Identifizierung der für die Agonisten-induzierte Phosphorylierung und Internalisierung relevanten Serine und Threonine in der C-terminalen Domäne des humanen Prostaglandin E<sub>2</sub> Rezeptors, Subtyp EP4

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

> > vorgelegt von Matthias Rehwald aus Homberg

Göttingen 2003

D 7 Referent : Prof. Dr. K. von Figura Korreferent : Prof. Dr. R. Hardeland Tag der mündlichen Prüfung : 7. Mai 2003

# INHALTSVERZEICHNIS

Zusammenfassung	1
VERZEICHNIS DER AMINOSÄUREN UND IHRER ABKÜRZUNGEN	XVIII
VERZEICHNIS DER ABKÜRZUNGEN	XV
VERZEICHNIS DER TABELLEN	XIV
VERZEICHNIS DER ABBILDUNGEN	XI

1	Einleitung	3
1.1	Prostanoide	3
1.2	Plasmamembranständige Prostanoidrezeptoren	3
1.2.1	Klassifikation der Prostanoidrezeptoren	5
1.2.2	Strukturelle Gemeinsamkeiten der Prostanoidrezeptoren	5
1.3	Signaltermination der G-Protein-gekoppelten Rezeptoren	8
1.3.1	Komponenten der Agonisten-induzierten Desensitisierung und	
	Internalisierung	10
	Proteinkinase A (PKA) und Proteinkinase C (PKC)	10
	G-protein-coupled receptor kinase (GRK)	11
	β-Arrestin	11
	Adaptin	12
	Dynamin	12
	Clathrin	13
1.4	Der humane EP4-Rezeptor	13
1.4.1	Struktur des humanen EP4-Rezeptors	13
1.4.2	Physiologische Bedeutung des EP4-Rezeptors	15
1.4.3	Signaltermination des EP4-Rezeptors	15
1.5	Ziel der Arbeit	16
2	Material	17
2.1	Chemikalien und Biochemikalien	17
2.2	Geräte	20
2.3	Verbrauchsmaterialien	22
2.4	Reinigungs- und Isolierungssysteme	22
2.5	Chemilumineszenz-Nachweissystem	23
2.6	Molekulare Standards	23
2.7	Radiochemikalien	24
2.8	Antikörper	24

2.8.1	Monoklonale Antikörper	24
2.8.2	Polyklonale Antiseren	24
2.9	Enzyme	25
2.9.1	Restriktionsenzyme mit Erkennungssequenz und Spaltstelle (-)	25
2.9.2	Sonstige Enzyme	26
2.10	Oligonukleotide	26
2.10.1	Vorwärts-Primer	26
2.10.2	Rückwärts-Primer	27
2.11	Eukaryote Zellinie HEK293	28
2.12	Bakterienstamm <i>E. coli</i> XL1 (blue)	29
2.13	Vektoren	29
2.13.1	pBluescript-Vektor	29
2.13.2	pcDNA3-Vektor	30
2.13.3	pEGFP-Vektor	31
3	Methoden	32
	ALLGEMEINE MOLEKULARBIOLOGISCHE METHODEN	
3.1	PCR-gestützte cDNA-Synthese	32
3.1.1	Puffer und Lösungen	32
3.1.2	Prinzip der Polymerasekettenreaktion (PCR)	32
3.1.3	Amplifizierung von Rezeptor-cDNA mit der PowerScript DNA-Polymerase	33
3.1.4	Verlängerung des translatierten Bereichs einer cDNA-Sequenz um eine für	
	eine Peptid- oder Restriktionsenzym-Erkennungsstelle-codierenden	
	Sequenz durch PCR	33
3.1.5	Prinzip der sequenzgerichteten Mutagenese	34
3.2	Agarose-Gelelektrophorese von DNA	35
3.2.1	Puffer und Lösungen	35
3.2.2	Auftrennung von DNA auf Agarose-Gelen	36
3.2.3	Semiquantitative Bestimmung der DNA-Menge in Agarose-Gelen	36
3.3	Reinigung von DNA aus Agarose-Gelen	36
3.3.1	Puffer und Lösungen	36
3.3.2	Isolierung der DNA-Fragmente	37
3.4	Klonierung der gereinigten cDNA-Fragmente in einen Vektor	37
3.4.1	Puffer und Enzyme	37

3.4.2	Vorbereitung der cDNA-Fragmente (5'- und 3'-hEP4-Fragmente) und	
	der Vektoren (pBluescript und pcDNA3)	37
3.4.3	Ligation der cDNA-Fragmente in die Vektoren (pBluescript und	
	pcDNA3)	38
3.5	Herstellung kompetenter <i>E. coli</i> XL1 (blue) Zellen für die	
	Elektroporation	38
3.5.1	Puffer und Lösungen	38
3.5.2	Vorbereitung der <i>E. coli</i> XL1 (blue) Zellen	39
3.5.3	Herstellung einer Glycerolkultur von <i>E. coli</i> XL1 (blue) Zellen	39
3.6	Transformation kompetenter <i>E.coli</i> XL1 (blue) Zellen	39
3.6.1	Puffer und Lösungen	39
3.6.2	Transformation durch Elektroporation	40
3.7	Isolierung von Plasmid-DNA im Mini-Maßstab	41
3.7.1	Puffer und Lösungen	41
3.7.2	Präparation von Plasmid-DNA im Mini-Maßstab	42
3.7.3	Photometrische Quantifizierung der gereinigten Plasmid-DNA	42
3.8	Isolierung von Plasmid-DNA im Maxi-Maßstab	43
3.8.1	Puffer und Lösungen	43
3.8.2	Isolierung der Plasmid-DNA durch Affinitätschromatographie im Maxi-	
	Maßstab	44
3.9	Charakterisierung der Plasmide durch Restriktionsenzymspaltung	44
3.9.1	Puffer und Enzyme	44
3.9.2	Spaltungsreaktion	44
3.10	Charakterisierung der Plasmide durch Sequenzierung	45
3.10.1	Puffer und Lösungen	45
3.10.2	Vorbereitung der Polyacrylamid (PAA)-DNA-Sequenziergele	46
3.10.3	Sequenzierungsreaktion	46
3.10.4	Aufreinigung der Proben	47
3.10.5	Automatische Sequenzierung und EDV-gestützte Auswertung	47
	SYNTHESE DER MUTIERTEN REZEPTORPROTEINE	
3 11	Modifikationen der humanen EP4-Rezentor-cDNA	47

3.11	Modifikationen der numanen EP4-Rezeptor-CDNA	47
3.11.1	Verlängerung des translatierten Bereichs der hEP4-Rezeptor-cDNA	
	um eine für das FLAG-Epitop codierende Sequenz	47
3.11.2	Sequenzgerichtete Mutagenese der FLAG-hEP4-Rezeptor-cDNA zum	
	Einführen der SnaB I-Restriktions-Erkennungssequenz	48

3.12	Einfügen der Mutationen zur Substitution der Serine und	
	Threonine in der für die C-terminalen Domäne codierenden	
	3'-Sequenz der FLAG-hEP4 wt-R-cDNA	49
3.12.1	Amplifizierung des 5' um die Kpn I-Restriktions-Erkennungssequenz	
	verlängerten 3'-cDNA-Fragments der FLAG-hEP4-Rezeptor-cDNA und	
	Einfügen der ST335-338A-Mutationen	49
3.12.2	Synthese der C-terminalen Sequenz der FLAG-hEP4-R-cDNA mit der	
	Substitution aller Serine und Threonine	50
3.12.3	Klonierung der gereinigten Fragmente in pBluescript	52
3.13	Klonierung der gesamten FLAG-hEP4 wt-Rezeptor- sowie der	
	mutierten Rezeptor-cDNAs in den pcDNA3-Vektor	54
3.13.1	Puffer und Enzyme	54
3.13.2	Vorbereitung der cDNA-Fragmente und Ligation	54
	ZELLBIOLOGISCHE UND BIOCHEMISCHE METHODEN	
3.14	Eukaryote Expression der gentechnisch modifizierten Rezeptor-	
	proteine in HEK293-Zellen	55
3.14.1	Puffer und Lösungen	55
3.14.2	Kultivierung von HEK293-Zellen	56
3.14.3	TransienteTransfektion von HEK293-Zellen mit der modifizierten	
	Calcium-Phosphat-Methode	56
3.14.4	Selektion stabil transfizierter HEK293-Zellen	57
3.14.5	Kryolagerung der stabilen Zellklone in flüssigem Stickstoff	58
3.15	Präparation von Gesamt-RNA aus stabil transfizierten HEK293-	
	Zellen	58
3.15.1	Puffer und Lösungen	58
3.15.2	Isolierung von Gesamt-RNA aus stabil transfizierten HEK293-Zellen	59
3.16	cDNA-Synthese durch reverse Transkription	60
3.16.1	Puffer und Lösungen	60
3.16.2	cDNA-Synthese	61
3.17	PCR-gestützte Analyse zur Identifikation der stabil transfizierten	
	HEK293-Zellen	61
3.17.1	Puffer und Lösungen	61
3.17.2	Amplifizierung spezifischer cDNA-Fragmente	61
3.18	Nachweis der Rezeptorproteine durch [ <sup>3</sup> H]-PGE <sub>2</sub> -Bindung	62
3.18.1	Puffer und Lösungen	62
3.18.2	Membranpräparation	63

3.18.3	Proteinbestimmung nach Bradford (1976)	64
3.18.4	Nachweis der [ <sup>3</sup> H]-PGE <sub>2</sub> -Bindung in Membranen	64
3.19	Immunologischer Nachweis der Rezeptorproteine durch	
	Westernblot-Analyse	64
3.19.1	Puffer und Lösungen	64
3.19.2	Immunpräzipitation der Rezeptorproteine	67
3.19.3	Vorbereitung der Proben für die SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese	68
3.19.4	Vorbereitung der Polyacrylamidgele für die SDS-PAGE	68
3.19.5	Trennung der Membranproteine durch SDS-PAGE	69
3.19.6	Fixierung mit Coomassie-Blue-Fixierlösung und Trocknung der Gele für	
	den Nachweis der metabolisch [ <sup>32</sup> P]-ortho-Phosphat markierten	
	Rezeptorproteine	69
3.19.7	Transfer der getrennten Proteine auf PVDF-Membranen durch	
	Elektroblotting für den immunologischen Nachweis der	
	Rezeptorproteine	70
3.19.8	Nachweis der geblotteten Proteine durch Ponceau S-Färbung	70
3.19.9	Immunologischer Nachweis der Rezeptorproteine durch	
	Immunperoxidase-Färbung der geblotteten Proteine	70
3.20	Charakterisierung der Bindungseigenschaften der modifizierten	
	Rezeptorproteine im Vergleich mit dem nativen Rezeptorprotein	71
3.20.1	Puffer und Lösungen	71
3.20.2	Bestimmung der Affinität und der maximalen Bindungskapazität der	
	verschiedenen Rezeptorproteine durch Sättigungsbindungsstudien	71
3.21	Nachweis der funktionellen Eigenschaften der Rezeptorproteine	
	durch Bestimmung der PGE2-induzierten cAMP-Bildung	72
3.21.1	Puffer und Lösungen	72
3.21.2	Präparation von Membranen der Rezeptor exprimierenden HEK293-	
	Zellen	74
3.21.3	Nachweis der Dosis-abhängigen cAMP-Bildung an Membranen Rezeptor-	
	exprimierender HEK293-Zellen	75
3.21.4	Kinetik der Forskolin-abhängigen cAMP-Bildung in intakten Zellen	75
3.21.5	Bestimmung der cAMP-Konzentration durch Radioimmunoassay (RIA)	76
3.22	Untersuchung der Desensitisierung der in HEK293-Zellen stabil	
	exprimierten Rezeptorproteine	76
3.22.1	Puffer und Lösungen	76

3.22.2	Bestimmung der Desensitisierung der PGE <sub>2</sub> -abhängigen cAMP-Bildung	
	nach Vorstimulation der Rezeptor-exprimierenden HEK293-Zellen mit	
	PGE <sub>2</sub>	77
3.22.3	Kinetik der PGE <sub>2</sub> -induzierten cAMP-Bildung nach Vorstimulation der	
	Rezeptor exprimierenden HEK293-Zellen mit PGE2	77
3.22.4	Kinetik der ONO604-induzierten cAMP-Bildung nach Vorstimulation	
	der Rezeptor-exprimierenden HEK293-Zellen mit ONO604 und	
	verzögerter Gabe von IBMX	78
3.22.5	Bestimmung der Konzentrations-abhängigen cAMP-Bildung nach	
	Vorstimulation mit PGE2	78
3.23	Nachweis der Internalisierung der Rezeptorproteine durch einen	
	Oberflächen-ELISA ( <u>E</u> nzyme- <u>l</u> inked <u>I</u> mmuno <u>s</u> orbent <u>A</u> ssay)	79
3.23.1	Puffer und Lösungen	79
3.23.2	Stimulation der Rezeptor exprimierenden HEK293-Zellen und Antikörper-	
	bindung	80
3.23.3	Vorbereitung der ELISA-Platte	80
3.23.4	Antigenbindung	81
3.23.5	Nachweis der Rezeptorproteine durch einen Sekundärantikörper,	
	Streptavidin-Peroxidase und eine Farbreaktion mit ABTS	81
3.24	Bestimmung der Internalisierung aufgrund der Reduktion der	
	Oberflächen-[ <sup>3</sup> H]-PGE <sub>2</sub> -Bindung	81
3.24.1	Puffer und Lösungen	81
3.24.2	Nachweis der Internalisierung durch Bestimmung des nach Stimulation	
	internalisierten [ <sup>3</sup> H]-PGE <sub>2</sub>	82
3.25	Nachweis der Plasmamembranlokalisation und der Internalisierung	
	der in den HEK293-Zellen stabil exprimierten Rezeptorproteine	
	durch Immunfluoreszenz-Mikroskopie	83
3.25.1	Puffer und Lösungen	83
3.25.2	Kultivierung und Stimulation der Rezeptor-exprimierenden HEK293-Zellen	85
3.25.3	Plasmamembranmarkierung der HEK293-Zellen	85
3.25.4	Fixierung, Permeabilisierung und Blockierung der HEK293-Zellen	85
3.25.5	Nachweis der FLAG-markierten Rezeptorproteine und Gegenfärbung	
	der biotinylierten Plasmamembran	86
3.25.6	Einbettung der HEK293-Zellen für die Visualisierung der markierten	
	Rezeptorproteine am konfokalen Laser-Scan-Mikroskop	86

3.26	Metabolische [ <sup>32</sup> P]-ortho-Phosphat-Markierung zur Bestimmung der	
	Agonisten-induzierten Phosphorylierung der in HEK293-Zellen	
	stabil exprimierten Rezeptorprteine	87
3.26.1	Puffer und Lösungen	87
3.26.2	Metabolische [ <sup>32</sup> P]-ortho-Phosphat-Markierung und Stimulation der	
	Rezeptor- exprimierenden HEK293-Zellen	88
3.26.3	Auftrennung und Visualisierung der markierten Rezeptorproteine	88
4	Ergebnisse	89
4.1	Einfügen der SnaB I-Restriktionsschnittstelle in die FLAG-hEP4-	
	Rezeptor-cDNA durch sequenzgerichtete Mutagenese	89
4.1.1	Überprüfung der sequenzgerichteten Mutagenese durch Restriktions-	
	fragmentlängen-Analyse	90
4.2	Synthese der mutierten FLAG-hEP4-Rezeptor-cDNA zur	
	Substitution aller Serine und Threonine durch Alanine mittels	
	sequenzgerichteter Mutagenese	91
4.2.1	Einfügen der ST335-338A-Mutationen und Anfügen einer 5' der SnaB I-	
	Restriktionsschnittstelle gelegenen Kpn I-Restriktionserkennungssequenz	
	in hEP4 CT	92
4.2.2	Einfügen der ST369-382A-Mutationen in pBluescript hEP4 CT ST335-338A	
	und Eliminierung der durch S372A-Substitution neu entstehenden Sty I-	
	Schnittstelle	92
4.2.3	Einfügen der ST428-443A-Mutationen in pBluescript hEP4 CT ST335-338;	
	369-382A	94
4.2.4	Einfügen der ST354-366; 400-405A-Mutationen in pBluescript hEP4 CT	
	ST335-338; 369-382; 428-443A	96
4.2.5	Einfügen der ST448-484A-Mutationen in pBluescript hEP4 CT ST335-382;	00
4.0.0		96
4.2.6	Einfugen der ST389-394A-Mutationen in pBluescript nEP4 CT ST335-382;	
	400-484A und Eliminierung der durch 1394A-Substitution neu	00
407	Suppose day polycopyring hED4 CT ST225 4054 und day polycopyring hED4	99
4.2.7	CT ST429 4944	00
120	Synthese des pPluescript hEP4 CT ST325 354: 390 494A und des	99
7.2.0	nBluescript hED4 CT ST335 382A	101
420	Synthese der ELAG-bEP4 S379A, und der ELAG-bEP4 ST335-377, 382	101
7.2.3	484A-Rezentor-cDNA	103
		103

4.3	Klonierung der verschiedenen mutierten 3'-Fragmente und des 5'-	
	Fragmentes der FLAG-hEP4 Rezeptor-cDNA in den Expressionvektor	
	pcDNA3	106
4.4	Stabile Expression des FLAG-hEP4 wt-Rezeptors und der	
	verschiedenen mutierten FLAG-hEP4-Rezeptoren	107
4.5	Charakterisierung der in HEK293-Zellen stabil exprimierten FLAG-	
	hEP4-Rezeptorproteine	108
4.5.1	Immunologischer Nachweis der stabil exprimierten FLAG-hEP4 wt- und	
	der mutierten FLAG-hEP4-Rezeptorproteine durch SDS-PAGE und	
	Western-Blot-Analyse	108
4.5.2	Untersuchung der Plasmamembranlokalisation der verschiedenen stabil	
	exprimierten FLAG-hEP4-Rezeptorproteine durch Immunfluoreszenz-	
	Mikroskopie	110
4.5.3	Bestimmung der Affinität und der maximalen Bindungskapazität der	
	verschiedenen stabil exprimierten FLAG-hEP4-Rezeptoren für PGE <sub>2</sub>	
	durch Sättigungsbindungsstudien	112
4.5.4	Nachweis der Funktionalität der verschiedenen in HEK293-Zellen stabil	
	exprimierten FLAG-hEP4 Rezeptoren an Membranen	113
4.5.5	Bestimmung der EC50-Werte der verschiedenen FLAG-hEP4-Rezeptoren	
	für die PGE <sub>2</sub> -stimulierte cAMP-Bildung an Membranen	115
4.6	Untersuchung der Phosphorylierung des FLAG-hEP4-Rezeptors und	
	der verschiedenen mutierten Rezeptorproteine	116
4.6.1	Untersuchung der durch PGE <sub>2</sub> -Stimulation induzierten Phosphorylierung	
	des FLAG-hEP4 wt-Rezeptors	116
4.6.2	Untersuchung der durch $PGE_2$ induzierten Phosphorylierung des FLAG-	
	hEP4 wt-Rezeptors und der mutierten Rezeptorproteine	118
4.7	Untersuchung der Desensitisierung des FLAG-hEP wt- und des	
	FLAG-hEP4 ST335-484A-Rezeptors in stabil transfizierten HEK293-	
	Zellen	120
4.7.1	Untersuchung der Desensitisierung der PGE2-induzierten cAMP-Bildung	
	des FLAG-hEP4 wt- und des FLAG-hEP4 ST335-484A-Rezeptors nach	
	Vorstimulation mit PGE <sub>2</sub>	121
4.7.2	Kinetik der PGE <sub>2</sub> -induzierten cAMP-Bildung des FLAG-hEP4 wt- und	
	des FLAG-hEP4 ST335-484A-Rezeptors nach Vorstimulation und	
	verzögerter Gabe von IBMX und Kinetik der Forskolin-induzierten	
	cAMP-Bildung an ganzen Zellen	122

5.3	Agonisten-induzierte Phosphorylierung des FLAG-hEP4 wt-Rezeptors und der verschiedenen mutierten Rezeptorproteine	152
5.3	Agonisten-induzierte Phosphorylierung des FLAG-hEP4 wt-Rezeptors	
	Kopplungskontrolle	152
	Kopplungsspezifität	151
	Signaltransduktion des Rezeptors.	151
5.2.4	Einfluß der Mutationen in der C-terminalen Domäne des hEP4-R für die	4 <b>-</b> -
5.2.3	Bedeutung der eingefügten Mutationen für die Ligandbindung	150
5.2.2	Subzelluläre Lokalisation der hEP4-Rezeptoren in HEK293-Zellen	150
5.2.1	Expression der hEP4-Rezeptoren in HEK293-Zellen	149
	verschiedenen FLAG-hEP4-Rezeptorproteine	149
	in HEK293-Zellen und Uberprüfung der Funktionalität der	
5.2	Stabile Expression der verschiedenen FLAG-hEP4-Rezeptorproteine	
		147
	C-terminalen Domäne des hEP4-R durch sequenzgerichtete	
5.1	Eliminierung potentieller Phosphorylierungsstellen in der	
5	Diskussion	146
_		
	Zellen durch Immunfluoreszenz-Mikroskopie	141
	Exposition der die FLAG-hEP4-Rezentoren exprimierenden HFK293-	
4.10	Untersuchung der Rezeptor/ß-Arrestin-Colokalisation nach Agonisten-	
	Rezeptoren durch Immunfluoreszenz-Mikroskopie	135
4.9	Untersuchung der Internalisierung der verschiedenen FI AG-hFP4-	102
r.u.z	Rezentoren durch Bindungsstudien mit $I^3$ H1-PGF <sub>2</sub>	132
482	Untersuchung der Internalisierung der verschiedenen FLAG-hEP4-	120
		120
<del>т</del> .0. I	Rezentoren anhand der reduzierten ELAG-M2-mAk-Oberflächenbindung	
481	I Intersuchung der Internalisierung der verschiedenen ELAG-hEP4	129
	FI AG-hEP4-Rezentoren	120
4.0	transfizierten ELAG-hEP4 wt- und der verschiedenen mutierten	
48	Intersuchung der Internalisierung des in HEK293-Zellen stabil	121
	484A-Rezentors	127
<i>ч.1.</i> ч	stimulierte cAMP-Rildung des ELAG-bEP4 wt- und des ELAG-bEP4 ST335-	
474	Lintersuchung der Verschiehung der Dosis-Wirkungskurven für die PGF	125
	synthetischen Agonisten ONO604 und verzögerter Gabe von IBMX	125
4.7.5	484A-Rezentors nach Vorstimulation mit dem EP4-Rezentor-spezifischen	
473	Kinetik der cAMP-Bildung des ELAG-hEP4 wt- und des ELAG-hEP4 ST335-	

	FLAG-hEP4 wt-Rezeptors beteiligten Kinasen	153
5.3.2	PGE <sub>2</sub> -induzierte Phosphorylierung der verschiedenen mutierten FLAG-	
	hEP4-Rezeptorproteine	154
5.4	Desensitisierung des FLAG-hEP4 wt-Rezeptors und des FLAG-hEP4	
	ST335-484A-Rezeptors	155
5.4.1	Desensitisierung des hEP4 wt-Rezeptors und des hEP4 ST335-484A-	
	Rezeptors nach Vorstimulation mit PGE <sub>2</sub>	156
5.4.2	Fehlende Unterschiede in der Kinetik der PGE2-induzierten cAMP-Bildung	
	in hEP4 wt-Rezeptor oder hEP4 ST335-484A-Rezeptor exprimierenden	
	HEK293-Zellen nach Prästimulation mit PGE2	157
5.4.3	Fehlende Rechtsverschiebung der Dosis-Wirkungskurve des hEP4 wt-R	158
5.5	Internalisierung und $\beta$ -Arrestin-Rekrutierung des FLAG-hEP4 wt-	
	Rezeptors und der verschiedenen mutierten Rezeptoren	159
5.5.1	Internalisierung der verschiedenen FLAG-hEP4-Rezeptoren	160
5.5.2	Untersuchung der Rezeptor/β-Arrestin-Colokalisation der verschiedenen	
	Rezeptorproteine durch Immunfluoreszenz-Mikroskopie	162
5.6	Schlußfolgerung	164
6	Literatur	165

## VERZEICHNIS DER ABBILDUNGEN

Abb. 1:	Prostanoid-Synthese	4
Abb. 2:	Schematische Darstellung der durch Ligandbindung und	
	Rezeptoraktivierung ausgelösten Signalkaskaden der G-Protein-	
	gekoppelten Rezeptoren	9
Abb. 3:	Schematische Darstellung der Entkopplung des Rezeptors vom	
	G-Protein durch $\beta$ -Arrestin und anschließende Internalisierung	10
Abb. 4:	Hypothetische Struktur des humanen EP4-Rezeptors	14
Abb. 5:	Restriktionskarte von pBluescript SK	29
Abb. 6:	Restriktionskarte von pcDNA3	30
Abb. 7:	Restriktionskarte von pEGFP	31
Abb. 8:	Synthese des pcDNA3 FLAG hEP4 wt-Rezeptors mit der eingefügten	
	SnaB I-Restriktionserkennungssequenz	90
Abb. 9:	Charakterisierung der isolierten Plasmid-DNA des	
	pcDNA/Amp FLAG-hEP4- und des pcDNA3 FLAG-hEP4 wt-Rezeptors	
	durch Spaltung mit den Restriktionsenzymen Hind III, SnaB I und Xba I	91
Abb. 10:	Synthese des pBluescript hEP4 CT ST335-338A	93
Abb. 11:	Synthese des pBluescript hEP4 CT ST335-338; 369-382A	94
Abb. 12:	Synthese des pBluescript hEP4 CT ST335-338; 369-382; 428-443A	95
Abb. 13:	Synthese des pBluescript hEP4 CT ST335-382; 400-443A	97
Abb. 14:	Synthese des pBluescript hEP4 CT ST335-382; 400-484A	98
Abb. 15:	Synthese des pBluescript hEP4 CT ST335-484A	100
Abb. 16:	Synthese des pBluescript hEP4 CT ST335-405A und des	
	pBluescript hEP4 CT ST428-484A	101
Abb. 17:	Synthese des pBluescript hEP4 CT ST335-354; 389-484A	102
Abb. 18:	Synthese des pBluescript hEP4 CT ST335-382A	103
Abb. 19:	Synthese des pcDNA3 FLAG-hEP4 S379A	104
Abb. 20:	Synthese des pcDNA3 FLAG-hEP4 S335-377; 382-484A	105
Abb. 21:	Überprüfung der Klonierung der verschiedenen Rezeptor-cDNAs in den	
	Expressionsvektor pcDNA3	107
Abb. 22:	Westernblotanalyse der in HEK293-Zellen stabil exprimierten	
	Rezeptorproteine	109
Abb. 23:	Plasmamembranlokalisation der verschiedenen, in den HEK293-Zellen	
	stabil exprimierten FLAG-hEP4-Rezeptoren	111
Abb. 24:	Nachweis der PGE <sub>2</sub> - und der Forskolin-induzierten cAMP-Bildung der	
	die verschiedenen Rezeptoren exprimierenden HEK293-Zellen	114

Abb. 25:	Phosphorylierung des FLAG-hEP4 wt-Rezeptors durch PGE <sub>2</sub> , Forskolin	
	und PMA	117
Abb. 26:	Nachweis der Lokalisation der für die Agonisten-induzierte	
	Phosphorylierung des FLAG-hEP4 wt-Rezeptors relevanten Ser und Thr	
	in der C-terminalen Domäne	119
Abb. 27:	PGE <sub>2</sub> -induzierte cAMP-Bildung in FLAG-hEP4 wt- und in FLAG-hEP4	
	ST335-484A-Rezeptor exprimierenden HEK293-Zellen mit und ohne	
	Vorstimulation durch PGE <sub>2</sub>	122
Abb. 28:	Kinetik der PGE2-induzierten cAMP-Bildung der den FLAG-hEP4 wt-	
	und FLAG-hEP4 ST335-484A-Rezeptor stabil exprimierenden HEK293-	
	Zellen nach verzögerter Gabe von IBMX	124
Abb. 29:	Kinetik der Forskolin-induzierten cAMP-Bildung der mit dem FLAG-hEP4	
	wt- und dem FLAG-hEP4 ST335-484A-Rezeptor stabil transfizierten	
	HEK293-Zellen	125
Abb. 30:	Kinetik der cAMP-Bildung in FLAG-hEP4 wt- und FLAG-hEP4 ST335-484A-	
	Rezeptor exprimierenden HEK293-Zellen durch Stimulation mit dem	
	EP4-R-spezifischen Agonisten ONO604 und verzögerter Gabe von IBMX	126
Abb. 31:	Konzentrationsabhängigkeit der PGE <sub>2</sub> -induzierten cAMP-Bildung in	
	FLAG-hEP4 wt- und FLAG-hEP4 ST335-484A-Rezeptor exprimierenden	
	HEK293-Zellen nach Vorstimulation mit PGE <sub>2</sub>	128
Abb. 32:	Bestimmung der Agonisten-induzierten Internalisierung des	
	FLAG-hEP4 wt- und des FLAG-hEP4 ST335-484A-Rezeptors durch	
	Zell-Oberflächen-ELISA	130
Abb. 33:	Bestimmung der Agonisten-induzierten Internalisierung des	
	FLAG-hEP4 wt-Rezeptors und der mutierten Rezeptorproteine durch	
	Zell-Oberflächen-ELISA ohne und nach Vorbehandlung der Zellen mit	
	Saccharose	131
Abb. 34:	Bindung von [³H]-PGE₂ an die Oberflächen von FLAG-hEP4 wt- oder	
	FLAG-hEP4 ST335-484A-Rezeptor exprimierenden HEK293-Zellen	
	bei 4°C und bei 37°C	133
Abb. 35:	Internalisierung der verschiedenen Rezeptorproteine durch Bestimmung des	
	intrazellulären [ <sup>3</sup> H]-PGE <sub>2</sub> ohne und nach Vorbehandlung der Zellen	
	mit Saccharose	134
Abb. 36:	Internalisierung des FLAG-hPE4 wt-Rezeptors in stabil transfizierten	
	HEK293-Zellen nach PGE <sub>2</sub> -Stimulation	136
Abb. 37:	Plasmamembranlokalisation des FLAG-hPE4 ST335-484A-Rezeptors	
	nach PGE <sub>2</sub> -Stimulation	137

Abb. 38	: PGE <sub>2</sub> -induzierte Internalisierung des FLAG-hEP4 S379A-, FLAG-hEP4	
	ST335-382A- und FLAG-hEP4 ST335-405A-Rezeptors in stabil	
	exprimierenden HEK293-Zellen	138
Abb. 39	: Plasmamembranlokalisation des FLAG-hEP4 ST335-377; 382-484A-,	
	FLAG-hEP4 ST335-354; 382-484A- und FLAG-hEP4 ST428-484A-	
	Rezeptors nach PGE <sub>2</sub> -Stimulation	140
Abb. 40	: Nachweis der cytosolischen $\beta$ -Arrestin-Lokalisation in HEK293-	
	Zellen	141
Abb. 41	: Translokation und Colokalisation von $\beta$ -Arrestin mit dem FLAG-hEP4 wt-	
	Rezeptors nach PGE <sub>2</sub> -Stimulation ohne und nach Vorbehandlung	
	der Zellen mit Saccharose dargestellt durch Immunfluoreszenz-	
	Mikroskopie	143
Abb. 42	: Fehlende $\beta$ -Arrestin-Translokation und -Colokalisation mit dem FLAG-hEP4	
	ST335-484A-, FLAG-hEP4 S335-405A-, FLAG-hEP4 ST428-484A-, FLAG-	
	hEP4 ST335-354; 389-484A-Rezeptor und dem FLAG-hEP4 ST335-377;	
	382-484A-R nach PGE <sub>2</sub> -Stimulation dargestellt durch Immunfluoreszenz-	
	Mikroskopie	144
Abb. 43	: β-Arrestin-Translokation und -Colokalisation mit dem FLAG-hEP4 ST335-	
	382A-, und dem FLAG-hEP4 S379A-Rezeptor nach $PGE_2$ -Stimulation ohne	
	und nach Vorbehandlung der Zellen mit Saccharose	145

## VERZEICHNIS DER TABELLEN

Tab. 1:	Einteilung der Prostanoidrezeptoren	6
Tab. 2:	Durchführung der sequenzgerichteten Mutagenese zum Einfügen der	
	SnaB I-Schnittstelle in die FLAG-hEP4-R-cDNA	48
Tab. 3:	PCR-Reaktionen zur Synthese der für die C-terminale Domäne	
	codierenden Sequenz der FLAG-hEP4-R-cDNA mit der Substitution	
	aller Serine und Threonine	50
Tab. 4:	Restriktionsansätze zur Generierung der verschiedenen hEP4 CT-cDNA-	
	Fragmente	51
Tab. 5:	Restriktionsansätze zur Generierung der verschiedenen pBluescript hEP4	
	CT Vektor-Fragmente	52
Tab. 6:	Ligationsansätze zur Synthese der verschiendenen C-terminalen cDNA-	
	Fragmente	53
Tab. 7:	$K_d$ -Werte und maximale Bindungskapazität der verschiedenen in HEK293-	
	Zellen stabil exprimierten FLAG-hEP4-Rezeptoren	112
Tab. 8:	EC50-Werte der PGE2-stimulierten cAMP-Bildung der verschiedenen	
	in HEK293-Zellen stabil exprimierten FLAG-hEP4-Rezeptoren	115

# VERZEICHNIS DER ABKÜRZUNGEN

ABTS	2,2'-Azino-di-[3-ethylbenzthioazylin-sulfonat (6)]		
Amp	Ampicillin		
APS	Ammoniumpersulfat		
ATP	Adenosintriphosphat		
BES	N,N-bis[2-Hydroxyethyl]-2-aminoethansulfonsäure		
bp	Basenpaare		
BS	Bovines Serum		
BSA	Bovines Serum Albumin		
cDNA	complementary (komplementäre) DNA		
Ci	Curie		
cAMP	cyclisches Adenosin-3',5'-monophosphat		
cpm	counts per minute (Zerfälle pro Minute)		
СуЗ	Cyanin-Farbstoff		
СТ	C-Terminus		
DABCO	Diazobicyclooctan		
DEPC	Diethylpyrocarbonat		
DMEM	Dulbecco's Modifiziertes Eagle Medium		
DMSO	Dimethylsufoxid		
DNA	Desoxyribonukleinsäure		
dNTP	Desoxyribonukleosidtriphosphate		
DP-R	Prostaglandin D <sub>2</sub> -Rezeptor		
DTT	Dithiothreitol		
E. coli	Escherichia coli		
EDTA	Ethylendiamintetraacetat		
ELISA	Enzyme-linked Immunosorbent Assay		
EP1-R	Prostaglandin E <sub>2</sub> -Rezeptor Subtyp 1		
EP2-R	Prostaglandin E <sub>2</sub> -Rezeptor Subtyp 2		
EP3-R	Prostaglandin E <sub>2</sub> -Rezeptor Subtyp 3		
EP4-R	Prostaglandin E <sub>2</sub> -Rezeptor Subtyp 4		
FCS	Fetal Calf Serum (Fötales Kälberserum)		
FITC	Fluoresceinisothiocyanat		
FP-R	Prostaglandin $F_{2\alpha}$ -Rezeptor		
G-418	Geneticin-Sulfat		
GFP	Green-Fluorenscent-Protein		
GPCR	G-protein-coupled receptor (G-Protein-gekoppelter Rezeptor)		

G-Protein	Guanin-Nucleotid-bindendes Protein	
Grb2	growth-factor-receptor bound protein	
GRK	G-protein-coupled receptor kinase	
HEK	Human Embryonic Kidney	
HEPES	2-(4-/2-Hydroxyethyl)-Piperazinyl-1-Ethansulfonat	
IBMX	Isobuthylmethylxanthin	
lgG	Immunglobulin G	
InsP <sub>3</sub>	Inositol-1,4,5-trisphosphat	
IP-R	Prostacyclin (Prostaglandin I <sub>2</sub> ) Rezeptor	
Kana	Kanamycin	
kb	Kilobasenpaare	
LB	Luria Bertani	
LMW-Standard	Low Molecular Weight-Standard	
mAk	monoklonaler Antikörper	
MES	2-(N-Morpholino)ethansulfonsäure	
OD <sub>xx</sub>	Absorption (Optische Dichte) bei einer Wellenlänge von xx nm	
р	Plasmid	
PAA	Polyacrylamid	
pBs	PBluescript	
PBS	Phosphat Buffered Saline (Phosphat-gepufferte Kochsalzlösung)	
PCR	Polymerase Chain Reaction (Polymerasekettenreaktion)	
Pen/Strep	Penicillin/Streptomycin	
PG	Prostaglandin	
PGD <sub>2</sub>	Prostaglandin D <sub>2</sub>	
PGE <sub>2</sub>	Prostaglandin E <sub>2</sub>	
PGH <sub>2</sub>	Prostaglandin H <sub>2</sub>	
PGI <sub>2</sub>	Prostaglandin I <sub>2</sub>	
РКА	Proteinkinase A	
PKC	Proteinkinase C	
PVDF	Polyvinylidendifluorid	
RIA	Radio-linked Immunoassay	
RNA	Ribonucleinsäure	
RNase	Ribonuclease	
rpm	revolutions per minute (Umdrehungen pro Minute)	
RT	Raumtemperatur	
RT-PCR	Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction	
SDS	Sodium Dodecylsulfat (Natriumdodecylsulfat)	

SDS-PAGE	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese
SH3-domäne	Src-homology 3 Domäne
Stlsg	Stammlösung
TAE	Tris-Acetat-EDTA-Puffer
TBE	Tris-Borat-EDTA
TCA	Trichloressigsäure
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin
Tetra	Tetracyclin
TP-R	Thromboxan A <sub>2</sub> -Rezeptor
Tris	Tri-(hydroxymethyl)-aminomethan
TXA <sub>2</sub>	Thromboxan A2
U	Units (enzymatische Aktivität)
UV	Ultraviolett
v/v	volume per volume (Volumen pro Volumen)
wt	Wildtyp
w/v	weight per volume (Gewicht pro Volumen)

# VERZEICHNIS DER AMINOSÄUREN UND IHRER ABKÜRZUNGEN

A	Ala	Alanin
С	Cys	Cystein
D	Asp	Asparaginsäure
E	Glu	Glutaminsäure
F	Phe	Phenylalanin
G	Gly	Glycin
Н	His	Histidin
I	lle	Isoleucin
K	Lys	Lysin
L	Leu	Leucin
М	Met	Methionin
N	Asn	Asparagin
Р	Pro	Prolin
Q	Gln	Glutamin
R	Arg	Arginin
S	Ser	Serin
Т	Thr	Threonin
V	Val	Valin
W	Trp	Tryptophan
Y	Tyr	Tyrosin

## Zusammenfassung

*Ausgangsbefunde und Aufgabenstellung:* Der humane Prostaglandin E<sub>2</sub> Rezeptor, Subtyp EP4 (hEP4-R), ist ein in der Plasmamembran lokalisierter G-Protein-gekoppelter Rezeptor, der an ein G<sub>s</sub>-Protein koppelt und nach Ligandbindung eine Erhöhung des intrazellulären cAMP-Spiegels induziert. Für diesen Rezeptor konnte eine Agonisten-induzierte Desensitisierung gezeigt werden, die möglicherweise durch eine G-Protein-gekoppelter Rezeptor-Kinasen (GRK) vermittelte Phosphorylierung des Rezeptors an Serinen und Threoninen in den intrazellulären Domänen initiiert wird. Die Agonisten-induzierte Phosphorylierung des Rezeptors konnte auf Serine und Threonine in der C-terminalen Domäne des Rezeptors eingegrenzt werden. Innerhalb der C-terminalen Domäne des hEP4-R sind 38 Serine und Threonine lokalisiert, die alle für die Agonisten-induzierte Phosphorylierung und die daran anschließende Desensitisierung und Internalisierung des Rezeptors relevant sein könnten.

Ziel dieser Arbeit war, die Serine und Threonine in der C-terminalen Domäne des hEP4-R zu identifizieren, die an der Agonisten-induzierten Phosphorylierung, Desensitisierung und Internalisierung des humanen EP4-Rezeptors beteiligt sind.

*Eliminierung der potentiellen Phosphorylierungsstellen:* Durch PCR-gestützte, sequenzgerichtete Mutagenese wurden die in der C-terminalen Domäne des hEP4-R lokalisierten Serine und Threonine teilweise oder vollständig gegen Alanine ausgetauscht. Folgende, für mutierte EP4-Rezeptoren codierende cDNAs wurden synthetisiert: hEP4 ST335-484A-R, in dem alle Serine und Threonine in der C-terminalen Domäne durch Alanine ersetzt waren, sowie hEP4 ST335-405A-, hEP4 ST428-484A-, hEP4 ST335-382A-, hEP4 S379A- und hEP4 ST335-377; 382-484A-R, in denen die Serine und Threonine zwischen den angegeben Aminosäuren durch Alanine ersetzt waren.

*Expression, Ligandbindung und Signaltransduktion:* Die cDNAs für die verschiedenen Rezeptorproteine wurden in HEK293-Zellen stabil transfiziert. Wildtyp- und alle mutierten Rezeptorproteine wurde synthetisiert und korrekt prozessiert und in die Plasmamembran eingebaut. Die Substitution einzelner oder mehrerer Serine und Threonine in der C-terminalen Domäne des hEP4-Rezeptors hatte ebenfalls keine Auswirkung auf die Affinität der Rezeptoren für PGE<sub>2</sub> und führte zu keiner Veränderung der Ligand-induzierten G-Protein-Aktivierung und Signaltransduktion im Vergleich mit dem Wildtyp EP4-R.

*Phosphorylierung:* Der hEP4 wt-R wurde Agonisten-abhängig, wahrscheinlich durch GRKs phosphoryliert. Nach Substitution aller in der C-terminalen Domäne lokalisierten Serine und Threonine wurde der Rezeptor nach Agonisten-Exposition nicht mehr phosphoryliert, was die Lokalisation der Phosphorylierungsstellen in der C-terminalen Domäne des Rezeptors bestätigte. Als potentielle Hauptphosphorylierungsstellen konnten Serine und Threonine zwischen den Serinen 359 und 382 identifiziert werden, jedoch konnte eine residuale

Phosphorylierung von Serinen und Threoninen, die distal von Serin 382 lokalisiert waren, nicht ausgeschlossen werden

Desensitisierung: Eine Agonisten-induzierte Desensitisierung des hEP4 wt-R konnte in stabil transfizierten HEK293-Zellen nicht nachgewiesen werden, so daß die Relevanz der identifizierten Phosphorylierungsstellen für die Agonisten-induzierte Desensitisierung nicht überprüft werden konnte. Dies war möglicherweise auf die hohe Rezeptorexpression in dem gewählten System zurückzuführen, bei dem ein geringer Teil nicht desensitierter Rezeptoren ausreichen würde, um die nachgeschaltete Signalkette noch immer maximal zu aktivieren.

Internalisierung: Der hEP4 wt-R wurde Agonisten-abhängig internalisiert und war nach der Internalisierung mit  $\beta$ -Arrestin colokalisiert. Die Agonisten-induzierte Internalisierung des hEP4-R wurde durch Substitution der Serine und Threonine in der C-terminalen Domäne des Rezeptors aufgehoben. Die in dem identifizierten Hauptphosphorylierungsbereich lokalisierten Serine und Threonine Ser359-Ser382 waren für die Internalisierung des hEP4-R weder hinreichend noch notwendig. Die für die Internalisierung des hEP 4-R notwendigen Serine und Threonine waren distal von Serin 382 lokalisiert, wobei der internalisierte hEP4-R nach Substitution von Ser359-Ser382 nicht mehr mit  $\beta$ -Arrestin colokalisiert war. Die Internalisierung des hEP4-R wurde durch Behandlung der Rezeptor-exprimierenden HEK293-Zellen mit hyperosmolaren Saccharosekonzentrationen inhibiert, was auf eine Clathrin-vermittelte Internalisierung hindeutete.

Schlußfolgerung: Agonisten-induzierte Für die. wahrscheinlich GRK-vermittelte, Phosphorylierung sind die Serine und Threonine zwischen Serin 359 und Serin 382 in der Cterminalen Domäne des hEP4-R notwendig. Die Relevanz dieser Serine und Threonine für die Agonisten-induzierte Desensitisierung des hEP4-R konnte jedoch in dem gewählten System nicht nachgewiesen werden. Die für die Agonisten-induzierte Internalisierung des hEP4-R relevanten Serine und Threonine sind mit den für die Phosphorylierung und möglicherweise Desensitisierung notwendigen nicht identisch und sind distal des Serin 382 lokalisiert, wobei eine der Internalisierung vorausgehende Phosphorylierung der Rezeptoren an diesen Positionen nicht ausgeschlossen werden kann. Der hEP4-R wird im Komplex mit β-Arrestin internalisiert, jedoch scheinen die im distalen Teil der C-terminalen Domäne gelegenen Serine und Threonine möglicherweise eine β-Arrestin-unabhängige Clathrinvermittelte Internalisierung zu ermöglichen. Die im proximalen Teil der C-terminalen Domäne lokalisierten Serine und Threonine des hEP4-R sind also wahrscheinlich für die Entkopplung des Rezeptors verantwortlich, während die im distalen Bereich lokalisierten Serine und Threonine für die Internalisierung relevant sind.

### 1 Einleitung

#### 1.1 Prostanoide

Prostanoide sind lokal gebildete autokrin oder parakrin wirkende Mediatoren. Sie sind Derivate der Arachidonsäure, die durch einen externen Stimulus durch die Phospholipase A<sub>2</sub> aus Phospholipiden der Plasmamembran freigesetzt wird (Clark *et al.* (1991)). Durch Katalyse des bifunktionellen Enzyms Prostaglandin-H-Synthase (Cyclooxygenase und Peroxidase) entsteht aus der Arachidonsäure unter Einbau von molekularem Sauerstoff das Prostaglandin H<sub>2</sub> (PGH<sub>2</sub>) (Smith und Marnett (1991)), aus dem durch Redoxreaktionen und Umlagerung des Endoperoxidrings die Prostanoide Prostaglandin D<sub>2</sub> (PGD<sub>2</sub>), Prostaglandin E<sub>2</sub> (PGE<sub>2</sub>), Prostaglandin F<sub>2α</sub> (PGF<sub>2α</sub>) sowie Prostacyclin (PGI<sub>2</sub>) und Thromboxan A<sub>2</sub> (TXA<sub>2</sub>) gebildet werden (Abb. 1) (Samuelsson (1978)).

Die freigesetzten Prostanoide können verschiedene Funktionen modulieren; so wurde die durch  $PGF_{2\alpha}$  induzierte Gefäßkonstriktion gezeigt (Morita *et al.* (1994)), während Prostacyclin die Gefäßdilatation (Williams *et al.* (1994); Baxter *et al.* (1995)) induzieren kann. Für  $PGE_2$  wurde ein anaboler Effekt auf den Knochenmetabolismus (Machwate *et al.* (2001)) und die Regulation von Entzündungsreaktionen in der Leber (Peters *et al.* (1990)) beschrieben, während für  $PGD_2$  eine Rolle an der Schlafinduktion nachgewiesen wurde (Hayaishi (1991); Urade und Hayaishi (1999)). Thromboxan  $A_2$  bewirkt die Kontraktion vaskulärer und respiratorischer glatter Muskulatur (Samuelsson 1978; Coleman und Sheldrick (1989)) und stimuliert die Thrombocytenaggregation (Okuma *et al.* (1996)), die durch  $PGI_2$  inhibiert wird (Armstrong *et al.* (1989);Hirata *et al.* (1994)).

Prostanoide übertragen ihre Signale auf Zielzellen über Prostanoidrezeptoren, die zur Klasse der an heterotrimere G-Proteine gekoppelten Rezeptoren (GPCR) mit sieben Transmembrandomänen gehören (Giles *et al.* (1991); Narumiya *et al.* (1993); Coleman *et al.* (1994)). PGI<sub>2</sub> kann darüber hinaus über die Bindung an nukleäre Hormonrezeptoren, sogenannte Peroxisom Proliferator-aktivierte Rezeptoren (PPAR  $\gamma$  und  $\delta$ ) die Adipocyten-Proliferation modulieren (Reginato *et al.* (1998); Hatae *et al.* (2001)).

### 1.2 Plasmamembranständige Prostanoidrezeptoren

Die plasmamembranständigen Prostaniodrezeptoren bilden eine Subfamilie innerhalb der Rhodopsin-Typ-Rezeptorfamilie. Sie besitzen eine extrazelluläre N-terminale Domäne, sieben Transmembrandomänen, drei extrazelluläre und drei intrazelluläre Schleifen und eine intrazelluläre C-terminale Domäne (Dohlman *et al.* (1991)).



**Abb. 1: Prostanoid-Synthese.** Die Bildung der Prostanoide erfolgt nach Freisetzung von Arachidonsäure aus der Zellmembran. Nach Ring- und Peroxidbildung durch die Cyclooxygenase werden die einzelnen Prostanoide durch spezifische Synthasen (Prostacyclin-Synthase, Endoperoxid-Isomerase D, Endoperoxid-Isomerase E, Endoperoxid-Reduktase, und Thromboxan A<sub>2</sub>-Synthase) gebildet. TXA<sub>2</sub>: Thromboxan A<sub>2</sub>, PGI<sub>2</sub>: Prostacyclin, PGD<sub>2</sub>: Prostaglandin D<sub>2</sub>, PGF<sub>2</sub>: Prostaglandin F<sub>2</sub>, PGE<sub>2</sub>: Prostaglandin E<sub>2</sub>.

Sie sind an heterotrimere G-Proteine gekoppelt, die die Bildung sekundärer Botenstoffe wie cAMP und InsP<sub>3</sub>/Ca<sup>2+</sup> modulieren und so extrazelluläre Signale in intrazelluläre umwandeln (Boege *et al.* (1991); Narumiya *et al.* (1993)).

### 1.2.1 Klassifikation der Prostanoidrezeptoren

Die Prostanoidrezeptoren wurden anhand ihrer Spezifität für natürliche und synthetische Agonisten und Antagonisten sowie biochemisch durch ihre Kopplung an verschiedene G-Proteine klassifiziert und in acht Gruppen unterteilt (Coleman *et al.* (1994)) (Tab. 1).

Danach existieren folgende Rezeptortypen:  $PGD_2$ -Rezeptor (DP-R),  $PGF_{2\alpha}$ -Rezeptor (FP-R),  $PGI_2$ -Rezeptor (IP-R), Thromboxan A<sub>2</sub>-Rezeptor (TP-R) und vier Subtypen von  $PGE_2$ -Rezeptoren: EP1-R, EP2-R, EP3-R, EP4-R, die von verschiedenen Genen codiert werden und sich in ihrer Größe und in ihrer G-Protein-Kopplung unterscheiden.

Der DP-, EP2-, EP4- und der IP-Rezeptor sind  $G_s$ -gekoppelt und erhöhen somit den intrazellulären cAMP-Spiegel, der EP1-, FP-, IP- und der TP-Rezeptor sind  $G_q$ -gekoppelt und führen so zu einem Anstieg von InsP<sub>3</sub> und Ca<sup>2+</sup>. Der EP3-Rezeptor ist  $G_i$ -gekoppelt und hemmt die Hormon-stimulierte cAMP-Bildung. Für den TP-Rezeptor wurde darüberhinaus direkt (Offermanns *et al.* (1994); Djellas *et al.* (1999)), für den EP3-Rezeptor (Katoh *et al.* (1996); Hasegawa *et al.* (1997)) und den FP-Rezeptor (Pierce *et al.* (1999)) indirekt eine Kopplung an  $G_{12/13}$  mit einer Aktivierung von Rho nachgewiesen.

Spleißvarianten des bovinen EP3-Rezeptors zeigten eine Kopplung an verschiedene G-Proteine (Namba *et al.* (1993)). Für den ovinen FP-R und humanen TP-R wurden ebenfalls Spleißvarianten identifiziert (Pierce und Regan (1998); Narumiya *et al.* (1999)).

### 1.2.2 Strukturelle Gemeinsamkeiten der Prostanoidrezeptoren

Die Prostanoidrezeptoren zeigen untereinander eine Sequenzidentität von 20-30%, die in den Transmembrandomänen sehr hoch, dagegen aber in den extrazellulären und intrazellulären Rezeptordomänen deutlich geringer ist. Die konservierten Aminosäuren innerhalb der Prostaniodrezeptoren sind für die räumliche Struktur sowie die Ausbildung der Ligandbindungstaschen und die Signaltransduktion von Bedeutung. So sind in den extrazellulären Domänen der Prostanoidrezeptoren Asn-X-Ser/Thr Konsensus-Sequenzen für N-Glykosylierungsstellen lokalisiert. Die N-Glykosylierung ist für den Transport und die korrekte Insertion in die Plasmamembran, sowie in einigen Fällen für die korrekte Faltung wichtig. So wurde eine Mutante des EP3β-R, der die potentiellen Glykosylierungsstellen fehlten, im endoplasmatischen Retikulum retiniert (Böer *et al.* (2000)).

**Tab. 1: Einteilung der Prostanoidrezeptoren.** In der Tabelle aufgeführt sind die Prostanoidrezeptoren, ihre natürlichen Liganden, die durch die Ligandenbindung aktivierten G-Proteine und das dadurch ausgelöste intrazelluläre Signal. DP-R, EP2-R, EP4-R und IP-R werden als relaxierende Rezeptoren bezeichnet und stimulieren die cAMP- Bildung; EP3-R wirkt als einziger der Prostanoidrezeptoren inhibierend auf die Hormon-stimulierte cAMP-Bildung; EP1-R, FP-R und TP-R gelten als kontrahierende Rezeptoren und führen zu einer Erhöhung des intrazellulären Ca<sup>2+</sup>-Spiegels. Die mit \* versehenen Prostanoidrezeptoren existieren in manchen Spezies in Spleißvarianten, welche auch andere Signalketten aktivieren können.

Name	Natürlicher Ligand	Aktiviertes G-Protein	Intrazelluläres Signal
DP-R	$PGD_2$	Gs	cAMP↑
EP1-R*	PGE <sub>2</sub>	Gq	InsP₃↑, Ca²⁺↑
EP2-R	PGE <sub>2</sub>	Gs	cAMP↑
EP3-R*	PGE <sub>2</sub>	Gi	cAMP↓
EP4-R	PGE <sub>2</sub>	Gs	cAMP↑
FP-R*	$PGF_{2\alpha}$	Gq	InsP₃↑, Ca²+↑
IP-R	$PGI_2$	$G_s, G_q$	cAMP $\uparrow$ , InsP <sub>3</sub> $\uparrow$ , Ca <sup>2+</sup> $\uparrow$
TP-R*	TXA <sub>2</sub>	Gq	InsP₃↑, Ca²⁺↑

Weiterhin wurde für den in Astrozyten endogen exprimierten FP-Rezeptor gezeigt, daß die Behandlung der Zellen mit Tunicamycin, einem Inhibitor der N-Glykosylierung, zu einer gestörten Rezeptorfunktion führte (Kitanaka *et al.* (1994)). Die Elimination der Glykosylierungsstellen im hIP-R führte zu einem geringeren Transport in die Plasmamembran und einer reduzierten Ligandbindung der plasmamembranständigen Rezeptoren (Zhang *et al.* 2001)), was auch für den TP-R gezeigt wurde (Walsh *et al.* (1998); Chiang *et al.* (1998)).

In der ersten und zweiten extrazellulären Schleife sind zwei Cysteine konserviert, die durch Ausbildung einer Disulfidbrücke zur Stabilisierung der funktionellen Proteinstruktur beitragen können (Probst *et al.* (1992); D'Angelo *et al.* (1996), Chiang *et al.* (1996), Dorn II. *et al.* (1997), Narumiya *et al.* (1999)). Das im hochkonservierten Trp-Cys-Phe-Element in der zweiten extrazellulären Schleife lokalisierte Cys ist die am höchsten konservierte Aminosäure in den extrazellulären Domänen der Prostanoidrezeptoren (Abramowitz *et al.* (1995)). Allerdings schien im Kaninchen-EP3-R die Ausbildung dieser Disulfidbrücke für die Faltung eines funktionellen Rezeptorproteins nicht essentiell zu sein (Audoly und Breyer (1997b)).

Die Ligandbindung der Prostanoidrezeptoren findet innerhalb der Plasmamembran an den hydrophoben Transmembrandomänen statt, die aus 22 bis 28 zumeist unpolaren Aminosäuren gebildeten werden. Innerhalb der Prostanoidrezeptoren sind in der III., IV., VI. und VII. Transmembrandomäne vier Proline hochkonserviert, von denen vermutet wird, daß sie für die Bildung der Bindungstasche relevant sein könnten (Probst *et al.* (1992)). Weiterhin wurde nach Substitution einzelner Aminosäuren in den Transmembrandomänen für den EP3α-R (Huang und Tai (1995)), den Maus-IP-R (Kobayashi *et al.* (1997)), den Kaninchen-EP3-R (Audoly und Breyer (1997a)) und den humanen FP-R (Neuschäfer-Rube *et al.* 2003) eine verringerte Ligandbindung gezeigt. Eine eindeutige Zuordnung einzelner hydrophiler Aminosäuren in den Transmembrandomänen für die Hydroxyl- und Ketogruppen der Prostanoide ist bislang aber noch nicht möglich.

Spezifisch für die Prostanoidrezeptoren ist die polare, positiv geladene Aminosäure Arginin in der VII. Transmembrandomäne, die tief in der lipophilen Membran liegt. Diese Aminosäure ist in allen Prostanoidrezeptoren konserviert (Coleman *et al.* (1994); Abramovitz *et al.* (1995)). Es wird vermutet, daß dieses Arginin über eine ionische Wechselwirkung oder durch Ausbildung von Wasserstoffbindungen mit der Carboxylgruppe der Prostanoide die Ligandbindung unterstützt (Funk *et al.* (1993); Chang *et al.* (1997); Audoly und Breyer (1997a)).

Eine in allen G-Protein-gekoppelten Rezeptoren (GPCR) hoch konservierte intrazelluläre Sequenz ist das an die III. Transmembrandomäne anschließende DRY-Motiv, welches einen Einfluß auf die Struktur und die Signaltransduktion (Rasmussen *et al.* (1999)), sowie die Signaltermination (Bennett *et al.* (2000); Hüttenrauch *et al.* (2002)) hat. Diesem DRY-Motiv entspricht ein ERC-Motiv innerhalb der meisten Prostanoidrezeptoren, wobei im EP2- und im EP4-R ein ERY-Motiv konserviert ist. Das Arginin ist in allen GPCR vorhanden.

Unmittelbar am Ende der VII. Transmembrandomäne ist das in Prostanoidrezeptoren konservierte DPXXY-Motiv zu finden, das für die Kopplung des Rezeptors an das G-Protein von Bedeutung ist. Der Austausch des Asp im DPXXY-Motiv des mEP3α-R (Satoh *et al.* (1999)) oder des Kaninchen-EP3-R (Audoly und Breyer (1997a)) veränderte die Affinität des Rezeptors zum Liganden nicht wesentlich, führte aber zu einer Reduktion der Kopplung des Rezeptors an das G-Protein.

Weiterhin befinden sich im proximalen Teil der C-terminalen Domäne des EP2-, EP4-, FPund der IP-R zwei Cysteine, die palmitoyliert werden können, sodaß durch deren Membranverankerung eine vierte cytoplasmatische Schleife gebildet werden kann, die an der Signaltransduktion beteiligt sein könnte (Bouvier *et al.* (1995); Morello *et al.* (1996); Böhm *et al.* (1997)). Die Membranverankerung über ein in der C-terminalen Domäne lokalisiertes Cys, die zu einer verminderten G-Protein-Aktivierung führte, wurde für den IP-R gezeigt (Hayes *et al.* (1999)). Die für die Palmitoylierung postulierte Konsensus-Sequenz Leu-X-Cys-(X)n-Arg/Lys ca. 11-16 Aminosäuren nach der VII. Transmembrandomäne ist in den Prostanoidrezeptoren jedoch nicht vorhanden (Narumiya *et al.* (1999)).

Zusätzlich sind in den intrazellulären Schleifen und der C-terminalen Domäne der verschiedenen Rezeptoren Serine und Threonine lokalisiert, denen durch Phosphorylierung ihrer Seitenketten eine Bedeutung in der Entkopplung des Rezeptors von der intrazellulären Signalkette zukommt. Bisher konnte eine Beteiligung der C-terminalen Domäne an der Entkopplung von der intrazellulären Signalkette für den IP- (Smyth *et al.* 1998), den TP- (Spurney (1998)), den EP3 $\alpha$ - (Negishi *et al.* (1993)) und den EP4-Rezeptor (Bastepe und Ashby (1997)) gezeigt werden.

#### 1.3 Signaltermination der G-Protein-gekoppelten Rezeptoren

Nach der Ligandbindung an den Rezeptor kommt es zu einer Konformationsänderung des Rezeptors in seine aktivierte Form, die eine Interaktion mit dem G-Protein ermöglicht. Diese Interaktion führt zum Austausch des an die  $\alpha$ -Untereinheit gebundenen GDP zu GTP, wodurch das G-Protein in die  $\alpha$ - und die  $\beta\gamma$ -Untereinheit dissoziiert und die  $\alpha$ -Untereinheit verschiedene Effektoren aktiviert oder inhibiert.

Die Signaltermination der G-Protein-gekoppelten Rezeptoren kann entweder durch die Entfernung des Liganden vom Rezeptor an der Zelloberfläche oder durch eine Entkopplung des Ligand-besetzten Rezeptors von seiner intrazellulären Signalkette erfolgen. Damit der Ligand sich vom Rezeptor lösen kann, muß er aus dem Gleichgewicht entfernt werden, was durch Diffusion und daraus resultierender Verdünnung in das umgebende Medium erfolgen kann. Die Entfernung des Liganden aus dem Gleichgewicht kann weiterhin durch extrazellulären enzymatischen Abbau oder durch Aufnahme in die Zelle beschleunigt werden. Dieser letzte Weg könnte für die Prostaglandine relevant sein, für die Prostaglandin-Transporter identifiziert wurden, durch die die Prostaglandine in die Zelle aufgenommen werden, in der sie dann metabolisiert werden. Prostaglandin-Transporter wurden für PGD<sub>2</sub> PGE<sub>2</sub> und PGF<sub>2α</sub> beschrieben (Kanai *et al.* (1995); Lu *et al.* (1996); Chan *et al.* (1998)).

Auch in Gegenwart des Liganden kann bei vielen GPCR durch intrazelluläre kovalente Modifikationen des Rezeptors die Signaltransduktion terminiert werden. Dabei werden die Rezeptorproteine zunächst signalabhängig entweder durch "second messenger"-abhängige Kinasen (siehe 1.3.1) oder durch den Ligand-besetzten Rezeptor selbst aktivierte Kinasen (G-protein-coupled receptor kinase (GRKs)) (siehe 1.3.1) an intrazellulären Domänen phosphoryliert. Während durch GRKs nur Ligand-besetzte, aktivierte Rezeptoren homolog phosphoryliert werden können, kann eine Rezeptorphosphorylierung durch "secondmessenger"-abhängige Kinasen auch ohne Aktivierung des Substratrezeptors (heterolog) durch Aktivierung eines anderen Rezeptors in derselben Zelle erfolgen (Abb. 2).



Abb. 2: Schematische Darstellung der durch Ligandbindung und Rezeptoraktivierung ausgelösten Signalkaskaden der G-Protein-gekoppelten Rezeptoren. Dargestellt sind die VII. Transmembrandomäne und die C-terminale Domäne des Rezeptors mit gebundenem Liganden (L) und der aktivierte Effektor (E). Weitere Einzelheiten siehe Text.

Die Phosphorylierung der Rezeptorproteine ermöglicht die Interaktion mit einem Protein, dem  $\beta$ -Arrestin (Lohse *et al.* (1992)) (siehe 1.3.1), das die Kopplung des Rezeptors an sein G-Protein sterisch inhibiert. Diese Entkopplung wird als Desensitisierung bezeichnet (Abb. 3).  $\beta$ -Arrestin markiert gleichzeitig den Rezeptor für die auf die Entkopplung folgende Internalisierung.

Durch die Bindung des Adaptorproteins Adaptin (siehe 1.3.1) an  $\beta$ -Arrestin wird die Internalisierung eingeleitet. Nach Kopplung von  $\beta$ -Arrestin und Adaptin an Clathrin (siehe 1.3.1) folgt die Invagination der Plasmamembran und die Dynamin-vermittelte Abschnürung eines Vesikels, die in einer Entfernung des Rezeptors von der Zelloberfläche resultiert (Abb. 3). Der Rezeptor wird internalisiert und in einem intrazellulären Kompartiment vom Liganden getrennt und dephosphoryliert. Der dephosphorylierte Rezeptor kann zur Plasmamembran zurücktransportiert (Resensitisierung) oder aber, vor allem bei lang anhaltender Agonisten-Exposition der Zelle, abgebaut werden (Down-Regulation).



Abb. 3: Schematische Darstellung der Entkopplung des Rezeptors vom G-Protein durch  $\beta$ -Arrestin und anschließende Internalisierung. Dargestellt sind die VII. Transmembrandomäne mit gebundenem Ligand und die phosphorylierte C-terminale Domäne des Rezeptors, sowie die an der Internalisierung beteiligten Proteine. Weitere Einzelheiten siehe Text.

### 1.3.1 Komponenten der Agonisten-induzierten Desensitisierung und Internalisierung

An der Desensitisierung G-Protein-gekoppelter Rezeptoren sind verschiedene Proteine beteiligt, deren Zusammenspiel zur Entkopplung und Internalisierung des Rezeptors führt. Die einzelnen Komponenten der Entkopplung und Internalisierung werden durch den Rezeptor selbst oder durch Komponenten der intrazellulär ausgelösten Signalkaskade aktiviert. Die Hauptkomponenten, denen eine Bedeutung in der Desensitisierung und Internalisierung nachgewiesen wurde, sind im folgenden dargestellt.

### Proteinkinase A (PKA) und Proteinkinase C (PKC)

PKA und PKC sind "second messenger"-abhängige (PKA durch cAMP und PKC durch Diacylglycerol (DAG)) cytosolische Kinasen, die Serine und Threonine, die sich innerhalb einer spezifischen Konsensus-Sequenz befinden, phosphorylieren können (Böhm *et al.* (1997), Ferguson (2001)). Sie werden in vielen Geweben exprimiert und sind an verschiedenen Signalwegen beteiligt. PKA und PKC können einen Rezeptor phosphorylieren, auch wenn der Rezeptor nicht Ligand-besetzt ist und so nur als Substrat dient. PKA und PKC sind an der heterologen Desensitisierung beteiligt.

#### G-protein-coupled receptor kinase (GRK)

"G-protein-coupled receptor kinases" (GRK) sind cytosolische oder membranassoziierte Kinasen, die in verschiedenen Geweben exprimiert werden (Lefkowitz (1993), Böhme et al. (1997), Ferguson (2001)). Bisher konnten sieben verschiedene GRKs identifiziert werden, die einen Rezeptor nach der notwendigen Membranassoziation phosphorylieren können (Stoffel et al. (1997)). Die Membranassoziation wird durch Elemente in der C-terminalen Domäne gewährleistet. GRK1 und GRK7, die nur in der Retina exprimiert werden, verfügen über ein CAAX-Motiv, durch das sie über eine lichtinduzierte Farnesylierung an der Membran verankert werden. GRK2 und GRK3 sind ubiquitär exprimierte, cytosolisch lokalisierte Kinasen, die über eine G<sub>By</sub>-Bindungs- und eine "pleckstrin-homology"-Domäne innerhalb der C-terminalen Domäne verfügen, über die es zu einer G<sub>By</sub>- und Phosphoinositid-abhängigen Membranverankerung kommt. Im Gegensatz dazu sind GRK4, die im Testis exprimiert wird, und GRK6, die ubiquitär exprimiert wird, palmitoyliert und permanent an der Plasmamembran verankert. Die Membranverankerung von der ubiquitär exprimierten GRK5 wird möglicherweise durch elektrostatische Interaktionen über einen basischen Bereich in der C-terminalen Domäne mit Phospholipiden der Membran gewährleistet (Krupnick und Benovic (1998); Penn et al. (2000)).

Die GRKs haben eine vergleichbare strukturelle Organisation. Sie verfügen über eine gering konservierte N-terminale-Domäne, in der die Rezeptor-Bindungsdomäne lokalisiert ist. Innerhalb der Rezeptor-Bindungsdomäne liegt die konservierte "regulator of G-Protein signaling homology"-Domäne (RGS-Domäne), über die die Aktivität der G-Proteine moduliert werden kann. Der N-terminalen Domäne folgt die katalytische Domäne (Böhm *et al.* (1997)), an die sich ein 66 Aminosäuren-umfassender konservierter Bereich anschließt. Die C-terminale Domäne, die zur Membranassoziation der GRKs dient, ist in der Peptidsequenz und Größe sehr variabel.

Die Membranverankerung der cytosolischen Kinasen und die Aktivierung werden durch einen aktivierten Rezeptor induziert, wobei für die Aktivierung Phosphatidylinisitol-bisphosphat (GRK2 und 3) oder  $G_{\beta\gamma}$  erforderlich ist. Nach der Membranassoziation phosphorylieren die GRKs ausschließlich Serine und Threonine, wobei sie im Gegensatz zu PKA und PKC keine Konsensus-Sequenz benötigen. Die aktivierten GRKs können nur Ligand-besetzte Rezeptoren phosphorylieren.

### $\beta$ -Arrestin

 $\beta$ -Arrestin ist ein monomeres cytosolisches Protein, von dem bisher vier Typen identifiziert wurden: Visual-Arrestin und C-Arrestin sind hauptsächlich in der Retina lokalisiert, wohingegen  $\beta$ -Arrestin1 und  $\beta$ -Arrestin2 in vielen Geweben exprimiert werden (Böhm *et al.* 

(1997)). Für  $\beta$ -Arrestin wurden in verschiedenen Geweben Spleißvarianten identifiziert (Parruti *et al.* (1993); Sterne-Marr *et al.* (1993)).

 $\beta$ -Arrestin besitzt eine N-terminale und eine C-terminale regulatorische Domäne, die für die Struktur wichtig sind. Weiterhin verfügen sie N-terminal über eine Erkennungsstelle für den Aktivierungsgrad des Rezeptors, der eine Phosphorylierungs-Erkennungsstelle folgt. Innerhalb der C-terminalen Domäne ist eine Rezeptor-Bindungsdomäne lokalisiert und, in  $\beta$ -Arrestin1, eine primäre Phosphorylierungsstelle (Ser 412), über deren Phosphorylierung die Affinität zu Clathrin reduziert werden kann. Weiterhin befinden sich ein Clathrin-Bindungsmotiv (LIEF) und ein RXR-Bindungsmotiv für  $\beta$ 2-Adaptin in diesem Bereich (Luttrell und Lefkowitz (2002)).  $\beta$ -Arrestin bindet hauptsächlich an phosphorylierte Rezeptoren, kann jedoch auch mit einer deutlich geringeren Affinität an nicht-phosphorylierte Ligand-besetzte Rezeptoren binden (Böhm *et al.* (1997)).

#### Adaptin

Adaptin ist ein heterotetrameres Protein, das sich aus zwei großen Untereinheiten ( $\alpha$ ,  $\gamma$ ,  $\delta$ , oder  $\varepsilon$  und  $\beta$ 1- $\beta$ 4) zusammensetzt, die nicht-kovalent über eine  $\mu$ -Untereinheit ( $\mu$ 1- $\mu$ 4) und eine kleine  $\sigma$ -Untereinheit ( $\sigma$ 1- $\sigma$ 4) assoziiert sind. Bisher konnten vier Adaptin-Komplexe identifiziert werden, AP1-4 (Adaptor-Protein 1-4), von denen AP2 an der Clathrin-vermittelten Endocytose beteiligt ist. Die Bindung von Adaptin an  $\beta$ -Arrestin erfolgt über ein Motiv in der C-terminalen Domäne von  $\beta$ -Arrestin (Laporte *et al.* (1999)). Die Interaktion mit Clathrin erfolgt über ein Clathrin-Bindungsmotiv in der  $\beta$ -Untereinheit (Galluser und Kirchhausen (1993)). Die  $\alpha$ -Untereinheit des Adaptin kann mit Dynamin interagieren (Wang *et al.* (1995), das eine regulatorische Funktion in der Endocytose übernimmt (Zhang *et al.* (1996), Ahn *et al.* (2002)). Die Bindung des Adaptin-Komplex an das Zielprotein kann auch über Dileucin-Motiv im Zielprotein erfolgen.

#### Dynamin

Dynamin ist ein monomeres Protein von dem bisher zwei Isoformen identifiziert wurden, wobei Dynamin I im Nervengewebe und Dynamin II in vielen Geweben exprimiert wird. Dynamin besitzt eine GTPase-Aktivität, durch die eine Oligomerisierung in Ring- oder Spiralstrukturen und die daraus resultierende Abschnürung von Vesikeln von der Plasmamembran ermöglicht wird (Hinshaw und Schmid (1995); Ahn *et al.* (2002)). Die GTPase-Domäne mit drei hochkonservierten GTP-Bindungsstellen ist im N-terminalen Bereich des Proteins lokalisiert, der die mögliche Assemblierungs-Domäne folgt. Weiterhin verfügt Dynamin über eine "pleckstrin-homology"-Domäne, die an Phosphoinositide der Plasmamembran bindet und so für die Membranlokalisation relevant ist. In der C-terminalen Domäne ist eine GTPase-Effektor-Domäne (GED), die die GTP-abhängige Oligomerisierung

beschleunigt (Warnock *et al.* (1996)) und eine Prolin-reiche Domäne, an die regulatorische Proteine mit einer "Src-homology-3"-Domäne binden können (Grabs *et al.* (1997)), lokalisiert. Die Interaktion von Dynamin mit Clathrin und dem AP2-Komplex sowie die Oligomerisierung kann von Amphiphysin, Grb2, PLC $\gamma$  und Endophilin über diese Domäne reguliert werden (Eccleston *et al.* (2002); Claing *et al.* (2002)). Darüber hinaus können PIP<sub>2</sub> und G<sub>βγ</sub> die GTPase-Aktivität von Dynamin und damit die Abschnürung positiv und negativ modulieren (Lin und Gilman (1996)).

### Clathrin

Clathrin besteht aus drei schweren und drei leichten Polypeptidketten, die die sogenannte Triskelion-Struktur ausbilden. Diese Triskelions formen korbähnliche konvexe Netzwerke auf der cytosolischen Seite der Plasmamembran mit den assoziierten Rezeptoren, die dann durch Invagination zu cytosolischen Clathrin-coated-Vesikeln werden. Anschließend folgt die Dynamin-vermittelte Abschnürung der Vesikel von der Plasmamembran und eine darauffolgende Fusion mit Lysosomen oder cytosolischen Transportkompartimenten.

### 1.4 Der humane EP4 Rezeptor

### 1.4.1 Struktur des humanen EP4-Rezeptors

Die von der cDNA abgeleitete Aminosäuresequenz des humanen EP4-Rezeptors (Abb. 4) besteht aus 488 Aminosäuren. Das anhand der Peptidsequenz errechnete Molekulargewicht beträgt ca. 54 kDa. Innerhalb dieser Sequenz befinden sich zwei Asn an Position 7 in der N-terminalen Domäne und an Position 177 in der zweiten extrazellulären Schleife, die potentielle N-Glykosylierungsstellen sind. Weiterhin sind an Position 92 in der ersten und an Position 170 in der zweiten extrazellulären Schleife zwei Cysteine vorhanden, die durch Ausbildung einer Disuldfidbrücke den Rezeptor stabilisieren können, wobei Cys 170 in dem koservierten Trp-Cys-Phe-Element (Position 169-171) liegt. Im Gegensatz zu den meisten Prostanoidrezeptoren, die statt des unter allen GPCR konservierten DRY-Motives, ein ERC-Motiv haben, trägt der EP4-R in Position 116-118 ein ERY-Motiv in der zweiten cytoplasmatischen Schleife. In den Transmembrandomänen IV (Position 154), VI (Position 287) und VII (Position 326) sind drei der vier konservierten Proline vorhanden.



**Abb. 4: Hypothetische Struktur des humanen EP4-Rezeptors.** Gezeigt ist die hypothetische Struktur des humanen Prostaglandin E<sub>2</sub>-Rezeptors, Subtyp EP4 mit seinen sieben Transmembrandomänen, der extrazellulären N- und der intrazellulären C-terminalen Domäne und den drei extrazellulären und den drei intrazellulären Schleifen. Die mit -CHO versehenen Aminosäuren bilden potentielle N-Glykosylierungsstellen. Serine und Threonine in der C-terminalen Domäne, die als potentielle Phosphorylierungsstellen dienen können sind blau, die Dileucin-Motive grün, Aminosäuren, die in allen Prostanoidrezeptoren konserviert sind, rot markiert. Cysteine, die extrazellulär eine Disulfidbrücke bilden können, sind gelb und durch eine Linie verbunden; die gelb markierten Cysteine 346 und 349 in der C-terminalen Domäne sind möglicherweise palmitoyliert und können somit in der Membran verankert sein.

Die VII. Transmembrandomäne wird wahrscheinlich von den Aminosäuren 311 bis 332 gebildet, innerhalb der sich an Position 316 das hochkonservierte Arginin befindet und in der an Position 325-329 das DPXXY-Motiv lokalisiert ist. Die C-terminale Domäne des EP4-R wird von den Aminosäuren 333-488 gebildet. Die C-terminale Domäne ist die mit Abstand größte innerhalb der Prostanoidrezeptoren. Innerhalb der 156 Aminosäuren sind Position 346 und 349 zwei an Cysteine lokalisiert, die als potentielle Palmitoylierungsstellen dienen können. Weiterhin beinhaltet die C-terminale Sequenz 38 Serine und Threonine, denen durch Phosphorylierung ihrer Seitenketten eine Rolle in der Entkopplung des Rezeptors von der Signalkette und der Internalisierung des Rezeptors zukommen kann. Darüber hinaus verfügt der EP4-R über eine sehr große dritte intrazelluläre Schleife, in der weitere Serine und Threonine lokalisiert sind, die eine

mögliche Bedeutung in der Entkopplung und Internalisierung haben können. Zusätzlich sind auch drei Dileucin-Motive (LL 395-96; LL 452-53; LL 414-15) in der C-terminalen Domäne vorhanden, die als Bindungsmotive für Adaptin ein Rolle in der Internalisierung spielen können (Gabilondo *et al.* (1997), Fan *et al.* (2001)).

### 1.4.2 Physiologische Bedeutung des EP4-Rezeptors

Der EP4-Rezeptor konnte bisher in vielen verschiedenen Geweben nachgewiesen werden, in denen er eine Vielzahl verschiedener Funktionen übernehmen kann. Bisher wurde eine Beteiligung des EP4-Rezeptors an Fieberreaktionen (Narumiya *et al.* 1999), an der intestinalen Sekretion während Entzündungen (Belley und Chadee (1999)) und an der Regulation von Nierenfunktionen (Breyer und Breyer (2000)) nachgewiesen. Die Beteiligung des Rezeptors am Knochenmetabolismus wurde gezeigt (Machwate *et al.* (2001)) und PGE<sub>2</sub> hemmt die Akut-Phase-Reaktion über den EP4-R in der Leber (Fennekohl *et al.* 2000). In EP4-R knock-out Mäusen kam es nicht mehr zum Verschluß des Ductus arteriosus und führte zum Tod neonataler Tiere (Segi *et al.* (1998)).

### **1.4.3** Signaltermination des EP4-Rezeptors

Die Desensitisierung des EP4-Rezeptors wurde zuerst von Nishigaki *et al.* (1996) beschrieben. Sie zeigten, daß bei repetitiver Stimulation mit  $PGE_2$  die maximale, Agonisteninduzierte cAMP-Bildung in der zweiten Stimulationsphase reduziert war, jedoch die halbmaximale Stimulation der cAMP-Bildung nicht beeinflußt wurde. Weiterhin konnte nach Trunkierung der C-terminalen Domäne des EP4-Rezeptors ab Aminosäure 350 ein Verlust der Agonisten-induzierten Desensitisierung dieses Rezeptors nachgewiesen werden (Bastepe und Ashby (1999)), was eine Beteiligung der C-terminalen Domäne an der Desensitisierung vermuten läßt. Die Relevanz der C-terminalen Domäne für die Desensitisierung wurde durch die Charakterisierung eines nach  $PGE_2$ -Stimulation desensitisierbaren Hybrid-Rezeptors unterstützt, der aus dem nicht desensitisierbaren Ratten-EP3 $\beta$ -R und der C-terminalen Domäne des humanen EP4-Rezeptors bestand (Neuschäfer-Rube *et al.* 1997b).

Innerhalb der intrazellulären Domänen sind für PKA und PKC aufgrund ihrer Konsensus-Sequenz Ser 222 und Ser 259 (PKA) und Ser 360, Ser 372, Ser 429, Thr 431 und Ser 484 (PKC) als potentielle Phosphorylierungsstellen lokalisiert, jedoch sind die PKA-Stellen für die Desensitisierung und Internalisierung irrelevant, da sie nicht in der C-terminalen Domäne lokalisiert sind.

### 1.5 Ziel der Arbeit

Ziel dieser Arbeit war es, die 38 potentiellen Phosphorylierungsstellen in der C-terminalen Domäne des humanen EP4-Rezeptors durch sequenzgerichtete Mutagenese auszutauschen und die Serine und Threonine zu identifizieren, die für die Agonisten-abhängige Phosphorylierung von Bedeutung sind. Weiterhin sollte die Agonisten-abhängige Desensitisierung anhand der reduzierten cAMP-Bildung durch  $\beta$ -Arrestin-induzierte Entkopplung und die durch den Verlust der Phosphorylierung resultierende Eliminierung der Internalisierung der mutierten Rezeptoren mit dem Wildtyp-Rezeptor verglichen werden.
### 2 Material

#### 2.1 Chemikalien und Biochemikalien

2,2'-Azino-di-[3-ethylbenzthioazylin-	Roche	Mannheim
sulfonat (6)] (ABTS)		
Acrylamid/Bisacrylamid-Lösung	Roth	Karlsruhe
Agarose	Hybaid	Heidelberg
Albumin Fraktion V (BSA)	Roth	Karlsruhe
Ammoniumchlorid	Merck	Darmstadt
Ammoniumpersulfat	BioRad	Hamburg
Ampicillin	Sigma	Deisenhofen
ATP (Dinatriumsalz)	Sigma	Deisenhofen
Borsäure	Merck	Darmstadt
Bovines Serum (BS)	Biochrom	Berlin
Bromphenolblau	Sigma	Deisenhofen
Calciumchlorid-Dihydrat	Merck	Darmstadt
Coomassie-Brilliant-Blue R250	Serva	Heidelberg
Creatin-Phosphat	Roche	Mannheim
Diazobicyclooctan (DABCO)	Sigma	Deisenhofen
Desoxyribonukleotide	Roche	Mannheim
Diethylpyrocarbonat (DEPC)	Sigma	Deisenhofen
Dinatriumhydrogenphosphat	Sigma	Deisenhofen
Dinatriumhydrogenphosphat-Dihydrat	Sigma	Deisenhofen
Dithiothreitol (DTT)	Biomol	Hamburg
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Sigma	Deisenhofen
Ethylendiamintetraacetat (EDTA)	Sigma	Deisenhofen
Essigsäure	Roth	Karlsruhe
Ethanol p. a.	Roth	Karlsruhe
Ethidiumbromid	Sigma	Deisenhofen
Fibronectin	Sigma	Deisenhofen
Formamid	Roth	Karlsruhe
Forskolin	Calbiochem	Bad Soden
Gelatine	Serva	Heidelberg
Glucose	Roth	Karlsruhe
Glycerol	Roth	Karlsruhe
Glycin	Roth	Karlsruhe

GTP	Sigma	Deisenhofen
Harnstoff	Roth	Karlsruhe
Hefe-Extrakt	Gibco BRL	Eggenstein
HEPES	Applichem	Darmstadt
Hydroluma	Baker	Groß-Gerau
25-Hydroxycholesterol	Sigma	Deisenhofen
Hyperfilm	Amersham-Pharmacia	Freiburg
Isobuthylmethylxanthin (IBMX)	Calbiochem	Bad Soden
Isopropanol	Roth	Karlsruhe
Kaliumchlorid	Applichem	Darmstadt
Kaliumdihydrogenphosphat	Merck	Darmstadt
Kanamycin	Serva	Heidelberg
LB-Agar	Gibco BRL	Eggenstein
Leupeptin	Biomol	Hamburg
Magermilchpulver	Nestle	Frankfurt
Magnesiumchlorid	Merck	Darmstadt
Methanol	Roth	Karlsruhe
2-(N-Morpholino)ethansulfonsäure	Biomol	Hamburg
(MES)		
Mercaptoethanol	Roth	Karlsruhe
Mowiol 4-88	Calbiochem	Bad Soden
Nagellack	Jade	Berlin
Natriumacetat	Merck	Darmstadt
Natriumcarbonat	Merck	Darmstadt
Natriumchlorid	Merck	Darmstadt
Natriumcitrat	Merck	Darmstadt
Natriumfluorid	Sigma	Deisenhofen
Natriumhydrogencarbonat	Applichem	Darmstadt
Natriumdihydrogenphosphathydrat	Merck	Darmstadt
Natriumhydroxid	Merck	Darmstadt
Natriumdodecylsulfat (SDS)	Serva	Heidelberg
Natriumperiodat	Sigma	Deisenhofen
Natriumpyrophosphat	Sigma	Deisenhofen
N-Biotin-Hydrazid	Pierce	Frankfurt am Main
n-Butanol	Roth	Karlsruhe
Paraformaldehyd	Sigma	Deisenhofen
Pefabloc	Biomol	Hamburg

Phorbol-12-myristat-13-acetat (PMA)	Calbiochem	Bad Soden
Oligo (dT <sub>12-18</sub> )	Amersham-Pharmacia	Freiburg
ONO604	ONO Pharmaceutical	Kyoto, Japan
	Company	
o-Phosphorsäure (85% v/v)	Roth	Karlsruhe
Ponceau S	Sigma	Deisenhofen
Prostaglandin E <sub>2</sub> (PGE <sub>2</sub> )	Calbiochem	Bad Soden
Protein G-Sepharose	Amersham-Pharmacia	Freiburg
Natriumpyruvat	Serva	Heidelberg
Salzsäure (37 % (w/v))	Roth	Karlsruhe
Saponin	Sigma	Deisenhofen
Sepharose 4B	Amersham-Pharmacia	Freiburg
Serva-Blue G Nr. 35050	Serva	Heidelberg
Staurosporin	Calbiochem	Bad Soden
Streptavidin-Fluoresceinisothiocyanat	Amersham-Pharmacia	Freiburg
(FITC)-Konjugat		
Streptavidin-Peroxidase-Konjugat	Dianova	Hamburg
Sucrose	Fluka	Buchs (Schweiz)
Tetracyclin	Sigma	Deisenhofen
Trichloressigsäure (TCA)	Merck	Darmstadt
N,N,N',N'-Tetramethyl-ethylendiamin	Bio Rad	München
(TEMED)		
Tris(hydroxymethyl)-aminomethan	Merck	Darmstadt
Triton X-100	Serva	Heidelberg
Trypsin-Inhibitor	Biomol	Hamburg
Trypton	Gibco BRL	Eggenstein
Tween 20	Merck	Darmstadt
Wasserstoffperoxid	Roth	Karlsruhe
Ziegenserum	Gibco BRL	Eggenstein
Zellkultur		
(N,N-bis[2-Hydroxyethyl]-2-	Sigma	Deisenhofen
aminoethansulfonsäure (BES)		
Dulbecco's modifiziertes Eagle Medium	Gibco BRL	Eggenstein
DMEM-Trockenpulver		
Dulbecco's modifiziertes Eagle Medium	ICN	Eschwege

Fötales Kälberserum (FCS)	Biochrom	Berlin
Geneticin (G-418)-Sulfat	Calbiochem	Bad Soden
L-Glutamat 100 x Stammlösung	ICN	Eschwege
Penicillin/Streptomycin-Lösung	Gibco BRL	Eggenstein
Poly-L-Lysin	Sigma	Deisenhofen
Trypsin	Gibco BRL	Eggenstein

#### 2.2 Geräte

Automatische Pipettierhilfe, Gilson,	Eppendorf	Hamburg
Typ P10, P20, P200, P1000		
Automatische Pipettierhilfe,	Labsystems	Frankfurt am Main
Finnpipetten Digital		
Automatische Pipettierhilfe,	Hirschmann	Eberstadt
pipetus akku		
Automatische Pipettierhilfe,	Eppendorf	Hamburg
Typ Multipette plus		
Automatischer DNA-Sequenzierer	ABI	Weiterstadt
Begasungsbrutschrank	Zapf Instruments	Sarstedt
Nu Aire IR Autoflow		
ChemiDoc <sup>™</sup> -System	BioRad	München
Dampfsterilisator Varioklav	H+P Labortechnik	Oberschleißheim
Eismaschine	Ziegra	Isernhagen
Elektrophorese-System Mini Protean II	BioRad	München
Flachbettelektrophorese-Kammer	Biometra	Göttingen
Flüssigkeitsscintillationszähler	Beckmann / Coulter	München
Gene Pulser II Elektroporator	BioRad	München
Hettich-Zentrifugen Rotina 35 und	Hettich	Tuttlingen
Universal 16		
Hettich-Rotoren 1617 und 1717	Hettich	Tuttlingen
High Voltage Power Pack P30	Biometra	Göttingen
Laborbrenner Gasprofi 1	Wartewig-Labortechnik	Göttingen
Laborwaage Sartorius	Sartorius	Göttingen
Magnetrührer mit Heizblock	Heidolph	Göttingen
MR 2002		
Microplate-Reader MRX II	Dynex Technologies	Denkendorf
Mikroskop Wilovert S und Wilovert A	Hund	Wetzlar

Mikrowellengerät	Deawoo	Frankreich
Molecular-Imager	BioRad	München
pH-Meter inoLab pH Level 1	WTW	Weilheim
Quarzdestille DESTAMAT Bi 18 E	Heraeus	Hanau
Röntgenfilmkasetten	Intas	Göttingen
Schüttelapparat 3006	GFL	Burgwedel
Schüttelinkubator 3031	GFL	Burgwedel
Scintillationszähler SM6000LL	Beckmann / Coulter	München
Sicherheitswerkbank Nu Aire Class II	Zapf Instruments	Sarstedt
Sicherheitswerkbank Herasafe	Heraeus	Hanau
Sicherheitsbrenner Fireboy eco	Technorama	Wallisellen (Schweiz)
SIGMA Rotor 12154-H	Sigma	Osterode am Harz
SIGMA Zentrifuge 3K30	Sigma	Osterode am Harz
Sorvall Rotor GSA	Du Pont Instruments	Bad Homburg
Sorvall Rotor SS 34	Du Pont Instruments	Bad Homburg
Sorvall Zentrifuge RC 5B plus	Du Pont Instruments	Bad Homburg
Spannungsgerät	Biometra	Göttingen
Spectralphotometer Ultrospec 1000	Amersham-Pharmacia	Freiburg
Taumler Rocky 3D	Fröbel Labortechnik	Lindau
Thermocycler 60/2	Biomed	Theres
Thermocycler T3	Biometra	Göttingen
Thermoshaker Schutron TS 2-24	Haep Labor Consult	Bovenden
Tischzentrifuge Biofuge pico	Heraeus	Hanau
Transblot SD Semi-Dry Transfer Cell	BioRad	München
Univac Vakuumpumpe	Uniquip Laborgeräte	Martinsried
Univapo 150 H beheizbare Zentrifuge	Uniquip Laborgeräte	Martinsried
mit Kühlfalle Unicryo MC 2L 60°C		
UV-Leuchtkasten	Schütt	Göttingen
Vakuum-Filtrationsanlage	Millipore	Neuisenburg
Vortex Genie 2	Scientific Industries	Bohemia, USA
Wasserbad ecoline O11 mit	Lauda	Lauda-Königshofen
Einhängethermostat A100		
Wasserbad Haake D1	Schütt	Göttingen
Wärmeschrank Modell 600	Memmert	Schwabach

#### 2.3 Verbrauchsmaterialien

3MM-Filter	Whatmann	Maidstone (England)
Cryo-Röhrchen, 2 ml	Roth	Karlsruhe
Einmachfolie Zellglas	Folia	Wendelstein
Einmal-Spritzen, 2 ml	Braun Melsungen	Melsungen
ELISA-Platten Microlon 96 K	Greiner BIO-ONE	Frickenhausen
Faltenfilter	Schleicher und Schüll	Dassel
Glasdeckgläschen	Heinemann	Duderstadt
GF 52-Filter	Schleicher und Schüll	Dassel
Petrischalen 100 x 15 mm	Sarstedt	Nürnbrecht
Pipettenspitzen	Sarstedt	Nürnbrecht
Polypropylen-Ria-Röhrchen, 4 ml	Sarstedt	Nürnbrecht
Polypropylenröhrchen, 15 ml und 50 ml,	Sarstedt	Nürnbrecht
steril		
Objektträger	Roth	Kahlsruhe
Polystyrol-Gewebekulturschalen,	Sarstedt	Nürnbrecht
$8,7 \text{ cm}^2 \text{ und } 58 \text{ cm}^2$		
Polystyrol-Gewebekulturflasche, 25 cm <sup>2</sup>	Sarstedt	Nürnbrecht
und 75 cm <sup>2</sup>		
6-Well-Gewebekulturplatte	Sarstedt	Nürnbrecht
24-Well-Gewebekulturplatte	Sarstedt	Nürnbrecht
Polystyrol-Röhrchen, 15 ml	Sarstedt	Nürnbrecht
PVDF-Membran	Millipore	Neuisenburg
Schnappdeckel-Reaktionsgefäße, 1,5 ml	Sarstedt	Nürnbrecht
Schraubdeckel-Reaktionsgefäße	Sarstedt	Nürnbrecht
1,5 und 2 ml		

#### 2.4 Reinigungs- und Isolierungssysteme

Gesamt-RNA-Isolierung		
SV Total RNA Isolation System	Promega	Madison (USA)
DNA-Isolierung aus Agarose-Gelen		
Jetsorb	Genomed	Bad Oeynhausen

Plasmid-Reinigung			
Jetstar	Genomed	Bad Oeynhausen	
GFX <sup>™</sup> Micro Plasmid prep Kit	Amersham-Pharmacia	Freiburg	
DNA-Sequenzierung			
BigDye Ready Reaction Terminator	Applied Biosystems	Weiterstadt	
Cycle Sequencing Kit			
2.5 Chemilumineszenz-Nachweissys	tem		
SuperSignal <sup>R</sup> West Pico	Pierce	Rochford (USA)	
Chemiluminescence substrate			
2.6 Molekulare Standards			
DNA-Längenstandard			
Smart-Ladder	Eurogentec	Seraing (Belgien)	
Proteinstandard			
Protein LMW-Marker	MBI-Fermentas	St. Leon-Rot	
[ <sup>14</sup> C]-methylierter Proteinstandard	Amersham-Pharmacia	Freiburg	

Low-molecular-weight-Standards (LMW-Standard)		
Protein	MW (kDa)	
β-Galaktosidase	116	
Bovines Serum Albumin	66,2	
Ovalbumin	45	
Lactat-Dehydrogenase	35	
Restriktionsendonukleas Bsp 98I	25	
β-Lactoglobulin	18,4	

#### 2. Material

[ <sup>14</sup> C] methylierter Protein-Standard ( <sup>14</sup> C-Standard)	<u>dard)</u>
Protein	MW (kDa)
[ <sup>14</sup> C]-methyliertes Myosin	220
[ <sup>14</sup> C]-methylierte Phosphorylase b *	97,4
[ <sup>14</sup> C]-methyliertes Bovines Serum Albumin	66
[ <sup>14</sup> C]-methyliertes Ovalbumin *	46
[ <sup>14</sup> C]-methylierte Carboanhydrase	30
[ <sup>14</sup> C]-methyliertes Lysozym	14,3

\* [<sup>14</sup>C]-methylierte Phosphorylase b kann zwei Banden mit einem Molekulargewicht von 97,4 kDa und 100 kDa und [<sup>14</sup>C]-methyliertes Ovalbumin kann zwei Banden mit einem Molekulargewicht von 46 kDa und 50 kDa aufweisen.

#### 2.7 Radiochemikalien

cAMP-[ <sup>125</sup> I] Biotrak Assay system	Amersham-Pharamcia	Freiburg
[ <sup>3</sup> H]-Prostaglandin E <sub>2</sub>	Amersham-Pharmacia	Freiburg
[ <sup>32</sup> P]-ortho-Phosphat	Amersham-Pharmacia	Freiburg

#### 2.8 Antikörper

#### 2.8.1 Monoklonale Antikörper

FLAG -M2-mAk	Kodak/Sigma	Stuttgart
2.8.2 Polyklonale Antiseren		
Antiserum gegen die C-terminale	wurde im Labor	
Domäne des hEP4-R	hergestellt	
Cy3-gekoppelte Ziege-Anti-Maus-	Dianova	Hamburg
Immunglobuline G (H+L)		
Peroxidase-gekoppelte Ziege-Anti-Maus-	Biorad	München
Immunoglobuline G (H+L)		
Peroxidase-gekoppelte-Ziege-anti-	Biorad	München
Kaninchen-Immunoglobuline G (H+L)		
Biotin-gekoppelte Schaf-Anti-Maus	Amersham-Buchler	Braunschweig
Immunglobuline G (H+L)		
Ziege-anti-Maus Immunglobuline G	Dianova	Hamburg
(H+L)		

#### 2.9 Enzyme

#### Enzym Erkennungssequenz Puffer L Dra II **RG-GNCCY** BioLabs Schwalbach Hind III В Madison (USA) A-AGCTT Promega J Madison (USA) Kpn I **GGTAC-C** Promega Sma I CCC-GGG J Promega Madison (USA) SnaB I TAC-GTA В Promega Madison (USA) Sty I C-CWWGG F Promega Madison (USA) Xba I **T-CTAGA** D Promega Madison (USA) R = A, G Y = C, TN = A, C, G, T W = A, T

#### 2.9.1 Restriktionsenzyme mit Erkennungssequenz und Spaltstelle (-)

Inkubationspuffer für die Enzyme

<u>Puffer</u>	<u>A</u>	<u>B</u>	<u>C</u>	D	<u>F</u>	<u>J</u>	<u>L</u>	MULTI CORE <sup>™</sup>
Tris/HCI (mM)	6	6	10	6	10	10	10	-
MgCl <sub>2</sub> (mM)	6	6	10	6	10	7	10	-
NaCl (mM)	6	50	50	150	100		-	-
KCI (mM)	-	-	-	-	-	50	-	-
DTE (mM)	-	-	-	-	-	-	1	
DTT (mM)	1	1	1	1	1	1	-	1
Tris-Acetat (mM)	-	-	-	-	-	-	-	25
K-Acetat (mM)	-	-	-	-	-	-	-	100
Mg-Acetat (mM)	-	-	-	-	-	-	-	10
pH (bei 37°C)	7,5	7,5	7,9	7,9	8,5	7,5	7,5	7,5

Die Restriktionsendonukleasen spalten nur unter bestimmten Pufferbedingungen. Für die Spaltung wurden die vom Hersteller empfohlenen Puffer eingesetzt, bei denen die Enzyme ihre volle Aktivität besitzen. In Spaltungsreaktionen mit mehreren Enzymen wurde der Puffer gewählt, in dem die jeweiligen Enzyme ihre höchste Aktivität hatten. Im MULTI CORE<sup>TM</sup>-Puffer der Firma Promega hatten bis auf *Sty* I alle Enzyme eine hohe Aktivität. Das Enzym *Sma* I hat ein Temperaturoptimum von 25°C, so daß Reaktionen mit diesem Enzym in zwei Schritten mit den jeweiligen Temperaturen aufeinanderfolgend durchgeführt wurden.

#### 2.9.2 Sonstige Enzyme

PowerScript DNA-Polymerase	PAN	Aidenbach
Taq DNA-Polymerase	Amersham-Pharmacia	Freiburg
T4 DNA-Ligase	GibcoBRL	Eggenstein
Superscript <sup>™</sup> II RNase H⁻ Reverse	Invitrogen	Karlsruhe
Transkriptase		
Creatin-Kinase	Roche	Mannheim

#### 2.10 Oligonukleotide

Die Positionsangaben beziehen sich auf den Eintrag L25124 für die humane Prostaglandin  $E_2$ -Rezeptorsequenz, Subtyp EP4 in der GenBank<sup>TM</sup>/EMBL Data Bank Sequence Library in Heidelberg. Die Positionangaben der Primer SP6 und T7 beziehen sich auf den pBluescriptbzw. pcDNA3-Vektor.

#### 2.10.1 Vorwärts-Primer

Name	Sequenz	Position in GenBank Acc. No. L25124
Hind FLAG EP4 f	5'-gcggcg <u>aagctt</u> ccaccatg <b>gactacaa</b> ggacgacgacgacaagTCCACTCCC GGGGTCAATTCGTCC	<i>Hind</i> III-Erkennungssequenz ( <u>unterstrichen</u> ), Kozak-Sequenz ( <i>kursiv</i> ), FLAG-Epitop codierende Sequenz ( <b>fett</b> ), hEP4-R Position: 589-612
EP4 SnaBl f	5'-GGATATATATCCTCC <u>T<b>AC</b>GTA</u> AGACAGTGCTC	<i>SnaB</i> I-Erkennungssequenz ( <u>unterstrichen</u> ), mutierte Basen ( <b>fett</b> ), Position:1565-1596
SM 1f	5'-cggcgg <u>ggtacc</u> ccgTCC <u>TACGTA</u> AG <b>G</b> CAGTGCTC <b>GC</b> TAAAGCAA TAG	<i>Kpn</i> I- und <i>SnaB</i> I-Erkennungssequenz ( <u>unterstrichen),</u> mutierte Basen ( <b>fett</b> ), Position: 1585-1610
SM 2f	5'-ggc <u>GGGGCCC</u> GCAGGGAGCG C <b>G</b> CCGGACAGCACTGC <b>G</b> CAGA C <b>GC</b> TCAAAGG	<i>Dra</i> II-Erkennungssequenz ( <u>unterstrichen</u> ), mutierte Basen ( <b>fett</b> ), Position: 1639-1689

SM 4f	5'-tcc <u>CCCGGG</u> AGCTGAACGAGA TC <b>GC</b> C <b>GC</b> T <b>G</b> CA <b>G</b> CTCA <b>AG</b> CCC TCCTGCCAG	<i>Sma</i> I-Erkennungssequenz ( <u>unterstrichen</u> ), mutierte Basen ( <b>fett</b> ), Position: 1730-1777
SM 6f	5'-GAC <b>G</b> CC <b>G</b> CC <b>G</b> CACTGAGG <b>G</b> CTTTGCGAATA <b>G</b> CAGAG <b>G</b> CC <b>G</b> CAGAC <b>G</b> CT <b>G</b> CACAGGGTCAG	mutierte Basen ( <b>fett</b> ), Position: 1864-1923
SM 7f	5'-AC <b>G</b> CAGAG <b>GC</b> TGTCTTACTG GTGGATGAGGCTGGTGGG <b>G</b> C CGGCAGG	mutierte Basen ( <b>fett</b> ), Position: 1925-1971
EP4 S379A	5'-CACTCTCGC <b>G</b> CCTTCATCTC	mutierte Base (fett),
f	CCGG	Position: 1711-1734
EP4 A379S f	5'-CAGCTCGCTCCTTCATCGCC CGG	Position: 1711-1734
hEP4 2f	5'-GGCGCGCTGCTCCGCATGC AC	Position: 1207-1227
	5'-GAACCCATCGCTTACTGGCT	Position 5' des Polylinkers
Т7	TATCG	pcDNA3 Position: 864-882
		pBluescript Position: 626-647

#### 2.10.2 Rückwärts-Primer

Name	Sequenz	Position in GenBank Acc. No. L25124
EP4 Xba r	5'-gcggcg <u>tctaga</u> CTACTATATAC ATTTTTCTGATAA	<i>Xba</i> I-Erkennungssequenz ( <u>unterstrichen</u> ), Position: 2051- 2032
EP4 SnaBl r	5'-GAGCACTGTCT <u>T<b>A</b>C<b>GT</b>A</u> GG AGGATATATATCC	<i>SnaB</i> I-Erkennungssequenz ( <u>unterstrichen</u> ), mutierte Basen ( <b>fett</b> ), Position: 1596-1565
SM 3r	5'-tcc <u>CCCGGG</u> CGATGAAGGC GCGAGCGTGGCCTGCCATAG CAGCAGCTGCCCTTTGACT	<i>Sma</i> II-Erkennungssequenz ( <u>unterstrichen</u> ), mutierte Basen ( <b>fett</b> ), Position: 1739-1681

SM 5r	5'-CTGCCT <u>CCAAGG</u> CCATTTT CA <b>GC</b> GAGGTCTGGCAGTG <b>C</b> G AGGTCT	<i>Sty</i> I-Erkennungssequenz ( <u>unterstrichen</u> ), mutierte Basen ( <b>fett</b> ), Position: 1820-1776
SM 6r	5'-TGTGCAGCGTCTGCGGCC TCTGCTATTCGCAAAGCCCT CAGTGCGGCGGCGTCTTCCT GG	mutierte Basen ( <b>fett</b> ), Position: 1916-1857
SM 7r	5'-CCGG <b>C</b> CCCACCAGCCTCA TCCACCAGTAAGACA <b>GC</b> CTC TG <b>C</b> GTCCTGA	mutierte Basen ( <b>fett</b> ), Position: 1967-1920
SM 8r	5'-gc <u>tctaga</u> TTATTATATACATT TTTCT <b>GC</b> TAAGTTCAGT <b>GC</b> TTC A <b>GC</b> GGGAAAT <b>GC</b> GACTTGC AGG <b>GC</b> G <b>GC</b> CCCCTT	<i>Xba</i> I-Erkennungssequenz ( <u>unterstrichen</u> ), mutierte Basen ( <b>fett</b> ), Position: 2052-1987
EP4 ma A379S r	5'-GGCGATGAAGGAGCGAGC GTGGCC	Position: 1731-1708
EP4 wt S379A r	5'-GGAGATGAAGG <b>A</b> GCGAGA GTGGCC	mutierte Base ( <b>fett</b> ), Position: 1731-1708
EP4 Xba r mut	5'-GGCGCGTCTAGATTATTAT ATACATTTTTCTGCTAAGTT	Position: 2051- 2029
SP 6	5'-GCGAGCTCTAGCATTTAGG TGACAC	Position 3' des Polylinkers pcDNA3 Position: 999-1016

Alle Oligonukleotide wurden entweder von der Firma NAPS in Göttingen oder von der Firma MWG-Biotech AG in Ebersberg hergestellt.

#### 2.11 Eukaryote Zellinie HEK293

Die HEK293-Zellinie ist eine humane Adenovirus-transformierte Nierenzellinie (ATCC Nr.CRL 1573). Die HEK293-Zellen wurden zur stabilen eukaryoten Expression der Rezeptorproteine verwendet und in DMEM mit 10% (v/v) FCS und 1% (v/v) Penicillin/Streptomycin kultiviert.

#### 2.12 Bakterienstamm E. coli XL1 (blue)

*E. coli* XL 1 (blue) Stratagene Heidelberg recA1;endA1;gyrA96;thi-1;hsdR17;subE44;relA1;lac[F';proAB;lacl<sup>q</sup> ZWM15;Tn10(tet<sup>r</sup>)]

#### 2.13 Vektoren

#### 2.13.1 pBluescript-Vektor

Der pBluescript SK (-)-Vektor (pBS) von Stratagene (La Jolla, USA) wurde als Klonierungsvektor zur Synthese des 3'-cDNA-Fragmentes der hEP4-R-cDNA, in dem alle Serine und Threonine gegen Alanine substituiert waren, verwendet. Der Aufbau des Vektors ist in Abb. 5 gezeigt.



**Abb. 5: Restriktionskarte von pBluescript SK-.** Der Vektor besitzt die pUC19-Replikationsstelle (pUC ori) und das Ampicillin-Resistenzgen für die Selektion transformierter Bakterien in Ampicillin-haltigen Medien. In das LacZ-Gen, das ein blau/weiß-Screening rekombinanter Bakterienklone ermöglicht, ist eine multiple Klonierungsstelle integriert, die vom T3- und T7-Promotor für die *in vitro*-Transkription flankiert wird und die die Sequenzen für den universalen Vorwärts- und Rückwärts-Primer enthält.

#### 2.13.2 pcDNA3-Vektor

Der pcDNA3-Vektor von Invitrogen (San Diego, USA) wurde zur stabilen eukaryoten Expression der verschiedenen Rezeptor-cDNAs verwendet. Die Aufbau des Vektors ist in Abb. 6 gezeigt.



**Abb. 6: Restriktionskarte von pcDNA3.** Der Vektor eignet sich für die transiente und stabile Expression rekombinanter Proteine in eukaryoten Zellinien. Er besitzt für eine hohe Transkriptionsrate die Enhancer/Promotor-Sequenzen des frühen Gens des menschlichen Cytomegalie-Virus (CMV) und zur Stabilisierung der mRNA die Transkriptions-Terminationsund mRNA-Processierungs-Signale des Rinder-Wachstumshormon-Gens (BGH polyA). Das Plasmid verfügt darüberhinaus über eine multiple Klonierungsstelle. Für die Selektion und Vermehrung in *E. coli* wird von dem Plasmid ein Ampicillin-Resistenzgen und zur Selektion von Säugetierzellen, die das Plasmid stabil in ihr Genom aufgenommen haben, ein Neomycin-Resistenzgen codiert, welches den Zellen Resistenz gegenüber dem Antibiotikum Geneticin (G-418)-Sulfat verleiht.

#### 2.13.3 pEGFP-Vektor

Der pEGFP-Vektor der Firma Clontech diente zur Co-Transfektion der Rezeptorproteine mit  $\beta$ -Arrestin. Der pEGFP verfügt über die Sequenz für das "green-fluorescent-protein" (GFP), das 3' an das zu exprimierende Protein angefügt werden kann. Dieses GFP ist ein 27 kDa großes monomeres Protein, das aus 238 Aminosäuren besteht. Es stammt aus der Qualle *Aequorea victoria* und eignet sich sowohl für *in vivo*- als auch *in situ*-Proteinlokalisationen durch Lichtemission nach Anregung mit UV- oder Blau-Licht. Die Fluoreszenz des GFP-Proteins ist speciesunabhängig, sehr stabil und eignet sich auch für Doppelmarkierungen mit anderen Fluoreszenzmarkern. Der Aufbau des pEGFP-Vektors ist in Abb. 7 gezeigt.



**Abb. 7: Restriktionskarte von pEGFP.** Der Vektor eignet sich für die transiente und stabile Expression rekombinanter Proteine in eukaryoten Zellinien. Der Vektor verfügt über den starken CMV-Promotor vor der multiplen Klonierungsstelle (MCS) und das SV40 Polyadenylierungssignal. Der Vektor besitzt den SV40-Origin für die Replikation in Säugerzellen, die das SV40-T-Antigen exprimieren. Eine Neomycin-Resistenz-Kassette, die den frühen SV40-Promoter beinhaltet, das Neomycin/Kanamycin-Resistenzgen (Kan<sup>r</sup>/Neo<sup>r</sup>) von Tn5, sowie das Polyadenylierungssignal des Herpes simplex-Thymidinkinasegens (HSV TK poly A) erlauben eine Selektion stabil transfizierter eukaryoter Zellen durch G-418. Der bakterielle Promoter P<sub>amp</sub> (P) 5' von dieser Kassette induziert die Kanamycinresistenz in *E. coli*. Der pEGFP-N1 verfügt über den pUC19 Replikationsursprung (pUC ori) für die Amplifizierung in *E. coli*.

#### 3 Methoden

#### ALLGEMEINE MOLEKULARBIOLOGISCHE METHODEN

Alle Puffer und Lösungen wurden, soweit nicht anders angegeben, mit entmineralisiertem H<sub>2</sub>O angesetzt, sterilfiltriert und bei 4°C gelagert.

#### 3.1 PCR-gestützte cDNA-Synthese

#### 3.1.1 Puffer und Lösungen

10 x PCR Puffer für Power	Script DNA-Polymerase	
КОН	500 mM	
$(NH_4)_2SO_4$	160 mM	
Tween-20	0,1% (v/v)	pH 9,2
Der Puffer war der Polyme	rase beigefügt.	

<u>Mg<sup>2+</sup>-Lösung</u>	
MgCl <sub>2</sub>	50 mM
Die Lösung war der Polymerase beigefügt.	

#### OptiZyme-Enhancer (5 x)

Die Lösung war der Polymerase beigefügt. Der Hersteller machte zur Zusammensetzung keine näheren Angaben. Die Lösung mußte vor der Verwendung auf 50°C erwärmt werden, bis sie komplett gelöst war.

#### 3.1.2 Prinzip der Polymerasekettenreaktion (PCR)

Die Polymerase-Kettenreaktion (PCR = **P**olymerase **C**hain **R**eaction) erlaubt es, beliebige spezifische DNA-Abschnitte zu amplifizieren. Dazu werden zwei Oligonukleotide, die mit jeweils einem der DNA-Stränge auf beiden Seiten des zu amplifizierenden DNA-Abschnittes hybridisieren, ausreichende Mengen der vier Desoxyribonukleosidtriphosphate und eine hitzebeständige DNA-Polymerase benötigt.

Ein einzelner Zyklus besteht aus drei Schritten. Im ersten Schritt wird der DNA-Doppelstrang bei 95°C denaturiert, d. h. die beiden Stränge werden voneinander getrennt. Im zweiten Schritt wird dann der Reaktionsansatz auf ca. 45-70°C abgekühlt, um die Hybridisierung der in großem Überschuß vorhandenen Primer mit komplementären DNA-Sequenzen zu ermöglichen. Im dritten Schritt werden nun von diesen Startermolekülen ausgehend, an beiden Strängen komplementäre DNA-Stränge bei 72°C neu synthetisiert. Die 72°C entsprechen dem Temperaturoptimum der DNA-Polymerase.

Dieser Zyklus wird im selben PCR Ansatz 20-40 mal wiederholt. Die Produkte des ersten Synthesedurchgangs sind heterogen in ihrer Größe; ihre Länge kann den Abstand zwischen den Primern überschreiten. Erst im zweiten Zyklus entstehen einzelsträngige DNA-Fragmente definierter Länge und nach dem zweiten Zyklus bilden sich DNA-Doppelstränge, deren Länge dem Abstand zwischen den Primern entspricht.

Das so synthetisierte Produkt definierter Länge dient als Matrize in den folgenden Zyklen, wodurch die Menge der amplifizierten DNA-Moleküle exponentiell zunimmt. Auch die in den ersten zwei Zyklen der PCR synthetisierten längeren Moleküle werden in den folgenden Zyklen immer wieder synthetisiert. Sie vermehren sich jedoch im Gegensatz zum Produkt definierter Länge nur linear und tragen im Vergleich zur exponentiell amplifizierten Zielsequenz nicht signifikant zur Masse der neu synthetisierten DNA bei.

Das zyklische Erhitzen und Abkühlen übernehmen "Thermocycler" oder Computergesteuerte Thermostate.

#### 3.1.3 Amplifizierung von Rezeptor-cDNA mit der PowerScript DNA-Polymerase

Für einen 50 µl PCR-Ansatz wurden 10 ng zirkulärer Plasmid-cDNA, 5 µl 10 x PCR Puffer für PowerScript DNA-Polymerase, 5 µl 2 mM dATP, dGTP, dCTP, dTTP in H<sub>2</sub>O, je 30 pmol Vorwärts- und Rückwärts-Primer, 1,5 µl 50 mM MgCl<sub>2</sub>, 10 µl 5 x "Optizyme-Enhancer" und 2 U PowerScript DNA-Polymerase gemischt und mit H<sub>2</sub>O auf 50 µl aufgefüllt. Die PCR erfolgte im "Thermocycler" unter folgenden Bedingungen: 3 min 95°C; 35 x (1 min 95°C, 1 min 55°C, 2 min 72°C); 10 min 72°C. Die Reaktionsprodukte wurden zur Analyse oder Reinigung in einem Agarose-Gel aufgetrennt (siehe 3.2).

#### 3.1.4 Verlängerung des translatierten Bereichs einer cDNA-Sequenz um eine für eine Peptid- oder Restriktionsenzym-Erkennungsstelle-codierenden Sequenz durch PCR

Für die Verlängerung einer cDNA-Sequenz um eine für ein Peptid- oder eine Restriktionsenzym-Erkennungsstelle-codierende Sequenz am 5'-Bereich durch PCR wurden Primer verwendet, die um die einzufügende Sequenz verlängert waren. Dabei waren die 5'-gelegenen Nukleotide des Vorwärts-Primers, die für eine Peptidsequenz- oder für eine Restriktionsenzym-Erkennungsstelle codieren, nicht komplementär zum 5'-Bereich der cDNA-Sequenz und die folgenden ca. 20 Nukleotide, der 3'-Bereich des Primers, waren komplementär zum 5'-Bereich der cDNA-Sequenz (5' überhängender Primer).

Mit diesem Vorwärts-Primer und dem flankierenden Rückwärts-Primer wurde eine PCR mit der zu verlängernden cDNA-Sequenz als Matrize durchgeführt. Im ersten Zyklus der PCR-Reaktion lagern sich die Primer nach der Denaturierung mit ihren komplementären Sequenzen an die DNA-Matrize an und die Polymerase synthetisiert die neuen DNA-Stränge. Durch diesen Schritt entsteht nur ein Strang, der die zusätzliche codierende Sequenz trägt. Im zweiten Zyklus der PCR-Reaktion werden nach der Denaturierung und Anlagerung der Primer ein DNA-Doppelstrang mit der zusätzlichen codierenden Sequenz und zwei DNA-Doppelstränge, von denen jeweils nur ein Strang die zusätzliche codierende Sequenz trägt, synthetisiert. Der DNA-Doppelstrang mit der zusätzlichen codierenden Sequenz wird von dem 3'-flankierenden Primer synthetisiert, der mit dem im ersten Zyklus synthetisierten Strang mit zusätzlicher codierender Sequenz hybridisiert. Von beiden DNA-Doppelsträngen, von denen nur jeweils ein Strang die zusätzliche codierende Sequenz trägt, wird einer, wie im ersten Zyklus beschrieben, synthetisiert, wobei der zweite an dem Syntheseprodukt des 3'-flankierenden Primers aus dem ersten Zyklus entsteht. Die Amplifizierung der cDNA-Sequenz mit der zusätzlichen codierenden Sequenz verläuft ab dem zweiten Zyklus exponentiell.

#### 3.1.5 Prinzip der sequenzgerichteten Mutagenese

Die Methode der sequenzgerichteten Mutagenese ("site directed mutagenesis") wird häufig eingesetzt, um einzelne Basen in einem DNA-Abschnitt gezielt auszutauschen und somit eine gewünschte mutierte cDNA zu synthetisieren.

Es sind drei PCR-Reaktionen notwendig, um die mutierte Rezeptor-cDNA zu erhalten. In einer ersten PCR-Reaktion wird das 5'-Fragment der Rezeptor-cDNA mit einem Vorwärts-Primer, der 5' vor dem Startcodon des translatierten Bereichs der DNA des Rezeptor-Wildtyps aufsetzt und einem Rückwärts-Primer, der die einzuführende Mutation etwa in der Mitte trägt, amplifiziert. Ein zu diesem Rückwärts-Primer komplementäres Oligonukleotid bildet den Vorwärts-Primer für die zweite PCR-Reaktion, mit der das 3'-Fragment der zu mutierenden Rezeptor-cDNA amplifiziert wird. Der Rückwärts-Primer der zweiten PCR-Reaktion liegt in 3'-Richtung des translatierten Bereichs der DNA-Matrize des Rezeptor-Wildtyps. Die resultierenden Amplifikate (Megaprimer) enthalten nun eine komplementäre Sequenz, die die gewünschte Mutation trägt.

In einer dritten PCR lagern sich die Megaprimer mit ihren komplementären Enden zusammen, wobei die Hybride mit den 5'-überhängenden Enden in der Synthesereaktion zu einem Fragment der vollen Länge aufgefüllt werden. Im nächsten Zyklus lagern sich die flankierenden Primer an die Enden des die volle Länge umfassenden Fragmentes an und es wird amplifiziert.

Die sequenzgerichtete Mutagenese kann auch mit nur einer PCR-Reaktion durchgeführt werden, wenn das zu mutierende Nukleotid in der Nähe einer geeigneten Restriktionsschnittstelle liegt. Für diese sequenzgerichtete Mutagenese wird der Primer zum Einfügen der gewünschten Mutation so gewählt, daß er im 5'-Bereich vor der einzufügenden

Mutation für eine Restriktionsenzym-Erkennungssequenz codiert, wobei der zweite für die PCR-Reaktion verwendete Primer, der auch eine Mutation tragen kann, ebenfalls 5' für eine Restriktionsenzym-Erkennungssequenz codiert. Im ersten Zyklus der PCR-Reaktion (siehe 3.1.2) werden die Mutationen tragenden Primern an ihrem 3'-Ende Matrizen-abhängig verlängert, so daß DNA-Stränge amplifiziert werden, die 5' der eingefügten Mutationen über eine Restriktionsenzym-Erkennungssequenz verfügen. Im zweiten Zyklus lagern sich an diese Ampifikate die entsprechenden Vorwärts- bzw. Rückwärts-Primer an, durch die ein DNA-Fragment amplifiziert wird, das 5' und 3' der eingefügten Mutationen Restriktionsschnittstellen enthält. Die Amplifizierung der cDNA-Sequenz, in die nur mit einem Primer eine Mutation eingefügt wurde, verläuft ab dem zweiten Zyklus exponentiell, während die Amplifizierung der cDNA-Sequenz, in der mit dem Vorwärts- und dem Rückwärts-Primer Mutationen eingefügt wurden, ab dem dritten Zyklus exponentiell verläuft. Über die flankierenden Restriktionsschnittstellen kann das Amplifikat anschließend in die ursprüngliche Matrizen-cDNA kloniert werden kann.

#### 3.2 Agarose-Gelelektrophorese von DNA

DNA-Fragmente lassen sich in Agarose-Gelen elektrophoretisch trennen. Linearisierte DNA-Moleküle haben in diesen Gelen Wanderungsgeschwindigkeiten, die umgekehrt proportional dem Logarithmus ihrer Molekulargewichte sind (Helling *et al.* 1974). Ihre Größe kann durch Vergleich mit Größenstandards ermittelt werden. Die Agarosekonzentration der Gele richtet sich nach der Größe der zu trennenden DNA-Fragmente. Für größere Fragmente (>1,0 kb) wurden 1% (w/v), für kleinere Fragmente (< 1,0 kb) 2% (w/v) Agarose-Gele verwendet.

#### 3.2.1 Puffer und Lösungen

<u>10 x TAE-Puffer</u>		1000 ml
Tris	0,5 M	60,56 g
Natriumacetat	0,2 M	16,4 g
EDTA	20 mM	5,84 g

Der Puffer wurde mit 100% iger Essigsäure auf pH 8,0 eingestellt und autoklaviert.

Ethidiumbromid-Lösung		10 ml
Ethidiumbromid	10 mg/ml	100 mg in TAE-Puffer
Die Lösung wurde bei 4°C gelagert.	Für das Färbebad wurder	n 300 ml TAE-Puffer mit 75 μl
dieser Lösung versetzt.		

Bromphenolblau-Probenpuffe	<u>er</u>	100 ml
Bromphenolblau	0,25% (w/v)	0,25 g
Glycerol	40% (v/v)	40 ml 100% Glycerol
10 x TAE-Puffer	10% (v/v)	10 ml 10 x TAE-Puffer
Der Puffer wurde bei Raumte	emperatur gelagert.	

#### 3.2.2 Auftrennung von DNA auf Agarose-Gelen

Die zu analysierende Probe wurde mit 1/5 Volumen Bromphenolblau-Probenpuffer gemischt und in eine 5 mm breite Geltasche pipettiert. Zur Bestimmung der Fragmentlänge wurde in eine Spur der DNA-Längenstandard Smart-Ladder aufgetragen, bei dem die einzelnen DNA-Fragmente eine Größe von 10; 8; 6; 5; 4; 3; 2,5; 2; 1,5; 1; 0,8; 0,6; 0,4 und 0,2 kb aufwiesen.

Die DNA-Fragmente wurden in einem 10 cm langen Gel bei 80 V für ca. 90 min aufgetrennt, bis der Farbstoff Bromphenolblau die vordere Gelkante erreicht hatte. Danach wurde das Gel für 15 min in einem Ethidiumbromid-Färbebad inkubiert. Die DNA-Fragmente wurden auf einem Leuchtkasten bei 300 nm visualisiert und das Ergebnis durch ein Imager-System der Firma BioRad mit angeschlossenem Drucker dokumentiert.

#### 3.2.3 Semiquantitative Bestimmung der DNA-Menge in Agarose-Gelen

Neben der Auftrennung von DNA erlaubt die Gelelektrophorese auch eine semiquantitative Bestimmung der DNA-Menge. Dazu konnte ebenfalls der DNA-Längenstandard Smart-Ladder genutzt werden. Bei der gewählten Auftragsmenge (5 µl pro Geltasche) entsprachen die einzelnen Banden des Smart-Ladder-Standards 100, 80, 60, 50, 40, 30, 25, 20, 15, 100, 80, 60, 40 und 20 ng DNA.

#### 3.3 Reinigung von DNA aus Agarose-Gelen

#### 3.3.1 Puffer und Lösungen

#### Jetsorb-Suspension

Die Lösung war ohne nähere Angaben des Herstellers im Kit enthalten und wurde bei Raumtemperatur gelagert.

#### Waschpuffer A (hohe Salzkonzentration)

Die Lösung enthält konzentriertes Natriumperchlorat (NaClO<sub>4</sub>), Tris-Borat-EDTA-Solubilisierer und Natriumacetat ohne nähere Konzentrationsangaben des Herstellers. Die Lösung wurde bei Raumtemperatur gelagert.

#### Waschpuffer B (niedrige Salzkonzentration)

Die Lösung enthält Ethanol, NaCl, EDTA und Tris/HCl ohne nähere Konzentrationsangaben des Herstellers. Die Lösung wurde bei Raumtemperatur gelagert.

#### 3.3.2 Isolierung der DNA-Fragmente

Die DNA-Fragmente wurden mit dem Jetsorb-Kit der Firma Genomed isoliert. Dazu wurde der gesamte PCR-Ansatz auf ein 1% (w/v) Agarose-Gel aufgetragen. Nach der Elektrophorese und dem Anfärben des Gels im Ethidiumbromidbad wurden die DNA-Banden mit einem Skalpell präzise aus dem Gel ausgeschnitten, in ein Reaktionsgefäß überführt und ausgewogen. Zu je 100 mg Gel wurden 300  $\mu$ l Waschpuffer A und 10  $\mu$ l Jetsorb-Suspension zur DNA-Bindung hinzugefügt. Das Gemisch wurde 15 min bei 50°C unter Schütteln inkubiert, 60 s bei 13 000 rpm (16 000 x g) in der Tischzentrifuge Biofuge "pico" zentrifugiert, das Sediment einmal mit Waschpuffer A und zweimal mit Waschpuffer B gewaschen und anschließend für 5 min bei 50°C vollständig getrocknet. Zur Gewinnung der DNA wurde das Sediment für 10 min bei 50°C mit 20  $\mu$ l H<sub>2</sub>O pro 100 mg Gel inkubiert, 60 s bei 13 000 rpm (16 000 x g) in der Tischzentrifugiert und der DNA-haltige Überstand abgenommen.

#### 3.4 Klonierung der gereinigten cDNA-Fragmente in einen Vektor

#### 3.4.1 Puffer und Enzyme

Restriktionsenzyme und Puffer siehe 2.9.1

5 x T4 DNA-Ligase-Reaktionspuffer			
Tris/HCI	250 mM		
MgCl <sub>2</sub>	50 mM		
ATP	5 mM		
DTT	5 mM		
Polyethylenglycol 8000	25% (w/v)		
Der Puffer war der Ligase beigefügt un	d wurde bei -20°C gelagert.		

Zur Ligation wurde die T4 DNA-Ligase der Firma GibcoBRL verwendet.

## 3.4.2 Vorbereitung der cDNA-Fragmente (5'- und 3'-hEP4-Fragmente) und der Vektoren (pBluescript und pcDNA3)

Die cDNA-Fragmente eines PCR-Ansatzes wurden in einem 2% (w/v) Agarose-Gel aufgetrennt und wie unter 3.3 beschrieben aus dem Agarose-Gel extrahiert. Zu den

extrahierten cDNA-Fragmenten und dem jeweiligen Vektor wurden jeweils 1  $\mu$ l (10 U) der gewünschten Restriktionsenzyme und 2,5  $\mu$ l 10 x Puffer zugegeben und der Spaltansatz mit H<sub>2</sub>O auf 25  $\mu$ l aufgefüllt. Der Ansatz wurde für 2 h oder über Nacht bei 37°C inkubiert, mit 10  $\mu$ l Probenpuffer gemischt, die cDNA-Fragmente in einem 2% (w/v) Agarose-Gel und die Vektoren in einem 1% (w/v) Agarose-Gel aufgetrennt (siehe 3.2) und aus dem Gel isoliert (siehe 3.3).

#### 3.4.3 Ligation der cDNA-Fragmente in die Vektoren (pBluescript und pcDNA3)

Die zuvor mit den jeweiligen Restriktionsenzymen geschnittenen cDNA-Fragmente sowie der jeweilige linearisierte Vektor wurden in einen Ligationsansatz eingesetzt. Für die Ligation wurden das cDNA-Fragment und der Vektor mit einem molaren Quotient Vektor:cDNA-Fragment 1:3, 4  $\mu$ I 5 x T4 DNA-Ligase-Puffer, 1  $\mu$ I (1 U) T4 DNA-Ligase gemischt und das Endvolumen von 20  $\mu$ I mit H<sub>2</sub>O eingestellt.

Die Ligationsansätze wurde für 2 h bei 24°C inkubiert und sofort für die Transformation von *E. coli* XL1 (blue) Zellen verwendet (siehe 3.6) oder bis zur Transformation bei -20°C gelagert.

#### 3.5 Herstellung kompetenter *E. coli* XL1 (blue) Zellen für die Elektroporation

#### 3.5.1 Puffer und Lösungen

Tetracyclin-Stammlösung		100 ml
Tetracyclin	5 mg/ml	500 mg
		ad 100 ml 99,7% (v/v) Ethanol

Die Tetracyclin-Stammlösung wurde sterilfiltriert und bei -20°C gelagert.

<u>LB-T</u>	etra-Agar-Plat	<u>ten</u>							100	0 ml	
LB-A	Agar			3,2% (	(w/v)					32 g	
Die	Agar-Lösung	wurde	autoklaviert,	nach	Abkühlung	auf	ca.	46°C	wurden	2,5	ml
Tetra	acyclin-Stamm	lösung z	zugegeben un	id 15 n	nl/Petrischale	e aus	platt	iert. Di	e Platten	wurd	den
bei 4	I°C und, weger	n der Lic	chtempfindlich	keit de	s Tetracyclin	is, ur	iter L	ichtau	sschluß g	elage	ert.

LB-Tetra-Medium		1000 ml
Hefe-Extrakt	0,5% (w/v)	5 g
Trypton	1% (w/v)	10 g
NaCl	1% (w/v)	10 g

Das LB-Medium wurde autoklaviert, nach Abkühlung auf 46°C 2,5 ml der sterilfiltrierten Tetracyclin-Stammlösung zugegeben und das Medium bei 4°C gelagert.

Elektroporationspuffer		1000 ml
Glycerol	10% (v/v)	100 ml 100% Glycerol

#### 3.5.2 Vorbereitung der E. coli XL1 (blue) Zellen

Es wurden 5 µl einer Glycerolkultur von *E. coli* XL1 (blue) Zellen auf LB-Tetra-Agar-Platten ausgestrichen und über Nacht bei 37°C inkubiert. Danach wurde eine Kolonie in 5 ml LB-Tetra-Medium überführt und über Nacht bei 37°C geschüttelt. Anschließend wurden diese 5 ml in 250 ml LB-Tetra-Medium überführt und bei 37°C so lange geschüttelt, bis die Bakteriensuspension eine OD<sub>550nm</sub> von 0,5-1,0 (mittlere exponentielle Wachstumsphase) erreicht hatte. Die Zellen wurden sofort für 10 min im Eisbad abgekühlt.

Alle nachfolgenden Schritte wurden bei 4°C durchgeführt und die Zellen zwischen den einzelnen Schritten auf Eis gelagert. Nach einer Zentrifugation für 15 min bei 4 000 rpm (2 500 x *g*, Hettrich-Zentrifuge) wurden die Zellen mit vorgekühltem Elektroporationspuffer einmal mit dem Ausgangsvolumen der ursprünglichen Zellsuspension, einmal mit 1/2 Volumen und einmal mit 1/20 Volumen Elektroporationspuffer gewaschen. Nach jedem Waschschritt folgte eine Zentrifugation für 15 min bei 4000 rpm (2 500 x *g*, Hettrich-Zentrifuge). Zum Ende des Waschvorganges wurde das Sediment in 1/500 Volumen der ursprünglichen Zellsuspension mit Elektroporationspuffer resuspendiert (Zellzahl ca.  $10^{10}$ /ml). Es wurden jeweils 50 µl der Zellsuspension in 1,5 ml-Reaktionsgefäße überführt, in flüssigem Stickstoff Schock-gefroren und bei -70°C gelagert.

#### 3.5.3 Herstellung einer Glycerolkultur von E. coli XL1 (blue) Zellen

Einer dicht gewachsenen *E. coli*-Bakterienkultur (nicht-transformiert oder transformiert) wurde 50% (v/v) Glycerol als Gefrierschutz zugesetzt. So können die Zellen bei -70°C für mindestens 12 Monate gelagert werden, wobei häufiges Auftauen und Einfrieren vermieden werden sollte.

#### 3.6 Transformation kompetenter E. coli XL1 (blue) Zellen

#### 3.6.1 Puffer und Lösungen

SOB-Medium		500 ml
Hefe-Extrakt	0,5% (w/v)	2,5 g
Trypton	2% (w/v)	10 g
KCI	2,7 mM	0,1 g
NaCl	10 mM	0,3 g

Das Medium wurde auf pH 7,0 eingestellt, autoklaviert und bei 4°C gelagert.

SOC-Medium		1 ml
SOB-Medium		980 µl
MgCl <sub>2</sub>	20 mM	10 µl 2 M Stlsg
Glucose	20 mM	10 µl 2 M Stlsg
Das Medium wurde unmittelba	r vor Gebrauch angesetzt und	im Wasserbad auf 37°C
erwärmt.		
Ampicillin-Stammlösung		100 ml
Ampicillin	0,5% (w/v)	500 mg
Die Lösung wurde sterilfiltriert un	d in Aliquots bei -20°C gelagert.	
Kanamycin-Stammlösung		100 ml
Kanamycin	0,5% (w/v)	500 mg
Die Lösung wurde sterilfiltriert un	d in Aliquots bei -20°C gelagert.	
LB-Amp-Agar-Platten		1000 ml
LB-Agar	3,2% (w/v)	32 g
Die Lösung wurde autoklaviert,	nach Abkühlung auf ca. 46°C	wurden 10 ml Ampicillin-
Stammlösung zugegeben und 1	15 ml/Petrischale ausplattiert. D	ie Platten wurden bei 4°C
gelagert.		
LB-Kana-Agar-Platten		1000 ml

LB-Agar			3,2% (w/v	/)				32	g
Die Lösung wu	irde autokla	aviert, nach	Abkühlung	auf ca.	46°C v	vurden 1	0 ml Kar	amy	cin-
Stammlösung z	zugegeben	und 15 ml/	Petrischale	ausplat	tiert. Die	e Platter	n wurden	bei 4	4°C
gelagert.									

#### 3.6.2 Transformation durch Elektroporation

Um Plasmide in *E. coli* XL1 (blue) Zellen einzubringen, wurden 50  $\mu$ l elektrokompetente Zellen während des Auftauens mit 1-2  $\mu$ l Ligationsansatz oder 1 ng zirkulärem Plasmid gemischt. Die Zellen wurden in die zuvor gekühlten Transformationsküvetten mit einem Elektrodenabstand von 2 mm pipettiert und mit einem Puls von 2500 V, einem Widerstand von 200 Ohm und einer Kapazität von 25  $\mu$ F elektroporiert. Um das Absterben der Zellen zu minimieren, wurde sofort nach dem Puls 950  $\mu$ l auf 37°C erwärmtes SOC-Medium zu den Zellen gegeben und die Suspension 1 h bei 37°C im Schüttler inkubiert. Nach der Inkubation wurden 50-200  $\mu$ l des Transformationsansatzes auf den LB-Amp-Platten bzw. LB-Kana-Platten ausgestrichen und über Nacht bei 37°C inkubiert.

Da die *E. coli* XL1 (blue) Zellen Ampicillin-sensitiv sind und der pcDNA3- sowie der pBluescript-Vektor ein Antibiotika-Resistenzgen für Ampicillin enthalten, konnten nur transformierte (rekombinante) Bakterienklone auf den LB-Amp-Platten wachsen. Der pEGFP-Vektor besitzt ein Kanamycin-Resistenzgen und daher konnten die mit diesem Vektor transformierten Bakterienklone auf LB-Kana-Platten wachsen.

#### 3.7 Isolierung von Plasmid-DNA im Mini-Maßstab

Bei dieser Methode werden die Bakterienzellen zunächst lysiert und die im Lysat befindliche Plasmid-DNA an eine Säulenmatrix gebunden. Nach mehrmaligem Waschen wird anschließend die DNA durch Absenken der Salzkonzentration eluiert.

Hier wurde der "GFX<sup>™</sup> *Micro* Plasmid Prep Kit" von Amersham-Pharmacia verwendet. Alle Lösungen waren im Kit enthalten.

#### 3.7.1 Puffer und Lösungen

LB-Amp-Medium	5 m	I
LB-Medium	5 m	I
Das Medium wurde bei 4°C aufbewahrt und unmittelbar vor der Verwendung mit	50	μl
Ampicillin-Stammlösung (siehe 3.6) versetzt.		

LB-Kana-Medium	5 ml
LB-Medium	5 ml

Das Medium wurde bei 4°C aufbewahrt und unmittelbar vor der Verwendung mit 50 µl Kanamycin-Stammlösung (siehe 3.6) versetzt.

Resuspendierungspuffer ("S	100 ml		
Tris/HCI	100 mM	1,211 g	
EDTA	10 mM	372,3 mg	
RNase A	0,4 mg/ml	40 mg	
Der Puffer hatte einen pH-V	Vert von 7,5 und wurde bei 4°C gelage	rt.	
Lysispuffer ("Solution II")		100 ml	
NaOH	190 mM	760 mg	
SDS	1% (w/v)		
Der Puffer wurde bei Raum	temperatur gelagert.		
Neutralisationspuffer ("Solu	tion III")	100 ml	
Natriumacetat	3 M	24,6 g	

Der Puffer hatte einen pH-Wert von 5,5 und wurde bei Raumtemperatur gelagert.

Waschpuffer ("Wash Buffer")	100 ml	
Ethanol	80% (v/v)	80 ml
EDTA	10 mM	372,3 mg
Tris/HCI	100 mM	1,211 g

Der Puffer hatte einen pH-Wert von 7,5 und wurde bei Raumtemperatur gelagert.

#### 3.7.2 Präparation von Plasmid-DNA im Mini-Maßstab

Es wurde jeweils eine Bakterienkolonie von den Kulturplatten in 5 ml LB-Amp-Medium für Bakterien, die mit dem pBluescript- oder pcDNA3-Vektor transformiert worden waren oder in 5 ml LB-Kana-Medium für Bakterien, die mit dem pEGFP-Vektor transformiert worden waren, überführt und über Nacht unter Schütteln bei 37°C inkubiert. Danach wurden je 1,5 ml der Bakteriensuspension in ein Reaktionsgefäß überführt, 30 s bei Raumtemperatur (RT) und 13 000 rpm (16 000 x *g*) in der Tischzentrifuge Biofuge "pico" zentrifugiert und der Überstand verworfen. Dieser Schritt wurde wiederholt und das entstandene Pellet in 300 µl Resuspendierungspuffer resuspendiert. Die Zellen wurden durch Zugabe von 300 µl Lysispuffer lysiert und die Suspension 10-15 mal invertiert. Danach wurden 600 µl Neutralisationspuffer zugegeben und das Reaktionsgefäß mehrmals invertiert, bis sich eine gleichmäßige Suspension gebildet hatte; diese Suspension wurde für 5 min bei RT mit 13 000 rpm (16 000 x *g*) zentrifugiert.

Der Überstand mit der Plasmid-DNA wurde auf die GFX-Säule gegeben, 1 min bei RT inkubiert und 1 min ebenfalls bei RT und 13 000 rpm (16 000 x *g*) zentrifugiert. Das Eluat wurde verworfen, die Säule mit 400  $\mu$ l Waschpuffer gewaschen und 1 min bei 13 000 rpm (16 000 x *g*) zentrifugiert. Wiederum wurde das Eluat verworfen und die Säule in ein neues Reaktionsgefäß überführt. Die Säulenmatrix wurde mit 100  $\mu$ l H<sub>2</sub>O überschichtet und 1 min bei RT inkubiert. Die Säule wurde dann bei 13 000 rpm (16 000 x *g*) für 2 min zentrifugiert und so die Plasmid-DNA eluiert.

#### 3.7.3 Photometrische Quantifizierung der gereinigten Plasmid-DNA

Zur photometrischen Bestimmung wurden 10  $\mu$ l der Plasmid-DNA-Lösung in 500  $\mu$ l H<sub>2</sub>O verdünnt, das Photometer gegen H<sub>2</sub>O geeicht und die Absorption bei 260 nm und bei 280 nm gemessen.

Die Konzentration der Plasmid-DNA im Eluat wurde nach folgender Formel berechnet:

DNA-Konzentration [ng/ $\mu$ l] = E<sub>260 nm</sub> x Verdünnungsfaktor x 50

Die Reinheit wurde durch Quotientenbildung der  $OD_{260 nm}$  und  $OD_{280 nm}$  errechnet. Nur Plasmid-DNA mit einem 260/280 nm-Quotienten zwischen 1,8 und 2,0 wurde verwendet.

#### 3.8 Isolierung von Plasmid-DNA im Maxi-Maßstab

#### 3.8.1 Puffer und Lösungen

Die Präparation wurde mit dem "Jetstar-Kit" der Firma Genomed durchgeführt. Alle Lösungen waren im Kit enthalten.

Lösung E1 (Resuspendierung)		100 ml
Tris	50 mM	5 ml (1 M Stlsg pH 8)
EDTA	10 mM	2 ml (0,5 M Stlsg)
Zu dem Puffer wurde lyophilisie	rte RNase in einer	Endkonzentration von 100 µg/m
zugegeben. Er hatte einen pH-Wer	t von 8,0 und wurde b	ei 4°C gelagert.
Lösung E2 (Zelllyse)		100 ml
NaOH	200 mM	2 ml (10 N NaOH)
SDS	1% (w/v)	1 g
Der Puffer wurde bei Raumtempera	tur gelagert.	
Lösung E3 (Neutralisation)		100 ml
Natriumacetat	3,1 M	31,41 g
Der Puffer hatten einen pH-Wert vo	n 5,5 und wurde bei F	Raumtemperatur gelagert.
Lösung E4 (Säulenäquilibrierung)		100 ml
NaCl	600 mM	4,67 g
Natriumacetat	100 mM	0,82 g
Triton X-100	0,15% (v/v)	0,15 ml
Der Puffer hatte einen pH-Wert vor	5,0 und wurde bei Ra	aumtemperatur gelagert.
Lösung E5 (Waschen der Säule)		100 ml
NaCl	800 mM	4,7 g
Natriumacetat	100 mM	0,82 g
Der Puffer hatte einen pH-Wert vor	5,0 und wurde bei Ra	aumtemperatur gelagert.
Lösung E6 (DNA-Elution)		100 ml
NaCl	1250 mM	7,3 g
Tris/HCI	100 mM	10 ml (1 M Stlsg)
Der Puffer hatte einen pH-Wert vor	8,5 und wurde bei Ra	aumtemperatur gelagert.

#### 3.8.2 Isolierung der Plasmid-DNA durch Affinitätschromatographie im Maxi-Maßstab

Es wurden 150 ml LB-Amp-Medium mit 1 ml Bakterienübernachtkultur angeimpft und bei 37°C über Nacht unter Schütteln inkubiert. Die Bakteriensuspension wurde anschließend bei Raumtemperatur 20 min bei 6000 rpm (10 400 x *g*, Sorvall-Zentrifuge, SLA-1500-Rotor) sedimentiert. Das Sediment wurde in 10 ml Lösung E1 resuspendiert, 10 ml Lösung E2 zugegeben und die Bakterien 5 min bei Raumtemperatur lysiert. Danach wurde mit 10 ml Lösung E3 neutralisiert, die Suspension durch Invertieren des Reaktionsgefäßes gemischt und für 10 min bei 15 000 rpm (27 000 x *g*, Sorvall-Zentrifuge, SS-34-Rotor) und 20°C zentrifugiert. Der Überstand wurde auf eine Säule gegeben, die zuvor mit 30 ml Lösung E4 äquilibriert worden war. Anschließend wurde die Säule mit 60 ml Lösung E5 gewaschen und die Plasmid-DNA mit 15 ml Lösung E6 eluiert. Die Plasmid-DNA 45 min bei 15 000 rpm (27 000 x *g*, Sorvall Zentrifuge, SS-34-Rotor) und 20°C rom (27 000 x *g*, Sorvall Zentrifuge, SS-34-Rotor) und 20°C sedimentiert.

Das Pellet wurde durch Waschen mit 1,5 ml 70% (v/v) Ethanol in ein 1,5 ml-Reaktionsgefäß überführt und resuspendiert. Nach erneutem Zentrifugieren für 15 min bei 4°C und 20 000 rpm (36 700 x *g*, SIGMA-Zentrifuge 3K30, Rotor 12154-H) wurde der Überstand verworfen, die DNA 10 min an der Luft getrocknet und in 500  $\mu$ l H<sub>2</sub>O gelöst. Die Ausbeute betrug zwischen 0,5 und 3,0  $\mu$ g/ $\mu$ l Plasmid-DNA.

#### 3.9 Charakterisierung der Plasmide durch Restriktionsenzymspaltung

#### 3.9.1 Puffer und Enzyme

Die Puffer und Enzyme wurden unter 2.9.1 beschrieben.

#### 3.9.2 Spaltungsreaktion

Für einen 25 µl-Ansatz wurden ca. 100 ng der isolierten Plasmid-DNA, 5 U der jeweiligen Restriktionsenzyme und 2,5 µl des für die Enzymkombination optimalen 10 x Puffer gemischt, mit H<sub>2</sub>O auf 25 µl aufgefüllt und für ca. 2 h bei 37°C inkubiert. Anschließend wurden 5 µl Bromphenolblau-Probenpuffer (siehe 3.2.1) hinzupipettiert, 15 µl der Lösung auf ein 1% (w/v) Agarose-Gel aufgetragen, für ca. 90 min bei 80 mV aufgetrennt, 15 min im Ethidiumbromidbad gefärbt (siehe 3.2) und die DNA mit dem ChemiDoc<sup>TM</sup>-System der Firma BioRad visualisiert.

#### 3.10 Charakterisierung der Plasmide durch Sequenzierung

Die Sequenzierung von Doppelstrang-DNA der Plasmide wurde mit dem automatischen DNA-Sequenzierungsgerät der Firma ABI (Model 373 A) durchgeführt. Es wurde die "Big Dye Terminator Cycle Sequencing"-Methode entsprechend der Herstellervorschrift (Perkin Elmer) angewendet. Bei dieser Methode werden vier mit unterschiedlichen Fluoreszenz-Farbstoffen gekoppelte Didesoxyribonukleosidtriphosphate (ddATP, ddCTP, ddGTP, ddTTP) im Mangel mit nicht markierten Desoxyribonukleosidtriphosphaten gemischt. Die DNA-Matrize wurde von einem Oligonukleotid, z. B. dem T7- oder Sp6-Primer, ausgehend an einem Strang durch zyklisches Denaturieren, Anlagern und Synthetisieren immer wieder abgeschrieben. Die so entstandenen, am 3'-Ende mit basenspezifischen Farbstoffen markierten Fragmente wurden elektrophoretisch in einem Acrylamidgel unter denaturierenden Bedingungen aufgetrennt und durch ihre Fluoreszenz im Gel nachgewiesen.

#### 3.10.1 Puffer und Lösungen

30% (w/v) Acrylamid-Stammlösung		100 ml
Acrylamid	29% (w/v)	29 g
Bisacrylamid	1% (w/v)	1 g
Die Lösung wurde filtriert und in einer lic	chtgeschützten Flasche bei 4	°C gelagert.
10% (w/v) Ammoniumpersulfat-Lösung		100 ml
Ammoniumpersulfat	10% (w/v)	10 g
Die Lösung wurde bei 4°C gelagert.		
<u>10 x TBE-Puffer (Tris-Borat-EDTA-Puffe</u>	er)	1000 ml
Tris	0,9 M	108,0 g
Borsäure	0,9 M	55,0 g
EDTA	25 mM	8,3 g
Der Puffer wurde mit Borsäure auf pH 8	,2 eingestellt und bei Raumte	emperatur gelagert.
Natriumacetat-Puffer		100 ml
Natriumacetat	3 M	24.6 g
Der pH-Wert des Puffers wurde auf	4,6 eingestellt und der Puff	er bei Raumtemperatur
gelagert.		

EDTA-Lösung10 mlEDTA25 mM875 mgDer pH-Wert der Lösung wurde auf pH 8,0 eingestellt und die Lösung bei Raumtemperatur<br/>gelagert.gelagert.

Formamid/EDTA-Lösung 5:1		1 ml
Formamid	83,3% (v/v)	833 µl
25 mM EDTA-Lösung	16,6% (v/v)	166 µl
Die Lösungen wurden gemischt ur	nd bei 4°C gelagert.	

#### 3.10.2 Vorbereitung der Polyacrylamid-(PAA)-DNA-Sequenziergele

Die Glasplatten wurden mit einem Detergenz (Alconox) gewaschen, mit H<sub>2</sub>O gespült, mit Isopropanol nachbehandelt und danach getrocknet. Nach dem Trocknen wurden die Abstandhalter aufgelegt und die Glasplatten zusammengesetzt. Für das 4% (w/v) PAA-Gel wurden 30 g Harnstoff, 8 ml 30% (w/v) Acrylamidlösung, 6,0 ml 10 x TBE-Puffer und 22,5 ml H<sub>2</sub>O eingesetzt. Der Harnstoff wurde durch Rühren und Erwärmen (nicht über 50°C) gelöst und die Lösung danach durch einen 0,2 µm-Filter filtriert und entgast. Die Lösung wurde in ein Becherglas überführt und die Polymerisationsreaktion durch Zugabe von 350 µl 10% iger Ammoniumpersulfatlösung und 20 µl TEMED gestartet. Die Lösung wurde sofort zwischen die vorbereiteten Glasplatten gegossen und der Kamm eingesetzt. Das Gel polymerisierte anschließend 2 h in horizontaler Lage.

#### 3.10.3 Sequenzierungsreaktion

Die Sequenzierungsreaktion wurde wie folgt angesetzt:

Enzym/Puffer Gemisch	4 µl
(dNTP, ddNTP, Puffer, Polymerase)	
DNA-Matrize (Plasmid-DNA-Doppelstrang)	1 µg
Oligonukleotide	5 pmol
H <sub>2</sub> O	ad 20 µl

Die Substanzen wurden kurz gemischt, zentrifugiert und anschließend für 25 Zyklen in einem Thermocycler mit folgendem Programm inkubiert:

Denaturierung: 30 s bei 96°C; Anlagerung der Oligonukleotide: 15 s bei 50°C; Kettenverlängerung: 4 min bei 60°C.

#### 3.10.4 Aufreinigung der Proben

Nach Abschluß der Sequenzierungsreaktion wurde der Reaktionsansatz auf 4°C gekühlt und die DNA mit Ethanol gefällt, um überschüssige Didesoxyribonukleosidtriphosphate mit Fluoreszenzfarbstoffgruppen zu entfernen.

Hierzu wurden zu dem Reaktionsansatz 80  $\mu$ I H<sub>2</sub>O, 10  $\mu$ I 3 M Natriumacetat (pH 4,6) und 250  $\mu$ I 95% (v/v) Ethanol (RT) gegeben und das Gemisch 15 min bei 13 000 rpm (16 000 x *g*) in der Tischzentrifuge zentrifugiert. Danach wurde der Überstand entfernt, das Sediment mit 250  $\mu$ I 70% (v/v) Ethanol (RT) gewaschen und 5 min bei 13 000 rpm (16 000 x *g*) zentrifugiert. Anschließend wurde das Ethanol abpipettiert und die DNA getrocknet. Die DNA wurde in 3  $\mu$ I Formamid/EDTA-Lösung 5:1 aufgenommen und 2 min bei 90°C denaturiert.

#### 3.10.5 Automatische Sequenzierung und EDV-gestützte Auswertung

Auf das Sequenziergel wurden 3 µl der DNA-Lösung aufgetragen und die Oligonukleotide elektrophoretisch der Größe nach aufgetrennt. Die vier unterschiedlichen Fluoreszenz-Farbstoffgruppen, die jeweils an das terminale Didesoxyribonukleotid eines bestimmten Oligonukleotids gekoppelt waren, wurden durch einen 40 mW Argon-Laser (540 nm, 570 nm, 595 nm und 625 nm) angeregt. Die dadurch hervorgerufenen Fluoreszenzsignale wurden durch ein Detektorsystem des DNA-Sequenzierers anhand ihrer unterschiedlichen Emissionswellenlängen identifiziert und quantifiziert.

Die Auftragung der Proben auf Sequenziergele und die automatische Sequenzierung und Auswertung wurde von Herrn A. Nolte am Institut für Biochemie und Molekulare Zellbiologie der Universität Göttingen durchgeführt.

#### SYNTHESE DER MUTIERTEN REZEPTOR-cDNA

#### 3.11 Modifikationen der humanen EP4-Rezeptor-cDNA

#### 3.11.1 Verlängerung des translatierten Bereichs der hEP4-Rezeptor-cDNA um eine für das FLAG-Epitop codierende Sequenz

Zu Beginn dieser Arbeit gab es noch keinen Antikörper gegen den humanen EP4-Rezeptor, mit dem ein immunologischer Nachweis der exprimierten Rezeptorproteine möglich war. Die immunologische Detektion der in den HEK293-Zellen exprimierten rekombinanten Rezeptorproteine sollte daher über ein künstlich angefügtes Epitop für den käuflichen monoklonalen FLAG-M2-Antikörper erfolgen. Die Verlängerung der hEP4-Rezeptor-cDNA um die FLAG-Epitop codierende Sequenz wurde, wie unter 3.1.4 beschrieben, durchgeführt. Die PCR-Reaktion wurde mit dem pcDNA/AMP-hEP4-Plasmid als Matrize und dem Hind FLAG EP4 f als Vorwärts- und dem EP4 Xba r als Rückwärts-Primer durchgeführt. Die PCR wurde unter den gleichen Bedingungen, wie unter 3.1.3 beschrieben, durchgeführt.

## 3.11.2 Sequenzgerichtete Mutagenese der FLAG-hEP4-Rezeptor-cDNA zum Einführen der *SnaB* I-Restriktions-Erkennungssequenz

Da die für die sequenzgerichtete Mutagenese verwendete Taq-Polymerase keine "proofreading"-Aktivität hat können unerwünschte Mutationen bei der Replikation eingeführt werden. Die Wahrscheinlichkeit, unerwünschte Mutationen einzufügen, steigt mit der Länge des zu amplifizierenden DNA-Fragments. Um mit einem möglichst kurzen cDNA-Fragment arbeiten zu können, wurde die *SnaB* I-Restriktions-Erkennungssequenz unmittelbar vor der für die C-terminale Domäne codierenden Sequenz eingefügt.

Zur Herstellung des 5'- und des 3'-cDNA-Fragmentes der modifizierten FLAG-hEP4-Rezeptor-cDNA wurden der pcDNA/AMP FLAG-hEP4 wt-Rezeptor als Matrize und folgende Primerkombinationen gewählt:

PCR	Primer	Matrizen cDNA	Mutation	Produkt
1	Hind FLAG EP4 f	pcDNA AMP	Einfügen der SnaB I-	5'-Fragment mit 3'
•	SnaBl EP4 r	FLAG-hEP4	Restriktionsschnittstelle	SnaB I-Sequenz
2	SnaBl EP4 f	pcDNA AMP	Einfügen der SnaB I-	3'-Fragment mit 5'
	EP4 Xba r	FLAG-hEP4	Restriktionsschnittstelle	SnaB I-Sequenz
n	Hind FLAG EP4 f	5'-Fragment aus 1		komplette FLAG-
3	EP4 Xba r	3'-Fragment aus 2		hEP4-cDNA

Tab. 2: Durchführung der sequenzgerichteten Mutagenese zum Einfügen der SnaB I-Schnittstelle in die FLAG-hEP4-R-cDNA

Alle anderen Komponenten der PCR-Ansätze waren mit denen unter 3.1.3 beschriebenen identisch. Das 5'- und das 3'-Fragment sowie die komplette modifizierte FLAG-hEP4-R-cDNA wurden mit dem unter 3.1.3 beschriebenen PCR-Programm durchgeführt. Die durch die PCR 1 und PCR 2 erhaltenen Produkte wurden über Agarose-Gele aufgetrennt (siehe 3.2), gereinigt (siehe 3.3) und in die PCR 3 eingesetzt. Das PCR-Produkt wurde ebenfalls über ein Agarose-Gel aufgetrennt und daraus isoliert. Die komplette mutierte FLAG-hEP4-R-cDNA wurde mit *Hind* III ind *Xba* I in Puffer B geschnitten (siehe 3.4.2) und in den mit den gleichen Enzymen geschnittenen pcDNA3-Vektor kloniert (siehe 3.4.3). Mit dem Ligationsprodukt wurden *E. coli* XL1 (blue) Zellen transformiert (siehe 3.6), die Plasmid-DNA aus einer Übernachtkultur isoliert (siehe 3.7) und die Klonierung durch Restriktionsenzymspaltung (siehe 3.9) und Sequenzierung überprüft (siehe 3.10).

#### 3.12 Einfügen der Mutationen zur Substitution der Serine und Threonine in der für die C-terminalen Domäne codierenden 3'-Sequenz der FLAG-hEP4 wt-R-cDNA

Zum Austausch einzelner Basen in der für die C-terminale Domäne codierenden Sequenz wurden sequenzgerichtete Mutagenesen durchgeführt, in denen jedoch keine komplementären Primer verwendet wurden. In den verschiedenen PCR-Reaktionen wurde mit Primern gearbeitet, die sowohl die zu mutierenden Basen als auch Restriktions-Erkennungssequenzen enthielten, über die das synthetisierte, gereinigte und mit den jeweiligen Enzymen geschnittene PCR-Produkt in die jeweilige Ausgangs-cDNA kloniert werden konnte. Als Ausgangs-Matrize diente das pcDNA3 FLAG-hEP4 wt-Rezeptor-Plasmid. Für die Synthese der mutierten, für die C-terminale Domäne codierenden Sequenzen konnte der pcDNA3-Vektor nicht verwendet werden, da die für die Klonierung benötigen Restriktionsschnittstellen mehrmals in diesem Vektor lokalisiert waren. Daher wurde der pBluescript-Vektor gewählt, da er die nötigen Restriktionsschnittstellen nach der Klonierung des für die C-terminale Domäne codierenden DNA-Fragmentes nur noch einmal enthielt.

# 3.12.1 Amplifizierung des 5' um die *Kpn* I-Restriktions-Erkennungssequenz verlängerten 3'-cDNA-Fragments der FLAG-hEP4-Rezeptor-cDNA und Einfügen der ST335-338A-Mutationen

Da der pBluescript über keine *SnaB* I-Schnittstelle verfügte, wurde die die multiple Klonierungsstelle des pBluescript flankierende *Kpn* I-Schnittstelle, wie unter 3.1.4 beschrieben, 5' an das für die C-terminale Domäne codierende 3'-Fragment des FLAG-hEP4 wt-Rezeptors angefügt, was die Klonierung des Fragments in diesen Vektor erlaubte. Zusätzlich wurde in dieser PCR-Reaktion die Substitution von T335 und S338 durchgeführt. Für die PCR-Reaktion wurde der pcDNA3/FLAG-hEP4 wt-Rezeptor als Matrize und der SM 1f als Vorwärts- und der EP4 Xba r als Rückwärts-Primer eingesetzt. Alle anderen Komponenten des PCR-Ansatzes entsprachen den unter 3.1.3 beschriebenen. Das Produkt wurde mit dem unter 3.1.3 beschriebenen PCR-Programm amplifiziert. Das Produkt wurden zur Analyse und Reinigung in einem 2% (w/v) Agarose-Gel aufgetrennt und mit *Kpn* I und *Xba* I in Puffer MULTI CORE<sup>TM</sup> geschnitten (siehe 3.4.2), anschließend in den mit den gleichen Enzymen geschnittenen pBluescript-Vektor kloniert (siehe 3.4) und *E. coli* XL1 (blue) Zellen transformiert (siehe 3.6.2). Die aus einer Übernachtkultur isolierte (siehe 3.7) und charakterisierte (siehe 3.9 und 3.10) Plasmid-DNA wurde als pBluescript hEP4 CT ST335-338A bezeichnet.

## 3.12.2 Synthese der C-terminalen Sequenz der FLAG-hEP4-R-cDNA mit der Substitution aller Serine und Threonine

Für die Synthese der für die C-teminalen Domäne codierenden Sequenz der FLAG-hEP4-RcDNA, in der alle Serine und Threonine substitutiert waren, wurden mehrere aufeinanderfolgende PCR-Reaktionen durchgeführt. Dazu wurde das durch PCR amplifizierte cDNA-Fragment mit den jeweiligen, flankierenden Restriktionsenzymen verdaut und in das Plasmid kloniert, das als Matrizen-cDNA für die Amplifizierung dieses Fragmentes diente. Das erhaltene Klonierungsprodukt wurde für die weitere Synthese verwendet, die nach dem gleichen Prinzip erfolgte. Als Ausgangsplasmid diente der pBluescript hEP4 CT ST335-338A. Alle PCR-Reaktionen wurden mit denen unter 3.1.3 beschriebenen Komponenten und Bedingungen durchgeführt. Die amplifizierten Produkte wurden zur Analyse und Reinigung in einem 2% (w/v) Agarose-Gel aufgetrennt (siehe 3.2). Die einzelnen PCR-Reaktionen sowie die dazu verwendeten Primer, Matrizen-cDNAs und die eingefügten Mutationen sind in Tabelle 3 dargestellt.

Tab. 3: PCR-Reaktionen zur Synthese der für die C-terminale Domäne codierenden Sequenz der FLAG-hEP4-R-cDNA mit der Substitution aller Serine und Threonine. Dargestellt sind die synthetisierten Ziel-cDNA-Fragmente mit den zum Einfügen der Mutationen verwendeten Primer, sowie die verwendeten Matrizen-cDNAs, die neu eingefügten Mutationen und die Größe der amplifizierten Produkte.

Ziel-cDNA Fragment	Primer	Matrizen-cDNA	Mutation	Errechnete Produktgröße
hEP4 CT ST335-338A ST369-382A	SM 1f SM 3r	pBs EP4 ST335-338A	ST369-382A	177 bp
5'-Fragment ST428-443A	Hind FLAG EP4 f SM 6r	pcDNA AMP FLAG- hEP4	ST428-443A	1372 bp
3'-Fragment ST428-443A	SM 6f EP4 Xba r	pcDNA AMP FLAG- hEP4	ST428-443A	207 bp
FLAG-hEP4 ST428-443A	Hind FLAG EP4 f EP4 Xba r	5'-Fragment ST428- 443A 3'-Fragment ST428- 443A	ST428-443A	1519 bp

hEP4 CT ST 354-369; 400-405A	SM 2f SM 5r	pBluescript hEP4 CT ST335-338; 369-382A	ST354-366A ST400-405A	182 bp
hEP4 CT ST389-394; 428-460A	SM 4f SM 7r	pBluescript hEP4 CT ST335-338; 369-382; 428-443A	ST389-392A ST448-460A	245 bp
hEP4 CT ST448-484A	SM 7f SM 8r	pBluescript hEP4 CT ST335-338; 369-382; 428-443A	ST448-484A	139 bp
hEP4 CT ST389-394; 428-484A	SM 4f SM 8r	hEP4 CT ST389-394; 428-460A hEP4 CT ST448-484A	ST389-394 428-484A	337 bp
hEP4 CT ST389-484A	SM 4f SM 8r	pBluescript hEP4 CT ST335-382; 400-484A	ST389-392A	337 bp

Tab. 4: Restriktionsansätze zur Generierung der verschiedenen hEP4 CT-cDNA-<br/>Fragmente. 5' und 3' geben die Enzyme an, mit denen das Fragment geschnitten wurde.<br/>5' = Schnittstelle 5' des cDNA-Fragmentes 3' = Schnittstelle 3' des cDNA-Fragmentes.

	PCR-Fragment	5'	3'	Puffer
1	hEP4 CT ST335-338A	Kpn I	Xba I	MULTI CORE <sup>™</sup>
2	hEP4 CT ST335-338; 369-382A	Kpn I	Sma I	MULTI CORE <sup>™</sup>
3	hEP4 CT ST428-443A	Sty I	Xba I	D
4	hEP4 CT ST354-369; 400-405A	Dra II	Sty I	F
5	hEP4 CT ST389-394; 428-484A	Sma I	Xba I	MULTI CORE <sup>™</sup>
6	hEP4 CT ST389-484A	Sma I	Xba I	MULTI CORE <sup>™</sup>
	cDNA-Fragment			
7	hEP4 CT	Dra II	Sma I	J
8	hEP4 CT ST335-382A	Kpn I	Sma I	J

**Tab. 5: Restriktionsansätze zur Generierung der verschiedenen pBluescript hEP4 CT Vektor-Fragmente.** 5' und 3' geben die Enzyme an, mit denen das Fragment geschnitten wurde. 5' = Schnittstelle 5' des cDNA-Fragmentes 3' = Schnittstelle 3' des cDNA-Fragmentes.

	cDNA-Fragment tragende pBluescript-	5'	3'	Puffer
	Vektoren	-	-	
1	pBluescript	Kpn I	Xba I	MULTI CORE <sup>™</sup>
2	pBluescript hEP4 CT ST335-338A	Kpn I	Sma I	MULTI CORE <sup>™</sup>
3	pBluescript hEP4 CT ST335-338; 369-382A	Sty I	Xba I	D
4	pBluescript hEP4 CT ST335-338; 369-382; 428-443A	Dra II	Sty I	F
5	pBluescript hEP4 CT ST335-382; 400-443A	Sma I	Xba I	MULTI CORE <sup>™</sup>
6	pBluescript hEP4 CT ST335-394; 428-484A	Sma I	Xba I	MULTI CORE <sup>™</sup>
7	pBluescript hEP4 CT	SnaB I	Sty I	В
8	pBluescript hEP4 CT ST335-484A	SnaB I	Sty I	В
9	pBluescript hEP4 CT	Dra II	Sma I	J
10	pBluescript hEP4 CT ST335-484A	Kpn I	Sma I	J

#### 3.12.3 Klonierung der gereinigten Fragmente in pBluescript

Die durch PCR synthetisierten cDNA-Fragmente sowie die verwendeten Matrizen-Vektoren (Tab. 3) wurden mit den in Tabelle 4 und Tabelle 5 angegebenen Restriktionsenzymen geschnitten (siehe 3.4.2).

Die Restriktionsansätze wurden, wie unter 3.2 beschrieben, elektrophoretisch getrennt und die entsprechenden Fragmente aus den Agarose-Gelen isoliert (siehe 3.3). Anschließend wurden die DNA-Konzentration photometrisch quantifiziert (siehe 3.2.3) und die entsprechenden Mengen in eine Ligation (siehe 3.4.3) eingesetzt (Tab. 6).
**Tab. 6: Ligationsansätze zur Synthese der verschiedenen C-terminalen cDNA-Fragmente.** Gezeigt sind die jeweiligen cDNA-Fragmente und die mit den gleichen Enzymen geschnittenen pBluescript-Vektoren (eckige Klammer), sowie das daraus resultierende Ligationsprodukt.

	cDNA-Fragment	Vektor	Produkt
1	hEP4 CT ST335-338A [ <i>Kpn</i> I; <i>Xba</i> I]	pBluescript [ <i>Kpn</i> I; <i>Xba</i> I]	pBluescript hEP4 CT ST335- 338A
2	hEP4 CT ST335-338; 369-382A [ <i>Kpn</i> I; <i>Sma</i> I]	pBluescript hEP4 CT ST335- 338A [ <i>Kpn</i> I; <i>Sma</i> I]	pBluescript hEP4 CT ST335- 338; 369-382A
3	hEP4 CT ST428-443A	pBluescript hEP4 CT ST335-	pBluescript hEP4 CT ST335-
	[ <i>Sty</i> I; <i>Xba</i> I]	338; 369-382A [ <i>Sty</i> I; <i>Xba</i> I]	338; 369-382; 428-443A
4	hEP4 CT ST354-369; 400-405A [ <i>Dra</i> II; <i>Sty</i> I]	pBluescript hEP4 CT ST335- 338; 369-382; 428-443A [ <i>Dra</i> II; <i>Sty</i> I]	pBluescript hEP4 CT ST335- 382; 400-443A
5	hEP4 CT ST389-394; 428-484A [ <i>Sma</i> I; <i>Xba</i> I]	pBluescript hEP4 CT ST335- 382; 400-443A [ <i>Sma</i> I; <i>Xba</i> I]	pBluescript hEP4 CT ST335- 382; 400-484A
6	hEP4 CT ST389-484A	pBluescript hEP4 CT ST335-	pBluescript hEP4 CT ST335-
	[ <i>Sma</i> I; <i>Xba</i> I]	394; 428-484A [ <i>Sma</i> I; <i>Xba</i> I]	484A
7	hEP4 CT ST335-484A	pBluescript hEP4 CT	pBluescript hEP4 CT ST335-
	[ <i>SnaB</i> I; <i>Sty</i> I]	[ <i>SnaB</i> I; <i>Sty</i> I]	405A
8	hEP4 CT ST335-484A	pBluescript hEP4 CT	pBluescript hEP4 CT ST428-
	[ <i>Sty</i> I; <i>Xba</i> I]	[ <i>Sty</i> I; <i>Xba</i> I]	484A
9	hEP4 CT	pBluescript hEP4 ST335-354;	pBluescript hEP4 CT ST335-
	[ <i>Dra</i> II; <i>Sma</i> I]	389-484A [ <i>Dra</i> II, <i>Sma</i> I]	354; 389-484A
10	hEP4 CT ST335-382A	pBluescript hEP4 CT	pBluescript hEP4 CT ST335-
	[ <i>Kpn</i> I; <i>Sma</i> I]	[ <i>Kpn</i> I, <i>Sma</i> I]	382A

Mit den Ligationsprodukten wurden *E. coli* XL1 (blue) Zellen transformiert (siehe 3.6), die Plasmid-DNA aus Übernachtkulturen isoliert (siehe 3.7) und die Klonierung durch Restriktionsenzymspaltung mit *SnaB* I und *Xba* I in Puffer B überprüft (siehe 3.9).

# 3.13 Klonierung der gesamten FLAG-hEP4 wt-Rezeptor-cDNA sowie der mutierten Rezeptor-cDNAs in den pcDNA3-Vektor

#### 3.13.1 Puffer und Enzyme

Enzyme: Hind III, SnaB I und Xba I sowie Puffer B (siehe 2.9.1)

#### 3.13.2 Vorbereitung der cDNA-Fragmente und Ligation

Da der pcDNA3-Vektor über eine SnaB I-Restriktionsschnittstelle verfügte und das Restriktionsenzym SnaB I Fragmente mit nicht überlappenden Enden generiert, wären nach Spaltung des pcDNA3 FLAG-hEP4 wt-R drei Fragmente entstanden von denen eines 5' und 3' nicht überlappende Enden gehabt hätte. Da die Orientierung dieses Fragmentes während der Klonierung nicht bestimmt werden konnte, wurde die FLAG-hEP4 wt-R-cDNA zuerst aus dem pcDNA3-Vektor über Hind III und Xba I herausgeschnitten und anschließend mit SnaB I gespalten. Dadurch entstanden Fragmente mit verschiedenen flankierenden Schnittstellen am 5' und am 3' Ende, durch die die richtige Orientierung in der Ligation gewährleistet wurde. Dazu wurden je 3 µg der verschiedenen pBluescript-Konstrukte (siehe Tab. 6) mit den Restriktionsenzymen SnaB I und Xba I und 2 µg der zuvor aus pcDNA3 FLAG-hEP4 wt-R Plasmid-DNA über Hind III und Xba I isolierten FLAG-hEP4 wt-R-cDNA mit SnaB I geschnitten (siehe 3.4.2), in Agarose-Gelen aufgetrennt (siehe 3.2) und die mutierten 3'hEP4 CT- und das 5'-FLAG-hEP4 wt-R-Fragmente daraus isoliert (siehe 3.3). In einer anschließenden 3'-Fragment-Ligation wurde das 5'-Fragment (Hind III, SnaB I) und die aus pBluescript herausgeschnittenen 3'-Fragmente (SnaB I, Xba I) der FLAG-hEP4-R-cDNAs in den zuvor mit Hind III und Xba I linearisierten pcDNA3-Vektor (Hind III, Xba I), ligiert (siehe 3.4.3), E coli XL1 (blue)-Zellen transformiert (siehe 3.6) und die Plasmid-DNA aus einer Übernachtkultur isoliert (siehe 3.7). Die Ligation wurde durch Restriktionsenzymspaltung (siehe 3.9) und Sequenzierung (siehe 3.10) überprüft. Aus den positiv getesteten Klonen wurden erneut Übernachtkulturen angesetzt und anschließend die Plasmid-DNA im Maxi-Maßstab isoliert (siehe 3.8).

# ZELLBIOLOGISCHE UND BIOCHEMISCHE METHODE

# 3.14 Eukaryote Expression der gentechnisch modifizierten Rezeptorproteine in HEK293-Zellen

Soweit nicht anders angegeben, wurden alle Puffer und Lösungen mit entmineralisiertem H<sub>2</sub>O angesetzt, sterilfiltriert und bei 4°C gelagert.

## 3.14.1 Puffer und Lösungen

<u>10 x PBS-Stammlösung</u>		5000 ml
NaCl	1370 mM	400,31 g
KCI	27 mM	10,07 g
KH₂PO₄	15 mM	10,27 g
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	80 mM	56,78 g
		pH 7,3
Die Lösung wurde autoklaviert und	bei Raumtemperatur gel	agert.
DMEM-Medium		5000 ml
DMEM-Trockenpulver		66,8 g
NaHCO <sub>3</sub>	44 mM	18,5 g
Die Lösung wurde mit HCI auf pH 7	,25 eingestellt, sterilfiltrie	ert und bei 4°C gelagert.
DMEM-komplett		500 ml
DMEM		445 ml
FCS	10% (v/v)	50 ml
Penicillin/Streptomycin-Lösung	1% (v/v)	5 ml
Das Medium wurde bei 4°C gelager	t.	
<u>10 x Trypsin-EDTA-Stammlösung</u>		100 ml
Trypsin	0,5% (w/v)	500 mg
EDTA	5,4 mM	158 mg
NaCl	145 mM	850 mg
Die Lösung wurde sterilfiltriert und b	bei -20°C gelagert.	
Trypsin-Lösung		
Trypsin-EDTA-Lösung	1 x	1 ml 10 x Stlsg/10 ml PBS
Die Lösung wurde steril angesetzt u	und bei -20°C gelagert.	

2,5 M CaCl <sub>2</sub> -Lösung	100 ml
CaCl <sub>2</sub> x 2 H <sub>2</sub> O	36,75g
H <sub>2</sub> O	ad 100 ml
Die Lösung wurde sterilfiltriert und in Aliquots von 10 ml bei -20°C gelagert.	

<u>2 x BBS-Lösung</u>		100 ml
BES	50 mM	1,07 g
NaCl	280 mM	1,64 g
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> x 2 H <sub>2</sub> O	1,5 mM	0,026 g

Die Lösung wurde auf pH 6,96 eingestellt, sterilfiltriert und bei -20°C gelagert.

1000 x 25-Hydroxycholesterol-Lösung		10 ml
25-Hydroxycholesterol	0,25% (w/v)	25 mg
Ethanol		ad 10 ml
Die Lösung wurde sterilfiltriert und bei -20°C gelagert.		

## 3.14.2 Kultivierung von HEK293-Zellen

HEK293-Zellen wurden in DMEM-komplett bei 5% CO<sub>2</sub> und 37°C bis zur Konfluenz auf 75 cm<sup>2</sup>-Flaschen kultiviert. 24 h vor der Transfektion wurden sie neu ausplattiert. Hierzu wurde das Medium entfernt und die Zellen einmal mit 10 ml PBS gewaschen. Danach wurden 1,5 ml Trypsin-Lösung/75 cm<sup>2</sup>-Flasche zugegeben und die Zellen im Brutschrank bei 37°C 5 min inkubiert. Nach der Inkubation wurden die Zellen durch leichtes Klopfen von der Kulturflasche abgelöst und das Trypsin mit 10 ml DMEM-komplett inaktiviert. Die Suspension wurde in ein 15 ml-Polypropylenröhrchen überführt, bei 1 000 rpm (140 x *g*) 5 min in der Hettich-Zentrifuge Universal16 zentrifugiert und der Überstand entfernt. Die Zellen wurden in DMEM-komplett resuspendiert und die Zellzahl mit Hilfe der Neubauer-Zählkammer bestimmt.

# 3.14.3 Transiente Transfektion von HEK293-Zellen nach der modifizierten Calcium-Phosphat-Methode

Die Transfektion der HEK293-Zellen mit der modifizierten Calcium-Phosphat-Methode wurde nach dem Protokoll von Chen und Okoyama (1987) mit Modifikationen durchgeführt.

HEK293-Zellen wurden auf 58 cm<sup>2</sup>-Platten mit einer Dichte von 4 x 10<sup>6</sup> Zellen ausplattiert und nach 24 h mit der modifizierten Calcium-Phosphat-Methode transfiziert. Hierzu wurden die Zellen einmal mit 10 ml DMEM ohne Zusätze gewaschen und anschließend mit 10 ml DMEM + 5% (v/v) Rinderserum + 0,1% (v/v) 1000 x 25-Hydroxycholesterol-Lösung versetzt, was die Zellen zur DNA-Aufnahme vorbereitete. 17  $\mu$ g zirkulärer Plasmid-DNA/58 cm<sup>2</sup>- Platten wurden mit Wasser auf 585 µl aufgefüllt und mit 65 µl 2,5 M CaCl<sub>2</sub>-Lösung und 650 µl 2 x BBS-Lösung versetzt. In der anschließenden Inkubationszeit von 20 min bei Raumtemperatur bildeten sich Calcium-Phosphat-DNA-Präzipitate, was durch leichte Trübung der Lösung angezeigt wurde. Die Lösung wurde anschließend tropfenweise auf die Zellen gegeben und die Kulturschale danach noch einmal geschwenkt. Die Aufnahme der DNA-Präzipitate erfolgte während der Inkubation für 3 h bei 37°C und 3% CO<sub>2</sub>. Danach wurden die Zellen zum Entfernen der überschüssigen Präzipitate mit 10 ml DMEM ohne Zusätze gewaschen und wieder mit 15 ml DMEM-komplett zur Proteinexpression kultiviert.

#### 3.14.4 Selektion stabil transfizierter HEK293-Zellen

Stabil transfizierte Zellen haben die Plasmid-DNA dauerhaft in ihr Genom integriert und exprimieren das rekombinante Protein permanent.

HEK293-Zellen wurden auf 58 cm<sup>2</sup>-Platten mit einer Dichte von 4 x 10<sup>6</sup> Zellen ausplattiert und nach der modifizierten Calcium-Phosphat-Methode mit den verschiedenen RezeptorcDNAs transfiziert. 24 h nach der Transfektion wurde das Kulturmedium gegen ein Selektionsmedium ausgewechselt, welches zusätzlich 500 µg G-418/ml enthielt. Bei G-418 handelt es sich um ein dem Neomycin-verwandtes 2'-Desoxystreptamin-Antibiotikum, gegen das eukaryote Zellen empfindlich sind. Es kann durch Aminoglykosid-3'-Phospho-Transferase-Aktivitäten, welche von den Kanamycin- und Neomycinresistenzgenen codiert werden, inaktiviert werden. Das Neomycinresistenz-Gen war in dem Vektor pcDNA3 lokalisiert (Abb. 6) und sorgte bei stabiler Expression in den transfizierten HEK293-Zellen für eine Resistenz gegenüber G-418. Nach etwa sieben Tagen waren die nichttransfizierten Zellen abgestorben, während die resistenten Zellen zu Kolonien herangewachsen waren. Makroskopisch sichtbare Kolonien von mehr als 15 Zellen wurden mit einem sterilen Wattestäbchen vorsichtig abgenommen und in je eine Vertiefung einer 24-Well-Platte überführt. Der Zelltransfer wurde anschließend mikroskopisch überprüft. Wenn eine Vertiefung bis zur Konfluenz zugewachsen war, wurden die Zellen mit 100 µl Trypsin-Lösung abgelöst und auf zwei 8,7 cm<sup>2</sup>-Platten bis zur Konfluenz weiterkultiviert. Von jedem Klon wurde die Expressionseffizienz durch einen Bindungsassay mit [<sup>3</sup>H]-PGE<sub>2</sub> (siehe 3.18) mit den Zellen einer 8,7 cm<sup>2</sup>-Platte ermittelt. Diejenigen monoklonalen Zellinien, die im Bindungsassay eine vergleichbare Oberflächenbindung aufwiesen, wurden ausgewählt, und in größerem Maßstab kultiviert, alle anderen positiven Klone wurden in flüssigem Stickstoff gelagert. Die Zellinien werden im folgenden nach den in ihnen stabil exprimierten Rezeptoren benannt.

#### 3.14.5 Kryolagerung der stabilen Zellklone in flüssigem Stickstoff

Da es durch sehr häufiges Passagieren zu einer Reduktion der Rezeptorexpression kommen kann und durch mögliche Kontaminationen Zellklone verloren gehen können, wurden sehr frühe Passagen der stabil exprimierenden Zellen in flüssigem Stickstoff eingefroren.

Zur Lagerung der Zellen in flüssigem Stickstoff wurden zunächst 1 x 10<sup>6</sup> Zellen auf einer 25 cm<sup>2</sup>-Kulturflasche ausgesät und bis zur Konfluenz kultiviert. Anschließend wurden die Zellen, wie unter 3.14.2 beschrieben, von den Kulturflaschen gelöst, zentrifugiert und in 1,5 ml DMEM-komplett mit 10% (v/v) DMSO resuspendiert. DMSO verhindert beim Einfrieren der Zellen, daß die entstehenden Wasserkristalle die Zellmembranen permeabilisieren. Die konzentrierte Zellsuspension wurde in Kryoröhrchen überführt und im Kühlschrank für 15 min langsam abgekühlt. Danach wurden die Zellen in einem Styroporbehälter bei -70°C eingefroren und anschließend in flüssigen Stickstoff überführt, in dem die Zellen über mehrere Jahre gelagert werden können.

#### 3.15 Präparation von Gesamt-RNA aus stabil transfizierten HEK293-Zellen

#### 3.15.1 Puffer und Lösungen

Zur Isolierung der Gesamt-RNA aus stabil transfizierten HEK293-Zellen wurde das "SV Total RNA Isolation System" von Promega (Madison/ USA) benutzt.

<u>SV-RNA-Lysis-Buffer</u>	
Guanidin-Isothiocyanat	4 M
Tris/HCI (pH 7,5)	10 mM
β-Mercaptoethanol	0,97% (v/v)

Der Puffer war im "SV Total RNA Isolation System" enthalten und wurde nach Zugabe des  $\beta$ -Mercaptoethanols bei 4°C gelagert.

SV-DNase-Stop-Solution		
Guanidin-Isothiocyanat	2 M	
Tris/HCI (pH 7,5)	4 mM	
Ethanol (95%)	57% (v/v)	8 ml
Die Lösung war im "SV	Total RNA Isolation System	n" enthalten und wurde bei
Raumtemperatur gelagert.		

SV-RNA-Wash-Solution	
Kaliumacetat	60 mM
Tris/HCI (pH 7,5)	10 mM

Ethanol (95%)60% (v/v)100 mlDie Lösung war im "SV Total RNA Isolation System" enthalten und wurde bei<br/>Raumtemperatur gelagert.

Yellow-Core-Buffer

NaCl	1,125 M
Tris/HCI (pH 7,5)	22,5 mM
Yellow dye	0,0025% (w/v)

Die Lösung war im "SV Total RNA Isolation System" enthalten und wurde bei Raumtemperatur gelagert.

#### DNase I (lyophilisiert)

Die DNase I war im "SV Total RNA Isolation System" enthalten, wurde mit Nuklease-freiem Wasser in einer Konzentration von 14 000 U/ml gelöst und bei -20°C gelagert.

#### <u>MnCl</u><sub>2</sub> (0,09 M)

MnCl<sub>2</sub> war im "SV Total RNA Isolation System" enthalten und wurde bei Raumtemperatur gelagert.

#### SV-RNA-Dilution-Buffer

SV RNA Dilution Buffer war im "SV Total RNA Isolation System" enthalten und wurde bei Raumtemperatur gelagert. Der Hersteller machte keine Angaben zur Zusammensetzung dieses Puffers.

#### DEPC-H<sub>2</sub>O

DEPC

0,1% (v/v)

1 ml/l

Quarz-bidest  $H_2O$  wurde mit 0,1% (v/v) DEPC versetzt und für 12 h bei Raumtemperatur inkubiert, um evtl. vorhandene RNasen vollständig zu inaktivieren. Das verbliebene DEPC wurde durch Autoklavieren zersetzt.

## 3.15.2 Isolierung von Gesamt-RNA aus stabil transfizierten HEK293-Zellen

1 x  $10^6$  HEK293-Zellen wurden bei 1 000 rpm (140 x *g*) sedimentiert und das Medium entfernt. Die Zellen wurden in 175 µl SV-RNA-Lysis-Buffer aufgenommen und lysiert. Anschließend wurden 350 µl SV-RNA-Dilution-Buffer hinzugegeben, der Ansatz 3-4 mal durch Invertieren gemischt und im Wasserbad für 3 min bei 70°C inkubiert. Die Probe wurde bei 16 000 x *g* für 10 min zentrifugiert, der klare Überstand in ein neues Gefäß überführt, mit 200 µl 95% (v/v) Ethanol versetzt und gemischt.

Das Gemisch wurde auf eine Mikrosäule aufgetragen und bei 16 000 x g für 1 min zentrifugiert. Dabei banden die Nukleinsäuren an die Säulenmatrix. Nach dem Waschen der

Säule mit 600  $\mu$ I SV-RNA-Wash-Solution wurde diese mit einer Mischung aus 40  $\mu$ I Yellow-Core-Buffer, 5  $\mu$ I 0,09 M MnCl<sub>2</sub> und 5  $\mu$ I DNase I für 15 min bei Raumtemperatur inkubiert, um gebundene DNA zu entfernen. Danach wurden 200  $\mu$ I der SV-DNase-Stop-Solution auf die Säule pipettiert und bei 16 000 x *g* für 1 min zentrifugiert. Die Säule wurde zuerst mit 600  $\mu$ I und anschließend mit 250  $\mu$ I SV-RNA-Wash-Solution gewaschen. Danach wurde die RNA mit 100  $\mu$ I DEPC-H<sub>2</sub>O eluiert.

Die Konzentration bzw. Reinheit der RNA wurde durch die Messung der Extinktion bei 260 und 280 nm bestimmt. Dazu wurde eine 1:50 Verdünnung mit DEPC-H<sub>2</sub>O hergestellt und diese bei 260 nm und 280 nm gegen den Leerwert (nur DEPC-H<sub>2</sub>O) in einer Quarzglasküvette gemessen.

Die in der Lösung verbliebenen Proteine besitzen bei 280 nm ein Absorptionsmaximum, somit kann die Reinheit der RNA durch den Quotienten  $\Delta E_{260 nm}/\Delta E_{280 nm}$  charakterisiert werden. Es wurde nur RNA mit einem Quotienten > 1,7 verwendet und die Konzentration der RNA im Eluat nach folgender Formel berechnet:

RNA-Konzentration  $[ng/\mu I] = \Delta E_{260 \text{ nm}} x \text{ Verdünnung } x 40$ 

## 3.16 cDNA-Synthese durch reverse Transkription

Für die Synthese von cDNA wurde "Superscript<sup>TM</sup> II RT"-Reverse Transkriptase der Firma Invitrogen (Karlsruhe) verwendet, eine retrovirale Polymerase, die in Gegenwart eines DNA-Oligonukleotides (Oligo-dT<sub>12-18</sub>) als Startermolekül und mRNA als Matrize, cDNA synthetisiert. Der Oligo-dT<sub>12-18</sub>-Primer lagert sich an den poly-A-Schwanz der mRNA und macht so die cDNA-Synthese möglich.

#### 3.16.1 Puffer und Lösungen

5 x Reaktionspuffer ("First	<u>Strand"-Puffer)</u>	
Tris/HCI	250 mM	30,275 g/l
MgCl <sub>2</sub>	15 mM	3,050 g/l
KCI	375 mM	27,960 g/l
		pH 8,3
Die Lösung war der Revers	en Transkriptase beigefügt.	
Dithiothreitol (DTT)		
DTT	0,1 M	0,157 g/l
Die Lösung war der Revers	en Transkriptase beigefügt.	

## 3.16.2 cDNA-Synthese

In einem sterilen Eppendorfgefäß wurden 5 µg Gesamt-RNA mit 1 µl Oligo-dT<sub>12-18</sub> (0,5 µg/µl) gemischt und mit DEPC-H<sub>2</sub>O auf 12 µl aufgefüllt. Zur Denaturierung von Sekundärstrukturen innerhalb der RNA wurde der Ansatz für 10 min auf 70°C erhitzt und danach sofort auf Eis schockgekühlt. Anschließend wurde der Ansatz mit je 4 µl Reaktionspuffer, 2 µl DTT und 1 µl 10 mM dATP, dCTP, dGTP, dTTP versetzt und bei 42°C für 2 min vorinkubiert. Die cDNA-Synthese wurde durch Zugabe von 1 µl (200 U) "Superscript<sup>™</sup> II RT"-Reverse Transkriptase gestartet und für 50 min bei 42°C fortgeführt. Die Reaktion wurde durch Erhitzen des Ansatzes auf 70°C für 15 min gestoppt und der Ansatz bis zur weiteren Verwendung bei -20°C gelagert.

## 3.17 PCR-gestützt Analyse zur Identifikation der stabil transfizierten HEK293-Zellen

## 3.17.1 Puffer und Lösungen

<u>10 x Taq DNA-Polymerase-Puffer</u>		
Tris/HCI	100 mM	pH 9,0
MgCl <sub>2</sub>	15 mM	
KCI	500 mM	
Der Puffer wurde von der Firma mitgelief	ert und bei -20°C gela	igert.
<u>MgCl<sub>2</sub> Stammlösung</u>		

MgCl<sub>2</sub> 25 mM Die MgCl<sub>2</sub>-Stammlösung wurde von der Firma mitgeliefert und bei -20°C gelagert.

# 3.17.2 Amplifizierung spezifischer cDNA-Fragmente

Die aus HEK293-Zellen synthetisierte cDNA wurde in einer Verdünnung von 1:10 bis 1:100 in eine PCR-Reaktion (siehe 3.1.2) mit spezifischen Primern eingesetzt. Die PCR-Ansätze enthielten folgende Komponenten:

Matrize:	cDNA-Verdünnung	1:10 bis 1:100
Vorwärts-Primer:	EP4-SnaB I f bzw. SM 1f*	15 pmol
Rückwärts-Primer:	EP4 Xba r bzw. EP4 Xba r mut **	15 pmol
Desoxyribonukleosidtriphosphate:	dATP, dCTP, dGTP, dTTP	1 mM
DMSO:	3% (v/v)	1,5 µl
Taq DNA-Polymerase:	2 U	0,5 µl
10 x Taq DNA-Polymerase-Puffer:	1 x	5 µl
MgCl <sub>2</sub> :	1,5 mM	3 µl
Wasser:		ad 50 µl

\* In PCR-Reaktionen, in denen mit cDNA von Zellen gearbeitet wurde, die den FLAG-hEP4 ST335-484A-, den FLAG-hEP4 ST335-405A-, den FLAG-hEP4 ST335-354; 389-484A-, den FLAG-hEP4 ST335-382A- oder den FLAG-hEP4 ST335-377; 379-484A-Rezeptor exprimierten, wurde der SM 1f als Vorwärts-Primer eingesetzt.

\*\* In PCR-Reaktionen, in denen mit cDNA von Zellen gearbeitet wurde, die den FLAG-hEP4 ST335-484A-, den FLAG-hEP4 ST428-484A-, den FLAG-hEP4 ST335-354; 389-484A- oder den FLAG-hEP4 ST335-377; 382-484A-Rezeptor exprimierten, wurde der EP4 Xba r mut als Rückwärts-Primer eingesetzt.

Die PCR-Reaktionen wurden mit folgendem PCR-Programm durchgeführt: 3 min 95°C, 35 x (1 min 95°C, 1 min 55°C, 2 min 72°C), 10 min 72°C. Die Amplifizierung der Produkte wurde in der Gelelektrophorese überprüft (siehe 3.2) und das erhaltene Produkt sequenziert (siehe 3.10).

## 3.18 Nachweis der Rezeptorproteine durch [<sup>3</sup>H]-PGE<sub>2</sub>-Bindung

#### 3.18.1 Puffer und Lösungen

#### Pefabloc-Stammlösung

Pefabloc200 mM2,3 g/50mlPefabloc wurde in Wasser gelöst und in Aliquots bei -20°C gelagert.

#### Leupeptin-Stammlösung

Leupeptin wurde in einer Konzentration von 10 mg/ml gelöst und in Aliquots bei -20°C gelagert.

#### Trypsin-Inhibitor-Stammlösung

Trypsin-Inhibitor wurde in einer Konzentration von 10 mg/ml gelöst und in Aliquots bei -20°C gelagert.

<u>Homogenisierungspuffer</u>		1000 ml
Saccharose	250 mM	85,58 g
Tris/HCI	10 mM	10 ml 1M Stlsg, pH 7,5
EDTA	1 mM	2 ml 0,5 M Stlsg
MgCl <sub>2</sub>	10 mM	5 ml 1 M Stlsg
Der Puffer wurde auf pH 7,5 eingestellt b	ei 4°C gelagert.	
Pro 100 ml wurden als Protease-Inhibitor	en frisch hinzugefügt:	
Pefabloc	0,2 mM	100 µl 200 mM Stlsg
Leupeptin	10 µg/ml	100 µl 10 mg/ml Stlsg
Trypsin-Inhibitor	10 µg/ml	100 µl 10 mg/ml Stlsg

Bindungspuffer		2000ml
MES	10mM	3,9 g
MgCl <sub>2</sub>	10 mM	10ml 2 M Stlsg
EDTA	1mM	4ml 0,5 MStlsg
Der Puffer wurde mit NaOH auf pH 6,2	eingestellt und bei 4°C gela	gert.
Für die Membranpräparation wurden pr	o ml als Protease-Inhibitore	n frisch hinzugefügt:

Pefabloc	0,2 mM	1 µl 200 mM Stlsg
Leupeptin	10 µg/ml	1 µl 10 mg/ml Stlsg
Trypsin-Inhibitor	10 µg/ml	1 µl 10 mg/ml Stlsg
Bradford-Reagenz		1000 ml
Serva Blue (Nr. 35050)	0,01% (w/v)	100 mg 1 M Stlsg
Phosphorsäure (85%)	8,5% (w/v)	100 ml 85% (v/v) Stlsg
Ethanol (95%)	4,75% (v/v)	50 ml 95% (v/v) Stlsg
BSA-Standard		10 ml
BSA	1 mg/ml	10 mg
Der BSA-Standard wurde in Aliquots	bei -20°C gelagert.	

# PGE<sub>2</sub>-Stammlösung

PGE<sub>2</sub> wurde in einer Konzentration von 10 mM in 70% (v/v) Ethanol gelöst und in Aliquots bei -20°C gelagert.

## [<sup>3</sup>H]-PGE<sub>2</sub> Stammlösung

 $[^{3}H]$ -PGE<sub>2</sub> wurde in einer Konzentration von 621 nM in 70% (v/v) Ethanol vom Hersteller geliefert und bei -20°C gelagert.

## 3.18.2 Membranpräparation

Es wurden  $3 \times 10^{6}$  Zellen auf  $58 \text{ cm}^{2}$ -Platten bis zur Konfluenz kultiviert. Anschließend wurde das Medium abgesaugt, die Zellen einmal mit 10 ml PBS gewaschen und die Zellkulturplatte 1 min auf Eis mit 1 ml Homogenisierungspuffer inkubiert. Danach wurden die Zellen abgeschabt und in ein Schraubdeckelgefäß überführt, für weitere 20 min auf Eis inkubiert und durch mehrmaliges Aufziehen durch eine 0,4 mm-Kanüle aufgeschlossen und homogenisiert. Die Membransuspension wurde 30 min bei 4°C und 20 000 rpm (36 700 x *g*, SIGMA 3K30-Zentrifuge) zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Sediment in 800 µl Bindungspuffer mit Protease-Inhibitoren mit Hilfe einer Pipette und anschließend erneut durch mehrmaliges Aufziehen durch eine 0,4 mm-Kanüle resuspendiert. Der

Proteingehalt der Membransuspension wurde nach Bradford (siehe 3.18.3) bestimmt und die Suspension anschließend bei -70°C gelagert.

## 3.18.3 Proteinbestimmung nach Bradford (1976)

Mit der Proteinbestimmung nach Bradford (1976) können Proteinkonzentrationen zwischen 1 und 10  $\mu$ g photometrisch bestimmt werden. Um im idealen Meßbereich messen zu können, wurden die Proben zwischen 1:2,5 und 1:5 verdünnt. 10  $\mu$ l der Verdünnung wurden mit H<sub>2</sub>O auf 100  $\mu$ l aufgefüllt und mit 1 ml Bradford-Reagenz versetzt. Für den Leerwert wurden 100  $\mu$ l H<sub>2</sub>O mit 1 ml Bradford-Reagenz versetzt. Als Eichreihe dienten 1  $\mu$ g, 2  $\mu$ g, 4  $\mu$ g, 6  $\mu$ g, 8  $\mu$ g und 10  $\mu$ g BSA. Es entwickelte sich innerhalb von 10 min eine Blau-Färbung, die mindestens 1 h stabil war und bei 578 nm photometrisch quantifiziert werden konnte.

## 3.18.4 Nachweis der [<sup>3</sup>H]-PGE<sub>2</sub>-Bindung in Membranen

Die Bindungsreaktion wurde in Polypropylenröhrchen durchgeführt. Um die spezifische Bindung für einen Meßpunkt zu erhalten, wurde die Differenz zwischen unspezifischer und gesamter Bindung ermittelt. Für einen Meßpunkt wurden 25  $\mu$ l 20 nM [<sup>3</sup>H]-PGE<sub>2</sub> in Bindungspuffer für die gesamte Bindung und parallel der gleiche Ansatz mit zusätzlich 25  $\mu$ l 40  $\mu$ M nicht-[<sup>3</sup>H]-markiertem PGE<sub>2</sub> zur Bestimmung der unspezifischen Bindung vorgelegt und mit Bindungspuffer auf 50  $\mu$ l aufgefüllt. Die Bindungsreaktion wurde bei Raumtemperatur durch Zugabe von 50  $\mu$ l Membransuspension der stabil transfizierten Zellen mit einem Proteingehalt von ca. 0,5  $\mu$ g Protein/ $\mu$ l in Bindungspuffer angefeuchtete GF 52-Filter in einer Absaugvorrichtung vom Inkubationsansatz getrennt und dreimal mit 4 ml kaltem Bindungspuffer gewaschen. Die Filter wurden abgenommen, in Scintillationsgefäße überführt und mit 5 ml Hydroluma-Scintillator versetzt. Nach ca. 2 h, in denen die Chemilumineszenz abgeklungen war, wurde die Aktivität von gebundenem [<sup>3</sup>H]-PGE<sub>2</sub> im Flüssigkeitsscintillationszähler gemessen.

## 3.19 Immunologischer Nachweis der Rezeptorproteine durch Westernblot-Analyse

## 3.19.1 Puffer und Lösungen

Pefabloc-Stammlösung siehe 3.18.1

Leupeptin-Stammlösung siehe 3.18.1

<u>Trypsin-Inhibitor-Stammlösung</u> siehe 3.18.1

FLAG-Solubilisierungspuffer		1000 ml
HEPES	50 mM	11,9 g
EDTA	5 mM	1,5 g
NaCl	150 mM	8,8 g
Triton X-100	15% (v/v)	10 ml
SDS	0,05% (v/v)	0,5 g

Der Puffer wurde auf pH 7,5 eingestellt und danach wurden 0,42 g Natriumfluorid (10 mM) und 4,5 g Natriumpyrophosphat (10 mM) zugegeben. Der Puffer wurde bei 4°C gelagert. Pro ml wurden als Protease-Inhibitoren frisch hinzugefügt:

Pefabloc		0,2 mM	1 µl 200 mM Stlsg
Leupeptin		10 µg/ml	1 µl 10 mg/ml Stlsg
Trypsin-Inhibitor		10 µg/ml	1 µl 10 mg/ml Stlsg
5 x SDS-Probenpuffer			50ml
Tris	400 mM		1,25 ml 1 M Stlsg pH 6
SDS	10% (w/v)		25 ml 20% (w/v) Stlsg
Glycerol	25% (w/v)		14,35 ml 87% (w/v) Stlsg
Bromphenolblau	0,01% (w/v)		52 mg
4 x SDS-Probenpuffer			1 ml
5 x SDS-Probenpuffer			800 µl
$\beta$ -Mercaptoethanol	20% (v/v)		200 µl
Sammelgelpuffer			100 ml
Tris	0,5 M		50 ml 1 M Stlsg
SDS	0,4% (w/v)		4 ml 10% (w/v) Stlsg
Der Puffer wurde mit HCI auf	pH 6,8 eingestellt und	bei 4°C gela	igert.
Trenngelpuffer			100 ml
Tris	1,5 M		18,17 g
SDS	0,4% (w/v)		4 ml 10% Stlsg

Der Puffer wurde mit 12 N HCl auf pH 8,8 eingestellt und bei 4°C gelagert.

## Acrylamid-Lösung

Bei der Acrylamid-Lösung handelt es sich um eine gebrauchsfertige, gasstabilisierte wäßrige 30% (v/v) Acrylamidstammlösung mit 0,8% (w/v) Bisacrylamid im Verhältnis 37,5:1 (rotiphorese Gel 30 der Firma Roth).

Ammoniumpersulfat-Lösung		100 ml
Ammoniumpersulfat	10% (w/v)	10 g
Dle Lösung wurde bei 4°C gelagert		
Elektrophorese-Laufpuffer		5000 ml
Tris	25 mM	15,45 g
Glycin	191 mM	72,05 g
SDS	0,1% (w/v)	5 ml 10% Stlsg
Der Puffer wurde bei Raumtempera	atur gelagert.	
Coomassie-Blue Fixierlösung		500 ml
Coomassie-Brilliant Blue R 250	0,1% (w/v)	0,5 g
Essigsäure	12,5% (v/v)	62,5 ml
Methanol	20% (v/v)	100 ml
Die Lösung wurde durch einen Falt	enfilter filtriert und bei Ra	umtemperatur gelagert.
Coomassie-Entfärbelösung		500 ml
Essigsäure	10% (v/v)	50 ml
Methanol	40% (v/v)	200 ml
Die Lösung wurde bei Raumtemper	ratur gelagert.	
Blottransferpuffer A		1000 ml
Tris	300 mM	300 ml 1 M Stlsg
SDS	0,1% (w/v)	10 ml 10% Stlsg
Methanol	20% (v/v)	200 ml
Der Puffer mit dem pH Wert von 11	,5 wurde bei Raumtempe	eratur gelagert.
Blottransferpuffer B		1000 ml
Tris	25 mM	25 ml 1 M Stlsg
SDS	0,1% (w/v)	10 ml 10% (w/v) Stlsg
Methanol	20% (v/v)	200 ml
Der Puffer mit dem pH Wert von 10	,5 wurde bei Raumtempe	eratur gelagert.

Blottransferpuffer C			1000 ml
Tris/Borat		25 mM	25 ml 1 M Stlsg
SDS		0,1% (w/v)	10 ml 10% (w/v) Stlsg
Methanol		20% (v/v)	200 ml
Der Puffer wurde mit	1 M Borsäure	auf pH 9,0 einges	stellt und bei Raumtemperatur gelagert.
Ponceau S-Färbelösu	ing		1000 ml
Ponceau S		0,25% (w/v)	2,5 g
Methanol		40% (v/v)	400 ml
Essigsäure		15% (v/v)	150 ml
Die Lösung wurde	durch einen	Faltenfilter filtri	ert und war mindestens 12 Monate
verwendbar.			
PBS-Tween-Waschpu	uffer		1000 ml
PBS		1 x	1
Tween 20		0,05% (v/v)	0,5 ml
Blockierungslösung			
Magermilchpulver		5% (w/v)	5 g/100 ml PBS-Tween-Waschpuffer
Die Lösung wurde im	mer frisch ang	esetzt.	

#### SuperSignal West Pico Chemiluminescent Substrate

Die beiden Nachweislösungen "Luminol/Enhancer Solution" und "Stable Peroxide Solution" wurden ohne Angaben des Herstellers (PIERCE) geliefert und bei 4°C gelagert.

## 3.19.2 Immunpräzipitation der Rezeptorproteine

Die die verschiedenen Rezeptor-exprimierenden HEK293-Zellen wurden 72 h auf 58 cm<sup>2</sup>-Kulturschalen inkubiert. Danach wurde das Medium entfernt, die Zellen einmal mit PBS gewaschen und 800 µl FLAG-Solubilisierungspuffer mit Proteaseinhibitoren hinzupipettiert. Die Zellen wurden anschließend abgeschabt, die Zellsuspension in ein 1,5 ml-Reaktionsgefäß überführt und für 30 min bei 20 000 rpm (36 700 x *g*, SIGMA-Zentrifuge 3K30, Rotor 12154-H 3K30) und 4°C zentrifugiert. Danach wurde der Überstand in ein neues 1,5 ml-Reaktionsgefäß überführt und mit 100 µl 10% Sepharose 4-B in FLAG-Solubilisierungspuffer und 1% (w/v) BSA für 1 h in einem Überkopfschüttler bei 4°C inkubiert. Auf diese Weise wurden Proteine entfernt, die Antikörper-unabhängig (unspezifisch) an die Sepharose banden. Zusätzlich wurden parallel für jeden Ansatz 100 µl 10% Protein G-Sepharose in FLAG-Solubilisierungspuffer und 1% (w/v) BSA mit 15 µg FLAG-M2-Antikörper zur Bindung des Antikörpers an die Protein G-Sepharose pipettiert und mitinkubiert. Nach der Inkubation wurden die Ansätze für 5 min bei 15 000 rpm (20 600 x *g*, SIGMA-Zentrifuge 3K30, Rotor 12154-H 3K30) und 4°C zentrifugiert und der Überstand in ein neues 1,5 ml-Reaktionsgefäß überführt. Zu jedem Ansatz wurden 100 µl der Protein G-Sepharose in FLAG-Solubilisierungspuffer und 1% (w/v) BSA mit 15 µg FLAG-M2 Antikörper pipettiert und die Ansätze wiederum für 2 h in einem Überkopfschüttler bei 4°C inkubiert. Danach wurden die Ansätze für 5 min bei 15 000 rpm (20 600 x *g*, SIGMA-Zentrifuge 3K30, Rotor 12154-H 3K30) und 4°C zentrifugiert, der Überstand verworfen und das Sediment fünfmal mit 1 ml FLAG-Solubilisierungspuffer gewaschen. Während der Waschschritte wurde der Ansatz durch wiederholtes Zentrifugieren für 4 min bei 15 000 rpm (20 600 x *g*, SIGMA-Zentrifuge 3K30, Rotor 12154-H 3K30) und 4°C sedimentiert. Zu dem Sediment wurde anschließend ein auf die spezifische Bindung (siehe 3.18.4) normalisiertes 1 x SDS-Probenpuffer-Volumen (siehe 3.19.1) mit 5% (v/v)  $\beta$ -Mercaptoethanol pipettiert. Die Ansätze wurden bei -20°C gelagert.

#### 3.19.3 Vorbereitung der Proben für die SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Die Ansätze wurden für 1 h unter Schütteln bei 37°C inkubiert, danach für weitere 10 min unter Schütteln auf 60°C erhitzt und dann für 5 min bei 13 000 rpm (16 000 x g) in der Tischzentrifuge zentrifugiert. Anschließend wurden die Proben auf ein 10% (w/v) Polyacrylamid-Gel aufgetragen.

## 3.19.4 Vorbereitung der Polyacrylamid-Gele für die SDS-PAGE

Zur analytischen Trennung von Proteinen aufgrund ihres Molekulargewichtes wurden diskontinuierliche Polyacrylamidgele nach Laemmli (1970) eingesetzt. Die verwendeten Gele für den immunologischen Nachweis hatten eine Stärke von 1,0 mm und eine Abmessung von 8,5 x 5,5 cm und wurden mit dem Elektrophorese-System Mini Protean II (BioRad) gegossen und betrieben. Die verwendeten Gele für die Auftrennung der [<sup>32</sup>P]-ortho-Phosphat markierten Proteine hatten eine Stärke von 1,0 mm und eine Abmessung von 9 x 14 cm und wurden mit einem am Institut hergestellen System betrieben. Die Glasplatten wurden mit Aceton gereinigt und mit zwei Abstandhaltern zwischen den Platten zusammengesetzt, abgedichtet und die 8,5 x 5,5 cm großen Gele wie folgt gegossen (für die 9 x 14 cm großen Gele wurden die Volumen der einzelnen Puffer und Lösungen entsprechend angepaßt):

<u>Trenngel</u> (10% (w/v) PAA)	
Acrylamid-Lösung	3,3 ml
H <sub>2</sub> O	4,2 ml
Trenngelpuffer	2,5 ml
Ammoniumpersulfat-Lösung	75 µl
TEMED	15 µl

Die einzelnen Komponenten wurden gemischt und bis zu einer Höhe von 5,5 cm (bzw. 9 cm) zwischen die Glasplatten gefüllt. Zur Glättung des Oberfläche wurde das Gel daraufhin mit H<sub>2</sub>O–gesättigtem n-Butanol überschichtet. Nachdem das Trenngel vollständig polymerisiert war, wurde das n-Butanol entfernt, die Geloberfläche vorsichtig mit H<sub>2</sub>O gespült und mit einem Filterpapier getrocknet.

Anschließend wurde das Sammelgel wie folgt gegossen:

<u>Sammelgel</u> (4,5% (w/v) PAA)	
Acrylamid-Lösung	0,75 ml
H <sub>2</sub> O	3 ml
Sammelgelpuffer	1,25 ml
Ammoniumpersulfat-Lösung	50 µl
TEMED	15 µl

Die Lösungen wurde gemischt, bis zum oberen Rand zwischen die Glasplatten gefüllt und der Probenkamm luftblasenfrei eingesetzt. Nach 20 min wurde das Gel in die Elektrophoresekammer eingesetzt, diese mit Elektrophorese-Laufpuffer gefüllt, der Probenkamm unter Flüssigkeit entfernt und Luftblasen entfernt.

## 3.19.5 Trennung der Membranproteine durch SDS-PAGE

Die aufbereiteten Proben wurden mit einer Hamilton-Spitze in die Geltaschen gegeben. Als Molekulargewichts-Standard dienten 10 µl des LMW-Standard. Die Elektrophorese erfolgte bei 15 mA/Gel im Sammelgel bis die Proben konzentriert waren und anschließend bei 20 mA/Gel im Trenngel. Sie wurde beendet, wenn die Bromphenolblaubande den unteren Rand des Trenngels erreicht hatte. Anschließend wurden die Gele entweder für die Detektion der metabolisch [<sup>32</sup>P]-ortho-Phosphat-markierten Proteine in Coomassie-Blue-Fixierlösung angefärbt, fixiert und getrocknet oder die getrennten Proteine für die immunologische Detektion auf eine PVDF-Membran transferiert.

# 3.19.6 Fixierung mit Coomassie-Blue-Fixierlösung und Trocknung der Gele für den Nachweis der metabolisch [<sup>32</sup>P]-ortho-Phosphat markierten Rezeptorproteine

Nach der Gelelektrophorese wurde das Sammelgel abgetrennt, die linke obere Ecke des Trenngels zur Markierung entfernt und die aufgetrennten Proteine zur Kontrolle für 30 min in Coomassie Blue-Fixierlösung angefärbt und das Gel fixiert. Anschließend wurde die Fixierlösung durch Waschen mit Coomassie-Entfärbelösung wieder entfernt, das Gel in Einmachfolie eingelegt und für 2 h bei 65°C unter Vakuum getrocknet.

# 3.19.7 Transfer der getrennten Proteine auf PVDF-Membranen durch Elektroblotting für den immunologischen Nachweis der Rezeptorproteine

Nach der Gelelektrophorese wurde das Sammelgel abgetrennt, die linke obere Ecke des Trenngels zur Markierung entfernt und das Gel für 20 min in Blottransferpuffer C äquilibriert. Währenddessen wurden eine PVDF-Membran und vier Whatman-Filter (3 mm) auf das entsprechende Gelmaß (8,5 x 5,5 cm) zugeschnitten und die linke obere Ecke der Membran ebenfalls markiert. Nachfolgend wurde die PVDF-Membran kurz in reinem Methanol geschwenkt, wodurch sie gleichmäßig angefeuchtet wurde. Danach wurde die Membran 2 min in H<sub>2</sub>O bidest. gespült und anschließend in Blottransferpuffer B für 15 min äquilibriert. Der Blotaufbau wurde auf der Anodenplatte der Blotvorrichtung durchgeführt. Es mußte darauf geachtet werden, die einzelnen Schichten möglichst luftblasenfrei aufzulegen. Zuerst wurde ein Filterpapier in Blottransferpuffer A angefeuchtet und aufgelegt. Darauf wurde ein zuvor mit Blottransferpuffer B benetztes Filterpapier gelegt. Auf die beiden Filter wurde die PVDF-Membran vorsichtig aufgelegt und auf diese dann das Polyacrylamidgel, so daß die beiden markierten Ecken übereinander lagen. Abschließend wurden zwei zuvor in Blottransferpuffer C angefeuchtete Filter auf das Gel geschichtet und der Aufbau mit einem Glasröhrchen vorsichtig komprimiert, um eventuell noch vorhandene Luftblasen und überschüssige Flüssigkeit zu entfernen. Nun wurde die Kathodenplatte vorsichtig aufgelegt. Der Transfer erfolgte bei konstanter Stromstärke von 1,2 mA/cm<sup>2</sup> Gelfläche über einen Zeitraum von 45 min.

#### 3.19.8 Nachweis der geblotteten Proteine durch Ponceau S-Färbung

Nach Ablauf der Transferzeit wurde der Blotaufbau abgebaut, die PVDF-Membran mit einer Pinzette entnommen und in eine Schale mit Ponceau S-Färbelösung für die reversible Proteinfärbung gelegt. Die Membran wurde einige Minuten angefärbt und anschließend mit H<sub>2</sub>O bidest. gespült, bis die Hintergrundfärbung verschwunden war. Anschließend wurden die Banden des Molekulargewichtstandards und die Proteinspuren mit Nadelstichen markiert und die Membran in PBS-Tween-Waschpuffer entfärbt, wobei je nach Intensität der Färbung ein oder mehrere Pufferwechsel nötig waren.

# 3.19.9 Immunologischer Nachweis der Rezeptorproteine durch Immunperoxidase-Färbung der geblotteten Proteine

Zur Absättigung der unspezifischen Bindungsstellen wurde die Membran für 1 h bei Raumtemperatur in Blockierungslösung geschwenkt. Danach wurde die Membran zweimal 10 min mit PBS-Tween-Waschpuffer gewaschen und über Nacht bei 4°C unter Schwenken mit einem Antiserum gegen Epitope in der C-terminalen Domäne des hEP4-R in einer Verdünnung von 0,4 µg/ml in PBS-Tween-Waschpuffer mit 1% (w/v) Magermilchpulver inkubiert. Nachfolgend wurde die Antikörperlösung entfernt, die Membran dreimal 15 min mit PBS-Tween-Waschpuffer gewaschen, 1 h mit Peroxidase-gekoppeltem Ziege-Anti-Kaninchen-Antikörper in einer Verdünnung von 1:10 000 in PBS-Tween-Waschpuffer mit 1% (w/v) Milchpulver inkubiert und anschließend die Membran wie zuvor gewaschen. Der Nachweis wurde durch eine Chemilumineszenz-Reaktion mit dem Chemilumineszenz-Substrat "SuperSignal<sup>R</sup> West Pico Chemiluminescence Substrate" der Firma Pierce (Rochford, USA) durchgeführt. Dazu wurden Lösung 1 und 2 zu gleichen Teilen zu einem Endvolumen von 2 ml/PVDF Membran gemischt und auf die Membran aufgetropft. Nach 5 min wurde die Membran luftblasenfrei in Frischhaltefolie eingepackt und überschüssige Lösung entfernt. Die entstandene Lumineszenz wurde direkt mit Hilfe des ChemiDoc<sup>™</sup>-Systems der Firma BioRad detektiert. Die spezifischen Banden wurden mit dem Software-Programm Quantity One der Firma BioRad quantifiziert.

# 3.20 Charakterisierung der Bindungseigenschaften der modifizierten Rezeptorproteine im Vergleich mit dem nativen Rezeptorprotein

#### 3.20.1 Puffer und Lösungen

#### <u>Bindungspuffer</u>

Die Zusammensetzung des Puffers wurde unter 3.18.1 beschrieben.

# 3.20.2 Bestimmung der Affinität und der maximalen Bindungskapazität der verschiedenen Rezeptorproteine durch Sättigungsbindungsstudien

Zur Ermittlung der Rezeptordichte und Rezeptoraffinität der exprimierten Rezeptorproteine für PGE<sub>2</sub> wurden Membranen von stabil transfizierten HEK293-Zellen mit 5 nM [<sup>3</sup>H]-PGE<sub>2</sub> und 0 bis 20  $\mu$ M nicht-[<sup>3</sup>H]-markiertem PGE<sub>2</sub> in einem 100  $\mu$ l-Ansatz für 1 h bei Raumtemperatur, wie unter 3.18.4 beschrieben, inkubiert. Die Reaktion wurde durch Vakuumfiltration beendet und die membrangebundene Radioaktivität im Flüssigkeitsscintillationszähler gemessen. Dabei wurde in jeder Sättigungsbindungsserie die unspezifische Bindung in Gegenwart von 20  $\mu$ M PGE<sub>2</sub> gemessen. Die Bindungskonstanten wurden durch nichtlineare Regression mit dem Programm LIGAND ermittelt.

# 3.21 Nachweis der funktionellen Eigenschaften der Rezeptorproteine durch Bestimmung der PGE<sub>2</sub>-induzierten cAMP-Bildung

## 3.21.1 Puffer und Lösungen

PBS		1000 ml
NaCl	137 mM	8,006 g
KCI	2,7 mM	201 mg
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	1,5 mM	205 mg
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	8 mM	1,136 g

Die Lösung wurde auf pH 7,3 eingestellt und bei Raumtemperatur gelagert.

Pefabloc-Stammlösung siehe 3.18.1

Leupeptin-Stammlösung

siehe 3.18.1

<u>Trypsin-Inhibitor-Stammlösung</u> siehe 3.18.1

<u>Hypotoner Homogenisierungspuffer</u>		1000 ml
Tris/HCI	50 mM	20 ml 1 M Stlsg, pH 7,5
EDTA	5 mM	10 ml 0,5 M Stlsg
Der Puffer wurde auf pH 7,5 eigestellt und bei 4°	C gelagert.	
Pro ml wurden als Protease-Inhibitoren frisch hin	zugefügt:	
Pefabloc	0,2 mM	1 µl 200 mM Stlsg
Leupeptin	10 µg/ml	1 µl 10 mg/ml Stlsg
Trypsin-Inhibitor	10 µg/ml	1 µl 10 mg/ml Stlsg
Resuspendierungspuffer		100 ml
Tris/HCI	60 mM	1,667 ml 1M Stlsg, pH 7,5
Der Puffer wurde mit HCl auf pH 7,5 eingestellt u	nd bei 4°C gela	gert.
Pro ml wurden als Protease-Inhibitoren frisch hin	zugefügt:	
Pefabloc	0,2 mM	1 µl 200 mM Stlsg
Leupeptin	10 µg/ml	1 µl 10 mg/ml Stlsg
Trypsin-Inhibitor	10 µg/ml	1 µl 10 mg/ml Stlsg
PGE <sub>2</sub> -Stammlösung		

siehe 3.18.1

GTP-Stammlösung		10 ml
GTP	10 mM	53,5 mg
Die Lösung wurde in 60 mM Tris/HCl pH 7,5 a	ngesetzt und bei -20°	°C gelagert.
IBMX-Stammlösung		10 ml
IBMX	100 mM	222,2 mg
Die Lösung wurde in DMSO angesetzt und bei	-20°C gelagert.	
2 x Reaktionspuffer		100 ml
ATP	4 mM	220 mg
MgCl <sub>2</sub>	20 mM	407 mg
DTT	2 mM	25 mg
GTP	20 µM	200µl 10 mM Stlsg
IBMX	2 mM	2 ml 100 mM Stlsg
EDTA	4 mM	117 mg
Creatin-Phosphat	10 mM	372 mg
Creatin-Kinase	20 U/ml	0,6mg
60 mM Tris/HCl pH 7,5		ad 10 ml
Der Puffer wurde mit HCl auf pH 7,5 eingestell	t und bei -20°C gelao	gert.
Poly-L-Lysin-Lösung		100 ml
Poly-L-Lysin	0,1 mg/ml	10 mg
Die Lösung wurde in PBS angesetzt und bei 4	°C gelagert.	
cAMP-Inkubationsmedium		1000 ml
HEPES	15 mM	3,57 g
NaCl	140 mM	8,18 g
KCI	4,7 mM	0,35 g
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	1,2 mM	0,35 g
Glucose x 1 H <sub>2</sub> O	11 mM	2,09 g
CaCl <sub>2</sub>	2,2 mM	1,1 ml/2 M Stlsg
Der Puffer wurde auf pH 7,5 eingestellt und be	i 4°C gelagert.	
Aufschlußpuffer		100 ml
HCI	10 mM	0,5 ml 2 N Stlsg
IBMX	1 mM	1 ml 100 mM Stlsg

Der Puffer wurde immer frisch angesetzt.

## Forskolin-Stammlösung

Forskolin wurde in einer Konzentration von 10 mM in DMSO gelöst und in Aliquots bei -20°C gelagert.

Acetat	50 mM
Azid	0,01% (w/v)
Thimerosal	ohne Angabe

pH 5,8

10 ml der vom Hersteller mitgelieferten konzentrierten Pufferlösung wurden auf 500 ml mit entmineralisiertem H<sub>2</sub>O aufgefüllt. Der Puffer wurde bei 4°C gelagert.

# [<sup>125</sup>I]cAMP (Tracer)

Adenosin-3',5'-Phosphorsäure-2'-O-Succinyl-3-[<sup>125</sup>I]iodothyrosin-Methylester, Iyophilisiert, ~59 kBq

Der Tracer wurde vom Hersteller mitgeliefert, mit 11 ml cAMP-RIA-Puffer rekonstituiert und bei 4°C gelagert.

## Antiserum (Anti-cAMP Antikörper)

Kaninchen-Anti-Succinyl-cAMP-Serum, lyophilisiert mit 0,05% (w/v) BSA

Das Antiserum wurde vom Hersteller mitgeliefert, mit 11 ml cAMP-RIA-Puffer rekonstituiert und bei 4°C gelagert.

# cAMP-Standard ("non-acetylation-protocol")

cAMP-Standard, lyophilisiert in 50 mM Acetat mit 0,01% (v/v) Thimerisol

Der cAMP-Standard wurde vom Hersteller mitgeliefert, mit 2 ml cAMP-RIA-Puffer rekonstituiert und gemischt. Aus dieser Stammlösung (32 pmol/ml) wurde durch Verdünnung mit cAMP-RIA-Puffer eine Standardreihe (0,5-16 nM) hergestellt. Der cAMP-Standard wurde bei 4°C gelagert.

## Amerlex-M Reagenz (immobilisierter 2. Antikörper)

Das Reagenz wurde vom Hersteller mitgeliefert und bei 4°C gelagert.

# 3.21.2 Präparation von Membranen der Rezeptor exprimierenden HEK293-Zellen

Die Membranpräparation wurde, wie unter 3.18.2 beschrieben, durchgeführt, jedoch wurden die stabil transfizierten HEK293-Zellen in 1,5 ml eiskaltem hypotonen Homogenisierungspuffer mit Protease-Inhibitoren (Leupeptin, Trypsin-Inhibitor, Pefablock) abgeschabt und vor der Zentrifugation mit einer 0,4 mm-Kanüle homogenisiert. Nach der Zentrifugation wurde der Überstand verworfen und die Membranen in 500 µl

Resuspendierungspuffer, wie unter 3.18.2 beschrieben, resuspendiert und eine Proteinbestimmung durchgeführt (siehe 3.18.3). Die Konzentration wurde auf 1 µg Membranprotein/µl eingestellt.

# 3.21.3 Nachweis der Dosis-abhängigen cAMP-Bildung an Membranen Rezeptorexprimierender HEK293-Zellen

Zur Stimulation der cAMP-Bildung an Membranen wurden 50 µl 2 x Reaktionspuffer mit 20 µl einer 5-fach konzentrierten PGE<sub>2</sub>-Lösung in Resuspendierungspuffer mit Konzentrationen von 0 oder 5 x  $10^{-5}$ - $10^{-11}$ M PGE<sub>2</sub> auf Eis pipettiert. Anschließend wurden 30 µl Membransuspension zugegeben und der Reaktionsansatz für 5 min bei 37°C zur cAMP-Bildung inkubiert. Die Reaktion wurde durch Erhitzen des Ansatzes auf 95°C für 2 min abgestoppt. Anschließend wurden die Proben für 10 min bei 15 000 rpm (20 600 x *g*, SIGMA-Zentrifuge 3K30, Rotor 12154-H 3K30) und 4°C zentrifugiert. Der Überstand, in dem sich das zu bestimmende cAMP befand, wurde 1:100 verdünnt und in den [<sup>125</sup>I]-cAMP-Radioimmunoassay (siehe 3.21.5) eingesetzt oder bei -70°C gelagert.

#### 3.21.4 Kinetik der Forskolin-abhängigen cAMP-Bildung in intakten Zellen

8,7 cm<sup>2</sup>-Kulturplatten wurden 30 min mit 1 ml Poly-L-Lysin-Lösung inkubiert und anschließend einmal mit PBS gewaschen. Poly-L-Lysin verbessert die Haftung der Zellen auf den Kulturplatten und vermeidet ein Wegwaschen der Zellen im Versuch. Danach wurden 2 x 10<sup>5</sup> der stabil transfizierten HEK293-Zellen auf die beschichteten Kulturplatten ausplattiert und für 48 h kultiviert. Anschließend wurde das Kulturmedium abgesaugt und die Zellen zweimal mit 1 ml 37°C-warmen cAMP-Inkubationsmedium gewaschen. Danach wurden 990 µl cAMP-Inkubationsmedium zugeben und die Zellen für 10 min bei 37°C in Anwesenheit von 1 mM IBMX vorinkubiert. IBMX ist ein Phosphodiesterase-Inhibitor und verhindert, daß das gebildete cAMP wieder abgebaut werden kann. Anschließend wurden die Zellen für 0, 2, 5, 10, 15, 30 min mit 1 µM Forskolin in Anwesenheit von 1 mM IBMX zur cAMP-Bildung stimuliert. Nach der Stimulation wurde das Medium abgesaugt und die Kulturplatten in flüssigen Stickstoff überführt, um die Reaktion zu stoppen. Anschließend wurden die Zellen aus dem flüssigen Stickstoff herausgenommen und während sie auftauten, wurden sie mit 500 µl Aufschlußpuffer versetzt und 1 h auf Eis aufgeschlossen. Danach wurden die Zellen abgeschabt und die Zellsuspension in ein Schnappdeckelgefäß überführt und bei -70°C gelagert oder direkt in den [<sup>125</sup>I]-cAMP-Radioimmunoassay (siehe 3.21.5) eingesetzt.

## 3.21.5 Bestimmung der cAMP-Konzentration durch Radioimmunoassay (RIA)

Die Quantifizierung der cAMP-Konzentrationen wurde mit dem cAMP-[<sup>125</sup>I] Biotrak Assay System der Firma Amersham-Phamacia nach Anweisung des Herstellers durchgeführt.

Die bei -70°C gelagerten Proben wurden aufgetaut und für 10 min bei 15 000 rpm (20 600 x *g*, SIGMA-Zentrifuge 3K30, Rotor 12154-H 3K30) und 4°C zentrifugiert. 10 µl des Überstandes wurden mit 990 µl des cAMP-RIA-Puffers verdünnt und 50 µl dieser Verdünnung wurden in den RIA eigesetzt. Für die Eichreihe wurden 50 µl des nichtacetylierten cAMP-Standard (32 nM) mit 50 µl des cAMP-RIA-Puffers verdünnt und mit jeweils 50 µl cAMP-RIA-Puffer siebenmal 1:2 weiterverdünnt. Für die Standardreihe wurden zwei Leerwerte (nur cAMP-RIA-Puffer) und sieben Standard-Punkte eingesetzt (16, 8, 4, 2, 1, 0,5 und 0,25 nM nicht-acetylierter cAMP-Standard).

Zu den 50 µl Probe oder Standard wurden 50 µl [<sup>125</sup>I]-cAMP (Tracer) und 50 µl Antiserum (cAMP-Antikörper) pipettiert und für 3 h bei 4°C inkubiert. Danach wurden 250 µl Amerlex-M Reagenz (immobilisierter 2. Antikörper) zugegeben und 15 min bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurden die Proben für 10 min bei 13 000 rpm (16 000 x *g*) in der Tischzentrifuge bei Raumtemperatur zentrifugiert, der Überstand vollständig abgenommen und das Sediment im  $\gamma$ -Zähler für 1 min gemessen.

# 3.22 Untersuchung der Desensitisierung der in HEK293-Zellen stabil exprimierten Rezeptorproteine

#### 3.22.1 Puffer und Lösungen

#### Poly-L-Lysin-Lösung

Die Zusammensetzung der Poly-L-Lysin-Lösung wurde unter 3.21.1 beschrieben.

<u>cAMP-Inkubationsmedium</u> Die Zusammensetzung des Inkubationsmediums wurde unter 3.21.1 beschrieben.

<u>IBMX-Stammlösung</u> Die Zusammensetzung des Puffers wurde unter 3.21.1 beschrieben.

<u>Hypotoner Homogenisierungspuffer</u> Die Zusammensetzung des Puffers wurde unter 3.21.1 beschrieben.

<u>Resuspendierungspuffer</u> Die Zusammensetzung des Puffers wurde unter 3.21.1 beschrieben.

#### 2 x Reaktionspuffer

Die Zusammensetzung des Puffers wurde unter 3.21.1 beschrieben.

#### ONO604-Stammlösung

Der EP4-R-Agonist (ONO604) wurde in einer Konzentration von 10 mM in 70% (v/v) in Ethanol gelöst und in Aliqots bei -20°C gelagert.

Saurer Puffer		100 ml
Glycin	50 mM	375 mg
NaCl	150 mM	877 mg
Der Puffer wurde mit HCl auf pH 3	eingestellt und bei 4°C gelagert.	

# 3.22.2 Bestimmung der Desensitisierung der PGE<sub>2</sub>-abhängigen cAMP-Bildung nach Vorstimulation der Rezeptor-exprimierenden HEK293-Zellen mit PGE<sub>2</sub>

Stabil transfizierte HEK293-Zellen wurden auf acht zuvor mit Poly-L-Lysin beschichtete 8,7 cm<sup>2</sup>-Platten mit einer Dichte von 2 x  $10^5$  Zellen ausplattiert und bis zur Konfluenz kultiviert. Anschließend wurden die Zellen zweimal mit cAMP-Inkubationsmedium gewaschen und je vier Platten mit 100 nM PGE<sub>2</sub> für 10 min vorstimuliert, während vier weitere Platten ohne PGE<sub>2</sub> inkubiert wurden. Nach der Vorstimulation wurden die Zellen zweimal mit cAMP-Inkubationsmedium gewaschen und für 1 min in Saurem Puffer inkubiert, um den Liganden von der Zelloberfläche zu eluieren. Anschließend wurden die Zellen wiederum zweimal mit cAMP-Inkubationsmedium gewaschen und zwei Platten der nicht-vorstimulierten und zwei Platten der vorstimulierten Zellen für 10 min mit 10 nM PGE<sub>2</sub> in Anwesenheit von 1 mM IBMX restimuliert. Die jeweils anderen beiden Platten wurden als Kontrolle für 10 min ohne PGE<sub>2</sub> in Anwesenheit von 1 mM IBMX inkubiert. Nach der Restimulation wurden das Medium abgesaugt und die Reaktion in flüssigem Stickstoff abgestoppt. Die Ansätze wurden wie unter 3.21.4 beschrieben aufgearbeitet.

# 3.22.3 Kinetik der PGE<sub>2</sub>-induzierten cAMP-Bildung nach Vorstimulation der Rezeptorexprimierenden HEK293-Zellen mit PGE<sub>2</sub>

2 x  $10^5$  der stabil transfizierten HEK293-Zellen wurden auf zuvor mit Poly-L-Lysin beschichteten Kulturplatten ausplattiert und für 48 h kultiviert. Anschließend wurde das Kulturmedium abgesaugt und die Zellen zweimal mit 1 ml 37°C-warmen cAMP-Inkubationsmedium gewaschen. Danach wurden 980 µl cAMP-Inkubationsmedium zugeben und die Zellen für 10 min bei 37°C mit 1 µM PGE<sub>2</sub> in Abwesenheit von IBMX vorstimuliert. Danach wurde die Kinetik durch Zugabe von 1 mM IBMX gestartet und die Zellen für 0-30 min zur cAMP-Bildung inkubiert. Die Reaktion wurde in flüssigem Stickstoff abgestoppt (siehe 3.21.4.), die Ansätze, wie unter 3.21.4 beschrieben, aufgearbeitet und das gebildete cAMP, wie unter 3.21.5 beschrieben, bestimmt.

# 3.22.4 Kinetik der ONO604-induzierten cAMP-Bildung nach Vorstimulation der Rezeptor-exprimierenden HEK293-Zellen mit ONO604 und verzögerter Gabe von IBMX

2 x  $10^5$  der stabil transfizierten HEK293-Zellen wurden auf zuvor mit Poly-L-Lysin beschichteten Kulturplatten ausplattiert und für 48 h kultiviert. Anschließend wurde das Kulturmedium abgesaugt und die Zellen dreimal mit 1 ml 37°C warmen cAMP-Inkubationsmedium gewaschen. Danach wurde 1 ml cAMP-Inkubationsmedium zugegeben und die Zellen für 10 min bei 37°C mit 10 nM ONO604 in Abwesenheit von IBMX stimuliert. Danach wurde das Medium entfernt und die Zellen dreimal mit cAMP-Inkubationsmedium gewaschen. Anschließend wurden die Zellen in 990 µl cAMP-Inkubationsmedium für 10 min ohne Agonist und ohne IBMX inkubiert. Danach wurde die Kinetik durch Zugabe von 10 µl IBMX-Stammlösung gestartet und die Zellen für 0-30 min zur cAMP-Bildung inkubiert. Die Reaktion wurde in flüssigem Stickstoff abgestoppt (siehe 3.21.4.), die Ansätze, wie unter 3.21.4 beschrieben, aufgearbeitet und das gebildete cAMP bestimmt (siehe 3.21.5).

# 3.22.5 Bestimmung der Konzentrations-abhängigen cAMP-Bildung nach Vorstimulation mit PGE<sub>2</sub>

Stabil transfizierte HEK293-Zellen wurden auf zuvor mit Poly-L-Lysin beschichteten 58 cm<sup>2</sup>-Platten mit einer Dichte von 3 x 10<sup>6</sup> Zellen ausplattiert und für 72 h inkubiert. Anschließend wurde das Kulturmedium abgesaugt und die Zellen zweimal mit 10 ml 37°C warmen cAMP-Inkubationsmedium gewaschen. Danach wurden 10 ml cAMP-Inkubationsmedium/58 cm<sup>2</sup>-Platte pipettiert und die Zellen mit 1  $\mu$ M PGE<sub>2</sub> für 5 min stimuliert, parallel wurden Zellen ohne PGE<sub>2</sub> inkubiert. Nach der Stimulation wurde das cAMP-Inkubationsmedium absaugt, die Zellen zweimal mit 10 ml kaltem PBS gewaschen und für 1 min in 5 ml Saurem Puffer zur Elution des auf der Zelloberfläche gebundenen Liganden inkubiert. Anschließend wurden die Zellen zweimal mit 10 ml kaltem PBS gewaschen und 1,5 ml hypotoner Homogenisierungspuffer mit Protease-Inhibitoren zupipettiert. Danach wurden Membranen aus den Zellen präpariert (siehe 3.21.2) und eine Proteinbestimmung durchgeführt (siehe 3.18.3) Die Konzentration wurde auf 1  $\mu$ g Membranprotein/ $\mu$ l eingestellt. Die Dosisabhängige cAMP-Bildung wurde, wie unter 3.21.3 beschrieben, durchgeführt und anschließend das gebildete cAMP bestimmt (siehe 3.21.5).

# 3.23 Nachweis der Internalisierung der Rezeptorproteine durch einen Oberflächen-ELISA (<u>Enzyme-linked Immunos</u>orbent <u>A</u>ssay)

## 3.23.1 Puffer und Lösungen

Poly-L-Lysin		
siehe 3.21.1		
5 x Saccharose-Lösung		50 ml
Saccharose	2,25 M	38,509 g
Die Lösung wurde bei Raumtemperatur ge	elagert.	
Tween 20-Stammlösung		100 ml
Tween 20	20% (v/v)	20 ml
Die Lösung wurde bei Raumtemperatur ge	elagert.	
PBS-Tween-Waschpuffer		
Tween 20	0,05%	2,5 ml 20% Stlsg
PBS	1 x	ad 1000 ml
<u>Blockierungspuffer I</u>		100 ml
BSA	3% (w/v)	3 g
BS	20% (v/v)	20 ml
PBS	1 x	77 ml
Der Puffer wurde bei -20°C gelagert.		
Ablösungspuffer		100 ml
Na-Citrat x 2 H₂O	100 mM	2,941 g
NaCl	50 mM	0,292 g
Der Puffer wurde mit HCl auf pH 3 eingest	ellt und bei 4°C gelagert.	
Beschichtungspuffer		100 ml
Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub>	34 mM	360 mg
NaHCO <sub>3</sub>	16 mM	134 mg
Der Puffer wurde bei 4°C gelagert.		
Blockierungspuffer II		100 ml
Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub>	34 mM	360 mg
NaHCO3	16 mM	134 mg
Gelatine	1% (w/v)	1 g
Der Puffer wurde für jeden Versuch frisch	angesetzt.	

ABTS-Lösung		500 ml
Natriumacetat	100 mM	4,1 g
NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> x H <sub>2</sub> O	50 mM	3,45 g
ABTS	0,55% (w/v)	0,55 g

Die Lösung wurde in 10 ml Aliquots bei -20°C gelagert und vor Gebrauch mit 7  $\mu$ l H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> pro 10 ml ABTS-Lösung versetzt.

# 3.23.2 Stimulation der Rezeptor exprimierenden HEK293-Zellen und Antikörperbindung

Stabil transfizierte HEK293-Zellen wurden auf zuvor mit Poly-L-Lysin beschichteten 6-Wellplatten mit einer Dichte von 3 x  $10^5$  Zellen/Vertiefung ausplattiert und für 48 h kultiviert. Anschließend wurden optional 500 µl der 5 x Saccharose-Lösung zupipettiert und die Zellen für 30 min bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub> im Begasungsbrutschrank vorinkubiert. Durch die hyperosmolare Saccharosekonzentration kann die Clathrin-vermittelte Internalisierung der Rezeptorproteine inhibiert werden. Danach wurden die Zellen mit 1 µM PGE<sub>2</sub> für 45 min bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub> im Begasungsbrutschrank stimuliert.

Nach Beendigung der Stimulation wurden die Zellen auf Eis gestellt, das Medium abgesaugt und die Zellen zweimal mit 2 ml eiskaltem PBS/Vertiefung gewaschen. Zum Abblocken der unspezifischen Bindungsstellen wurden die Zellen mit 500 µl Blockierungspuffer I/Vertiefung für 1 h bei 4°C unter Schwenken inkubiert. Danach wurde der Puffer abgesaugt und die Zellen einmal mit 2 ml eiskaltem PBS gewaschen.

Zur Antikörperbindung wurden in einer 1:3-Verdünnung in Blockierunspuffers I 2,5  $\mu$ g FLAG-M2-mAk/ml angesetzt und die Zellen mit 250  $\mu$ l dieser Verdünnung für 2 h bei 4°C unter Schwenken inkubiert. Anschließend wurden die Zellen sechsmal mit eiskaltem PBS gewaschen, mit 500  $\mu$ l Ablösungspuffer versetzt und für 30 min bei 4°C unter Schwenken inkubiert, um den FLAG-M2-mAk von den Rezeptoren wieder in Lösung zu bringen. Danach wurden die Zellen in Ablösungspuffer abgeschabt, in ein 1,5 ml-Reagiergefäß überführt und die Zellsuspension mit einer Spatelspitze NaHCO<sub>3</sub> neutralisiert. Die Suspension wurde bei -20°C gelagert.

#### 3.23.3 Vorbereitung der ELISA-Platte

Es wurde ein polyklonaler Antikörper aus Ziege gegen Immunglobuline (IgG) der Maus (Dianova) 1:250 in Beschichtungspuffer verdünnt und 100 µl/Vertiefung einer ELISA-Platte Microlon 96 K (Greiner) über Nacht bei 4°C inkubiert. Danach wurde einmal mit PBS-Tween-Waschpuffer gewaschen und mit 100 µl Blockierungspuffer II/Vertiefung für 1 h bei Raumtemperatur die unspezifischen Bindungsstellen geblockt.

#### 3.23.4 Antigenbindung

Die zellulären Bestandteile der Zellsuspension wurden durch Zentrifugation für 5 min bei 13 000 rpm (16 000 x g) in der Tischzentrifuge sedimentiert und der sich im Überstand befindende FLAG-M2-mAk im Verhältnis 1:12,5 mit PBS-Tween-Waschpuffer verdünnt. Es wurden 100  $\mu$ I der Verdünnung/Vertiefung pipettiert und für 2 h bei Raumtemperatur inkubiert. Zusätzlich wurde eine Standardreihe mit 0-1 ng FLAG-M2-mAk in PBS-Tween-Waschpuffer in einem Ansatz von 100  $\mu$ I/Vertiefung pipettiert.

# 3.23.5 Nachweis der Rezeptorproteine durch einen Sekundärantikörper, Streptavidin-Peroxidase und eine Farbreaktion mit ABTS

Nach der Antigenbindung wurde die ELISA-Platte fünfmal mit PBS-Tween gewaschen und 100  $\mu$ l einer 1:500-Verdünnung eines polyklonalen, Biotin-gekoppelten Antikörpers aus Schaf gegen Immunglobuline (IgG) der Maus (Amersham-Buchler) in PBS-Tween-Waschpuffer für 1 h bei Raumtemperatur inkubiert. Danach wurde wiederum fünfmal mit PBS-Tween-Waschpuffer gewaschen und 100  $\mu$ l einer 1:500-Verdünnung des Peroxidase-gekoppelten Streptavidins in PBS-Tween-Waschpuffer für 1 h bei Raumtemperatur inkubiert. Nach fünf Waschschritten mit PBS-Tween-Waschpuffer wurde die Farbreaktion durch Zugabe von 100  $\mu$ l ABTS-Lösung mit H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> gestartet. Nach ca. 10 min wurde die Intensität der Farbreaktion mit dem Microplate-Reader MRX II (Dynex Technologies) mit einem Testfilter von 405 nm und einem Referenzfilter von 490 nm gemessen.

# 3.24 Bestimmung der Internalisierung aufgrund der Reduktion der Oberflächen-[<sup>3</sup>H]-PGE<sub>2</sub>-Bindung

#### 3.24.1 Puffer und Lösungen

#### 5 x Saccharose-Lösung

Die Zusammensetzung der Lösung wurde unter 3.23.1 beschrieben.

#### cAMP-Inkubationsmedium

Die Zusammensetzung des Inkubationsmediums wurde unter 3.21.1 beschrieben.

#### Saurer Puffer

Die Zusammensetzung des Puffers wurde unter 3.22.1 beschrieben.

Lysis-Puffer		250 ml
NaOH	0,3 M	7,5 ml 10 M Stlsg
SDS	1% (w/v)	2,5 g
Der Puffer wurde bei Raumtemperatur gelagert.		

# 3.24.2 Nachweis der Internalisierung durch Bestimmung des nach Stimulation internalisierten [<sup>3</sup>H]-PGE<sub>2</sub>

Es wurden 1 x  $10^5$  Zellen der die verschiedenen Rezeptoren stabil exprimierenden HEK293-Zellen pro Vertiefung einer 24 Well-Kulturschale ausplattiert und für 24 h kultiviert. Anschließend wurde optional das Kulturmedium abgesaugt und die Zellen für 30 min bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub> in DMEM-komplett und 0,45 M Saccharose vorinkubiert. Durch die hyperosmolare Saccharosekonzentration kann die Clathrin-vermittelte Internalisierung der Rezeptorproteine inhibiert werden.

Die Zellen wurden zweimal mit cAMP-Inkubationsmedium gewaschen und anschließend wurden in An- oder Abwesenheit von 0,45 M Saccharose 5 nM [<sup>3</sup>H]-PGE<sub>2</sub> in An- und Abwesenheit von 10 µM nicht [<sup>3</sup>H]-markiertem PGE<sub>2</sub> in 200 µl cAMP-Inkubationsmedium pro Vertiefung pipettiert und 2 h bei 4°C zur Bestimmung der Oberflächenbindung unter Bedingungen, bei denen keine Internalisierung möglich sein sollte, inkubiert. Parallel wurde der gleiche Reaktionsansatz für 30 min bei 37°C zur Bestimmung der Oberflächenbindung unter Bedingungen, bei denen eine Internalisierung stattfinden kann, inkubiert.

Nach der Inkubation wurden die Zellen auf Eis gestellt und dreimal mit cAMP-Inkubationsmedium gewaschen. Anschließend wurden die Zellen für 5 min mit 200 µl Saurem Puffer zur Elution des an der Zelloberfläche verbliebenen [<sup>3</sup>H]-PGE<sub>2</sub> inkubiert und die Überstande in Scintillationsgefäße überführt. Die Inkubation mit Saurem Puffer wurde wiederholt und die Überstände in die gleichen Scintillationsgefäße pipettiert. Danach wurden die Zellen vom Eis genommen, 400 µl Lysis-Puffer zugegeben und die Zellsuspension zur Bestimmung der intrazellulären Radioaktivität ebenfalls in Scintillationsgefäße pipettiert. Die Proben wurden mit 5 ml Hydroluma-Scintillator versetzt und nach ca. 2 h, in denen die Chemilumineszenz abgeklungen war, wurde die Aktivität des eluierten und des intrazellulären [<sup>3</sup>H]-PGE<sub>2</sub> im Flüssigkeitsscintillationszähler gemessen. 3.25 Nachweis der Plasmamembranlokalisation und der Internalisierung der in den HEK293-Zellen stabil exprimierten Rezeptorproteine durch Immunfluoreszenz-Mikroskopie

#### 3.25.1 Puffer und Lösungen

Poly-L-Lysin-Lösung		
Die Zusammensetzung der Lösung wurde ur	nter 3.21.1 beschrieben.	
Fibronectin-Lösung		1 ml
Fibronectin	0,005% (w/v)	50µl 0,1% (w/v) Stlsg
Die Lösung wurde immer frisch angesetzt.		
Kulturmedien		
Die Zusammensetzung der Medien wurde ur	nter 3.14.1 beschrieben.	
5 x Saccharose-Lösung		
Die Zusammensetzung der Lösung wurde ur	nter 3.23.1 beschrieben.	
PBS		
Die Zusammensetzung des Puffers wurde un	nter 3.14.1 beschrieben.	
Natriumacetat-Puffer		1000 ml
Natriumacetat	100 mM	8,2 g
Der pH-Wert wurde mit 1 N HCl auf pH 5,5 e	ingestellt.	
Natriumperiodat-Lösung		100 ml
Natriumperiodat	10 mM	214 mg
PBS		ad 100 ml
Die Lösung wurde immer frisch angesetzt.		
N-Biotin-Hydrazid-Lösung		100 ml
N-Biotin-Hydrazid	1 mM	25 mg
Natriumacetat-Puffer		ad 100 ml
Die Lösung wurde immer frisch angesetzt.		

Fixierlösung		100 ml
Paraformaldehyd	4% (w/v)	4 g
PBS		ad 100 ml
Die Lösung wurde für ca. 5-10 min auf	60°C erhitzt, bis sich das	s Paraformaldehyd gelöst
hatte und anschließend in ein vorgekühl	tes Gefäß filtriert. Die Lö	sung wurde immer frisch
angesetzt.		
Ammoniumchlorid-Puffer		100 ml
Ammoniumchlorid	50 mM	267 mg
PBS		ad 100 ml
Der Puffer wurde bei 4°C gelagert.		
Permeabilisierungslösung		100 ml
Saponin	0,1% (w/v)	100 mg
PBS		ad 100 ml
Die Lösung wurde immer frisch angesetzt	t.	
PBS mit 1% (w/v) BSA		100 ml
BSA	1% (w/v)	1 g
PBS		ad 100 ml
Die Lösung wurde bei -20°C gelagert.		
Mowiol-Lösung		24 ml
Mowiol 4-88	10% (w/v)	2,4 g
Glycerol	25% (w/v)	6 ml
Tris/HCI	0,1 M	12 ml 0,2 M Stlsg pH 8,5
Es wurden 2,4 g Mowiol 4-88 in 6 ml	Glycerol und 6 ml $\rm H_2O$	über Nacht gerührt und
anschließend kurz erwärmt. Danach wurd	len 12 ml 0,2 M Tris/HCl p	oH 8,5 zugegeben und für
10 min auf 60°C erhitzt. Anschließend	wurde die Lösung bei 5	5000 x g für 30 min bei
Raumtemperatur zentrifugiert, der Überst	and aliquotiert und bei -20	°C gelagert.
Diazobicyclooctan (DABCO)		5 ml
Diazobicyclooctan	20% (w/v)	1 g
Die Lösung wurde bei -20°C gelagert.		
Mowiol-DABCO-Einbettungsmedium		10 ml

		10 111
Diazobicyclooctan	5% (w/v)	2,5 ml 20% Stlsg
Mowiol-Lösung		7,5 ml
Das Einbettungsmedium wurde in 1 ml-Aliqots b	bei -20°C gelagert i	und vor Gebrauch zur
Verflüssigung kurz auf 95°C erhitzt .		

#### 3.25.2 Kultivierung und Stimulation der Rezeptor-exprimierenden HEK293-Zellen

Die Untersuchung der subzellulären Rezeptorverteilung durch Immunfluoreszenz erfolgte mit kleineren Modifikationen nach Hille *et al.* (1992).

Runde Glasdeckgläschen wurden zur Sterilisation in 100% Ethanol getaucht und kurz abgeflammt. Anschließend wurden sie in Platten mit 6 Vertiefungen von je 9,6 cm<sup>2</sup> gelegt und 30 µl Fibronectin-Lösung auf die Deckgläschen pipettiert. Fibronectin ermöglicht den HEK293-Zellen ein besseres Wachstum auf den Glasdeckgläschen. Nachdem die Fibronectin-Lösung getrocknet war, wurden die Deckgläschen für 30 min mit 1 ml Poly-L-Lysin/Vertiefung überschichtet und danach einmal mit PBS gewaschen. Die Poly-L-Lysin-Beschichtung verbessert die Haftung der Zellen an die Deckgläschen. Anschließend wurden  $2 \times 10^5$  der mit den verschiedenen Rezeptoren stabil transfizierten HEK293-Zellen/Vertiefung ausplattiert und bei 37°C unter 5% CO<sub>2</sub> für 24 h kultiviert.

Für die transiente Transfektion mit  $\beta$ -Arrestin/GFP nach der modifizierten Calcium-Phosphat-Methode (siehe 3.14.3) wurden 1,5 x 10<sup>5</sup> Zellen/Vertiefung ausplattiert, nach 24 h transient transfiziert und für weitere 24 h kultiviert. Anschließend wurden die Zellen optional für 30 min mit 0,45 M Saccharose vorinkubiert und danach für 45 min mit 1  $\mu$ M PGE<sub>2</sub> im Kulturmedium stimuliert.

#### 3.25.3 Plasmamembranmarkierung der HEK293-Zellen

Nach der Stimulation wurden die Zellen mit 1,5 ml PBS gewaschen und für 30 min bei 4°C im Dunkeln mit 500 µl Natriumperiodatlösung inkubiert, wodurch die an den plasmamembranständigen Kohlenhydraten vorkommenden Hydroxylgruppen zu Aldehydgruppen oxidiert wurden. Danach wurden die Zellen einmal mit PBS und einmal mit Natriumacetat-Puffer gewaschen und für 30 min bei 4°C im Dunkeln mit 500 µl N-Biotin-Hydrazid-Lösung inkubiert, wodurch eine Biotinylierung der Kohlenhydratreste durch Reduktion der Aldehyde mit dem Hydrazid erfolgte (Schiff'sche Basen-Bildung). Die Zellen wurden erneut einmal mit Natriumacetat-Puffer und einmal mit PBS gewaschen und anschließend fixiert.

#### 3.25.4 Fixierung, Permeabilisierung und Blockierung der HEK293-Zellen

Die Zellen wurden für 30 min mit 500 µl Fixierlösung/Vertiefung bei 4°C fixiert, einmal mit PBS gewaschen und verbleibendes Paraformaldehyd mit 500 µl Ammoniumchlorid-Puffer für 10 min durch Reaktion der Aldehydgruppen mit den Ammoniumionen entfernt. Die Zellen wurden nochmals mit PBS gewaschen, mit 500 µl Permeabilisierungslösung für 15 min permeabilisiert und die Zellen für 60 min bei Raumtemperatur mit 500 µl unverdünntem

Ziegenserum (Gibco BRL, Eggenstein) blockiert, um die unspezifische Bindung der Antikörper zu verringern. Das Serum wurde vollständig entfernt und die Zellen abermals mit PBS gewaschen.

# 3.25.5 Nachweis der FLAG-markierten Rezeptorproteine und Gegenfärbung der biotinylierten Plasmamembran

Zum Nachweis der Rezeptorproteine wurden die so vorbereiteten Zellen mit 450 µl pro Vertiefung einer 5 µg/ml FLAG-M2-mAK-Verdünnung in PBS mit 1% (w/v) BSA für 1 h bei 37°C im Begasungsbrutschrank inkubiert. Anschließend wurde der ungebundene Antikörper durch achtmaliges Waschen mit PBS entfernt. Gebundener Antikörper wurde mit einem Cy3gekoppelten polyklonalen Antikörper aus Ziege gegen Immunglobuline (IgG) der Maus nachgewiesen. Die Präparate wurden mit 450 µl einer 1:250-Verdünnung dieses Antikörpers für 1 h unter Lichtausschluß bei 37°C im Begasungsbrutschrank inkubiert. Die biotinylierten Proteine in der Plasmamembran wurden mit FITC-markiertem Streptavidin gegengefärbt. Dazu wurden die Präparate mit 450 µl einer 1:75-Verdünnung des FITC-markierten Streptavidins für 1 h unter Lichtausschluß bei 37°C im Brutschrank inkubiert und und anschließend die Markierung durch achtmaliges Waschen mit PBS beendet.

# 3.25.6 Einbettung der HEK293-Zellen für die Visualisierung der markierten Rezeptorproteine am konfokalen Laser-Scan-Mikroskop

Das Einbettungsmedium wurde zur Verflüssigung kurz auf 95°C erhitzt und 4 µl davon auf einen Objektträger pipettiert. Die Deckgläschen wurden mit den Zellen nach unten auf das Einbettungsmedium gelegt und überschüssiges Medium vorsichtig mit Zellstoff entfernt. Die Präparate wurden mit farblosem Nagellack abgedichtet und konnten so unter Lichtausschluß bei 4°C für mehrere Wochen gelagert werden.

Die markierten Zellen wurden mit einem konfokalen Laser-Scan-Mikroskop der Firma Zeiss aufgenommen. Bei der Bildentstehung durch Scannen mit einem auf die Objektebene fokussierten monochromatischen Laserstrahl sind Abbildungs-, Streuungs- und Beugungsfehler minimal, wodurch sich die optische Auflösung erhöht. Der Scanbetrieb erlaubt die Erstellung optischer Schnitte in xy- und xz-Ebenen. Ihre Dicke wurde auf 350 nm eingestellt (White *et al.* (1987)).

# 3.26 Metabolische [<sup>32</sup>P]-ortho-Phosphat-Markierung zur Bestimmung der Agonisteninduzierten Phosphorylierung der in HEK293-Zellen stabil exprimierten Rezeptorproteine

Alle Experimente zur Untersuchung der Agonisten-induzierten Phosphorylierung der Rezeptorproteine wurden von Herrn Dr. Frank Neuschäfer Rube durchgeführt.

## 3.26.1 Puffer und Lösungen

#### Zellkulturmedien

Die Zusammensetzung der Medien wurde unter 3.14.1 beschrieben.

<u>Dialysepuffer</u>		1000 ml
HEPES	10 mM	2,383 g
NaCl	150 mM	8,766 g
Der Puffer wurde auf pH 7,5 eingest	tellt und bei 4°C gelagert.	

#### **Dialysiertes FCS**

10 ml FCS wurden in einem Dialyseschlauch mit einer Ausschlußgröße von 4000 Da für 24 h gegen 1 l Dialysepuffer bei 4°C dialysiert. Der Puffer wurde nach 8 und 16 h gewechselt. Das dialysierte FCS wurde in 1 ml-Aliquots bei -20°C gelagert.

## DMEM-Minusmedium

Das Minusmedium wurde als Glutamat- und Phosphat-freies Medium von der Firma ICN bezogen und durch 100 x Glutamat-Stammlösung (siehe 2.1) komplettiert. Phosphat wurde nicht zugesetzt, weiterhin wurden 10% (v/v) dialysiertes FCS und 1% Penicillin/Streptomycin zugegeben.

	50 ml
	44,5 ml
10% (v/v)	5 ml
1% (v/v)	0,5 ml
	150 μCi/ml
	10% (v/v) 1% (v/v)

# PGE<sub>2</sub>-Stammlösung

siehe 3.18.1

Foskolin-Stammlösung siehe 3.21.1

#### PMA-Stammlösung

PMA wurde in einer Konzentration von 10 mM in DMSO gelöst und in Aliquots bei -20°C gelagert.

## Staurosporin-Stammlösung

Staurosporin wurde in einer Konzentration von 10 mM in DMSO gelöst und in Aliquots bei -20°C gelagert.

## FLAG-Solubilisierungspuffer

siehe 3.19.1

# 3.26.2 Metabolische [<sup>32</sup>P]-ortho-Phosphat-Markierung und Stimulation der Rezeptorexprimierenden HEK293-Zellen

5 x 10<sup>5</sup> Zellen der stabil transfizierten HEK293-Zellen wurden auf zuvor mit Poly-L-Lysin beschichteten 8,7 cm<sup>2</sup>-Kulturschalen ausplattiert und für 48 h in DMEM-komplett kultiviert. Danach wurde das Kulturmedium entfernt, die Zellen zweimal mit Phosphat-freiem Medium gewaschen und für 90 min bei 37°C mit 150  $\mu$ Ci/ml [<sup>32</sup>P]-ortho-Phosphat in 500  $\mu$ l [<sup>32</sup>P]-ortho-Phosphat-DMEM-komplett/Kulturschale vormarkiert. Nach der Vormarkierung wurden die Zellen in An- oder Abwesenheit von 400 nM Staurosporin zur Inhibition der "secondmessenger"-abhängigen Kinasen für 20 min bei 37°C vorinkubiert und anschließend für 10 min bei 37°C mit 1  $\mu$ M PGE<sub>2</sub>, 2  $\mu$ M PMA oder 50  $\mu$ M Forskolin in Phosphat-freiem Medium stimuliert. Nach der Stimulation wurden die Zellen zweimal mit 2 ml eiskaltem PBS gewaschen, durch Zugabe von 800  $\mu$ I FLAG-Solubilisierungspuffer aufgeschlossen und die SDS-PAGE aufgetrennt (siehe 3.19).

# 3.26.3 Auftrennung und Visualisierung der markierten Rezeptorproteine

Nach der Immunpräzipitation wurden die Rezeptorproteine durch eine SDS-PAGE aufgetrennt (siehe 3.19.4) und das Gel nach der Fixierung und der Coomassie-Färbung für die Analyse im Molecular-Imager der Firma BioRad getrocknet (siehe 3.19.5). Zur Quantifizierung der Rezeptorphosphorylierung wurden die Intensitäten der detektierten Banden bestimmt und die Phosphorylierung des FLAG-hEP4 wt-R als 100% gesetzt.
#### 4 Ergebnisse

### 4.1 Einfügen der *SnaB* I-Restriktionsschnittstelle in die FLAG-hEP4-Rezeptor-cDNA durch sequenzgerichtete Mutagenese

Der offene Leserahmen des humanen EP4-Rezeptors umfaßt 1464 Basen, was einem Protein von 488 Aminosäuren entspricht. 468 Basen des 3'-Bereichs dieser Sequenz codieren für die ungewöhnlich lange, 156 Aminosäuren umfassende C-terminale Domäne des Rezeptorproteins, in der sich 38 Serine und Threonine befinden, die als mögliche Phosphorylierungsstellen dienen können und daher gegen Alanine ausgetauscht werden sollten. Die für die sequenzgerichtete Mutagenese verwendete Taq-Polymerase hat keine "proof-reading"-Aktivität und daher eine relativ hohe Fehlerrate bei der Replikation, durch die unerwünschte Mutationen eingeführt werden können. Die Wahrscheinlichkeit, unerwünschte Mutationen eingeführt werden können. Die Wahrscheinlichkeit, unerwünschte das zu amplifizierende DNA-Fragment möglichst klein gehalten werden. Zu diesem Zweck wurde eine zusätzliche Restriktionsschnittstelle unmittelbar vor der für die C-terminale Domäne codierenden Sequenz eingefügt, die jedoch keine Änderung in der Proteinsequenz zur Folge hatte.

Die sequenzgerichtete Mutagenese zum Einfügen dieser *SnaB* I-Schnittstelle wurde nach dem unter 3.1.3 beschriebenen Prinzip durch PCR mit pcDNA/AMP FLAG-hEP4-R als Matrize und den Primern Hind FLAG hEP4 f und EP4 SnaB f sowie EP4 SnaBI r und EP4 Xba r durchgeführt (Abb. 8).

Das Produkt der dritten PCR-Reaktion wurde mit *Hind* III, und *Xba* I geschnitten und in den pcDNA3-Vektor einkloniert. Die Klonierung der in *E. coli* amplifizierten und daraus isolierten Plasmide wurde durch eine Spaltungsreaktion mit anschließender Gelelektrophorese überprüft (Abb. 9) und das Einfügen der *SnaB* I-Schnittstelle durch Sequenzierung der gesamten Rezeptor-cDNA mit dem T7-, SP6- und dem EP4 2f-Sequenzierprimer bestätigt. Das erhaltene Plasmid pcDNA3 FLAG-hEP4 wt-R wurde für die weitere Synthese der Rezeptormutanten verwendet.

#### Matrize: pcDNA/AMP FLAG-hEP4-R



Name des neuen Produktes: pcDNA3 FLAG-hEP4 wt-R

Abb. 8: Synthese des pcDNA3 FLAG-hEP4 wt-Rezeptors mit der eingefügten *SnaB* I-Restriktionserkennungssequenz. Dargestellt ist das für die PCR-Reaktion verwendete Plasmid und die notwendigen Primer (Hind FLAG EP4 f und EP4 SnaBI r sowie EP4 SnaBI f und EP4 Xba r). Die für den FLAG-hEP4-R codierende Sequenz ist weiß, die flankierenden Elemente der Vektoren sind grau dargestellt. Weiterhin sind die verwendeten Restriktionsschnittstellen und das erhaltene Klonierungsprodukt mit der eingefügten *SnaB* I-Schnittstelle gezeigt.

#### 4.1.1 Überprüfung der sequenzgerichteten Mutagenese durch Restriktionsfragmentlängen-Analyse

Die Mutationen zur Einführung der *SnaB* I-Restriktionsschnittstelle wurde durch Restriktionsfragmentlängen-Analyse überprüft. Da der pcDNA3-Vektor und der pcDNA/AMP-Vektor ebenfalls eine *SnaB* I-Schnittstelle besitzen, wurden nach der Spaltung mit *Hind* III, *SnaB* I und *Xba* I für den pcDNA3 FLAG-hEP4 wt-R vier Fragmente erwartet. Nach der Auftrennung der Spaltprodukte auf einem 1% (w/v) Agarose-Gel waren für den pcDNA3 FLAG-hEP4 wt-R vier Fragmente erwartet, nach der Spaltprodukten des Vektors, und ein 460 bp und 5051 bp großes Fragment, die den Spaltprodukten der FLAG-hEP4 wt-R-cDNA entsprachen. In der Spur der pcDNA/Amp FLAG-hEP4-R-cDNA waren nur drei Fragmente mit einer Größe von 300 bp und 4407 bp für den pcDNA/AMP-Vektor und 1505 bp für die nicht gespaltene FLAG-hEP4-R-cDNA zu erkennen (Abb. 9).



Abb. 9: Charakterisierung der isolierten Plasmid-DNA des pcDNA/Amp FLAG-hEP4- und des pcDNA3 FLAG-hEP4 wt-Rezeptors durch Spaltung mit den Restriktionsenzymen Hind III, SnaB I und Xba I. Die mit den Restriktionsenzymen Hind III und Xba I vorbehandelte FLAG-hEP4 wt-R-cDNA wurde mit dem ebenfalls durch diese Enzyme linearisierten Vektor pcDNA3 für 2 h bei 24°C ligiert. Anschließend wurden E. coli XL1 (blue) Zellen durch Elektroporation mit diesen Konstrukten transformiert. Je ca. 1,5 µg der Plasmide wurden mit den Restriktionsenzymen Hind III, SnaB I und Xba I geschnitten und die Fragmente in einem 1% (w/v) Agarose-Gel aufgetrennt.

Die Analyse zeigte wie erwartet die ca. 300 bp und 4500 bp großen Fragmente des pcDNA/Amp und das ca. 1500 bp große Fragment der FLAG-hEP4-R-cDNA und die ca. 300 bp und 5000 bp großen Fragmente des pcDNA3 und die ca. 500 bp und 1000 bp großen Fragmente der FLAG-hEP4 wt-R-cDNA. Standard = 5 $\mu$ l Smart-Ladder.

#### 4.2 Synthese der mutierten FLAG-hEP4-Rezeptor-cDNAs zur Substitution aller Serine und Threonine durch Alanine mittels sequenzgerichteter Mutagenese

Um alle Serine und Threonine in der C-terminalen Domäne des FLAG-hEP4 wt-R, die als potentielle Phosphorylierungsstellen dienen können, gegen Alanine auszutauschen, wurden mehrere sequenzgerichtete Mutagenesen durchgeführt. Da die Serine und Threonine z. T. unmittelbar aufeinander folgten, wurden Primer verwendet, mit denen mehrere Serine und Threonine gleichzeitig substituiert werden konnten. Zusätzlich waren die Primer so gewählt, daß sie möglichst die Erkennungssequenzen der Restriktionsendonukleasen *Dra* II, *Sty* I oder *Sma* I enthielten, die in der für die C-terminale Domäne codierenden Sequenz nur einmal vorkommen. Dazu wurde das für die C-terminale Domäne codierende cDNA-Fragment (hEP4 CT) über *Kpn* I und *Xba* I in den Vektor pBluescript kloniert. Das Konstrukt enthielt die Schnittstellen *SnaB* I, *Dra* II, *Sma* I, *Sty* I und *Xba* I nur einmal. Die Klonierung der einzelnen, nacheinander synthetisierten cDNA-Fragmente erfolgte über die zuvor in die FLAG-hEP4-R-cDNA eingefügte *SnaB* I-Schnittstelle sowie über eine *Kpn* I-, *Dra* II-, *Sma* I-, *Sty* I- und die 3' flankierende *Xba* I-Schnittstelle.

#### 4.2.1 Einfügen der ST335-338A-Mutationen und Anfügen einer 5' der SnaB I-Restriktionsschnittstelle gelegenen Kpn I-Restriktionserkennungssequenz in hEP4 CT

Da der pBluescript-Vektor über keine SnaB I-Restriktionsschnittstelle verfügte, wurde die die multiple Klonierungsstelle flankierende Kpn I-Schnittstelle an die für die C-terminale Domäne codierende Sequenz der FLAG-hEP4 wt-R-cDNA angefügt. Diese Schnittstelle war nicht in der für die C-terminale Domäne codierenden Seguenz vorhanden und durch Klonierung des Fragmentes in pBluescript über Kpn I und Xba I wurden die in der multiplen Klonierungsstelle des Vektors vorhandene Sma I- und Dra II-Schnittstelle eliminiert. Die 5' der SnaB I-Erkennungssequenz gelegene Kpn I-Erkennungssequenz und die notwendigen Basenaustausche für die T335A- und S338A-Mutationen waren in dem Primer SM 1f lokalisiert. Es wurde eine PCR-Reaktion durchgeführt, in der pcDNA3 FLAG-hEP4 wt-R als Matrize und die Primer SM 1f und EP4 Xba r eingesetzt wurden. Das 5' um eine Kpn I-Erkennungssequenz verlängerte 502 bp große Produkt (Abb. 10 B) wurde mit Kpn I und Xba I geschnitten und in den pBluescript-Vektor kloniert (Abb. 10 A). Die Klonierung der in E. coli amplifizierten und daraus isolierten Plasmide wurde durch eine Spaltungsreaktion mit anschließender Gelelektrophorese überprüft und das Einfügen der ST335-338A-Mutationen durch Sequenzierung bestätigt. Der erhaltene pBluescript hEP4 CT ST335-338A wurde für die Synthese weiterer Rezeptormutanten verwendet.

### 4.2.2 Einfügen der ST369-382A-Mutationen in pBluescript hEP4 CT ST335-338A und Eliminierung der durch S372A-Substitution neu entstehenden *Sty* I-Schnittstelle

Zum Einfügen der ST369-382A-Mutationen wurde eine PCR-Reaktion durchgeführt, in der pBluescript hEP4 CT ST335-338A als Matrize und die Primer SM 1f und SM 3r eingesetzt wurden. Der Primer SM 1f war mit dem in 4.2.1 beschriebenen Primer identisch, die notwendigen Basenaustausche für T369A und S(370,371,374,377,379,382)A waren in dem SM 3r-Primer lokalisiert, der 5' eine *Sma* I-Erkennungssequenz trug. Zusätzlich enthielt der SM 3r an Position 1116 eine weitere stille Punktmutation (C-T), die eine durch die S372A-Substitution neu entstehende *Sty* I-Schnittstelle eliminierte und die Klonierung der einzelnen Fragmente mit den nur einmal im Fragment vorkommenden Enzymen ermöglichte. Die Klonierung wurde über die *Kpn* I- und die *Sma* I-Schnittstelle durchgeführt, da durch Spaltung mit den Enzymen *SnaB* I und *Sma* I ein cDNA-Fragment mit nicht überlappenden Enden entstanden wäre, wodurch die Orientierung des Fragmentes während der Klonierungen nicht hätte bestimmt werden können. Das 177 bp große Produkt (Abb. 11 B) wurde mit *Kpn* I und *Sma* I geschnitten und in den pBluescript hEP4 CT ST335-338A kloniert (Abb. 11 A). Die Klonierung der in *E. coli* amplifizierten und daraus isolierten Plasmide wurde

durch eine Spaltungsreaktion mit anschließender Gelelektrophorese überprüft und das Einfügen der Mutationen durch Sequenzierung bestätigt. Der erhaltene pBluescript hEP4 CT ST335-338; 369-382A wurde für die weitere Synthese der Rezeptormutanten verwendet.



**Abb. 10: Synthese des pBluescript hEP4 CT ST335-338A.** A) Dargestellt ist das für die PCR-Reaktion verwendete Plasmid und die notwendigen Primer (SM 1f und EP4 Xba r). Mit dem Primer SM 1f wurden die Mutationen ST335-338A in die cDNA eingefügt und die *Kpn* I-Erkennungssequenz an das für die C-terminale Domäne codierende Fragment angefügt. Über die in den Primern enthaltenen Schnittstellen wurde das neue cDNA-Fragment in den pBluescript-Vektor einkloniert. Die für den FLAG-hEP4 wt-Rezeptor und die für den hEP4 CT codierenden Sequenzen sind weiß, die flankierenden Elemente der Vektoren sind grau dargestellt. Weiterhin sind die verwendeten Restriktionsschnittstellen (*Kpn* I und *Xba* I) und das erhaltene Klonierungsprodukt mit den eingefügten Mutationen ST335-338A (schwarz) gezeigt. B) Dargestellt ist das durch PCR amplifizierte Produkt. Für einen 50 µl PCR-Ansatz wurden 5 ng Plasmid mit je 30 pmol Vorwärts- und Rückwärtsprimer und 2 U Powerscript-DNA-Polymerase eingesetzt (siehe 3.1.3). Das mutierte DNA-Fragment wurde mit folgendem Programm amplifiziert: 3 min 95°C; 35 x (1 min 95°C; 1 min 55°C; 2 min 72°C); 10 min 72°C und in einem 1% (w/v) Agarose-Gel aufgetrennt. Die Analyse zeigte das bei ca. 500 bp erwartete DNA-Fragment CT 335-488(ST335-338A).



**Abb. 11: Synthese des pBluescript hEP4 CT ST335-338; 369-382A.** A) Dargestellt ist das für die PCR-Reaktion verwendete Plasmid und die notwendigen Primer (SM 1f und SM 3r). Mit dem Primer SM 3r wurden die Mutationen ST369-382A in die cDNA eingefügt. Über die in den Primern enthaltenen Schnittstellen wurde das neue cDNA-Fragment in den pBluescript hEP4 CT ST335-338A einkloniert. Die für die C-terminale Domäne codierende Sequenz der hEP4-R-cDNA ist weiß, die flankierenden Elemente des Vektors sind grau dargestellt. Weiterhin sind die verwendeten Restriktionsschnittstellen (*Kpn* I und *Sma* I) und das erhaltene Klonierungsprodukt mit den eingefügten ST369-382A-Mutationen (schwarz) gezeigt. B) Dargestellt ist das, wie in Abb. 10 beschrieben, durch PCR amplifizierte Produkt. Die Analyse in einem 2% (w/v) Agarose-Gel zeigte das bei ca. 180 bp erwartete DNA-Fragment CT 335-384(ST335-338; 369-382A).

## 4.2.3 Einfügen der ST428-443A-Mutationen in den pBluescript hEP4 CT ST335-338; 369-382A

Zum Einfügen der ST428-443A-Mutationen wurden drei PCR-Reaktionen durchgeführt, in denen der pcDNA3 FLAG-hEP4 wt-R in der ersten und zweiten Reaktion als Matrizen-cDNA und die Primer Hind EP4 f und SM 6r bzw. SM 6f und EP4 Xba r eingesetzt wurden. Der pcDNA3 FLAG-hEP4 wt-R wurde als Matrizen-cDNA gewählt, da die PCR-Reaktionen parallel zur Synthese des pBluescript hEP4 ST ST335-338; 369-382A durchgeführt wurden. Die notwendigen Basenaustausche für T(428,429,433,439)A und S(430,437,440,442,443)A waren in den komplementären SM 6f- und SM 6r-Primern lokalisiert. Die amplifizierten 1372 bp großen (NT 1-444(ST428-443A)) und 207 bp großen (CT 427-488(ST428-443A)) Megaprimer (Abb. 12 B) wurden mit den flankierenden Primern Hind FLAG EP4 f und EP4

Xba r in eine dritte PCR-Reaktion eingesetzt. Das 1519 bp große Produkt (Abb. 12 B) der dritten PCR wurde mit *Sty* I und *Xba* I geschnitten und in den pBluescript hEP4 CT ST335-338; 369-382A kloniert (Abb. 12 A). Die Klonierung der in *E. coli* amplifizierten und daraus isolierten Plasmide wurde durch eine Spaltungsreaktion mit anschließender Gelelektrophorese überprüft und das Einfügen der Mutationen durch Sequenzierung bestätigt. Der erhaltene pBluescript hEP4 CT ST335-338; 369-382; 428-443A wurde für die weitere Synthese der Rezeptormutanten verwendet.



**Abb. 12: Synthese des pBluescript hEP4 CT ST335-338; 369-382; 428-443A.** Dargestellt ist das für die PCR-Reaktionen verwendete Plasmid und die notwendigen Primer (Hind FLAG EP4 f und SM 6r sowie SM 6f und EP4 Xba r). Mit den Primern SM 6f und SM 6r wurden die neuen Mutationen ST428-443A in die cDNA eingefügt. Über die in der cDNA enthaltenen Schnittstellen wurde das neu synthetisierte cDNA-Fragment in den pBluescript hEP4 CT ST335-338; 369-382A einkloniert. Die für den FLAG-hEP4 wt-Rezeptor und die für den hEP4 CT codierenden Sequenzen sind weiß, die flankierenden Elemente des Vektors sind grau dargestellt. Weiterhin sind die verwendeten Restriktionsschnittstellen (*Sty* I und *Xba* I) und das erhaltene Klonierungsprodukt mit den eingefügten ST428-443A-Mutationen (schwarz) gezeigt. B) Dargestellt sind die, wie in Abb. 10 beschrieben, durch PCR amplifizierten Produkte. Die Analyse in einem 1% (w/v) Agarose-Gel zeigte wie erwartet das ca. 1300 bp große, durch Hind FLAG EP4 f und SM 6r (NT 1-444(ST428-443)), das ca. 200 bp große, durch SM 6f und EP4 Xba r (CT 427-488(ST428-443)) amplifizierte cDNA-Fragment.

#### 4.2.4 Einfügen der ST354-366; 400-405A-Mutationen in pBluescript hEP4 CT ST335-338; 369-382; 428-443A

Zum Einfügen der ST354-366; 400-405A-Mutationen wurde eine PCR-Reaktion durchgeführt, in der der pBluescript hEP4 CT ST335-338; 369-382; 428-443A als Matrize und die Primer SM 2f und SM 5r eingesetzt wurden. Die notwendigen Basenaustausche für S(354,359,364,366)A waren in dem Primer SM 2f lokalisiert, der 5' die *Dra* II-Erkennungssequenz trug, die notwendigen Basenaustausche für S(400,405)A waren in dem Primer SM 5r lokalisiert, der 5' die *Sty* I-Erkennungssequenz trug. Das 182 bp große Produkt (Abb. 13 B) wurde mit *Dra* II und *Sty* I geschnitten und in den pBluescript hEP4 CT ST335-338; 369-382; 428-443A, der mit den gleichen Enzymen geschnitten worden war, einkloniert (Abb. 13 A). Die Klonierung der in *E. coli* amplifizierten und daraus isolierten Plasmide wurde durch eine Spaltungsreaktion mit anschließender Gelelektrophorese überprüft und das Einfügen der Mutationen durch Sequenzierung bestätigt. Der erhaltene pBluescript hEP4 CT ST335-382; 400-443A wurde für die weitere Synthese der Rezeptormutanten verwendet.

#### 4.2.5 Einfügen der ST448-484A-Mutationen in pBluescript hEP4 CT ST335-382; 400-443A

Zum Einfügen der ST448-484A-Mutationen wurden drei PCR-Reaktionen durchgeführt, in denen der pBluescript hEP4 CT ST335-338; 369-382; 428-443A als Matrize und die Primer SM 4f und SM 7r bzw. SM 7f und SM 8r eingesetzt wurden. Die notwendigen Basenaustausche für S(448,450,460)A waren auf den komplementären Primern SM 7f und SM 7r lokalisiert, die notwendigen Basenaustausche für die S(470,471,478,484)A- und T(475,480)A-Mutationen waren auf dem SM 8r-Primer lokalisiert, der 5' die Xba I-Erkennungssequenz trug. Die in den PCR-Reaktionen amplifizierten, 245 bp großen (CT 383-462(ST389-394, 428-460A)) und 139 bp großen (CT 448-488(ST448-488)) Megaprimer (Abb. 14 B) wurden in eine dritte PCR-Reaktion mit den Primern SM 4f und SM 8r eingesetzt. Das 337 bp große Produkt (CT 383-488(ST389-394,428-488)) (Abb. 14 B) wurde mit Sty I und Xba I geschnitten und in den pBluescript hEP4 CT ST335-382; 400-443A kloniert (Abb. 14 A). Da die PCR-Reaktionen parallel zur Synthese des pBluescript hEP4 ST335-382; 400-443A durchgeführt wurden, konnte dieses Konstrukt nicht als MatrizencDNA verwendet werden. Daher diente der SM 4f nur als Synthese-Primer und die über diesen Primer eingefügten Mutationen gingen durch die Klonierung des Produktes über Sty I und Xba I verloren, wurden aber über eine weitere PCR-Reaktion eingefügt. Die Klonierung der in E. coli amplifizierten und daraus isolierten Plasmide wurde durch eine Spaltungsreaktion mit anschließender Gelelektrophorese überprüft und das Einfügen der Mutationen durch Sequenzierung bestätigt. Der erhaltene pBluescript hEP4 CT ST335-382; 400-484A wurde für die weitere Synthese der Rezeptormutanten verwendet.



**Abb. 13: Synthese des pBluescript hEP4 CT ST335-382; 400-443A.** A) Dargestellt ist das für die PCR-Reaktion verwendete Plasmid und die notwendigen Primer (SM 2f und SM 5r). Mit den Primern SM 2f und SM 5r wurden die neuen Mutationen ST534-366A und ST400-405A in die cDNA eingefügt. Über die in den Primern enthaltenen Schnittstellen wurde das neu synthetisierte cDNA-Fragment in den pBluescript hEP4 CT ST335-338; 369-382; 428-443A einkloniert. Die für den hEP4 CT codierende Sequenz ist weiß, die flankierenden Elemente des Vektors sind grau dargestellt. Weiterhin sind die verwendeten Restriktionsschnittstellen (*Dra* II und *Sty* I) und das erhaltene Klonierungsprodukt mit den eingefügten Mutationen (schwarz) gezeigt. B) Dargestellt ist das, wie in Abb. 10 beschrieben, durch PCR amplifizierte Produkt. Die Analyse in einem 2% (w/v) Agarose-Gel zeigte das erwartete ca. 180 bp große cDNA-Fragment CT 352-411(ST354-382, 400-405A).



Abb. 14: Synthese des pBluescript hEP4 CT ST335-382; 400-484A. A) Dargestellt ist das für die PCR-Reaktion verwendete Plasmid und die notwendigen Primer (SM 4f und SM 7r sowie SM 7f und SM 8r). Mit den Primern SM 4f und SM 7r sowie SM 7f und SM 8r wurden zwei Megaprimer synthetisiert, mit deren Hilfe zusammen mit den Primern SM 4f und SM 8r ein cDNA-Fragment amplifiziert wurde, das über Sty I und Xba I in das zuvor synthetisierte Konstrukt pBluescript hEP4 CT ST335-382; 400-443A kloniert wurde. Mit den Primern SM 7f und SM 7r wurden die Mutationen ST448-460A und mit dem Primer SM 8r die Mutationen ST470-484A eingefügt. Die für hEP4 CT codierende Sequenz ist weiß, die flankierenden Elemente des Vektors sind hellgrau dargestellt. Weiterhin sind die verwendeten Restriktionsschnittstellen (Sty I und Xba I (Pfeile)) und das erhaltene Klonierungsprodukt mit den eingefügten Mutationen (dunkelgrau) gezeigt. B) Dargestellt sind die, wie in Abb. 10 beschrieben, durch PCR amplifizierten Produkte. Die Analyse in einem 2% (w/v) Agarose-Gel zeigte wie erwartet das ca. 240 bp große, durch SM 4f und SM 7r (CT 383-462(ST389-394, 428-460A)), das ca. 140 bp große, durch SM 7f und SM 8r (CT 448-488(ST448-488)) und das ca. 340 bp große, durch SM 4f und SM 8r (CT 383-488(ST389-394,428-488)) amplifizierte DNA-Fragment.

#### 4.2.6 Einfügen der ST389-394A-Mutationen in pBluescript hEP4 CT ST335-382; 400-484A und Eliminierung der durch T394A-Substitution neu entstehenden *Dra* II-Schnittstelle

Zum Einfügen der ST389-394A-Mutationen wurde eine PCR-Reaktion durchgeführt, in der der pBluescript hEP4 CT ST335-382; 400-484A als Matrize und die Primer SM 4f und SM 8r eingesetzt wurden. Die notwendigen Basenaustausche für S(389,390,392)A und T(391,394)A waren in dem SM 4f-Primer lokalisiert, der 5' die Sma I-Erkennungssequenz trug. Zusätzlich enthielt der SM 4f an Position 1179 eine weitere stille Mutation (G-A), die die durch die T394A-Substitution neu entstehende Dra II-Schnittstelle eliminierte und die Klonierung der einzelnen Fragmente mit den nur einmal im Fragment vorkommenden Schnittstellen ermöglichte. Der SM 8r entsprach dem unter 4.2.5 beschriebenen Primer. Das amplifizierte 337 bp große Produkt (CT 383-488(ST389-488A)) (Abb. 15 B) wurde mit Sma I und Xba I geschnitten und in den pBluescript hEP4 CT ST335-382; 400-484A kloniert (Abb. 15 A). Die Klonierung der in *E. coli* amplifizierten und daraus isolierten Plasmide wurde durch eine Spaltungsreaktion mit anschließender Gelelektrophorese überprüft und das Einfügen der Mutationen durch Sequenzierung bestätigt. In dem erhaltenen pBluescript hEP4 CT ST335-484A waren alle Serine und Threonine durch Alanine substituiert. Durch verschiedene Spaltungsreaktionen und Klonierungen wurden die weiteren Rezeptormutanten hergestellt.

### 4.2.7 Synthese des pBluescript hEP4 CT ST335-405A und des pBluescript hEP4 CT ST428-484A

Es wurden zwei Rezeptormutanten synthetisiert, in denen entweder alle im proximalen Teil oder alle im distalen Teil der C-terminalen Domäne des hEP4-Rezeptors gelegenen Serine und Threonine durch Alanine substituiert waren, um weiter eingrenzen zu können, welche dieser potentiellen Phosphorylierungsstellen Agonisten-abhängig phosphoryliert werden und an der Agonisten-induzierten Internalisierung beteiligt sind. Dazu wurde der pBluescript hEP4 CT und der pBluescript hEP4 CT ST335-484A mit *Kpn* I und *Sty* I geschnitten und die *Kpn* I/*Sty* I-Fragmente zwischen den beiden Konstrukten ausgetauscht. In den Produkten, dem pBluescript hEP4 CT ST335-405A und dem pBluescript hEP4 CT ST428-484A, waren alle im proximalen bzw. distalen Teil der C-terminalen Domäne lokalisierten Serine und Threonine durch Alanine substituiert (Abb. 16). Die Klonierung der in *E. coli* amplifizierten und daraus isolierten Plasmide wurde durch eine Spaltungsreaktion und anschließende Gelelektrophorese überprüft.



**Abb. 15: Synthese des pBluescript hEP4 CT ST335-484A.** A) Dargestellt ist das für die PCR-Reaktion verwendete Plasmid und die notwendigen Primer (SM 4f und SM 8r). Mit dem Primern SM 4f wurden die Mutationen ST389-394A eingefügt. Über die in den Primern enthaltenen Schnittstellen wurde das neu synthetisierte cDNA-Fragment in den pBluescript hEP4 CT ST335-382; 400-443A einkloniert. Die für hEP4 CT codierende Sequenz ist weiß, die flankierenden Elemente des Vektors sind grau dargestellt. Weiterhin sind die verwendeten Restriktionsschnittstellen (*Sma* I und *Xba* I) und das erhaltene Klonierungsprodukt mit den eingefügten Mutationen (schwarz) gezeigt. B) Dargestellt ist das, wie in Abb. 10 beschrieben, durch PCR amplifizierte Produkt. Die Analyse in einem 1% (w/v) Agarose-Gel zeigte das erwartete ca. 340 bp große cDNA-Fragment CT 383-488(ST389-488A).



Abb. 16: Synthese des pBluescript hEP4 CT ST335-405A und des pBluescript hEP4 CT ST428-484A. Dargestellt sind die verwendeten Ausgangsplasmide und die erhaltenen Klonierungsprodukte. Die Ausgangsplasmide wurden mit *SnaB* I und *Sty* I geschnitten und die einzelnen Fragmente isoliert. Das cDNA-Fragment mit den Mutationen ST335-405A wurde in das Plasmid pBluescript hEP4 CT, das cDNA-Fragment, in dem ST335-405 erhalten waren, in das Plasmid pBluescript hEP4 CT ST335-484A kloniert. Die für die C-terminalen Domänen codierenden Sequenzen sind weiß, die flankierenden Elemente des Vektors sind grau dargestellt. Weiterhin sind die verwendeten Restriktionsschnittstellen (*SnaB* I und *Sty* I) und die Mutationen (schwarz) gezeigt.

## 4.2.8 Synthese des pBluescript hEP4 CT ST335-354; 389-484A und des pBluescript hEP4 CT ST335-382A

Die Analyse der Agonisten-induzierten Phosphorylierung der Mutanten, in denen die Phosphorylierungsstellen entweder im proximalen oder im distalen Teil der C-terminalen Domäne eliminiert worden waren, deutete darauf hin, daß vorwiegend Serine und Threonine im proximalen Teil der C-terminalen Domäne Agonisten-abhängig phosphoryliert werden (siehe 4.6.2). Daher wurden weitere Mutanten mit dem Ziel hergestellt, den Bereich, in dem die für die Agonisten-induzierte Phosphorylierung relevanten Serine und Threonine liegen, weiter einzugrenzen. Dazu wurden entweder die Serine und Threonine im Bereich zwischen 359-382 (ST335-354; 389-484A) bzw. Serin 379 (ST335-377; 382-484A) als einzige in der C-terminalen Domäne belassen oder nur die Serine und Threonine bis einschließlich Serin 382 (ST335-382A) bzw. selektiv Serin 379 (S379A) eliminiert. Zur Synthese des pBluescript

hEP4 CT ST335-354; 389-484A wurden der pBluescript hEP4 CT ST335-484A und der pBluescript hEP4 CT mit den Restriktionsenzymen *Dra* II und *Sma* I geschnitten und anschließend das aus dem pBluescript hEP4 CT herausgeschnittene cDNA-Fragment, in dem die ST359-382 erhalten waren, in den pBluescript hEP4 CT ST335-484A ligiert (Abb. 17).



Abb. 17: Synthese des pBluescript hEP4 CT ST335-354; 389-484A. Dargestellt ist das verwendete Ausgangsplasmid und das erhaltene Klonierungsprodukt. Das Ausgangsplasmid und das Zielplasmid wurden mit *Dra* II und *Sma* I geschnitten und die einzelnen Fragmente isoliert. Das cDNA-Fragment, in dem ST359-382 erhalten waren, wurde anschließend in das Plasmid pBluescript hEP4 CT ST335-484A kloniert. Die für die C-terminalen Domänen codierenden Sequenzen sind weiß, die flankierenden Elemente des Vektors sind grau und die Mutationen sind schwarz dargestellt.

Zur Synthese des pBluescript hEP4 CT ST335-382A wurden der pBluescript hEP4 CT ST335-484A und der pBluescript hEP4 CT mit den Restriktionsenzymen *Kpn* I und *Sma* I geschnitten und anschließend das aus dem pBluescript hEP4 CT ST335-484A herausgeschnittene cDNA-Fragment, in dem die ST335-382 durch Alanine substituiert waren, in den pBluescript hEP4 CT ligiert (Abb. 18). Anschließend wurde die Klonierung der in *E. coli* amplifizierten und daraus isolierten Plasmide durch eine Spaltungsreaktion und Gelelektrophorese überprüft.



**Abb. 18: Synthese des pBluescript hEP4 CT ST335-382A.** Dargestellt ist das verwendete Ausgangsplasmid und das erhaltene Klonierungsprodukt. Das Ausgangsplasmid und das Zielplasmid wurden mit *Kpn* I und *Sma* I geschnitten und die einzelnen Fragmente isoliert. Das cDNA-Fragment mit den Mutationen ST335-382A wurde anschließend in das Plasmid pBluescript hEP4 CT kloniert. Die für die C-terminalen Domänen codierenden Sequenzen sind weiß, die flankierenden Elemente des Vektors sind grau und die Mutationen sind schwarz dargestellt.

Die mutierten, für die C-terminale Domäne codierenden Fragmente wurden über *SnaB* I und *Xba* I aus pBluescript herausgeschnitten (siehe 3.4). Anschließend wurden die in Agarose-Gelen aufgetrennten und daraus isolierten 3'-Fragmente des hEP4-R zusammen mit dem 5'-Fragment des hEP4-R in den eukaryoten Expressionsvektor pcDNA3 kloniert (siehe 4.3).

#### 4.2.9 Synthese der FLAG-hEP4 S379A- und der FLAG-hEP4 ST335-377; 382-484A-Rezeptor-cDNA

Durch sequenzgerichtete Mutagenese mit dem pcDNA3 FLAG-hEP4 wt-R und den Primern Hind FLAG EP4 f und EP4 S379A r sowie EP4 S379A f und EP4 Xba r wurden ein 1187 bp großer Megaprimer (NT 1-382(S379A)) und ein 356 bp großer Megaprimer (CT 376-488(S379A)) amplifiziert (Abb. 19 B), mit deren Hilfe unter Verwendung der flankierenden Primer Hind FLAG EP4 f und EP4 Xba r die komplette mutierte FLAG-hEP4-cDNA amplifiziert wurde (Abb.19 A). Das erhaltene 1519 bp große Produkt wurde mit *SnaB* I und *Xba* I verdaut und das für die C-terminale Domäne codierende mutierte cDNA-Fragment mit dem zuvor sequenzierten FLAG-hEP4 NT in den pcDNA3-Vektor ligiert (Abb 19 A). Die erfolgreiche Klonierung wurde durch Restriktionsfragmentlängen-Analyse überprüft und die eingeführte Mutation durch Sequenzierung mit dem SP6-Sequenzierprimer in einer Richtung bestätigt.



Abb. 19: Synthese des pcDNA3 FLAG-hEP4 S379A. A) Dargestellt ist das für die PCR-Reaktionen verwendete Plasmid und die notwendigen Primer (Hind FLAG EP4 f und EP4 S379A r sowie EP4 S379A f und EP4 Xba r). Mit den Primern Hind FLAG EP4 f und EP4 S379A r sowie EP4 S379A f und EP4 Xba r wurden zwei Megaprimer synthetisiert, mit deren Hilfe zusammen mit den Primern Hind FLAG EP4 f und EP4 Xba r die komplette FLAG-hEP4 S379A cDNA amplifiziert wurde. Mit den komplementären Primern EP4 S379A f und EP4 S379A r wurde die S379A-Mutation eingefügt. Die die Mutation tragende FLAG-hEP4-cDNA wurde mit SnaB I und Xba I verdaut und die für die C-terminale Domäne codierende Sequenz in den pcDNA3 FLAG-hEP4 NT kloniert. Die für den FLAG-hEP4 codierende Sequenz ist weiß, die flankierenden Elemente des Vektors sind grau dargestellt. Weiterhin sind die verwendeten Restriktionsschnittstellen (SnaB I und Xba I) und das erhaltene Klonierungsprodukt mit der eingefügten Mutation (schwarz) gezeigt. B) Dargestellt sind die, wie in Abb. 10 beschrieben, durch PCR amplifizierten Produkte. Die Analyse in einem 1% (w/v) Agarose-Gel zeigte wie erwartet das ca. 1200 bp große, durch Hind FLAG EP4 f und EP4 S379A r (NT 1-382(S379A)) und das ca. 350 bp große, durch EP4 S379A f und EP4 Xba r (CT 376-488(S379A)) amplifizierte DNA-Fragment.

Zur Synthese der Rezeptor-cDNA, in der alle Serine und Threonine außer S379 mutiert waren, wurde eine sequenzgerichtete Mutagenese mit drei PCR-Reaktionen mit pcDNA3 FLAG-hEP4 ST335-484A als Matrizen-cDNA und den Primern Hind FLAG EP4 f und EP4 A379S r sowie EP4 A379S f und EP4 Xba r durchgeführt. Der in der ersten PCR-Reaktion amplifizierte 1187 bp große Megaprimer (NT 1-382 (ST335-377,382A)) und der in der zweiten PCR-Reaktion amplifizierte 356 bp große Megaprimer (CT 376-488(S377,382-484A)) (Abb. 20 B) wurden unter Verwendung der flankierenden Primer Hind FLAG EP4 f

und EP4 Xba r in eine dritte PCR-Reaktion eingesetzt, in der die FLAG-hEP4 ST335-377; 382-484A-cDNA amplifiziert wurde (Abb. 20 A).



Abb. 20: Synthese des pcDNA3 FLAG-hEP4 S335-377; 382-484A. A) Dargestellt ist das für die PCR-Reaktionen verwendete Plasmid und die notwendigen Primer (Hind FLAG EP4 f und EP4 A379S r sowie EP4 A379S f und EP4 Xba r). Mit den Primern Hind FLAG EP4 f und EP4 A379S r sowie EP4 A379S f und EP4 Xba r wurden zwei Megaprimer synthetisiert, mit deren Hilfe zusammen mit den Primern Hind FLAG EP4 f und EP4 Xba r die komplette FLAG-hEP4 ST33-337; 382-484A-cDNA amplifiziert wurde. Mit den komplementären Primern EP4 A379S f und EP4 A379S r wurde das ursprünglich an dieser Position vorhandene Serin wieder eingefügt. Die FLAG-hEP4 ST335-377; 382-484A-cDNA wurde mit SnaB I und Xba I gespalten und die für die C-terminale Domäne codierende Sequenz in den pcDNA3 FLAG-hEP4 NT kloniert. Die für FLAG-hEP4 codierende Sequenz ist weiß, die flankierenden Elemente des Vektors sind grau dargestellt. Weiterhin sind die verwendeten Restriktionsschnittstellen (SnaB I und Xba I) und das erhaltene Klonierungs-produkt mit dem eingefügten S379 (magenta) gezeigt. B) Dargestellt sind die, wie in Abb. 10 beschrieben, durch PCR amplifizierten Produkte. Die Analyse in einem 1% (w/v) Agarose-Gel zeigte wie erwartet das ca. 1200 bp große, durch Hind FLAG EP4 f und EP4 A379S r (NT 1-382(ST335-377,383A)) und das ca. 350 bp große, durch EP4 A379S f und EP4 Xba r (CT 376-488(ST377,382-484A)) amplifizierte DNA-Fragment.

Die erhaltene 1519 bp große komplette Rezeptor-cDNA wurde mit *SnaB* I und *Xba* I gespalten und das für die C-terminale Domäne codierende Fragment mit dem zuvor sequenzierten FLAG-hEP4 NT in den pcDNA3-Vektor ligiert (Abb. 20 A). Die erfolgreiche

Klonierung wurde durch Restriktionsfragmentlängen-Analyse überprüft und die Einführung des Ser379 durch Sequenzierung mit dem SP6-Sequenzierprimer in einer Richtung bestätigt.

### 4.3 Klonierung der verschiedenen mutierten 3'-Fragmente und des 5'-Fragmentes der FLAG-hEP4-Rezeptor-cDNA in den Expressionvektor pcDNA3

Zur Expression der verschiedenen kompletten FLAG-hEP4 Rezeptor-cDNAs wurde der pcDNA3-Vektor gewählt, da er über den starken CMV-Promotor und die nötigen Prozessierungssignale verfügt. Zusätzlich trägt dieser Vektor auch ein Neomycin-Resistenzgen, durch das er sich zur stabilen Expression der Rezeptorpoteine in eukaryoten Zellen durch G-418-Selektion eignet.

Die verschiedenen pcDNA3/FLAG-hEP4-R-Plasmide wurden aus transformierten *E. coli* XL1 (blue)-Zellen isoliert und 500 ng der Plasmid-DNA mit den Restriktionsenzymen *Hind* III und *Xba* I gespalten. Die Spaltprodukte wurden in einem 1% (w/v) Agarose-Gel aufgetrennt und visualisiert. Es waren zwei Framente mit einer Größe von 1505 bp für die jeweilige FLAG-hEP4-R-cDNA und von 5351 bp für den pcDNA3-Vektor zu sehen (Abb. 21).

Von den Bakterienkolonien, welche die Plasmide der verschiedenen pcDNA3 FLAG-hEP4-RcDNAs mit der richtigen Sequenz trugen, wurde anschließend eine Übernachtkultur in LB-Amp-Medium angelegt und die Plasmid-DNA aus den Bakterienkulturen im Maxi-Maßstab isoliert. Die gewonnene Plasmid-DNA wurde zur Transfektion der eukaryoten Zellen eingesetzt.



Abb. 21: Überprüfung der Klonierung der verschiedenen Rezeptor-cDNAs in den Expressionsvektor pcDNA3. Die Plasmid-DNA wurde aus den Übernachtkulturen durch Affinitätschromatographie isoliert und 1 µg der isolierten DNA für 90 min mit den Restriktionsenzymen *Hind* III und *Xba* I geschnitten, anschließend auf einem 1% Agarose-Gel aufgetennt und mittels Ethidiumbromid-Interkalation visualisiert. Dargestellt ist jeweils eines der positiv getesteten Plasmide. Es waren die erwarteten Framente mit einer Größe von ca. 1500 bp für die FLAG-hEP4-Rezeptor-cDNA und ca. 5400 bp für den pcDNA3-Vektor für alle klonierten Rezeptoren zu sehen.

## 4.4 Stabile Expression des FLAG-hEP4 wt-Rezeptors und der verschiedenen mutierten FLAG-hEP4-Rezeptoren

Zur stabilen Expression der pcDNA3/FLAG-hEP4 wt-R und der entsprechenden mutierten Rezeptor-cDNAs wurden HEK293-Zellen mit der modifizierten Calcium-Phosphat-Methode transfiziert (siehe 3.14.3) und die die verschiedenen Rezeptorproteine stabil exprimierenden Zellen mittels des Neomycinderivates G-418 selektiert (siehe 3.14.4). Für alle Rezeptoren konnten mehrere G-418-resistente Kolonien isoliert und die daraus resultierenden Zellklone kultiviert werden. Die Rezeptorexpression dieser Klone wurde durch Bestimmung der spezifischen [<sup>3</sup>H]-PGE<sub>2</sub>-Bindung getestet. Von den Zellinien, welche die mutierten Rezeptor-cDNAs exprimierten, wurden die Klone ausgewählt, die die höchste spezifische [<sup>3</sup>H]-PGE<sub>2</sub>-

Bindung zeigten. Aus den stabilen Zellinien wurde, um zu überprüfen, ob der richtige Rezeptor exprimiert wurde, Gesamt-RNA isoliert (siehe 3.15), diese in cDNA umgeschrieben (siehe 3.16) und anschließend mit Primerkombinationen, mit denen der zu überprüfende Sequenzabschnitt amplifiziert werden konnte, PCR-Reaktionen durchgeführt (siehe 3.17). Die erhaltenen PCR-Produkte wurden in eine Sequenzierreaktion eingesetzt (siehe 3.10), wodurch die in den Zellen exprimierten hEP4-R identifiziert wurden.

#### 4.5 Charakterisierung der in HEK293-Zellen stabil exprimierten FLAG-hEP4-Rezeptorproteine

#### 4.5.1 Immunologischer Nachweis der stabil exprimierten FLAG-hEP4 wt- und der mutierten FLAG-hEP4-Rezeptorproteine durch SDS-PAGE und Western-Blot-Analyse

Für den immunologischen Nachweis der stabil exprimierten Rezeptorproteine wurden die verschiedenen Rezeptorproteine solubilisiert, mit dem FLAG-M2-Antikörper immunpräzipitiert (siehe 3.19.2) und parallel die spezifische [<sup>3</sup>H]-PGE<sub>2</sub>-Bindung von Rezeptor-exprimierenden HEK293-Zellen bestimmt (siehe 3.18.4). Die auf die spezifische [<sup>3</sup>H]-PGE<sub>2</sub>-Bindung normalisierte hEP4-Rezeptormenge wurde in einer SDS-PAGE getrennt, auf eine PVDF-Membran transferiert und mit Hilfe eines gegen die C-terminale Domäne des hEP4-R gerichteten, polyklonalen Antiserums aus Kaninchen, einem Peroxidase-gekoppelten Sekundärantikörper und einem Chemilumineszenzsubstrat der Peroxidase detektiert (siehe 3.19). Als Kontrolle dienten Immunpräzipitate nicht-transfizierter HEK293-Zellen.

Das von der cDNA-Sequenz des hEP4-R abgeleitete Molekulargewicht des hEP4-R beträgt ca. 54 kDa. Der FLAG-hEP4-R, sowie die modifizierten Rezeptorproteine konnten jedoch alle als breite Bande mit einem Molekulargewicht von ca. 70-100 kDa nachgewiesen werden, welche in nicht-transfizierten HEK293-Zellen nicht zu beobachten war (Abb. 22). Die Differenz von errechnetem und tatsächlichem Molekulargewicht der Rezeptorproteine ist möglicherweise auf eine komplexe Glykosylierung der Rezeptoren an den potentiellen N-Glykosylierungsstellen Asn 7 und/oder Asn 177 zurückzuführen, was auf eine korrekte Prozessierung der Rezeptoren beim Transport vom endoplasmatischen Retikulum zur Plasmamembran rückschließen lassen würde.

Die Intensität der Rezeptorbande für die Rezeptoren FLAG-hEP4 ST335-484A-R und FLAG-hEP4 ST335-377; 382-484A-R lag unter der Intensität der restlichen Rezeptorbanden. Dies ist möglicherweise darauf zurückzuführen, daß durch die Mutation aller/nahezu aller Serine und Threonine in der C-terminalen Domäne dieser Rezeptoren potentielle Epitope für Antikörper des polyklonalen anti-hEP4-R-Ct-Antiserums zerstört wurden.

Neben der Hauptrezeptorbande bei ca. 70–100 kDa konnte bei dem FLAG-hEP4-R S379A noch eine Bande bei ca. 54 kDa und bei dem FLAG-hEP4-R ST335-377; 382-484A noch zwei Banden von ca. 62 und 65 kDa nachgewiesen werde, welche in nicht-transfizierten HEK293-Zellen nicht zu beobachten waren. Hierbei könnte es sich möglicherweise um nicht glykosylierte bzw. nur "core"-glykosylierte Formen der Rezeptoren handeln. Es ist jedoch nicht auszuschließen, daß es sich bei diesen Banden um proteolytische, C-terminale Abbauprodukte der Rezeptoren handelt, die nach der Immunpräzipitation mit dem FLAG-M2 Antikörper entstanden sein müßten.

Zusätzlich zu den Banden des hEP4-R konnte in allen Spuren, einschließlich der nichttransfizierten Kontrollzellen, eine prominente Bande bei ca. 50 kDa beobachtet werden, bei der es sich wahrscheinlich um eine unspezifische Reaktion des Primär- oder Sekundärantikörpers mit der schweren Kette des FLAG-M2-Antikörpers handelt.



Abb. 22: Westernblotanalyse der in HEK293-Zellen stabil exprimierten Rezeptorproteine. Die das FLAG-Epitop tragenden hEP4-Rezeptoren wurden solubilisiert, mit dem FLAG-M2-Antikörper immunpräzipitiert (siehe 3.19.2) und die Rezeptor-Expression in einem parallelen Ansatz durch Bestimmung der spezifischen [<sup>3</sup>H]-PGE<sub>2</sub>-Bindung quantifiziert. Die auf die spezifische Bindung normalisierte Menge an Rezeptorprotein wurde in einer SDS-PAGE aufgetrennt (siehe 3.19.4), durch Elektrotransfer auf eine PVDF-Membran überführt (siehe 3.19.6) und die Rezeptorproteine mit einem gegen die C-terminale Domäne des FLAG-hEP4-Rezeptors gerichteten polyklonalen Antiserum, einem Peroxidase-gekoppelten Sekundärantikörper und einem Chemilumineszenzsubstrat der Peroxidase detektiert (siehe 3.19.8).

#### 4.5.2 Untersuchung der Plasmamembranlokalisation der verschiedenen stabil exprimierten FLAG-hEP4-Rezeptorproteine durch Immunfluoreszenz-Mikroskopie

Zur Untersuchung der Plasmamembranlokalisation der verschiedenen FLAG-hEP4-Rezeptorproteine wurden Rezeptor-exprimierende HEK293-Zellen auf Glasdeckgläschen kultiviert (siehe 3.25.2). Nach Fixierung und Permeabilisierung wurden die Rezeptorproteine mit dem FLAG-M2-mAk und einem Cy3-gekoppelten Sekundärantikörper (siehe 3.25.5) nachgewiesen. Nach Biotinylierung der intakten Zellen vor der Fixierung wurde die Plasmamembran mit einem FITC-gekoppelten Streptavidin-Konjugat (siehe 3.25.3) markiert. Die Aufnahmen wurden mit einem konfokalen Laser-Scan-Mikroskop gemacht (siehe 3.25.6).

In den nicht-transfizierten HEK293-Kontrollzellen war mit dem FLAG-M2-mAk und dem Cy3gekoppelten Sekundärantikörper (rot) keine spezifische Bindung zu erkennen; es war in den Überlagerungen der bei den unterschiedlichen Anregungs- und Emissions-Wellenlängen aufgenommenen Bilder nur die durch das FITC-Konjugat (grün) markierte Plasmamembran sichtbar (Abb. 23 a). In den die verschiedenen Rezeptoren stabil exprimierenden HEK293-Zellen (Abb. 23 b-i) konnte die Expression und die Plasmamembranlokalisation der exprimierten Rezeptorproteine nachgewiesen werden, was durch die Kolokalisation der grün dargestellten Plasmamembran mit den rot dargestellten Rezeptorproteinen und der daraus resultierenden Gelbfärbung zu sehen war. Für die den FLAG-hEP4 S379A-R exprimierenden HEK293-Zellen (Abb. 23 h) konnte eine geringe perinukleäre Ansammlung der Rezeptorproteine nachgewiesen werden, die auf ein mögliches Verbleiben eines Teils der Rezeptorproteine im endoplasmatischen Retikulum hindeutete. Dies steht im Einklang mit den Ergebnissen des Rezeptornachweises im Western-Blot, bei der der FLAG-hEP4 S379A-R als potentiell nicht-glykosylierter, nicht prozessierter Rezeptor nachgewiesen werden konnte (Abb. 22). Allerdings wies diese Zellinie in Bindungsstudien (siehe 4.5.3) auch die höchste Rezeptordichte von allen Zellinien auf.



Abb. 23: Plasmamembranlokalisation der verschiedenen, in HEK293-Zellen stabil exprimierten FLAG-hEP4-Rezeptoren. Stabil transfizierte HEK293-Zellen wurden auf Fibronectin- und Poly-L-Lysin-beschichteten Glasdeckgläschen für 24 h kultiviert. Anschließend wurden die Hydroxylgruppen der plasmamembranständigen Kohlenhydrate zu Aldehydgruppen oxidiert und die entstandenen Aldehydgruppen biotinyliert. Die Zellen wurden fixiert, permeabilisiert und die Rezeptoren mit dem FLAG-M2-mAk und einem Cy3gekoppelten Sekundärantikörper (rot), die Plasmamembran mit einem FITC-gekoppelten Streptavidin-Konjugat (grün) markiert. Die Präparate wurden in Mowiol eingebettet und die Aufnahmen mit einem konfokalen Laser-Scan-Mikroskop gemacht. Dargestellt ist die Überlagerung der bei den unterschiedlichen Anregungs- und Emissions-Wellenlängen aufgenommenen Bilder. a = nicht transfizierte HEK293-Zellen, b = FLAG-hEP4 wt-R, c = FLAG-hEP4 ST335-484A-R, d = FLAG-hEP4 ST335-405A-R, e = FLAG-hEP4 ST428-484A-R, f = FLAG-hEP4 ST335-354; 389-484A-R, g = FLAG-hEP4 ST335-382A-R, h = FLAGhEP4 S379A-R, i = FLAG-hEP4 ST335-377; 382-484A. Die Plasmamembran erscheint grün (a). Durch die Überlagerung der grün dargestellten Plasmamembran mit dem rot dargestellten Sekundärantikörper für den Rezeptornachweis erscheint die Plasmamembran in den Rezeptor-exprimierenden HEK293-Zellen gelb (b-i).

# 4.5.3 Bestimmung der Affinität und der maximalen Bindungskapazität der verschiedenen stabil exprimierten FLAG-hEP4-Rezeptoren für PGE<sub>2</sub> durch Sättigungsbindungsstudien

Zur Bestimmung der Affinität und der maximalen Bindungskapazität für PGE<sub>2</sub> wurden Membranen der mit den verschiedenen Rezeptoren stabil transfizierten HEK293-Zellen präpariert (siehe 3.18.2) und in Sättigungsbindungsstudien eingesetzt. 25 µg Membranprotein wurden mit steigenden Konzentrationen PGE<sub>2</sub> von 0-20 µM und 5 nM [<sup>3</sup>H]-PGE<sub>2</sub> für 1 h bei Raumtemperatur unter Schütteln inkubiert und die Reaktion durch anschließende Vakuumfiltration beendet (siehe 3.20.2). Aus den Bindungsdaten wurden mit dem Computerprogramm LIGAND (Munson und Rodbard (1980)) die K<sub>d</sub>-Werte und die maximale Bindungkapazität durch nicht-lineare Regression berrechnet (Tab. 7).

Die ermittelte Dissotiationskonstante (K<sub>d</sub>) für PGE<sub>2</sub> betrug für den FLAG-hEP4 wt-R 1,31  $\pm$  0,51 nM (Tab. 7). Durch Einführen der Mutationen in die C-terminale Domäne kam es nicht zu einer signifikanten Verschiebung der K<sub>d</sub>-Werte (Tab. 7). Lediglich der FLAG-hEP4 ST335-377; 382-484A-R wies eine tendenziell höhere Affinität zum Liganden als der FLAG-hEP4 wt-R auf.

Tab. 7: K<sub>d</sub>-Werte und maximale Bindungskapazität der verschiedenen in HEK293-Zellen stabil exprimierten FLAG-hEP4-Rezeptoren. Aus HEK293-Zellen, die den Wildtyp hEP4-R oder Mutanten exprimierten, in denen die Serine und Threonine der C-terminalen Domäne teilweise oder vollständig durch Alanine ersetzt worden waren, wurden Membranen isoliert. Die Membranen wurden in Sättigungsbindungsstudien mit [<sup>3</sup>H]-PGE<sub>2</sub> eingesetzt. K<sub>d</sub> und B<sub>max</sub> wurden durch nicht-lineare Regressionsanalyse (LIGAND) berechnet. Die Werte sind Mittelwerte ± S.D. aus drei unabhängigen Versuchen.

Rezeptor	K <sub>d</sub> (nM)	B <sub>max</sub> (pmol/mg)
FLAG-hEP4 wt	1,31 ± 0,51	1,83 ± 0,16
FLAG-hEP4 ST335-484A	3,30 ± 2,60	1,63 ± 0,44
FLAG-hEP4 ST335-405A	1,74 ± 1,20	2,07 ± 0,27
FLAG-hEP4 ST428-484A	1,08 ± 0,97	1,68 ± 0,22
FLAG-hEP4 ST335-354; 389-484A	$2,09 \pm 0,49$	$1,24 \pm 0,27$
FLAG-hEP4 ST335-382A	$1,07 \pm 0,33$	$4,41 \pm 0,53$
FLAG-hEP4 S379A	$2,37 \pm 0,62$	6,19 ± 1,80
FLAG-hEP4 ST335-377; 382-484A	$0,49 \pm 0,1$	1,19 ± 0,65

Für die den Wildtyprezeptor exprimierende Zellinie ergab sich eine  $B_{max}$  von 1,83 ± 0,16 pmol/mg Membranprotein (Tab. 7). Die  $B_{max}$ -Werte der Zellinien, die die mutierten Rezeptorproteine exprimierten, unterschieden sich nicht signifikant von der den

hEP4-R-Wildtyp exprimierenden Zellinie. Lediglich die Zellinien mit den Mutanten FLAGhEP4 ST335-382A-R und FLAG-hEP4 S379A-R hatten einen 2- bzw. 3-fach höhere  $B_{max}$ (Tab. 7).

### 4.5.4 Nachweis der Funktionalität der verschiedenen in HEK293-Zellen stabil exprimierten FLAG-hEP4-Rezeptoren an Membranen

Es ist gezeigt worden, daß die C-terminale Domäne der Prostanoidrezeptoren für die G-Protein-Kopplungskontrolle (Hasegawa et al. (1996)) und/oder -Spezifität (Namba et al. (1993)) relevant ist. Daher war nicht auszuschließen, daß die Substitution einzelner oder mehrerer Serine und Threonine in der C-terminalen Domäne zu einer Veränderung der Kopplungseigenschaften der Rezeptoren führte. Daher wurde die PGE2- und die Forskolininduzierte cAMP-Bildung der die verschiedenen Rezeptoren stabil exprimierenden HEK293-Zellen untersucht. Da die G<sub>s</sub>-Proteine und die Adenylatcyclase membranassoziiert sind, konnten die Versuche zur Funktionalität der Rezeptorproteine an Membranen dieser Zellinien durchgeführt werden. Dazu wurden Membranen aus den die Rezeptoren exprimierenden HEK293-Zellen präpariert (siehe 3.21.2) und in einem ATP-regenerierenden System mit 1 µM PGE<sub>2</sub> oder 1 µM Forskolin, in Anwesenheit von 1 mM IBMX zur Hemmung der Phosphodiesterase, stimuliert (siehe 3.21.3). Anschließend wurde die Menge des gebildeten cAMP mit einem RIA ermittelt (siehe 3.21.4) und parallel die [<sup>3</sup>H]-PGE<sub>2</sub>-Bindung der verwendeten Membranen in Bindungsstudien bestimmt (siehe 3.18.4). Die Menge an gebildetem cAMP wurde unter Einbeziehung der Rezeptoraffinitäten auf die Rezeptordichte bezogen.

In Membranen nicht-transfizierter HEK293-Zellen war eine schwache basale cAMP-Bildung nachweisbar, die durch PGE<sub>2</sub> nur geringfügig gesteigert werden konnte. Diese leichte PGE<sub>2</sub>- abhängige Steigerung der cAMP-Bildung in nicht-transfizierten HEK293-Zellen könnte auf den endogen schwach exprimierten EP2-R zurückzuführen sein (Daten nicht gezeigt).

Die basale unstimulierte cAMP-Bildung war in Membranen von HEK293-Zellen, die mit dem Wildtyp hEP4-R oder den Rezeptormutanten transfiziert waren, nicht signifikant höher als in nicht-transfizierten Zellen. Daher konnte ausgeschlossen werden, daß der Wildtyprezeptor die G<sub>s</sub>-abhängige Signalkette Ligand-unabhängig aktivierte oder die Einführungen der Mutationen in die C-terminale Domäne zu solch einer konstitutiven Aktivität führten.

PGE<sub>2</sub> stimulierte in Membranen von HEK293-Zellen, die mit dem FLAG-hEP4 wt-R oder einer der Rezeptormutanten transfiziert waren, die cAMP-Bildung. Dabei unterschied sich bei Rezeptor-sättigenden (ca. 1000x K<sub>d</sub>) PGE<sub>2</sub>-Konzentrationen die auf die Rezeptordichte normalisierte cAMP-Bildung in Membranen aller untersuchten, die Rezeptormutanten exprimierenden Zellinien, nicht signifikant von der des FLAG-hEP4 wt-R (Abb. 24).



Abb. 24: Nachweis der PGE<sub>2</sub>- und Forskolin-induzierten cAMP-Bildung der die verschiedenen Rezeptoren exprimierenden HEK293-Zellen. Aus HEK293-Zellen, die mit den verschiedenen Rezeptoren stabil transfiziert waren, wurden Membranen präpariert (siehe 3.21.2). Die durch 1µM PGE<sub>2</sub> oder 1µM Forskolin in Anwesenheit von 1 mM IBMX in dieser Membranpräparation stimulierte (siehe 3.21.3) cAMP-Bildung wurde mit einem RIA ermittelt (siehe 3.21.4) und parallel die spezifische [<sup>3</sup>H]-PGE<sub>2</sub>-Bindung der verwendeten Membranen ermittelt (siehe 3.18.4). Die cAMP-Bildungsrate wurde auf die Rezeptormenge normalisiert. Die Werte stellen die Mittelwerte  $\pm$  S.E.M. aus drei Versuchen in Doppelbestimmung dar.

Dies deutet darauf hin, daß die Einführung der Mutationen in die C-terminale Domäne des hEP4-R nicht zu einer Veränderung der G-Protein-Kopplungseffizienz der entsprechenden Rezeptorproteine führte.

Diese Annahme wird auch dadurch unterstützt, daß das Verhältnis der Rezeptorunabhängigen, durch Foskolin stimulierten cAMP-Bildung (Abb. 24) zur maximalen PGE<sub>2</sub>stimulierten cAMP-Bildung in Membranen aller Zellinien annährend gleich war.

# 4.5.5 Bestimmung der EC50-Werte der verschiedenen FLAG-hEP4-Rezeptoren für die PGE<sub>2</sub>-stimulierte cAMP-Bildung an Membranen

Zur Bestimmung der EC50-Werte der PGE<sub>2</sub>-stimulierten cAMP-Bildung wurden Dosis-Wirkungskurven für die verschiedenen Rezeptoren bestimmt. Dazu wurden Membranen aus den verschiedenen FLAG-hEP4-R stabil exprimierenden HEK293-Zellen präpariert (siehe 3.21.2), die cAMP-Bildung mit steigenden PGE<sub>2</sub>-Konzentrationen stimuliert (siehe 3.21.3) und das gebildete cAMP mit einem RIA bestimmt (siehe 3.21.5). Anschließend wurde durch nicht-lineare Regression die PGE<sub>2</sub>-Konzentrationen ermittelt, bei denen die Agonistenabhängige cAMP-Bildung halbmaximal war (EC 50).

Die so ermittelten EC50-Werte für den Wildtyprezeptor und die meisten Rezeptormutanten (Tab. 8) unterschieden sich nicht signifikant von den ermittelten  $K_d$ -Werten. Lediglich die für den FLAG-hEP4 S379A-R ermittelte EC50 war signifikant niedriger als der korrespondierende  $K_d$ -Wert, was wahrscheinlich auf die hohe Rezeptordichte in diesen Membranen zurückgeführt werden kann. In diesem Fall würden auch bei niedrigeren Ligandkonzentrationen genügend Rezeptoren aktiviert, um die nachgeschaltete Signalkette zu aktivieren ("spare-receptor"-Hypothese (Zhu (1993)).

Tab. 8: EC50-Werte der PGE<sub>2</sub>-stimulierten cAMP-Bildung der verschiedenen in HEK293-Zellen stabil exprimierten FLAG-hEP4-Rezeptoren. Aus HEK293-Zellen, die mit den verschiedenen FLAG-hEP4-Rezeptoren stabil transfiziert waren, wurden Membranen präpariert (siehe 3.21.2). Die durch steigende Konzentrationen PGE<sub>2</sub> ( $10^{-11}$ - $10^{-5}$  M) in Anwesenheit von 1 mM IBMX in diesen Membranpräparationen stimulierte cAMP-Bildung wurde mit einem RIA bestimmt (siehe 3.21.4). Die EC50-Werte wurden durch nicht-lineare Regression ermittelt. Die Werte sind Mittelwerte ± S.D. aus drei Versuchen in Doppelbestimmung.

Rezeptor	EC50-Wert [nM]
FLAG-hEP4 wt	2,19 ± 0,63
FLAG-hEP4 ST335-484A	1,67 ± 0,87
FLAG-hEP4 ST335-405A	1,13 ± 0,14
FLAG-hEP4 ST428-484A	$0,62 \pm 0,53$
FLAG-hEP4 ST335-354; 389-484A	2,67 ± 3,04
FLAG-hEP4 ST335-382A	2,77 ± 1,63
FLAG-hEP4 ST379A	0,49 ± 0,11
FLAG-hEP4 ST335-377; 382-484A	1,33 ± 0,41

### 4.6 Untersuchung der Phosphorylierung des FLAG-hEP4-Rezeptors und der verschiedenen mutierten Rezeptorproteine

Die Agonisten-induzierte Phosphorylierung des hEP4-Rezeptors wurde durch Neuschäfer-Rube *et al.* (1999) und Slipetz *et al.* (2001) nachgewiesen. Aus diesen Studien ging hervor, daß die für die Agonisten-induzierte Phosphorylierung relevanten Phosphorylierungsstellen innerhalb der C-terminale Domäne lokalisiert sind.

Alle Experimente zur Untersuchung der Phosphorylierung wurden von Herrn Dr. F. Neuschäfer-Rube durchgeführt.

### 4.6.1 Untersuchung der durch PGE<sub>2</sub>-Stimulation induzierten Phosphorylierung des FLAG-hEP4 wt-Rezeptors

Die den FLAG-hEP4 wt-Rezeptor stabil exprimierenden HEK293-Zellen wurden für 90 min in 150 µCi/ml [<sup>32</sup>P]-ortho-Phosphat-haltigen Medium kultiviert, in An- oder Abwesenheit von 400 nM Staurosporin für 20 min vorinkubiert und danach für 10 min mit PGE<sub>2</sub>, Forskolin oder PMA stimuliert (siehe 3.26.2). Die Rezeptorproteine wurden immunpräzipitiert (siehe 3.19.2), über eine SDS-PAGE aufgetrennt und die phosphorylierten Rezeptorproteine mit einem Imager-System visualisiert.

Der FLAG-hEP4 wt-R zeigte in den nicht stimulierten stabil exprimierenden HEK293-Zellen eine geringe basale Phosphorylierung, die durch PGE<sub>2</sub>-Stimulation auf das 3-fache gesteigert werden konnte (Abb. 25). Das phosphorylierte Protein erschien als einzelne breite Bande mit einer Größe von ca. 70-100 kDa, was dem durch Western-Blot bestimmten Molekulargewicht des FLAG-hEP4 wt-Rezeptors (Abb. 22) entsprach. Durch Stimulation der Zellen mit Forskolin konnte die Phosphorylierung des Rezeptors nicht gesteigert werden. Dies deutet darauf hin, daß die Agonisten-induzierte Phosphorylierung unabhängig von der hEP4-R-vermittelten Aktivierung der Proteinkinase A stattfand. Die Phosphorylierung des FLAG-hEP4 wt-R konnte nach Stimulation der Zellen mit PMA, einem Aktivator der PKC, minimal gegenüber der basalen Phosphorylierung gesteigert werden (Abb. 25). Durch Behandlung der Zellen mit Staurosporin, einem Inhibitor der "second-messenger"-abhängigen Proteinkinasen PKA und PKC wurde die PGE<sub>2</sub>-induzierte Phosphorylierung nicht, dagegen aber die PMA-induzierte Phosphorylierung reduziert (Abb. 25). Daher wurde die Agonisten-induzierte Phosphorylierung reduziert (Abb. 25). Daher wurde die Agonisten-induzierte Phosphorylierung reduziert (Abb. 25). Daher wurde die Agonisten-induzierte Phosphorylierung reduziert (Abb. 25).



Abb. 25: Phosphorylierung des FLAG-hEP4 wt-Rezeptors durch PGE<sub>2</sub>, Forskolin und PMA. Mit dem FLAG-hEP4 wt-R stabil transfizierte HEK293-Zellen wurden für 90 min in Kulturmedium mit 150  $\mu$ Ci [<sup>32</sup>P]-ortho-Phosphat/ml inkubiert, wo angezeigt die letzten 20 min mit Staurosporin bei 37°C behandelt und danach mit 1  $\mu$ M PGE<sub>2</sub>, 50  $\mu$ M Forskolin + 1 mM IBMX oder 2  $\mu$ M PMA für 10 min stimuliert (siehe 3.26.2). Die phosphorylierten Rezeptorproteine wurden immunpräzipitiert (siehe 3.19.2), über eine SDS-PAGE aufgetrennt (siehe 3.19.4 und 3.19.5) und anschließend mit einem Imager-System visualisiert. Dargestellt sind die aus drei unabhängigen Versuchen ± S.E.M. ermittelten Phosphorylierungen in Relation zur basalen Phosphorylierung der nicht mit Staurosporin behandelten Zellen. Statistik: Student's *t*-Test für ungepaarte Proben; a: signifikant unterschiedlich von den unter gleichen Bedingungen nicht mit Staurosporin vorbehandelten Zellen.

### 4.6.2 Untersuchung der durch PGE<sub>2</sub> induzierten Phosphorylierung des FLAG-hEP4 wt-Rezeptors und der mutierten Rezeptorproteine

Die Untersuchung der Agonisten-induzierten Phosphorylierung der verschiedenen FLAGhEP4-R-Mutanten wurde, wie für den Wildtyprezeptor beschrieben, (siehe 4.6.1) durchgeführt, wobei die Menge an auf die SDS-PAGE aufgetragenem Immunpräzipitat auf die [<sup>3</sup>H]-PGE<sub>2</sub>-Oberflächenbindung der unterschiedlichen hEP4-Rezeptoren exprimierenden Zelllinien normalisiert wurde.

Der Wildtyprezeptor wurde, wie vorher gezeigt, Agonisten-abhängig phosphoryliert. Die Agonisten-induzierte Phosphorylierung des Wildtyprezeptors wurde densitometrisch quantifiziert und arbiträr als 100% gesetzt (Abb. 26). Die Agonisten-abhängige Phosphorylierung der Rezeptormutanten wurde dazu ins Verhältnis gesetzt.

Der FLAG-hEP4 ST335-484A-Rezeptor, in dem alle potentiellen Phosphorylierungsstellen in der C-terminalen Domäne eliminiert waren, wurde im Gegensatz zum Wildtyprezeptor nicht mehr Agonisten-abhängig phosphoryliert. Dieses Ergebnis bestätigt frühere Studien mit einem Rezeptorhybrid aus dem Ratten EP3-R dessen C-terminale Domäne gegen die des hEP4-R ausgetauscht worden war (Neuschäfer-Rube *et al.* (1999)). Hier konnte gezeigt werden, daß nur die C-terminale Domäne des hEP4-R Agonisten-abhängig phosphoryliert wird.

Die Agonisten-abhängige Phosphorylierung des FLAG-hEP4 ST335-405A-R, in dem alle potentiellen Phosphorylierungsstellen im proximalen Bereich der C-terminalen Domäne eliminiert waren, betrug noch 25% von der des Wildtyprezeptors, während die Agonisten-abhängige Phosphorylierung der Mutante FLAG-hEP4 ST428-484A, der alle potentiellen Phosphorylierungsstellen im distalen Teil der C-terminalen Domäne fehlten, noch 75% von der des Wildtyps betrug. Aus diesen Ergebnissen konnte geschlossen werden, daß die Agonisten-induzierte Phosphorylierung im wesentlichen im proximalen Teil der C-terminalen Domäne des hEP4-R stattfand. Die Bereich, in dem der Hauptanteil der Agonisten-induzierten Phosphorylierung stattfand, konnte weiter eingegrenzt werden. Die Agonisten-abhängige Phosphorylierung des FLAG-hEP4 ST335-354; 389-484A-R war mit der Phosphorylierung des Wildtyp vergleichbar (Abb. 26), was auf eine Hauptphosphorylierung im proximalen Teil der C-terminalen Domäne des Mildtyp vergleichbar (Abb. 26), was auf eine Hauptphosphorylierung im proximalen Teil der C-terminalen Domäne Z-terminalen Domäne Z-terminalen Domäne Z-terminalen Domäne Z-terminalen Domäne Z-terminalen D-terminalen D-



Abb. 26: Nachweis der Lokalisation der für die Agonisten-induzierte Phosphorylierung des FLAG-hEP4 wt-Rezeptors relevanten Ser und Thr in der C-terminalen Domäne. Die mit den verschiedenen Rezeptoren stabil transfizierten HEK293-Zellen wurden für 90 min in Kulturmedium mit 150  $\mu$ Ci/ml [<sup>32</sup>P]-ortho-Phosphat/ml inkubiert und anschließend mit 1  $\mu$ M PGE<sub>2</sub> für 10 min stimuliert (siehe 3.26.2). Die phosphorylierten Rezeptorproteine wurden wie unter Abb 21. beschrieben visualisiert (siehe 3.26.3 und siehe 3.19.) Dargestellt sind die Ergebnisse aus drei unabhängigen Versuchen ± S.E.M. Zur Berechnung der relativen Phosphorylierung des FLAG-hEP4 wt-R die basale Phosphorylierung subtrahiert und als 100% gesetzt. Zur Bestimmung der Phosphorylierung der verschiedenen Rezeptoren basale Phosphorylierung subtrahiert und als 100% gesetzt. Zur Bestimmung der Phosphorylierung der verschiedenen Rezeptoren wurde von der PGE<sub>2</sub>-induzierter Phosphorylierung der basale Phosphorylierung subtrahiert und als 100% gesetzt. Zur Bestimmung der Phosphorylierung der basale Phosphorylierung subtrahiert und als 100% gesetzt. Zur Bestimmung der Phosphorylierung der basale Phosphorylierung subtrahiert und als 100% gesetzt. Phosphorylierung der basale Phosphorylierung subtrahiert und als 100% gesetzt. Zur Bestimmung der Phosphorylierung der basale Phosphorylierung subtrahiert und als 100% gesetzt. Zur Bestimmung der Phosphorylierung der basale Phosphorylierung subtrahiert und die mit der des FLAG-hEP4 wt-R ins Verhältnis gesetzt. Statistik: Student's *t*-Test für ungepaarte Proben; \* = signifikant unterschiedlich vom FLAG-hEP4 wt-R.

Allerdings wäre zu erwarten gewesen, daß die Phosphorylierung dieses Rezeptors der des FLAG-hEP4 ST428-484A-R entsprach, da in beiden Rezeptoren die distalen Serine und Threonine substituiert waren. Die Agonisten-abhängige Phosphorylierung des FLAG-hEP4 ST335-382A-R, die noch ca 25% von der des FLAG-hEP4 wt-R betrug und mit der des FLAG-hEP4 ST335-405A-R vergleichbar war, unterstützte die Annahme der Lokalisation der Hauptphosphorylierung zwischen Serin 359 und Serin 382.

Erste Phosphopeptidsequenzierungen von Peptiden, die durch enzymatische Spaltung des phosphorylierten FLAG-hEP4 wt-R generiert wurden, gaben eine Hinweis darauf, daß dem Serin an Position 379 eine besondere Rolle bei der Phosphorylierung des hEP4-R zukommen könnte. Der FLAG-hEP4 S379A-R, in dem nur Serin 379 substituiert war, zeigte jedoch nach PGE<sub>2</sub>-Stimulation eine dem FLAG-hEP4 wt-R entsprechende Phosphorylierung, woraus resultierte, das Serin 379 nicht essentiell für die Agonisten-induzierte Phosphorylierung des hEP4-R war. Dieses Resultat wurde durch den FLAG-hEP4 ST335-377; 382-484A-R, der wie der FLAG-hEP4 ST335-484A-R keine Phosphorylierung mehr zeigte, unterstützt (Abb. 26). Da sich die beiden Rezeptoren wie der Wildtyprezeptor bzw. wie der FLAG-hEP4 ST335-484A-R verhielten, wurden sie daraufhin als positive bzw. negative Kontrollen in den weiteren Experimenten verwendet.

## 4.7 Untersuchung der Desensitisierung des FLAG-hEP wt- und des FLAG-hEP4 ST335-484A-Rezeptors in stabil transfizierten HEK293-Zellen

Der in CHO-Zellen exprimierte EP4-R desensitisierte, im Gegensatz zu dem ebenfalls G<sub>s</sub>gekoppelten EP2-R, nach Agonisten-Exposition schnell (Nishigaki *et al.* (1996)). Diese Agonisten-induzierte Desensitisierung war in einer hEP4-R-Mutante aufgehoben, die am Anfang der C-terminalen Domäne trunkiert war (Bastepe und Ashby (1997)). Andererseits war ein Hybridrezeptor, in dem die C-terminale Domäne des nicht-desensitisierbaren EP3β-R durch die C-terminale Domäne des desensitisierbaren hEP4-R ersetzt worden war, desensitisierbar (Neuschäfer-Rube *et al.* (1997b)). Daraus folgte, daß die C-terminale Domäne des hEP4-R sowohl notwendig wie hinreichend für die Agonisten-induzierte Desensitisierung war. Eine Voraussetzung für die Agonisten-induzierte Desensitisierung ist die Agonisten-induzierte Phosphorylierung. Daher wurde angenommen, daß der FLAG-hEP4 ST335-484A-R, in dem alle potentiellen Phosphorylierungsstellen eliminiert waren, nicht mehr Agonisten-abhängig desensitisierte.

#### 4.7.1 Untersuchung der Desensitisierung der PGE<sub>2</sub>-induzierten cAMP-Bildung des FLAG-hEP4 wt- und des FLAG-hEP4 ST335-484A-Rezeptors nach Vorstimulation mit PGE<sub>2</sub>

Die Desensitisierung der in HEK293-Zellen exprimierten Rezeptoren sollte dadurch gezeigt werden, daß die PGE<sub>2</sub>-stimulierte cAMP-Bildung in einer zweiten Stimulationsphase nach vorheriger Stimulation der Zellen mit PGE<sub>2</sub> geringer ausfällt, als in nicht vorstimulierten Zellen.

Die den FLAG-hEP4 wt- oder den FLAG-hEP4 ST335-484A-Rezeptor exprimierenden HEK293-Zellen wurden mit 100 nM PGE<sub>2</sub> für 10 min vorstimuliert und anschließend mit saurem Puffer (pH3) zur Entfernung des Liganden inkubiert. Danach wurden die Zellen in Anwesenheit von 1 mM IBMX mit 10 nM PGE<sub>2</sub> für 10 min restimuliert (siehe 3.22.2) und die cAMP-Bildung mit einem RIA bestimmt (siehe 3.21.5).

Die basale Agonisten-unabhängige cAMP-Bildung war in den hEP4-R-Wiltdtyp und den FLAG-hEP4 ST335-484A-R exprimierenden HEK293-Zellen gleich. Sie lag in der Größenordnung von 1,5 pmol \* (min \* 10<sup>6</sup> Zellen)<sup>-1</sup>. In beiden Zellinien steigerte 10 nM PGE<sub>2</sub> die cAMP-Bildung um das 15-20-fache (Abb. 27). Wurden die Zellen mit PGE<sub>2</sub> (100 nM) vorbehandelt, der Agonist entfernt und die Zellen in Gegenwart des Phosphodiesterase-Inhibitors IBMX weiterinkubiert, stieg die cAMP-Bildung auf das 10-20-fache gegenüber den unvorbehandelten Zellen (Abb. 27). Diese ohne weiteren Stimulus ausgelöste cAMP-Bildung war in Zellen, die den Wildtyprezeptor exprimierten, signifikant kleiner als die durch 10 nM PGE<sub>2</sub> ohne Vorstimulation ausgelöste cAMP-Bildung. In Zellen, die den FLAG-hEP4 ST335-484A-R exprimierten, war diese ohne weiteren Stimulus ausgelöste cAMP-Bildung gleich der durch 10 nM PGE<sub>2</sub> ohne Vorstimulation ausgelösten cAMP-Bildung und konnte durch 10 nM PGE<sub>2</sub> ohne Vorstimulation ausgelösten cAMP-Bildung und konnte durch 10 nM PGE<sub>2</sub> nicht mehr weiter gesteigert werden (Abb. 27).

Diese Ergebnisse zeigen, daß zum einen ganz offensichtlich der Ligand (PGE<sub>2</sub>) durch den sauren Waschschritt nach der ersten Stimulationsphase nicht vollständig vom Rezeptor gelöst werden konnte und der weiterhin gebundene Ligand auch ohne Zusatz von weiterem PGE<sub>2</sub> die cAMP-Bildung stimulierte. Aufgrund der hohen cAMP-Spiegel nach Vorstimulation ohne Zugabe von weiterem Liganden konnte die cAMP-Bildung nach erneuter Ligandzugabe nicht vernünftig quantifiziert werden. Die Ergebnisse weisen aber auch daraufhin, daß der nach dem Waschschritt an den Rezeptoren verbleibende Ligand in Wildtyprezeptor exprimierenden Zellen zu einer geringeren cAMP-Bildung führte als in den FLAG-hEP4 ST335-484A-R exprimierenden Zellen. Dies könnte ein Hinweis auf eine Desensitisierung des FLAG-hEP4 wt-R sein, die in FLAG-hEP4 ST335-484A-R exprimierenden Zellen nicht mehr nachweisbar war.



Abb. 27: PGE<sub>2</sub>-induzierte cAMP-Bildung in FLAG-hEP4 wt- und in FLAG-hEP4 ST335-484A-Rezeptor exprimierenden HEK293-Zellen mit und ohne Vorstimulation durch PGE<sub>2</sub>. 2 x 10<sup>5</sup> Zellen, der mit dem FLAG-hEP4 wt-R oder dem FLAG-hEP4 ST335-484A-R stabil transfizierten HEK293-Zellen, wurden auf Poly-L-Lysin beschichten Kulturplatten 48 h kultiviert. Anschließend wurden die Zellen mit 100 nM PGE<sub>2</sub> oder Puffer für 10 min vorstimuliert und darauffolgend 2 min mit saurem Puffer zur Entfernung des Liganden inkubiert. Danach wurden die Zellen in Anwesenheit von 1 mM IBMX mit 10 nM PGE<sub>2</sub> für 10 min in cAMP-Inkubationsmedium stimuliert (siehe 3.22.2). Das Medium wurde entfernt, die Zellen lysiert und das gebildete cAMP mit einem RIA bestimmt (siehe 3.21.5). Die Werte stellen die Mittelwerte  $\pm$  S.E.M. aus drei Versuchen in Doppelbestimmung dar. \*p < 0,05, Student's *t*-Test für ungepaarte Proben

### 4.7.2 Kinetik der PGE<sub>2</sub>-induzierten cAMP-Bildung des FLAG-hEP4- und des FLAGhEP4 ST335-484A-Rezeptors nach Vorstimulation und verzögerter Gabe von IBMX und Kinetik der Forskolin-induzierten cAMP-Bildung an ganzen Zellen

Da durch Vorstimulation der den FLAG-hEP4 wt-R exprimierenden Zellen die Agonisteninduzierte cAMP-Bildung gering reduziert war (Abb. 27), wurde die Kinetik der PGE<sub>2</sub>induzierten cAMP-Bildung nach Vorstimulation der Rezeptor-exprimierenden Zellen mit PGE<sub>2</sub> untersucht. Dazu wurden die den FLAG-hEP4 wt- und den FLAG-hEP4 ST335-484A-Rezeptor exprimierenden HEK293-Zellen für 10 min mit 1 µM PGE<sub>2</sub> vorstimuliert und die intrazelluläre cAMP-Akkumulation durch Zugabe von 1 mM IBMX gestartet. Die Ansätze wurden für 0-30 min zur cAMP-Bildung inkubiert (siehe 3.22.3) und anschließend das gebildete cAMP mit einem RIA bestimmt (siehe 3.21.5).

Für die den FLAG-hEP4 wt-R exprimierenden HEK293-Zellen sollte nach Vorstimulation mit PGE<sub>2</sub> noch ein Anstieg des cAMP-Spiegels erfolgen, jedoch wurde das Erreichen eines konstanten cAMP-Spiegels erwartet, da nach der Entkopplung des Rezeptors kein weiteres cAMP mehr gebildet werden kann. Dagegen wurde in den den FLAG-hEP4-ST335-484A-R exprimierenden Zellen ein kontinuierlicher Anstieg des cAMP-Spiegels erwartet.

Nach Vorstimulation zeigten die den FLAG-hEP4 wt-R und den FLAG-hEP4 ST335-484A-R exprimierenden HEK293-Zellen einen geringen basalen cAMP-Spiegel, der nach Zugabe von IBMX für den FLAG-hEP4 wt-R im gleichen Maße wie für den FLAG-hEP4 ST335-484A-R anstieg (Abb. 28). Die den FLAG-hEP wt-R exprimierenden Zellen zeigten nach 10 min einen maximalen cAMP-Spiegel, der für weitere 20 min nicht mehr gesteigert werden konnte. Allerdings zeigten auch die den FLAG-hEP4 ST335-484A-R exprimierenden Zellen ein Maximum der PGE<sub>2</sub>-induzierten cAMP-Bildung nach 10 min, welches ebenfalls konstant blieb. Der erwartete kontinuierliche, Agonisten-abhängige cAMP-Anstieg für den FLAG-hEP4 ST335-484A-R konnte nicht nachgewiesen werden (Abb. 28). Dies Ergebnis könnte bedeuten, daß entweder beide Rezeptoren Agonisten-abhängig desensitisieren, oder aber, daß ein sehr hoher cAMP-Spiegel die weitere cAMP-Bildung hemmt.

Um diesen möglichen zellulären Effekt auf die cAMP-Bildung zu untersuchen, wurde die Kinetik der Forskolin-induzierten cAMP-Bildung mit den den FLAG-hEP4 wt-R oder den FLAG-hEP4 ST335-484A-R exprimierenden HEK293-Zellen bestimmt (siehe 3.21.4). Da Forskolin ein direkter, Rezeptor-unabhängiger Aktivator der Adenylatcyclase ist, sollte in der Kinetik ein konstanter cAMP-Anstieg in den beiden Rezeptor exprimierenden Zellinien messbar sein.

Durch Stimulation der Rezeptor exprimierenden HEK293-Zellen kam es zu einem Forskolinvermittelten Anstieg des intrazellulären cAMP-Spiegels, allerdings erreichte auch die Forskolin-induzierte cAMP-Bildung ein Maximum nach 10 min und blieb über weitere 20 min konstant (Abb. 29). Die Kinetikprofile der Forskolin-induzierten cAMP-Bildung in den beiden Rezeptor exprimierenden Zellen waren mit den Rezeptor-vermittelten Kinetikprofilen nach PGE<sub>2</sub>-Simulation vergleichbar (vgl. Abb. 28, Abb. 29). Dieses Ergebnis deutete darauf hin, daß nicht beide Rezeptoren desensitisieren, sondern daß durch einen Rezeptorunabhängigen Mechanismus die weitere cAMP-Bildung inhibiert wird.

Weiterhin ist nicht auszuschließen, daß die Expression des FLAG-hEP4 wt-Rezeptors so hoch war, daß der Anteil an desensitisierten Rezeptoren zu gering war und die verbleibenden nicht desensitisierten Rezeptoren noch ausreichten, um ein maximales cAMP-Signal auszulösen. Zusätzlich könnte auch der in den verwendeten HEK293-Zellen in geringem Maße endogen exprimierte EP2-Rezeptor die mögliche Desensitisierung des hEP4-wt-R überlagern.



Abb. 28: Kinetik der PGE<sub>2</sub>-induzierten cAMP-Bildung der den FLAG-hEP4 wt- und FLAG-hEP4 ST335-484A-Rezeptor stabil exprimierenden HEK293-Zellen nach verzögerter Gabe von IBMX.  $2 \times 10^5$ , der mit dem FLAG-hEP4 wt-R und dem FLAG-hEP4 ST335-484A-R stabil transfizierten HEK293-Zellen, wurden auf Poly-L-Lysin beschichteten Kulturplatten für 48 h kultiviert. Das Kulturmedium wurde entfernt und die Zellen für 10 min mit 1  $\mu$ M PGE<sub>2</sub> in cAMP-Inkubationsmedium vorinkubiert. Danach wurde IBMX in einer Endkonzentration von 1 mM zugegeben und damit die cAMP-Akkumulation in den Zellen für 0-30 min bei 37°C stimuliert (siehe 3.21.4). Die cAMP-Bildung wurde, wie in Abb. 27 beschrieben, bestimmt. Die Werte stellen die Mittelwerte  $\pm$  S.E.M. aus zwei Versuchen in Doppelbestimmung dar.


Abb. 29: Kinetik der Forskolin-induzierten cAMP-Bildung der mit dem FLAG-hEP4 wtund dem FLAG-hEP4 ST335-484A-Rezeptor stabil transfizierten HEK293-Zellen.  $2 \times 10^5$ , der mit dem FLAG-hEP4 wt- und dem FLAG-hEP4 ST335-484A-Rezeptor stabil transfizierten HEK293-Zellen, wurden auf Poly-L-Lysin beschichteten Kulturplatten für 48 h kultiviert. Das Kulturmedium wurde entfernt und die Zellen für 10 min mit 1 mM IBMX in cAMP-Inkubationsmedium vorinkubiert. Danach wurden die Zellen für 0-30 min mit 1  $\mu$ M Forskolin bei 37°C zur cAMP-Bildung stimuliert (siehe 3.21.4). Die cAMP-Bildung wurde, wie in Abb. 27 beschrieben, bestimmt. Die Werte stellen die Mittelwerte  $\pm$  S.E.M. aus drei Versuchen in Doppelbestimmung dar.

## 4.7.3 Kinetik der cAMP-Bildung des FLAG-hEP4 wt- und des FLAG-hEP4 ST335-484A-Rezeptors nach Vorstimulation mit dem EP4-Rezeptor-spezifischen synthetischen Agonisten ONO604 und verzögerter Gabe von IBMX

Da die verwendeten HEK293-Zellen in geringem Maße endogen den EP2-Rezeptor exprimieren und ein möglicher Überlagerungseffekt durch diesen G<sub>s</sub>-gekoppelten Rezeptor nicht ausgeschlossen werden konnte, wurde eine Kinetik der Agonisten-induzierten cAMP-Bildung mit dem synthetischen EP4-R-spezifischen Agonisten ONO604 in einer Konzentration durchgeführt, bei der der EP2-Rezeptor nicht aktiviert wurde. Durch den spezifischen Agonisten sollte eine mögliche Desensitisierung des FLAG-hEP wt-Rezeptors, die durch eine potentielle Aktivierung des endogenen EP2-Rezeptors überlagert wurde, nachgewiesen werden. Dazu wurden die den FLAG-hEP4 wt-R und die den FLAG-hEP4 ST335-484A-R exprimierenden HEK293-Zellen für 10 min mit 10 nM ONO604 vorstimuliert, anschließend der Ligand entfernt und die Zellen 10 min ohne Ligand inkubiert (siehe 3.22.4). Die cAMP-Akkumulation wurde durch Zugabe von IBMX gestartet und nach verschieden langen Zeiträumen das gebildete cAMP mit einem RIA bestimmt (siehe 3.21.5). Nach Vorstimulation mit ONO604 und Inkubation ohne Agonisten zeigten die den FLAG-hEP4 wt-R und die den FLAG-hEP4 ST335-484A-R exprimierenden HEK293-Zellen einen geringen basalen cAMP-Spiegel (Abb. 30), jedoch wurde für beide Rezeptoren nach Zugabe von IBMX ein maximaler cAMP-Spiegel nach ca. 10 min bestimmt, der über weitere 20 min konstant blieb (Abb. 30). Die Kinetikprofile der Rezeptoren unterschieden sich nicht. Dies könnte in der sehr hohen Expression der Rezeptoren begründet sein, sodaß nach Vorstimulation und Inkubation ohne Ligand noch genug FLAG-hEP4 wt-Rezeptoren nicht desensitisiert waren, um ein maximales Signal auszulösen. Die Kinetik bestätigte zusätzlich, daß der Ligand nicht vollständig vom Rezeptor entfernt werden konnte.



Abb. 30: Kinetik der cAMP-Bildung in FLAG-hEP4 wt- und FLAG-hEP4 ST335-484A-Rezeptor exprimierenden HEK293-Zellen durch Stimulation mit dem EP4-Rspezifischen Agonisten ONO604 und verzögerter Gabe von IBMX. 2 x 10<sup>5</sup>, der mit dem FLAG-hEP4 wt-R und der mit dem FLAG-hEP4 ST335-484A-R stabil transfizierten HEK293-Zellen, wurden für 48 h kultiviert. Das Kulturmedium wurde entfernt, die Zellen für 10 min mit 10 nM ONO604 in cAMP-Inkubationsmedium stimuliert und anschließend der Ligand in drei Waschschritten entfernt. Die Zellen wurden ohne Ligand 10 min in cAMP-Inkubationsmedium inkubiert und die cAMP-Akkumulation durch Zugabe von IBMX in einer Endkonzentration von 1 mM gestartet ( siehe 3.22.4). Die Ansätze wurden für 0-30 min bei 37°C zur cAMP-Bildung inkubiert (siehe 3.22.) und das gebildete cAMP, wie in Abb. 27 beschrieben, bestimmt. Die Werte stellen die Mittelwerte ± S.E.M. aus drei Versuchen in Doppelbestimmung dar.

## 4.7.4 Untersuchung der Verschiebung der Dosis-Wirkungskurven für die PGE<sub>2</sub>stimulierte cAMP-Bildung des FLAG-hEP4 wt- und des FLAG-hEP4 ST335-484A-Rezeptors

Die Desensitisierung eines Rezeptors kann anhand der Rechtsverschiebung seiner Dosis-Wirkungskurve für die Agonisten-induzierten "second-messenger"-Bildung ermittelt werden. Werden die in einer Zelle exprimierten Rezeptoren nach Vorstimulation mit ihrem Liganden von ihrem G-Protein entkoppelt, kann nach Restimulation der Zelle derselbe Ligand ein gleich großes Signal erst mit höheren Konzentrationen auslösen (Nishigaki *et al.* (1996)). Ferner können sättigende Agonistenkonzentrationen in Zellen, in denen der Rezeptor desensitisiert ist, eine geringere maximale Signalstärke auslösen, als in Zellen mit nichtdesensitisiertem Rezeptor.

Zur Untersuchung der Dosis-Wirkungskurven-Verschiebung der FLAG-hEP4 wt- oder FLAGhEP4 ST335-484A-Rezeptor-vermittelten, PGE<sub>2</sub>-stimulierten cAMP-Bildung wurden die die Rezeptoren exprimierenden Zellen mit 1  $\mu$ M PGE<sub>2</sub> für 10 min vorstimuliert, der Ligand mit saurem Puffer entfernt und Membranen aus den Zellen präpariert (siehe 3.21.2). An den Membranen wurde in einem *"in vitro*-Assay" die Dosis-abhängige cAMP-Bildung durch PGE<sub>2</sub>gemessen (3.21.3). Das gebildete cAMP wurde mit einem RIA bestimmt (siehe 3.21.5).

In Membranen nicht vorstimulierter, FLAG-hEP4 wt-R exprimierender HEK293-Zellen stimulierte PGE<sub>2</sub> die cAMP-Bildung mit einer EC50 von 1,98 ± 0,7 nM. Die EC50 für die PGE<sub>2</sub>-stimulierte cAMP-Bildung war in Membranen vorstimulierter, Wildtyprezeptorexprimierender HEK293-Zellen zwar tendentiell höher  $(3,73 \pm 0,45 \text{ nM})$ , aber nicht signifikant unterschiedlich von der in Membranen nicht-vorstimulierter Zellen. Auch die maximale PGE2induzierte cAMP-Bildung war in Membranen vorstimulierter Zellen nicht reduziert (Abb. 31). In Membranen aus nicht-vorstimulierten und vorstimulierten HEK293-Zellen, die den FLAGhEP4 ST335-484A-R exprimierten. verliefen die Dosis-Wirkungskurven absolut deckungsgleich (Abb. 31). Trotz dieses kleinen Unterschiedes zwischen dem FLAG-hEP4 wt- und dem FLAG-hEP4 ST335-484A-R konnte eine Desnsitisierung des Wildtyprezeptors auch in diesem experimentellen Ansatz nicht eindeutig nachgewiesen werden.



Abb. 31: Konzentrationsabhängigkeit der PGE<sub>2</sub>-induzierten cAMP-Bildung in FLAGhEP4 wt- und FLAG-hEP4 ST335-484A-Rezeptor exprimierenden HEK293-Zellen nach Vorstimulation mit PGE<sub>2</sub>. Konfluente, mit dem FLAG-hEP4 wtR- und dem FLAG-hEP4 ST335-484A-R stabil transfizierte HEK293-Zellen, wurden für 10 min mit 1  $\mu$ M PGE<sub>2</sub> in cAMP-Inkubationmedium stimuliert. Danach wurde der auf der Oberfläche gebundene Ligand 1 min in saurem Puffer eluiert (siehe 3.22.5), der saure Puffer in zwei Waschschritten mit cAMP-Inkubationsmedium entfernt und Membranen aus den Zellen präpariert (siehe 3.21.2). Die Membranen wurden mit steigenden Konzentrationen PGE<sub>2</sub> in Gegenwart von IBMX inkubiert (siehe 3.21.3). Das gebildete cAMP wurde mit einem RIA bestimmt (siehe 3.21.5). Die Werte stellen die Mittelwerte aus drei unbahängigen Versuchen ± S.E.M. in Doppelbestimmung dar.

### 4.8 Untersuchung der Internalisierung des in HEK293-Zellen stabil transfizierten FLAG-hEP4 wt- und der verschiedenen mutierten FLAG-hEP4-Rezeptoren

Nach Phosphorylierung und Desensitisierung kommt es bei vielen G-Protein-gekoppelten Rezeptoren zu einer Clathrin-vermittelten Internalisierung des Rezeptors, daß heißt einer Verlagerung des Rezeptors mit dem gebundenen Liganden von der Zelloberfläche in Kompartimente (Kraft (2001)). Diese Clathrin-vermittelte intrazelluläre et al. Rezeptorinternalisierung kann durch hohe extrazelluläre Saccharosekonzentrationen gehemmt werden (Heuser und Anderson (1989)). Die Relevanz der C-terminalen Domäne für die Internalisierung des EP4-Rezeptors wurde bereits durch Desai et al. (2000) und Slipetz et al. (2001) anhand von Trunkierungsmutanten beschrieben. Hier sollte nun untersucht werden, wie sich die Elimination der potentiellen Phosphorylierungsstellen in der C-terminalen Domäne des hEP4-R auf die Internalisierung auswirkt.

# 4.8.1 Untersuchung der Internalisierung der verschiedenen FLAG-hEP4-Rezeptoren anhand der reduzierten FLAG-M2-mAk-Oberflächenbindung durch ELISA

Zur Untersuchung der Internalisierung wurden die mit den verschiedenen Rezeptoren stabil transfizierten HEK293-Zellen für 30 min in An- oder Abwesenheit von 0,45 M Saccharose inkubiert und danach 45 min mit 1  $\mu$ M PGE<sub>2</sub> stimuliert. Anschließend wurden die Zellen für 2 h bei 4°C mit dem FLAG-M2-mAk inkubiert und der an die Zelloberfläche gebundene Antikörper im ELISA quantitativ bestimmt (siehe 3.23).

In Zellen, die den FLAG-hEP4 wt-R exprimierten, war die Anzahl der an der Zelloberfläche zugänglichen FLAG-Epitope und damit die Zahl der an der Zelloberfläche nachweisbaren hEP4-Rezeptorproteine nach Stimulation der Zellen mit PGE<sub>2</sub> um ca. 20% reduziert (Abb. 32). In Zellen, die den FLAG-hEP4 ST335-484A-R exprimierten war keine PGE<sub>2</sub>-abhängige Reduktion der Rezeptorproteine an der Zelloberfläche nachweisbar. Die Serine und Threonine in der C-terminalen Domäne des hEP4-R waren also für die Agonisten-induzierte Internalisierung essentiell.

In Zellen, die die Rezeptormutanten exprimierten, in denen lediglich die Serine und Threonine im proximalen Teil der C-terminalen Domäne bzw. Serin 379 selektiv gegen Alanin ausgetauscht waren (FLAG-hEP4 ST335-405A-, FLAG-hEP4 ST335-382A- und FLAG-hEP4 S379A-R), reduzierte die Inkubation mit PGE<sub>2</sub> die Anzahl der auf der Zelloberfläche für die Antikörper zugänglichen Rezeptoren in ähnlichem Umfang wie in Wildtyprezeptor-exprimierenden Zellen. Im Gegensatz dazu wurden Rezeptoren, in denen die Serine und Threonine im distalen Teil der C-terminalen Domäne gegen Alanine ausgetauscht waren (FLAG-hEP4 ST428-484A-, FLAG-hEP4 ST335-354; 389-484A- und FLAG-hEP4 ST335-377; 382-484A-R), nicht internalisiert.

Vorbehandlung der Zellen mit Saccharose zur Hemmung der Clathrin-vermittelten Endocytose hob die Internalisierung des FLAG-hEP4 wt-, des FLAG-hEP ST335-405A-und des FLAG-hEP4 S379A-R auf (Abb. 33), was die Annahme unterstützt, daß die Rezeptorendocytose über einen durch Saccharose inhibierbaren, Clathrin-vermittelten Internalisierungweg erfolgt. Überraschenderweise wurde die Internalisierung des FLAG-hEP4 ST335-382A-Rezeptors mit Saccharose nicht gehemmt (Abb. 33). Dies könnte auf einen möglichen sekundären,  $\beta$ -Arrestin- und Clathrin-unabhängigen Internalisierungweg hindeuten.



Abb. 32: Bestimmung der Agonisteninduzierten Internalisierung des FLAGhEP4 wt- und des FLAG-hEP4 ST335-484A-Rezeptors durch Zell-Oberflächen-ELISA. HEK293-Zellen, die die verschiedenen Rezeptoren stabil exprimierten, wurden für 45 min mit 1µM PGE<sub>2</sub> bei 37°C stimuliert, anschließend auf 4°C abgekühlt und die Menge der an der Oberfläche zugänglichen Rezeptorproteine durch einen Cyto-ELISA (siehe 3.23) mit dem FLAG-M2-mAk bestimmt. Dargestellt ist die ermittelte FLAG-M2mAk-Oberflächenbindung als Prozent der nicht mit PGE<sub>2</sub> stimulierten Kontrollzellen. Die Werte stellen die Mittelwerte ± S.E.M. aus vier (FLAG-hEP4 ST335-484A-R) fünf oder (FLAG-hEP4 wt-R) verschiedenen Versuchen in Dreifachbestimmung dar. \*p < 0,05, Student's t-Test für ungepaarte Proben.



Abb. 33: Bestimmung der Agonisten-induzierten Internalisierung des FLAG-hEP4 wt-Rezeptors und der mutierten Rezeptorproteine durch Zell-Oberflächen-ELISA ohne und nach Vorbehandlung der Zellen mit Saccharose. HEK293-Zellen, die die verschiedenen Rezeptoren stabil exprimierten, wurden für 30 min in An- oder Abwesenheit von 0,45 M Saccharose bei 37°C vorinkubiert. Danach wurden die Zellen für 45 min mit 1 µM PGE<sub>2</sub> bei 37°C stimuliert, anschließend auf 4°C abgekühlt und die Menge der an der Oberfläche zugänglichen Rezeptorproteine durch einen Cyto-ELISA (siehe 3.23) mit dem FLAG-M2-mAk bestimmt. Dargestellt ist die reduzierte FLAG-M2-mAk-Oberflächenbindung als Prozent der nicht mit PGE<sub>2</sub> stimulierten Kontrollzellen. Die Werte stellen die Mittelwerte ± S.E.M. aus drei (FLAG-hEP4 ST335-484A-R, FLAG-hEP ST335-405A-R, FLAG-hEP4 ST335-377; 382-484A-R und FLAG-hEP4 S379A-R), vier (FLAG-hEP4 ST428-484A-R, FLAG-hEP4 ST 335-354; 389-484-R und FLAG-hEP4 ST335-382A-R) oder fünf (FLAGhEP4 wt-R) verschiedenen Versuchen in Dreifachbestimmung ohne Vorbehandlung der Zellen mit Saccharose und die Mittelwerte ± S.E.M. aus drei (FLAG-hEP4 ST335-484A-R, FLAG-hEP ST335-405A-R, FLAG-hEP4 ST428-484A-R, FLAG-hEP4 S379A-R und FLAGhEP4 ST335-377; 382-484A-R) oder vier (FLAG-hEP4 wt-R, FLAG-hEP4 ST 335-354; 389-484-R und FLAG-hEP4 ST335-382A-R) verschiedenen Versuchen in Dreifachbestimmung nach Vorbehandlung der Zellen mit Saccharose dar. \*p < 0,05, Student's t-Test für ungepaarte Proben.

# 4.8.2 Untersuchung der Internalisierung der verschiedenen FLAG-hEP4-Rezeptoren durch Bindungsstudien mit [<sup>3</sup>H]-PGE<sub>2</sub>

Die Quantifizierung der Rezeptorinternalisierung über den Cyto-ELISA erfaßt die Summe aller Epitop-tragender Rezeptorproteine auf der Zelloberfläche. Sie sollte durch ein Verfahren ergänzt werden, bei dem der Weg der Ligand-besetzten Rezeptoren verfolgt werden kann. Da der Rezeptor während der Internalisierung immer noch mit dem Ligand besetzt ist, konnte die Internalisierung anhand der Verteilung von [<sup>3</sup>H]-PGE<sub>2</sub> zwischen Plasmamembran und intrazellulären Kompartimenten nach längeren Inkubationszeiten, in denen eine Agonisten-induzierte Internalisierung ausgelöst werden kann, bestimmt werden. Dafür wurden die die verschiedenen Rezeptoren exprimierenden HEK293-Zellen für 2 h bei 4°C, einer Temperatur, bei der keine Internalisierung stattfindet und bei der die Internalisierungs- unabhängige Bindung von [<sup>3</sup>H]-PGE<sub>2</sub> an die Zelloberfläche bestimmt werden kann, und parallel für 30 min bei 37°C mit 5 nM [<sup>3</sup>H]-PGE<sub>2</sub> in An- oder Abwesenheit von nichtmarkiertem PGE<sub>2</sub> zur Bestimmung der unspezifischen Bindung inkubiert und anschließend das auf der Zelloberfläche gebundene [<sup>3</sup>H]-PGE<sub>2</sub> durch Behandlung der Zellen mit saurem Puffer (pH3) eluiert. Danach wurden die Zellen in Lysis-Puffer aufgeschlossen und die Radioaktivität im Zellaufschluß sowie im Eluat bestimmt (siehe 3.24).

In Zellen, die den FLAG-hEP4 wt-R exprimierten, konnten unter Bedingungen, die keine Internalisierung zulassen (4°C), 60% der gesamten spezifisch Zell-assoziierten [<sup>3</sup>H]-PGE<sub>2</sub>-Menge an der Plasmamembran von den Zellen eluiert werden. Unter Bedingungen, die eine Internalisierung zulassen (37°C), war die Menge an Zelloberflächen-assoziiertem [<sup>3</sup>H]-PGE<sub>2</sub> auf 30% reduziert (Abb. 34). Daraus wurde geschlossen, daß etwa 50% der ursprünglich an der Plasmamembran zugänglichen Rezeptoren bei 37°C internalisiert werden (Abb. 35). Im Gegensatz dazu war die Zelloberflächen-assoziierte [<sup>3</sup>H]-PGE<sub>2</sub>-Menge in Zellen, die den FLAG-hEP4 ST335-484A-R exprimierten, unter beiden Bedingungen nahezu identisch (Abb. 34). Es fand also keine Agonisten-induzierte Internalisierung statt (Abb. 35). Dieser Befund ist im Einklang mit den Ergebnissen des Cyto-ELISAs (Abb. 33). Bei allen Mutanten, in denen die Serine und Threonine im distalen Teil der C-terminalen Domäne des hEP4-R gegen Alanine substituiert waren, war der Anteil des von der Zelloberfläche mit dem Rezeptor in die Zelle sequestrierten [<sup>3</sup>H]-PGE<sub>2</sub> geringer als beim Wildtyprezeptor; die Rezeptoren wurden also in geringerem Umfang Agonisten-abhängig internalisiert. Auch dies stimmte mit den im Cyto-ELISA erhobenen Daten überein. Von den Mutanten, in denen die Serine und Threonine im proximalen Bereich der C-terminalen Domäne gegen Alanine ausgetauscht worden waren, wurde die Mutante FLAG-hEP4 ST335-382A-R wie der Wildtyprezeptor internalisiert, die Mutante FLAG-hEP4 ST335-405A-R aber deutlich weniger als der Wildtyprezeptor. Dieser Befund weicht von den Ergebnissen des Cyto-ELISAs ab, der Anhalt dafür lieferte, daß beide Mutanten gleich stark wie der Wildtyprezeptor internalisiert werden.



Abb. 34: Bindung von [<sup>3</sup>H]-PGE<sub>2</sub> an die Oberflächen von FLAG-hEP4 wt- oder FLAGhEP4 ST335-484A-Rezeptor exprimierenden HEK293-Zellen bei 4°C und bei 37°C. HEK293-Zellen, die die angegebenen Rezeptoren stabil exprimierten wurden mit 5 nM [<sup>3</sup>H]-PGE<sub>2</sub> in An- oder Abwesenheit von 10 µM nicht-markiertem PGE<sub>2</sub> für 2 h bei 4°C und parallel 30 min bei 37°C inkubiert. Der Überstand wurde entfernt und das an der Zelloberfläche gebundene [<sup>3</sup>H]-markierte PGE<sub>2</sub> zweimal 5 min mit saurem Puffer eluiert (siehe 3.24). Danach wurden die Zellen in Lysis-Puffer aufgeschlossen und die Radioaktivität im Eluat sowie im Lysat im  $\beta$ -Zähler bestimmt. Die [<sup>3</sup>H]-PGE<sub>2</sub>-Oberflächenbindung wurde berechnet als:

 $[^{3}H]$ -PGE<sub>2</sub>-Oberflächenbindung =  $\left[\frac{[^{3}H]-PGE_{2}Eluat (total-unspez.)}{[^{3}H]-PGE_{2}(Eluat (total-unspez.) + Lysat (total-unspez.))}\right]$ 

total = totale [<sup>3</sup>H]-PGE<sub>2</sub>-Bindung, unspez. = unspezifische [<sup>3</sup>H]-PGE<sub>2</sub>-Bindung. Die Werte stellen die Mittelwerte ± S.D. von jeweils drei verschiedenen Versuchen in Dreifachbestimmung dar. Statistik: Student's t-Test für ungepaarte Proben. \*p < 0,05, Student's t-Test für ungepaarte Proben.

Vorbehandlung der Zellen mit Saccharose hemmte die Internalisierung aller Rezeptormutanten, die Agonisten-abhängig internalisiert wurden (Abb. 35). Die im Cyto-ELISA gefundene Ausnahme der Saccharose-unabhängigen Internalisierung des FLAGhEP4 ST335-382A-R konnte mit diesem Internalisierungsnachweis nicht bestätigt werden.



Abb. 35: Internalisierung der verschiedenen Rezeptorproteine durch Bestimmung des intrazellulären [<sup>3</sup>H]-PGE<sub>2</sub> ohne und nach Vorbehandlung der Zellen mit Saccharose. HEK293-Zellen, die die angegebenen Rezeptoren stabil exprimierten, wurden für 30 min in An- oder Abwesenheit von 0,45 M Saccharose bei 37°C inkubiert und, wie in Abb. 35 beschrieben, mit [<sup>3</sup>H]-PGE<sub>2</sub> stimuliert und aufgearbeitet. Die Radioaktivität im Eluat und im Lysat wurde im  $\beta$ -Zähler bestimmt. Die [<sup>3</sup>H]-PGE<sub>2</sub>-Internalisierung wurde berechnet als :

$[^{3}H]$ -PGE <sub>2</sub> -Internalisierung (%) = 100% -	[ <sup>3</sup> H]-PGE <sub>2</sub> -Oberflächenbindung bei 37°C
	[ <sup>3</sup> H]-PGE <sub>2</sub> -Oberflächenbindung bei 4°C

wobei die [<sup>3</sup>H]-PGE<sub>2</sub>-Oberflächenbindung, wie in Abb. 34 beschrieben, berechnet wurde. Die Werte stellen die Mittelwerte  $\pm$  S.D. von jeweils drei verschiedenen Versuchen in Dreifachbestimmung dar. Statistik: Student's *t*-Test für ungepaarte Proben. \*p < 0,05, Student's *t*-Test für ungepaarte Proben.

# 4.9 Untersuchung der Internalisierung der verschiedenen FLAG-hEP4-Rezeptoren durch Immunfluoreszenz-Mikroskopie

Zur Untersuchung der Internalisierung der verschiedenen FLAG-hEP4-Rezeptorproteine an intakten Zellen durch Immunfluoreszenz-Mikroskopie wurden Rezeptor exprimierende HEK293-Zellen auf Glasdeckgläschen kultiviert (siehe 3.25.2) und für 45 min mit 1 µM PGE<sub>2</sub> stimuliert. Nach Fixierung und Permeabilisierung wurden die Rezeptorproteine mit dem FLAG-M2-mAk und einem Cy3-gekoppelten Sekundärantikörper (siehe 3.25.5) nachgewiesen. Nach Biotinylierung der intakten Zellen vor der Fixierung wurde die Plasmamembran mit einem FITC-gekoppelten Streptavidin-Konjugat (siehe 3.25.3) markiert. Die Aufnahmen wurden mit einem konfokalen Laser-Scan-Mikroskop gemacht (siehe 3.25.6).

In den nicht-stimulierten, den FLAG-hEP4 wt-Rezeptor exprimierenden HEK293-Zellen war die grün dargestellte Plasmamembran als begrenzt diffuse Linie zu erkennen, was auf eine geringe Deformationen der Plasmamembran während der Fixierung oder auf eine nicht orthogonale Orientierung der Plasmamembran zur Aufnahmeebene zurückzuführen war (Abb. 36 erste Zeile, linke Spalte). Intrazellulär war keine grüne Markierung zu erkennen. Unter den gewählten Bedingungen wurde also tatsächlich nur Protein an der Zelloberfläche biotinyliert. Der rot dargestellte FLAG-hEP4 wt-Rezeptor war in der Plasmamembran lokalisiert, jedoch waren auch geringe Markierungen intrazellulär zu erkennen, die wahrscheinlich auf Rezeptoren hindeuten, die nicht zur Plasmamembran transportiert werden oder ein unspezifisches Signal sind (Abb. 36 erste Zeile, mittlere Spalte). In der Überlagerung war eine deutliche Colokalisation der Rezeptorproteine mit der Plasmamembran durch die Gelbfärbung zu erkennen (Abb. 36 erste Zeile, rechte Spalte). In der "z-scan"-Darstellung der Überlagerung wurden die Zellen in der dritten Dimension gezeigt. Im unteren Bereich der Darstellung war die Adhäsionsebene der Zelle auf dem Glasdeckgläschen zu sehen, während sich die Plasmamembran mit den darin lokalisierten Rezeptoren als dünne Linie über diese Ebene wölbte. Im Zellinneren, das sich in dieser Darstellung zwischen der Adhäsionsebene und der gewölbten Plasmamembran befindet, war keine Rezeptormarkierung zu erkennen (Abb. 36 zweite Zeile).

Nach Agonisten-Exposition war die grün dargestellte Plasmamembran als begrenzte Linie zu erkennen (Abb. 36 dritte Zeile, linke Spalte) und der rot-dargestellte FLAG-hEP4 wt-Rezeptor war nicht mehr gleichmäßig in der Plasmamembran lokalisiert (Abb. 36 dritte Zeile, mittlere Spalte), sondern geclustert im Inneren der Zelle (Abb. 36 dritte Zeile, rechte Spalte). Die punktuelle Gelbfärbungen in der Plasmamembran läßt noch auf einen Teil nicht-internalisierter Rezeptoren schließen (Abb. 36, dritte Zeile). In der "z-scan"-Darstellung war die intrazelluläre Lokalisation der rot dargestellten Rezeptoren innerhalb der von der grün dargestellten Plasmamembran umgebenen Zellen zu sehen (Abb. 36, vierte Zeile).



Abb. 36: Internalisierung des FLAG-hPE4 wt-Rezeptors in stabil transfizierten HEK293-Zellen nach PGE<sub>2</sub>-Stimulation. Die den FLAG-hEP4 wt-R exprimierenden HEK293-Zellen wurden auf Fibronectin und Poly-L-Lysin beschichteten Glasdeckgläschen für 24 h kultiviert und anschließend für 45 min mit 1  $\mu$ M PGE<sub>2</sub> stimuliert. Anschließend wurden die Zellen, wie in Abb. 21 beschrieben, präpariert und Aufnahmen mit einem konfokalen Laser-Scan-Mikroskop gemacht. Dargestellt sind die bei den unterschiedlichen Anregungs- und Emissions-Wellenlängen aufgenommenen Bilder (Spalte 1 und 2) und die Überlagerung beider Aufnahmen (Spalte 3) (vergleiche Abb. 21). Der FLAG-hEP4 wt-Rezeptor (rot) war in den nicht-stimulierten Kontrollzellen homogen in der Plasmamembran (grün) lokalisiert. (Gelbfärbung in der Überlagerung). Nach Agonisten-Exposition der Zellen war der Rezeptor kaum noch in der Plasmamembran, aber als punktuelle Struktur intrazellulär sichtbar (Verlust der Gelbfärbung in der Überlagerung).

Auch in Zellen, die den FLAG-hEP4 ST335-484A-R, in dem alle Serine und Threonine in der C-terminalen Domäne durch Alanine ersetzt waren, exprimierten, war das Rezeptorprotein vor Stimulation mit PGE<sub>2</sub> praktisch vollständig in der Plasmamembran lokalisiert (Abb. 37). Sowohl in der Aufsicht, wie im "z-scan" war intrazellulär kein Rezeptorprotein nachweisbar. Im Gegensatz zu den Zellen, die den Wildtyprezeptor exprimierten, kam es nach Agonisten-Exposition jedoch nicht zu einer Umverteilung des FLAG-hEP4 ST335-484A-R. Der Rezeptor verblieb auch nach Agonisten-Exposition vollständig in der Plasmamembran. Die

für den internalisierten Rezeptor typischen intrazellulären Cluster konnten weder in der Aufsicht noch im "z-scan" nachgewiesen werden (Abb. 37).



**Abb. 37:** Plasmamembranlokalisation des FLAG-hPE4 ST335-484A-Rezeptors nach PGE<sub>2</sub>-Stimulation. Die den FLAG-hEP4 ST335-484A-R exprimierenden HEK293-Zellen wurden, wie in Abb. 36 beschrieben, kultiviert und stimuliert und, wie in Abb. 21 beschrieben, präpariert. Die Aufnahmen wurden mit einem konfokalen Laser-Scan-Mikroskop gemacht. Dargestellt sind die Überlagerungen der bei den unterschiedlichen Anregungs- und Emissions-Wellenlängen aufgenommenen Bilder. Der FLAG-hEP4 ST335-484A-R (rot) war in den nicht stimulierten Kontrollzellen in der Plasmamembran (grün) lokalisiert (Gelbfärbung). Nach Stimulation der Zellen mit PGE<sub>2</sub> konnte keine Internalisierung der Rezeptorproteine nachgewiesen werden (noch vorhandene Gelbfärbung).

Wurde selektiv nur Serin 379 in der C-terminalen Domäne gegen Alanin getauscht, verhielt sich das Rezeptorprotein wie der Wildtyprezeptor und wurde Agonisten-induziert fast vollständig internalisiert (Abb 38, A). Das Rezeptorprotein, in dem alle Serine und Threonine im proximalen Teil der C-terminalen Domäne bis einschließlich Serin 382 gegen Alanine getauscht waren (FLAG-hEP4 ST335-382A), wurde ebenfalls nach Agonisten-Exposition internalisiert (Abb. 38, B), jedoch verblieb ein großer Teil der Rezeptorproteine auch nach Agonisten-Exposition in der Plasmamembran. Auch unterschied sich die Verteilung des nach Agonisten-Exposition intrazellulär gelegenen Rezeptorproteins von der des Wildtyprezeptors. Während der Wildtyprezeptor und der FLAG-hEP4 S379A-R in großen Clustern an wenigen Stellen intrazellulär konzentriert war, war der FLAG-hEP4 ST335-382A-R über den gesamten intrazellulären Raum verteilt. Das Rezeptorprotein, in dem zusätzlich zu Ser/Thr 335-382 die im direkt dahinter liegenden Block lokalisierten Serine und Threonine gegen Alanine ausgetauscht worden waren (FLAG-hEP4 ST335-405A-R), wurde praktisch nicht mehr Agonisten-abhängig internalisiert.



Abb. 38: PGE<sub>2</sub>-induzierte Internalisierung des FLAG-hEP4 S379A-, FLAG-hEP4 ST335-382A- und FLAG-hEP4 ST335-405A-Rezeptors in stabil exprimierenden HEK293-Zellen. Die die Rezeptorproteine exprimierenden HEK293-Zellen wurden, wie in Abb. 36 beschrieben, kultiviert, stimuliert und, wie in Abb. 21 beschrieben, präpariert. Die Aufnahmen wurden mit einem konfokalen Laser-Scan-Mikroskop durchgeführt. Der FLAG-hEP4 S379A-, FLAG-hEP4 ST335-382A- und der FLAG-hEP4 ST335-404A-R (rot) waren in den nicht stimulierten Kontrollzellen in der Plasmamembran (grün) lokalisiert (Gelbfärbung). Nach Stimulation der Zellen mit PGE<sub>2</sub> zeigte der FLAG-hEP4 S379A-R eine Internalisierung wie der Wildtyprezeptor, während der FLAG-hEP4 ST335-382A-R eine reduzierte Internalisierung aufwies. Der FLAG-hEP4 ST335-404A-R wurde nicht mehr internalisiert, jedoch waren die Rezeptorproteine nicht mehr homogen in der Plasmamembran verteilt (noch vorhandene Gelbfärbung). Allerdings kam es nach Agonisten-Exposition zu einer deutlichen Clusterung der Rezeptorproteine in oder unmittelbar unterhalb der Plasmamembran (Abb. 38 C).

Die Mutante FLAG-hEP4 ST335-377; 382-484A-R, in der Serin 379 als einziges Serin in der C-terminalen Domäne verblieben war, wurde wie die Mutante, in der alle Serine und Threonine in der C-terminalen Domäne substituiert waren nicht mehr internalisiert (Abb. 39, A). Auch die beiden Mutanten, in denen alle Serine und Threonine im distalen Teil der C-terminalen Domäne des hEP4-R durch Alanine ersetzt waren (FLAG-hEP4-ST335-354; 389-484A-R und FLAG-hEP4 ST428-484A-R), wurden nicht mehr Agonisten-abhängig internalisiert (Abb. 39 B, C). Auch eine Agonisten-abhängige Clusterung der Rezeptorproteine in oder direkt unterhalb der Plasmamembran, wie bei den den FLAG-hEP4 ST335-405A-R exprimierenden Zellen, war bei diesen Mutanten nicht nachweisbar.



Abb. 39: Plasmamembranlokalisation des FLAG-hEP4 ST335-377; 382-484A-, FLAGhEP4 ST335-354; 382-484A- und FLAG-hEP4 ST428-484A-Rezeptors nach PGE<sub>2</sub>-Stimulation. Die die Rezeptorproteine exprimierenden HEK293-Zellen wurden, wie in Abb. 36 beschrieben, kultiviert, stimuliert und, wie in Abb. 21 beschrieben, präpariert. Die Aufnahmen wurden mit einem konfokalen Laser-Scan-Mikroskop durchgeführt. Der FLAGhEP4 ST335-377; 382-484A-, der FLAG-hEP4 ST335-354; 382-484A- und der FLAG-hEP4 ST428-484A-Rezeptors (rot) waren in den nicht stimulierten Kontrollzellen in der Plasmamembran (grün) lokalisiert (Gelbfärbung). Nach Agonisten-Exposition der Zellen kam es zu keiner Umverteilung der Rezeptorproteine nach intrazellulär (noch vorhandene Gelbfärbung).

## 4.10 Untersuchung der Rezeptor/β-Arrestin-Colokalisation nach Agonisten-Exposition der die FLAG-hEP4-Rezeptoren exprimierenden HEK293-Zellen durch Immunfluoreszenz-Mikroskopie

Um die direkte Interaktion der verschiedenen Rezeptorproteine mit β-Arrestin zu untersuchen, wurden die mit den verschiedenen Rezeptoren stabil transfizierten HEK293-Zellen transient mit einer cDNA für β-Arrestin cotransfiziert, die am 3'-Ende um die für das "green fluorescent-protein" (GFP) codierende Sequenz verlängert worden war. Anschließend wurde die Lokalisation der beiden exprimierten Proteine vor und nach Agonisten-Stimulation untersucht. Dazu wurden die Rezeptor exprimierenden HEK293-Zellen auf Glasdeckgläschen für 24 h kultiviert, mit pEGFP/β-Arrestin transfiziert und für weitere 24 h kultiviert. Anschließend wurden die Zellen in An- oder Abwesenheit von 0,45 M Saccharose für 45 min mit 1µM PGE<sub>2</sub> stimuliert und die Zellen, wie unter 4.9 beschrieben, präpariert. Das grün dargestellte β-Arrestin/GFP war in nicht-stimulierten HEK293-Zellen homogen verteilt (Abb. 40). Mit dem FLAG-M2-mAk und dem Cy3-gekoppelten Sekundärantikörper konnte in HEK293-Zellen, die nicht mit der für die Rezeptorproteine codierenden cDNA transfiziert waren, nur eine sehr geringe unspezifische Markierung nachgewiesen werden (Abb. 40).



Abb. 40: Nachweis der cytosolischen  $\beta$ -Arrestin-Lokalisation in HEK293-Zellen. HEK293-Zellen wurden auf mit Fibronectin und Poly-L-Lysin beschichteten Glasdeckgläschen kultiviert und mit der Calcium-Phosphat-Methode mit pEGFP/B-Arrestin (grün) transfiziert. Anschließend wurden die Zellen fixiert, permeabilisiert und mit dem FLAG-M2-mAk und einem Cy3-gekoppelten Sekundärantikörper (rot) markiert. Die Präparate wurden in Mowiol eingebettet. Die Aufnahmen wurden mit einem konfokalen Laser-Scan-Mikroskop gemacht. Dargestellt sind die bei den unterschiedlichen Anregungs- und Emissions-Wellenlängen aufgenommenen Bilder und die Überlagerung beider Aufnahmen. Das in den HEK293-Zellen exprimierte  $\beta$ -Arrestin/GFP war ubiguitär im Cytosol verteilt (linke Aufnahme). Der FLAG-M2-mAk zeigte eine sehr geringe unspezifische Bindung an die HEK293-Zellen (mittlere Aufnahme). In der Überlagerung (rechte Aufnahme) war keine Colokalisation beider Markierungen sichtbar (fehlende Gelbfärbung).

In den nicht stimulierten FLAG-hEP4 wt-R exprimierenden Kontrollzellen war der Rezeptor ausschließlich in der Plasmamembran lokalisiert und das β-Arrestin/GFP homogen in der Zelle verteilt. In der Überlagerung war keine Colokalisation beider markierten Proteine zu sehen (Abb. 41 erste Zeile). Nach der Ligand-Exposition zeigte sich eine Translokation des rot dargestellten FLAG-hEP4 wt-Rezeptors von der Plasmamembran in das Zellinnere, zusätzlich kam es zu einer punktuellen Ansammlung des ursprünglich im Cytosol homogen verteilten, grün dargestellten  $\beta$ -Arrestin/GFP. In der Überlagerung beider Aufnahmen war eine deutliche, gelb dargestellte Colokalisation beider Proteine sichtbar, was auf eine Interaktion des Rezeptors mit dem β-Arrestin/GFP nach Agonisten-Stimulation hindeutet (Abb. 41 zweite Zeile). In den mit Saccharose vorbehandelten Zellen war nach anschließender Stimulation mit 1 μM PGE<sub>2</sub> der überwiegende Teil des grün dargestellten β-Arrestin/GFPs homogen im Cytosol verteilt. Der rot dargestellte Rezeptor wurde nicht internalisiert. Allerdings konnte eine leichte Verstärkung der Grünfärbung an der Plasmamembran beobachtet werden, die in nicht-stimulierten Zellen nicht nachweisbar war. In der Überlagerung war eine deutliche Gelbfärbung an der Plasmamembran zu sehen, die auf eine Colokalisation der Rezeptorproteine mit β-Arrestin/GFP an der Plasmamembran nach Agonisten-Exposition deutete. Es kam also noch zur Agonisten-induzierten Translokation des  $\beta$ -Arrestins zur Plasmamembran, Saccharose aber hemmte die Clathrinabhängige Internalisierung des  $\beta$ -Arrestin-Rezeptor-Komplexes (Abb. 41 dritte Zeile). Dieses Ergebnis steht im Einklang mit den Ergebnissen des Cyto-ELISA (Abb. 33) und der Internalisierung des [<sup>3</sup>H]-PGE<sub>2</sub> (Abb. 35). In beiden experimentellen Ansätzen wurde ebenfalls gefunden, daß die Agonisten-induzierte Internalisierung durch Saccharose gehemmt wurde. Zusammengenommen unterstützen die Ergebnisse die Annahme, daß die Agonisten-induzierte Internalisierung des hEP4-wt-Rezeptors Clathrin-vermittelt und von einer Komplexierung des  $\beta$ -Arrestin mit dem Ligand-besetzten Rezeptor abhängig ist.

Für den FLAG-hEP4 ST335-484A-, den FLAG-hEP4 ST335-405A-, den FLAG-hEP4 ST428-484A-, den FLAG-hEP4 ST335-354, 389-484A- und den FLAG-hEP4 ST335-377; 382-484A-Rezeptor zeigte sich in den Kontrollzellen keine Überlagerung der rot dargestellten Rezeptoren und des grün dargestellten  $\beta$ -Arrestin/GFP (Abb. 42, linke Spalte). Nach Agonisten-Stimulation der die verschiedenen Rezeptoren exprimierenden HEK293-Zellen kam es zu keiner Internalisierung der Rezeptorproteine in das Zellinnere und zu keiner punktuellen Ansammlung des  $\beta$ -Arrestin/GFP. Die Plasmamembran war deutlich von dem durch das  $\beta$ -Arrestin/GFP markierten Cytosol zu unterscheiden (Abb. 42, rechte Spalte). Für die nicht internalisierenden Rezeptoren wurden keine Studien mit Saccharose durchgeführt.



Rezeptors nach PGE<sub>2</sub>-Stimulation ohne und nach Vorbehandlung der Zellen mit Saccharose dargestellt durch Immunfluoreszenz-Mokroskopie. Mit dem FLAG-hEP4 wt-R stabil transfizierte HEK293-Zellen wurden auf mit Fibronectin und Poly-L-Lysin beschichteten Glasdeckgläschen kultiviert und mit der Calcium-Phosphat-Methode mit pEGFP/β-Arrestin (gün) transfiziert (siehe 3.14.3). Nach 24 h wurden die Zellen für 30 min in An- oder Abwesenheit von 0.45 M Saccharose vorinkubiert und für 45 min mit 1 uM PGE<sub>2</sub> stimuliert. Anschließend wurden die Zellen, wie in Abb. 40 beschrieben, präpariert und Aufnahmen mit einem konfokalen Laser-Scan-Mikroskop gemacht. Dargestellt sind die bei den unterschiedlichen Anregungs- und Emissions-Wellenlängen aufgenommenen Bilder (Spalte 1 und 2) und die Überlagerung beider Aufnahmen (Spalte 3). In den den FLAG-hEP4 wt-R exprimierenden HEK293-Zellen war das β-Arrestin/GFP ubiquitär im Cytosol verteilt. Nach Agonistenexposition kam es zu einer punktuellen cytosolischen Ansammlung von β-Arrestin/GFP (zweite Reihe, erste Spalte), die eine Colokalisation mit dem internalisierten Rezeptor zeigte (punktuelle Gelbfärbung zweite Reihe, dritte Spalte). Die Internalisierung des Rezeptors konnte durch Saccharose gehemmt werden (dritte Reihe), allerdings kam es noch zu einer Agonisten-abhängigen Translokation von  $\beta$ -Arrestin/GFP an die Plasmamembran (Gelbfärbung).



Abb. 42: Fehlende β-Arrestin-Translokation und -Colokalisation mit dem FLAG-hEP4 ST335-484A-, FLAG-hEP4 S335-405A-, FLAG-hEP4 ST428-484A-FLAGhEP4 ST335-354: 389-484A-Rezeptor und dem FLAG-hEP4 ST335-377; 382-484A-R nach PGE<sub>2</sub>-Stimulation dargestellt durch Immunfluoreszenz Mikroskopie. Die die Rezeptoren stabil exprimierenden HEK293 Zellen wurden, wie in beschrieben, Abb. 41 kultiviert, transfiziert und ohne Saccharosebehandlung stimuliert. Anschliessend wurden die Zellen, wie in Abb. 40 beschrieben, präpariert und die Aufnahmen, wie in Abb. 41 beschrieben, durchgeführt. In den Rezeptorexprimierenden HEK293-Zellen war β-Arrestin/GFP ubiquitär im Zellinneren verteilt (linke Spalte). Nach Agonisten-Stimulation zeigte sich keine Umverteilung des ß-Arrestin/GFP und keine Colokalisation mit den verschiedenen Rezeptoren (fehlende Gelbfärbung, rechte Spalte).

382-484A

Für den FLAG-hEP4 ST335-382A- und den FLAG-hEP4 S379A-Rezeptor zeigte sich in den Kontrollzellen keine Überlagerung von Rezeptor und  $\beta$ -Arrestin/GFP (Abb. 43, linke Spalte). Nach Ligand-Exposition der Rezeptor exprimierenden HEK293-Zellen internalisierten der FLAG-hEP4 ST335-382A- und der FLAG-hEP4 S379A-R, jedoch war keine eindeutige punktuelle Ansammlung des cytosolischen  $\beta$ -Arrestin/GFP sichtbar, woraus die geringe intrazelluläre Gelbfärbung in der Colokalisation beider Proteine resultierte (Abb. 43, mittlere Spalte).

Nach Inkubation der Zellen mit Saccharose und anschließender Stimulation konnte keine Umverteilung der Rezeptoren von der Plasmamembran ins Zellinnere mehr beobachtet werden, die hyperosmolare Saccharosekonzentration verhinderte eine Internalisierung der Rezeptorproteine (Abb. 43, rechte Spalte).



Abb. 43:  $\beta$ -Arrestin-Translokation und -Colokalisation mit dem FLAG-hEP4 ST335-382A- und dem FLAG-hEP4 S379A-Rezeptor nach PGE<sub>2</sub>-Stimulation ohne und nach Vorbehandlung der Zellen mit Saccharose. Die die verschiedenen Rezeptoren exprimierenden HEK293-Zellen wurden, wie in Abb. 41 beschrieben, kultiviert, transfiziert und in An- oder Abwesenheit von Saccharose stimuliert. Anschließend wurden die Zellen, wie in Abb. 40 beschrieben, präpariert und Aufnahmen mit einem konfokalen Laser-Scan-Mikroskop gemacht. Dargestellt sind die Überlagerungen aus den mit den einzelnen Lasern gemachten Aufnahmen. Der FLAG-hEP4 ST335-382A- und der FLAG-hEP4 S379A-R (rot) internalisierten nach Agonistenstimulation und zeigten eine schwache Colokalisation mit  $\beta$ -Arrestin/GFP (grün) (Gelbfärbung, mittlere Spalte), die durch Saccharose gehemmt werden konnte (rechte Spalte).

### 5 Diskussion

Für Prostaglandin  $E_2$  (PGE<sub>2</sub>) wurden bisher die vier Rezeptorsubtypen EP1-, EP2-, EP3-, und EP4-R identifiziert, wobei für den EP1- und EP3-R in manchen Spezies Spleißvarianten nachgewiesen wurden. Der EP1-R ist an ein G<sub>q</sub>-Protein gekoppelt und seine Aktivierung führt zu einer Erhöhung des intrazellulären InsP<sub>3</sub>- und Ca<sup>2+</sup>-Spiegels, während der EP3-R an G<sub>i</sub> gekoppelt ist und eine hormonstimulierte cAMP-Bildung hemmt. Dagegen sind der EP2und der EP4-R an G<sub>s</sub> gekoppelt und erhöhen nach PGE<sub>2</sub>-Bindung den intrazellulären cAMP-Spiegel. Die Sequenzidentität der vier EP-R-Subtypen liegt unter 50%, wobei die Sequenzen der Transmembrandomänen am höchsten konserviert sind.

Die beiden G<sub>s</sub>-gekoppelten EP-R, EP2-R und EP4-R, unterscheiden sich in ihrer Agonisteninduzierten Rezeptordesensitisierung. Der in CHO-Zellen exprimierte murine EP4-R wurde nach Agonisten-Exposition schnell desensitisiert, der murine EP2-R nicht (Nishigaki et al. (1996)). Ein deutlicher struktureller Unterschied zwischen den beiden Rezeptoren EP2-R und EP4-R besteht in der Größe ihrer C-terminalen Domänen. Die C-terminale Domäne des humanen EP4-R umfaßt 156 Aminosäuren, innerhalb derer sich 38 Serine und Threonine Phosphorylierungsstellen befinden. denen als potentielle eine Rolle in der Rezeptordesensitisierung und Internalisierung zukommen könnte. Im Gegensatz dazu ist die C-terminale Domäne des humanen EP2-R, der eine höhere Seguenzidentität zum DP- und IP-R als zum EP4-R aufweist (Breyer et al. (2001)), mit 40 Aminosäuren deutlich kleiner und beinhaltet nur 10 Serine und Threonine. Weiterhin verfügt der EP4-R auch über eine sehr große dritte cytoplasmatische Schleife, in der weitere potentielle Phosphorylierungsstellen lokalisiert sind.

Für die Agonisten-induzierte Desensitisierung und Internalisierung vieler G Proteingekoppelter Rezeptoren ist deren Phosphorylierung an intrazellulären Serin- oder Threoninresten notwendig, wie für den  $\beta$ 2-adrenergen Rezeptor als Modellsystem gezeigt wurde (Bouvier *et al.* (1988); Hausdorff *et al.* (1989)). Nach Phosphorylierung kommt es zu einer Interaktion des Rezeptors mit dem Adaptorprotein  $\beta$ -Arrestin, die zur Entkopplung des Rezeptors von der intrazellulären Signalkaskade führt. In vielen Fällen ist die Bindung von  $\beta$ -Arrestin gleichzeitig für die Clathrin-vermittelte Internalisierung des Ligand-besetzten, phosphorylierten Rezeptors in intrazelluläre Kompartimente, die auf die Entkopplung folgt, notwendig. Die Agonisten-induzierte Desensitisierung des EP4-R wurde zuerst anhand der reduzierten maximalen Aktivierung der Adenylatcyclase nach PGE<sub>2</sub>-Vorstimulation der Rezeptor-exprimierenden Zellen durch Nishigaki *et al.* (1996) beschrieben. Der von ihnen parallel untersuchte EP2-R zeigte diese reduzierte PGE<sub>2</sub>-vermittelte Adenylatcyclase-Aktivität nach Vorstimulation mit dem Agonisten nicht. Die Relevanz der C-terminalen Domäne des hEP4-R für die Agonisten-induzierte Desensitisierung wurde von Bastepe und Ashby (1996) anhand einer nicht mehr desensitisierbaren Rezeptormutante gezeigt, der durch Trunkierung des Rezeptors ab Aminosäure 350 große Teile der C-terminalen Domäne fehlten. Die Bedeutung der C-terminalen Domäne für die Agonisten-induzierte Desensitisierung wurde weiterhin dadurch belegt, daß ein Hybridrezeptor, in dem die C-terminale Domäne des nicht desensitisierbaren Ratten-EP3β-R gegen die des hEP4-R ausgetauscht war, nach Agonisten-Stimulation desensitisiert wurde (Neuschäfer-Rube *et al.* (1997)). Die Bindung des Agonisten führte beim EP4-R und beim Hybridrezeptor, aber nicht beim EP3β-R zu einer Phosphorylierung in der C-terminalen Domäne. Dadurch konnte gezeigt werden, daß die C-terminale Domäne des EP4-R sowohl hinreichend wie notwendig für die Agonisten-induzierte Phosphorylierung war (Neuschäfer-Rube *et al.* (1999)). Diese Schlußfolgerung wurde dadurch weiter gestützt, daß ein EP4-R, in dem große Teile der dritten cytoplasmatischen Schleife deletiert waren (Slipetz *et al.* (2001)), nach Agonisten-Exposition noch phosphorylierbar war.

Aufgrund dieser Befunde sollten in dieser Arbeit die potentiellen Phosphorylierungsstellen in der C-terminalen Domäne des humanen EP4-Rezeptors durch sequenzgerichtete Mutagenese teilweise oder komplett eliminiert und die Auswirkung dieser Mutationen auf die Phosphorylierung, Desensitisierung und Internalisierung untersucht werden. Weiterhin wurde der Einfluß der Mutationen auf die Bindungs- und Signaltransduktionseigenschaften, sowie den Transport des Rezeptors zur Plasmamembran untersucht.

# 5.1 Eliminierung potentieller Phosphorylierungsstellen in der C-terminalen Domäne des hEP4-R durch sequenzgerichtete Mutagenese

Für die Elimierung der potentiellen Phosphorylierungsstellen in der C-terminalen Domäne des hEP4-R existieren zwei prinzipiell unterschiedliche Verfahren, die Trunkierung der C-terminalen Domäne oder der Austausch einzelner Serine/Threonine durch sequenzgerichtete Mutagenese.

Zur Synthese einer trunkierten Rezeptormutante, in der die potentiellen Phosphorylierungsstellen eliminiert sind, wird an einer definierten Position der Rezeptor-cDNA ein Stop-Codon durch PCR-Reaktionen eingefügt, was nach heterologer Expression zu einem verkürzten Rezeptorprotein führt. Dieses Verfahren wurde jedoch nicht gewählt, da durch den Verlust großer Teile der C-terminalen Rezeptordomäne auch Elemente entfernt werden können, denen eine strukturelle Bedeutung bei der Phosphorylierung, Desensitisierung oder Internalisierung zukommen kann, ohne selbst jedoch relevante Phosphorylierungsstellen zu beinhalten. Für Trunkierungsmutanten kann daher nicht eindeutig bestimmt werden, ob der Verlust der potentiellen Phosphorylierungsstellen oder der Verlust anderer Strukturelemente für eine Modulation der Agonisten-induzierte Phosphorylierung verantwortlich sind. Darüber hinaus können durch die Trunkierung die funktionellen Eigenschaften des Rezeptors verändert werden. Für den bovinen EP3-R konnte gezeigt werden, daß Spleißvarianten des Rezeptors, die sich nur in der Sequenz ihrer C-terminalen Domäne unterschieden, an unterschiedliche G-Proteine koppelten und damit unterschiedliche Signalketten aktivierten (Namba *et al.* (1993)). Weiterhin wurde von Irie *et al.* (1994) für den EP3-R nachgewiesen, daß die C-terminale Domäne essentiell für die Agonisten-abhängige Kontrolle der Aktivierung des G-Proteins ist. Die Trunkierung der C-terminalen Domäne führte zu einer konstitutiven Aktivität des Rezeptors (Hasegawa *et al.* (1996); Jin *et al.* (1997)).

Aus diesen Gründen wurde für die Eliminierung potentieller Phosphorylierungsstellen in der C-terminalen Domäne des hEP4-R nicht die Trunkierung sondern die Substitution der Serine und Threonine durch die nicht mehr phosphorylierbare Aminosäure Alanin gewählt. Als Substituent wurde Alanin gewählt, da Alanin etwa die gleiche Größe wie Serin oder Threonin hat. Eine allein durch den Größenunterschied der Seitenkette hervorgerufene Änderung der räumlichen Anordnung des Proteins sollte so minimiert werden. Allerdings unterschieden sich Alanin einerseits und Serin und Threonin andererseits trotzdem nicht unerheblich in der relativen Häufigkeit, mit der sie in  $\alpha$ -helikalen-,  $\beta$ -Faltblatt- oder  $\beta$ -Turn-Strukturen gefunden werden können. Auch gehen durch den Austausch von Serinen und Threoninen nach Alanin Wasserstoffbrücken-Donoren und -Akzeptoren verloren, die potentiell relevant für die Stabilisierung der Sekundär- oder Tertiärstruktur sein könnten. Aus diesem Grund wurde bei der Identifikation relevanter Phosphorylierungsstellen des C5a-Rezeptors (Giannini et al. (1995) oder des Parathyroidhormon-Rezeptors (Malecz et al. (1998)) eine noch konservativere Substitutionsstrategie gewählt. Durch Phosphoraminosäureanalyse konnte ermittelt werden, daß eine Agonisten-induzierte Phosphorylierung des Rezeptors ausschließlich an Serinen und nicht an Threoninen, die ebenfalls z. B. durch GRKs phosphoryliert werden können, stattfand. Durch Substitution von Serinen durch Threonine konnten dann diejenigen Serine identifiziert werden, durch deren Substitution es zu einer Phosphorylierung des Rezeptors an Threoninresten kam.

Der Nachteil dieser Strategie besteht darin, daß nicht davon ausgegangen werden kann, daß sich Serin und Threonin unabhängig vom umgebenden Sequenzmotiv als Substrat für die GRKs in jedem Fall identisch verhalten. Threonine könnten phosphoryliert werden, obwohl Serine in identischer Position nicht phosphoryliert werden und umgekehrt. Dieses Problem erscheint weniger relevant, wenn es nur einen oder wenige Bereiche mit potentiellen Phosphorylierungsstellen gibt und nicht, wie im hEP4-R, etliche Cluster von Serinen und Threoninen, die als potentielle Phosphorylierungsstellen in Frage kommen.

Die Synthese der verschiedenen mutierten hEP4-R-cDNAs wurde mit der Methode der PCR mit überlappenden Extensionen ("site directed mutagenesis") (Ho *et al.* (1989)) durchgeführt.

Die sequenzgerichtete Mutagenese ist eine schnelle und effiziente Methode, bei der die gewünschten Mutationen durch spezifisch mutierte Primer in die cDNA eingefügt oder diese um spezifische Sequenzen verlängert werden. Zusätzlich bietet sie durch Kombination verschiedener Primer die Möglichkeit zur Synthese unterschiedlicher mutierter Fragmente, welche durch die die Primer flankierenden Restriktionsschnittstellen in unterschiedlicher Weise kombiniert werden können.

Zusätzlich zum Einfügen der Mutationen diente die PCR-Technik auch zum Verlängern des 5`-Endes der hEP4-R-cDNA um eine für das FLAG-Epitop codierenden Sequenz, welches zur Immunpräzipitation der in HEK293-Zellen exprimierten Rezeptorproteine mit dem FLAG-M2-Antikörper diente.

## 5.2 Stabile Expression der verschiedenen FLAG-hEP4-Rezeptorproteine in HEK293-Zellen und Überprüfung der Funktionalität der verschiedenen FLAG-hEP4-Rezeptorproteine

Die cDNAs für die hEP4-Rezeptormutanten, in denen die potentiellen Phosphorylierungsstellen durch Substitution eliminiert worden waren, wurden in den eukaryonten Expressionsvektor pcDNA3 kloniert, die Rezeptorproteine in HEK293-Zellen stabil exprimiert und die Rezeptorexpression immunologisch untersucht.

Von den 156 Aminosäuren der C-terminale Domäne des hEP4-R sind insgesamt 38 Serine und Threonine. Diese Serine und Threonine wurden teilweise oder vollständig gegen Alanine ausgetauscht, so daß bis zu 25% (hEP4-ST335-484A-R) der Aminosäuren der C-terminalen Domäne durch eine fremde Aminosäure ersetzt wurden. Obwohl es sich um eine relativ konservative Substitution handelte, war nicht auszuschließen, daß hierdurch die Gesamtstruktur des Rezeptorproteins gestört wurde. Deshalb wurde überprüft, ob durch die Einführung der Mutationen die Rezeptoreigenschaften, wie der korrekte Transport zur Plasmamembran, Ligandbindung und Signaltransduktion beeinflußt wurden.

#### 5.2.1 Expression der hEP4-Rezeptoren in HEK293-Zellen

Durch Immunpräzipitation mit dem FLAG-M2-Antikörper und nachfolgende Westernblot-Analyse konnte die Expression der verschiedenen hEP4-Rezeptorproteine wie erwartet in HEK293-Zellen nachgewiesen werden (Abb. 22). Alle Rezeptorproteine stellten sich als breite Bande mit einem Molekulargewicht von 70-100 kDa dar, was auf eine komplexe Glykosylierung der Rezeptoren und damit eine korrekte Prozessierung der Proteine im Golgi-Apparat rückschließen lies. Der Molekulargewichtsbereich, in dem die Rezeptorproteine nachgewiesen wurden, stimmte mit dem in Untersuchungen zur Phosphorylierung des hEP4-R in transient transfizierten COS-7-Zellen überein, bei der nur die im Bereich von 70-110 kDa wandernde Form des Rezeptors Agonisten-abhängig phosphoryliert wurde (Neuschäfer-Rube *et. al.* 1999)

#### 5.2.2 Subzelluläre Lokalisation der hEP4-Rezeptoren in HEK293-Zellen

Für den Vasopressin V<sub>2</sub>-Rezeptor ist gezeigt worden, daß Mutationen, die Aminosäureaustausche in der C-terminalen Domäne des Rezeptor verursachten, dazu führten, daß der Transport des Rezeptors zur Plasmamembran gestört war (Schülein *et al.* (1998)). Deshalb sollte sichergestellt werden, daß die Serin/Threonin nach Alanin-Substitutionen in der C-terminalen Domäne des EP4-R keinen Einfluß auf den Transport der Rezeptorproteine zur Plasmamembran hatten. Dazu wurde die subzelluläre Verteilung der Rezeptoren mit Hilfe des FLAG-M2-Antikörpers durch indirekte Immunfluoreszenz-Mikroskopie mit einem konfokalen Laserscanmikroskop untersucht.

Der hEP4-R wie auch alle mutierten Rezeptorproteine waren korrekt in der Plasmamembran lokalisiert (Abb. 23). Die Mutationen hatten also keinen Einfluß auf den intrazellulären Transport der Rezeptorproteine. Lediglich für den hEP4-S379A-Rezeptor konnte neben der Lokalisation an der Plasmamembran zusätzlich noch eine geringe perinukleäre Lokalisation und damit intrazelluläre Retention festgestellt werden (Abb.23). Dies war am ehesten auf die hohe Expressionrate dieses Rezeptors zurückzuführen, der dadurch nicht vollständig prozessiert werden konnte.

#### 5.2.3 Bedeutung der eingefügten Mutationen für die Ligandbindung

In früheren Studien wurde gezeigt, daß die Ligandbindungstasche der Prostanoidrezeptoren wahrscheinlich, wie z. B. auch bei den Catecholaminrezeptoren (Probst et al. (1992)) durch die Transmembrandomänen gebildet wird, wobei der hoch konservierten VII. Transmembrandomäne eine besondere Bedeutung bei der Ligandbindung zukommt. (Funk et al. (1993) Huang et al. (1995); Audoly und Breyer (1997a); Rehwald et al. (1999); Neuschäfer-Rube et al. (2003)). Weitere für die Ligandbindung relevante Aminosäuren sind unter Umständen in den extrazellulären Domänen lokalisiert. (Huang et al. (1996); Audoly und Breyer (1997b); Tai et al. (1997), Kedzie et al. (1998); Stillman et al. (1998); Stillman et al. (1999)). Da sich alle eingefügten Mutationen in der intrazellulären C-terminalen Domäne des hEP4-Rezeptors befanden, wurde angenommen, daß diese Mutationen keinen Einfluß auf die Ligandbindung haben. Es gibt aber auch Beispiele dafür, daß auch Veränderungen in der C-terminalen Domäne einen Einfluß auf die Ligandbindung haben können. So wurde gezeigt, daß eine C-terminale Trunkation des Angiotensin II-Rezeptors zu einer veränderten Affinität des Rezeptors zum Liganden führte (Pulakat et al. (2002)). Daher war nicht auszuschließen, daß ein solcher Effekt auch für die mutierten hEP4-Rezeptorproteine

zutreffen könnte, zumal die C-terminale Domäne des hEP4-R direkt an die hochkonservierte VII. Transmembrandomäne anschließt und mögliche, durch die Mutationen bedingte Strukturveränderungen dieser Domäne direkt auf die VII. Transmembrandomäne übertragen werden könnten.

Die Affinität der verschiedenen FLAG-hEP4-Rezeptorproteine für PGE<sub>2</sub> wurden durch Sättigungsbindungsstudien mit [<sup>3</sup>H]-markiertem-PGE<sub>2</sub> untersucht. Die K<sub>d</sub> für den Liganden betrug für den Wildtyprezeptor 1,31 nM (Tab. 7). Da die Affinität aller mutierten Rezeptorproteine für PGE<sub>2</sub> gleich hoch war wie die des Wildtyps (Tab. 7), ließ sich ein Einfluß der Mutationen auf die Ligandbindung der Rezeptorproteine ausschließen. Die Bindungskapazitäten der die unterschiedlichen Rezeptorproteine exprimierenden HEK293-Zellklone (Tab. 7) waren mit Ausnahme des den hEP4-S379A-R exprimierenden Zellklons, Unterschiede etwa aleich. SO daß sich in der Rezeptorsignaltransduktion, Rezeptorphosphorylierung, und Internalisierung Desensitisierung nicht auf eine unterschiedliche Rezeptorexpression zurückführen lassen. Ähnlich wie beim EP4-R hatte auch beim Thromboxan A2-Rezeptor (Spurney et al. (1998)) und den Gastrin-releasingpeptide-Rezeptor (Benya et al. (1993)) die Substitution verschiedener Serine und Threonine in der C-terminalen Domäne keinen Einfluß auf die Bindungseigenschaften des Rezeptors. Die Affinität des hEP4-wt-Rezeptors und der hEP4-Rezeptormutanten für PGE<sub>2</sub> war annähernd gleich wie die in anderen Untersuchungen gefundene (Bastepe und Ashby (1997); Neuschäfer-Rube et al. (1998)). Weiterhin konnten Bastepe und Ashby (1997) für einen in CHO-K1-Zellen exprimierten trunkierten EP4-R, dem die C-terminale Domäne ab Aminosäure 350 fehlte, eine dem Wildtyp vergleichbare Affinität für PGE<sub>2</sub> bestimmen. Diese Ergebnisse bestätigen, daß die Mutationen in der C-terminalen Domäne des EP4-R keinen Einfluß auf die Bindungseigenschaften des Rezeptors haben.

# 5.2.4 Einfluß der Mutationen in der C-terminalen Domäne des hEP4-R für die Signaltransduktion des Rezeptors

#### Kopplungsspezifität

Für den bovinen EP3-R konnte eine Funktion der C-terminalen Domäne für die Spezifität der Kopplung des Rezeptors an unterschiedliche G Proteine gezeigt werden. Spleißvarianten des Rezeptors, welche sich nur in der Sequenz ihrer C-terminalen Domäne unterschieden, koppelten an unterschiedliche G-Proteine (Namba *et al.* (1993)). Im Gegensatz dazu koppelte ein Hybridrezeptor aus dem G<sub>i</sub>-gekoppelten Ratten-EP3 $\beta$ -R, in dem die C-terminale Domäne gegen die des G<sub>s</sub>-gekoppelten EP4-R ausgetauscht war, weiterhin an G<sub>i</sub> (Neuschäfer-Rube *et al.* (1997)). Es war dennoch nicht auszuschließen, daß sich die Kopplungsspezifität des hEP4-R aufgrund der eingefügten Mutationen in der C-terminalen Domäne ändern könnte.

Durch PGE<sub>2</sub>-Stimulation konnte in allen Rezeptor-exprimierenden Zellen die cAMP-Bildung gesteigert werden, woraus sich schließen ließ, daß in HEK293-Zellen sowohl der hEP4 wt-R wie auch alle mutierten Rezeptorproteine an G<sub>s</sub> koppelten (Abb. 24). Die PGE<sub>2</sub>-induzierte cAMP-Bildung in Membranen von Zellen, die die mutierten hEP4-R exprimierten unterschied sich nicht von der PGE<sub>2</sub>-induzierten cAMP-Bildung in Membranen hEP4 wt-R-exprimierender HEK293-Zellen. Weiterhin war das Verhältnis der spezifischen, PGE<sub>2</sub>-induzierten cAMP-Bildung und der unspezifischen, direkt die Adenylatcyclase aktivierenden Forskolin-stimulierten cAMP-Bildung in allen Zellen annährend gleich. Daher konnte davon ausgegangen werden, daß alle mutierten Rezeptorproteine funktionell waren und mit der gleichen Effizienz an das G<sub>s</sub>-Protein und die Adenylatcyclase-Signalkette koppelten (Abb. 24).

#### Kopplungskontrolle

Die C-terminale Domäne von G-Protein-gekoppelten Rezeptoren kann auch einen Einfluß auf die G-Protein-Kopplungskontrolle haben. So führte die Trunkierung der C-terminalen Domäne des EP3-R (Hasegawa et al. (1996); Jin et al. (1997)), oder die Substitution eines Leucin unmittelbar zu Beginn der C-terminalen Domäne des AT<sub>1A</sub>-Rezeptors (Parnot et al. (2000)) zu einer konstitutiven, Ligand-unabhängigen Aktivität dieser Rezeptoren. Dagegen zeigte der IP-R nach Substitution verschiedener Aminosäuren in der C-terminalen Domäne ein normales Kopplungsverhalten (Smyth et al. (1998)) und Sustitutionen in der C-terminalen Domäne des PTH-Rezeptors hatten keinen Einfluß auf dessen Signaltransduktion (Malecz et al. (1998)). Weiterhin führte die Trunkierung der C-terminalen Domäne des EP4-Rezeptors (Bastepe und Ashby (1997); Slipetz et al. (2000)) zu keiner Veränderung in der G-Protein-Kopplung. Um dennoch einen möglichen Einfluß der Mutationen in der C-terminalen Domäne des hEP4-R auf die Liganden-unabhängige G-Protein-Aktivierung auszuschließen, wurde die basale und Agonisten-induzierte cAMP-Bildung der verschiedenen Rezeptor-exprimierenden Zellen bestimmt. Die verschiedenen Rezeptor-exprimierenden HEK293-Zellen zeigten ohne Agonisten-Stimulation einen vergleichbar geringen basalen cAMP-Spiegel, was zeigt, daß die Mutationen keine konstitutive Aktivität der verschiedenen Rezeptoren hervorrief. Ebenso hatten die Mutationen keinen Einfluß auf die G-Protein-Kopplung, da die PGE<sub>2</sub>-induzierte cAMP-Bildung der mutierten Rezeptorproteine sich nicht von der des Wildtyprezeptors unterschied (Abb. 24).

# 5.3 Agonisten-induzierte Phosphorylierung des FLAG-hEP4-wt-Rezeptors und der verschiedenen mutierten Rezeptorproteine

Eine allgemein gültige, auf der Primärstruktur basierende Vorraussage, welche der Serine und Threonine nach Agonisten-Exposition in den intrazellulären Domänen von GPCR phosphoryliert werden, ist nicht möglich, da es nur für die "second-messenger"-abhängigen Kinasen PKA und PKC, nicht aber für die GRKs Konsensus-Sequenzen gibt. Bisher wurden relevante Phosphorylierungsstellen hauptsächlich in der C-terminalen Domäne verschiedener GPCRs identifiziert, jedoch wurden auch Phosphorylierungen in den intrazellulären Schleifen nach Stimulation mit dem Agonisten beschrieben (Hosey *et al.* (1999); Celver *et al.* (2001)).

Da eine ab Aminosäure 350 deletierte Trunkierungsmutante des EP4-Rezeptors nicht mehr desensitisierte (Bastepe und Ashby (1996)), wurden die relevanten Phosphorylierungsstellen des hEP4-R in der C-terminalen Domäne des Rezeptors vermutet. Dies konnte anhand von Untersuchungen mit einem Hybridrezeptor, der aus dem nicht desensitisierbaren EP3β-R bis einschließlich der VII. Transmembrandomäne und der C-terminalen Domäne des EP4-R bestand, bestätigt werden. Der Hybridrezeptor wurde, wie der hEP4-R, nach Agonisten-Exposition phosphoryliert während der rEP3β-R nicht phosporyliert wurde. Damit konnte gezeigt werden, daß die C-terminale Domäne des hEP4-R nicht nur notwendig, sondern auch hinreichend war, die Agonisten-induzierte Phosphorylierung zu vermitteln (Neuschäfer-Rube et al. (1999)). Während der Arbeiten zu der vorliegenden Untersuchung konnte eine Agonisten-induzierte Phosphorylierung des EP4-R ebenfalls von Slipetz et al. (2001) gezeigt werden. In dieser Untersuchung wurde eine nach Aminosäure 355-deletierte Rezeptormutante nicht mehr Agonisten-induziert phosphoryliert, wodurch der Bereich der potentiell relevanten Phosphorylierungsstellen mit gewissen Vorbehalten (siehe 5.1) auf die Serine und Threonine zwischen 359 und 484 eingrenzt werden konnte.

### 5.3.1 Identifizierung der an der PGE<sub>2</sub>-induzierten Phosphorylierung des FLAG-hEP4wt-Rezeptors beteiligten Kinasen

Der FLAG-hEP4-wt-Rezeptor zeigte eine basale Phosphorylierung, die nach PGE<sub>2</sub>-Stimulation deutlich gesteigert werden konnte (Abb. 25). Dagegen war nach Stimulation der Zellen mit Forskolin, welches die Adenylatcyclase und damit PKA aktiviert, keine Phosphorylierung und durch den PKC-Aktivator PMA nur eine schwache Phosphorylierung zu beobachten. Die basale und PMA-induzierte Phosphorylierung, nicht jedoch die PGE<sub>2</sub>induzierte Phosphorylierung konnte durch Vorbehandlung der Zellen mit dem PKA/PKC-Inhibitor Staurosporin gehemmt werden. Diese Befunde ließen auf eine GRK- und nicht PKAoder PKC-vermittelte Phosphorylierung des Rezeptors durch Ligand-Exposition schließen, obwohl der Rezeptor über mehrere PKA- und PKC-Konsensus-Sequenzen verfügt. Dieses Ergebnis wurde durch Behandlung der FLAG-hEP4-wt-R exprimierenden HEK293-Zellen mit GRK-Antisense-Nukleotiden unterstützt, durch welche die PGE<sub>2</sub>-induzierte Phosphorylierung reduziert werden konnte (nicht gezeigt). Weiterhin führte die Überexpression von GRK2, 3 und 5 zu einer Steigerung der Agonisten-induzierten Phosphorylierung des hEP4-R (Neuschäfer-Rube *et al.* (1999)). Auch konnte die Agonisten-abhängige Desensitisierung des hEP4-Rezeptors durch Heparin, einem Inhibitor der GRK-vermittelten Phosphorylierung, gehemmt werden (Nishigaki *et al.* (1996)), was auf eine Beteiligung von GRKs bei der Agonisten-induzierten hEP4-R-Phosphorylierung hindeutete.

### 5.3.2 PGE<sub>2</sub>-induzierte Phosphorylierung der verschiedenen mutierten FLAG-hEP4-Rezeptorproteine

Die Substitution aller in der C-terminalen Domäne lokalisierten Serine und Threonine durch Alanin führte zu einem vollständigen Verlust der Agonisten-induzierten Phosphorylierung (Abb. 26), was die Lokalisation der für die PGE<sub>2</sub>-induzierten Phosphorylierung relevanten Phosphorylierungsstellen des Rezeptors in der C-terminalen Domäne bestätigte. Desweiteren konnte eine Phosphorylierung an Tyrosinresten ausgeschlossen werden. Die noch vorhandene basale Phosphorylierung könnte auf eine nicht Agonisten-abhängige unspezifische Phosphorylierung in einer cytoplasmatischen Schleife hinweisen.

PGE<sub>2</sub>-Stimulation von HEK293-Zellen, die den hEP4 ST428-484A-R oder den hEP4 ST335-354; 389-484A-R stabil exprimierten, führte zu einer mit dem hEP4 wt-R vergleichbaren Phosphorylierung, während die PGE<sub>2</sub>-induzierte Phosphorylierung des hEP4 ST335-405A-R und des hEP4 ST335-382A-R im Vergleich zu dem hEP4 wt-R um 75% reduziert war. Hierdurch konnte gezeigt werden, daß der hEP4-R nach PGE<sub>2</sub>-Stimulation zum überwiegenden Teil an Serinen und Threoninen im proximalen Teil der C-terminale Domäne phosphoryliert wurde und daß die Serine und Threonine zwischen Aminosäure 359 und 382 für eine dem hEP4 wt-R vergleichbaren Phosphorylierung hinreichend, und zum überwiegenden Teil auch notwendig waren. Diese Ergebnisse stehen im Einklang mit Experimenten zur PGE<sub>2</sub>-induzierten Desensitisierung des hEP4-R, die während der laufenden Arbeiten publiziert wurden. In diesen Experimenten wurde gezeigt, daß Substitution der Serine und Threonine zwischen Aminosäure 370 und 382 durch Alanin zu einem Verlust der Agonisten-induzierten Desensitisierung des hEP4-R führte (Bastepe und Ashby (1999)). Dies konnte weiterhin durch Untersuchungen bestätigt werden, in denen ein nach Aminosäure 355 trunkierter hEP4-R nicht mehr Agonisten-abhängig phosphoryliert wurde (Slipetz et al. (2001)).

Vorläufige Experimente zur Identifizierung der nach Agonisten-Stimulation im hEP4 wt-R phosphorylierten Serine/Threonine durch Phosphopeptidsequenzierung hatten ergeben, daß unter Umständen dem Serin 379 eine besondere Bedeutung bei der Phosphorylierung des Rezeptors zukommt. Dies konnte jedoch in den in dieser Arbeit durchgeführten Experimente nicht bestätigt werden. Einerseits reduzierte die alleinige Substitution des Serin 379 die PGE<sub>2</sub>-induzierte Phosphorylierung des hEP4-R nicht und andererseits führte die Reinsertion von Serin 379 in den FLAG-hEP4 ST335-484A-R zu keiner Agonisten-induzierten

Rezeptorphosphorylierung. Eine Phosphorylierung von Serin 379 im hEP4 wt-R konnte jedoch hierdurch nicht ausgeschlossen werden. Es ist zu vermuten, daß der Verlust einer einzigen Phosphorylierungsstelle durch die Phosphorylierung residualer Phosphorylierungsstellen kompensiert werden kann und eine einzige verbleibende Phosphorylierungsstelle nicht für eine effektive Initiation der Rezeptorphosphorylierung ausreichend ist.

Anhand der durchgeführten Experimente konnte neben der überwiegenden Phosphorylierung proximaler Serine und Threonine auch eine geringe Agonisten-induzierte Phosphorylierung im distalen Bereich der C-terminalen Domäne nachgewiesen werden, die mit großer Wahrscheinlichkeit im Bereich der Serine und Threonine zwischen Aminosäure 428 und 484 lokalisiert war. Die durchgeführte Untersuchung reichte jedoch nicht aus, um entscheiden zu können, ob die PGE<sub>2</sub>-induzierte Phosphorylierung distaler Serine und Threonine auch im hEP4 wt-R stattfand, oder ob es sich hierbei um eine kompensatorische Phosphorylierung in den Rezeptormutanten handelte, bei denen die "Hauptphosphorylierungssstelle" nicht mehr vorhanden war.

### 5.4 Desensitisierung des FLAG-hEP4 wt-Rezeptors und des FLAG-hEP4 ST335-484A-Rezeptors

Nach einem, für den  $\beta$ 2-adrenergen Rezeptor als Modell-Rezeptor entwickelten Konzept, kommt es nach der Bindung eines Liganden an G-Protein-gekoppelte Rezeptoren zur Rekrutierung des Adaptoproteins  $\beta$ -Arrestin an den Ligand-besetzten Rezeptor, was eine, wahrscheinlich sterische, Entkopplung des Rezeptors von seinem G-Protein und seiner nachgeschalteten Signalkette zur Folge hat. Dieses Phänomen wird als Desensitisierung bezeichnet. Eine der  $\beta$ -Arrestin-Bindung vorausgehende Phosphorylierung des Rezeptors durch G-Protein-gekoppelter-Rezeptor-Kinasen oder PKA/PKC erhöht dabei die Affinität von  $\beta$ -Arrestin für den Rezeptor und ist in den meisten untersuchten Rezeptorsystemen Vorraussetzung für eine effektive Desensitisierung des Rezeptors. Eine der Desensitisierung vorausgehende Phosphorylierung wurde für den  $\beta$ -adrenergen Rezeptor (Palmer *et al.* (1995)), den Angiotensin II-Rezeptor (Oppermann *et al.* (1996)), den  $\mu$ -opioid-Rezeptor (Yu *et al.* (1997)), den Endothelin-Rezeptor (Freedman *et al.* (1997)), den  $\beta$ 1-adrenergen-Rezeptor (Ishii *et al.* (1994)) sowie viele andere Rezeptoren beschrieben.

Die Agonisten-induzierte Desensitisierung des EP4-R wurde zuerst von Nishigaki *et al.* (1996) beschrieben. Im Gegensatz zu CHO-Zellen, welche den ebenfalls G<sub>s</sub>-gekoppelten EP2-R der Maus exprimierten, führte eine primäre PGE<sub>2</sub>-Exposition von CHO-Zellen, welche den Maus EP4-R exprimierten, zu einer Reduktion der cAMP-Bildung durch einen sekundären PGE<sub>2</sub>-Stimulus. Dabei verringerte der erste Stimulus die maximale durch die

zweite PGE<sub>2</sub>-Exposition induzierte cAMP-Bildung ohne die EC50 für die PGE<sub>2</sub>-induzierte cAMP-Bildung zu beeinflussen. Die Desensitisierung des EP4-R war nach 5 min zu beobachten und erreichte ihr Maximum nach 10 min.

Die Bedeutung der C-terminalen Domäne für die Agonisten-induzierte Desensitisierung konnte durch Untersuchungen mit einem Hybridrezeptor aus dem Ratten EP3β-Rezeptor, dessen C-terminale Domäne durch die des humanen EP4-R ausgetauscht war, gezeigt werden. Im Gegensatz zu dem Ratten EP3β-R führte die Agonisten-Exposition zu einer Desensitisierung des Hybridrezeptor, wodurch gezeigt werden konnte, daß die C-terminale Domäne des hEP4-R ausreichend war, um eine Agonisten-induzierte Desensitisierung zu vermitteln.

Dieser Befund wurde dadurch unterstützt, daß eine C-terminal ab Aminosäure 350 trunkierte Mutante des hEP4-R nicht mehr Agonisten-abhängig desensitisierte (Bastepe und Asby (1997)).

Um die Relevanz der in der C-terminalen Domäne hEP4 wt-R lokalisierten Serine und Threonine für die Desensitisierung zu ermitteln, wurde zunächst die Agonisten-induzierte Desensitierung des hEP4 wt-R im Vergleich mit dem hEP4 ST335-484A-R, in dem keine der potentiellen Phosphorylierungsstellen mehr vorhanden waren, untersucht. Dabei wurde die PGE<sub>2</sub>-stimulierte cAMP-Bildung der beiden Rezeptoren als Meßparameter für die nachgeschaltete Signalkette verwendet.

# 5.4.1 Desensitisierung des hEP4 wt-Rezeptors und des hEP4 ST335-484A-Rezeptors nach Vorstimulation mit PGE<sub>2</sub>

Die Agonisten-induzierte Entkopplung des FLAG-hEP4 wt-R und des FLAG-hEP4 ST335-484A-R wurde zunächst in einem Verfahren untersucht, bei dem die Desensitisierung der Rezeptoren durch einen ersten PGE<sub>2</sub>-Stimulus (Vorstimulation) initiiert, der gebundene Ligand vom Rezeptor entfernt und die cAMP-Bildung auf eine direkt anschließende zweite PGE<sub>2</sub>-Exposition (Restimulation) gemessen wurde (Abb. 27). Dabei wurde eine intrazelluläre cAMP-Akkumulation erst in der zweiten Stimulationsphase durch Zugabe des Phosphodiesteraseinhibitors IBMX ermöglicht. Der deutlich erhöhte cAMP-Spiegel der vorstimulierten, aber nicht restimulierten hEP4 wt-R oder hEP4 ST335-484A-R exprimierenden HEK293-Zellen ließ auf ein Verbleiben eines Großteils des Liganden am Rezeptor schließen. Weder in den hEP4 wt-R noch in den hEP4 ST335-484-R exprimierenden HEK293-Zellen ließ sich der erhöhte intrazelluläre cAMP-Spiegel durch einen zweiten Stimulus steigern. Eine durch den ersten Stimulus induzierte verringerte Signaltransduktion ließ sich daher nicht messen. Jedoch war der basale, durch den nach Vorstimulation am Rezeptor verbleibenden Liganden induzierte Anstieg des cAMP in vorstimulierten hEP4 wt-R exprimierenden Zellen, nicht aber in hEP4 ST335-484A-R

exprimierenden Zellen geringer als der durch PGE<sub>2</sub> induzierte cAMP-Anstieg in nichtvorstimulierten Zellen. Dies konnte als ein Hinweis darauf gewertet werden, daß der hEP4 wt-R im Gegensatz zum hEP4-ST335-484A-R Agonisten-abhängig desensitisiert wurde. Wenn überhaupt, wurde jedoch nur ein so kleiner Teil der hEP4 wt-R Agonisten-abhängig desensitisiert, daß die Aktivierung der nachgeschalteten Signalkette davon kaum beeinträchtigt wurde. Dies könnte seine Ursachen in einem, in der hohen Expressionsrate der Rezeptoren in den HEK293-Zellen begründeten, Mißverhältniss zwischen Rezeptor und nachgeschalteter Signalkette haben. In diesem Fall würde ein geringer Anteil nicht von seinem G-Protein entkoppelter Rezeptoren ausreichend sein, um die intrazelluläre Signalkaskade maximal zu aktivieren ("spare-receptor"-Hypothese). Zusammengefaßt war das gewählte Verfahren nicht geeignet, um eine Bedeutung einzelner Phosphorylierungsstellen für die PGE<sub>2</sub>-induzierte hEP4-R-Desensitisierung zu untersuchen.

### 5.4.2 Fehlende Unterschiede in der Kinetik der PGE<sub>2</sub>-induzierten cAMP-Bildung in hEP4 wt-Rezeptor oder hEP4 ST335-484A-Rezeptor exprimierenden HEK293-Zellen nach Prästimulation mit PGE<sub>2</sub>

Da nach PGE<sub>2</sub>-Vorstimulation der hEP4 wt-R exprimierenden Zellen im Gegensatz zu den hEP4 ST335-484A-R exprimierenden Zellen eine geringfügig reduzierte cAMP-Bildung gemessen werden konnte, wurde in beiden Zellinien die Kinetik der PGE<sub>2</sub>-induzierten cAMP-Bildung nach Stimulation der Zellen mit PGE<sub>2</sub> und nachfolgender Akkumulation des intrazellulären cAMPs durch den Phosphodiesteraseinhibitor IBMX untersucht. Die hEP4 wt-R oder hEP4 ST335-484A-R exprimierenden Zellen zeigten nach IBMX-Zugabe einen vergleichbar schnellen Anstieg des intrazellulären cAMP-Spiegels, der nach ca. 10 min sein Maximum errreichte und über weitere 20 min konstant blieb (Abb. 28). Die Steigerung der cAMP-Bildung war in beiden Rezeptor exprimierenden Zellinien vergleichbar, was gegen eine Desensitisierung des EP4 wt-R und einer daraus resultierenden verminderten Steigerung des cAMP-Spiegel sprach. Dieses Ergebnis unterstützte die Annahme, daß der nach Agonisten-Exposition verbleibende, nicht entkoppelte Rezeptoranteil ausreichte, um die nachgeschaltete Signalkette maximal zu aktivieren (vgl. Abb. 27).

Die für den potentiell nicht mehr desensitisierbaren FLAG-hEP4 ST335-484A-R erwartete, kontinuierliche Agonisten-induzierte cAMP-Bildung konnte nicht beobachtet werden. Das Erreichen eines konstanten cAMP-Spiegels könnte bedeuteten, daß möglicherweise eine Komponente der dem Rezeptor nachgeschalteten Signalkette durch die starke intrazelluläre cAMP-Akkumulation desensitisiert wurde. Aus diesem Grund wurde die Kinetik der Rezeptor-unabhängigen cAMP-Bildung durch Stimulation mit Forskolin, einem direkten Aktivator der Adenylatcyclase untersucht. Forskolin stimulierte die cAMP-Bildung in hEP4 wt-R oder hEP4 ST335-484A-R exprimierenden Zellen mit der gleichen Kinetik wie

PGE<sub>2</sub>, wobei ein Maximum ebenfalls nach 10 min erreicht wurde und der cAMP-Spiegel über weitere 20 min konstant blieb (Abb 29). Dies ließ vermuten, daß es unabhängig vom Rezeptor zu einer Desensitisierung der Adenylatcyclase, verursacht durch den hohen intrazellulären cAMP-Spiegel kam. Denkbar wäre auch, daß sich ein Gleichgewicht zwischen cAMP-Bildung und cAMP-Abbau nach ca. 10 min einstellte, bei dem, trotz des Phosphodiesteraseinhibitors IBMX, ein weiterer cAMP-Anstieg durch eine erhöhte Abbaurate kompensiert wurde.

In HEK293-Zellen wird in geringem Maße endogen der ebenfalls  $G_s$ -gekoppelte EP2-Rezeptor exprimiert. Um eine mögliche Aktivierung dieses Rezeptors zu vermeiden, wodurch die Desensitisierung des EP4 wt-R überlagert werden könnte, wurde eine Kinetik der cAMP-Bildung in hEP4 wt-R oder hEP4 ST335-484A-R exprimierenden HEK293-Zellen mit dem EP4-Rezeptor-spezifischen, synthetischen Agonisten ONO604 durchgeführt (Abb. 30).

Die resultierende Kinetik entsprach der aus dem Versuch mit PGE<sub>2</sub> (Abb. 28), was zeigte, daß der fehlende Nachweis der Desensitisierung des hEP4 wt-R nicht auf eine Aktivierung des intrinsisch in HEK293-Zellen exprimierten EP2-R zurückzuführen war.

Zusammenfassend konnte auch durch die kinetische Erfassung der PGE<sub>2</sub>-stimulierten cAMP-Bildung in hEP4 wt-R- oder hEP4 ST335-484A-R-exprimierenden Zellen die Agonisten-induzierte Desensitisierung des hEP4 wt-R nicht gezeigt werden.

#### 5.4.3 Fehlende Rechtsverschiebung der Dosis-Wirkungskurve des hEP4 wt-R

Da in den Kinetiken die Desensitisierung des hEP4 wt-R nicht nachgewiesen werden konnte, sollte die Desensitisierung anhand einer Rechtsverschiebung der Dosis-Wirkungskurve für die PGE<sub>2</sub>-induzierte cAMP-Bildung in Membranen PGE<sub>2</sub>-vorstimulierter Zellen untersucht werden, wie dies für den  $\beta$ 2-adrenergen Rezeptor gezeigt worden war (Bouvier *et al.* (1988); Hausdorff et al. (1998)). Nach PGE<sub>2</sub>-Vorstimulation der hEP4 wt-R exprimierenden Zellen sollte in der Restimulation PGE<sub>2</sub> ein gleich großes Signal erst mit höheren Konzentrationen auslösen. Ferner sollten sättigende Agonistenkonzentrationen in Zellen, in denen der Rezeptor desensitisiert ist, eine geringere maximale Signalstärke auslösen. Die Untersuchung der Dosis-Wirkungskurven-Verschiebung wurde in Membranen durchgeführt, um einen Einfluß des während der Vorstimulationsphase aufgebauten hohen intrazellulären cAMP-Spiegels auf die cAMP-Bildung in der zweiten Stimulationsphase auszuschließen. Auch mit diesem experimentellen Ansatz konnte eine Desensitisierung des hEP4 wt-R nicht nachgewiesen werden. Die Dosis-Wirkungskurven für die PGE2-stimulierte cAMP-Bildung waren in Membranen nicht-vorstimulierter und vorstimulierter Zellen nicht signifikant unterschiedlich (Abb. 31).

Im Gegensatz zu diesem Befund konnten Slipetz *et al.* (2001) in ganzen Zellen eine Rechtsverschiebung der Dosis-Wirkungskurve für die PGE<sub>2</sub>-stimulierte cAMP-Bildung in HEK293-Zellen nachweisen, die den EP4-Rezeptors stabil exprimierten, allerdings wählten sie eine 30 minütige Vorstimulation. Bei solch langen Vorstimulationsphasen kann es neben der Rezeptordesensitisierung schon zu einer Internalisierung des Rezeptors kommen und die beobachtete Rechtsverschiebung der Dosis-Wirkungskurve könnte daher die Folge der Internalisierung und nicht der Desensitisierung des Rezeptorproteine sein.

Nishigaki *et al.* (1996) konnten eine Rechtsverschiebung der Dosis-Wirkungskurve nach PGE<sub>2</sub>-Vorstimulation in CHO-K1-Zellen, die den hEP4 wt-R exprimierten nicht nachweisen, allerdings fanden sie eine um 20% reduzierte maximale Aktivierung der Adenylatcyclase nach Vorstimulation mit PGE<sub>2</sub>. Eine mögliche Erklärung dafür, daß in den CHO-K1-Zellen eine Desensitisierung im Gegensatz zu den jetzt durchgeführten Experimenten nachweisbar war, ist der wahrscheinlich sehr viel niedrigere Expressionsspiegel der Rezeptorproteine. In den Arbeiten von Bastepe und Ashby (1997) und Castleberry *et al.* (2001) wurden Zellklone untersucht, in denen sättigende Kontentrationen PGE<sub>2</sub> den cAMP-Spiegel ca. 2-fach über basal steigerten. In den in dieser Arbeit untersuchten Zellinien hob PGE<sub>2</sub> dagegen den cAMP-Spiegel ca. 15-20-fach über basal.

Wahrscheinlich ist durch die sehr hohe Konzentration der Rezeptorproteine in der hier untersuchten HEK293-Zellinie die Desensitisierung des FLAG-hEP4 wt-Rezeptors nicht nachweisbar, da selbst bei einer Entkopplung eines großen Teils der vorhandenen Rezeptoren die Anzahl der verbleibenden, noch aktivierbaren Rezeptoren zur vollständigen Aktivierung der nachgeschalteten Signalkaskade ausreicht. Ein Unterschied zwischen dem hEP4 wt-R und dem mutmaßlich nicht mehr desensitisierbaren hEP4 ST335-484A-R konnte daher nicht nachgewiesen werden.

### 5.5 Internalisierung und β-Arrestin-Rekrutierung des FLAG-hEP4 wt-Rezeptors und der verschiedenen mutierten Rezeptoren

Zu Beginn dieser Arbeit lagen noch keine Daten über die Internalisierung des hEP4-Rezeptors vor.

Desai *et al.* (2000) zeigten als erstes die Agonisten-induzierte Internalisierung des EP4-R. Ein ab Aminosäure 350 trunkierter EP4-Rezeptor wurde nach Agonisten-Stimulation nicht mehr internalisiert, was einen ersten Hinweis auf die Beteiligung der C-terminalen Domäne bei der Internalisierung gab. Eine weitere von ihnen untersuchte Rezeptormutante, in der die Serine und Threonine zwischen Aminosäure 354 und 382 durch Alanine substituiert waren, und ein ab Aminosäure 383 trunkierter Rezeptor internalisierten allerdings noch ähnlich wie der Wildtyprezeptor. Die Agonisten-abhängige Internalisierung des EP4-R wurde von Slipetz *et al.* (2001) bestätigt. Sie zeigten weiterhin anhand von zwei Deletionsmutanten, daß der Verlust großer Teile der dritten intrazellulären Schleife keinen Einfluß auf die Internalisierung hatte, während die Deletion der C-terminalen Domäne ab Aminosäure 355 zu einem Verlust der Internalisierung führte. Diese Ergebnisse bestätigten die Lokalisation der für die Internalisierung relevanten Elemente in der C-terminalen Domäne des EP4-R. Weiterhin wurde die Beteiligung von  $\beta$ -Arrestin und Dynamin an der Internalisierung des EP4-R durch Co-Expression mit dominant-negativem  $\beta$ -Arrestin (319-418), das konstitutiv an Clathrin bindet, und dominant-negativem Dynamin I (K44A), das GTP nicht mehr binden kann, gezeigt (Desai *et al.* (2001)). Die Co-Expression beider Proteine mit dem EP4-R hemmte die Agonisten-induzierte Internalisierung.

#### 5.5.1 Internalisierung der verschiedenen FLAG-hEP4-Rezeptoren

Die Internalisierung des hEP4 wt-R wurde in dieser Arbeit durch drei experimentelle Ansätze untersucht: Die Reduktion der an der Zelloberfläche durch das FLAG-Epitop nachweisbaren Rezeptorproteine wurde im Cyto-ELISA nachgewiesen (Abb. 32), die Umverteilung der Rezeptorproteine von der Plasmamembran in ein intrazelluläres Kompartiment durch Immunfluoreszenz-Mikroskopie gezeigt (Abb. 36) und die Cointernalisierung des radioaktiv markierten Liganden mit dem Rezeptor quantifiziert (Abb. 34). In allen drei Verfahren konnte nachgewiesen werden, daß der Wildtyprezeptor Agonisten-abhängig internalisiert wurde, während keine Agonisten-induzierte Internalisierung der Mutante nachweisbar war, in der alle Serine und Threonine in der C-terminalen Domäne gegen Alanin substituiert waren. Offensichtlich war das Vorhandensein der Serine und Threonine für die Agonisten-induzierte Internalisierung notwendig.

Die Lokalisation der für die Internalisierung relevanten Serine und Threonine konnte anhand der Messung des mit den unterschiedlichen Rezeptormutanten internalisierten Liganden auf den Bereich zwischen Aminosäure 389-484 eingegrenzt werden (Abb. 35), da nur die Mutanten, in denen diese Serine und Threonine erhalten waren in diesem Assay im gleichen Umfang wie der Wildtyprezeptor Agonisten-abhängig internalisiert wurden, jedoch nicht die Mutanten, denen diese Serine und Threonine fehlten (Abb. 35).

Die Daten des Cyto-ELISAs unterstrichen die Notwendigkeit des Vorhandenseins der Serine und Threonine im distalen Teil der C-terminalen Domäne des hEP4-R ab dem Serin 428 für die Agonisten-induzierte Internalisierung. Die Mutante, der nur diese Serine und Threonine fehlten, wurde nicht mehr Agonisten-abhängig internalisiert. Im Gegensatz zum Ligand-Internalisierungsassay, der den Schluß nahelegte, daß auch noch die Serine und Threonine zwischen 389 und 405 für die Agonisten-induzierte Internalisierung essentiell waren, deutete der Cyto-ELISA darauf hin, daß dieser Cluster nicht essentiell war, da die Mutante, in der diese Serine und Threonine erhalten war (hEP4 ST335-382A-R) nicht besser internalisiert
wurde als die Mutante, der diese Serine und Threonine fehlten (hEP4-ST335-405A-R). Beide Mutanten wurden im gleichen Umfang wie der Wildtyp-Rezeptor internalisiert.

Die Unterschiede in der durch Cyto-ELISA und Ligand-Internalisierung nachgewiesenen Rezeptorinternalisierungen könnten unter Umständen darauf zurückzuführen sein, daß der Cyto-ELISA nur die zu einem bestimmten Zeitpunkt an der Oberfläche zugänglichen Epitope erfaßt, während die Internalisierung des an den Rezeptor gebunden Liganden den gesamten über einen längeren Zeitraum in die Zelle aufgenommenen Liganden erfaßt. Die Menge des internalisierten Liganden könnte die Menge an internalisiertem Rezeptor übersteigen, wenn man annimmt, daß im Beobachtungszeitraum Rezeptorproteine an die Zelloberfläche rezirkulieren und neuen Liganden binden und internalisieren können, während der Ligand intrazellulär verbleibt.

Die Ergebnisse der Immunfluoreszenz-mikroskopischen Untersuchung zur Internalisierung sind eher mit denen des Ligand-Internalisierungsassays vereinbar, da nur bei solchen Rezeptormutanten eine Internalisierung morphologisch eindeutig nachweisbar war, bei denen alle Serine und Threonine ab Serin 389 erhalten waren. Die Mutante, der zusätzlich zu den Serinen und Threoninen bis Serin 382 auch die Serine und Threonine 389-405 fehlten, wurde nicht mehr internalisiert, allerdings war eine Agonisten-abhängige Clusterung der Rezeptorproteine an oder unmittelbar unterhalb der Plasmamembran nachweisbar. Zusammengenommen sprechen die Versuche eher dafür, daß die Serine und Threonine ab 389 bis 484 für die Agonisten-induzierte Internalisierung essentiell sind.

Für den Neurotensin 1-, Oxyticin- und Angiotensin II Typ 1A-Rezeptor wurde gezeigt (Oakley *et al.* (2001)), daß für die Agonisten-induzierte Internalisierung Cluster von Serinen und Threoninen notwendig sind, um nach Agonisten-Exposition einen stabilen Komplex von  $\beta$ -Arrestin und Rezeptor zu bilden. Innerhalb des Bereichs der C-terminalen Domäne des hEP4-R, der für die Internalisierung relevant war, befinden sich drei Serin/Threonin-Cluster (ST389-392, ST428-431 und ST439-443), die für die Ausbildung eines solchen, möglicherweise für die Internalisierung relevanten, stabilen  $\beta$ -Arrestin-Rezeptor-Komplexes dienen könnten. Die vorliegenden Ergebnisse erlauben nicht zu unterschieden, welchem dieser drei Cluster eine besondere Bedeutung für die Agonisten-induzierte Internalisierung des hEP4-R zukommt.

Dagegen war die Agonisten-induzierte Internalisierung des Substanz P-Rezeptors im Gegensatz zum Neurotensin 1-, Oxytocin- und Angiotensin II Typ 1A-Rezeptor unabhängig von solchen Ser/Thr-Clustern (Oakley *et al.* (2001)). Eine solche, von solchen Ser/Thr-Clustern unabhängige Internalisierung ist für den hEP4-R unwahrscheinlich, da die EP4-Rezeptormutante, in der alle Serine und Threonine in der C-terminalen Domäne durch Alanine ersetzt waren, nicht mehr internalisiert wurde.

Die stark verminderte, residuale, nur im Ligand-Interalisierungsassay nachweisbare Internalisierung der Mutante, in der alle distalen Serine und Threonine gegen Alanine getauscht waren, könnte dafür sprechen, daß die im proximalen Teil der C-terminalen Domäne gelegenen Phosphorylierungsstellen allein eine Agonisten-induzierte Internalisierung auslösen könnten, die durch die distal gelegenen Strukturen weiter reguliert wird. Die Trunkierung würde eine solche komplexe Regulierung zerstören.

In Übereinstimmung mit den hier erhobenen Daten fanden Desai *et al.* (2000), daß die Substitution der Serine und Threonine proximal des Serin 389 mit Alanin nicht mit der Agonisten-induzierten Internalisierung interferierte. Im extremen Widerspruch zu den hier gefunden Ergebnissen steht aber, daß bei ihren Untersuchungen ein Rezeptor, der distal der Aminosäure 383 trunkiert war, genau so gut internalisierte wie der Wildtyprezeptor. Erst wenn die Trunkierung weiter proximal erfolgte, war die Internalisierung gestört. Eine Bedeutung distal der Aminosäure 383 gelegener Strukturen in der C-terminalen Domäne des hEP4-R für die Internalisierung schien damit ausgeschlossen.

Der Unterschied ist möglicherweise auch auf zelluläre Unterschiede zurückzuführen. So zeigten Zhang *et al.* (1996), daß die Internalisierung des  $\beta$ 2-adrenergen Rezeptors in COS 7-Zellen wesentlich schwächer war als in HEK293-Zellen, wohingegen sich die Internalisierung des Angiotensin 1A-Rezeptors in den beiden Zellinien nicht unterschied. Dies läßt vermuten, daß wahrscheinlich schon geringe Expressionsunterschiede in den verwendeten Zellinien ausreichten, um divergierenden Ergebnisse zu erhalten.

## 5.5.2 Untersuchung der Rezeptor/β-Arrestin-Colokalisation der verschiedenen Rezeptorproteine durch Immunfluoreszenz-Mikroskopie

Durch Immunfluoreszenz-mikroskopische Untersuchung in den transient mit  $\beta$ -Arrestin/GFPcotransfizierten Rezeptor exprimierenden HEK293-Zellen wurde gezeigt, daß  $\beta$ -Arrestin nach Agonisten-Stimulation von dem EP4 wt-R rekrutiert und internalisiert wurde. Rezeptorprotein und  $\beta$ -Arrestin waren nach Agonisten-Exposition intrazellulär colokalisiert. Dies legte nahe, daß eine Interaktion von  $\beta$ -Arrestin mit dem Rezeptor für die Internalisierung des hEP4-R notwendig ist. Die Rezeptormutante, in der alle Serine und Threonine in der C-terminalen Domäne durch Alanine substituiert waren, rekrutierte  $\beta$ -Arrestin nicht mehr an die Plasmamembran, daher ist eine Phosphorylierung des Rezeptors für die  $\beta$ -Arrestin-Rekrutierung wahrscheinlich notwendig.  $\beta$ -Arrestin wurde nach Agonisten-Exposition, wenn auch nur in geringerem Umfang als bei dem Wildtyprezeptor, von der Mutante rekrutiert, in der alle proximalen Serine und Threonine in Rezeptor fehlte. Dies legte nahe, daß die für die zur Internalisierung notwendige stabile Rezeptor- $\beta$ -Arrestin-Interaktion relevanten Serine und Threonine distal von Serin 382 lokalisiert waren.

Durch Inkubation der den hEP4-R-exprimierenden Zellen mit einer hyperosmolaren Saccharosekonzentration wurde die  $\beta$ -Arrestin-Rekrutierung nicht beeinflußt, jedoch war die Clathrin-vermittelte Internalisierung gehemmt. Die durch Saccharose inhibierbare Internalisierung des EP4-R wurde auch von Desai *et al.* (2001) beschrieben. Die Hemmung der Agonisten-induzierten Internalisierung durch eine hyperosmolare Saccharose-konzentration (Abb. 33, Abb. 35, Abb. 41 Abb. 43) bestätigte die Clathrin-vermittelte Internalisierung der verschiedenen noch internalisierenden Rezeptoren, da durch eine hyperosmolare Saccharosekonzentration nur die Clathrin-vermittelte Internalisierung gehemmt wird (Heuser und Anderson (1989); Okamoto *et al.* (2000)).

Die durch die Phosphorylierungsstudien erhaltenen Ergebnisse die zeigten Hauptphosphorylierung des EP4-Rezeptors im proximalen Teil der C-terminalen Domäne zwischen Aminosäure 359 und 382, während die für die Internalisierung relevanten Serine und Threonine zwischen Aminosäure 389 und 484 lokalisiert waren. Dies könnte darauf hindeuten, daß zwei unterschiedliche Motive für die Phosphorylierung und Internalisierung des EP4-R notwendig sind. Allerdings war auch eine geringe Phosphorylierung nach Elimination der Serine und Threonin im proximalen Teil der C-terminalen Domäne feststellbar, was darauf hindeuten könnnte, daß die Phosphorylierung im proximalen Teil für die Entkopplung des Rezeptors von der intrazellulären Signalkette verantwortlich ist und die geringe Phosphorylierung im distalen Teil der C-terminalen Domäne an der Agonisteninduzierten Internalisierung beteiligt ist. Eine eindeutige Aussage über die Beteiligung der proximalen Phosphorylierungsstellen an der Desensitisierung ist anhand der in dieser Arbeit erhobenen Daten nicht möglich, da die Desensitisierung des Rezeptors in dem gewählten System nicht nachweisbar war. Allerdings wird diese Vermutung durch die Ergebnisse von Bastepe et al. (1999) unterstützt, die den Verlust der Desensitisierung nach Substitution der Serine und Threonine zwischen Aminosäure 369 und 382 in CHO-Zellen zeigen konnten. Eine Beteiligung von Phosphorylierungsstellen an der Internalisierung in den intrazellulären Schleifen, wie sie für den M2-muscarinischen Acetylcholin-Rezeptor (Hosey et al. (1999))

gezeigt wurde, ist jedoch auszuschließen, da die Rezeptormutante, in der alle Serine und Threonine eliminiert waren, nicht mehr internalisierte. Weiterhin scheint die Phosphorylierung für die Internalisierung notwendig, da eine  $\beta$ -Arrestin und GRK-unabhängige Internalisierung, wie die des IP-Rezeptors (Smyth *et al.* 2000) nicht gezeigt werden konnte.

Für die, wahrscheinlich GRK-vermittelte, Agonisten-induzierte Phosphorylierung sind die Serine und Threonine zwischen Serin 359 und Serin 382 in der C-terminalen Domäne des hEP4-R notwendig. Die Relevanz dieser Serine und Threonine für die Agonisten-induzierte Desensitisierung des hEP4-R konnte jedoch in dem gewählten System nicht nachgewiesen werden. Die für die Agonisten-induzierte Internalisierung des hEP4-R relevanten Serine und Threonine sind mit den für die Phosphorylierung und möglicherweise Desensitisierung notwendigen nicht identisch und sind distal des Serin 382 lokalisiert, wobei eine der Internalisierung vorausgehende Phosphorylierung der Rezeptoren an diesen Positionen nicht ausgeschlossen werden kann. Der hEP4-R wird im Komplex mit  $\beta$ -Arrestin internalisierung zu ermöglicherweise eine  $\beta$ -Arrestin-unabhängige Clathrin-vermittelte Internalisierung zu ermöglichen. Die im proximalen Teil der C-terminalen Domäne lokalisierten Serine und Threonine des hEP4-R sind also wahrscheinlich für die Entkopplung des Rezeptors verantwortlich, während die im distalen Bereich lokalisierten Serine und Threonine für die Internalisierung zu ernöglicherweise eine date met der C-terminalen Domäne lokalisierten Serine und Threonine des hEP4-R sind also wahrscheinlich für die Entkopplung des Rezeptors verantwortlich, während die im distalen Bereich lokalisierten Serine und Threonine für die Internalisierung zu ernöglicherweise sind.

## 6 Literatur

- Abramovitz M, Adam M, Boie Y, Grygorczyk R, Rushmore TH, Nguyen T, Funk CD, Bastien L, Sawyer N, Rochette C *et al.* (1995): Human prostanoid receptors: cloning and characterization. Adv Prostaglandin Thromboxane Leukot Res 23: 499-504
- Ahn S, Kim J, Lucaveche CL, Reedy MC, Luttrell LM, Lefkowitz RJ, Daaka Y (2002): Src-dependent tyrosine phosphorylation regulates dynamin self-assembly and ligandinduced endocytosis of the epidermal growth factor receptor. J Biol Chem 277: 26642-26651
- Armstrong RA, Lawrence RA, Jones RL, Wilson NH, Collier A (1989): Functional and ligand binding studies suggest heterogeneity of platelet prostacyclin receptors. Br J Pharmacol 97: 657-668
- Audoly L und Breyer RM (1997a): Substitution of charged amino acid residues in transmembrane regions 6 and 7 affect ligand binding and signal transduction of the prostaglandin EP3 receptor. Mol Pharmacol 51: 61-68
- Audoly L und Breyer RM (1997b): The second extracellular loop of the prostaglandin EP3 receptor is an essential determinant of ligand selectivity. J Biol Chem 272: 13475-13478
- **Bastepe M und Ashby B (1997):** The long cytoplasmic carboxyl terminus of the prostaglandin E2 receptor EP4 subtype is essential for agonist-induced desensitization. Mol Pharmacol 51: 343-349
- Bastepe M und Ashby B (1999): Identification of a region of the C-terminal domain involved in short-term desensitization of the prostaglandin EP4 receptor. Br J Pharmacol 126: 365-371
- Baxter GS, Clayton JK, Coleman RA, Marshall K, Sangha R, Senior J (1995): Characterization of the prostanoid receptors mediating constriction and relaxation of human isolated uterine artery. Br J Pharmacol 116: 1692-1696
- Belley A und Chadee K (1999): Prostaglandin E(2) stimulates rat and human colonic mucin exocytosis via the EP(4) receptor. Gastroenterology 117: 1352-1362
- Bennett TA, Maestas DC, Prossnitz ER (2000): Arrestin binding to the G protein-coupled N-formyl peptide receptor is regulated by the conserved "DRY" sequence. J Biol Chem 275: 24590-24594
- Benya RV, Fathi Z, Battey JF, Jensen RT (1993): Serines and threonines in the gastrinreleasing peptide receptor carboxyl terminus mediate internalization. J Biol Chem 268: 20285-90
- **Boege F, Neumann E, Helmreich EJ (1991):** Structural heterogeneity of membrane receptors and GTP-binding proteins and its functional consequences for signal transduction. Eur J Biochem 199: 1-15
- **Böer U, Neuschäfer-Rube F, Möller U, Püschel GP (2000):** Requirement of Nglycosylation of the prostaglandin E2 receptor EP3beta for correct sorting to the plasma membrane but not for correct folding. Biochem J 350: 839-847
- Böhm SK, Grady EF, Bunnett NW (1997): Regulatory mechanisms that modulate signalling by G-protein-coupled receptors. Biochem J 322: 1-18
- Bouvier M, Hausdorff WP, De Blasi A, O'Dowd BF, Kobilka BK, Caron MG, Lefkowitz RJ (1988): Removal of phosphorylation sites from the beta 2-adrenergic receptor delays onset of agonist-promoted desensitization. Nature 333: 370-3

- Bouvier M, Loisel TP, Hebert T (1995): Dynamic regulation of G-protein coupled receptor palmitoylation: potential role in receptor function. Biochem Soc Trans 23: 577-581
- **Bradford MM (1976):** A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. Anal Biochem 72: 248-254
- **Breyer MD und Breyer RM (2000):** Prostaglandin receptors: their role in regulating renal function. Curr Opin Nephrol Hypertens 9: 23-29
- Breyer RM, Bagdassarian CK, Myers SA, Breyer MD (2001): Prostanoid receptors: subtypes and signaling. Annu Rev Pharmacol Toxicol 41: 661-90
- Celver JP, Lowe J, Kovoor A, Gurevich VV, Chavkin C (2001): Threonine 180 is required for G-protein-coupled receptor kinase 3- and beta-arrestin 2-mediated desensitization of the mu-opioid receptor in Xenopus oocytes. J Biol Chem 2001 276: 4894-900
- Chan BS, Satriano JA, Pucci M, Schuster VL (1998): Mechanism of prostaglandin E2 transport across the plasma membrane of HeLa cells and Xenopus oocytes expressing the prostaglandin transporter "PGT". J Biol Chem 273: 6689-6697
- **Chang CS, Negishi M, Nishigaki N, Ichikawa A (1997):** Characterization of functional interaction of carboxylic acid group of agonists and arginine of the seventh transmembrane domains of four prostaglandin E receptor subtypes. Prostaglandins 54: 437-446
- Chen C und Okayama H (1987): High-efficiency transformation of mammalian cells by plasmid DNA. Mol Cell Biol 7: 2745-2752
- Chiang N, Kan WM, Tai HH (1996): Site-directed mutagenesis of cysteinyl and serine residues of human thromboxane A2 receptor in insect cells. Arch Biochem Biophys 334: 9-17
- Chiang N und Tai HH (1998): The role of N-glycosylation of human thromboxane A2 receptor in ligand binding. Arch Biochem Biophys 352: 207-213
- Claing A, Laporte SA, Caron MG, Lefkowitz RJ (2002): Endocytosis of G protein-coupled receptors: roles of G protein-coupled receptor kinases and beta-arrestin proteins. Prog Neurobiol 66: 61-79
- Clark JD, Lin LL, Kriz RW, Ramesha CS, Sultzman LA, Lin AY, Milona N, Knopf JL (1991): A novel arachidonic acid-selective cytosolic PLA2 contains a Ca(2+)-dependent translocation domain with homology to PKC and GAP. Cell 65: 1043-1051
- **Coleman RA und Sheldrick RL (1989):** Prostanoid-induced contraction of human bronchial smooth muscle is mediated by TP-receptors. Br J Pharmacol 96: 688-692
- **Coleman RA, Smith WL, Narumiya S (1994):** International Union of Pharmacology classification of prostanoid receptors: properties, distribution, and structure of the receptors and their subtypes. Pharmacol Rev 46: 205-29
- Csepli J und Csapo Al (1975): The effect of the prostaglandin F2alpha analogue ICI 81008 on uterine small arteries and on blood pressure. Prostaglandins 10: 689-697
- D'Angelo DD, Eubank JJ, Davis MG, Dorn GW 2nd. (1996): Mutagenic analysis of platelet thromboxane receptor cysteines. Roles in ligand binding and receptor-effector coupling. J Biol Chem 271: 6233-6240
- **Desai S, April H, Nwaneshiudu C, Ashby B (2000):** Comparison of agonist-induced internalization of the human EP2 and EP4 prostaglandin receptors: role of the carboxyl terminus in EP4 receptor sequestration. Mol Pharmacol 58: 1279-1286

- **Desai S, Ashby B (2001):** Agonist-induced internalization and mitogen-activated protein kinase activation of the human prostaglandin EP4 receptor. FEBS Lett 501: 156-160
- **Djellas Y, Manganello JM, Antonakis K, Le Breton GC (1999):** Identification of Galpha13 as one of the G-proteins that couple to human platelet thromboxane A2 receptors. J Biol Chem 274: 14325-30
- Dohlman HG, Thorner J, Caron MG, Lefkowitz RJ (1991): Model systems for the study of seven-transmembrane-segment receptors. Annu Rev Biochem 60: 653-688
- **Dorn GW 2nd, Davis MG, D'Angelo DD (1997):** Structural determinants for agonist binding affinity to thromboxane/prostaglandin endoperoxide (TP) receptors, Analysis of chimeric rat/human TP receptors. J Biol Chem 272: 12399-12405
- Eccleston JF, Binns DD, Davis CT, Albanesi JP, Jameson DM (2002): Oligomerization and kinetic mechanism of the dynamin GTPase. Eur Biophys J 31: 275-282
- **Eshet R, Peleg S, Laron Z (1984):** Direct visualization of binding, aggregation and internalization of human growth hormone in cultured human lymphocytes. Acta Endocrinol 107: 9-15
- Fan GH, Yang W, Wang XJ, Qian Q, Richmond A (2001): Identification of a motif in the carboxyl terminus of CXCR2 that is involved in adaptin 2 binding and receptor internalization. Biochemistry 40: 791-800
- **Fennekohl A, Lucas M, Püschel GP (2000):** Induction by interleukin-6 of Gs-coupled prostaglandin E2 receptors in rat hepatocytes mediating a prostaglandin E2-dependent inhibition of the hepatocyte's acute phase response. Hepatology 31: 1128-1134
- Ferguson SS (2001): Evolving concepts in G protein-coupled receptor endocytosis: the role in receptor desensitization and signaling. Pharmacol Rev 53: 1-24
- Freedman NJ, Liggett SB, Drachman DE, Pei G, Caron MG, Lefkowitz RJ (1995): Phosphorylation and desensitization of the human beta 1-adrenergic receptor. Involvement of G protein-coupled receptor kinases and cAMP-dependent protein kinase. J Biol Chem 270: 17953-61
- Freedman NJ, Ament AS, Oppermann M, Stoffel RH, Exum ST, Lefkowitz RJ (1997): Phosphorylation and desensitization of human endothelin A and B receptors. Evidence for G protein-coupled receptor kinase specificity. J Biol Chem 272: 17734-43
- Funk CD, Furci L, Moran N, Fitzgerald GA (1993): Point mutation in the seventh hydrophobic domain of the human thromboxane A2 receptor allows discrimination between agonist and antagonist binding sites. Mol Pharmacol 44: 934-939
- Gabilondo AM, Hegler J, Krasel C, Boivin-Jahns V, Hein L, Lohse MJ (1997): A dileucine motif in the C terminus of the beta2-adrenergic receptor is involved in receptor internalization. Proc Natl Acad Sci USA 94: 12285-12290
- Gallusser A, Kirchhausen T. (1993): The beta 1 and beta 2 subunits of the AP complexes are the clathrin coat assembly components. EMBO J 12: 5237-5244
- **Giannini E, Brouchon L, Boulay F (1995):** Identification of the major phosphorylation sites in human C5a anaphylatoxin receptor in vivo. J Biol Chem 270: 19166-72
- Giles H, Bolofo ML, Lydford SJ, Martin GR (1991): A comparative study of the prostanoid receptor profile of 9 alpha 11 beta-prostaglandin F2 and prostaglandin D2. Br J Pharmacol 104: 541-549
- Gilbert JA, Strobel TR, Richelson E (1988): Desensitization of neurotensin receptormediated cyclic GMP formation in neuroblastoma clone N1E-115. Biochem Pharmacol 37: 2833-3838

- Grabs D, Slepnev VI, Songyang Z, David C, Lynch M, Cantley LC, De Camilli P (1997): The SH3 domain of amphiphysin binds the proline-rich domain of dynamin at a single site that defines a new SH3 binding consensus sequence. J Biol Chem 272: 13419-13425
- Harden TK, Su YF, Perkins JP (1979): Catecholamine-induced desensitization involves an uncoupling of beta-adrenergic receptors and adenylate cyclase. J Cyclic Nucleotide Res 5: 99-106
- Hausdorff WP, Bouvier M, O'Dowd BF, Irons GP, Caron MG, Lefkowitz RJ (1989): Phosphorylation sites on two domains of the beta 2-adrenergic receptor are involved in distinct pathways of receptor desensitization. J Biol Chem 264: 12657-65
- Hasegawa H, Negishi M, Ichikawa A (1996): Two isoforms of the prostaglandin E receptor EP3 subtype different in agonist-independent constitutive activity. J Biol Chem 271: 1857-1860
- Hasegawa H, Negishi M, Katoh H, Ichikawa A (1997): Two isoforms of prostaglandin EP3 receptor exhibiting constitutive activity and agonist-dependent activity in Rho-mediated stress fiber formation. Biochem Biophys Res Commun 234: 631-636
- Hatae T, Wada M, Yokoyama C, Shimonishi M, Tanabe T (2001): Prostacyclin-dependent apoptosis mediated by PPAR delta. J Biol Chem 276: 46260-46267
- Hayaishi O (1991): Molecular mechanisms of sleep-wake regulation: roles of prostaglandins D2 and E2. FASEB J 5: 2575-81
- Hayes JS, Lawler OA, Walsh MT, Kinsella BT (1999): The prostacyclin receptor is isoprenylated. Isoprenylation is required for efficient receptor-effector coupling. J Biol Chem 274: 23707-23718
- Heuser JE, Anderson RG (1989): Hypertonic media inhibit receptor-mediated endocytosis by blocking clathrin-coated pit formation. J Cell Biol 108: 389-400
- Hille A, Klumperman J, Geuze HJ, Peters C, Brodsky FM, von Figura K (1992): Lysosomal acid phosphatase is internalized via clathrin-coated pits. Eur J Cell Biol 59: 106-115
- **Hinshaw JE und Schmid SL (1995):** Dynamin self-assembles into rings suggesting a mechanism for coated vesicle budding. Nature 374: 190-192
- Hirata Y, Umemura K, Nakano M, Uematsu T, Nakashima M (1994): Enhancement of thrombotic arterial occlusion following cholesterol feeding in the guinea-pig: a role for thromboxane A2. Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids 51: 81-86
- Ho SN, Hunt HD, Horton RM, Pullen JK, Pease LR (1989): Site-directed mutagenesis by overlap extension using the polymerase chain reaction. Gene 77: 51-59
- Hosey MM, Pals-Rylaarsdam R, Lee KB, Roseberry AG, Benovic JL, Gurevich VV, Bunemann M (1999): Molecular events associated with the regulation of signaling by M2 muscarinic receptors. Life Sci 64: 363-8
- **Huang C und Tai HH (1995):** Expression and site-directed mutagenesis of mouse prostaglandin E2 receptor EP3 subtype in insect cells. Biochem J 307: 493-498
- Huang C und Tai HH (1996): Ser-268 plays an important role in ligand binding of prostaglandin E2 receptor EP3alpha subtype. Arch Biochem Biophys 327: 161-166
- Hüttenrauch F, Nitzki A, Lin FT, Honing S, 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: 30769-30777

- Irie A, Sugimoto Y, Namba T, Asano T, Ichikawa A, Negishi M (1994): The C-terminus of the prostaglandin-E-receptor EP3 subtype is essential for activation of GTP-binding protein. Eur J Biochem 224: 161-166
- Ishii K, Chen J, Ishii M, Koch WJ, Freedman NJ, Lefkowitz RJ, Coughlin SR (1994): Inhibition of thrombin receptor signaling by a G-protein coupled receptor kinase. Functional specificity among G-protein coupled receptor kinases. J Biol Chem 269: 1125-30
- Itoh S, Lu R, Bao Y, Morrow JD, Roberts LJ, Schuster VL (1996): Structural determinants of substrates for the prostaglandin transporter PGT. Mol Pharmacol 50: 738-742
- Jin J, Mao GF, Ashby B (1997): Constitutive activity of human prostaglandin E receptor EP3 isoforms. Br J Pharmacol 121: 317-323
- Kanai N, Lu R, Satriano JA, Bao Y, Wolkoff AW, Schuster VL (1995): Identification and characterization of a prostaglandin transporter. Science 268: 866-869
- Katoh H, Negishi M, Ichikawa A (1996): Prostaglandin E receptor EP3 subtype induces neurite retraction via small GTPase Rho. J Biol Chem 271: 29780-29784
- Kedzie KM, Donello JE, Krauss HA, Regan JW, Gil DW (1998): A single amino-acid substitution in the EP2 prostaglandin receptor confers responsiveness to prostacyclin analogs. Mol Pharmacol 54: 584-590
- Kempson SA, Helmle C, Abraham MI, Murer H (1990): Parathyroid hormone action on phosphate transport is inhibited by high osmolality. Am J Physiol 258: 1336-1344
- Kitanaka J, Hamano T, Gotoh M, Hashimoto H, Baba A (1994): Tunicamycin inhibits prostaglandin F2 alpha receptor-mediated phosphoinositide hydrolysis in cultured rat astrocytes. Neurochem Res 19: 1545-1550
- Kobayashi T, Kiriyama M, Hirata T, Hirata M, Ushikubi F, Narumiya S (1997): Identification of domains conferring ligand binding specificity to the prostanoid receptor. Studies on chimeric prostacyclin/prostaglandin D receptors. J Biol Chem 272: 15154-15160
- Kraft K, Olbrich H, Majoul I, Mack M, Proudfoot A, 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: 34408-34418
- Krupnick JG und Benovic JL (1998): The role of receptor kinases and arrestins in G protein-coupled receptor regulation. Annu Rev Pharmacol Toxicol 38: 289-319
- Laemmli UK (1970): Cleavage of structural proteins during assembly of the Head of Bacteriophage T4. Nature 227: 680-685
- Laporte SA, Oakley RH, Zhang J, Holt JA, Ferguson SS, Caron MG, Barak LS (1999): The beta2-adrenergic receptor/betaarrestin complex recruits the clathrin adaptor AP-2 during endocytosis. Proc Natl Acad Sci USA 96: 3712-3717
- Laporte SA, Miller WE, Kim KM, Caron MG (2002): beta-Arrestin/AP-2 interaction in G protein-coupled receptor internalization: identification of a beta-arrestin binging site in beta 2-adaptin. J Biol Chem 277: 9247-9254
- **Laporte SA, Miller WE, Kim KM, Caron MG (2002):** β-arrestin/AP-2 interaction in G proteincoupled receptor internalization: identification of a β-arrestin binding site in β<sub>2</sub>-adaptin. J Biol Chem 277: 9247-9254

Lefkowitz RJ (1993): G protein-coupled receptor kinases. Cell 74: 409-412

- Lin HC und Gilman AG (1996): Regulation of dynamin I GTPase activity by G protein betagamma subunits and phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate. J Biol Chem 271: 27979-27982
- Lin FT, Miller WE, Luttrell LM, Lefkowitz RJ (1999): Feedback regulation of beta-arrestin1 function by extracellular signal-regulated kinases. J Biol Chem 274: 15971-15974
- Lohse MJ, Andexinger S, Pitcher J, Trukawinski S, Codina J, Faure JP, Caron MG, Lefkowitz RJ (1992): Receptor-specific desensitization with purified proteins. Kinase dependence and receptor specificity of beta-arrestin and arrestin in the beta 2-adrenergic receptor and rhodopsin systems. J Biol Chem 267: 8558-8564
- Lu R, Kanai N, Bao Y, Schuster VL (1996): Cloning, in vitro expression, and tissue distribution of a human prostaglandin transporter cDNA(hPGT). J Clin Invest 98: 1142-1149
- Luttrell LM, Roudabush FL, Choy EW, Miller WE, Field ME, Pierce KL, Lefkowitz RJ (2001): Activation and targeting of extracellular signal-regulated kinases by β-arrestin scaffolds. Proc Natl Acad Sci USA 98: 2449-2454
- Luttrell LM und Lefkowitz RJ (2002): The role of beta-arrestins in the termination and transduction of G-protein-coupled receptor signals. J Cell Sci 115: 455-465
- Machwate M, Harada S, Leu CT, Seedor G, Labelle M, Gallant M, Hutchins S, Lachance N, Sawyer N, Slipetz D, Metters KM, Rodan SB, Young R, Rodan GA (2001): Prostaglandin receptor EP(4) mediates the bone anabolic effects of PGE2. Mol Pharmacol 60: 36-41
- Malecz N, Bambino T, Bencsik M, Nissenson RA (1998): Identification of phosphorylation sites in the G protein-coupled receptor for parathyroid hormone. Receptor phosphorylation is not required for agonist-induced internalization. Mol Endocrinol 12: 1846-56
- **Morello JP und Bouvier M (1996):** Palmitoylation: a post-translational modification that regulates signalling from G-protein coupled receptors. Biochem Cell Biol 74: 449-457
- Morita T, Ando M, Kihara K, Kitahara S, Ishizaka K, Matsumura T, Oshima H (1994): Effects of prostaglandins E1, E2 and F2 alpha on contractility and cAMP and cGMP contents in lower urinary tract smooth muscle. Urol Int 52: 200-203
- **Munson PJ und Rodbard D (1980):** Ligand a versatil computerized approach for characterization of ligand-binding systems. Anal Biochem 107: 220-239
- Namba T, Sugimoto Y, Negishi M, Irie A, Ushikubi F, Kakizuka A, Ito S, Ichikawa A, Narumiya S (1993): Alternative splicing of C-terminal tail of prostaglandin E receptor subtype EP3 determines G-protein specificity. Nature 365: 166-170
- Narumiya S, Hirata N, Namba T, Hayashi Y, Ushikubi F, Sugimoto Y, Negishi M, Ichikawa A (1993): Structure and function of prostanoid receptors. J Lipid Mediat 6: 155-161
- Narumiya S, Sugimoto Y, Ushikubi F (1999): Prostanoid receptors: structures, properties, and functions. Physiol Rev 79: 1193-1226
- Negishi M, Sugimoto Y, Irie A, Narumiya S, Ichikawa A (1993): Two isoforms of prostaglandin E receptor EP3 subtype. Different COOH-terminal domains determine sensitivity to agonist-induced desensitization. J Biol Chem 268: 9517-9521
- Negishi M, Sugimoto Y, Ichikawa A (1995): Molecular mechanisms of diverse actions of prostanoid receptors. Biochim Biophys Acta 1259: 109-119

- Neuschäfer-Rube F, Hänecke K, Blaschke V, Jungermann K, Püschel GP (1997a): The C-terminal domain of the Gs-coupled EP4 receptor confers agonist-dependent coupling control to Gi but no coupling to Gs in a receptor hybrid with the Gi-coupled EP3 receptor. FEBS Lett 401: 185-190
- **Neuschäfer-Rube F, Hänecke K, Püschel GP (1997b):** The C-terminal domain of the human EP4 receptor confers agonist-induced receptor desensitization in a receptor hybrid with the rat EP3β receptor. FEBS Lett 415: 119-124
- Neuschäfer-Rube F, Oppermann M, Möller U, Böer U, Püschel GP (1999): Agonistinduced phosphorylation by G protein-coupled receptor kinases of the EP4 receptor carboxyl-terminal domain in an EP3/EP4 prostaglandin E(2) receptor hybrid. Mol Pharmacol 56: 419-428
- Neuschäfer-Rube F, Engemaier E, Koch S, Böer U, Püschel GP (2003): Identification by site directed mutagenesis of amino acids contributing to ligand binding specificity or signal transduction properties of the human FP prostanoid receptor. Biochem J, [epub ahead of print]
- Nishigaki N, Negishi M, Ichikawa A (1996): Two Gs-coupled prostaglandin E receptor subtypes, EP2 and EP4, differ in desensitization and sensitivity to the metabolic inactivation of the agonist Mol Pharmacol 50:1031-1037
- **Oakley RH, Laporte SA, Holt JA, Barak LS, Caron MG (2001):** Molecular determinants underlying the formation of stable intracellular G protein-coupled receptor-beta-arrestin complexes after receptor endocytosis. J Biol Chem 276: 19452-19460
- Offermanns S, Laugwitz KL, Spicher K, Schultz G (1994): G proteins of the G12 family are activated via thromboxane A2 and thrombin receptors in human platelets. Proc Natl Acad Sci USA 91: 504-508
- **Okamoto Y, Ninomiya H, Miwa S, Masaki T (2000):** Cholesterol oxidation switches the internalization pathway of endothelin receptor type A from caveolae to clathrin-coated pits in Chinese hamster ovary cells. J Biol Chem 275: 6439-46
- **Okuma M, Hirata T, Ushikubi F, Kakizuka A, Narumiya S (1996):** Molecular characterization of a dominantly inherited bleeding disorder with impaired platelet responses to thromboxane A2. Pol J Pharmacol 48: 77-82
- **Oppermann M, Freedman NJ, Alexander RW, Lefkowitz RJ (1996):** Phosphorylation of the type 1A angiotensin II receptor by G protein-coupled receptor kinases and protein kinase C. J Biol Chem 271: 13266-72
- Parnot C, Bardin S, Miserey-Lenkei S, Guedin D, Corvol P, Clauser E. (2000): Systematic identification of mutations that constitutively activate the angiotensin II type 1A receptor by screening a randomly mutated cDNA library with an original pharmacological bioassay. Proc Natl Acad Sci USA 97:7615-7620
- Parruti G, Peracchia F, Sallese M, Ambrosini G, Masini M, Rotilio D, De Blasi A (1993): Molecular analysis of human beta-arrestin-1: cloning, tissue distribution, and regulation of expression. Identification of two isoforms generated by alternative splicing. J Biol Chem 268: 9753-9761
- Penn RB, Pronin AN, Benovic JL (2000): Regulation of G protein-coupled receptor kinases. Trends Cardiovasc Med 10: 81-89
- Peters T, Gaillard T, Decker K (1990): Tumor necrosis factor alpha stimulates prostaglandin but not superoxide synthesis in rat Kupffer cells. Eicosanoids 3: 115-120
- Pierce KL und Regan JW (1998): Prostanoid receptor heterogeneity through alternative mRNA splicing. Life Sci 62: 1479-1483

- Pierce KL, Fujino H, Srinivasan D, Regan JW (1999): Activation of FP prostanoid receptor isoforms leads to Rho-mediated changes in cell morphology and in the cell cytoskeleton. J Biol Chem 274: 35944-35949
- Probst WC, Snyder LA, Schuster DI, Brosius J, Sealfon SC (1992): Sequence alignment of the G-protein coupled receptor superfamily. DNA Cell Biol 11: 1-20
- Pulakat L, Gray A, Johnson J, KnowleD, Burns V, Gavini N (2002): Role of C-erminal cytoplasmatic domain of the AT2 receptor in ligand binding and signaling. FEBS Lett 524: 73-78
- Rasmussen SG, Jensen AD, Liapakis G, Ghanouni P, Javitch JA, Gether U (1999): Mutation of a highly conserved aspartic acid in the beta2 adrenergic receptor: constitutive activation, structural instability, and conformational rearrangement of transmembrane segment 6. Mol Pharmacol 56: 175-184
- Reginato MJ, Krakow SL, Bailey ST, Lazar MA (1998): Prostaglandins promote and block adipogenesis through opposing effects on peroxisome proliferator-activated receptor gamma. J Biol Chem 273: 1855-1858
- Rehwald M, Neuschäfer-Rube F, de Vries C, Püschel GP (1999): Possible role for ligand binding of histidine 81 in the second transmembrane domain of the rat prostaglandin F2alpha receptor. FEBS Lett 443: 357-62
- Samuelsson B (1978): Prostaglandins and thromboxanes. Recent Prog Horm Res 34: 239-258
- Satoh S, Chang C, Katoh H, Hasegawa H, Nakamura K, Aoki J, Fujita H, Ichikawa A, Negishi M (1999): The key amino acid residue of prostaglandin EP3 receptor for governing G protein association and activation steps. Biochem Biophys Res Commun 255: 164-168
- Schülein R, Hermosilla R, Oksche A, Dehe M, Wiesner B, Krause G, Rosenthal W (1998): A dileucine sequence and an upstream glutamate residue in the intracellular carboxyl terminus of the vasopressin V2 receptor are essential for cell surface transport in COS.M6 cells. Mol Pharmacol 54: 525-35
- Segi E, Sugimoto Y, Yamasaki A, Aze Y, Oida H, Nishimura T, Murata T, Matsuoka T, Ushikubi F, Hirose M, Tanaka T, Yoshida N, Narumiya S, Ichikawa A (1998): Patent ductus arteriosus and neonatal death in prostaglandin receptor EP4-deficient mice. Biochem Biophys Res Commun 246: 7-12
- Slipetz D, Buchanan S, Mackereth C, Brewer N, Pellow V, Hao C, Adam M, Abramovitz M, Metters KM (2001): Sequestration and phosphorylation of the prostaglandin E2 EP4 receptor: dependence on the C-terminal tail. Biochem Pharmacol 62: 997-1012
- Smith WL und Marnett LJ (1991): Prostaglandin endoperoxide synthase: structure and catalysis. Biochim Biophys Acta 1083: 1-17
- Smyth EM, Li WH, FitzGerald GA (1998): Phosphorylation of the prostacyclin receptor during homologous desensitization. A critical role for protein kinase C. J Biol Chem 273: 23258-23266
- Smyth EM, Austin SC, Reilly MP, FitzGerald GA (2000): Internalization and sequestration of the human prostacyclin receptor. J Biol Chem 275: 32037-32045
- **Spurney RF (1998):** Role of C-terminal serines in desensitization and phosphorylation of the mouse thromboxane receptor. J Biol Chem 273: 28496-28503

- **Sterne-Marr R, Gurevich VV, Goldsmith P, Bodine RC, Sanders C, Donoso LA, Benovic JL (1993):** Protein Polypeptide variants of β-arrestin and arrestin3. J Biol Chem 268: 15640-15648
- Stillman BA, Audoly L, Breyer RM (1998): A conserved threonine in the second extracellular loop of the human EP2 and EP4 receptors is required for ligand binding. Eur J Pharmacol 357: 73-82
- Stillman BA, Breyer MD, Breyer RM (1999): Importance of the extracellular domain for prostaglandin EP(2) receptor function. Mol Pharmacol 56: 545-551
- Stoffel RH 3rd, Pitcher JA, Lefkowitz RJ (1997): Targeting G protein-coupled receptor kinases to their receptor substrates. J Membr Bio 157: 1-8
- Sugimoto Y, Negishi M, Hayashi Y, Namba T, Honda A, Watabe A, Hirata M, Narumiya S, Ichikawa A (1993): Two isoforms of the EP3 receptor with different carboxyl-terminal domains. Identical ligand binding properties and different coupling properties with Gi proteins. J Biol Chem 268: 2712-2718
- Tai HH, Huang C, Chiang N (1997): Structure and function of prostanoid receptors as revealed by site-directed mutagenesis. Adv Exp Med Biol 407: 205-209
- **Urade Y und Hayaishi O (1999):** Prostaglandin D2 and sleep regulation. Biochim Biophys Acta 1436: 606-15
- Walsh MT, Foley JF, Kinsella BT (1998): Characterization of the role of N-linked glycosylation on the cell signaling and expression of the human thromboxane A2 receptor alpha and beta isoforms. J Pharmacol Exp Ther 286: 1026-1036
- Warnock DE, Hinshaw JE, Schmid SL (1996): Dynamin self-assembly stimulates its GTPase activity. J Biol Chem 271: 22310-22314
- White JG, Amos WB, Fordham M (1987): An evaluation of confocal versus conventional imaging of biological structures by fluorescence light microscopy. J Cell Biol 105: 41-48
- Williams SP, Dorn GW 2nd, Rapoport RM (1994): Prostaglandin I2 mediates contraction and relaxation of vascular smooth muscle. Am J Physiol 267: H796-803
- Yu Y, Zhang L, Yin X, Sun H, Uhl GR, Wang JB (1997): Mu opioid receptor phosphorylation, desensitization, and ligand efficacy. J Biol Chem 272: 28869-74
- Zhang J, Ferguson SS, Barak LS, Menard L, Caron MG (1996): Dynamin and betaarrestin reveal distinct mechanisms for G protein-coupled receptor internalization. Biol Chem 271: 18302-18305
- **Zhang Z, Austin SC, Smyth EM (2001):** Glycosylation of the human prostacyclin receptor: role in ligand binding and signal transduction. Mol Pharmacol 60: 480-487
- **Zhu BT (1993):** The competitive and non-competitive antagonism of receptor mediated drug actions in the presence of spare receptors. J Pharmacol Toxicol Methods 29: 85-91

## Danksagung

Mein besonderer Dank gilt Herrn Professor Dr. Kurt Jungermann für die Überlassung des Dissertationsthemas und die zahlreichen anregenden und hilfreichen Diskussionen. Leider konnte er aufgrund einer schweren Krankheit, an der er im Mai 2002 verstarb, meine Arbeit nicht mehr bis zum Ende betreuen.

Mein Dank gilt auch Herrn Prof. Dr. Kurt von Figura, der meine Dissertation übernommen hat und zur problemlosen Beendigung der Arbeit einen großen Teil beigetragen hat.

Ich möchte auch Prof. Dr. Gerhard P. Püschel, dem Betreuer dieser Arbeit, besonders danken, da er mir stets mit Rat und Tat zur Seite stand und dessen Hilfsbereitschaft und die vielen hilfreichen Diskussionen zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben.

Herrn Prof. Dr R. Hardeland möchte ich meinen Dank für die Übernahme des Korreferats aussprechen.

Für die vielen hilfreichen Ratschläge und die Unterstütztung und für all das, was ich von ihm gelernt habe, möchte ich mich bei Dr. Frank Neuschäfer-Rube bedanken.

Mein Dank geht auch an Dr. Alexandra Fennekohl, Dr. Ulrike Böer, Ulrike Möller, Christiane Spillner, Manuela Kuna, Eva Engemeier, Sina Koch, Nadine Priemer und all die anderen, die mit ihrer Unterstützung für ein freundliches Arbeitsklima und für viel Spaß im Labor gesorgt haben.

Den Mitarbeitern der Abteilung von Prof. Dr. Kurt Jungermann und den Mitgliedern der Werksatt möchte ich für das schöne Arbeitsklima, und daß sie mir immer behilflich waren, danken.

Nicht zuletzt möchte ich auch meiner Familie, meinen Freunden, und besonders Yvonne für die Unterstützung, ihr Verständnis und aufmunterenden Worte, die zum Gelingen dieser beigetragen haben, danken.

## LEBENSLAUF

Angaben zur Person:	
Name:	Rehwald
Vorname:	Matthias
Geburtsdatum:	02. 08. 1973
Geburtsort:	Homberg
Staatsangehörigkeit:	Deutsch
Schulbildung:	
1980-1986	Grundschule Altmorschen
1986-1990	Gesamtschule Spangenberg
1990-1993	Oberstufengymnasium Melsungen mit Abschluß Abitur
Studium:	
Oktober 1993	Immatrikulation an der Georg-August Universität zu
	Göttingen im Studiengang Biologie
Oktober 1995	Vordiplom in den Fächern: Zoologie, Mikrobiologie,
	Chemie und Physikalische Chemie
Oktober 1997	Hauptdiplomprüfung in den Fächern: Zoologie, Biochemie
	und Physikalische Chemie
November 1997-August 1998	Anfertigung der Diplomarbeit am Institut für Biochemie und
	Molekulare Zellbiologie der Georg-August-Universität mit
	dem Titel: "Vergleich der Bindungseigenschaften einer
	durch sequenzgerichtete Mutagenese des His81 in der
	zweiten Transmembrandomäne gewonnenen
	Prostaglandin $F_{2\alpha}$ Rezeptormutante mit denen des
	Wildtyps"
September 1998	Beginn der experimentellen Arbeit zur vorliegenden
	Dissertation
März 2003	Abgabe der vorliegenden Dissertation