

Mechanismen der Agonist-abhängigen Phosphorylierung des humanen Somatostatin-Rezeptors sst3

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 Diplom-Biologe Andreas Lehmann

geboren am 05.11.1984 in Görlitz

März 2015

Gutachter:

1. Prof. Dr. Stefan Schulz

Institut für Pharmakologie und Toxikologie, Friedrich-Schiller Universität, Jena

2. Prof. Dr. Frank-Dietmar Böhmer

Institut für Molekulare Zellbiologie, Friedrich-Schiller Universität, Jena

3. Prof. Dr. Günter Stalla

Max-Planck-Institut für Psychiatrie, München

Tag der öffentlichen Disputation: 22.07.2015

Zusammenfassung

Der humane sst3-Rezeptor gehört zur Familie der GPCRs und stellt unter anderem ein wichtiges Element bei Behandlung von speziellen neuroendokrinen Tumoren dar.

Im Rahmen der vorliegenden Doktorarbeit sollte ein Beitrag dazu geleistet werden, die detaillierten Abläufe der Aktivierung und Regulation des Somatostatin-Rezeptors 3 (sst3) in Zusammenhang zu bringen. Um die zugrunde liegenden molekularen Mechanismen aufzuklären, wurden Rezeptormutanten in humanen embryonalen Nierenzellen stabil transfiziert und spezifischen Phosphorylierungsstellen-Antikörpern generiert.

Es konnte gezeigt werden, dass Somatostatin als Vollagonist am sst3 eine starke Rezeptorphosphorylierung an den Stellen Ser 337/ Thr 341 und Thr 348 induziert. Das wiederum führte zu einer stabilen Rekrutierung des β -Arrestin-2 und zu einer Internalisierung des Rezeptor-Komplexes. Die Partialagonisten Octreotid und Pasireotid hingegen induzierten eine schwächere Rezeptorphosphorylierung an den betreffenden Serin- und Threonin-Stellen, so dass keine Translokation des cytoplasmatisch lokalisierten β -Arrestin-2 an die Membran stattfand. Trotzdem konnte eine Internalisierung des sst3 beobachtet werden, auch wenn diese im Vergleich zum Somatostatin wesentlich schwächer ausfiel. Der nicht-peptidische sst3-spezifische Ligand L-796/778 löste indessen keine Phosphorylierung an Ser 337/Thr 341 und am Thr 348 aus. Die induzierte Konformationsänderung des Rezeptors führte jedoch zu einer phosphorylierungs- und β -Arrestin-2-unabhängigen schwachen Internalisierung.

Mit Hilfe von C-terminalen Rezeptormutanten, bei denen potentielle Phosphorylierungsstellen gegen Alanin ausgetauscht wurden, konnte gezeigt werden, dass vor allem die Serine 337, 361 und die Threonine 341 und 348 essentiell für die β -Arrestin-2-Rekrutierung und die Internalisierung des Rezeptors sind.

Die für Phosphorylierung und Dephosphorylierung verantwortlichen Enzyme wurden unter Verwendung spezifischer siRNA identifiziert. Für die homologe Phosphorylierung des sst3 sind die G-Protein-gekoppelten Rezeptor-Kinasen GRK2 und GRK3

verantwortlich. Die Dephosphorylierung des Rezeptors wird von den Protein-Phosphatasen PP1 α und PP1 β katalysiert. Eine heterologe Aktivierung des sst3 durch die Proteinkinasen A und C kann ausgeschlossen werden.

Nach der Clathrin-abhängigen Internalisierung wird der sst3 entweder endosomal recycelt oder proteasomal/ lysosomal abgebaut. Die intrazellulären Lysin-Reste des Rezeptors und ihr Ubiquitinylierungs-Zustand entscheiden dabei über den nachfolgenden Ablauf. Eine Mutation dieser sieben Lysin-Reste und damit das Fehlen von Ubiquitin-Resten bewirkt, dass der Rezeptor recycelt und nicht proteasomal abgebaut wird.

Eine Besonderheit des sst3 ist die Downregulation bei langfristiger Somatostatin-Inkubation. Es konnte gezeigt werden, dass andere Agonisten entweder keine oder nur eine sehr schwache Downregulation induzierten und dass dieser Prozess nur möglich ist, wenn der Rezeptor phosphoryliert und β -Arrestin-2-abhängig internalisiert wurde. Auch die ubiquitinylierbaren Lysinreste haben einen Einfluss auf die Downregulation. Eine Mutation dieser Aminosäuren verzögerte den Prozess. Der Einsatz von proteasomalen und lysosomalen Inhibitoren hemmte die Degradation des sst3 ebenfalls.

Insgesamt konnten in der vorliegenden Arbeit wichtige regulatorische Mechanismen am humanen Somatostatin-Rezeptor 3 aufgeklärt werden. Die Arbeit zeigt, welche Bedeutung einzelne Phosphorylierungs- und Lysin-Stellen für die agonist-abhängigen Prozesse einnehmen und welche Proteine an der Regulation des sst3 beteiligt sind.

Summary

The human sst3 receptor belongs to the family of GPCRs. It is an important pharmacological target for the treatment of neuroendocrine tumours.

In this work processes of the activation and regulation of the somatostatin receptor 3 (sst3) were investigated. To explain the molecular mechanisms behind receptor mutants were transfected stably in human embryonic kidney cells and phosphosite-specific antibodies were generated.

We could show, that somatostatin acts as full agonist and induces a strong phosphorylation on ser 337/ thr 341 and thr 348. This leads to a stable recruitment of β -arrestin-2 and to the internalization of the receptor complex. The partial agonists octreotide and pasireotide induce a weaker receptor phosphorylation on the mentioned serine and threonine sites. Though a translocation of the β -arrestin-2 to the membrane was not observed. Nevertheless an internalization of the sst3 was visible but weaker in comparison to somatostatin. The non-peptide sst3 specific ligand L-796/778 induced no phosphorylation on the ser 337/ thr 341 and thr 348. However the changes in receptor conformation lead to a phosphorylation and β -arrestin-2 independent weak internalization.

Using c-terminal receptor mutants where potential phosphorylation sites were exchanged with alanine we could show that serines 337, 361 and threonines 341 and 348 are essential for the β -arrestin-2 recruitment and internalization of the receptor.

The enzymes which are responsible for the phosphorylation and dephosphorylation of sst3-residues were identified by the use of specific siRNAs. The G protein-coupled receptor kinases 2 and 3 (GRK2/3) are responsible for the homologue phosphorylation. The protein phosphatase 1 α and β (PP1 α / β) catalyses the receptor dephosphorylation. Protein kinase C and A are not able to induce a phosphorylation.

After the clathrin-dependent internalization the sst3 is either recycled in endosomes or degraded proteasomally/ lysosomally. The intracellular lysine sites of the receptor and their state of ubiquitination decide about subsequent procedure. The mutation of

seven lysine sites and though the absence of ubiquitination affects the recycling of the receptor and prevents it from proteasomal degradation.

A characteristic of the sst3 is the down regulation after a long-term stimulation with somatostatin. We have shown that other agonists induce no or a weaker down regulation. This process is only possible if the receptor is phosphorylated and internalized via β -arrestin-2. The ubiquitinated lysine sites have also an influence on this down regulation. Mutations of these amino acids delay the process. As well the application of proteasomal and lysosomal inhibitors block the degradation of the sst3.

Altogether in this work important regular mechanism of the human somatostatin receptor 3 were clarified. The work shows the importance of particular phosphorylation and lysine sites for agonist dependent processes and determines some proteins participating in the regulation of the sst3.

Inhaltsverzeichnis	Seite
1. Einleitung	1
1.1 Die Familie der G-Protein-gekoppelten Rezeptoren und ihre Regulation	1
1.2 Die Familie der G-Proteine	4
1.3 Regulatoren der GPCR: G-Protein-gekoppelten Rezeptor-Kinasen und Protein-Serin/ Threonin-Phosphatasen	5
1.4 Das Somatostatin und seine Rezeptoren	7
1.5 Der Somatostatin-Rezeptor 3	13
1.6 Frage- und Zielstellungen	19
2. Material und Methoden	20
2.1 Molekularbiologische Methoden	20
2.1.1 Hitzeschock-Transformation von kompetenten Bakterien	20
2.1.2 Plasmid-DNA-Amplifikation und -Präparation	20
2.1.3 Gensynthese von cDNA-Konstrukten	20
2.2 Biochemische Methoden	21
2.2.1 SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese	21
2.2.2 Western-Blot und Immundetektion	21
2.3 Zellkultur	22
2.3.1 Zelllinien	22
2.3.2 Kultivierung von HEK-Zellen	22
2.3.3 Stabile Transfektion	22
2.3.4 Rezeptoranreicherung mittels Weizenkeim-Lektin	23
2.3.5 ELISA-Internalisierungs-Assay	24
2.3.6 Immunzytochemie	24
2.3.7 „Live Cell Imaging“ von β -Arrestin-EGFP	25
2.3.8 Experimente mit siRNA	25
2.3.9 Okadasäure/ Calyculin A	26
2.3.10 Immunpräzipitation	26
2.3.11 „Transferrin Pulse Chase“-Experiment	27
2.3.12 Datenauswertung	28
3. Ergebnisse	33
3.1 Eingeführte Mutationen am Somatostatin-Rezeptor 3	33

3.2 Generierung von Phosphorylierungsstellen-spezifischen Antikörper	34
3.3 Konzentrationsabhängige Phosphorylierung durch Somatostatin	35
3.4 Agonist-abhängige Phosphorylierungen am sst3	36
3.5 Kinetiken der Agonist-induzierten Phosphorylierung am sst3	38
3.6 Homologe und heterologe Aktivierung des sst3	40
3.7 Dephosphorylierungskinetik am sst3	42
3.8 Identifizierung der Dephosphorylierung-regulierenden Phosphatasen	43
3.9 Agonist-abhängige Rekrutierung des β -Arrestin-1 und -2	46
3.10 Internalisierung des Somatostatin-Rezeptors 3 nach Behandlung mit verschiedenen Agonisten	49
3.11 Einfluss der Mutationen auf das Recyclingverhalten des sst3	52
3.12 Beeinflussende Faktoren auf die Downregulation	54
3.13 Ubiquitynylierungen der verschiedenen Somatostatin-Rezeptoren	58
3.14 Clathrin-abhängige Internalisierung und Recycling-Verhalten von Somatostatin-Rezeptoren	59
4. Diskussion	62
5. Literaturverzeichnis	72
6. Anhang	81

1. Einleitung

1.1 Die Familie der G-Protein-gekoppelten Rezeptoren und ihre Regulation

Im Jahr 1971 wurde von Martin Rodbell erstmals eine Beziehung zwischen einem GPCR und seinem Effektorsystem aufgedeckt (Pierce et al. 2002). Er zeigte, dass ein Guanin-Nukleotid-regulatorisches Protein mit einem in der Plasmamembran integrierten Komplex interagiert. In diesem Fall ging es um die Aktivierung der Adenylatcyclase nach einer Glukagon-Stimulierung von Leberzellen einer Ratte (Rodbell et al. 1971). 41 Jahre später erhielten Robert J. Lefkowitz und Brian K. Kobilka den Nobelpreis für Chemie für ihre wissenschaftlichen Arbeiten an den GPCRs. Innerhalb dieses Zeitraums wurde viel über GPCRs geforscht. Dazu zählt vor allem die Identifizierung der Rezeptoren samt ihrer Liganden, ihrer Entschlüsselung, ihrer Regulation und Funktion in Geweben und die Aufklärung der molekularen Proteine, die mit diesen Rezeptoren assoziiert sind. Die G-Protein-gekoppelten Rezeptoren zählen neben den Ionenkanälen und den Rezeptoren mit Tyrosin-Kinase-Aktivität zu den Transmembran- bzw. Zelloberflächenrezeptoren.

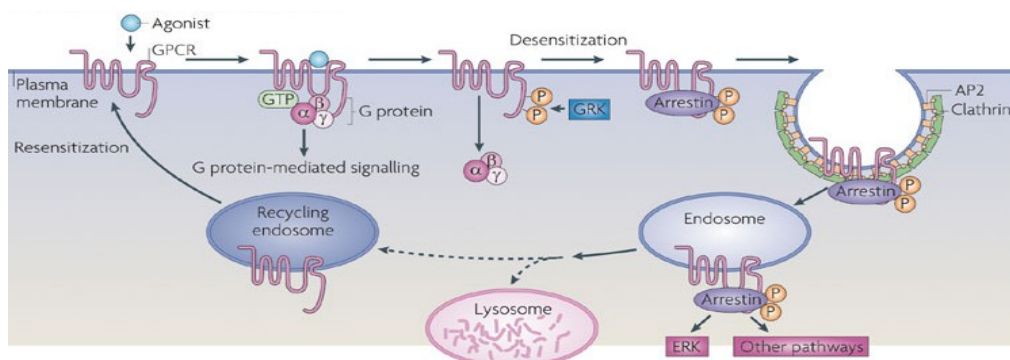
Innerhalb dieser Rezeptorgruppen zählt die Gruppe der GPCRs mit bisher über 800 identifizierten Rezeptoren zum größten Vertreter (Pierce et al. 2002). Sie lassen sich wiederum in fünf Familien klassifizieren. Mit 672 Mitgliedern stellt die Rhodopsin-Familie die größte Gruppe dar. Die Vertreter dieser Familie werden laut der „International Union of Pharmacology Committee on Receptor Nomenclature and Drug Classification“ von 273 Genen codiert, von denen 89 zu den sogenannten Orphan-Rezeptoren gehören. Die anderen vier Mitglieder sind die Secretin- (15 Mitglieder), Adhesions- (33), Glutamat- (22) und die Frizzled/Taste-Familie (36) (Zalewska et al. 2014; Millar et al. 2010). Aufgrund dieser großen Anzahl an Rezeptoren ist es verständlich, dass die GPCRs eine enorme Bedeutung in der Pharmakotherapie einnehmen. Fast ein Drittel aller Medikamente, die auf dem heutigen pharmazeutischen Markt erhältlich sind, besitzen einen GPCR als Zielstruktur. Sie sind zudem für zahlreiche physiologische Prozesse wie Sehen, intrazelluläre Kommunikation, neuronale Transmission und Hormonsignalling verantwortlich (Miller et al. 2010). Mehr als 600 erkannte Mutationen können eine deaktivierende und über 100 Mutationen eine aktivierende Funktion in den jeweiligen GPCRs auslösen. Insgesamt sind zurzeit 30 verschiedene Krankheiten aufgrund dieser Mutationen be-

kannt (Zalewska et al. 2014). So führen beispielsweise Veränderungen in den GPCR-Funktionen zu Erkrankungen wie Retina Pigmentosa (Rhodopsin-Mutation), Diabetes (Vasopressin-Rezeptor- Mutation) oder Adipositas (Melanocortin-Rezeptor-Mutation) (Pierce et al. 2002).

Alle GPCR vermitteln die Mehrheit ihre Signaltransduktionswege über die Membran. Sie bestehen aus sieben Transmembrandomänen, die über je drei extrazelluläre und intrazelluläre Schleifen miteinander verbunden sind. Die extrazelluläre Domäne dient als Ligandenbindungsstelle und weist mehrere Glykosylierungen und Disulfidbrücken auf. Als Liganden kommen Aminosäuren, Ionen, Odorantien, Photonen, Fettsäuren, Neurotransmitter und (Poly-)Peptide, Enzyme sowie Adhäsionsmoleküle in Frage (Miller et al. 2010). Die Transmembrandomäne leitet das Signal auf die cytosolische Seite weiter und besteht aus sieben Helices, die als Bündel organisiert sind. Die intrazelluläre Domäne, die durch die Agonisten induzierte Konformationsänderung aktiviert wird, reguliert downstream-Effektoren und löst Signalkaskaden aus. Welche Signalmoleküle aktiviert oder inhibiert werden, hängt zum großen Teil von der Art des gebundenen G-Proteins ab. Die Interaktion zwischen den heterotrimeren G-Proteinen und dem Rezeptor findet zwischen der zweiten und dritten intrazellulären Schleife statt. Durch die vom Agonisten ausgelöste Konformationsänderung und Aktivierung des GPCRs kommt es an der α -Untereinheit des G-Proteins zum Austausch des Guanosindiphosphats (GDP) durch ein Guanosin-5-triphosphat (GTP). Dies hat zur Folge, dass das nun instabile G-Protein in seine α -Untereinheit und den $\beta\gamma$ -Komplex dissoziiert. Daraufhin werden bestimmte Signalmoleküle und Effektoren wie die Adenylatcyclase, die Phospholipase C (PLC) oder die Kalium-Kanäle aktiviert oder inhibiert (Oldham et al. 2008; Neves et al. 2002).

Die Agonist-abhängige Regulation beinhaltet die schnelle Phosphorylierung der Serin- und Threoninreste im C-Terminus durch die sogenannten G-Protein-gekoppelten-Rezeptor-Kinasen (GRKs). Diese Phosphorylierungen erleichtern die Bindung von β -Arrestin, welche sterisch eine weitere Interaktion des Rezeptors mit dem G-Protein verhindert und somit dazu führt, dass erstens das Rezeptorsignal abgeschwächt/ beendet wird (Krupnick et al. 1998). Diese Desensibilisierung schützt die Zelle vor einer konstanten Zuführung des Signals und somit vor unkontrollierter Rezeptorstimulation. Zweitens kommt es zur Internalisierung des Rezeptor-Liganden-Komplexes über Clathrin-beschichtete Vesikel. Zusätzlich ist das β -Arrestin in der Lage, selber einen zweiten Signalweg wie z.B. den MAPK-Signalweg zu induzieren

(De Wire et al. 2007; Luttrell et al. 2001). Es ist aber auch möglich, dass Rezeptoren von den second-messenger abhängigen Proteinkinasen PKC und PKA phosphoryliert werden (Marchese et al. 2008). In diesem, nur wenige GPCRs betreffenden Fall spricht man von einer heterologen Phosphorylierung oder nicht agonist-spezifischen Desensibilisierung (Lefkowitz et al. 1998). Die Proteinkinase A wird durch cAMP aktiviert, die Proteinkinase C durch Calciumerhöhung und Diacylglycerol. Aber nicht alle GPCRs beenden ihr Signalling nach der Interaktion mit β -Arrestin bzw. mit der Einleitung der Internalisierung. Der Parathyroid-Hormon-Rezeptor (PTHr) und auch der Vasopressin-Typ-2 Rezeptor können auch auf dem Weg zu den Endosomen eine Signalweiterleitung bewirken. Erst wenn der endosomale pH-Wert sinkt, kommt es zur Dissoziation des Liganden-Rezeptor-Arrestin-Komplexes, zu einer Assoziation mit dem Retromer-Komplex in der Endosomen-Membran und damit zur Beendigung der cAMP-Produktion (Gidon et al. 2014). Im Regelfall können die GPCRs nach der Endocytose unterschiedlichen Wegen folgen. Manche Rezeptoren werden im saurem pH von Lysosomen abgebaut, andere Rezeptoren werden in endocytotischen Kompartimenten desphosphoryliert und an die Membran zurücktransportiert, wo sie erneut durch Agonisten stimuliert werden können (Hanyaloglu et al. 2008). Bei der Degradation des Rezeptors soll unter anderem seine Ubiquitinylierung eine wesentliche Rolle spielen (Marchese et al. 2008, 2003 a,b). Sowohl die Zeit, die von der Aktivierung und Internalisierung des Rezeptors bis hin zum erneuten Einbau in die Zelloberfläche vergeht, als auch der Rezeptoranteil, der lysosomal oder proteosomal abgebaut wird, ist vom jeweiligen Rezeptortyp abhängig.



Nature Reviews | Molecular Cell Biology

Abbildung 1: GPCR-Aktivierung und Signalling. Nach Bindung eines Agonisten kommt es zur Aktivierung des heterotrimeren G-Proteins und zu einer GRK-vermittelten Phosphorylierung. Die daraus resultierende Bindung des β -Arrestins induziert die Clathrin-abhängige Internalisierung. Der Rezeptorkomplex wird dann entweder endosomal recycelt oder lysosomal abgebaut. Das β -Arrestin ist zusätzlich in der Lage, Signalmoleküle wie das ERK zu aktivieren (aus Ritter et al. 2009).

1.2 Die Familie der G-Proteine

Die heterotrimeren Guanin-Nukleotid-Bindungsproteine sind durch die Regulierung metabolischer Enzyme, Transkriptionsfaktoren und Ionenkanäle in eine Vielzahl physiologischer Prozesse involviert (Neves et al. 2002).

Die zur Familie der GTPasen gehörenden Proteine bestehen aus der GDP-beladenen α -Untereinheit (39-52 kDa) und der β - (35-36 kDa) und γ -Untereinheit (7-10 kDa), die zwar beide separat voneinander synthetisiert werden, aber einen sehr stabilen Komplex bilden. Im menschlichen Genom befinden sich 21 G_{α} -Untereinheiten, die von 16 Genen codiert werden, 6 G_{β} -Untereinheiten (codiert von 5 Genen) und 12 G_{γ} -Untereinheiten (codiert von 12 Genen) (Downes et al. 1999).

Basierend auf ihren Eigenschaften und ihrer Sequenzähnlichkeit werden vier Typen von G-Proteinen unterschieden (Oldham et al. 2008; Cabrera-Vera et al. 2003; Neves et al. 2002; Simon et al. 1991) (Abbildung 2).

1. $G_{\alpha s}$ aktivieren Adenylatcyclasen (AC) und Ca^{2+} -Kanäle
2. $G_{\alpha i}$ inhibieren AC und aktivieren K^+ -Kanäle, die Phosphoinositid-3-Kinase (PI3K) und die Phospholipase $C\beta$ (PLC β)
3. $G_{\alpha q/11}$ aktivieren die PLC β
4. $G_{\alpha 12/13}$ als monomere G-Proteine fungieren als Rho-GEF (Guanin-Nukleotid-exchange-factor).

Alle G-Proteine binden intrazellulär an die 7-Transmembran-Rezeptoren und werden durch eine vom Liganden induzierte Konformationsänderung des Rezeptors aktiviert. In diesem Fall fungiert der GPCR als GEF, was den Austausch des an der α -Untereinheit bindenden GDP mit dem GTP zur Folge hat. Daraufhin zerfällt das G-Protein in die α -Untereinheit und den $\beta\gamma$ -Komplex, der durch seine Acetyl- und Prenylgruppen in der Membran verankert ist und somit bestimmte Ionenkanäle, die Phospholipase $C\beta$ (PLC β), die Phosphoinositid-3-Kinase (PI3K) oder den MAPK-Signalweg aktivieren kann und die GRKs an den C-Terminus des Rezeptors rekrutiert (Khan et al. 2013; Wedegaertner et al. 1995).

Die Termination der Signale, also die Hydrolyse des GTP und damit die Inaktivierung der α -Untereinheit, kann über verschiedene Prozesse ablaufen. Entweder

katalysieren die RGSs (regulator of G Protein signaling) diese Reaktion oder es geschieht durch die intrinsische GTPase-Aktivität der α -Untereinheit selber.

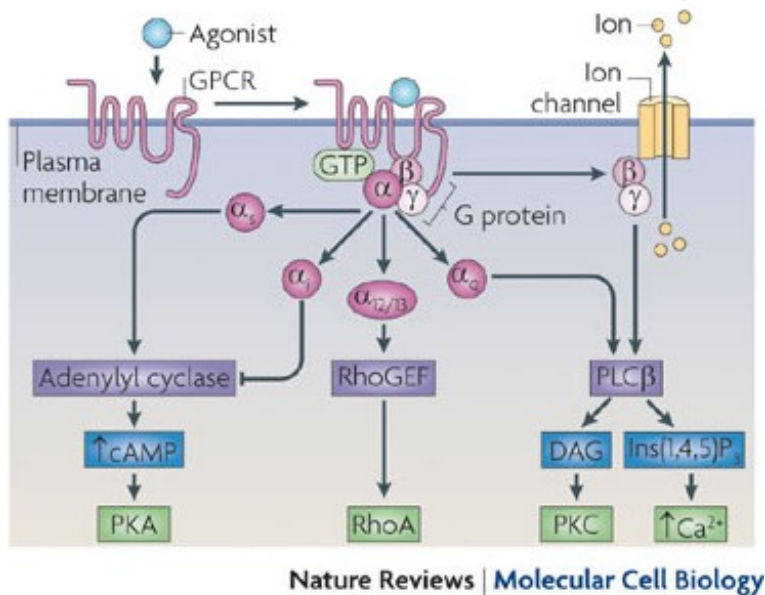


Abbildung 2: Aktivierung und Signalling von G-Proteinen. Die Aktivierung von Enzymen oder anderen second messenger ist von der Art des gebundenen G-Proteins abhängig (aus Ritter et al. 2009).

1.3 Regulatoren der GPCR: G-Protein-gekoppelten Rezeptor-Kinasen und Protein-Serin/ Threonin-Phosphatasen

Das menschliche Genom soll laut Sequenzierung für etwa 518 putative Protein-Kinasen codieren, welche in zwei Hauptfamilien unterteilt werden: Tyrosin-Kinasen (PTKs) mit 90 Mitgliedern und Serin/ Threonin-Kinasen (PSKs) mit 428 Vertretern (Johnson et al. 2005; Lander et al. 2001; Venter et al. 2001). Die Familie der G-Protein-gekoppelten Rezeptor-Kinasen (~60-80 kDa) gehört zur Familie der PSKs und besteht selber aus sieben Kinasen, welche aufgrund von Sequenzhomolgien und der Genstruktur in 3 Subfamilien unterteilt werden können: in die GRK1-Subfamilie/ Rhodopsinkinase (GRK1 und 7), die GRK2-Subfamilie/ β -adrenerge Rezeptorkinasen (GRK 2 und 3) und die GRK3-Subfamilie/ GRK4-Kinasen (GRK 4, 5,6) (Zalewska et al. 2014; Lodowski et al. 2006).

Die GRK1 und 7 werden hauptsächlich in den retinalen Stäbchen und Zapfen exprimiert. Die anderen GRKs kommen ubiquitär vor, wobei die GRK4 vorwiegend in den Hoden, aber auch im Kleinhirn und den Nieren nachgewiesen wurde (Sallese et

al.1997) und die GRK6 eine größere Bedeutung in den Zellen des Immunsystems einnimmt. Strukturell zeichnen sich alle GRKs durch eine stark konservierte katalytische Domäne aus, in denen ein zentrales Lysin das ATP gebunden hat. Die variable N-terminale Domäne ist sowohl für die Verankerung in der Zellmembran als auch für die Erkennung des aktivierten GPCRs verantwortlich (Pitcher et al. 1996; Koch et al. 1993).

Rekrutiert werden die GRKs vom $\beta\gamma$ -Komplex. Mit Ausnahme der GRK2 und 3 sind alle anderen GRKs über ihre Farnesyl- oder Palmitylreste in der Plasmamembran verankert. Die cytosolischen GRK2 und 3 interagieren über ihre PH-Domäne (pleckstrin homology) mit der Plasmamembran (Levy et al. 1998). Daraufhin werden die Serin- und Threonin-Reste im C-Terminus der aktivierten GPCRs phosphoryliert. Diese Modifikationen dienen dann der Bindung von β -Arrestin. Somit nehmen diese Kinasen eine Schlüsselrolle in der Desensibilisierung von aktivierten GPCRs ein.

2004 wurde von Alonso et al. publiziert, dass 107 putative Protein-Tyrosin-Phosphatasen (PTPs) und eine etwas größere Anzahl an Protein-Serin/ Threonin-Phosphatasen (PSTPs) im menschlichen Genom existieren. Proteomische Analysen von 6600 Phosphorylierungsstellen an 2244 humanen Proteinen ergaben folgendes Verteilungsmuster: 86,4% Phosphoserine, 11,8% Phosphothreonine und 1,8% Phosphotyrosine (Olsen et al. 2006).

Für die PSTPs sind drei Genfamilien beschrieben worden: PPM (metal-dependent protein phosphatase), FCP/SCD (TFIIF-associating component of RNA polymerase II CTD phosphatase/ small CTD phosphatase), PPP (phospho protein phosphatase) (McConnell et al 2009; Shi 2009).

Die PPP-Familie besteht aus den PP1-, PP2A-, PP2B- (Calcineurin), PP4-, PP5-, PP6- und PP7-Subfamilien, welche eine hohe Aminosäuresequenzhomologie innerhalb ihrer katalytischen Domäne besitzen und auch ähnliche katalytische Mechanismen teilen (Swingle et al. 2004; Honkanen et al. 2002; Barford et al. 1998). Die PP1 und die PP2 sind die häufigsten Serin/ Threonin-Phosphatasen und regulieren zelluläre Prozesse wie Meiose, Zellteilung, Apoptose, Proteinsynthese, Metabolismus, Reorganisation des Cytoskeletts und Regulation von membranständigen Rezeptoren und Ionenkanälen (Ceulemans et al. 2004; Cohen 2002). In den Zellen fungieren diese Phosphatasen als multimere Enzyme, die aus der kleinen Anzahl von katalytischen Untereinheiten und hunderten von regulatorischen Untereinheiten zu-

sammengesetzt werden können (Cohen et al. 2009). Dabei interagiert die Zielproteinsequenz sowohl mit den katalytischen als auch den regulatorischen Untereinheiten. Viele der regulatorischen Untereinheiten tragen ein PP1-Motiv (RVxF), aber es gibt auch zusätzliche PP1-Bindungsdomänen, die es einer einzelnen katalytischen Untereinheit einer PP1 erlaubt, mit mehr als einem Regulator zu interagieren (Lesage et al. 2007; Eto et al. 2002; Egloff et al. 1997). Diese Regulatoren besitzen jedoch keine nennenswerte Sequenzkonservierung. Stattdessen werden sie nach ihrer physikalischen Assoziation und Funktion identifiziert. Sie liefern die essentiellen Informationen für die subzelluläre Lokalisation, die Substratspezifität und das Feintuning der Phosphatasenaktivität (Virshup et al. 2009). Die katalytische Untereinheit führt am Zielprotein die direkte enzymatische Funktion aus (Ceulemans et al. 2004). Ebenso können die katalytischen Untereinheiten von reversiblen Phosphorylierungen reguliert werden. Zum Beispiel kann die Phosphorylierung des Tyrosin 320, welches im C- Terminus aller PP1-Isoformen konserviert ist, in einer Inhibierung der Enzymaktivität resultieren (Li et al. 2007).

Geblockt wird die Phosphatase-Aktivität durch den Einsatz bestimmter Inhibitoren wie Calyculin A und Okadasäure. Beide Substanzen inhibieren die Dephosphorylierung vieler GPCRs wie des Beta-adrenergen Rezeptors, des D1-Dopamin-Rezeptors, des Parathyroid-Hormon-Rezeptors, des Thromboxan-A-Rezeptors, des Vasopressin-Rezeptors, des μ -Opioid-Rezeptors oder der Somatostatin-Rezeptoren 2 und 5 (Petrich et al. 2013; Doll et al. 2012; Pöll et al. 2011; Tran et al. 2007; Chauvin et al. 2002; Gardner et al. 2001; Spurney 2001; Innamorati et al. 1998). Diese effektive Inhibierung betrifft die Phosphatasen PP5, PP4 und PP2. Calyculin A hemmt zusätzlich die katalytische Aktivität der PP1 (Cohan et al. 2005; Honkanen et al. 2002).

1.4 Das Somatostatin und seine Rezeptoren

Das Somatostatin wurde 1973 von Guillemin und Gerich als Inhibitor der Freisetzung von Wachstumshormonen entdeckt und liegt in zwei aktiven, cyclischen Formen von je 14 bzw. 28 Aminosäuren vor (Burgus et al. 1973) (Abbildung 3). Beide Peptide werden durch proteolytische Prozessierung aus den Precursor Molekülen Prä-Somatostatin und Pro-Somatostatin generiert (Sevarino et al. 1987). Nach der Spaltung des Pro-Somatostatin-Moleküls entstehen dann die physiologisch,

regulatorischen Somatostatin-Formen, die primär von neuroendokrinen Neuronen des Hypothalamus produziert werden, aber auch in geringen Mengen von neuroendokrinen Organen (Schilddrüse, Pankreas, Magen-Darm-Trakt), Entzündungszellen und Zellen des Immunsystems sekretiert werden (Patel 1999).

Als parakrin-autokriner Regulator steuert es diverse Aktionen im zentralen Nervensystem, indem es die Freisetzung von Hormonen wie Somatotropin, Thyreotropin und Adrenocorticotropin aus dem Hypophysenvorderlappen inhibiert. Zudem übernimmt es eine Vielzahl von physiologischen Funktionen im Gastrointestinaltrakt (Inhibierung der Sekretion von Gastrin), im Pankreas (Regulierung der Glucagon- und Insulinfreisetzung), in den Nebennieren (Hemmung der Sekretion von Aldosteron und den Katecholaminen Dopamin, Noradrenalin und Adrenalin), in der Niere (Inhibierung der Reninfreisetzung und ADH-vermittelten Wasserabsorption) und im Immunsystem (Inhibierung der Cytokin-Freisetzung) (Patel 1999; Olias et al. 2004; Weckbecker et al. 2003; Aguila et al. 1996; Raully et al. 1996; van Hagen et al. 1994).

Somatostatin bindet mit sehr hoher Affinität an alle fünf humanen Somatostatin-Rezeptoren (sst), wodurch es die Inhibierung der Adenylatcyclase und die Aktivierung von Calcium-Kanälen, die Phospho-Tyrosin-Phosphatase oder den MAPK-Signalweg in Gang setzt (Patel 1999, 1997; Reisine et al. 1995).

Außerdem übt es in Tumorzellen einen direkten antiproliferativen Effekt aus. Die Produktion von Wachstumsfaktoren (IGF1, EGF, PDGF), Cytokinen (IL6, IFN-g) und das Auslösen von mitogenen Signalen wird gehemmt (Elliot et al. 1998; Blum et al. 1992). Dies geschieht entweder durch Erzeugung eines Wachstumsarrests und/ oder durch die Induktion von Apoptose. Dabei kann die Wachstumsreduktion über die Stimulierung der Protein-Tyrosin-Phosphatase (sst2, sst3) oder durch die Inhibierung von Calcium-Kanälen (sst5) erfolgen (Liu et al. 2000; Sharma et al. 1996; Candi et al. 1995; Buscail et al. 1995; Pagliacci et al 1991). Auf Grund der kurzen Halbwertszeit von etwa 1-3 min ist der klinische Gebrauch des Somatostatin allerdings stark limitiert. Deshalb wurden in der Vergangenheit stabile Analoga wie Octreotid und Lanreotid synthetisiert (Donangelo et al 2005). Neben diesen beiden peptidischen Substanzen gibt es noch Pasireotid (SOM230), Somatoprim, KE108 oder die nicht-peptidischen Agonisten wie beispielsweise L-779/976 (sst2), L-796/778 (sst3) oder L-817/818 (sst5).

Für den klinischen Gebrauch sind Octreotid und Pasireotid diejenigen Substanzen, die momentan am meisten Verwendung finden.

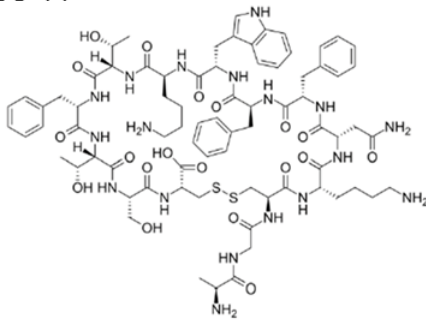
Octreotid ist ein acht Aminosäuren umfassendes zyklisches Peptid (Abbildung 3) und besitzt im Serum eine Halbwertszeit von ca. 90 min. Es supprimiert die Wachstumshormonfreisetzung über acht Stunden hinweg, sodass es zu einer Reduktion des Wachstumshormonspiegels und auch des IGF-1 kommt. Eingesetzt wird es vorzugsweise bei der medikamentösen Behandlung bestimmter neuroendokriner Tumore wie dem GH-produzierenden Hypophysenadenom. Dabei kommt es bei 50% und mehr der Fälle zu einer signifikanten Inhibierung der GH-Produktion (Freda et al. 2002, 2005; Jallad et al. 2005). Allerdings lässt diese Wirkung bei einer chronischen (über ein Jahr) Gabe von Octreotid wieder nach und die Ausbildung einer Therapieresistenz ist nicht ausgeschlossen (Lesche et al. 2009; Vezzosi et al. 2008; Asnacios et al. 2008; Oberg 2005; Lamberts et al. 2002; Petersenn et al. 2000; Saslow et al. 1997). Weiterhin findet Octreotid Anwendung bei der Behandlung der Akromegalie (Casarini et al. 2009; Oberg 2005; Donangelo et al. 2005).

Substratspezifisch bindet Octreotid eher moderat an die sst3 und sst5, zeigt aber eine sehr hohe Affinität zum sst2, was man sich in der Radiodiagnostik beim Imaging von neuroendokrinen Tumoren zu Nutze macht (Pöll et al. 2010; Lesche et al. 2009; Arnold et al. 1996; Patel et al. 1994). Nach Injektion des stabilen, radioaktiv markierten Analogons kommt es in den Zielgeweben durch die schnelle Internalisierung und hohe Internalisierungsrate des sst2 zu einer Akkumulation des Radiopharmakons (Octreotid abgeleitetes Indium-markiertes DTPA-Derivat (Octreoscan)). Beim Zerfall des Radionuklids wird Gammastrahlung abgegeben, welche mit entsprechenden Gammakameras detektiert werden kann (De Herder et al. 2003; Koenig et al. 1997; Breeman et al. 1998).

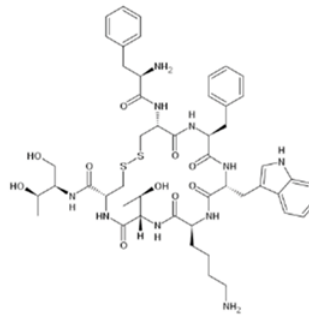
Pasireotid wurde als Nachfolgesubstanz von Octreotid entwickelt. Der Haupteffekt dieses cyclischen Hexapeptids (Abbildung 3) ist es, das Wachstum und die Hormonsekretion von neuroendokrinen Zellen der Hypophyse und des Pankreas über die Somatostatinrezeptoren zu inhibieren. Mit einer Halbwertszeit von 12-24 h ist es wesentlich stabiler als Octreotid (Lancranjan et al. 1996). Als sogenannter Multi-Rezeptor-Ligand bindet es mit hoher Affinität an alle Somatostatin-Rezeptoren (vor allem an den sst5) – mit Ausnahme des sst4 (Lewis et al. 2003; Bruns et al. 2002). Das Pasireotid ist für die Behandlung des Morbus Cushing zugelassen. Für die

Therapien von Akromegalie und von Karzinoid- und Octreotid-resistenten Tumoren wird Pasireotid in klinischen Studien getestet und teilweise ist auch eine Zulassung beantragt (Boscaro et al. 2009).

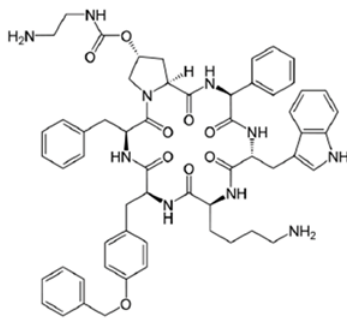
SS-14



Octreotid



Pasireotid



L-796/778

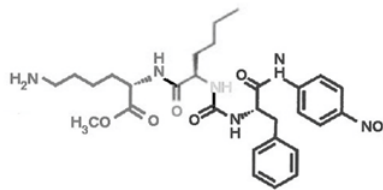


Abbildung 3: Somatostatin und Analoga. Somatostatin ist der natürliche Ligand für alle Somato-statin-Rezeptoren. Octreotid und Pasireotid sind Analoga des SS-14, die ein spezifisches Bindungsprofil und eine längere Halbwertszeit als das SS-14 aufweisen. Die nicht-peptidische Substanz L-796/778 ist ein spezifischer Agonist am sst3 (IUPHAR Database).

Die fünf humanen Somatostatin-Rezeptoren (sst1-sst5) wurden zwischen 1992 und 1994 charakterisiert (Hoyer et al. 1995). Codiert werden die Rezeptoren von fünf Genen, die auf separaten Chromosomen lokalisiert sind (Bruno et al. 1992; Kluxen et al. 1992; Yamada et al. 1992 b; Yasuda et al. 1992).

Die Somatostatin-Rezeptoren werden sowohl in neuronalen als auch in nicht-neuronalen Geweben und Tumoren exprimiert. Dabei zeichnet sich jeder Subtyp durch ein bestimmtes, spezieabhängiges Expressionsmuster aus, wobei die verschiedenen sst-Rezeptoren auch in denselben Zellen vorkommen können (Patel 1997; Fischer et al. 2008; Jacobs et al. 2008). Ihre Überexpression in den neuroendokrinen Tumoren dient sogleich als molekulare Basis für die diagnostische und therapeutische Applikation von stabilen Somatostatin Analoga wie Octreotid oder Lanreotid. Dabei ist zu erwähnen, dass der sst2 in den neuroendokrinen Tumoren

am häufigsten verbreitet ist (Yachu et al. 2011; Fischer et al. 2008; Guillermet-Guibert et al. 2005).

Hinsichtlich ihres regulatorischen Verhaltens gibt es diverse Unterschiede innerhalb der sst-Rezeptor-Familie. So verhält sich der sst2 wie ein typischer Klasse-B-GPCR. Das bedeutet, dass die nach der Rezeptoraktivierung eingeleiteten Phosphorylierungen eine starke Interaktion mit β -Arrestin 1 und 2 ermöglichen. Nach der Clathrin-abhängigen Internalisierung werden die Rezeptoren allerdings schnell wieder resensibilisiert (Jacobs et al 2008; Liu et al. 2005; Lesche et al. 2009; Tulipano et al. 2004). Die sst3 und sst5 gehören zur Klasse-A-GPCR. Dabei wird der sst3 nach der Endocytose zu einem gewissen Teil Ubiquitin-abhängig degradiert und im Vergleich zum sst2 weit weniger recycelt (Schwartkop et al. 1999; Tulipano et al. 2004).

Auch bezüglich ihrer Internalisierung gibt es Unterschiede zwischen den einzelnen Subtypen. So internalisieren die sst2, sst3 und sst5 nach der Agonistenbindung schneller als die sst1 und sst4 (Olias et al. 2004; Csaba et al. 2001).

Auf molekularer Ebene führt die Aktivierung der Rezeptoren zu einer $G_{\alpha i}$ -Protein-abhängigen und β -Arrestin-abhängigen Regulation der extracellular-signal regulated kinase (ERK), wobei es vom jeweiligen Rezeptorsubtyp abhängt, ob eine Aktivierung oder Inhibierung dieser Kinase stattfindet. Der sst1, sst2 und der sst4 stimulieren die ERK-Phosphorylierung, während der sst5 eine inhibitorische Wirkung besitzt (Somvanshi et al. 2009; Grant et al. 2008; Lahlou et al. 2004). Beim sst3 hängt es zusätzlich vom Zellsystem ab, ob die ERK aktiviert wird oder nicht (Pfeiffer et al. 2001; Lahlou et al. 2004). Zudem kommt es zu einer Inhibierung der Adenylatcyclase (AC) und damit verbunden zu einem Abfall von cAMP. Daneben werden Subtyp-abhängig andere Modulatoren reguliert, wie z.B. Phospho-Tyrosin-Phosphatasen (sst1, 2, 3), Kalium-Kanäle (sst2, 3, 4, 5), spannungsabhängige Calcium-Kanäle (sst1, 2), Natrium/ Protonen Austausch (sst1), AMPA/Kainat-Glutamatrezeptoren (sst1, 2), die Phospholipase C (sst2, 5), die Phospholipase A2 (sst4) und das Tumorsuppressor-Protein p53 (sst3) (Patel 1997; 1999; Miyashita et al. 1995; Zhan et al. 1994).

Da dem humanen Somatostatin-Rezeptor 2 die größte Bedeutung bei der Behandlung von neuroendokrinen Tumoren zukommt, wurde dieser Rezeptor bereits im größeren Umfang untersucht. Besonders in den gastroenteropankreatischen

neuroendokrinen Tumoren zeigt sich eine sehr starke Expression des sst2 an der Membran (Fischer et al. 2008).

Innerhalb weniger Minuten nach der Stimulation mit einem Agonisten kommt es durch die GRK2 und 3 zur Phosphorylierung der C-terminalen Serin- und Threoninreste.

Besonders wichtig für die β -Arrestin-vermittelte Internalisierung und Desensibilisierung sind die Serine 341, 343 und vor allem die Threonine 353, 354, 356 und 359 (Lehmann et al. 2014 a, Kliewer et al. 2012, Nagel et al. 2011, Pöll et al. 2011). Eine Mutation aller sechs Reste hat zur Folge, dass der Rezeptor nicht mehr in der Lage ist, internalisiert zu werden. Allein schon die Mutation der beiden Serine 341 und 343 reduziert die Internalisierung wirksam (weniger als 40%). Im Vergleich dazu führt eine 30-minütige Stimulierung des sst2 mit Somatostatin zu einer Internalisierungsrate von fast 80%.

Ebenso haben diese Mutationen einen Einfluss auf die Desensibilisierung. Bei den Rezeptoren, bei denen alle 14 potentiellen Phosphorylierungsstellen durch Alanin ersetzt wurden, verlängert sich das Signalling im Vergleich zum sst2-Wildtyp-Rezeptor deutlich (Lehmann et al. 2014). Ein besonderes Merkmal des hsst2 ist, dass dieser auch heterolog über die PKC aktiviert werden kann (Liu et al. 2009).

Die Dephosphorylierung wird durch die PP1 β katalysiert, wobei dieser Prozess an den Threonin-Resten schneller erfolgt als an den betreffenden Serin-Stellen.

Der humane Somatostatin-Rezeptor 5, der eine bedeutende Rolle bei der Behandlung des Cushing Syndroms einnimmt, weist im Gegensatz zum sst2 und sst3 nur zwei C-terminale Phosphorylierungsstellen auf. Dabei handelt es sich um das Threonin 333, was agonist-spezifisch phosphoryliert wird, und das Threonin 347, welches konstitutiv phosphoryliert vorliegt. Die von der GRK2 katalysierte Phosphorylierung scheint dabei abhängig vom jeweiligen Agonisten zu sein. Eine ähnlich starke Phosphorylierung wie sie durch Somatostatin initiiert wird, war nur durch eine Behandlung mit BIM-23268 möglich. Andere Somatostatin-Analoga wie SOM230 oder der sst5-spezifische Ligand L-817/818 induzierten eine schwächere Phosphorylierung, wobei Octreotid oder KE108 keine sichtbare Phosphorylierung auslösten. Wie die Phosphorylierung geschieht auch die Dephosphorylierung dieses Rezeptors innerhalb weniger Minuten. Dabei wird dieser Prozess durch die PP1 γ vermittelt. Anders als beim sst2 führt die Stimulation des sst5 mit Somatostatin für 30 min nur

zu einer 30%igen Internalisierungsrate. Allerdings kann die Mutation der Stellen Ser 242 und Thr 247 oder des Threonin 333 zu einer fast kompletten Blockade der Endocytose führen (Petrich et al. 2013; Peverelli et al. 2008).

Interessanterweise konnte gezeigt werden, dass die zeitliche Regulierung der Phosphorylierung wie auch die Katalyse der Dephosphorylierung vom C-Terminus des entsprechenden Rezeptors abhängig ist. So führt der Austausch des sst2-C-Terminus gegen den sst5-C-Terminus am sst2 dazu, dass die Dephosphorylierung nicht mehr von der PP1 β , sondern von der PP1 γ durchgeführt wird. Auch verändern sich durch diesen Austausch die β -Arrestin-Rekrutierung und die Internalisierungsrate. Beide Prozesse gleichen sich dem Verhalten des sst5 an. In umgekehrter Weise zeigt ein sst5 mit einem sst2-C-Terminus ein ähnliches Verhalten wie der sst2 (Lehmann et al. 2014 b).

1.5 Der Somatostatin Rezeptor 3

Der Somatostatin Rezeptor 3 (sst3) wurde erstmals Anfang der 1990er Jahre (Yamada et al. 1992 a) charakterisiert.

Das Gen für den humanen sst3 ist auf dem Chromosom 22q13.1 lokalisiert und der Rezeptor ist mit einem molekularen Gewicht von 70-85 kDa in etwa genauso groß wie die anderen vier Somatostatin Rezeptorsubtypen (Reisine 1995). Im Besonderen zeichnet sich dieser Rezeptor durch einen sehr langen C-Terminus aus, der für dessen Regulation eine bedeutende Rolle einnimmt. Exprimiert wird der sst3 in vielen Gehirnarealen wie Hypophyse, Hypothalamus, Cortex, Medulla des Großhirns, Cerebellum, Prosencephalon, Mesencephalon, Amygdala, Hippocampus und Bulbus olfactorius (Händel et al. 1999). In den Zilien von hippocampalen Neuronen ist der sst3 besonders konzentriert (Iwanaga et al. 2011; Berbari et al. 2008; Händel et al. 1999). Hier hat der Rezeptor Einfluss auf den Zellzyklus und die Apoptose während der postnatalen Entwicklung und erlaubt den Zilien, eine entscheidende Rolle als chemischer, osmotischer und mechanischer Sensor einzunehmen (Stanic et al. 2009). Des Weiteren wird der sst3 in der Haut, im Pankreas sowie in Darmganglienzellen exprimiert (Lupp et al. 2012; Hagströmer et al. 2006). Über Real-time-PCR und Immunocytochemie wurde herausgefunden, dass der sst3 in ungefähr 50 % aller neuroendokrinen Tumore exprimiert wird (Mizutani et al. 2012). Hierzu zählen vor

allem die Hypophysenadenome (ACTH- und GH-produzierende Adenome). Aber auch in Darm-, Nieren-, Prostata-, Brust-, Gebärmutterhals- und Eierstocktumoren wurde eine verstärkte Expression des Rezeptors nachgewiesen (Lupp et al 2012). Im Adenokarzinom des Magens induziert Octreotid über den sst3 eine Inhibierung des Zellwachstums und löst gleichzeitig eine Apoptose in allen sst3-exprimierenden Zellen aus (Grimberg 2004).

Der humane Somatostatin-Rezeptor 3 liegt vorzugsweise als Homodimer vor und internalisiert auch als solcher (War et al. 2011; Pfeiffer et al. 2001). Für die Homodimerisierung ist der C-Terminus nicht unbedingt erforderlich. Es existieren aber auch Heterodimere mit dem humanen sst2. In diesem Fall führt die Aktivierung eines Rezeptors zu einer starken Internalisierung beider Rezeptoren und der $G_{\alpha i}$ -abhängige, antiproliferative Effekt des sst3 scheint verstärkt zu werden.

Dieselbe Heterodimerisierung wurde auch speziesübergreifend in Ratten beobachtet, hat allerdings nicht die gleichen regulatorischen Funktionen. Das Heterodimer zeigt eine hohe Affinität zum Somatostatin und zum sst2-spezifischen Liganden L-779/976, aber nicht zum L-796/778, einem spezifischen Liganden des sst3. Auch verläuft die Desensibilisierung beim Heterodimer langsamer ab als bei den beiden Homodimeren.

Von der funktionellen Seite aus betrachtet, überwiegt die regulatorische Aktivität des Ratten-Somatostatin-Rezeptors 2 (rsst2) in den Heterodimer-Komplexen. Das heißt, dass es nach Behandlung der Zellen mit dem sst2-spezifischen Liganden L-779/976 zur Bindung von GTP kommt. Somit wird die AC inhibiert und die ERK aktiviert. Das Ganze geschieht jedoch nicht, wenn mit dem spezifischen sst3-Liganden L-796/778 stimuliert wird. Ähnlich verhält es sich auch mit der Internalisierung. Eine Aktivierung mit Somatostatin oder dem sst2-spezifischen Liganden L-779/976 führt nur zu einer robusten Internalisierung des sst2. Der sst3 verbleibt selbst nach einer 4-stündigen Stimulierung an der Plasmamembran und auch die L-796/778-Substanz ist nicht in der Lage eine Endocytose der Rezeptoren zu induzieren (War et al. 2012; Pfeiffer et al. 2001).

Für die Verankerung in die Plasmamembran ist die N-terminale Domäne verantwortlich (Ammon et al. 2002). Für den rsst3-Rezeptor wurde weiterhin gezeigt, dass sowohl die Glykosylierungsstellen als auch die Asparaginsäure 124 (in der dritten

helicalen Domäne) für die Ligandenbindung essentiell sind (Nehring et al. 2000, 1995).

Der N-Terminus des humanen Somatostatin-Rezeptors 3 besteht aus 43 Aminosäuren und weist zusätzlich 2 Glykosylierungsstellen an den Asparaginen 17 und 30 auf. Zudem besitzt der Rezeptor eine Disulfidbrückenbindung zwischen den Cysteinen 116 und 191.

Im Vergleich zu den anderen vier humanen Somatostatin-Rezeptoren besitzt der sst3 einen sehr langen C-Terminus, der mit einem Serin an Position 317 anfängt. Innerhalb dieser 102 Aminosäuren langen Sequenz gibt es 18 potentielle Phosphorylierungsstellen, die sich in je zwölf Serin- und sechs Threonin-Reste aufteilen (Abbildung 4). Auffällig ist auch, dass der C-Terminus einen Glutaminsäure-haltigen Abschnitt (AS 346-360) beinhaltet. Dieser Bereich könnte für die Rekrutierung der G-Protein-gekoppelten-Rezeptorkinasen wichtig sein.



Abbildung 4: Schematische Darstellung des sst3-C-Terminus.

Ein besonderes Merkmal des sst3 ist die Fähigkeit, Apoptose auszulösen (Sharma et al. 1996). Eine Behandlung von Zellen, die den sst3 exprimieren, mit einem Agonisten führt einerseits zur Inhibierung der Zellproliferation und andererseits zur Auslösung des programmierten Zelltodes, was sich beispielsweise in einer gesteigerten Expression der Poly-ADP-Ribose-Polymerase (PARP-1) äußert (War et al. 2011). Im Falle der Apoptose induziert der sst3 sehr schnell die dephosphorylierungsabhängige Konformationsänderung des Tumorsuppressor-Proteins p53 und im späteren Verlauf die Aktivierung des pro-apoptische Effektorproteins BCL-2 associated X protein (BAX), einem downstream-Modulator des p53 (Miyashita et al.

1995; Zhan et al. 1994). Dabei ist die Initiierung der Apoptose $G_{\alpha i}$ -Protein abhängig (Sharma et al. 1996).

Gleichzeitig kann der sst3 antiproliferativ wirken. Dies geschieht über die Aktivierung der Protein-Tyrosin-Phosphatase SHP-1 (SH2 domain containing cytoplasmic protein-tyrosine phosphatase; PTP1C) und deren Translokation an die Membran. Dies stellt einen essentiellen Schritt in den Somatostatin-induzierten antiproliferativen und apoptotischen Effekte dar (Liu et al. 2000; Sharma et al. 1996). Zwar sind die Somatostatin-Rezeptoren 1 und 2 ebenfalls in der Lage, SHP-1 an die Membran zu rekrutieren, lösen aber im Gegensatz zum sst3 keine Apoptose oder Phosphorylierung des p53 aus (Buscail et al. 1995; Florio et al. 1994). Allerdings ist es so, dass eine zu geringe Expression des sst3 oder eine Mutation des p53 ein Grund dafür sein können, warum in Tumoren unter Umständen keine Apoptose nach Behandlung mit Somatostatin oder dessen Analogon Octreotid ausgelöst werden kann. Das heißt, dass Octreotid eine gute therapeutische Lösung darstellt, wenn die Tumore den sst3 und ein funktionelles p53 in ausreichendem Maße exprimieren (Sharma et al. 1996). Auch bei der Akromegalie wurde bereits gezeigt, dass der sst3 über die Auslösung von Apoptose das Tumorstadium reduzieren kann (Casarini et al. 2009).

Für das Auslösen von Apoptose und des antiproliferativen Effekts sind vor allem die Aminosäure-Reste innerhalb des C-Terminus verantwortlich. Eine vom COOH-Ende ausgehende Deletion von 30 oder mehr Aminosäuren resultiert im Verlust der antiproliferativen Eigenschaft. Die Expression von PARP-1 wird reduziert, wenn die letzten 76 C-terminalen Aminosäuren deletiert sind. Gleichzeitig führen die Deletionen dazu, dass die Translokation der PTP an die Membran unterdrückt wird (War et al. 2011). Eine andere Möglichkeit, den antiproliferativen Prozess zu inhibieren, ist die Verwendung des nicht-peptidischen BN81658, einem spezifischen Antagonisten des sst3, oder der Einsatz des PTP-Inhibitors Orthovanadat (Sharma et al. 1998).

Der sst3 inhibiert als $G_{\alpha i}$ -gekoppelter Rezeptor in vielen Zellsystemen die Adenylatcyclase, was eine Reduzierung des Levels an cyclischen Adenosinmonophosphat (cAMP) zur Folge hat (Patel et al. 1994; Law et al. 1994; Kaupmann et al. 1993; Yamada et al. 1992 a,b; Yasuda et al. 1992). Dabei ist diese Inhibierung nicht über andere G-Proteine ($G_{\alpha o}$, $G_{\alpha z}$) möglich (Komatsuzaki et al. 1997).

Wie auch bei der Regulierung der antiproliferativen Wirkung haben auch hier die Deletionen von C-terminalen Aminosäuren Einfluss auf die Fähigkeit, die Synthese von cAMP zu inhibieren. Bereits der Verlust des letzten drei Aminosäuren im C-Terminus (Ser416, Tyr417, Lys418) resultiert in einer verringerten Inhibierung des cAMP-Signals um ca. 40% im Vergleich zum Wildtyp-Rezeptor, der nach Behandlung mit 1 μ M Somatostatin das cAMP-Signal um 52-62 % reduzieren kann. Fehlt der gesamte C-Terminus des sst3, wird nahezu das gesamte cAMP-Signal gehemmt (War et al. 2011; Roth et al. 1997).

Der sst3 gehört zur Klasse A der GPCR (Tulipano et al. 2004). Das bedeutet, dass der Komplex aus Arrestin und phosphoryliertem Rezeptor sehr schnell an oder nahe der Membran dissoziiert. Besonders der rsst3 wurde bezüglich der Internalisierung und Downregulierung untersucht. Im Vergleich zum humanen sst3 ist dieser mit 428 Aminosäuren um 10 Reste länger (Meyerhof et al. 1992). Der humane sst3 zeigt nach Stimulierung mit Somatostatin die stärkste Internalisierung während die stabilen Analoga Octreotid und Pasireotid (SOM230) nur eine schwache Endocytose auslösen. Im Gegensatz dazu ist Somatoprim nicht in der Lage, am sst3 Phosphorylierungen oder eine Internalisierung zu induzieren (Kliwer et al. 2012; Lesche et al. 2009).

Die agonist-induzierte Endocytose ist dabei vor allem von der Interaktion mit einem funktionsfähigen β -Arrestin abhängig, aber auch vom Vorhandensein des Clathrin und α -Adaptins, einer Untereinheit des Adapter-Protein-Komplex 2 (AP-2 Komplexes), der die Internalisierung vieler Plasmamembranproteine vermittelt (Kreuzer et al. 2001; Tulipano et al. 2004). Er interagiert zum einen mit der schweren Kette des Clathrins und zum anderen mit der cytoplasmatischen Domäne des Rezeptors. Die Bildung dieser Verbindung ist essentiell für die Assemblierung von Clathrin-beschichteten Vesikeln und der Endocytose (Hirst et al. 1998; Zaremba et al. 1983). Der rsst3 internalisiert zusammen mit dem Somatostatin sehr schnell über die frühen Endosomen und weist eine Internalisierungsrate von 60-70% auf (Tulipano et al. 2004; Roth et al. 1997). Allerdings ist auch dieser Prozess von den C-terminalen Phosphorylierungsstellen des Rezeptors abhängig. Roth et al. konnten bereits 1997 zeigen, dass die Internalisierung des rsst3 von vier polaren Aminosäuren abhängig ist. Dabei handelt es sich um die drei Serine 341,346 und 351 und um das Threonin

357. Die Mutation dieser vier Stellen bewirkt keine Phosphorylierung, Internalisierung oder Desensibilisierung des stimulierten Rezeptors.

In Maus-IMCD3-Zellen konnte während der Internalisierung eine Kolokalisation des sst3 sowohl mit den endosomalen Proteinen Rab4 und Rab 21 (jeweils Marker von frühen Endosomen) als auch mit dem Rab 11 und Transferrin (Marker für Recycling Endosomen) nachgewiesen werden. Eine Kolokalisation mit Rab7 führt hingegen zum lysosomalen Abbau des Rezeptors. Allerdings ist der Anteil an degradiertem sst3 in diesen Zellen eher gering (Tower-Gilchrist et al. 2011).

Ein anderes Phänomen des sst3 ist die Downregulation nach einer chronischen Stimulation mit Somatostatin. Die Degradation des sst3 ist bereits nach drei Stunden anhaltender Stimulation detektierbar und nimmt mit der Zeit zu (Roosterman et al. 2008; Tulipano et al. 2004). Sie kann aber durch den Einsatz des lysosomalen Inhibitors Chloroquin oder des proteasomalen Inhibitors MG132 nahezu vollständig blockiert werden (Tulipano et al. 2004).

1.6 Frage- und Zielstellung

Der humane sst3-Rezeptor gehört zur Familie der GPCRs, die eine immer größere Bedeutung für die Pharmakotherapie von Erkrankungen einnimmt. Die Somatostatin-Rezeptoren stellen ein wichtiges Element bei der Erkennung und Behandlung speziell von neuroendokrinen Tumoren (NETs) dar. Der sst3 findet sich vor allem auf Hypophysenadenomen insbesondere ACTH- und GH-produzierende Adenome, aber auch in Nonfunktionellen und Gastroenteropankreatischen NETs wurde eine verstärkte Expression des Rezeptors nachgewiesen.

Allerdings gibt es noch keine Erkenntnisse über die genauen Mechanismen der Regulation des sst3. Diese Arbeit soll nun Aufschlüsse darüber geben, durch welche Liganden der humane sst3 aktiviert werden kann und was anschließend mit diesem in der Zelle passiert. Mit Hilfe von bestimmten Rezeptormutanten und der Generierung von Phosphorylierungsstellen-spezifischen Antikörper konnten folgende, grundlegende Fragestellungen bearbeitet werden:

1. Bewirken die unterschiedlichen Liganden eine selektive Aktivierung und Phosphorylierung des Rezeptors?
2. Welche Phosphorylierungsstellen des sst3 sind essentiell, wenn es um die ekrutierung des β -Arrestins und die damit induzierte Internalisierung geht?
3. Wie sind die Prozesse der (De-) Phosphorylierung zeitlich reguliert und welche Proteine leiten diese Mechanismen ein?
4. Haben die eingeführten Mutationen einen Einfluss auf das Recycling und die Downregulierung des Rezeptors bzw. welche Bedingungen müssen erfüllt sein, damit diese Prozesse ablaufen können?

Als Modellsystem dienten humane embryonale Nierenzellen (HEK293-Zellen).

2. Material und Methoden

2.1 Molekularbiologische Methoden

2.1.1 Hitzeschock-Transformation von kompetenten Bakterien

Für das Einschleusen (Transformieren) der Plasmid-DNA-Konstrukte in kompetente Escherichia-coli-Zellen wurde die entsprechende Menge an DNA (300ng) auf mindestens 50µl Zellen gegeben. Nach einer 15-minütigen Inkubation auf Eis erfolgte für 45 sec der Hitzeschock bei 42°C. Anschließend wurden die Zellen nochmals 5 min auf Eis inkubiert, ehe sie auf Ampicillin-LB-Platten ausplattiert wurden. Am nächsten Tag konnte eine gewachsene Kolonie gepickt und in einer Flüssigkultur angereichert werden.

LB-Medium: 10% Pepton, 5% Hefe-Extrakt, 10% NaCl

Ampicillin (1 µl/ml)

2.1.2 Plasmid-DNA-Amplifikation und -Präparation

Die Präparation erfolgte nach dem Protokoll von Invitrogen. Aus einer Aufreinigung von 200 ml Bakterienkultur erhielt man je nach Art des Plasmids 1000 - 5000 µg DNA. Zur Fällung der DNA wurde Isopropanol verwendet. Nach dem Abzentrifugieren wurde das Pellet anschließend mit 70%igen Ethanol gewaschen.

2.1.3 Gensynthese von cDNA-Konstrukten

Die Synthese der einzelnen cDNA Konstrukte wurde von der Firma Source BioSciene imaGenes durchgeführt. Als Vorlage diente der humane sst3-Rezeptor. Zusätzlich wurden Mutanten erzeugt, bei denen bestimmte Serin- und Threonin-Reste gegen Alanin bzw. Lysin- Reste gegen Asparagin ausgetauscht wurden.

Zusätzlich wurde die 5'-UTR für die Transkription optimiert und die „Codon-usage“ an HEK293-Zellen angepasst. Die verschiedenen Konstrukte wurden in den pcDNA3.1-Vektor kloniert und durch anschließende Sequenzierung überprüft.

2.2 Biochemische Methoden

2.2.1 SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese

Mittels der sogenannten „Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese“ wurden die Proteine nach ihrem Molekulargewicht in Polyacrylamid-Netzwerk der Größe nach aufgetrennt. Die Proben wurden abhängig vom durchgeführten Experiment mit 1x oder 5x SDS-Probenpuffer für 15 min bei 50°C bzw. 5 min bei 95°C denaturiert.

1xSDS-Probenpuffer: 62,5 mM Tris-HCl pH 7,6 , 2 % SDS, 20 % Glycerol, 100 mM Dithiothreitol (DTT), 0,005% Bromphenolblau

5xSDS-Probenpuffer: 250 mM Tris-HCl pH 6,8, 7,5% SDS, 30 % Glycerol, 1% Mercapto-Ethanol, 0,25% Bromphenolblau

Elektrophorese-Puffer 10x (1l): Tris Ultra (30,3 g), 20 % SDS (10 ml), Glycin (144 g)

2.2.2 Western-Blot und Immundetektion

Beim Western-Blot wurden die sich im Gel befindlichen Proteine auf eine PVDF-Membran übertragen und dann in einer spezifischen Nachweisreaktion mittels Antikörpern detektiert. Der Transfer erfolgte im Trans-Blot® Turbo Transfer System (BioRad) für 15 min bei 0,25 A (pro Blot). Anschließend erfolgte die Blockierung der Membran für 1 h in 5 Gew. % Milchpulver in TBS-T. Die Membran wurde dann mit dem Primär-Antikörper (in 5 % Gew. BSA in TBS-T verdünnt) über Nacht bei 4°C inkubiert (siehe Tabelle 2). Am darauf folgenden Tag wurde die Membran mit dem sekundären Antikörper (gekoppelt an die Meerrettich-Peroxidase; 5 Gew. % Milchpulver in TBS-T verdünnt) (siehe Tabelle 2) für 1h bei Raumtemperatur inkubiert. Die Chemilumineszenz-Reaktion erfolgte durch eine Entwicklerlösung, in denen die p-Cumarsäure und das Luminol gelöst waren. Die Detektion erfolgt mit den Röntgen-Filmen von FUJIFILM im Cawomat 2000 IR.

Blotpuffer (1x): 25 mM Tris-Ultra, 150 mM Glycin, 10% Methanol

TBS-T: 10 mM Tris pH 7,6, 300 mM NaCl, 0,1 % Tween 20

Entwicklerlösung: 55 µl 90 mM p-Cumarsäure (14,77 g/l in DMSO) und 125 µl 250 mM Luminol (44,3 g/l in DMSO) in 12,5 ml Tris 0,1M pH 8,3; 10 µl H₂O₂ in 12,5 ml Tris 0,1 M pH 8,3

2.3 Zellkultur

2.3.1 Zelllinien

HEK 293 (Human embryonic kidney cells)

Tabelle 1: Rezeptoren, mit denen HEK 293 stabil transfiziert wurden. Die Synthese der einzelnen cDNA Konstrukte wurde von der Firma Source BioScience imGenes durchgeführt

Rezeptor-Wildtypen (WT)	Mutanten
hsst3-Rezeptor-WT	hsst3-317-370 S/T-A
	hsst3-4 S/T-A
	hsst3-371-418 S/T-A
	hsst3-K-R
hsst2-Rezeptor WT	
hsst5-Rezeptor-WT	

2.3.2 Kultivierung von HEK-Zellen

Die Kultivierung der Zellen erfolgte in DMEM+ (Dulbecco's Modified Eagle Medium; 1x mit 4,5 g/l Glucose) Medium mit 10 % FKS, 2 mM L-Glutamin, 100 U/ml Penicillin und 0,1 mg/ml Streptomycin. Im Falle von stabil transfizierten Zelllinien wurden zusätzlich 500 µg/ml Selektionsantibiotikum Geneticinsulfat (G418) eingesetzt.

2.3.3 Stabile Transfektion

Für eine stabile Transfektion wurden 1,5 Mio HEK-Zellen in einer 10 cm Schale ausgesät. Einen Tag später erfolgte die Transfektion mit Lipofectamin (Lipofectamine®2000 Reagent, invitrogen). Dafür wurden 24 µg DNA sowie 60 µl Lipofectamin in je 1,5 ml serumfreien DMEM Medium gelöst, nach 3 min miteinander vermischt und für 20 min bei Raumtemperatur inkubiert. Dieser Ansatz wurde dann auf die Zellen gegeben. Nach 24 h wurden die Zellen mit neuem DMEM+ Medium versehen und weitere 6 h später mit G418 (75 µg/ml) behandelt. Sobald die Schale konfluent war, wurden die Zellen mittels Trypsin abgelöst, dann bei 800 rpm 5 min

lang abzentrifugiert und das Pellet in 5 ml neuen G418 (100 µg/ml) resuspendiert. Die Suspension konnte dann in einem Verhältnis von 1:5, 1:10 und 1:50 gesplittet werden und in 6 cm Schalen ausgesät werden (G418 (100 µg/ml)). Wenn die Schalen konfluent bewachsen waren, wurden die Zellen abgelöst und in Flaschen kultiviert. Für die weitere Behandlung wurde DMEM+ Medium mit einer G418 Konzentration von 50 µg/ ml verwendet.

2.3.4 Rezeptoranreicherung mittels Weizenkeim-Lektin

Bei allen Experimenten ((De-)Phosphorylierung, Downregulierung), bei denen mit den phospho-spezifischen, den HA (Hämagglutinin) - oder UMB-Antikörpern Signale detektiert werden sollten, mussten die hsst3-Rezeptoren mittels Weizenkeim-Lektin angereichert werden. Hierfür wurden konfluent bewachsene 6 cm-Schalen je nach Experiment unterschiedlich aufgearbeitet. Für die Untersuchung der Phosphorylierungskinetiken und der Downregulierung wurden die Zellen nach ihrer Behandlung mit Agonisten (1 µM) dreimal mit kaltem PBS (pH 7,4) gewaschen und sofort mit 800 µl RIPA-Lysepuffer (enthält Protease- (complete) und Phosphatase (PhosStop)-Inhibitoren von Roche) lysiert. Bei der Dephosphorylierung erfolgte nach der Stimulation mit einem Agonisten (1 µM) ein sogenannter Washout. Das heißt, die Zellen wurden dreimal mit kaltem PBS (pH 7,4) gewaschen und danach in Agonisten-freiem Medium inkubiert. Im Anschluss daran wurde die Zellyse eingeleitet. Die Zeitdauer der Lyse erfolgte dabei für wenige min auf Eis. Danach wurden die Zellen in geeignete Eppendorf-Reaktionsgefäße überführt und bei 21.100 g und 4°C für 20 Minuten zentrifugiert. Die im Überstand befindlichen Proteine wurden dann in Eppendorf-Reaktionsgefäße mit 50 µl Weizenkeim-Lektin (Fluka) überführt und für 1,5 h auf dem Rotator bei 4°C inkubiert. Anschließend wurden die Proben zweimal mit RIPA gewaschen, danach mit 50 µl SDS-Probenpuffer versehen und für 15 min bei 50°C aufgekocht. Die Proben wurden dann bei -20°C aufbewahrt.

RIPA (pH 7,4): 150 mM NaCl, 50 mM Tris-Ultra, 5 mM EDTA, 1 % Igepal, 0,5 % Deoxycholat, 0,1 % SDS (20%)

2.3.5 ELISA-Internalisierungs-Assay

Mit diesen Enzyme Linked Immunosorbent Assay konnte die Internalisierung des hsst3- Rezeptors quantitativ analysiert werden. Dafür wurden ca. 250.000 Zellen auf einer Poly-L-Lysin beschichteten 24-Well-Schale ausgesät. Einen Tag später erfolgte im ersten Schritt die Inkubation mit dem in OptiMem 1:100 verdünnten HA-Antikörper für 2h bei 4°C in einer Feuchtekammer. Im zweiten Schritt wurden die Zellen mit OptiMem gewaschen und anschließend mit 1 µM Agonisten für 30 min bei 37°C inkubiert. Danach wurden die Zellen dreimal mit kalten PBS (pH 7,4) gewaschen, mit der Zamboni-Lösung für 30 min bei Raumtemperatur fixiert, danach nochmals mit PBS gewaschen und mit 3% NGS PBS (1 mM CaCl₂) blockiert. Über Nacht wurden die Zellen mit dem in 1% NGS PBS (1 mM CaCl₂) gelösten Meerrettich-Peroxidase (HRP)-gekoppelten Sekundärantikörper inkubiert. Am nächsten Tag erfolgte nach dem Waschen mit PBS (1 mM CaCl₂) die Inkubation mit dem HRP-Substrat ABTS (2,2'-Azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid)). Nach der ablaufenden Farb-reaktion (5-20 min) wurde die Absorption bei 405 nm an der Fusion™ gemessen. Für die Untersuchung des Rezeptor-Recyclings wurde vor der Inkubation des HA-Antikörpers die Stimulierung mit 1 µM Somatostatin (30 min) und der anschließende Washout vorgenommen. Erst danach erfolgte die Fixierung mit Zamboni.

Zamboni-Fixierlösung (2 l): 350 ml gesättigte Pikrinsäure, 80 g Paraformaldehyd (PFA) mit Phosphatpuffer auf 2 l auffüllen

2.3.6 Immunzytochemie

Mit dieser Methode konnte mit Hilfe spezifischer Antikörper und der Fluoreszenzmikroskopie die quantitative Menge an internalisierten Rezeptoren sichtbar gemacht werden. In einem 24-Well Ansatz wurden 150.000 Zellen auf Poly-L-Lysin beschichtete Deckgläschen ausgesät und über Nacht im 5% CO₂-Inkubator kultiviert. Nach dem jeweiligen Experiment (Internalisierung, Recycling- Stimulierung, Washout) wurden die Zellen zunächst mit kaltem PBS (pH 7,4) gewaschen und für 30 min mit der Zamboni-Lösung bei Raumtemperatur fixiert. Danach wurden diese dreimal mit PB-Puffer (0,1 Vol. % Triton X-100) gewaschen und für 2 h im selben Puffer (enthält zusätzlich 3 % NGS) permeabilisiert und blockiert. In diesem "Blockierungsansatz"

wurden später auch die zu verwendenden Antikörper gelöst. Der Primärantikörper (HA-Antikörper) wurde unmittelbar nach dem Blockieren zugegeben und über Nacht inkubiert. Nach dem Waschen mit dem oben genannten Puffer wurden die Zellen nun mit dem Sekundärantikörper (Alexa488-gekoppelte Anti-Kaninchen-Antikörper) für etwa 2 h im Dunkeln inkubiert. Nach erneutem Waschen wurden die Deckgläschen mit einem Tropfen Fluoromount-G® (SouthernBiotech) auf den Objektträgern fixiert. Für die Immunfluoreszenzaufnahmen wurde das LSM 510 META Mikroskop von Zeiss mit dazugehöriger Software verwendet.

PB-Puffer (für ICC mit Triton X-100): 0,1 M Na₂HPO₄, 30 mM NaH₂PO₄, 0,1 Vol. % Triton X-100

Blockierlösung: PB-Puffer, 3 Vol. % Ziegenserum

2.3.7 „Live Cell Imaging“ von β -Arrestin-EGFP

Für die Lebendzellaufnahme wurden 200.000 HEK-Zellen auf einer Poly-L-Lysin beschichteten 35-mm-Glasboden-Zellkulturschale (Mattek) ausgesät und 24 h später nach dem Turbofectamin-Protokoll (TurboFect Transfection Reagent, Thermo Scientific) transfiziert. Dazu wurden 2,2 μ g DNA (0,2 μ g β -Arrestin-2-EGFP oder β -Arrestin-1-EGFP, 2 μ g Rezeptor) in 300 μ l DMEM- gelöst und danach mit 4,4 μ l Turbofectamin vermischt. Nach einer 20-minütigen Inkubation wurde dieses Transfektionsgemisch auf die Zellen pipettiert. Am darauf folgenden Tag wurden die Zellen mit 37°C warmen PBS gewaschen, die Schalen mit PBS auf einen beheizten (37°C) Objektträger-Tisch platziert und die Zellen mit 1 μ M Agonisten für einen Zeitraum von 15 min stimuliert. Die Aufnahmen erfolgten bei einer Wellenlänge von 488 nm am LSM 510 META von Zeiss.

2.3.8 Experimente mit siRNA

Für die Identifizierung der G-Protein-gekoppelten Rezeptorkinasen (GRK) und der Protein-Phosphatase 1 Untereinheiten (PP1) wurden die entsprechenden Proteine mithilfe von spezifischen siRNAs (Sequenzen siehe Tabelle 4) herunter reguliert. Dazu wurden 550.000 Zellen in 6 cm Schalen ausgesät und am nächsten Tag mit dem HiPerFect Transfection Reagent (Qiagen) transfiziert. Für die Transfektion wurden pro Probe 500 μ l serumfreies Medium in Eppendorf-Reaktionsgefäße vor-

gelegt, 10 µl siRNA (100 nM) hinzugefügt und anschließend mit 50 µl HiPerFect vermischt. Nach einer 10-minütigen Inkubationszeit bei Raumtemperatur wurde dieser Ansatz auf die Schalen (2 ml Medium) pipettiert und 4 h später mit weiteren 3 ml Medium aufgefüllt. Nach 72 h Inkubationszeit bei 37°C wurde dann der entsprechende Versuch (Stimulierung mit 1 µM Somatostatin mit oder ohne anschließenden Washout) durchgeführt. Nach der Zellyse mit RIPA wurden die Rezeptoren mittels Weizenkeim-Lektin angereichert.

2.3.9 Okadasäure/ Calyculin A

Mit Hilfe der spezifischen Inhibitoren Okadasäure und Calyculin A konnte herausgefunden werden, welche Familie der Protein-Phosphatase für die Dephosphorylierung des humanen sst3 Rezeptors zuständig ist. Dazu wurden die am Vortag dicht ausgesäten Zellen in einer 6 cm Schalen mit dem jeweiligen Inhibitor (Okadasäure: 5, 50 nM; Calyculin A: 10, 30 nM) für 10 min bei 37 °C vorinkubiert. Danach erfolgte in Anwesenheit des Inhibitors eine 10-minütige Stimulation mit 1 µM Somatostatin bei 37°C. Der sich anschließende Washout (ebenfalls in Anwesenheit der Inhibitoren) wurde bei Raumtemperatur für 5 und 15 min durchgeführt. Nach der Zellyse mit RIPA wurden die Rezeptoren mittels Weizenkeim-Lektin angereichert.

2.3.10 Immunpräzipitation

Für den Nachweis der Ubiquitylierung am humanen sst3-, sst2- und sst5-Rezeptor wurden die in 6 cm Schalen dicht bewachsenen Zellen für eine entsprechende Zeit mit 1 µM Somatostatin bei Raumtemperatur behandelt und anschließend mit RIPA lysiert. Nach der Lyse auf Eis erfolgte der Zenrifugationsschritt bei 21.100 g, 4°C, 20 Minuten. Für die Anreicherung der Rezeptoren wurden Protein A-Agarose Beads (Santa Cruz Biotechnologies) mit spezifischen UMB beladen (sst3: UMB31-10; sst2: UMB 97-1; sst5: UMB 30-5). Dazu wurde der Gesamtansatz an Protein A-Agarose Beads (50 µl pro Probe) einmal mit RIPA gewaschen und dann mit dem UMB-Antikörper beladen (pro Probe 2 ml AK). Dieses Gemisch inkubierte dann für 1,5 h bei 4°C. Danach wurden die mit AK beladenen Beads abzentrifugiert und mit RIPA gewaschen. Die Suspension wurde dann in geeignete Eppendorf-Reaktionsgefäße

überführt, abzentrifugiert und mit den Proteinüberständen der behandelten Zellen versehen. Die Anreicherung der Rezeptoren erfolgte ebenso für 1,5 h bei 4°C. Anschließend wurden die Proben zweimal mit RIPA gewaschen, danach mit 50 µl SDS-Probenpuffer versehen und für 15 min bei 50°C aufgeköcht. Die Proben wurden dann bei -20°C aufbewahrt. Als Ubiquitin-Antikörper dienten der Ub-F11- und der Ub-P4D1-Antikörper von Santa Cruz Biotechnologies.

2.3.11 „Transferrin Pulse Chase“-Experiment

Mit Hilfe dieses immunzytochemischen “pulse-chase” Assay konnte bestimmt werden, welche Menge an internalisierten Rezeptor mit endozytiertem Transferrin kolokalisiert ist, um Aufschlüsse über das Recycling-Verhalten zu gewinnen. Dazu wurden in einem 24-Well-Ansatz 150.000 stabil transfizierte Zellen auf Poly-L-Lysin beschichtete Deckgläschen ausgesät. Am darauf folgenden Tag wurden die Zellen zunächst mit dem HA-Antikörper (1:100) für 1h bei 37°C in serumfreien Medium inkubiert. Dieser AK bindet an den N-terminalen HA-Tag der Rezeptoren. Anschließend erfolgte eine 30-minütige Stimulierung der Zellen mit 1 µM Somatostatin (DMEM-). Danach wurden die Zellen dreimal mit kalten 0,4% EDTA-enthaltenen PBS gewaschen und mit 5 µg/ml Alexa Fluor 488-gekoppelten humanen Transferrin (Life technologies) (DMEM, 37°C, ohne Somatostatin) bei 37°C für 20 min inkubiert. Die nächsten Schritte erfolgten aufgrund der Lichtsensibilität des Fluorophor-gekoppelten Transferrins im Dunkeln. Wie bei einer Immunzytochemie erfolgte das Waschen mit kaltem PBS (pH 7,4), die 30-minütige Fixierung mit der Zamboni-Lösung und die Permeabilisierung und Blockierung mit dem PB-Puffer (0,1 Vol. % Triton X-100; 3 % NGS) für 1 h. Nach dem Waschen wurden die Zellen nun mit einem Gemisch aus Sekundärantikörper (5 µg/ml Cy3-gekoppelten Anti-körper (Dianova)) und 1 µg/ml DAPI (Sigma) für etwa 30 min im Dunkeln inkubiert. Die Deckgläschen wurden mit einem Tropfen Fluoromount-G® (SouthernBiotech) auf den Objektträgern fixiert. Für die Immunfluoreszenzaufnahmen wurde das LSM 510 META Mikroskop von Zeiss mit dazugehöriger Software verwendet.

2.3.12 Datenauswertung

Für die Auswertung der immunzytochemischen Aufnahmen wurde das LSM 510 ME-TA Mikroskop von Zeiss verwendet. Statistische Analysen erfolgten mit dem Programm GraphPad Prism 4.0 und zur Bildbearbeitung dienten Adobe Photoshop CS4.

Tabelle 2: Verwendete Primär- und Sekundärantikörper und ihre für die Immundetektion im Western Blot, Immunzytochemie und ELISA eingesetzten Verdünnungen

Antikörper	Verdünnung/Konzentration im Western Blot (WB) Immunzytochemie (IC) ELISA (E)	Wirtsorganismus	Hersteller
anti-GRK2	1:2000 (WB)	Kaninchen; polyklonal	Santa Cruz
anti-GRK3	1:2000 (WB)	Kaninchen; polyklonal	Santa Cruz
anti-GRK5	1:2000 (WB)	Kaninchen; polyklonal	Santa Cruz
anti-GRK6	1:2000 (WB)	Kaninchen; polyklonal	Santa Cruz
anti-HA	0,1 µg/ ml(WB) 0,2 µg/ ml (IC); 1 µg/ ml (E)	Kaninchen; polyklonal	Gramsch
anti-HA	1:500 (WB)	Ratte; Biotin-gekoppelt	Roche
anti-Kaninchen IgG, sekundär	1: 5000 (WB, E)	Ziege; POD-gekoppelt	Santa Cruz
anti-Kaninchen IgG, sekundär	1:500 (IC)	Ziege; lexa488-gekoppelt	Invitrogen
anti-Kaninchen IgG, sekundär	1:500 (IC)	Ziege; Cy3-gekoppelt	Dianova
anti-Maus IgG; sekundär	1:5000 (WB)	Ziege; POD-gekoppelt	Santa Cruz
anti-PP1α	1:1000 (WB)	Ziege; polyklonal	Santa Cruz
anti-PP1β	1:10.000 (WB)	Ziege; polyklonal	Santa Cruz
anti-PP1γ	1:2000 (WB)	Ziege; polyklonal	Santa Cruz
anti-psst3 (S337/T341)	0,1 µg/ ml (WB)	Kaninchen; polyklonal	Affinitätsreinigung anti-psst3 (Genosphere Biotechnologies)
anti-psst3 (T348)	0,1 µg/ ml (WB)	Kaninchen; polyklonal	Affinitätsreinigung anti-psst3 (Genosphere Biotechnologies)
anti-sst2 (UMB 97-1)	1:200 (WB)	Kaninchen; monoklonal	Affinitätsreinigung
anti-sst3 (UMB 30-10)	1:200 (WB)	Kaninchen; monoklonal	Affinitätsreinigung
anti-sst5 (UMB 30-5)	1:200 (WB)	Kaninchen; monoklonal	Affinitätsreinigung

anti-Transferrin-Rezeptor	1:2000 (WB)	Maus; monoklonal	Invitrogen
Anti-UB (F11)	1:100 (WB)	Maus; monoklonal	Santa Cruz
anti-Ub (P4D1)	1:100 (WB)	Maus; monoklonal	Santa Cruz
anti-Ziege IgG	1:5000 (WB)	Esel; POD-gekoppelt	Santa Cruz
anti- β -Aktin C4	1:200 (WB)	Maus; monoklo.	Santa Cruz
Streptavidin	1:1000 (WB)	POD-gekoppelt	Life technologies

Tabelle 3: Verwendete cDNA-Expressionskonstrukte (pcDNA3.1 wurde bei Source BioScience imaGenes erworben)

cDNA-Expressionskonstrukte	Vektor	Verwendung
β -Arrestin-2-EGFP		Heterologe Expression
β -Arrestin-1-GFP		Heterologe Expression
hsst2(-HA)	pcDNA3.1	Stabile heterologe Expression
hsst3(-HA)	pcDNA3.1	Stabile heterologe Expression
hsst3-317-370 S/T-A	pcDNA3.1	Stabile heterologe Expression
Hsst3-4 S/T-A	pcDNA3.1	Stabile heterologe Expression
hsst3-371-418 S/T-A	pcDNA3.1	Stabile heterologe Expression
hsst3-K-R	pcDNA3.1	Stabile heterologe Expression
hsst5 (-HA)	pcDNA3.1	Stabile heterologe Expression

Tabelle 4: Verwendete siRNA-Sequenzen

Zielprotein	siRNA-Sequenz (Duplexe)	Hersteller
GRK2	5'-CCGGGAGATCTTCGACTCATA-3' und 5'-AAGAAGTACGAGAAGCTGGAG-3'	Qiagen
GRK3	5'-AAGCAAGCTGTAGAACACGTA-3' und 5'-GCAGAAGTCGACAAATTTA-3'	Qiagen
GRK5	5'-AGCGTCATAACTAGAACTGAA-3' und 5'-AAGCCGTGCAAAGAACTCTTT-3'	Qiagen
GRK6	5'-AACACCTTCAGGCAATACCGA-3' und 5'-AACAGTAGGTTTGTAGTGAGC-3'	Qiagen
PP1 α	5'-AAGAGACGCTACAACATCAA-3'	Qiagen
PP1 β	5'-TACGAGGATGTCGTCCAGGAA-3' und 5'-GTTTCGAGGCTTATGTATCA-3'	Qiagen
PP1 γ	5'-AACATCGACAGCATTATCCAA-3' und 5'-AGAGGCAGTTGGTCACTCT-3'	Qiagen
nonsilencing RNA duplex	5'-GCTTAGGAGCATTAGTAAA-3' oder 5'-AAACTCTATCTGCACGCTGAC-3'	Qiagen

Tabelle 5: Verwendete Substanzen

Substanz	Firma
ABTS (2,2'-Azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid))	Sigma
Acrylamid	Roth
APS 10 % (Ammoniumpersulfat)	Applichem
Ampicillin (1µl/ml)	Sigma
BSA pH7 (Bovines Serum Albumin)	PAA Laboratories
Bromphenolblau	Roth
Calciumchlorid	Sigma
Chloroquin	Sigma
Dinatriumhydrogenphosphat-Dihydrat	Roth
DMEM (High Glucose) (4,5g/l)	PAA Laboratories
DMSO (Dimethylsulfoxid)	Roth
DTT (Dithiothreitol)	Sigma
Dulbecco's PBS (1x) pH 7,4	PAA Laboratories
EDTA	AppliChem
FKS (Fetales Kälberserum)	PAA Laboratories
Fluoromount-G	Southern Biotech
Forskolin	Sigma
G418 Sulphate Solution (50 mg/ml)	PAA
Glycerol	Roth
Glycin	Roth
Goat Serum	PAA Laboratories
HBSS (Hanks balanced salt solution)	Sigma
Hepes Buffer Solution 1M	PAA
IBMX (3-Isobutyl-1-methylxanthin)	Sigma
Igepal CA-630	Sigma
Isopropanol	Applichem

jetPEI DNA Transfektion Reagent	PolyPlus
L-796/778	Merck
L-Glutamin 200 mM	PAA Laboratories
LB-Agar	Invitrogen
Lectin, immobilized on Agarose	Fluka
Lipofectamin 2000	Invitrogen
Luminol	Roth
Methanol	J.T. Baker
MG132	Sigma
Natriumazid	Applichem
Natriumchlorid	Roth
Natriumdeoxycholat	Merck
Natriumhydrogenphosphat-Monohydrat	Roth
Octreotid	Novartis
OptiMem with GlutaMax	Invitrogen
p-Cumarsäure	Roth
Page Ruler Prestained Protein	Fermentas
Pasireotid	Novartis
PBS mit/ ohne Ca^{2+} / Mg^{2+}	PAA
Penicillin (100 U/ml)	als PenStrep von PAA
Pertussistoxin (0,1 mg/ ml)	Sigma
PhosStop	Roche
Pikrinsäure	Sigma
Poly L-Lysin (1:1000)	Sigma
Protease-Inhibitor complete Mini EDTA-free	Roche
Protein-Agarose A-Beads	Santa Cruz
SDS 20%	Roth
Somatoprim	DeveloGen

Somatostatin	Bachem
Streptomycin (0,1 mg/ml)	als PenStrep von PAA
Temed (N,N,N',N'-Tetramethylethyldiamin)	Roth
Tris-Hydrochlorid	Roth
Tris Ultra	Roth
Triton X-100	Roth
Trypsin-EDTA (1x) 0,05 % in PBS	PAA Laboratories
Turbofectamin	Fermentas
Tween 20	Sigma
Wasserstoffperoxid	Roth

Tabelle 6: Laborgeräte

Biofuge 28 RS	Heraeus
Blotmaschine Trans-Blot®SD Semi-Dry Transfer Cell	BioRad
CO ₂ -Inkubator Heracell 150i	Thermo Scientific
Elektrophorese-Ausstattung	BioRad
Entwicklermaschine Cawomat 200 IR	Cawo
FlexStation3	Molecular Devices
Fusion™	Packard
Laborwaage MC1 Laboratory LC220S	Sartorius
Mikroskop LSM 510 META	Carl Zeiss
Mikroskop Motic®AE20	Carl Zeiss
Mikroskop ProgRes®C5	Carl Zeiss
ph-Meter Microprocessor pH Meter WTW	Hanna® Instruments
Pipetten (0,5-10, 20, 100, 200, 100-1000, 500-5000 µl)	Eppendorf
Schüttler Unimax 1010	Heidolph
Sterilbank Hera safe	Thermo Scientific
Thermomixer comfort	Eppendorf
Vortexer Heidolph REAX 2000	Heidolph
Zentrifuge Fresco 21	Thermo Scientific
Zentrifuge Heraeus Pico 21	Thermo Scientific

Tabelle 7: Verbrauchsmaterialien

Coverslips	Roth
Cryo-Röhrchen	Greiner
Falcon-Röhrchen (15, 50 ml)	Cellstar
Fujifilm Super RX	Fuji/ Hartenstein
PVDF-Membran „Roti-PVDF“ (0,45 µm)	Roth
Serologische Pipetten (5, 10, 25 ml)	Greiner
Zellkultur-Flaschen 250 ml (75 cm ²)	PAA Laboratories
Zellkultur-Schalen (6, 10 cm)	Greiner
Zellkultur-Platten (6-, 12-, 24-, 96-Well)	Greiner

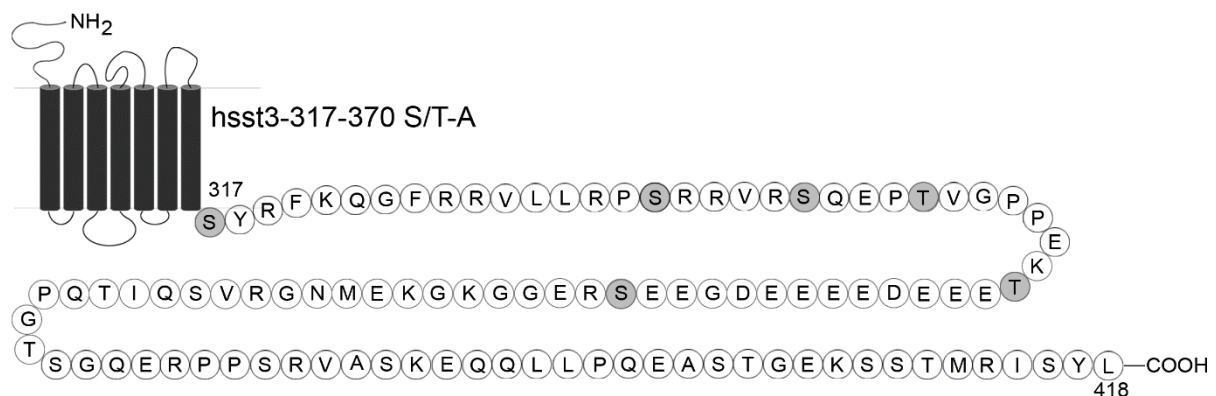
3. Ergebnisse

3.1 Eingeführte Mutationen am Somatostatin-Rezeptor 3

Für die Untersuchung der phosphorylierungsabhängigen zellulären Mechanismen wurden spezielle Rezeptor-Mutanten erzeugt. Die Synthese der einzelnen cDNA Konstrukte wurde von der Firma Source BioScience imGenes durchgeführt. Mit Hilfe dieser Rezeptoren können Prozesse wie die Internalisierung oder die β -Arrestin-Rekrutierung näher untersucht werden.

Im Detail handelt es sich bei den Mutanten um folgende Somatostatin-Rezeptor-3-Formen (Abbildung 5). Bei der 317-370 S/T-A-Mutante sind die sechs proximalen Serin- und Threonin-Reste gegen Alanin ausgetauscht worden. Bei der 4 S/T-A-Mutante handelt es sich um eine spezielle Form des 317-370-S/T-A-Rezeptors, in der sowohl die Serine an den Positionen 337 und 361 als auch die Threonine an den Stellen 341 und 348 mutiert vorliegen. Bei der 371-418-S/T-A-Mutante sind alle zwölf distalen Phosphorylierungsstellen gegen Alanin ausgetauscht worden.

Des Weiteren wurde eine Lysin-Mutante generiert. Dieser Rezeptor zeichnet sich dadurch aus, dass alle sieben intrazellulären Lysin-Reste (sechs davon im C-Terminus) durch Arginin ausgetauscht wurden. Mittels dieser K-R-Mutante kann eine Ubiquitin-abhängige Regulierung des Somatostatin-Rezeptors 3 untersucht werden. Insbesondere die Bedeutung der Lysine, die für eine Ubiquitylierung essentiell sind, rückte hier bei der Untersuchung der Mechanismen der Downregulierung oder des Rezeptor-Recyclings näher in den Focus.



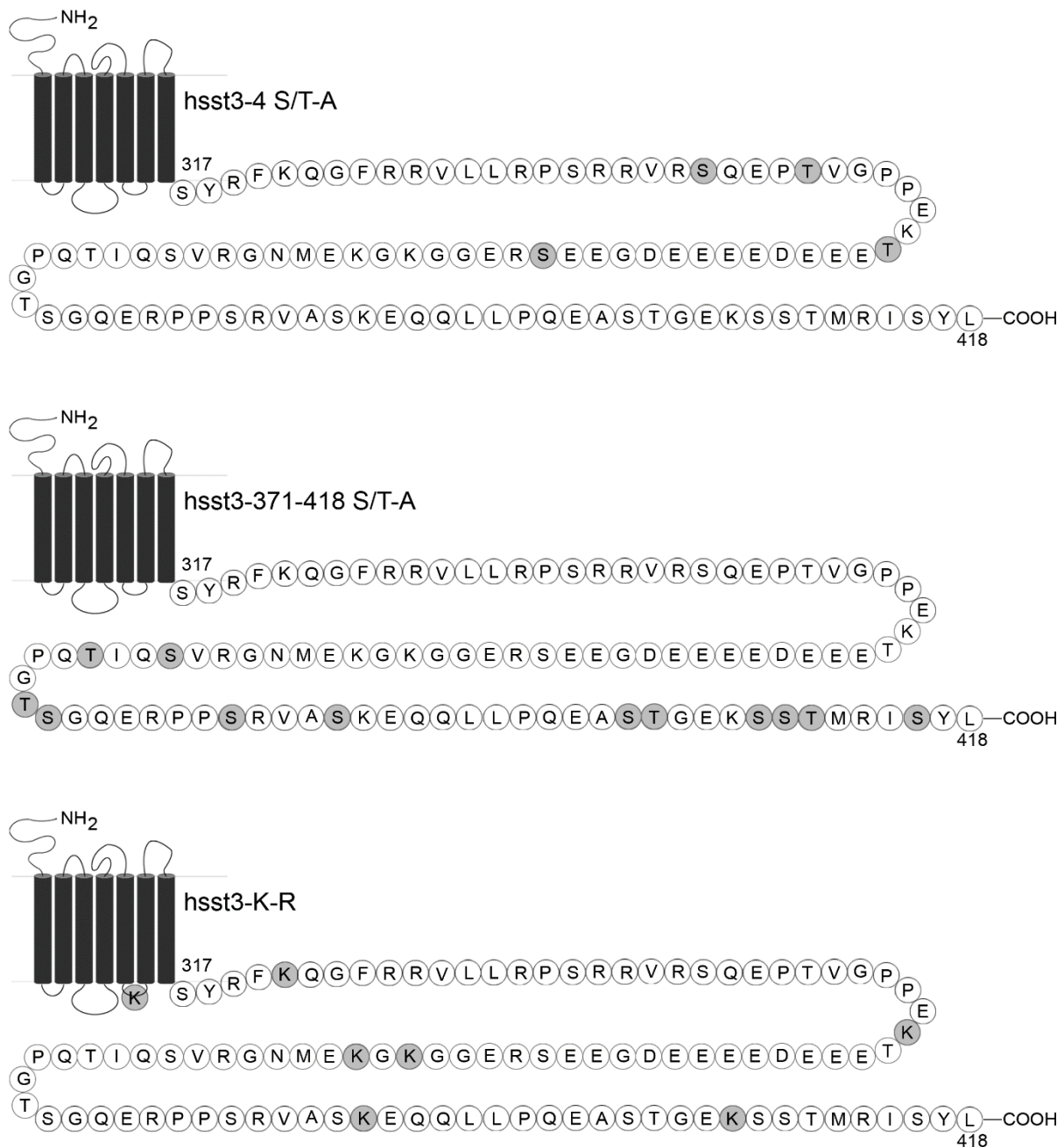


Abbildung 5: Schematische Darstellung des jeweiligen C-Terminus der hsst3-Mutanten. Innerhalb dieser Domäne befinden sich 18 potentielle Phosphorylierungsstellen und sechs Lysin-Reste. Die grau markierten Positionen zeigen die entsprechenden Aminosäuren an, die gegen Alanin bzw. Arginin ausgetauscht wurden.

3.2 Generierung von Phosphorylierungsstellen-spezifischen Antikörper

Zusätzlich wurden Antikörper von der Firma Genosphere Biotechnologies gegen die C-terminalen Phosphorylierungsstellen pSer337/ pT341 und pT348 generiert (Abbildung 6). Durch den Einsatz dieser Somatostatin-Rezeptor 3-spezifischen Phospho-Antikörper ist es möglich, Prozesse wie die agonist-abhängige Phosphorylierung oder Dephosphorylierung des Rezeptors näher zu betrachten.

Weiterhin können Fragestellungen bzgl. der möglichen Kinasen und Phosphatasen beantwortet werden, die in der Regulierung des Somatostatin-Rezeptors 3 eine entscheidende Rolle einnehmen.



Abbildung 6: Für die vorliegende Arbeit generierte Antikörper gegen sst3-Phosphorylierungsstellen. Alle potentiellen C-terminalen Phosphorylierungsstellen des Rezeptors sind grau markiert. Gegen die schwarz markierten Positionen (Ser 337/ Thr 341; Thr 348) wurden spezifische Antikörper generiert, die eine Detektion von Phosphorylierungen an diesen Stellen ermöglichen.

3.3 Konzentrationsabhängige Phosphorylierung durch Somatostatin

Zu Beginn der Arbeit wurde mit Somatostatin die konzentrationsabhängige Phosphorylierung des Rezeptors untersucht. Dazu wurden HEK-Zellen, die den sst3 stabil exprimieren, mit Somatostatin in einer Konzentration von 1 nM bis 10 μ M stimuliert (Abbildung 7). Anschließend wurden die Zellen lysiert und mittels WGA-Beads angereichert. Im Western-Blot wurden die Phosphorylierungsstellen mit den pS337/ T341- und dem pT348-Antikörper detektiert. Phosphoryliert wird sowohl das Monomer (~75 kDa) als auch das Rezeptordimer (~150 kDa) am Serin 337/ Threonin 341 und am Threonin 348, wenn Somatostatin in einer Konzentration von mindestens 10 nM eingesetzt wird. Ab 100 nM wird diese agonisten-induzierte Phosphorylierung wesentlich stärker. Die Phosphorylierung am Threonin 348 ist am Dimer etwas schwächer ausgeprägt. Als Ladekontrolle wurde der anti-HA-Antikörper eingesetzt, um aufzuzeigen, dass gleiche Probemengen aufgetragen wurden.

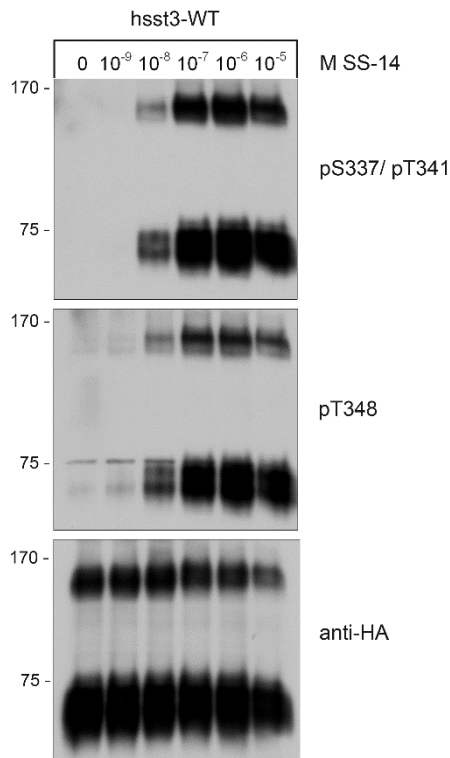


Abbildung 7: Konzentrationsabhängige Phosphorylierung des sst3 durch Somatostatin. Der sst3 wurde mit unterschiedlichen Konzentrationen an SS-14 (10^{-9} bis 10^{-5} M) behandelt. Die Phosphorylierungen an den Positionen Ser 337, Thr 341 und Thr 348 sind erst detektierbar, wenn ein Agonist den Rezeptor aktiviert.

3.4. Agonist-abhängige Phosphorylierung am sst3

Im nächsten Schritt erfolgte der Nachweis einer agonist-abhängigen und spezifischen Phosphorylierung (Abbildung 8). Für jeweils 10 min wurden der humane Wildtyp-Somatostatin-Rezeptor-3 (WT) und die vier Mutanten mit Somatostatin und dessen Analoga Octreotid, SOM230, Somatoprim und der nicht-peptidischen Substanz L-796/778 behandelt, jeweils in einer Konzentration von 1 μ M. Anschließend wurden die Zellen lysiert, die Rezeptoren angereichert und die Phosphorylierungssignale mittels Western-Blot detektiert.

Dabei kam es nur zu einer Phosphorylierung an den Monomeren und Dimeren, wenn die Rezeptoren mit den entsprechenden Liganden stimuliert werden. In unbehandelten Zellen war keine agonist-spezifische Phosphorylierung detektierbar bzw. waren die betreffenden Serin- und Threonin-Reste nicht konstitutiv phosphoryliert.

Auch zeigte sich, dass bei der 317-370 S/T-A Mutante und der 4S/T-A Mutante keine Phosphorylierungen an den Stellen Ser 337/ Thr 341 und Thr 348 nach Agonisten-Behandlung eintrat. Da die detektierbaren Serin- und Threonin-Phosphorylierungs-

stellen gegen Alanin ausgetauscht wurden, konnten auch keine Phosphorylierungssignale nachgewiesen werden. Ebenso war Somatoprim nicht in der Lage, eine Phosphorylierung am C-Terminus des sst3 auszulösen. Dasselbe konnte beobachtet werden, wenn die Zellen mit dem sst3-spezifischen Liganden L-796/778 stimuliert wurden. Auffällig ist jedoch, dass Somatostatin bei dem sst3-WT, der 371-418 S/T-A- und der K-R-Mutante die stärksten Phosphorylierungen erzeugt. Dabei wird sowohl das sst3-Monomer als auch das Homodimer phosphoryliert. Vergleicht man zusätzlich die Intensität der Phosphorylierung an der Position Ser 337/ Thr 341 mit der am Thr 348, so fällt auf, dass es am Threonin 348 zu einer etwas schwächer ausgeprägten Phosphorylierung kommt.

Die Analoga Octreotid und SOM230 induzieren zwar auch eine detektierbare Phosphorylierung, diese ist aber weniger intensiv als bei Somatostatin, was vor allem an der Stelle pT348 sichtbar wird.

Interessanterweise kam es nach Stimulierung der K-R-Mutante mit diesen zwei Agonisten zu keiner Phosphorylierung. Nur Somatostatin ist in der Lage, eine agonist-abhängige Phosphorylierung an den entsprechenden Stellen zu erzeugen. Aber auch hier zeigten sich sehr starke Unterschiede in der Intensität der Phosphorylierung. Während die pS337/ pT341- Stelle nach der 10-minütigen Somatostatin-Behandlung stark phosphoryliert wurde, war das Signal am pT348 kaum wahrnehmbar. Mittels des anti-HA Antikörpers kann der Anteil an Gesamtrezeptor detektiert werden. Dies ist ein Nachweis, dass bei allen Proben eines Rezeptors die gleichen Mengen aufgetragen wurden.

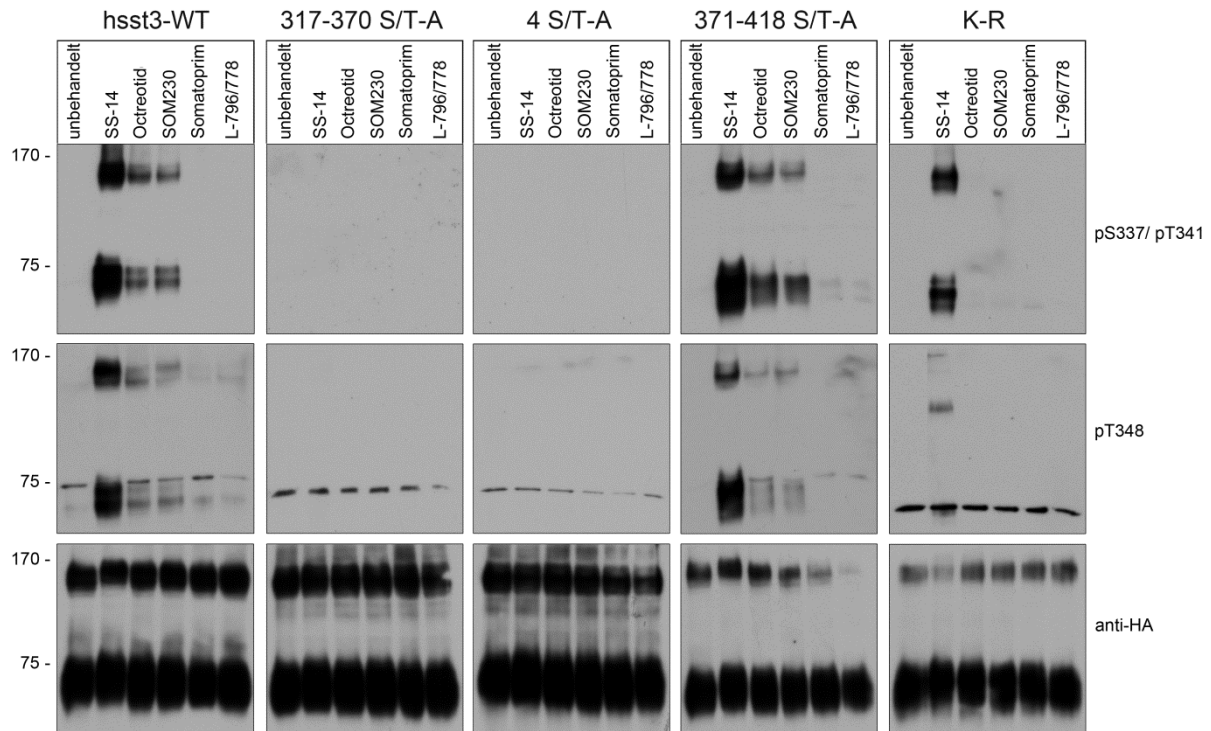


Abbildung 8: Agonist-abhängige Phosphorylierung des sst3. Der sst3-WT und die Mutanten wurden für jeweils 10 min (RT) mit SS-14, Octreotid, SOM230, Somatoprim oder L-796/778 (je 1 μ M) stimuliert. Anschließend wurden die Rezeptoren angereichert und die Phosphorylierungssignale an den Stellen Ser 337/Thr 341 und Thr 341 sowie der Gesamtrezeptor mit einem anti-HA-Antikörper detektiert.

3.5 Kinetiken der Agonist-induzierten Phosphorylierung am sst3

Als nächstes wurde der zeitliche Verlauf der Phosphorylierung betrachtet. Dazu wurde der sst3 mit jeweils 1 μ M Somatostatin, Octreotid bzw. SOM230 für 2-60 Minuten stimuliert (Abbildung 9). Die HEK-Zellen wurden nach der Behandlung mit den Agonisten für einen Western-Blot aufgearbeitet. Deutlich zu erkennen ist die schnell einsetzende Phosphorylierung durch Somatostatin. Die Phosphorylierung an der Stelle Ser 337/ Thr 341 bleibt an den Monomeren und Homodimeren über den gesamten Stimulationszeitraum von 60 min erhalten. Am Threonin 348 des Monomers kommt es zwar auch zu Beginn der Stimulation zu einer starken Phosphorylierung, aber nachdem die Stärke ihr Maximum nach 15 min erreicht hat, nimmt die Intensität danach deutlich ab. Das heißt, dass beide Phosphorylierungsstellen eine unterschiedliche Kinetik aufweisen. Wie aus Abbildung 8 hervorgeht, induzieren Octreotid und SOM230 eine deutlich schwächere Phosphorylierung am sst3 als der natürlich vorkommende Ligand Somatostatin. Unter denselben Versuchsbeding-

ungen setzen die Phosphorylierungen an den Stellen Ser 337 und Thr 341 erst nach einer 10-minütigen Stimulation ein, wobei das Maximum erst nach etwa 30 min erreicht ist. Die Phosphorylierung am Thr 348 beginnt zwar kurz nach der Stimulierung, ist allerdings schwächer ausgeprägt, obwohl die Intensität über den gesamten Zeitraum relativ stabil bleibt.

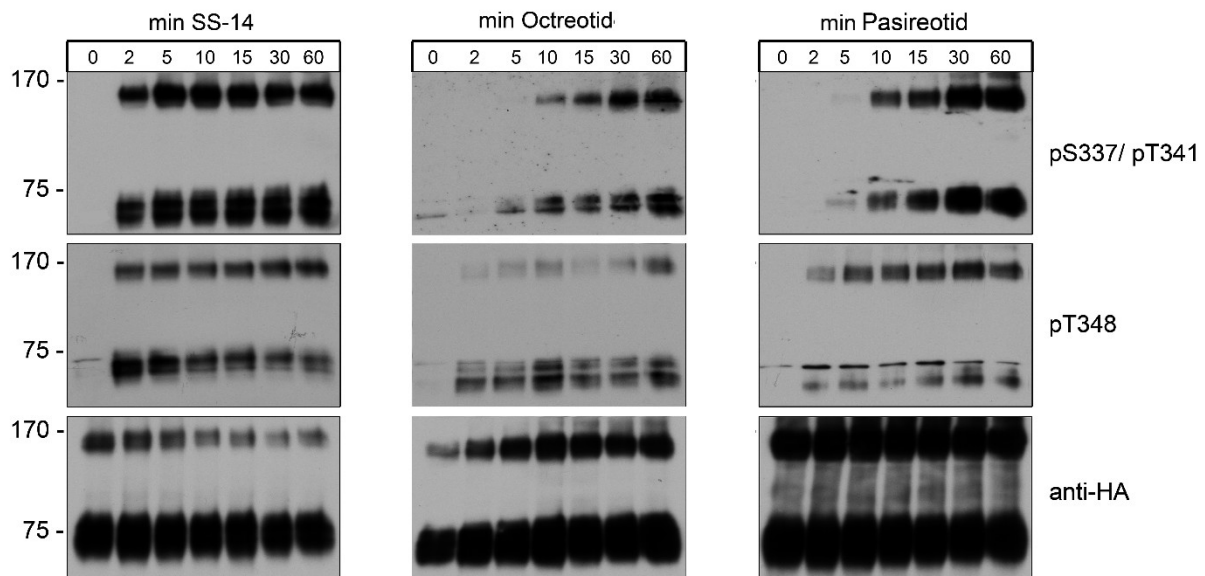


Abbildung 9: Zeitverlauf der Phosphorylierung am sst3. Der sst3 wurde mit je 1 μ M Somatostatin, Octreotid oder Pasireotid für den angegebenen Zeitraum von 0 min bis zu 60 min stimuliert. Dargestellt sind die Phosphorylierungskinetiken an den zwei Phosphorylierungsstellen.

Aus dem vorangegangenen Experiment (Abbildung 8) ist zu entnehmen, dass die L-796/ 778-Substanz keine Phosphorylierung an den zu untersuchenden Rezeptoren auslöste. Die Partialagonisten Octreotid und SOM230 bewirkten zum Teil erst nach einer 10-minütigen Stimulierung ein entsprechendes Signal. Um eine Phosphorylierungsfähigkeit des nicht-peptidischen Liganden sicher auszuschließen, wurde der sst3 mit diesem über eine Stunde lang behandelt. Allerdings war auch nach dieser Zeit keine Phosphorylierung an den Stellen Ser337/ Thr 341 und Thr348 nachzuweisen (Abbildung 10).

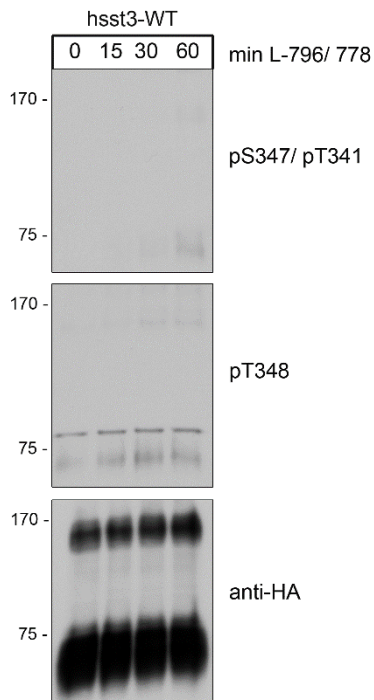


Abbildung 10: Ausbleibende Phosphorylierung am sst3 nach Stimulation mit dem spezifischen sst3-Liganden L-796/778. Der sst3 wurde mit seinem spezifischen Liganden L-796/778 für 60 min stimuliert. Weder am Ser 337/ Thr 341 noch am Thr 348 kam es zu einer Phosphorylierungen.

3.6 Homologe und heterologe Aktivierung des sst3

Nachdem die agonist-abhängigen und zeitlichen Verläufe der Phosphorylierung am sst3 untersucht wurden, stellte sich nun die Frage, welche Kinasen in diesen Prozess involviert sind. Dabei unterscheidet man zwischen einer homologen Phosphorylierung und einer heterologen Aktivierung des Rezeptors.

Im Falle einer heterologen Phosphorylierung kommen in erster Linie die Proteinkinase A und C (PKA, PKC) in Betracht. Um eine Beteiligung dieser Kinasen zu erfassen, wurden die sst3-exprimierenden Zellen außer mit Somatostatin (1 μ M) entweder mit 0,1 μ M Phorbol-12-myristat-13-acetat (PMA) oder mit 10 μ M Forskolin für 15 min (RT) stimuliert. PMA ist ein direkter Aktivator der Proteinkinase C. Forskolin ist ein direkter, nicht-selektiver Stimulator der Adenylatcyclase (Ausnahme AC₉), woraufhin die Proteinkinase A aktiviert wird. Im Anschluß an die Behandlung wurden die Zellen lysiert. Der Rezeptoranreicherung folgte die Detektierung der Phosphorylierungssignale im Western-Blot.

Da weder PMA noch Forskolin zu einer Phosphorylierung führt, kann für den sst3 eine heterologe Phosphorylierung ausgeschlossen werden (Abbildung 11).

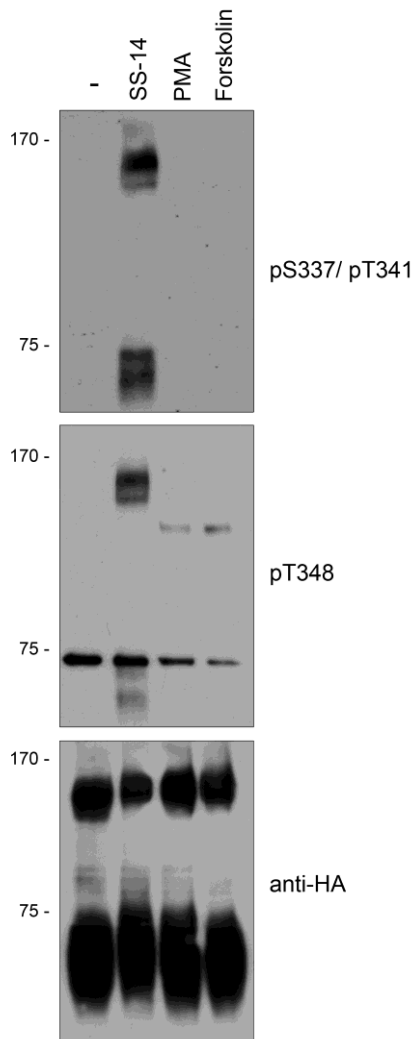


Abbildung 11: Untersuchung einer möglichen heterologen Phosphorylierung des sst3. Hierfür wurden der sst3 mit den PKA- und PKC-Aktivatoren Forskolin und PMA für 15 min (RT) stimuliert. Als Kontrolle dienten die SS-14 vermittelten Phosphorylierungen.

Da es sich bei dem sst3 um einen GPCR handelt, kommen nur die G-Proteingekoppelten-Rezeptorkinasen (GRKs) für eine homologe Phosphorylierung am C-Terminus in Frage. Um den Einfluss dieser GRKs untersuchen zu können, wurden diese mithilfe spezifischer siRNAs herunter reguliert. Nach Behandlung der Zellen mit diesen siRNAs und der darauf folgenden Stimulierung mit Somatostatin ist im Blot deutlich erkennbar, dass nach Herunterregulation der GRK 2 und GRK 3 eine sehr viel schwächere Phosphorylierung auslöst wurde (Abbildung 12 A). Abbildung 12 B zeigt, dass der Knock-down der GRKs in den sst3-exprimierenden Zellen effektiv erfolgt war.

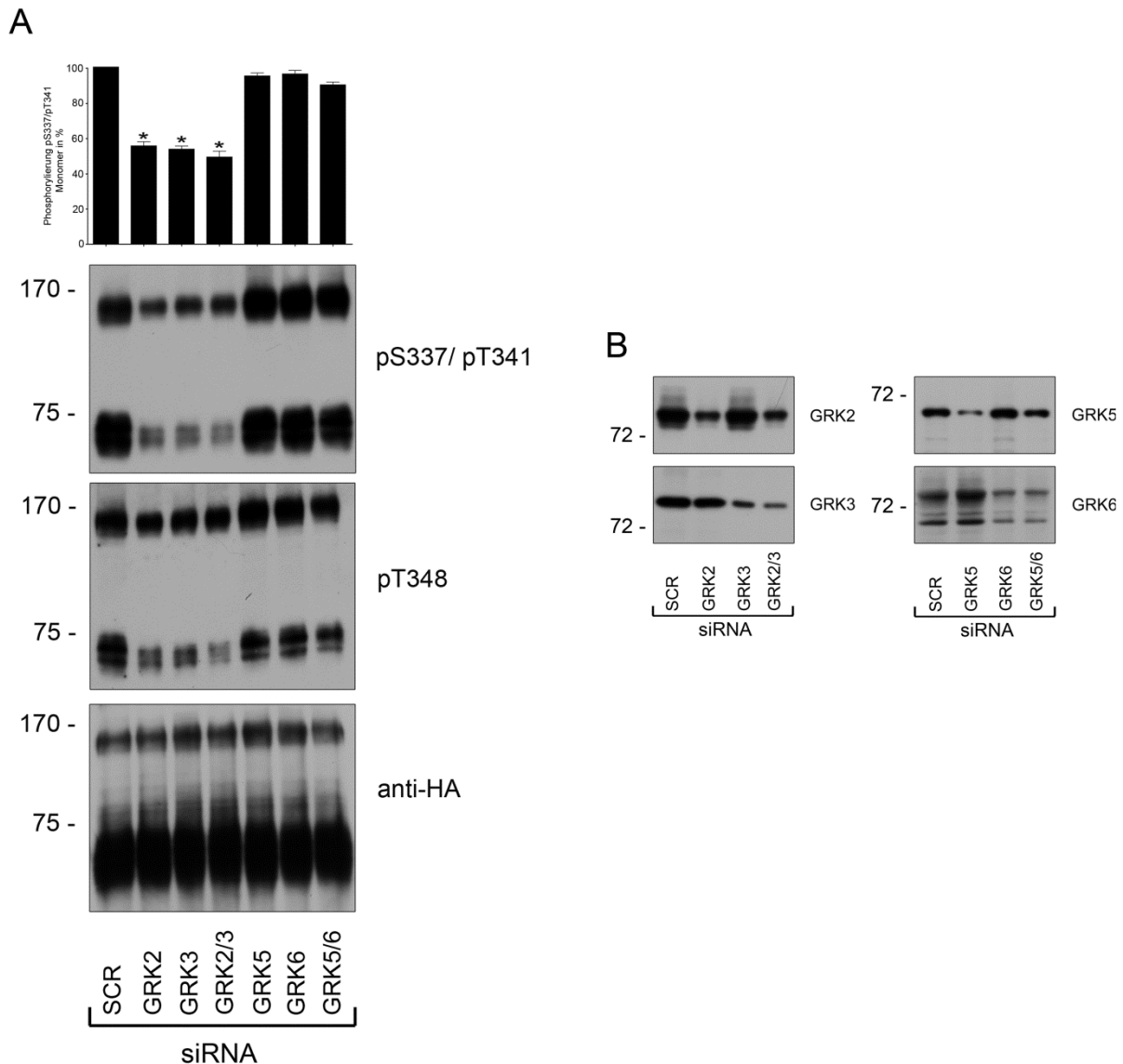


Abbildung 12: Analyse der GRK-vermittelten Phosphorylierung des sst3. A) Die sst3 exprimierenden Zellen wurden mit den spezifischen siRNAs für die verschiedenen GRKs transfiziert. Nach einer 72-stündigen Inkubationszeit erfolgte die Stimulierung der Zellen mit 1 μ M Somatostatin (10 min, RT). Anhand der Reduzierung der entsprechenden Phosphorylierungssignale können diejenigen GRKs identifiziert werden, die für die Phosphorylierung des Rezeptors essentiell sind. Die Auswertung der Phosphorylierungssignale (pS337/ pT341 Monomer) erfolgte per ImageJ. Die Signifikanz bezieht sich auf die Phosphorylierung der Scr-Kontrolle. B) Diese Abbildung zeigt die Spezifität und Effektivität des GRK-Knockdowns an.

3.7 Dephosphorylierungskinetik am sst3

Neben der Phosphorylierung wird auch die Dephosphorylierung agonist-abhängig am sst3 reguliert (Abbildung 13). Für die Untersuchung der Dephosphorylierung wurden die Zellen zunächst mit 1 μ M Somatostatin für 10 Minuten (RT) stimuliert.

Anschließend erfolgte ein Auswaschen des Liganden und die Inkubation der Zellen in agonist-freiem Medium für die angegebene Zeitdauer. Diese Zeitdauer wird als „washout“ (WS) bezeichnet. Nach dem WS erfolgte die Zellyse und die Anreicherung der Rezeptoren mit WGA-Beads.

Im Western-Blot ergaben sich je nach Phosphorylierungsstelle unterschiedliche Kinetiken. Während die Phosphorylierung am Thr 348 nach wenigen Minuten entfernt wurde (vor allem an den Monomeren), dauerte dieser Prozess am Ser 337/ Thr 341 wesentlich länger. Nach einer Stunde lagen alle Monomere und Dimere wieder nahezu dephosphoryliert vor.

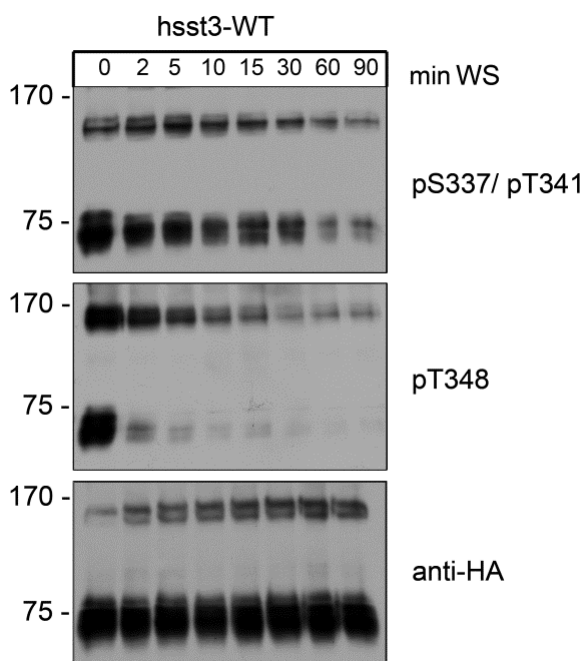


Abbildung 13: Zeitverlauf der Dephosphorylierung des sst3. Für die Aufnahme der Dephosphorylierungskinetiken wurden die sst3-WT-Zellen mit 1 μ M SS-14 stimuliert (Washout 0 min) und nach dem Auswaschen des Agonisten für entsprechende Zeit in liganden-freiem Medium inkubiert (WS 2-60 min). Dabei zeigte sich, dass beide Phosphorylierungsstellen unterschiedlich schnell dephosphoryliert werden.

3.8 Identifizierung der Dephosphorylierung-regulierenden Phosphatasen

Um die für die Dephosphorylierung verantwortlichen Phosphatasen festzustellen, wurden die sst3-exprimierenden Zellen vor und während der Somatostatin-Stimulierung und des darauffolgenden WS mit Phosphatase-Inhibitoren behandelt. Bei den verwendeten Inhibitoren handelte es sich um Calyculin A und die Okadasäure. Beide Substanzen inhibieren effektiv die Protein-Phosphatasen PP2, PP4 und PP5.

Calyculin A hemmt zusätzlich die katalytische Aktivität der PP1 (Cohan et al. 2005; Honkanen et al. 2002). Für den Versuch wurden Konzentrationen von 5-50 nM der Inhibitoren eingesetzt. Nach dem WS wurden die sst3-WT Zellen lysiert und mit WGA-Beads angereichert.

Im Blot sieht man, dass die Okadasäure keinen größeren Einfluss auf die Dephosphorylierung hatte (Abbildung 14 A). Im Vergleich zu den inhibitorfreien Zellen ist dieser Prozess kaum oder nur sehr wenig beeinflusst. Anders hingegen sieht es bei den Zellen aus, die mit Calyculin A behandelt wurden (Abbildung 14 B). Vor allem in einer Konzentration von 30 nM hemmt diese Substanz die katalytische Funktion der Phosphatasen. Diese Hemmung ist durch eine anhaltende Phosphorylierung sowohl an den Monomeren als auch an den Dimeren zu sehen.

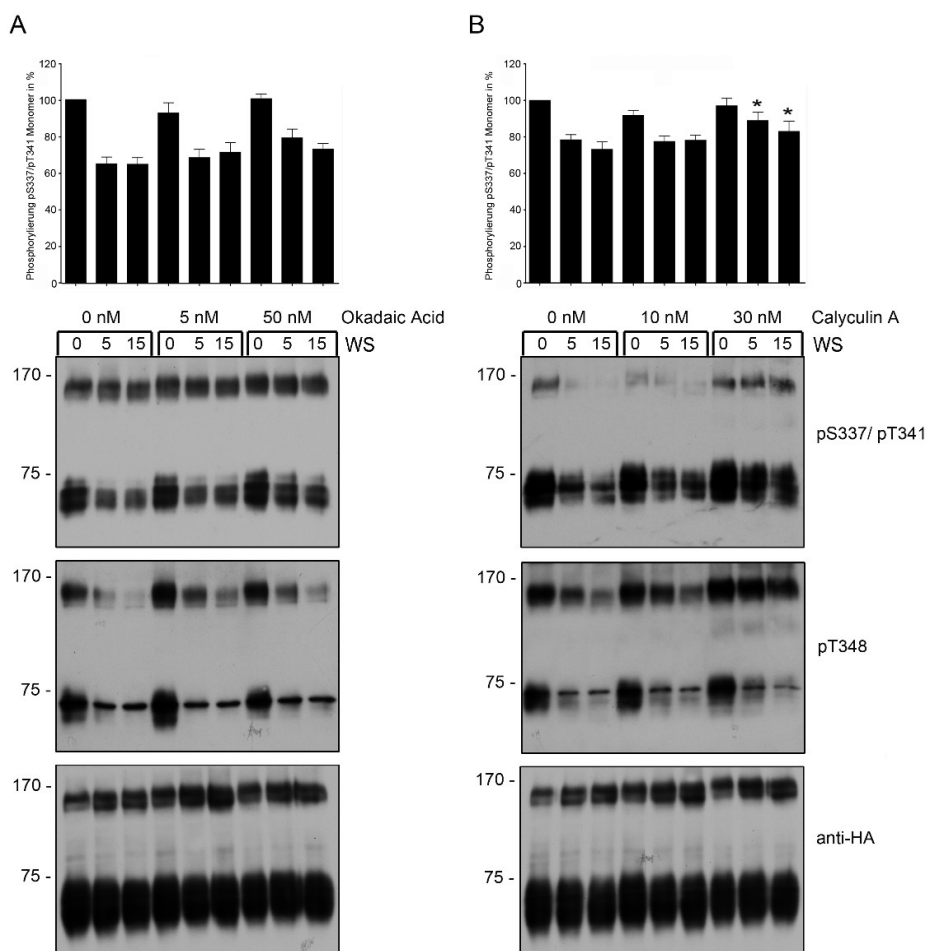


Abbildung 14: Calyculin A inhibiert die Dephosphorylierung des sst3. Okadasäure und Calyculin A hemmen die Funktion der PP2, PP4 und PP5. Zusätzlich wird durch Calyculin A die katalytische Aktivität der PP1 gehemmt. Die Zellen wurden vor der Stimulierung mit 1 μ M Somatostatin 10 min mit den entsprechenden Konzentrationen an Inhibitoren bei 37 °C vorinkubiert. Die Stimulation (bei 37°C) und der darauf folgende Washout (WS) wurden ebenfalls in Anwesenheit der Inhibitoren durchgeführt. Die Auswertung der Phosphorylierungen (pS337/ pT341 Monomer) erfolgte per ImageJ. Die Hemmung der Dephosphorylierung durch Calyculin A (30 nM) ist signifikant im Vergleich zur Kontrollgruppe.

Ausgehend vom Ergebnis aus Abbildung 14 scheint vor allem die Protein-Phosphatase 1 für die Dephosphorylierung der C-terminalen Serin- und Threonin-Reste zuständig zu sein. Um im nächsten Schritt herauszubekommen, welche katalytischen Untereinheiten der PP1 für diesen Prozess verantwortlich sind, wurden wie im Falle der GRK-Identifizierung spezifische siRNAs eingesetzt. Nach der Inkubation der Zellen mit den entsprechenden siRNAs für 72 h erfolgte die Stimulierung mit Somatostatin (1 μ M) und ein WS für 5 bzw. 15 Minuten. Detektiert wurden die Phosphorylierungssignale im Western-Blot, nachdem die behandelten Zellen lysiert und die sst3-Rezeptoren angereichert wurden. In Abbildung 15 A ist deutlich erkennbar, dass für beide detektierbaren Phosphorylierungsstellen die Signale länger erhalten bleiben, wenn zuvor ein Knockdown der PP1 α und PP1 β erfolgte. Das Herunterregulieren der PP1 γ hatte für den Dephosphorylierungsprozess am sst3 dagegen keinen Einfluss. Abbildung 15 B zeigt den effektiven Knockdown der PP1-Untereinheiten α an.

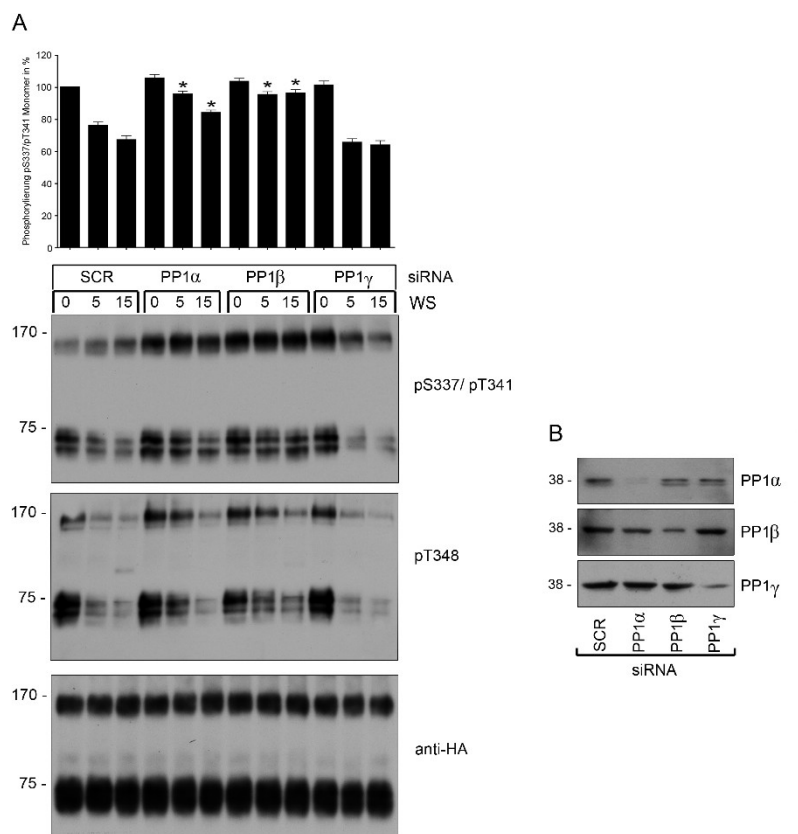


Abbildung 15: Die PP1 α und die PP1 β katalysieren die Dephosphorylierung des sst3. A) Der Knockdown der katalytischen PP1-Untereinheiten wurde mittels spezifischer siRNA erreicht. Nach der 10-minütigen Stimulierung mit Somatostatin wurde ein WS durchgeführt, mit dem gezeigt werden konnte, dass PP1 α und β signifikant die Dephosphorylierung regulieren. Die Auswertung der Phosphorylierungs-Signale (pS337/ pT341 Monomer) erfolgte per ImageJ. B) Der Western Blot zeigt die Spezifität und Effektivität des Knockdowns katalytischen Untereinheiten der PP1 an.

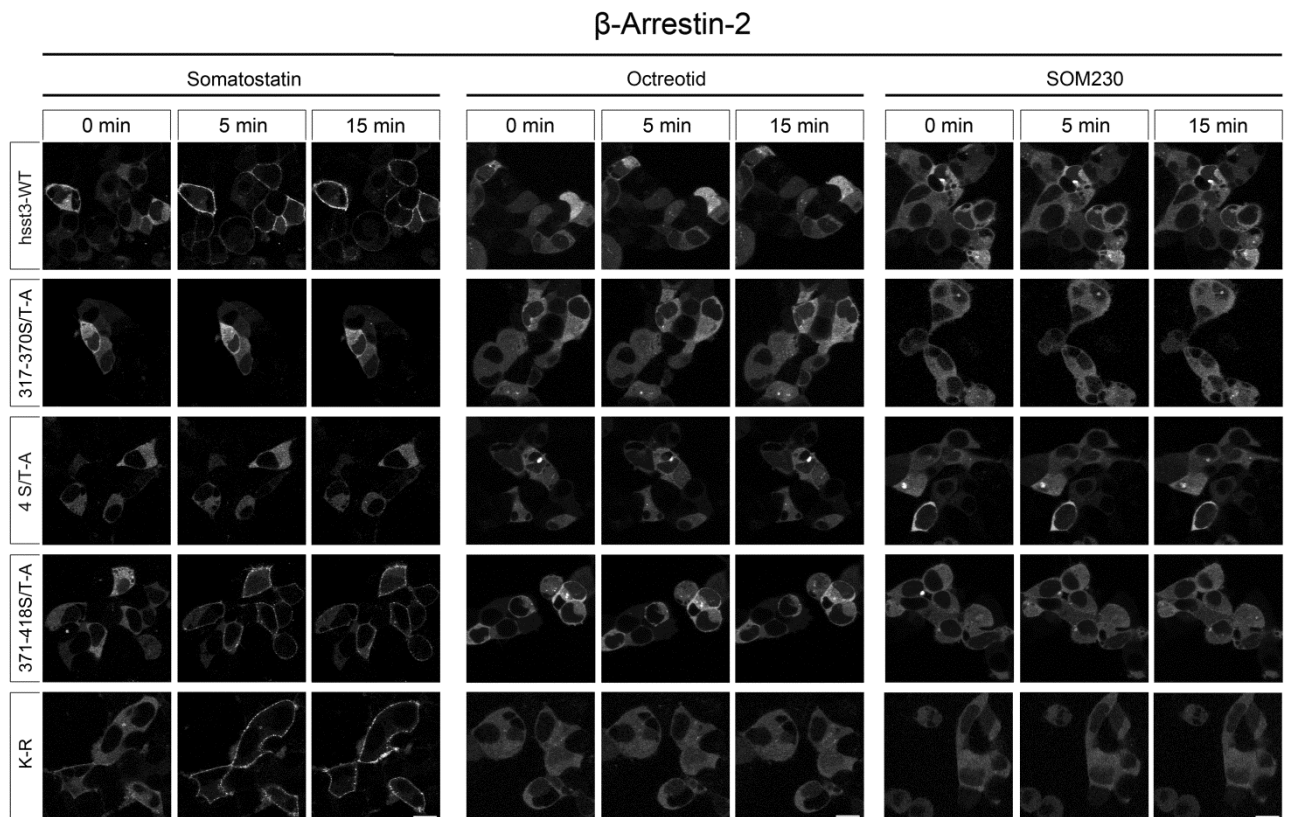
3.9 Agonist-abhängige Rekrutierung des β -Arrestin-1 und -2

Für die Internalisierung des sst3 ist vor allem eine agonisten-abhängige Phosphorylierung durch die GRKs und die anschließende β -Arrestin-Rekrutierung an die Membran notwendig. Das β -Arrestin bewirkt dann die Desensibilisierung des Rezeptorsignals und die Internalisierung des Liganden-Rezeptor-Komplexes über Clathrin-beschichtete Vesikel.

Insgesamt gibt es vier verschiedene Arrestine, wobei für den sst3-Rezeptor die Arrestin-1- und Arrestin-4-Isoformen keine Relevanz haben, da diese überwiegend im Auge exprimiert werden (Gurevich et al. 2011). Die sogenannten β -Arrestine-1 und -2 (auch als Arrestin-2 und -3 bekannt) sind die nicht-visuellen Arrestine, die ubiquitär exprimiert werden und für die Desensibilisierung der meisten GPCRs verantwortlich sind (Marchese et al. 2003).

Für den humanen sst3 wurde deshalb die β -Arrestin-1- und -2-Rekrutierung näher untersucht (Abbildung 16 a, b). Dazu wurden native HEK Zellen mit dem entsprechenden Rezeptor (WT oder Mutante) und einem GFP-gekoppelten β -Arrestin transfiziert. 24 h später erfolgte das live cell imaging. Die Zellen wurden vor und nach der Agonisten-Stimulierung für einen Zeitraum von 15 min aufgenommen. Beide β -Arrestine sind unter basalen Bedingungen im Cytoplasma lokalisiert. Kommt es durch die Aktivierung des Rezeptors zu einer C-terminalen Phosphorylierung, kann im Normalfall eine Translokation der Arrestine an die Membran beobachtet werden. In Abbildung 16 ist die β -Arrestin-2-Rekrutierung nach Stimulation der Rezeptoren unter dem Einfluss der Mutationen zu sehen. Auffällig ist in erster Linie, dass alle eingesetzten Substanzen bis auf das Somatostatin nicht in der Lage waren, am sst3-WT oder den Mutanten eine Translokation des β -Arrestin-2 zu induzieren, obwohl die Partialagonisten Octreotid und SOM230 eine Rezeptorphosphorylierung auslösen können. Im Falle des Somatostatins ist die Rekrutierung des β -Arrestin-2 sehr gut zu erkennen. Vor Beginn der Stimulierung lag das β -Arrestin-2 im Cytoplasma vor, wurde aber nach Somatostatin-Behandlung sehr schnell an die Membran rekrutiert und blieb dort auch über einen längeren Zeitraum lokalisiert. Eine Internalisierung der Liganden-Rezeptor-Komplexe mit dem Arrestin war nicht zu beobachten. Dasselbe Verhalten wie der WT zeigten auch die 371-418 S/T-A-Mutante und sogar die K-R-Mutante. Hier hatten die Mutationen keinen negativen Einfluss auf die β -Arrestin-2-Translokation. Waren allerdings die proximalen Serin- und Threonin-Reste mutiert,

dann verblieb das β -Arrestin-2 auch nach Somatostatin-Stimulierung im Cytoplasma vorliegen.



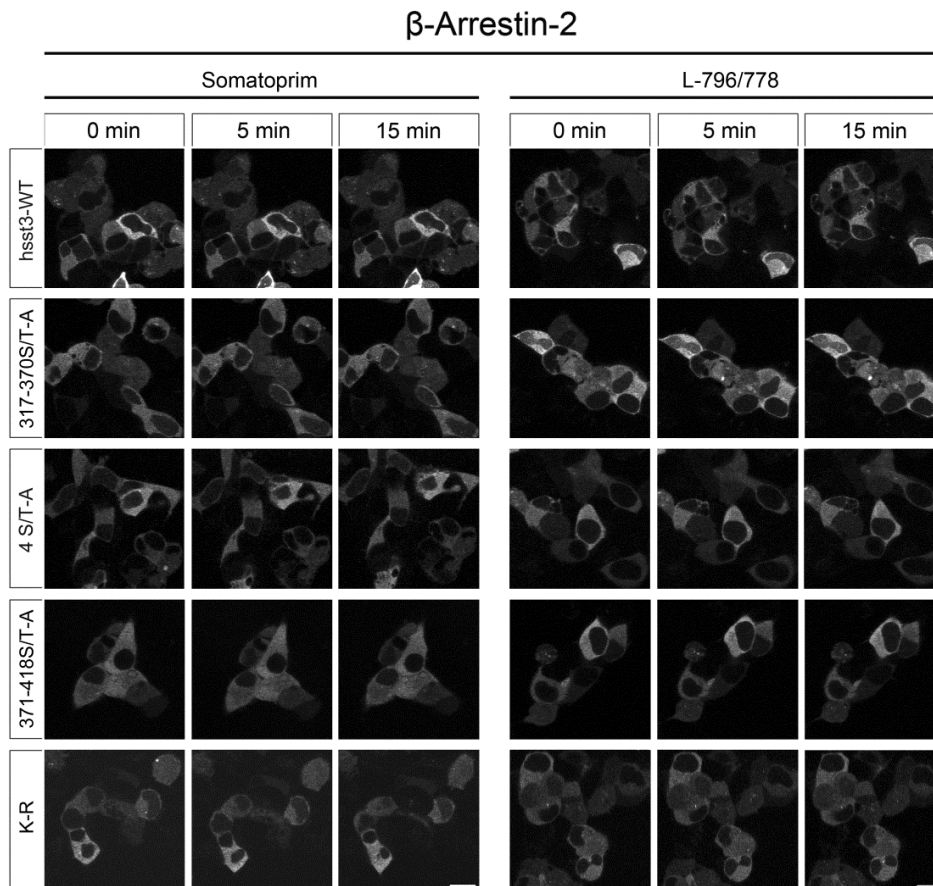


Abbildung 16: Rekrutierung von β -Arrestin-2. Die Translokation des β -Arrestin-2-EGFP wurde per live cell imaging aufgenommen. Nach Stimulierung aller sst3-Formen mit SS-14, Octreotid, Pasireotid, Somatoprim oder L-796/778 konnte nur der natürlich vorkommende Ligand eine Translokation des cytoplasmatisch vorliegenden β -Arrestin-2 an die Membran hervorrufen. Für die Rekrutierung sind vor allem die Serine 337, 361 und die Threonine 341 und 348 essentiell. Die Bilder wurden bei einer Wellenlänge von 488 nm am LSM 510 META (Carl Zeiss, Jena, Dtl.) aufgenommen.

Wurde unter gleichen Bedingungen das β -Arrestin-1-Verhalten überprüft, ergab sich ein leicht verändertes Bild (Abbildung 17). Wie beim β -Arrestin-2 erzeugten die Partialagonisten Octreotid und SOM230 sowie das Somatoprim und der sst3-spezifische Ligand L-796/778 keine Rekrutierung des β -Arrestin-1 an die Zellmembran. Aber auch das Somatostatin selber konnte keine dauerhafte Translokation des β -Arrestin-1 induzieren. Beim sst3-WT, der 371-418 S/T-A-Mutante und der K-R-Mutante ist nur eine schwache, transiente Bindung des β -Arrestin-1 an den Rezeptoren zu beobachten (Abbildung 17, Zeitpunkt 5 min). Nach 15 min war der größte Teil des rekrutierten β -Arrestin-1 nicht mehr an der Membran lokalisiert.

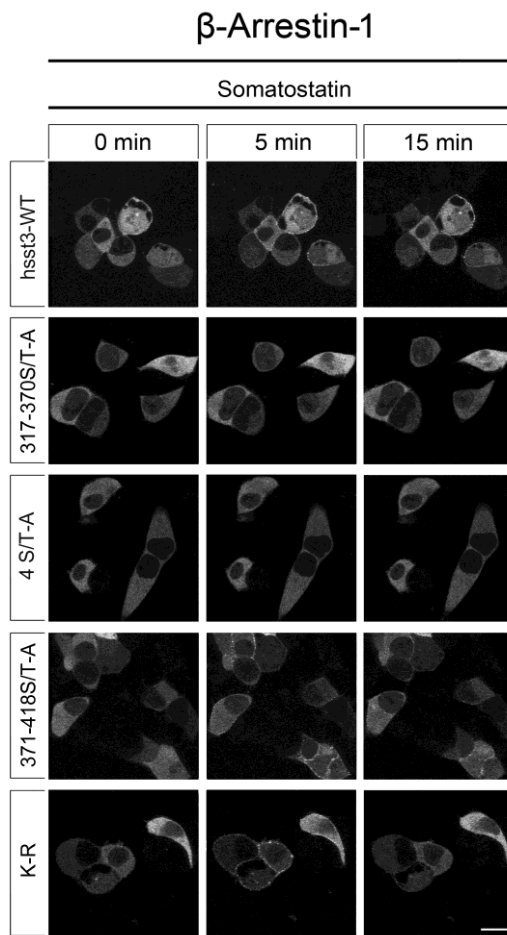


Abbildung 17: Rekrutierung von β -Arrestin-1. Wie bei der β -Arrestin-2-Rekrutierung wurden die unterschiedlichen Rezeptoren mit den verschiedenen Liganden behandelt und per live cell imaging aufgenommen. Einzig SS-14 verursachte eine schwache Translokation des β -Arrestin-1 an die Membran. Allerdings war im Vergleich zum β -Arrestin-2 die Bindung des β -Arrestin-1 nicht lange stabil.

Das zeigt, dass der sst3 zwar beide nicht-visuellen Arrestine an die phosphorylierten Serin- und Threonin-Reste im C-Terminus rekrutieren kann, aber die Bindung des β -Arrestin-2 wesentlich stärker ist und auch über einen längeren Zeitraum hin erhalten bleibt als es beim β -Arrestin-1 der Fall ist. Diese Translokation der Arrestine ist nur nach Stimulierung mit Somatostatin möglich.

3.10 Internalisierung des Somatostatin-Rezeptors 3 nach Behandlung mit verschiedenen Agonisten

Im nächsten Schritt wurde die agonist-abhängige Internalisierung qualitativ und quantitativ untersucht. Die Endozytose des sst3 ist dabei von der Interaktion des β -Arrestins mit Clathrin und α -Adaptin abhängig.

Um eine qualitative Aussage über eine stattfindende Internalisierung zu erhalten, wurde eine Immunzytochemie durchgeführt (Abbildung 18). In welchem Ausmaß die Endozytose erfolgte, wurde mittels ELISA analysiert (Abbildung 19).

Bei der Immunzytochemie wurden die verschiedenen sst3-Formen für einen Zeitraum von 30 Minuten mit den Liganden (1 μ M) stimuliert. Anschließend wurden die Zellen gewaschen, fixiert, permeabilisiert, blockiert und mit dem HA-Antikörper inkubiert. Als Sekundärantikörper diente der Alexa488-gekoppelte Anti-Kaninchen-Antikörper. Bei der quantitativen Ermittlung der Internalisierungsraten mittels ELISA wurden die Zellen zunächst mit dem HA-Antikörper inkubiert. Erst danach erfolgte eine 30-minütige Stimulierung der Zellen. Die darauffolgenden Schritte beinhalteten das Waschen, Fixieren, Permeabilisieren und Blockieren der Zellen. Hinterher fand die Inkubation mit dem HRP-gekoppelten Sekundärantikörper und danach mit dem HRP-Substrat ABTS statt. Nachdem die Farbreaktion abgelaufen war, wurde die Absorption bei 405 nm gemessen.

In den immunzytochemischen Aufnahmen zeigten alle Rezeptoren eine sehr gute Membranständigkeit, wenn sie unstimuliert in den Zellen vorlagen. Dieses Verhalten änderte sich allerdings nicht bei den 317-370 S/T-A- und den 4 S/T-A-Mutanten, wenn die Zellen mit einem Agonisten behandelt wurden (die Internalisierungsraten betragen bei diesen beiden Rezeptoren jeweils weniger als 6 %). Auch eine Stimulation der Zellen mit Somatoprim hatte keinen Einfluss auf die Lokalisation der Rezeptoren. Dieser Ligand ist aufgrund seiner nicht vorhandenen Affinität zum sst3 weder in der Lage eine Phosphorylierung am C-Terminus auszulösen noch eine β -Arrestin-1/2-Rekrutierung zu induzieren.

Obwohl die L-796/778-Substanz ein ähnliches Muster wie das Somatoprim zeigte, bewirkt die Bindung an den sst3 eine geringfügige Internalisierung. Diese Internalisierung ist jedoch nur beim sst3-WT und der 371-418 S/T-A-Mutante sichtbar. Aber im Vergleich zum SS-14 oder zu den Analoga sind die Internalisierungsraten mit etwa 10 % sehr gering. Wenn die Zellen mit den Partialagonisten Octreotid und Pasireotid stimuliert wurden, zeigte sich bei allen phosphorylierungsfähigen Rezeptoren (WT, 371-418 S/T-A, K-R) eine Internalisierung, die hinsichtlich der Qualität und Quantität (zwischen 12 % und 21%) relativ ähnlich war.

Die größten Unterschiede zwischen den verschiedenen Rezeptor-Varianten zeigten sich bei der Somatostatin-vermittelten Endozytose. Am stärksten ausgeprägt war die Internalisierung beim sst3-WT, der nach der 30-minütigen Stimulierung zu etwa 64%

internalisiert vorlag. Wenn aber die distalen Phosphorylierungsstellen mutiert waren, war die Somatostatin-induzierte Endocytose bereits reduziert. Die Internalisierungsrate der 371-418 S/T-A-Mutante betrug nur noch 40 %. Erstaunlicherweise hatten die Mutation der sieben intrazellulären Lysin-Reste einen noch größeren Einfluss auf die Internalisierung als die Mutation der letzten 12 Serin- und Threonin-Reste im C-Terminus. Die K-R-Mutante zeigte zwar auch eine Internalisierung, diese war aber im Vergleich zum sst3-WT mit etwa 30 % um etwa die Hälfte reduziert.

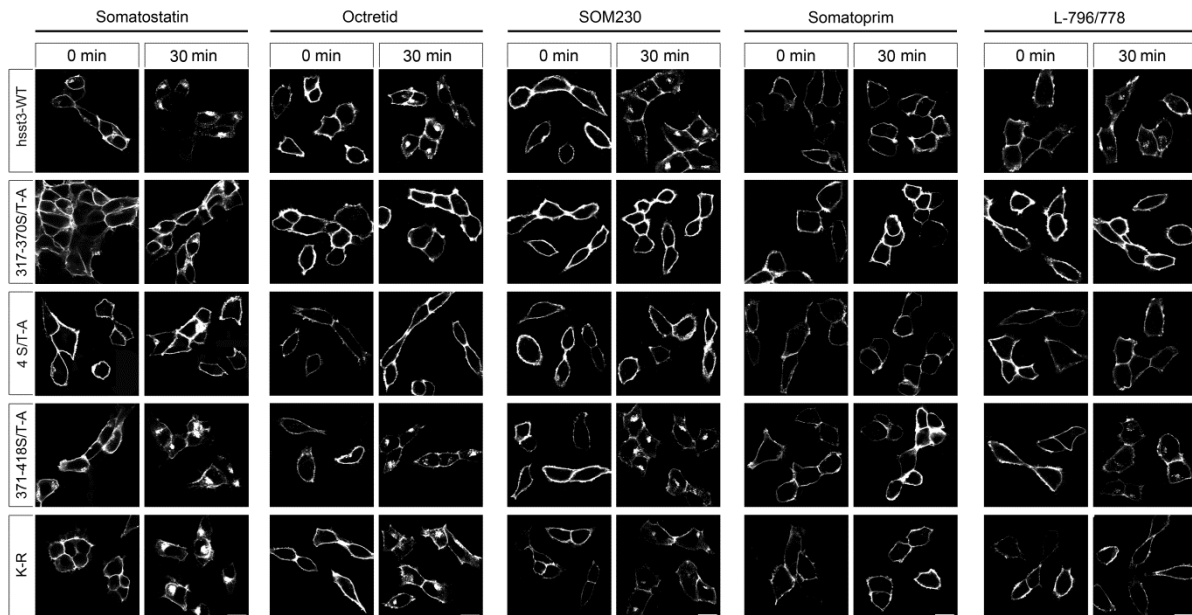


Abbildung 18: Immunzytochemische Untersuchung der agonist-abhängigen Internalisierung. Für die qualitative Auswertung der Internalisierung wurden alle sst3-Formen mit den verschiedenen Liganden für 30 min stimuliert. Somatostatin induzierte dabei die stärkste Internalisierung der membranständigen Rezeptoren, wobei die Mutation proximaler Serin- und Threonin-Reste den Endocytose-Prozess verhinderte.

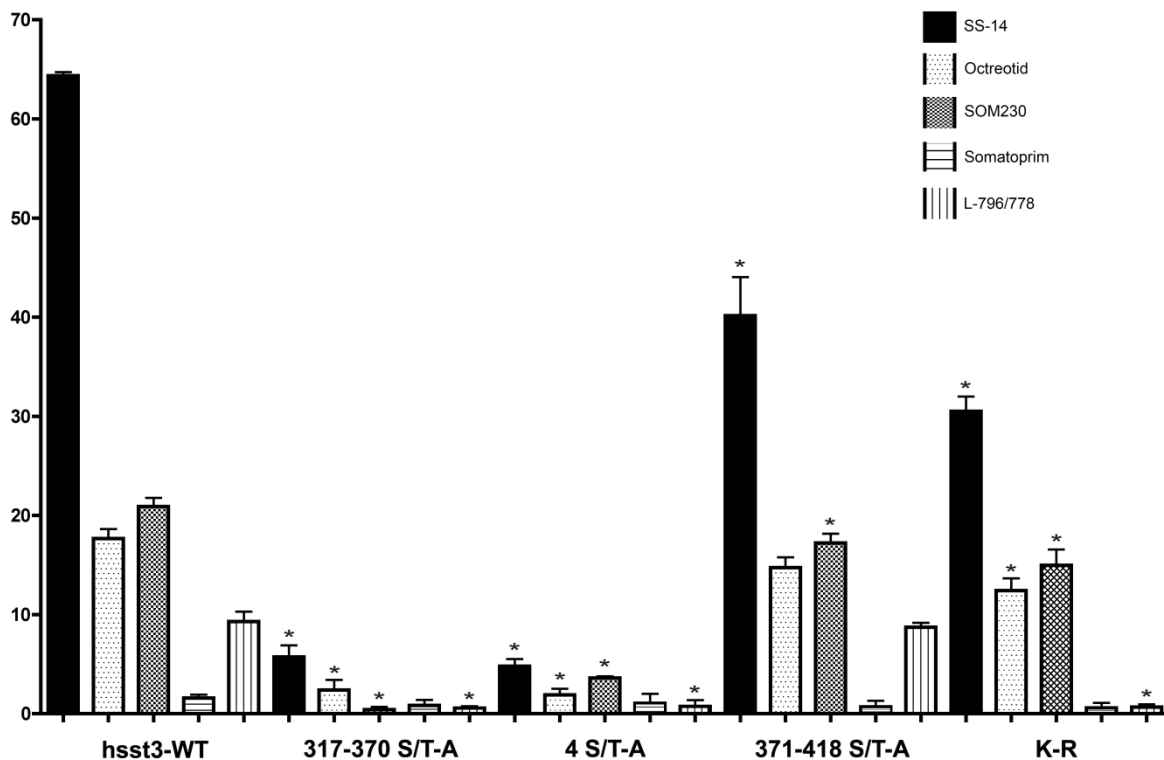


Abbildung 19: Quantitative Auswertung der Internalisierung nach 30 min. Wie bei der Immunzytochemie wurden für den ELISA (siehe Methodenteil) die Zellen mit den unterschiedlichen Rezeptoren 30 min mit den verschiedenen Liganden stimuliert. Die Absorption wurde bei 405 nm an der Fusion™ gemessen. Die Reduzierungen der einzelnen agonist-vermittelten Internalisierungsraten der Rezeptor-Mutanten sind signifikant gegenüber dem WT.

3.11 Einfluss der Mutationen auf das Recyclingverhalten des sst3

Nach der Internalisierung von GPCRs können zwei unterschiedliche Prozesse ablaufen. Entweder die Rezeptoren werden im sauren pH von Lysosomen abgebaut oder sie werden in den Endosomen dephosphoryliert und zurück an die Membran transportiert (Recycling).

Für den rsst3 wurden diese Vorgänge schon genauer untersucht. Zusammen mit dem Somatostatin internalisiert dieser Rezeptor sehr schnell über den endosomalen Weg, wobei seine Internalisierungsrate 60-70 % beträgt (Tulipano et al. 2004; Roth et al. 1997). Allerdings konnte auch gezeigt werden, dass nur ein geringer Anteil des internalisierten Rezeptors degradiert wird (Tower-Gilchrist et al. 2011).

Für den humanen sst3 wurden ebenfalls diese Mechanismen untersucht. Wie bei der Internalisierung wurden beim Recycling eine quantitative und eine qualitative Analyse (Abbildung 20, 21) durchgeführt. Das Rezeptorrecycling wurde methodisch wie eine Immunzytochemie bearbeitet. Allerdings erfolgte nach der 30-minütigen

Stimulierung mit Somatostatin ein Washout (Inkubation der Zellen in agonistenfreiem Medium) über eine Zeitspanne von 90 min. In dieser Zeit kann man ermitteln, zu welchem Anteil die Rezeptoren erneut in die Membran eingebaut werden. Für die quantitativen Werte (Abbildung 21) wurde wiederum ein ELISA durchgeführt, allerdings mit dem Unterschied, dass die Inkubation mit dem HA-Antikörper erst nach der Stimulierung und dem WS erfolgte. Wie in Abbildung 18 war auch hier (Abbildung 20) eine Internalisierung der Rezeptoren (WT, 371-418 S/T-A-, K-R-Mutante) nach 30-minütiger Stimulierung zu beobachten. Der sst3-WT benötigte nach der Somato-statin-induzierten Internalisierung etwa 90 min, um wieder vollständig in die Membran eingebaut zu werden. Dieselbe Kinetik war auch bei der 371-418 S/T-A-Mutante zu beobachten. Diese zeigte zwar keine so starke Internalisierungsrate wie der sst3-WT, benötigte dennoch ähnlich lange, um das Recycling abzuschließen. Was besonders auffällt, ist das Recycling-Verhalten der K-R-Mutante. Nach der Endozytose dieses Rezeptors benötigte dieser Prozess nur 20 min. Das heißt, dass die Mutation der Lysin-Reste das Recycling beschleunigt und somit diesen Regulationsmechanismus stark beeinflusst. Aufgrund der fehlenden Internalisierung der 317-370 S/T-A- und 4 S/T-A-Mutante war hier kein Recycling detektierbar. Hier war der Anteil der Oberflächenrezeptoren über die gesamte Versuchszeit unverändert.

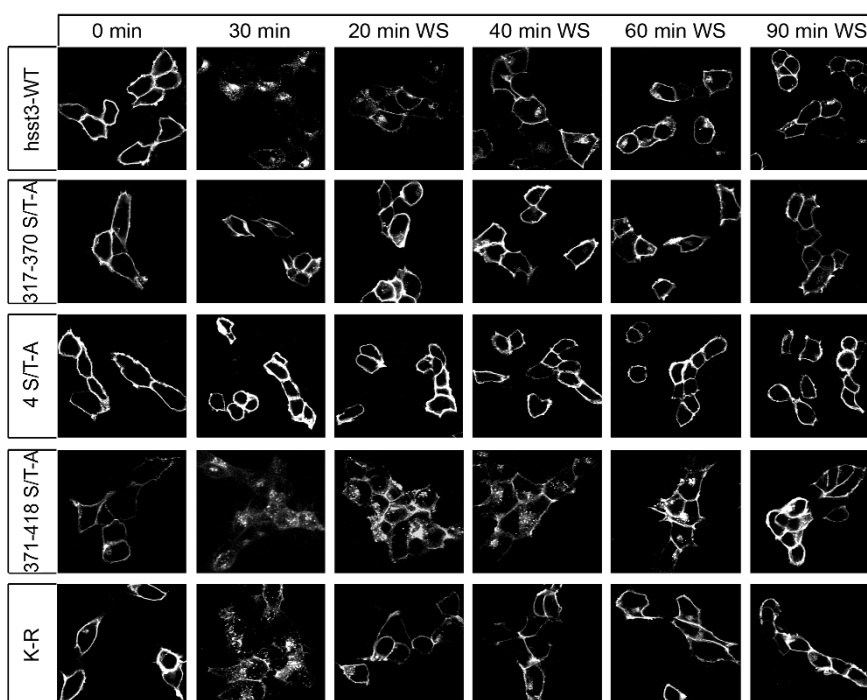


Abbildung 20: Immunzytochemische Untersuchung des Rezeptor-Recycling. Die Zellen wurden für 30 min mit SS-14 stimuliert, um die Internalisierung der Rezeptoren zu ermöglichen. Anschließend erfolgte ein WS in SS-14-freiem Medium. In diesem Zeitraum konnte die Dauer des Rezeptor-Recyclings ermittelt werden.

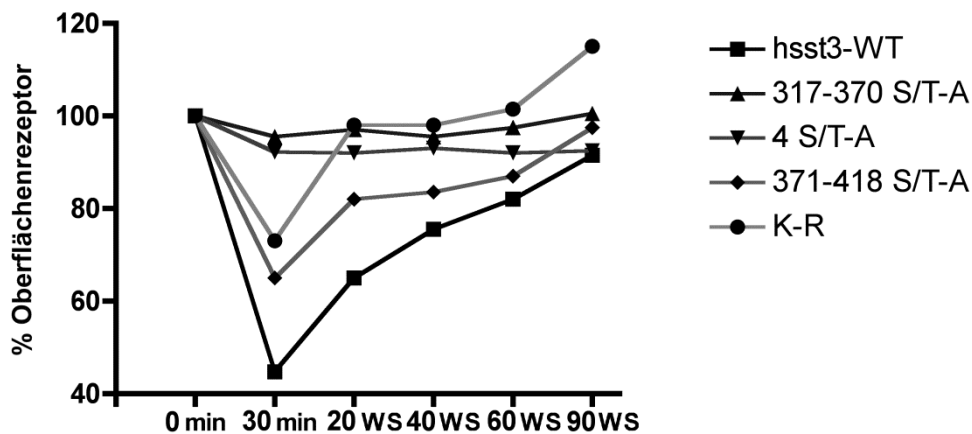


Abbildung 21: Quantitative Bestimmung des Recycling-Prozesses. Die Zellen wurden für 30 min mit SS-14 stimuliert. Anschließend erfolgte der Washout und danach die Inkubation der Zellen mit dem anti-HA-Antikörper. Die Ermittlung der Oberflächen-Rezeptor-Werte zu den jeweiligen Zeitpunkten erfolgte nach dem ELISA-Protokoll. Deutlich zu erkennen sind die unterschiedlichen Kinetiken des WT und der K-R-Mutante.

3.12 Beeinflussende Faktoren auf die Downregulation

Eine Besonderheit des humanen sst3 ist eine verstärkte Degradation des Rezeptors bzw. seine Downregulation nach einer länger anhaltenden Stimulierung.

Die Downregulation wurde in dieser Arbeit nach verschiedenen Gesichtspunkten bearbeitet. Zum einem stellte sich die Frage, welche Substanzen am sst3-WT eine Downregulation induzieren und wie stark diese ausfällt. Zum anderen konnte, wie in den anderen Versuchen auch, der Einfluss der Mutationen auf diesen Prozess untersucht werden. So können bestimmte Faktoren aufgezeigt werden, die den Prozess der Downregulation beeinflussen.

Zunächst wurde der sst3-WT mit den verschiedenen Liganden für einen Zeitraum von 0 bis zu 24 h bei 37°C stimuliert (Abbildung 22). Anschließend wurden die Zellen lysiert und mittels WGA-Beads angereichert. Im Western-Blot wurden die Gesamtlevels an Rezeptoren mit dem HA-Antikörper detektiert. Wie zu erwarten, waren weder das Somatoprim noch die L-796/778-Substanz in der Lage, eine signifikante Downregulation hervorzurufen. Selbst die Partialagonisten Octreotid und SOM230, die eine phosphorylierungsabhängige Internalisierung auslösen, konnten keine starke Downregulation des sst3 induzieren. Nach einer 24-stündigen Stimulation mit diesen beiden Liganden reduzierte sich das Level an Gesamt-rezeptoren nur um etwa 15 bis 25 %. Die einzig deutliche Downregulation des sst3 war nur nach einer mehrstündigen Behandlung mit Somatostatin zu erreichen. Hier

nahm der Anteil an Gesamtrezeptor mit der Zeit deutlich ab. Bereits nach einer 4 h anhaltenden Stimulierung waren über 20 % des Rezeptors abgebaut. Der Anteil, der nach einer 24-stündigen Stimulierung noch in den Zellen intakt vorhanden war, betrug nur noch etwas mehr als 20 %.

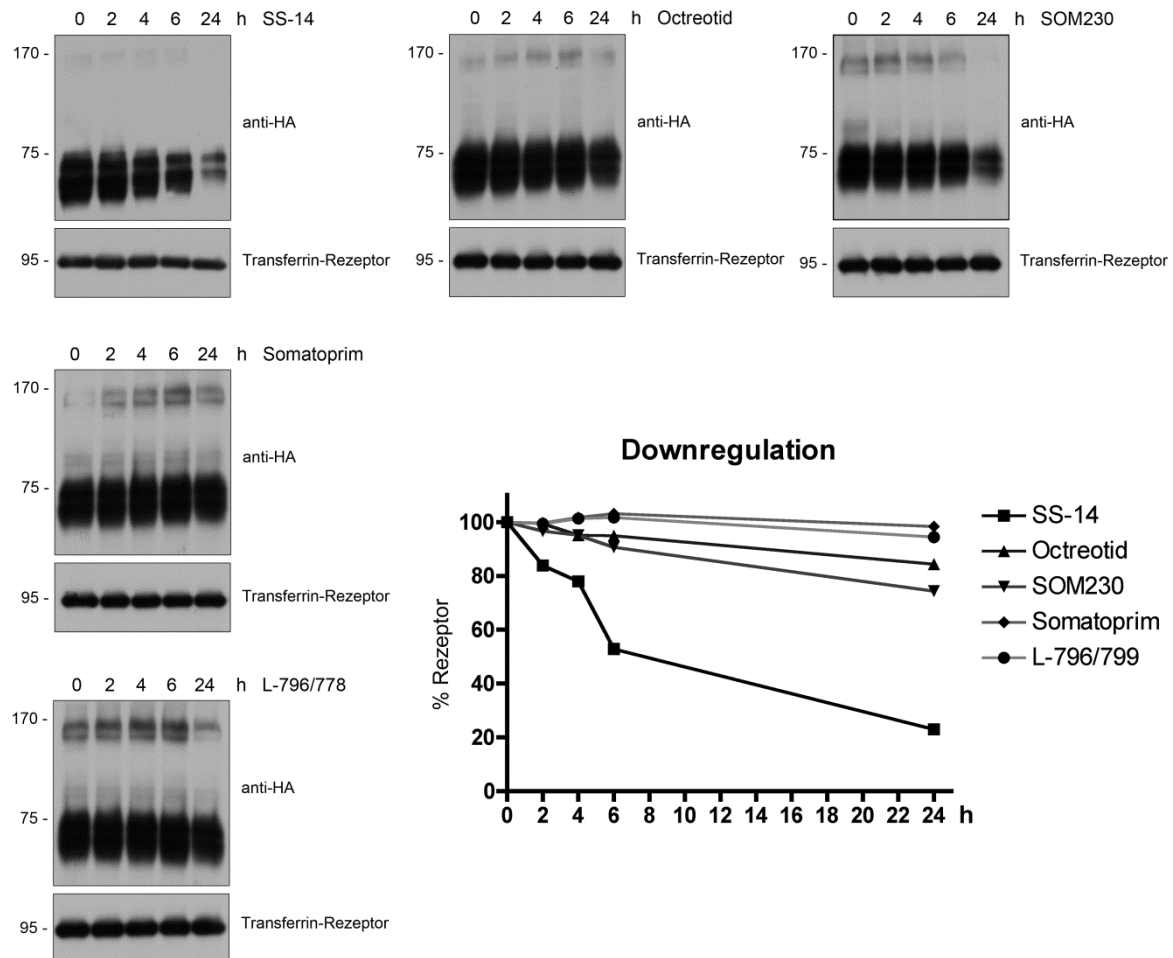


Abbildung 22: Agonist-abhängige Downregulation des sst3. Dargestellt ist der Einfluss der Liganden auf die Downregulation des Rezeptor-WT. Die Inkubation mit Somatostatin und den Analoga erfolgte über einen Zeitraum von bis zu 24 h. Der Transferrin-Rezeptor diente als Ladekontrolle. Die Auswertung der Rezeptorlevel erfolgte per ImageJ.

Für die Untersuchung des Einflusses der Mutationen auf diesen Prozess wurden der sst3-WT und die entsprechenden Mutanten nur mit Somatostatin behandelt, um die auftretenden Unterschiede am deutlichsten aufzuzeigen (Abbildung 23).

Die nicht-internalisierungsfähigen Mutanten (317-370 S/T-A, 4 S/T-A) zeigten in den ersten Stunden der Stimulierung keine Downregulation und selbst der Anteil an degradiertem Rezeptor nach 24 h war mit 10 bis 12 % sehr gering.

Im Vergleich dazu zeigte die 371-418 S/T-A-Mutante ein ähnliches Verhalten wie der sst3-WT. Die Downregulation war zwar nicht so stark ausgeprägt, aber die Mutation

der distalen Phosphorylierungsstellen scheint den Abbau des Rezeptors nicht sonderlich zu beeinträchtigen.

Wie beim Recycling nahm auch hier die K-R-Mutante eine besondere Rolle ein, denn in den ersten Stunden der Somatostatin-Behandlung zeigte sich keine Downregulation. Erst nach 24 h reduzierte sich der Anteil an Gesamtrezeptor um etwa 40 %. Die Downregulation scheint hier verzögert aufzutreten.

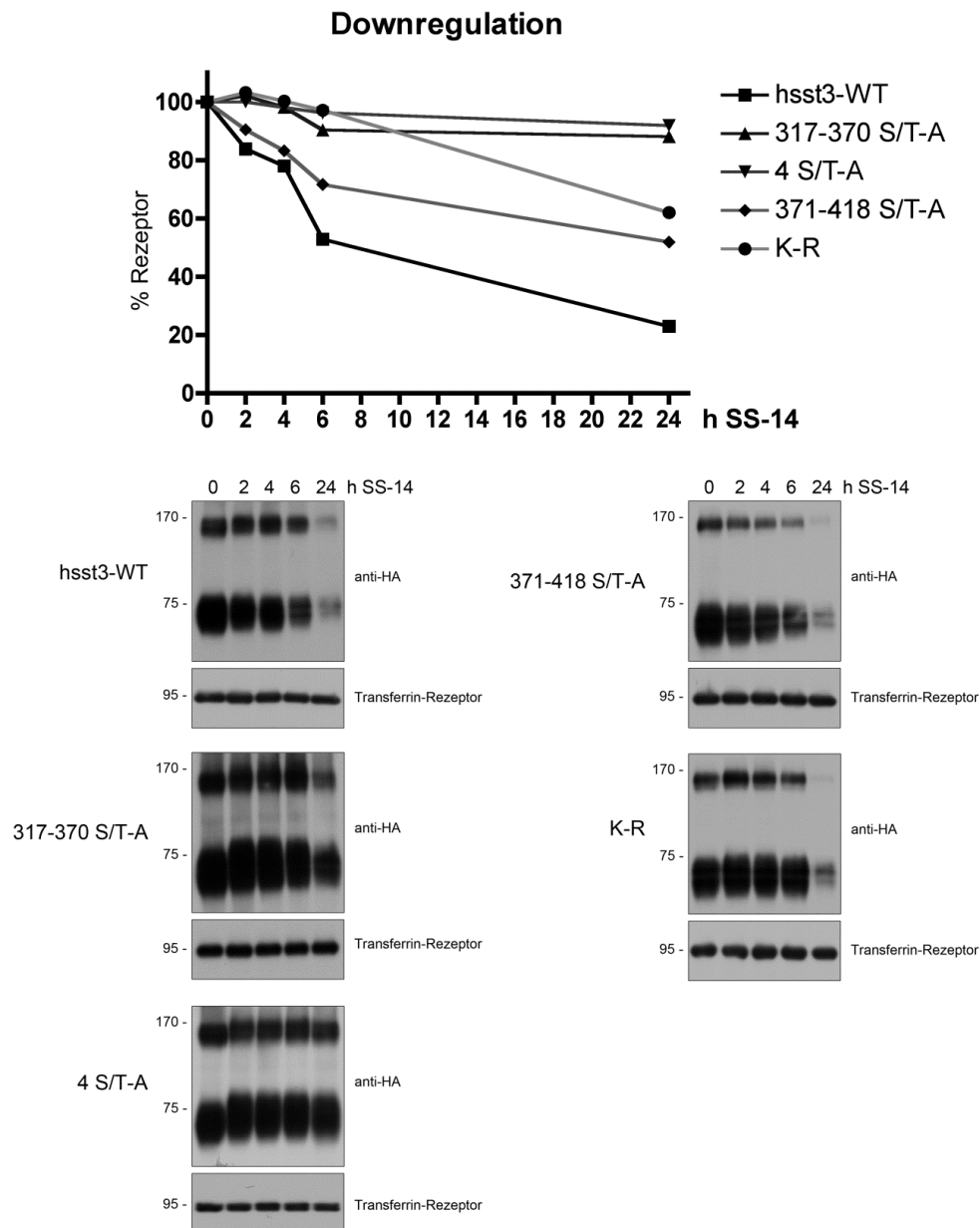


Abbildung 23: Einfluss einer Mutation von Lysin- und Phosphorylierungsstellen auf die Downregulation des sst3. Das Somatostatin induziert während der 24-stündigen Stimulierung eine deutlich sichtbare Downregulation des sst3-WT. Nur die Mutation der distalen Phosphorylierungsstellen scheint keinen größeren Einfluss auf diesen Prozess zu haben.

Durch den Einsatz eines proteasomalen Inhibitors (MG-132) kann die Degradation von Ubiquitin-konjugierten Proteinen reduziert werden. Für die Untersuchung des inhibitorischen Effekts wurden die sst3-exprimierenden Zellen vor der Somatostatin-Behandlung mit MG132 (25 μ M) eine Stunde lang vorinkubiert. Nach der Zellyse und der Anreicherung der Rezeptoren wurden im Western-Blot die Rezeptorlevel mittels dem HA-Antikörper detektiert. Man sieht, dass die Downregulation des sst3 sehr stark vermindert wurde, wenn die Zellen gleichzeitig mit Somatostatin und dem Inhibitor behandelt wurden (Abbildung 24). Im Normalfall zeigt sich nach einer 5-stündigen Somatostatin-Stimulierung ein Abbau des Rezeptors von mehr als 30 %. Wenn aber im selben Zeitraum der proteasomale Inhibitor zugesetzt wurde, kam es nur zu einer Downregulation von 8 %. Ebenso konnte dieser inhibitorische Effekt mit dem lysosomalen Inhibitor Chloroquin (200 μ M) erreicht werden. Auch hier wurde die Degradation weitestgehend verhindert.

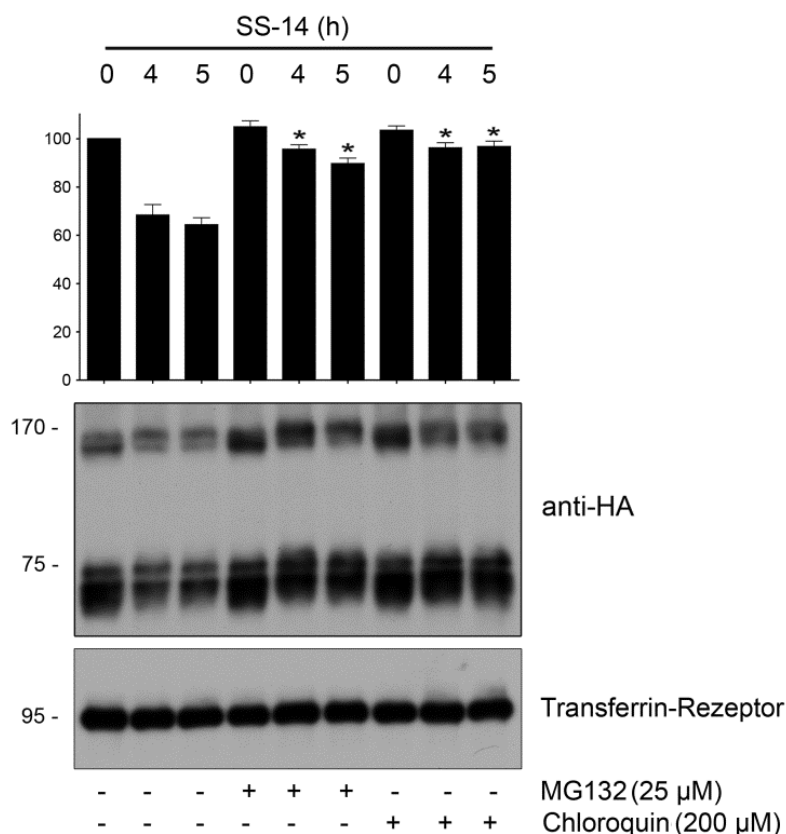


Abbildung 24: Inhibition der Downregulation des sst3 durch proteasomale und lysosomale Inhibitoren. Die sst3-WT-Zellen wurden zunächst 1h mit den Inhibitoren vorinkubiert. Danach erfolgte die Stimulierung mit Somatostatin (1 μ M) in Anwesenheit der Inhibitoren. Die Auswertung der Rezeptorlevel (Monomere) wurde mittels ImageJ durchgeführt.

3.13 Ubiquitynylierungen der verschiedenen Somatostatin-Rezeptoren

Für die Downregulierung des sst3 scheinen die Ubiquitynylierungen an den Lysin-Resten eine bestimmte Funktion einzunehmen. Wenn die sieben intrazellulären Lysin-Stellen des Rezeptors mutiert sind, hat dies zur Folge, dass sich die Downregulation verzögert.

Um den Nachweis einer Ubiquitynylierung zu erbringen, wurden Ub (F-11)- und Ub (P4D1)-Antikörper verwendet, die beide unabhängig voneinander ubiquitynylierte Proteine aufzeigen können. Mittels einer Immunpräzipitation wurden die unbehandelten und mit Somatostatin stimulierten Zellen über ihre spezifischen UMB-Antikörper gebunden und anschließend über einen Western-Blot mit den Ubiquitin-Antikörper inkubiert.

Wenn der sst3-WT mit der K-R Mutante verglichen wird, dann zeigt sich, dass der WT-Rezeptor ubiquitynyliert vorliegt, unabhängig davon, ob die entsprechenden Zellen mit Somatostatin stimuliert wurden oder nicht (Abbildung 25). Im Western-Blot zeigte sich zudem, dass die Rezeptoren ein Molekulargewicht von etwa 95 kDa aufweisen. Normalerweise besitzen alle sst3 eine Größe von etwa 75 kDa (siehe Ladekontrolle Abbildung 25). Das bedeutet, dass die an die Rezeptoren bindenden Ubiquitin-Moleküle einen Shift von etwa 20 kDa hervorrufen. Unter dem Aspekt, dass ein Ubiquitin-Molekül 8,5 kDa groß ist, binden demzufolge 2-3 Moleküle an den C-terminalen Lysin-Stellen des sst3-Rezeptors.

Die Lysin-Mutante zeigte keinerlei Ubiquitynylierungen, was einerseits die Spezifität der verwendeten Antikörper zeigt und andererseits beweist, dass die Lysin-Stellen eines Proteins wichtig sind, um ubiquitynyliert werden zu können.

Weiterhin wurden auch noch andere Somatostatin-Rezeptoren auf ihre Fähigkeit, Ubiquitin-Moleküle zu binden, untersucht. Die nicht-internalisierungsfähige 317-370 S/T-A-Mutante kann ebenfalls agonisten-unabhängig ubiquitynyliert werden, auch wenn die Ubiquitynylierungssignale im Vergleich zum WT etwas schwächer ausfielen. Der humane Somatostatin-Rezeptor 2 besitzt fünf C-terminale Lysin-Stellen, die keine wahrnehmbare Ubiquitynylierung aufweisen. Der humane Somatostatin-Rezeptor 5, der nur vier Lysine im C-Terminus besitzt, wird wie der sst3 sehr stark ubiquitynyliert. Auch hier treten diese Modifikationen agonisten-unabhängig auf.

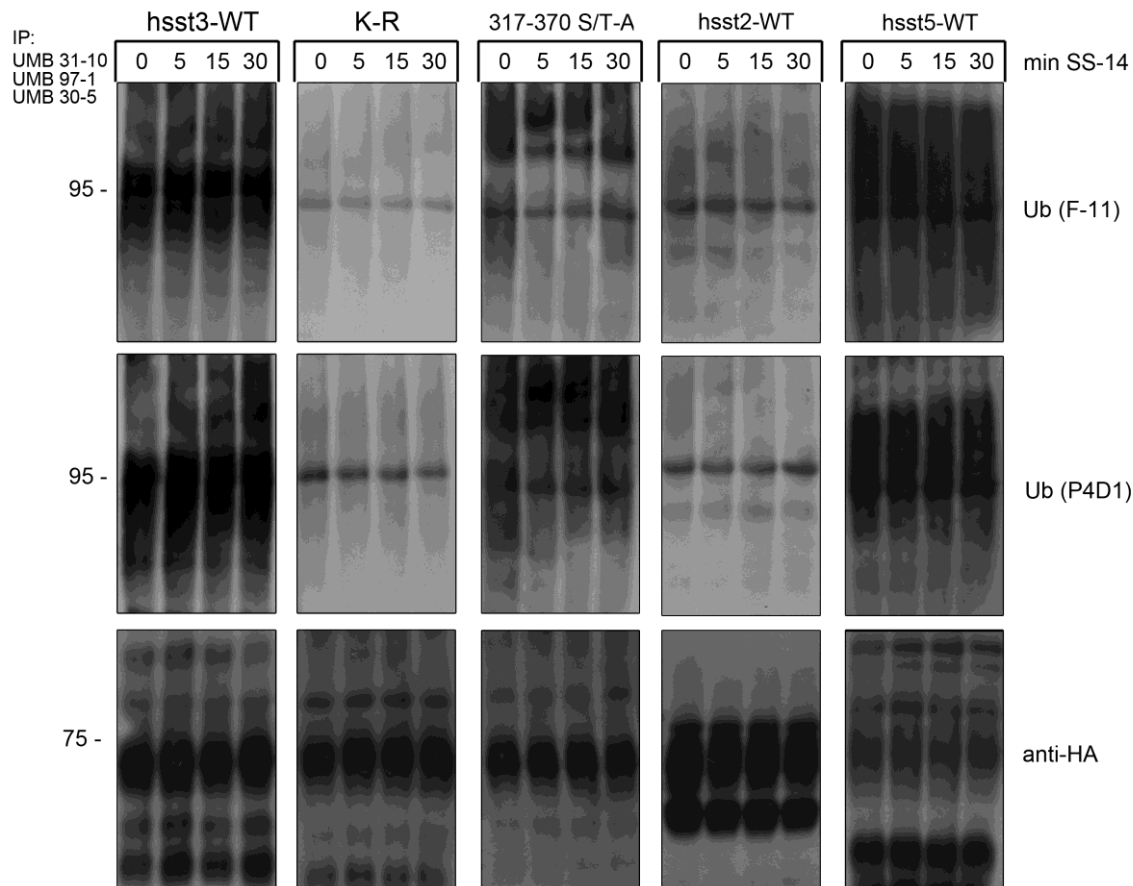


Abbildung 25: Ubiquitinylierungen der verschiedenen Somatostatin-Rezeptoren. Die Rezeptoren wurden nach einer 30-minütigen Stimulierung mit 1 μ M Somatostatin über ihre spezifischen UMB-Antikörper (sst3: UMB31-10; sst2: UMB 97-1; sst5: UMB 30-5) immunpräzipitiert (siehe Methodenteil). Anschließend konnten durch den Einsatz der spezifischen Ubiquitin-Antikörper die agonist-unabhängigen Ubiquitinylierungen detektiert werden.

3.14 Clathrin-abhängige Internalisierung und Recycling-Verhalten von Somatostatin-Rezeptoren

Wie bereits schon bei der Downregulierung und dem Recycling Prozess zu beobachten war, zeichnete sich die K-R-Mutante durch ein anderes Verhalten aus als der sst3-WT.

Gerade das schnelle Recycling nach der Stimulierung mit Somatostatin zeigt, welche tiefgreifenden Konsequenzen die Mutation der Lysin-Reste mit sich bringt.

Um das Recycling-Verhalten der beiden Somatostatin-Rezeptoren näher zu untersuchen, wurde ein sogenanntes „Transferrin-Pulse-Chase“-Experiment durchgeführt. Hierbei wurden die Zellen vor der Behandlung mit Somatostatin mit dem HA-Antikörper inkubiert. Die Stimulierung mit Somatostatin führte zur Endozytose der Rezeptoren. Danach erfolgte das Waschen und die Inkubation mit einem Fluorophor-

gekoppelten Transferrin für 20 min. Die darauffolgende Aufarbeitung war methodisch der Immun-zytochemie identisch. Als Sekundärantikörper diente ein Cy3-gekoppelten Antikörper, der an die HA-markierten Rezeptoren bindet.

Das Glykoprotein Transferrin ist ein sehr guter Marker für die frühen Endosomen und die „Recycling“-Endosomen. Somit lassen sich Aussagen darüber treffen, ob ein Rezeptor recycelt wird (an der Kolokalisation des Rezeptors mit dem Transferrin zu erkennen) oder einem Abbau unterliegt. Die mit Eisen gebundenen Transferrin-Moleküle werden zusammen mit dem Transferrin-Rezeptor über eine Clathrin-abhängige Endozytose in die Zelle aufgenommen und versorgen die Zelle somit mit Eisen-Ionen. Das unbeladene Transferrin und der Rezeptor werden daraufhin wieder an die Zellmembran zurück transportiert. Ungefähr 85-95 % dieser Transferrin-Komplexe folgen dem Recycling Pathway (Tortorella et al. 2014).

Im ersten Teil des Versuchs wurden die Zellen gleichzeitig mit Somatostatin und dem Transferrin für 30 Minuten behandelt (Abbildung 26). Im unstimulierten Zustand befanden sich die mit Cy3-gekoppelten Antikörper-angefärbten Rezeptoren (rot) an der Plasmamembran, während das Alexa488-gekoppelte Transferrin (grün) im Cytoplasma lokalisiert war. Während der Stimulation mit Somatostatin kam es zur Internalisierung der Rezeptoren.

Der hohe Grad an Kolokalisation (gelbe Vesikel-strukturen) zwischen den Rezeptoren und dem Transferrin impliziert, dass der *hsst2*-WT, der *hsst3*-WT und die K-R-Mutante über denselben endozytotischen Pathway internalisiert werden.

Anders war das Verhalten, wenn die Zellen erst für 30 Minuten mit Somatostatin stimuliert wurden. In diesem Zeitraum kam es zur Internalisierung der Rezeptoren. Danach wurden die Zellen für 20 min in Gegenwart des Fluorophor-gekoppelten Transferrins inkubiert. Der Gehalt an Kolokalisation zwischen den internalisierten Rezeptoren mit dem endocytotischen Marker fiel hier unterschiedlich stark aus. Die meisten Vesikel, die den *sst2* beinhalteten, waren mit dem Transferrin kolokalisiert, was für ein schnelles Recycling der Rezeptoren spricht. Im Gegensatz dazu waren die internalisierten *sst3* in Vesikel eingebaut, die kein Transferrin beinhalteten. Der *sst3* wird also zu einem gewissen Anteil abgebaut. Wie der *sst2* zeigte auch die K-R-Mutanten einen hohen Grad an Kolokalisation mit dem Transferrin.

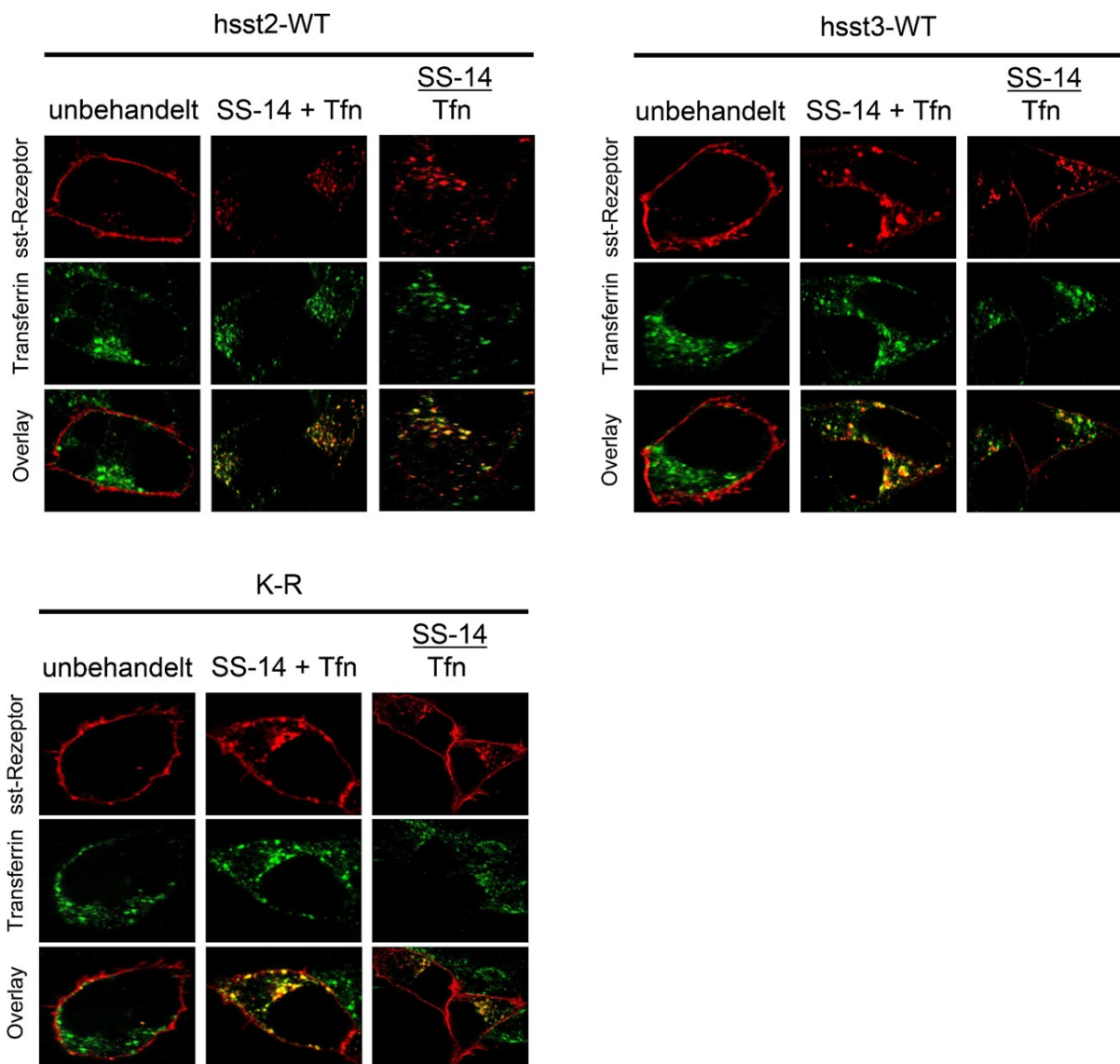


Abbildung 26: Clathrin-abhängige Internalisierung und Recycling-Verhalten von Somatostatin-Rezeptoren. In einem immunzytochemischen Verfahren wurden die Rezeptoren mittels dem Cy3-gekoppelten Antikörper angefärbt (rot). Das humane Transferrin ist mit dem Alexa-488-Antikörper verknüpft (grün). In den unbehandelten Zellen ist der Rezeptor membranständig und das Transferrin liegt im Cytoplasma vor. In den mittleren Spalten wurden die Zellen gleichzeitig mit Somatostatin (1 μ M) und dem Transferrin inkubiert. Die gelben Vesikel zeigen an, dass beide Proteinkomplexe über denselben endosomalen Weg internalisiert werden. Um das Recycling-Verhalten zu untersuchen, wurden die Zellen erst über eine 30-minütige Stimulierung mit Somatostatin zur Internalisierung gebracht, anschließend ausgewaschen und mit dem Fluorophor-gekoppelten Transferrin für 20 min inkubiert. Kolokalisationen von Rezeptor und Transferrin (gelb) lassen auf ein schnelles Recycling der Rezeptorschließen.

4. Diskussion

Der humane sst3 gehört zur Familie der GPCRs und inhibiert als $G_{\alpha i}$ -gekoppelter Rezeptor in vielen Zellsystemen die Adenylatcyclase. Besonders stark ist der sst3 in Hypophysenadenomen exprimiert. Hier kann die Aktivierung des Rezeptors zu proapoptotischen und antiproliferativen Effekten führen (Sharma et al. 1996; 1998). Allerdings gibt es noch keine Veröffentlichungen darüber, wie der sst3 auf molekularer Ebene reguliert wird. Daher sollte untersucht werden, durch welche Liganden der humane sst3 aktiviert werden kann und was anschließend mit diesem in der Zelle passiert. Mit Hilfe von bestimmten Rezeptormutanten und der Generierung von phosphorylierungsstellen-spezifischen Antikörpern konnten in humanen embryonalen Nierenzellen grundlegende Erkenntnisse über das Phosphorylierungs- und Internalisierungsverhalten des hsst3 erarbeitet werden.

Für die Untersuchung der regulatorischen Mechanismen wurden vier sst3-Mutanten generiert, bei denen der C-Terminus des sst3 als Vorlage diente. Bei der 317-370 S/T-A-Mutante wurden die sechs proximalen Serin- und Threonin-Reste gegen Alanin ausgetauscht. Bei der 4 S/T-A-Mutante handelt es sich um eine spezielle Form des 317-370-S/T-A-Rezeptors, in der sowohl die Serine an den Positionen 337 und 361 als auch die Threonine an den Stellen 341 und 348 mutiert vorliegen. Bei der 371-418-S/T-A-Mutante wurden alle zwölf distalen Phosphorylierungsstellen gegen Alanin ausgetauscht. Des Weiteren wurde eine Lysin-Mutante generiert, bei der alle sieben intrazellulären Lysin-Reste (sechs davon im C-Terminus) durch Arginin ersetzt wurden. Zur Detektierung der Phosphorylierungsstellen dienten die Serin 337/ Threonin 341- und der Threonin 348-Antikörper, die spezifisch die phosphorylierten Aminosäuren erkennen. Zudem wurden mehrerer Liganden eingesetzt, um Unterschiede in der agonist-abhängigen Phosphorylierung und Internalisierung aufzeigen zu können. Dazu zählen das natürlich vorkommende Somatostatin, die Analoga Octreotid, Pasireotid, Somatoprim und die nicht-peptidische Substanz L-796/778. Auf diese Weise war es möglich, die Prozesse der Phosphorylierung näher zu beschreiben und herauszufinden, welche Kinasen diesen Mechanismus regulieren. Ebenso galt dieselbe Fragestellung der Dephosphorylierung und den daran beteiligten Phosphatasen. Zusätzlich konnten diejenigen Aminosäuren identifiziert werden, die für die Internalisierung des sst3 essentiell sind.

Mittels Western-Blot-Analysen konnte aufgezeigt werden, dass es nicht bei allen Agonisten und Rezeptormutanten nach der Stimulierung des Rezeptors zu einer Phosphorylierung kommt. Die Phosphorylierungsstellen konnten erst nach einer Stimulation mit einem Agonisten detektiert werden. In unbehandelten Zellen war keine Phosphorylierung des Rezeptors messbar. Das deutet daraufhin, dass Ser 337/ Thr 341 und Thr 348 nicht konstitutiv phosphoryliert sind. Eine Besonderheit des sst3 ist die Phosphorylierung der Monomere und der Dimere nach einer Stimulierung. Bei der 317-370 S/T-A- und der 4 S/T-A-Mutante wurden im Western-Blot keine Phosphorylierungen detektiert. Der Austausch der betreffenden Serin- und Threonin-Reste gegen Alanin beweist, dass die verwendeten Antikörper phosphorylierungsspezifisch sind. Somatoprim war nicht in der Lage, eine Phosphorylierung am sst3-WT oder den Mutanten auszulösen, was daran liegt, dass diese Substanz keine Affinität zum Rezeptor aufweist.

Die Stimulation der Rezeptoren mit dem sst3-spezifischen Liganden löste keine Phosphorylierung am Ser 337/ Thr 341 und Thr 348 aus. Selbst eine Stimulierung über 60 Minuten hinweg induzierte kein Phosphorylierungssignal. Die Stimulierung der WT-, 371-418 S/T-A- und K-R-Rezeptoren mit Somatostatin führte zur stärksten Phosphorylierung. Im Vergleich dazu, induzierten die Analoga Octreotid und Pasireotid nur eine schwache Phosphorylierung am Ser 337/ Thr 341 und Thr 348 der WT- und 371-418 S/T-A-Rezeptoren. Da alle Substanzen in einer Konzentration von 1 μ M (Substratsättigung) eingesetzt wurden und die Affinitäten der Agonisten für den sst3 im nanomolaren Bereich liegen (IUPHAR Database), kann davon ausgegangen werden, dass es sich bei Octreotid und Pasireotid um Partialagonisten am sst3 handelt.

Bei der K-R-Mutante kam es nach Behandlung mit den beiden Partialagonisten zu keiner Phosphorylierung. Die Somatostatin-induzierte Phosphorylierung am Thr 348 war verhältnismäßig schwach. Das kann zwei mögliche Ursachen haben. Entweder wird der Rezeptor generell nur sehr schwach an dieser Stelle phosphoryliert, was aber nicht zu den Ergebnissen mit den WT- und 371-418 S/T-A-Rezeptoren passt, da die Phosphorylierungen an beiden Stellen in etwa gleich stark ausfielen. Oder die eingeführte Arginin-Mutation direkt neben dem Threonin 348 behinderte die Detektion durch den Phosphorylierungsstellen-spezifischen Antikörper sterisch zu sehr. Die letzte Annahme ist wahrscheinlicher.

Um herauszufinden, welche Kinasen für die Rezeptorphosphorylierung verantwortlich sind, wurden spezifische siRNAs gegen einzelne G-Protein-gekoppelten-Rezeptor-Kinasen eingesetzt. Daraus ergab sich, dass für die Phosphorylierung am sst3 die GRK2 und die GRK 3 hauptverantwortlich sind. Dies ist auch beim sst2-WT der Fall. Hier bewirken die GRK2 und die GRK3 die Phosphorylierung der Serine 341 und 343 und der Threonine 353, 354, 356 und 359 (Pöll et al. 2010). Für den sst5-WT-Rezeptor wurde die GRK2 als essentielle Kinase identifiziert, die die Phosphorylierung der C-terminalen Threonine 333 und 347 (konstitutiv phosphoryliert) reguliert (Petrich et al. 2013).

Eine heterologe Aktivierung des sst3 bzw. des sst5 durch die PKA oder die PKC kann scheinbar ausgeschlossen werden, da weder das Forskolin noch das PMA in der Lage waren, eine Phosphorylierung an den Serin- und Threonin-Resten des sst3 respektive am Thr 333 des sst5 herbei zu führen. Hingegen kann der sst2 durch PMA aktiviert werden. Die PKC induziert hier eine Phosphorylierung am Serin 343 (Liu et al. 2009).

Des Weiteren konnten agonist-spezifische Unterschiede in der Phosphorylierungskinetik ermittelt werden. Der zeitliche Verlauf der Phosphorylierung ist von der Stimulierung des sst3 mit einem Voll- oder Partialagonisten abhängig. Bei Somatostatin war die Phosphorylierung am Ser 337/ Thr 341 bereits nach zwei Minuten deutlich detektierbar. Diese Stelle blieb auch über einen Zeitraum von über 60 Minuten phosphoryliert. Am Thr 348 nahm die Intensität der nach zwei Minuten beginnenden Phosphorylierung kontinuierlich ab. Bei der Stimulierung mit den Partialagonisten kam es dagegen erst nach zehn Minuten zu einer Phosphorylierung am Ser 337/ Thr 341 und das Maximum wurde hier frühestens nach einer halben Stunde erreicht. Am Thr 348 setzte die Phosphorylierung etwas früher ein, war im Vergleich zur anderen Phosphorylierungsstelle schwächer, aber konstant über den gesamten Phosphorylierungszeitraum.

Diese Ergebnisse bedeuten, dass die Agonisten unterschiedliche Phosphorylierungskinetiken an den entsprechenden Phosphorylierungsstellen des sst3 auslösen.

Die Dephosphorylierung zeigte bei den beiden Phosphorylierungsstellen eine unterschiedliche Kinetik. Nach einer Stimulierung der sst3 mit Somatostatin nahmen die Phosphorylierungen am Ser 337/ Thr 341 nur sehr schwach ab, während das

phosphorylierte Thr 348 am Monomer extrem schnell dephosphoryliert wurde. Die Dephosphorylierung der beiden Stellen war nach 60 Minuten abgeschlossen. Auch beim sst2 werden die Ser 341/ 343 langsamer als die Threonine im „TTETQRT“-Motiv dephosphoryliert (Lehmann et al. 2014 a, b).

Um herauszufinden, welche Protein-Phosphatase diesen Prozess reguliert, wurden die zwei Inhibitoren Okadasäure und Calyculin A verwendet. Beide Substanzen hemmen effektiv die PP2, die PP4 und die PP5 (Cohan et al. 2005; Honkanen et al. 2002). Die Hemmung der Dephosphorylierung durch diese beiden Inhibitoren wurde auch bei anderen Rezeptoren wie dem β_2 -adrenergen Rezeptor, dem D₁-Dopamin-Rezeptor, dem Parathyroid-Hormon-Rezeptor, dem Thromboxan-A-Rezeptor, dem Vasopressin-Rezeptor 1 oder μ -Opioid-Rezeptor gezeigt (Schulz et al. 2014). Da nur das Calyculin A die Somatostatin-induzierte Dephosphorylierung am sst3 deutlich blockierte, kann die PP1 als ausführendes Enzym für diesen Prozess angesehen werden. Von der PP1 sind die drei katalytischen Untereinheiten α , β und γ bekannt. Durch den Einsatz spezifischer siRNAs gegen diese Untereinheiten wurde im Western-Blot keine Abnahme des Phosphorylierungssignals sichtbar, wenn die PP1 α und PP1 β herunter reguliert wurden.

Das bedeutet, dass vor allem die PP1 α und die PP1 β für die Dephosphorylierung des sst3 zuständig sind. Für den sst2 wurde die PP1 β , für den sst5 die PP1 γ identifiziert (Pöll et al. 2011; Petrich et al. 2013).

Die unterschiedlich intensiven Phosphorylierungen durch die Agonisten an den jeweiligen Rezeptoren hat Folgen für die β -Arrestin-Rekrutierung und die Internalisierung des Rezeptors.

Für die Untersuchung der β -Arrestin-Rekrutierung wurden HEK-Zellen mit dem entsprechenden Rezeptor und einem GFP-markierten β -Arrestin-1 oder -2 transfiziert. Dabei scheint das β -Arrestin-1 keine große Rolle bei der Internalisierung des sst3 einzunehmen, da die Translokation nach Somatostatin-Stimulierung nur transient und kaum wahrnehmbar ausfiel. Für den sst3 nimmt das β -Arrestin-2 die größere Bedeutung ein. Allerdings war nur beim Vollagonisten Somatostatin eine Translokation des β -Arrestin-2 zu beobachten. Obwohl Octreotid und Pasireotid eine Phosphorylierung induzieren, reicht diese nicht aus, um das cytoplasmatisch lokalisierte β -Arrestin-2 an die Membran zu rekrutieren. Beim sst2 gibt es ebenfalls

eine agonist-abhängige Arrestin-Rekrutierung. Während Somatostatin und Octreotid eine Translokation des Arrestins bewirken, ist dies bei Stimulierung mit Pasireotid nicht der Fall. Grund hierfür ist, dass dieses Analogon im Gegensatz zu den anderen beiden genannten Agonisten nur die Phosphorylierung der Serine 341 und 343 bewirkt. Diese lokal begrenzte Phosphorylierung reicht nicht aus, um das β -Arrestin-2 an die Membran zu transferieren (Pöll et al. 2010).

Bei der 317-370 S/T-A- und bei der 4 S/T-A-Mutante führte die Stimulierung mit einem Agonisten ebenfalls zu keiner Rekrutierung des β -Arrestin-2 an die Membran. Daraus kann eine wesentliche Bedingung für die Rekrutierung des β -Arrestin-2 abgeleitet werden. Um eine Translokation zu ermöglichen, muss eine starke Phosphorylierung am Ser 337/ Thr 341 vorliegen. Die Phosphorylierung am Thr 348 spielt hierbei keine entscheidende Rolle, da die K-R-Mutante an dieser Stelle nicht phosphoryliert wird, aber trotzdem das β -Arrestin-2 an die Membran rekrutieren kann.

Im Hinblick auf die Internalisierung fällt auf, dass für die agonist-abhängige Endozytose des Rezeptors die Stärke der Phosphorylierung am Ser 337/ Thr 341 und Thr 348 eine größere Bedeutung einnimmt als die Fähigkeit, das β -Arrestin-2 zu rekrutieren. Das heißt, dass alle Agonisten, die eine Phosphorylierung von C-terminalen Serin- und Threonin-Resten erzeugen, eine Internalisierung des Rezeptors bewirken, auch wenn keine β -Arrestin-Translokation zu beobachten war. Somatostatin induzierte am sst3-WT mit einer 64 %-igen Internalisierungsrate die stärkste Endozytose. Eine Behandlung mit Octreotid oder Pasireotid führte nur zu einer 20 %-igen Internalisierungsrate. Bei den phosphorylierungsfähigen Rezeptor-Mutanten ergibt sich ein ähnliches Bild - Somatostatin löste die stärkste Endozytose der Rezeptoren aus und die Partialagonisten eine schwächere. Die L-796/778-Substanz konnte nur eine sehr schwache Internalisierung des WT- und 371-418 S/T-A-Rezeptors bewirken, obwohl keine Phosphorylierung oder β -Arrestin-2-Rekrutierung zu beobachten war. Das heißt, dass wahrscheinlich allein die durch die Bindung des nicht-peptidischen Liganden eingeleitete Konformationsänderung des sst3 ausreicht, um eine Internalisierung hervorzurufen.

Die 317-370 S/T-A- und die 4 S/T-A-Mutante internalisierten nicht. Dementsprechend ist die Internalisierung des sst3 am effektivsten, wenn eine starke Phosphorylierung am Ser 337/ Thr 341 vorliegt und es zu einer Rekrutierung des β -Arrestin-2 kommt. Wie auf die β -Arrestin-2-Translokation auch, haben die Mutationen der distalen

Phosphorylierungsstellen keinen größeren inhibitorischen Einfluss auf die agonist-abhängige Internalisierung.

Die Internalisierung des sst3 findet nicht mehr statt, wenn die Serine an den Positionen 337, 361 und die Threonine an den Stellen 341 und 348 mutiert sind. Diese vier polaren Aminosäuren sind essentiell in der agonist-abhängigen Einleitung der Endozytose. Ebenso wurde sichtbar, dass eine Konformationsänderung am sst3 durch die L-Substanz ausreicht, um die Internalisierung des Rezeptors einzuleiten. Jedoch dürfen die vier identifizierten Phosphorylierungsstellen nicht mutiert sein und die Endozytose fällt im Vergleich zur Phosphorylierungs- und β -Arrestin-2-vermittelten Internalisierung sehr schwach aus.

Nach der Internalisierung wird der sst3 entweder endosomal recycelt oder proteasomal/ lysosomal abgebaut. Das Recycling des sst3-WT benötigt etwa 90 Minuten. Bei der 371-418 S/T-A-Mutante dauert dieser Prozess genauso lange. Bei der K-R-Mutante läuft der Recycling-Prozess schneller ab. Die internalisierten K-R-Rezeptoren sind bereits nach 20 Minuten wieder in der Plasmamembran eingebaut.

Das Recycling wird demnach von mehreren Faktoren beeinflusst. Erstens muss der Rezeptor an den proximalen Serin- und Threonin-Stellen phosphoryliert werden, um auch internalisiert zu werden. Auf das Recycling haben die distalen Phosphorylierungsstellen keinen Einfluss. Zweitens hat der Ubiquitylierungszustand des Rezeptors eine Bedeutung. Liegt der Rezeptor nicht ubiquityliert vor, erfolgt das Recycling sehr schnell, und wie aus dem „Transferrin-Pulse-Chase“-Experiment sichtbar ist, auch nahezu vollständig. Sind die Lysin-Stellen am Rezeptor vorhanden, wird durch die Bindung von Ubiquitin-Molekülen der proteasomale Abbau eingeleitet. Beim „Transferrin-Pulse-Chase“-Experiment diente das Fluorophor-gekoppelte Transferrin als Marker für eine Clathrin-abhängige Internalisierung und für das endosomale Recycling. Der sst3-WT, der sst2-WT und die K-R-Mutante internalisieren alle über den Clathrin-abhängigen Weg. Der sst2-WT und die K-R-Mutanten werden vorwiegend recycelt, während ein Anteil der sst3-WT-Rezeptoren nicht in den Recycling-Endosomen vorliegt.

Das heißt, dass die Lysin-Mutante weniger der Degradation unterliegt, sondern der größte Anteil der internalisierten K-R-Rezeptoren wieder in die Membran eingebaut wird.

Diese Beobachtungen lassen den Schluss zu, dass die Mutation der Lysin-Stellen ein schnelles Recycling induziert, der proteasomale Abbau nicht stattfindet und die Ubiquitin-abhängige Downregulation nicht einsetzt.

Die Downregulation des sst3 ist vor allem nach einer langfristigen Stimulierung mit Somatostatin zu beobachten. Da unter denselben Bedingungen die Partialagonisten nur eine schwache Downregulation hervorrufen, scheint auch hier die Stärke der Phosphorylierung und der agonist-induzierten Internalisierung eine wichtige Rolle zu spielen. Wird der Rezeptor weniger zur Endozytose getrieben, dann kann auch weniger Rezeptor abgebaut werden. Von der klinischen Seite her betrachtet, ist es ein Vorteil, dass die Substanzen Octreotid und Pasireotid keine Downregulation in einem solchen Umfang auslösen wie es der natürliche Ligand macht. So kann die Wirkung dieser klinisch eingesetzten Substanzen länger anhalten bzw. können durch den geringen Rezeptorabbau mehr sst3 aktiviert werden. Liegt wie im Falle der 317-370 S/T-A- und 4 S/T-A-Mutante keine Phosphorylierung oder Internalisierung vor, dann kann der Rezeptor in den ersten Stunden der chronischen Somatostatin-Stimulierung nicht herunterreguliert werden. Erst nach 24 Stunden ist ein Anteil von etwa 10 % abgebaut worden. Die 371-418 S/T-A-Mutante wird etwas weniger downreguliert als der WT, zeigt aber dieselbe Kinetik. Grund dafür ist, dass diese Mutante weniger stark durch Somatostatin internalisiert wird als der sst3-WT.

Wenn die Lysin-Stellen des sst3 mutiert sind, erfolgt nach einer 6-stündigen Stimulierung mit Somatostatin keine signifikante Downregulation des Rezeptors. Zum Vergleich sind nach dieser Zeit schon mehr als 40 % des WT-Rezeptors abgebaut. Erst nach der Stimulation der K-R-Mutante mit Somatostatin für 24 h ist eine deutliche Abnahme des Gesamtzeptorlevels erkennbar.

Das bedeutet, dass für die schnelle Downregulation des sst3 zwei Bedingungen erfüllt sein müssen. Erstens muss der Rezeptor phosphoryliert und internalisiert werden und zweitens scheint dieser Prozess von den vorhandenen Lysin-Resten und entsprechend von den Ubiquitinylierungen abhängig zu sein. Das lässt die Aussage zu, dass die Downregulation in den ersten Stunden der chronischen Stimulierung vorwiegend proteasomal abläuft.

Auch der ubiquitin-unabhängige, lysosomale Abbau der Rezeptoren findet in der Anfangsphase einer Dauerstimulierung statt. Das erkennt man daran, dass der Einsatz des lysosomalen Inhibitors Chloroquin die Downregulation des sst3-WT nahezu vollständig inhibiert. Dieser Abbauweg scheint jedoch nicht im Vordergrund zu stehen.

Im letzten Schritt der Arbeit wurde die Ubiquitylierung des sst3 betrachtet. Dabei ist zu sehen, dass der sst3 agonist-unabhängig ubiquityliert an der Plasmamembran vorliegt. Eine Stimulierung mit Somatostatin hat kaum einen Einfluss auf die Stärke der Ubiquitylierungen. Das bedeutet, die Ubiquitylierungen sind nicht von der Phosphorylierung des sst3 abhängig, sondern liegen permanent an den Lysin-Stellen des sst3 vor. Dies wird auch bei der 317-370 S/T-A-Mutante deutlich. Dieser Rezeptor liegt ebenfalls ubiquityliert vor, kann aber durch die eingeführten Mutationen weder phosphoryliert noch internalisiert werden. Wird der sst3-WT stimuliert und internalisiert, dann kann der Rezeptor über den proteasomalen Weg abgebaut werden. Das hat wiederum einen Einfluss auf die Menge an recycelten Rezeptor. Sind die intrazellulären Lysin-Stellen des sst3 mutiert, dann sind auch keine Ubiquitin-Moleküle an dieser Rezeptormutante detektierbar. Der internalisierte K-R-Rezeptor wird innerhalb von 20 Minuten vollständig recycelt und wird auch in den ersten Stunden einer chronischen Somatostatin-Behandlung nicht downreguliert.

Neben dem sst3-WT wird auch der sst5-WT ubiquityliert. Der sst2-WT zeigt wie die K-R-Mutante keine Ubiquitylierungen, wodurch die hohe Anzahl an recycelten sst2 erklärt werden kann. Dieser Prozess dauert beim sst2-WT mehr als 60 Minuten. Das könnte daran liegen, dass nach einer Stimulierung mit Somatostatin fast 80 % der sst2-WT-Rezeptoren internalisiert werden und die Zelle eine gewisse Zeit benötigt, diesen Anteil wieder in die Membran einzubauen (Lehmann et al. 2014 a).

Der sst5 gehört wie der der sst3 zu den Klasse-A-GPCR. Nur der sst3 wird nach der Somatostatin-vermittelten Endozytose zum Teil Ubiquitin-abhängig degradiert und im Vergleich zum sst2 oder sst5 weniger recycelt. Ein Grund, warum der sst5 trotz der Ubiquitylierungen nicht dem Rezeptorabbau unterliegt, könnte in seiner Internalisierungsrate und in der Dephosphorylierung begründet sein. Der sst5 besitzt nur zwei C-terminale Phosphorylierungsstellen, von denen das Thr 347 konstitutiv phosphoryliert ist und die Thr 333-Phosphorylierung verantwortlich für die β -Arrestin-Rekrutierung und die Internalisierung ist. Zum sst3 gibt es zwei wesentliche Unter-

schiede. Erstens wird der sst5 nur zu 20-30 % internalisiert, wenn der Rezeptor für 30 min mit Somatostatin behandelt wird, und zweitens wird das Thr 333 innerhalb weniger Minuten dephosphoryliert (Lehmann et al. 2014 b; Petrich et al. 2013).

Das heißt, dass in den Rezeptorabbau und das Recycling mehrere Faktoren eingreifen: (I) die Anzahl und die Stärke der agonist-abhängigen Phosphorylierungen, (II) die Ubiquitinylierung des Rezeptors, (III) die Dauer der Dephosphorylierung und (IV) die Internalisierungsrate.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass der C-Terminus für die Mechanismen der agonist-abhängigen Phosphorylierung und Internalisierung besonders wichtig ist. Die Phosphorylierung der Serine 337, 361 und der Threonine 341 und 348 sind essentiell für die Regulation des sst3.

Ebenso ist das Rezeptor-Verhalten von den Agonisten, die am sst3 binden, abhängig. Dabei sind alle Effekte am sst3 durch Stimulierung mit Somatostatin am stärksten ausgeprägt. Im Gegensatz dazu lösen die Partialagonisten Octreotid und Pasireotid eine schwächere Phosphorylierung und Internalisierung aus. Das Pasireotid wirkt auch als Vollagonist am sst5-WT und als Partialagonist am sst2-WT, wo es eine Phosphorylierung der Serine 341 und 343 auslöst. Auch hier ist im Vergleich zum Somatostatin die induzierte Internalisierung stark reduziert. Das Somatostatin bewirkt am sst2 sowohl eine Phosphorylierung an den beiden Serinen als auch an den Threoninen 353, 354, 356 und 359 (Kliwer et al. 2012; Pöll et al. 2010).

Allerdings ist nicht allein die Phosphorylierung und β -Arrestin-Bindung an den Rezeptor für die Internalisierung des Rezeptors notwendig, sondern es reichen wie im Falle des sst3-spezifischen Liganden schon induzierte Konformationsänderungen am Rezeptor aus, um die Endozytose einzuleiten. Kommt es zusätzlich zu einer Rezeptorphosphorylierung und β -Arrestin-Rekrutierung verstärkt sich Internalisierungsrate deutlich. Die L-796/778-Substanz kann aber durch die Bindung an den Rezeptor eine G-Protein-Kopplung bewirken und somit die Adenylatcyclase hemmen oder spezifische Kalium-Kanäle, wie z.B. GIRK aktivieren.

Zusätzlich zu den oben genannten Effekten sind die Aminosäure-Reste innerhalb des sst3-C-Terminus für das Auslösen der Apoptose und des antiproliferativen Effekts verantwortlich (War et al. 2011).

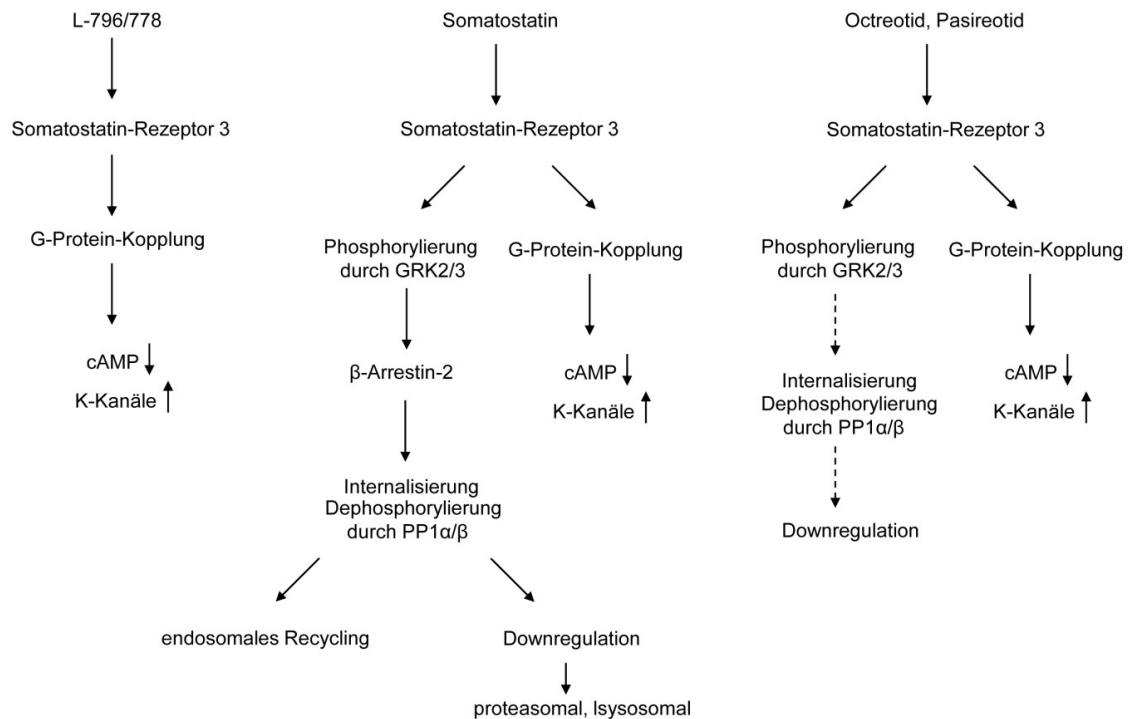


Abbildung 27: sst3-Agonisten induzieren unterschiedliche Signalwege.

Somatostatin bewirkt einerseits eine Aktivierung des G-Proteins und eine darauffolgende Hemmung der AC und andererseits eine GRK2/3-abhängige Phosphorylierung des sst3. Daraufhin wird die β -Arrestin rekrutiert und die Internalisierung des sst3 eingeleitet. Dephosphoryliert werden die C-terminalen Serine und Threonine durch die PP1 α/β . Nach der Endozytose erfolgt das Recycling in den frühen Endosomen oder der sst3 wird, vor allem bei langanhaltender Stimulierung, downreguliert. Der Abbau des Rezeptors kann dabei proteasomal und lysosomal erfolgen. Die L-Substanz induziert nur eine G-Protein-Kopplung. Die Partialagonisten führen wie das Somatostatin zu einer G-Protein-Aktivierung und zu einer Phosphorylierung, die aber nicht so stark ist, um das β -Arrestin zu rekrutieren. Der sst3 wird nur partial internalisiert und downreguliert.

Der Vergleich zwischen den Somatostatin-Subtypen zeigt, dass es auf der regulatorischen Seite viele Gemeinsamkeiten gibt. Der sst2, der sst3 und der sst5 werden von Somatostatin am stärksten phosphoryliert. Das Octreotid und das Pasireotid agieren z.T. als Partialagonisten an diesen Rezeptoren. Die Phosphorylierung wird durch die GRK2 (und GRK3) reguliert. Die Dephosphorylierung wird von der PP1 katalysiert, wobei dieser Vorgang an den Threonin-Resten schneller erfolgt als an den Serin-Resten. Unterschiede gibt es unter anderem in der Somatostatin-induzierten Internalisierungsrate und beim Recycling. Der sst2 wird nach einer 30-minütigen Stimulierung mit Somatostatin zu fast 80 % internalisiert. Unter derselben Bedingung wird der sst3 zu 64 % und der sst5 nur zu 25 % internalisiert. Nach der Endozytose werden die sst2 und sst5 recycelt und der sst3 zum Teil ubiquitin-abhängig abgebaut. Ubiquitylierungen wurden außer am sst3 nur am sst5 nachgewiesen.

5. Literaturverzeichnis

- Aguila MC, Rodriguez AM, Aguila-Mansilla HN, Lee WT. (1996) Somatostatin antisense oligodeoxynucleotide-mediated stimulation of lymphocyte proliferation in culture. *Endocrinology*. 137(5):1585-90.
- Alonso A, Sasin J, Bottini N, Friedberg I, Friedberg I, Osterman A, Godzik A, Hunter T, Dixon J, Mustelin T. (2004) Protein tyrosine phosphatases in the human genome. *Cell*. 117(6):699-711.
- Ammon C, Schäfer J, Kreuzer OJ, Meyerhof W. (2002) Presence of a plasma membrane targeting sequence in the amino-terminal region of the rat somatostatin receptor 3. *Arch Physiol Biochem*. 110(1-2):137-45.
- Arnold R, Trautmann ME, Creutzfeldt W, Benning R, Benning M, Neuhaus C, Jürgensen R, Stein K, Schäfer H, Bruns C, Dennler HJ. (1996) Somatostatin analogue octreotide and inhibition of tumour growth in metastatic endocrine gastroenteropancreatic tumours. *Gut*. 38(3):430-8.
- Asnacios, A., Courbon, F., Rochaix, P., Bauvin, E., Cances-Lauwers, V., Susini, C., Schulz, S., Boneau, A., Guimbaud, R., Buscail, L. (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):963-70.
- Barford D, Das AK, Egloff MP. (1998) The structure and mechanism of protein phosphatases: insights into catalysis and regulation. *Annu Rev Biophys Biomol Struct*. 27:133-64.
- Berberi NF, Lewis JS, Bishop GA, Askwith CC, Mykytyn K. (2008) Bardet-Biedl syndrome proteins are required for the localization of G protein-coupled receptors to primary cilia. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 105(11):4242-6.
- Blum AM, Metwali A, Matthew RC, Cook G., Elliott D, Weinstock JV. (1992) Granuloma T lymphocytes in murine schistosomiasis mansoni have somatostatin receptors and respond to somatostatin with decreased IFN- γ secretion. *J. Immunol*. 149; 3621–3626.
- Boscaro M, Ludlam WH, Atkinson B, Glusman JE, Petersenn S, Reincke M, Snyder P, Tabarin A, Biller BM, Findling J, Melmed S, Darby CH, Hu K, Wang Y, Freda PU, Grossman AB, Frohman LA, Bertherat J. (2009) Treatment of pituitary-dependent Cushing's disease with the multireceptor ligand somatostatin analog pasireotide (SOM230): a multicenter, phase II trial. *J Clin Endocrinol Metab*. 94(1):115-22.
- Breeman WA, de Jong M, Bernard B, Hofland LJ, Srinivasan A, van der Pluijm M, Bakker WH, Visser TJ, Krenning EP (1998) Tissue distribution and metabolism of radioiodinated DTPA0, D-Tyr1 and Tyr3 derivatives of octreotide in rats. *Anticancer Res*. 18:83-89.
- 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 antisecretory profile. *Eur J Endocrinol*. 146:707-716.
- Bruno JF, Xu Y, Song J, Berelowitz M. (1992) Molecular cloning and functional expression of a brain-specific somatostatin receptor. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 89(23); 11151-5.
- Burgus R, Ling N, Butcher M, Guillemin R. (1973) Primary structure of somatostatin, a hypothalamic peptide that inhibits the secretion of pituitary growth hormone. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 70(3):684-8.

- Buscail L, Estève JP, Saint-Laurent N, Bertrand V, Reisine T, O'Carroll AM, Bell GI, Schally AV, Vaysse N, Susini C. (1995) Inhibition of cell proliferation by the somatostatin analogue RC-160 is mediated by somatostatin receptor subtypes SSTR2 and SSTR5 through different mechanisms. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 92(5):1580-4.
- Cabrera-Vera TM, Vanhauwe J, Thomas TO, Medkova M, Preininger A, Mazzone MR, Hamm HE (2003) Insights into G protein structure, function, and regulation. *Endocr. Rev.* 24(6); 765-81.
- Candi E, Melino G, De Laurenzi V, Piacentini M, Guerrieri P, Spinedi A, Knight RA. (1995) Tamoxifen and somatostatin affect tumours by inducing apoptosis. *Cancer Lett.* 96(1):141-5.
- Casarini AP, Jallad RS, Pinto EM, Soares IC, Nonogaki S, Giannella-Neto D, Musolino NR, Alves VA, Bronstein MD. (2009) Acromegaly: correlation between expression of somatostatin receptor subtypes and response to octreotide-lar treatment. *Pituitary.* 12(4):297-303.
- Ceulemans H, Bollen M. (2004) Functional diversity of protein phosphatase-1, a cellular economizer and reset button. *Physiol Rev.* 84(1):1-39.
- Chauvin S, Bencsik M, Bambino T, Nissenson RA. (2002) Parathyroid hormone receptor recycling: role of receptor dephosphorylation and beta-arrestin. *Mol Endocrinol.* 16(12):2720-32.
- Cohen et al. (2009) Phosphatase families dephosphorylating serine and threonine residues in proteins. In *handbook of cell signaling*, R. Bradshaw and E.A. Dennis, eds. (London: Academic Press), pp. 593-600.
- Cohen PT, Philp A, Vázquez-Martin C. (2005) Protein phosphatase 4--from obscurity to vital functions. *FEBS Lett.* 579(15):3278-86.
- Cohen PT. (2002) Protein phosphatase 1--targeted in many directions. *J Cell Sci.* 115(Pt 2):241-56.
- Csaba Z, Dournaud P. (2001) Cellular biology of somatostatin receptors. *Neuropeptides* 35; 1-23.
- De Herder WW, Hofland LJ, van der Lely AJ, Lamberts SW. (2003) Somatostatin receptors in gastroentero-pancreatic neuroendocrine tumours. *Endocr Relat Cancer.* 10(4):451-8.
- Delesque N, Buscail L, Estève JP, Rauly I, Zeggari M, Saint-Laurent N, Bell GI, Schally AV, Vaysse N, Susini C. (1995) A tyrosine phosphatase is associated with the somatostatin receptor. *Ciba Found Symp.* 190:187-96.
- DeWire SM, Ahn S, Lefkowitz RJ, Shenoy S.K. (2007) Beta-arrestins and cell signaling. *Annu. Rev. Physiol.* 69; 483-510.
- Doll C, Pöll F, Peuker K, Loktev A, Gluck L, Schulz S (2012) Deciphering microopioid receptor phosphorylation and dephosphorylation in HEK293 cells. *Br J Pharmacol.* 167:1259-1270.
- Donangelo I, Melmed S. (2005) Treatment of acromegaly: future. *Endocrine* 28; 123-28.
- Downes GB, Gautam N. (1999) The G protein subunit gene families. *Genomics* 62;544-552.
- Egloff MP, Johnson DF, Moorhead G, Cohen PT, Cohen P, Barford D. (1997) Structural basis for the recognition of regulatory subunits by the catalytic subunit of protein phosphatase 1. *EMBO J.* 16(8):1876-87
- Elliott DE, Blum AM, Li J, Metwaki A, Weinstock JV. (1998) Preprosomatostatin messenger RNA is expressed by inflammatory cells and induced by inflammatory mediators and cytokines. *J. Immunol.* 160; 3997-4003.

- Eto M, Elliott E, Prickett TD, Brautigan DL. (2002) Inhibitor-2 regulates protein phosphatase-1 complexed with NimA-related kinase to induce centrosome separation. *J Biol Chem.* 277(46):44013-20.
- Fischer T, Doll C, Jacobs S, Kolodziej A, Stumm R, and Schulz S. (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.
- Florio T, Rim C, Hershberger RE, Loda M, Stork PJ. (1994) The somatostatin receptor SSTR1 is coupled to phosphotyrosine phosphatase activity in CHO-K1 cells. *Mol Endocrinol.* 8(10):1289-97.
- Freda PU, Katznelson L, van der Lely AJ, Reyes CM, Zhao S, Rabinowitz D. (2005) Long-acting somatostatin analog therapy of acromegaly: a meta-analysis. *J Clin Endocrinol Metab.* 90(8):4465-73.
- Freda PU. (2002) Somatostatin analogs in acromegaly. *J Clin Endocrinol Metab.* 87(7):3013-8.
- 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):310-21.
- Gidon A, Al-Bataineh MM, Jean-Alphonse FG, Stevenson HP, Watanabe T, Louet C, Khatri A, Calero G, Pastor-Soler NM, Gardella TJ, Vilaradaga JP. (2014) Endosomal GPCR signaling turned off by negative feedback actions of PKA and v-ATPase. *Nat Chem Biol.* 10(9):707-9.
- Grant M, Alturaihi H, Jaquet P, Collier B., Kumar U. (2008) Cell growth inhibition and functioning of human somatostatin receptor type 2 are modulated by receptor heterodimerization. *Mol. Endocrinol.* 22; 2278-2292.
- Grimberg A. (2004) Somatostatin and cancer: applying endocrinology to oncology. *Cancer Biol Ther.* 3(8):731-3.
- Guillemet-Guibert J, Lahlou H, Pyronnet S, Bousquet C, Susini C. (2005) Endocrine tumours of the gastrointestinal tract. Somatostatin receptors as tools for diagnosis and therapy: molecular aspects. *Best Pract Res Clin Gastroenterol.* 19(4):535-51.
- Gurevich VV, Hanson SM, Song X, Vishnivetskiy SA, Gurevich EV (2011) The functional cycle of visual arrestins in photoreceptor cells. *Prog Retin Eye Res.* 30:405-430.
- Hagströmer L, Emtestam L, Stridsberg M, Talme T. (2006) Expression pattern of somatostatin receptor subtypes 1-5 in human skin: an immunohistochemical study of healthy subjects and patients with psoriasis or atopic dermatitis. *Exp Dermatol.* 15(12):950-7.
- Händel M, Schulz S, Stanarius A, Schreff M, Erdtmann-Vourliotis M, Schmidt H, Wolf G, Höllt V. (1999) Selective targeting of somatostatin receptor 3 to neuronal cilia. *Neuroscience.* 89(3):909-26.
- Hanyaloglu AC, von Zastrow M. (2008) Regulation of GPCRs by endocytic membrane trafficking and its potential implications. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 48; 537-68.
- Hirst J, Robinson MS. (1998) Clathrin and adaptors. *Biochim Biophys Acta.* 1404(1-2):173-93.
- Honkanen RE, Golden T. (2002) Regulators of serine/threonine protein phosphatases at the dawn of a clinical era? *Curr Med Chem.* 9(22):2055-75.
- Hoyer D, Bell GI, Berelowitz M, Epelbaum J, Feniuk W, Humphrey PP, O'Carroll AM, Patel YC, Schonbrunn A, Taylor JE, et al. (1995) Classification and nomenclature of somatostatin receptors. *Trends Pharmacol Sci.* 16(3):86-8.

- Innamorati G, Sadeghi H, Birnbaumer M. (1998) Transient phosphorylation of the V1a vasopressin receptor. *J Biol Chem.* 273(12):7155-61.
- Iwanaga T, Miki T, Takahashi-Iwanaga H. (2011) Restricted expression of somatostatin receptor 3 to primary cilia in the pancreatic islets and adenohypophysis of mice. *Biomed Res.* 32(1):73-81.
- Jacobs S, Schulz S. (2008) Review: Intracellular trafficking of somatostatin receptors. *Mol. Cell. Endocrinol.* 286; 58-62.
- Jallad RS, Musolino NR, Salgado LR, Bronstein MD. (2005) Treatment of acromegaly with octreotide-LAR: extensive experience in a Brazilian institution. *Clin Endocrinol (Oxf).* 63(2):168-75.
- Johnson SA, Hunter T. (2005) Kinomics: methods for deciphering the kinome. *Nat Methods.* 2(1):17-25.
- Kaupmann K, Bruns C, Hoyer D, Seuwen K, Lübbert H. (1993) Distribution and second messenger coupling of four somatostatin receptor subtypes expressed in brain. *FEBS Lett.* 331(1-2):53-9.
- Khan SM, Sleno R, Gora S, Zylbergold P, Laverdure JP, Labbé JC, Miller GJ, Hébert TE. (2013) The expanding roles of G $\beta\gamma$ subunits in G protein-coupled receptor signaling and drug action. *Pharmacol Rev.* 65(2):545-77.
- Kliwer A, Mann A, Petrich A, Pöll F, Schulz S (2012) A transplantable phosphorylation probe for direct assessment of G protein-coupled receptor activation. *PLoS One.* 7:e39458.
- Kluxen, F.W., Bruns, C., Lübbert, H. (1992) Expression cloning of a rat brain somatostatin receptor cDNA. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 89(10); 4618-22.
- Koch WJ, Inglese J, Stone WC, Lefkowitz RJ. (1993) The binding site for the beta gamma subunits of heterotrimeric G proteins on the beta-adrenergic receptor kinase. *J Biol Chem.* 268(11):8256-60.
- Koenig JA, Edwardson JM, Humphrey PP (1997) Somatostatin receptors in Neuro2A neuroblastoma cells: operational characteristics. *Br J Pharmacol.* 120:45-51.
- Komatsuzaki K, Murayama Y, Giambarella U, Ogata E, Seino S, Nishimoto I. (1997) A novel system that reports the G-proteins linked to a given receptor: a study of type 3 somatostatin receptor. *FEBS Lett.* 406(1-2):165-70.
- Kreuzer OJ, Krisch B, Déry O, Bunnett NW, Meyerhof W. (2001) Agonist-mediated endocytosis of rat somatostatin receptor subtype 3 involves beta-arrestin and clathrin coated vesicles. *J Neuroendocrinol.* 13(3):279-87.
- Lahlou H, Guillermet J, Hortala M, Vernejoul F, Pyronnet S, Bousquet C, Susini C. (2004) Molecular signaling of somatostatin receptors. *Ann. NY Acad. Sci.* 1014; 121-131.
- Lamberts SW, de Herder WW, Hofland LJ. (2002) Somatostatin analogs in the diagnosis and treatment of cancer. *Trends Endocrinol Metab.* 13(10):451-7.
- Lancranjan I, Bruns C, Grass P, Jaquet P, Jervell J, Kendall-Taylor P, Lamberts SW, Marbach P, Orskov H, Pagani G, Sheppard M, Simionescu L (1996) Sandostatin LAR: a promising therapeutic tool in the management of acromegalic patients. *Metabolism* 45:67-71.
- Lander et al. (2001) Initial sequencing and analysis of the human genome. International Human Genome Sequencing Consortium. *Nature.* 409(6822):860-921.

- Law SF, Zaina S, Sweet R, Yasuda K, Bell GI, Stadel J, Reisine T. (1994) Gi alpha 1 selectively couples somatostatin receptor subtype 3 to adenylyl cyclase: identification of the functional domains of this alpha subunit necessary for mediating the inhibition by somatostatin of cAMP formation. *Mol Pharmacol.* 45(4):587-90.
- Lefkowitz RJ. (1998) G protein-coupled receptors. III. New roles for receptor kinases and beta-arrestins in receptor signaling and desensitization. *J Biol Chem.* 273(30):18677-80.
- Lehmann A, Kliewer A, Schütz D, Nagel F, Stumm R, Schulz S. (2014 a) Carboxyl-terminal multi-site phosphorylation regulates internalization and desensitization of the human sst2 somatostatin receptor. *Mol Cell Endocrinol.* 387(1-2):44-51.
- Lehmann A, Kliewer A, Märtens JC, Nagel F, Schulz S. (2014 b) Carboxyl-terminal receptor domains control the differential dephosphorylation of somatostatin receptors by protein phosphatase 1 isoforms. *PLoS One.* 9(3):e91526.
- Lesage B, Beullens M, Pedelini L, Garcia-Gimeno MA, Waelkens E, Sanz P, Bollen M. (2007) A complex of catalytically inactive protein phosphatase-1 sandwiched between Sds22 and inhibitor-3. *Biochemistry.* 46(31):8909-19.
- 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):654-61.
- Levay K, Satpaev DK, Pronin AN, Benovic JL, Slepak VZ. (1998) Localization of the sites for Ca²⁺-binding proteins on G protein-coupled receptor kinases. *Biochemistry.* 37(39):13650-9.
- Lewis I, Bauer W, Albert R, Chandramouli N, Pless J, Weckbecker G, Bruns C (2003) A novel somatostatin mimic with broad somatotropin release inhibitory factor receptor binding and superior therapeutic potential. *J Med Chem.* 46:2334-2344.
- Li T, Chalifour LE, Paudel HK. (2007) Phosphorylation of protein phosphatase 1 by cyclin-dependent protein kinase 5 during nerve growth factor-induced PC12 cell differentiation. *J Biol Chem.* 282(9):6619-28.
- Liu Q, Cescato R, Dewi DA, Rivier J, Reubi JC, Schonbrunn A. (2005) Receptor signaling and endocytosis are differentially regulated by somatostatin analogs. *Mol Pharmacol.* 68(1); 90-101.
- Liu W, Ahmad SA, Reinmuth N, Shaheen RM, Jung YD, Fan F, Ellis LM. (2000) Endothelial cell survival and apoptosis in the tumor vasculature. *Apoptosis.* 5(4):323-8.
- 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):16785-93.
- Lupp A, Nagel F, Doll C, Röcken C, Evert M, Mawrin C, Saeger W, Schulz S. (2012) Reassessment of sst3 somatostatin receptor expression in human normal and neoplastic tissues using the novel rabbit monoclonal antibody UMB-5. *Neuroendocrinology.* 96(4):301-10.
- Luttrell LM, Roudabush FL, Choy EW, Miller WE, Field ME, Pierce KL, Lefkowitz RJ. (2001) Activation and targeting of extracellular signal-regulated kinases by beta-arrestin scaffolds. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 98; 2449-2454.
- Manning G, Whyte DB, Martinez R, Hunter T, Sudarsanam S. (2002) The protein kinase complement of the human genome. *Science.* 298(5600):1912-34.

- Marchese A, Paing MM, Temple BR, Trejo J. (2008) G protein-coupled receptor sorting to endosomes and lysosomes. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 48; 601-629.
- Marchese A, Raiborg C, Santini F, Keen JH, Stenmark H, Benovic JL. (2003 a) The E3 ubiquitin ligase AIP4 mediates ubiquitination and sorting of the G protein-coupled receptor CXCR4. *Dev Cell.* 5(5):709-22.
- Marchese A, Chen C, Kim YM, Benovic JL (2003 b) The ins and outs of G protein coupled receptor trafficking. *Trends Biochem Sci.* 28:369-376.
- McConnell JL, Wadzinski BE. (2009) Targeting protein serine/threonine phosphatases for drug development. *Mol Pharmacol.* 75(6):1249-61.
- Meyerhof W, Wulfsen I, Schönrock C, Fehr S, Richter D. (1992) Molecular cloning of a somatostatin-28 receptor and comparison of its expression pattern with that of a somatostatin-14 receptor in rat brain. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 89(21):10267-71.
- Millar RP, Newton CL. (2010) The year in G protein-coupled receptor research. *Mol Endocrinol.* 24(1):261-74.
- Miyashita T, Reed JC. (1995) Tumor suppressor p53 is a direct transcriptional activator of the human bax gene. *Cell.* 80(2):293-9.
- Mizutani G, Nakanishi Y, Watanabe N, Honma T, Obana Y, Seki T, Ohni S, Nemoto N. (2012) Expression of Somatostatin Receptor (SSTR) Subtypes (SSTR-1, 2A, 3, 4 and 5) in Neuroendocrine Tumors Using Real-time RT-PCR Method and Immunohistochemistry. *Acta Histochem Cytochem.* 45(3):167-76.
- Nagel F, Doll C, Pöll F, Kliewer A, Schröder H, Schulz S. (2011) Structural determinants of agonist-selective signaling at the sst(2A) somatostatin receptor. *Mol Endocrinol.* 25(5):859-66.
- Nehring RB, Richter D, Meyerhof W. (2000) Glycosylation affects agonist binding and signal transduction of the rat somatostatin receptor subtype 3. *J Physiol Paris.* 94(3-4):185-92.
- Nehring RB, Meyerhof W, Richter D. (1995) Aspartic acid residue 124 in the third transmembrane domain of the somatostatin receptor subtype 3 is essential for somatostatin-14 binding. *DNA Cell Biol.* 14(11):939-44.
- Neves SR, Ram PT, Iyengar R. (2002) G protein pathways. *Science.* 296(5573):1636-9.
- Oberg K. (2005) Somatostatin-receptor mediated diagnosis and treatment in gastrointestinal neuroendocrine tumours (GEP-NET's). *Rocz Akad Med Bialymst.* 50:62-8.
- Oldham WM, Hamm HE. (2008) Heterotrimeric G protein activation by G-protein-coupled receptors. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 9(1):60-71.
- Olias G, Viollet C, Kusserow H, Epelbaum J, Meyerhof W. (2004) Regulation and function of somatostatin receptors. *J. Neurochem.* 89; 1057-1091.
- Olsen JV, Blagoev B, Gnäd F, Macek B, Kumar C, Mortensen P, Mann M. (2006) Global, in vivo, and site-specific phosphorylation dynamics in signaling networks. *Cell.* 127(3):635-48.
- Pagliacci MC, Tognellini R, Grignani F, Nicoletti I. (1991) Inhibition of human breast cancer cell (MCF-7) growth in vitro by the somatostatin analog SMS 201-995: effects on cell cycle parameters and apoptotic cell death. *Endocrinology.* 129(5):2555-62.
- Patel YC. (1999) Somatostatin and its receptor family. *Front Neuroendocrinol.* 20(3):157-98.

- Patel YC, Srikant CB. (1997) Somatostatin receptors. *Trends Endocrinol Metab.* 8(10):398-405.
- Patel YC, Greenwood MT, Warszynska A, Panetta R, Srikant CB. (1994) All five cloned human somatostatin receptors (hSSTR1-5) are functionally coupled to adenylyl cyclase. *Biochem Biophys Res Commun.* 198(2):605-12.
- Petersenn S, Heyens M, Lüdecke DK, Beil FU, Schulte HM. (2000) Absence of somatostatin receptor type 2 A mutations and gip oncogene in pituitary somatotroph adenomas. *Clin Endocrinol (Oxf).* 52(1):35-42.
- Petrich A, Mann A, Kliewer A, Nagel F, Strigli A, Martens JC, Pöll F, Schulz S (2013) Phosphorylation of Threonine 333 Regulates Trafficking of the Human sst5 Somatostatin Receptor. *Mol Endocrinol.* 27(4):671-82.
- Peverelli E, Mantovani G, Calebiro D, Doni A, Bondioni S, Lania A, Beck-Peccoz P, Spada A (2008) The third intracellular loop of the human somatostatin receptor 5 is crucial for arrestin binding and receptor internalization after somatostatin stimulation. *Mol Endocrinol.* 22:676-688.
- Pfeiffer M, Koch T, Schröder H, Klutzny M, Kirscht S, Kreienkamp HJ, Höllt V, Schulz S. (2001) Homo- and heterodimerization of somatostatin receptor subtypes. Inactivation of sst(3) receptor function by heterodimerization with sst(2A). *J Biol Chem.* 276(17):14027-36.
- Pierce KL, Premont RT, Lefkowitz RJ. (2002) Seven-transmembrane receptors. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 3(9):639-50.
- Pitcher JA, Fredericks ZL, Stone WC, Premont RT, Stoffel RH, Koch WJ, Lefkowitz RJ. (1996) Phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate (PIP₂)-enhanced G protein-coupled receptor kinase (GRK) activity. Location, structure, and regulation of the PIP₂ binding site distinguishes the GRK subfamilies. *J Biol Chem.* 271(40):24907-13.
- Plöckinger U, Hoffmann U, Geese M, Lupp A, Buchfelder M, Flitsch J, Vajkoczy P, Jakob W, Saeger W, Schulz S, Dohrmann C. (2012) DG3173 (somatoprim), a unique somatostatin receptor subtypes 2-, 4- and 5-selective analogue, effectively reduces GH secretion in human GH-secreting pituitary adenomas even in Octreotide non-responsive tumours. *Eur J Endocrinol.* 166(2):223-34.
- Pöll F, Doll C, Schulz S. (2011) Rapid dephosphorylation of G protein-coupled receptors by protein phosphatase 1 β is required for termination of β -Arrestin-dependent signaling. *J. Biol. Chem.* 286(38); 32931-6.
- Pöll F, Lehmann D, Illing S, Gjinj M, Jacobs S, Lupp A, Stumm R, Schulz S. (2010) Pasireotide and octreotide stimulate distinct patterns of sst2a somatostatin receptor phosphorylation. *Mol. Endocrinol.* 24(2); 436-46.
- Rauly I, Saint-Laurent N, Delesque N, Buscail L, Estève JP, Vaysse N, Susini C. (1996) Induction of a negative autocrine loop by expression of sst2 somatostatin receptor in NIH 3T3 cells. *J Clin Invest.* 97(8):1874-83.
- Reisine T. (1995) Somatostatin receptors. *Am J Physiol.* 269(6 Pt 1):G813-20.
- Ritter SL, Hall RA. (2009) Fine-tuning of GPCR activity by receptor-interacting proteins. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 10(12):819-30.
- Rodbell M, Birnbaumer L, Pohl SL. (1971) Characteristics of glucagon action on the hepatic adenylyl cyclase system. *Biochem J.* 125(3):58P-59P.

- Roosterman D, Brune NE, Kreuzer OJ, Feld M, Pauser S, Zarse K, Steinhoff M, Meyerhof W. (2008) Intracellular degradation of somatostatin-14 following somatostatin-receptor3-mediated endocytosis in rat insulinoma cells. *FEBS J.* 275(19):4728-39.
- Roth A, Kreienkamp HJ, Meyerhof W, Richter D. (1997) Phosphorylation of four amino acid residues in the carboxyl terminus of the rat somatostatin receptor subtype 3 is crucial for its desensitization and internalization. *J Biol Chem.* 272(38):23769-74.
- Sallese M, Marigliò S, Collodel G, Moretti E, Piomboni P, Baccetti B, De Blasi A. (1997) G protein-coupled receptor kinase GRK4. Molecular analysis of the four isoforms and ultrastructural localization in spermatozoa and germinal cells. *J Biol Chem.* 272(15):10188-95.
- Saslow SB, O'Brien MD, Camilleri M, von der Ohe M, Homburger HA, Klee GG, Pitot HC, Rubin J. (1997) Octreotide inhibition of flushing and colonic motor dysfunction in carcinoid syndrome. *Am J Gastroenterol.* 92(12):2250-6.
- Schulz S, Lehmann A, Kliewer A, Nagel F (2014) Fine-tuning somatostatin receptor signalling by agonist-selective phosphorylation and dephosphorylation: IUPHAR Review 5. *Br J Pharmacol.* 2014 Apr;171(7):1591-9.
- 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); 1275-82.
- Sevarino KA, Felix R, Banks CM, Low MJ, Montminy MR, Mandel G, Goodman RH. (1987) Cell-specific processing of preprosomatostatin in cultured neuroendocrine cells. *J Biol Chem.* 262(11):4987-93.
- Sharma K, Srikant CB. (1998) Induction of wild-type p53, Bax, and acidic endonuclease during somatostatin-signaled apoptosis in MCF-7 human breast cancer cells. *Int J Cancer.* 76(2):259-66.
- Sharma K, Patel YC, Srikant CB. (1996) Subtype-selective induction of wild-type p53 and apoptosis, but not cell cycle arrest, by human somatostatin receptor 3. *Mol Endocrinol.* 10(12):1688-96.
- Shi Y. (2009) Serine/threonine phosphatases: mechanism through structure. *Cell.* 139(3):468-84.
- Simon MI, Strathmann MP, Gautam N. (1991) Diversity of G proteins in signal transduction. *Science.* 252;802–808.
- Somvanshi RK, Billova S, Kharmate G, Rajput PS, Kumar U. (2009) C-tail mediated modulation of somatostatin receptor type-4 homo- and heterodimerizations and signaling. *Cell. Signal.* 21; 1396-1414.
- Spurney RF. (2001) Regulation of thromboxane receptor (TP) phosphorylation by protein phosphatase 1 (PP1) and PP2A. *J Pharmacol Exp Ther.* 296(2):592-9.
- Stanić D, Malmgren H, He H, Scott L, Aperia A, Hökfelt T. (2009) Developmental changes in frequency of the ciliary somatostatin receptor 3 protein. *Brain Res.* 1249:101-12.
- Swingle MR, Honkanen RE, Ciszak EM. (2004) Structural basis for the catalytic activity of human serine/threonine protein phosphatase-5. *J Biol Chem.* 279(32):33992-9.
- Tortorella S, Karagiannis TC. (2014) Transferrin receptor-mediated endocytosis: a useful target for cancer therapy. *J Membr Biol.* 247(4):291-307.
- Tower-Gilchrist C, Lee E, Sztul E. (2011) Endosomal trafficking of the G protein-coupled receptor somatostatin receptor 3. *Biochem Biophys Res Commun.* 413(4):555-60.

- Tran TM, Friedman J, Baameur F, Knoll BJ, Moore RH, Clark RB. (2007) Characterization of beta2-adrenergic receptor dephosphorylation: Comparison with the rate of resensitization. *Mol Pharmacol.* 71(1):47-60.
- Tulipano G, Stumm R, Pfeiffer M, Kreienkamp HJ, Höllt V, Schulz S. (2004) Differential beta-arrestin trafficking and endosomal sorting of somatostatin receptor subtypes. *J Biol Chem.* 279(20):21374-82.
- van Hagen PM, Krenning EP, Kwekkeboom DJ, Reubi JC, Anker-Lugtenburg PJ, Löwenberg B, Lamberts SW. (1994) Somatostatin and the immune and haematopoietic system; a review. *Eur J Clin Invest.* 24(2):91-9.
- Venter et al. (2001) The sequence of the human genome. *Science.* 291(5507):1304-51.
- Vezzosi D, Bennet A, Courbon F, Caron P. (2008) Short- and long-term somatostatin analogue treatment in patients with hypoglycaemia related to endogenous hyperinsulinism. *Clin Endocrinol (Oxf).* 68(6):904-11.
- Virshup DM, Shenolikar S. (2009) From promiscuity to precision: protein phosphatases get a makeover. *Mol Cell.* 33(5):537-45.
- War SA, Kumar U. (2012) Coexpression of human somatostatin receptor-2 (SSTR2) and SSTR3 modulates antiproliferative signaling and apoptosis. *J Mol Signal.* 7(1):5
- War SA, Somvanshi RK, Kumar U (2011) Somatostatin receptor-3 mediated intracellular signaling and apoptosis is regulated by its cytoplasmic terminal. *Biochim Biophys Acta.* 1813(3):390-402.
- Weckbecker G, Lewis I, Albert R, Schmid HA, Hoyer D, Bruns, C. (2003) Opportunities in somatostatin research: biological, chemical and therapeutic aspects. *Nat. Rev. Drug Discov.* 2; 999-1017.
- Wedegaertner PB, Wilson PT, Bourne HR. (1995) Lipid modifications of trimeric G proteins. *J. Biol. Chem.* 270(2); 503-6.
- Yachu JK, Gosh M, and Schonbrunn A. (2011) Ligand-dependent mechanism of sst2a receptor trafficking: role of site-specific phosphorylation and receptor activation in the actions of biased somatostatin agonists *Mol. Endocrinol.* 25(6):1040-1054.
- Yamada Y, Reisine T, Law SF, Ihara Y, Kubota A, Kagimoto S, Seino M, Seino Y, Bell GI, Seino S. (1992 a) Somatostatin receptors, an expanding gene family: cloning and functional characterization of human SSTR3, a protein coupled to adenylyl cyclase. *Mol Endocrinol.* 6(12):2136-42.
- Yamada Y, Post SR, Wang K, Tager HS, Bell GI, Seino S. (1992 b) 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):251-5.
- Yasuda K, Rens-Domiano S, Breder CD, Law SF, Saper CB, Reisine T, Bell GI. (1992) Cloning of a novel somatostatin receptor, SSTR3, coupled to adenylylcyclase. *J Biol Chem.* 267(28):20422-8.
- Zalewska M, Siara M, Sajewicz W. (2014) G protein-coupled receptors: abnormalities in signal transmission, disease states and pharmacotherapy. *Acta Pol Pharm.* 71(2):229-43.
- Zaremba S, Keen JH. (1983) Assembly polypeptides from coated vesicles mediate reassembly of unique clathrin coats. *J Cell Biol.* 97(5 Pt 1):1339-47.
- Zhan Q, Fan S, Bae I, Guillouf C, Liebermann DA, O'Connor PM, Fornace AJ Jr. (1994) Induction of bax by genotoxic stress in human cells correlates with normal p53 status and apoptosis. *Oncogene.* 9(12):3743-51.

6. Anhang

Abbildungsverzeichnis

- Abbildung 1:** GPCR-Aktivierung und Signalling (aus Ritter et al. 2009)
- Abbildung 2:** Aktivierung und Signalling von G-Proteinen (aus Ritter et al. 2009)
- Abbildung 3:** Somatostatin und Analoga
- Abbildung 4:** Schematische Darstellung des sst3-C-Terminus
- Abbildung 5:** Schematische Darstellung des jeweiligen C-Terminus der hsst3-Mutanten
- Abbildung 6:** Für die vorliegende Arbeit generierte Antikörper gegen sst3-Phosphorylierungsstellen
- Abbildung 7:** Konzentrationsabhängige Phosphorylierung des sst3 durch Somatostatin
- Abbildung 8:** Agonist-abhängige Phosphorylierung des sst3
- Abbildung 9:** Zeitverlauf der Phosphorylierung am sst3
- Abbildung 10:** Ausbleibende Phosphorylierung am sst3 nach Stimulation mit dem spezifischen sst3-Liganden L-796/778
- Abbildung 11:** Untersuchung einer möglichen heterologen Phosphorylierung des sst3
- Abbildung 12:** Analyse der GRK-vermittelten Phosphorylierung des sst3
- Abbildung 13:** Zeitverlauf der Dephosphorylierung des sst3
- Abbildung 14:** Calyculin A inhibiert die Dephosphorylierung des sst3
- Abbildung 15:** Die PP1 α und die PP1 β katalysieren die Dephosphorylierung des sst3
- Abbildung 16:** Rekrutierung von β -Arrestin-2
- Abbildung 17:** Rekrutierung von β -Arrestin-1
- Abbildung 18:** Immunzytochemische Untersuchung der agonist-abhängigen Internalisierung
- Abbildung 19:** Quantitative Auswertung der Internalisierung nach 30 min
- Abbildung 20:** Immunzytochemische Untersuchung des Rezeptor-Recycling
- Abbildung 21:** Quantitative Bestimmung des Recycling-Prozesses
- Abbildung 22:** Agonist-abhängige Downregulation des sst3
- Abbildung 23:** Einfluss einer Mutation von Lysin- und Phosphorylierungsstellen auf die Downregulation des sst3
- Abbildung 24:** Inhibierung der Downregulation des sst3 durch proteasomale und lysosomale Inhibitoren
- Abbildung 25:** Ubiquitinylierungen der verschiedenen Somatostatin-Rezeptoren
- Abbildung 26:** Clathrin-abhängige Internalisierung und Recycling-Verhalten von Somatostatin-Rezeptoren
- Abbildung 27:** sst3-Agonisten induzieren unterschiedliche Signalwege

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Rezeptoren, mit denen HEK 293 stabil transfiziert wurden

Tabelle 2: Verwendete Primär- und Sekundärantikörper und ihre für die Immundetektion im Western Blot, Immunzytochemie und ELISA eingesetzten Verdünnungen

Tabelle 3: Verwendete cDNA-Expressionskonstrukte (pcDNA3.1 wurde bei Source BioScience imaGenes erworben)

Tabelle 4: Verwendete siRNA-Sequenzen

Tabelle 5: Verwendete Substanzen

Tabelle 6: Laborgeräte

Tabelle 7: Verbrauchsmaterialien

Abkürzungsverzeichnis

Abb	Abbildung
AC	Adenylatzyklase
ACTH	Adrenocorticotropes Hormon
ADH	Antidiuretisches Hormon
AP-2	Adapter-Protein-2
AS	Aminosäure
BAX	BCL-2 associated X protein
BSA	Bovine Serum Albumin (Rinderserumalbumin)
cAMP	cyklisches Adenosinmonophosphat
C-Terminus	Carboxyl-Terminus
DAG	Diacylglycerin
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
DTPA	Diethylentriaminpentaessigsäure
DTT	Dithiothreitol
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EGF	Epidermaler Wachstumsfaktor
ERK	extrazellulär Signal-regulierte Kinase
FCS	Fetal Calf Serum (fetales Kälberserum)
FCP/SCD	TFIIF-associating component of RNA polymerase II CTD phosphatase/ small CTD phosphatase
G418	Geneticinsulfat
GDP	Guanosindiphosphat
GEF	GTP-Austauschfaktor
GH	Growth hormon, Wachstumshormon
GIRK	G protein-coupled inwardly-rectifying potassium channels
GPCR	G-Protein-gekoppelter Rezeptor
GRK	G-Protein-gekoppelte Rezeptorkinase
G-Protein	Guanosin-5'-triphosphat-bindendes Protein
GTP	Guanosintriphosphat
GTPase	Guanosintriphosphatase
HA	Hämagglutin
HEK293	humane embryonale Nieren-293-Zellen
IGF-1	Insulin-like Growth Factor
IGFBP	IGF binding protein
IMCD	inner medullary collecting duct
MAPK	Mitogen aktivierte Proteinkinase
N-Terminus	Amino-Terminus
PARP-1	Poly-ADP-Ribose-Polymerase

PBS	Phosphate Buffered Saline
PCR	Polymerase Chain Reaction (Polymerasekettenreaktion)
PDE	Phosphodiesterase
PDGF	Platelet-derived growth factor
PH	pleckstrin homolgy
PI3K	Phosphatidylinositol-3-Kinase
PIP2	Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat
PIP3	Phosphatidylinositol-3,4,5-triphosphat
PKA	Proteinkinase A
PKC	Proteinkinase C
PLC	Phospholipase C
PP	Proteinphosphatase
PPM	metal-dependent protein phosphatase
PPP	Phospho Protein Phosphatase
PSK	Serin/ Threonin Kinasen
PSTP	Protein Serin/ Threonin Phosphatasen
PTHr	Parathyroid-Hormon-Rezeptor
PTK	Protein Tyrosin Kinasen
PTP	Protein Tyrosin Phosphatase
PVDF	Polyvinylidenfluorid
RGS	Regulatoren der G-Protein-Signalweitergabe
rsst-Rezeptor	Ratten Somatostatin-Rezeptor
SDS	Sodium Dodecyl Sulfate (Natriumdodecylsulfat)
SHP-1	SH2 domain containing cytoplasmic protein-tyrosine phosphatase
siRNA	small interfering ribonucleic acid
SOM230	Pasireotid
SS-14 (-28)	Somatostatin-14 (-28)
sst	Somatostatin-Rezeptor
Tfn	Transferrin
TRIS	Tris(hydroxymethyl)aminomethan
WS	washout

Danksagung

Ich möchte mich sehr herzlich bei Prof. Dr. Stefan Schulz bedanken, für die Möglichkeit und das Vertrauen, diese Arbeit in seinem Institut anzufertigen. Vielen Dank für die stets offene Tür, die gute Betreuung und die vielfältigen Ideen.

Meinen Gutachter Prof. Frank-Dietmar Böhmer und Prof. Günter Stalla möchte ich für die Begutachtung und Bewertung meiner Arbeit danken.

Des Weiteren möchte ich mich bei allen Mitgliedern der AG Schulz bedanken, speziell bei Andrea Kliewer, Heidrun Guder, Elke Miess, Anika Mann und Stephan Klinger für die schöne Arbeitsatmosphäre und die guten Ratschläge, die vielen produktiven Diskussionen und die alltäglichen Gespräche, die den Laboralltag abwechslungsreich gestaltet haben.

Vielen Dank auch an alle anderen Arbeitsgruppen und Mitarbeiter des Instituts für neue Ideen, Hilfestellungen und anderweitige Unterstützung.

Bei meinen Eltern möchte ich mich für die vielfältige Unterstützung während des ganzen Studiums bedanken. Bei allem seid ihr mir eine große Hilfe. Euer Glaube an mich gibt mir Halt und den Willen, niemals aufzugeben.

Meinem Bruder, Matthias Lehmann, möchte ich dafür danken, dass er immer für mich da ist und zu mir hält.

Zuletzt, ein liebes Dankeschön an meine Freundin Laura Bloch für die immer vorhandene Unterstützung und den Zusammenhalt. Du hast mir wertvolle Tipps gegeben, mit dir kann ich über alles sprechen und du hast an mich geglaubt!

Du und Diana seid das wertvollste Geschenk in meinem Leben. Danke für Alles!

Selbständigkeitserklärung

Hiermit erkläre ich, dass ich die vorliegende Arbeit selbständig und ausschließlich unter Verwendung der angegebenen Hilfsmittel und Literatur angefertigt habe.

Wörtliches oder indirekt übernommenes Gedankengut wurde als solches gekennzeichnet.

Des Weiteren erkläre ich, dass die Hilfe eines Promotionspartners nicht in Anspruch genommen wurde und Dritte im Zusammenhang mit dem Inhalt der vorgelegten Dissertation weder unmittelbar noch mittelbar geldwerte Leistungen von mir erhalten haben.

Die Promotionsordnung der Biologisch-Pharmazeutischen Fakultät der Friedrich-Schiller-Universität Jena ist mir bekannt und die gleiche, eine in wesentlichen Teilen ähnliche oder eine andere Abhandlung wurde von mir nicht bei einer anderen Hochschule als Dissertation eingereicht.

Jena, den 25.03.15

Andreas Lehmann