

ZUSAMMENFASSUNG

Beim Menschen und anderen Säugetieren gibt es fünf Somatostatin-Rezeptor-Subtypen (sst1-sst5), die zur Gruppe der G-Protein-gekoppelten Rezeptoren (GPCR) der Klasse I gehören. Sie sind für die von Somatostatin ausgehende Signaltransduktion verantwortlich und an der Regulierung der Sekretion von Wachstums- und weiteren Peptidhormonen beteiligt. Neuere Literaturbefunde zeigen, dass GPCR als dimere oder oligomere Funktionseinheiten existieren. Bisher wurden hauptsächlich phylogenetisch nahe verwandte Rezeptorkombinationen getestet. Daher wurde hier erstmals die Heterodimerisierung bei mehreren Kombinationen von sst2A-Rezeptoren der Ratte mit verschiedenen GPCR systematisch untersucht. Hierfür wurden sst2A-exprimierende HEK293-Zellen mit folgenden Rezeptoren transfiziert: den sst1-sst5; dem MOR1 (Opioid-Familie, Klasse I); den vasoaktiven-intestinal-Peptid-Rezeptoren VPAC1, VPAC2; den Neurotensin-Rezeptoren NT1, NT2 (Klasse II) und den metabotropen Glutamat-Rezeptoren mGluR1 und mGluR5 (Klasse III).

Ziel dieser Arbeit war es festzustellen, ob die Rezeptoren unter diesen Bedingungen miteinander dimerisieren und ob die phylogenetische Entfernung dabei eine Rolle spielt. Die Homodimerisierung des sst2A-Rezeptors und die Heterodimerisierung von sst2A mit MOR1 wurde in lebenden HEK293-Zellen mittels BRET (Biolumineszenz-Resonanz-Energie-Transfer) sowie an isolierten Rezeptoren durch eine Koimmunpräzipitation (Ko-IP) nachgewiesen. Nach den Ko-IP-Studien wurde im Immunoblot gezeigt, dass sich alle untersuchten Kombinationen mit dem sst2A-Subtyp als Heterodimere kopräzipitieren ließen.

Darüber hinaus wurde bei den Heterodimeren sst2A-sst4 und sst2A-MOR1 nach dimerisierungsbedingten funktionellen Veränderungen gesucht, weil die in der Literatur beschriebenen Dimere oft veränderte Rezeptoreigenschaften zeigten. Die agonisten-induzierte Endozytose (Internalisierung) wurde mit Hilfe von Immunzytochemie im Konfokalmikroskop ausgewertet, die Aktivierung der mitogen-aktivierten-Kinasen (ERK1 und ERK2) wurde hingegen im Immunoblot bestimmt.

Obwohl die Heterodimere sst2A-sst4 an der Plasmamembran kolokalisiert waren, verhielten sich beide Rezeptoren, verglichen mit der sst2- und sst4-Zelllinie, unverändert. Der sst2-Rezeptor internalisierte ausschließlich nach Stimulation mit sst2-selektiven Liganden (L-779,976). Dagegen internalisierte der sst4-Rezeptor konstitutiv, unabhängig von einer Stimulation. Auch im Fall der Aktivierung von ERK1/2 konnten keine signifikanten Unterschiede zwischen einzeln und koexprimierten Rezeptoren festgestellt werden.

Im Gegensatz dazu veränderte sich das Internalisierungsmuster von MOR1 nach einer Koexpression mit sst2A im Vergleich zu einzeln exprimierten MOR1-Zellen signifikant. In der Abwesenheit von Agonisten befanden sich die einzeln exprimierten sst2A- und MOR1-Rezeptoren an der Plasmamembran. Sie endozytierten ausschließlich nach einer Stimulation mit rezeptor-selektiven Agonisten (sst2-selektiv L-779,976; MOR1-selektiv DAMGO [D-Ala²,Me-Phe⁴,Gly⁵-ol]-enkephalin). Bei einer Koexpression von beiden Rezeptoren internalisierte MOR1 weiterhin unverändert nur nach Behandlung mit MOR1-selektivem DAMGO. Nach einer Stimulation mit dem sst2A-spezifischen Liganden (L-779,976) internalisierten beide Rezeptoren jedoch zusammen. Des Weiteren desensibilisierten beide Rezeptoren nach einer Präinkubation (4 h) mit L-779,976 oder DAMGO und konnten anschließend mit den eigenen Agonisten nicht mehr stimuliert werden.

Die Experimente zeigen, dass Heterodimerisierung ein häufiges Phänomen ist, jedoch nicht immer zur Modulation der Rezeptoreigenschaften führt. Dabei spielt der phylogenetische Verwandtschaftsgrad vermutlich keine Rolle. Möglicherweise bilden alle GPCR in der Plasmamembran lange oligomere Doppelketten, aus denen die unterschiedlichen physiologischen Konsequenzen resultieren können. Es ist daher zu vermuten, dass es weitere spezies- oder zellartsspezifische Mechanismen gibt, die die Heterodimerisierung und ihre Konsequenzen regulieren.