

Ligand induzierte Phosphorylierung des Chemokin Rezeptors
CCR5: strukturelle Analyse und Funktion

Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultäten
der Georg-August-Universität zu Göttingen

vorgelegt von
Friederike Hüttenrauch
aus Braunschweig

Göttingen 2004

D7

Referent: Prof. Dr. Hardeland

Korreferent: Prof. Dr. Pieler

Tag der mündlichen Prüfung: 03.11.2004

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis	7
Abbildungsverzeichnis.....	9
Tabellenverzeichnis.....	11
<u>I. Einleitung</u>	12
1 G-Protein-gekoppelte Rezeptoren.....	12
1.1 Struktur von G-Protein-gekoppelten Rezeptoren.....	12
1.2 Signaltransduktion von G-Protein-gekoppelten Rezeptoren.....	15
1.2.1 Signaltransduktion über G-Proteine und Rezeptorphosphorylierung.....	16
1.2.2 Desensibilisierung von G-Protein-gekoppelten Rezeptoren.....	18
1.2.3 Internalisierung von G-Protein-gekoppelten Rezeptoren.....	19
2 Chemokinrezeptoren.....	20
3 Der CC-Chemokinrezeptor 5 (CCR5).....	21
4 Ziele dieser Arbeit.....	24
<u>II. Material und Methoden</u>	
1 Material	25
1.1 Chemikalien, Reagenzien, Kits.....	25
1.2 Labormaterialien.....	26
1.3 Geräte.....	27
1.4 Stammlösungen und Standardpuffer	28
1.5 Bakterienstämme.....	30
1.6 Medien für Bakterien.....	31
1.7 Eukaryotische Zelllinien.....	31
1.8 Medien für Zellkultur.....	32
1.9 Enzyme.....	33
1.10 Antikörper.....	33
1.11 Oligonukleotide.....	35
1.12 Vektoren.....	38
1.13 Antibiotika.....	41

2	Methoden	42
2.1	<u>Kultivierung und Manipulation von Mikroorganismen</u>	42
2.1.1	Kultivierung von <i>Escherichia coli</i>	42
2.1.2	Präparation von chemisch kompetenten <i>E. coli</i> - Zellen.....	42
2.1.3	Transformation von chemisch kompetenten <i>E. coli</i> - Zellen.....	43
2.2	<u>Klonierungstechniken und Manipulation von Nukleinsäuren.....</u>	43
2.2.1	Isolierung von Plasmid-DNA aus <i>E. coli</i>	43
2.2.1.1	Isolierung von Plasmid-DNA (STET-Methode).....	43
2.2.1.2	Mini-Präparation.	44
2.2.1.3	Maxi-Präparation.....	44
2.2.2	Phenol-Fällung von DNA.....	44
2.2.3	Konzentrations- und Reinheitsbestimmung von DNA.....	44
2.2.4	Polymerase-Kettenreaktion („PCR“)	45
2.2.5	Restriktion von DNA	45
2.2.6	Dephosphorylierung von DNA.....	46
2.2.7	Agarose-Gelelektrophorese	46
2.2.8	Isolierung von DNA-Fragmenten aus Agarose	46
2.2.9	Ligation von DNA-Fragmenten	46
2.2.10	Sequenzierung von DNA.....	47
2.3	<u>Kultivierung und Manipulation eukaryotischer Zellen.....</u>	47
2.3.1	Kultivierung von RBL-Zellen.....	47
2.3.2	Kultivierung von HEK-293-Zellen.....	47
2.3.3	Bestimmung der Zellzahl und Zellvitalität.....	48
2.3.4	Lagerung eukaryotischer Zellen.....	48
2.3.5	Transfektion eukaryotischer Zellen.....	48
2.3.5.1	Elektroporation von RBL-2H3 Zellen.....	48
2.3.5.2	Identifizierung und Subklonierung von Transfektanten.....	49
2.3.5.3	Ca-Phosphat-Transfektion von HEK-293 Zellen.....	50
2.4	<u>Funktionelle Untersuchungen transfizierter eukaryotischer Zellen.....</u>	51
2.4.1	Durchflußzytometrie im Fluoreszenz-aktivierten Zellsorter (FACS).....	51
2.4.1.1	Markierung nicht permeabilisierter Zellen.....	51
2.4.1.2	Markierung permeabilisierter Zellen.....	51
2.4.2	Konfokale Lasermikroskopie.....	52

2.4.2.1	Markierung nicht permeabilisierter Zellen.....	52
2.4.2.2	Markierung permeabilisierter Zellen.....	53
2.4.2.3	Mikroskopische Analyse.....	53
2.4.3	ELISA („Sandwich-Verfahren“).....	53
2.4.4	N-Acetyl- β -D-Glucosaminidase-Freisetzung (NAGA-Test).....	54
2.4.5	Fluoreszenzphotometrische Messung der Calciumionen-Freisetzung.....	55
2.4.6	β -Arrestin-Translokation.....	56
2.4.7	Immunpräzipitation.....	57
2.4.8	SDS-Gelelektrophorese.....	58
2.4.9	Immunoblot.....	59
2.4.10	Ablösen von Immunkomplexen von Zellulose-Membranen („Strippen“)..	60
2.4.11	Chemotaxis.....	61
2.4.12	Biolumineszenz Resonanz Energie Transfer (BRET).....	61
2.5	<u>Radioaktive Methoden</u>	63
2.5.1	^{32}P -Inkorporation.....	63
2.5.2	Phosphoaminosäuren-Analyse mittels 2D-Gelelektrophorese.....	64
2.5.3	Markierung von Antikörpern mit ^{125}I od.....	65
2.5.3.1	Iodierung des Antikörpers.....	65
2.5.3.2	Bestimmung der Effizienz der Iodierung.....	66
2.5.4	Nachweis der Rezeptor-Internalisierung mit ^{125}I -markierten Antikörpern	67
2.5.5	Nachweis der Rezeptor-Internalisierung mit ^{125}I -markierten Liganden....	67

III. Ergebnisse

1.	<u>Strukturelle Voraussetzungen und funktionelle Konsequenzen der β-Arrestin-Bindung an CCR5</u>	69
1.1	Bedeutung der vier C-terminalen Serine des CCR5 für die β-Arrestin-Bindung, Internalisierung und Desensibilisierung des Rezeptors.....	69
1.1.1	Herstellung und Expression der RBL-CCR5-S/A-Zellreihen.....	69
1.1.2	Charakterisierung der β -Arrestin Bindung an den CCR5-C-Terminus.....	71
1.1.2.1	Zeit- und Dosis-abhängige β -Arrestin-Bindung an den CCR5-WT-Rezeptor.....	71

1.1.2.2	Bedeutung der Anzahl und Position der C-terminalen Serine für die β -Arrestin-Bindung an CCR5.....	73
1.1.3	Bedeutung der Anzahl und Position der C-terminalen Serine für die CCR5-Internalisierung.....	75
1.1.4	Bedeutung der Anzahl und Position der C-terminalen Serine für die Desensibilisierung des CCR5.....	77
1.2	Charakterisierung der β-Arrestin-Bindung an das CCR5-DRY-Motiv.	80
1.2.1	Herstellung und Aktivität der RBL-CCR5-DR/NN-Mutante.....	81
1.2.2	Bedeutung des DRY-Motivs für die β -Arrestin-Bindung an CCR5.....	82
1.2.3	Bedeutung des DRY-Motivs für die Internalisierung des CCR5.....	84
2.	<u>Strukturelle Voraussetzungen und Regulation von Rezeptorfunktionen durch Homo- und Heterodimerisierung G-Protein-gekoppelter Rezeptoren</u>	85
2.1	Nachweis und funktionelle Konsequenzen von CCR5-Homodimeren....	85
2.1.1	<u>Nachweis der CCR5-Homodimerisierung mittels BRET-Analysen.....</u>	85
2.1.1.1	Herstellung der CCR5-BRET-DNA-Konstrukte.....	85
2.1.1.2	Nachweis von Ligand-unabhängigen CCR5-Homodimeren.....	86
2.1.2	<u>Funktionelle Bedeutung der homologen CCR5-Dimerisierung für die Rezeptorregulation</u>	87
2.1.2.1	Konstruktion einer CCR5- Δ 2-17-Rezeptormutante mit einem deletierten RANTES-Bindungsmotiv.....	87
2.1.2.2	Herstellung und Expression von RBL-CCR5- Δ 2-17-Zellreihen.....	88
2.1.2.3	GRK-Kreuzphosphorylierung nicht Ligand-gebundener Rezeptoren in CCR5-Homodimeren.....	89
2.1.2.4	Komplementierung der β -Arrestin-Bindung zweier Defektmutanten in CCR5-Homodimeren.....	92
2.1.2.5	Komplementierung der β -Arrestin-abhängigen Internalisierung zweier Defektmutanten in CCR5-Homodimeren.....	93

2.2	Nachweis und funktionelle Konsequenzen der Heterodimerisierung.....	94
2.2.1	<u>Nachweis und funktionelle Konsequenzen der CCR5-Heterodimerisierung mit C5aR und AT1aR.....</u>	95
2.2.1.1	Herstellung und Expression von RBL-C5aR/CCR5- und RBL-AT1aR/CCR5-Zellreihen.....	95
2.2.1.2	Charakterisierung der β -Arrestin-Bindung an C5aR und AT1aR.....	96
2.2.1.3	Nachweis der Heterodimerisierung durch Coimmunpräzipitation in RBL-C5aR/CCR5- und RBL-AT1aR/CCR5-Zellen.....	97
2.2.1.4	Nachweis von C5aR/CCR5- und AT1aR/CCR5-Heterodimeren in BRET-Analysen.....	99
2.2.1.4.1	Herstellung der BRET-DNA-Konstrukte.....	99
2.2.1.4.2	Nachweis von Ligand-unabhängigen CCR5-Heterodimeren.....	99
2.2.1.5	Heterologe CCR5-Kreuzphosphorylierung durch C5aR und AT1aR.....	100
2.2.1.6	CCR5-Cointernalisierung in RBL-C5aR/CCR5- und RBL-AT1aR/CCR5-Zellen.....	102
2.2.1.7	Desensibilisierung der C5aR/CCR5-Heterodimere.....	103
2.2.2	<u>Bedeutung des C5aR-C-Terminus für die CCR5-Regulation in CCR5/C5aR-Heterodimeren.....</u>	104
2.2.2.1	Charakterisierung der phosphorylierungsdefizienten C5a-Rezeptoren.....	104
2.2.2.1.1	Herstellung von phosphorylierungsdefizienten C5a-Rezeptoren.....	105
2.2.2.1.2	Expression der phosphorylierungsdefizienten C5a-Rezeptoren.....	105
2.2.2.1.3	Serin- und Threonin-Phosphorylierung des C5a-Rezeptors.....	106
2.2.2.1.4	Bedeutung der C-terminalen Serine und Threonine für die β -Arrestin-Bindung des C5a-Rezeptors.....	107
2.2.2.1.5	Bedeutung der C-terminalen Serine und Threonine für die Internalisierung des C5a-Rezeptors.....	108
2.2.2.1.6	Bedeutung der C-terminalen Serine und Threonine für die Desensibilisierung des C5a-Rezeptors.....	109
2.2.2.2	Heterologe CCR5-Regulation durch phosphorylierungsdefiziente C5a-Rezeptoren.....	110
2.2.2.2.1	Herstellung und Expression der RBL-CCR5/C5aR-S(T)/A-Zellen..	110

2.2.2.2.2	Nachweis der Heterodimerisierung von CCR5 und C5aR-ST/A mittels BRET-Analysen.....	111
2.2.2.2.3	Bedeutung der C-terminalen Serine und Threonine des C5aR für die heterologe CCR5-Kreuzphosphorylierung.....	112
2.2.2.2.4	Bedeutung der C-terminalen Serine und Threonine des C5aR für die heterologe CCR5-Cointernalisierung.....	113
2.2.3	<u>Heterologe CCR5-Cointernalisierung mit einer konstitutiv internalisierenden C5aR-US28_{CT}-Rezeptor-Chimäre.....</u>	115
2.2.3.1	Herstellung der C5aR-US28 _{CT} -Chimäre.....	115
2.2.3.2	Rezeptorexpression in RBL-C5aR-US28 _{CT} /CCR5-Zellen.....	116
2.2.3.3	Nachweis der konstitutiven CCR5-Cointernalisierung mit der C5aR-US28 _{CT} -Chimäre in der Konfokalmikroskopie.....	117
2.2.4	<u>Strategien zur Durchbrechung der Homodimerisierung.....</u>	121
2.2.4.1	Bedeutung von CCR5-Ile52 und -Val150 für die homologe CCR5-Dimerisierung.....	121
2.2.4.1.1	Einfluß der Blockade von CCR5-Ile52 und -Val150 auf die CCR5-Dimerisierung.....	121
2.2.4.1.2	Einfluß der Blockade von CCR5-Ile52 und -Val150 auf die funktionelle Regulation des CCR5.....	122
2.2.4.2	Bedeutung des ersten Leucins der ersten Transmembrandomäne für die Homodimerbildung.....	123
2.2.4.2.1	Herstellung der Leu-Arg-Rezeptormutanten.....	124
2.2.4.2.2	Expression und Aktivität der Leu-Arg-Rezeptormutanten.....	124
2.2.4.2.3	Homodimerisierung der Leu-Arg-Rezeptormutanten.....	125
3	<u>CCR5-C5aR-Rezeptorchimären.....</u>	126
3.1	Konstruktion der CCR5-C5aR-Rezeptorchimären.....	126
3.2	Expression und Funktionalität der Rezeptorchimären.....	128
3.2.1	Phosphorylierung der Rezeptorchimären im ELISA.....	129
3.2.2	β-Arrestin-Bindung und Internalisierung der Rezeptorchimären.....	133

<u>IV. Diskussion</u>	135
1 Strukturelle Voraussetzungen und funktionelle Konsequenzen der β -Arrestin-Bindung an G-Protein-gekoppelte Rezeptoren.....	135
2 Strukturelle Grundlagen, funktionelle Konsequenzen und Relevanz der Dimerisierung von G-Protein-gekoppelten Rezeptoren.....	143
3 Die Bedeutung des Rezeptor-C-Terminus für die Phosphorylierung und β -Arrestin-Bindung an CCR5 und C5aR.....	156
4 Ausblick.....	157
<u>V. Zusammenfassung</u>	158
<u>VI. Literaturverzeichnis</u>	160

Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
ABTS	2,2-Azino-3-ethylbenzthiazolinsulfonat
Ak	Antikörper
AT1aR	Angiotensin-Rezeptor II Typ 1a
ATII	Angiotensin 2
bp	Basenpaare
BRET	Biolumineszenz Resonanz Energie Transfer
BSA	Rinderserumalbumin
C5aR	C5a-Rezeptor
CCR5	CC-Chemokinrezeptor 5
DMEM	<i>Dulbecco's modified eagle medium</i>
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	3'-Desoxynukleosid-5'-Triphosphat
DTT	Dithiothreitol
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
ELISA	<i>Enzyme linked immunosorbent assay</i>
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
FACS	Fluoreszenz-aktivierter Zellsorter (Durchflußzytometer)
FCS	Fötale Kälberserum
FITC	Fluoreszeinisothiocyanat
g	Gramm

GDP	Guanosindiphosphat
GPCR	G-Protein-gekoppelter Rezeptor
GRK	G-Protein-gekoppelte Rezeptorkinase
GTP	Guanosintriphosphat
h	Stunde
kb	Kilobasen
kDa	Kilodalton
m	milli
M	Molar
mAK	Monoklonaler Antikörper
MCF	<i>mean channel of fluorescence</i>
NaAc	Natrium-Acetat
NK	Negativkontrolle
nm	Nanometer
OD	optische Dichte
PBS	Phosphat-gepufferte Kochsalzlösung
PCR	Polymerase Kettenreaktion
pH	Negativ dekadischer Logarithmus der Protonenkonzentration
PK	Positivkontrolle
PKC	Proteinkinase C
RANTES	<i>regulated upon activation normal T cell expressed and secreted</i>
rpm	Umdrehungen pro Minute
RT	Raumtemperatur
SDS	Natriumdodecylsulfat
SDS-PAGE	SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese
s	Sekunde
τ	Calcium-Zeitkonstante [sec]
TBS	Tris-gepufferte Kochsalzlösung
TEMED	NNN'N'-Tetramethyldiamin
TRIS	Trishydroxymethylaminomethan
U	enzymatische Einheit
WT	Wildtyp
x g	vielfache Erdbeschleunigung

Abbildungsverzeichnis

Abb. 1:	Klassifikation und strukturelle Unterschiede von GPCRs.....	13
Abb. 2:	Dimerisierung von Rhodopsin und Opsin in nativen Membranen.....	14
Abb. 3:	Signaltransduktion von G-Protein-gekoppelten Rezeptoren.....	15
Abb. 4:	Klassisches Modell der homo- und heterologen Phosphorylierung von GPCRs.....	17
Abb. 5:	Schematischer Aufbau und Aminosäuresequenz von CCR5.....	23
Abb. 6:	Plasmidkarte des Expressionsvektors pEF1- <i>Myc</i> HIS-A.....	38
Abb. 7:	Plasmidkarte des Expressionsvektors pEF-Bos.....	39
Abb. 8:	Plasmidkarte des Vektors pRlucN2.....	40
Abb. 9:	Plasmidkarte des Vektors pGFP ² N2.....	40
Abb. 10:	β -Arrestin-Translokation an die Membran von RBL-CCR5-Zellen.....	72
Abb. 11:	β -Arrestin-1/2-Kreuzreaktivität des anti- β -Arrestin-1 Antikörpers.....	73
Abb. 12:	β -Arrestin-Translokation in RBL-CCR5-S/A-Mutanten.....	74
Abb. 13:	Internalisierung der RBL-CCR5-S/A-Mutanten.....	76
Abb. 14:	Verlauf der Calciumionen-Freisetzung in RBL-CCR5-S/A-Mutanten....	79
Abb. 15:	Lokalisation des CCR5-DRY-Motivs.....	80
Abb. 16:	Calciumionen-Freisetzung in RBL-CCR5- und RBL-CCR5-DR/NN-Zellen.....	82
Abb. 17:	β -Arrestin-Translokation in RBL-CCR5- und RBL-CCR5-DR/NN-Zellen.....	82
Abb. 18:	Konzentrations- und zeitabhängige β -Arrestin-Bindung an RBL-CCR5-DR/NN.....	83
Abb. 19:	Bedeutung des DRY-Motivs für die CCR5-Internalisierung.....	84
Abb. 20:	Nachweis homologer CCR5-Dimerisierung in BRET-Analysen.....	86
Abb. 21:	Schematischer Aufbau der CCR5- Δ 2-17-Rezeptormutante.....	88
Abb. 22:	Phosphorylierungsnachweis des CCR5- Δ 2-17 mittels Immunpräzipitation.....	90
Abb. 23:	Nachweis der Phosphorylierung der RBL-CCR5- Δ 2-17-Zellen im ELISA.....	91
Abb. 24:	β -Arrestin-Translokation in RBL-CCR5- Δ 2-17-Zellen.....	92
Abb. 25:	Internalisierung der RBL-CCR5- Δ 2-17-Mutanten.....	93
Abb. 26:	β -Arrestin-Translokation in RBL-C5aR- und RBL-AT1aR-Zellen.....	97

Abb. 27: Coimmunpräzipitation in RBL-C5aR/CCR5- und RBL-AT1aR/CCR5-Zellen.....	98
Abb. 28: Untersuchung der Heterodimerisierung von CCR5 in BRET-Analysen..	100
Abb. 29: Heterologe CCR5-Phosphorylierung in RBL-C5aR/CCR5- und RBL-AT1aR/CCR5-Zellen.....	101
Abb. 30: Heterologe Cointernalisierung des CCR5.....	102
Abb. 31: Calciumionen-Freisetzung in RBL-C5aR/CCR5- und RBL-AT1aR/CCR5-Zellen.....	104
Abb. 32: Nachweis der C5aR-Phosphorylierung in der 2D-Gelelektrophorese.....	107
Abb. 33: β -Arrestin-Translokation in RBL-C5aR-Mutanten.....	108
Abb. 34: Internalisierung der phosphorylierungsdefizienten C5a-Rezeptor-mutanten.....	109
Abb. 35: Verlauf der intrazellulären Calcium-Freisetzung in RBL-C5aR-Mutanten.....	110
Abb. 36: CCR5-Kreuzphosphorylierung durch C5aR-S/A und C5aR-ST/A.....	113
Abb. 37: CCR5-Cointernalisierung durch C5aR-S/A und C5aR-ST/A.....	114
Abb. 38: Rezeptorexpression in RBL-C5aR-US28 _{CT} /CCR5-Zellen.....	117
Abb. 39: Rezeptorlokalisierung in RBL-C5aR-US28 _{CT} /CCR5-Zellen.....	118
Abb. 40: Rezeptor-Colokalisation in RBL-C5aR-US28 _{CT} /CCR5-Zellen.....	120
Abb. 41: Einfluß der R5wt1- und R5wt4-Peptide auf die CCR5-Homodimerisierung.....	122
Abb. 42: Einfluß der R5wt1- und R5wt4-Peptide auf die CCR5-Phosphorylierung.....	123
Abb. 43: Einfluß der Leu-Arg-Mutation der TM1 auf die homologe CCR5- bzw. C5aR-Dimerisierung.....	126
Abb. 44: Schematische Darstellung der CCR5-C5aR-Rezeptorchimären.....	127
Abb. 45: Konzentrationsabhängige Phosphorylierung der Rezeptorchimären.....	130
Abb. 46: Zeitabhängige Phosphorylierung der Rezeptorchimären.....	132
Abb. 47: β -Arrestin-Translokation an die Membran der Rezeptorchimären.....	133
Abb. 48: Modell der β -Arrestin-Bindung an GPCRs.....	139
Abb. 49: Modell der Komplementierung der Rezeptorfunktion durch Homodimerisierung.....	149
Abb. 50: Modell der GRK-vermittelten heterologen Phosphorylierung.....	151

Tabellenverzeichnis

Tab. 1: Antibiotika.....	42
Tab. 2: Zusammensetzung der SDS-Gele.....	58
Tab. 3: CCR5-Expression der stabil transfizierten RBL-CCR5-S/A-Zellreihen..	70
Tab. 4: Desensibilisierung der RBL-CCR5-S/A-Mutanten.....	78
Tab. 5: Expression und Aktivität der RBL-CCR5-DR/NN-Zellreihe.....	81
Tab. 6: Expression und Aktivität der CCR5- Δ 2-17-Zellreihen.....	89
Tab. 7: Expression und Funktion der RBL-C5aR- und RBL-AT1aR-Zellreihen.	96
Tab. 8: Expression und Aktivität der RBL-C5aR-Mutanten.....	106
Tab. 9: Rezeptorexpression der RBL-CCR5/C5aR-S(T)/A-Zellen.....	111
Tab. 10: Expression der RBL-C5aR-US28 _{CT} -Zellreihen.....	116
Tab. 11: Expression und Aktivität der RBL-Rezeptor-Leu-Arg-Zellreihen.....	125
Tab. 12: Expression und Funktionalität der CCR5-C5aR-Rezeptorchimären.....	129

I. Einleitung

1. G-Protein-gekoppelte Rezeptoren

G-Protein-gekoppelte Rezeptoren (GPCRs) stellen mit über 1000 identifizierten Mitgliedern die größte Klasse an membrangebundenen Rezeptoren im Säuger genom dar. Sie spielen eine wichtige Rolle in den verschiedensten Bereichen des Lebens, wie zum Beispiel in der Wahrnehmung von Licht, Geruch und Geschmack und in der Regulation von Blutdruck und Zuckerstoffwechsel (PIERCE *et al.*, 2002). Auch in der Pharmaindustrie spielen GPCRs eine große Rolle, da Schätzungen zufolge etwa 50 % aller modernen Medikamente die Aktivität von GPCRs modulieren (GEORGE *et al.*, 2002).

1.1 Struktur von G-Protein-gekoppelten Rezeptoren

Die Gruppe der GPCRs zeichnet sich aus durch einen einheitlichen Aufbau aus sieben Transmembrandomänen (TM), die durch drei intrazelluläre und drei extrazelluläre Schleifen miteinander verbunden sind, einem extrazellulären N-Terminus und einem intrazellulären C-Terminus. Die Transmembrandomänen sind aus 20 – 27 hydrophoben Aminosäuren aufgebaut, die eine α -helikale Anordnung aufweisen. Das Rhodopsin ist der bisher einzige GPCR, für den die Kristallstruktur mit einer Auflösung von 2,8 Ångstrom dargestellt werden konnte (PALCZEWSKI *et al.*, 2000).

Aufgrund von Ähnlichkeiten der Aminosäuresequenz werden GPCRs in mindestens sechs Familien eingeteilt, wobei die meisten der Rezeptoren der ersten Familie angehören (Abb. 1). In der Unterfamilie 1a, zu der Geruchsrezeptoren, die adrenergen Rezeptoren und auch Rhodopsin gehören, binden kleine Liganden innerhalb der Transmembrandomänen. In der Unterfamilie 1b ist die Ligandbindestelle primär in Bereichen des N-Terminus und der extrazellulären Schleifen lokalisiert. Zu dieser Familie gehören unter anderem die Chemokinrezeptoren (BOCKAERT *et al.*, 1999).

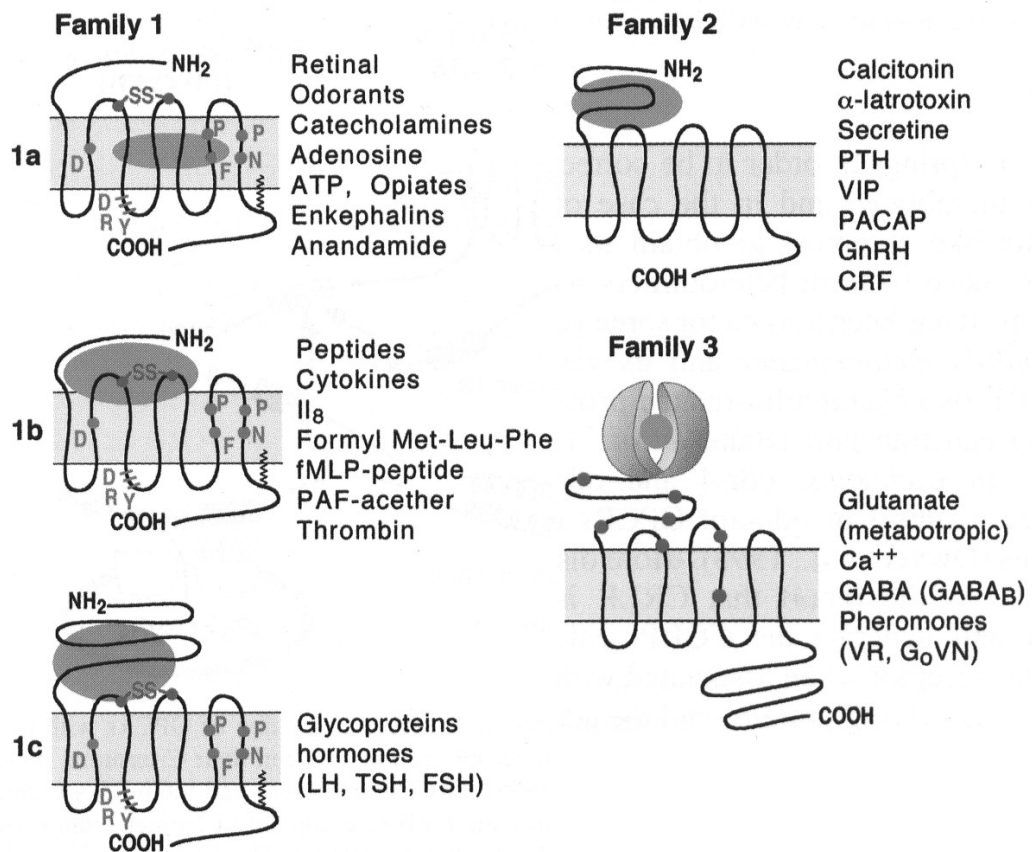


Abb. 1: Klassifikation und strukturelle Unterschiede von GPCRs

Die Abbildung zeigt die Unterschiede des strukturellen Aufbaus und der Ligandbindung der drei Hauptfamilien von G-Protein-gekoppelten Rezeptoren. Der jeweils obere Teil des Rezeptors entspricht der extrazellulären Domäne, der COOH-Terminus der Rezeptoren befindet sich im cytoplasmatischen Raum der Zelle. Die Position konservierter Aminosäuren ist im Einbuchstabencode angegeben. Die dunkelgrauen Ovale stellen den gebundenen Liganden der Rezeptoren dar. Neben dem schematischen Aufbau der GPCRs sind wichtige Vertreter der einzelnen Unterfamilien exemplarisch aufgeführt. (Abb. modifiziert aus BOCKAERT *et al.*, 1999)

Während von GPCRs lange angenommen wurde, daß sie als monomere Strukturen auf der Zelloberfläche exprimiert werden, deuten neue Untersuchungen auf eine Dimerisierung bzw. Oligomerisierung der Rezeptoren hin (ANGERS *et al.*, 2002; BOUVIER, 2001). Der erste GPCR, für den eine Dimerisierung überzeugend nachgewiesen wurde, ist der Gamma-Aminobuttersäure Rezeptor B (GABA(B)). Es konnte gezeigt werden, daß dieser Rezeptor aus zwei unterschiedlichen GPCRs zusammengesetzt ist, wobei beide Rezeptoren GbR1 und GbR2 alleine nicht funktionsfähig sind. GbR1 wird durch ein C-terminales Retentionsmotif im endoplasmatischen Reticulum zurückgehalten, während GbR2 zwar auf der Zelloberfläche exprimiert wird, aber inaktiv ist. Durch die Dimerisierung der Rezeptoren wird das GbR1-Retentionsmotif maskiert, und beide Rezeptoren werden als

funktionelles Heterodimer auf der Zelloberfläche exprimiert (WHITE *et al.*, 1998, NG *et al.*, 1999, MARGETA-MITROVIC *et al.*, 2000). Den eindrucksvollsten Hinweis auf das physiologische Vorkommen von Dimerisierung liefert die konstitutive, das heißt nicht Ligand-induzierte Dimerisierung von Rhodopsin und Opsin in nativen Membranen von murinen Photorezeptoren (LIANG *et al.*, 2003). Die Abbildung 2 zeigt deutlich die zweireihige Anordnung beider Rezeptoren, was darauf hindeutet, daß Rezeptordimerisierung nicht nur unter artifiziellen Bedingungen der Überexpression dieser Proteine auftritt.

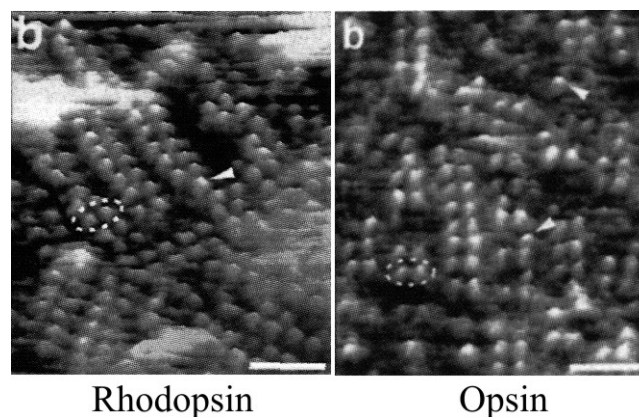


Abb. 2: Dimerisierung von Rhodopsin und Opsin in nativen Membranen

Die Abbildung zeigt elektronenmikroskopische Aufnahmen von Rhodopsin und Opsin in nativen Membranen von murinen Photorezeptoren. Beispiele für die Dimerisierung zweier Rezeptoren sind eingekreist, gelegentlich auftretende Monomere sind mit Pfeilspitzen gekennzeichnet. Die Größenbalken entsprechen jeweils 15 nm. (Abb. modifiziert aus LIANG *et al.*, 2003)

Da mit den meisten angewandten Untersuchungsmethoden nicht zwischen Dimeren und größeren Oligomeren unterschieden werden kann, wird in dieser Arbeit durchgängig der Begriff Dimer als kleinste Einheit womöglich vorhandener oligomerer Strukturen verwendet.

Obwohl die Dimerisierung mittlerweile für eine Reihe von Rezeptoren nachgewiesen werden konnte, ist bisher jedoch wenig über die Bedeutung der Dimerisierung für die Rezeptorregulation bekannt. Weiterhin stellt sich die Frage, welche Rezeptorstrukturen an der Dimerbildung beteiligt sind. Aufbauend auf Nachweisen der Heterodimerisierung mit anderen GPCRs ist außerdem unklar, was die Spezifität der Zusammenlagerung zweier unterschiedlicher GPCRs bestimmt.

1.2 Signaltransduktion von G-Protein-gekoppelten Rezeptoren

Die meisten GPCRs liegen in Abwesenheit eines Liganden in inaktiver Form vor (GETHER *et al.*, 1998). Nach der Stimulation des Rezeptors durch einen spezifischen Liganden kommt es zu einer Konformationsänderung des Rezeptors, wodurch die Bindung von heterotrimeren G-Proteinen ermöglicht und damit die Aktivierung oder Inhibition verschiedener Signalwege und Effektoren induziert wird. Durch die folgende Phosphorylierung des Rezeptors wird die Bindung von β -Arrestin ermöglicht, was zusammen mit der Phosphorylierung zur Verdrängung der G-Proteine und damit zur Termination von Signalkaskaden führt. Der desensibilisierte Rezeptor wird internalisiert und rezirkuliert nach seiner vollständigen Dephosphorylierung in endozytotischen Zellkompartimenten wieder als intakter Rezeptor an die Zelloberfläche zurück (Abb. 3). Die strukturellen Grundlagen dieses Zyklus werden in den folgenden Abschnitten detailliert beschrieben.

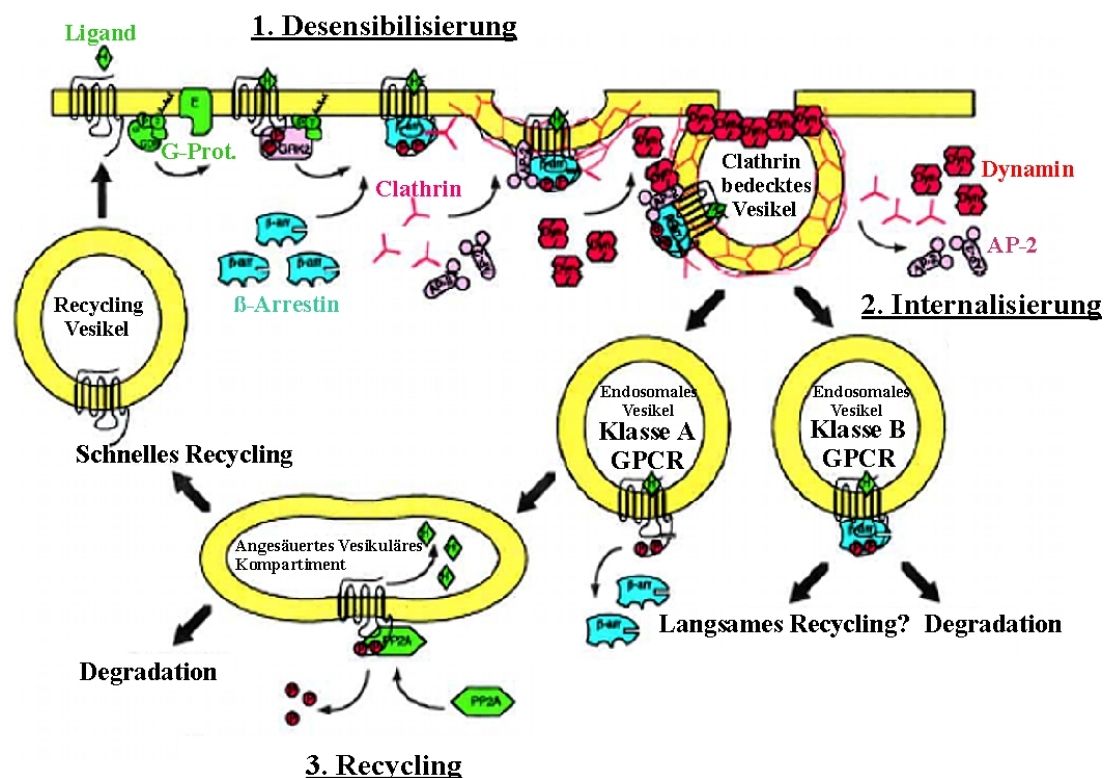


Abb. 3: Signaltransduktion von G-Protein-gekoppelten Rezeptoren

Die Ligand-Aktivierung eines GPCR führt zur Aktivierung von heterotrimeren G-Proteinen, die die Aktivierung verschiedener Signalkaskaden und parallel dazu auch die Phosphorylierung des Rezeptors induzieren. Die Phosphorylierung ermöglicht die Bindung von β -Arrestin an den GPCR, was zu dessen Desensibilisierung und Clathrin-abhängigen Internalisierung führt. Klasse A GPCRs rezirkulieren über angesäuerte Vesikel schnell wieder an die Zelloberfläche, während Klasse B GPCRs langsamer über endosomale Vesikel rezirkulieren oder degradiert werden. (Abb. modifiziert aus LUTTRELL und LEFKOWITZ, 2002)

1.2.1 Signaltransduktion über G-Proteine und Rezeptorphosphorylierung

Heterotrimere G-Proteine gehören zur Superfamilie der GTPasen und bestehen aus je einer α - (39-46 kDa), β - (35 kDa) und einer γ -Untereinheit (7,3-8,5 kDa). Die Klassifikation der G-Proteine wird durch die jeweilige α -Untereinheit determiniert, wobei bei Säugern bisher über 20 verschiedene α -Untereinheiten identifiziert und aufgrund ihrer Sequenzhomologien in vier Familien (s, i, q/11 und 12/13) eingeteilt wurden. Alle α -Untereinheiten sind aus einer Ras-ähnlichen GTPase-Domäne und einer vornehmlich helikal angeordneten Domäne aufgebaut, in deren Schnittstelle ein Guanin-Nukleotid gebunden ist. Die γ -Untereinheit ist mit einer C-terminalen Farnesyl-Gruppe in der Zellmembran verankert und bildet zusammen mit der β -Untereinheit einen fest assoziierten $\beta\gamma$ -Komplex. Es sind bisher 5 β - und 12 verschiedene γ -Untereinheiten identifiziert worden. Wegen der Vielzahl der einzelnen Untereinheiten entstehen zahlreiche Kombinationsmöglichkeiten zur Bildung funktioneller Heterotrimere (Übersicht in MORRIS und MALBON, 1999).

Die Ligand-Aktivierung eines GPCRs induziert eine Konformationsänderung des Rezeptors, die zumindest mit einer Umordnung der Membranhelices 3 und 6 einhergeht (PIERCE *et al.*, 2002). Dadurch wird die Rezeptor-Bindung an das inaktive, GDP-gebundene, heterotrimere G-Protein ermöglicht. Die Aktivierung des G-Proteins bewirkt den Austausch von GDP gegen GTP und gleichzeitig die Dissoziation der GTP-gebundenen α -Untereinheit vom membrangebundenen $\beta\gamma$ -Dimer. Sowohl die α -Untereinheit als auch die $\beta\gamma$ -Untereinheit wirken dann als „first messenger“ auf eine Reihe von Effektormolekülen ein (HAMM, 1998).

Die $G\alpha_s$ -Untereinheit reguliert bestimmte Calcium-Kanäle und stimuliert die Adenylat-Cyclase, die den „second messenger“ cAMP generiert, der unter anderem die Proteinkinase A (PKA) aktiviert. Die $G\alpha_i$ -Untereinheit reguliert Calcium- und Kalium-Kanäle und inhibiert die Adenylat-Cyclase, während die $G\alpha_{q/11}$ -Untereinheit die Phospholipase C aktiviert. Die $G\alpha_{12/13}$ -Untereinheit schließlich reguliert GTP-Austausch-Faktoren (OSTROM und INSEL, 2004). Durch die intrinsische GTPase-Aktivität der α -Untereinheit deaktiviert sich diese durch die Hydrolyse des GTP zu GDP nach kurzer Zeit selbst und kann wieder an den $\beta\gamma$ -Komplex binden.

Die $\beta\gamma$ -Untereinheit interagiert mit der membranständigen Phospholipase C, die wiederum Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat (PIP_2) in Inositol-1,4,5-triphosphat

(IP₃) und Diacylglycerin (DAG) spaltet. IP₃ wird von Phosphatasen in Inositol umgewandelt und bewirkt die intrazelluläre Freisetzung von Calciumionen. DAG aktiviert die cytosolische Serin/Threonin-Proteinkinase C (PKC), die daraufhin an die Membran transloziert und unter anderem zur Phosphorylierung von GPCRs führt. Die $\beta\gamma$ -Untereinheit bindet weiterhin zusammen mit PIP₂ an G-Protein-gekoppelte Rezeptorkinasen (GRK), die daraufhin ebenfalls die Serin- und Threonin-Phosphorylierung aktivierter GPCRs bewirken (PITCHER *et al.*, 1992; PITCHER *et al.*, 1998). Dem klassischen Modell zufolge phosphorylieren GRKs in homologer Weise lediglich Agonist-gebundenen Rezeptor (Abb. 4), während PKA und PKC in heterologer Weise auch nicht Agonist-gebundene Rezeptoren phosphorylieren (Übersicht in BÜNEMANN und HOSEY, 1999; FERGUSON, 2001). Da dieses Modell für die Regulation monomerer Rezeptoren aufgestellt wurde, bleibt zu klären, ob es auch für Rezeptor Homo- und Heterodimere seine Gültigkeit behält.

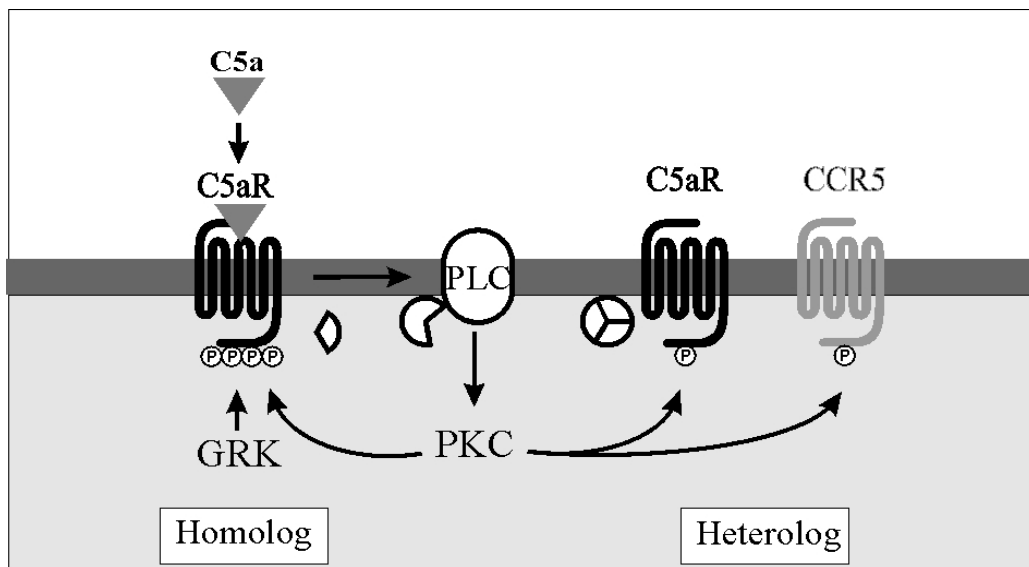


Abb. 4: Klassisches Modell der homo- und heterologen Phosphorylierung von GPCRs

Nach einer Ligand-Aktivierung eines GPCRs wird über heterotrimere G-Proteine und Phospholipase C die Phosphorylierung der GPCRs katalysiert. Dabei phosphorylieren G-Protein-gekoppelte Rezeptorkinasen (GRK) ausschließlich homolog Ligand-gebundene Rezeptoren, während Proteinkinase C (PKC) auch in heterologer Weise nicht Ligand-gebundene Rezeptoren phosphoryliert.

1.2.2 Desensibilisierung von G-Protein-gekoppelten Rezeptoren

Als Desensibilisierung wird die abnehmende zelluläre Antwort eines GPCR auf die anhaltende oder wiederholte Stimulation mit einem Liganden bezeichnet. Sie wird schon Sekunden nach der Ligand-Stimulation durch die Rezeptor-Phosphorylierung eingeleitet. Dabei unterscheidet man zwischen der homologen und heterologen Desensibilisierung von Rezeptoren (Übersicht in PERRY und LEFKOWITZ, 2002; LUTTRELL und LEFKOWITZ, 2002). Die Phosphorylierung von GPCRs durch die „second messenger“-Kinasen PKA und PKC, die zur Beeinträchtigung der Rezeptor-G-Protein-Bindung führt, zeichnet die heterologe Desensibilisierung aus, wobei dadurch auch nicht Ligand-gebundene Rezeptoren desensibilisiert werden (Abb. 4). Die homologe Desensibilisierung ist durch die GRK-vermittelte Phosphorylierung Ligand-gebundener GPCRs charakterisiert, die zur Bindung von β -Arrestin an den phosphorylierten Rezeptor führt. Durch die β -Arrestin-Bindung kommt es zur sterischen Verdrängung der G-Proteine und damit zur vollständigen Termination von G-Protein-vermittelten Signalkaskaden. β -Arrestin bindet schließlich Clathrin und β 2-Adaptin (AP-2) (GOODMAN *et al.*, 1996) und führt zur Rezeptor-Endozytose (Abb. 3). Es wird postuliert, daß β -Arrestin zwei Sensor-Regionen besitzt, wobei eine Region den Rezeptor-Phosphorylierungsstatus erkennt und der andere Sensor die Aktivierung des Rezeptors kontrolliert. Nur wenn beide Sensoren simultan einen aktivierten und zugleich phosphorylierten Rezeptor erkennen werden die Bindedomänen für Clathrin und β 2-Adaptin zugänglich (HIRSCH *et al.*, 1999, HAN *et al.*, 2001, GUREVICH *et al.*, 2003, SERGEY *et al.*, 2004). Die genauen Mechanismen dieser Sensorkontrollen sind dabei noch nicht bekannt. So bleibt zu klären, ob alle potenziellen Phosphorylierungsstellen des Rezeptors phosphoryliert sein müssen, und welcher Bereich des Rezeptors β -Arrestin die korrekte Rezeptoraktivierung vermittelt.

Zur Familie der Arrestine gehören zum einen das visuelle und das Zapfen-Arrestin, die fast ausschließlich in der Retina exprimiert werden und spezifisch an Rhodopsin bzw. Pigmente der Zapfen binden (SHINOHARA *et al.*, 1987; YAMAKI *et al.*, 1987; MURAKAMI *et al.*, 1993; CRAFT *et al.*, 1994). Die β -Arrestine, zu denen β -Arrestin-1 (Arrestin-2) und β -Arrestin-2 (Arrestin-3) gehören, werden ubiquitär exprimiert, wobei eine hohe Expressionsrate in Gehirn und Milz gefunden wurde (LOHSE *et al.*, 1990; ATTRAMADAL *et al.*, 1992). Zusätzlich wird postuliert, daß

β -Arrestine als Gerüstproteine für mitogen-aktivierte Protein-Kinasen (MAP-Kinasen) wirken (PIERCE und LEFKOWITZ, 2001; MILLER und LEFKOWITZ, 2001). Die MAP-Kinasen gehören zur Familie der Serin/Threonin-Kinasen, die in der Transduktion extrazellulärer Signale wie Zellwachstum, Zelldifferenzierung, Zellteilung und Apoptose involviert sind. Es konnte beispielsweise gezeigt werden, daß β -Arrestin-2 an die c-Jun aminoterminalen Kinasen JNK3 und ASK1 bindet (McDONALD *et al.*, 2000).

1.2.3 Internalisierung von G-Protein-gekoppelten Rezeptoren

Die Bindung von β -Arrestin an einen stimulierten GPCR führt zu dessen Internalisierung über Clathrin-bedeckte Vesikel. In nicht stimulierten Zellen rekrutiert AP-2 Clathrin-Moleküle an die Plasmamembran und initiiert die Ausbildung eines Clathrin-Gitters, wodurch eine flache, Clathrin-bedeckte Grube entsteht. Nach der Stimulation eines GPCRs leitet β -Arrestin diesen durch die Bindung an Clathrin und AP-2 in die vorgeformten Clathrin-Gruben (Abb. 3), die sich durch Bindung zahlreicher anderer endozytischer Proteine wie Amphiphysin, Dynamin und Synaptojanin in die Zelle einstülpen und sich schließlich von der Plasmamembran abschnüren (McPHERSON *et al.*, 2001). Im weiteren Verlauf der Internalisierung lassen sich GPCRs in zwei unterschiedliche Klassen einteilen. Klasse A-Rezeptoren, zu denen beispielsweise die β 2-adrenergen, μ -opiod-, Endothel-A- und Dopamin D1A-Rezeptoren gehören, binden β -Arrestin-2 mit höherer Affinität als β -Arrestin-1, wobei diese Bindung von transienter Natur ist. Die Rezeptoren internalisieren zusammen mit β -Arrestin in die Clathrin-Vesikel, dissoziieren dann aber sofort von diesen. In sauren, endozytischen Vesikeln kommt es zur Dephosphorylierung der Rezeptoren durch Protein-Phosphatasen (KRUEGER *et al.*, 1997), und danach werden die Rezeptoren relativ schnell wieder an die Zelloberfläche transportiert. Klasse B-Rezeptoren, wie zum Beispiel der Angiotensin 1A-, Vasopressin 2- und Neurokinin NK-1-Rezeptor, binden β -Arrestin-1 und -2 mit gleicher Affinität und internalisieren zusammen mit diesen zu den Endosomen (Abb. 3). Von dort werden sie zum Teil erst mehrere Stunden später wieder an die Zelloberfläche transportiert (LUTTRELL und LEFKOWITZ, 2002; PERRY und LEFKOWITZ, 2002). Es wurde postuliert, daß die Ubiquitinierung des β -Arrestins nach der Rezeptor-Bindung verantwortlich für die Stabilität der β -Arrestin-

Rezeptorkomplexe ist und damit bestimmt, welcher Klasse ein Rezeptor in Bezug auf sein Rezirkulierungsverhalten angehört (SHENOY und LEFKOWITZ, 2003).

Neben der Clathrin-abhängigen Internalisierung werden einige GPCRs über Clathrin-unabhängige Mechanismen internalisiert, die über Caveolae vermittelt werden. Caveolae sind 50 – 80 nm große Einstülpungen der Plasmamembran und zeichnen sich durch eine Umhüllung mit dem 21 kDa großen, integralen Membranprotein Caveolin-1 aus. Weiterhin sind Caveolae abhängig von Cholesterin und Sphingolipiden, die für die Stabilität der Caveolae essenziell sind (PELKMANS und HELENIUS, 2002; HARRIS *et al.*, 2002). Über die Regulation der Caveolae-Internalisierung von GPCRs ist weit weniger bekannt als über die Clathrin-abhängige Internalisierung. Es wird postuliert, daß sich GPCRs in Caveolin-reichen Mikrodomänen anreichern und daß das Caveolin eventuell auch als Gerüstprotein für verschiedene Signalkaskaden-Proteine fungiert (OSTROM und INSEL, 2004).

Für den β_1 -adrenergen Rezeptor wurde postuliert, daß die Rezeptor-Phosphorylierung den Internalisierungsweg des Rezeptors determiniert. Hier wurde gefunden, daß die PKC-vermittelte Phosphorylierung die Internalisierung über Caveolae induziert, während die Phosphorylierung durch GRKs die Clathrin-abhängige Rezeptor-internalisierung vermittelt (RAPACCIUOLO *et al.*, 2003).

2. Chemokinrezeptoren

Chemokinrezeptoren gehören zur Unterfamilie 1b innerhalb der GPCRs und bewirken die zielgerichtete Migration von Leukozyten zu Entzündungsherden. Chemokinrezeptoren werden aktiviert von Chemotaxis induzierenden Zytokinen, die als Chemokine bezeichnet werden, wobei die Wirkung der Chemokine nicht ausschließlich auf die Migrationsinduktion beschränkt ist. Chemokine sind kleine Peptide mit einem Molekulargewicht von 7 – 14 kDa, die eine hochkonservierte Region mit 4 Cysteinen aufweisen, die durch Disulfidbrücken miteinander verknüpft sind (BAGGIOLINI, 1998). Anhand der Anordnung der beiden aminoterminalen Cysteine werden Chemokine im wesentlichen in zwei Untergruppen unterteilt (MURPHY *et al.*, 2000). Bei den CC-Chemokinen liegen die beiden Cysteine direkt nebeneinander, während sie in CXC-Chemokinen durch eine variable Aminosäure getrennt sind. Ausnahmen bilden

das Lymphotoctin, das nur zwei Cysteine besitzt, und ein Mucin-haltiges Chemokin, in dem drei Aminosäuren die ersten beiden Cysteine trennen. CC-Chemokinrezeptoren (CCR) binden ausschließlich CC-Chemokine, CXC-Chemokinrezeptoren (CXCR) lediglich CXC-Chemokine. Dabei kann ein Rezeptor mehrere Chemokine binden und ebenso bindet ein Chemokin in der Regel an mehrere Chemokinrezeptoren (BAGGIOLINI, 1998). Neben der Klassifizierung über ihre Struktur können Chemokine und Chemokinrezeptoren auch nach funktionellen Gesichtspunkten in konstitutive und inflammatorische Chemokine eingeteilt werden. Dabei regulieren konstitutive Chemokine die Leukozytenmigration unter physiologischen Bedingungen, während die Sekretion inflammatorischer Chemokine durch Entzündungsmediatoren induziert wird.

Nach Stimulation von Chemokinrezeptoren durch ihren Agonisten kommt es innerhalb von Sekunden zu einer Polymerisation und dem Abbau von Aktin innerhalb der Zellen, wodurch Lamellipodien ausgebildet werden, die der Zelle die zielgerichtete Migration ermöglichen. Weiterhin werden Integrine aktiviert, die die Adhäsion der Zellen an Gefäßwände und die Passage durch Membranen in Richtung von Entzündungsherden ermöglichen. Außerdem steigt der intrazelluläre Calciumionen-Spiegel, und es werden bioaktive Lipide und Sauerstoffradikale gebildet. Je nach Zelltyp kommt es bei Neutrophilen und Monozyten zur Ausschüttung von Proteasen, von Histamin bei Basophilen oder von cytotoxischen Proteinen bei Eosinophilen (BAGGIOLINI, 1998).

3. Der CC-Chemokinrezeptor 5 (CCR5)

Der CC-Chemokinrezeptor 5 (CCR5) wird auf Monozyten, Makrophagen, ruhenden T-Lymphozyten und unreifen dendritischen Zellen exprimiert. Gegenstand intensiver Forschungsbemühungen ist CCR5 unter anderem deshalb geworden, weil er nicht nur die Migration von Zellen induziert, sondern weil er neben CD4 den essentiellen Corezeptor für die zelluläre Infektion mit M-tropischen (R5) Stämmen von HIV-1 darstellt (CHOE *et al.*, 1996). Es konnte gezeigt werden, daß HIV-1 für den Eintritt in die Zielzelle mit seinem Glykoprotein gp120 sowohl an CD4 als auch an den N-Terminus von CCR5 bindet, wobei der Virus-Eintritt in die Zelle unabhängig von CCR5-induzierter G-Protein-Kopplung oder Calcium-Freisetzung ist (FARZAN *et al.*, 1997; FARZAN *et al.*, 1999). Individuen, die homozygot für ein CCR5- Δ 32-Defektallel

sind, exprimieren einen trunkeierten Rezeptor, der nicht an der Zelloberfläche exprimiert wird. Diese Merkmalsträger sind fast vollständig vor einer HIV-1-Infektion geschützt, da der M-tropische Stamm vorwiegend für die Übertragung des Virus verantwortlich ist (LIU *et al.*, 1996; SAMSON *et al.*, 1996; BENKIRANE *et al.*, 1997; KINTER *et al.*, 2000). Das Fehlen von pathophysiologischen Auswirkungen in Individuen, die keinen funktionellen CCR5 exprimieren, macht CCR5 zu einem wichtigen Ansatzpunkt in der Entwicklung antiviraler Pharmazeutika (NANSEN *et al.*, 2002).

Die wichtigsten physiologischen Liganden von CCR5 sind die CC-Chemokine RANTES (CCL5), MIP-1 α (CCL3), MIP-1 β (CCL4), MCP-2 (CCL8) und HCC-1 (CCL14) (RAPORT *et al.*, 1996). Es wird postuliert, daß Chemokine in zwei Schritten an CCR5 binden. Zunächst interagiert der Kern des Chemokins mit extrazellulären Domänen des CCR5, wobei die zweite extrazelluläre Schleife des CCR5 die Ligandspezifität determiniert. Anschließend bindet der Chemokin-N-Terminus an Aminosäuren der Transmembranregion des CCR5 und triggert so die Rezeptoraktivierung (CLARK-LEWIS *et al.*, 1995; SAMSON *et al.*, 1997). Es konnte auch gezeigt werden, daß die Chemokine RANTES und MIP-1 α unterschiedliche extrazelluläre Aminosäurereste von CCR5 binden (BLANPAIN *et al.*, 2003).

Die Aminosäuresequenz und der Aufbau von CCR5 sind in der Abbildung 5 dargestellt. Es konnte bisher noch für keinen Chemokinrezeptor eine Kristallstruktur ermittelt werden, so daß das gezeigte computergenerierte Modell in Anlehnung an die Kristallstruktur von Rhodopsin durch Vergleich korrespondierender Bereiche erstellt wurde. CCR5 besteht aus 352 Aminosäuren und besitzt eine kalkulierte molekulare Masse von 40,6 kDa (SAMSON *et al.*, 1996; RAPORT *et al.*, 1996). Die posttranslationale Modifizierung des CCR5-Aminoterminus durch O-Glykosylierung und Tyrosin-Sulfatierung ist essenziell für die hoch affine Ligand-Bindung (FARZAN *et al.*, 1999). Zugleich ist sie verantwortlich für die breite Rezeptorbande nach Auftrennung über SDS-PAGE. Die zwischen den Cysteinen der ersten und zweiten extrazellulären Schleife gebildete Disulfidbrücke ist in der GPCR-Familie hoch konserviert. Zusätzlich bilden Chemokinrezeptoren wie CCR5 noch eine zweite Disulfidbrücke zwischen Cysteinen des Aminoterminus und der dritten extrazellulären Schleife aus. C-terminal wird CCR5 an den Cysteinen 321, 323 und 324 palmitoyliert und in der Zellmembran verankert, wodurch eine vierte intrazelluläre Schleife gebildet

wird. Es konnte gezeigt werden, daß die Palmitoylierung des Rezeptors wichtig für die Phosphorylierung und Internalisierung des Rezeptors ist, und daß ein trunkierter CCR5 ohne die Cysteine in seiner Zelloberflächenexpression eingeschränkt ist (KRAFT *et al.*, 2001; VENKATESAN *et al.*, 2001).

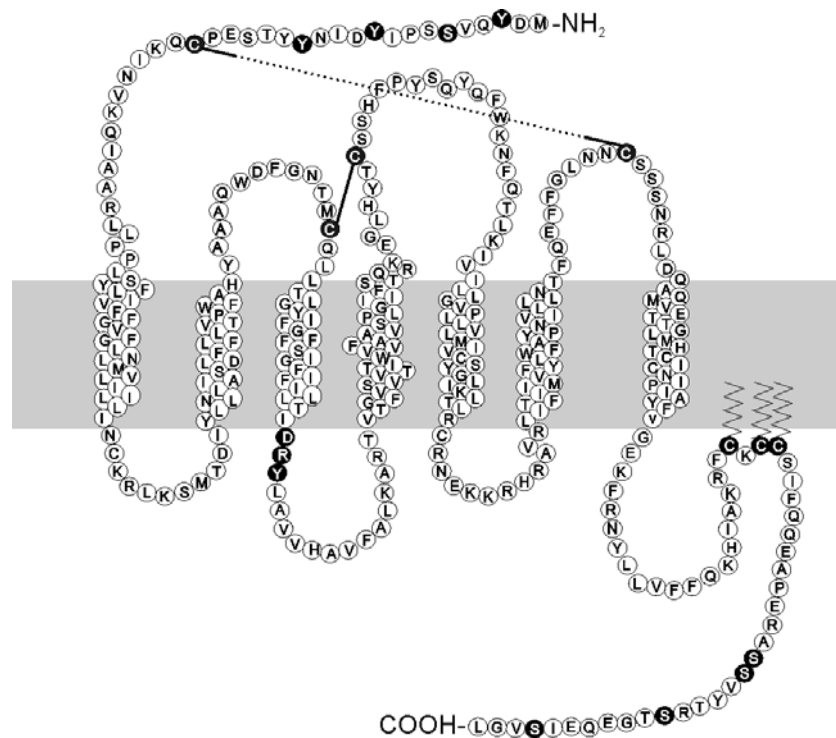


Abb. 5: Schematischer Aufbau und Aminosäuresequenz von CCR5

Gezeigt ist die Aminosäuresequenz im Einbuchstaben-Code und der schematische Aufbau von CCR5. Der Aminoterminus liegt extrazellulär, der Transmembranbereich ist grau unterlegt. Für die Stabilität und Funktion des CCR5 wichtige Aminosäuren sind schwarz gekennzeichnet. Die extrazellulären Verbindungen der Cysteine stellen Disulfidbrücken dar.

(Abb. modifiziert aus OPPERMANN, 2004)

Nach Stimulation mit seinen natürlichen Liganden wird CCR5 an vier im C-Terminus gelegenen Serinen phosphoryliert. Diese Serine stellen die einzigen Phosphorylierungsstellen dar, da weder eine Threonin-Phosphorylierung noch eine Rezeptorphosphorylierung an den intrazellulären Schleifen in einem C-terminal trunkierten CCR5 gefunden wurde (OPPERMANN *et al.*, 1999; OLBRICH *et al.*, 1999; KRAFT *et al.*, 2001). Weiterhin konnte gezeigt werden, daß eine CCR5-S/A-Mutante mit Austausch aller vier C-terminalen Serine gegen Alanin einen Defekt in der β -Arrestin-Bindung, in der Rezeptor-Internalisierung und der Desensibilisierung aufweist (KRAFT *et al.*, 2001). Die homologe Phosphorylierung des CCR5 wird primär durch die Kinasen GRK2 und GRK3 vermittelt (OPPERMANN *et al.*, 1999). Es

konnten für zwei der vier potentiellen Phosphorylierungsstellen monoklonale, phosphospezifische Antikörper hergestellt werden, mit denen der Verlauf und die Regulation der Phosphorylierung an diesen zwei Positionen dokumentiert werden kann. Dabei zeigte sich, daß Serin 337 ausschließlich durch PKC phosphoryliert wird, Serin 349 dagegen durch GRKs (POLLOK-KOPP *et al.*, 2003).

4. Ziele dieser Arbeit

Aufgabe dieser Arbeit war zum einen die systematische Untersuchung der Bedeutung der C-terminalen Phosphorylierungsstellen des CCR5 für die β -Arrestin-Bindung, Internalisierung und Desensibilisierung des Rezeptors. Dazu sollten verschiedene CCR5-Mutanten, in denen die Serine in unterschiedlicher Anzahl und Position gegen Alanin substituiert waren, stabil in RBL-2H3-Zellen exprimiert und die Rezeptoreigenschaften charakterisiert werden. Weiterhin sollte die Bedeutung des konservierten DRY-Motivs innerhalb der Rezeptors für die β -Arrestin-Bindung an CCR5 untersucht werden.

Im zweiten Abschnitt dieser Arbeit sollte überprüft werden, ob CCR5 homo- und heterodimere Strukturen bilden kann und inwieweit das klassische Modell der Rezeptorregulation (Abb. 4) durch diese neuen Kenntnisse modifiziert werden muß. Dazu sollten zwei CCR5-Mutanten mit Defekten in der Ligandbindung einerseits und der C-terminalen Phosphorylierbarkeit andererseits zusammen auf einer Zellreihe exprimiert werden. Es sollte geprüft werden, ob die Homodimerisierung beider Rezeptoren bei gemeinsamer Expression auf einer Zelle den jeweiligen Defekt in Bezug auf Rezeptorphosphorylierung, β -Arrestin-Bindung und Internalisierung komplementieren kann. Desweiteren sollte untersucht werden, ob CCR5 heterologe Rezeptordimere mit zwei weiteren GPCRs (C5aR und AT1aR) bilden kann und ob die Heterodimerisierung funktionelle Konsequenzen für die Regulation von CCR5 aufweist.

Schließlich sollte die Bedeutung des Rezeptor-C-Terminus für wichtige Rezeptorfunktionen wie Phosphorylierung und β -Arrestin-Bindung überprüft werden. Dazu sollten Rezeptorchimären hergestellt werden, in denen die C-Termini von CCR5 und C5a-Rezeptor ausgetauscht wurden, und es sollten die Rezeptoreigenschaften dieser Chimären untersucht werden.

II. Material und Methoden

1. Material

1.1 Chemikalien, Reagenzien, Kits

Chemikalien zur Herstellung von Lösungen und Puffern wurden von den Firmen MERCK (Darmstadt, D), DIFCO (Detroit, USA), ROCHE DIAGNOSTICS GmbH (Mannheim, D), ROTH (Karlsruhe, D), SERVA (Heidelberg, D) und SIGMA ALDRICH CHEMIE GmbH (Taufkirchen, D) bezogen.

Mediumbestandteile für die Herstellung der Zellkulturmedien stammten von BIOCHROM SEROMED (Berlin, D), GIBCO (Karlsruhe, D) und ICN-BIOMEDICALS (Irvine, USA). Fetales Kälberserum wurde bei PAESEL & LOREI (Hanau, D) bezogen. Bestandteile für Bakterienmedien waren von OTTO NORDWALL (Hamburg, D).

G418 Sulfat (*Geneticin*[®]) wurde von CALBIOCHEM-NOVABIOCHEM (Bad Soden, D), Zeocin[®] von INVIVOGEN (San Diego, USA) und Ampicillin und Kanamycin von SIGMA ALDRICH CHEMIE GmbH (Taufkirchen, D) bezogen.

Rekombinantes humanes C5a wurde im Labor aufgereinigt (LANGKABEL, 1999), rekombinantes humanes RANTES wurde freundlicherweise von Frau Dr. A. E. I. Proudfoot (SERONO Pharmaceutical Research Institut, Genf) bereitgestellt. PMA, Angiotensin II und Pertussis Toxin waren von CALBIOCHEM-NOVABIOCHEM (Bad Soden, D).

Das ECL[®]-Western Blot-Kit RPN 2108, Hyperfilm[™] ECL[™] und PD-10 Sephadex G-25M Säulen stammten von AMERSHAM BIOSCIENCES (Braunschweig, D). Entwickler und Fixierer zur Entwicklung der Hyperfilme waren von KODAK GBX (Stuttgart, D), Protein G-Sepharose fast flow von PHARMACIA (Freiburg, D).

Als Längenstandard für die Auftrennung von Nukleinsäuren im Agarose-Gel wurden die 100 bp-Leiter der Firma ROTH (Karlsruhe, D) und der DNA-Marker λ (*Bst* EII verdaut) der Firma BIOMOL (Hamburg, D) verwendet. Für die Auftrennung von Proteinen in der SDS-PAGE wurde der *Prestained Protein Molecular Weight Marker* der Firma MBI FERMENTAS GmbH (St.-Leon-Rot, D) benutzt.

Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol war von BIOMOL (Hamburg, D), synthetische Peptide wurden bei JERINI AG (Berlin, D) hergestellt.

Radioaktiv markiertes ^{125}I -C5a und ^{125}I -RANTES wurden bei der Firma PERKIN ELMER (Boston, USA), Bolton-Hunter-Reagenz und ^{32}P bei MP BIOMEDICAL Inc. (Irvine, USA) bestellt. Die Immobilon-P-Transfer Membran Filtertyp PVDF, Porengröße 0,45 μm war von MILLIPORE (Eschborn, D), die Szintillationsflüssigkeit Typ Roti-Szint Eco Plus von ROTH (Karlsruhe, D).

Zur Präparation von DNA wurden Kits der Firmen QIAGEN GmbH (Hilden, D) und MACHEREY-NAGEL (Düren, D) verwendet. Zur gezielten Punktmutagenese von DNA wurde das Quick-Change II Site-Directed Mutagenesis Kit der Firma STRATAGENE (La Jolla, CA) verwendet.

1.2 Labormaterialien

Pipettenspitzen, Reaktionsgefäße, Gewebekulturschalen (Mittel = 10 cm), Durchflußzytometrie-Röhrchen, 96-Loch-Gewebekulturplatten, Sterilfilter für Medien (Porengröße 0,2 μm) und 50 ml Plastikröhrchen wurden bei SARSTEDT (Nümbrecht, D) bezogen. Gewebekulturschalen (Groß = 14 cm), 15 ml Plastikröhrchen und 27,0/60,0 mm Szintillatorröhrchen stammten von GREINER GmbH (Nürtingen, D). Gewebekulturschalen (klein = 4 cm), 6- und 24-Lochplatten für Gewebekulturen und Maxisorp-Mikrotiterplatten für ELISA waren von NUNC GmbH (Wiesbaden, D), weiße OptiPlate Mikrotiterplatten für BRET-Experimente von PACKARD BIOSCIENCES (Dreieich, D). Die Chemotaxiskammern und Kryokonservierungsröhrchen wurden von COSTAR (Cambridge Massachusetts, USA) geliefert.

Der Potter Typ 810S CC und 5, 10 und 20 ml Einwegspritzen wurden bei BRAUN-MELSUNGEN (Melsungen, D), 50 ml Einwegspritzen bei BECTON DICKINSON (Heidelberg, D) bezogen. Sterile Zellschaber waren von COSTAR CORNING (Badhoevendorp, Niederlande), Plastibrand[®] Einweg-Pasteurpipetten von BRAND GmbH & Co KG (Wertheim, D).

Es wurden Pipetten von EPPENDORF (Hamburg, D) verwendet. Die elektrischen Pipettierhilfen vom Typ Pipetboy accu wurden bei INTEGRA BIOSCIENCES GmbH (Fernwald, D) bezogen, die Pipettierhilfe Typ accu-jet von BRAND GmbH & Co KG (Wertheim, D).

Protran[®] Nitrozellulose Transfer Membran und Filter-Papier stammten von SCHLEICHER & SCHÜLL (Dassel, D), Spectra/Por[®] CE Float-A-Lyzer Dialyseschläuche von SPECTRUM LABORATORIES Inc. (Rancho Dominguez, CA).

Deckgläser für Mikroskopie (\varnothing 12 mm) und Objektträger (ca. 76 x 26 mm, geschnitten) waren von SCHÜTT Labortechnik (Göttingen, D), die Zelläskammer Typ Neubauer Improved von KRANNICH GmbH (Göttingen, D). Küvetten, Typ Uvette 220-1600 nm wurden bei EPPENDORF (Hamburg, D) bezogen, die 4 x 4 mm Quarzküvetten waren von PERKIN ELMER (Boston, USA). Elektroporationsküvetten, Typ GenePulser 0,4 cm wurden von BIO-RAD (Hercules, CA) geliefert.

1.3 Geräte

Zentrifugationen von Eppendorf Reaktionsgefäßen bei Raumtemperatur wurden in einer Eppendorf Tischzentrifuge 5415D von EPPENDORF (Hamburg, D), Zentrifugationen bei 4°C in der EBA 21 von HETTICH (Tuttlingen, D) durchgeführt. Die Zentrifugation von 15 ml und 50 ml Plastikröhrchen erfolgte in der Biofuge A von HERAEUS (Hanau, D), in der Rotana/RP von HETTICH (Tuttlingen, D), der Sorvall RC-3B Refrigerated Centrifuge von DUPONT (Bad Nauheim, D) oder der Kühlzentrifuge Varifuge RF von HERAEUS (Hanau, D). Die Zentrifugation von Sucrosegradienten erfolgte in der L8-70 Ultrazentrifuge von BECKMAN (Krefeld, D), die von Maxi-DNA-Aufreinigungen in der Sorvall RC26 plus von DUPONT (Bad Nauheim, D).

Standardmäßig wurden die Heizblöcke Thermomixer 5436 von EPPENDORF (Hamburg, D) und HLC KBT 100-1 von HAEP LABOR CONSULT (Bovenden, D), der Vortex-Genie 2™ von BENDER & HOBEIN AG (Zürich, CH), Feinwaagen von SARTORIUS (Göttingen, D) und das pH-Meter PHM 63 Digital und der Leitfähigkeitsmesser CDM3 von RADIOMETER (Kopenhagen, DK) verwendet.

Zur Anzucht von Bakterien wurde der Brutschrank T6060 von HERAEUS (Hanau, D) verwendet, zur Anzucht von Eukaryonten der Typ B5060 EC-CO₂. Die Sterilbänke der Typen Clean Air DLF BSS6 (Eukaryontische Zellkulturen) und BSS4 (Prokaryontische Zellkulturen) waren von Med. Techn. Geräte J.H. SCHRADER (Göttingen, D).

Elektroporationen wurden mit dem GenePulser und Capacitance Extender von BIORAD (Hercules, USA) durchgeführt. Die Beschallung von Zellen erfolgte mit dem Ultraschall-Sonifikator Labsonic 1510 (90 Watt) von BRAUN-MELSUNGEN (Melsungen, D). Es wurde das Durchflußzytometer Coulter Epics XL von BECKMAN COULTER (Krefeld, D) mit der Coulter Epics XL/XL-MCL System II Software verwendet.

Agarose-Gele wurden in der Agagel Maxi Elektrophorese-Kammer von BIOMETRA (Göttingen, D) gefahren, SDS-Gele in der Elektrophorese-Kammer SE600 von

HOEFER SCIENTIFIC INSTRUMENTS (San Francisco, USA). Der Proteintransfer erfolgte im Elektroblob-Gerät Multiphor II von PHARMACIA LBK GmbH (Freiburg, D).

Es wurden die Mikroskope Telaval 31 und IM 15 von ZEISS (Oberkochen, D) und das Konfokal-Fluoreszenzmikroskop DM IRB von LEICA MICROSYSTEMS (Heidelberg, D) verwendet.

Die Quantifizierung von DNA erfolgte im Biophotometer von EPPENDORF (Hamburg, D), der Proteingehalt wurde im UV-Spektrometer Biochrom 4060 von PHARMACIA (Freiburg, D) bestimmt. Die optische Dichte in Mikrotiterplatten wurde im Thermo-max microplate reader von MOLECULAR DEVICES (Menlo Park, USA) bestimmt, BRET Messungen erfolgten im Mithras LB 940 von der Firma BERTHOLD (Bad Wildbad, D).

Für PCR wurden der Mastercycler Gradient von EPPENDORF (Hamburg, D) und das Gene Amp PCR-system 9600 von PERKIN ELMER (Boston, USA) verwendet. Das Einengen von Proben erfolgte in der Savant Speedvac mit der Kühlfalle RVT 400 von SCHÜTT (Göttingen, D).

Die Bestimmung radioaktiver Aktivität erfolgte für ^{125}I im WinSpectral 1414 Liquid Scintillation Counter von WALLAC (Turku, Finland) und für ^{32}P im Molecular Imager FX von BIORAD (Hercules, USA).

1.4 Stammlösungen und Standardpuffer

ABTS:

0,11 g	ABTS
0,69 g	$\text{NaH}_2\text{PO}_4 \times 2 \text{H}_2\text{O}$
0,89 g	Natriumacetat $\times 3 \text{H}_2\text{O}$

ad 100 ml dH_2O , pH 4,2, aliquotieren und bei -20°C lagern

Fluo3-AM

12,5 μl	Fluo3-AM (10 mg/ml in DMSO)
467,5 μl	HBSS ⁻ , pH 7,2 – 7,4 jeweils neu einstellen
20 μl	Pluronsäure 2,5 %

mischen, 30 min im Ultraschallbad inkubieren, zu 35 μl aliquotieren, bei -20°C lagern, lichtempfindlich

Lysepuffer:

50 mM	Tris
150 mM	NaCl
5 mM	EDTA
0,05 %	SDS
1 %	Triton X-100
10 mM	NaF
10 mM	Na ₂ HPO ₄

pH 8,0; jeweils frisch dazugeben: 1:500 PMSF (100 mM)

Mowiol

2,4 g	Mowiol
6,0 g	Glycerol
6 ml	dH ₂ O
12 ml	0,2 M Tris-HCl, pH 8,5

Zunächst nur Mowiol und Glycerol für 1 h bei RT rühren, dH₂O dazugeben und für 2 h rühren, Tris dazugeben und bei 50°C inkubieren. Anschließend für 15 min bei 5000 x g abzentrifugieren, aliquotieren und bei -20°C lagern. Gebrauchsaliquot mit p-Phenylendiamin in einer Endkonzentration von 1 mg/ml versetzen.

PAGE-Puffer (2x)

0,125 mM	Tris-HCl pH 6,8
0,1 %	Bromphenolblau
4 %	SDS
20 %	Glycerol
10 %	2-Mercaptoethanol, frisch dazugeben

PBS (einfach):

130 ml	0,5 M Na ₂ HPO ₄ x 12 H ₂ O
50 ml	0,5 M NaH ₂ PO ₄ x H ₂ O
72 g	NaCl

ad 10 l dH₂O, pH-Wert 7,2-7,4

Protein-G-Sepharose

5 ml absetzen lassen, Ethanol abnehmen, Zugabe von

50 ml	Lysepuffer
0,2 %	BSA
10 %	NaN ₃

10xTBE:

216 g	Tris
90 g	Borsäure
16,64 g	EDTA

ad 2000 ml dH₂O, pH 8,6

10xTBS:

24 g	Tris
80 g	NaCl

ad 1000 ml dH₂O, pH 7,6

TBS-Tween:

100 ml	10 x TBS
1 ml	Tween 20

ad 1000 ml dH₂O

TE

10 mM	Tris/HCl
-------	----------

pH 8,0, autoklavieren

1.5 Bakterienstämme

Zur Klonierung wurden die *Escherichia coli* Stämme TOP10 (*F*⁻ *mcrA* Δ (*mrr* *hsdRMS* *mcrBC*) Φ 80 *lacZ* Δ *M15* Δ *lacX74* *deoR* *recA1* *araD139* Δ (*ara-leu*)7697 *galU* *galK* *rpsL* (*Str*^R) *endA1* *nupG*) und XL1-blue (*recA* *endA1* *gyrA96* *thi-1* *hsdR17* *supE44* *relA1* *lac*[*F'* *proAB* *lacI*^q*Z* Δ *M15* *tn10* (*Tet*^r)]]) verwendet.

1.6 Medien für Bakterien

LB-Medium (Luria-Bertani)

10 g Trypton (1 %)

5 g Hefeextrakt (0,5 %)

10 g NaCl (1 %)

ad 1 Liter mit dH₂O, pH-Wert auf pH 7 einstellen, anschließend autoklavieren.

Für das Gießen von Agar-Platten wurden dem Medium 1,5 % Agar zugegeben. Eventuell zuzusetzende Antibiotika wurden nach dem Autoklavieren nach Abkühlung des Mediums auf etwa 60°C zugegeben.

Für das Antibiotikum Zeomycin wurde LB-low salt mit 0,5 % NaCl verwendet, da ein hoher Salzgehalt das Antibiotikum inhibiert.

SOB-Medium

5 g Trypton (2 %)

1,25 g Hefeextrakt (0,5 %)

146 mg NaCl (10 mM)

47 mg KCl (2,5 mM)

508 mg MgCl₂ x 6H₂O (10 mM)

516 mg MgSO₄ x 7H₂O (10 mM)

ad 0,25 Liter mit dH₂O, pH-Wert auf pH 7 einstellen, anschließend autoklavieren.

1.7 Eukaryotische Zelllinien

Für die stabile Expression der diversen Rezeptorkonstrukte wurde die Zelllinie RBL-2H3 ausgewählt. Bei den RBL-Zellen handelt es sich um Zellen einer basophilen Rattenzelllinie, die eine gute Adhärenz zeigen.

Für die transiente Expression von Rezeptoren wurden HEK293-Zellen (ATCC-Nr.: CRL-1573) verwendet, die aus einer humanen, embryonalen, adenoviral-transformierten Niere isoliert wurden. Ihr Erscheinungsbild entspricht dem einer Epithelzelle und sie wachsen mäßig adhären.

Beide Zellen wurden von der American Type Culture Collection (ATCC) (Maryland, USA) bezogen.

RBL-CCR5/C5aR WT 58.9

Stabil transfizierte RBL-2H3-Zellen, welche die Wildtypform des humanen C5a-Rezeptors sowie den humanen Chemokinrezeptor CCR5 auf der Zelloberfläche exprimieren (KRAFT *et al.*, 2001).

RBL-CCR5 WT 2.2

Stabil transfizierte RBL-2H3-Zellen, welche die Wildtypform des humanen Chemokinrezeptors CCR5 auf der Zelloberfläche exprimieren (OPPERMANN *et al.*, 1999).

RBL-C5aR

Stabil transfizierte RBL-2H3-Zellen, welche die Wildtypform des humanen C5a-Rezeptors auf der Zelloberfläche exprimieren (ROTHERMEL *et al.*, 1997)

1.8 Medien für Zellkultur

80/20-Medium (RPMI-1640/199-Medium)

für 5 Liter:

50 ml L-Glutamin

50 ml Antibiotische-antimykotische Lösung

50 ml Natrium Pyruvat

50 ml nicht essentielle Aminosäuren

41,6 g Instantmedium RPMI 1640

9,8 g Instantmedium Earle 199

10 g NaHCO₃

4,5 l dH₂O

Durch CO₂-Begasung für 1-2 min des fertig angesetzten Mediums pH-Wert von 6,8 - 7,0 einstellen, anschließend Sterilfiltrieren des Mediums.

80/20-10-Medium

Zum 80/20-Medium wurden 10 % (v/v) fötales Kälberserum gegeben, welches vorher eine Stunde bei 56°C hitzeinaktiviert und für 15 min bei 3000 rpm abzentrifugiert wurde.

DMEM (Dulbecco's Modifiziertes Eagle Medium)

50,6 g DMEM
10 g NaHCO₃
50 ml nicht essentielle Aminosäuren
50 ml Antibiotische-antimykotische Lösung
50 ml Glutamin
50 ml Natrium Pyruvat
22,5 g Glucose
ad 5 L dH₂O, pH 6,8

1.9 Enzyme

Restriktionsenzyme, T4-DNA-Ligase und Calf Intestine Alkaline Phosphatase (CIAP) wurden von MBI FERMENTAS GmbH (St.-Leon-Rot, D) bezogen. Accu Taq™ DNA-Polymerase und Red Taq™ DNA-Polymerase waren von SIGMA-ALDRICH Chemie GmbH (Deisenhofen, D), die Hot Star-Taq von QIAGEN (Hilden, D). RNase A wurde von BOEHRINGER (Mannheim, D) verwendet.

Alle Enzyme wurden nach den Angaben des Herstellers verwendet.

RNase wurde in einer Konzentration von 10mg/ml in dH₂O gelöst. Zur Inaktivierung von DNasen wurde die Lösung 15 min im kochenden Wasserbad inkubiert, langsam auf RT abgekühlt und bei -20°C gelagert.

1.10 Antikörper

Kommerzielle AntikörperF313

Ziege-Anti-Maus IgG, FITC-konjugiert, DAKO (Hamburg, D)

R480

Ziege-Anti-Maus IgG, PE-konjugiert, DAKO (Hamburg, D)

Z259

Kaninchen-Anti-Maus IgG, DAKO (Hamburg, D)

P260

Kaninchen-Anti-Maus IgG, HRP-konjugiert, DAKO (Hamburg, D)

β-Arrestin-Ak

Maus-Anti-β-Arrestin-1, BECTON DICKINSON (Transduction Laboratories)
(Heidelberg, D)

F3165

Anti-FLAG M2, SIGMA (Taufkirchen, D)

12CA5

Maus-Anti-HA IgG2b Klon 12CA5, BABCO (San Francisco, USA)

H6533

Anti-HA, Peroxidase-konjugiert, Klon HA-7, SIGMA (Taufkirchen, D)

MC5

Maus-Anti-human-CCR5, IgG2a, freundlicherweise zur Verfügung gestellt von Herrn
Dr. M. Mack

In der Abteilung hergestellte Antikörper:T21/8-3

Maus-Anti-CCR5, IgG2a, erkennt den Aminoterminus des humanen CCR5, (KRAFT *et al.*, 2001)

R22/7-6

Maus-Anti-CCR5, erkennt den Aminoterminus des humanen CCR5, (KRAFT *et al.*, 2001)

RC10

Maus-Anti-CCR5, erkennt das nicht phosphorylierte Serin 337 im C-Terminus des humanen CCR5, (POLLOK-KOPP *et al.*, 2003)

E11/19-10

Maus-Anti-CCR5, erkennt das durch GRK phosphorylierte Serin 349 im C-Terminus des humanen CCR5, (POLLOK-KOPP *et al.*, 2003)

V14/2-3

Maus-Anti-CCR5, erkennt das durch PKC phosphorylierte Serin 337 im C-Terminus des humanen CCR5, (POLLOK-KOPP *et al.*, 2003)

S5/1

Maus-Anti-C5aR, erkennt den Aminoterminus des humanen C5aR (OPPERMANN *et al.* 1993)

P12/1

Maus-Anti-C5aR, erkennt den Aminoterminus des humanen C5aR (OPPERMANN *et al.* 1993)

32-G1

Maus-Anti-C5aR, erkennt das durch PKC phosphorylierte Serin 334 im C-Terminus des humanen C5aR, (RETHORN, 2003)

21B1-8-32

Maus-Anti-β-Arrestin 1/2, (SGODDA, 2004)

1.11 Oligonukleotide

Alle Oligonukleotide sind in 5`-3`Richtung aufgeführt und wurden über IBA GmbH (Göttingen, D) bezogen. Eventuell vorhandene Schnittstellen wurden unterstrichen, eingeführte Markierungen wie HA-Tag oder sonstige mutagene Bereiche sind kursiv dargestellt.

CCR5 spezifische Oligonukleotide

CCR5-Xba-For (33mer)

5'-CGC GGG TCT AGA ACC ATG AAG ACC ATC ATC GCC-3'

CCR5-EcoRV-For (27mer)

5'-ACG GAT ATC ACC ATG GAT TAT CAA GTG-3'

CCR5-Hind3-EcoR5-For (38mer)

5'-ACG AAG CTT GAT ATC ACC ATG GAT TAT CAA GTG TCA AG-3'

CCR5-Rluc-For (30mer)

5'-ACG AAG CTT ACC ATG GAT TAT CAA GTG TCA-3'

CCR5 -Rluc-Back (27mer)

5'-ACG GGA TCC CAA GCC CAC AGA TAT TTC-3'

CCR5S349A-Rluc-Back (27mer)

5'-ACG GGA TCC CAA GCC CAC AGC TAT TTC-3'

CKR5/490 (20mer)

5'-TCA TCT TTA CCA GAT CTC AA-3'

CKR5 back (33mer)

5'-CGC GGG TCT AGA TCA CAA GCC CAC AGA TAT TTC-3'

CCR5-Xba-EcoRV-back (36mer)

5'-ACG TCT AGA GAT ATC TCA CAA GCC CAC AGA TAT TTC-3'

CCR5-ST/A-back (87mer)

5'-CGC GGG TCT AGA TCA CAA GCC CAC AGC TAT TTC CTG CTC CCC AGC
GGC TCG GGC GTA AAC TGC GGC TGC TCG CTC GGG AGC CTC TTG-3'

CCR5-d2-17-Bam-For (66mer)

5'-ACG GGA TCC ACC ATG *TAC CCA TAC GAC GTC CCA GAC TAC GCC* GAG
CCC TGC CAA AAA ATC AAT GTG-3'

CCR5-L36Arg-For (27mer)

5'-CTC CTG CCT CCG CGC TAC TCA CTG GTG-3'

CCR5-L36Arg-back (27mer)

5'-CAC CAG TGA GTA GCG CGG AGG CAG GAG-3'

C5aR spezifische OligonukleotideC5aR-EcoR5-For (27mer)

5'-ACG GAT ATC ACC ATG AAC TCC TTC GAT-3'

C5aR-Bam-For (30mer)

5'-ACG GGA TCC ACC ATG AAC TCC TTC GAT TAT-3'

C5aR-540 (21mer)

5'-GTA CTT TCC ACC AAA GGT GTT -3'

C5aR-Rluc-For (30mer)

5'-ACG AAG CTT ACC ATG AAC TCC TTC AAT TAT-3'

C5aR-Rluc-Back (27mer)

5'-ACG GGA TCC CAC TGC CTG GGT CTT CTG-3'

C5aR-S/A-EcoV-Back1 (75mer)

5'-ACG GAT ATC TTA CTC CCT AAC CAC GGC CTC TTC AGT CAA CAC GTT
CCG GAG GAG GGC GGG GAG GGC TTT CCG CAG-3'

C5aR-S/A-T/A-EcoR5-Back2 (90mer)

5'-ACG GAT ATC CTA CAC TGC CTG GGT CTT CTG GGC CAT AGT GTC CAC
TGT GGC GCG CGT GAA TGC/A CTT GGC CTC CCT AAC CAC GGC CTC
TTC-3'

C5aR-S/A-EcoV-Back2 (100mer)

5'-ACG GAT ATC CTA CAC TGC CTG *GGC* CTT CTG GGC CAT AGC GTC CAC
TGC GGC GCG CGC GAA *TGC* CTT *GGC* CTC CCT AAC CAC *GGC* CTC TTC
AGC CAA CAC G-3'

C5aR-ST/A-Rluc-back (27mer)

5'-ACG GGA TCC CAC TGC CTG GGC CTT CTG-3'

C5aR-L41A-For (36mer)

5'-CCA GAC ATC CTG GCC CGC GTC ATC TTT GCA GTC GTC-3'

C5aR L41A-Back (36mer)

5'-GAC GAC TGC AAA GAT GAC GCG GGC CAG GAT GTC TGG-3'

Oligonukleotide für Rezeptor ChimärenCCR5-890-Fse1-For (28mer)

5'-ACG GGC CGG CCA GAA GTT CAG AAA CTA C-3'

CCR5-890-Fse1-Back (28mer)

5'-ACG GGC CGG CCA AGG CAT AGA TGA TGG G-3'

CCR5 57bpCT-C5aR-Eco5-Back (100mer)

5'-ACG GAT ATC TCA CAA GCC CAC AGA TAT TTC CTG CTC CCC AGT GGA
TCG GGT GTA AAC TGA GCT TGC TCG CTC GGG AGC CTC TTC AGT CAA CAC
GTT CCG G-3'

C5aR 84bpCT-CCR5-Not1-Back (121mer)

5'-ACG GCG GCC GCC TAC ACT GCC TGG GTC TTC TGG GCC ATA GTG TCC
ACT GTG GAG CGC GTG AAT GAC TTG CTC TCC CTA ACC ACG GAC TCT TCA
GTC AAG GGA GCC TCT TGC TGG AAA ATA G-3'

C5aR 132bpCT-CCR5-Not-Back (168mer)

5'-ACG GCG GCC GCC TAC ACT GCC TGG GTC TTC TGG GCC ATA GTG TCC
ACT GTG GAG CGC GTG AAT GAC TTG CTC TCC CTA ACC ACG GAC TCT TCA
GTC AAC ACG TTC CGG AGG AGG CTG GGG AGG GAT TTC CGC AGT CGG
CCC TGC TGG AAA ATA GAA CAG CAT TTG CAG-3'

US28-890-Fse-For (26mer)

5'-ACG GGC CGG CCA GAA GTT TCG GCA AG-3'

US28-EcoR5-Back (26mer)

5'-ACG GAT ATC TTA CGG TAT AAT TTG TG-3'

Angiotensin spezifische OligonukleotideAT1-Hind3-For (27mer)

5'-ACG AAG CTT ACC ATG TAC CCA TAC GAC-3'

AT1-ohneStop-Bam-Back (26mer)

5'-ACG GGA TCC CTC CAC CTC AAA ACA AG-3'

AT1-560-For (15mer)

5'-CGG AAT TCG ACG CTC-3'

Sequenzier- und sonstige OligonukleotidepEF-Bos-sense (18mer)

5'-TCT CAA GCC TCA GAC AGT-3'

pRlucN-570 For (20mer)

5'-GCA GAG CTG GTT TAG TGA AC-3'

GFP2N2-590-For (14mer)

5'-GCT AGC GCT ACC GG-3'

GFP2-BamH1-For (24mer)5'-ACG GGA TCC GCC ACC ATG GTG AGC-3'GFP2-NotI-Back (29mer)5'-CGT GCG GCC GCC TAC TTG TAC AGC TCG TC-3'GFP2-EcoRV-For (27mer)5'-ACG GAT ATC GCC ACC ATG GTG AGC AAG-3'Rluc-NotI-Back (29mer)5'-ACG GCG GCC GCT TAC TGC TCG TTC TTC AG-3'Arr2-NotI-Back (29mer)5'-ACG GCG GCC GCC TAG CAG AGT TGA TCA TC-3'

1.12 Vektoren

1.12.1 Allgemeine Expressionsvektoren

pEF1/Myc-HIS-A

Der Expressionsvektor pEF1/Myc-HIS-A der Firma INVITROGEN wurde zur stabilen Expression fast aller neu synthetisierten Rezeptorkonstrukte genutzt. Als Selektionsmarker diente Ampicillin in Prokaryoten und Geneticin in Eukaryoten.

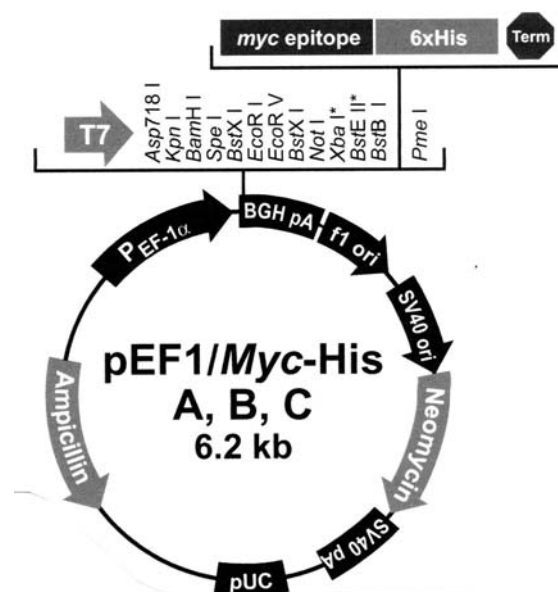


Abb. 6: Plasmidkarte des Expressionsvektors pEF1-MycHIS-A

Für stabile Transfektionen in RBL-Zellen wurde der Vektor mit *Pvu*I oder *Sca*I, deren Schnittstellen beide im Ampicillin-Resistenzgen liegen, linearisiert.

pEF-Bos

Der Expressionsvektor pEF-Bos setzt sich aus dem pUC119-Plasmidfragment und der EF-Bos Expressionskassette zusammen. Das pUC119-Fragment beinhaltet das Ampicillin-Resistenzgen. Dieser Vektor kodiert für kein eukaryotisches Resistenzgen, so daß bei stabilen Transfektionen in RBL-Zellen ein resistenztragendes Plasmid cotransfiziert werden mußte. In diesem Vektor exprimierte Rezeptoren wurden mit *Xba*I verdaut und ersetzen das 451 bp große Stuffer-DNA-Fragment im Vektor.

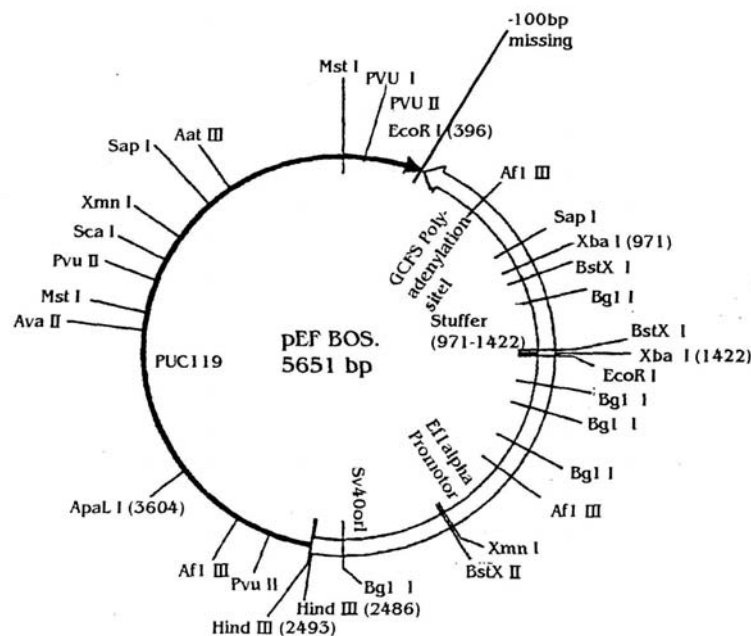


Abb. 7: Plasmidkarte des Expressionsvektors pEF-Bos

pHβAPr-1-neo

Das Plasmid pHβAPr-1-neo enthält das Neomycin-Resistenzgen des Transposons Tn5 (GUNNING et al., 1987) und wurde bei der Herstellung der stabilen RBL-CCR5-Ser/Ala-Zellreihen cotransfiziert.

1.12.2 BRET Vektoren

Alle BRET-Vektoren wurden von der Firma PERKIN ELMER bezogen und beinhalten die an den menschlichen Codon-Gebrauch angepaßten Gene für Renilla-luciferase und

GFP², wodurch ein erhöhter Expressionsgrad der Fusionsproteine in Mammalia-Zellen erzielt wird.

pRlucN2

Im Vektor pRlucN2 wurde das Renilla-luciferase-Gen unter Beachtung des Leserahmens an den C-Terminus verschiedener Rezeptoren, deren Stop-Codon deletiert wurde, kloniert. Dazu wurden die Rezeptoren N-terminal mit *Hind*III und C-terminal mit *Bam*HI verdaut und in die multiple Klonierungsstelle des Vektors eingefügt. Der Vektor codiert für eine prokaryotische Kanamycin-Resistenz und für eine eukaryotische Geneticin-Resistenz.

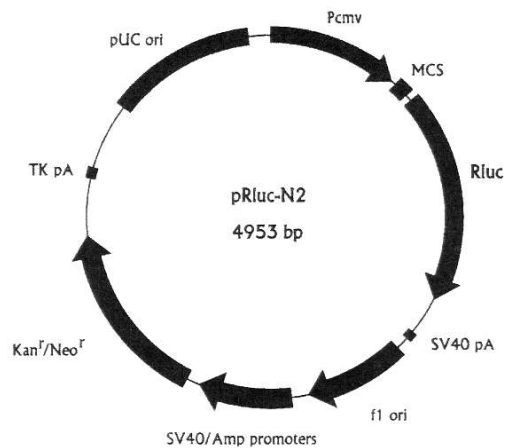


Abb. 8: Plasmidkarte des Vektors pRlucN2

pGFP²N2

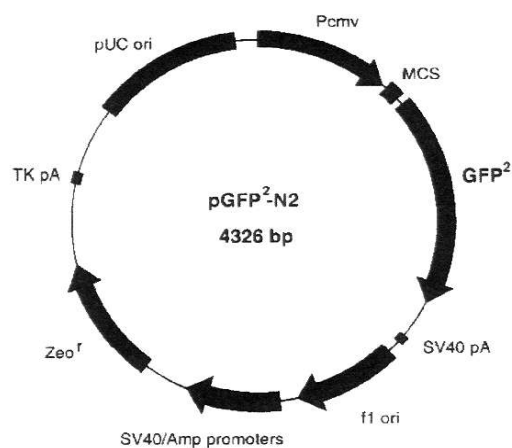


Abb. 9: Plasmidkarte des Vektors pGFP²N2

Im Vektor pGFP²N2 wurde das GFP²-Gen unter Beachtung des Leserahmens an den C-Terminus verschiedener Rezeptoren, deren Stop-Codon deletiert wurde, kloniert. Dazu wurden die Rezeptoren N-terminal mit *Hind*III und C-terminal mit *Bam*HI verdaut und in die multiple Klonierungsstelle des Vektors eingefügt. Der Vektor codiert sowohl in Prokaryoten als auch in Eukaryoten für eine Zeocin-Resistenz.

pGFP²-Rluc(h)

Der Vektor pGFP²-Rluc(h) wurde als BRET-Positivkontrolle verwendet und trägt ein direkt an die Renilla-luciferase gekoppeltes GFP²-Gen. Er codiert sowohl in Prokaryoten als auch in Eukaryoten für eine Zeocin-Resistenz.

1.13 Antibiotika

Ampicillin:

Ampicillin wirkt gegen die meisten Gram-negativen Bakterien, indem es die Bildung der bakteriellen Mureinschichten unterbindet.

Kanamycin

Kanamycin ist ein prokaryotisches Zellgift, daß sich an die 30S-Untereinheit der Ribosomen setzt und die Bindung der N-Formylmethionyl-t-RNA blockiert. Außerdem werden durch die Bindung des Aminoglykosids an die Ribosomen Fehler bei der Translation ausgelöst.

Zeomycin:

Es handelt sich um ein pro- und eukaryotisches Zellgift, welches durch Binden an die DNA zu einer Degradation durch das zentrale Cu²⁺-Ion führt.

G418 Sulfat (*Geneticin*[®]):

Es handelt sich um ein pro- und eukaryotisches Zellgift, welches die Protein-Biosynthese zum Erliegen bringt, indem es an die 30S- bzw. 40S-Untereinheit bindet. Durch die Expression der Aminoglycosid-3'-Phosphotransferase wird die Bindung an die ribosomale Untereinheit verhindert und damit G418 unwirksam. Die Aminoglycosid-3'-Phosphotransferase hebt ebenfalls die Wirkung von Kanamycin und Neomycin auf.

Tab. 1: Antibiotika

	Lagerungskonzentration	Arbeitskonzentration
Ampicillin	50 mg/ml in H ₂ O	100 mg/l
Kanamycin	50 mg/ml in H ₂ O	50 mg/l
Zeocin	100 mg/ml in H ₂ O	25 mg/l
G418	200 mg/ml in HEPES	600 mg/l

Ampicillin, Kanamycin und Zeocin wurden in entsprechender Konzentration in sterilem dH₂O gelöst. Anschließend wurden die Lösungen durch einen 0,22 µm-Filter sterilfiltriert, in 1-Milliliterportionen aliquotiert und bei -20°C eingefroren.

G418 Sulfat wurde in 100 mM HEPES, pH 7,3 gelöst, durch einen 0,22 µm-Filter sterilfiltriert, in 1,5-Milliliterportionen aliquotiert und bei -20°C eingefroren.

2. Methoden

2.1 Kultivierung und Manipulation von Mikroorganismen

2.1.1 Kultivierung von *Escherichia coli*

Die Zellen wurden in Luria-Bertani (LB) -Vollmedium bei 37°C kultiviert. Aus diesen Medien gegossene Platten enthielten 1,5 % Agar.

Zur Selektion transformierter Zellen wurden dem Medium die entsprechenden Antibiotika zugesetzt.

2.1.2 Präparation von chemisch kompetenten *E. coli*- Zellen

Zur Anzucht der Zellen wurde zunächst eine Kolonie *E. coli*- Zellen in 15 ml LB angeimpft und für 6-8 h bei 37°C angezogen. Aus dieser Vorkultur wurden dann durch Überimpfen von 5, 3 bzw. 1 ml Vorkultur 3 Hauptkulturen zu je 100 ml LB angeimpft, die über Nacht bei 18-22°C mit 200 U/min bis zu einer OD_{600nm} von 0,55 inkubiert wurden.

Zum Ernten der Zellen wurde eine der 100 ml Kulturen für 10 min auf Eis gekühlt und bei 2500 x g für 10 min bei 4°C abzentrifugiert. Das Sediment wurde in 100 ml Inoue-Puffer (10 mM PIPES, 15 mM CaCl₂ x 2H₂O, 250 mM KCl, 55 mM MnCl₂ x 4H₂O,

pH 6,7) durch vorsichtiges Schwenken resuspendiert, für 10 min auf Eis inkubiert und erneut abzentrifugiert. Die Zellen wurden dann in 10 ml Inoue-Puffer aufgenommen und vorsichtig mit 0,75 ml DMSO vermischt. Der Ansatz wurde erneut 10 min auf Eis inkubiert. Abschließend wurden die Zellen in 0,2 ml Aliquots in vorgekühlte E-cups aufgeteilt, in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bis zur weiteren Verwendung bei -80°C gelagert.

2.1.3 Transformation von chemisch kompetenten *E. coli*- Zellen

Bei -80°C eingefrorene, kompetente Zellen wurden auf Eis aufgetaut. Je 100 µl der Zellen wurden 1-5 µl DNA oder, bei einer vorangegangenen Ligation, dem gesamten Ligationsansatz zugesetzt, und der Ansatz wurde für 30 min auf Eis inkubiert. Anschließend wurden die Zellen für 1 min bei 42°C hitzegeschockt und auf Eis abgekühlt. Dem Ansatz wurden 800 µl SOC-Medium (SOB + 20 mM Glukose) zugefügt, und es erfolgte eine Inkubation für 1 h bei 37°C. Abschließend wurden die Zellen auf Selektionsmedium ausgestrichen.

2.2 Klonierungstechniken und Manipulation von Nukleinsäuren

2.2.1 Isolierung von Plasmid-DNA aus *E. coli*

2.2.1.1 Isolierung von Plasmid-DNA (STET-Methode)

Die Zellen aus 1,5 ml einer Übernacht-Kultur wurden durch Zentrifugation bei 13000 rpm für 30 sec bei RT geerntet und in 400 µl STET-Puffer (8 % Saccharose, 0,5 % Triton X-100, 50 mM EDTA, pH 8,0, 10 mM Tris, pH 8.0) resuspendiert. Die Proben wurden für 40 Sekunden in kochendem Wasser aufgeschlossen und die dadurch entstandenen Zelltrümmer nach 30 minütiger Zentrifugation bei 4°C mit Hilfe eines sterilen Zahnstochers entfernt. Die Plasmid-DNA wurde durch Zugabe von 50 µl NaOAc (3 M, pH 4,8) und 500 µl Isopropanol gefällt und durch eine 10 minütige Zentrifugation bei 4°C abzentrifugiert. Das Sediment wurde mit 70 % Ethanol gewaschen, getrocknet und in 50 µl TE-Puffer und 1µl RNase A (10 mg/ml) aufgenommen. Die Plasmid-DNA wurde bei -20°C aufbewahrt.

2.2.1.2 Mini-Präparation

Zur Aufreinigung von Plasmid-DNA, die für transiente Transfektionen (siehe 2.3.5.3) oder Sequenzierungsreaktionen eingesetzt werden sollte, wurde das Plasmid-Aufreinigungs-Kit AX 20 der Firma MACHEREY-NAGEL (Düren, D) nach Angaben des Herstellers verwendet.

2.2.1.3 Maxi-Präparation

Zur Aufreinigung großer Mengen an Plasmid-DNA wurde das Maxi-Plasmid-Aufreinigungs-Kit AX 500 der Firma MACHEREY-NAGEL (Düren, D) nach Angaben des Herstellers verwendet.

2.2.2 Phenol-Fällung von DNA

Zur Aufreinigung großer Mengen an DNA nach Restriktion wurde diese einer Phenolfällung unterworfen. Dazu wurde die DNA-Lösung mit gleichem Volumen Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol (25/24/1) versetzt, vermischt und für 15 sec abzentrifugiert. Dann wurde die obere Phase in ein neues steriles E-cup überführt und die DNA nach Zugabe von 1/10 Volumen 3 M NaAcetat und 2-3 Volumen 96 % eiskaltem Ethanol für 30 min bei -20°C gefällt. Anschließend wurde die DNA für 5 min bei 4°C abzentrifugiert, das Pellet mit 70 % Ethanol gewaschen und kurz getrocknet. Schließlich wurde die DNA in TE-Puffer aufgenommen.

2.2.3 Konzentrations- und Reinheitsbestimmung von DNA

Die Konzentrations- und Reinheitsbestimmung gelöster DNA erfolgte über die Messung der optischen Dichte der DNA-Lösungen bei 260 nm und 280 nm. Die Wellenlänge von 260 nm entspricht dem Absorptionsmaximum der Nukleotide AMP und UMP, wobei eine OD_{260} von 1 einer Konzentration von $50 \mu\text{g}/\mu\text{l}$ doppelsträngiger DNA entspricht. Der Quotient aus OD_{260} und OD_{280} ist ein Maß für die Reinheit der DNA-Lösung. Er sollte zwischen 1,8 und 2,0 liegen; ein geringerer Wert weist auf Verunreinigungen durch Proteine hin.

Standardmäßig wurden $2 \mu\text{l}$ DNA Lösung mit $98 \mu\text{l}$ Puffer verdünnt und die Konzentration der Lösung gegen einen Leerwert aus reinem Puffer bestimmt.

2.2.4 Polymerase-Kettenreaktion („PCR“)

Polymerase-Kettenreaktionen wurden mit dem thermostabilen Enzym *Taq*-Polymerase durchgeführt. Üblicherweise hatten die Ansätze folgende Zusammensetzung:

- 1 µl Polymerase
- 5 µl Polymerase-Puffer
- 1 µl Primer 1
- 1 µl Primer 2
- 1 µl dNTPs
- 1 µl DNA-Template
- 40 µl H₂O bidest.

Die PCR-Zyklen wurden durch einen 3-minütigen Denaturierungsschritt eingeleitet und durch einen finalen Syntheseschritt von 5 min abgeschlossen. Ein üblicher Zyklus bestand aus:

0,5 - 1 min 94°C	Denaturierung
0,5 - 1 min 54°C	Annealing
0,5 - 1 min 72°C	Elongation (etwa 1 min / 1 kb Amplifikatgröße).

Zur Synthese von modifizierter Rezeptor DNA wurde die Accu Taq™ DNA-Polymerase verwendet. Diese besitzt eine Korrekturlese-Fähigkeit und zeichnet sich durch eine geringe Fehlerrate der Amplifikate aus. Entsprechend den Herstellerangaben wurde dem PCR-Ansatz zusätzlich 1 µl DMSO zugesetzt. Das Temperaturoptimum der Accu-Taq liegt bei 68°C und es wurden üblicherweise 20 Amplifizierungszyklen durchlaufen.

Zur Synthese von Amplifikaten, die nicht weiter verwendet wurden, wurde die Red Taq™ DNA-Polymerase verwendet. Hier wurden üblicherweise 30 Zyklen durchlaufen. Zur Amplifikation genomischer Templates wurde die Hot Star Taq verwendet. Hier ging den Zyklen eine Aktivierung der Hot Star Taq für 5 min bei 95°C voraus.

2.2.5 Restriktion von DNA

Für analytische Restriktionsreaktionen wurden ca. 10 µg DNA mit 1-2 Units Restriktionsenzym in einem Volumen von 20 µl für 2-3 h bei 37°C inkubiert. Für die Restriktion präparativer Mengen an DNA wurden entsprechend größere Volumina und

Mengen Enzym eingesetzt. Reaktionspuffer wurden nach den Angaben des Herstellers verwendet.

2.2.6 Dephosphorylierung von DNA

Zur Minimierung von Vektoreigenligation wurde die geschnittene Vektor-DNA gelegentlich einer Dephosphorylierung durch CIAP (Calf Intestine Alcaline Phosphatase) unterzogen. Dazu wurde der Restriktionsansatz entweder durch Hitzeinaktivierung für 15 min bei 65°C abgestoppt und dann nach Zugabe von 1 µl CIAP für 1 h bei 37°C inkubiert, oder die DNA wurde nach Restriktion zunächst aufgereinigt und anschließend mit 1 µl CIAP und 1/10 Volumen CIAP-Puffer für 1 h bei 37°C inkubiert.

2.2.7 Agarose-Gelelektrophorese

Zur Auftrennung und Analyse von DNA-Fragmenten wurde die DNA-Lösung mit 0,1 Volumen DNA-Ladepuffer (20 % w/v Ficoll 400, 0,25 % w/v Bromphenolblau, 100 mM EDTA, 1 % w/v SDS pH 8,0) versetzt und über ein horizontales 0,8 %iges Agarosegel in TBE-Puffer in Gegenwart von 0,5 µg/ml Ethidiumbromid elektrophoretisch aufgetrennt. DNA-Banden wurden mittels eines UV-Transilluminators (254 nm) detektiert.

2.2.8 Isolierung von DNA-Fragmenten aus Agarose

Um DNA-Fragmente aus dem Agarosegel zu isolieren, wurde das QIAquick Gel Extraktions Kit gemäß der Gebrauchsanweisung des Herstellers verwendet. Hierbei wurden zunächst die DNA-Fragmente aus dem Gel herausgeschnitten und gewogen. Es wurden 3 Volumen des Puffers QX1 hinzugegeben und für 10 min bei 50°C inkubiert. Sobald sich das Gelfragment vollständig gelöst hatte, wurde das Gemisch auf die QIAquick-Säule gegeben und abzentrifugiert. Um die an die Säule gebundene DNA zu waschen, wurden 0,75 ml PE-Puffer hinzugegeben und erneut zentrifugiert. Schließlich wurde die DNA mit 30 - 50 µl EB-Puffer eluiert.

2.2.9 Ligation von DNA-Fragmenten

Lineare DNA-Fragmente mit kohäsiven oder glatten Enden wurden mit der T4-DNA-Ligase von FERMENTAS ligiert.

Dazu wurde die DNA in einem Reaktionsgemisch in einem Gesamtvolumen von 20 μ l mit 2 μ l Ligationspuffer, 2 μ l PEG 4000 und 5 Units T4-DNA-Ligase für 2-3 h bei RT ligiert. Die Konzentration an DNA betrug zwischen 1 und 10 μ g/ml, das molare Verhältnis Vektor/Insert-DNA lag zwischen 1:2 und 1:14. Im Anschluß an die Ligationsreaktion wurde der Ansatz für 10 min bei 65°C abgestoppt und die DNA ohne weitere Reinigung zur Transformation eingesetzt.

2.2.10 Sequenzierung von DNA

Zur Verifizierung mutagenisierter Rezeptor-DNA wurde diese bei der Firma SeqLab (Göttingen, D) unter GC-Bedingungen sequenziert.

2.3 Kultivierung und Manipulation eukaryotischer Zellen

Die Kultivierung eukaryotischer Zellen erfolgte im Brutschrank bei 37°C bei einem CO₂ Gehalt von 5 %. Alle verwendeten Zelllinien besitzen eine reguläre Verdopplungszeit von etwa 24 h.

2.3.1 Kultivierung von RBL-Zellen

Die adhärent wachsende Zelllinie RBL-2H3 wurde in 80/20-10 (RPMI)-Medium kultiviert. In dieser Arbeit verwendete stabil transfizierte Zelllinien wurden mit dem Neomycin-Resistenzgen cotransfiziert, so daß das Medium dieser Zellen zusätzlich mit 0,6 mg/ml G418 versetzt wurde.

Zum Ablösen der Zellen wurde das Medium abgesaugt und Trypsin/EDTA (0,025 % Trypsin, 0,01 % EDTA in PBS) auf die Zellen gegeben. Nach kurzer Einwirkzeit wurden die Zellen mit einem scharfen Pipettenstrahl abgelöst, in neues Medium überführt und gegebenenfalls ausgezählt.

2.3.2 Kultivierung von HEK-293-Zellen

Die mäßig adhärent wachsende Zelllinie HEK-293 wurde in DMEM-Medium kultiviert. Das Ablösen der Zellen erfolgte mit frischem Medium, da die Adhärenz dieser Zellen deutlich schwächer ausgeprägt ist.

2.3.3 Bestimmung der Zellzahl und Zellvitalität

Die Zellzahlbestimmung erfolgte in einer Neubauer-Zählkammer. Dazu wurden 10 μ l der Zellsuspension zur Zellvitalitätsbestimmung mit gleichem Volumen Trypan-Blau versetzt, welches tote Zellen blau anfärbt. Anschließend wurden 10 μ l dieser Suspension unter dem Phasenkontrastmikroskop ausgezählt.

2.3.4 Lagerung eukaryotischer Zellen

Zur Konservierung eukaryotischer Zellen wurden diese in flüssigem Stickstoff gelagert. Zum Einfrieren wurden die Zellen abgelöst, mit Einfriermedium (hitzeinaktiviertes FCS + 10 % DMSO) auf eine Zellzahl von $0,5 - 1 \times 10^7$ Zellen/ml eingestellt und in vorgekühlte Kryokonservierungsröhrchen überführt. Dann wurden die Zellen für 2 h bei -20°C und für weitere 24 h bei -80°C gelagert und anschließend in den Stickstofftank überführt.

Zum Auftauen wurden die Zellen für kurze Zeit im 37°C Wasserbad erwärmt, bis die Zellsuspension fast vollständig aufgetaut war, und dann in 10 ml Medium überführt, um das zelltoxische DMSO auszudünnen. Schließlich wurden die Zellen für 5 min bei 1000 rpm bei RT abzentrifugiert, das Pellet in warmem Medium resuspendiert und in einer Zellkulturflasche im Brutschrank inkubiert.

2.3.5 Transfektion eukaryotischer Zellen

Die Transfektion ermöglicht bei geeigneten Expressionsvektoren die Synthese von Fremdgenen in eukaryotischen Zellen. Bei der stabilen Transfektion wird die eingebrachte DNA in das Wirtsgenom integriert und an die Tochterzellen weitergegeben. Diese Methode birgt den Vorteil, daß mit gleichbleibender Expression der Fremdproteine gut reproduzierbare Experimente durchgeführt werden können, beinhaltet aber einen langwierigen Selektionsprozeß. Bei der transienten Transfektion wird die Fremd-DNA nicht in das Genom integriert und damit auch nicht an Tochterzellen weitergegeben. Diese Methode hat den Vorteil, daß man bereits zwei Tage nach der Transfektion eine optimale Fremd-Proteinexpression beobachten kann.

2.3.5.1 Elektroporation von RBL-2H3 Zellen

Bei der Elektroporation werden die Zellen kurzen elektrischen Impulsen hoher Spannung ausgesetzt, wodurch für kurze Zeit nanometergroße Poren in den Plasmamembranen der Zielzellen entstehen, wodurch die zu transfizierende DNA in die

Zellen gelangen kann (NEUMANN *et al.*, 1982). Dort integriert sie an zufälliger Stelle im Genom. Die Identifizierung und Isolierung der DNA-tragenden Zellen erfolgt durch Cotransfektion des Resistenzgens für Neomycin.

Zur Transfektion von RBL-2H3 Zellen wurde die zu transfizierende DNA zunächst linearisiert. Die Restriktion erfolgte idealerweise im Ampicillin-Gen des Vektors durch *PvuI* oder *ScaI*. Bei Verwendung des Vektors pEF-Bos, der selbst kein Neomycin-Resistenzgen trägt, wurden der mit *EcoRI* verdaute Vektor pHßAPr-1-neo oder der mit *ScaI* linearisierte Vektor pEF1-MycHISA cotransfiziert. Der Restriktion schloß sich jeweils eine Phenol-Fällung (siehe 2.2.2) der DNA an.

Die etwa 80 % konfluent gewachsenen RBL-2H3 Zellen wurden mit Trypsin/EDTA abgelöst, in 80/20-10-Medium aufgenommen und gezählt. Nach zweimaligem Waschen mit PBS wurden die Zellen auf eine Zellzahl von 4×10^7 Zellen/ml in PBS eingestellt und auf Eis gelagert.

In eine auf Eis vorgekühlte Elektroporationsküvette wurden 18 µg des linearisierten Expressionsvektors und gegebenenfalls 3 µg des Neomycin-Hilfsvektors gegeben und anschließend mit 250 µl Zellsuspension für 10 min auf Eis inkubiert. Danach erfolgte die Elektroporation bei 260 Volt und 960 µF bei RT. Die Zeitkonstante wurde notiert und die Zellen erneut für 10 min auf Eis inkubiert. Anschließend wurden die Zellen in 10 ml vorgekühltes 80/20-10-Medium überführt und für 5 min bei 1000 rpm bei RT abzentrifugiert. Das Zellpellet wurde in 1 ml Medium resuspendiert, in 36 ml Medium überführt und auf 3 sterile 24-Loch-Zellkulturplatten verteilt, die vorher jeweils mit 0,5 ml Medium pro Napf befüllt wurden. Nach 24 h wurde das Medium abgesaugt und durch G418-haltiges 80/20-10-Medium ersetzt. Nach weiteren 5 Tagen wurde das Medium erneuert, um Zelltrümmer zu entfernen. Nach weiteren 5 bis 10 Tagen konnten dann einzelne Transfektanten isoliert werden.

2.3.5.2 Identifizierung und Subklonierung von Transfektanten

Pro stabiler Transfektion mittels Elektroporation wuchsen zwischen 10 und mehreren hundert Einzelkolonien heran. Einzeln liegende Klone wurden mit einer Pipette in einem Volumen von 20 µl aspiriert und in eine 96-Loch-Zellkulturplatte überführt. Von dort aus wurden die Zellen nach 1 bis 3 Tagen auf zwei 24-Loch Näpfe aufgeteilt. Von einem der Näpfe wurde mittels FACS-Analyse (siehe 2.4.1) die Rezeptorexpression

überprüft. Von positiven Klonen wurde mit den Zellen des zweiten Napfes eine Subklonierung durchgeführt, um die Reinheit des Klons sicherzustellen. Dazu wurden die Zellen in drei Verdünnungen auf 260, 62 und 20 Zellen/ml eingestellt und in jeweils eine halbe 96-Loch-Zellkulturplatte getropft, so daß sich statistisch in jedem Napf 7,2, 2,4 bzw. 0,8 Zellen befanden. Nach etwa 10 Tagen Anzucht wurden nun erneut einzeln liegende Klone gepickt und im FACS analysiert. Falls nötig schlossen sich erneute Subklonierungen an. Mindestens zwei positive Klone pro Transfektion wurden angezogen und in funktionellen Tests verglichen, um klonale Artefakte zu vermeiden.

2.3.5.3 Calcium-Phosphat-Transfektion von HEK-293 Zellen

Bei der Transfektion mittels der Calcium-Phosphat Methode wird die zu transfizierende DNA mit Calcium und Phosphat komplexiert, auf die Zellen aufgebracht und dort endozytiert. Die Transformationseffizienz wird durch Glycerinbehandlung der Zellen erhöht.

Am Tag vor der Transfektion wurden die HEK-293 Zellen zu 25 % Konfluenz ausplattiert. Die Transfektion erfolgte standardmäßig in 6-Loch Nöpfen, bei Bedarf wurden mittlere oder große Schalen verwendet. Zu Beginn der Transfektion wurde das Medium abgesaugt und durch 3 ml frisches, vorgewärmtes Medium ersetzt. Dann wurden 3,3 µg ungeschnittene DNA in 166 µl 0,25 M CaCl₂ aufgenommen und vermennt. Nun wurden jeder Probe tropfenweise 166 µl 2x HBS (2,8 ml 2 M NaCl, 2 ml 0,5 M HEPES pH 7,0, 30 µl 1 M Na₂HPO₄, ad 20 ml H₂O, pH 7,1) zugesetzt, und das Gemisch wurde sanft auf den Zellen verteilt.

Nach 24 Stunden Wachstum wurde der Glycerin-Schock durchgeführt. Dazu wurde das Medium abgesaugt, und die Zellen wurden mit 300 µl vorgewärmtem Glycerin (10 % in PBS) bedeckt. Nach kurzem Schwenken wurde der Napf mit 3 ml Medium aufgefüllt, erneut abgesaugt und wieder mit 3 ml Medium versetzt. Nach weiteren 24 h wurden die transfizierten Zellen für funktionelle Tests verwendet.

Bei Transfektionen in mittleren Schalen wurden 10 µg DNA in je 500 µl CaCl₂ und HBS aufgenommen und der Mediumwechsel erfolgte mit 10 ml Medium und 900 µl Glycerin, bei großen Schalen wurden alle Mengen noch einmal verzweifacht.

2.4 Funktionelle Untersuchungen transfizierter eukaryotischer Zellen

2.4.1 Durchflußzytometrie im Fluoreszenz-aktivierten Zellsorter (FACS)

Die Durchflußzytometrie Fluoreszenz-markierter Zellen ermöglicht die gleichzeitige Erfassung von Größe (Vorwärtsstreulicht), Granularität (Seitwärtsstreulicht) und Expression des Fluoreszenz-markierten Antigens auf einzelnen Zellen. Die verwendete Laser-Wellenlänge von 488 nm entspricht der Anregungswellenlänge sowohl von Fluoresceinisothiocyanat (FITC) mit einer Emissionswellenlänge von 530 nm, als auch der des Phycoerythrins (PE), das ein Emissionsmaximum bei 585 nm besitzt.

2.4.1.1 Markierung nicht permeabilisierter Zellen

Es wurden $2-10 \times 10^5$ Zellen in eine Rundboden-Mikrotiterplatte überführt und für 1 min bei 1400 rpm bei RT abzentrifugiert. Anschließend wurden die Zellen mit 50 bis 100 µl Primärantikörper in einer Konzentration von 10 µg/ml in FACS-Puffer (1,5 % FCS, 0,1 % NaN_3 in PBS) für 1 h bei 4°C inkubiert. Danach wurde die Platte zweimal mit je 150 µl FACS-Puffer gewaschen, und die Zellen wurden mit je 100 µl Fluoreszenz-markiertem, polyklonalem Anti-Maus Sekundärantikörper in einer Verdünnung von 1:100 in FACS-Puffer versetzt. Nach einer Inkubation von 30 min bei 4°C im Dunkeln wurden die Zellen einmal mit FACS-Puffer gewaschen, in 100 µl FACS-Puffer resuspendiert und in FACS-Röhrchen überführt. Nach Zugabe von weiteren 300 µl FACS-Puffer pro Röhrchen erfolgte die Messung der Proben.

2.4.1.2 Markierung permeabilisierter Zellen

Zur Detektion intrazellulärer Antigene wurden die Zellen mittels Saponin permeabilisiert. Dazu wurde die Methode 2.4.1.1 leicht modifiziert. Die Zellen wurden vor Zugabe der Antikörper in der Rundboden-Mikrotiterplatte mit 150 µl PBS-Saponin-Gelatine (0,1 % Saponin, 0,2 % Gelatine in PBS) für 15 min auf Eis inkubiert. Anschließend wurde die Platte abzentrifugiert und es erfolgte die Inkubation des Primärantikörpers in PBS-Saponin (0,1 % Saponin in PBS). Nach zweimaligem Waschen der Zellen mit PBS-Saponin-Gelatine wurde der Anti-Maus Sekundärantikörper in PBS-Saponin verdünnt auf die Zellen gegeben. Nach der 30 minütigen Inkubation wurde die Platte einmal mit PBS-Saponin-Gelatine und direkt

anschließend einmal mit FACS-Puffer gewaschen. Schließlich wurden die Zellen wie oben in 100 µl FACS-Puffer aufgenommen.

2.4.2 Konfokale Lasermikroskopie

Die konfokale Lasermikroskopie nach Minsky (MINSKY, 1988) ermöglicht ein hochauflösendes, schichtweises Darstellen von Zellen in verschiedenen räumlichen Tiefen. Die hohe Abbildungsqualität wird dadurch erreicht, daß das Licht, welches von dem vom Laser angeregten Untersuchungsobjekt ausgeht, mittels eines Strahlteilerspiegels durch eine Lochblende geleitet wird, wodurch nur die Strahlung der Brennebene auf den Detektor gelangt, wo die Lichtenergie in elektrische Signale umgewandelt und verstärkt wird. Die auftretende Streustrahlung wird durch die Lochblende effektiv abgeschirmt.

2.4.2.1 Markierung nicht permeabilisierter Zellen

Am Vortag der Markierung wurden die RBL-Zellen mit Trypsin abgelöst, gezählt und mit Medium auf 1×10^5 Zellen/ml eingestellt. Dann wurden in die Näpfe einer 24-Loch-Platte sterile Glasplättchen (1 cm Durchmesser), die zur besseren Anheftung vorher kurz in steriles PBS getaucht wurden, gelegt. Auf diese wurde dann 1 ml Zellsuspension pro Napf pipettiert.

Am Tag der Markierung wurden die Zellen bei Bedarf mit 500 µl Stimulus in Medium stimuliert, auf Eis transferiert und mit 500 µl Formaldehyd (10 % in PBS) fixiert. Anschließend wurden die Zellen für 10 min auf Eis inkubiert und zweimal mit je 1 ml PBS gewaschen. Zur Blockade freier Bindungsstellen wurden die Zellen mit 500 µl Quench-Lösung (0,669 g NH_4Cl ad 250 ml PBS) für 20-25 min auf Eis inkubiert. Anschließend wurde die Quench-Lösung abgesaugt und 300 µl Primärantikörper in einer Konzentration von 10 µg/ml in PBS-BSA (0,2 % BSA in PBS) auf die Zellen gegeben. Nach einer Inkubation für eine Stunde auf Eis wurden die Zellen zweimal mit je 1 ml PBS gewaschen. Danach wurden 300 µl Sekundärantikörper in PBS-BSA auf die Zellen gegeben, und es wurde abgedunkelt erneut für eine Stunde auf Eis inkubiert. Schließlich wurden die Zellen einmal mit PBS gewaschen. Zum Eindeckeln wurden die Glasplättchen mit einer umgebogenen Spritzenkanüle aus dem 24-Loch Napf gehobelt und kurz bei RT getrocknet. Währenddessen wurden 8 µl Eindeckelmedium (10 % p-Phenylendiamin (10 mg/ml in dH_2O) in Mowiol) auf einen Objektträger pipettiert,

worauf das Glasplättchen mit den Zellen nach unten gerichtet aufgelegt wurde. Zum Aushärten des Eindeckelmediums wurden die Proben über Nacht bei 4°C aufbewahrt.

2.4.2.2 Markierung permeabilisierter Zellen

Zur Markierung von intrazellulären Antigenen wurden die Zellen mit Saponin permeabilisiert. Dazu wurde das Protokoll wie unter 2.4.2.1 mit leichten Modifikationen verwendet.

Nach dem Absättigen freier Bindungsstellen mit Quench-Lösung wurden die Zellen für 15 min auf Eis mit 500 µl PBS-Saponin-Gelatine (0,1 % Saponin, 0,2 % Gelatine in PBS) inkubiert. Die sich anschließenden Inkubationen mit Antikörper erfolgten anstelle in PBS-BSA in PBS-Saponin (0,1 % Saponin in PBS) und die Waschschrte wurden mit PBS-Saponin-Gelatine durchgeführt. Am Ende der Markierung wurden die Zellen zunächst einmal mit PBS-Saponin-Gelatine und darauf ein weiteres mal mit PBS gewaschen. Das Eindeckeln erfolgte wie unter 2.4.2.1.

2.4.2.3 Mikroskopische Analyse

Die Auswertung der markierten Zellen erfolgte mit dem Konfokalmikroskop Leica DM IRB der Firma LEICA MICROSYSTEMS (Heidelberg, D) mit der Software TCS SP2. FITC-markierte Zellen wurden mit einem Argon Laser mit einer Anregungswellenlänge von 488 nm bei einer Intensität von 20 % visualisiert. Cy3-markierte Zellen wurden mit einem Helium/Neon Laser bei 543 nm bei 65 % Intensität angeregt. Die aufgenommene Fläche betrug pro Bild 512 x 512 Pixel und die Schichtdicke der aufgenommenen Ebenen lag bei etwa 0,3 – 0,4 µm.

2.4.3 ELISA („Sandwich-Verfahren“)

Im „Sandwich-Verfahren“ des Enzyme-linked Immunosorbent Assays (ELISA) bestimmt man die Konzentration von Antigenen durch die Kombination zweier monoklonaler Antikörper, die gegen unterschiedliche Epitope des gleichen Antigens gerichtet sind. Ein Antikörper wird dabei als Fangantikörper auf der ELISA-Mikrotiterplatte immobilisiert und bindet das Antigen aus Zelllysaten. Der zweite Antikörper wird in biotinylierter Form eingesetzt und kann dann mit Hilfe der Streptavidin-Peroxidase-Reaktion quantifiziert werden.

Am Vortag des Experiments wurden je 7×10^5 RBL-Zellen in kleine Schalen ausplattiert. Weiterhin wurde eine Maxisorp Flachboden-Mikrotiterplatte mit 100 μl Fangantikörper in einer Konzentration von 5 $\mu\text{g/ml}$ in Coating Puffer (25 mM Carbonpuffer (85 ml 0,2 M Na_2CO_3 , 40 ml 0,2 M NaHCO_3 , ad 500 ml dH_2O), pH 10,6) versetzt und über Nacht bei RT in einer feuchten Kammer inkubiert.

Zu Beginn des Experiments wurde Lysepuffer frisch mit PMSF (1:500) versetzt. Nach der Stimulation der Zellen im 37°C Wasserbad wurde der Stimulus abgesaugt, die Zellen schnell auf Eis überführt und mit 300-900 μl Lysepuffer versetzt. Nach 10 min Inkubation auf Eis wurden die Zellen mit einem scharfen Pipettenstrahl abgelöst und in E-cups überführt. Anschließend wurden die Proben für 10 min bei 4°C und 13000 rpm abzentrifugiert. In dieser Zeit wurde die vorbeschichtete Mikrotiterplatte zweimal mit PBS-Tween gewaschen. Anschließend wurde je 100 μl Zelllysate in Doppelbestimmung in die ausgeschlagene Mikrotiterplatte überführt. Zur Quantifizierung wurde gegebenenfalls ein BSA-phospho-C-terminus Standard mitgeführt. Die Proben wurden für 1 h in einer feuchten Kammer bei RT inkubiert. Dann wurde die Platte dreimal mit PBS-Tween gewaschen, und die Proben wurden mit 100 μl des biotinylierten Nachweisantikörpers in einer Konzentration von 1 $\mu\text{g/ml}$ in PBS-Tween für eine Stunde bei RT in einer feuchten Kammer inkubiert. Anschließend wurde die Platte dreimal mit PBS-Tween gewaschen, und jedem Napf wurden 100 μl Streptavidin-Peroxidase 1:5000 in PBS-Tween zugefügt. Nach einer Inkubation für 45 min bei RT im Dunkeln in einer feuchten Kammer wurde die Platte erneut dreimal mit PBS-Tween gewaschen. Dann wurde das Peroxidase-Substrat ABTS frisch 1:200 mit 3,5 % H_2O_2 versetzt, und nach Zugabe von je 100 μl pro Napf wurde der Farbumschlag des Substrats bei einer $\text{OD}_{405-490 \text{ nm}}$ gemessen.

2.4.4 N-Acetyl- β -D-Glucosaminidase-Freisetzung (NAGA-Test)

Im NAGA-Test wird die Freisetzung des Enzyms N-Acetyl- β -D-Glucosaminidase nach Stimulation transfizierter RBL-Zellen mit RANTES oder C5a gemessen. Die Menge freigesetzten Enzyms korreliert dabei mit der Zeit, die der stimulierte Rezeptor zur Desensibilisierung benötigt. Die Quantifizierung der N-Acetyl- β -D-Glucosaminidase erfolgt über die Zugabe des Substrats 4-Nitrophenyl-N- β -D-Glucosamid, von dem bei einem pH-Optimum von 4,5 p-Nitrophenol abgespalten wird. Die ionische Form des

p-Nitrophenols geht oberhalb eines pH-Wertes von 7,5 in das gelb gefärbte p-Nitrophenolat über, das bei einer $OD_{405-650\text{ nm}}$ quantifiziert werden kann.

Zunächst wurde das schwer lösliche Substrat 4-Nitrophenyl-N- β -D-Glucosamid in Natrium-Acetat Puffer (42,5 mM, pH 4,5) in einer Konzentration von 8 mM eingewogen und bis zur Verwendung zur Lösung geschüttelt. Dann wurden die RBL-Zellen abgelöst, gezählt und es wurden pro Doppelbestimmung 4×10^6 Zellen für 10 min bei 1000 rpm bei RT abzentrifugiert. Das Pellet wurde in 1 ml HAG-CM Puffer (20 mM HEPES, 125 mM NaCl, 5 mM KCl, 1 mM $\text{CaCl}_2 \times 2 \text{H}_2\text{O}$, 1 mM $\text{MgCl}_2 \times 6\text{H}_2\text{O}$, 0,5 mM Glucose, pH 7,4) mit 0,25 % BSA aufgenommen und mit 5 μl Cytochalasin B (1 mg/ml in DMSO) versetzt und für 20 min bei 37°C im Wasserbad inkubiert. Während dieser Zeit wurde vom Stimulus eine 10fach konzentrierte Reihenverdünnung in HAG-CM Puffer angefertigt, und es wurden je 10 μl Stimulus in E-cups vorgelegt und auf 37°C vorgewärmt. Zur Bestimmung der prozentualen Glucosaminidase-Freisetzung wurde zusätzlich eine Triton-Kontrolle (1 % Triton X-100 in HAG-CM Puffer) angesetzt. Anschließend wurden die Reaktionsansätze mit 90 μl Zellsuspension versetzt und für 4 min bei 37°C inkubiert. Die Reaktion wurde auf Eis abgestoppt, und die Zellen wurden für 5 min bei 6000 rpm bei 4°C abzentrifugiert. Danach wurde von dem Überstand des Tritonkontrollansatzes eine 1:2 Reihenverdünnung angefertigt. Schließlich wurden je 25 μl Überstand aller Proben in eine Mikrotiterplatte überführt und mit je 125 μl Substratlösung versetzt für 2 Stunden bei 37°C im Brutschrank inkubiert. Die Reaktion wurde danach mit 50 μl Glycin-Puffer (0,4 M Glycin, pH 10,4) abgestoppt und die Extinktion des freigesetzten p-Nitrophenolats bei einer OD von 405-650 nm im Plattenphotometer gemessen.

2.4.5 Fluoreszenzphotometrische Messung der Calciumionen-Freisetzung

Die Stimulation eines GPCRs aktiviert über die $\beta\gamma$ -Einheit des G-Proteins die membrangebundene Phospholipase C, welche Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat in Inositol-1,4,5-triphosphat (IP_3) und 1,2-Diacylglycerin (DAG) spaltet (BERRIDGE, 1987). IP_3 wiederum katalysiert die Freisetzung von Calciumionen aus intrazellulären Speichern (BERRIDGE und IRVINE, 1984), die eine um den Faktor $10^3 - 10^4$ erhöhte Calcium-Konzentration im Vergleich zum Zytoplasma besitzen. Zur Detektion des freigesetzten Calciums *in vivo* werden die Zellen vor der Stimulation mit dem Chelatbildenden Fluoreszenzfarbstoff Fluo3AM inkubiert, dessen hydrophobe Eigenschaft

eine Passage der Zellmembran ermöglicht. Die Freisetzung der Ionen nach Rezeptorstimulation kann dann im Fluoreszenzspektrophotometer verfolgt werden.

RBL-Zellen wurden mit Trypsin/EDTA abgelöst und gezählt. Dann wurden 5×10^6 Zellen in ein 50 ml Röhrchen überführt, dieses einmal mit Puffer A (148 mM NaCl, 4,96 mM KCl, 0,98 mM $\text{MgCl}_2 \times 6\text{H}_2\text{O}$, 10 mM HEPES, 1 mM D-Glucose, pH 7,4) aufgefüllt und für 8 min bei 1000 rpm bei RT abzentrifugiert. Das Pellet wurde in 1 ml Puffer B (1 % BSA, 1,35 mM CaCl_2 in Puffer A, frisch ansetzen) aufgenommen und mit 33 μl Fluo3AM versetzt. Dann erfolgte eine Inkubation der Zellen für 40 min bei 37°C im Dunkeln im Brutschrank, währenddessen die Zellen etwa alle 5 min aufgeschüttelt wurden. Danach wurden die Zellen einmal mit Puffer A gewaschen, abzentrifugiert und in 1 ml Puffer A resuspendiert. Daraufhin wurde die Zellsuspension zu 250 μl portioniert und abgedunkelt.

Die Messung der Calciumfreisetzung erfolgte im Fluoreszenzspektrophotometer bei einer Anregungswellenlänge von 506 nm und einer Emissionswellenlänge von 526 nm (ELSNER *et al.*, 1992). Dazu wurden 25 μl 10fach konzentrierter Stimulus in Puffer A in die Quarzküvette vorgelegt und mit 250 μl Zellsuspension gemischt. Die Calciumfreisetzung wurde dann für 180 sec aufgezeichnet. Der Beladungserfolg der Zellen mit Fluo3AM wurde mittels Zellyse durch Zugabe von 25 μl Triton X-100 (1 % in Puffer A) und anschließender Fluoreszenzmessung überprüft.

Der Verlauf der intrazellulären Calciumfreisetzung ab 80 % des Maximums wurde an eine exponentielle Zerfallsfunktion angepaßt ($y = y_0 + a e^{-x/\tau}$), wobei die Zeitkonstante τ mit der Fähigkeit des Rezeptors korreliert, über verschieden lange Zeiträume in einer aktiven, nicht desensibilisierten Konformation vorzuliegen.

2.4.6 β -Arrestin-Translokation

Zum indirekten Nachweis von Arrestin-Rezeptor-Interaktion wird die Zellmembran von stimulierten RBL-Zellen mit einem Sucrose-Gradienten aufgereinigt und im Immunoblot auf die Translokation von β -Arrestin an die Zellmembran überprüft.

Die konfluent gewachsenen RBL-Zellen wurden in großen Schalen mit je 8 ml Stimulus in Medium bei 37°C im Wasserbad stimuliert, und die Reaktion wurde durch Absaugen des Mediums und Transferieren der Schalen auf Eis abgestoppt. Dann wurden die Zellen in 3 ml Lysepuffer mit einem Zellschaber aufgeschabt und in vorgekühlte 15 ml

Röhrchen überführt. Anschließend wurden die Zellen im Potter aufgeschlossen und zusätzlich für drei mal 5 sec beschallt. Danach wurde das Zelllysate in E-cups überführt und für 15 min bei 3000 rpm bei 4°C abzentrifugiert. Währenddessen wurde in 12 ml Beckmann-Röhrchen ein Sucrose-Gradient von je 2,5 ml 50 %, 35 % und 20 % Glucose in Membranpuffer (10 mM PIPES, 100 mM KCl, 3 mM NaCl, 3,5 mM MgCl₂, pH 7,0) geschichtet. Auf diesen wurde das Zelllysate geschichtet und für 2 h bei 35000 rpm bei 4°C im SW-40-Ti-Rotor ohne Bremse abzentrifugiert. Danach wurden von jeder Probe je 30 µl Zytosol aus der obersten Fraktion und die Membranbande aus der Interphase zwischen der 50 % und 35 % Glucosefraktion abgenommen. Die Membranschicht wurde in 6 ml Beckmann Röhrchen überführt, mit 3 ml Membranpuffer versetzt und erneut für 15 min bei 50000 rpm bei 4°C im SW-65 Rotor abzentrifugiert. Das Pellet wurde in 30 µl Lysepuffer resuspendiert. Zu allen Zytosol- und Membranfraktionen wurden dann 30 µl 2x PAGE gegeben, die Proben wurden für 5 min aufgekocht, kurz anzentrifugiert und schließlich wurden je 50 µl auf ein 10 %iges SDS-Gel aufgetragen. Nach der Gelelektrophorese und dem Immunoblot (siehe 2.4.8) wurde die Zellulosemembran für 30 min mit 4 % Milchpulver in TBS-Tween bei RT blockiert und mit dem Primärantikörper anti-β-Arrestin 1 von DAKO oder dem in der Abteilung hergestellten anti-β-Arrestin1/2 Antikörper 21B1-8-32 in 4 % Milchpulver-TBS-Tween über Nacht bei 4°C inkubiert. Als Sekundärantikörper wurde P260 (Peroxidase-konjugierter Kaninchen-anti-Maus Ak) verwendet. Dabei betrug das Molekulargewicht von β-Arrestin-1 etwa 40 kDa und das des β-Arrestin-2 etwa 45 kDa.

2.4.7 Immunpräzipitation

Die Immunpräzipitation dient der Isolation eines Proteins aus ganzen Zelllysaten mittels spezifischer Antikörper. Desweiteren wird die Co-Immunpräzipitation zum Nachweis von Protein-Protein-Bindung eingesetzt, wobei eines der interagierenden Proteine aus einem Zelllysate präzipitiert wird und das zweite Protein nach der Proteinauftrennung unter reduzierenden Bedingungen im Immunoblot detektiert wird.

Die in mittleren Schalen konfluent gewachsenen RBL-Zellen wurden bei Bedarf mit 4 ml Stimulus in Medium bei 37°C im Wasserbad stimuliert, der Stimulus wurde abgesaugt und die Schalen auf Eis überführt. Die Zellen wurden in 1 ml Lysepuffer mit einem Zellschaber aufgeschabt und in E-cups überführt. Dann wurden die Zellen für 15 min bei 13000 rpm bei 4°C abzentrifugiert. Vom Überstand wurden je nach Probe

5 – 1000 μ l mit 100 μ l Protein-G-Sepharose und 12 μ g Antikörper versetzt und für 2 h bei 4°C auf einem Überkopfrührer inkubiert. Dann wurden die Proben für 10 min bei 13000 rpm bei 4°C abzentrifugiert und das Pellet wurde 3 bis 4 mal mit 1 ml Lysepuffer gewaschen. Schließlich wurde das Pellet in 55 μ l 1x PAGE aufgenommen, für 20 min bei 37°C inkubiert und auf ein 10 %iges SDS-Gel aufgetragen.

2.4.8 SDS-Gelelektrophorese

In der SDS-Gelelektrophorese werden Proteine nach ihrem Molekulargewicht aufgetrennt. Dazu werden sie mit SDS, einem negativ geladenen, amphipatischen Detergenz, versetzt, das sich an die Proteine anlagert und deren bestehende Sekundär- und Tertiärstruktur weitgehend auflöst. Durch die Zugabe von β -Mercaptoethanol werden außerdem die Schwefeldisulfid-Brücken zwischen den Cysteinen gespalten. Durch die negative Ladung des SDS wandern alle Proteine zur Anode, wobei die Laufgeschwindigkeit der denaturierten Proteine umgekehrt proportional zu ihrem Molekulargewicht ist. Die Auftrennung der Proteine erfolgt in einem zweigeteilten Gel. Im oberen Teil, dem Sammelgel, erfolgt eine Konzentrierung sämtlicher Proteine an der Grenze zum Trenngel, sodaß sich eine einheitliche Lauffront der Proteine bilden kann. Im Trenngel erfolgt dann die eigentliche Auftrennung der Proteine.

Zunächst wurden zwei Glasplatten (16 x 18 cm) in die Gießvorrichtung eingespannt. Dann wurde das Trenngel gemäß Tabelle 2 bereitet.

Tab. 2: Zusammensetzung der SDS-Gele

Komponenten	Trenngel	Sammelgel
Acryl-Bisacrylamid-Lösung (58,4 g Acrylamid, 1,6 g N,N-Methylen-Bisacrylamid, ad 200 ml dH ₂ O)	10 ml	1,33 ml
Trenngelpuffer (1,5 M Tris, pH 8,8)	7,5 ml	-
Sammelgelpuffer (0,5 M Tris, pH 6,8)	-	2,5 ml
10 % SDS	0,3 ml	0,1 ml
Ammoniumpersulfat	5 mg	2,5 mg
dH ₂ O	12 ml	6,1 ml
TEMED	20 μ l	10 μ l

Von der Trenngellösung wurden 14,5 ml zwischen die beiden Glasplatten pipettiert und mit wassergesättigtem Butanol überschichtet, um eine blasenfreie und glatte Trennlinie

zwischen den beiden Gelen zu gewährleisten. Nachdem das Trenngel auspolymerisiert war, wurde das Butanol abgegossen und der Zwischenraum einmal mit dH₂O gespült. Anschließend wurde das Trenngel mit der Sammelgel-Lösung gemäß Tabelle 2 überschichtet. Zur Ausbildung der Taschen wurde ein Teflonkamm in das noch flüssige Sammelgel zwischen die Glasplatten gesteckt. Nach abgeschlossener Polymerisation wurde der Kamm entfernt, die Taschen mit Wasser gespült und das Gel in die mit Laufpuffer (0,025 M Tris pH 8,3, 0,192 M Glycin, 0,1 % SDS in dH₂O) gefüllte Elektrophorese-Kammer gespannt.

Die aufzutragenden Proben wurden in 1x PAGE aufgenommen. Rezeptor-Proteine wurden dann für 20 min bei 37°C inkubiert, alle weiteren Proteine wurden für 5 min aufgeköcht und anschließend mit einer 50 µl Hamiltonspritze aufgetragen. Als Molekulargewichtsmarker diente der *Prestained Protein Molecular Weight Marker* der Firma FERMENTAS. Die Auftrennung der Proteine erfolgte bei einer Stromstärke von 100 mA für ca. 1,5 Stunden in einer gekühlten Laufkammer. Das Gel wurde entnommen, sobald die durch Bromphenolblau gefärbte Lauffront aus dem Gel auszutreten begann.

2.4.9 Immunoblot

Der Immuno- oder Westernblot dient der Detektion immobilisierter Antigene mittels monoklonaler Antikörper.

Zum „Blotten“ des SDS-Gels wurden zwei Filterpapiere in semi-dry Blotpuffer (48 mM Tris, 39 mM Glycin, 0,037 % SDS, 20 % Methanol) äquilibriert und auf eine Kathodengraphitplatte gelegt. Auf diese Filterpapiere wurde die gleich große, ebenfalls in Blotpuffer äquilibrierte Nitrozellulose-Membran gelegt. Das SDS-Gel mit den aufgetrennten Proteinen wurde passend zurechtgeschnitten und auf die Membran aufgelegt. Darauf wurden abschließend zwei weitere, äquilibrierte Filterpapiere gelegt und eventuelle Luftblasen durch Abrollen mit einer 5 ml Glaspipette entfernt. Die Anodengraphitplatte wurde aufgelegt, und die Proteine wurden in einem elektrischen Feld mit einer Stromstärke von 0,8 mA/cm² über einen Zeitraum von 1,5 Stunden auf die Nitrozellulose-Membran übertragen.

Nach dem Transfer wurde die Membran standardmäßig für 30 min bei RT mit Blockadepuffer (4 % Milchpulver in TBS-Tween) auf dem Schüttler inkubiert, um unspezifische Bindungsstellen abzusättigen. Anschließend erfolgte die Markierung des nachzuweisenden Proteins mit einem spezifischen, monoklonalen Antikörper. Dieser

wurde standardmäßig in Blockadepuffer verdünnt und über Nacht bei 4°C mit der Membran inkubiert. Nach der Inkubation wurde die Membran unter mehrmaligem Pufferwechsel mit TBS-Tween für 30 min bei RT auf dem Schüttler gewaschen. Dann wurde der Peroxidase-gekoppelte Sekundärantikörper in Blockadepuffer auf die Membran gegeben, und es wurde für 1,5 h bei RT auf dem Schüttler inkubiert. Nach vier sich anschließenden Waschschritten wurde die Membran kurz mit Filterpapieren getrocknet.

Der Nachweis der an die Membran fixierten Immunkomplexe erfolgte durch das ECL[®]-Western-Blot-Kit der Firma AMERSHAM. Dazu wurden die beiden Entwicklungslösungen im Verhältnis 1:1 gemischt und für 1 min bei RT auf die Membran gegeben. Anschließend wurde die ECL-Lösung abgenommen und bei Bedarf aufbewahrt (siehe 2.4.10). Die Membran wurde mit Filterpapier getrocknet und in der Dunkelkammer mit einem Photofilm entwickelt. Dazu wurde der Photofilm je nach Signalstärke für 1 – 30 min auf der Membran exponiert und anschließend für 90 sec im Entwicklerbad entwickelt. Die Entwicklung wurde durch mehrmaliges Eintauchen des Films in 5 % Essigsäure gestoppt und danach für 1 min fixiert. Nach dem Waschen des Films mit dH₂O wurde dieser bei RT getrocknet.

2.4.10 Ablösen von Immunkomplexen von Zellulose-Membranen („Strippen“)

Um die Expression verschiedener Proteine in einer Probe miteinander vergleichen zu können, wurden nach einem erfolgten Immunoblot die Antikörper von der Membran gewaschen, und diese wurde in einem zweiten Durchgang erneut mit Primär- und Sekundärantikörper inkubiert.

Dazu wurde die Membran zunächst mit der aufbewahrten ECL-Lösung (siehe 2.4.9) für 30 min bei RT gebleicht und danach für 10 min bei RT in TBS-Tween gewaschen. Zum Ablösen der zuvor gebundenen Antikörper wurde die Membran zusammen mit 35 ml 1 x *stripping*-Puffer (62,5 mM Tris pH 6,8, 100 mM 2-Mercaptoethanol, 2 % SDS) in einer Plastiktasche eingeschweißt für 30 min bei 65°C im Wasserbad inkubiert. Anschließend wurde die Membran für 45 min unter mehrmaligem Pufferwechsel mit TBS-Tween gewaschen. Danach erfolgte die zweite Markierung der Membran beginnend mit dem Blockieren freier Bindungsstellen wie unter 2.4.9 beschrieben.

2.4.11 Chemotaxis

Als Chemotaxis wird die gerichtete Wanderung von Chemokinrezeptor-exprimierenden Zellen auf einen Stimulus hin bezeichnet.

Zunächst wurden pro Chemotaxiskammer 10 ml 80/20 Medium mit 1 % BSA auf 37°C vorgewärmt und entgast. Anschließend wurden die RBL-Zellen mit Trypsin/EDTA abgelöst, für 10 min bei 1000 rpm abzentrifugiert und mit dem BSA-haltigen Medium auf 1×10^6 Zellen/ml eingestellt. Dann wurde der untere Teil der Chemotaxiskammer mit 27,5 μ l Stimulus in 80/20 + BSA befüllt. Auf die Kammer wurde die Chemotaxismembran mit einer Porengröße von 8 μ m mit der glänzenden Seite nach unten aufgelegt. Anschließend wurden die Gummilippe und der obere Teil der Chemotaxiskammer aufgesetzt. Der obere Kammerteil wurde mit jeweils 50 μ l Zellsuspension gefüllt. Es folgte eine Inkubation für 90 min im Brutschrank bei 37°C. Nach der Inkubation wurde die Kammer auseinandergelöst und die Membran an der dem Stimulus abgewendeten Seite dreimal in PBS gewaschen und an einer Gummilippe abgestriphen. Nach dem Trocknen der Membran wurden die Zellen für 1 min in Methanol fixiert und erneut für etwa 2 min getrocknet. Dann wurden die durch die Membranporen gewanderten Zellen in einer Hämalaun-Färbelösung für 2 min angefärbt. Die Membran wurde anschließend kurz in einem Wasserbad geschwenkt und dann getrocknet.

Zur Dekontamination wurden der obere und untere Teil der Chemotaxiskammer in einer 1 % TergAZym-Lösung bei 60°C für 1 bis 3 Stunden inkubiert, und anschließend wurden beide Teile zusammen mit der Gummilippe für 1 bis 3 Stunden bei 60°C in dH₂O inkubiert.

Zur Auswertung wurden repräsentative Membranen auf Objektträgern eingedeckelt, und pro Napf wurden mindestens neun Blickfelder ausgezählt.

2.4.12 Biolumineszenz Resonanz Energie Transfer (BRET)

Die BRET-Methode basiert auf dem Biolumineszenz Resonanz Energie Transfer von einem Biolumineszenz erzeugenden Donor auf einen fluoreszierenden Akzeptor. Dieser Energietransfer hat eine maximale Reichweite von etwa 10 bis 100 Ångstrom und ermöglicht so die Erfassung von Protein-Protein-Bindung in lebenden Zellen. Dazu wird eines der Proteine an Renilla luciferase (Rluc), das andere Proteine an das grün fluoreszierende Protein (GFP) gekoppelt, und beide Proteine werden transient in HEK-293 Zellen exprimiert. In der hier angewandten BRET²-Technologie wird eine im

Extinktionsmaximum modifizierte GFP²-Variante verwendet, wodurch die Auflösung zwischen Luciferase- und GFP²-Signal auf 115 nm im Vergleich zu 45 nm der klassischen BRET-Anwendung mit nicht modifiziertem GFP erhöht wird. Als Substrat wird das Coelenterazin-Derivat DeepBlueC (PERKIN-ELMER) verwendet, das durch Luciferase-Katalysierung Licht der Wellenlänge 390-400 nm emittiert. Befindet sich das GFP², dessen Extinktionsmaximum an diese Wellenlänge adaptiert wurde, in räumlicher Nähe der Luciferase, wird es aktiviert und emittiert seinerseits Licht der Wellenlänge 510 nm. Die Effizienz des Energietransfers wird dargestellt als BRET²-Signal und ergibt sich aus der Division der GFP²-Emission durch die Intensität der Donor-Emission. Zur Quantifizierung der reinen Luciferase-Aktivität wurden die Zellen zusätzlich mit Coelenterazin-h (MOLECULAR PROBES) stimuliert, das Licht der Wellenlänge 466 nm emittiert, welches außerhalb des Extinktionsmaximums von GFP² liegt.

HEK 293 Zellen wurden zwei Tage vor jedem Experiment im 6-Loch Maßstab transient mit den verschiedenen Rezeptorkonstrukten transfiziert (siehe 2.3.5.3). Am Tag der BRET-Messung wurde zunächst die Zelldichte der einzelnen Näpfe mikroskopisch überprüft. Die Zellen wurden mit 1 ml BRET-Puffer (0,1 g/l CaCl₂, 0,1 g/l MgCl₂, 1 g/l D-Glucose in PBS) abgelöst, in E-cups überführt und für 1 min bei 3000 rpm bei RT abzentrifugiert. Die Zellen wurden einmal mit BRET-Puffer gewaschen und dann im gleichen Puffer auf etwa 4 x 10⁶ Zellen pro ml eingestellt. Von dieser Zellsuspension wurden je 12,5 µl (etwa 50000 Zellen) in eine weiße Mikrotiterplatte überführt, und jeder Napf wurde zusätzlich mit 25 µl BRET-Puffer versetzt. Von jedem Transfektionsansatz wurden dann zwei BRET-Reaktionen und zwei Luciferase- und Fluoreszenz-Quantifizierungen durchgeführt.

Die BRET-Lumineszenzreaktion wurde gestartet durch Zugabe von 12,5 µl DeepBlueC-Reagenz in einer Endkonzentration von 5 µM. Sofort danach wurde die Lumineszenz und Fluoreszenz der Proben im Mithras von BERTHOLD bei folgenden Einstellungen gemessen:

Lumineszenz: Emissionsfilter 410 / 80 nm, 1 sec

Fluoreszenz: Emissionsfilter 515 / 30 nm, 1 sec

Der Biolumineszenz Resonanz Energie Transfer ergab sich aus folgender Formel:

$$\text{BRET} = (\text{GFP}^2 / \text{Rluc}) - \text{Rf}$$

wobei Rf dem BRET-Quotienten in Zellen entspricht, die lediglich mit dem Luciferase-gekoppelten Rezeptor transfiziert wurden.

Zur Quantifizierung der Fluoreszenz wurde bei einer Anregungswellenlänge von 410 nm für 1 sec die Fluoreszenz der Proben bei einem Emissionsfilter von 515 nm bestimmt. Anschließend wurde die gleiche Probe mit 12,5 µl Coelenterazin h versetzt, und nach 5 min wurde die Lumineszenz für 0,5 sec ohne Filter gemessen.

2.5 Radioaktive Methoden

2.5.1 ³²P-Inkorporation

Die ³²P-Inkorporation gibt Aufschluß über die Phosphorylierung eines Proteins nach Zellstimulation. Dabei werden die Zellen in Anwesenheit von radioaktiv markiertem Phosphat stimuliert, aufgeschlossen und das zu untersuchende Protein wird mittels Immunpräzipitation aufgereinigt. Nach anschließender Gelelektrophorese und Immunoblot wird die Phosphorylierung des Proteins mittels Autoradiographie visualisiert.

Am Vortag des Experiments wurden 8×10^5 RBL-Zellen pro Napf in eine 6-Loch Platte plattiert. Zu Beginn des Experiments wurden die Zellen zunächst mit 2 ml Phosphat-freiem RPMI 1640 mit 0,2 % BSA gewaschen. Dann wurde jeder Napf mit 500 µl ³²P in einer Konzentration von 150 µCi/ml in Phosphat-freiem RPMI 1640 mit 0,2 % BSA versetzt und für 1 h bei 37°C im Brutschrank inkubiert. Danach erfolgte die Stimulation der Zellen durch Zugabe von 50 µl 10fach konzentriertem Stimulus. Das Medium wurde abgesaugt, und die Zellen wurden in 700 µl Lysepuffer aufgeschabt und in E-cups überführt. Anschließend erfolgte eine Zentrifugation für 30 min bei 13000 rpm bei 4°C. Der Überstand wurde mit 150 µl CL-Sepharose zur Präabsorption unspezifisch bindender Proteine für 1 h bei 4°C auf einem Überkopfrührer inkubiert. Danach wurden die Proben abzentrifugiert, und der Überstand wurde mit 100 µl Protein-G-Sepharose und 12 µg S5/1-Antikörper für 3 h bei 4°C inkubiert. Anschließend wurden die Proben für 10 min bei 13000 rpm bei 4°C abzentrifugiert, das Pellet wurde viermal mit Lysepuffer gewaschen und schließlich in 55 µl 1x PAGE aufgenommen und für 20 min bei 37°C inkubiert. Es folgte eine SDS-Gelelektrophorese (siehe 2.4.8). Danach wurde das Gel für 4 h bei 80°C unter Vakuum getrocknet und für 2 Tage bei -70°C auf einem Phosphoimager-Film exponiert.

2.5.2 Phosphoaminosäuren-Analyse mittels 2D-Gelelektrophorese

Die Phosphoaminosäuren-Analyse gibt Auskunft über den Phosphorylierungszustand einzelner Aminosäurearten. In GPCRs dienen die Aminosäuren Serin, Threonin und Tyrosin nach einer Rezeptorstimulation als mögliche Phosphorylierungsstellen. Diese werden in der 2D-Gelelektrophorese aufgetrennt (DUCLOS *et al.*, 1991).

Am Vortag des Experiments wurden je $6,4 \times 10^6$ RBL-Zellen in große Schalen ausplattiert und über Nacht angezogen. Am Tag darauf wurden die Schalen zunächst mit 12 ml Phosphat-freiem RPMI 1640 mit 0,2 % BSA gewaschen. Dann wurden die Schalen mit 5 ml ^{32}P in einer Konzentration von 150 $\mu\text{Ci/ml}$ in Phosphat-freiem RPMI 1640 mit 0,2 % BSA für 45 min bei 37°C im Brutschrank inkubiert. Daraufhin wurden die Zellen durch Zugabe von C5a in einer Endkonzentration von 50 nM für 4 min stimuliert. Der Überstand wurde abgesaugt und die Zellen wurden in je 2,5 ml Lysepuffer mit einem Zellschaber aufgeschabt und in E-cups überführt. Das Zelllysate wurde für 20 min bei 13000 rpm bei 4°C abzentrifugiert. Zum Entfernen unspezifisch bindender Proteine wurde der Überstand mit 100 μl CL-Sepharose versetzt und 30 min bei 4°C rotiert. Danach wurden die Proben für 10 min bei 13000 rpm bei 4°C abzentrifugiert, und der Überstand wurde mit 100 μl Protein-G-Sepharose und 8 μg S5/1-Antikörper für 2 h bei 4°C rotiert. Anschließend wurden die Proben abzentrifugiert, und es wurden 100 μl Überstand abgenommen und zur späteren radioaktiven Markierung der Immobilon-Membran bei 4°C verwahrt. Das Pellet wurde viermal mit Lysepuffer gewaschen, gegebenenfalls vereint und jeder Ansatz wurde in 70 μl 1x PAGE aufgenommen. Die Proben wurden dann für 20 min bei 37°C inkubiert und auf ein 10 % SDS-Gel aufgetragen (siehe 2.4.8). Nach der Gelelektrophorese wurden die Proben auf eine Immobilon-P-Membran transferiert. Dazu wurde die Immobilon-Membran aufeinanderfolgend 15 sec in Methanol, 2 min in dH_2O und 30 min in semi-dry Blotpuffer inkubiert. Anschließend erfolgte der Transfer für 90 min bei 120 mA (siehe 2.4.9). Danach wurde die Membran dreimal für je 2 min in 1 l dH_2O gewaschen. Nach dem Trocknen der Membran bei RT wurde diese zur Orientierung an drei Ecken mit je 1 μl des radioaktiven Überstandes markiert, in Folie eingeschlagen und für zwei Tage auf einem ECL-Film mit Verstärkerfolie exponiert. Mit Hilfe des Autoradiogramms wurde die Position der Rezeptorbanden auf der Membran ermittelt und mit einem Skalpell ausgeschnitten. Die Membranfragmente wurden für 30 sec in Methanol und 30 sec in dH_2O gewaschen und anschließend mit 200 ml 6 N HCl für 1 h bei 110°C im Trockenschrank einer sauren Hydrolyse unterworfen. Danach wurden die

Membranen für 5 min bei 13000 rpm bei RT abzentrifugiert und der Überstand wurde in ein neues E-cup überführt. Die Probe wurde in der Speedvac bei RT über Nacht getrocknet, das Pellet wurde in 20 µl dH₂O aufgenommen und erneut in der Speedvac getrocknet. Danach wurde das Pellet in 3,5 µl Puffer 1 (7,8 % Essigsäure, 2,5 % Ameisensäure, pH 1,9) und je 0,5 µl Phospho-D-Serin-, Phospho-D-Threonin- und Phospho-D-Tyrosin-Aminosäurestandard (je 2 mg/ml in Puffer 1) aufgenommen und zu je 0,5 µl auf den unteren Rand einer TLC-Dünnschichtchromatographieplatte appliziert. Die TLC-Platte wurde auf die gekühlte Elektrophoreseplatte aufgelegt und bis auf etwa 1 cm rund um die aufgetragenen Proben mit Puffer 1 befeuchtet. Dann wurde mit einseitig beschichtetem Whatman-Papier die Verbindung zu den mit Puffer 1 gefüllten Pufferkammern hergestellt, und es erfolgte die erste Elektrophorese für 1 h bei 1600 Volt. Anschließend wurde die TLC-Platte getrocknet, um 90° gedreht und der zweiten Elektrophorese in Puffer 2 (5 % Essigsäure, 0,5 % Pyridine, pH 3,5) für 50 min bei 1100 Volt unterworfen. Nach dem Trocknen der TLC-Platte wurde diese mit Ninhydrin besprüht und für 15 min bei 80°C inkubiert. Die sichtbar werdenden Positionen der einzelnen Phosphoaminosäurestandards wurden mit je 1 µl radioaktiven Überstand am Rand der TLC-Platte markiert, und die Platte wurde zur Detektion der phosphorylierten Aminosäuren der Proben einer Autoradiographie für 3 Tage unterworfen.

2.5.3 Markierung von Antikörpern mit ¹²⁵Iod

2.5.3.1 Iodierung des Antikörpers

Die Iodierung von Antikörpern erfolgte mit dem Bolton-Hunter-Reagenz von MP BIOMEDICAL.

Zunächst wurden 200 - 300 µl Antikörper in einer Konzentration von 1 bis 1,5 mg/ml in einem Float-a-lyzer Dialyseschlauch gegen 0,1 M Borat, pH 8,5 dialysiert. Es erfolgten drei Pufferwechsel über 3 h Dialyse bei 4°C. Währenddessen wurde eine PD-10 Säule mit 30 – 40 ml PBS + 0,25 % Gelatine + 0,02 % NaN₃ äquilibriert. Nach der Dialyse wurde der Antikörper mit gleicher molarer Masse Bolton-Hunter-Reagenz markiert. Dabei wurde davon ausgegangen, daß 150 mg Antikörper etwa 1 µmol entsprechen, die spezifische Aktivität des Bolton-Hunter-Reagenzes war gegeben. Das errechnete Volumen Bolton-Hunter-Reagenz wurde in ein Schraubdeckel-E-cup überführt und unter Stickstoffbegasung für 15-20 min getrocknet. Aufgrund der leichten Flüchtigkeit

von ^{125}I wurde das E-cup dabei mit einem Aktivkohlefilter verschlossen. Anschließend wurde eine äquimolare Menge Antikörper in das E-cup gegeben, dieses verschlossen und über 20 min alle 2 min sanft gemischt. Die Reaktion wurde abgestoppt durch Zugabe von 250 μl Stop-Lösung (0,2 M Glycin, 0,1 % Xylencyanol in 0,1 M Borat, pH 8,5), und es wurde erneut über 10 min alle 2 min bei RT sanft gemischt. Dann wurde die Lösung auf die äquilibrierte PD-10-Säule gegeben. Die Elution erfolgte in 500 μl Fraktionen durch Zugabe von PBS + 0,25 % Gelatine + 0,02 % NaN_3 , wobei die einzelnen Fraktionen in Schraubdeckel-E-cups aufgefangen wurden. Die Aktivität der einzelnen Proben wurden mit dem Handscanner erfaßt und die zwei bis drei Fraktionen mit der höchsten Aktivität wurden vereint. Dann wurde 1 μl dieser Probe mit 3 ml Szintillationsflüssigkeit versetzt und die Aktivität für 60 sec im Wallac Counter gemessen. Der Antikörper wurde aliquotiert und bis zur weiteren Verwendung bei -20°C aufbewahrt.

2.5.3.2 Bestimmung der Effizienz der Iodierung

Um eine geeignete Antikörpermenge für die folgenden Internalisierungsexperimente zu bestimmen, wurde zum einen die Antikörperkonzentration nach der Iodierung mittels ELISA überprüft, und zum anderen wurde die Stärke der spezifischen Aktivität und die Hintergrundstrahlung der Antikörper ausgetestet.

Zur Bestimmung der Antikörperkonzentration im ELISA (siehe 2.4.3) wurde die Mikrotiterplatte über Nacht mit Z259 (Kaninchen-Anti-Maus-Antikörper) gecoatet. Vom iodierten Antikörper wurde eine 1:2 Reihenverdünnung von 1:40 bis 1:10240 angefertigt, vom nicht iodierten Antikörper eine 1:2 Reihenverdünnung ab 500 ng/ml. Als Standard diente der Maus-IgG1-Antikörper MOPC21 (SIGMA) ab einer Konzentration von 500 ng/ml. Pro Napf wurden jeweils 100 μl verdünnter Antikörper verwendet. Als Sekundäntikörper diente P260 (Peroxidase-konjugierter Kaninchen-anti-Maus-Antikörper) in einer Verdünnung von 1:1000, als Substrat wurde ABTS verwendet. Die Auswertung des Farbumschlags erfolgte per Augenmaß.

Zur Bestimmung der spezifischen Aktivität und der Hintergrundstrahlung des iodierten Antikörpers wurden verkürzte Internalisierungsexperimente (siehe 2.5.4) ohne vorherige Stimulation der Zellen durchgeführt. Dazu wurden in einer 24-Loch Platte in die Hälfte der Näpfe RBL-2H3 Zellen plattiert, in die andere Hälfte Zellen, die den spezifischen Rezeptor, gegen den der iodierte Antikörper gerichtet war, exprimierten. Vom iodierten Antikörper wurde dann eine 1:2 Reihenverdünnung von 1:20 bis 1:640

angefertigt und die plattierten Zellen wurden in Doppelbestimmung mit den einzelnen Antikörperverdünnungen inkubiert und wie unter 2.5.4 beschrieben dreimal mit BM gewaschen. Nach der Aktivitätsbestimmung im Wallac Counter wurde eine ausreichend hohe Aktivität gewählt, bei der die unspezifische Bindung des Antikörpers auf RBL-2H3-Zellen aber maximal 10 % der Gesamtaktivität ausmachte.

Zusätzlich wurde ein weiteres Kontrollexperiment mit unstimulierten, rezeptortragenden Zellen durchgeführt, bei dem analog zu 2.5.4 die Abwaschbarkeit des oberflächengebundenen Antikörpers bei pH 2,3 überprüft wurde.

2.5.4 Nachweis der Rezeptor-Internalisierung mit ^{125}I -markierten Antikörpern

Zur Bestimmung der Rezeptorinternalisierung nach homologer oder heterologer Stimulation wird die Expression des Rezeptors nach Stimulation durch Inkubation mit dem radioaktiv markierten Antikörper ermittelt. Dazu werden die Zellen zunächst für unterschiedliche Zeitpunkte stimuliert, der Stimulus unter sauren pH-Bedingungen entfernt und die Zellen dann auf Eis mit radioaktivem Antikörper inkubiert.

Von jeder Zelllinie wurden je 6 Näpfe von 6 24-Loch Platten bis zu 80 % Konfluenz angezogen. Alle Näpfe wurden zunächst mit 1 ml BM (10 % 10x RPMI-1640 ohne Bicarbonat, 1 % 1 mM HEPES, pH 7,0, 0,2 % BSA, pH 7,3 – 7,4) gewaschen. Die Hälfte der Näpfe wurden dann mit 250 μl Stimulus in BM bei 37°C im Brutschrank inkubiert. Danach wurden die Platten auf Eis transferiert und zweimal für je 3 min mit EM (10 % 10x RPMI-1640 ohne Bicarbonat, 1 % 1 M MES, 0,2 % BSA, pH 2,3) und zweimal für 3 min mit BM gewaschen. Anschließend wurden die Platten mit 200 μl ^{125}I -markiertem Antikörper in geeigneter Konzentration (siehe 2.5.3.2) in BM für 90 min auf Eis auf einer Wippe inkubiert. Danach wurde ungebundener Antikörper durch dreimaliges Waschen mit 1 ml BM entfernt, und die Zellen wurden in je 400 μl 0,2 M NaOH aufgenommen. Die Zellen wurden mit einem scharfen Pipettenstrahl abgelöst und in Szintillationsröhrchen überführt. Die Proben wurden mit 4 ml Roti-Szint Szintillationsflüssigkeit aufgefüllt, und die Aktivität der Lysate wurde für je 3 min gemessen.

2.5.5 Nachweis der Rezeptor-Internalisierung mit ^{125}I -markierten Liganden

Zur Bestimmung der Rezeptorinternalisierung nach homologer Stimulation wird die Aufnahme von radioaktiv markiertem Stimulus in die Zellen bestimmt. Dazu läßt man den markierten Stimulus zunächst auf Eis an die Zellen binden, transferiert die Zellen

dann für definierte Zeit nach 37°C und bestimmt schließlich den prozentualen Anteil von säureresistenter und damit in die Zellen aufgenommener Radioaktivität im Vergleich zur zellassozierten Aktivität nicht-säurebehandelter Zellen. Diese Methode birgt den Vorteil, daß hier nur die Rezeptoren in das Ergebnis einfließen, die von vornherein Ligand gebunden haben. Außerdem lassen sich bei dieser Methode besonders die frühen Internalisierungsereignisse festhalten.

Von jeder Zelllinie wurden je 6 Näpfe von 4 24-Loch Platten bis zu 80 % Konfluenz angezogen. Die Platten wurden auf Eis transferiert und mit 1 ml vorgekühltem BM (10 % 10x RPMI-1640 ohne Bicarbonat, 1 % 1 mM HEPES, pH 7,0, 0,2 % BSA, pH 7,3 – 7,4) gewaschen. Das Medium wurde abgesaugt und die Zellen wurden mit 200 µl ¹²⁵I-markiertem Chemokin (1:200 in BM) für 90 min bei 4°C auf einer Wippe inkubiert. Anschließend wurde das Medium abgesaugt und ungebundener Stimulus durch einmaliges Waschen mit 1 ml eiskaltem BM entfernt. Dann wurden die Zellen mit 1 ml vorgewärmtem BM versetzt und für 0, 3, 10 oder 30 min bei 37°C im Brutschrank inkubiert. Zum Abstoppen der Internalisierung wurden die Platten auf Eis überführt und das Medium abgesaugt. Die Hälfte der Näpfe wurde dann zweimal für je 3 min mit 1 ml vorgekühltem EM (10 % 10x RPMI-1640 ohne Bicarbonat, 1 % 1 M MES, 0,2 % BSA, pH 2,5) gewaschen, die andere Hälfte zweimal mit je 1 ml vorgekühltem BM. Danach wurden alle Näpfe ein weiteres mal mit 1 ml BM gewaschen, trockengesaugt und mit 400 µl 0,2 M NaOH versetzt. Die Zellen wurden mit einem scharfen Pipettenstrahl abgelöst und in ein Szintillationsröhrchen überführt. Die Proben wurden mit 4 ml Roti-Szint Szintillationsflüssigkeit aufgefüllt, und die Aktivität der Lysate wurde für je 3 min gemessen.

III. Ergebnisse

1. Strukturelle Voraussetzungen und funktionelle Konsequenzen der β -Arrestin-Bindung an CCR5

Nach RANTES-Stimulation wird der CC-Chemokin-Rezeptor 5 an vier im C-terminalen Rezeptorschwanz gelegenen Serinen phosphoryliert. Diese Serine stellen die einzigen Phosphorylierungsstellen dar (OPPERMANN *et al.*, 1999).

1.1 Bedeutung der vier C-terminalen Serine des CCR5 für die β -Arrestin-Bindung, Internalisierung und Desensibilisierung des Rezeptors

Um die Bedeutung der einzelnen Serin-Phosphorylierungsstellen für β -Arrestin-Bindung, Internalisierung und Desensibilisierung des CCR5 zu untersuchen, wurden verschiedene CCR5-cDNA-Konstrukte, in denen die vier Serine in unterschiedlichen Positionen gegen Alanin substituiert waren, stabil in RBL-2H3 Zellen exprimiert, und es wurde die Rezeptoraktivität bestimmt.

1.1.1 Herstellung und Expression der RBL-CCR5-S/A-Zellreihen

Für die Herstellung stabil transfizierter RBL-Zellreihen wurde die Elektroporationsmethode gewählt. Dabei wurden die verschiedenen CCR5-Ser/Ala-pEFBos-Konstrukte zusammen mit dem G418-Resistenzplasmid hPR-neo in RBL-2H3-Zellen eingebracht. Die nach etwa zwei Wochen unter Selektionsbedingungen herangewachsenen Klone wurden mittels FACS-Analyse mit dem CCR5-spezifischen Antikörper T21 auf ihre Rezeptorexpression getestet und mindestens einmal subkloniert, um eine Kontamination mit nicht exprimierenden Zellen auszuschließen. Von jeder Rezeptormutante wurden wenigstens zwei unabhängige Zellreihen hergestellt und funktionell charakterisiert, um klonale Artefakte zu vermeiden. Die Herstellung der RBL-CCR5-Zellreihen erfolgte in Zusammenarbeit mit Frau Dr. med. Antje Nitzki.

Die Tabelle 3 enthält eine Auflistung der hergestellten RBL-Zellreihen. Die Spalte Mutation gibt die Position des durch Alanin substituierten C-terminalen Serins an. Die Rezeptorexpression im FACS wird als „mean channel of fluorescence“ (MCF) angegeben. Die Rezeptoraktivität wird durch die im Glucosaminidase-Freisetzungstest bestimmte halbmaximale Aktivität EC₅₀ mit der Einheit [nM RANTES] angegeben.

Tab. 3: CCR5-Expression der stabil transfizierten RBL-CCR5-S/A-Zellreihen

Rezeptor (Klon)	Mutation	MCF	EC50
CCR5-WT	-	52,9	5,2
CCR5- Δ 1A (#5)	S349A	17,6	7,2
CCR5- Δ 1B (#2)	S337A	46,0	23,7
CCR5- Δ 1C (#3)	S342A	44,4	19,6
CCR5- Δ 2A (#6)	S336A / S337A	47,7	4,5
CCR5- Δ 2B (#16)	S336A / S342A	53,4	25,7
CCR5- Δ 2C (#8)	S336A / S349A	50,3	20,9
CCR5- Δ 3A (#23)	S337A / S342A / S349A	6,3	16,5
CCR5- Δ 3B (#29)	S336A / S342A / S349A	72,4	14,6
CCR5- Δ 3C (#13)	S336A / S337A / S342A	24,8	16,4
CCR5- Δ 3D (#15)	S336A / S337A / S349A	50,9	16,2
CCR5- Δ 4 (#20)	S336A / S337A / S342A / S349A	40,0	13,4

Die Spalten 1 und 2 geben die Bezeichnung der CCR5-Rezeptormutanten und die Positionen der Serin-Alanin-Substitutionen an. Die Rezeptorexpression der stabil hergestellten Zellreihen wurde mittels FACS mit dem monoklonalen Primärantikörper T21, welcher gegen den CCR5-Aminoterminal gerichtet ist, und dem Sekundärantikörper Kaninchen-anti-Maus-FITC überprüft und ist als MCF (mean channel of fluorescence) angegeben. Die Rezeptoraktivität der Zellreihen wurde im NAGA bestimmt und ist als halbmaximale Aktivität EC50 [nM RANTES] angegeben. Alle Werte stellen den Mittelwert aus mindestens drei unabhängigen Messungen dar.

Um die Aktivität der einzelnen Rezeptormutanten miteinander vergleichen zu können, ist eine ausreichende und im Idealfall gleich hohe Rezeptorexpression Voraussetzung. Man sieht in der Tabelle 3, daß die meisten der RBL-Zellreihen eine Rezeptorexpression zeigten, die der des CCR5-Wildtyps (WT) mit einem MCF von 52,9 ähnelten. Die Mutanten CCR5- Δ 1A, CCR5- Δ 3A und CCR5- Δ 3C wiesen mit einem MCF von 17,6, 6,3 und 24,8 eine im Vergleich geringere Rezeptorexpression auf, die Mutante CCR5- Δ 3B zeigte mit einem MCF von 72,4 eine erhöhte Rezeptorexpression. Die gemessene Rezeptorexpression in nicht transfizierten RBL-2H3-Zellen betrug 0,5. Die halbmaximalen Aktivitäten (EC50) zwischen 4,5 und 25,7 nM RANTES zeigten, daß alle Rezeptoren funktionell aktiv waren.

1.1.2 Charakterisierung der β -Arrestin Bindung an den CCR5-C-Terminus

β -Arrestin liegt bei unstimulierten RBL-Zellen gleichmäßig verteilt im Cytoplasma vor. Nach Stimulation CCR5-exprimierender Zellen mit RANTES transloziert β -Arrestin an den phosphorylierten Rezeptor und trägt durch Verdrängung der G-Proteine zur Desensibilisierung und Internalisierung des Rezeptors bei. Durch Fluoreszenz-Resonanz-Energie-Transfer-Untersuchungen (FRET) konnte gezeigt werden, daß die β -Arrestin-Bindung abhängig von phosphorylierten Serinen ist, da die vollständig phosphorylierungsdefiziente CCR5- Δ 4-Mutante kein β -Arrestin bindet (KRAFT *et al.*, 2001). Ziel der nachfolgend geschilderten Experimente war es, die strukturellen Voraussetzungen der β -Arrestin-Bindung an CCR5 im Hinblick auf die Bedeutung der C-terminalen Serin-Phosphorylierungsstellen näher zu charakterisieren.

1.1.2.1 Zeit- und Dosis-abhängige β -Arrestin-Bindung an den CCR5-WT-Rezeptor

Bevor die β -Arrestin-Bindung an die einzelnen Rezeptormutanten untersucht wurde, wurde zunächst die β -Arrestin-Bindung an den WT-CCR5 näher charakterisiert. Hierbei wurde der indirekte Nachweis über die Membranaufreinigung gewählt. Dazu wurden die Zellen stimuliert, lysiert und die Membran- und Cytosolfraktion über einen Sucrosegradienten isoliert. Anschließend erfolgte die Auftrennung der Proteine im SDS-Gel und der Proteintransfer auf eine Nitrozellulosemembran mittels Immunoblot. Die Detektion des β -Arrestins erfolgte mit dem kommerziellen anti- β -Arrestin-1 Antikörper, der eine signifikante Kreuzreaktion mit β -Arrestin-2 zeigt (Abb. 11). Als Sekundärantikörper wurde ein Peroxidase-konjugierter Kaninchen-anti-Maus Antikörper verwendet, der sich anschließende Lumineszenz-Nachweis des ECL-Systems wurde auf einem Photofilm visualisiert.

Um zu zeigen, daß die β -Arrestin-Translokation an die Membran ausschließlich durch die Bindung an CCR5 katalysiert wird, wurden RBL-CCR5-Zellen und nicht transfizierte RBL-2H3-Zellen für 3 min mit 10 nM RANTES oder mit 200 nM des PKC-Aktivators PMA stimuliert, und es wurde die β -Arrestin-Translokation an die Membran gemessen. Man sieht in der Abbildung 10 A, daß eine RANTES-Stimulation des CCR5 zu einem etwa fünffachen Anstieg membrangebundenen β -Arrestins führte. Diese β -Arrestin-Translokation hatte den Ligand-aktivierten CCR5 zur Voraussetzung, da weder eine Phosphorylierung des CCR5 durch PMA noch die RANTES-Stimulation

der nicht transfizierten RBL-2H3-Zellen eine β -Arrestin-Translokation an die Membran induzieren konnten.

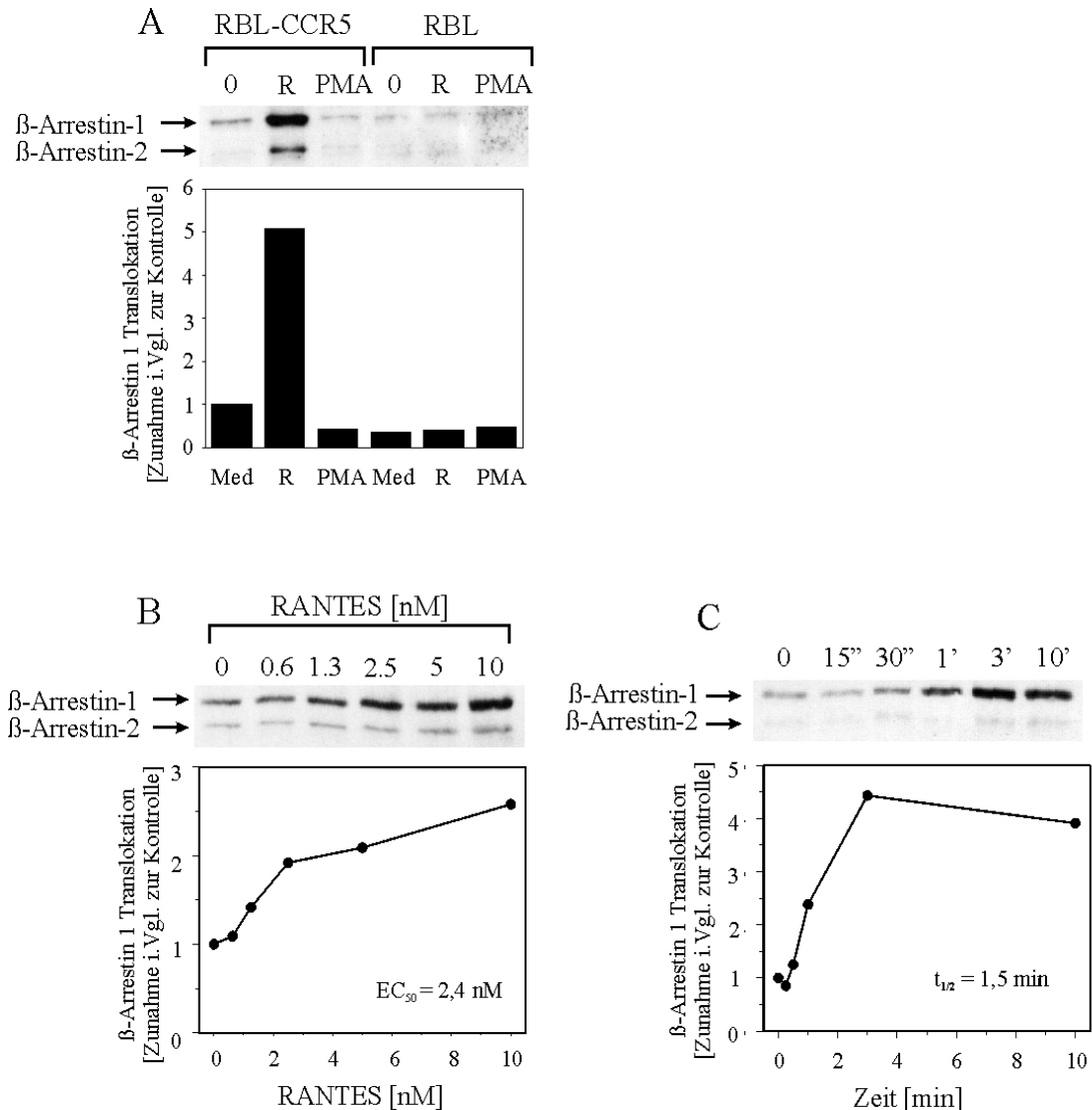


Abb. 10: β -Arrestin-Translokation an die Membran von RBL-CCR5-Zellen

A: RBL-CCR5- und nicht transfizierte RBL-2H3-Zellen wurden für 3 min mit Medium, 10 nM RANTES oder 200 nM PMA inkubiert, und es wurde die β -Arrestin-Translokation an die Membran nachgewiesen. Dazu wurde die Membran der lysierten Zellen mit einem Sucrosegradienten isoliert, mittels eines SDS-Gels aufgetrennt und auf eine Nitrozellulosemembran transferiert. Der Nachweis erfolgte mit dem anti- β -Arrestin-1-Antikörper (1:500) und dem sekundären Peroxidase-konjugierten Kaninchen-anti-Maus-Antikörper (1:2000). Die densitometrische Quantifizierung des ECL-Signals erfolgte mit der ImageMaster TotalLab Software.

B: RBL-CCR5-Zellen wurden für 3 min mit verschiedenen RANTES-Konzentrationen stimuliert, und die β -Arrestin-Translokation an die Membran wurde wie unter A bestimmt.

C: RBL-CCR5-Zellen wurden mit 10 nM RANTES für unterschiedliche Zeitpunkte stimuliert, und der Anstieg an β -Arrestin in der Membranfraktion wurde wie unter A quantifiziert.

A-C: Alle Ergebnisse sind repräsentativ für jeweils drei Versuche mit gleichem Ergebnis.

Die Abbildung 10 B zeigt die konzentrationsabhängige β -Arrestin-Translokation an die Membran. Man sieht, daß bereits ab einer Konzentration von 1,3 nM RANTES eine signifikante Menge an β -Arrestin an die Membran rekrutiert wurde, die halbmaximale β -Arrestin-Bindung lag bei 2,4 nM RANTES. Bei der zeitabhängigen Stimulation der RBL-CCR5-Zellen mit 10 nM RANTES konnte eine maximale β -Arrestin-Translokation nach etwa 3 min beobachtet werden (Abb. 10 C).

Zur Analyse der Spezifität des anti- β -Arrestin-1 Antikörpers wurden HEK-293-Zellen mit β -Arrestin-1-, β -Arrestin-2-cDNA oder einem Gemisch aus beiden DNAs transient transfiziert. Die Zellen wurden lysiert und die Proteine im SDS-Gel aufgetrennt. Nach dem Elektrotransfer wurde β -Arrestin wie oben detektiert. Es zeigte sich (Abb. 11), daß der anti- β -Arrestin-1 Antikörper beide Isoformen β -Arrestin-1 und -2 erkennt und daß die untere Bande nicht lediglich ein Spaltprodukt von β -Arrestin-1 darstellt.

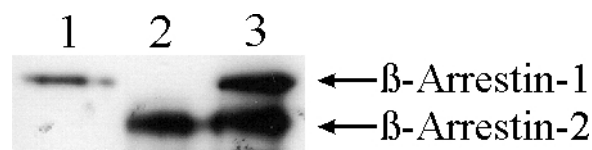


Abb. 11: β -Arrestin-1/2-Kreuzreaktivität des anti- β -Arrestin-1 Antikörpers

HEK-293-Zellen wurden transient mit 1) β -Arrestin-1-cDNA, 2) β -Arrestin-2-cDNA oder 3) einem Gemisch aus beiden cDNAs transfiziert. Der Nachweis von β -Arrestin erfolgte nach SDS-PAGE und Immunoblot mit dem Primärantikörper anti- β -Arrestin-1 (1:500) und dem sekundären Peroxidase-konjugierten Kaninchen-anti-Maus-Antikörper (1:2000). Die ECL-Reaktion wurde auf einem Photo-Film dokumentiert.

1.1.2.2 Bedeutung der Anzahl und Position der C-terminalen Serine für die β -Arrestin-Bindung an CCR5

Um die Bedeutung einzelner Serin-Phosphorylierungsstellen für die β -Arrestin-Bindung zu untersuchen, wurden die CCR5-WT und CCR5-S/A exprimierenden RBL-Zellen in Medium inkubiert oder für 3 min mit 10 nM RANTES stimuliert, und es wurde, wie unter Ergebnispunkt 1.1.2.1 beschrieben, die β -Arrestin-Translokation an die Membran nachgewiesen.

In der Abbildung 12 sind sowohl die Membran- als auch die Cytosolfractionen der RBL-CCR5-Mutanten in An- oder Abwesenheit des Stimulus dargestellt. Man erkennt, daß die RBL-CCR5-WT-Mutante nach RANTES-Stimulation eine deutliche

Translokation von β -Arrestin an die Membran zeigte. Die Konzentration des β -Arrestins in der Cytosolfraction verringerte sich dabei nicht merklich.

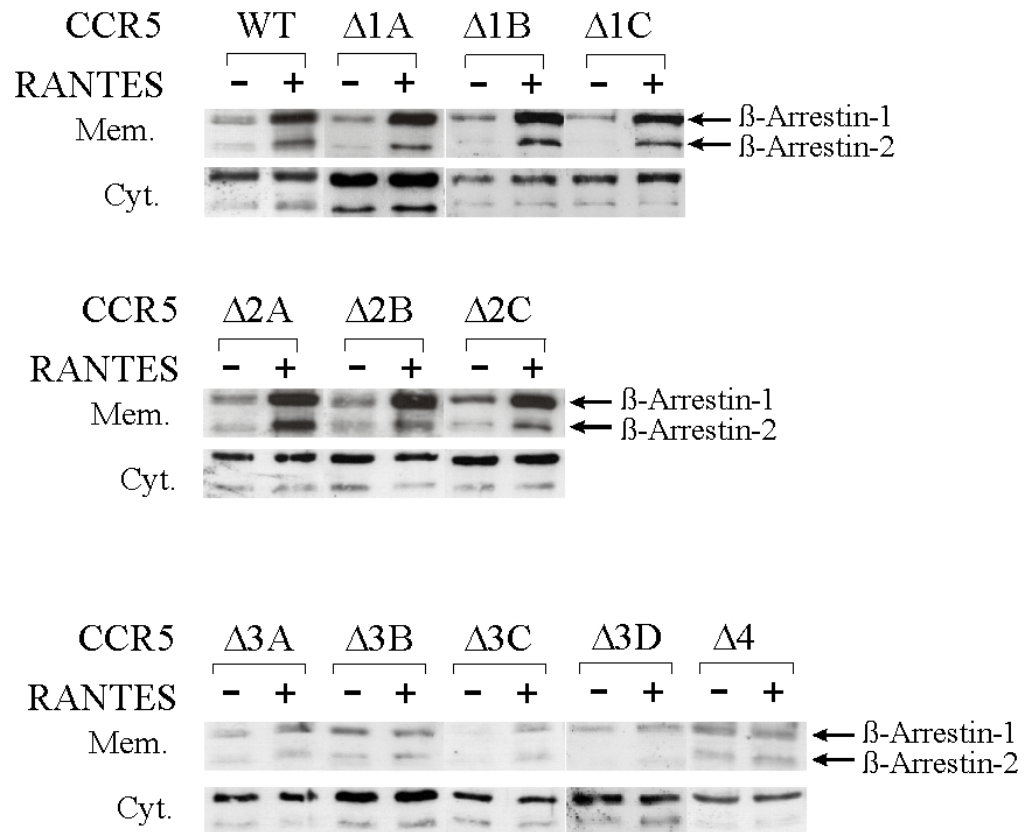


Abb. 12: β -Arrestin-Translokation in RBL-CCR5-S/A-Mutanten

Die RBL-CCR5-WT- und -S/A-Mutanten wurden für 3 min ohne oder mit 10 nM RANTES inkubiert, und die Membran (Mem.)- und Cytosolfractionen (Cyt.) wurden über einen Sucrosegradienten aufgereinigt. Die Proteine wurden auf einem SDS-Gel aufgetrennt, mittels Elektrotransfer auf eine Nitrozellulosemembran übertragen, und das β -Arrestin wurde mit dem Anti- β -Arrestin-1-Antikörper (1:500) und sekundären Peroxidase-konjugierten Kaninchen-anti-Maus-Antikörper (1:2000) markiert. Das ECL-Signal wurde auf einem Photo-Film detektiert. Die gezeigten Banden sind repräsentativ für mindestens drei unabhängige Versuche gleichen Ergebnisses.

Alle RBL-CCR5-S/A-Mutanten, bei denen ein oder zwei Serine in beliebiger Kombination gegen Alanin ausgetauscht wurden, wiesen nach RANTES-Stimulation eine signifikante β -Arrestin-Translokation an die Membran auf, die mit der des CCR5-WT zu vergleichen war. Bei den RBL-CCR5-S/A-Mutanten, die einen Austausch von beliebigen drei oder gar allen vier Serinen gegen Alanin aufwiesen, konnte keine oder nur eine stark verminderte β -Arrestin-Rekrutierung an die Membran beobachtet werden (Abb. 12). Somit läßt sich postulieren, daß für die β -Arrestin-Bindung an CCR5 zwei

intakte Serin-Phosphorylierungsstellen notwendig sind, wobei die genaue Position dieser Serine unerheblich ist.

1.1.3 Bedeutung der Anzahl und Position der C-terminalen Serine für die CCR5-Internalisierung

Für die Internalisierung des CCR5 nach Ligand-Stimulation wird zur Zeit die Beteiligung zweier verschiedener intrazellulärer Transportwege diskutiert. Zum einen rekrutiert das an den phosphorylierten Rezeptor gebundene β -Arrestin die Komponenten der Clathrin-umhüllten Vesikel an den Rezeptor und führt zu dessen Endozytose (Übersicht in LUTTRELL *et al.*, 2002). In einem weiteren, β -Arrestin-unabhängigen Internalisierungsweg werden die Rezeptoren abhängig von Cholesterin in Caveolae assoziiert und in das Zellinnere aufgenommen (MUELLER *et al.*, 2002). Weiterhin konnte gezeigt werden, daß die phosphorylierungsdefiziente RBL-CCR5- Δ 4-Mutante einen Defekt in der schnellen Rezeptorinternalisierung zeigt (KRAFT *et al.*, 2001).

Um die Bedeutung der einzelnen C-terminalen CCR5-Serine für die Internalisierung des Rezeptors zu klären, wurden die RBL-CCR5-WT und die RBL-CCR5-S/A-Mutanten mit iodiertem Stimulus auf Eis vorinkubiert und danach für verschiedene Zeitpunkte nach 37°C überführt. Die Internalisierung der Rezeptoren wurde bestimmt aus der in die Zellen aufgenommene, säureresistenten Aktivität im Vergleich zur Gesamtaktivität nicht säurebehandelter Zellen.

In der Abbildung 13 ist die prozentuale Internalisierung des radioaktiv markierten Stimulus RANTES in den einzelnen RBL-CCR5-Mutanten aufgeführt. Man erkennt, daß beim CCR5-WT-Rezeptor nach 3 min schon etwa 55 % des Stimulus ins Zellinnere aufgenommen worden waren und nach 10 min eine nahezu maximale Internalisierung mit etwa 80 % erreicht war. Im Vergleich dazu zeigte die phosphorylierungsdefiziente RBL-CCR5- Δ 4-Mutante mit Austausch aller vier Serine gegen Alanin eine stark verzögerte Internalisierung. Hier waren nach 3 min lediglich etwa 5 % und nach 10 min etwa 35 % des Stimulus internalisiert. Die RBL-CCR5-S/A-Mutanten mit dem Austausch von ein oder zwei Serinen gegen Alanin zeigten ein Internalisierungsverhalten, das dem des CCR5-WT stark ähnelte. Hier fand sich eine prozentuale Internalisierung zwischen 40 % und 58 % nach 3 min und ebenfalls eine nahezu maximale Internalisierung nach 10 min. Die RBL-CCR5-S/A-Mutanten mit Austausch von beliebigen drei Serinen gegen Alanin zeigten dagegen ein in der schnellen

Internalisierung defektes Verhalten wie die komplett phosphorylierungsdefiziente RBL-CCR5- $\Delta 4$ -Mutante. Hier fand sich nach 3 min eine RANTES-Internalisierung von maximal 10 %, nach 10 min waren bei allen CCR5- $\Delta 3$ -Mutanten zwischen 35 % und 40 % des Stimulus internalisiert.

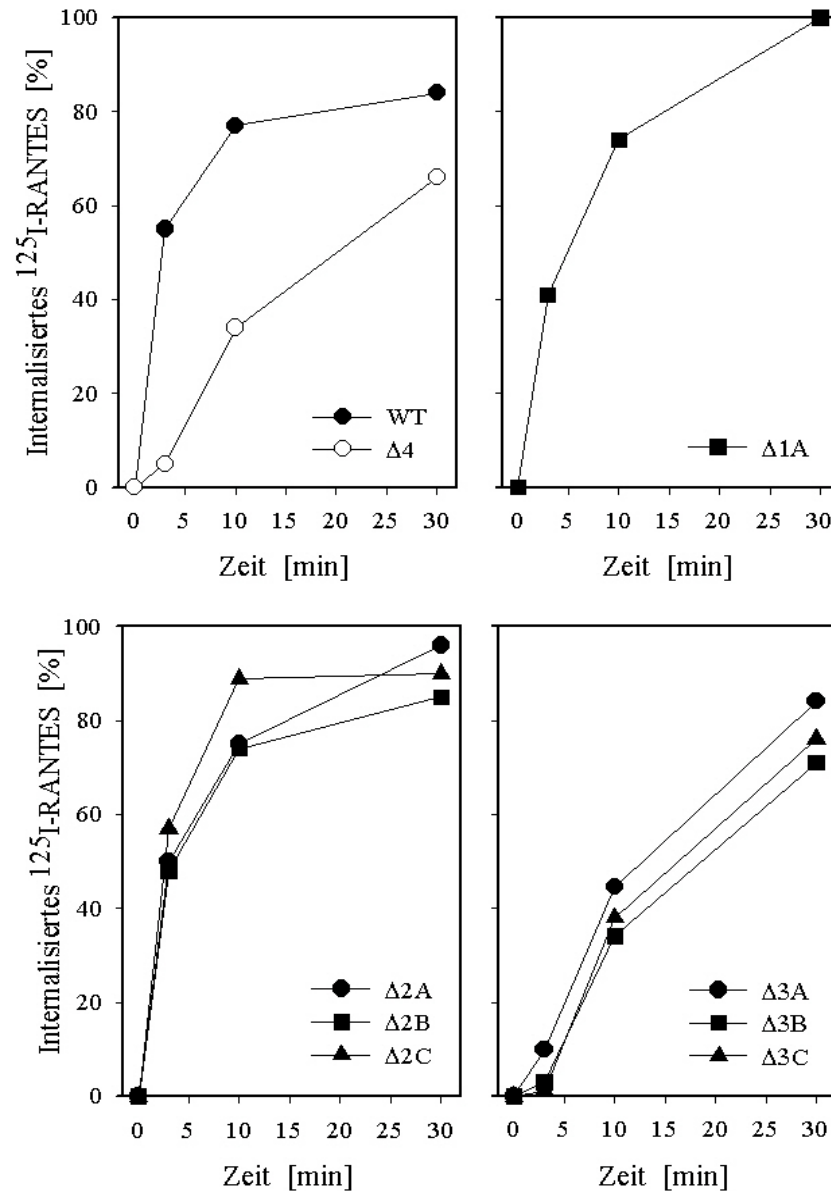


Abb. 13: Internalisierung der RBL-CCR5-S/A-Mutanten

Die RBL-CCR5-WT- und -CCR5-S/A-Mutanten wurden für 90 min mit ^{125}I -RANTES auf Eis vorinkubiert, gewaschen und für unterschiedliche Zeitpunkte nach 37°C transferiert. Die Internalisierung ergibt sich aus dem Anteil säureresistenter Aktivität dividiert durch die insgesamt zellassoziierte Aktivität der Zellen nach Abzug der unspezifischen Ligandbindung. Die gezeigten Ergebnisse entsprechen Mittelwerten aus zwei unabhängigen Messungen in dreifacher Ausführung. Die Standardabweichung lag unter 15 %.

Für den schnellen Internalisierungsprozeß scheinen demnach wie bei der β -Arrestin-Bindung auch hier zwei Serine Voraussetzung zu sein, wobei die genaue Position dieser Serine nicht von Bedeutung ist.

1.1.4 Bedeutung der Anzahl und Position der C-terminalen Serine für die Desensibilisierung des CCR5

Die Stimulation des CCR5 mit seinem Liganden RANTES führt zur Interaktion des Rezeptors mit membranassoziierten G-Proteinen, die ihrerseits eine Reihe von Signalwegen aktivieren. So wird über die membranständige Phospholipase C die Ausschüttung von Calciumionen aus intrazellulären Speichern katalysiert, gleichzeitig aber auch die Proteinkinase C aktiviert, die zusammen mit der G-Protein-gekoppelten Rezeptor Kinase (GRK) den stimulierten Rezeptor phosphoryliert. Die Phosphorylierung ermöglicht die Bindung von β -Arrestin an den Rezeptor, das seinerseits die G-Proteine vom Rezeptor verdrängt und somit die Agonist-induzierte Rezeptor-Desensibilisierung einleitet. Es konnte gezeigt werden, daß die phosphorylierungsdefiziente CCR5- $\Delta 4$ -Mutante einen Defekt in der Agonist-induzierten Rezeptor-Desensibilisierung aufweist, da der Rezeptor ohne intakte β -Arrestin-Bindung über einen verlängerten Zeitraum in einer aktiven Konformation vorliegt (KRAFT *et al.*, 2001).

Um den Einfluß der einzelnen C-terminalen Serin-Phosphorylierungsstellen auf die Rezeptor-Desensibilisierung zu überprüfen, wurden die verschiedenen CCR5-S/A-Mutanten auf ihre Fähigkeit zur Desensibilisierung untersucht. Als Parameter diente zum einen die Calciumionen-Freisetzung nach Stimulation der RBL-CCR5-Mutanten mit 40 nM RANTES, bei der die Zeitkonstante τ proportional zu der Zeit war, in der der Rezeptor in einer aktiven, nicht desensibilisierten Konformation vorlag. Zum anderen wurde die Freisetzung des lysosomalen Enzyms N-Acetyl- β -D-Glucosaminidase (NAGA) quantifiziert, dessen prozentuale Freisetzung ebenfalls mit dem Zeitraum der aktivierten Rezeptorkonformation korrelierte. Desweiteren diente die NAGA-Freisetzung der Bestimmung der Rezeptoraktivität (EC50), welche die Konzentration an Stimulus angibt, bei der der Rezeptor seine halbmaximale Aktivität erreichte.

Die Ergebnisse dieser Rezeptor-Desensibilisierungsversuche sind in der Tabelle 4 zusammengefaßt. Die halbmaximale Aktivität (EC50) der unterschiedlichen CCR5-Rezeptor-Mutanten lag zwischen 4,5 und 25,7 nM RANTES, so daß bei allen Mutanten von einer intakten Rezeptorfunktion ausgegangen werden konnte.

Man erkennt, daß die RBL-CCR5- Δ 1-Mutanten mit Austausch eines Serins gegen Alanin weder in der NAGA- noch in der Calciumionen-Freisetzung eine signifikant verlängerte Rezeptordesensibilisierung zeigten. Im Gegenteil wies die RBL-CCR5- Δ 1A-Mutante mit Austausch des Serins 349 sogar ein um den Faktor drei verringertes NAGA-Maximum (9,5 %) im Vergleich zum CCR5-WT (27,1 %) auf. Die Calcium-Zeitkonstante τ unterschied sich dagegen mit 11,7 sec nicht signifikant von der des CCR5-WT mit 14,8 sec.

Tab. 4: Desensibilisierung der RBL-CCR5-S/A-Mutanten

Rezeptor	NAGA EC50 [nM]	NAGA Maximum [%]	Calcium τ [sec]
CCR5-WT	5,2	27,1 +/- 2,4	14,8 +/- 4,6
CCR5- Δ 1A	7,2	9,5 +/- 5,2	11,7 +/- 3,9
CCR5- Δ 1B	23,7	29,4 +/- 3,5	19,3 +/- 3,8
CCR5- Δ 1C	19,6	31,3 +/- 5,2	18,8 +/- 7,0
CCR5- Δ 2A	4,5	29,3 +/- 3,8	16,6 +/- 6,3
CCR5- Δ 2B	25,7	47,8 +/- 11,7	25,2 +/- 3,7
CCR5- Δ 2C	20,9	46,2 +/- 4,8	40,2 +/- 7,2
CCR5- Δ 3A	16,5	34,8 +/- 2,5	32,8 +/- 0,4
CCR5- Δ 3C	16,4	59,3 +/- 7,7	33,8 +/- 8,1
CCR5- Δ 3D	16,2	40,5 +/- 6,8	30,4 +/- 4,7
CCR5- Δ 4	13,4	55,0 +/- 2,0	41,6 +/- 2,7

RBL-CCR5-WT- und -S/A-Mutanten wurden für 3 min mit unterschiedlichen Konzentrationen an RANTES stimuliert, und es wurde die Glucosaminidase-Freisetzung der Zellen gemessen. EC50 gibt die RANTES-Konzentration an, bei welcher der Rezeptor seine halbmaximale Aktivität zeigte. Das NAGA-Maximum gibt Auskunft über die prozentuale Enzymfreisetzung verglichen mit Zellen, bei denen durch Triton-Lyse sämtliches Enzym freigesetzt wurde. Die Calcium-Zeitkonstante τ wurde aus dem Verlauf der intrazellulären Calciumfreisetzung nach Stimulation der Zellen mit 40 nM RANTES ermittelt und korreliert mit der Zeit, in der der Rezeptor in einer aktiven, nicht desensibilisierten Konformation vorlag. Die gezeigten Werte entsprechen Mittelwerten mit Standardabweichung aus mindestens drei unabhängigen Messungen.

Die RBL-CCR5- Δ 2-Mutanten mit Austausch von zwei Serinen gegen Alanin zeigten im Gegensatz zur β -Arrestin-Bindung und Internalisierung kein einheitliches Desensibilisierungsmuster. Während die RBL-CCR5- Δ 2A-Mutante mit Austausch der

Serine 336 und 337 weder eine im Vergleich zum CCR5-WT erhöhte NAGA-Freisetzung (29,3 %) noch eine verlängerte Calcium-Zeitkonstante (16,6 sec) zeigte, wiesen die RBL-CCR5- Δ 2B- und Δ 2C-Mutanten mit Austausch der Serine 336 und 342 bzw. Serine 336 und 349 eine signifikant erhöhte NAGA-Freisetzung auf (47,8 % bzw. 46,2 %). Beide Mutanten zeigten außerdem eine verlängerte Calcium-Freisetzung, die bei der CCR5- Δ 2B-Mutante weniger stark ausgeprägt war (25,2 sec) als bei der CCR5- Δ 2C-Mutante (40,2 sec). Die Unterschiede im zeitlichen Verlauf der Calciumionen-Freisetzung der RBL-CCR5- Δ 2-Mutanten ist in der Abbildung 14 B dargestellt. Man erkennt, daß die RBL-CCR5- Δ 2C-Mutante eine deutliche verlängerte Calcium-Freisetzung und somit eine erhöhte Zeitkonstante τ zeigte.

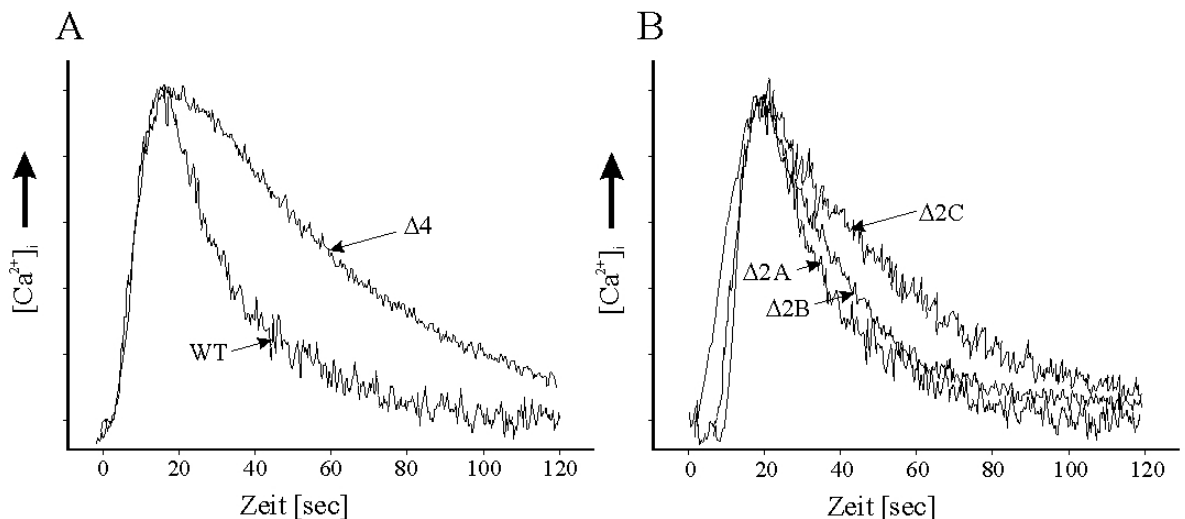


Abb. 14: Verlauf der Calciumionen-Freisetzung in RBL-CCR5-S/A-Mutanten

RBL-CCR5-WT- und -CCR5-S/A-Mutanten wurden mit 40 nM RANTES stimuliert, und es wurde der Verlauf der intrazellulären Calciumionen-Freisetzung aufgezeichnet. Die jeweiligen Verläufe sind repräsentativ für mindestens drei unabhängige Experimente.

Die Tabelle 4 macht weiterhin deutlich, daß alle RBL-CCR5- Δ 3-Mutanten mit Austausch beliebiger drei Serine gegen Alanin sowohl eine erhöhte NAGA-Freisetzung, mit Werten zwischen 34,8 % und 59,3 %, als auch eine verlängerte Calcium-Freisetzung (τ zwischen 30,4 sec und 33,8 sec) aufwiesen. Die RBL-CCR5- Δ 4-Mutante mit Austausch aller vier Serine gegen Alanin zeigte eine maximale NAGA-Freisetzung von 55,0 % und eine verlängerte Calciumionen-Freisetzung von 41,6 sec, die in der Abbildung 14 A im Vergleich zu der des CCR5-WT aufgetragen ist.

Zusammenfassend wird deutlich, daß die CCR5-Desensibilisierung nicht wie die β -Arrestin-Bindung und Internalisierung lediglich abhängig ist von der Anzahl sondern offenbar auch von der genauen Position der intakten Serin-Phosphorylierungsstellen des CCR5.

1.2 Charakterisierung der β -Arrestin-Bindung an das CCR5-DRY-Motiv

Um die Bindung von β -Arrestin an den CC-Chemokin Rezeptor 5 genauer zu charakterisieren und neben den C-terminal lokalisierten Serin-Phosphorylierungsstellen weitere mögliche Bindestellen des β -Arrestins an den Rezeptor aufzudecken, wurden in Kooperation mit Herrn PD Dr. Stefan Höning (Abteilung Biochemie II) SPR- („surface plasmon resonance“) Bindungsanalysen durchgeführt. Dabei zeigte sich, daß rekombinant exprimiertes β -Arrestin neben dem CCR5-C-Terminus noch eine zweite Bindestelle auf dem CCR5 besitzt (HÜTTENRAUCH *et al.*, 2002). Diese ist am Beginn der zweiten cytoplasmatischen Schleife des CCR5 lokalisiert (Abb. 15) und beschränkt sich auf die drei Aminosäuren Asp-Arg-Tyr, die das sogenannte DRY-Motiv bilden, welches in GPCRs eine hoch konservierte Bindungsstelle für heterotrimere G-Protein-Untereinheiten darstellt.

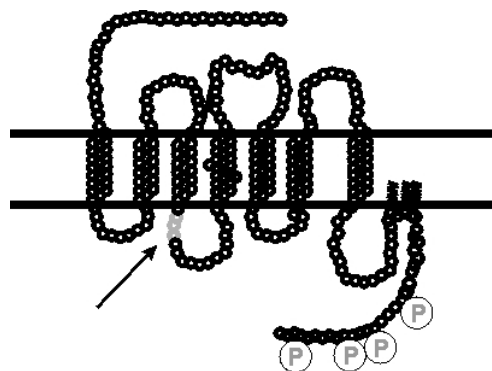


Abb. 15: Lokalisation des CCR5-DRY-Motivs

Gezeigt ist der schematische Aufbau des CCR5. An die Serin-Phosphorylierungsstellen wurden optisch Phosphatgruppen angehängt, der Pfeil weist auf die Lokalisation des CCR5-DRY-Motivs am Beginn der zweiten cytoplasmatischen Schleife hin.

1.2.1 Herstellung und Aktivität der RBL-CCR5-DR/NN-Mutante

Um die Bedeutung des DRY-Motivs für die β -Arrestin-Bindung und CCR5-Internalisierung zu prüfen, wurden RBL-2H3-Zellen stabil mit einer CCR5-DR/NN-Mutante transfiziert, bei der das Aspartat (D) 125 und das Arginin (R) 126 gegen Asparagin (N) mutagenisiert waren. Von dieser Mutante ist bekannt, daß sie einen Defekt in der intrazellulären Signalweiterleitung aufweist (FARZAN *et al.*, 1996). Die CCR5-DR/NN-pcDNA3-DNA wurde freundlicherweise von Craig Gerard (Harvard-University, Boston) zur Verfügung gestellt. Zur Expression in RBL-Zellen wurde das Rezeptorkonstrukt mit *XbaI* und *BamHI* aus dem Vektor pcDNA3 restrigiert und in das Expressionsplasmid pEF1-Myc-HIS-A inkloniert. Vor der stabilen Transfektion wurde die CCR5-DR/NN-pEF1-Myc-HIS-A DNA mit *PvuI* linearisiert und schließlich mittels Elektroporation in RBL-2H3-Zellen eingebracht.

Tab. 5: Expression und Aktivität der RBL-CCR5-DR/NN-Zellreihe

Klon	MCF	NAGA EC50 [nM]	NAGA max [%]
RBL-CCR5-DR/NN B34.20.5	40,1	-	2,1 +/- 0,4
RBL-CCR5	52,9	5,2	27,1 +/- 2,4

Gezeigt ist die Expression und Aktivität der RBL-CCR5-DR/NN-Mutante im Vergleich zur RBL-CCR5-WT-Zellreihe. MCF gibt die Expression der mit anti-CCR5- (T21) markierten Rezeptoren als „mean channel of fluorescence“ im FACS an. EC50 gibt die RANTES-Konzentration an, bei welcher der Rezeptor seine halbmaximale Glucosaminidase-Freisetzung zeigte. Das NAGA-Maximum gibt Auskunft über die prozentuale Glucosaminidase-Freisetzung verglichen mit Zellen, bei denen durch Triton-Lyse sämtliches Enzym freigesetzt wurde.

Die RBL-CCR5-DR/NN-Mutante zeigte im FACS mit einem MCF von 40,1 eine dem CCR5-WT vergleichbare Oberflächenexpression. Bei funktionellen Untersuchungen zeigte sich, daß die RBL-CCR5-DR/NN-Mutante nach Stimulation mit RANTES weder eine Calciumionen- (Abb. 16) noch eine Glucosaminidase-Freisetzung (Tab. 5) katalysierte. Die Phosphorylierung des CCR5-DR/NN konnte nicht bestimmt werden, da die Rezeptormutante keine Bindung an die C-terminal-spezifischen Antikörper E11, V14 oder RC-10 aufwies.

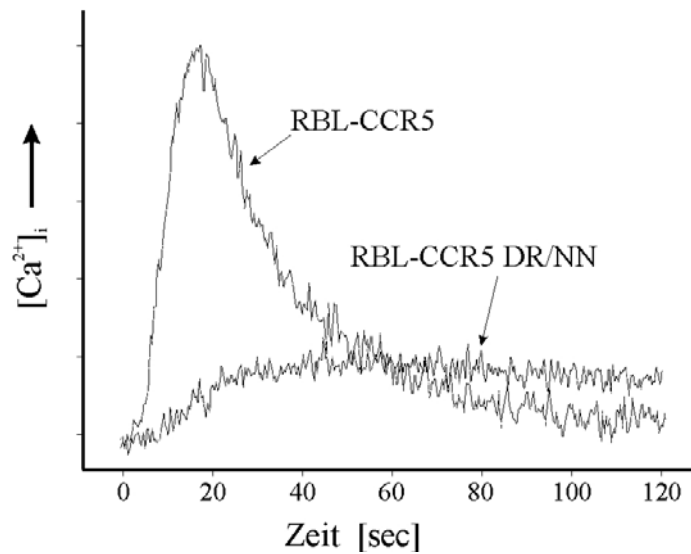


Abb. 16: Calciumionen-Freisetzung in RBL-CCR5- und RBL-CCR5-DR/NN-Zellen

RBL-CCR5- und RBL-CCR5-DR/NN-Zellen wurden mit dem Ca-Chelatbildner Fluo3-AM beladen, mit 40 nM RANTES stimuliert und es wurde die intrazelluläre Freisetzung von Calciumionen dokumentiert. Die Abbildung zeigt ein repräsentatives von drei Experimenten gleichen Ergebnisses.

1.2.2 Bedeutung des DRY-Motivs für die β -Arrestin-Bindung an CCR5

Um zu überprüfen, ob das CCR5-DRY-Motiv für die β -Arrestin-Bindung in intakten Zellen von Bedeutung ist, wurden RBL-CCR5- und RBL-CCR5-DR/NN-Zellen für 3 min mit Medium oder 20 nM RANTES inkubiert, und es wurde die β -Arrestin-Translokation an die Membran untersucht.

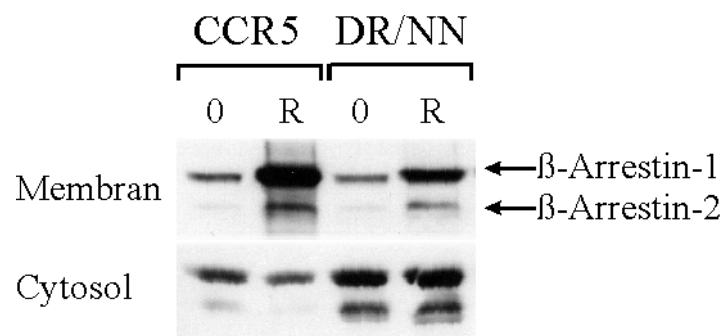


Abb. 17: β -Arrestin-Translokation in RBL-CCR5- und RBL-CCR5-DR/NN-Zellen

RBL-CCR5- und RBL-CCR5-DR/NN-Zellen wurden für 3 min ohne (0) oder mit 20 nM RANTES (R) stimuliert, und es wurde die β -Arrestin-Translokation an die Membran untersucht. Dazu wurden Membran und Cytosol der lysierten Zellen mit einem Sucrosegradienten isoliert, mittels SDS-Gel aufgetrennt und auf eine Nitrozellulosemembran transferiert. Der Nachweis erfolgte mit dem anti- β -Arrestin-1-Antikörper (1:500) und dem sekundären Peroxidase-

konjugierten Kaninchen-anti-Maus-Antikörper (1:2000). Gezeigt ist eines von zwei unabhängig voneinander durchgeführten Experimenten gleichen Ergebnisses.

Man sieht in der Abbildung 17, daß die RBL-CCR5-DR/NN-Mutante nach RANTES-Stimulation in der Lage war, β -Arrestin an die Membran zu translozieren, wobei die Menge an insgesamt gebundenem β -Arrestin geringer ausfiel als bei RBL-CCR5-Zellen.

Um die β -Arrestin-Bindung an die RBL-CCR5-DR/NN-Mutante genauer zu charakterisieren, wurde die konzentrations- und zeitabhängige β -Arrestin-Translokation an den CCR5-DR/NN-Rezeptor untersucht. Es zeigte sich, daß die RBL-CCR5-DR/NN-Mutante wie der CCR5-WT (Abb. 10 B) schon ab 1,3 nM RANTES signifikante Mengen β -Arrestin an die Membran translozierte (Abb. 18 A). Das zeitabhängige Experiment ergab, daß die CCR5-DR/NN-Mutante in der Lage war, β -Arrestin ähnlich schnell an die Membran zu rekrutieren wie der CCR5-WT. Hier zeigte sich, daß die RBL-CCR5-DR/NN-Zellen nach Stimulation mit 20 nM RANTES nach 15 – 30 sec einen deutlichen Anstieg membrangebundenen β -Arrestins aufwiesen (Abb. 18 B).

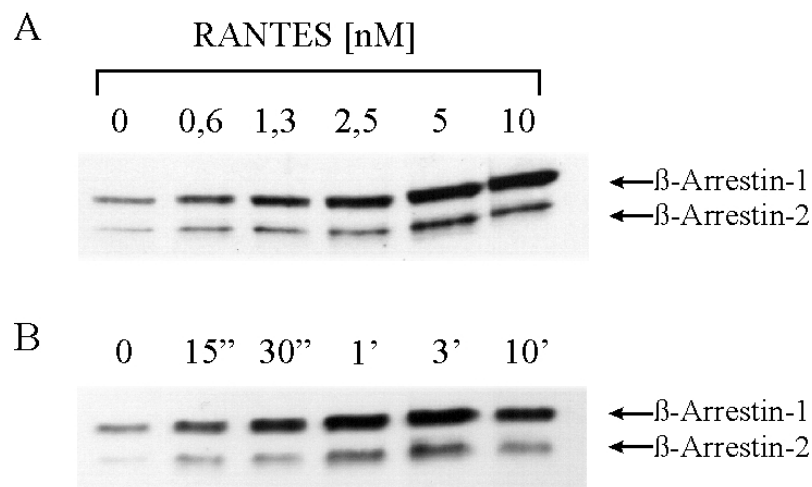


Abb. 18: Konzentrations- und zeitabhängige β -Arrestin-Bindung an RBL-CCR5-DR/NN

A: RBL-CCR5-DR/NN-Zellen wurden für 3 min mit unterschiedlichen Konzentrationen an RANTES inkubiert, und die Membran wurde über einen Sucrosegradienten aufgereinigt. Die Proteine wurden auf einem SDS-Gel aufgetrennt, mittels Immunoblot auf eine Nitrozellulosemembran übertragen und das β -Arrestin wurde mit dem Anti- β -Arrestin-1-Antikörper (1:500) und Peroxidase-konjugierten Kaninchen-anti-Maus-Antikörper (1:2000) markiert. Das ECL-Signal wurde auf einem Photofilm detektiert.

B: RBL-CCR5-DR/NN-Zellen wurden mit 20 nM RANTES für unterschiedliche Zeitpunkte stimuliert, und der Anstieg an β -Arrestin in der Membranfraktion wurde wie unter A nachgewiesen.

A+B: Die gezeigten Ergebnisse sind repräsentativ für jeweils drei Versuche mit gleichem Ergebnis.

1.2.3 Bedeutung des DRY-Motivs für die Internalisierung des CCR5

Schließlich wurde das Internalisierungsverhalten der CCR5-DR/NN-Mutante im Vergleich mit dem CCR5-WT untersucht. Hier zeigte sich, daß die RBL-CCR5-DR/NN-Mutante trotz intakter β -Arrestin-Bindung eine deutlich verlangsamte Rezeptor-Internalisierung aufwies (Abb. 19). Nach 3 min Stimulation waren nur etwa 1,2 % und nach 10 min 6,6 % des gebundenen RANTES internalisiert. Auch nach 30 min lag die prozentuale Internalisierung erst bei etwa 60 % und damit deutlich unter der Internalisierungsrate der RBL-CCR5-Zellen mit 94,2 %. Der Vergleich mit nicht transfizierten RBL-2H3-Zellen zeigte, daß die Internalisierung keine Rezeptor-unspezifische RANTES-Aufnahme darstellte, da hier eine maximale Internalisierung von lediglich 12,1 % zu beobachten war. Dabei ist zu beachten, daß die RBL-2H3-Zellen deutlich geringere Mengen an radioaktiv markiertem RANTES an die Zelloberfläche gebunden hatten. Während bei nicht säurebehandelten RBL-CCR5-Zellen etwa 20000 radioaktive Zerfälle pro Minute gemessen werden konnten, waren dies bei RBL-2H3-Zellen im Durchschnitt lediglich 5000 Zerfälle pro Minute.

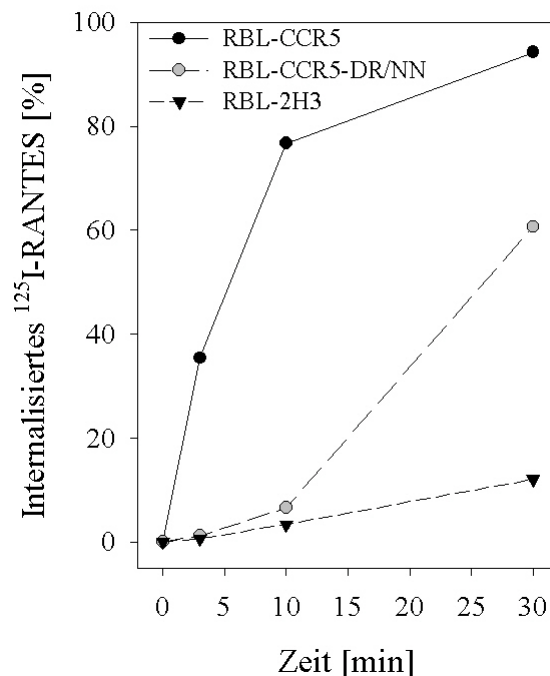


Abb. 19: Bedeutung des DRY-Motivs für die CCR5-Internalisierung

RBL-CCR5-, RBL-CCR5-DR/NN- und RBL-2H3-Zellen wurden für 90 min mit ^{125}I -RANTES auf Eis vorinkubiert, gewaschen und für unterschiedliche Zeitpunkte nach 37°C transferiert. Die Internalisierung ergibt sich aus dem Anteil säureresistenter Aktivität dividiert durch die insgesamt zellassoziierte Aktivität der Zellen nach Abzug der unspezifischen Ligandbindung. Die gezeigten Ergebnissen entsprechen Mittelwerten aus mindestens zwei unabhängigen Messungen in dreifacher Ausführung. Die Standardabweichung lag unter 15 %.

2. Strukturelle Voraussetzungen und Regulation von Rezeptorfunktionen durch Homo- und Heterodimerisierung G-Protein-gekoppelter Rezeptoren

2.1 Nachweis und funktionelle Konsequenzen von CCR5-Homodimeren

In der aktuellen Literatur gewinnt das Konzept der Dimerisierung von GPCRs stetig an Bedeutung. Dabei wird diskutiert, ob die Rezeptordimerisierung einen konstitutiven oder aber einen durch Ligand-Bindung induzierten Prozeß darstellt. So wurden für CCR5 differierende Ergebnisse veröffentlicht, in denen gezeigt wurde, daß CCR5 basal als Monomer vorliegt und nach Chemokin-Stimulation dimerisiert (VILA-CORO *et al.*, 2000), während in anderen Studien bereits unter basalen Bedingungen CCR5-Dimere gefunden wurden (BENKIRANE *et al.*, 1997, ISSAFRAS *et al.*, 2002).

2.1.1 Nachweis der CCR5-Homodimerisierung mittels BRET-Analysen

Die meisten Studien zur Rezeptordimerisierung basierten auf Co-Immunpräzipitations-Experimenten, deren Ergebnisse aufgrund von möglichen Aggregationen von Proteinen oder aber auch durch Loslösen von Dimeren aufgrund von zu hoch gewählten denaturierenden Bedingungen kritisch zu beurteilen waren. Eine Möglichkeit, die CCR5-Dimerisierung in lebenden Zellen zu untersuchen, bietet die Bestimmung von Proteininteraktionen mittels Biolumineszenz-Resonanz-Energietransfer (BRET).

2.1.1.1 Herstellung der CCR5-BRET-DNA-Konstrukte

Zur Bestimmung der CCR5-Dimerisierung wurde an den Rezeptor-C-Terminus mit deletiertem STOP-Codon das Renilla-Luciferase- bzw. das GFP²-Gen im Leserahmen angehängt. Dazu wurde CCR5 aus dem Vektor CCR5-pEF-Bos mit den Primern CCR5-Rluc-For und CCR5-Rluc-Back amplifiziert, aufgereinigt und mit *Hind*III und *Bam*HI in den Luciferase-kodierenden pRlucN2 und in den GFP²-kodierenden pGFP²N2 kloniert. Die Konstrukte wurden in den *E. coli*-Stamm XL1-blue transformiert, und die Basenabfolge der Plasmide wurde mittels Sequenzierung verifiziert.

2.1.1.2 Nachweis von Ligand-unabhängigen CCR5-Homodimeren

Zur Bestimmung der Dimerbildung wurden HEK-293-Zellen transient mit unterschiedlichen Konzentrationen an CCR5-Rluc und CCR5-GFP² oder leerem GFP²-Vektor transfiziert, und es wurde der Energietransfer nach Aktivierung der Luciferase mit ihrem Substrat DeepBlueC gemessen.

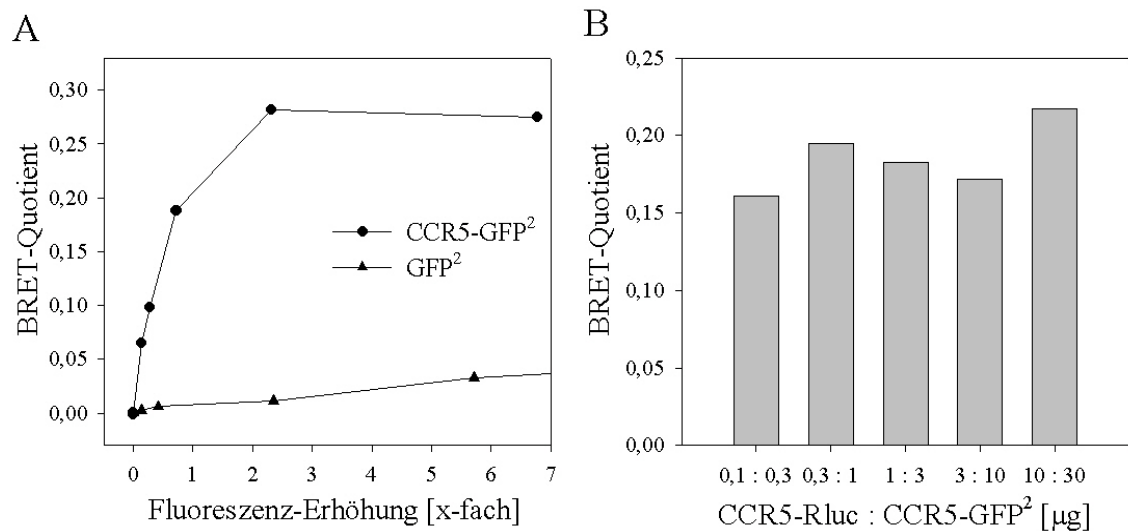


Abb. 20: Nachweis homologer CCR5-Dimerisierung in BRET-Analysen

A: HEK-293-Zellen wurden transient mit 0,1 µg CCR5-Rluc und steigenden Konzentrationen von CCR5-GFP² bzw. leerem pGFP² (0,01 µg – 3 µg) transfiziert, und nach 48 h wurde der Energietransfer nach Aktivierung der Luciferase mit ihrem Substrat DeepBlueC gemessen. Das BRET-Signal ergibt sich aus dem Quotienten aus GFP²-Fluoreszenz und Rluc-Lumineszenz abzüglich des BRET-Signals von Zellen, die lediglich mit dem CCR5-Rluc-Konstrukt transfiziert wurden. Die Fluoreszenzerhöhung, die die ansteigende Expression des GFP²-Konstrukts widerspiegelt, wurde ohne Substratzugabe nach Anregung der Zellen mit einer Wellenlänge von 410 nm bei 515 nm detektiert.

B: HEK-293-Zellen wurden mit steigenden Konzentrationen von CCR5-Rluc und CCR5-GFP² im Verhältnis von 1:3 transfiziert, und der Energietransfer wurde wie unter A bestimmt.

A + B: Die gezeigten Ergebnisse sind repräsentativ für mindestens 2 Versuche mit gleichem Ergebnis.

Man sieht in der Abbildung 20 A, daß bei Transfektion der Zellen mit gleicher Menge CCR5-Rluc aber steigender Menge CCR5-GFP² eine für Dimerisierung typische Sättigungskurve erhalten wurde, die abflachte, sobald alle Energie, die von der Luciferase abgegeben wurde, vom GFP in Fluoreszenz umgesetzt wurde. Das maximale BRET-Signal der CCR5-Homodimere lag bei 0,27. Die CCR5-Spezifität des BRET-Signals zeigt ein Kontrollexperiment, in dem steigende Menge an leerem pGFP²N2-Vektor cotransfiziert wurden (Abb. 20 A). Hier konnte trotz der durch die Fluoreszenzzunahme ersichtlichen steigenden Expression des GFP² kein signifikantes

BRET-Signal beobachtet werden. Die Stabilität des BRET-Signals bei steigenden Konzentrationen an transfizierter DNA im gleichbleibenden Verhältnis von CCR5-Rluc zu CCR5-GFP2 von 1:3 zeigte, daß die CCR5-Dimere nicht erst bei hohen Rezeptor-Überexpressionsleveln gebildet wurden (Abb. 20 B). Diese Ergebnisse deuten darauf hin, daß CCR5 unter basalen Bedingungen Homodimere ausbildet.

2.1.2 Funktionelle Bedeutung der homologen CCR5-Dimerisierung für die Rezeptorregulation

Um zu überprüfen, ob die beobachteten Dimere lediglich eine Zusammenlagerung der Rezeptoren bedeuten, oder ob die Dimerbildung auch eine funktionelle Konsequenz für die Rezeptoren hat, wurden zwei CCR5-Rezeptoren mit Defekten in der Ligand-Bindung bzw. der Phosphorylierung zusammen auf einer Zellreihe coexprimiert, und es wurde überprüft, ob die Rezeptoren ihre Defekte gegenseitig komplementieren konnten.

2.1.2.1 Konstruktion einer CCR5- Δ 2-17-Rezeptormutante mit einem deletierten RANTES-Bindungsmotiv

Als defekte Rezeptoren wurde zum einen der CCR5-S/A (CCR5- Δ 4) gewählt, bei dem alle vier C-terminalen Serine gegen Alanin mutagenisiert wurden und der einen Defekt in der β -Arrestin-Bindung, schnellen Internalisierung und der Phosphorylierung besitzt (siehe Ergebniskapitel 1.1). Zum anderen wurde ein CCR5 konstruiert, bei dem die Aminosäuren 2 bis 17, die der RANTES-Bindungsstelle und der des CCR5-Antikörpers T21 entsprechen (BLANPAIN *et al.*, 1999, KRAFT *et al.*, 2001), deletiert wurden (CCR5- Δ 2-17). Um diesen Rezeptor detektieren zu können, wurde an die entsprechende Stelle die HA-Signalsequenz eingebaut, die durch den Antikörper 12CA5 gebunden wird (Abb. 21). Dazu wurde aus dem Plasmid CCR5-pEFBos mit den Primern CCR5-Bam- Δ 2-17-For und CCR5-Xba-Eco5-Back das etwa 1,1 kb Rezeptorkonstrukt amplifiziert, aufgereinigt und mit *Bam*HI und *Eco*RV in den Vektor pEF1/Myc-HIS-A inseriert. Das Konstrukt wurde in den *E. coli*-Stamm XL1-blue transformiert, und die Basenabfolge des mutagenisierten Rezeptors wurde durch Sequenzieren verifiziert. Zur stabilen Transfektion wurde die DNA mit *Sca*I linearisiert.

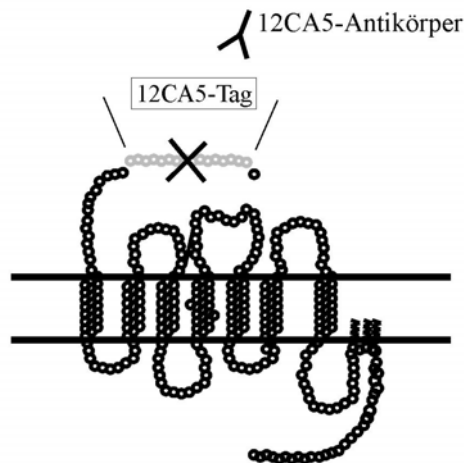


Abb. 21: Schematischer Aufbau der CCR5- Δ 2-17-Rezeptormutante

In der CCR5- Δ 2-17-Rezeptormutante wurden die N-terminalen Aminosäuren 2 bis 17 deletiert und durch die Erkennungssequenz des Antikörpers 12CA5 ersetzt.

2.1.2.2 Herstellung und Expression von RBL-CCR5- Δ 2-17-Zellreihen

Mittels Elektroporation wurden stabile RBL-2H3-Zellreihen hergestellt, in denen der CCR5- Δ 2-17 alleine exprimiert oder zusammen mit dem intakten CCR5 oder CCR5-S/A coexprimiert wurde. Von jeder Zellreihe wurden wenigstens zwei Klone auf ihre Funktionalität überprüft, um klonale Artefakte auszuschließen.

Man sieht in der Tabelle 6, daß in allen drei Zellreihen der CCR5- Δ 2-17 in vergleichbarer Dichte exprimiert wurde. Bei der RBL-CCR5- Δ 2-17-Zellreihe konnte nach Stimulation mit RANTES weder eine signifikante Glucosaminidase-Freisetzung noch eine Freisetzung intrazellulärer Calciumionen beobachtet werden, was die Deletion der RANTES-Bindestelle bestätigt. Die RBL-CCR5- Δ 2-17/CCR5-Zellreihe zeigte mit 23,2 nM RANTES eine leicht erhöhte EC₅₀, die Desensibilisierung war dagegen mit einem Glucosaminidase-Maximum von 25,0 % im Vergleich zu RBL-CCR5-Zellen mit 27,1 % und einer Zeitkonstante von 15,5 sec im Vergleich zu 14,8 sec unverändert (Tab. 4 und Tab. 6). RBL-CCR5- Δ 2-17/CCR5-S/A-Zellen zeigten eine deutlich verlangsamte Desensibilisierung. Die maximale Glucosaminidase-Freisetzung von 60,7 % glich der der RBL-CCR5-S/A-Mutante mit 55,0 %, die Calcium-Zeitkonstante lag mit 28,7 sec etwas unter der CCR5-S/A-Einzeltransfektante mit 41,6 sec, aber im Vergleich zum intakten CCR5 immer noch deutlich erhöht. Daraus läßt sich schließen, daß die Coexpression des CCR5- Δ 2-17 die Desensibilisierung von CCR5 oder CCR5-S/A nicht signifikant beeinflusst.

Tab. 6: Expression und Aktivität der CCR5- Δ 2-17-Zellreihen

Klon	FACS		NAGA EC50 [nM]	NAGA max [%]	Ca τ [sec]
	MCF				
RBL-CCR5- Δ 2-17 (24.4)	12CA5 :	43,6	-	3,9	-
	T21 :	-			
RBL-CCR5- Δ 2-17/CCR5 (21.7)	12CA5 :	32,4	23,2	25,0	15,5
	T21 :	30,2			
RBL-CCR5- Δ 2-17/CCR5-S/A (20.5)	12CA5 :	30,2	27,9	60,7	28,7
	T21 :	47,3			

Die Rezeptorexpression der stabil hergestellten Zellreihen wurde im FACS mit dem Primärantikörper 12CA5 (CCR5- Δ 2-17) oder T21 (CCR5 bzw. CCR5-S/A) und dem Sekundärantikörper Ziege-anti-Maus-FITC überprüft und ist als MCF (mean channel of fluorescence) angegeben. Die Rezeptoraktivität der Zellreihen wurde im NAGA bestimmt und ist als halbmaximale Aktivität EC50 [nM RANTES] gegeben. Die maximale Glucosaminidase-Freisetzung (max [%]) und die Zeitkonstante τ [sec] der intrazellulären Calcium-Freisetzung nach Stimulation mit 10 nM RANTES geben Auskunft über die Desensibilisierungsrate der Rezeptoren. Alle Werte stellen den Mittelwert aus mindestens drei unabhängigen Messungen dar. Ein (-) bedeutet nicht bestimmbar.

2.1.2.3 GRK-Kreuzphosphorylierung nicht Ligand-gebundener Rezeptoren in CCR5-Homodimeren

Es wurde die Phosphorylierung der RBL-CCR5- Δ 2-17-Mutanten durch PKC und GRK überprüft. Dazu wurden die Zellen mit 10 nM RANTES oder mit 200 nM PMA stimuliert, und es wurde die Phosphorylierung des CCR5- Δ 2-17 mit den Antikörpern E11, der die GRK-vermittelte Phosphorylierung des Serins 349 nachweist, V14, der das durch PKC phosphorylierte Serin 337 erkennt, und RC-10, der das nicht phosphorylierte Serin 337 bindet, gemessen. Die Bestimmung der Phosphorylierung erfolgte dabei sowohl im Immunoblot nach Immunpräzipitation und Geltransfer als auch im ELISA.

Für die Immunpräzipitation wurden RBL-CCR5- Δ 2-17-, RBL-CCR5- Δ 2-17/CCR5-S/A- und RBL-CCR5-S/A-Zellen für 3 min mit 10 nM RANTES oder für 5 min mit 200 nM PMA stimuliert, lysiert und CCR5- Δ 2-17 mit dem Antikörper 12CA5 aus den Proben präzipitiert. Nach dem Auftrennen der Proteine im SDS-Gel und Transfer der Proben auf eine Nitrozellulosemembran wurde die Phosphorylierung des CCR5- Δ 2-17 mit den Antikörpern V14, RC-10 und E11 und der Rezeptorgehalt der Proben mit dem

Antikörper HA-Peroxidase nachgewiesen. Man erkennt in der Abbildung 22, daß in RBL-CCR5- Δ 2-17-Zellen der CCR5- Δ 2-17 eine starke PMA vermittelte und eine schwache RANTES vermittelte PKC-Phosphorylierung (V14) zeigte, jedoch wie auch in RBL-CCR5-S/A-Zellen keine GRK-vermittelte Phosphorylierung (E11) aufwies. In coexprimierenden RBL-CCR5- Δ 2-17/CCR5-S/A-Zellen zeigte sich dagegen eine deutliche GRK-vermittelte Phosphorylierung (E11), die auf eine mögliche funktionelle Ergänzung der beiden defekten Rezeptoren im Dimer hinwies. Als Kontrolle, daß in allen Proben annähernd gleiche Rezeptormengen aufgetragen waren, wurde die Membran gestrippt und CCR5- Δ 2-17-Rezeptoren mit dem direkt Peroxidase-gekoppelten HA-Antikörper nachgewiesen.

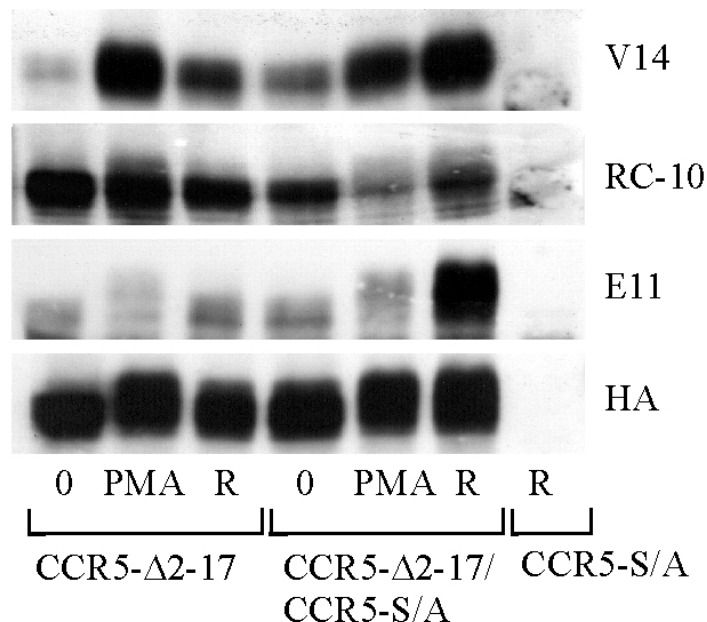


Abb. 22: Phosphorylierungsnachweis des CCR5- Δ 2-17 mittels Immunpräzipitation

RBL-CCR5- Δ 2-17-, RBL-CCR5- Δ 2-17/CCR5-S/A- und RBL-CCR5-S/A-Zellen wurden in 10 cm Schalen konfluent angezogen, für 3 min mit 10 nM RANTES oder für 5 min mit 200 nM PMA stimuliert und in 1 ml Lysepuffer aufgenommen. Für den Nachweis von V14 und RC-10 wurde der CCR5- Δ 2-17 aus 100 μ l und für den Nachweis von E11 und HA aus 900 μ l Lysat mit je 12 μ g 12CA5-Antikörper präzipitiert und auf einem SDS-Gel aufgetrennt. Nach dem Transfer auf eine Nitrozellulosemembran wurde die CCR5- Δ 2-17-Phosphorylierung zunächst mit den biotinylierten Antikörpern E11 (phospho-Serin 349, GRK-vermittelt, 10 μ g/ml) und V14 (phospho-Serin 337, PKC-vermittelt, 5 μ g/ml) und Streptavidin-Peroxidase (1:4000) nachgewiesen. Anschließend wurde die Membran gestrippt und mit biotinyliertem RC-10 (nicht phosphoryliertes Serin 337, 10 μ g/ml) und Streptavidin-Peroxidase (1:4000) oder Peroxidase-gekoppeltem HA (1:5000) nachgefärbt. Die CCR5- Δ 2-17-Rezeptorbande wurde bei etwa 33 kDa detektiert. Die Abbildung ist repräsentativ für drei Experimente mit gleichem Ergebnis.

Parallel zum Immunoblot wurde die Phosphorylierung der RBL-CCR5- Δ 2-17-Mutanten mittels ELISA überprüft. Dazu wurden RBL-CCR5- Δ 2-17- und RBL-CCR5- Δ 2-17/CCR5-S/A-Zellen für 3 min mit 10 nM RANTES oder für 5 min mit 200 nM PMA stimuliert. Für die Phosphorylierung von CCR5- Δ 2-17 wurde 12CA5 als Fangantikörper in die ELISA-Platte gegeben.

Man erkennt in der Abb. 23, daß der CCR5- Δ 2-17 in der einzeln exprimierenden RBL-CCR5- Δ 2-17-Zellreihe eine intakte PKC-Phosphorylierung (pSer337) nach Stimulation mit PMA, jedoch keine spezifische GRK-vermittelte Phosphorylierung (pSer349) zeigte. In RBL-CCR5- Δ 2-17/CCR5-S/A-Zellen konnte man dagegen nach 3 min Stimulation mit RANTES eine signifikante GRK-vermittelte Phosphorylierung des CCR5- Δ 2-17-Rezeptors erkennen. Da die GRK der allgemeinen Auffassung nach lediglich Ligand-gebundenen Rezeptor phosphoryliert, ist die GRK-Phosphorylierung des CCR5- Δ 2-17 auf RBL-CCR5- Δ 2-17/CCR5-S/A-Zellen womöglich ein Hinweis auf eine Dimerbildung mit funktioneller Konsequenz für die Regulation beider Rezeptoren.

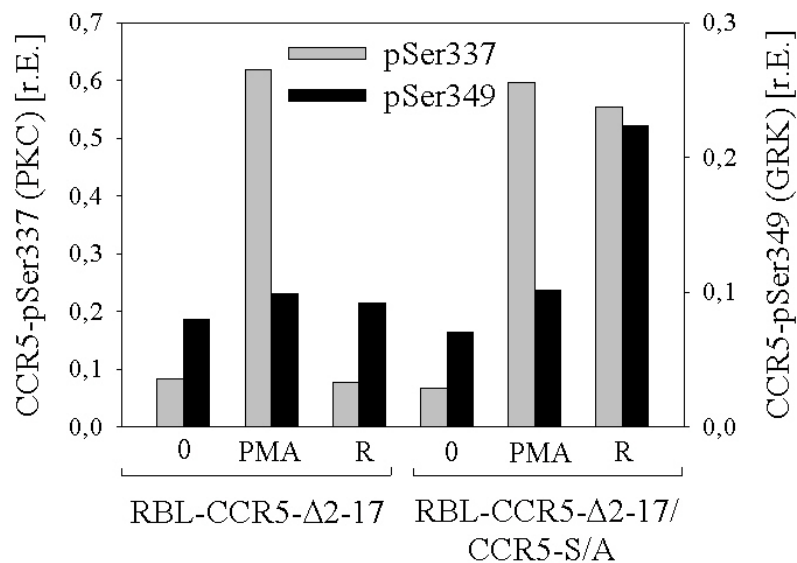


Abb. 23: Nachweis der Phosphorylierung der RBL-CCR5- Δ 2-17-Zellen im ELISA

RBL-CCR5- Δ 2-17- und RBL-CCR5- Δ 2-17/CCR5-S/A-Zellen wurden in kleinen Schalen konfluent angezogen und für 5 min mit 200 nM PMA oder für 3 min mit 10 nM RANTES stimuliert. Nach dem Aufschließen der Zellen in Lysepuffer wurde der CCR5- Δ 2-17 mit 12CA5 an die ELISA-Platte gebunden. Der Nachweis der Phosphorylierung der Rezeptoren erfolgte mit den biotinylierten Primärantikörpern V14 und E11 in einer Konzentration von 1 μ g/ml und Peroxidase-gekoppeltem Streptavidin. Als Substrat diente ABTS. Die Phosphorylierung ist angegeben als relative Einheit (r.E.) im Vergleich zu einem mitgeführten CCR5-phospho-CT-BSA-Standard. Gezeigt ist ein repräsentatives Experiment von vier durchgeführten mit gleichem Ergebnis.

Zusammenfassend konnte sowohl im ELISA als auch in der Immunpräzipitation gezeigt werden, daß beide mutagenisierte Rezeptoren CCR5- Δ 2-17 und CCR5-S/A ihre Defekte in Bezug auf Ligand-spezifische GRK-vermittelte Phosphorylierung gegenseitig komplementieren konnten.

2.1.2.4 Komplementierung der β -Arrestin-Bindung zweier Defektmutanten in CCR5-Homodimeren

Es wurde die Fähigkeit der RBL-CCR5- Δ 2-17-Mutanten, β -Arrestin an die Membran zu rekrutieren, untersucht. Dazu wurden die drei Zellreihen für 3 min mit 10 nM RANTES stimuliert, und es wurde die Membranfraktion auf einem Sucrosegradienten isoliert. Nach dem Auftrennen der Proteine mittels SDS-PAGE und Nitrozellulosetransfer wurde das an die Membran translozierte β -Arrestin nachgewiesen.

Es wurde deutlich, daß weder die RBL-CCR5-S/A-Mutante (Abb. 12) noch die RBL-CCR5- Δ 2-17-Mutante (Abb. 24) alleine in der Lage waren, β -Arrestin an die Membran zu rekrutieren. Wurden beide Defektmutanten zusammen auf einer Zellreihe coexprimiert, konnte nach RANTES-Stimulation jedoch eine signifikante β -Arrestin-Translokation und damit eine funktionelle Komplementierung beobachtet werden (Abb. 24). Der CCR5- Δ 2-17 stellte weiterhin keine dominant negative Mutante dar, da er die β -Arrestin-Interaktion mit dem intakten CCR5 in RBL-CCR5- Δ 2-17/CCR5-Zellen nicht inhibierte.

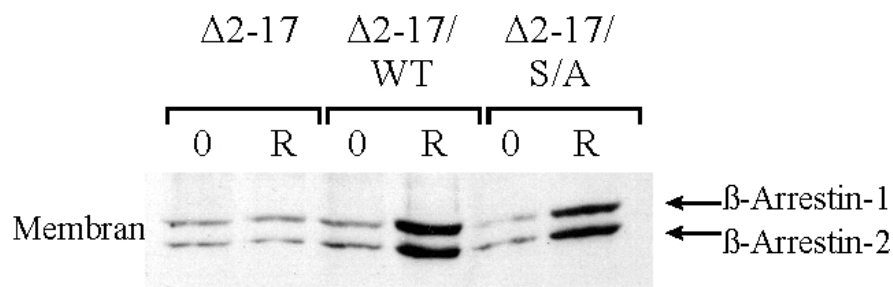


Abb. 24: β -Arrestin-Translokation in RBL-CCR5- Δ 2-17-Zellen

RBL-CCR5- Δ 2-17-, RBL-CCR5- Δ 2-17/CCR5- und RBL-CCR5- Δ 2-17/CCR5-S/A-Zellen wurden für 3 min mit Medium (0) oder 10 nM RANTES (R) inkubiert, und es wurde die β -Arrestin Translokation an die Membran nachgewiesen. Dazu wurde die Membranfraktion der lysierten Zellen mit einem Sucrosegradienten isoliert, auf einem SDS-Gel aufgetrennt und auf eine Nitrozellulosemembran transferiert. Der Nachweis erfolgte mit dem anti- β -Arrestin-1/2-Antikörper (10 μ g/ml) und dem sekundären Peroxidase-konjugierten Kaninchen-anti-Maus-Antikörper (1:2000). Das gezeigte Ergebnis ist repräsentativ für drei Versuche mit gleichem Ergebnis.

2.1.2.5 Komplementierung der β -Arrestin-abhängigen Internalisierung zweier Defektmutanten in CCR5-Homodimeren

Nach der Fähigkeit zur β -Arrestin-Rekrutierung wurde das Internalisierungsverhalten der drei RBL-CCR5- Δ 2-17-Zellreihen überprüft. Dazu wurde zum einen die Internalisierung indirekt über die Markierung und Aufnahme von radioaktiv markiertem RANTES bestimmt, wobei bei dieser Methode insbesondere schnelle Internalisierungsabläufe erfaßt werden können (Abb. 25 A). In einem zweiten Ansatz wurden die Zellen erst für unterschiedliche Zeitpunkte mit 100 nM RANTES stimuliert, und dann wurde die Oberflächenexpression des CCR5- Δ 2-17 bestimmt (Abb. 25 B).

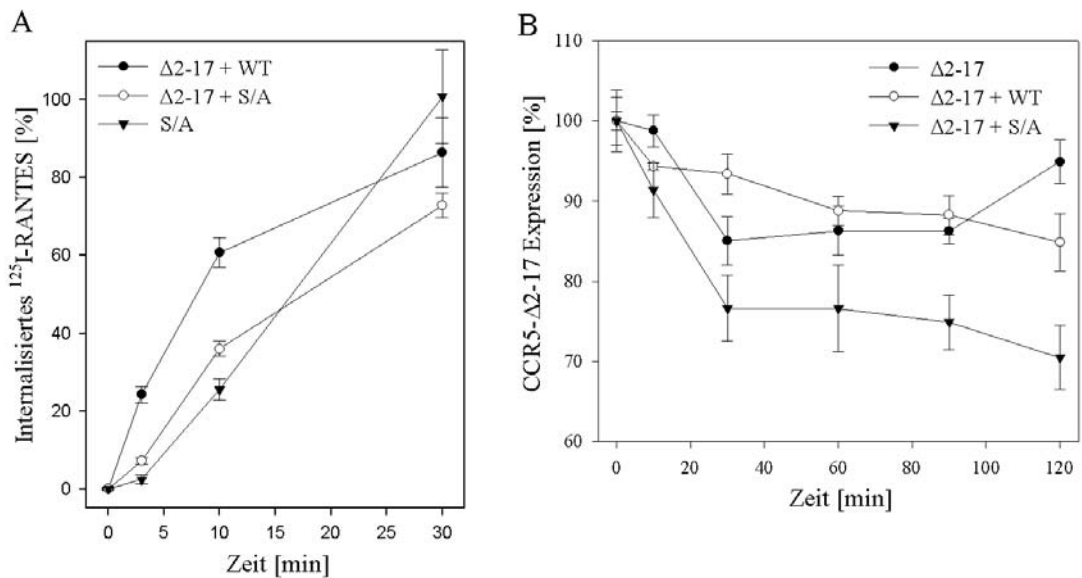


Abb. 25: Internalisierung der RBL-CCR5- Δ 2-17-Mutanten

A: Die RBL-CCR5- Δ 2-17-, RBL-CCR5- Δ 2-17/CCR5-, RBL-CCR5- Δ 2-17/CCR5-S/A- und RBL-CCR5-S/A-Zellen wurden für 90 min mit ^{125}I -RANTES auf Eis vorinkubiert, gewaschen und für unterschiedliche Zeitpunkte nach 37°C transferiert. Die Internalisierung ergibt sich aus dem Anteil säureresistenter Aktivität dividiert durch die insgesamt zellassoziierte Aktivität der Zellen nach Abzug der unspezifischen Ligandbindung. Die gezeigten Ergebnisse entsprechen Mittelwerten aus drei bis sechs unabhängigen Messungen mit triplikaten Ansätzen.

B: Die RBL-CCR5- Δ 2-17-, RBL-CCR5- Δ 2-17/CCR5- und RBL-CCR5- Δ 2-17/CCR5-S/A-Zellen wurden für unterschiedliche Zeitpunkte mit 100 nM RANTES stimuliert und die Stimulation auf Eis abgestoppt. Die Expression des CCR5- Δ 2-17 wurde durch Inkubation der Zellen mit 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 12C5-Antikörper und radioaktiv markiertem Protein-A für je 90 min auf Eis nachgewiesen. Ungebundener Antikörper wurde durch drei Waschschritte entfernt und es wurde die Anzahl radioaktiver Zerfälle jeder Probe im Wallac-Counter gemessen. Die gezeigten Ergebnisse entsprechen Mittelwerten aus drei unabhängigen Messungen in Duplikaten.

Die RBL-CCR5- Δ 2-17-Mutante zeigte erwartungsgemäß einen deutlichen Defekt in der Markierung mit ^{125}I -RANTES, der mit der gesamt-zellassoziierten Aktivität von nicht transfizierten RBL-2H3-Zellen vergleichbar war (Daten nicht gezeigt). RBL-CCR5-

$\Delta 2-17/CCR5$ -Zellen zeigten eine vergleichsweise schnelle RANTES-Aufnahme, die jedoch hinter der von RBL-CCR5-Zellen zurückblieb, da nach 10 min gerade 60 % des Stimulus aufgenommen waren und bis zu 30 min mit 91 % noch ein deutlicher Anstieg der RANTES-Internalisierung zu erkennen war. Die RBL-CCR5- $\Delta 2-17/CCR5$ -S/A-Zellreihe zeigte nach 10 min eine mit 36 % im Vergleich zu 25 % der RBL-CCR5-S/A-Mutante leicht aber signifikant ($p < 0,005$) gesteigerte RANTES-Internalisierung, was als eine eventuelle Komplementierung des Defekts der schnellen, β -Arrestin-abhängigen Internalisierung von β -Arrestin-bindenden CCR5- $\Delta 2-17/CCR5$ -S/A-Dimeren interpretiert werden könnte (Abb. 25 A). Allerdings war dieser Unterschied nur während der frühen Zeitpunkte der Rezeptorinternalisierung nachweisbar, in denen die β -Arrestin-abhängigen Internalisierungsmechanismen dominieren.

Bei der Bestimmung der Oberflächenexpression des CCR5- $\Delta 2-17$ mit iodiertem Protein-A (Abb. 25 B) zeigte sich bei den RBL-CCR5- $\Delta 2-17$ -Zellen eine nur sehr schwache Internalisierung mit einer maximalen Expressionsreduktion von 15 % nach 30 min, die nach 120 min mit 94 % Expression in etwa die Expression unstimulierter Zellen erreicht hatte. In RBL-CCR5- $\Delta 2-17/CCR5$ -Zellen konnte man eine ebenfalls sehr geringe aber gleichbleibende Reduktion der CCR5- $\Delta 2-17$ Expression beobachten, die nach 120 min bei 85 % lag. RBL-CCR5- $\Delta 2-17/CCR5$ -S/A-Zellen zeigten dagegen nach RANTES-Stimulation eine deutliche CCR5- $\Delta 2-17$ -Internalisierung, die nach gleichförmiger Reduktion nach 120 min bei 70 % Expression lag (Abb. 25 B).

Zusammenfassend kann postuliert werden, daß durch die Dimerisierung der mutagenisierten CCR5- $\Delta 2-17$ - und CCR5-S/A-Rezeptoren die Defekte beider Rezeptoren komplementiert werden und die CCR5- $\Delta 2-17/CCR5$ -S/A-Dimere nach RANTES-Stimulation β -Arrestin-abhängig in die Zelle endozytiert werden.

2.2 Nachweis und funktionelle Konsequenzen der Heterodimerisierung

In der aktuellen Literatur finden sich zahlreiche Berichte, deren zufolge GPCRs nicht nur Homodimere, sondern durch Komplexbildung mit anderen GPCRs auf derselben Zelle auch Heterodimere bilden können. Dabei wurde eine bevorzugte

Heterodimerisierung zwischen strukturell und funktionell verwandten Rezeptoren beobachtet.

Nach dem vorangegangenen Nachweis der GRK- und β -Arrestin-vermittelten Regulation von CCR5-Homodimeren sollte nun die Hypothese überprüft werden, daß diese Mechanismen auch für die Phosphorylierung und Internalisierung von Heterodimeren verantwortlich ist.

2.2.1 Nachweis und funktionelle Konsequenzen der CCR5-Heterodimerisierung mit C5aR und AT1aR

Um die Hypothese der heterologen Rezeptorregulation zu ergründen, wurde im folgenden die Heterodimerisierung des CCR5 mit zwei anderen GPCRs untersucht. Als Interaktionspartner wurde zum einen der C5a-Rezeptor gewählt, der eine hohe funktionelle und Sequenz-Homologie zum CCR5 aufweist. Zum anderen wurde der Angiotensin-Rezeptor II Typ 1a (AT1aR) gewählt, der auf Proteinebene eine sehr viel niedrigere Homologie zum CCR5 aufweist und kein chemotaktisch aktiver Rezeptor ist.

2.2.1.1 Herstellung und Expression von RBL-C5aR/CCR5- und RBL-AT1aR/CCR5-Zellreihen

Zur Charakterisierung möglicher Interaktion von CCR5 mit C5aR bzw. AT1aR wurde CCR5 stabil auf RBL-2H3-Zellen zusammen mit C5aR oder AT1aR coexprimiert.

RBL-C5aR- und RBL-C5aR/CCR5-Zellreihen waren im Labor vorhanden (ROTHERMEL *et al.*, 1997, KRAFT *et al.*, 2001). Zur Herstellung der RBL-AT1aR/CCR5-Zellreihe wurde die Rezeptor-cDNA aus dem Vektor AT1aR-pcDNA1 (OPPERMANN *et al.*, 1996) mit *NotI* und *BamHI* in den Vektor pEF1/Myc-HIS-A umkloniert und in den *E. coli*-Stamm XL1-blue transformiert. Zur stabilen Transfektion in RBL-2H3-Zellen wurden die CCR5-pEFBos- und AT1aR-pEF1/Myc-HIS-A-DNA mit *PvuI* linearisiert.

Die Tabelle 7 gibt einen Überblick über die Expression und Aktivität der RBL-Zellreihen. Man erkennt, daß der C5aR und AT1aR in den einzel- bzw. doppeltransfizierten Zellreihen in vergleichbarer Rezeptordichte vorlag, so daß in Einzel- und Doppeltransfektanten von gleicher Reaktion des Rezeptors auf seinen jeweiligen Stimulus ausgegangen werden konnte. Die Bestimmung der Stimulus-

Konzentration bei halbmaximaler Glucosaminidase-Freisetzung (EC50) ergab, daß auf allen Zellreihen funktionell aktive Rezeptoren exprimiert wurden.

Tab. 7: Expression und Funktion der RBL-C5aR- und RBL-AT1aR-Zellreihen

Klon	FACS MCF		NAGA EC50 [nM]		NAGA max [%]	
	RBL-C5aR	C5aR :	111,4	C5aR :	10,6	C5aR :
RBL-C5aR/CCR5 (58.9)	C5aR :	123,7	C5aR :	7,7	C5aR :	55,8
	CCR5 :	52,9	CCR5 :	27,0	CCR5 :	27,1
RBL-AT1aR (58.8)	AT1aR :	19,9	AT1aR :	42,3	AT1aR :	62,1
RBL-AT1aR/CCR5 (33.1)	AT1aR :	22,9	AT1aR :	39,2	AT1aR :	56,3
	CCR5 :	14,4	CCR5 :	14,4	CCR5 :	17,6

Gezeigt ist die Expression und Aktivität der RBL-C5aR- und RBL-AT1aR-Zellreihen. Bei Doppeltransfektanten wurde die Expression und Aktivität beider exprimierter Rezeptoren getestet und aufgeführt. MCF gibt die Rezeptorexpression als „mean channel of fluorescence“ im FACS an. EC50 zeigt die jeweilige Stimulus-Konzentration [nM ATII bzw. C5a] an, bei welcher der Rezeptor seine halbmaximale Glucosaminidase-Freisetzung zeigte. NAGA max gibt die maximale Glucosaminidase-Freisetzung in [%] an. Die aufgeführten Daten entsprechen Mittelwerten aus mindestens drei unabhängigen Messungen.

2.2.1.2 Charakterisierung der β -Arrestin-Bindung an C5aR und AT1aR

Sowohl der C5aR als auch der AT1aR zeichnen sich durch eine starke Arrestin-Bindung nach Stimulation mit ihrem jeweilig spezifischen Stimulus aus. Man erkennt in der Abb. 26 A, daß RBL-C5aR-Zellen (siehe Tab. 7) nach Stimulation mit 20 nM C5a schon nach 5 sec eine deutliche β -Arrestin-Translokation an die Membran zeigten. Im Gegensatz zu RBL-CCR5-Zellen (Abb. 12) war die β -Arrestin-Translokation hier so stark, daß die β -Arrestin-Konzentration im Cytosol nach C5a-Stimulation deutlich abnahm, was auf eine verstärkte Membrantranslokation hinwies. In RBL-AT1aR-Zellen war nach Stimulation mit 100 nM AtII ebenfalls nach 5 sec eine deutliche β -Arrestin-Translokation an die Membran zu erkennen, wobei auch hier die β -Arrestin-Menge im Cytosol erkennbar abnahm (Abb. 26 B).

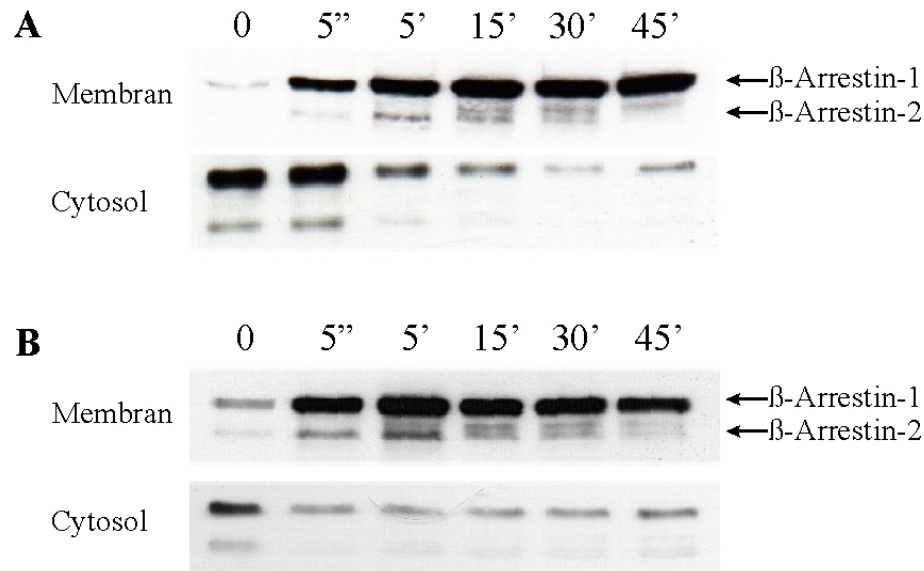


Abb. 26: β-Arrestin-Translokation in RBL-C5aR- und RBL-AT1aR-Zellen

RBL-C5aR- (A) und RBL-AT1aR-Zellen (B) wurden für unterschiedliche Zeitpunkte mit 20 nM C5a bzw. 100 nM ATII stimuliert, und es wurde die β-Arrestin Translokation an die Membran nachgewiesen. Dazu wurden die Membran und das Cytosol der lysierten Zellen mit einem Sucrosegradienten isoliert, auf einem SDS-Gel aufgetrennt und auf eine Nitrozellulosemembran transferiert. Der Nachweis erfolgte mit dem anti-β-Arrestin-1-Antikörper (1:500) und dem sekundären Peroxidase-konjugierten Kaninchen-anti-Maus-Antikörper (1:2000). Der Nachweis des ECL-Signals erfolgte auf einem Photofilm. Die gezeigten Ergebnisse sind repräsentativ für jeweils drei Versuche mit gleichem Ergebnis.

2.2.1.3 Nachweis der Heterodimerisierung durch Coimmunpräzipitation in RBL-C5aR/CCR5- und RBL-AT1aR/CCR5-Zellen

Um die Bildung von Rezeptordimeren zu untersuchen, wurden zunächst Coimmunpräzipitationsexperimente durchgeführt. Dazu wurden lysierte RBL-C5aR/CCR5-Zellen mit einem anti-CCR5- oder anti-C5aR-Antikörper inkubiert und auf die mögliche Coimmunpräzipitation von C5aR bzw. CCR5 getestet. Man sieht in der Abb. 27 A, daß in RBL-C5aR/CCR5-Lysaten nach Immunpräzipitation mit dem anti-C5aR-Antikörper S5/1 sowohl der C5aR als auch der CCR5 nachgewiesen werden konnte. Umgekehrt konnten nach Präzipitation mit dem anti-CCR5-Antikörper R22 sowohl CCR5 als auch C5aR nachgewiesen werden. Diese Coimmunpräzipitation ist nicht auf mögliche Kreuzreaktivität der Antikörper zurückzuführen, da in einem Zellgemisch aus RBL-Zellen, von denen eine Zellreihe lediglich CCR5, die andere ausschließlich C5aR exprimierten, keine Coimmunpräzipitation festzustellen war (Abb. 27 A). Als Negativkontrolle wurden nicht transfizierte RBL-2H3-Zellen mitgeführt.

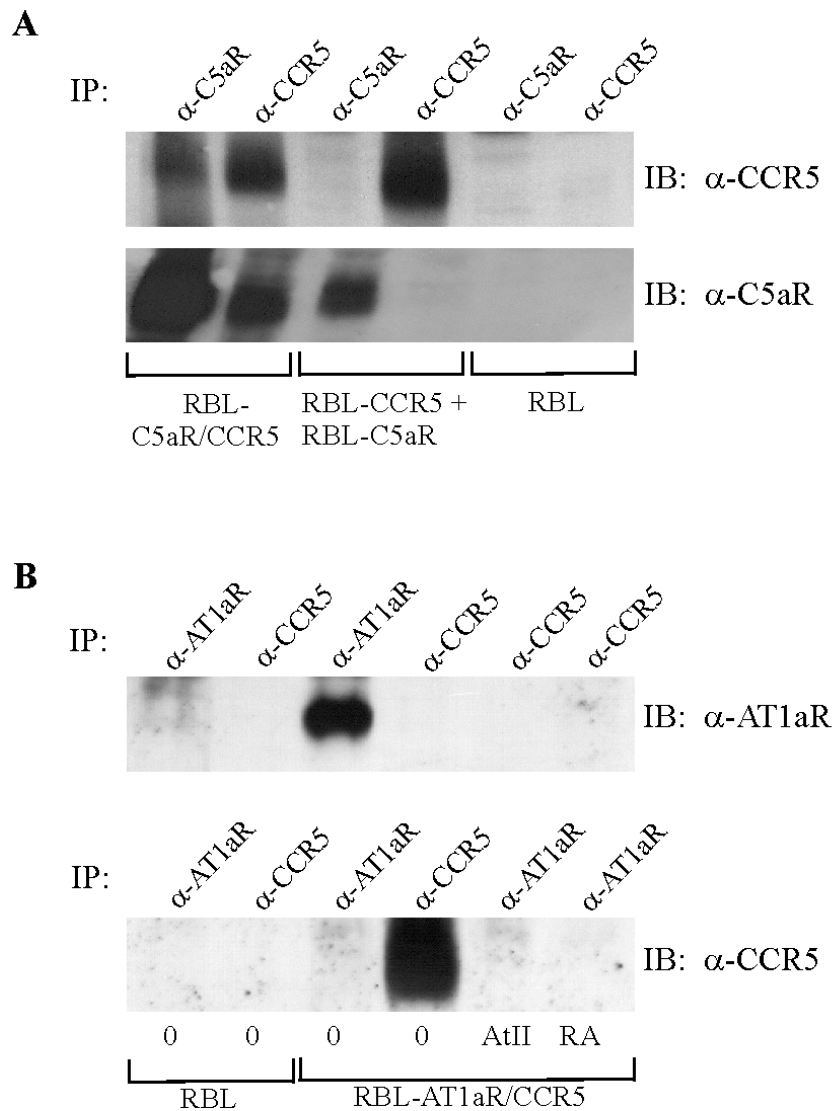


Abb. 27: Coimmunpräzipitation in RBL-C5aR/CCR5- und RBL-AT1aR/CCR5-Zellen

A: Coexprimierende RBL-C5aR/CCR5-Zellen, ein Gemisch aus einzeln exprimierenden RBL-C5aR- und RBL-CCR5-Zellen und nicht transfizierte RBL-2H3-Zellen wurden in Lysepuffer aufgeschabt und abzentrifugiert. Der Überstand wurde mit Protein-G-Sepharose und 12 μ g anti-C5aR- (S5/1) oder anti-CCR5- (R22) Antikörper versetzt und für zwei Stunden bei 4°C inkubiert. Nach viermaligem Waschen der Proben wurde das Protein-G-Pellet in 50 μ l PAGE-Puffer aufgenommen, für 20 min bei 37°C inkubiert und auf einem 10 %igen SDS-Gel aufgetrennt. Nach dem Transfer auf eine Nitrozellulosemembran wurde präzipitierter CCR5 mit dem Antikörper MC5 (0,25 μ g/ml) und Peroxidase-konjugiertem Kaninchen-anti-Maus-Antikörper (1:2000) nachgewiesen. Die Markierung des C5aR erfolgte mit 5 μ g/ml biotinyliertem P12/1 und Streptavidin-Peroxidase (1:4000).

B: RBL-2H3 Zellen oder coexprimierende RBL-AT1aR/CCR5-Zellen wurden für 3 min mit Medium (0), 100 nM Angiotensin II (AtII) oder 20 nM RANTES (RA) inkubiert, und es wurde die (Co-) Immunpräzipitation der Rezeptoren wie unter A bestimmt. In der Immunpräzipitation wurden der anti-CCR5-Antikörper R22 und der für den HA-markierten AT1aR spezifische 12CA5-Antikörper eingesetzt. Im Immunoblot wurde für den Nachweis von CCR5 der Antikörper MC5 (0,25 μ g/ml) und für AT1aR 12CA5 (5 μ g/ml) verwendet. Als Zweitantikörper wurde Peroxidase-konjugierter Kaninchen-anti-Maus-Antikörper (1:2000) eingesetzt.

A + B: Die gezeigten Ergebnisse sind repräsentativ für mindestens drei unabhängig voneinander durchgeführte Versuche mit gleichem Ergebnis. Die neben IP aufgeführten Antikörper wurden in der Immunpräzipitation verwendet, die neben IB bezeichneten Antikörper dienen der Rezeptormarkierung im Immunoblot. Die Rezeptorbande des CCR5 wurde bei etwa 37 kDa, die des C5aR bei 43 kDa und die des AT1aR bei etwa 43 kDa detektiert.

In RBL-AT1aR/CCR5-Zellen konnte keine Coimmunpräzipitation von AT1aR mit CCR5 festgestellt werden (Abb. 27 B). Auch durch Stimulation der Zellen mit RANTES oder Angiotensin II konnte keine Rezeptor-Coimmunpräzipitation induziert werden.

2.2.1.4 Nachweis von C5aR/CCR5- und AT1aR/CCR5-Heterodimeren in BRET-Analysen

Um die Heterodimerisierung zusätzlich in intakten Zellen nachzuweisen, wurde die basale CCR5-Heterodimerbildung in BRET-Analysen untersucht.

2.2.1.4.1 Herstellung der BRET-DNA-Konstrukte

Dazu wurden zum einen die unter 2.1.1.1 hergestellten CCR5-BRET-Konstrukte verwendet und zum anderen wurden analoge GFP²-Konstrukte für C5aR und AT1aR hergestellt. C5aR wurde mit den Primern C5aR-Rluc-For und C5aR-Rluc-Back aus C5aR-pEFBos amplifiziert, C5aR-ST/A (siehe Kapitel 2.2.2.2) mit den Primern C5aR-Rluc-For und C5aR-ST/A-Rluc-Back aus dem Plasmid C5aR-ST/A-pEF1/Myc-HIS-A. Für AT1aR wurden die Primer AT1-Hind3-For und AT1-ohneStop-Bam-Back und das Plasmid AT1aR-pcDNA3 verwendet. Alle Amplifikate wurden mit *HindIII* und *BamHI* in den Luciferase kodierenden pRlucN2 und in den GFP²-kodierenden pGFP²N2 kloniert. Die Konstrukte wurden in den *E. coli*-Stamm XL1-blue transformiert, und die Basenabfolge der Plasmide wurde mittels Sequenzierung verifiziert.

2.2.1.4.2 Nachweis von Ligand-unabhängigen CCR5-Heterodimeren

Zur Bestimmung der Heterodimerisierung wurden HEK-293-Zellen mit einer gleichbleibenden Menge CCR5-Rluc und steigenden Konzentrationen der diversen GFP²-Konstrukte transient transfiziert, und es wurde das BRET-Signal wie unter Abschnitt 2.1.1 bestimmt. Zur Vergleichbarkeit wurde das halbmaximale BRET-Signal (BRET₅₀) der verschiedenen Rezeptordimere bestimmt und in der Abbildung 28 aufgetragen. Man erkennt, daß CCR5 neben der schon gezeigten Homodimerisierung

signifikante Heterodimere mit C5aR und AT1aR bildete, wobei die Affinität des CCR5 zu C5aR deutlich höher war als zu AT1aR.

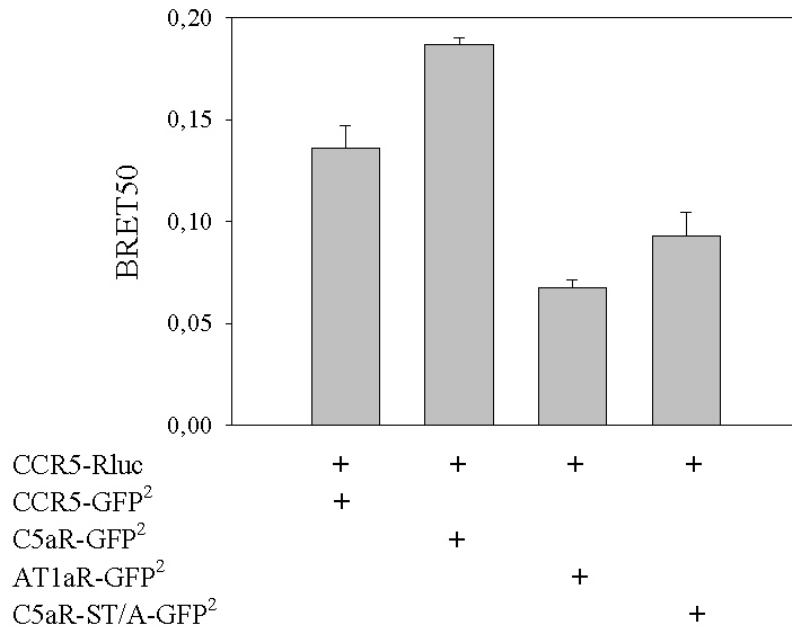


Abb. 28: Untersuchung der Heterodimerisierung von CCR5 in BRET-Analysen

HEK-293-Zellen wurden transient mit einer gleichbleibenden Menge CCR5-Rluc und steigenden Konzentrationen von CCR5-GFP², C5aR-GFP², AT1aR-GFP² oder C5aR-ST/A-GFP² transfiziert, und nach 48 h wurde der Energietransfer nach Aktivierung der Luciferase mit ihrem Substrat DeepBlueC gemessen. Das BRET-Signal ergab sich aus dem Quotienten aus GFP²-Fluoreszenz und Rluc-Lumineszenz abzüglich des BRET-Signals von Zellen, die lediglich mit dem CCR5-Rluc-Konstrukt transfiziert wurden. Die Fluoreszenzerhöhung wurde ohne Substratzugabe nach Anregung der Zellen mit einer Wellenlänge von 410 nm bei 515 nm detektiert. BRET50 gibt den halbmaximalen Energietransfer der unterschiedlichen Dimere an. Die gezeigten Ergebnisse sind Mittelwerte mit Standardfehler aus mindestens 3 Versuchen.

2.2.1.5 Heterologe CCR5-Kreuzphosphorylierung durch C5aR und AT1aR

Im Anschluß an den Nachweis der Rezeptor-Heterodimer-Bildung wurde die PKC- und GRK-vermittelte CCR5-Phosphorylierung nach heterologer Stimulation mit C5a bzw. ATII untersucht. Dazu wurden RBL-C5aR/CCR5- oder RBL-AT1aR/CCR5-Zellen mit C5a oder Angiotensin stimuliert, und es wurde die CCR5-Phosphorylierung im ELISA mit den Antikörpern V14, der die PKC-vermittelte Phosphorylierung des CCR5-Serins 337 erkennt, und dem Antikörper E11, der die GRK-vermittelte Phosphorylierung des Serins 349 detektiert, gemessen.

Die Untersuchungen zur heterologen CCR5-Phosphorylierung in RBL-C5aR/CCR5-Zellen wurden von Frau Dipl. biol. Stefanie Rethorn durchgeführt (RETHORN, 2003). In der Abbildung 29 ist die Phosphorylierung der CCR5-Serine 337 und 349 bei

unterschiedlichen Konzentrationen an Stimulus aufgetragen. Man erkennt, daß der CCR5 in RBL-C5aR/CCR5-Zellen eine deutliche C5a-induzierte heterologe Phosphorylierung sowohl des PKC-vermittelt phosphorylierten CCR5-Serins 337 als auch des GRK-vermittelt phosphorylierten Serins 349 aufwies. In RBL-AT1aR/CCR5-Zellen konnte dagegen am CCR5-Serin 337 nach Angiotensin-Stimulation nur eine schwache PKC-vermittelte Kreuzphosphorylierung und keine detektierbare GRK-vermittelte Phosphorylierung des CCR5-Serins 349 beobachtet werden.

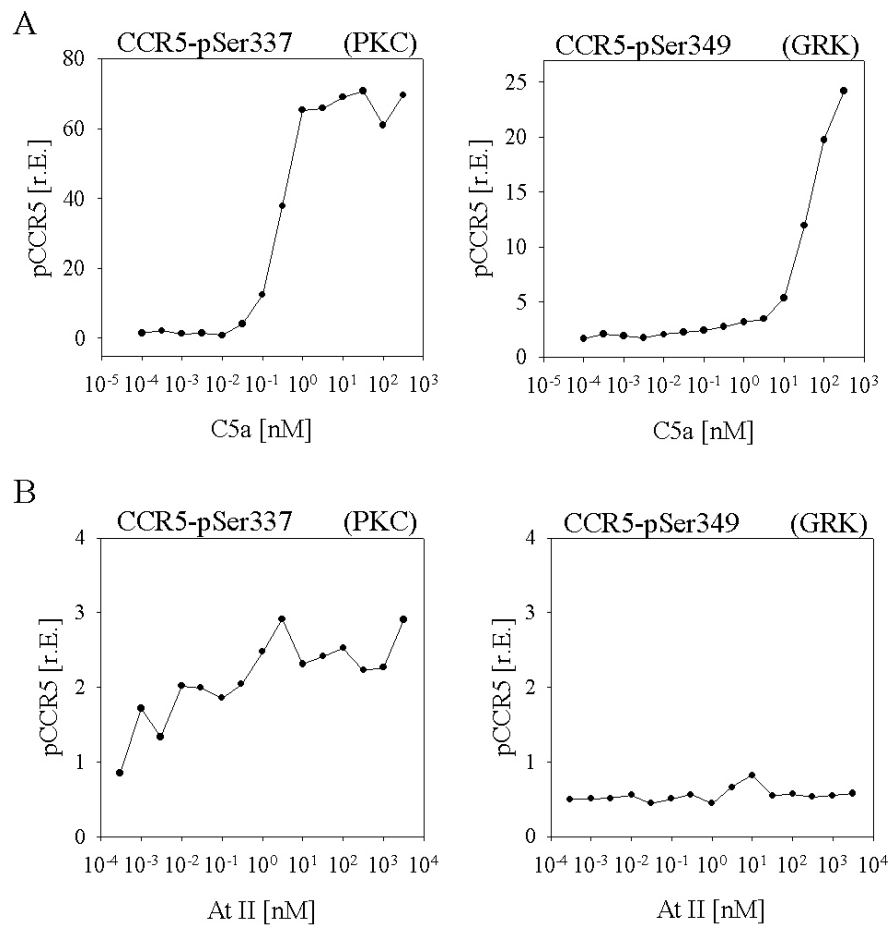


Abb. 29: Heterologe CCR5-Phosphorylierung in RBL-C5aR/CCR5- und RBL-AT1aR/CCR5-Zellen

(A) RBL-C5aR/CCR5- oder (B) RBL-AT1aR/CCR5-Zellen wurden in kleinen Schalen konfluent angezogen und für 3 min mit unterschiedlichen Konzentrationen an C5a oder Angiotensin II stimuliert. Die PKC- bzw. GRK-vermittelte Phosphorylierung des CCR5 wurde mit den biotinylierten Antikörpern V14 bzw. E11 (je 1 µg/ml) und Streptavidin-Peroxidase (1:4000) anhand eines CCR5-phospho-CT-BSA-Standards quantifiziert. Die Phosphorylierung ist angegeben als relative Einheit (r.E.). Die gezeigten Ergebnisse sind repräsentativ für je drei unabhängige Experimente mit gleichem Ergebnis.

2.2.1.6 CCR5-Cointernalisierung in RBL-C5aR/CCR5- und RBL-AT1aR/CCR5-Zellen

Um die funktionellen Konsequenzen der Heterodimerisierung weiter zu charakterisieren, wurden Cointernalisierungsexperimente durchgeführt. Dazu wurden RBL-C5aR/CCR5- oder RBL-AT1aR/CCR5-Zellen mit C5a oder Angiotensin II stimuliert, und es wurde die Expression des CCR5 auf der Zelloberfläche mit radioaktiv markiertem anti-CCR5-Antikörper T21 nachgewiesen.

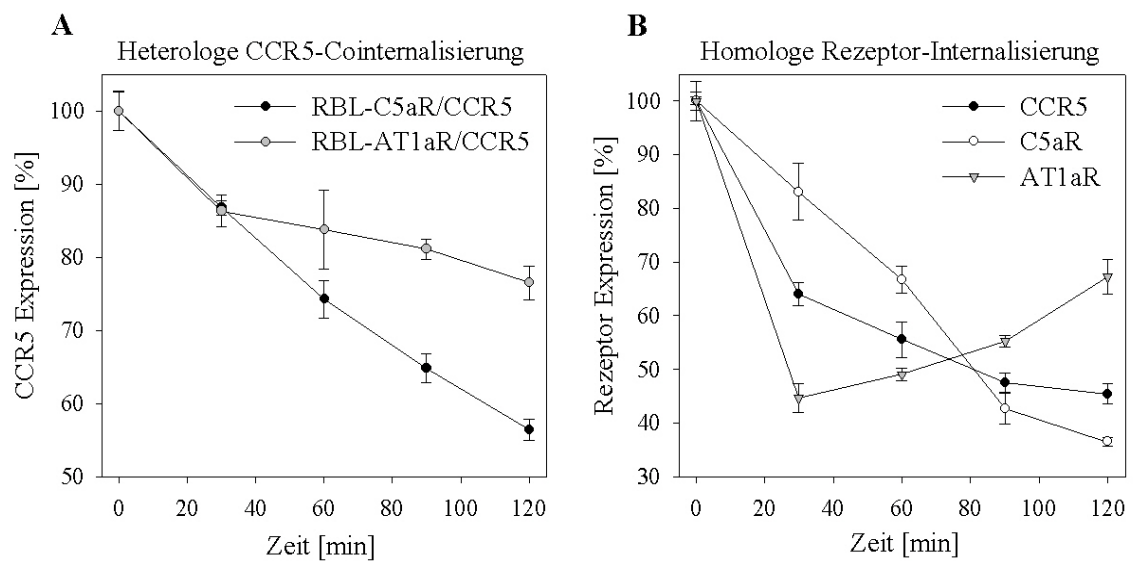


Abb. 30: Heterologe Cointernalisierung des CCR5

A: RBL-C5aR/CCR5- oder RBL-AT1aR/CCR5-Zellen wurden für unterschiedliche Zeitpunkte mit 100 nM C5a oder 100 nM Angiotensin II stimuliert, die Stimulation auf Eis abgestoppt und die Expression des CCR5 wurde durch Inkubation der Zellen mit radioaktiv markiertem anti-CCR5-Antikörper T21 für 90 min auf Eis nachgewiesen. Ungebundener Antikörper wurde durch drei Waschschritte entfernt und es wurde die Anzahl radioaktiver Zerfälle jeder Probe im Wallac-Counter gemessen.

B: Die Rezeptor-Internalisierung nach homologer Stimulation wurde wie unter A bestimmt. RBL-C5aR/CCR5-Zellen wurden dabei mit 100 nM RANTES oder 100 nM C5a stimuliert, der Nachweis des CCR5 erfolgte wie oben, die Expression des C5aR wurde mit dem radioaktiv markierten anti-C5aR-Antikörper S5/1 ermittelt. RBL-AT1aR/CCR5-Zellen wurden wie oben mit 100 nM Angiotensin II stimuliert; der Nachweis des AT1aR erfolgte hier mit unmarkiertem 12CA5-Antikörper, der wiederum mit radioaktiv markiertem Protein A nachgewiesen wurde.

A + B: Die Ergebnisse entsprechen Mittelwerten mit Standardabweichung aus drei unabhängig voneinander durchgeführten Experimenten mit triplicaten Bestimmungen.

Man erkennt in der Abb. 30 A, daß in RBL-C5aR/CCR5-Zellen nach heterologer C5a-Stimulation die Expression des CCR5 nahezu linear abnahm, wobei nach 120 min etwa 45 % des CCR5 cointernalisiert worden waren. Im Vergleich dazu wurden nach homologer RANTES-Stimulation nach 120 min etwa 55 % des CCR5 internalisiert

(Abb. 30 B). Der C5aR zeigte nach homologer C5a-Stimulation konform mit der CCR5-Cointernalisierung eine in etwa lineare Abnahme der Expression, wobei nach 120 min noch etwa 36 % des Rezeptors auf der Zelloberfläche nachzuweisen waren.

In RBL-AT1aR/CCR5-Zellen zeigte sich nach Angiotensin-Stimulation eine deutlich geringere CCR5-Cointernalisierung. Hier waren nach 30 min etwa 14 % des CCR5 cointernalisiert. Nach diesem Zeitpunkt nahm die Rezeptorexpression aber deutlich geringer ab, wobei nach 120 min etwa 23 % des CCR5 cointernalisiert waren. Im Vergleich dazu erkennt man bei der homologen AT1aR-Internalisierung nach ATII-Stimulation, daß der Rezeptor nach 30 min mit 44 % Expression maximal internalisiert war (Abb. 30 B). Nach diesem Zeitpunkt nahm die AT1aR-Expression auf der Zelloberfläche wieder leicht zu und lag nach 120 min bei etwa 67 %.

2.2.1.7 Desensibilisierung der C5aR/CCR5-Heterodimere

Schließlich wurde die Desensibilisierung der RBL-C5aR/CCR5 und RBL-AT1aR/CCR5 Doppeltransfektanten untersucht und mit den RBL-C5aR und RBL-AT1aR Einzeltransfektanten verglichen. Man erkennt in der Tabelle 7, daß sich die Expression von C5aR und AT1aR in den Einzel- und Doppeltransfektanten nicht signifikant unterschieden.

RBL-C5aR/CCR5- und RBL-C5aR-Zellen bzw. RBL-AT1aR/CCR5- und RBL-AT1aR-Zellen wurden mit 20 nM C5a bzw. 100 nM AtII stimuliert, und es wurden der Verlauf der intrazellulären Calcium-Freisetzung aufgezeichnet und die Glucosaminidase-Freisetzung der Zellen gemessen.

Man erkennt in der Abbildung 31 A, daß die RBL-C5aR/CCR5-Zellen im Vergleich mit der Einzeltransfektante RBL-C5aR nach C5a-Stimulation eine verlangsamte Desensibilisierung zeigte. Gleichzeitig wiesen die RBL-C5aR/CCR5-Zellen mit 55,8 % eine verlängerte Glucosaminidase-Freisetzung auf (Tab. 7). In einzeltransfizierten RBL-C5aR-Zellen wurden dagegen 40,9 % der Glucosaminidase freigesetzt.

In RBL-AT1aR/CCR5-Zellen konnten im Vergleich zu RBL-AT1aR-Zellen weder eine verlängerte Calcium-Freisetzung (Abb. 31 B) noch eine erhöhte NAGA-Freisetzung festgestellt werden (Tab. 7).

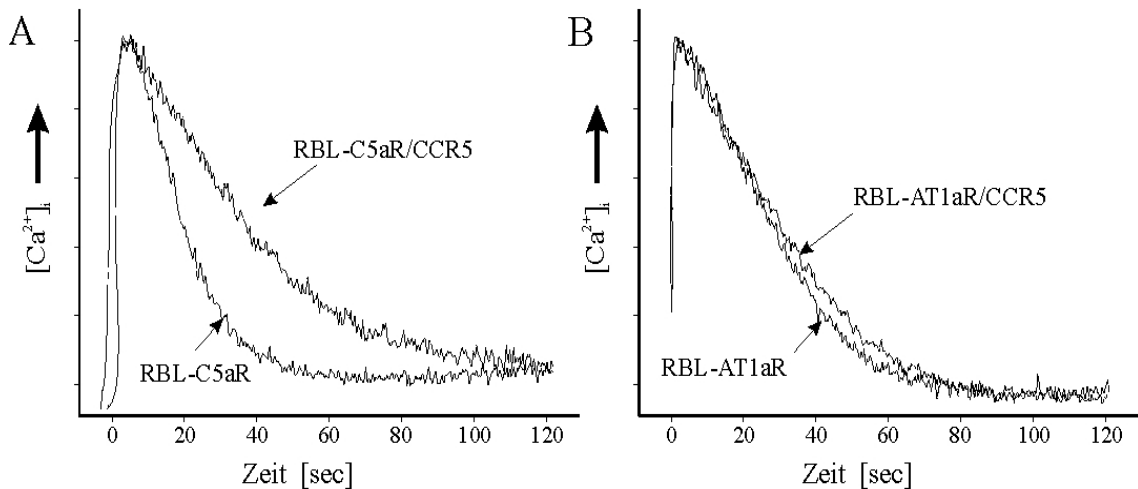


Abb. 31: Calciumionen-Freisetzung in RBL-C5aR/CCR5- und RBL-AT1aR/CCR5-Zellen

RBL-C5aR/CCR5- und RBL-C5aR-Zellen (**A**) wurden mit 20 nM C5a bzw. RBL-AT1aR/CCR5- und RBL-AT1aR Zellen (**B**) mit 100 nM Angiotensin II stimuliert, und es wurde der Verlauf der intrazellulären Calciumionen-Freisetzung aufgezeichnet. Die jeweiligen Verläufe sind repräsentativ für drei unanhängige Experimente mit gleichem Ergebnis.

2.2.2 Bedeutung des C5aR-C-Terminus für die CCR5-Regulation in CCR5/C5aR-Heterodimeren

Aufbauend auf der Charakterisierung der heterologen CCR5-Rezeptorregulation auf RBL-C5aR/CCR5-Zellen wurde nun die Bedeutung der intakten Serin-Phosphorylierungsstellen des C5aR-C-Terminus für die heterologe Interaktion mit dem CCR5 untersucht. Dazu wurde CCR5 zusammen mit phosphorylierungsdefizienten C5aR-Mutanten auf RBL-Zellen exprimiert und die Regulation des CCR5 nach C5a-Stimulation der Doppeltransfektanten untersucht.

2.2.2.1 Charakterisierung der phosphorylierungsdefizienten C5a-Rezeptoren

C5aR enthält in seinem C-Terminus 6 Serine und 4 Threonine als mögliche Phosphorylierungsstellen. Es wurde postuliert, daß die C-terminalen Serine die einzigen Phosphorylierungsstellen im C5aR darstellen (GIANNINI *et al.*; 1995).

2.2.2.1.1 Herstellung von phosphorylierungsdefizienten C5a-Rezeptoren

Aufgrund der veröffentlichten Daten wurden in einem ersten Ansatz alle sechs Serine gegen Alanin deletiert. Dazu wurde aus dem Vektor C5aR-pEFBos mit den Primern C5aR-Bam-For und C5aR-Eco-Back1 ein verkürzter C5aR amplifiziert, der drei der C-terminalen, Alanin-mutierten Serine enthielt und den N-terminalen 331 Aminosäuren entsprach (C5aR-T331). Das Amplifikat wurde mit *Bam*HI und *Eco*RV in den Vektor pEF1/Myc-HIS-A kloniert und in den *E. coli*-Stamm XL1-blue transformiert. Nach der Verifizierung der Basenabfolge mittels Sequenzierung wurde dieser verkürzte C5aR als Matrize für eine zweite PCR mit den Primern C5aR-Bam-For und C5aR-Eco-Back2 verwendet, in der der C-Terminus des Rezeptors komplettiert wurde, wobei alle Serine gegen Alanin deletiert wurden (C5aR-S/A). Aufgrund eines in der Abteilung hergestellten phosphospezifischen Antikörpers gegen das C5aR-Serin-334 wurde mit den gleichen Primern eine weitere C5aR-Mutante hergestellt, bei der das Serin 334 als einziges der sechs vorhandenen Serine nicht gegen Alanin mutagenisiert wurde (C5aR-S/A-S334). Dabei ist zu beachten, daß der Primer C5aR-Eco-Back2 an entsprechender Stelle entweder für ein Serin oder für ein Alanin codiert. Beide Amplifikate wurde wie oben mit *Bam*HI und *Eco*RV in den Vektor pEF1/Myc-HIS-A kloniert und in den *E. coli*-Stamm XL1-blue transformiert. Die Basenabfolge der mutagenisierten Rezeptoren wurde mittels Sequenzierung verifiziert.

Aufgrund der später beobachteten Fähigkeit des C5aR-S/A-Rezeptors, β -Arrestin zu binden (Abb. 33), wurden in einem weiteren Ansatz alle Serine und Threonine des C5aR gegen Alanin mutagenisiert. Dazu wurde aus dem Vektor C5aR-T331-pEF1/Myc-HIS-A mit den Primern C5aR-Bam-For und C5aR-S/A-T/A-Eco5-Back2 ein komplett phosphorylierungsdefizienter C5aR-ST/A amplifiziert. Das Amplifikat wurde wie oben in pEF1/Myc-HIS-A ligiert, in *E. coli* transformiert und sequenziert.

Zur stabilen Transfektion in RBL-2H3-Zellen wurden die verschiedenen mutagenisierten C5aR- pEF1/Myc-HIS-A-Konstrukte mit *Pvu*I linearisiert.

2.2.2.1.2 Expression der phosphorylierungsdefizienten C5a-Rezeptoren

Um die Eigenschaften der verschiedenen C5aR-Mutanten zu charakterisieren, wurden diese stabil auf RBL-2H3-Zellen exprimiert. Von jeder Zellreihe wurden mindestens 2 Klone auf ihre Funktionalität untersucht, um Artefakte zu vermeiden. Die Expression und Aktivität der Rezeptoren ist in Tabelle 8 gegeben.

Tab. 8: Expression und Aktivität der RBL-C5aR-Mutanten

Klon	MCF	EC50 [nM]
RBL-C5aR-S/A-S334 (B5.8)	48,2	2,1
RBL-C5aR-S/A (B19.2)	43,1	1,7
RBL- C5aR-ST/A (27.9)	14,5	1,8

Die Rezeptorexpression der stabil hergestellten Zellreihen wurde im FACS mit dem monoklonalen Primäntikörper S5/1, welcher gegen den C5aR-Aminoterminus gerichtet ist, und dem Sekundäntikörper Kaninchen-anti-Maus-FITC überprüft und ist als MCF (mean channel of fluorescence) angegeben. Die Aktivität der Rezeptoren ist angegeben als Konzentration an C5a, bei der der Rezeptor seine halbmaximale Glucosaminidase-Freisetzung zeigt (EC50 [nM]). Alle Werte entsprechen Mittelwerten aus mindestens zwei unabhängigen Versuchen.

Man sieht, daß der C5aR in RBL-C5aR-S/A-S334- und RBL-C5aR-S/A-Zellen in vergleichbarer Konzentration auf der Zelloberfläche exprimiert wurde. Die C5aR-Expression in RBL-C5aR-ST/A-Zellen fiel im Allgemeinen deutlich geringer aus. Alle Rezeptoren zeigten eine intakte Funktionalität in der Glucosaminidase-Freisetzung nach C5a-Stimulation.

2.2.2.1.3 Serin- und Threonin-Phosphorylierung des C5a-Rezeptors

Es wurde postuliert, daß die C-terminalen Serine die einzigen Phosphorylierungsstellen im C5aR darstellen (GIANNINI *et al.*; 1995). Um diese Aussage für die eigenen Zellen zu überprüfen, wurden 2D-Phosphoaminosäureanalysen durchgeführt, bei denen die Phosphorylierung einzelner Aminosäurearten nachgewiesen werden kann. Dazu wurden RBL-C5aR- und RBL-C5aR-S/A-Zellen für 10 min in ³²P-angereichertem Medium mit 100 nM C5a stimuliert, mittels 2D-Gelelektrophorese aufgetrennt, und die Position der einzelnen Aminosäuren wurde unter Verwendung von Aminosäurestandards lokalisiert. Man erkennt in der Abb. 32 das Autoradiogramm beider Zellreihen. RBL-C5aR-Zellen zeigten eine deutlich stärkere Phosphorylierung, was durch die im Vergleich zu den C5aR-S/A-Zellen erhöhte Rezeptorexpression und die höhere Anzahl intakter Phosphorylierungsstellen begründet werden kann. Man erkennt neben einer dominanten Phosphorylierung der Serine eine deutliche Phosphorylierung an der Position der Threonine. Auch in RBL-C5aR-S/A-Zellen fand man einen deutlichen Einbau an ³²Phosphat an Position der Threonine. Somit scheint der C5a-Rezeptor unter den

gegebenen Bedingungen entgegen Literaturberichten nicht ausschließlich an Serinen sondern auch an Threoninen phosphoryliert zu werden.

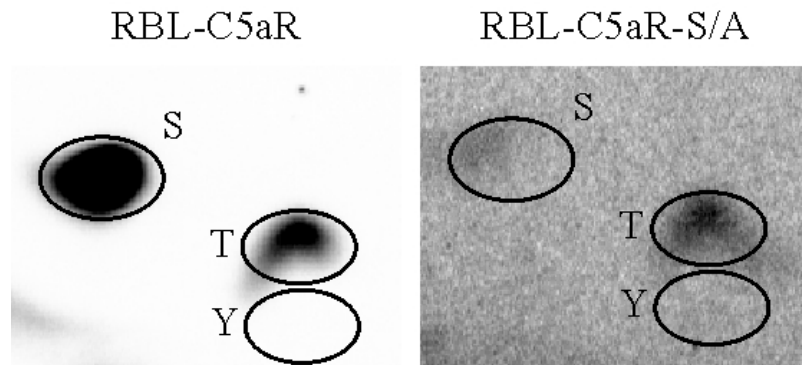


Abb. 32: Nachweis der C5aR-Phosphorylierung in der 2D-Gelelektrophorese

RBL-C5aR- und RBL-C5aR-S/A-Zellen, mit Austausch aller C-terminalen Serine gegen Alanin, wurden in 32 Phosphat-Medium für 10 min mit 100 nM C5a stimuliert, lysiert und der C5aR wurde mittels Immunpräzipitation mit dem Antikörper S5/1 aufgereinigt. Der Rezeptor wurde mittels SDS-PAGE aufgetrennt, auf eine Nitrozellulosemembran übertragen und mittels Autoradiographie lokalisiert. Der Rezeptor wurde aus der Membran ausgeschnitten, proteolysiert und zusammen mit Aminosäurestandards für Serin, Threonin und Tyrosin in der 2D-Gelelektrophorese aufgetrennt. Nach der Markierung der Position der Aminosäurestandards wurde das in den Rezeptor eingebaute 32 Phosphat mittels Autoradiographie detektiert.

2.2.2.1.4 Bedeutung der C-terminalen Serine und Threonine für die β -Arrestin-Bindung des C5a-Rezeptors

Aufbauend auf den Phosphorylierungsstudien wurde die Fähigkeit der verschiedenen phosphorylierungsdefizienten C5aR-Mutanten untersucht, β -Arrestin an die Membran zu rekrutieren. Man sieht in der Abbildung 33, daß die RBL-C5aR-S/A-Mutante mit Austausch aller sechs Serine entgegen der Literatur durchaus in der Lage war, nach Stimulation mit 20 nM C5a β -Arrestin an die Membran zu rekrutieren. Dagegen war die RBL-C5aR-ST/A-Mutante mit Austausch aller Serine und Threonine nicht mehr zur β -Arrestin-Bindung befähigt. In RBL-C5aR-S/A-S334-Zellen konnte ebenfalls eine intakte β -Arrestin-Translokation beobachtet werden (Daten nicht gezeigt).

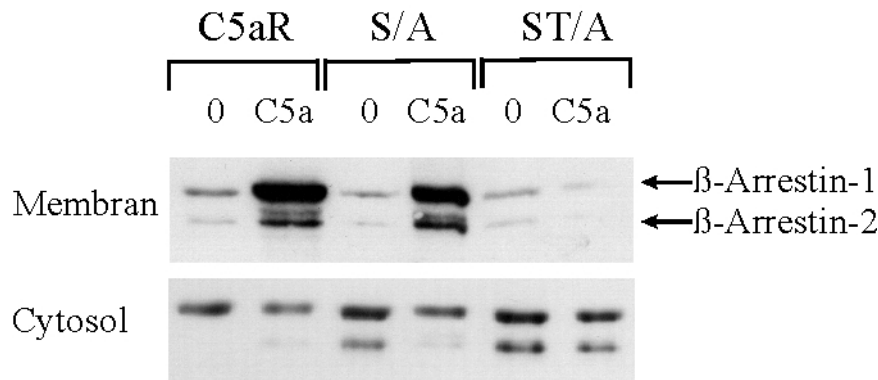


Abb. 33: β-Arrestin-Translokation in RBL-C5aR-Mutanten

RBL-C5aR-, RBL-C5aR-S/A- und RBL-C5aR-ST/A-Zellen wurden für 3 min mit 20 nM C5a stimuliert, und es wurde die β-Arrestin-Translokation an die Membran nachgewiesen. Dazu wurden die Membran und das Cytosol der lysierten Zellen mit einem Sucrosegradienten isoliert, mittels SDS-PAGE aufgetrennt und auf eine Nitrozellulosemembran transferiert. Der Nachweis erfolgte mit dem anti-β-Arrestin-1-Antikörper (1:500) und dem sekundären Peroxidase-konjugierten Kaninchen-anti-Maus-Antikörper P260 (1:2000). Der Nachweis des ECL-Signals erfolgte auf einem Photofilm. Das gezeigte Ergebnis ist repräsentativ für drei Versuche mit gleichem Ergebnis.

2.2.2.1.5 Bedeutung der C-terminalen Serine und Threonine für die Internalisierung des C5a-Rezeptors

Nach der Fähigkeit der Rezeptoren, β-Arrestin an die Membran zu rekrutieren, wurde die Internalisierung der C5aR-Mutanten untersucht. Dazu wurden RBL-C5aR-, RBL-C5aR-S/A-S334-, RBL-C5aR-S/A- und RBL-C5aR-ST/A-Zellen mit radioaktiv markiertem C5a stimuliert und es wurde die Aufnahme an Stimulus zu verschiedenen Zeitpunkten ermittelt. Man sieht in der Abbildung 34, daß RBL-C5aR- und RBL-C5aR-S/A-S334-Zellen einen nahezu identischen Verlauf der Internalisierung zeigten. Nach drei Minuten waren 35 % bzw. 32 % des gebundenen Stimulus internalisiert, nach zehn Minuten waren es bereits 69 % bzw. 72 %. Die RBL-C5aR-S/A- und RBL-C5aR-ST/A-Zellen wiesen dagegen trotz unterschiedlicher Fähigkeiten, β-Arrestin an die Membran zu rekrutieren, beide einen Defekt in der schnellen Internalisierung auf. Hier waren nach drei Minuten gerade 6 % bzw. 7 % des Stimulus internalisiert, nach zehn Minuten lag die Internalisierung bei 34 % bzw. 27 %.

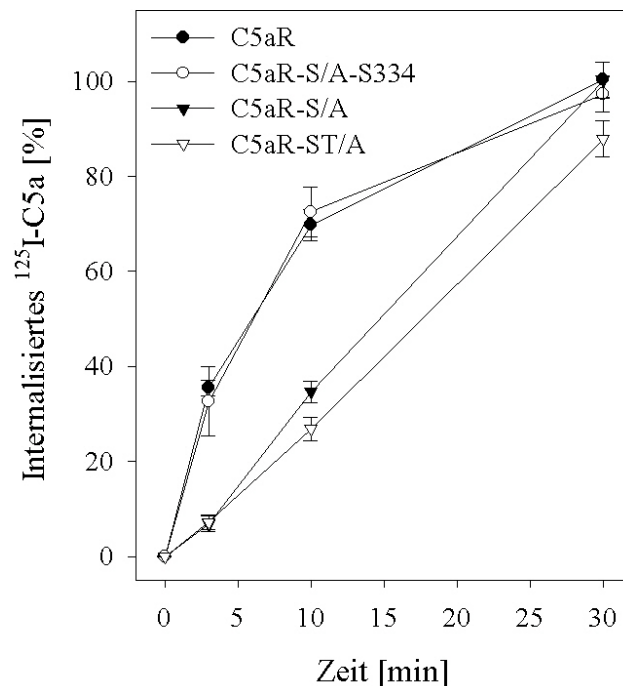


Abb. 34: Internalisierung der phosphorylierungsdefizienten C5a-Rezeptormutanten

RBL-C5aR-, RBL-C5aR-S/A-S334-, RBL-C5aR-S/A- und RBL-C5aR-ST/A-Zellen wurden für 90 min mit radioaktiv markiertem C5a inkubiert, ungebundener Stimulus wurde durch Waschen entfernt, und die Zellen wurden für unterschiedliche Zeitpunkte nach 37°C transferiert. Die Internalisierung ergibt sich aus dem Anteil säureresistenter Aktivität dividiert durch die insgesamt zellassoziierte Aktivität der Zellen nach Abzug der unspezifischen Ligandbindung. Die gezeigten Ergebnissen entsprechen Mittelwerten mit Standardfehler aus drei unabhängigen Messungen in dreifacher Ausführung.

2.2.2.1.6 Bedeutung der C-terminalen Serine und Threonine für die Desensibilisierung des C5a-Rezeptors

Aufgrund des Defekts in der schnellen Internalisierung wurde die Desensibilisierung der C5aR-S/A- und C5aR-ST/A-Mutanten untersucht. Dazu wurden die Zellen mit 20 nM C5a stimuliert, und es wurde der Verlauf der intrazellulären Calciumionen-Freisetzung aufgezeichnet. Man sieht in der Abbildung 35, daß beide phosphorylierungsdefiziente Rezeptoren eine verlängerte Freisetzung an Calcium aufwiesen. Die Zeitkonstanten lagen bei 22,2 sec für RBL-C5aR-S/A- und bei 20,3 sec bei RBL-C5aR-ST/A-Zellen im Vergleich zu RBL-C5aR-Zellen mit 14,0 sec. Außerdem zeigten beide mutagenisierte Rezeptoren eine verstärkte Freisetzung von Glucosaminidase (Daten nicht gezeigt).

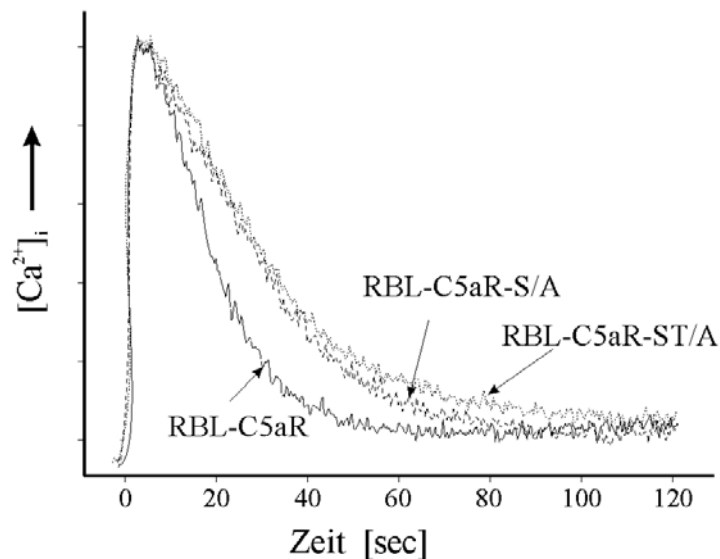


Abb. 35: Verlauf der intrazellulären Calcium-Freisetzung in RBL-C5aR-Mutanten

RBL-C5aR-, RBL-C5aR-S/A- und RBL-C5aR-ST/A-Zellen wurden dem Chelatbildner Fluo3AM beladen, gewaschen und mit 20 nM C5a stimuliert. Es wurde der Verlauf der intrazellulären Calciumionen-Freisetzung aufgezeichnet. Die gezeigten Verläufe entsprechen repräsentativen Kurven aus mindestens drei unabhängigen Messungen in Doppelbestimmungen.

2.2.2.2 Heterologe CCR5-Regulation durch phosphorylierungsdefiziente C5a-Rezeptoren

Um schließlich den Einfluß der mutagenisierten C5a-Rezeptoren auf die Kreuzregulation des CCR5 zu untersuchen, wurden die Rezeptoren zusammen mit CCR5 auf RBL-2H3-Zellen coexprimiert, und es wurde die Kreuzregulation des CCR5 nach heterologer C5a-Stimulation untersucht.

2.2.2.2.1 Herstellung und Expression der RBL-CCR5/C5aR-S(T)/A-Zellen

Zur Darstellung der C5aR/CCR5-Zellreihen wurden die unter 2.2.2.1.1 synthetisierten, phosphorylierungsdefizienten C5aR-Mutanten zusammen mit dem mit *ScaI* linearisierten CCR5-pEF-Bos stabil in RBL-2H3-Zellen transfiziert.

Die Tabelle 9 zeigt die Expression und Aktivität der verschiedenen Zellreihen. Man erkennt, daß der C5aR-ST/A im Vergleich zu den C5aR-S/A-S334 und C5aR-S/A-Mutanten nur schwach exprimiert wurde, aber trotzdem eine vergleichbare Rezeptoraktivität aufwies. Der CCR5 zeigte trotz zum Teil geringer Expression auf allen Zellreihen eine mit RBL-CCR5-Zellen vergleichbare Funktionalität und

Desensibilisierung gemessen durch die maximale Glucosaminidase-Freisetzung und Freisetzung von intrazellulären Calciumionen nach RANTES-Stimulation (Daten nicht gezeigt).

Tab. 9: Rezeptorexpression der RBL-CCR5/C5aR-S(T)/A-Zellen

Klon	MCF		EC50
	C5aR :		
RBL-C5aR-S/A-S334 + CCR5 (B2.9)	C5aR :	29,9	2,4
	CCR5 :	8,7	14,8
RBL-C5aR-S/A + CCR5 (C17.3.11)	C5aR :	30,1	2,1
	CCR5 :	45,8	11,0
RBL-C5aR-ST/A + CCR5 (37.3)	C5aR :	3,0	1,7
	CCR5 :	24,5	18,5

Die Rezeptorexpression der stabil hergestellten Zellreihen wurde im FACS mit den monoklonalen Primärantikörpern S5/1, der den C5aR-Aminoterminus bindet, und T21, welcher gegen den CCR5-Aminoterminus gerichtet ist, und dem Sekundärantikörper Ziege-anti-Maus-FITC überprüft und ist als MCF (mean channel of fluorescence) angegeben. Die Rezeptoraktivität der Zellreihen wurde im NAGA bestimmt und ist als halbmaximale Aktivität EC50 [nM Stimulus] angegeben. Alle Werte stellen den Mittelwert aus mindestens drei unabhängigen Messungen dar.

2.2.2.2.2 Nachweis der Heterodimerisierung von CCR5 und C5aR-ST/A mittels BRET-Analysen

Um zu überprüfen, ob die Heterodimerisierung von CCR5 mit C5aR abhängig von den C-terminalen Phosphorylierungsstellen des C5aR ist, wurde die Heterodimerisierung von CCR5 und C5aR-ST/A in BRET-Analysen überprüft (Abb. 28, Seite 99). Es zeigte sich ein relativ niedriges BRET50-Signal des Heterodimers von 0,9 im Vergleich zu 1,9 des CCR5/C5aR-Heterodimers. Dieses reduzierte BRET-Signal könnte auf die beobachtete reduzierte Expression der C5aR-ST/A-Mutante zurückzuführen sein, wodurch womöglich mehr CCR5/CCR5-Homodimere als CCR5/C5aR-ST/A-Heterodimere gebildet wurden und das BRET-Signal dadurch geringer ausfiel. Offensichtlich ist der Alanin-mutagenisierte C5aR-ST/A jedoch noch in der Lage, Heterodimere mit CCR5 auszubilden (Abb. 28).

2.2.2.2.3 Bedeutung der C-terminalen Serine und Threonine des C5aR für die heterologe CCR5-Kreuzphosphorylierung

Aufgrund der in RBL-C5aR/CCR5-Zellen beobachteten GRK-vermittelten Phosphorylierung des CCR5 nach heterologer C5a-Stimulation (Abb. 29) wurde überprüft, ob diese Kreuzphosphorylierung einen intakten C5aR-C-Terminus voraussetzt.

Dazu wurden RBL-CCR5/C5aR-ST/A- und RBL-CCR5/C5aR-S/A-Zellen für 3 min mit unterschiedlichen Konzentrationen an C5a stimuliert, und es wurde die PKC-vermittelte (V14) und GRK-vermittelte (E11) Phosphorylierung des CCR5 untersucht.

Man erkennt in der Abbildung 36 A, daß der CCR5 in RBL-CCR5/C5aR-ST/A-Zellen zwar eine deutliche PKC-Phosphorylierung aber keine signifikante GRK-Phosphorylierung zeigte. Durch die geringe Expression des C5aR-ST/A (Tab. 9) ist dabei jedoch anzunehmen, daß die GRK-Kreuzphosphorylierung durch die geringe Zahl an Rezeptordimeren unter der Nachweisgrenze des Tests liegt. Daher wurde die CCR5-Phosphorylierung in RBL-CCR5/C5aR-S/A-Zellen untersucht. Hier konnte man nach C5a-Stimulation neben einer PKC-vermittelten auch eine signifikante GRK-vermittelte Kreuzphosphorylierung des CCR5 beobachten (Abb. 36 A).

Aufgrund der verzögerten Desensibilisierung des C5aR-ST/A (Abb. 35) wurde der zeitliche Verlauf der PKC-vermittelten CCR5-Kreuzphosphorylierung untersucht. Dazu wurden RBL-CCR5/C5aR-ST/A- und RBL-CCR5/C5aR-Zellen für unterschiedliche Zeitpunkte mit 0,2 nM C5a stimuliert, und es wurde mit dem Antikörper V14 die PKC-vermittelte Phosphorylierung des CCR5-Serin 337 gemessen. Man erkennt in der Abb. 36 B, daß die PKC-Phosphorylierung in RBL-CCR5/C5aR-Zellen einen sehr transienten Prozeß darstellte, wobei die Phosphorylierung nach 2 min schon nahezu auf ihren unstimulierten Ausgangswert zurückgegangen war. In RBL-CCR5/C5aR-ST/A-Zellen wurde die Phosphorylierung dagegen deutlich verlangsamt abgebaut. Hier erreichte die Phosphorylierung erst nach etwa 15 min ihren Ausgangswert. Dieses Ergebnis ist ein möglicher Hinweis auf die verzögerte Desensibilisierung des C5aR-ST/A, der länger in einer aktiven und phosphorylierten Konformation verbleibt.

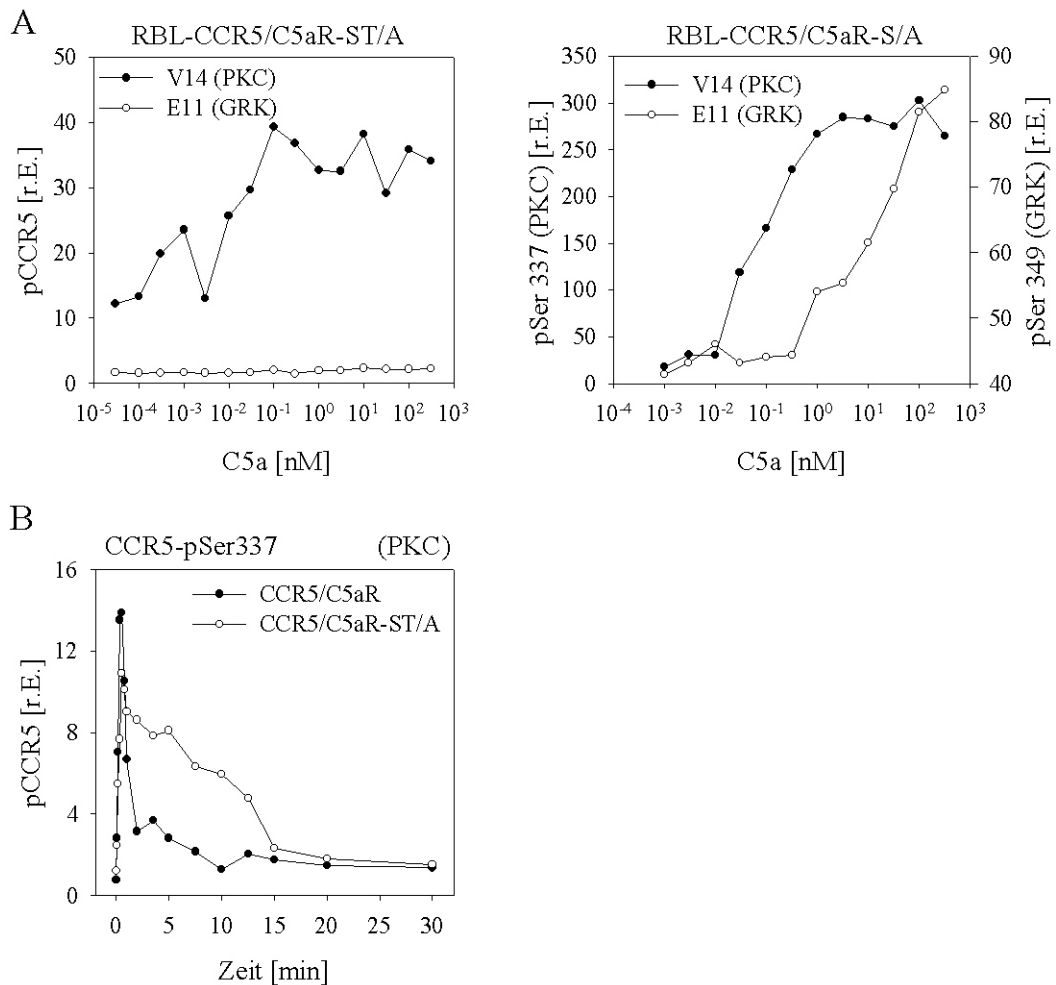


Abb. 36: CCR5-Kreuzphosphorylierung durch C5aR-S/A und C5aR-ST/A

A: RBL-CCR5/C5aR-ST/A- und RBL-CCR5/C5aR-S/A-Zellen wurden in kleinen Schalen konfluent angezogen und für 3 min mit unterschiedlichen Konzentrationen an C5a stimuliert. Die PKC- bzw. GRK-vermittelte Phosphorylierung des CCR5 wurde mit den biotinylierten Antikörpern V14 bzw. E11 (je 1 µg/ml) und Streptavidin-Peroxidase (1:4000) anhand eines CCR5-phospho-CT-BSA-Standards quantifiziert. Die Phosphorylierung ist angegeben als relative Einheit (r.E.).

B: RBL-CCR5/C5aR-ST/A- und RBL-CCR5/C5aR-Zellen wurden für unterschiedliche Zeitpunkte mit 0,2 nM C5a stimuliert und es wurde wie unter (A) die PKC-vermittelte Phosphorylierung des CCR5 bestimmt.

A + B: Gezeigt ist ein repräsentatives Experiment von drei durchgeführten mit gleichem Ergebnis.

2.2.2.2.4 Bedeutung der C-terminalen Serine und Threonine des C5aR für die heterologe CCR5-Cointernalisierung

Aufbauend auf der Beobachtung, daß der CCR5 in RBL-C5aR/CCR5 Zellen nach heterologer C5a-Stimulation cointernalisiert wurde (Abb. 30 A), wurde überprüft, ob diese Cointernalisierung abhängig von dem intakten C5aR-C-Terminus ist.

Dazu wurden RBL-CCR5/C5aR-S/A-S334-, RBL-CCR5/C5aR-S/A- und RBL-CCR5/C5aR-ST/A-Zellen für unterschiedliche Zeitpunkte mit 100 nM C5a stimuliert, und es wurde die Oberflächenexpression des CCR5 mit radioaktiv markiertem T21 bestimmt.

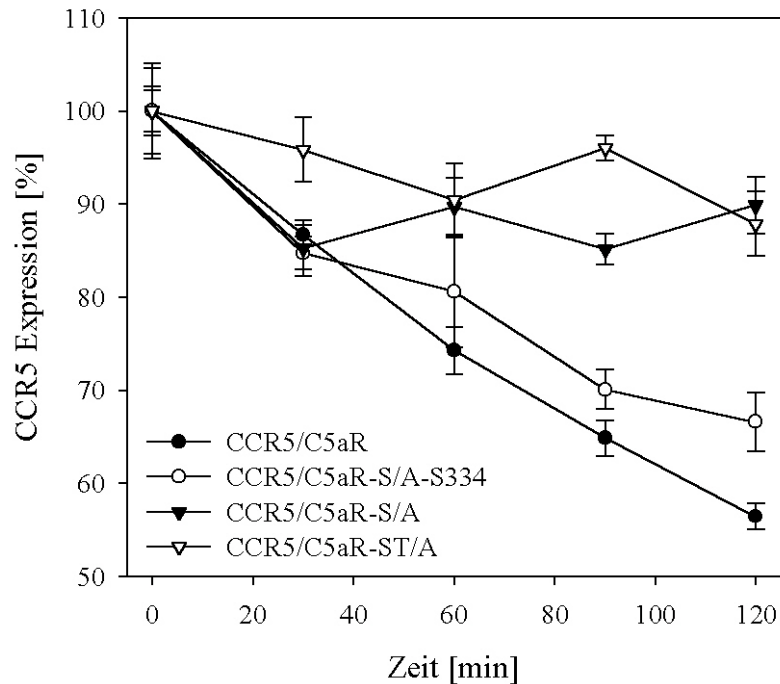


Abb. 37: CCR5-Cointernalisierung durch C5aR-S/A und C5aR-ST/A

RBL-CCR5/C5aR-, RBL-CCR5/C5aR-S/A-S334-, RBL-CCR5/C5aR-S/A- und RBL-CCR5/C5aR-ST/A-Zellen wurden für unterschiedliche Zeitpunkte mit 100 nM C5a stimuliert, die Stimulation auf Eis abgestoppt und die Expression des CCR5 wurde durch Inkubation der Zellen mit radioaktiv markiertem anti-CCR5-Antikörper T21 für 90 min auf Eis nachgewiesen. Ungebundener Antikörper wurde durch drei Waschschritte entfernt und es wurde die Anzahl radioaktiver Zerfälle jeder Probe im Wallac-Counter gemessen. Die Ergebnisse entsprechen Mittelwerten mit Standardfehler aus drei unabhängig voneinander durchgeführten Experimenten mit triplikaten Bestimmungen.

Man erkennt in der Abbildung 37, daß der CCR5 auf RBL-CCR5/C5aR-S/A- und RBL-CCR5/C5aR-ST/A-Zellen keine signifikante Cointernalisierung zeigte. Diese Beobachtung war in RBL-CCR5/C5aR-ST/A-Zellen wahrscheinlich nicht nur auf die geringe C5aR-ST/A-Expression zurückzuführen, da der C5aR-S/A, der in der vorangegangenen Charakterisierung der phosphorylierungsdefizienten C5a-Rezeptoren eine vergleichbare Aktivität mit dem C5aR-ST/A aufwies, in der RBL-CCR5/C5aR-S/A-Zellreihe eine ausreichende Expression zeigte, um den CCR5 signifikant beeinflussen zu können (Tab. 9). In RBL-CCR5/C5aR-S/A-S334-Zellen zeigte der

CCR5 nach C5a-Stimulation dagegen eine deutliche Cointernalisierung, die nach 120 min eine Expressionsreduktion von 32 % erreichte.

In der Zusammenschau mit den Ergebnissen zur homologen C5aR-Internalisierung konnten demnach alle C5aR-Mutanten, die eine schnelle, homologe Internalisierung zeigten (Abb. 34), ebenfalls den CCR5 nach heterologer Stimulation cointernalisieren.

2.2.3 Heterologe CCR5-Cointernalisierung mit einer konstitutiv internalisierenden C5aR-US28_{CT}-Rezeptor-Chimäre

Der GPCR US28 ist ein viraler Rezeptor des humanen Cytomegalievirus, der eine konstitutive Internalisierung auch in Abwesenheit externer Stimuli aufweist. Es konnte gezeigt werden, daß dieses Internalisierungsverhalten allein durch den Rezeptor-C-Terminus determiniert wird, da sich dieses durch den Transfer des US28-C-Terminus auf den Tachykinin-NK₁-Rezeptor und den ORF74 übertragen ließ (WALDHOER *et al.*, 2003). Um zu testen, ob der Transfer des US28-C-Terminus auf den C5aR einen ebenfalls konstitutiv internalisierenden Rezeptor hervorbringt und ob dieser weiterhin Dimere mit CCR5 bilden und CCR5 gegebenenfalls auch cointernalisieren kann, wurde eine C5aR-US28_{CT}-Rezeptorchimäre erstellt und diese gemeinsam mit CCR5 auf RBL-2H3-Zellen stabil exprimiert.

2.2.3.1 Herstellung der C5aR-US28_{CT}-Chimäre

Die 59 C-terminalen Aminosäuren des US28 wurden hinter das NPIIY-Motiv am Ende der siebten Transmembranregion des C5aR kloniert, wobei die 46 C-terminalen Aminosäuren des C5aR deletiert wurden. Die US28-pcDNA3.1-DNA wurde freundlicherweise von Frau Dr. Uta E. Höpken (Max Delbrück Zentrum für Molekulare Medizin, Berlin) zur Verfügung gestellt. Der etwa 180 bp große US28-C-Terminus wurde mit den Primern US28-890-Fse-For und US28-Eco5-Back amplifiziert, aufgereinigt und mit *FseI* und *EcoRV* restrigiert. Aus dem Vektor C5aR-pcDNA3 wurde der C5aR-N-Terminus mit *KpnI* und *FseI* ausgeschnitten, und beide Rezeptorfragmente wurden in den mit *KpnI* und *EcoRV* linearisierten Vektor pEF1/Myc-HIS-A ligiert. Nach der Transformation in den *E. coli*-Stamm XL1-blue wurde die Basenpaarabfolge der C5aR-US28_{CT}-Chimäre durch Sequenzieren verifiziert.

Zur Erstellung stabiler RBL-Zellreihen wurde die C5aR-US28_{CT}-pEF1/Myc-HIS-A-DNA mit *PvuI* und die CCR5-pEFBos-DNA mit *ScaI* linearisiert und mittels Elektroporation gemeinsam in RBL-2H3-Zellen transfiziert.

2.2.3.2 Rezeptorexpression in RBL-C5aR-US28_{CT}/CCR5-Zellen

Es wurden je zwei stabile Zellreihen RBL-C5aR-US28_{CT} und RBL-C5aR-US28_{CT}/CCR5 charakterisiert. Unter etwa 200 getesteten RBL-Zellklonen fand sich nicht einer, der eine nennenswerte C5aR-Oberflächenexpression aufwies. Dies zeigt, daß die C5aR-US28_{CT}-Rezeptormutante nahezu ausschließlich intrazellulär exprimiert wird. Die Expression der Rezeptoren ist in der Tabelle 10 und Abbildung 38 wiedergegeben. Man sieht, daß bei nicht permeabilisierten Zellen nur eine geringe Expression an C5aR-US28_{CT} auf der Zelloberfläche zu detektieren war, die nahe der FACS-Negativ-Kontrolle lag (Abb. 38 A). Der CCR5 wurde dagegen mit einem MCF von 21,3 in robuster Konzentration auf der Oberfläche exprimiert (Abb. 38 A).

Tab. 10: Expression der RBL-C5aR-US28_{CT}-Zellreihen

Klon	MCF	
	RBL-C5aR-US28 _{CT} (14.1)	C5aR :
	C5aR perm :	17,2
RBL-C5aR-US28 _{CT} + CCR5 (12.7)	C5aR :	3,1
	C5aR perm :	30,3
	CCR5 :	21,3
	CCR5 perm :	26,7

Die Expression des C5aR-US28_{CT} und CCR5 wurden im FACS mit 10 µg/ml des Primär-Antikörpers S5/1 bzw. T21 und dem Sekundäntikörper Ziege-Anti-Maus-FITC (1:100) überprüft. Die Markierung der Zellen erfolgte dabei in FACS-Puffer oder im permeabilisierenden Saponin-Puffer (perm). MCF gibt die Expression der Rezeptoren als „mean channel of fluorescence“ an. Die Werte entsprechen Mittelwerten aus mindestens drei unabhängigen Messungen.

In permeabilisierten Zellen (Tab. 10 und Abb. 38 B) fand sich dagegen eine stabile Expression der C5aR-US28_{CT}-Chimäre mit einem MCF von 30,3, die Expression des CCR5 betrug 26,7.

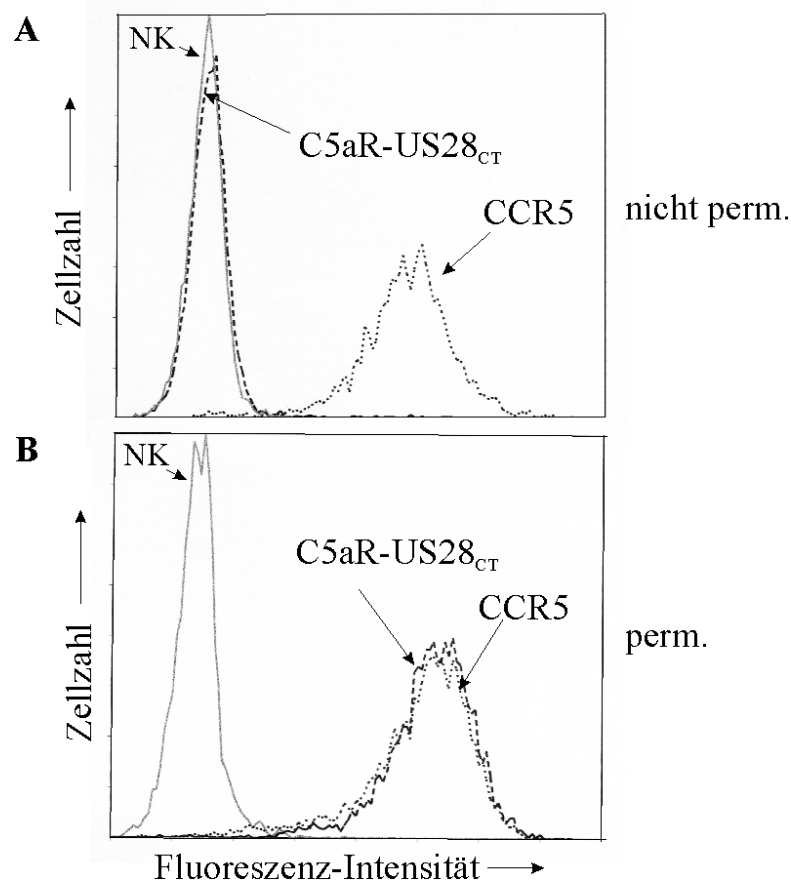


Abb. 38: Rezeptorexpression in RBL-C5aR-US28_{CT}/CCR5-Zellen

Die Expression des C5aR-US28_{CT} und CCR5 wurde in nicht permeabilisierten (A) und permeabilisierten (B) RBL-Zellen im FACS überprüft. Die Markierung der Rezeptoren erfolgte mit den Primärantikörpern S5/1 (C5aR-US28_{CT}) und T21 (CCR5) in einer Konzentration von 10 µg/ml und mit dem Sekundärantikörper Ziege-Anti-Maus-FITC (1:100). Als Negativkontrolle (NK) dienten Zellen, die lediglich mit Sekundärantikörper markiert wurden. Gezeigt ist ein repräsentatives Experiment von vier durchgeführten gleichen Ergebnisses.

2.2.3.3 Nachweis der konstitutiven CCR5-Cointernalisierung mit der C5aR-US28_{CT}-Chimäre in der Konfokalmikroskopie

Um die Rezeptoren in der Zelle zu lokalisieren und eine mögliche Cointernalisierung des CCR5 zu untersuchen, wurden die Rezeptoren in RBL-C5aR/CCR5- und RBL-C5aR-US28_{CT}/CCR5-Zellen mit Antikörpern markiert und die Expression mittels konfokaler Lasermikroskopie analysiert. Man sieht in der Abbildung 39 A, daß in nicht permeabilisierten RBL-C5aR/CCR5-Zellen eine deutliche Ringfluoreszenz beider Rezeptoren vorlag. Auch in permeabilisierten Zellen waren nur wenige Rezeptoren intrazellulär lokalisiert. In RBL-C5aR-US28_{CT}/CCR5-Zellen (Abb. 39 B) war in nicht permeabilisierten Zellen nur eine sehr geringe Expression des C5aR-US28_{CT} zu erkennen während der CCR5 gemäß der FACS-Analysen eine deutliche Oberflächenexpression

zeigte. In permeabilisierten RBL-C5aR-US28_{CT}/CCR5-Zellen sah man dagegen eine deutliche cytosolische Lokalisation des C5aR-US28_{CT}.

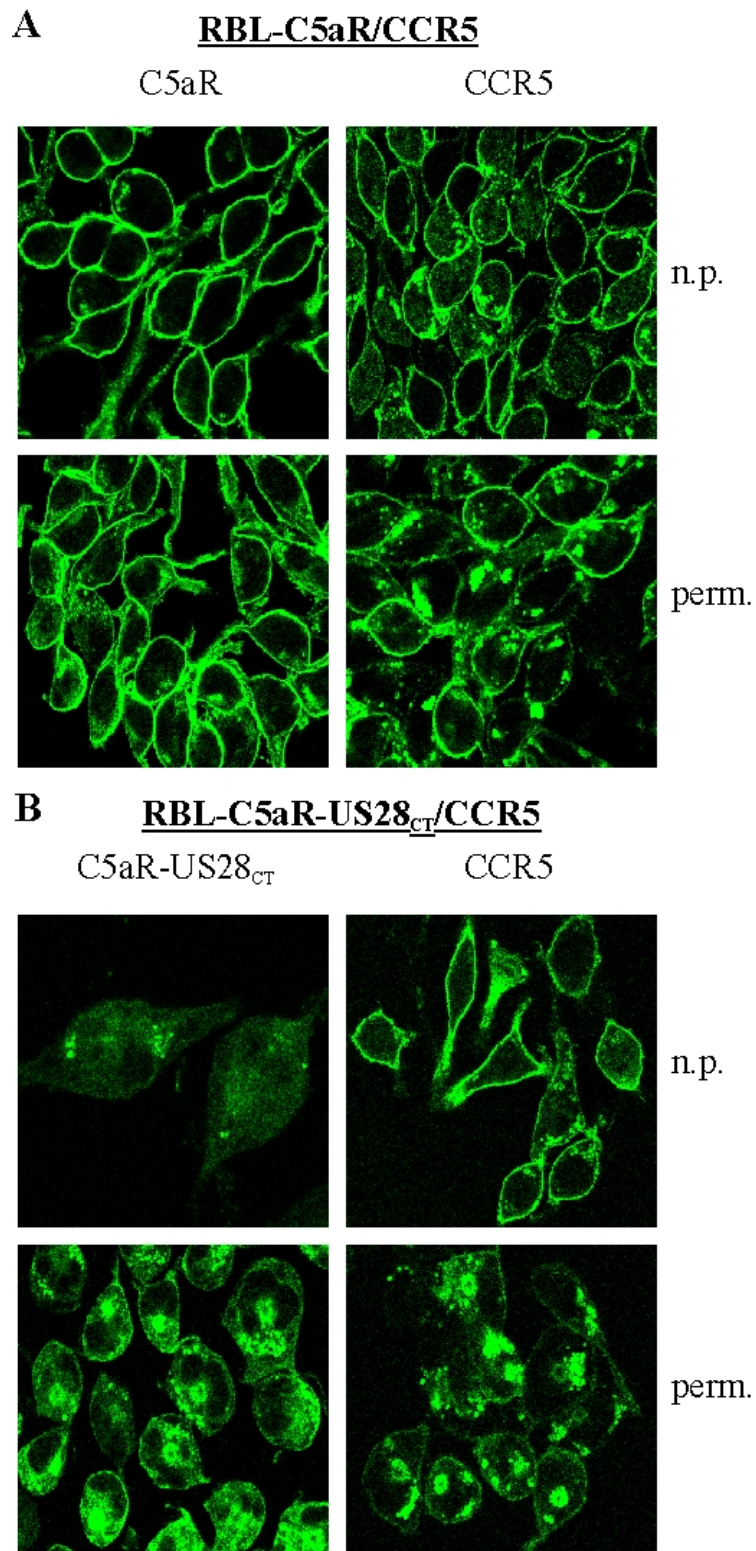


Abb. 39: Rezeptorlokalisierung in RBL-C5aR-US28_{CT}/CCR5-Zellen

RBL-C5aR/CCR5-Zellen (**A**) und RBL-C5aR-US28_{CT}/CCR5-Zellen (**B**) wurden auf einem Deckglas über Nacht angezogen, und die Rezeptoren wurden auf nicht permeabilisierten (n.p.)

oder in permeabilisierten Zellen (perm.) mit den Primärantikörpern S5/1 (C5aR bzw. C5aR-US28_{CT}) und T21 (CCR5) in einer Konzentration von 10 µg/ml und mit dem Sekundärantikörper Ziege-Anti-Maus-FITC (1:100) markiert. Die Analyse der Zellen erfolgte mit dem konfokalen Lasermikroskop bei einer Fluorochrom-Anregungswellenlänge von 488 nm. Gezeigt sind repräsentative Ausschnitte von vier unabhängig durchgeführten Experimenten gleichen Ergebnisses.

Auch der CCR5 zeigte eine verstärkte cytosolische Expression im Vergleich mit RBL-C5aR/CCR5-Zellen (Abb. 39 B).

Um die Colokalisation von C5aR-US28_{CT} und CCR5 in den Zellen zu überprüfen, wurden Doppelfärbungen der RBL-C5aR/CCR5- und RBL-C5aR-US28_{CT}/CCR5-Zellen angefertigt. Dabei wurde C5aR bzw. C5aR-US28_{CT} mit dem in der Abteilung vorhandenen anti-C5aR-Antikörper S5/1-FITC direkt markiert. CCR5 wurde über den biotinylierten T21-anti-CCR5-Antikörper und Streptavidin-Cy3 angefärbt. Als Kontrolle, daß bei den gegebenen Wellenlängen spezifisch nur FITC bzw. Cy3 detektiert werden, wurden Experimente durchgeführt, bei denen RBL-C5aR/CCR5-Zellen mit jeweils nur einem Fluorochrom markiert wurden, und es wurde die Fluoreszenz in beiden Parametereinstellungen gemessen. Hier zeigte sich, daß die einzelnen Fluorochrome keine unspezifische Streuung in den jeweils anderen Meßbereich aufwiesen (Daten nicht gezeigt).

Man sieht in der Abbildung 40 A, daß in RBL-C5aR/CCR5-Zellen beide Rezeptoren sowohl in nicht permeabilisierten als auch in permeabilisierten Zellen eine deutliche Colokalisation auf der Zelloberfläche zeigten. In nicht permeabilisierten RBL-C5aR-US28_{CT}/CCR5-Zellen war konform zu der Einzelfärbung der Zellen keine markante C5aR-US28_{CT}-Expression zu erkennen. In permeabilisierten Zellen konnte eine schwache CCR5-Oberflächenexpression und eine dicht unter der Zellmembran liegende C5aR-US28_{CT}-Expression detektiert werden. Weiterhin zeigte sich eine Colokalisation beider Rezeptoren in vesikelartigen Strukturen innerhalb der Zelle (Abb. 40 B).

Zusammenfassend deuten die mikroskopischen Analysen der RBL-C5aR-US28_{CT}/CCR5-Zellen auf eine Cointernalisierung des CCR5 zusammen mit dem offensichtlich konstitutiv internalisierenden C5aR-US28_{CT} hin.

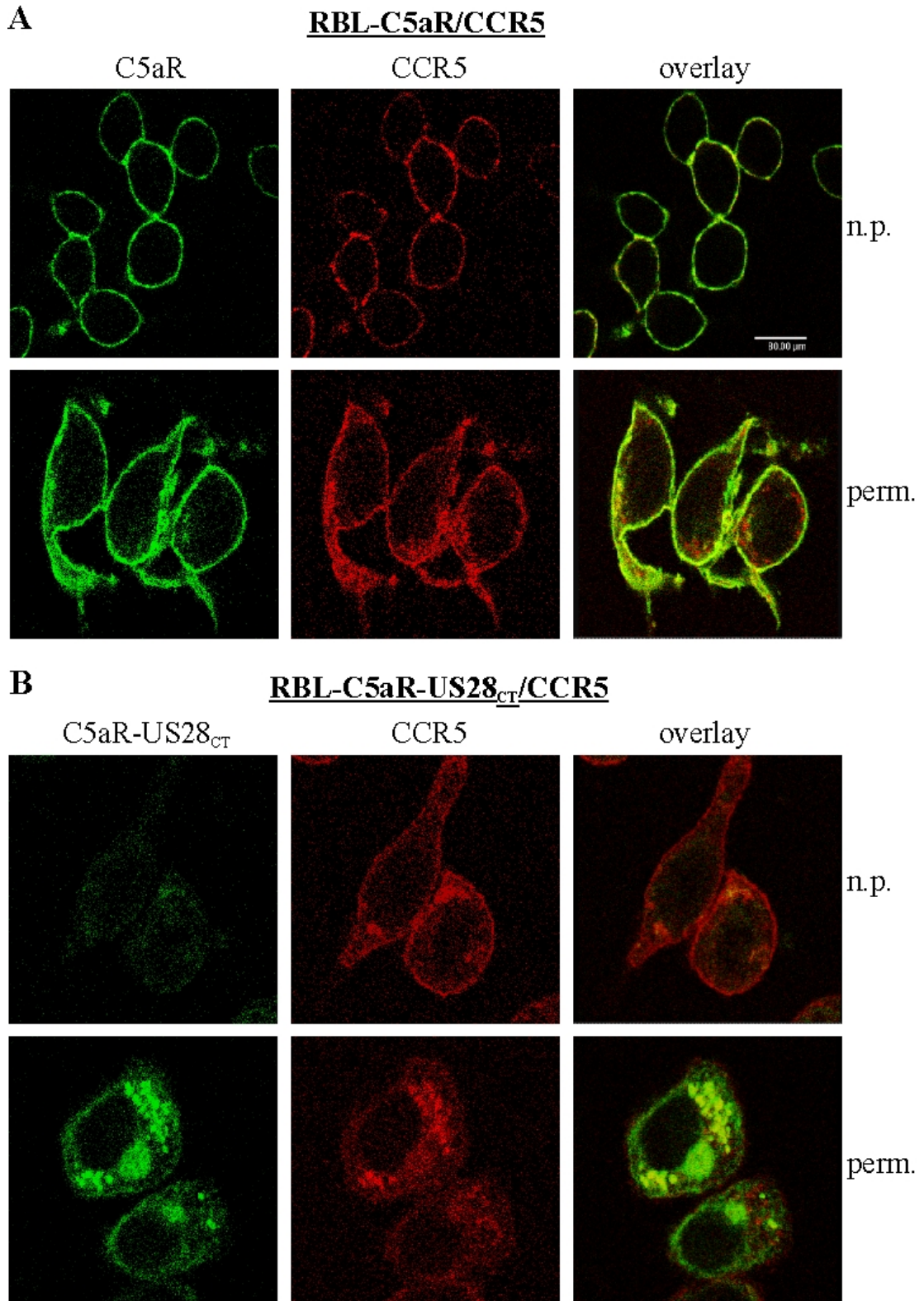


Abb. 40: Rezeptor-Colokalisation in RBL-C5aR-US28_{CT}/CCR5-Zellen

RBL-C5aR/CCR5-Zellen (**A**) und RBL-C5aR-US28_{CT}/CCR5-Zellen (**B**) wurden auf einem Deckglas über Nacht angezogen, und die Rezeptoren wurden in nicht permeabilisierten (n.p.) oder permeabilisierten Zellen (perm.) mit S5/1-FITC (10 μg/ml) (C5aR bzw. C5aR-US28_{CT}) und 10 μg/ml biotinyliertem T21 und Streptavidin-Cy3 (1:300) (CCR5) markiert. Die Analyse

der Zellen erfolgte mit dem konfokalen Lasermikroskop bei Anregungswellenlängen von 488 nm (FITC-Grünkanal) und 543 nm (Cy3-Rotkanal). Im overlay wurden die Bereiche, die sowohl eine Grün- als auch Rotfärbung zeigten, gelb dargestellt und wiesen auf eine Colokalisation beider Rezeptoren hin. Gezeigt sind repräsentative Ausschnitte von zwei unabhängig voneinander durchgeführten Doppelfärbungen gleichen Ergebnisses. Der Größenbalken in dem overlay der nicht permeabilisierten RBL-C5aR/CCR5-Zellen entspricht 80 μm .

2.2.4 Strategien zur Durchbrechung der Homodimerisierung

Nachdem in mehreren eigenen Ansätzen die Dimerisierung von CCR5 sowohl als Homodimer als auch als Heterodimer gezeigt wurde, wurden nun verschiedene in der Literatur beschriebene Ansätze zur Durchbrechung der Dimerisierung von Rezeptoren auf ihre Eignung hin überprüft.

2.2.4.1 Bedeutung von CCR5-Ile52 und -Val150 für die homologe CCR5-Dimerisierung

In der Arbeitsgruppe um Mellado wurde postuliert, daß die Aminosäuren Ile52 der Transmembranregion 1 und Val150 der Transmembranregion 4 essenziell für die CCR5-Dimerbildung sind. Die Autoren zeigten, daß die Inkubation von CCR5-exprimierenden Zellen mit zwei Peptiden, in denen die Aminosäuren Ile52 und Val150 (R5wt1 und R5wt4) enthalten waren, die Aktivierbarkeit und Dimerisierung intakter Rezeptoren blockieren konnte (HERNANZ-FALCON *et al.*, 2004).

Um die zitierten Ergebnisse zu überprüfen und dann auf die mögliche Blockade von CCR5/C5aR-Heterodimeren anzuwenden, wurden die Peptide R5wt1 und R5wt4 in eigenen Versuchen getestet.

2.2.4.1.1 Einfluß der Blockade von CCR5-Ile52 und -Val150 auf die CCR5-Dimerisierung

Um den Einfluß der Peptide auf die CCR5-Dimerbildung zu untersuchen, wurden HEK-293-Zellen transient mit CCR5-Rluc und CCR5-GFP² transfiziert, und es wurde der Biolumineszenz-Resonanz-Energietransfer in unbehandelten Zellen und in Zellen, die mit einem Kontroll-Peptid oder den R5wt1- und R5wt4-Peptiden vorinkubiert wurden, gemessen. Man erkennt in der Abbildung 41, daß die Dimerbildung weder durch die Inkubation mit dem Kontrollpeptid noch durch die Inkubation mit den R5wt1- und R5wt4-Peptiden inhibiert wurde.

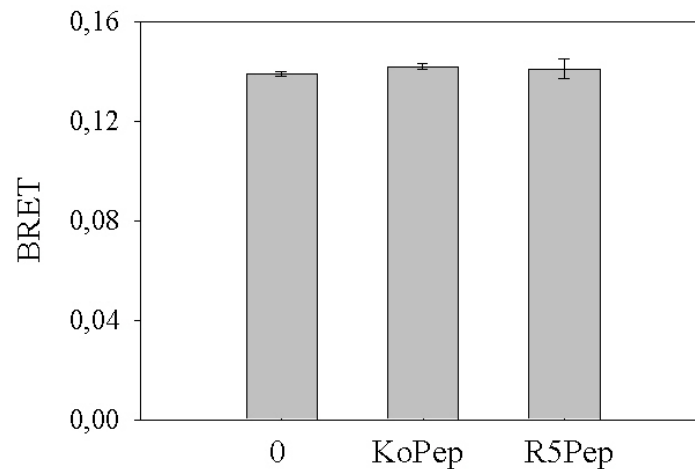


Abb. 41: Einfluß der R5wt1- und R5wt4-Peptide auf die CCR5-Homodimerisierung

HEK-293-Zellen wurden in einer großen Schale bis zu 50 % Konfluenz angezogen und mit je 20 µg CCR5-pRluc-N2 und CCR5-pGFP²-N2 transient transfiziert. Die Zellen wurden mit BRET-Puffer auf eine Konzentration von 4×10^6 Zellen/ml eingestellt und für 30 min bei 37°C mit Puffer (0), 100 µg/ml Kontroll-Peptid (KoPep) oder je 50 µg/ml R5wt1- und R5wt4-Peptid inkubiert. Die Zellen wurden gewaschen, und es wurde das BRET-Signal in den einzelnen Ansätzen gemessen. Gezeigt sind die Mittelwerte mit Standardabweichung von einem von drei unabhängigen Experimenten in triplikatener Bestimmung.

2.2.4.1.2 Einfluß der Blockade von CCR5-Ile52 und -Val150 auf die funktionelle Regulation des CCR5

Neben dem Einfluß der Peptide auf die Dimerisierung wurde die Funktionalität des CCR5 nach Peptid-Behandlung untersucht. Dazu wurden RBL-CCR5-Zellen für 30 min mit 100 µg/ml Kontroll-Peptid oder je 50 µg/ml R5wt1- und R5wt4-Peptid vorinkubiert, und es wurden die Phosphorylierung im ELISA, die Calcium- und Glucosaminidase-Freisetzung und die Internalisierung des CCR5 nach Stimulation mit RANTES gemessen.

Man sieht in der Abbildung 42, daß die Inkubation des CCR5 mit den Peptiden R5wt1 und R5wt4 keinen signifikanten Einfluß auf die PKC-vermittelte Phosphorylierung des CCR5 zeigte. Dagegen wurde die GRK-vermittelte Phosphorylierung nach 10 minütiger Stimulation mit RANTES unter dem Einfluß von R5wt1 und R5wt4 um etwa 50 % im Vergleich zu Kontroll-Peptid behandelten Zellen reduziert.

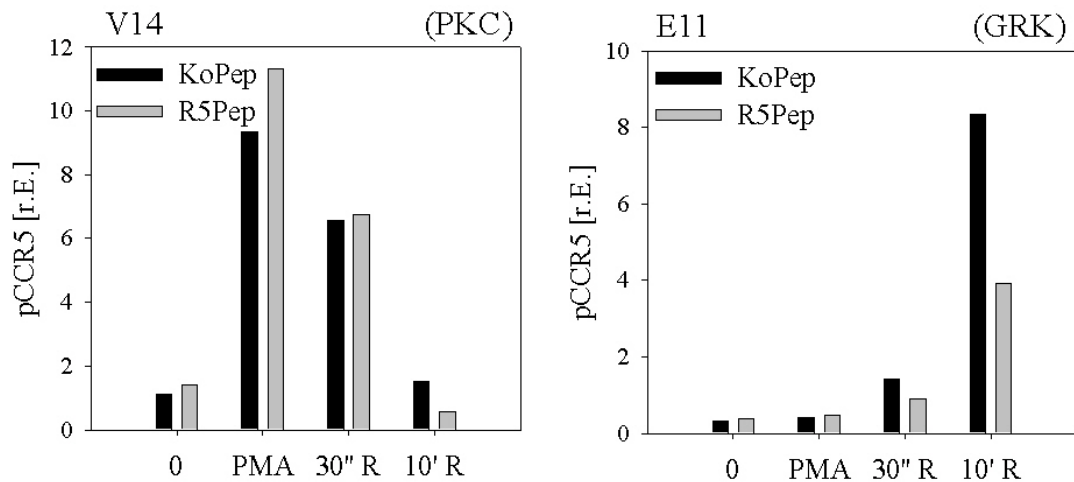


Abb. 42: Einfluß der R5wt1- und R5wt4-Peptide auf die CCR5-Phosphorylierung

RBL-CCR5-Zellen wurden in kleinen Schalen konfluent angezogen und für 30 min mit 100 µg/ml Kontroll-Peptid oder je 50 µg/ml R5wt1- und R5wt4-Peptid vorinkubiert. Anschließend wurden die Zellen für 5 min mit 200 nM PMA oder für 30 sec oder 10 min mit 30 nM RANTES in Peptid-haltigem Medium stimuliert. Nach dem Aufschließen der Zellen in Lysepuffer wurde der CCR5 mit T21 an die ELISA-Platte gebunden. Der Nachweis der Phosphorylierung des Rezeptors erfolgte mit den biotinylierten Primärantikörpern V14 bzw. E11 in einer Konzentration von 1 µg/ml und Peroxidase-gekoppeltem Streptavidin (1:2500). Als Substrat diente ABTS. Die Phosphorylierung ist angegeben als relative Einheit (r.E.) im Vergleich zu einem mitgeführten CCR5-phospho-CT-BSA-Standard. Gezeigt ist ein repräsentatives Experiment von drei durchgeführten mit gleichem Ergebnis.

In keiner der anderen funktionellen Untersuchungen (Calcium- und Glucosaminidase-Freisetzung, Internalisierung des CCR5) konnte eine signifikante Reduktion der Rezeptorfunktionalität nach Inkubation mit den R5wt1- und R5wt4-Peptiden festgestellt werden, wie von HERNANZ-FALCON *et al.*(2004) beschrieben worden war. Daher waren diese Peptide für die eigenen Untersuchungen nicht verwendbar.

2.2.4.2 Bedeutung des ersten Leucins der ersten Transmembrandomäne für die Homodimerbildung

In einer Studie der Arbeitsgruppe von Baranski wurde eine C5aR-cDNA-Bank angefertigt, in der die Transmembranregionen des C5aR zufällig mutagenisiert wurden. Aus den erhaltenen Daten wurde ein putativer dreidimensionaler Aufbau des C5aR erstellt, in dem Aminosäuren der ersten und der zweiten Transmembranregion als mögliche Interaktionsstellen von Rezeptordimeren prognostiziert wurden. Dabei war auffällig, daß Leu41 als einzigen Austausch ein Cystein tolerierte, das wie das Leucin

zur Ausbildung von Disulfidbrücken befähigt ist (BARANSKI *et al.*, 1999, GEVA *et al.*, 2000).

Ein Sequenzvergleich der ersten Transmembranregion von C5aR, CCR1 bis CCR5 und dem Rhodopsin-Rezeptor zeigte, daß Leu41 eine hoch konservierte Aminosäure an dieser Position darstellt. Daher wurden C5aR- und CCR5-Rezeptormutanten erstellt, in denen das C5aR-Leu41 und das entsprechende CCR5-Leu36 gegen Arginin mutagenisiert wurden, und es wurde die Expression und Aktivität dieser Rezeptoren untersucht.

2.2.4.2.1 Herstellung der Leu-Arg-Rezeptormutanten

Die Leu-Arg Mutationen wurden mit Hilfe des QuickChangeII-Mutagenesis-Kit von Stratagene in die Rezeptoren eingeführt. Dazu wurde der CCR5-L36R mit den Primern CCR5-L36Arg-For und CCR5-L36Arg-Back aus dem Plasmid CCR5-pBos synthetisiert und der C5aR-L41R mit den Primern C5aR-L41A-For und C5aR-L41A-Back aus dem Plasmid C5aR-pBos amplifiziert. Beide Konstrukte wurden in den *E. coli*-Stamm XL1-blue transfiziert und die Basenabfolge der mutagenisierten Rezeptoren wurde mittels Sequenzieren verifiziert.

Zur stabilen Transfektion wurden die Plasmide mit *PvuI* linearisiert, und es wurden je 18 µg DNA zusammen mit je 2 µg mit *ScaI* linearisiertem pEF1/Myc-HIS-A-Plasmid in RBL-2H3-Zellen transfiziert.

2.2.4.2.2 Expression und Aktivität der Leu-Arg-Rezeptormutanten

Es wurden etwa je 100 Klone RBL-CCR5-L36R und RBL-C5aR-L41R im FACS mit den Antikörpern T21 bzw. S5/1 auf ihre Rezeptorexpression untersucht. Dabei zeigte in nicht-permeabilisierten Zellen kein Klon eine signifikante Oberflächenexpression von CCR5 bzw. C5aR. In permeabilisierten Zellen konnte dagegen in einer Vielzahl der getesteten Klone eine signifikante Rezeptormarkierung festgestellt werden (Tab. 11). Dieses Ergebnis zeigte, daß die mutagenisierten Rezeptoren zwar synthetisiert, aber nicht auf der Zelloberfläche exprimiert wurden. Dadurch konnte auch nur eine minimale Glucosaminidase-Freisetzung nach Stimulation der Zellen mit RANTES bzw. C5a detektiert werden (Tab. 11).

Tab. 11: Expression und Aktivität der RBL-Rezeptor-Leu-Arg-Zellreihen

Klon	Expression [MCF]		NAGA max [%]
	nicht perm.:	perm.:	
RBL-CCR5-L36R (8.27.6)	nicht perm.:	1,5	2,0
	perm.:	17,3	
RBL-C5aR-L41R (1.11.5)	nicht perm.:	2,7	4,8
	perm.:	53,6	

Gezeigt ist die Expression und Aktivität der RBL-CCR5-L36R- und RBL-C5aR-L41R-Zellreihe. Die Rezeptorexpression wurde im FACS mit 10 µg/ml des Primärantikörpers T21 (CCR5-L36R) bzw. S5/1 (C5aR-L41R) und dem Sekundärantikörper Ziege-Anti-Maus-FITC (1:100) überprüft. Die Markierung der Zellen erfolgte dabei in FACS-Puffer (nicht perm.) oder im permeabilisierenden Saponin-Puffer (perm). MCF gibt die Expression der Rezeptoren als „mean channel of fluorescence“ an. Das NAGA-Maximum gibt Auskunft über die prozentuale Glucosaminidase-Freisetzung verglichen mit Zellen, bei denen durch Triton-Lyse sämtliches Enzym freigesetzt wurde. Die Werte entsprechen Mittelwerten aus mindestens drei unabhängigen Messungen.

2.2.4.2.3 Homodimerisierung der Leu-Arg-Rezeptormutanten

Um trotz der mangelnden Expression die Fähigkeit der Leu-Arg-Rezeptoren zur Homodimerisierung zu überprüfen, wurden analog zu den Ergebniskapiteln 2.1.1.1 und 2.2.1.4.1 BRET-Konstrukte erstellt, in denen die Rezeptoren an Luciferase bzw. GFP² gekoppelt wurden. Es wurden 0,3 µg Rezeptor-Rluc-DNA und 3 µg Rezeptor-GFP²-DNA transient in HEK-293-Zellen transfiziert, und es wurde der Energietransfer der CCR5-Homodimere bzw. C5aR-Homodimere gemessen. Man sieht in der Abb. 43, daß das Ausmaß des Energietransfers stark variierte, je nachdem ob der Luciferase-gekoppelte, der GFP²-gekoppelte oder beide Rezeptoren das mutagenisierte Leucin der ersten Transmembranregion enthielten. Das BRET-Signal von Rezeptor-Heterodimeren ist normalerweise jedoch unabhängig davon, welcher Rezeptor Luciferase- bzw. GFP²-gekoppelt verwendet wird. Daher war trotz des beobachteten Energietransfers nicht eindeutig, ob es sich hier um echte Rezeptordimere handelte, oder ob der Energietransfer durch die vermutliche Aggregation der Rezeptoren im ER und die daraus resultierende räumliche Nähe der Rezeptoren untereinander erzeugt wurde.

Zusammenfassend konnte mit den hier angewandten Methoden die Bedeutung des ersten Leucins der Transmembranregion 1 von CCR5 und C5aR für die Rezeptordimerisierung nicht eindeutig geklärt werden.

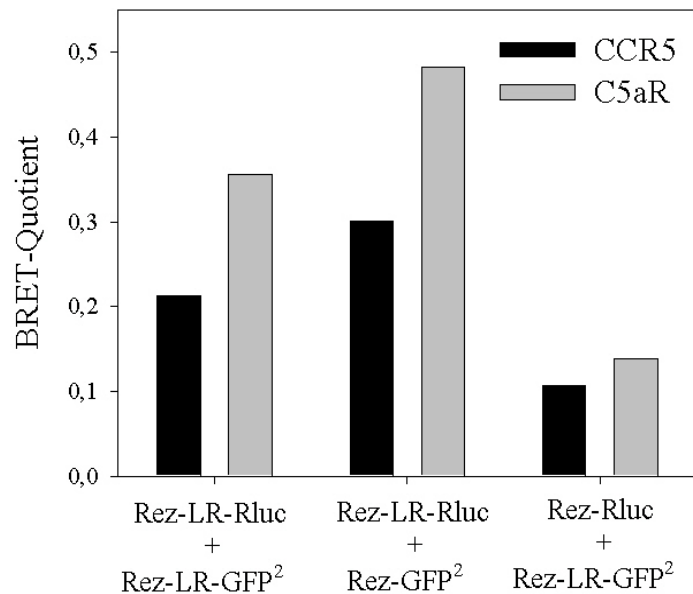


Abb. 43: Einfluß der Leu-Arg-Mutation der TM1 auf die homologe CCR5- bzw. C5aR-Dimerisierung

Es wurde die homologe Rezeptordimerisierung von CCR5 bzw. C5aR bestimmt, wobei entweder jeweils ein BRET-Konstrukt oder beide Konstrukte ein gegen Arginin mutagenisiertes Leucin (Rez-LR) in der ersten Transmembrandomäne aufwies. Dazu wurden HEK-293-Zellen in unterschiedlichen Kombinationen transient mit 0,3 µg Rluc- und 3 µg GFP²-gekoppeltem Rezeptor transfiziert, und nach 48 h wurde der Energietransfer nach Aktivierung der Luciferase mit ihrem Substrat DeepBlueC gemessen. Das BRET-Signal ergibt sich aus dem Quotienten aus GFP²-Fluoreszenz und Rluc-Lumineszenz abzüglich des BRET-Signals von Zellen, die lediglich mit dem Rezeptor-Rluc-Konstrukt transfiziert wurden. Die gezeigten Ergebnisse sind repräsentativ für mindestens 2 Versuche mit gleichem Ergebnis.

3. CCR5-C5aR-Rezeptorchimären

Um zu überprüfen, ob wichtige Rezeptoreigenschaften wie β -Arrestin-Bindung und Internalisierung von CCR5 und C5aR primär durch ihre jeweiligen C-Termini determiniert sind, wurden Rezeptorchimären hergestellt, bei denen die C-Termini von CCR5 und C5aR vertauscht wurden. Diese Rezeptorchimären wurden stabil in RBL-2H3-Zellen exprimiert und die Rezeptoreigenschaften mit denen der WT-Rezeptoren verglichen.

3.1 Konstruktion der CCR5-C5aR-Rezeptorchimären

Ein Sequenzvergleich verschiedener GPCRs zeigte, daß eine Vielzahl an Rezeptoren ein konserviertes NPIIY-Motiv am Ende der siebten Transmembranregion tragen. Daher

wurden in einem ersten Ansatz (Rezeptorchimären T1a bzw. T1b) die C-Termini beider Rezeptoren direkt hinter diesem konservierten Motiv vertauscht (Abb. 44). Aufgrund der fehlenden Expression bzw. Funktionalität dieser ersten Rezeptorchimären (Tab. 12) wurden in einem zweiten Ansatz (Rezeptorchimären T2a bzw. T2b) lediglich die hinter der CCR5-Cystein-Palmytylierungsaufhängung gelegenen C-Termini beider Rezeptoren vertauscht (Abb. 44). Um die Größe der Rezeptoren nicht markant zu verändern, wurden dabei nur die vier C-terminalen Serine des C5aR auf den CCR5 übertragen, da den beiden N-terminal gelegenen Serinen nur eine untergeordnete Rolle bei der Rezeptorfunktion zugeschrieben wird (CHRISTOPHE *et al.*, 2000, BRAUN *et al.*, 2003).

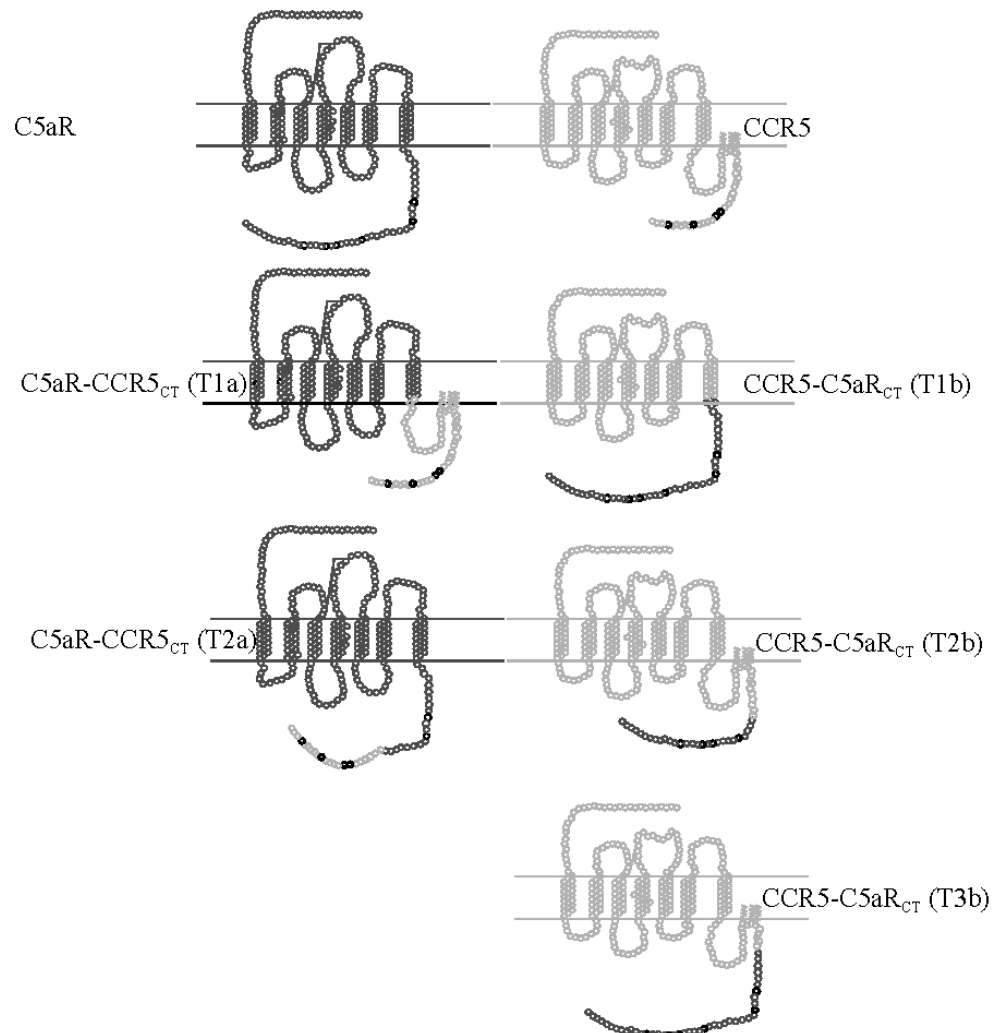


Abb. 44: Schematische Darstellung der CCR5-C5aR-Rezeptorchimären

Gezeigt ist der schematische Aufbau der Rezeptorchimären. Aminosäuren des C5aR sind dunkelgrau gefärbt, Aminosäuren des CCR5 hellgrau. Serine wurden als schwarze Kreise gekennzeichnet. Die Rezeptoren sind so angeordnet, daß der obere Teil dem extrazellulären Bereich entspricht, die beiden waagerechten Striche repräsentieren die Zellmembran.

Da die CCR5-C5aR_{CT}-Mutante des zweiten Ansatzes keine β -Arrestin-Bindung zeigte, wurde in einem dritten Ansatz (Rezeptorchimäre T3b) der C5aR-C-Terminus inklusive aller sechs Serine auf den CCR5 übertragen (Abb. 44).

Zur Erstellung der C5aR-CCR5_{CT}-Mutante (T2a) wurde aus dem Vektor C5aR-FLAG-pcDNA3 mit den Primern C5aR-Bam-For und CCR5-57bpCT-C5aR-Eco5-Back das etwa 1,1 kb große Rezeptorfragment amplifiziert und mit *Bam*HI und *Eco*RV in den Vektor pEF1/Myc-HIS-A kloniert. Dabei wurden die 23 C-terminalen Aminosäuren des CCR5 inklusive aller 4 Serin-Phosphorylierungsstellen auf den C5aR übertragen, wobei die 25 C-terminalen Aminosäuren des C5aR deletiert wurden (Abb. 44). Die CCR5-C5aR_{CT}-Rezeptorchimäre (T3b) wurde mit den Primern CCR5-EcoRV-For und C5aR-132bpCT-CCR5-Not1-Back aus CCR5-pEF-Bos amplifiziert und mit *Eco*RV und *Not*1 in den Vektor pEF1/Myc-HIS-A kloniert. Dabei wurden die 43 C-terminalen C5aR-Aminosäuren inklusive aller sechs Serine auf den CCR5 übertragen (Abb. 44) und die 23 C-terminalen Aminosäuren des CCR5 deletiert. Beide Konstrukte wurden in den *E. coli* Stamm XL1-blue transformiert, und die Basenabfolge der Rezeptoren wurde mittels Sequenzierung verifiziert. Die Aktivität und Expression aller Rezeptoren ist in Tabelle 12 gegeben.

3.2 Expression und Funktionalität der Rezeptorchimären

Alle Rezeptorchimären wurden stabil in RBL-2H3-Zellen exprimiert, und es wurden jeweils mindestens zwei Klone auf ihre Aktivität untersucht, um klonale Artefakte zu vermeiden. Die Tabelle 12 zeigt einen Überblick über die Expression und generelle Funktionalität der verschiedenen Rezeptorchimären im Vergleich mit den jeweiligen WT-Rezeptoren.

Man erkennt in der Tabelle 12, daß die C5aR-CCR5_{CT}-Rezeptorchimäre mit Austausch hinter dem NPIIY-Motiv (T1a) nicht auf der Zelloberfläche exprimiert wurde. Dagegen zeigte die C5aR-CCR5_{CT}-Mutante mit Anfügen der CCR5-Region, die hinter der Palmylierungsstelle liegt (T2a), eine robuste Expression und eine funktionelle Aktivierbarkeit des Rezeptors inklusive intakter Arrestin-Bindung und Vermittlung von Chemotaxis, so daß dieses Konstrukt für weitere Untersuchungen verwendet wurde.

Die CCR5-C5aR_{CT}-Mutante mit Austausch hinter dem NPIIY-Motiv (T1b) zeigte eine stabile Expression auf der Zelloberfläche, aber fehlende Rezeptoraktivität. Die zweite CCR5-C5aR_{CT}-Chimärenvariante (T2b) zeigte zwar eine Aktivierung des Rezeptors im

NAGA- und Calcium-Test und eine Induktion von Chemotaxis, war aber nicht in der Lage, β -Arrestin an die Membran zu rekrutieren. Erst durch Anfügen aller sechs C5aR-Serin-Phosphorylierungsstellen an den CCR5 (T3b) konnte eine β -Arrestin-bindende CCR5-C5aR_{CT}-Rezeptorchimäre hergestellt werden, die im folgenden für weitere Untersuchungen verwendet wurde.

Tab. 12: Expression und Funktionalität der CCR5-C5aR-Rezeptorchimären

Klon	Expression (MCF)	NAGA EC50	NAGA max [%]	β -Arrestin-Bindung	Chemotaxis
CCR5	52,9	5,2	27,1	+	+
C5aR	111,4	10,6	40,9	+	+
C5aR-CCR5 _{CT} T1a	-	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.
C5aR-CCR5_{CT} T2a (25.1)	167,4	5,8	51,6	+	+
CCR5-C5aR _{CT} T1b (77.4)	37,7	-	-	-	n.b.
CCR5-C5aR _{CT} T2b (2.2)	32,9	7,8	34,4	-	+
CCR5-C5aR_{CT} T3b (25.12)	37,9	19,1	54,2	+	+

Die Rezeptoren wurden einzeln stabil in RBL-2H3-Zellen exprimiert. Die Expression der Rezeptoren wurde im FACS mit den Antikörpern T21 oder S5/1 (je 10 μ g/ml) und dem Zweitantikörper Ziege-anti-Maus-FITC (1:100) bestimmt und ist als MCF angegeben. EC50 gibt die halbmaximale Enzymaktivität im NAGA-Test in [nM Stimulus] an. Die maximale NAGA-Aktivität in [%] macht Aussagen über die Desensibilisierung der Rezeptoren. β -Arrestin-Bindung zeigt die allgemeine Fähigkeit der Rezeptoren an, nach Stimulation β -Arrestin an die Membran zu rekrutieren. Chemotaxis zeigt, ob die Rezeptoren in der Lage waren, eine Stimulus-spezifische Wanderung der Zellen zu vermitteln.

Ein – bedeutet fehlende Aktivität, n.b. bedeutet, daß dieser Parameter nicht bestimmt wurde. Alle Angaben entsprechen den gemittelten Ergebnissen aus mindestens drei unabhängigen Versuchen, die Standardabweichung lag unter 15 %. Die in Fettdruck dargestellten Rezeptormutanten wurden für weitergehende Untersuchungen verwendet.

3.2.1 Phosphorylierung der Rezeptorchimären im ELISA

Es zeigte sich in vorangegangenen Untersuchungen, daß in RBL-CCR5-Zellen die PKC-vermittelte Phosphorylierung des CCR5-Serins 337 mit steigender RANTES-Konzentration konstant ansteigt, während in RBL-C5aR-Zellen die PKC-vermittelte Phosphorylierung des C5aR-Serins 334 bis zu einer C5a-Konzentration von etwa 3 nM ansteigt, bei höheren C5a-Mengen jedoch wieder abfällt (RETHORN, 2003).

Dieses differierende konzentrationsabhängige Phosphorylierungsverhalten wurde in den beiden Rezeptorchimären untersucht. Dazu wurde die RBL-CCR5-C5aR_{CT}-T3b-Mutante für 1 min mit RANTES-Konzentrationen von 0-1000 nM stimuliert, und die Phosphorylierung wurde im ELISA gemessen. Als Fangantikörper diente der CCR5-spezifische T21, der Nachweis erfolgte mit dem C5aR-spezifischen biotinylierten 32-G1. Die RBL-C5aR-CCR5_{CT}-T2a-Mutante wurde für 1 min mit 0-316 nM C5a stimuliert, als Fangantikörper wurde S5/1 verwendet. Der Phosphorylierungsnachweis erfolgte mit dem Antikörper V14, der die PKC-vermittelte Phosphorylierung erkennt, und E11, der das GRK-regulierte Serin bindet.

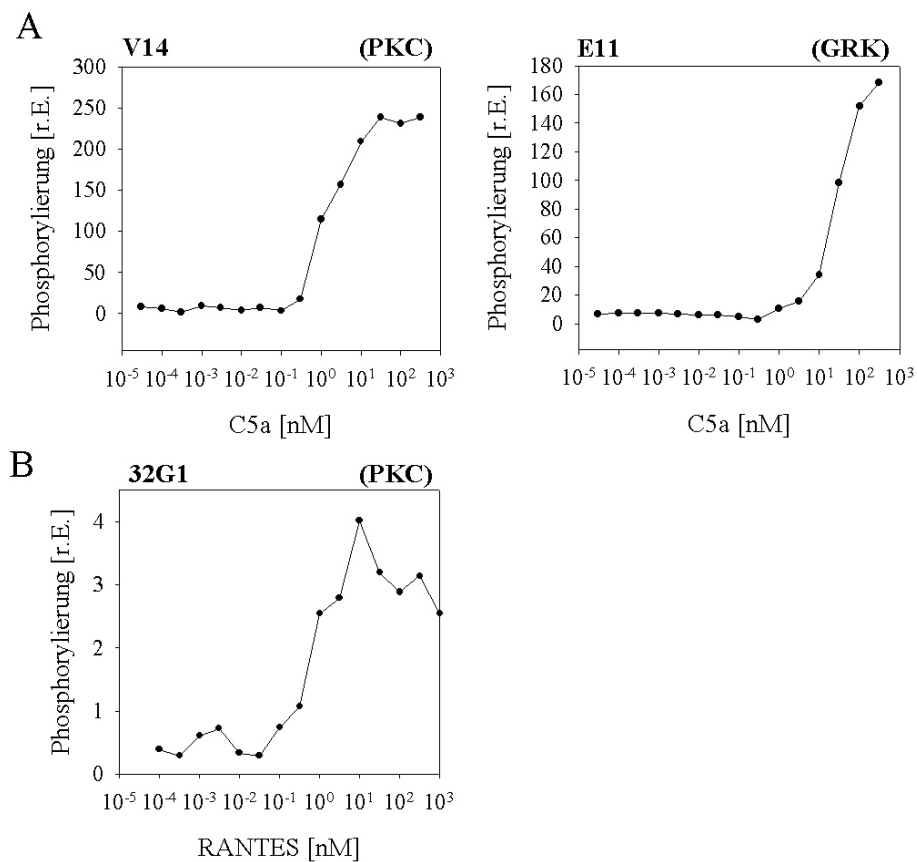


Abb. 45: Konzentrationsabhängige Phosphorylierung der Rezeptorchimären

A: RBL-C5aR-CCR5_{CT}-T2a-Zellen wurden in kleinen Schalen konfluent angezogen und für 3 min mit unterschiedlichen Konzentrationen an C5a stimuliert. Die PKC- bzw. GRK-vermittelte Phosphorylierung des Rezeptors wurde mit den biotinylierten Antikörpern V14 bzw. E11 (je 1 µg/ml) und Streptavidin-Peroxidase (1:4000) anhand eines CCR5-phospho-CT-BSA-Standards quantifiziert. Der Farbumschlag des Substrats ABTS wurde bei einer OD405-490 nm gemessen. Die Phosphorylierung ist angegeben als relative Einheit (r.E.).

B: RBL-CCR5-C5aR_{CT}-T3b-Zellen wurden für 3 min mit unterschiedlichen Konzentrationen an RANTES stimuliert und die PKC-vermittelte Phosphorylierung wurde mit dem biotinylierten 32-G1 (1 µg/ml) und Streptavidin-Peroxidase (1:4000) wie oben aber anhand eines BSA-C5aR-Ex1-phospho-CT-Standards bestimmt.

A + B: Gezeigt ist ein repräsentatives Experiment von mindestens drei durchgeführten mit gleichem Ergebnis.

Man sieht in der Abb. 45 B, daß die Phosphorylierung der CCR5-C5aR_{CT}-Rezeptorchimäre T3b-25.12 bis zu einer RANTES-Konzentration von etwa 10 nM anstieg, bei höheren Konzentrationen an Stimulus jedoch wieder sank. Dagegen zeigte die C5aR-CCR5_{CT}-Chimäre T2a-25.1 eine ab etwa 1 nM C5a ansteigende PKC-Phosphorylierung, die bei Erhöhung der Stimulus-Konzentration nicht wieder sank. Diese Chimäre zeigte außerdem eine intakte GRK-vermittelte Phosphorylierung ab einer C5a-Konzentration von etwa 10 nM (Abb. 45 A).

Bei der Bestimmung der zeitabhängigen Phosphorylierung von CCR5 und C5aR konnte gezeigt werden, daß CCR5 und C5aR bei niedrigen Stimulus-Konzentrationen von 0,5 nM RANTES bzw. 2 nM C5a nur eine sehr transiente PKC-vermittelte Phosphorylierung zeigten, die nach etwa 4 min wieder nahezu auf den Phosphorylierungsgrad nicht stimulierter Rezeptoren zurückging. Bei höheren Stimulus-Konzentrationen von 50 nM RANTES bzw. 20 nM C5a ging die Phosphorylierung deutlich langsamer wieder auf Grundniveau zurück, wobei die allgemeine Stärke der Phosphorylierung im Vergleich zu niedrigen Stimulus-Konzentrationen beim CCR5 anstieg, beim C5aR dagegen niedriger ausfiel (POLLOK-KOPP *et al.*, 2003, RETHORN, 2003).

Zur Bestimmung der zeitabhängigen Phosphorylierung der Rezeptorchimären wurden diese für unterschiedliche Zeiten mit 0,2 und 20 nM C5a bzw. 5 und 50 nM RANTES stimuliert, und der Nachweis der Phosphorylierung erfolgte analog der Bestimmung der konzentrationsabhängigen Phosphorylierung. Man sieht in der Abbildung 46 A, daß die C5aR-CCR5_{CT}-T2a-Chimäre eine maximale V14-Phosphorylierung nach etwa 45 sec zeigte, die nach 2 min nahezu auf Grundphosphorylierung zurückging. Nach Stimulation mit 20 nM C5a war die Phosphorylierung deutlich erhöht und wurde signifikant langsamer wieder abgebaut. Weiterhin zeigte die C5aR-CCR5_{CT}-T2a-Chimäre erst bei hohen Stimulus-Konzentrationen von 20 nM C5a eine detektierbare GRK-vermittelte Phosphorylierung. Die CCR5-C5aR_{CT}-T3b-Rezeptorchimäre zeigte bei 5 nM RANTES-Stimulation eine maximale PKC-vermittelte Phosphorylierung nach 45 sec, die nach etwa 5 min wieder abgebaut war. Nach Stimulation mit 50 nM RANTES war eine geringere Phosphorylierung der Mutante im Vergleich zu 5 nM RANTES zu beobachten, und es zeigte sich ein ebenfalls leicht verzögerter Rückgang auf die Grundphosphorylierung (Abb. 46 B).

Zusammenfassend kann postuliert werden, daß die Phosphorylierungseigenschaften von CCR5 und C5aR offenbar vom C-Terminus determiniert werden, da sich sowohl das konzentrations- als auch das zeitabhängige Phosphorylierungsmuster zusammen mit dem C-Terminus auf den jeweils anderen Rezeptor übertragen ließ.

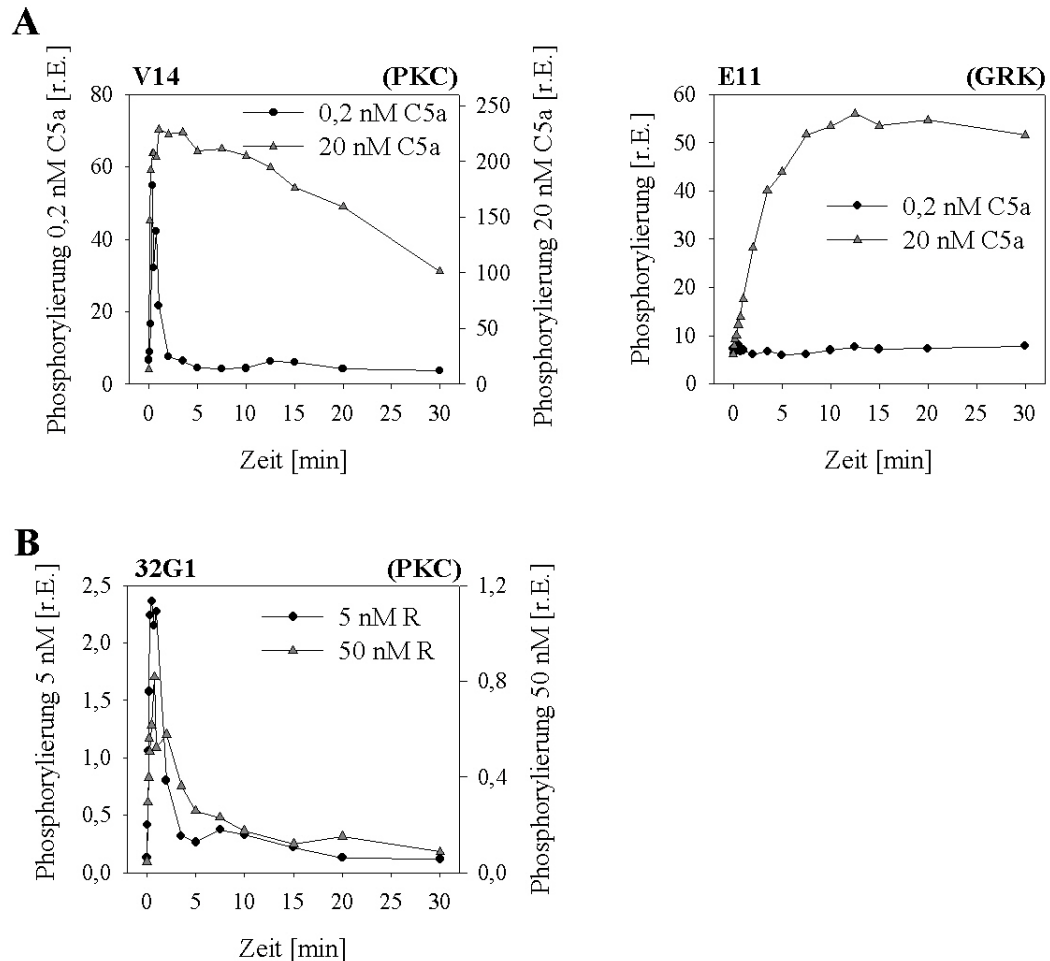


Abb. 46: Zeitabhängige Phosphorylierung der Rezeptorchimären

A: RBL-C5aR-CCR5_{CT}-T2a-Zellen wurden für unterschiedliche Zeiträume mit 0,2 nM oder 20 nM C5a stimuliert. Die PKC- bzw. GRK-vermittelte Phosphorylierung des Rezeptors wurde mit den biotinylierten Antikörpern V14 bzw. E11 (je 1 µg/ml) und Streptavidin-Peroxidase (1:4000) anhand eines CCR5-phospho-CT-BSA-Standards quantifiziert. Der Farbumschlag des Substrats ABTS wurde bei einer OD405-490 gemessen. Die Phosphorylierung ist angegeben als relative Einheit (r.E.).

B: RBL-CCR5-C5aR_{CT}-T3b-Zellen wurden für unterschiedliche Zeiträume mit 0,5 nM oder 50 nM RANTES stimuliert und die PKC-vermittelte Phosphorylierung wurde mit dem biotinylierten 32-G1 (1 µg/ml) und Streptavidin-Peroxidase (1:4000) wie oben bestimmt.

A + B: Gezeigt ist ein repräsentatives von drei durchgeführten Experimenten mit gleichem Ergebnis. Zu beachten ist, daß bei der PKC-vermittelten Phosphorylierung beider Chimären aufgrund der besseren Darstellbarkeit für jede Stimulus-Konzentration eine separate Skalierung aufgetragen wurde.

3.2.2 β -Arrestin-Bindung und Internalisierung der Rezeptorchimären

Im folgenden wurde die Fähigkeit der Rezeptorchimären, β -Arrestin an die Membran zu rekrutieren, mit der der WT-Rezeptoren verglichen. Wie in der Abbildung 10 dargestellt, zeigen RBL-CCR5-Zellen nach 30 bis 60 sec RANTES-Stimulation eine signifikante β -Arrestin-Bindung, wobei die β -Arrestin-Konzentration im Cytosol nicht merklich abnimmt. Dagegen zeigt der C5aR nach C5a-Stimulation schon nach 5 sec eine signifikante β -Arrestin-Bindung und die Konzentration im Cytosol nimmt deutlich ab (Abb. 26), was auf eine verstärkte Rekrutierung an die Membran hinweist.

Zur Bestimmung der β -Arrestin-Bindung der Rezeptorchimären wurden diese mit dem entsprechenden Stimulus in einer Konzentration von 20 nM für unterschiedliche Zeiträume stimuliert und die β -Arrestin-Translokation an die Membran nachgewiesen.

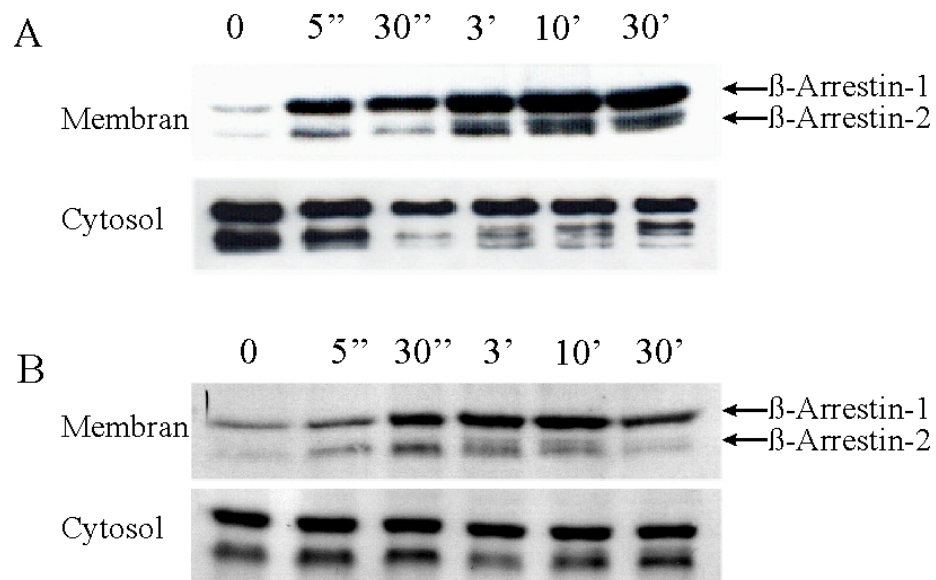


Abb. 47: β -Arrestin-Translokation an die Membran der Rezeptorchimären

RBL-C5aR-CCR5_{CT}-T2a-Zellen (A) und RBL-CCR5-C5aR_{CT}-T3b-Zellen (B) wurden für unterschiedliche Zeitpunkte mit 20 nM C5a bzw. 20 nM RANTES stimuliert, und es wurde die β -Arrestin-Translokation an die Membran nachgewiesen. Dazu wurden die Membran und das Cytosol der lysierten Zellen mit einem Sucrosegradienten isoliert, auf einem SDS-Gel aufgetrennt und auf eine Nitrozellulosemembran transferiert. Der Nachweis erfolgte mit dem anti- β -Arrestin-1/2-Antikörper (10 μ g/ml) und dem sekundären Peroxidase-konjugierten Kaninchen-anti-Maus-Antikörper (1:2000). Der Nachweis des ECL-Signals erfolgte auf einem Photofilm. Die gezeigten Ergebnisse sind repräsentativ für jeweils drei Versuche mit gleichem Ergebnis.

Die Abbildung 47 A zeigt, daß die RBL-C5aR-CCR5_{CT}-Mutante T2a-25.1 β -Arrestin ähnlich schnell rekrutierte wie der RBL-C5aR-WT. Allerdings nahm die β -Arrestin-Konzentration im Cytosol nicht derart stark ab wie beim C5aR. Die RBL-CCR5-

C5aR_{CT}-Rezeptorchimäre T3b-25.12 zeigte nach 30 sec eine signifikante β -Arrestin-Translokation, die etwas schneller als beim CCR5-WT zu sein schien. Auch hier nahm die Konzentration im Cytosol ähnlich wie beim RBL-CCR5-WT nicht merklich ab.

Um zu überprüfen, ob die Arrestin-Bindung der Rezeptorchimären diese zur schnellen Internalisierung befähigt, wurde die Internalisierungsrate der Chimären bestimmt. Dazu wurden RBL-C5aR-CCR5_{CT}-T2a-, RBL-CCR5-C5aR_{CT}-T2b- und RBL-CCR5-C5aR_{CT}-T3b-Zellen mit radioaktiv markiertem Liganden vorinkubiert, und es wurde die Internalisierung zu unterschiedlichen Zeitpunkten gemessen. Dabei zeigte sich, daß die RBL-C5aR-CCR5_{CT}-T2a und RBL-CCR5-C5aR_{CT}-T3b-Zellreihen, die beide in der Lage waren, β -Arrestin an die Membran zu rekrutieren, eine schnelle Internalisierung ihres spezifischen Stimulus aufwiesen. Die RBL-CCR5-C5aR_{CT}-T2b-Mutante, die nicht in der Lage war, β -Arrestin zu rekrutieren (Tab. 12), zeigte ähnlich wie die RBL-CCR5-S/A- und RBL-C5aR-ST/A-Zellreihe (Abb. 13 und 34) eine verlangsamte Internalisierung, was erneut auf die Beteiligung des β -Arrestins am schnellen Internalisierungsprozeß der Rezeptoren hinwies (Daten nicht gezeigt).

Zusammenfassend scheint die Kinetik der β -Arrestin-Translokation an CCR5-C5aR_{CT}- und C5aR-CCR5_{CT}-Rezeptorchimären nicht vorwiegend durch C-terminale Sequenzen determiniert zu sein.

IV. Diskussion

1. Strukturelle Voraussetzungen und funktionelle Konsequenzen der β -Arrestin-Bindung an G-Protein-gekoppelte Rezeptoren

β -Arrestine sind zentrale Schlüsselproteine für die Desensibilisierung und Internalisierung von G-Protein-gekoppelten Rezeptoren. Ihre Bindung an phosphorylierte Rezeptoren terminiert Signalkaskaden durch sterische Verdrängung der G-Proteine und initiiert gleichzeitig die Clathrin-abhängige Rezeptor-Internalisierung.

In dieser Arbeit wurden die strukturellen Voraussetzungen der β -Arrestin-Bindung an den CC-Chemokin Rezeptor 5 im Detail charakterisiert. Durch Phosphoaminosäuren-Analyse konnte in früheren Arbeiten gezeigt werden, daß CCR5 nach einer Stimulation mit seinem Liganden RANTES an vier im extremen CCR5-C-Terminus gelegenen Serinen phosphoryliert wird (OPPERMANN *et al.*, 1999). Eine Substitution dieser vier Serine durch Alanin verhinderte die β -Arrestin-Bindung an diesen mutagenisierten CCR5 nach RANTES-Stimulation in FRET-Analysen (KRAFT *et al.*, 2001). In der vorliegenden Arbeit wurde die β -Arrestin-CCR5-Interaktion durch den indirekten Nachweis der β -Arrestin-Translokation an die aufgereinigte Zellmembran nachgewiesen. Daß diese Methode spezifisch nur die durch CCR5 vermittelte β -Arrestin-Rekrutierung an die Membran darstellt, zeigte sich zum einen durch die Dosis- und Zeitabhängigkeit der β -Arrestin-Translokation und zum anderen in Kontrollexperimenten, in denen nicht transfizierte RBL-2H3-Zellen verwendet wurden. In diesen Experimenten war nach RANTES-Stimulation keine β -Arrestin-Translokation an die Membran zu beobachten (Abb. 10). Diese Methode bietet im Unterschied zu anderen Methoden den Vorteil, daß β -Arrestin nicht überexprimiert zu werden braucht, was in einigen Anwendungen zu einer unspezifischen β -Arrestin-Bindung an nicht aktivierte Rezeptoren führte (QIAN *et al.*, 2001).

Ligand-Aktivierung von RBL-CCR5-Zellen führte zu einer etwa 3,8-fachen Erhöhung von membrangebundenem β -Arrestin-1 und zu einem etwa 3,6-fachen Anstieg von membrangebundenem β -Arrestin-2. Bei der in dieser Arbeit verwendeten Methode wird lediglich die β -Arrestin-Translokation an die Membran dargestellt, inwieweit die beiden β -Arrestin-Isoformen jeweils spezifische Funktionen bei der Rezeptor-Internalisierung

übernehmen bleibt dabei offen. In anderen Rezeptorsystemen konnte gezeigt werden, daß β -Arrestin-1 und β -Arrestin-2 zum Teil unterschiedlichen Einfluß auf die Internalisierung und Desensibilisierung von GPCRs besitzen. So war die Internalisierung des β_2 -adrenergen Rezeptors in β -Arr2-KO-Zellen signifikant reduziert, während die Deletion von β -Arrestin-1 keinen Einfluß auf die Rezeptor-Internalisierung hatte. Die Internalisierung des AT1aR dagegen wurde durch die Deletion von β -Arrestin-1 nur leicht reduziert und war in β -Arr2-KO-Zellen unverändert (KOHOUT *et al.*, 2001). In COS-1-Zellen steigerte die β -Arrestin-2-Coexpression die Internalisierung des α_{2b} -adrenergen Rezeptors um ein Vielfaches, während die α_{2a} -adrenerge Rezeptor-Internalisierung nicht beeinflußt wurde (DeGRAFF *et al.*, 1999). Diese Ergebnisse zeigen, daß beide β -Arrestin-Isoformen abhängig von der Art des gebundenen GPCR unterschiedlichen Einfluß auf dessen Internalisierung ausüben können. In RBL-2H3-Zellen konnte gezeigt werden, daß nach Stimulation des β_2 -adrenergen oder des mACh Rezeptors lediglich β -Arrestin-2 an Clathrin-umhüllte Vesikel rekrutiert wird (SANTINI *et al.*, 2000). Weiterhin wies β -Arrestin-2 im Vergleich mit β -Arrestin-1 eine 6-fach höhere Affinität zu Clathrin auf (GOODMAN *et al.*, 1996).

Um die Bedeutung der einzelnen C-terminalen Serine des CCR5 für die β -Arrestin-Bindung an CCR5 zu untersuchen, wurden diese in unterschiedlicher Anzahl und Position gegen Alanin mutagenisiert. Anschließend wurde die β -Arrestin-Bindung und Internalisierung dieser Rezeptormutanten untersucht. Dabei konnte gezeigt werden, daß β -Arrestin wenigstens zwei intakte Serin-Phosphorylierungsstellen zur Bindung an CCR5 benötigt, wobei die genaue Position dieser Serine unerheblich ist (Abb. 12). Weiterhin konnte keine durch die Anzahl der potenziell phosphorylierbaren Serine determinierte Abstufung der β -Arrestin-Bindung an CCR5 festgestellt werden. Eine derartige von der Anzahl potentieller Phosphorylierungsstellen abhängige Abstufung der β -Arrestin-Affinität findet man im Licht-aktivierten Rhodopsin. Hier steigt die β -Arrestin-Affinität zum Rezeptor mit Erhöhung der intakten Phosphorylierungsstellen bis zu einer Stöchiometrie von 4 mol Phosphat / mol Rezeptor linear an (GIBSON *et al.*, 2000). Im β -adrenergen und m2-muskarinischen Rezeptor dagegen hat man gefunden, daß eine Stöchiometrie von 2 mol Phosphat / mol Rezeptor erforderlich und auch ausreichend für eine β -Arrestin-Bindung an den jeweiligen Rezeptor ist (GUREVICH *et al.*, 1993, GUREVICH *et al.*, 1995).

Übereinstimmend mit den Ergebnissen zur β -Arrestin-Bindung an CCR5 konnte gezeigt werden, daß auch für die schnelle Internalisierung dieses Rezeptors zwei intakte Serin-Phosphorylierungsstellen notwendig und ausreichend sind (Abb. 13). Somit kann postuliert werden, daß die schnelle CCR5-Internalisierung abhängig ist von β -Arrestin, welches eine Internalisierung über Clathrin-umhüllte Vesikel vermittelt. Diese Hypothese wird durch aktuelle elektronenmikroskopische Untersuchungen unterstützt, in denen gezeigt wurde, daß sich CCR5-Rezeptoren in RBL-CCR5-Zellen nach Stimulation mit RANTES von einer willkürlichen Verteilung auf der Membran clusterförmig in vorgeformte Clathrin-Gitter umlagern. Weiterhin konnten die Autoren zeigen, daß eine Deletion des Clathrins durch eine der schweren Clathrin-Kette entsprechenden si-RNA ein vollständiges Ausbleiben der CCR5-Internalisierung nach RANTES-Stimulation zur Folge hatte (SIGNORET *et al.*, eingereichtes Manuskript). Die in der vorliegenden Arbeit nach 30 min beobachtete Internalisierung der phosphorylierungsdefizienten CCR5-S/A-Mutante (Abb. 13), die nicht mehr in der Lage war, β -Arrestin zu binden, impliziert jedoch, daß der CCR5 noch über einen zweiten, β -Arrestin-unabhängigen Weg internalisiert werden kann. In der Literatur wurde postuliert, daß CCR5 zusätzlich zur Clathrin-vermittelten Endozytose auch abhängig von Cholesterin über Caveolae in die Zelle aufgenommen wird (MUELLER *et al.*, 2002, VENKATESAN *et al.*, 2003, GOMEZ-MOUTON *et al.*, 2004). Diese Arbeiten wurden jedoch von SIGNORET *et al.* (unveröffentlichtes Manuskript) in Frage gestellt, die zeigen konnten, daß eine Cholesterin-Depletion zwar die Agonist-Bindung an den CCR5, nicht aber dessen Internalisierung beeinflusst. Weiterhin konnte die Arbeitsgruppe eine Stimulations-unabhängige, spontane Membraninternalisierung beobachten, die eine Endozytose von etwa 2 – 3 % des exprimierten Rezeptors pro Minute zur Folge hat (M. Marsh, persönliche Mitteilung). Dadurch blieb die Rezeptordichte auf der Zelloberfläche unverändert, da statistisch gesehen die gleiche Rezeptormenge neu auf die Zelloberfläche transportiert wurde, wie auch Rezeptor in die Zelle aufgenommen wurde. In der in dieser Arbeit verwendeten Untersuchung zur Rezeptorinternalisierung, bei der die Rezeptoren mit radioaktiv markiertem Ligand vorinkubiert wurden und die prozentuale, säureresistente und damit in die Zelle aufgenommene Aktivität verglichen mit der gesamt-zellassozierten Aktivität bestimmt wurde, würde demnach durch den unstimulierten Rezeptorgrundumsatz nach 30 min etwa 60 – 90 % der Aktivität mit in die Zelle endozytiert werden. Bei der Ligandinternalisierung der RANTES-stimulierten RBL-CCR5-S/A-Zellen, die nach

3 min 5 %, nach 10 min 34 % und nach 30 min 66 % betrug (Abb. 13), könnte diese Internalisierung demnach der unspezifischen Ligandaufnahme durch Membranfluß in die Zelle entsprechen. RBL-CCR5-Zellen zeigten dagegen mit 55 % nach 3 min und 77 % nach 10 min eine ^{125}I -RANTES-Internalisierung, die weit über der zu erwartenden unspezifischen Aufnahme lag und somit spezifisch dem durch Ligandbindung internalisierten Rezeptor entsprach.

Zusammenfassend kann unter Einbeziehung der Ergebnisse von SIGNORET *et al.* postuliert werden, daß CCR5 nach RANTES-Stimulation ausschließlich β -Arrestin-abhängig über Clathrin-umhüllte Vesikel in die Zelle internalisiert wird und daß diese Internalisierung abhängig von wenigstens zwei intakten CCR5-Serin-Phosphorylierungsstellen ist.

Neben der Bindung des β -Arrestins an den CCR5-C-Terminus konnte mittels SPR-Analyse das DRY-Motiv am Beginn der zweiten cytoplasmatischen Rezeptorschleife, das eine in GPCRs hoch konservierte G-Protein-Bindestelle darstellt (PROBST *et al.*, 1992), als weitere β -Arrestin-Bindungsstelle im CCR5 identifiziert werden (HÜTTENRAUCH *et al.*, 2002). RBL-CCR5-DR/NN-Zellen, in denen Aspartat (D) 125 und Arginin (R) 126 gegen Asparagin (N) ausgetauscht wurden, konnten nach RANTES-Stimulation zwar β -Arrestin an die Membran rekrutieren, zeigten aber keine schnelle, β -Arrestin-vermittelte Internalisierung (Abb. 17 und 19). Diese Beobachtung läßt sich mit einem aktuellen Modell der Bindung von β -Arrestin an GPCRs in Einklang bringen, das auf der Grundlage der kürzlich aufgelösten β -Arrestin-1-Kristallstruktur entwickelt wurde. Durch kristallographische Analyse der β -Arrestin-Struktur wurde postuliert, daß β -Arrestin wenigstens 2 Konformationen annehmen kann. In der inaktiven, cytosolischen Form liegt der β -Arrestin C-Terminus, der mit AP-2 und Clathrin interagieren kann, in einem polaren Kern gebunden vor, der aus β -Strängen der N- und C-Domäne und der α -Helix I des Arrestins gebildet wird. Für β -Arrestin werden zwei Sensor-Regionen angenommen, wobei eine Region den Rezeptor-Phosphorylierungsstatus erkennt und der andere Sensor die Aktivierung des Rezeptors kontrolliert. Nur wenn beide Sensoren simultan einen aktivierten und zugleich phosphorylierten Rezeptor erkennen, kommt es innerhalb des β -Arrestins zu Konformationsänderungen, die durch die Exposition weiterer Bindungsstellen eine hoch affine β -Arrestin-Rezeptor-Interaktion ermöglichen (Abb. 48).

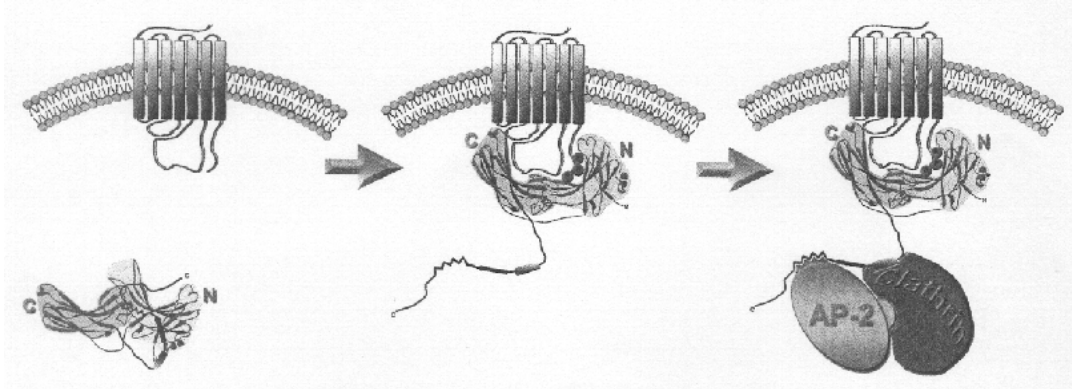


Abb. 48: Modell der β -Arrestin-Bindung an GPCRs

Die Auflösung der β -Arrestin-1-Kristallstruktur der inaktiven, cytosolischen Form von β -Arrestin-1 ermöglichte den Entwurf eines Modells für den Bindungsmechanismus von β -Arrestin an GPCRs. Demnach bindet β -Arrestin sowohl mit seiner C-Domäne als auch mit seiner N-Domäne ausschließlich an phosphorylierte und gleichzeitig aktivierte GPCRs. Diese Bindung katalysiert die Freisetzung des β -Arrestin-1 C-Terminus, der mit AP-2 und Clathrin interagiert.

(Abb. aus GUREVICH *et al.*, 2003)

Durch die Bindung an den Rezeptor wird dabei der polare Kern des β -Arrestins destabilisiert, wodurch der C-Terminus aus dem polaren Kern freigesetzt und zugänglich wird für die Bindung von AP-2 und Clathrin (HIRSCH *et al.*, 1999, HAN *et al.*, 2001, GUREVICH *et al.*, 2003, SERGEY *et al.*, 2004). Bisher konnte aber noch kein Rezeptor- β -Arrestin-Komplex kristallisiert werden, der dieses Modell bestätigen würde.

Die Bindung beider Arrestin-Domänen an den GPCR impliziert, daß β -Arrestin neben dem phosphorylierten C-Terminus noch weitere Regionen im cytoplasmatischen Teil des Rezeptors erkennt. Eine mögliche Bindestelle könnte das Rezeptor-DRY-Motiv darstellen, das über Peptid-Bindungsstudien identifiziert worden war (HÜTTENRAUCH *et al.*, 2002). Dieses Motiv könnte im Kontext der Zwei-Sensor-Hypothese dem Aktivierungssensor auf β -Arrestin entsprechen. In der in dieser Arbeit verwendeten CCR5-DR/NN-Mutante würde das bedeuten, daß β -Arrestin den Rezeptor zwar binden kann, aber daß durch das mutagenisierte DRY-Motiv der polare Kern intakt bleibt, der den β -Arrestin C-Terminus arretiert. Diese Hypothese könnte den Defekt der RBL-CCR5-DR/NN-Zellen in der β -Arrestin-abhängigen Internalisierung erklären, setzt jedoch eine Phosphorylierung des CCR5 trotz fehlender G-Protein-Bindung voraus. Die Phosphorylierung der RBL-CCR5-DR/NN-Zellen konnte in dieser Arbeit nicht bestimmt werden, da alle phosphospezifischen anti-CCR5 Antikörper E11 und V14 und RC-10 den CCR5-C-Terminus nicht erkannten. Dieses Ergebnis deutet auf

eine eventuelle Konformationsänderung des Rezeptor-C-Terminus hin. Tatsächlich konnte für den N-formyl Peptid Rezeptor (FPR) gezeigt werden, daß eine FPR-R123G-Mutante, in der eine der DRY-Aminosäuren mutagenisiert wurde und die nicht mehr zur G-Protein-Bindung in der Lage war, dennoch phosphoryliert wurde (PROSSNITZ *et al.*, 1999, BENNETT *et al.*, 2000). Dagegen zeigte eine R139G-Mutante des Gastrin-releasing Peptid Rezeptors keine Ligand-induzierte Phosphorylierung (ALLY *et al.*, 2003).

Zusammenfassend konnten eigene Arbeiten das in der Literatur diskutierte Modell, demzufolge β -Arrestin aktivierte Rezeptoren in zwei Schritten erkennt, von der Seite des Rezeptors bestätigen und ergänzen. So erkennt β -Arrestin nicht nur die C-terminale Phosphorylierung, sondern auch die korrekte Aktivierung eines GPCR, wobei die DRY-Sequenz im CCR5 eine wichtige Rolle in der Vermittlung der Rezeptoraktivierung innezuhaben scheint.

Im Rahmen der Untersuchungen zur CCR5-Kreuzregulation wurde die Phosphorylierung und Voraussetzung der β -Arrestin-Bindung an den verwandten C5a-Rezeptor untersucht. C5aR weist in seinem C-Terminus 6 Serine und 5 Threonine als mögliche Phosphorylierungsstellen auf. In stabilen RBL-C5aR-Zellreihen wurde gefunden, daß der C5a-Rezeptor nach Ligand-Stimulation mit 50 nM C5a sowohl an Serinen als auch an Threoninen phosphoryliert wird, wobei die Serinphosphorylierung wesentlich stärker ausgeprägt ist als die Threonin-Phosphorylierung (Abb. 32). Auch ein mutagenisierter C5aR, bei dem alle sechs Serine gegen Alanin ausgetauscht wurden (C5aR-S/A), zeigte eine deutliche Threonin-Phosphorylierung nach C5a-Stimulation. Diese Ergebnisse stehen im Widerspruch zu einer Arbeit, in der berichtet wurde, daß C5aR nach Stimulation mit C5a oder PMA ausschließlich an Serinen phosphoryliert wird (GIANNINI *et al.*, 1995).

Entsprechend der unterschiedlichen Ergebnisse der Phosphoaminosäurenanalyse ergeben sich auch in Bezug auf die C5aR-Internalisierung konträre Daten im Vergleich zu Literaturangaben. Es wurde zuvor postuliert, daß die Internalisierung und β -Arrestin-Bindung an den C5aR abhängig ist von zwei intakten Serinen, wobei hier die genaue Position der Serine entscheidend sei. Es wurde gezeigt, daß die distalen Serine des C5aR-C-Terminus Ser334 und Ser338 als primäre Phosphorylierungsstellen dienen und daß die partielle Phosphorylierung des C5aR an den Serinpaaren Ser327/Ser338 oder Ser334/Ser338 notwendig und ausreichend für eine dem C5aR-WT-vergleichbare

Rezeptor-Internalisierung und β -Arrestin-Cotransport in intrazelluläre Vesikel ist (CHRISTOPHE *et al.*, 2000, BRAUN *et al.*, 2003). In der vorliegenden Arbeit konnte dagegen gezeigt werden, daß die Konservierung des C5aR-Serins-334 in Kombination mit intakten Threonin-Phosphorylierungsstellen (C5aR-S/A-S334) ausreichend für eine C5a-vermittelte Internalisierung des C5aR war (Abb. 34). Dagegen zeigten die RBL-C5aR-S/A- und RBL-C5aR-ST/A-Zellreihen mit Austausch aller Serine bzw. aller Serine und Threonine einen nahezu identisch verlaufenden Defekt in der schnellen Rezeptor-Internalisierung nach C5a-Stimulation. Vergleicht man die Eigenschaften der C5aR-S/A-Mutante (β -Arrestin-Bindung bei defekter, schneller Internalisierung) mit denen der CCR5-DR/NN-Mutante, so läßt sich postulieren, daß auch hier eine niederaffine Interaktion zwischen Threonin-phosphoryliertem Rezeptor und β -Arrestin eingegangen wird. Allerdings reicht die Threonin-Phosphorylierung allein offenbar nicht zur Aktivierung und Konformationsänderung des β -Arrestins aus. Erst durch die zusätzliche Phosphorylierung eines Serins in der C5aR-S/A-S334-Mutante wird die Aktivierung des β -Arrestins katalysiert, die in der Rekrutierung von Komponenten der Clathrin-Internalisierungsmaaschinerie resultiert. Somit wird erneut deutlich, daß die β -Arrestin-Bindung an die untersuchten GPCRs einem zweistufigen Prozeß entspricht. Diesem Modell zufolge wird nach der Bindung des β -Arrestins an den Rezeptor der Aktivierungszustand des Rezeptors überprüft und darauffolgend nur bei einem aktivierten und ausreichend phosphorylierten Rezeptor der β -Arrestin C-Terminus freigesetzt. Dieser katalysiert schließlich die Internalisierung des Rezeptors.

Als Desensibilisierung wird die Deaktivierung von Rezeptoren nach einer Ligand-Stimulation bezeichnet, die die Beendigung von Signalkaskaden und in der Regel auch die Internalisierung des Ligand-gebundenen Rezeptors zur Folge hat. Neben der durch Phosphorylierung verursachten Konformationsänderung des Rezeptors wird der Bindung des β -Arrestins an den phosphorylierten Rezeptor eine große Bedeutung bei der Rezeptor-Desensibilisierung zugeschrieben. Für CCR5 konnte gezeigt werden, daß die Deletion der vier C-terminalen Serin-Phosphorylierungsstellen eine verlängerte Aktivierung und damit verzögerte Desensibilisierung des Rezeptors zur Folge hatte (KRAFT *et al.*, 2001).

In dieser Arbeit wurde die Bedeutung dieser vier Serine für die Desensibilisierung des CCR5 im Einzelnen untersucht. Als Parameter hierfür wurden die intrazelluläre

Calciumionen-Freisetzung und die Freisetzung der N-Acetyl- β -D-Glucosaminidase (NAGA) nach RANTES-Stimulation bestimmt. Es konnte gezeigt werden, daß der Austausch eines beliebigen Serins die CCR5-Desensibilisierung nicht beeinträchtigte, wohingegen der Austausch von drei Serinen gegen Alanin einen Defekt in der Desensibilisierung verursachte, der mit dem der komplett phosphorylierungsdefizienten Mutante vergleichbar war (Tab. 4). Im Gegensatz zu den Ergebnissen der β -Arrestin-Bindung an CCR5 und der Rezeptor-Internalisierung wurde aber gefunden, daß beim Austausch zweier Serine die exakte Position dieser Serin-Phosphorylierungsstellen für die Desensibilisierung des CCR5 sehr wohl von Bedeutung ist. So zeigte CCR5- Δ 2A als einzige Mutante mit Austausch von zwei Serinen eine dem CCR5-WT vergleichbare Desensibilisierung. Alle anderen CCR5- Δ 2-Mutanten wiesen trotz intakter β -Arrestin-Bindung und Internalisierung eine verzögerte Rezeptor-Desensibilisierung auf. Dieses Ergebnis impliziert, daß neben der β -Arrestin-abhängigen Rezeptordesensibilisierung noch weitere, wahrscheinlich phosphorylierungsabhängige Mechanismen der Desensibilisierung existieren, bei denen die exakte Position der Serine von Bedeutung ist.

Ähnliche Beobachtungen wurden beim C5a-Rezeptor gemacht. Hier wurde gefunden, daß im besonderen die exakte Position der Serine 332, 334 und 338 für die Rezeptorregulation von Bedeutung ist (CHRISTOPHE *et al.*, 2000, BRAUN *et al.*, 2003). Auch für den N-formyl Peptid Rezeptor (KEY *et al.*, 2001, BENNETT *et al.*, 2001) wurde eine β -Arrestin-unabhängige Inhibition der Rezeptor-G-Protein-Interaktion durch die Phosphorylierung des Rezeptors gefunden. Der β_2 -adrenerge Rezeptor zeigte dagegen nur eine geringe Beeinträchtigung der G-Protein-Aktivierung durch die Rezeptor-Phosphorylierung. Hier wurde eine vollständige Rezeptor-Desensibilisierung erst durch β -Arrestin-Bindung erreicht (LOHSE *et al.*, 1990).

Zusammenfassend unterstützen die eigenen Ergebnisse die Hypothese, derzufolge Rezeptorphosphorylierung unabhängig von der β -Arrestin-Bindung die G-Protein-Kopplung an verschiedene GPCRs inhibieren kann.

2. Strukturelle Grundlagen, funktionelle Konsequenzen und Relevanz der Dimerisierung von G-Protein-gekoppelten Rezeptoren

G-Protein-gekoppelte Rezeptoren wurden ursprünglich als monomere Einheiten betrachtet. Es häuften sich in der Literatur jedoch die Anzeichen, daß einige GPCRs zur Bildung von Homo- und Heterodimeren in der Lage sind. Der erste GPCR, für den eine Dimerisierung überzeugend nachgewiesen wurde, war der Gamma-Aminobuttersäure Rezeptor B (GABA(B)). Es konnte gezeigt werden, daß dieser Rezeptor aus zwei unterschiedlichen GPCRs zusammengesetzt ist, wobei beide Rezeptoren GbR1 und GbR2 alleine nicht funktionsfähig sind. GbR1 wird durch ein C-terminales Retentionsmotif im ER zurückgehalten, während GbR2 zwar auf der Zelloberfläche exprimiert wird, aber inaktiv ist. Durch die Dimerisierung beider Rezeptoren wird das GbR1-Retentionsmotif maskiert, und beide Rezeptoren werden als funktionelles Heterodimer auf der Zelloberfläche exprimiert (WHITE *et al.*, 1998, NG *et al.*, 1999, MARGETA-MITROVIC *et al.*, 2000). Aufbauend auf dieser Beobachtung konnte mittlerweile für eine Reihe von Rezeptoren die Bildung von Dimeren bzw. Oligomeren nachgewiesen werden (Übersicht in ANGERS *et al.*, 2002, BOUVIER, 2001). Da in den meisten angewandten Untersuchungsmethoden nicht zwischen Dimeren und größeren Oligomeren unterschieden werden kann, wurde in dieser Arbeit durchgängig der Begriff Dimer als kleinste Einheit womöglich vorhandener oligomerer Strukturen verwendet.

Bei der Untersuchung von Rezeptordimeren blieben in der Literatur jedoch bisher einige Fragen offen oder wurden konträr dargestellt. (1) Existieren Rezeptordimere bereits unter basalen Bedingungen oder werden diese erst durch Stimulation mit spezifischen Liganden induziert? (2) Welche strukturellen Grundlagen liegen der Rezeptordimerisierung zu Grunde? (3) Hat die Rezeptordimerisierung sowohl in Homodimeren als auch in Heterodimeren eine funktionelle Konsequenz für die Signaltransduktion und Internalisierung beider Rezeptoren? (4) Welche physiologische Relevanz hat die Rezeptordimerisierung *in vivo* und für medizinische Anwendungen? Insbesondere war ungeklärt, ob die Rezeptordimerisierung Auswirkungen hat auf das zur Zeit gültige Modell der homologen und heterologen Rezeptorregulation durch Phosphorylierung und β -Arrestin-Bindung.

Die mögliche Dimerisierung des CCR5 wurde in dieser Arbeit sowohl mit Immunpräzipitation als auch mittels Biolumineszenz-Resonanz-Energietransfer (BRET) untersucht. Es konnte mit beiden Methoden nachgewiesen werden, daß CCR5 auch in geringen Konzentrationen konstitutiv, also in Abwesenheit des spezifischen Liganden Homodimere ausbildet. Dieses Ergebnis steht im Einklang mit Untersuchungen, die zeigten, daß CCR5 in physiologischen Konzentrationen, die denen auf humanen Lymphozyten und Monozyten entsprechen, Ligand-unmodifiziert Dimere ausbildet (ISSAFRAS *et al.*, 2002). Weiterhin zeigten die Autoren durch subzelluläre Fraktionierung, daß CCR5-Dimere sowohl auf der Zellmembran als auch bereits im ER unstimulierter Zellen nachgewiesen werden konnten. Untersuchungen anderer Autoren deuten darauf hin, daß Ligand-Aktivierung die CCR5-Dimerisierung möglicherweise stabilisiert, da in Immunpräzipitationsexperimenten nur in Chemokin-stimulierten Zellen CCR5-Dimere gefunden wurden (HERNANZ-FALCON *et al.*, 2004).

Basale Rezeptordimerisierung, die nicht durch Ligand modifiziert wurde, konnte bisher unter anderem für die Vasopressin-Rezeptoren V1a und V1b und den Oxytocin Rezeptor (TERRILLON *et al.*, 2003), den α_{1b} -adrenergen Rezeptor (STANASILA *et al.*, 2003), den Adenosin A_{2A} -Rezeptor (CANALS *et al.*, 2004), den C5a Rezeptor (FLOYD *et al.*, 2003), den CXCR4 (BABCOCK *et al.*, 2003), den κ -opiod Rezeptor (RAMSAY *et al.*, 2002) und den Calcium-sensing Rezeptor CaR (JENSEN *et al.*, 2002) nachgewiesen werden. Dagegen wurde eine Dimerisierung-steigernde Ligand Wirkung für den β_2 -adrenergen Rezeptor (ANGERS *et al.*, 2000) berichtet. Die Quantifizierung des möglichen Einflusses der Liganden auf die Rezeptordimerisierung ist jedoch kritisch zu bewerten, da in BRET-Analysen bereits Konformationsänderungen der Rezeptoren nach Stimulation zu einem veränderten Energietransfer führen können. Hier nimmt der Energietransfer mit der 6. Potenz des Abstandes von Luciferase und GFP ab. In der Vergangenheit wurde für einige GPCRs, so auch für CCR5 postuliert, daß diese als Monomere auf den Zellen exprimiert werden und sich erst nach Stimulation als Dimere zusammenlagern (RODRIGUEZ-FRADE *et al.*, 2001). Es werden jedoch immer mehr Beispiele berichtet, in denen die Dimerisierung von Rezeptoren als eine Voraussetzung für das Verlassen des ERs postuliert wird. Während bereits lange bekannt ist, daß die Bildung oligomerer Strukturen für viele Proteine eine wichtige Voraussetzung für das Passieren des ERs ist (REDDY *et al.*, 1998), war der GABA(B)-Rezeptor der erste GPCR, für den dieser Mechanismus gleichfalls gezeigt wurde (MARGETA-MITROVIC *et al.*, 2000). Mittlerweile konnte das ER als GPCR-

Kontrollpunkt auch für den humanen δ -opioid Rezeptor verifiziert werden, nachdem gezeigt wurde, daß mißgefaltete δ -opioid Rezeptoren an die cytosolische Seite des ER transportiert werden, deglycosyliert und durch das cytosolische 26 S Proteasom abgebaut werden (PETAJA-REPO *et al.*, 2001).

Zusammenfassend weisen die eigenen Ergebnisse in Übereinstimmung mit den meisten Literaturbefunden darauf hin, daß CCR5 bereits unter konstitutiven Bedingungen Dimere bildet.

Nach dem Nachweis der CCR5-Dimerisierung mittels BRET und Immunpräzipitation wurden die strukturellen Voraussetzungen der Dimerbildung untersucht. Es wurde postuliert, daß GPCRs entweder die Transmembrandomänen TM1 und TM2, TM4 und TM5 oder TM4 alleine als Dimerisierungsdomänen verwenden (KLCO *et al.*, 2003). In dieser Arbeit wurde daher in zwei unterschiedlichen Ansätzen versucht, die CCR5-Dimerbildung zu inhibieren.

Im ersten Ansatz wurden zwei Peptide verwendet, die in der Arbeitsgruppe um M. Mellado identifiziert wurden (HERNANZ-FALCON *et al.*, 2004). Diese Autoren zeigten, daß die Aminosäuren Ile52 der TM 1 und Val150 der TM 4 essenziell für die CCR5-Dimerbildung sind. Die Autoren beobachteten außerdem, daß die Inkubation von CCR5 exprimierenden Zellen mit zwei synthetischen Heptameren, in denen die Aminosäuren Ile52 und Val150 (R5wt1 und R5wt4) enthalten waren, die Aktivierbarkeit intakter Rezeptoren blockieren konnte. Weiterhin inhibierten die Peptide die Dimerbildung in FRET-Analysen und Immunpräzipitationen. Um diese Ergebnisse zu überprüfen und dann auf die mögliche Blockade von Heterodimeren auszuweiten, wurden die Peptide R5wt1 und R5wt4 für eigene Versuche synthetisiert und eingesetzt. Hier zeigte sich jedoch, daß die Peptide in keinem der getesteten Versuchsansätze einen signifikanten Einfluß auf die CCR5-Dimerisierung oder andere von Mellado *et al.* postulierte Auswirkungen auf die Rezeptorfunktion hatten. Der Grund für diese abweichenden Ergebnisse bleibt zunächst ungeklärt.

In einem zweiten Ansatz wurde die Bedeutung des ersten Leucins in der TM1 von CCR5 und C5aR für die Rezeptordimerisierung untersucht. Ausgangspunkt hierfür war eine Studie der Arbeitsgruppe von T. Baranski *et al.*, in der eine C5aR-cDNA-Bank angefertigt wurde, in der in die Transmembranregionen des C5aR zufällig und in hoher Zahl Mutationen eingefügt wurden. Es wurde ein putativer dreidimensionaler Aufbau

des C5aR erstellt, in dem Aminosäuren der ersten und der zweiten Transmembranregion als mögliche Interaktionsstellen von Rezeptordimeren prognostiziert wurden. Dabei war auffällig, daß Leu41 als einzigen Austausch ein Cystein tolerierte, das zur Ausbildung von Disulfidbrücken befähigt ist (BARANSKI *et al.*, 1999, GEVA *et al.*, 2000). Ein Sequenzvergleich der ersten Transmembranregion von C5aR, CCR1 bis CCR5 und dem Rhodopsin-Rezeptor ergab, daß Leu41 eine hoch konservierte Aminosäure an dieser Position darstellt. Daher wurden C5aR- und CCR5-Rezeptormutanten erstellt, in denen C5aR-Leu41 und das entsprechende CCR5-Leu36 gegen Val ausgetauscht wurden, und es wurde die Expression und Aktivität dieser Rezeptoren untersucht. Hier zeigte sich, daß die Oberflächenexpression beider mutagenisierter Rezeptoren drastisch reduziert war. Geht man von der Hypothese aus, daß die Dimerisierung eine Voraussetzung für eine stabile Expression von GPCRs ist, so könnte dies bedeuten, daß mit dem Leucin eine wichtige Dimerisierungsdomäne deletiert wurde und die Rezeptoren demnach innerhalb der Zelle zurückgehalten werden. Es ist jedoch nicht auszuschließen, daß der Austausch des Leucins die monomere Rezeptorstruktur an sich destabilisiert und somit keine korrekte Faltung beider Rezeptoren ermöglicht wird. Um diese Frage zu klären wurden Dimerisierungsversuche durchgeführt. In der BRET-Analyse konnte kein klärendes Ergebnis erzielt werden, da hier das BRET-Signal stark variierte, abhängig davon, welcher Rezeptor in Luciferase- bzw. GFP-gekoppelter Form verwendet wurde (Abb. 41). In Co-Immunpräzipitationsexperimenten konnte ebenfalls kein eindeutiges Ergebnis erzielt werden, da hier durch die geringere Rezeptorexpression am Rand der Nachweisgrenze gearbeitet wurde. Um die Bedeutung des Leucins zu Beginn der TM1 für die Dimerbildung zu klären, wäre demnach in der Zukunft eine intensive Analyse der 3D-Struktur der mutagenisierten Rezeptoren erforderlich.

Vergleicht man die Untersuchungen anderer Autoren zur Dimerbildung von GPCRs, so wurde noch kein allgemein gültiges Dimerisierungsmotif gefunden. Für CCR5 konnte gezeigt werden, daß die N-terminalen Aminosäuren 2-17 nicht für die Dimerisierung essentiell sind (BANNERT *et al.*, 2001). Es wurde weiterhin prognostiziert, daß die Dimerisierungsdomäne des CCR5 in der Transmembranregion 3 oder 4 lokalisiert sein könnte (CHELLI *et al.*, 2001). Für den β_2 -adrenergen Rezeptor wurde postuliert, daß ein $^{276}\text{GXXXGXXXL}^{284}$ -Motif in TM6 für die Bildung von Homodimeren und auch für den Transport der Rezeptordimere aus dem ER von Bedeutung ist. Hier konnte gezeigt werden, daß ein an den postulierten Positionen mutagenisierter $\beta_2\text{AR-Leu}^{276}\text{-Leu}^{280}\text{-Tyr}^{284}$ -Rezeptor eine um 50 % reduzierte Dimerisierung gemäß

BRET-Messungen aufwies (HEBERT *et al.*, 1996, SALAHPOUR *et al.*, 2004). Dieses Ergebnis deutet aber auch darauf hin, daß das mögliche Dimerisierungsmotif in TM6 nicht die einzige Dimerisierungsdomäne in diesem Rezeptor darstellen kann. Für den α_{1b} -adrenergen Rezeptor wurde postuliert, daß TM1 wichtig für die Homodimerisierung ist (STANASILA *et al.*, 2003), während für Rhodopsin postuliert wurde, daß TM4 und TM5 die Kontaktstelle für Dimere darstellen und TM1 und TM2 den Kontakt zwischen den Dimerreihen herstellen (LIANG *et al.*, 2003). Beim α -Faktor-Rezeptor in der Hefe *Saccharomyces cerevisiae* wurde ein GXXXG-Motif in TM1 als Dimerisierungsdomäne identifiziert (OVERTON *et al.*, 2003).

Zusammenfassend konnten die strukturellen Voraussetzungen der Dimerisierung bisher für keinen GPCR vollständig aufgeklärt werden. Es wird aber deutlich, daß es offenbar kein für alle GPCRs allgemeingültiges Dimerisierungsmotif gibt, da Sequenzen und Strukturen der einzelnen Rezeptoren stark voneinander abweichen.

Es konnte gezeigt werden, daß GPCRs nicht nur Homodimere ausbilden, sondern auch mit anderen Rezeptorsubtypen oder nicht verwandten Rezeptoren Dimere ausbilden können. Der erste GPCR, für den die Heterodimerisierung nachgewiesen wurde, ist der Gamma-Aminobuttersäure Rezeptor, der aus zwei unterschiedlichen Subtypen GbR1 und GbR2 aufgebaut wird (WHITE *et al.*, 1998, NG *et al.*, 1999, MARGETA-MITROVIC *et al.*, 2000). Ähnliche heterodimere Rezeptoren, die aus zwei verwandten Subklassen gebildet werden, konnten bisher beispielsweise für κ - und δ -opiod Rezeptoren (RAMSAY *et al.*, 2002), μ - und δ -opiod Rezeptoren (GEORGE *et al.*, 2000) und α_{1a} - und α_{1b} -adrenerge Rezeptoren (STANASILA *et al.*, 2003) gezeigt werden.

In dieser Arbeit wurde die Fähigkeit von CCR5 zur Heterodimerisierung mit anderen GPCRs untersucht. Es konnte mittels BRET und Coimmunpräzipitation (Abb. 27 und 28) gezeigt werden, daß CCR5 stabile Heterodimere mit C5aR eingeht. Diese Dimerbildung ist wie die CCR5-Homodimerisierung unabhängig von einer Ligand-Stimulation beider Rezeptoren. Weiterhin konnte für den nicht mit CCR5 verwandten AT1a-Rezeptor gezeigt werden, daß dieser eine wesentlich schwächere Heterodimerisierung mit CCR5 eingeht. In Coimmunpräzipitationsexperimenten konnte hier keine Heterodimerisierung beobachtet werden, während in BRET-Analysen ein geringer Energietransfer zu beobachten war. Dieser Befund deutet darauf hin, daß die

Heterodimerisierung womöglich zu einem gewissen Grad abhängig von der Ähnlichkeit beider Rezeptoren zueinander ist. Ein analoges Konzept wurde für die Heterodimerisierung des α_{1b} -adrenergen Rezeptors postuliert, wobei mittels FRET-Analysen gezeigt wurde, daß das Ausmaß der Heterodimerisierung des α_{1b} -AR abhängig von der Sequenzhomologie des heterologen Dimerpartners ist (STANASILA *et al.*, 2003). Auch für den κ -opiod Rezeptor wurde gezeigt, daß dieser mit höherer Affinität Heterodimere mit dem δ -opiod Rezeptor eingeht, als mit den weniger verwandten β_2 -adrenergen oder dem Thyrotropin-releasing Hormon Rezeptor-1 (RAMSAY *et al.*, 2002). Um dieses Konzept für CCR5 zu untermauern, sind weitere Dimerisierungsstudien mit anderen GPCRs erforderlich. Es konnte bisher gezeigt werden, daß CCR5 Heterodimere mit CD4 (XIAO *et al.*, 1999) und CCR2 (MELLADO *et al.*, 2001) eingeht, während keine Heterodimerisierung mit CXCR4 (BABCOCK *et al.*, 2003, CHELLI *et al.*, 2002) zu erfolgen scheint.

Der Nachweis der Rezeptordimerisierung zieht die Frage nach sich, welche funktionelle Konsequenzen dieser Befund haben könnte. In mehreren Arbeiten wurde postuliert (s.o.), daß die Dimerisierung von Rezeptoren eine Voraussetzung für das Passieren des ER darstellen könnte. Dabei konnte durch Coexpression dominant negativer Rezeptormutanten, die im ER retiniert wurden, gezeigt werden, daß auch ein Anteil des jeweiligen WT-Rezeptors im ER zurückgehalten wurde (SALAHPOUR *et al.*, 2004, CHELLI *et al.*, 2001, KAYKAS *et al.*, 2004). Es ist bisher jedoch wenig über die mögliche Bedeutung der Homodimerisierung für Signaltransduktion und Desensibilierung bekannt.

In der vorliegenden Arbeit wurde die Regulation von Rezeptor-Homodimeren durch Coexpression zweier CCR5-Defektmutanten untersucht. Die dabei verwendete CCR5-S/A-Rezeptormutante mit Austausch aller Serin-Phosphorylierungsstellen gegen Alanin kann nicht phosphoryliert werden, während in der CCR5- $\Delta 2-17$ -Defektmutante die RANTES-Bindedomäne deletiert wurde. Beide Rezeptoren waren einzeln exprimiert nicht zu einer GRK-vermittelten Phosphorylierung, β -Arrestin-Bindung und damit folgender schneller, Ligand-vermittelter Internalisierung fähig. Wurden beide Rezeptoren jedoch auf einer Zelle exprimiert, so konnte überraschenderweise eine GRK-vermittelte Phosphorylierung des CCR5- $\Delta 2-17$ beobachtet werden (Abb. 22). Damit wurde in dieser Arbeit erstmalig gezeigt, daß die G-Protein-gekoppelte

Rezeptorkinase, von der allgemein angenommen wurde, daß sie lediglich Ligand-gebundenen Rezeptor phosphoryliert, auch nicht Ligand-gebundene aber komplezierte Rezeptoren phosphorylieren kann. Es kann postuliert werden, daß diese Phosphorylierung durch die Dimerisierung von CCR5-S/A und CCR5- Δ 2-17 ermöglicht wird.

Neben der Phosphorylierung wurde der Einfluß der Dimerisierung auf die β -Arrestin-Bindung und Internalisierung der mutagenisierten CCR5-Rezeptoren untersucht. Es zeigte sich, daß beide Rezeptoren alleine nach RANTES-Stimulation nicht in der Lage waren, β -Arrestin an die Membran zu translokieren (Abb. 12, 24). In einer Zellreihe, die CCR5-S/A und CCR5- Δ 2-17 coexprimierte, wurde die β -Arrestin-Translokation nach RANTES-Stimulation jedoch wieder hergestellt (Abb. 24). Dies zeigt, daß durch die Dimerisierung beider Rezeptoren nicht nur die GRK-vermittelte Phosphorylierung, sondern auch die β -Arrestin-Bindung komplementiert werden kann. Demnach kann ein Modell postuliert werden (Abb. 49), demzufolge CCR5-S/A den Liganden binden und dadurch die Konformationsänderung beider Dimerpartner induzieren würde. Nach G-Protein-Aktivierung transloziert die GRK an das Rezeptordimer und phosphoryliert den nicht Ligand-gebundenen, aber dennoch aktivierten CCR5- Δ 2-17, was wiederum die β -Arrestin-Bindung ermöglicht.

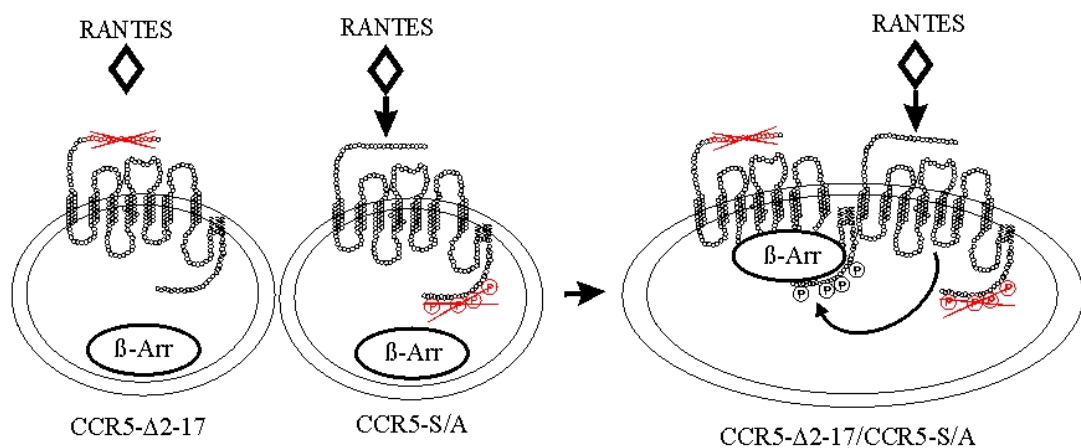


Abb. 49: Modell der Komplementierung der Rezeptorfunktion durch Homodimerisierung

Coexpression und Dimerisierung von CCR5- Δ 2-17, der potenziell zur β -Arrestin-Bindung in der Lage ist aber ein deletiertes RANTES-Bindemotiv besitzt, und CCR5-S/A, der durch Deletion der C-terminalen Phosphorylierungsstellen kein β -Arrestin binden kann, komplementiert den funktionellen Defekt beider Rezeptorvarianten.

Es konnte weiterhin nachgewiesen werden, daß in RBL-CCR5- Δ 2-17/CCR5-S/A-Zellen die RANTES-vermittelte, schnelle Internalisierung des CCR5-S/A nach 10 min signifikant um 40 % erhöht wurde. Offensichtlich induziert die Bindung von β -Arrestin an die CCR5- Δ 2-17/CCR5-S/A-Dimere die Clathrin-vermittelte Internalisierung beider Rezeptoren. Daß die Internalisierungsrate des CCR5-S/A nicht vollständig auf CCR5-WT-Niveau komplementiert wurde, läßt sich durch die Tatsache erklären, daß nur CCR5- Δ 2-17/CCR5-S/A-Dimere, nicht aber CCR5-S/A/CCR5-S/A-Dimere schneller in die Zelle aufgenommen wurden.

Aufgrund der in der Literatur beschriebenen supprimierenden Wirkung dominant negativer Rezeptormutanten auf coexprimierte WT-Rezeptoren, wurde schließlich der Einfluß von CCR5- Δ 2-17 auf CCR5-WT in RBL-CCR5/CCR5- Δ 2-17-Zellen untersucht. Dabei zeigte sich, daß weder die β -Arrestin-Bindung an CCR5 (Abb. 24), noch die Desensibilisierung des Rezeptors (Tab. 6) inhibiert wurden. Demnach besitzt die CCR5- Δ 2-17-Rezeptormutante keinen nachweisbaren dominant negativen Effekt auf CCR5-WT-Rezeptoren.

Ein ähnlicher Versuchsansatz wurde kürzlich für den Angiotensin Rezeptor AT1aR beschrieben (HANSEN *et al.*, 2004). Es wurden ebenfalls ein funktionell inaktiver AT1aR-EEA-Rezeptor und eine AT1aR-K199A-Mutante, in der die Angiotensin-Bindedomäne deletiert wurde, zusammen mit der jeweils anderen Defektmutante oder dem WT-AT1aR coexprimiert. Hier zeigte sich, daß beide Defektmutanten einen dominant negativen Einfluß auf die $G\alpha_q$ -Signalweiterleitung, nicht aber auf die ERK-Aktivierung oder die β -Arrestin-2-Bindung des AT1aR ausübten. Durch Coexpression der K199A-Mutante mit dem WT-AT1aR konnte die β -Arrestin-2-Bindung dieser Defektmutante wiederhergestellt werden, was analog zu den eigenen Versuchen in dieser Arbeit auf eine Dimerisierung beider Rezeptoren zurückzuführen sein könnte.

Zusammenfassend konnte gezeigt werden, daß die Dimerisierung nicht nur eine für den Transport aus dem ER essenzielle Zusammenlagerung zweier Rezeptoren darstellt, sondern auch funktionelle Konsequenzen für beide Rezeptoren nach sich zieht. Da hier erstmalig gezeigt werden konnte, daß GRK auch nicht Ligand-gebundene aber komplexierte Rezeptoren phosphoryliert und damit eine β -Arrestin-Bindung ermöglicht (Abb. 49), scheinen Homodimere in der weiteren Signalweiterleitung als eine funktionelle Einheit eingebunden zu sein.

Nachdem gezeigt wurde, daß CCR5 Heterodimere mit C5aR und zu einem geringen Maße offenbar auch mit AT1aR eingeht, wurde der Einfluß der Dimerpartner auf die heterologe Regulation des CCR5 untersucht.

Dazu wurden coexprimierende RBL-CCR5/C5aR- bzw. RBL-CCR5/AT1aR-Zellen mit C5a bzw. Angiotensin II stimuliert, und es wurde die heterologe PKC- und GRK-vermittelte Phosphorylierung des CCR5 untersucht. Dabei zeigte sich, daß CCR5 in RBL-CCR5/C5aR-Zellen nicht nur durch PKC- sondern auch durch GRKs phosphoryliert wird (Abb. 29). In entsprechenden Kontrollexperimenten wurde eine Kreuzreaktivität der phosphospezifischen Antikörper mit C5aR ausgeschlossen. Dies zeigt, daß GRKs nicht nur in CCR5-Homodimeren, sondern auch in Heterodimeren nicht Ligand-gebundene, komplezierte Rezeptoren phosphorylieren können (Abb. 50). In RBL-CCR5-AT1aR-Zellen konnte dagegen lediglich eine PKC-vermittelte, aber keine GRK-vermittelte Kreuzphosphorylierung des CCR5 nach Angiotensin-Stimulation beobachtet werden (Abb. 29).

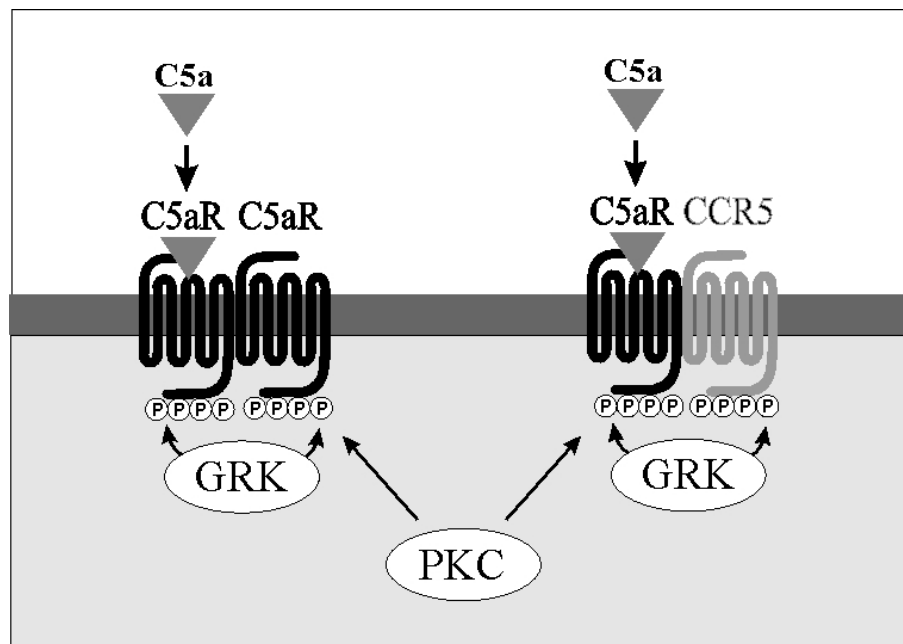


Abb. 50: Modell der GRK-vermittelten heterologen Phosphorylierung

Auf der Grundlage der Phosphorylierungsstudien in Homo- und Heterodimeren kann postuliert werden, daß GRKs entgegen dem bisher gültigen Konzept auch nicht Ligand-gebundene aber komplezierte Rezeptoren heterolog phosphorylieren können.

Der Nachweis der Phosphorylierung nicht Ligand-gebundener Rezeptoren durch GRKs widerlegt das bisher gültige Konzept der heterologen Rezeptorregulation ausschließlich

durch „second-messenger“-aktivierte Kinasen wie PKC und PKA. Es kann postuliert werden, daß die Dimerisierung die heterologe, GRK-vermittelte Phosphorylierung nicht Ligand-gebundener aber komplexierter Rezeptoren ermöglicht (Abb. 50).

Analog zu den Untersuchungen der CCR5-S/A/CCR5- Δ 2-17-Homodimere wurde die heterologe Cointernalisierung des CCR5 in RBL-CCR5/C5aR- bzw. RBL-CCR5/AT1aR-Zellen nach Stimulation mit C5a bzw. Angiotensin II untersucht (Abb. 30). Dabei zeigte sich, daß in RBL-CCR5/C5aR-Zellen etwa 45 % des an der Zelloberfläche exprimierten CCR5 nach heterologer C5a-Stimulation in die Zelle cointernalisiert wurden. Dieser Wert liegt nahe dem der homologen CCR5-Internalisierung nach RANTES-Stimulation, wo nach 2 Stunden etwa 55 % des CCR5 in die Zelle endozytiert worden waren (Abb. 30). Diese Cointernalisierung scheint abhängig von β -Arrestin zu sein. In Zellen, auf denen CCR5 zusammen mit phosphorylierungsdefizienten, nicht β -Arrestin-bindenden C5aR-S/A- oder C5aR-ST/A-Mutanten mit Austausch aller Serine bzw. aller Serine und Threonine gegen Alanin coexprimiert wurde, konnte nach C5a-Stimulation keine CCR5-Cointernalisierung beobachtet werden (Abb. 37). Die C5aR-S/A-S334-Mutante, die ein intaktes Serin und intakte β -Arrestin-Bindung aufwies, konnte CCR5 dagegen heterolog cointernalisieren. Damit weisen die Ergebnisse auf einen β -Arrestin/Clathrin-vermittelten Cointernalisierungsweg für CCR5 hin.

In RBL-CCR5/AT1aR-Zellen konnte nur eine sehr schwache Cointernalisierung des CCR5 nach heterologer ATII-Stimulation beobachtet werden. Hier waren nach 2 h etwa 20 % des CCR5 endozytiert. In der Zusammenschau der Ergebnisse für die CCR5/AT1aR-Heterodimere läßt sich vermuten, daß die beiden Rezeptoren Dimere mit sehr geringer Affinität eventuell auf Grund der Überexpression beider Rezeptoren eingehen. In Coimmunpräzipitationsexperimenten konnten trotz ausreichender Rezeptorexpression keine Heterodimere nachgewiesen werden, während in BRET-Analysen ein schwacher Energietransfer beobachtet wurde. Gleichzeitig konnte nach heterologer ATII-Stimulation keine GRK-vermittelte Phosphorylierung aber eine schwache Cointernalisierung des CCR5 nachgewiesen werden. Eine mögliche Erklärung für diese Beobachtungen wäre die unspezifische Clusterung beider Rezeptoren auf der Zelloberfläche.

Die heterologe CCR5-Cointernalisierung wurde in einem weiteren Rezeptorsystem untersucht, in dem CCR5 zusammen mit einer C5aR-US28_{CT}-Chimäre coexprimiert

wurde. US28 ist ein viraler GPCR, der aus dem humanen Cytomegalievirus kloniert wurde (GAO *et al.*, 1994). Er zeigt eine Ligand-unabhängige, konstitutive Aktivierung, die sich durch eine konstitutive GRK-vermittelte Phosphorylierung (MOKROS *et al.*, 2002; MILLER *et al.*, 2003) und eine konstitutive Internalisierung auszeichnet. Maximal 20 % des US28-Rezeptors liegen auf der Zelloberfläche exprimiert vor, während der Großteil des Rezeptors in intrazellulären Vesikeln lokalisiert ist (FRAILE-RAMOS *et al.*, 2001). Dabei konnte gezeigt werden, daß die Internalisierung von US28 unabhängig von β -Arrestin, aber abhängig von der Clathrin-vermittelten Endozytose ist (FRAILE-RAMOS *et al.*, 2003). Weiterhin ist bekannt, daß die konstitutive Internalisierung alleine durch den US28-C-Terminus determiniert wird, und daß sich die Eigenschaft der konstitutiven Internalisierung durch Transfer des US28-C-Terminus auf andere GPCRs übertragen läßt (WALDHOER *et al.*, 2003).

In dieser Arbeit konnte durch den Transfer des US28-C-Terminus auf C5aR eine konstitutiv internalisierende C5aR-US28_{CT}-Rezeptorchimäre erstellt werden, die wie US28 fast ausschließlich in vesikulären Strukturen innerhalb der Zelle lokalisiert ist (Abb. 39). Durch die Coexpression dieser Chimäre mit CCR5 konnte gezeigt werden, daß CCR5 teilweise konstitutiv mit in die Zelle internalisiert wurde. Dies bestätigt erneut die Hypothese der konstitutiven, Ligand-unabhängigen Bildung von Rezeptordimeren, wobei in diesem Fall das Internalisierungsverhalten des konstitutiv rezirkulierenden C5aR-US28_{CT} dominant ist und auf CCR5 übertragen zu werden scheint.

Der Einfluß der heterologen Rezeptordimerisierung auf die Internalisierung beider Dimerpartner wurde mittlerweile für eine Reihe anderer Rezeptoren untersucht. Für die Heterodimere aus V1a und V2 Vasopressin Rezeptoren, die für sich genommen beide β -Arrestin-abhängig internalisiert werden, konnte gezeigt werden, daß nach selektiver Stimulation einer der beiden Dimerpartner beide Rezeptoren zusammen in die Zelle internalisiert wurden. Da die beiden verwendeten Rezeptoren unterschiedliche Recyclingwege innerhalb der Zelle verwenden, konnte interessanterweise weiterhin gezeigt werden, daß der jeweils stimulierte Dimerpartner das Recycling des Heterodimers bestimmte (TERRILLON *et al.*, 2004). Dagegen konnte im μ -opiod/Substanz-P-Heterodimerpaar in Bezug auf das Recycling eine Dominanz des Substanz-P-Rezeptors festgestellt werden. (PFEIFFER *et al.*, 2003).

Neben der Phosphorylierung und Internalisierung wurde schließlich die Desensibilisierung der RBL-CCR5/C5aR- bzw. RBL-CCR5/AT1aR-Zellen untersucht.

Dabei zeigte sich, daß RBL-CCR5/C5aR-Zellen eine deutlich verlangsamte Desensibilisierung im Vergleich zu RBL-C5aR-Zellen aufwiesen, obwohl beide Zellreihen vergleichbare C5aR-Rezeptormengen exprimierten. Eine mögliche Erklärung für dieses Ergebnis ist, daß das CCR5/C5aR-Heterodimer andere G-Protein Subklassen binden könnte als das C5aR-Homodimer, wodurch eine veränderte Signaltransduktion induziert werden könnte.

Eine veränderte G-Protein-Bindung wurde auch für das μ -/ δ -opiod-Heterodimer postuliert. Hier konnte gezeigt werden, daß die Signaltransduktion des μ -/ δ -opiod-Heterodimers nicht durch Pertussis-Toxin inhibiert werden konnte, während beide Rezeptoren einzeln exprimiert Pertussis-Toxin sensitiv waren. Die Autoren postulierten, daß das Heterodimer andere, Pertussis-Toxin-insensitive G-Protein-Subklassen bindet als die Homodimere (GEORGE *et al.*, 2000). Zu dem gleichen Ergebnis kamen BREIT und Kollegen, die zeigten, daß β_2/β_3 -adrenerge-Heterodimere insensitiv gegenüber Pertussis-Toxin waren, während die ERK-Aktivierung und cAMP-Anreicherung in den jeweiligen Homodimeren durch Pertussis-Toxin inhibiert wurden (BREIT *et al.*, 2004). Diese Vermutung der veränderten G-Protein-Bindung unterstützen strukturelle Analysen der G-Protein-Bindung an aktivierte GPCRs. Es wurde postuliert, daß die Vielzahl an identifizierten Bindungsstellen zwischen GPCR und G-Protein nicht von einem Rezeptor alleine, sondern nur von einem Rezeptordimer repräsentiert werden kann (HAMM *et al.*, 2001, LIANG *et al.*, 2003). Außerdem wurde kürzlich ein pentamerer Komplex bestehend aus einem heterotrimeren G-Protein $G\alpha_{i2}\beta_1\gamma_2$ und einem Leukotrien-B4-Rezeptor-Homodimer aufgereinigt, der diese Hypothese bestätigt (BANERES *et al.*, 2003).

Geht man von der Bindung eines G-Proteins an ein Rezeptordimer aus, dann scheint die Veränderung der G-Protein-Spezifität von Heterodimeren im Vergleich mit den Homodimeren naheliegend, da durch die unterschiedlichen Strukturen der einzelnen Rezeptoren im Heterodimer womöglich auch unterschiedliche G-Protein-Bindungsdomänen gebildet werden.

Die Vielzahl der gezeigten Beispiele für Homo- und Heterodimere wirft die Frage auf, ob Dimerisierung von GPCRs physiologisch relevant ist. Die Untersuchung von Heterodimerisierung zweier Rezeptoren wird aktuell überwiegend in artifiziellen Systemen durchgeführt, in denen beide Rezeptoren überexprimiert werden. Es ist daher

eine offene Frage, ob die Dimerisierung auch bei physiologischer Rezeptorexpression vorliegt, oder ob es sich um artifizielle Ergebnisse handelt. Zum Beispiel konnte für den β_2 -adrenergen Rezeptor gezeigt werden, daß dieser nur bei hohen Expressionsraten Heterodimere mit δ - und κ -opiod Rezeptoren bildet (RAMSAY *et al.*, 2002). Weiterhin muß die Verteilung der *in vivo* Expression der Rezeptoren bedacht werden. Die Heterodimerisierung zweier Rezeptoren, die physiologisch nicht zusammen auf den gleichen Zellen exprimiert werden, kann zu irreführenden Hypothesen führen. Die in dieser Arbeit untersuchten Rezeptoren sind jedoch auf gleichen Zellen exprimiert. Es konnte gezeigt werden, daß CCR5 auf Monocyten, Makrophagen, ruhenden T-Lymphocyten und unreifen dendritischen Zellen exprimiert wird. Dieses Expressionsmuster wurde auch für den C5aR beschrieben. So könnte die hier beobachtete Kreuzregulation beider Rezeptoren auch *in vivo* von Bedeutung sein.

Ein deutliches Beispiel der funktionellen Relevanz der homologen Dimerisierung liefert die CCR5 Δ 32-Defekt-Mutante, die bei immerhin 17 % aller Mitteleuropäer angefounden wird. Homozygote CCR5 Δ 32/CCR5 Δ 32 Individuen sind weitgehend vor einer HIV-1 Infektion geschützt, da der defekte CCR5 nicht an die Zelloberfläche transportiert wird und dem Virus so der nötige Corezeptor fehlt. Es konnte jedoch auch gezeigt werden, daß der Krankheitsausbruch in heterozygoten CCR5/CCR5 Δ 32 Individuen um zwei bis vier Jahre verzögert auftritt im Vergleich zu CCR5/CCR5 homozygoten, HIV-infizierten Personen. Diese Beobachtung ist vermutlich auf eine reduzierte CCR5-Oberflächenexpression zurückzuführen. Es konnte gezeigt werden, daß der defekte CCR5 Δ 32 den intakten CCR5 zum Teil innerhalb der Zelle zurückhält, was durch die Dimerisierung beider Rezeptoren erklärt werden kann (BENKIRANE *et al.*, 1997).

Die Bildung von Rezeptordimeren spielt auch in der Entwicklung neuer Pharmazeutika, die die Aktivität von GPCRs regulieren sollen, eine große Rolle. Beim Design neuer Pharmazeutika wurden meist monomere Rezeptoren als Zielstrukturen angenommen. Durch die Dimerisierung können jedoch gänzlich andere Protein-Zielstrukturen entstehen. Außerdem konnte in einigen Beispielen gezeigt werden, daß Heterodimere zum Teil anders auf Stimuli reagieren als ihre einzeln exprimierten Rezeptorpartner, wodurch die Wirksamkeit von Pharmazeutika verändert oder gänzlich aufgehoben werden könnte (GEORGE *et al.*, 2002).

Diese Überlegungen zeigen, daß die Rezeptordimerisierung eine wichtige Rolle in der *in vivo* Regulation G-Protein-gekoppelter Rezeptoren spielt und daß sich durch die

Aufklärung der Dimerisierung neue Perspektiven insbesondere für die Entwicklung neuer Pharmazeutika auf tun.

3. Die Bedeutung des Rezeptor-C-Terminus für die Phosphorylierung und β -Arrestin-Bindung an CCR5 und C5aR

In einem weiteren Teil dieser Arbeit wurde die Bedeutung des Rezeptor-C-Terminus für die Regulation der Phosphorylierung und β -Arrestin-Bindung von GPCRs untersucht. Dazu wurden Rezeptorchimären aus CCR5 und C5aR hergestellt, in denen die C-Termini beider Rezeptoren untereinander ausgetauscht wurden.

Es konnten zwei funktionelle CCR5-C5aR_{CT}- und C5aR-CCR5_{CT}-Chimären hergestellt werden, die beide eine β -Arrestin-abhängige Internalisierung zeigten und eine charakteristische Chemotaxis der Zellen induzieren konnten. Die Untersuchungen der Rezeptorphosphorylierung zeigten, daß die zeit- und konzentrationsabhängigen Phosphorylierungsmuster zusammen mit dem C-Terminus auf den jeweils anderen Rezeptor übertragen wurden. Die Kinetik der β -Arrestin-Translokation wurde dagegen nicht zusammen mit dem C-Terminus übertragen, sondern blieb vom N-terminalen Rezeptorbereich determiniert. Diese Beobachtung korreliert erneut mit dem postulierten Bindungsmodell der β -Arrestin-Bindung an GPCRs, wonach der Rezeptor-C-Terminus nicht die einzige Bindestelle darstellt.

Ähnliche Studien wurden beim β_2 -adrenergen und dem V2 Vasopressin Rezeptor durchgeführt, wobei der β_2 -adrenerge Rezeptor ein Klasse A Rezeptor ist, der schnell rezirkuliert, und V2 Vasopressin Rezeptor ein Klasse B Rezeptor ist, der zusammen mit β -Arrestin in Endosomen internalisiert wird und langsam rezirkuliert. Hier zeigte sich, daß durch den Austausch der C-Termini beider Rezeptoren das Rezirkulierungsverhalten auf den jeweils anderen Rezeptor übertragen werden konnte (SHENOY *et al.*, 2003). Der Austausch der C-Termini der μ - und δ -opiod Rezeptoren führte dagegen nicht zu einem vertauschten Rezirkulierungsverhalten (WANG *et al.*, 2003). Dies zeigt, daß der Rezeptor-C-Terminus abhängig vom untersuchten Rezeptor in unterschiedlichem Maße die Rezeptorregulation bestimmen kann.

4. Ausblick

In der vorliegenden Arbeit wurden die strukturellen Voraussetzungen der β -Arrestin-Bindung an CCR5 und C5aR untersucht. Dabei konnte sowohl bei CCR5 als auch bei C5aR eine β -Arrestin-Bindung an den Rezeptor nachgewiesen werden, die nicht zugleich zu einer Internalisierung des Rezeptors führte. Die Aufklärung der verschiedenen Stadien der GPCR- β -Arrestin-Interaktion stellen daher eine weitere zukünftige Aufgabe dar.

Aus dem Nachweis der Homo- und Heterodimerisierung von CCR5 resultieren eine Vielzahl neuer Fragestellungen. Zum einen sollen weitere CCR5-Dimerisierungspartner gefunden werden und die Affinität dieser Heterodimerpartner untereinander mittels BRET verglichen werden. Als Partner, mit denen CCR5 möglicherweise komplexiert, kommen neben weiteren chemotaktischen Rezeptoren aus der GPCR-Familie Proteine wie CD4 (als HIV-Corezeptor) in Frage, mit denen CCR5 eine funktionelle Einheit bildet. Diese Daten gestatten möglicherweise Einblick in die strukturellen Voraussetzungen, die der Selektivität der Heterodimerisierung von GPCRs zugrunde liegen.

In diesem Zusammenhang soll auch weiterhin an der Identifizierung der Dimerisierungsdomäne von CCR5 gearbeitet werden. Die Auswirkungen der in dieser Arbeit untersuchten Mutation des ersten Leucins in TM1 von CCR5 und C5aR sollen weiter spezifiziert werden.

Für die konstitutiv internalisierenden Heterodimere aus CCR5 und C5aR-US28_{CT} soll ihre genaue intrazelluläre Lokalisation bestimmt werden. Dazu sollen die Zellen zusätzlich mit spezifischen Antikörpern für Lysosomen bzw. Endosomen angefärbt werden, um den Nachweis der Colokalisation mit den Rezeptoren zu erlauben.

Die beobachtete heterologe CCR5-Internalisierung in den diversen C5aR-Mutanten coexprimierenden Zellen deutet auf einen Clathrin-abhängigen Cointernalisierungsweg hin. Um diese Hypothese zu bestätigen, soll die CCR5-Cointernalisierung in Zellen untersucht werden, in denen die Clathrin-abhängige Internalisierung inhibiert wurde.

V. Zusammenfassung

In dieser Arbeit wurde die Bedeutung der C-terminalen Phosphorylierungsstellen des CC-Chemokin Rezeptors 5 (CCR5) für die Rezeptorregulation untersucht. Es konnte gezeigt werden, daß sowohl für die β -Arrestin-Bindung als auch für die schnelle Rezeptorinternalisierung wenigstens zwei C-terminale Serin-Phosphorylierungsstellen vorhanden sein müssen, wobei die exakte Position dieser zwei Serine unerheblich ist. Für die Rezeptordesensibilisierung dagegen ist die genaue Position dieser Serine bestimmend. Dies impliziert, daß CCR5 auch über β -Arrestin-unabhängige Mechanismen desensibilisiert werden kann.

β -Arrestin bindet außerdem an das in GPCRs hoch konservierte DRY-Motiv am Beginn der zweiten intrazellulären Schleife von CCR5. Dieses Motiv ist nicht essenziell für die Bindung von β -Arrestin an CCR5, vermittelt aber offensichtlich die korrekte Rezeptoraktivierung, die in der β -Arrestin-vermittelten Internalisierung des Rezeptors resultiert.

Es konnte weiterhin gezeigt werden, daß CCR5 bereits unter basalen, nicht Ligand-aktivierten Bedingungen Homodimere bildet. Durch Coexpression zweier CCR5-Mutanten mit unterschiedlichen Defekten in ihrer Rezeptoraktivierbarkeit konnte die Funktion beider Rezeptoren wieder hergestellt werden. Daher läßt sich postulieren, daß Homodimere in der Signaltransduktion vermutlich als eine funktionelle Einheit reguliert werden.

CCR5 bildet neben Homodimeren auch Heterodimere mit dem C5a Rezeptor (C5aR) und zu einem geringeren Maße mit dem Angiotensin Rezeptor II Typ 1a (AT1aR). Durch Coexpression von CCR5 mit C5aR oder AT1aR konnte eine signifikante CCR5-Cointernalisierung nach heterologer C5a-Stimulation beobachtet werden, die bei heterologer Angiotensin-Stimulation deutlich geringer ausfiel. Weiterhin zeigte CCR5 bei Coexpression mit einer konstitutiv internalisierenden C5aR-US28-Chimäre eine Ligand unabhängige Cointernalisierung. Eine phosphorylierungsdefiziente C5aR-Mutante, die nicht in der Lage war, β -Arrestin zu binden, konnte CCR5 nicht cointernalisieren. Damit weisen die Ergebnisse auf einen β -Arrestin/Clathrin-vermittelten Cointernalisierungsweg für CCR5 hin. In Cophosphorylierungs-experimenten konnte gezeigt werden, daß CCR5 nach heterologer C5a-Stimulation

sowohl durch Protein Kinase C (PKC) als auch durch G-Protein-gekoppelte Rezeptorkinasen (GRKs) phosphoryliert wird. Der Nachweis der Phosphorylierung nicht Ligand-gebundener Rezeptoren durch GRKs widerlegt das bisher gültige Konzept der heterologen Rezeptorregulation ausschließlich durch „second-messenger“-aktivierte Kinasen wie PKC und PKA. Es kann postuliert werden, daß die Rezeptor-Dimerisierung die heterologe, GRK-vermittelte Phosphorylierung nicht Ligand-gebundener aber komplexierter Rezeptoren ermöglicht.

Schließlich wurde die Bedeutung des Rezeptor-C-Terminus für die Regulation der Phosphorylierung und β -Arrestin-Bindung von GPCRs untersucht. Dazu wurden Rezeptorchimären aus CCR5 und C5aR hergestellt, in denen die C-Termini beider Rezeptoren untereinander ausgetauscht wurden. Die Untersuchungen zeigten, daß die zeit- und konzentrationsabhängigen Phosphorylierungsmuster zusammen mit dem C-Terminus auf den jeweils anderen Rezeptor übertragen wurden. Die Kinetik der β -Arrestin-Translokation wurde dagegen nicht zusammen mit dem C-Terminus übertragen, sondern blieb vom N-terminalen Rezeptorbereich determiniert.

VI. Literaturverzeichnis

Alkhatib, G., Ahuja, S. S., Light, D., Mummidi, S., Berger, E. A. und Ahuja, S. K. (1997). "CC chemokine receptor 5-mediated signaling and HIV-1 Co-receptor activity share common structural determinants. Critical residues in the third extracellular loop support HIV-1 fusion." *J Biol Chem* **272**(32): 19771-6.

Ally, R. A., Ives, K. L., Traube, E., Eltounsi, I., Chen, P. W., Cahill, P. J., Battey, J. F., Hellmich, M. R. und Kroog, G. S. (2003). "Agonist- and protein kinase C-induced phosphorylation have similar functional consequences for gastrin-releasing peptide receptor signaling via Gq." *Mol Pharmacol* **64**(4): 890-904.

Angers, S., Salahpour, A., Joly, E., Hilairret, S., Chelsky, D., Dennis, M. und Bouvier, M. (2000). "Detection of beta 2-adrenergic receptor dimerization in living cells using bioluminescence resonance energy transfer (BRET)." *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**(7): 3684-9.

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

Attramadal, H., Arriza, J. L., Aoki, C., Dawson, T. M., Codina, J., Kwatra, M. M., Snyder, S. H., Caron, M. G. und Lefkowitz, R. J. (1992). "Beta-arrestin2, a novel member of the arrestin/beta-arrestin gene family." *J Biol Chem* **267**(25): 17882-90.

Babcock, G. J., Farzan, M. und Sodroski, J. (2003). "Ligand-independent dimerization of CXCR4, a principal HIV-1 coreceptor." *J Biol Chem* **278**(5): 3378-85.

Baggiolini, M. (1998). "Chemokines and leukocyte traffic." *Nature* **392**(6676): 565-8.

Baneres, J. L. und Parello, J. (2003). "Structure-based analysis of GPCR function: evidence for a novel pentameric assembly between the dimeric leukotriene B4 receptor BLT1 and the G-protein." *J Mol Biol* **329**(4): 815-29.

Bannert, N., Craig, S., Farzan, M., Sogah, D., Santo, N. V., Choe, H. und Sodroski, J. (2001). "Sialylated O-glycans and sulfated tyrosines in the NH2-terminal domain of CC chemokine receptor 5 contribute to high affinity binding of chemokines." *J Exp Med* **194**(11): 1661-73.

Baranski, T. J., Herzmark, P., Lichtarge, O., Gerber, B. O., Trueheart, J., Meng, E. C., Iiri, T., Sheikh, S. P. und Bourne, H. R. (1999). "C5a receptor activation. Genetic identification of critical residues in four transmembrane helices." *J Biol Chem* **274**(22): 15757-65.

Benkirane, M., Jin, D. Y., Chun, R. F., Koup, R. A. und Jeang, K. T. (1997). "Mechanism of transdominant inhibition of CCR5-mediated HIV-1 infection by CCR5delta32." *J Biol Chem* **272**(49): 30603-6.

- Bennett, T. A., Maestas, D. C. und Prossnitz, E. R. (2000).** "Arrestin binding to the G protein-coupled N-formyl peptide receptor is regulated by the conserved "DRY" sequence." *J Biol Chem* **275**(32): 24590-4.
- Bennett, T. A., Foutz, T. D., Gurevich, V. V., Sklar, L. A. und Prossnitz, E. R. (2001).** "Partial phosphorylation of the N-formyl peptide receptor inhibits G protein association independent of arrestin binding." *J Biol Chem* **276**(52): 49195-203.
- Berridge, M. J. und Irvine, R. F. (1984).** "Inositol triphosphate, a novel second messenger in cellular signal transduction." *Nature* **312**: 315-21.
- Berridge, M. J. (1987).** "Inositol trisphosphate and diacylglycerol: two interacting second messengers." *Annu Rev Biochem* **56**: 159-93.
- Blanpain, C., Doranz, B. J., Vakili, J., Rucker, J., Govaerts, C., Baik, S. S., Lorthioir, O., Migeotte, I., Libert, F., Baleux, F., Vassart, G., Doms, R. W. und Parmentier, M. (1999).** "Multiple charged and aromatic residues in CCR5 amino-terminal domain are involved in high affinity binding of both chemokines and HIV-1 Env protein." *J Biol Chem* **274**(49): 34719-27.
- Blanpain, C., Doranz, B. J., Bondue, A., Govaerts, C., De Leener, A., Vassart, G., Doms, R. W., Proudfoot, A. und Parmentier, M. (2003).** "The core domain of chemokines binds CCR5 extracellular domains while their amino terminus interacts with the transmembrane helix bundle." *J Biol Chem* **278**(7): 5179-87.
- Bockaert, J. und Pin, J. P. (1999).** "Molecular tinkering of G protein-coupled receptors: an evolutionary success." *EMBO J* **18**(7): 1723-9.
- Bouvier, M. (2001).** "Oligomerization of G-protein-coupled transmitter receptors." *Nat Rev Neurosci* **2**(4): 274-86.
- Braun, L., Christophe, T. und Boulay, F. (2003).** "Phosphorylation of key serine residues is required for internalization of the complement 5a (C5a) anaphylatoxin receptor via a beta-arrestin, dynamin, and clathrin-dependent pathway." *J Biol Chem* **278**(6): 4277-85.
- Breit, A., Lagace, M. und Bouvier, M. (2004).** "Hetero-oligomerization between beta2- and beta3-adrenergic receptors generates a beta-adrenergic signaling unit with distinct functional properties." *J Biol Chem* **279**(27): 28756-65.
- Bünemann, M. und Hosey, M. M. (1999).** "G-protein coupled receptor kinases as modulators of G-protein signalling." *J Physiol* **517** (Pt 1): 5-23.
- Canals, M., Burgueno, J., Marcellino, D., Cabello, N., Canela, E. I., Mallol, J., Agnati, L., Ferre, S., Bouvier, M., Fuxe, K., Ciruela, F., Lluís, C. und Franco, R. (2004).** "Homodimerization of adenosine A2A receptors: qualitative and quantitative assessment by fluorescence and bioluminescence energy transfer." *J Neurochem* **88**(3): 726-34.

Chelli, M. und Alizon, M. (2001). "Determinants of the trans-dominant negative effect of truncated forms of the CCR5 chemokine receptor." *J Biol Chem* **276**(50): 46975-82.

Chelli, M. und Alizon, M. (2002). "Rescue of HIV-1 receptor function through cooperation between different forms of the CCR5 chemokine receptor." *J Biol Chem* **277**(42): 39388-96.

Choe, H., Farzan, M., Sun, Y., Sullivan, N., Rollins, B., Ponath, P. D., Wu, L., Mackay, C. R., LaRosa, G., Newman, W., Gerard, N., Gerard, C. und Sodroski, J. (1996). "The beta-chemokine receptors CCR3 and CCR5 facilitate infection by primary HIV-1 isolates." *Cell* **85**(7): 1135-48.

Christophe, T., Rabiet, M. J., Tardif, M., Milcent, M. D. und Boulay, F. (2000). "Human complement 5a (C5a) anaphylatoxin receptor (CD88) phosphorylation sites and their specific role in receptor phosphorylation and attenuation of G protein-mediated responses. Desensitization of C5a receptor controls superoxide production but not receptor sequestration in HL-60 cells." *J Biol Chem* **275**(3): 1656-64.

Clark-Lewis, I., Kim, K. S., Rajarathnam, K., Gong, J. H., Dewald, B., Moser, B., Baggiolini, M. und Sykes, B. D. (1995). "Structure-activity relationships of chemokines." *J Leukoc Biol* **57**(5): 703-11.

Craft, C. M., Whitmore, D. H. und Wiechmann, A. F. (1994). "Cone arrestin identified by targeting expression of a functional family." *J Biol Chem* **269**(6): 4613-9.

DeGraff, J. L., Gagnon, A. W., Benovic, J. L. und Orsini, M. J. (1999). "Role of arrestins in endocytosis and signaling of alpha2-adrenergic receptor subtypes." *J Biol Chem* **274**(16): 11253-9.

Duclos, B., Marcandier, S. und Cozzone, A. J. (1991). "Chemical properties and separation of phosphoamino acids by thin-layer chromatography and/or electrophoresis." *Methods Enzymol* **201**: 10-21.

Elsner, J., Kaefer, V., Emmendorffer, A., Breidenbach, T., Lohmann Matthes, M. L. und Roesler, J. (1992). "Heterogeneity in the mobilization of cytoplasmic calcium by human polymorphonuclear leukocytes in response to fMLP, C5a and IL-8/NAP-1." *J. Leukoc Biol* **51**: 77-83.

Farzan, M., Choe, H., Martin, K. A., Sun, Y., Sidelko, M., Mackay, C. R., Gerard, N. P., Sodroski, J. und Gerard, C. (1997). "HIV-1 entry and macrophage inflammatory protein-1beta-mediated signaling are independent functions of the chemokine receptor CCR5." *J Biol Chem* **272**(11): 6854-7.

Farzan, M., Mirzabekov, T., Kolchinsky, P., Wyatt, R., Cayabyab, M., Gerard, N. P., Gerard, C., Sodroski, J. und Choe, H. (1999). "Tyrosine sulfation of the amino terminus of CCR5 facilitates HIV-1 entry." *Cell* **96**(5): 667-76.

Ferguson, S. S. (2001). "Evolving concepts in G protein-coupled receptor endocytosis: the role in receptor desensitization and signaling." *Pharmacol Rev* **53**(1): 1-24.

- Floyd, D. H., Geva, A., Bruinsma, S. P., Overton, M. C., Blumer, K. J. und Baranski, T. J. (2003).** "C5a receptor oligomerization. II. Fluorescence resonance energy transfer studies of a human G protein-coupled receptor expressed in yeast." *J Biol Chem* **278**(37): 35354-61.
- Fraile-Ramos, A., Kledal, T. N., Pelchen-Matthews, A., Bowers, K., Schwartz, T. W. und Marsh, M. (2001).** "The human cytomegalovirus US28 protein is located in endocytic vesicles and undergoes constitutive endocytosis and recycling." *Mol Biol Cell* **12**(6): 1737-49.
- Fraile-Ramos, A., Kohout, T. A., Waldhoer, M. und Marsh, M. (2003).** "Endocytosis of the viral chemokine receptor US28 does not require beta-arrestins but is dependent on the clathrin-mediated pathway." *Traffic* **4**(4): 243-53.
- Gaborik, Z., Szaszak, M., Szidonya, L., Balla, B., Paku, S., Catt, K. J., Clark, A. J. und Hunyady, L. (2001).** "Beta-arrestin- and dynamin-dependent endocytosis of the AT1 angiotensin receptor." *Mol Pharmacol* **59**(2): 239-47.
- Gao, J. L. und Murphy, P. M. (1994).** "Human cytomegalovirus open reading frame US28 encodes a functional beta chemokine receptor." *J Biol Chem* **269**(46): 28539-42.
- George, S. R., Fan, T., Xie, Z., Tse, R., Tam, V., Varghese, G. und O'Dowd, B. F. (2000).** "Oligomerization of mu- and delta-opioid receptors. Generation of novel functional properties." *J Biol Chem* **275**(34): 26128-35.
- George, S. R., O'Dowd, B. F. und Lee, S. P. (2002).** "G-protein-coupled receptor oligomerization and its potential for drug discovery." *Nat Rev Drug Discov* **1**(10): 808-20.
- Gether, U. und Kobilka, B. K. (1998).** "G protein-coupled receptors. II. Mechanism of agonist activation." *J Biol Chem* **273**(29): 17979-82.
- Geva, A., Lassere, T. B., Lichtarge, O., Pollitt, S. K. und Baranski, T. J. (2000).** "Genetic mapping of the human C5a receptor. Identification of transmembrane amino acids critical for receptor function." *J Biol Chem* **275**(45): 35393-401.
- Giannini, E., Brouchon, L. und Boulay, F. (1995).** "Identification of the major phosphorylation sites in human C5a anaphylatoxin receptor in vivo." *J Biol Chem* **270**(32): 19166-72.
- Gibson, S. K., Parkes, J. H. und Liebman, P. A. (2000).** "Phosphorylation modulates the affinity of light-activated rhodopsin for G protein and arrestin." *Biochemistry* **39**(19): 5738-49.
- Gomez-Mouton, C., Lacalle, R. A., Mira, E., Jimenez-Baranda, S., Barber, D. F., Carrera, A. C., Martinez, A. C. und Manes, S. (2004).** "Dynamic redistribution of raft domains as an organizing platform for signaling during cell chemotaxis." *J Cell Biol* **164**(5): 759-68.

- Goodman, O. B., Jr., Krupnick, J. G., Santini, F., Gurevich, V. V., Penn, R. B., Gagnon, A. W., Keen, J. H. und Benovic, J. L. (1996).** "Beta-arrestin acts as a clathrin adaptor in endocytosis of the beta2-adrenergic receptor." *Nature* **383**(6599): 447-50.
- Gunning, P., Leavitt, J., Muscat, G., Ng, S. Y. und Kedes, L. (1987).** "A human beta-actin expression vector system directs high-level accumulation of antisense transcripts." *Proc Natl Acad Sci U S A* **84**: 4831-35.
- Gupte, J., Cutler, G., Chen, J. L. und Tian, H. (2004).** "Elucidation of signaling properties of vasopressin receptor-related receptor 1 by using the chimeric receptor approach." *Proc Natl Acad Sci U S A* **101**(6): 1508-13.
- Gurevich, V. V., Richardson, R. M., Kim, C. M., Hosey, M. M. und Benovic, J. L. (1993).** "Binding of wild type and chimeric arrestins to the m2 muscarinic cholinergic receptor." *J Biol Chem* **268**(23): 16879-82.
- Gurevich, V. V., Dion, S. B., Onorato, J. J., Ptasienski, J., Kim, C. M., Sterne-Marr, R., Hosey, M. M. und Benovic, J. L. (1995).** "Arrestin interactions with G protein-coupled receptors. Direct binding studies of wild type and mutant arrestins with rhodopsin, beta 2-adrenergic, and m2 muscarinic cholinergic receptors." *J Biol Chem* **270**(2): 720-31.
- Gurevich, V. V. und Gurevich, E. V. (2003).** "The new face of active receptor bound arrestin attracts new partners." *Structure (Camb)* **11**(9): 1037-42.
- Hamm, H. E. (1998).** "The many faces of G protein signaling." *J Biol Chem* **273**(2): 669-72.
- Hamm, H. E. (2001).** "How activated receptors couple to G proteins." *Proc Natl Acad Sci U S A* **98**(9): 4819-21.
- Han, M., Gurevich, V. V., Vishnivetskiy, S. A., Sigler, P. B. und Schubert, C. (2001).** "Crystal structure of beta-arrestin at 1.9 Å: possible mechanism of receptor binding and membrane translocation." *Structure (Camb)* **9**(9): 869-80.
- Hansen, J. L., Theilade, J., Haunso, S. und Sheikh, S. P. (2004).** "Oligomerization of wild type and nonfunctional mutant angiotensin II type I receptors inhibits galphaq protein signaling but not ERK activation." *J Biol Chem* **279**(23): 24108-15.
- Harris, J., Werling, D., Hope, J. C., Taylor, G. und Howard, C. J. (2002).** "Caveolae and caveolin in immune cells: distribution and functions." *Trends Immunol* **23**(3): 158-64.
- Hebert, T. E., Moffett, S., Morello, J. P., Loisel, T. P., Bichet, D. G., Barret, C. und Bouvier, M. (1996).** "A peptide derived from a beta2-adrenergic receptor transmembrane domain inhibits both receptor dimerization and activation." *J Biol Chem* **271**(27): 16384-92.

- Hernanz-Falcon, P., Rodriguez-Frade, J. M., Serrano, A., Juan, D., del Sol, A., Soriano, S. F., Roncal, F., Gomez, L., Valencia, A., Martinez, A. C. und Mellado, M. (2004).** "Identification of amino acid residues crucial for chemokine receptor dimerization." *Nat Immunol* **5**(2): 216-23.
- Hirsch, J. A., Schubert, C., Gurevich, V. V. und Sigler, P. B. (1999).** "The 2.8 Å crystal structure of visual arrestin: a model for arrestin's regulation." *Cell* **97**(2): 257-69.
- Hüttenrauch, F., Nitzki, A., Lin, F. T., Honing, S. und Oppermann, M. (2002).** "Beta-arrestin binding to CC chemokine receptor 5 requires multiple C-terminal receptor phosphorylation sites and involves a conserved Asp-Arg-Tyr sequence motif." *J Biol Chem* **277**(34): 30769-77.
- Issafras, H., Angers, S., Bulenger, S., Blanpain, C., Parmentier, M., Labbe-Jullie, C., Bouvier, M. und Marullo, S. (2002).** "Constitutive agonist-independent CCR5 oligomerization and antibody-mediated clustering occurring at physiological levels of receptors." *J Biol Chem* **277**(38): 34666-73.
- Jensen, A. A., Hansen, J. L., Sheikh, S. P. und Brauner-Osborne, H. (2002).** "Probing intermolecular protein-protein interactions in the calcium-sensing receptor homodimer using bioluminescence resonance energy transfer (BRET)." *Eur J Biochem* **269**(20): 5076-87.
- Kaykas, A., Yang-Snyder, J., Heroux, M., Shah, K. V., Bouvier, M. und Moon, R. T. (2004).** "Mutant Frizzled 4 associated with vitreoretinopathy traps wild-type Frizzled in the endoplasmic reticulum by oligomerization." *Nat Cell Biol* **6**(1): 52-8.
- Key, T. A., Bennett, T. A., Foutz, T. D., Gurevich, V. V., Sklar, L. A. und Prossnitz, E. R. (2001).** "Regulation of formyl peptide receptor agonist affinity by reconstitution with arrestins and heterotrimeric G proteins." *J Biol Chem* **276**(52): 49204-12.
- Kinter, A., Arthos, J., Cicala, C. und Fauci, A. S. (2000).** "Chemokines, cytokines and HIV: a complex network of interactions that influence HIV pathogenesis." *Immunol Rev* **177**: 88-98.
- Klco, J. M., Lassere, T. B. und Baranski, T. J. (2003).** "C5a receptor oligomerization. I. Disulfide trapping reveals oligomers and potential contact surfaces in a G protein-coupled receptor." *J Biol Chem* **278**(37): 35345-53.
- Kohout, T. A., Lin, F. S., Perry, S. J., Conner, D. A. und Lefkowitz, R. J. (2001).** "beta-Arrestin 1 and 2 differentially regulate heptahelical receptor signaling and trafficking." *Proc Natl Acad Sci U S A* **98**(4): 1601-6.
- Kraft, K., Olbrich, H., Majoul, I., Mack, M., Proudfoot, A. und Oppermann, M. (2001).** "Characterization of sequence determinants within the carboxyl-terminal domain of chemokine receptor CCR5 that regulate signaling and receptor internalization." *J Biol Chem* **276**(37): 34408-18.

- Krueger, K. M., Daaka, Y., Pitcher, J. A. und Lefkowitz, R. J. (1997).** "The role of sequestration in G protein-coupled receptor resensitization. Regulation of beta2-adrenergic receptor dephosphorylation by vesicular acidification." *J Biol Chem* **272**(1): 5-8.
- Langkabel, P. (1999).** "Phosphorylierung und Desensibilisierung der chemotaktischen Leukozytenrezeptoren C3aR und C5aR durch G Protein-gekoppelte Rezeptorkinasen." Georg-August-Universität, Göttingen
- Liang, Y., Fotiadis, D., Filipek, S., Saperstein, D. A., Palczewski, K. und Engel, A. (2003).** "Organization of the G protein-coupled receptors rhodopsin and opsin in native membranes." *J Biol Chem* **278**(24): 21655-62.
- Liu, R., Paxton, W. A., Choe, S., Ceradini, D., Martin, S. R., Horuk, R., MacDonald, M. E., Stuhlmann, H., Koup, R. A. und Landau, N. R. (1996).** "Homozygous defect in HIV-1 coreceptor accounts for resistance of some multiply-exposed individuals to HIV-1 infection." *Cell* **86**(3): 367-77.
- Lohse, M. J., Benovic, J. L., Caron, M. G. und Lefkowitz, R. J. (1990).** "Multiple pathways of rapid beta 2-adrenergic receptor desensitization. Delineation with specific inhibitors." *J Biol Chem* **265**(6): 3202-11.
- Lohse, M. J., Benovic, J. L., Codina, J., Caron, M. G. und Lefkowitz, R. J. (1990).** "beta-Arrestin: a protein that regulates beta-adrenergic receptor function." *Science* **248**(4962): 1547-50.
- Luttrell, L. M. und Lefkowitz, R. J. (2002).** "The role of beta-arrestins in the termination and transduction of G-protein-coupled receptor signals." *J Cell Sci* **115**(Pt 3): 455-65.
- Margeta-Mitrovic, M., Jan, Y. N. und Jan, L. Y. (2000).** "A trafficking checkpoint controls GABA(B) receptor heterodimerization." *Neuron* **27**(1): 97-106.
- McDonald, P. H., Chow, C. W., Miller, W. E., Laporte, S. A., Field, M. E., Lin, F. T., Davis, R. J. und Lefkowitz, R. J. (2000).** "Beta-arrestin 2: a receptor-regulated MAPK scaffold for the activation of JNK3." *Science* **290**(5496): 1574-7.
- McPherson, P. S., Kay, B. K. und Hussain, N. K. (2001).** "Signaling on the endocytic pathway." *Traffic* **2**(6): 375-84.
- Mellado, M., Rodriguez-Frade, J. M., Vila-Coro, A. J., Fernandez, S., Martin de Ana, A., Jones, D. R., Toran, J. L. und Martinez, A. C. (2001).** "Chemokine receptor homo- or heterodimerization activates distinct signaling pathways." *EMBO J* **20**(10): 2497-507.
- Miller, W. E. und Lefkowitz, R. J. (2001).** "Expanding roles for beta-arrestins as scaffolds and adapters in GPCR signaling and trafficking." *Curr Opin Cell Biol* **13**(2): 139-45.

- Miller, W. E., Houtz, D. A., Nelson, C. D., Kolattukudy, P. E. und Lefkowitz, R. J. (2003).** "G-protein-coupled receptor (GPCR) kinase phosphorylation and beta-arrestin recruitment regulate the constitutive signaling activity of the human cytomegalovirus US28 GPCR." *J Biol Chem* **278**(24): 21663-71.
- Minsky, M. (1988).** "Memoir on inventing the confocal scanning microscope." *Scanning* **10**: 128-38.
- Mokros, T., Rehm, A., Droese, J., Oppermann, M., Lipp, M. und Höpken, U. E. (2002).** "Surface expression and endocytosis of the human cytomegalovirus-encoded chemokine receptor US28 is regulated by agonist-independent phosphorylation." *J Biol Chem* **277**(47): 45122-8.
- Morris, A. J. und Malbon, C. C. (1999).** "Physiological regulation of G protein-linked signaling." *Physiol Rev* **79**(4): 1373-430.
- Mueller, A., Kelly, E. und Strange, P. G. (2002).** "Pathways for internalization and recycling of the chemokine receptor CCR5." *Blood* **99**(3): 785-91.
- Murakami, A., Yajima, T., Sakuma, H., McLaren, M. J. und Inana, G. (1993).** "X-arrestin: a new retinal arrestin mapping to the X chromosome." *FEBS Lett* **334**(2): 203-9.
- Murphy, P. M., Baggiolini, M., Charo, I. F., Hebert, C. A., Horuk, R., Matsushima, K., Miller, L. H., Oppenheim, J. J. und Power, C. A. (2000).** "International union of pharmacology. XXII. Nomenclature for chemokine receptors." *Pharmacol Rev* **52**(1): 145-76.
- Nansen, A., Christensen, J. P., Andreasen, S. O., Bartholdy, C., Christensen, J. E. und Thomsen, A. R. (2002).** "The role of CC chemokine receptor 5 in antiviral immunity." *Blood* **99**(4): 1237-45.
- Neumann, E., Schaefer-Ridder, M., Wang, Y. und Hofschneider, P. H. (1982).** "Gene transfer into mouse lymphoma cells by electroporation in high electric fields." *Embo J* **1**: 841-45.
- Ng, G. Y., Clark, J., Coulombe, N., Ethier, N., Hebert, T. E., Sullivan, R., Kargman, S., Chateaufneuf, A., Tsukamoto, N., McDonald, T., Whiting, P., Mezey, E., Johnson, M. P., Liu, Q., Kolakowski, L. F., Jr., Evans, J. F., Bonner, T. I. und O'Neill, G. P. (1999).** "Identification of a GABAB receptor subunit, gb2, required for functional GABAB receptor activity." *J Biol Chem* **274**(12): 7607-10.
- Olbrich, H., Proudfoot, A. E. und Oppermann, M. (1999).** "Chemokine-induced phosphorylation of CC chemokine receptor 5 (CCR5)." *J Leukoc Biol* **65**(3): 281-5.
- Oppermann, M., Freedman, N. J., Alexander, R. W. und Lefkowitz, R. J. (1996).** "Phosphorylation of the type 1A angiotensin II receptor by G protein-coupled receptor kinases and protein kinase C." *J Biol Chem* **271**(22): 13266-72.

- Oppermann, M., Mack, M., Proudfoot, A. E. und Olbrich, H. (1999).** "Differential effects of CC chemokines on CC chemokine receptor 5 (CCR5) phosphorylation and identification of phosphorylation sites on the CCR5 carboxyl terminus." *J Biol Chem* **274**(13): 8875-85.
- Oppermann, M. (2004).** "Chemokine receptor CCR5: insights into structure, function, and regulation." *Cell Signal* **16**(11): 1201-10.
- Ostrom, R. S. und Insel, P. A. (advanced online publication, August 2004).** "The evolving role of lipid rafts and caveolae in G protein-coupled receptor signaling: implications for molecular pharmacology." *Br J Pharmacol*.
- Overton, M. C., Chinault, S. L. und Blumer, K. J. (2003).** "Oligomerization, biogenesis, and signaling is promoted by a glycoporphin A-like dimerization motif in transmembrane domain 1 of a yeast G protein-coupled receptor." *J Biol Chem* **278**(49): 49369-77.
- Palczewski, K., Kumasaka, T., Hori, T., Behnke, C. A., Motoshima, H., Fox, B. A., Le Trong, I., Teller, D. C., Okada, T., Stenkamp, R. E., Yamamoto, M. und Miyano, M. (2000).** "Crystal structure of rhodopsin: A G protein-coupled receptor." *Science* **289**(5480): 739-45.
- Pelkmans, L. und Helenius, A. (2002).** "Endocytosis via caveolae." *Traffic* **3**(5): 311-20.
- Perry, S. J. und Lefkowitz, R. J. (2002).** "Arresting developments in heptahelical receptor signaling and regulation." *Trends Cell Biol* **12**(3): 130-8.
- Petaja-Repo, U. E., Hogue, M., Laperriere, A., Bhalla, S., Walker, P. und Bouvier, M. (2001).** "Newly synthesized human delta opioid receptors retained in the endoplasmic reticulum are retrotranslocated to the cytosol, deglycosylated, ubiquitinated, and degraded by the proteasome." *J Biol Chem* **276**(6): 4416-23.
- Pfeiffer, M., Kirscht, S., Stumm, R., Koch, T., Wu, D., Laugsch, M., Schröder, H., Holtt, V. und Schulz, S. (2003).** "Heterodimerization of substance P and mu-opioid receptors regulates receptor trafficking and resensitization." *J Biol Chem* **278**(51): 51630-7.
- Pierce, K. L. und Lefkowitz, R. J. (2001).** "Classical and new roles of beta-arrestins in the regulation of G-protein-coupled receptors." *Nat Rev Neurosci* **2**(10): 727-33.
- Pierce, K. L., Premont, R. T. und Lefkowitz, R. J. (2002).** "Seven-transmembrane receptors." *Nat Rev Mol Cell Biol* **3**(9): 639-50.
- Pitcher, J. A., Inglese, J., Higgins, J. B., Arriza, J. L., Casey, P. J., Kim, C., Benovic, J. L., Kwatra, M. M., Caron, M. G. und Lefkowitz, R. J. (1992).** "Role of beta gamma subunits of G proteins in targeting the beta-adrenergic receptor kinase to membrane-bound receptors." *Science* **257**(5074): 1264-7.

- Pitcher, J. A., Freedman, N. J. und Lefkowitz, R. J. (1998).** "G protein-coupled receptor kinases." *Annu Rev Biochem* **67**: 653-92.
- Pollok-Kopp, B., Schwarze, K., Baradari, V. K. und Oppermann, M. (2003).** "Analysis of ligand-stimulated CC chemokine receptor 5 (CCR5) phosphorylation in intact cells using phosphosite-specific antibodies." *J Biol Chem* **278**(4): 2190-8.
- Probst, W. C., Snyder, L. A., Schuster, D. I., Brosius, J. und Sealfon, S. C. (1992).** "Sequence alignment of the G-protein coupled receptor superfamily." *DNA Cell Biol* **11**(1): 1-20.
- Prossnitz, E. R., Gilbert, T. L., Chiang, S., Campbell, J. J., Qin, S., Newman, W., Sklar, L. A. und Ye, R. D. (1999).** "Multiple activation steps of the N-formyl peptide receptor." *Biochemistry* **38**(8): 2240-7.
- Qian, H., Pipolo, L. und Thomas, W. G. (2001).** "Association of beta-Arrestin 1 with the type 1A angiotensin II receptor involves phosphorylation of the receptor carboxyl terminus and correlates with receptor internalization." *Mol Endocrinol* **15**(10): 1706-19.
- Ramsay, D., Kellett, E., McVey, M., Rees, S. und Milligan, G. (2002).** "Homo- and hetero-oligomeric interactions between G-protein-coupled receptors in living cells monitored by two variants of bioluminescence resonance energy transfer (BRET): hetero-oligomers between receptor subtypes form more efficiently than between less closely related sequences." *Biochem J* **365**(Pt 2): 429-40.
- Rapacciuolo, A., Suvarna, S., Barki-Harrington, L., Luttrell, L. M., Cong, M., Lefkowitz, R. J. und Rockman, H. A. (2003).** "Protein kinase A and G protein-coupled receptor kinase phosphorylation mediates beta-1 adrenergic receptor endocytosis through different pathways." *J Biol Chem* **278**(37): 35403-11.
- Raport, C. J., Gosling, J., Schweickart, V. L., Gray, P. W. und Charo, I. F. (1996).** "Molecular cloning and functional characterization of a novel human CC chemokine receptor (CCR5) for RANTES, MIP-1beta, and MIP-1alpha." *J Biol Chem* **271**(29): 17161-6.
- Reddy, P. S. und Corley, R. B. (1998).** "Assembly, sorting, and exit of oligomeric proteins from the endoplasmic reticulum." *Bioessays* **20**(7): 546-54.
- Rethorn, S (2003).** "Untersuchung chemotaktischer Leukozyten-Rezeptoren mit phosphospezifischen Antikörpern." Georg-August-Universität, Göttingen
- Rodriguez-Frade, J. M., Mellado, M. und Martinez, A. C. (2001).** "Chemokine receptor dimerization: two are better than one." *Trends Immunol* **22**(11): 612-7.
- Rothermel, E., Zwirner, J., Vogt, T., Rabini, S. und Götze, O. (1997).** "Molecular cloning and expression of the functional rat C5a receptor." *Mol Immunol* **34**(12-13): 877-86.

Salahpour, A., Angers, S., Mercier, J. F., Lagace, M., Marullo, S. und Bouvier, M. (2004). "Homodimerization of the beta2-adrenergic receptor as a prerequisite for cell surface targeting." *J Biol Chem* **279**(32): 33390-7.

Samson, M., Labbe, O., Mollereau, C., Vassart, G. und Parmentier, M. (1996). "Molecular cloning and functional expression of a new human CC-chemokine receptor gene." *Biochemistry* **35**(11): 3362-7.

Samson, M., Libert, F., Doranz, B. J., Rucker, J., Liesnard, C., Farber, C. M., Saragosti, S., Lapoumeroulie, C., Cognaux, J., Forceille, C., Muyldermans, G., Verhofstede, C., Burtonboy, G., Georges, M., Imai, T., Rana, S., Yi, Y., Smyth, R. J., Collman, R. G., Doms, R. W., Vassart, G. und Parmentier, M. (1996). "Resistance to HIV-1 infection in caucasian individuals bearing mutant alleles of the CCR-5 chemokine receptor gene." *Nature* **382**(6593): 722-5.

Samson, M., LaRosa, G., Libert, F., Painsavoine, P., Detheux, M., Vassart, G. und Parmentier, M. (1997). "The second extracellular loop of CCR5 is the major determinant of ligand specificity." *J Biol Chem* **272**(40): 24934-41.

Santini, F., Penn, R. B., Gagnon, A. W., Benovic, J. L. und Keen, J. H. (2000). "Selective recruitment of arrestin-3 to clathrin coated pits upon stimulation of G protein-coupled receptors." *J Cell Sci* **113** (Pt 13): 2463-70.

Scheer, A., Fanelli, F., Costa, T., De Benedetti, P. G. und Cotecchia, S. (1997). "The activation process of the alpha1B-adrenergic receptor: potential role of protonation and hydrophobicity of a highly conserved aspartate." *Proc Natl Acad Sci U S A* **94**(3): 808-13.

Sgodda, M. (2004). "Die Auswirkungen der unterdrückten Beta-Arrestin Expression auf die Funktion myeloischer Zellen." Georg-August-Universität, Göttingen

Shenoy, S. K. und Lefkowitz, R. J. (2003). "Trafficking patterns of beta-arrestin and G protein-coupled receptors determined by the kinetics of beta-arrestin deubiquitination." *J Biol Chem* **278**(16): 14498-506.

Shinohara, T., Dietzschold, B., Craft, C. M., Wistow, G., Early, J. J., Donoso, L. A., Horwitz, J. und Tao, R. (1987). "Primary and secondary structure of bovine retinal S antigen (48-kDa protein)." *Proc Natl Acad Sci U S A* **84**(20): 6975-9.

Signoret, N., Hewlett, L., Wavre, S., Pelchen-Matthews, A., Oppermann, M. und Marsh, M. (eingereichtes Manuskript). "Agonist-induced endocytosis of CC chemokine receptor 5 (CCR5) is clathrin-dependant."

Stanasila, L., Perez, J. B., Vogel, H. und Cotecchia, S. (2003). "Oligomerization of the alpha 1a- and alpha 1b-adrenergic receptor subtypes. Potential implications in receptor internalization." *J Biol Chem* **278**(41): 40239-51.

Terrillon, S., Durroux, T., Mouillac, B., Breit, A., Ayoub, M. A., Taulan, M., Jockers, R., Barberis, C. und Bouvier, M. (2003). "Oxytocin and vasopressin V1a and V2 receptors form constitutive homo- and heterodimers during biosynthesis." *Mol Endocrinol* **17**(4): 677-91.

Terrillon, S., Barberis, C. und Bouvier, M. (2004). "Heterodimerization of V1a and V2 vasopressin receptors determines the interaction with beta-arrestin and their trafficking patterns." *Proc Natl Acad Sci U S A* **101**(6): 1548-53.

Venkatesan, S., Petrovic, A., Locati, M., Kim, Y. O., Weissman, D. und Murphy, P. M. (2001). "A membrane-proximal basic domain and cysteine cluster in the C-terminal tail of CCR5 constitute a bipartite motif critical for cell surface expression." *J Biol Chem* **276**(43): 40133-45.

Venkatesan, S., Rose, J. J., Lodge, R., Murphy, P. M. und Foley, J. F. (2003). "Distinct mechanisms of agonist-induced endocytosis for human chemokine receptors CCR5 and CXCR4." *Mol Biol Cell* **14**(8): 3305-24.

Vishnivetskiy, S. A., Hosey, M. M., Benovic, J. L. und Gurevich, V. V. (2004). "Mapping the arrestin-receptor interface. Structural elements responsible for receptor specificity of arrestin proteins." *J Biol Chem* **279**(2): 1262-8.

Waldhoer, M., Casarosa, P., Rosenkilde, M. M., Smit, M. J., Leurs, R., Whistler, J. L. und Schwartz, T. W. (2003). "The carboxyl terminus of human cytomegalovirus-encoded 7 transmembrane receptor US28 camouflages agonism by mediating constitutive endocytosis." *J Biol Chem* **278**(21): 19473-82.

Wang, W., Loh, H. H. und Law, P. Y. (2003). "The intracellular trafficking of opioid receptors directed by carboxyl tail and a di-leucine motif in Neuro2A cells." *J Biol Chem* **278**(38): 36848-58.

Wang, Z., Lee, B., Murray, J. L., Bonneau, F., Sun, Y., Schweickart, V., Zhang, T. und Peiper, S. C. (1999). "CCR5 HIV-1 coreceptor activity. Role of cooperativity between residues in N-terminal extracellular and intracellular domains." *J Biol Chem* **274**(40): 28413-9.

White, J. H., Wise, A., Main, M. J., Green, A., Fraser, N. J., Disney, G. H., Barnes, A. A., Emson, P., Foord, S. M. und Marshall, F. H. (1998). "Heterodimerization is required for the formation of a functional GABA(B) receptor." *Nature* **396**(6712): 679-82.

Xiao, X., Wu, L., Stantchev, T. S., Feng, Y. R., Ugolini, S., Chen, H., Shen, Z., Riley, J. L., Broder, C. C., Sattentau, Q. J. und Dimitrov, D. S. (1999). "Constitutive cell surface association between CD4 and CCR5." *Proc Natl Acad Sci U S A* **96**(13): 7496-501.

Yamaki, K., Takahashi, Y., Sakuragi, S. und Matsubara, K. (1987). "Molecular cloning of the S-antigen cDNA from bovine retina." *Biochem Biophys Res Commun* **142**(3): 904-10.

Danksagung

Mein besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. Martin Oppermann für die Überlassung des Themas, die ausgezeichneten Arbeitsbedingungen und seinem steten Interesse am Fortgang dieser Arbeit.

Herrn Prof. Dr. Hardeland danke ich für die externe Betreuung dieser Arbeit und Herrn Prof. Dr. Pieler für die Übernahme des Korreferats.

Den Mitgliedern der Arbeitsgruppe Immunologie danke ich für die angenehme Laboratmosphäre. Ganz besonders möchte ich Maren Wüstefeld und Katrin Schwarze für die gute Zusammenarbeit und praktische Unterstützung danken. Dank auch an Beatrix Pollok-Kopp und Malte Sgodda für das sorgfältige Korrekturlesen dieser Arbeit.

Marco George danke ich für die seelische Unterstützung besonders während der Zusammenschreibphase dieser Arbeit.

Besonderer Dank gilt vor allem meinen Eltern, die mir mein Studium und diese Arbeit erst ermöglicht haben und die mich in jeder Hinsicht unterstützt haben.

Lebenslauf

Name: Hüttenrauch
Vorname: Friederike
Geburtsdatum: 28.03.1977
Geburtsort: Braunschweig
Staatsangehörigkeit: deutsch

Schulbildung:

1983 - 1987 Grundschule in Königslutter
1987 - 1989 Haupt- und Orientierungsschule in Königslutter
1989 – 1996 Gymnasium Anna-Sophianeum in Schöningen
21.05.1996 Allgemeine Hochschulreife mit einer Note von 2,0

Studium:

WS 1996/97 Immatrikulation an der Georg-August-Universität in Göttingen im Studiengang Biologie Diplom
14.10.1998 Diplomvorprüfung mit der Note `Sehr gut`
2000-2001 Diplomarbeit im Institut für Mikrobiologie und Genetik der Georg-August-Universität; Titel der Diplomarbeit: „Gcn4p regulierte *FLO11* Expression in *Saccharomyces cerevisiae*“
16.10.2001 Diplomprüfung Gesamtnote `Sehr gut`
01.03.2002 Beginn der externen Dissertation in der Abteilung Immunologie der Georg-August-Universität; Thema der Dissertation: „Ligand induzierte Phosphorylierung des Chemokin-Rezeptors CCR5: strukturelle Analyse und Funktion“.