

Aus dem Institut für Zelluläre und Molekulare Immunologie
(Prof. Dr. rer. nat. J. Wienands)
der Medizinischen Fakultät der Universität Göttingen

**Effekte chemisch induzierter
 β -Arrestin-1-Translokation an die
Chemokinrezeptoren CXCR4 und CCR5**

INAUGURAL-DISSERTATION

zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizinischen Fakultät der
Georg-August-Universität zu Göttingen

vorgelegt von

Viola Vogt

aus

Lemgo

Göttingen 2020

Dekan: Prof. Dr. med. W. Brück
Referent/in: Prof. Dr. med. M. Oppermann
Ko-Referent/in: Prof. Dr. rer. nat. Peter Schu
Drittreferent/in:

Datum der mündlichen Prüfung: 27.07.2021

Hiermit erkläre ich, die Dissertation mit dem Titel "Effekte chemisch induzierter β -Arrestin-1-Translokation an die Chemokinrezeptoren CXCR4 und CCR5" eigenständig angefertigt und keine anderen als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel verwendet zu haben.

Göttingen, den

.....

(Unterschrift)

Die Daten, auf denen die vorliegende Arbeit basiert, wurden publiziert:

Liebick M, Henze S, **Vogt V**, Oppermann M (2017): Functional consequences of chemically-induced β -arrestin binding to chemokine receptors CXCR4 and CCR5 in the absence of ligand stimulation. *Cell Signal* 38, 201-211

Inhaltsverzeichnis

Abbildungsverzeichnis	IV
Tabellenverzeichnis	V
Abkürzungsverzeichnis	VI
1 Einleitung	1
1.1 Signaltransduktion G-Protein-gekoppelter Rezeptoren.....	1
1.1.1 GPCR-Desensibilisierung.....	2
1.1.2 GPCR-Internalisierung.....	3
1.2 Chemokinrezeptoren.....	6
1.2.1 Der CXC-Chemokinrezeptor CXCR4.....	7
1.2.2 Der CC-Chemokinrezeptor CCR5.....	8
1.3 β -Arrestine.....	11
1.3.1 Vielseitigkeit der durch β -Arrestin vermittelten Funktionen	12
1.3.2 <i>Biased Signaling</i> – G-Protein-vermittelte versus β -Arrestin-vermittelte Signaltransduktion.....	14
1.3.3 Konformationsänderungen im β -Arrestin und konstitutiv aktive β -Arrestin-1R169E-Mutation.....	16
1.4 Heterodimerisierungssystem	20
1.5 Fragestellung.....	22
2 Material und Methoden	23
2.1 Geräte und Laborutensilien.....	23
2.2 Chemikalien, Pufferlösungen und Zellkulturmedien.....	25
2.3 Zelllinien.....	32
2.4 Zelltransfektion	32
2.5 Antikörper zum Proteinnachweis.....	34
2.6 Längen- und Gewichtsmarkierungen.....	35
2.7 Software.....	35
2.8 Molekularbiologie.....	36
2.8.1 Polymerasekettenreaktion.....	36
2.8.2 Agarosegelelektrophorese.....	36
2.8.3 DNA-Aufreinigung aus PCR-Ansätzen	37
2.8.4 DNA-Verdau und DNA-Dephosphorylierung.....	37
2.8.5 DNA-Ligation	37
2.8.6 Hitzeschocktransformation kompetenter <i>E. coli</i>	37
2.8.7 <i>Colony-PCR</i> transformierter <i>E. coli</i>	38
2.8.8 Plasmidextraktion und Plasmidaufreinigung aus <i>E. coli</i>	38
2.8.9 DNA-Sequenzierung	39

2.9	HEK-293-Zellen	39
2.9.1	Zellkultivierung.....	39
2.9.2	Selektionsmedium	39
2.9.3	Lagerung und Reaktivierung	39
2.9.4	Zellzählung.....	40
2.10	Zelltransfektion	40
2.10.1	Plasmid-DNA-Linearisierung und DNA-Phenol-Fällung.....	40
2.10.2	Stabile Kotretransfektion von HEK-293-Zellen mittels Kalziumphosphat-Präzipitation.....	41
2.10.3	Transiente Transfektion von HEK-293-Zellen	41
2.10.4	Subklonierung.....	42
2.11	Proteinanalyse.....	42
2.11.1	Ultrazentrifugation.....	42
2.11.2	Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE)	42
2.11.3	Immunoblot.....	43
2.12	Funktionsassays.....	43
2.12.1	Kalziummobilisierungsassay.....	43
2.12.2	Quantifizierung der Rezeptorexpression und Rezeptorinternalisierungsprozesse	44
2.12.3	Doppelimmunfluoreszenz und Konfokalmikroskopie	45
2.12.4	MAP-Kinase-Phosphorylierungsassay.....	45
3	Ergebnisse	47
3.1	Molekularbiologie.....	47
3.1.1	Konstruktion des Plasmids pHet-1 mit β -Arrestin-1-DmrC oder β -Arrestin-1R169E-DmrC.....	47
3.1.2	Kontrollverdau amplifizierter Plasmid-DNA	49
3.2	Charakterisierung von HEK-293-Zellen mit Koexpression von Chemokinrezeptor-DmrA und β -Arrestin-1-DmrC	50
3.2.1	Stabile Expression von CCR5-DmrA oder CXCR4-DmrC in HEK-293-Zellen.....	50
3.2.2	Stabile Expression von β -Arrestin-1-DmrC oder β -Arrestin-1R169E-DmrC in HEK-293-Zellen	51
3.3	AP21967-induzierte Translokation von β -Arrestin-1-DmrC an die Zellmembran.....	53
3.4	Rezeptordesensibilisierung nach AP21967-Stimulation.....	54
3.5	Rezeptorinternalisierung nach AP21967-Stimulation versus Ligandenstimulation.....	56
3.5.1	Induzierte Internalisierung des Chemokinrezeptors CXCR4-DmrA in β -Arrestin-1-DmrC-koexprimierenden Zelllinien: AP21967 versus CXCL12.....	56
3.5.2	Induzierte Internalisierung des Chemokinrezeptors CCR5-DmrC in β -Arrestin-1-DmrC-koexprimierenden Zelllinien: AP21967 versus CCL5.....	57
3.5.3	Induzierte Internalisierung des Chemokinrezeptors CCR5-DmrC in Zelllinien mit Koexpression der konstitutiv aktiven β -Arrestin-1R169E-DmrC-Mutante: AP21967 versus CCL5.....	58
3.6	Intrazelluläre Lokalisation von Chemokinrezeptoren und β -Arrestin-1 nach AP21967-induzierter versus ligandeninduzierter Rezeptorinternalisierung.....	60
3.6.1	CXCR4-DmrA-Internalisierung nach Stimulation mit AP21967 versus CXCL12 in β -Arrestin-1-DmrC-koexprimierenden Zellen.....	60
3.6.2	CCR5-DmrA-Internalisierung nach AP21967- versus CCL5-Stimulation in β -Arrestin-1-DmrC oder β -Arrestin-1R169E-DmrC-koexprimierenden Zellen.....	62

3.7	Einfluss der AP21967-induzierten β -Arrestin-1-Translokation an den Chemokinrezeptor auf nachgeschaltete Signalprozesse am Beispiel von MAP-Kinasen.....	65
3.7.1	Phosphorylierungskinetik von ERK1/2 nach AP21967-induzierter β -Arrestin-1-DmrC-Translokation.....	65
3.7.2	Induzierte ERK1/2-Aktivierung in HEK-293-Zellen mit Koexpression von CXCR4-DmrA oder CCR5-DmrA und β -Arrestin-1-DmrC oder β -Arrestin-1R169E-DmrC: AP21967 versus Liganden	66
4	Diskussion	69
4.1	Rezeptordesensibilisierung	71
4.2	Rezeptorinternalisierung	73
4.3	Signaltransduktion.....	77
4.4	Vergleich der β -Arrestin-Isoformen 1 und 2.....	82
5	Zusammenfassung.....	83
6	Literaturverzeichnis	84

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1:	Intrazelluläre Distribution von GPCRs und β -Arrestinen.	4
Abbildung 2:	Die Struktur des CC-Chemokinrezeptors CCR5 in zweidimensionaler Topologie der Zellmembran.	10
Abbildung 3:	Balancierte GPCR-Signaltransduktion und <i>biased signaling</i>	15
Abbildung 4:	Arrestinaktivierung.	18
Abbildung 5:	Schematische Darstellung des Heterodimerisierungssystems im zellulären Kontext mit GPCR und Arrestin.	21
Abbildung 6:	Konstruktion der Vektorensysteme mit Chemokinrezeptor oder β -Arrestin-1.	48
Abbildung 7:	Kontrollverdau von pEF/ <i>myc</i> -HisA-Chemokinrezeptor-DmrC und pHet-1- β -Arrestin-1-DmrC.	49
Abbildung 8:	Chemokinrezeptorexpression in stabil transfizierten HEK-293-Zelllinien.	50
Abbildung 9:	Verschiedene β -Arrestin-Varianten mit und ohne DmrC-Domäne nach transienter Transfektion.	51
Abbildung 10:	β -Arrestin-Expression in stabil transfizierten HEK-293-Zelllinien.	52
Abbildung 11:	Kinetik der AP21967-induzierten Translokation von β -Arrestin-1-DmrC an die Zellmembran.	53
Abbildung 12:	Ligandeninduzierte Kalziummobilisierung nach AP21967-Vorbehandlung in CXCR4-DmrA- bzw. CCR5-DmrA- und β -Arrestin-1-DmrC-koexprimierenden Zelllinien.	55
Abbildung 13:	Internalisierung des Chemokinrezeptors CXCR4-DmrA in β -Arrestin-1-DmrC-koexprimierenden Zellen nach Stimulation mit AP21967 oder CXCL12.	56
Abbildung 14:	Internalisierung des Chemokinrezeptors CCR5-DmrA in β -Arrestin-1-DmrC-koexprimierenden Zellen nach Stimulation mit AP21967 oder CCL5.	58
Abbildung 15:	Internalisierung des Chemokinrezeptors CCR5-DmrA nach Stimulation mit AP21967 oder CCL5 in β -Arrestin-1R169E-DmrC-koexprimierenden Zellen im Vergleich zu den β -Arrestin-1-WT-DmrC-koexprimierenden Zellen.	59
Abbildung 16:	Immunfluoreszenzbasierte Darstellung der AP21967-induzierten versus CXCL12-induzierten Rezeptorinternalisierung in CXCR4-DmrA- und β -Arrestin-1-DmrC-koexprimierenden HEK-293-Zellen.	61
Abbildung 17:	Immunfluoreszenzbasierte Darstellung der AP21967-induzierten versus CCL5-induzierten Rezeptorinternalisierung in CCR5-DmrA- und β -Arrestin-1-DmrC-koexprimierenden HEK-293-Zellen.	63
Abbildung 18:	Immunfluoreszenzbasierte Darstellung der AP21967-induzierten versus CCL5-induzierten Rezeptorinternalisierung in CCR5-DmrA- und β -Arrestin-1R169E-DmrC-koexprimierenden HEK-293-Zellen.	64
Abbildung 19:	Kinetik der AP21967-induzierten ERK1/2-Phosphorylierung in CXCR4-DmrA- und β -Arrestin-1-DmrC-koexprimierenden Zellen.	65
Abbildung 20:	ERK1/2-Phosphorylierung nach AP21967-induzierter versus liganden-induzierter Translokation von β -Arrestin-1-DmrC bzw. β -Arrestin-1R169E-DmrC.	67

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1:	Arrestin-Isoformen mit Nomenklatur nach Sterne-Marr (1993)	11
Tabelle 2:	Geräte	23
Tabelle 3:	Laborutensilien	24
Tabelle 4:	Chemikalien und biologische Substanzen	25
Tabelle 5:	Zusammensetzung von Lösungen und Pufferlösungen	27
Tabelle 6:	Zusammensetzung von Zellkulturmedien	31
Tabelle 7:	Antibiotika	31
Tabelle 8:	DNA-Inserts	32
Tabelle 9:	Plasmide	32
Tabelle 10:	DNA-Oligonukleotide	33
Tabelle 11:	DNA-Aufbereitungskits	33
Tabelle 12:	Enzyme	33
Tabelle 13:	Primärantikörper	34
Tabelle 14:	Sekundärantikörper	34
Tabelle 15:	DNA-Längen- und Proteingewichtsmarkierung	35
Tabelle 16:	Verwendete Softwareprogramme	35
Tabelle 17:	PCR-Ansatz und Cyclerprotokoll für die Amplifizierung von cDNA	36
Tabelle 18:	<i>Colony</i> -PCR-Ansatz und Cyclerprotokoll für die Plasmid-DNA aus <i>E. coli</i>	38

Abkürzungsverzeichnis

AIDS	<i>acquired immune deficiency syndrome</i>
AIP4	<i>atrophin-interacting protein 4</i>
AP2	Adapterprotein-2
AT _{1A} R	Angiotensin II Typ 1A-Rezeptor
BM	BSA-HEPES-Medium
bov	bovin
BSA	bovines Serumalbumin
C-	Carboxy-
cAMP	cyclisches Adenosinmonophosphat
CCL5	CC-Chemokinligand 5
CCR5	CC-Chemokinrezeptor 5
cDNA	<i>complementary deoxyribonucleic acid</i>
c-Src	<i>cellular and sarcoma</i> (Eigename der Tyrosinkinase)
CXCL12	CXC-Chemokinligand 12
CXCR4	CXC-Chemokinrezeptor 4
DMEM	<i>Dulbecco's modified Eagle's medium</i>
DMSO	Dimethylsulfoxid
dNTP	Desoxynukleotidtriphosphat
DmrA	Dimerisierungsdomäne A
DmrC	Dimerisierungsdomäne C
ECL	<i>extracellular loop</i>
ECL-Lösung	<i>enhanced-chemoluminescence</i> -Lösung
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EM	Ethansulfonsäuremedium
ERK1/2	<i>extracellular signal-related kinases 1 and 2</i>
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
FACS	<i>fluorescence-activated cell sorter</i>
FAK	<i>focal adhesion kinase</i>
FCS	<i>fetal calf serum</i>
FITC	Fluoreszeinisothiocyanat
FKBP12	12 kDa FK506-Bindungsprotein
for	<i>forward</i>
FRB	FKBP12-Rapamycin-Bindung
FRET	Förster-Resonanzenergietransfer
GFP	<i>green fluorescent protein</i>
GPCR	<i>G protein-coupled receptor</i>
GRAFS	Akronym: <i>Glutamate, Rhodopsin, Adhesion, Frizzled/Taste, Secretin</i>
GRK	<i>G protein-coupled receptor kinase</i>

HA-Tag	<i>(human influenza) hemagglutinin-Tag</i>
HBS	<i>Hepes-buffered saline</i>
HEK-Zellen	<i>human embryonic kidney cells</i>
HEPES	N-2-Hydroxyethylpiperazin-N'-2-Ethansulfonsäure
HF	<i>high fidelity</i>
HIV-1	<i>human immunodeficiency virus-1</i>
HRP	<i>horseradish peroxidase</i>
ICL	<i>intracellular loop</i>
IF	Immunfluoreszenz
IgG	Immunglobulin G
JNK	c-Jun N-terminale Kinase
LB	<i>lysogeny broth</i>
LESTR	<i>leucocyte-derived seven-transmembrane domain receptor</i>
MAPK	<i>mitogen-activated protein kinase</i>
MAP2K	<i>mitogen-activated protein kinase kinase</i>
MAP3K	<i>mitogen-activated protein kinase kinase kinase</i>
MES	N, N-Morpholinoethansulfonsäure
MCF	<i>mean channel of fluorescence</i>
mTOR	<i>mechanistic/ mammalian target of rapamycin</i>
N-	Amino-
NK	Negativkontrolle
PBS	<i>phosphate-buffered saline</i>
PCR	<i>polymerase chain reaction</i>
PE	Phycoerythrin
PFA	Paraformaldehyd
PIPES	Piperazin-N, N'-bis(2-Ethansulfonsäure)
PKA	Proteinkinase A
PKC	Proteinkinase C
PLC- β	Phospholipase C- β
PMA	Phorbol-12-Myristat-13-Acetat
POI	<i>protein of interest</i>
PTX	Pertussistoxin
RANTES	<i>regulated upon activation, normal T-cell expressed and secreted</i>
rev	<i>reverse</i>
rpm	<i>revolutions per minute</i>
RT	Raumtemperatur
SA	<i>Solution A, Lösung A</i>
SB	<i>Solution B, Lösung B</i>
SDF-1	<i>stromal cell-derived factor-1</i>
SDS-PAGE	<i>sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis</i>
TBS	<i>TRIS-buffered saline</i>
TBS-T	<i>TRIS-buffered saline-Tween</i>

TEMED	Tetramethylethyldiamin
TRIS	Tris(Hydroxymethyl)-Aminomethan
UV	ultraviolett
V2R	Vasopressinrezeptor-2
WB	Western Blot
WHIM	Akronym: Warzen, Hypogammaglobulinämie, Infektionen, Myelokathexis
β -Arr	β -Arrestin
β_2 -AR	β_2 -Adrenozeptor
δ -OR	δ -Opioidrezeptor
μ -OR	μ -Opioidrezeptor

1 Einleitung

G-Protein-gekoppelte Rezeptoren (GPCRs) sind in einer großen Vielfalt im menschlichen Organismus vorhanden. Als Steuereinheiten auf der Zelloberfläche exprimiert, leiten sie Signale von außen ins Zellinnere weiter. Die Signale kleiner extrazellulärer Moleküle werden dabei mit Hilfe von G-Proteinen, Kinasen und sekundären Botenstoffen um ein Vielfaches verstärkt und führen zu unterschiedlichen Antworten in der Zelle selbst oder auf Ebene der Zell-Zell-Interaktion. Daneben kommen sodann auch Gegenspieler zum Zuge, welche die sonst ausufernden Signalprozesse regulieren oder stoppen können.

Zu diesen Gegenspielern gehören die Arrestine, welche ihren Namen der arrestierenden (festhaltenden, beendenden) Funktion verdanken, da sie GPCRs desensibilisieren. Zu welchen Funktionen sie darüber hinaus noch imstande sind, blieb anfänglich unentdeckt, wurde Forschungsobjekt und soll Frage dieser Arbeit sein. Sie befasst sich mit den Auswirkungen einer chemisch induzierten β -Arrestin-1-Translokation an den CXCR4-Chemokinrezeptor 4 (CXCR4) sowie an den CCR5-Chemokinrezeptor 5 (CCR5).

1.1 Signaltransduktion G-Protein-gekoppelter Rezeptoren

GPCRs weisen eine heptahelikale Struktur mit sieben die Plasmamembran durchquerenden α -Helices auf, die untereinander durch drei extrazelluläre Schleifen (*extracellular loops*, ECL) und drei intrazelluläre Schleifen (*intracellular loops*, ICL) verbunden sind. Der Amino (N)-Terminus ist dabei extrazellulär ausgerichtet und der Carboxy (C)-Terminus intrazellulär (Baldwin 1994). Mindestens 800 humane GPCRs werden anhand der GRAFS-Klassifikation unterteilt in *Glutamate*, *Rhodopsin*, *Adhesion*, *Frizzled/Taste2* und *Secretin*. Die Rhodopsinrezeptoren stellen mit 719 Exemplaren die größte Klasse unter den GPCRs dar (Fredriksson et al. 2003; Alexander et al. 2013).

GPCRs sind an diversen physiologischen Funktionen wie Kreislaufregulation und Immunkompetenz, Sinneswahrnehmungen wie Sehen und Riechen beteiligt, zugleich aber auch an der Pathogenese diverser Krankheiten (Birnbaumer 1995; Pierce et al. 2002; Lefkowitz 2013). In Kombination mit ihrem Ligandenspektrum, welches unter anderem Hormone, Peptide, Lipide und Photonen umfasst, wurden GPCRs zu beliebten Angriffspunkten in der Pharmakologie (Fredriksson et al. 2003). Aktuell stellen sie etwa ein Drittel der Zielstrukturen pharmakologischer Substanzen dar (Sriram und Insel 2018).

Sobald extrazelluläre Agonisten am GPCR binden, verändert sich die dreidimensionale strukturelle Ausrichtung des Rezeptors: Er nimmt eine sogenannte aktivierte Konformation ein (Kobilka und Deupi 2007). Dadurch koppeln intrazelluläre G-Proteine an den GPCR und leiten die Signaltransduktionskaskade ein. Durch den Austausch von gebundenem Guanosindiphosphat zu Guanosintriphosphat wird das heterotrimer

G-Protein aktiviert. Dadurch teilt sich das G-Protein in die α -Untereinheit einerseits und die $\beta\gamma$ -Untereinheiten andererseits auf. Die aktivierte α -Untereinheit dissoziiert vom Rezeptor und schafft Platz für die Kopplung und Aktivierung weiterer G-Proteine. Die aktiven Untereinheiten aktivieren wiederum Effektoren und sekundäre Botenstoffe, die je nach Subtyp der α -Untereinheit variieren können (Woehler und Ponimaskin 2009).

Der ligandenstimulierte Chemokinrezeptor CXCR4 koppelt beispielsweise an Pertussistoxin (PTX)-sensitive G_i -Proteine, deren $G_{\alpha i}$ -Untereinheit die Non-Rezeptor-Tyrosinkinase c-Src (*cellular and sarcoma*) aktiviert und die Adenylylzyklase inhibiert. Währenddessen aktivieren die $G_{\beta\gamma}$ -Untereinheiten die Phospholipase C- β (PLC- β) und die Phosphoinositid-3-Kinase (Busillo und Benovic 2007). PLC- β hydrolysiert Phosphatidylinositol-4,5-Bisphosphat zu Inositoltriphosphat und Diacylglycerol. Inositoltriphosphat mobilisiert Kalzium aus dem endoplasmatischen Retikulum und Diacylglycerol aktiviert die Proteinkinase C (PKC) (Woehler und Ponimaskin 2009). Intrazellulär mobilisiertes Kalzium stimuliert ebenfalls PKC und darüber hinaus die *focal adhesion kinase* (FAK). Letztere ist an Chemotaxis und Zelladhäsion beteiligt (Le et al. 2005; Busillo und Benovic 2007).

Auf G-Protein-Aktivierung folgt in Abhängigkeit der Tyrosinkinase c-Src die Phosphorylierung Mitogen-aktivierter Proteinkinasen (MAPKs). Dabei phosphorylieren sich nacheinander *mitogen-activated protein kinase kinase kinase* (MAP3K), *mitogen-activated protein kinase kinase* (MAP2K) und MAPK im Sinne einer Aktivierung: Durch c-Src phosphoryliertes Raf (eine MAP3K) phosphoryliert seinerseits MEK (eine MAP2K), welche wiederum die *extracellular signal-regulated kinases 1 and 2* (ERK1/2) phosphoryliert. Auf diese Weise aktivierte ERK1 und ERK2 (MAPKs) beteiligen sich an der Regulierung des Zellzyklus, der Zellproliferation und der Zellapoptose (Pearson et al. 2001). ERK1/2 sowie p38 und c-Jun N-terminale Kinase (JNK) sind bekannte MAPKs für die Chemokinrezeptoren CXCR4 und CCR5 (Ganju et al. 1998a; Ganju et al. 1998b; Popik und Pitha 1998).

1.1.1 GPCR-Desensibilisierung

Um die generierten signaltransduktoriischen Effekte der aktivierten Rezeptoren auszubalancieren, bedarf es eines Regulationsmechanismus. Die Signaltransduktion muss rechtzeitig abgeschwächt bzw. gestoppt werden, damit sie nicht dauerhaft persistiert und der Ausgangsstatus des Rezeptors zurückerlangt werden kann. Unter dieser Voraussetzung kann das Liganden-Rezeptor-System wieder sensitiv auf neue Reize reagieren (Ferguson 2001).

Nach Ligandenbindung und Aktivierung des GPCRs phosphorylieren G-Proteingekoppelte Rezeptorkinasen (GRKs) den GPCR an C-terminalen Serinresten (Krupnick und Benovic 1998). Dabei sind am Chemokinrezeptor CCR5 mindestens vier Phosphatreste erforderlich, die in unterschiedlichen Phosphorylierungsmustern angeordnet

sein können (Pollok-Kopp et al. 2003). Es sind sieben mammale GRKs bekannt, die zu den Serin/Threonin-Proteinkinasen gehören und in drei Subgruppen unterteilt werden: Die Rhodopsinkinase bzw. GRK1 und GRK7 bilden die erste Gruppe und werden ausschließlich in der Retina exprimiert. GRK2 und GRK3 bilden die zweite, GRK4, GRK5 und GRK6 die dritte Gruppe. GRKs der Gruppen zwei und drei sind bis auf die testikulär exprimierte GRK4 jeweils organübergreifend im Organismus verbreitet (Pitcher et al. 1998; Premont und Gainetdinov 2007). Vor allem GRK2 und GRK3 sind an der Rezeptorregulierung der Chemokinrezeptoren CCR5 und CXCR4 beteiligt (Oppermann et al. 1999; Luo et al. 2017). Sie binden an die $\beta\gamma$ -Untereinheiten der G-Proteine, wodurch der Kontakt zum GPCR erleichtert wird (Koch et al. 1993).

An den membranständigen aktivierten und phosphorylierten GPCR koppeln auf zytoplasmatischer Seite β -Arrestine (Benovic et al. 1987; Barak et al. 1997; Shenoy und Lefkowitz 2005b). Durch die hochaffine Bindung, die dabei zwischen Rezeptor und β -Arrestin an der Plasmamembran entsteht, konkurrieren die β -Arrestine mit den G-Proteinen um die Bindungsstelle am ICL2 und ICL3 des Rezeptors. Dadurch werden die G-Proteine auf sterische Art und Weise entkoppelt und an erneuter Rezeptorbindung gehindert (Ferguson et al. 1996; DeGraff et al. 2002; Marion et al. 2006). Dieser Prozess nennt sich Rezeptordesensibilisierung und bezeichnet den Funktionsverlust des Rezeptors auf einen externen Ligandenstimulus zu reagieren. Der Desensibilisierungsprozess findet binnen Sekunden bis Minuten nach Ligandenstimulation des GPCRs statt und schwächt weitere G-Protein-vermittelte Signaltransduktion ab (Koenig und Edwardson 1997; Smith und Rajagopal 2016). Messbar ist der desensibilisierende Effekt beispielsweise als Abnahme der durch sekundäre Botenstoffe bedingten intrazellulären Kalziummobilisierung (Berridge und Irvine 1984; Wang et al. 1993).

Der Prozess der Desensibilisierung bedarf im klassischen Modell zweier Schritte, bestehend aus Rezeptorphosphorylierung und β -Arrestin-Bindung (Bouvier et al. 1988; Kong et al. 1994; Carman und Benovic 1998). Unterschieden wird homologe von heterologer Rezeptordesensibilisierung. Homologe Desensibilisierung wird durch GRKs vermittelt, die nach Rezeptoraktivierung selbigen phosphorylieren. Heterologe Desensibilisierung, die durch cyclisches Adenosinmonophosphat (cAMP)-abhängige Proteinkinase A (PKA) oder PKC vermittelt wird, kann infolge der Aktivierung eines anderen als des zu phosphorylierenden Rezeptors erfolgen (Pitcher et al. 1992). CCR5-Desensibilisierung kann darüberhinaus im Gegensatz zu CXCR4 auch als sogenannte *Cross*-Desensibilisierung aus der Aktivierung von μ - oder δ -Opioidrezeptoren (μ/δ -OR) und damit Rezeptortyp-übergreifend resultieren (Szabo et al. 2003).

1.1.2 GPCR-Internalisierung

Infolge der Rezeptorphosphorylierung und β -Arrestin-Bindung beginnt die Rezeptorinternalisierung, bei dem der Rezeptor mitsamt dem gebundenen Liganden und

β -Arrestin von der Zelloberfläche verschwindet und in intrazellulären Vesikeln von der Plasmamembran fortbewegt wird (Koenig und Edwardson 1997). Eine weit verbreitete und bekannte Form der Rezeptorinternalisierung ist die Clathrin-vermittelte Endozytose in sogenannten *clathrin-coated pits* (Goldstein et al. 1979). Dabei interagieren Clathrin, das Adapterprotein-2 (AP2) und Dynamin als Bestandteile der Endozytosemaschinerie zusammen mit β -Arrestin, sodass sich endosomale Vesikel bilden, die in unterschiedliche Zellkompartimente transportiert werden (Zaremba und Keen 1983; Pearse und Robinson 1990; Goodman et al. 1996; Zhang et al. 1996). Alternativ kann die CCR5-Internalisierung im Gegensatz zur CXCR4-Internalisierung auch Caveolae-abhängig stattfinden (Mueller et al. 2002; Venkatesan et al. 2003).

Bestimmte C-terminale Sequenzmotive und posttranslationelle Modifizierungen wie Ubiquitylierung bestimmen dabei das Schicksal des internalisierten Rezeptors. Er wird wie in Abbildung 1 dargestellt, entweder recycelt, also erneut an die Plasmamembran retransferiert, oder degradiert und damit endgültig durch Abbau entfernt (Oakley et al. 1999; Shenoy et al. 2001).

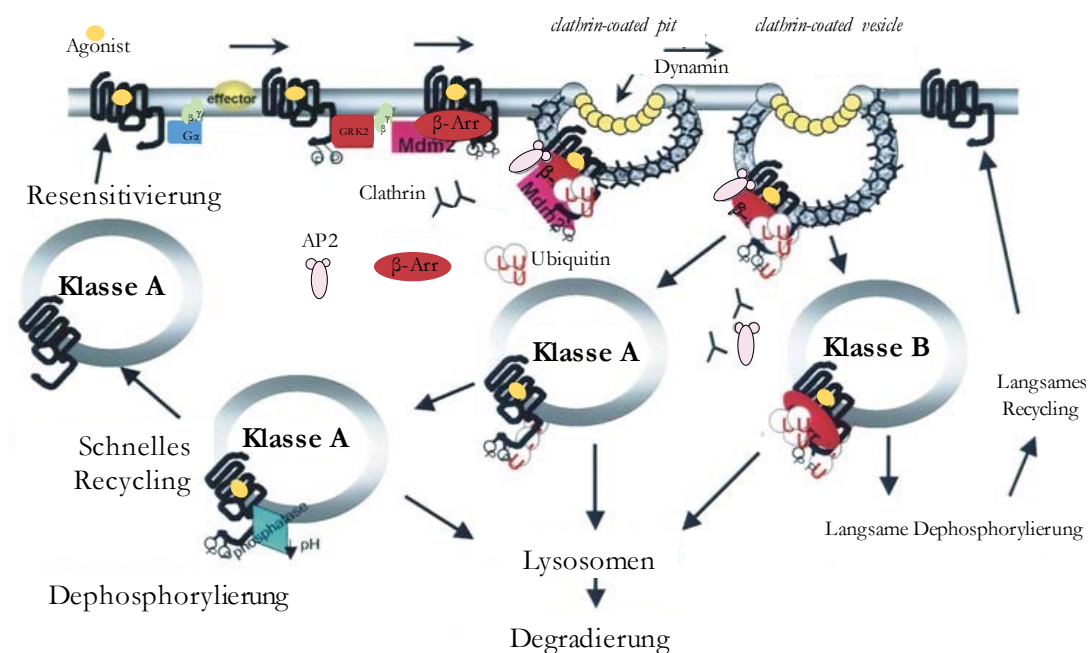


Abbildung 1: Intrazelluläre Distribution von GPCRs und β -Arrestinen. Nachdem GRKs den Agonisten-aktvierten Rezeptor phosphoryliert haben, wird β -Arrestin (β -Arr) an den zellmembranständigen GPCR rekrutiert. Als *scaffold* ermöglicht β -Arrestin nach Mdm2- und AP2-Rekrutierung die Clathrin-vermittelte Internalisierung des GPCRs. Die klassenabhängige Sortierung des GPCRs zum schnellen Recyclingpfad in Richtung Plasmamembran (Klasse A) oder Degradierungspfad in Lysosomen (Klasse B) erfolgt in Abhängigkeit vom Ubiquitylierungsstatus des Rezeptors. Abbildung modifiziert nach Shenoy und Lefkowitz (2003b). Die Verwendung erfolgt mit freundlicher Genehmigung der Portland Press, Ltd. Erlaubnis erteilt durch Copyright Clearance Center, Inc. Lizenz-ID 1009481-1 / 1009263-1.

Beim Rezeptorrecycling dissoziieren Rezeptor-gebundene Liganden nicht unbedingt sofort, sondern können einige Zyklen aus Rezeptorinternalisierung und Recycling zusammen mit dem Rezeptor zurück an die Zelloberfläche durchlaufen, ehe sie sich von ihm lösen (Pollok-Kopp et al. 2003). Bevor der Rezeptor in resensitiverter, d.h. erneut aktivierbarer Form vorliegt, muss er zunächst durch Phosphatasen in angesäuerten Endosomen dephosphoryliert werden und der Ligand dissoziiert sein (Krueger et al. 1997; Mack et al. 1998; Ferguson 2001). Die Rezeptordegradierung ist ein Ubiquitin-abhängiger Prozess, der in späten Endosomen bzw. Lysosomen stattfindet (Hershko und Ciechanover 1992; Marchese und Benovic 2001).

Klassische Beispiele für Rezeptoren, die dem Recyclingpfad (*recycling pathway*) unterliegen, sind der β_2 -adrenerge Rezeptor, der μ -OR oder der Dopaminrezeptor-D1A. Der Vasopressinrezeptor-2 (V2R) oder der Angiotensin II Typ 1A-Rezeptor (AT_{1A}R) hingegen werden typischerweise dem Degradierungspfad (*degradative pathway*) zugeteilt (Oakley et al. 2000). Während der Chemokinrezeptor CCR5 dem *recycling pathway* in frühe Endosomen folgt, von wo aus in dephosphorylierter Form ein Retransfer an die Plasmamembran stattfindet, weist der Chemokinrezeptor CXCR4 keine effiziente Recyclingquote auf und wird stattdessen von der E3-Ubiquitin-Ligase *atrophin-interacting protein 4* (AIP4) ubiquitinyliert und anschließend in Lysosomen degradiert (Tarasova et al. 1998; Marchese et al. 2003; Venkatesan et al. 2003).

Internalisierte Rezeptoren akkumulieren in unterschiedlichen Mustern: So wurden für CCR5 perinukleär lokalisierte Recyclingvesikel und für CXCR4 distinkte zytoplasmatische Vesikel beschrieben (Mack et al. 1998; Orsini et al. 1999; Signoret et al. 2000). Die unterschiedliche Postinternalisierungs-Distribution der Rezeptoren spiegelt sich auch in der im nachfolgenden Abschnitt erläuterten Rezeptorklassifikation von Oakley et al. (1999; 2000) wider, die auf unterschiedlichen Affinitäten der β -Arrestin-Isoformen basiert. Klasse A-Rezeptoren unterliegen klassischerweise dem *recycling pathway*, wohingegen Klasse B-Rezeptoren degradiert werden.

Insgesamt ist festzuhalten, dass Rezeptordesensibilisierung und Rezeptorinternalisierung zwei Prozesse sind, die der Regulierung und Abschwächung der durch G-Proteine vermittelten Signale infolge der Ligandenstimulation des GPCRs dienen. Während die Desensibilisierung eine kurzfristige und schnelle Antwort auf die Rezeptoraktivierung ist, findet die Internalisierung zeitlich verzögert und kontinuierlicher innerhalb von Minuten bis Stunden nach Ligandenaktivierung statt (Smith und Rajagopal 2016). Für Desensibilisierung und vor allem Internalisierung ist ein enges Zusammenspiel des Rezeptors mit GRKs oder PKC und β -Arrestinen als Interaktionspartner notwendig. Dabei ist die β -Arrestin-Rekrutierung abhängig vom GRK-vermittelten oder PKC-vermittelten Phosphorylierungsstatus des aktivierten Rezeptors (Hüttenrauch et al. 2002; Luo et al. 2017). Ohne adäquate Rezeptorphosphorylierung sind β -Arrestin-Rekrutierung, Desensibilisierung und Internalisierung eingeschränkt (Kraft et al. 2001).

1.2 Chemokinrezeptoren

Chemokinrezeptoren sind Schaltstellen vieler Zellen, herkömmlicherweise der Immunzellen. In erster Linie vermitteln Chemokine durch Bindung und Aktivierung des Chemokinrezeptors Zellmobilität, genannt Chemotaxis (Murphy et al. 2000). Die verschiedenen Chemokinrezeptoren zeigen spezielle Expressionsmuster und Funktionen, die sich nicht ausschließlich auf immunologische Prozesse beschränken, sondern auch embryologische Entwicklungsprozesse sowie die Pathogenese von Krankheiten umfassen. Chemokinrezeptoren sind darüber hinaus zu beliebten Zielstrukturen in der Pharmakologie geworden (Bachelier et al. 2014).

Die 18 typischen Chemokinrezeptoren gehören zur δ -Subgruppe der Rhodopsinklasse G-Protein-gekoppelter Rezeptoren. Sie werden anhand der Position bestimmter Cysteine im zugehörigen Chemokin unterteilt in vier verschiedene Chemokinrezeptorklassen: CXC- und CC-Rezeptoren stellen die beiden größten, CX3C- und C-Rezeptoren zwei weitere Klassen dar. Darüber hinaus existieren sechs atypische Chemokinrezeptoren, die G-Protein-unabhängig und stattdessen Arrestin-abhängig Chemokine herausfiltern und somit Inflammationsprozesse dämpfen, sowie einige virale Chemokinrezeptoren, die auf Kopien aus dem Wirtsgenom zurückzuführen sind (Murphy et al. 2000; Bachelier et al. 2014).

Die beiden Chemokinrezeptoren CXCR4 und CCR5 sind Kofaktoren für den Zelleintritt des humanen Immundefizienz-Virus-1 (HIV-1). Entsteht ein Kontakt zwischen dem viralen Glykoprotein gp120 und dem CD4-Rezeptor der Wirtszelle, resultiert eine Konformationsänderung im Glykoprotein, die den zusätzlichen Kontakt zum Chemokinrezeptor als Kofaktor erleichtert. Daraufhin stellen sich weitere Konformationsänderungen des viralen *envelope protein* gp120/gp41 ein, die zum Ausklappen von gp41 und zur Fusion mit der Wirtszellmembran führen (McDougal et al. 1986; Rizzuto et al. 1998; Berger et al. 1999). Das Retrovirus HIV-1 liegt in verschiedenen Varianten vor: R5-Stämme mit Makrophagen-Tropismus des HIV-1 nutzen CCR5 als Kofaktor, X4-Stämme mit T-Zell-Tropismus hingegen CXCR4 (Alkhatib et al. 1996; Feng et al. 1996; Barmania und Pepper 2013).

CXCR4 war zunächst als *orphan receptor* (klassenloser Rezeptor) unter dem Namen *leucocyte-derived seven-transmembrane domain receptor* (LESTR) bekannt, als ihm seine Kofaktorfunktion den zusätzlichen Namen Fusin zutrug (Loetscher et al. 1994; Bleul et al. 1996a; Feng et al. 1996). Der Bindungsnachweis zwischen dem Agonisten CXC-Chemokinligand 12 (CXCL12) und LESTR/Fusin führte schließlich zur Klassifizierung des Rezeptors als CXC-Chemokinrezeptor 4 (Bleul et al. 1996a; Oberlin et al. 1996). Die Ligandenbindung inhibiert sowohl die durch CXCR4 als auch die durch CCR5 vermittelte Infektion mit den jeweiligen HIV-1-Varianten (Cocchi et al. 1995; Dragic et al. 1996). Diesem Phänomen liegt die durch Chemokine vermittelte Endozytose der Rezeptoren zugrunde, die die als Kofaktoren zur Verfügung stehenden oberflächlichen

Rezeptoren reduziert (Mack et al. 1998). Der bislang erfolgreichste pharmakologische Ansatz, um die Bindung zwischen Chemokinrezeptor und Retrovirus zu verhindern, ist die Blockierung der gp120-Bindungsstelle am Rezeptor (Bachelierie et al. 2014). Ein diesbezüglich bekanntes Medikament ist der *small molecule antagonist* Maraviroc der Firma Pfizer, dessen Wirkung auf einem allosterischen Antagonismus am Chemokinrezeptor CCR5 basiert. Als allosterischer Inhibitor bindet Maraviroc an einer anderen als der Chemokin- bzw. gp120-Bindungsstelle und stabilisiert eine Rezeptorkonformation, welche die HIV-1-Bindung nicht zulässt (Dragic et al. 2000; Dorr et al. 2005; Garcia-Perez et al. 2011; Tan et al. 2013).

1.2.1 Der CXC-Chemokinrezeptor CXCR4

Vor der Entdeckung des Chemokinrezeptors CXCR4 wurde sein Agonist CXCL12 entdeckt, welcher zunächst als *stromal-derived factor-1* (SDF-1) durch seine Lymphozyten-anlockende Funktion als *chemoattractant* (Lockstoff) eingeordnet und als CXC-Chemokin klassifiziert wurde (Tashiro et al. 1993; Nagasawa et al. 1994; Bleul et al. 1996b). SDF-1 liegt in sechs verschiedenen Splicevarianten vor: α , β , γ , δ , ϵ , θ (Bachelierie et al. 2014).

CXCR4 besteht aus 352 Aminosäuren und hat ein Molekulargewicht von etwa 46 kDa (Loetscher et al. 1994; Feng et al. 1996). CXCR4 wird von fast allen hämatopoetischen Zellen und Leukozyten sowie von Gefäßendothelzellen und Neuronen des zentralen und des peripheren Nervensystems exprimiert (Bleul et al. 1997; Hesselgesser et al. 1997; Gupta et al. 1998; Murphy et al. 2000). Dass die Expression von CXCR4 und CXCL12 lebensnotwendig ist, wurde an CXCR4- bzw. CXCL12-Knockout-Mäusefeten gezeigt, die bereits intrauterin verstarben und Defizite in der B-Lymphopoese, Myelopoese sowie der Organogenese von Herz, Gefäßendothel und ZNS aufwiesen (Nagasawa et al. 1994; Ma et al. 1998; Tachibana et al. 1998).

Die pharmakologische Bedeutung des Chemokinrezeptors CXCR4 zeigte beispielhaft der *small molecule antagonist* Plerixafor, welcher CXCR4 reversibel bindet (De Clercq 2009). Zum einen verhindert Plerixafor die Infektion mit HIV-1 und zum anderen wirkt es stammzellmobilisierend, weshalb es in hämatologisch-onkologischen Therapiekonzepten bei Patienten mit Multiplem Myelom oder Non-Hodgkin-Lymphom verwendet wird (De Clercq 2009; Pusic und DiPersio 2010).

Neben der Korezeptorfunktion für HIV-1 ist CXCR4 an der Pathogenese weiterer Krankheitsbilder beteiligt. CXCR4 wird in hämatopoetischen und nicht-hämatopoetischen Krebszellen exprimiert, deren Metastasierungsmuster CXCL12-reichen Organen entspricht (Balkwill 2004). Immundefiziente Patienten mit WHIM-Syndrom weisen heterozygote Deletionen im C-terminalen Bereich des Chemokinrezeptors CXCR4 auf. Das Akronym WHIM steht für: Warzen, die durch eine erhöhte Suszeptibilität gegenüber Papillomaviren bedingt sind, Hypogammaglobulinämie, Infektionen und Myelokathexis (Neutrophilenretention im Knochenmark mit assoziierter Panleukopenie) (Hernandez et al. 2003). Dieser

Erkrankung liegen eine verstärkte Kopplung von G-Proteinen sowie verstärkte β -Arrestin-2-abhängige Signale als Reaktion des Chemokinrezeptors CXCR4 auf Ligandenstimulation mit CXCL12 zugrunde (Lagane et al. 2008).

Die Lokalisation dieses Rezeptordefekts ist im Zusammenhang mit der Funktion des C-Terminus zu betrachten. Für die β -Arrestin-vermittelte Rezeptordesensibilisierung ist vor allem die C-terminale Domäne entscheidend, für die β -Arrestin-vermittelte Rezeptorinternalisierung und ERK1/2-Aktivierung insbesondere der enge Kontakt zwischen dem ICL3 des Rezeptors und β -Arrestin sowie ein Dileucinmotiv und Serinreste im C-Terminus (Haribabu et al. 1997; Ganju et al. 1998b; Orsini et al. 1999; Cheng et al. 2000).

1.2.2 Der CC-Chemokinrezeptor CCR5

Die Identifizierung des aus 352 Aminosäuren bestehenden CC-Chemokinrezeptors CCR5 mit einer molekularen Masse von etwa 40 kDa gelang unmittelbar vor der Entdeckung seiner HIV-1-Kofaktoraktivität im Jahr 1996 (Boring et al. 1996; Samson et al. 1996a). CCR5 besitzt im Gegensatz zu CXCR4 eine wesentlich umfangreichere Bandbreite verschiedener Liganden. *Regulated upon activation, normal T-cell expressed and secreted* (RANTES), nach heutigem Klassifikationssystem als CC-Chemokinligand 5 (CCL5) bezeichnet, wurde neben *macrophage inflammatory protein 1- α* (MIP1- α oder CCL3) und *macrophage inflammatory protein 1- β* (MIP1- β oder CCL4) als einer der ersten natürlichen Agonisten des Chemokinrezeptors bekannt (Combadiere et al. 1996; Raport et al. 1996). Inzwischen sind dem Chemokinrezeptor CCR5 zehn Chemokine als Liganden zugeordnet, wovon CCL7 ein natürlicher Antagonist ist (Blanpain et al. 1999; Bachelerie et al. 2014).

Exprimiert wird der Chemokinrezeptor CCR5 auf T-Effektor- und T-Gedächtniszellen sowie zahlreichen antigenpräsentierenden Zellen, darunter Makrophagen, Monozyten und dendritische Zellen. Darüber hinaus ist die CCR5-Expression auch auf CD34⁺-hämatopoetischen Vorläuferzellen und regulatorischen T-Zellen nachzuweisen (Bachelerie et al. 2014). Die Expression in humanen Neuronen, Astrozyten und Kapillarendothel des Gehirns weist auf Bedeutungen in Organogenese und HIV-1-bedingter Neuropathologie hin (Andjelkovic et al. 1999; Klein et al. 1999). CCR5 ist dennoch in erster Linie bekannt für seine Funktionen in Inflammationsprozessen und der Entwicklung erworbener Immunität (Taub et al. 1996; Murphy 2002; Barmania und Pepper 2013). CCR5 vermittelt Chemotaxis und fördert Zell-Zell-Interaktionen in sekundären lymphatischen Organen (Castellino et al. 2006; Bachelerie et al. 2014).

Schon früh wurde erkannt, dass die Oberflächenexpressionsrate von CCR5 interindividuell stark variieren kann. Individuen mit einer homozygoten C-terminalen 32-Basenpaar (bp)-Deletion (CCR5- Δ 32) sind gegenüber der Infektion mit HIV-1 resistent, weil ihre verkürzten CCR5-Rezeptoren nicht an der Zelloberfläche erscheinen. Der Defekt tritt in der kaukasischen Bevölkerung mit einer Allelfrequenz von 10 % auf und führt bei

heterozygoter Ausprägung bereits zu einer partiellen Resistenz gegenüber HIV-1 bzw. zur verzögerten Progression zum *acquired immune deficiency syndrome* (AIDS) (Dean et al. 1996; Liu et al. 1996; Samson et al. 1996b). In Berlin zog die CCR5- Δ 32-Mutation im Rahmen einer Stammzelltransplantation bei einem Patienten mit akuter myeloischer Leukämie und präexistenter HIV-1-Infektion therapeutische Konsequenzen nach sich: Im Anschluss an die Transplantation blieb der Virusnachweis langfristig aus. Überlegungen im Hinblick auf weitere HIV-1-Therapiestrategien beziehen neben der Stammzelltransplantation eines CCR5- Δ 32-homozygoten Spenders auch gentherapeutische Ansätze ein (Hütter et al. 2009; 2015).

Interessanterweise ist die CCR5-Expression nicht lebensnotwendig wie diejenige von CXCR4. CCR5-Knockout-Mäuse sind unter pathogenfreien Bedingungen lebensfähig (Zhou et al. 1998). Das Fehlen oder die reduzierte Oberflächenexpression von CCR5 geht jedoch mit veränderten immunologischen Reaktionen auf bestimmte Erreger oder mit der Ausbildung von Autoimmunkrankheiten einher (Glass et al. 2001; Kohlmeier et al. 2008). CCR5-defiziente Mäuse weisen eine eingeschränkte Eliminationsfähigkeit gegenüber *Listeria monocytogenes* auf, jedoch eine potentere Immunreaktion gegen *Mycobacterium tuberculosis* (Zhou et al. 1998; Algood und Flynn 2004). Die CCR5- Δ 32-Mutation ist mit einem mildereren Verlauf einer rheumatoiden Arthritis assoziiert und stellt zugleich einen Risikofaktor für eine symptomatische Infektion mit dem West-Nil-Virus dar (Glass et al. 2006; Prahalad 2006). Die Mutation wirkt sich auch protektiv auf eine Infektion mit dem Hepatitis-C-Virus im Sinne einer mildereren Leberfibrosierung aus (Hellier et al. 2003).

Für die Ligandenbindung am CCR5-Rezeptor sind folgende Modifizierungen im extrazellulär gelegenen N-Terminus erforderlich (Oppermann 2004): Sulfatierungen von Tyrosinresten erleichtern die Bindung des viralen gp120, während O-Glykosylierungen von Serin essentiell für Chemokinbindung sind (Farzan et al. 1999; Bannert et al. 2001). Die in Abbildung 2 dargestellte für Chemokinrezeptoren spezifische zweite Disulfidbrücke zwischen dem N-Terminus und dem ECL3 stabilisiert die zur Chemokinbindung und Kofaktorfunktion notwendige Rezeptorkonformation (Blanpain et al. 1999). CCR5 zeigt strukturell neben den typischen Chemokinrezeptor-Strukturelementen Besonderheiten gegenüber CXCR4 auf. Dazu gehören die Palmitoylierungsstellen in der C-terminalen Rezeptorregion, die für Rezeptorendozytose, intrazelluläre Translokationen des Rezeptors und Kopplung nachgeschalteter Proteine wie GRKs wichtig sind (Blanpain et al. 2001; Kraft et al. 2001; Percherancier et al. 2001).

Wie in anderen Chemokinrezeptoren befinden sich im funktionell bedeutsamen C-Terminus Serinreste, die essentiell für die ligandenstimulationsbedingte durch GRK oder PKC vermittelte Rezeptorphosphorylierung und nachfolgende β -Arrestin-Bindung sind (Oppermann et al. 1999). Für die β -Arrestin-Bindung an den Chemokinrezeptor CCR5 ist erstens die Phosphorylierung von mindestens zwei der vier C-terminalen Serinreste essentiell und zweitens ein Bereich im ICL2, der ein DRY-Motiv enthält (Kraft et al. 2001;

Hüttenrauch et al. 2002). Diese unter GPCRs hochkonservierte Aminosäuresequenz ist zudem für die Rezeptoraktivierung mit einhergehender G-Protein-Bindung infolge von Ligandenstimulation wichtig (Gosling et al. 1997; Oppermann 2004; Lagane et al. 2005).

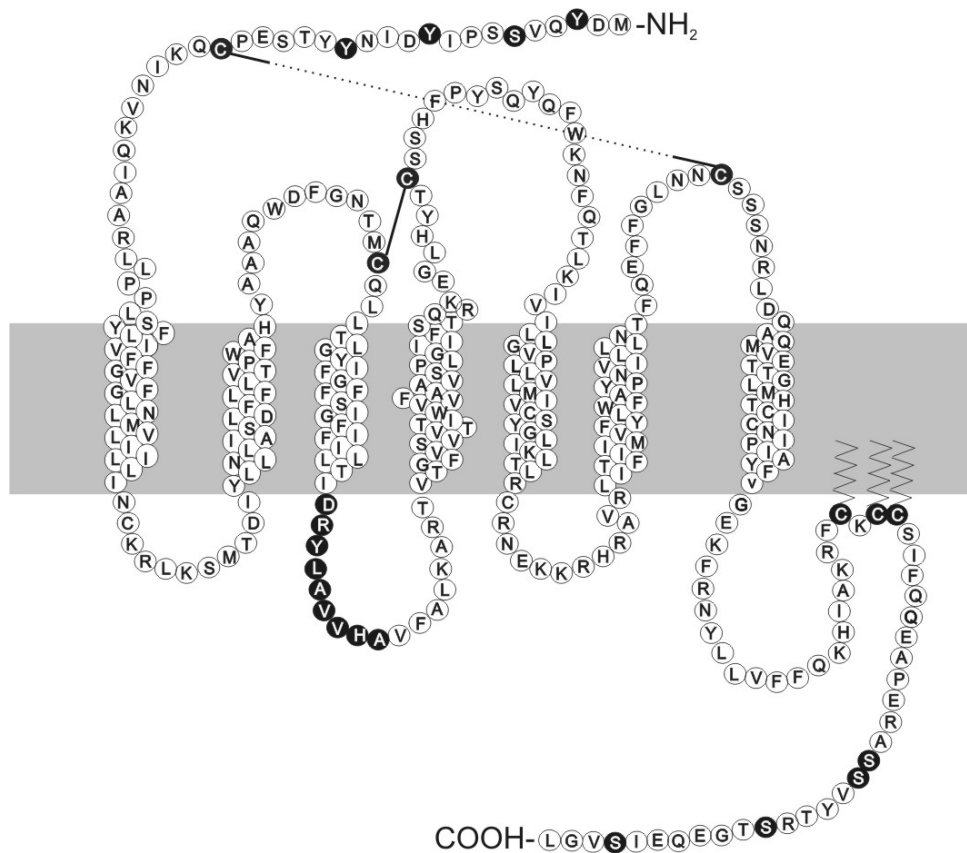


Abbildung 2: Die Struktur des CC-Chemokinrezeptors CCR5 in zweidimensionaler Topologie der Zellmembran. Dargestellt ist CCR5 in der Lipiddoppelschicht (hellgrau) mit angrenzendem extrazellulärem Raum (oberhalb) und intrazellulärem Raum (unterhalb). Funktionell bedeutsame Aminosäuren sind visuell hervorgehoben (schwarz): N-terminale Tyrosinreste zur Sulfatierung, GPCR-typische extrazelluläre Disulfidbrücke als Verbindungslinie zwischen Cysteinen sowie Chemokinrezeptor-spezifische als gestrichelte Linie, DRYLAVVHA-Motiv im zweiten ICL, C-terminale palmitoylierte Cysteine mit gezackter Darstellung in Verbindung zur Plasmamembran, phosphorylierbare Serinreste im C-Terminus. Die Verwendung der Abbildung von Oppermann (2004) erfolgt mit freundlicher Genehmigung des Autors und des Verlages Elsevier.

Die dreidimensionale Struktur des heptahelikalen Chemokinrezeptors CCR5 stellten Tan et al. (2013) im Komplex mit dem allosterischen Inhibitor Maraviroc in Form einer Kristallstruktur dar.

1.3 β -Arrestine

Arrestin-1 wurde im Zusammenhang mit der Signaltransduktion von Photorezeptoren Ende der 70er Jahre des letzten Jahrhunderts entdeckt. Das auch als 48 kDa-Protein bezeichnete intrazelluläre Arrestin band so wie die zuvor entdeckte Rhodopsinkinase an den Licht-aktivierten Photorezeptor Rhodopsin (Kühn 1978). Daraufhin wurde der desensibilisierende Effekt erstmals beschrieben: Zuerst stimuliert Licht das Rhodopsin, wodurch das intrazelluläre Transducin (ein G-Protein-Äquivalent) aktiviert wird. Letzteres aktiviert wiederum eine Phosphodiesterase, die anschließend durch das 48 kDa-Protein deaktiviert wird (Wilden et al. 1986a).

Später gelang der Nachweis eines ähnlichen Zusammenhangs zwischen dem β_2 -Adrenozeptor (β_2 -AR) und einem dem Arrestin-1 analogen Protein, das fortan β -Arrestin genannt wurde (Benovic et al. 1987; Lohse et al. 1990). 1992 wurde die zweite nonvisuelle Arrestin-Isoform entdeckt. β -Arrestin-1 und -2 erwiesen sich im Gegensatz zum visuellen Arrestin nicht als spezifisch für einen Rezeptortyp. Sie verfügen vielmehr über eine generalisierte GPCR-desensibilisierende Funktion (Attramadal et al. 1992).

Schließlich wurde *Cone*-Arrestin als weitere visuelle Isoform identifiziert (Craft et al. 1994). Tabelle 1 bietet eine Übersicht zu Nomenklatur, Synonymgebrauch und Expression der Arrestine (Sterne-Marr et al. 1993).

Tabelle 1: Arrestin-Isoformen mit Nomenklatur nach Sterne-Marr (1993)

Nomenklatur	Synonyme	Expression	
Arrestin-1	<i>Visual</i> (v)-Arrestin S-Antigen 48 kDa-Protein	<i>Rod</i> (Stäbchen)-Photorezeptoren Glandula pinealis	visuell
Arrestin-2	β -Arrestin-1	ubiquitär	nonvisuell
Arrestin-3	β -Arrestin-2		
Arrestin-4	<i>Cone</i> (c)-Arrestin X-Arrestin	<i>Cone</i> (Zapfen)-Photorezeptoren	visuell

β -Arrestine sind ubiquitär in allen nonvisuellen Zellen des Organismus mit besonders hohen Konzentrationen im neuronalen Gewebe exprimiert. Im Verlauf der Embryogenese entwickelt sich β -Arrestin-1 zur dominierenden Isoform neuronaler Zellen. Prinzipiell können alle Arrestine in den Nukleus importiert und exportiert werden (Gurevich und Gurevich 2006). Die Isoformen unterscheiden sich in den Translokationseigenschaften insofern voneinander, als dass nur β -Arrestin-1 in funktionell bedeutsamer Konzentration nukleär vorliegt und dortige Histon-Acetylierungsprozesse und Transkriptionsvorgänge vermittelt (Kang et al. 2005). β -Arrestin-2 hingegen ist aufgrund seiner *nuclear export sequence* fast ausschließlich im Zytoplasma lokalisiert (Wang et al. 2003).

1.3.1 Vielseitigkeit der durch β -Arrestin vermittelten Funktionen

Auf den ersten Blick scheinen β -Arrestin-1 und β -Arrestin-2 funktionell untereinander austauschbar zu sein, allerdings finden sich zelltyp- oder rezeptorspezifische funktionelle Isoformunterschiede (Srivastava et al. 2015). So vermitteln zwar beide β -Arrestin-Isoformen CXCR4- und β_2 -AR-Internalisierung, jedoch spielt β -Arrestin-2 in beiden Fällen die dominierende Rolle. In humanen embryonalen Nierenzellen (HEK)-293-Zellen mit β -Arrestin-2-Expression erreicht die CXCR4-Internalisierung nach CXCL12-Stimulation ein Ausmaß von 40 %, das unter alternativer Expression von β -Arrestin-1 nicht in vollem Umfang erreicht wird (Cheng et al. 2000). Die β_2 -AR-Internalisierung wird ebenfalls hauptsächlich durch β -Arrestin-2 vermittelt (Kohout et al. 2001) – ein Effekt, der auf einer höheren Affinität von β -Arrestin-2 zu Clathrin beruhen könnte (Goodman et al. 1996). Auch der durch β -Arrestin-2 vermittelte Desensibilisierungseffekt nach CXCR4-Ligandenstimulation ist stärker als durch β -Arrestin-1. Hingegen zeigt β -Arrestin-1 ein stärkeres ERK1/2-Aktivierungspotential als β -Arrestin-2 (Busillo et al. 2010).

Beispielhaft für die Tragweite der isoformbedingten Unterschiede im klinischen Kontext ist der Einfluss auf das Myokard. In β -Arrestin-Knockout-Mäusen erwies sich β -Arrestin-2 im Myokardinfarkt-Modell als zytoprotektiv, β -Arrestin-1 hingegen als zellschädigend, was mit der Entwicklung einer stärker ausgeprägten Herzinsuffizienz einherging (Watari et al. 2013; Bathgate-Siryk et al. 2014). Darüber hinaus werden den beiden Isoformen gegensätzliche Funktionen in der Apoptose- und Anti-Apoptose-Regulierung zugeschrieben (Kook et al. 2014; Kook et al. 2019).

Zwei GPCR-Rezeptorklassen wurden durch Oakley et al. (2000) beschrieben, deren Einteilung auf unterschiedlichen Affinitäten zu den β -Arrestin-Isoformen beruht. Während Klasse A-Rezeptoren β -Arrestin-2 mit höherer Affinität binden als β -Arrestin-1, weisen Rezeptoren der Klasse B diese Isoformspezifität nicht auf. Sie binden β -Arrestine generell mit höherer Affinität als Klasse A-Rezeptoren, was zu einer stabileren und damit länger persistierenden Bindung zwischen Klasse B-Rezeptor und β -Arrestin führt. Der Klasse A zugehörige Rezeptoren dissoziieren nach Internalisierung schnell vom β -Arrestin. Derartige Rezeptoreigenschaften werden in den Rezeptor-*C-tails* determiniert.

Neben ihrer desensibilisierenden und internalisierenden Funktion erfüllen β -Arrestine in erster Linie Adaptereigenschaften. Als sogenannte Gerüstproteine (*scaffolds*) erleichtern sie bestimmte Signaleffekte oder ermöglichen diese zum Teil sogar erst, indem sie den Kontakt zwischen den Interaktionspartnern vermitteln (Luttrell und Lefkowitz 2002).

Die Rezeptorinternalisierung findet β -Arrestin-vermittelt statt: Als Adaptermolekül bringt β -Arrestin einzelne Elemente der Endozytosemaschinerie wie Clathrin, AP2 und Dynamin in direkte Rezeptornähe, sodass sich *clathrin-coated pits* ausbilden und der Rezeptor mitsamt dem Liganden endozytiert wird (Goodman et al. 1996; Zhang et al. 1996; Laporte et al. 1999). β -Arrestin dissoziiert daraufhin in Plasmamembrannähe schnell von den

Klasse A-Rezeptoren, wohingegen es in hochaffiner Bindung an Klasse B-Rezeptoren länger gebunden bleibt (Oakley et al. 2000).

Genauer betrachtet kolokalisiert β -Arrestin mit Rezeptoren wie CXCR4 nach deren Ligandenstimulation in frühen Endosomen, die sich in der Immunfluoreszenz (IF) als punktuelle Vesikel darstellen und durch das Markerprotein Transferrin identifiziert werden können (Orsini et al. 1999). In diesem Zusammenhang steht auch die Zuordnung der Klasse B-Rezeptoren zum *degradative pathway*: Die stabile Bindung zwischen Rezeptor und dem Adapterprotein β -Arrestin erleichtert den Kontakt zu E3-Ubiquitinligasen wie AIP4, die Rezeptoren wie CXCR4 ubiquitinylieren (Marchese et al. 2003). Durch die Ubiquitinylierung wird der Rezeptor für die Degradierung in Proteasomen markiert (Shenoy et al. 2001). Damit übernimmt β -Arrestin die Funktion eines Sortierungsmoleküls (Bhandari et al. 2007). β -Arrestine können selbst durch *mouse double minute 2* (Mdm2)-vermittelte Ubiquitinylierung modifiziert werden und gewährleisten dadurch die hochaffine Bindung zum Rezeptor und dessen intrazellulären Transport in Endosomen (Shenoy und Lefkowitz 2003a; Shenoy et al. 2009). Zudem erleichtert die Ubiquitinylierung des β -Arrestins Effekte wie ERK1/2-Aktivierung und die Akkumulation der phosphorylierten MAPK im Zytoplasma (Shenoy und Lefkowitz 2005a).

β -Arrestine sind zudem auch Adapter für MAP-Kinasen. Sie erleichtern die Kaskadenaktivierung durch die Assoziation mit c-Raf-1, MEK und ERK1/2. Damit wurde neben dem klassischen G-Protein-abhängigen ein neuer, durch β -Arrestin vermittelter ERK1/2-Aktivierungs-Signalweg beschrieben (Luttrell et al. 2001). Etwa 10 min nach CXCR4-Ligandenstimulation zeigten HEK-293-Zellen mit Koexpression von β -Arrestin-1/2 eine stärker ausgeprägte ERK1/2-Phosphorylierung als ohne (Cheng et al. 2000). Dabei fördert die Rezeptoraktivierung die β -Arrestin-Assoziation mit ERK1/2 (Coffa et al. 2011b). Hingegen liegt JNK3, eine andere Kinase, unabhängig von vorausgegangener Rezeptoraktivierung in an β -Arrestin-2 gebundener und bereits aktivierter Form vor (Song et al. 2006; Song et al. 2009). Die Kinasen JNK1/2/3 werden allerdings nur in Kontakt mit der Isoform β -Arrestin-2 als adäquatem *scaffold* aktiviert. Der Kontakt mit den anderen Arrestin-Isoformen vermittelt keine JNK-Phosphorylierung (McDonald et al. 2000; Zhan et al. 2011; Kook et al. 2013). Für die Tyrosinkinase c-Src wurde β -Arrestin-1 als Adapter beschrieben (Luttrell et al. 1999). Der Komplex bildet sich aus, sobald β_2 -AR aktiviert wird und leitet die durch Src vermittelte MAPK-Aktivierung ein (Miller et al. 2000).

Somit können verschiedene ERK-Aktivierungs-Signalwege wie folgt beschrieben werden (Luttrell 2003): Während der zuvor erwähnte durch G-Proteine vermittelte Weg c-Src-abhängig über Ras- zu ERK1/2-Aktivierung führt (1.1) und mit nukleärer Translokation der phosphorylierten ERK1/2 (pERK1/2) einhergeht, findet der durch β -Arrestin vermittelte Weg c-Raf1-abhängig statt und sorgt für eine zytoplasmatische Akkumulation der pERK1/2 (Luttrell und Miller 2013). So werden unterschiedliche

Effekte auf Transkriptionsebene erreicht – nur G-Protein-vermittelte ERK1/2-Aktivierung führt zu den klassischen ERK-assoziierten Proliferations- und Proteinsyntheseeffekten (DeFea et al. 2000). β -Arrestin übernimmt eine regulatorische Funktion, indem es die Lokalisation und damit die Effektorfunktion der aktivierten ERK1/2 kontrolliert (Sorkin und von Zastrow 2009). β -Arrestin vermittelt durch zytosolisch lokalisierte ERK1/2-Aktivität Proteintranslation, Zytoskelettarrangement für Chemotaxis oder Metastasierungsfunktionen der Zelle (Luttrell und Spiller 2017).

1.3.2 *Biased Signaling* – G-Protein-vermittelte versus β -Arrestin-vermittelte Signaltransduktion

Desensibilisierungs-, Internalisierungs- und intrazelluläre GPCR-Distributionsfunktionen sind die initial bekannt gewordenen durch β -Arrestin vermittelten Effekte. Später traten die Adapterfunktionen und die durch β -Arrestin vermittelten Signaltransduktionseffekte in den Vordergrund der Forschung. Dabei wurde β -Arrestin zunächst eine Mediatorfunktion in der GPCR-Signaltransduktion zuteil (Daaka et al. 1998). Mit zunehmenden Erkenntnissen über das Funktionsspektrum der β -Arrestine gewannen sie eine neue Bedeutung als eigenständige Signaltransduktoren, die G-Protein-unabhängig agieren können (Shukla et al. 2011).

Seither gilt es, G-Protein-abhängige und β -Arrestin-abhängige Signaltransduktionsprozesse zu unterscheiden und zugrunde liegende Mechanismen zu verstehen, die für die präferentielle Wahl des einen oder anderen Signaltransduktors verantwortlich sind. Die Begrifflichkeit *bias* (engl. für Verzerrung, Neigung, Vorliebe) steht für die schwerpunktmäßige Ansteuerung des durch den jeweiligen Interaktionspartner vermittelten Signaleffekts (Abbildung 3). Dabei entsteht eine funktionelle Selektivität. G-Protein-*biased-signaling* ist demnach der klassische Weg mit G-Protein-Aktivierung und G-Protein-vermittelten Effekten, β -Arrestin-*biased-signaling* der alternative davon unabhängige Weg mit β -Arrestin-vermittelten Effekten (Rajagopal et al. 2010).

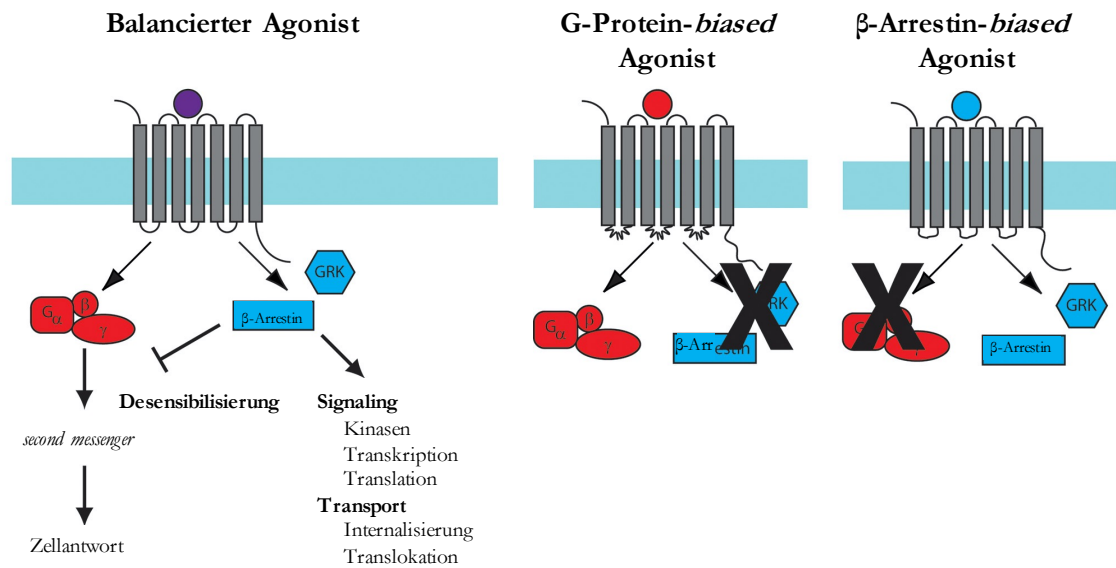


Abbildung 3: Balancierte GPCR-Signaltransduktion und *biased signaling*. Das Verhältnis zwischen G-Protein-vermittelter und β -Arrestin-vermittelter Signaltransduktion an GPCRs kann ausgewogen bzw. balanciert (links) oder zugunsten einer Komponente verzerrt sein (rechts). Dabei kann in Abhängigkeit von aktiver und inaktiver Komponente zwischen G-Protein-*biased-signaling* und β -Arrestin-*biased-signaling* unterschieden werden. Die Verwendung der Abbildung von Smith und Rajagopal (2016) erfolgt mit freundlicher Genehmigung der American Society for Biochemistry and Molecular Biology, Erlaubnis erteilt durch Copyright Clearance Center, Lizenz-ID 1009462-1 / 1009476-1.

Im Jahr 2003 wurde die G-Protein-unabhängige Signaltransduktion erstmalig beschrieben. Am $AT_{1A}R$ wurde ERK1/2 auf zwei voneinander unabhängige Arten aktiviert. Eine Art der ERK1/2-Aktivierung findet G-Protein-abhängig über PKC und die andere β -Arrestin-2-abhängig statt. β -Arrestin-2-Depletion oder Inhibierung der PKC teilinhibiert die ERK1/2-Aktivierung, während Depletion bzw. Inhibierung beider Vermittler zu vollständiger Inhibition der ERK1/2-Aktivierung führt (Wei et al. 2003).

Zunächst wurden zeitliche und räumliche Unterschiede zwischen G-Protein- und β -Arrestin-abhängiger Signaltransduktion als determinierende Faktoren herausgearbeitet: G-Protein-abhängige ERK1/2-Aktivierung setzt schnell nach Ligandenstimulation des $AT_{1A}R$ ein und bleibt mit einer Dauer von 2 min transient bestehen. Dahingegen tritt die β -Arrestin-abhängige Aktivierung mit einer Latenz von 5 bis 10 min auf und persistiert länger als eine Stunde (Ahn et al. 2004b). Analoge Zusammenhänge wurden auch für β -Arrestin-1 und -2 nach β_2 -AR-Aktivierung nachgewiesen (Shenoy et al. 2006). In G-Protein-Abhängigkeit transloziert pERK1/2 in den Nukleus und stimuliert dort Transkriptions- und Zellproliferationsprozesse. β -Arrestin-abhängig aktivierte ERK1/2 akkumulieren stattdessen in endozytotischen Vesikeln (Ahn et al. 2004b). Zur Stabilisierung der pERK1/2-Akkumulation in Endosomen trägt hierbei die Ubiquitylierung des β -Arrestins bei (Shenoy und Lefkowitz 2005a).

Es entwickelten sich Theorien über die Mechanismen, die dem *biased signaling* zugrunde liegen. Verschiedene Ligandentypen, Ligandenstrukturen oder Ligandenkonzentrationen können am gleichen Rezeptor für unterschiedliche intrazelluläre Signaleffekte sorgen (Violin und Lefkowitz 2007). Während niedrige Agonistenkonzentrationen am β_2 -AR G-Protein-abhängige Signale auslösen, sorgen hohe Agonistenkonzentrationen für G-Protein-unabhängige Signale (Sun et al. 2007). Am Chemokinrezeptor CCR7 führt der Ligand CCL19 neben ERK-Aktivierung, die auch durch CCL21-Stimulation erreicht wird, zu zusätzlicher Desensibilisierung und Endozytose des Rezeptors. Dieser *bias* wird durch zwei unterschiedliche „Pools“ von β -Arrestin-2 vermittelt, die jeweils durch spezifische Phosphorylierung bestimmter GRK-Isoformen an den Rezeptor rekrutiert werden (Zidar et al. 2009). Das Muster der Rezeptorphosphorylierungsstellen beschreibt einen bestimmtem „Phosphorylierungs-Barcode“, der weitere Rezeptorinteraktionen auf bestimmte Partner beschränkt (Kim et al. 2005). Auch die aus der Aktivierung resultierende Rezeptorkonformation enthält entscheidende Informationen, die für die Auswahl spezifischer Interaktionspartner sorgen (Azzi et al. 2003).

Neue Möglichkeiten und Ziele entwickeln sich besonders in der pharmakologischen Forschung, die nach spezifischen Ansteuerungsmöglichkeiten des einen oder anderen Signalweges sucht, um neue Medikamente mit besserem Wirkungs-Nebenwirkungs-Profil zu entwickeln. Aus der Feststellung, dass β -Arrestin-defiziente Mäuse unter Morphin-Gabe weniger Atemdepression und Obstipation aufweisen, entstand beispielsweise eine pharmakologische Idee für einen *biased* Opioid-Agonisten (Bohn et al. 1999). In einer klinischen Phase-1-Studie konnte für den G-Protein-*biased* Liganden TRV130 bereits eine höhere analgetische Potenz bei geringeren Nebenwirkungen im Vergleich zu Morphin gezeigt werden (Soergel et al. 2014).

Biased signaling kann spezies-, gewebe- oder zelltypspezifisch sein und bedarf geeigneter Interaktionspartner, die die Vielseitigkeit der Signale differenziert weiterleiten (Wang und DeFea 2006; DeWire et al. 2008; Tobin et al. 2008). Die hohe Strukturflexibilität der Arrestine, also die Eigenschaft ihre Konformation und damit dreidimensionale Ausrichtung anzupassen, unterstützt diese Fähigkeit maßgeblich.

1.3.3 Konformationsänderungen im β -Arrestin und konstitutiv aktive β -Arrestin-1R169E-Mutation

Die länglich gestaltete Proteinstruktur der β -Arrestine setzt sich wie die des visuellen Arrestins aus N-Domäne und C-Domäne zusammen, die durch eine die Flexibilität gewährleistende Scharnierregion (*interdomain hinge*) verbunden sind (Hirsch et al. 1999; Han et al. 2001; Vishnivetskiy et al. 2002). N- und C-Domäne bestehen, vereinfacht dargestellt, jeweils aus sieben β -Strängen. Diese bilden eine Art „Sandwich“, bei dem sich auf einer Seite drei, auf der anderen vier der sieben β -Stränge gegenüberliegen (Abbildung 4). Das C-terminale Ende des Arrestins (*C-tail*) ist über eine Linker-Struktur mit der C-Domäne

verbunden und formt eine β -Faltblattstruktur aus (Hirsch et al. 1999). Die größten Strukturunterschiede zwischen den β -Arrestin-Isoformen 1 und 2 liegen im Bereich der C-Termini und der *interdomain-hinge*-Regionen, wodurch sich Unterschiede in der isoformspezifischen Rezeptoraffinität und Rezeptorinternalisierung erklären lassen (Zhan et al. 2011; Srivastava et al. 2015).

Je nach Aktivierungsstatus verändert Arrestin seine dreidimensionale Strukturausrichtung: Es wechselt zwischen inaktiver und aktiver Konformation (Palczewski et al. 1991; Gurevich und Gurevich 2004). In Zellen mit unstimuliertem Rezeptor liegt Arrestin in inaktiver Konformation vor (*basal state*). Die inaktive Konformation wird durch intramolekulare ionische und hydrophobe Wechselwirkungen stabilisiert. Daran ist die Kernregion (*polar core*) maßgeblich beteiligt, in der sich positiv geladene Aminosäuren wie zum Beispiel Arginin175 (R175) im ν -Arrestin befinden (Gurevich und Benovic 1997). Diese positiven Ladungen stehen mit negativen Ladungen anderer Aminosäuren im Arrestin im Gleichgewicht. Zusätzlich stabilisieren drei Elemente (α -Helix I, β -Strang I und β -Strang XX) den *basal state* durch hydrophobe Wechselwirkungen untereinander (Hirsch et al. 1999; Han et al. 2001).

Arrestine bevorzugen aktivierte phosphorylierte Rezeptoren als Bindungspartner (Gurevich und Benovic 1992). Schon früh wurden zwei an der Rezeptorerkennung beteiligte Strukturelemente entdeckt: die Aktivierungsdomäne und die Phosphorylierungserkennungsdomäne. Beide weisen auf zwei Voraussetzungen im Prozess der Rezeptorbindung hin. Erst die gleichzeitige Erfassung beider Rezeptoreigenschaften (Aktivierung und Phosphorylierung) in Kombination bewirken der sogenannten *sequential-multisite-binding*-Theorie nach eine substantielle Konformationsänderung im Arrestin, die eine hochaffine Bindung zum Rezeptor ermöglicht (Gurevich und Benovic 1992; 1993). Durch Interaktion des Arrestins mit dem phosphorylierten Rezeptor-C-Terminus werden zusätzliche Bindungsstellen mobilisiert und die Affinität der Phosphorylierungserkennungsdomäne für den C-Terminus erhöht (Gurevich und Benovic 1997).

Durch Kristallstrukturdarstellung des Arrestins und β -Arrestin-1 wurde der Mechanismus der Rezeptorbindung konkretisiert (Hirsch et al. 1999; Han et al. 2001). Der Übergang aus der inaktiven in die aktivierte Arrestin-Konformation wird modellhaft in Abbildung 4 dargestellt. Sobald der ligandenaktivierte GPCR phosphoryliert wird und damit eine negative Ladung erhält, wird Arrestin aufgrund seines stark positiv geladenen Potentials an den Rezeptor rekrutiert. N-terminale Lysinreste (K12 im β -Strang I des β -Arrestin-1) führen dabei den phosphorylierten *C-tail* des Rezeptors zum *polar core* des β -Arrestins (Han et al. 2001). Dieser erste Bindungsschritt nennt sich *C-tail*-Rekrutierung (Shukla et al. 2014). Die negativ geladenen Phosphatreste am Rezeptor brechen die ionischen Bindungen im *polar core* des Arrestins auf, so dass der *basal state* destabilisiert wird und sich auch die drei hydrophoben Elemente aus ihren Positionen bewegen. Der Arrestin-*C-tail* mit dem darin enthaltenen β -Strang XX klappt dabei aus und sorgt für ausreichend Spielraum, der für die

Adapterfunktionen des β -Arrestins notwendig ist (Han et al. 2001). β -Arrestin geht in einem zweiten Schritt eine *Core*-Interaktion mit dem Rezeptor ein und nimmt dabei seine aktivierte *Core*-Konformation an (Shukla et al. 2014; Cahill et al. 2017). Es bildet sich eine intensivierte, hochaffine Bindung zum Rezeptor aus, wobei der *finger loop* des Arrestins in den transmembranösen Rezeptor-*Core* hineinragt und sich das Arrestin longitudinal entlang des plasmamembranständigen Rezeptors ausrichtet (Shukla et al. 2014).

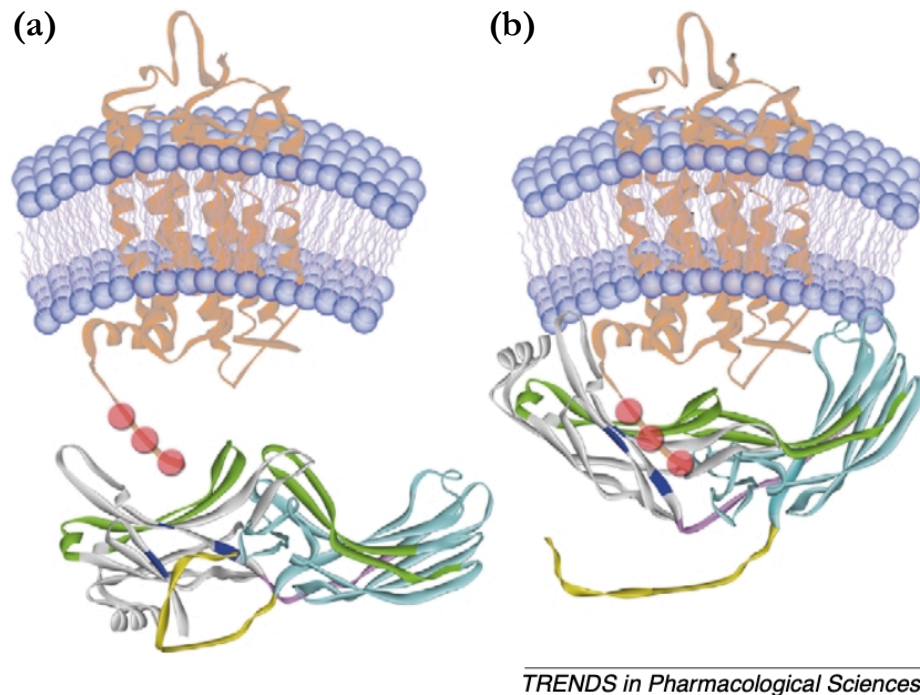


Abbildung 4: Arrestinaktivierung. Darstellung des inaktiven Arrestins auf intrazellulärer Seite eines plasmamembranständigen GPCRs (a). Farbliche Hervorhebung der Phosphatbindungsstellen (dunkelblau), der Rezeptorbindungselemente (hellgrün) im Arrestin sowie der Phosphatreste (rot) im Rezeptor. Hypothetisches Model des Komplexes aus Rezeptor und gebundenem aktiviertem Arrestin (b). Bindungen zwischen Rezeptorphosphatresten und Lysinresten (dunkelblau) führen zu intramolekularen Bewegungen von β -Strang I, Aufbrechen der hydrophoben Wechselwirkungen und Ladungs-neutralisierenden Effekten, die den *polar core* destabilisieren. Der herausklappende *C-tail* (gelb) verstärkt diese Destabilisierung, die herauschwingende α -Helix I trägt zur Rezeptorbindung bei. Bei der Aktivierung bewegen sich N-Domäne (grau) und C-Domäne (türkis) durch Bewegung in der *interdomain hinge region* (lila) aufeinander zu. Die Verwendung der Abbildung von Gurevich und Gurevich (2004) erfolgt mit freundlicher Genehmigung des Verlages Elsevier.

Die Bedeutung des *polar core* als Garant für eine stabile inaktive Arrestinkonformation wurde im Rahmen von Mutationsstudien mit Aminosäureaustausch deutlich (Gurevich et al. 1997; Gurevich und Benovic 1997; Kovoov et al. 1999). Ein Ungleichgewicht in der elektrischen Ladungsbalance im Arrestin, etwa durch Austausch des positiv geladenen Arginins in Position 175 des ν -Arrestins gegen eine negativ geladene Aminosäure wie Glutamat (R175E), sorgt für veränderte Bindungseigenschaften. Die Bindungsaffinität

zwischen ν -ArrestinR175E und unphosphorylierten Rezeptoren ist vergleichbar mit derjenigen zwischen ν -ArrestinR175E und phosphorylierten Rezeptoren. V-ArrestinR175E bindet phosphorylierungs-unabhängig jeglichen agonistenaktivierten GPCR. Die Rezeptortypspezifität nimmt durch die Mutation zu. V-ArrestinR175E bindet andere Rezeptoren als Rhodopsin mit noch geringerer Affinität als Wildtyp (WT)- ν -Arrestin (Gurevich et al. 1997; Gurevich und Benovic 1997).

In analoger Weise wurde eine Mutation im β -Arrestin-1 an Position Arg169 eingefügt. Agonistenstimulierte Rezeptoren werden von β -Arrestin-1R169E mit deutlich höherer Affinität als von WT- β -Arrestin-1 gebunden (Gurevich et al. 1997). Die Mutation weist ebenfalls phosphorylierungs-unabhängige Bindungseigenschaften auf: Sogar C-terminal gekürzte Rezeptoren ohne Phosphorylierungsstellen werden vom β -Arrestin-1R169E gebunden (Kovoor et al. 1999). Die β -Arrestin-1R169E-Mutanten sind vor der Rezeptoraktivierung noch nicht an den Rezeptor gebunden, denn die signaltransduktorische Antwort des Rezeptors auf einen Ligandenstimulus erreicht einen vergleichbaren Maximalwert wie in Zellen mit β -Arrestin-1-WT. Nach erfolgter Ligandenstimulation ist der Anteil desensibilisierter Rezeptoren in Zellen mit β -Arrestin-1R169E-Expression allerdings höher als in β -Arrestin-1-WT-Zellen (Kovoor et al. 1999).

Die Eigenschaft der Mutante wurde zunächst als konstitutiv aktiv beschrieben (Vishnivetskiy et al. 2000). Durch Aufhebung des intakten *polar core* wird der inaktive Konformationsstatus destabilisiert und somit der Wechsel in die aktive Konformation des Arrestins erleichtert (Hirsch et al. 1999). Laut Carter et al. (2005) befinden sich die Mutanten jedoch noch nicht per se im aktivierten Konformationsstatus. Es handelt sich eher um präaktivierte Varianten des β -Arrestins, die sich in einer Art Zwischenmodus befinden und die für die Ausbildung einer hochaffinen Rezeptorbindung noch die ligandeninduzierte Rezeptoraktivierung benötigen (Carter et al. 2005). Dass zwischen Wildtyp- β -Arrestinen und Mutante jedoch bereits deutliche Konformationsunterschiede vorliegen, zeigte sich besonders im Bereich der β -Stränge II bis IV und in der Lassoschleife (*ariat loop*) beider β -Arrestin-Isoformen. β -Arrestin-1 zeigte darüber hinaus noch ausgedehntere Strukturveränderungen durch R169E-Mutation als β -Arrestin-2 (Yun et al. 2015).

1.4 Heterodimerisierungssystem

Gewisse intrazelluläre Proteinfunktionen finden nur in bestimmten Zellkompartimenten oder im Kontakt mit bestimmten Interaktionspartnern statt. Zur Analyse derartig abhängiger Proteinaktivitäten wurden Systeme entwickelt, in denen sich das Protein durch Hinzugabe eines kleinen Adaptermoleküls an eine konkrete Zielstruktur translozieren lässt. Heterodimerisierung bezeichnet den Prozess der Zusammenführung zweier unterschiedlicher Komponenten. Steuerbar wird die Heterodimerisierung durch Zugabe einer bestimmten externen Substanz, die den Prozess in der Zelle zeitgenau induziert. Diese Substanzen werden als chemische Dimerisierungsinduktoren bezeichnet (Putyrski und Schultz 2012; DeRose et al. 2013).

Das Zytostatikum Rapamycin ist ein sogenanntes *small molecule*, welches das 12 kDa FK506-Bindungsprotein (FKBP12) und die Kinase *mechanistic/mammalian target of rapamycin* (mTOR) gleichzeitig bindet, um den entstandenen Multiproteinkomplex zu inhibieren. Bedingung der mTOR-Bindung ist dabei die zuvor eingegangene und bestehende Bindung an FKBP12. Rapamycin bindet sodann an die FKBP12-Rapamycin-Bindungs-Domäne (FRB) der mTOR-Kinase. Um den Mechanismus einer solchen Zwei-Komponenten-Bindung in Zellen für chemisch induzierbare Heterodimerisierung nutzbar zu machen, ohne sie dabei durch zytostatische Effekte zu schädigen, wurden Heterodimerisierungssysteme mit sogenannten Rapalogs (Rapamycinanaloga) entwickelt. Rapalogs binden die FKBP12- und FRB-Domänen zwar simultan mit hoher Affinität, sind jedoch deutlich weniger toxisch. Durch Modifizierung der Bindungsstrukturen im Rapalog und in der FRB-Domäne binden Rapalogs kein endogenes Wildtyp-FRB, sondern ausschließlich die strukturverwandte modifizierte FRB-Dimerisierungsdomäne. Die hochaffine Bindung gilt im zellulären Kontext als irreversibel (Banaszynski et al. 2005; Putyrski und Schultz 2012).

Der Hersteller Takara Bio (ehemals Clontech) bietet ein kommerzielles System an, in dem ein bestimmtes intrazelluläres *protein of interest* (POI) an eine konkrete Zielstruktur in der Zelle geführt werden kann. Die zelluläre Expression dimerisierungsfähiger Proteine wird durch Plasmid-Transfektion ermöglicht, die eine genetische Fusion des Proteingens bzw. Zielstrukturgens mit einer Dimerisierungsdomäne verursacht. Die Dimerisierungsdomäne A (DmrA) entspricht der Bindungskomponente FKBP12 und wird an die intrazelluläre Zielstruktur angefügt, an die das POI transloziert werden soll. Die Dimerisierungsdomäne C (DmrC) entspricht FRB und wird an ein im Zytoplasma mobiles POI angehängt. Durch Zugabe des Rapalogs AP21967 bindet DmrC innerhalb von Sekunden bis Minuten indirekt an DmrA (Putyrski und Schultz 2012; Takara Bio USA Inc. 2017).

β -Arrestine liegen vorwiegend zytosolisch vor und werden erst nach Rezeptoraktivierung durch Ligandenstimulation an diesen rekrutiert. Ein Modell, in dem β -Arrestin mittels Heterodimerisierung an den zellmembranständigen Rezeptor transloziert wird, könnte

Aufschluss über die Frage liefern, welche Funktionen β -Arrestin am GPCR ohne dessen ligandeninduzierte Aktivierung vermittelt. Terrillon und Bouvier (2004) etablierten ein solches System mit β -Arrestin-2 und Vasopressinrezeptoren: Sie zeigten die ligandenunabhängige Internalisierung der Rezeptoren durch Heterodimerisierung von β -Arrestin-2 und dem Rezeptor. Darüberhinaus vermittelte die chemisch induzierte β -Arrestin-2-Translokation an die Plasmamembran eine ERK1/2-Aktivierung.

In der Arbeitsgruppe Oppermann wurden Heterodimerisierungsexperimente in Systemen mit β -Arrestin-2 und den Chemokinrezeptoren CXCR4 und CCR5 etabliert (Liebick 2015). In der vorliegenden Dissertationsarbeit wurden zelluläre Effekte einer chemisch induzierten Heterodimerisierung zweier Varianten der β -Arrestin-1-Isoform (WT und β -Arrestin-1R169E-Mutante) mit den beiden Chemokinrezeptoren untersucht.

Abbildung 5 stellt die Verwendung des beschriebenen Heterodimerisierungssystem zur Translokation eines β -Arrestins (POI) an einen GPCR (intrazelluläre Zielstruktur) dar.

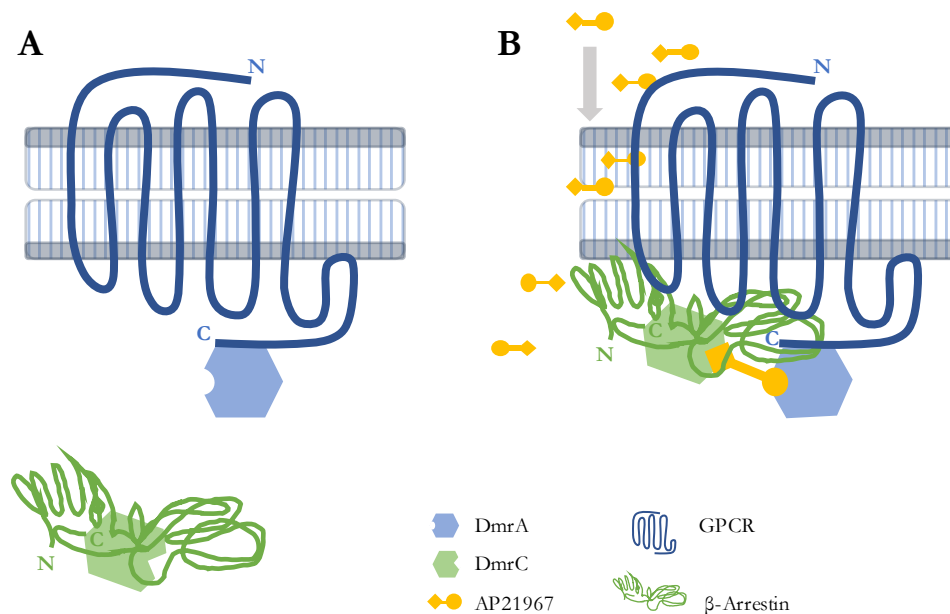


Abbildung 5: Schematische Darstellung des Heterodimerisierungssystems im zellulären Kontext mit GPCR und Arrestin. Ausgangszustand (A) und Effekt nach chemisch induzierter Heterodimerisierung (B). Zielstruktur für das intrazelluläre POI (β -Arrestin, grün) ist der GPCR (blau), hier zellmembranständig mit C-Domäne auf der intrazellulären Seite der Lipiddoppelschicht (grau) vorliegend. Die jeweils C-terminal angefügten Dimerisierungsdomänen (DmrA blau, DmrC grün) werden durch Zugabe von AP21967 (gelb) indirekt miteinander verbunden und damit die Zielstrukturen GPCR und β -Arrestin in räumliche Nähe zueinander gebracht. Basierend auf Takara Bio USA Inc. (2017).

1.5 Fragestellung

Die Trennung von G-Protein-abhängigen und β -Arrestin-abhängigen Effekten im Kontext der Signaltransduktion und Regulation G-Protein-gekoppelter Rezeptoren bleibt vorerst ein unvollständig verstandenes Thema der zellbiologischen und pharmakologischen Forschung. Die gezielte Rekrutierung von β -Arrestinen an GPCRs mittels chemisch induzierter Translokation erlaubt eine getrennte Analyse von Arrestin- und G-Protein-abhängigen zellulären Effekten.

Ziel dieser Arbeit war es, β -Arrestin-1-abhängige Effekte zu definieren, indem Desensibilisierung, Internalisierung, und Distribution von Chemokinrezeptoren sowie Signaltransduktion in Form von MAPK-Aktivierung nach chemisch induzierter Translokation des β -Arrestin-1 an die Chemokinrezeptoren CXCR4 und CCR5 untersucht werden sollten. In einem weiteren Teil der Arbeit sollte vergleichend die Auswirkung einer konstitutiv aktiven β -Arrestin-1R169E-Mutation auf Signaltransduktion sowie Internalisierungs- und Distributionsverhalten der Chemokinrezeptoren untersucht werden.

Zunächst sollten stabil transfizierte Zelllinien mit Koexpression eines Chemokinrezeptors und β -Arrestin-1 in Kombination mit einem chemisch induzierbaren Heterodimerisierungssystem etabliert werden, um Funktionsstudien zu folgenden Hypothesen durchzuführen:

Hypothese A:

β -Arrestin-1 vermittelt G-Protein-unabhängig Rezeptordesensibilisierung, Rezeptorinternalisierung und ERK1/2-Aktivierung.

Hypothese B:

Die konstitutiv aktive β -Arrestin-1R169E-Mutante weist gesteigerte Internalisierungs- und ERK1/2-Aktivierungspotentiale auf.

Die Auswirkungen der chemisch induzierten β -Arrestin-1-Translokation sollten im Kontext von isoformbedingten und rezeptorklassenspezifischen Effekten eingeordnet werden.

2 Material und Methoden

2.1 Geräte und Laborutensilien

Tabelle 2: Geräte

Gerätebezeichnung	Modell	Hersteller
Autoklav	Fedegari Autoclavi Spa	Technorama (Fernwald, DE)
Blot-Gerät	Pierce Fast Semi-Dry Blotter	Thermo Scientific (Waltham, USA)
Durchflusszytometer	BD FACS Calibur LSR II	Becton Dickinson (San Francisco, USA)
Elektrophoresekammer	Agagel Maxi	Biometra (Göttingen, DE)
	SE600	Hofer (San Francisco, USA)
Eismaschine	Ziegra Ice Maker	Ziegra (Hannover, DE)
Feinwaage	BP61	Sartorius (Göttingen, DE)
Immunoblotkamera	ChemoCam	Intas (Göttingen, DE)
Inkubator	HERAcell 150 Heraeus	Thermo Scientific
	T6060 Heraeus Unitron	
Hamiltonspritze	Microliter Syringe 50 µl	Hamilton (Darmstadt, DE)
Homogenisator	Homogenizer Potter S	Sartorius
Kühlgerät	Gastro line (+4°C)	Liebherr (Ochsenhausen, DE)
	Comfort (-20°C)	
	VIP series (-86°C)	Sanyo (München, DE)
Magnetrührer	Combimag Reo	IKA (Staufen, DE)
Mikroskop	Confocal Microscope TCS SP2	Leica Microsystems (Heidelberg, DE)
	Axiovert 40	Carl Zeiss (Jena, DE)
pH-Meter	pH Level 1	Inolab (Weilheim, DE)
Photometer	Nanodrop 2000c	Thermo Scientific
Pipette	Research (10 bis 1 000 µl)	Eppendorf (Hamburg, DE)
Pipettierhilfe	Pipetboy acu 2	Integra Bioscience (Zizers, CH)
Schüttelinkubator	Polymax 1040	Heidolph (Schwabach, DE)
Schwenkplatte	GFL 3005	GFL (Burgwedel, DE)
	WT 12	Biometra

Gerätebezeichnung	Modell	Hersteller
Spannungsquelle	ECPS 2000/300	Pfizer (New York, USA)
	EPS 301	Amersham Bioscience (Uppsala, SE)
Sterilbank	CleanAir DLF BSS4	Schrader (Göttingen, DE)
	Typ HeraSafe KS 12	Thermo Scientific
Thermocycler	Mastercycler epGradient	Eppendorf
Thermomixer	Thermomixer Compact	Eppendorf
	Thermomixer Comfort	
Ultraschall-Sonifikator	UW 2070 mit HD2070	Bandelin Electronics (Berlin, DE)
Ultrazentrifuge	Beckman Optima LE-80K	Beckman Coulter (Pasadena, USA)
Ultrazentrifugenrotor	Rotor Model SW50.1	Beckman Coulter
	Rotor Model SW65Ti	
Ultraviolett (UV)-Photodrucker	Digital graphik printer UP-D890	Sony (Minato, Japan)
UV-Transilluminator	Gellmager	Intas
Vortex-Mixer	Vortex-Genie 2TM	Scientific Industries (New York, USA)
Waagen	Laboratory LC 1200 S	Sartorius
	TF.612	
Wasserbad	W6	Schütt (Göttingen, DE)
	W13	
H ₂ O-Bidestgerät	Arium 611	Sartorius
Zählkammer	Neubauer Improved	Brand (Wertheim, DE)
Zentrifuge	5414D	Eppendorf
	5417R	
	Multifuge 3 S-R Heraeus	Schütt
	Megafuge 1.0 R	

Tabelle 3: Laborutensilien

Utensilbezeichnung	Typ	Hersteller
Blot-Filterpapier	MN 440 B	Machery & Nagel (Düren, DE)
Durchflusszytometer-röhrchen	Polystyrene tube 5 ml	Sarstedt (Nümbrecht, DE)
Filtersäule	PD-10	GE Healthcare (Fairfield, USA)
Kryokonservierungsröhrchen	121789	Greiner Bio-One (Frickenhausen, DE)

Utensilbezeichnung	Typ	Hersteller
Nitrozellulosemembran	Whatman Protran BA 83 0,2 µm	GE Healthcare
Parafilm	PM-996	Bemis (Neenah, USA)
Pasteurpipette	747715	Brand
Polymerasekettenreaktion (PCR)-Röhrchen	0,2 ml	Sarstedt
Petrischale	92 x 16 mm	Sarstedt
Pipettenspitze	1 bis 1 000 µl	Greiner Bio-One
Safe-Lock-Tube	0,5 bis 2 ml	Greiner Bio-One
Sterilfilter	Pore size (0,25 µm)	Sartorius
Zellkulturplatte	6 Kavitäten, Zellkultur	Greiner Bio-One
	24 Kavitäten, Zellkultur	Sarstedt
	96 Kavitäten, Zellkultur	
	96 Kavitäten, Flachboden	
	96 Kavitäten, V-Boden	
Zellkulturschale	10 cm	Greiner Bio-One
	14 cm	
Zellschaber	99002	TPP (Trasadingen, CH)
Zentrifugenröhrchen	Falcon® Tubes 15 ml	Greiner Bio-One
	Falcon® Tubes 50 ml	
	Ultra Clear 14 x 95 mm Ultra Clear 13 x 51 mm	Beckman Coulter

2.2 Chemikalien, Pufferlösungen und Zellkulturmedien

Tabelle 4: Chemikalien und biologische Substanzen

Chemikalienbezeichnung	Hersteller
A/C Heterodimerizer (AP21967)	Clontech (Mountain View, USA)
Acrylamid (2x)	Serva Electrophoresis (Heidelberg, DE)
	Carl Roth (Karlsruhe, DE)
Agar-Agar	Carl Roth
Ammoniumchlorid	Carl Roth
Ammoniumpersulfat	Carl Roth
Ampicillin-Natrium	Carl Roth
Bovines (bov) Serumalbumin (BSA)	Sigma Aldrich (Taufkirchen, DE)
Bromphenolblau	Carl Roth
Kalziumchlorid	Carl Roth

Chemikalienbezeichnung	Hersteller
CCL5	PeptoTech (Hamburg, DE)
CXCL12	PeptoTech
D-Glucose	Carl Roth
Desoxynukleotidtriphosphat-Mix (dNTP-Mix)	Sigma Aldrich
	Carl Roth
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Carl Roth
<i>Dulbecco's modified Eagle's medium</i> (DMEM)	Merck (Darmstadt, DE)
	Invitrogen (Carlsbad, USA)
Essigsäure	Carl Roth
Ethanol	Sigma Aldrich
Ethidiumbromid	Carl Roth
Ethylendiamintetraacetat (EDTA)	Carl Roth
FACSflow	Becton Dickinson
Fast Semi-Dry Transfer Puffer (10x)	Thermo Scientific
Fetales Kälberserum (FCS)	GE Healthcare
Geneticin (G418-Sulfat)	Calbiochem (Darmstadt, DE)
Glycerol (> 99 %)	Carl Roth
Glycin	Carl Roth
Hefeextrakt	Carl Roth
HEPES (N-2-Hydroxyethylpiperazin-N'-2-ethansulfonsäure)	Carl Roth
Igepal	Sigma Aldrich
Indo-1 AM	Invitrogen
Isopropanol (> 99,8 %)	Carl Roth
Kaliumchlorid	Carl Roth
Luminol-Natrium-Salz	Sigma Aldrich
Magnesiumchlorid	Carl Roth
Mowiol 4-88 Reagenz	Calbiochem
Natriumazid	Carl Roth
Natriumchlorid	Carl Roth
Natriumdihydrogenphosphat	Carl Roth
Natriumdodecylsulfat (SDS)	Carl Roth
N, N-Methylenbisacrylamid (2x)	Serva Electrophoresis
	Carl Roth
N, N-Morpholinoethansulfonsäure (MES)	Sigma Aldrich
Paraformaldehyd (PFA)	Sigma Aldrich
P-Coumarinsäure	Sigma Aldrich

Chemikalienbezeichnung	Hersteller
Phorbol-12-Myristat-13-Acetat (PMA)	Calbiochem
Piperazin-N, N'-bis(2-Ethansulfonsäure) (PIPES)	Sigma Aldrich
Pluronsäure F127 (5 %)	Thermo Scientific
Poly-L-Lysin-Lösung	Sigma Aldrich
Pertussistoxin (PTX)	Calbiochem
Saponin	KN Biomedicals (Aurora, USA)
Sucrose	Sigma Aldrich
Tetramethylethyldiamin (TEMED)	Carl Roth
Tris(Hydroxymethyl)-Aminomethan (TRIS)	Carl Roth
Trypanblau	Carl Roth
Trypsin-Lösung (10x)	Biochrom (Berlin, DE)
Trypton	Carl Roth
Tween 20	Carl Roth
Ultrapure Agarose	Invitrogen
β -Mercaptoethanol	Merck

Tabelle 5: Zusammensetzung von Lösungen und Pufferlösungen

Lösungsbezeichnung	Menge	Inhaltsstoffe
Acryl-Bisacrylamid-Lösung	58,4 g 1,6 g ad 200 ml	Acrylamid (2x) N, N'-Methylenbisacrylamid (2x) doppelt destilliertes H ₂ O (ddH ₂ O)
CaCl ₂ (2,5 M)	18,38 g ad 50 ml	CaCl ₂ * H ₂ O ddH ₂ O Zwischenlagerung bei +4°C Dauerlagerung bei -20°C
<i>Enhanced-chemoluminescence</i> - (ECL)-Lösung	4 ml 0,4 ml 1,2 μ l	SA-Lösung SB-Lösung H ₂ O ₂ (35 %)
<i>Fluorescence-activated-cell-sorter</i> (FACS)-Puffer	490 ml 2,5 ml 7,5 ml	PBS-Lösung (1x) NaN ₃ (20 %) FCS Lagerung bei +4°C
Glycerol (10 % v/v)	10 ml 90 ml	Glycerol (> 99 %) PBS-Lösung (1x), autoklaviert Sterilfiltration

Lösungsbezeichnung	Menge	Inhaltsstoffe
<i>Hepes-buffered-saline</i> (HBS)-Lösung (2x)	2,8 ml	NaCl (2 M)
	2 ml	HEPES (0,5 M)
	30 µl	Na ₂ HPO ₄ (1 M)
	ad 20 ml	ddH ₂ O
	Anpassung pH 7,1	
HEPES (1 M)	11,9 g	HEPES
	ad 50 ml	ddH ₂ O
	Anpassung pH 7,0	
	Lagerung in Dunkelheit	
Indo-1-AM-Lösung (1 mM)	50 µg	Indo-1 AM
	ad 50 µl	H ₂ O-freies DMSO
Indo-1 AM-Pluronsäure-F127-Mix	0,7 µl	Indo-1 AM (1 mM)
	2,1 µl	Pluronsäure F127 (5 %)
Krebs-Ringer-Lösung	4,1 g	NaCl
	150 mg	KCl
	100 mg	MgCl ₂ * 6 H ₂ O
	0,9 g	D-Glucose
	1,2 g	HEPES
	74 mg	CaCl ₂ * 2 H ₂ O
	ad 500 ml	ddH ₂ O
	Anpassung pH 7,4	
	Lagerung bei +4°C	
Laemmli-Puffer (10x)	720 g	Glycin
	50 g	SDS
	150 g	TRIS
	ad 5 000 ml	ddH ₂ O
	Lagerung bei +4°C	
Lysierungspuffer	25 ml	TRIS (1 M; pH 7,0)
	4,4 g	NaCl
	12,5 g	EDTA-Dipotassiumsalz * 3 H ₂ O (0,2 M; pH 8,0)
	5,0 ml	Igepal
	25 ml	SDS (10 %)
	ad 500 ml	ddH ₂ O
Membranpuffer	1,5 g	PIPES
	3,7 g	KCl
	90 mg	NaCl
	360 mg	MgCl ₂ * 6 H ₂ O
	ad 500 ml	ddH ₂ O
	Anpassung pH 7,0	

Lösungsbezeichnung	Menge	Inhaltsstoffe
MES-Puffer (1 M)	10,66 g ad 50 ml	MES +H ₂ O ddH ₂ O
	Lagerung bei Raumtemperatur (RT) in Dunkelheit	
<i>Mounting</i> -Medium	2,4 g 6,0 g 6 ml 12 ml	Mowiol 4-88 Glycerol (> 99 %) ddH ₂ O TRIS (0,2 M; pH 8,5)
	Mowiol und Glycerol verrühren (1 h; RT) ddH ₂ O (2 h; RT) und TRIS unterrühren (50°C) Zentrifugation (5 000 x g, 15 min) Lagerung bei -20°C	
Natriumacetat (3 M)	20,4 g ad 50 ml	TRIS ddH ₂ O
NH ₄ Cl-Lösung	1,3 g ad 500 ml	NH ₄ Cl ddH ₂ O
	Sterilfiltration	
<i>Phosphate-buffered-saline</i> (PBS)- Stammlösung (10x)	323,3 g 48 ml ad 2 500 ml	Na ₂ HPO ₄ * 12 H ₂ O Na ₂ HPO ₄ * H ₂ O ddH ₂ O
	Anpassung pH 7,2 – 7,4	
PBS-Lösung (1x)	7,2 g 18 ml ad 1 000 ml	NaCl PBS-Stammlösung (10x) ddH ₂ O
	Anpassung pH 7,3 Autoklavierung (121°C; 20 min) Lagerung bei +4°C	
Sammelgel	1,33 ml 2,5 ml 0,1 ml 2,5 mg 6,1 ml 10 µg	Acryl-Bisacrylamid-Lösung Sammelgelpuffer SDS (10 %) Ammoniumpersulfat ddH ₂ O TEMED
Sammelgelpuffer	30,3 g ad 500 ml	TRIS ddH ₂ O
	Anpassung pH 6,8	
Saponin-Gelatine-Lösung	0,1 g 0,2 g ad 100 ml	Saponin Gelatine PBS
	unter Erhitzen auflösen	

Lösungsbezeichnung	Menge	Inhaltsstoffe
<i>Solution A</i> (SA)	250 mg ad 1 000 ml	Luminol TRIS (0,1 M)
	Anpassung pH 8,6 Lagerung bei +4°C	
<i>Solution B</i> (SB)	12 mg ad 10 ml	P-Coumarinsäure DMSO
	Lagerung bei RT in Dunkelheit	
<i>Stripping</i> -Puffer	20 g 62,5 ml 7 ml ad 1 000 ml	SDS TRIS (pH 6,7) β-Mercaptoethanol ddH ₂ O
TRIS- <i>buffered-saline</i> (TBS)- Puffer (10x)	80 g 24 g ad 1 000 ml	NaCl TRIS ddH ₂ O
	Anpassung pH 7,6	
TRIS-Acetat-EDTA (TAE)-Puffer (50x)	242 g 57,1 ml 18,6 g ad 1 000 ml	TRIS Essigsäure (100%) EDTA-Dipotassiumsalz * 3 H ₂ O ddH ₂ O
	Anpassung pH 8,2 – 8,4	
TRIS- <i>buffered-saline</i> -Tween (TBS-T) (1x)	100 ml 1 ml ad 1 000 ml	TBS (10x) Tween 20 ddH ₂ O
	<i>Treatment</i> -Puffer (2x)	12,5 ml 20 ml 10 ml 5 ml
<i>Treatment</i> -Puffer mit β-Mercaptoethanol (1x)	450 µl	<i>Treatment</i> -Puffer (2x)
	100 µl	β-Mercaptoethanol
	450 µl	ddH ₂ O
Trenngel	10 ml	Acryl-Bisacrylamid-Lösung
	7,5 ml	Trenngelpuffer
	0,3 ml	SDS (10 %)
	5 mg	Ammoniumpersulfat
	12 ml	ddH ₂ O
	20 µl	TEMED
Trenngelpuffer	90,9 g ad 500 ml	TRIS ddH ₂ O
	Anpassung pH 8,8	
Trypan-Blau-Lösung (0,5 %)	0,5 g ad 100 ml	Trypan-Blau PBS-Lösung (1x)

Lösungsbezeichnung	Menge	Inhaltsstoffe
Trypsin-EDTA-Lösung	100 ml	Trypsin-EDTA (0,05 %/0,02 %)
	400 ml	ddH ₂ O, autoklaviert
	Lagerung bei +4°C	

Tabelle 6: Zusammensetzung von Zellkulturmedien

Medienbezeichnung	Menge	Stoff
BSA-HEPES-Medium (BM)	0,1 g	BSA
	0,5 ml	HEPES (1 M; pH 7,0)
	ad 50 ml	DMEM
Anpassung pH 7,4		
DMEM	500 ml	DMEM
		± FCS
		± Penicillin, Streptomycin, Geneticin
Ethansulfonsäuremedium (EM)	0,1 g	BSA
	0,5 ml	MES-Puffer (1 M)
	ad 50 ml	DMEM
Anpassung pH 2,4		
Einfriermedium für HEK-293-Zellen	45 ml	FCS
	5 ml	DMSO
	Lagerung bei +4°C	
Einfriermedium für <i>Escherichia coli</i> (<i>E. coli</i>)	800 µl	Zellsuspension (in <i>Lysogeny-broth</i> -Medium)
	200 µl	Glycerol (> 99 %)
<i>Lysogeny-broth</i> (LB)-Medium	10 g	Trypton
	5 g	Hefeextrakt
	5 g	NaCl
	1 000 ml	ddH ₂ O
	Anpassung pH 7,0	
Autoklavierung (121°C, 20 min)		
Zur Herstellung von Agar-Nährböden zusätzlich 15 g Agar		

Tabelle 7: Antibiotika

Antibiotikum	Konzentration	Hersteller
Ampicillin	100 µg/ml	Sigma Aldrich
Geneticin	600 µg/ml	Calbiochem
	1 200 µg/ml	
Penicillin + Streptomycin	100 [U/ml] + 100 µg/ml	Merck

2.3 Zelllinien

E. coli des Stammes 'TOP10F' wurden für die Amplifizierung von Plasmid-Desoxyribonukleinsäure (DNA) verwendet. Erworben wurde der Bakterienstamm mit dem Genotyp $F' \{lacI^q, Tn10(Tet^R)\} mcrA \Delta(mrr-bsdRMS-mcrBC) \Phi80lacZ\Delta M15 \Delta lacX74 recA1 araD139 \Delta(ara-leu)7697 galU galK rpsL endA1 nupG$ von der Firma Invitrogen.

Humane embryonale Nierenzellen (HEK-Zellen) wurden stabil mit humanen Chemokinrezeptoren und bovinem β -Arrestin-1 jeweils in Kombination mit Dimerisierungsdomänen eines kommerziellen Heterodimerisierungssystem transfiziert, um die Funktionsstudien dieser Arbeit durchzuführen. Die HEK-293-Zellen wurden von der Deutschen Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH (Braunschweig, D) erworben.

2.4 Zelltransfektion

Tabelle 8: DNA-Inserts

Insert-Bezeichnung	Herkunft
CXCR4 human	AG Oppermann
CCR5 human	AG Oppermann
β -Arrestin-1-GFP (<i>green fluorescent protein</i>) bov	AG Oppermann
β -Arrestin-1R169E bov	Zur Verfügung gestellt von J. L. Benovic

Tabelle 9: Plasmide

Bezeichnung	Größe (bp)	Resistenzgen	Inserts	Hersteller
pEF1/ <i>myc</i> -HisA	6165	Ampicillin + Geneticin	CCR5-DmrA CXCR4-DmrA	Invitrogen
pHet-1	5329	Ampicillin	bov β -Arr-1 bov β -Arr-1R169E	Clontech
pHet-Nuc1	5410	Ampicillin	human CCR5 human CXCR4	Clontech

Tabelle 10: DNA-Oligonukleotide

Bezeichnung	Sequenz	Verwendung
<i>Xba</i> I-bov β -Arr-1 for	CCGCGCTCTAGAGGCGAC AAAGGGACGCGGGTG	Klonierung von β -Arr-1 bzw. β -Arr-1R169E in pHet-1
Bov β -Arr-1- <i>Spe</i> I rev	CGGCGCACTAGTTCTGTC CTTGAGCCGCGGAGA	Klonierung von β -Arr-1 bzw. β -Arr-1R169E in pHet-1
DmrC- <i>Not</i> I rev	GCGGCGCGCGGCCGCCTA CTTTGAGATTTCGTGCGAA	Sequenzierung
UTR for	GGATCTTGGTGGCGTGAA ACTC	Sequenzierung

Sämtliche Oligonukleotide wurden von der Firma IBA (Göttingen) hergestellt.

Tabelle 11: DNA-Aufbereitungskits

Produktbezeichnung	Hersteller
NucleoBond PC 500	Machery & Nagel
NucleoSpin Plasmid	Machery & Nagel
NucleoSpin Gel and PCR Clean-up	Machery & Nagel
Rapid DNA Ligation Kit	Thermo Scientific

Tabelle 12: Enzyme

Enzymbezeichnung	Hersteller
Alkaline Phosphatase	New England Biolabs (Frankfurt am Main, DE)
Phusion® DNA Polymerase	New England Biolabs
REDTaq® DNA Polymerase	Sigma Aldrich
Restriktionsenzyme	New England Biolabs
<i>Kpn</i> I-HF (<i>high fidelity</i>)	
<i>Mlu</i> I	
<i>Not</i> I-HF	
<i>Sca</i> I-HF	
<i>Spe</i> I	
<i>Xba</i> I	

2.5 Antikörper zum Proteinnachweis

Tabelle 13: Primärantikörper

Bezeichnung, Klon (K)	Herkunft	Konjugat	Assay	Hersteller
Anti-HA, 3F10	Ratte	– Biotin	WB IF	Roche (Basel, CH)
Anti-human-CCR5, T21/8	Maus	– Phycoerythrin (PE)	IF FACS	Biologend (San Diego, USA)
Anti-human-CXCR4, 12G5	Maus	– PE	IF FACS	R&D Systems (Minneapolis, USA)
Anti-Maus-Immunglobulin G (IgG), K14D4	Ratte	–	IF	AG Oppermann (Göttingen, DE)
Anti-p44/p42 MAPK, 137F5	Kaninchen	–	WB	Cell Signalling (Cambridge, GB)
Anti-pan-Cadherin, CH-19	Maus	–	WB	Santa Cruz Biotechnology (Dallas, USA)
Anti-phospho-p44/p42 MAPK, D13.14.4E	Kaninchen	–	WB	Cell Signalling
Anti- β -Aktin, 13E5	Kaninchen	–	WB	Cell Signalling
Anti-Ratte- β -Arrestin-1/2, 21B1	Maus	–	WB	AG Oppermann

Tabelle 14: Sekundärantikörper

Bezeichnung	Herkunft	Konjugat	Assay	Hersteller
Anti-Maus IgG	Ziege	Fluoreszein- isothiozyanat (FITC)	IF	Dako (Glostrup, DK)
				Jackson Immunoresearch (West Grove, USA)
Anti-Maus IgG	Kaninchen	<i>horseradish peroxidase</i> (HRP)	WB	Dako
Anti-Kaninchen IgG	Schwein	HRP	WB	Dako
Anti-Kaninchen IgG	Ziege	HRP	WB	Jackson Immunoresearch
Anti-Ratte IgG	Ziege	HRP	WB	Jackson Immunoresearch
Streptavidin	re-kombinant	Alexa Fluor $\text{\textcircled{R}}$ 647	IF	Jackson Immunoresearch

2.6 Längen- und Gewichtsmarkierungen

Tabelle 15: DNA-Längen- und Proteingewichtsmarkierung

Verwendungsbereich	Produktbezeichnung	Hersteller
Protein-Molekulargewichts-Marker für SDS-PAGE	Pierce Prestained Protein Molecular Weight Marker	Thermo Scientific
Basenpaar-Längenstandard für Agarosegelelektrophorese	GeneRuler 1 kb Plus DNA Ladder	Thermo Scientific

2.7 Software

Tabelle 16: Verwendete Softwareprogramme

Softwarebezeichnung	Verwendungsbereich	Hersteller
Adobe Photoshop CS 5	Bildbearbeitung	Adobe (San Jose, USA)
CellQuestPro	Durchflusszytometrische Aufzeichnung	Becton Dickinson
Clone Manager Professional 8	DNA-Analyse	Sci-Ed (Cary, USA)
FlowJo 7.6.5	Durchflusszytometrische Analyse	Treestar (Ashland, USA)
GENtle	Primer-Design und DNA-Analyse	Markus Manske (DE)
ImageJ	Quantifizierung und Datenanalyse von Bildern	National Institutes of Health (USA)
Leica microscope software	Immunfluoreszenzbilder	Leica Microsystems
Paint.net3.5	Bildbearbeitung	Rick Brewster (USA)
PhotoFiltre 6.4	Bildbearbeitung	Antonio Da Cruz (FRA)
Sigma Plot 12	Statistische Datenanalyse und Graphiken	Systat Software (San Jose, USA)
Microsoft® Word für Mac (Version 16.43)	Verschriftlichung	Microsoft (Redmond, USA)
Microsoft® PowerPoint für Mac (Version 16.43)	Abbildungserstellung und -bearbeitung	Microsoft
Zotero (Version 5.0.82)	Zitation	Center for History and New Media (Fairfax, USA)

2.8 Molekularbiologie

Zur Etablierung mammaler Expressionsvektoren wurde komplementäre DNA (cDNA) mittels Polymerasekettenreaktion (PCR) amplifiziert und anschließend gereinigt. Nach Ligation selbiger in zuvor linearisierte Vektorsysteme folgte die DNA-Amplifikation in Form von Plasmiden in *E. coli*. Diese DNA-Amplifikate wurden nach erneuter Aufreinigung und Linearisierung zur Transfektion von HEK-293-Zellen verwendet.

2.8.1 Polymerasekettenreaktion

Zur Amplifizierung von DNA mittels PCR wurde die Phusion-DNA-Polymerase verwendet. Die PCR-Ansätze enthielten dabei die in Tabelle 17 aufgeführten Bestandteile. Jeder Reaktionsansatz wurde in PCR-Cups (0,5 ml) gefüllt und durchlief im PCR-Cycler 30 Zyklen bestehend aus Denaturierung, Anlagerung und Extension.

Tabelle 17: PCR-Ansatz und Cyclerprotokoll für die Amplifizierung von cDNA

Volumen [µl]	Inhaltsstoff	Programmpunkt	Temperatur [C°]	Dauer [sek]	
10 µl	HF Phusion Puffer (5x)	Deckel	100		
1 µl	dNTP-Mix (10 mM)	Initiale Denaturierung	98	30	
2,5 µl	<i>forward</i> (for) Primer (0,05 µM)	Denaturierung	98	10	30 Zyklen
2,5 µl	<i>reverse</i> (rev) Primer (0,05 µM)	Anlagerung	59	30	
5-15 ng/µl	cDNA-Template	Extension	72	30/kb	
0,5 µl	Phusion-DNA-Polymerase	Finale Extension	72	300	
ad 50 µl	ddH ₂ O	Halt	10		

2.8.2 Agarosegelelektrophorese

In der Agarosegelelektrophorese wurden DNA-Fragmente ihrer Größe nach aufgetrennt. Agarose wurde dazu in TAE-Puffer (1x) gelöst, sodass eine 1 %- bzw. 1,5 %-Lösung (w/v) entstand. Zu DNA-Visualisierungszwecken enthielt die Lösung Ethidiumbromid in einer Endkonzentration von 0,5 µg/ml. Die bei 60°C verflüssigte Agarose wurde in die Form gegossen und ein Kamm eingesteckt. Die Polymerisation war bei Raumtemperatur nach 30 min abgeschlossen. Das Gel wurde in die Elektrophoresekammer gelegt und mit TAE-Puffer übergossen. Die mit Ladepuffer versetzten Proben wurden mit einer Pipette in die Kammern gefüllt. Der Gellauf erfolgte bei 120 V und 220 mA für 60 min. Die DNA wurde nach erfolgter Auftrennung im Gel unter ultraviolettem Licht (UV-Licht) visualisiert.

2.8.3 DNA-Aufreinigung aus PCR-Ansätzen

DNA aus PCR-Ansätzen wurde mit dem „NucleoSpin® Gel and PCR Clean-up“ des Herstellers Machery & Nagel nach dessen Protokollmaßnahmen gereinigt. Die DNA wurde daraufhin in 30 µl ddH₂O resuspendiert und die Konzentration mittels NanoDrop photometrisch bestimmt.

2.8.4 DNA-Verdau und DNA-Dephosphorylierung

Zur späteren Ligation von DNA-Fragmenten wurde Doppelstrang-DNA an definierten Nukleinsäuresequenzen mit Restriktionsenzymen (Tabelle 12) geschnitten. Diese Endonukleasen schnitten den DNA-Doppelstrang so, dass jeweils ein Phosphat- und ein Hydroxydionrest entstanden. Die Mengen von DNA, Restriktionsenzymen und Puffer richteten sich nach den Herstellerangaben. Die Inkubation erfolgte für 3 h bei 37°C und 350 Umdrehungen pro Minute (rpm) im Thermomixer. Zur Überprüfung des DNA-Verdaus wurden verdaute und unverdaute Proben mittels Agarosegelelektrophorese aufgetrennt (2.8.2).

Um verdaute Vektoren in offener Form zu stabilisieren und eine Religation zu verhindern, wurden Phosphatreste der äußeren Nukleobasen mit alkalischer Phosphatase entfernt. Die zur späteren Ligation benötigten Phosphatreste befanden sich an den Insertionssequenzen (Chemokinrezeptor oder β-Arrestin).

2.8.5 DNA-Ligation

Zur Amplifikation in kompetenten *E. coli* und zur späteren Expression in mammalen Zelllinien wurde verdaute Chemokinrezeptor- bzw. β-Arrestin-DNA mit den linearisierten Vektoren pEF1/*myc*-HisA bzw. pHet-1 (Tabelle 9) unter Verwendung des „Rapid DNA Ligation Kit“ ligiert. Dazu wurden beide Komponenten in einem molaren Verhältnis von 1:3 (Vektor:Chemokinrezeptor-DNA oder β-Arrestin-DNA) gemischt. Dabei betrug das Gesamtvolumen pro Ansatz 20 µl. Die Ligation wurde durch die T4-Ligase katalysiert (3 h, RT). Mit einer Probe ohne DNA-Insert wurde die Religationsrate des linearisierten Vektors überprüft. 10 µl des Ligationsansatzes wurden unmittelbar für die Transformation von *E. coli* verwendet (2.8.6).

2.8.6 Hitzeschocktransformation kompetenter *E. coli*

Das Plasmid, bestehend aus einem Vektor mit inserierter Chemokinrezeptor- bzw. β-Arrestin-DNA, wurde in kompetente *E. coli* (Stamm Top10F) transformiert. Dazu wurden *E. coli* auf Eis ruhend aufgetaut und anschließend mit 2 µl der ligierten Plasmid-DNA aus dem Ligationsansatz behutsam vermischt und für weitere 20 min auf Eis inkubiert. Der Hitzeschock erfolgte für 90 sek bei 42°C im Thermomixer. Danach wurde der Ansatz auf Eis abgekühlt (2 min) bevor er mit 500 µl LB-Medium vermischt und inkubiert wurde (37°C, 60 min). Auf vorbereitete LB-Agarplatten wurden 25 µl, 50 µl bzw.

100 µl des Ansatzes ausplattiert. Das Restvolumen des Ansatzes wurde zentrifugiert (1400 x g), das Pellet in 200 µl LB-Medium resuspendiert und ebenfalls auf einer LB-Agar-Platte ausplattiert. Sämtliche Agarplatten inkubierten über Nacht bei 37°C.

2.8.7 Colony-PCR transformierter *E. coli*

Die Colony-PCR diente dem Expressionsnachweis transformierter Plasmide in *E. coli*. Dazu wurden solitär wachsende Kolonien von einer Agarplatte mit Hilfe von Pipettenspitzen auf sogenannte „Master“-Agarplatten ausgestrichen und für mindestens 8 h bei 37°C inkubiert. Das restliche *E. coli*-Material an der Pipettenspitze wurde jeweils nach dem Ausstreichvorgang in 50 µl ddH₂O resuspendiert und 5 min bei 95°C erhitzt. Die Amplifizierung der darin enthaltenen DNA mittels REDTaq® DNA-Polymerase erfolgte nach dem in Tabelle 18 aufgeführten Protokoll. Das Programm durchlief 30 Zyklen bestehend aus Denaturierung, Anlagerung und Extension.

Tabelle 18: Colony-PCR-Ansatz und Cyclerprotokoll für die Plasmid-DNA aus *E. coli*

Volumen [µl]	Inhaltsstoff	Programmpunkt	Temperatur [C°]	Dauer [min]	
2,5	REDTaq Puffer (10x)	Deckel	100		
0,5	dNTP-Mix (10 mM)	Initiale Denaturierung	94	1	
1,25	for Primer (0,05 µM)	Denaturierung	94	1	30 Zyklen
1,25	rev Primer (0,05 µM)	Anlagerung	59	2	
1,25	REDTaq® DNA-Polymerase	Extension	72	1/kb	
10	DNA	Finale Extension	72	5	
ad 25	ddH ₂ O	Halt	10		

10 µl eines jeden amplifizierten PCR-Ansatzes wurden in eine Tasche eines Agarosegels (1,5 %) gefüllt. Nach elektrophoretischer Auftrennung wurde amplifizierte DNA unter UV-Licht ausgewertet (2.8.2). Positive Klone wurden von der Master-Agarplatte in 8 ml LB-Medium mit 0,8 mg Ampicillin überführt und über Nacht angezogen (37°C, 210 rpm). Am Folgetag wurde die DNA extrahiert und verdaut (2.8.8).

Zur längerfristigen Lagerung wurden transformierte *E. coli* in Einfriermedium mit Glycerol bei -80°C eingefroren.

2.8.8 Plasmidextraktion und Plasmidaufreinigung aus *E. coli*

Zur Aufreinigung der Plasmid-DNA aus *E. coli* wurden kommerzielle Kits des Herstellers Machery & Nagel verwendet. „NucleoBond® PC 500“ wurde zu Transfektionszwecken, „NucleoSpin® Plasmid“ zu Sequenzierungszwecken verwendet. Die Aufreinigung der

extrahierten Plasmid-DNA erfolgte nach Herstellerangaben und die gereinigte DNA wurde in ddH₂O (30 µl bis 300 µl) resuspendiert. Die DNA-Konzentration wurde photometrisch mittels NanoDrop bestimmt.

Ein erneuter Kontrollverdau mit Auftrennung im Agarosegel zeigte, dass sowohl der Vektor als auch das Insert (Chemokinrezeptor oder β-Arrestin) transformiert wurden. Zur Bestätigung der korrekten Ligation des Vektors und des DNA-Inserts wurde die aufgereinigte DNA verdaut (2.8.4) und gelelektrophoretisch aufgetrennt (2.8.2).

2.8.9 DNA-Sequenzierung

Die Sequence Laboratories Göttingen GmbH (SeqLab) wurde mit der Sequenzierung der Plasmid-DNA beauftragt. DNA aus *E. coli* wurde mittels NucleoSpin® Plasmid gereinigt, um Proben mit 2 000 ng DNA und 30 pmol Primer in einem Gesamtvolumen von 15 µl ddH₂O zu versenden.

2.9 HEK-293-Zellen

2.9.1 Zellkultivierung

Zur Kultivierung von HEK-293-Zellen wurden Zellkulturschalen und Mikrotiterplatten verschiedener Größe verwendet. Die Zellen wurden bei 37°C in befeuchteter CO₂-Atmosphäre (5 %) kultiviert. Dem eingesetzten *Dulbecco's modified Eagle's medium* (DMEM) wurde Penicillin (100 U/ml), Streptomycin (100 µg/ml) sowie hitzeinaktiviertes fetales Kälberserum (10 %) zugefügt.

Zur Ablösung adhärent wachsender HEK-293-Zellen wurden diese mit PBS-Lösung (1x) gewaschen und mit Trypsin-EDTA-Lösung (1 %) vom Boden der Zellkulturschale gelöst. Zur Neutralisierung der Trypsin-EDTA-Lösung wurde DMEM benutzt. Sämtliche Lösungen und DMEM wurden vor der Verwendung auf 37°C erwärmt. Die abgelösten Zellen wurden bei 1 200 rpm für 5 min zentrifugiert, um den Überstand mit Hilfe einer elektrischen Pipettierhilfe abzunehmen und zu verwerfen.

2.9.2 Selektionsmedium

Geneticin wurde zur Selektion transfizierter Zellen verwendet. Direkt nach einer Transfektion mit pEF1/*myc*-HisA wurde Geneticin in einer Konzentration von 1 200 mg/ml eingesetzt. Für Erhaltungskulturen wurde die Konzentration auf 600 µg/ml gesenkt.

2.9.3 Lagerung und Rekultivierung

Etablierte Zelllinien wurden bei -80°C zwischengelagert und zur endgültigen Lagerung in flüssigen Stickstoff überführt. Dazu wurden die in Kultur befindlichen Zellen mit PBS

gewaschen und mit Trypsin-EDTA abgelöst sowie das Zellpellet der abzentrifugierten Kulturmedium-Zell-Suspension im Einfriermedium resuspendiert. Für die Lagerung wurde die Zellsuspension in vorgekühlte Kryotubes überführt.

Tiefgefrorene Zellen wurden zur Rekultivierung im Wasserbad bei 37°C aufgetaut und zügig in 10 ml DMEM überführt. Anschließend wurde diese Zellsuspension zur Reinigung zentrifugiert (2 700 x g, 5 min) und der Überstand verworfen. Die Zellen wurden erneut im Zellkulturmedium suspendiert und kultiviert.

2.9.4 Zellzählung

Gewaschene, abgelöste und anschließend abzentrifugierte Zellen wurden in einer kleinen Menge Medium (2 bis 10 ml) resuspendiert. Von dieser sorgfältig durchmischten Zellsuspension wurden 10 µl entnommen und mit 90 µl Trypan-Blau-Lösung (0,5 %) gemischt. Von der gefärbten Zellsuspension wurden 10 µl in eine Neubauer-Zählkammer pipettiert und unter einem Lichtmikroskop gezählt.

2.10 Zelltransfektion

2.10.1 Plasmid-DNA-Linearisierung und DNA-Phenol-Fällung

Für den Einbau in das Genom von HEK-293-Zellen mussten die Plasmide linearisiert vorliegen (2.8.4). Die Schnittstellen der ausgewählten Restriktionsenzyme befanden sich außerhalb der für die Proteinexpression relevanten Regionen.

ScaI wurde zur Linearisierung von pEF1/*myc*-HisA-CXCR4-DmrA sowie von pEF1/*myc*-HisA-CCR5-DmrA verwendet, *MluI* zur Linearisierung von pHet-1-β-Arrestin-1 sowie für pHet-1-β-Arrestin-1R169E. Die Ansätze erfolgten in Konzentrationen gemäß des Herstellerprotokolls.

Linearisierte Plasmid-DNA wurde mittels Phenol-Fällung gereinigt. Dazu wurde Phenol:Chloroform:Isoamylalkohol (25:24:1) isovolumetrisch zum DNA-Ansatz gegeben. Nach Zentrifugation (12 600 x g, 15 sek) wurde die obere Phase mit der darin enthaltenen DNA mittels Pipette abgenommen und in ein verschließbares *tube* gefüllt. Natrium-Acetat (3 M, 1/10 des Ansatzvolumens) und Ethanol (96 %, zwei- bis dreifaches Ansatzvolumen) wurden hinzugegeben. Der Ansatz inkubierte zunächst für 30 min bei -20°C, anschließend für weitere 20 min auf Eis. Die Lösung wurde zentrifugiert (4°C, 6 000 rpm, 5 min), der Überstand abgenommen und das Pellet mit 100 µl Ethanol gewaschen. Nach erneuter Zentrifugation wurde der Überstand abgenommen und die DNA in 50 µl ddH₂O resuspendiert. Der DNA-Gehalt wurde photometrisch mit dem NanoDrop bestimmt.

2.10.2 Stabile Kotransfektion von HEK-293-Zellen mittels Kalziumphosphat-Präzipitation

Eine Zelllinie sollte eine Chemokinrezeptorart kombiniert mit einer β -Arrestin-1-Variante exprimieren. Dafür wurden HEK-293-Zellen mit der im pHet-1-Vektor befindlichen β -Arrestin-1-DNA oder β -Arrestin-1R169E-DNA in Kombination mit der im pEF1/*myc*-HisA-Vektor befindlichen CCR5-DmrA-DNA oder CXCR4-DmrA-DNA kotransfiziert. Die in Kalziumphosphat-Präzipitaten eingeschlossenen linearisierten Plasmide wurden von den Zellen aufgenommen und in eine zufällige Position ihres Genoms eingebaut.

Am Vortag der Transfektion wurden Zellkulturschalen (10 cm) mit jeweils 6×10^5 Zellen vorbereitet. Das Zellkulturmedium DMEM der über Nacht inkubierten adhären Zellen wurde vier Stunden vor der Transfektion gegen DMEM (Hersteller Invitrogen) ausgewechselt. Pro Zellkulturschale wurden 5 μ g DNA des pEF1/*myc*-HisA-Chemokinrezeptor-DmrA-Plasmids und 5 μ g des pHet-1- β -Arrestin-1-Plasmids bzw. des pHet-1- β -Arrestin-1R169E-Plasmids kotransfiziert. Die DNA wurde zunächst mit 50 μ l CaCl_2 (2,5 M) versetzt und anschließend mit ddH₂O auf ein Gesamtvolumen von 500 μ l aufgefüllt. Im nächsten Schritt wurden 500 μ l der HBS-Lösung (2x) tröpfchenweise hinzugegeben. Direkt im Anschluss wurde die Kalziumphosphat-DNA-Lösung tröpfchenweise gleichmäßig auf die HEK-293-Zellen in den Zellkulturschalen verteilt. Zur Steigerung der DNA-Aufnahme wurden die Zellen 24 h nach der Transfektion mit Glycerol behandelt. Dazu wurde das Medium abgenommen und 900 μ l Glycerol (10 %) vorsichtig durch Schwenken der Zellkulturschale auf den Zellen verteilt. Nach einer Minute wurde das Glycerol abgesaugt, die Kulturschalen mit DMEM gespült und frisches DMEM auf die Zellen gegeben. Ab dem Folgetag wurde das Selektionsmedium mit Geneticin zur weiteren Zellkultivierung eingesetzt (2.9.1). Die nach 10 bis 14 Tagen sichtbar wachsenden Kolonien wurden einzeln in Mikrotiterplatten mit 96 Kavitäten überführt. Nach einigen Tagen der Zellproliferation wurden die Kolonien in entsprechend größeren Zellkulturschalen angezüchtet.

2.10.3 Transiente Transfektion von HEK-293-Zellen

Analog zur stabilen Transfektion per Kalziumphosphat-Präzipitation (2.10.2) wurden HEK-293-Zellen transient transfiziert. Für die transiente Transfektion wurden 3×10^5 Zellen in Kulturschalen mittlerer Größe verwendet. Die eingesetzte DNA-Menge betrug 3,3 μ g pro Ansatz. Die zu transfizierende DNA wurde in 16,6 μ l CaCl_2 (2,5 M) resuspendiert und der Ansatz wurde mit ddH₂O auf ein Gesamtvolumen von 166 μ l aufgefüllt. Die Lösung wurde tröpfchenweise mit 166 μ l HBS-Lösung (2x) vermischt und auf den Zellkulturschalen verteilt. Im Rahmen der transienten Transfektion wurden weder Zellkolonien separiert noch Selektionsmedien verwendet, sondern ab dem zweiten Tag mit der Gesamtmenge an Zellen gearbeitet.

2.10.4 Subklonierung

Stabil transfizierte HEK-293-Zelllinien wurden subkloniert, um eine homogene Expression der transfizierten Plasmide zu gewährleisten. Dazu wurden $1,3 \times 10^4$ HEK-293-Zellen in drei Schritten auf 270; 65 bzw. 21 Zellen pro Milliliter DMEM verdünnt. Nach dem letzten Verdünnungsschritt wurde die Zellsuspension tröpfchenweise in die Kavitäten von Mikrotiterplatten verteilt und mit 100 μ l DMEM aufgefüllt. Es ergab sich eine kalkulierte Endkonzentration von 0,8 Zellen pro Kavität. Singulär wachsende Subklone wurden hinsichtlich ihrer Rezeptorexpression durchflusszytometrisch analysiert (2.12.2).

2.11 Proteinanalyse

2.11.1 Ultrazentrifugation

Zur Auftrennung von der Membran- und der Zytosolfraktion wurden Zellysate über einen Sucrosegradienten ultrazentrifugiert. Stabil transfizierte HEK-293-Zelllinien wurden mit Liganden (125 nM) oder AP21967 (500 nM) stimuliert. Zum Beenden der zellulären Reaktionen wurden die Zellen nach 0 bis 240 min auf Eis gestellt. Um die Zellen von der Platte abzuschaben, wurde Membranpuffer zugegeben. Zur Lysierung wurden die Zellen im Homogenisator und zusätzlich per Ultraschallsonde aufgeschlossen (20 Einheiten à 1 sek, 50 %-Amplitude). Das Lysat wurde vorsichtig auf einen zuvor vorbereiteten Sucrosegradienten (50 % – 35 % – 20 %) pipettiert und die Ansätze bei 217 000 x g zentrifugiert (4°C, 2 h). Die Interphase zwischen der 50 %- und der 35 %-Sucroseschicht, welche die Membranfraktion enthielt, wurde mit einer Pasteurpipette aufgenommen und erneut zentrifugiert (248 000 x g, 4°C, 15 min). Das entstandene Pellet wurde in 50 μ l Lysierungspuffer resuspendiert und im Immunoblot ausgewertet (2.11.3).

2.11.2 Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE)

Um Proteine ihrer molekularen Masse nach aufzutrennen, wurde die SDS-PAGE angewendet. Das Trenngel wurde in flüssigem Zustand zwischen zwei Glasplatten gegossen und mit Isopropanol überschichtet. Nach Polymerisation des Trenngels wurde die Isopropanolschicht verworfen und das flüssige Sammelgel auf das Trenngel geschichtet. Zum Einbringen der Taschen wurde zusätzlich ein Kamm zwischen die Glasplatten gesteckt, welcher nach Polymerisation des Gels wieder entfernt wurde. Anschließend wurden beide Glasplatten mit Trenn- und Sammelgel in eine Elektrophoresekammer gespannt, welche mit Laemmli-Puffer (1x) aufgefüllt wurde.

Zur Zellysierung inkubierten die Proben mit *Treatment*-Puffer (95°C, 5 min) und wurden anschließend per Ultraschall aufgeschlossen (20 Einheiten à 1 sek, 50 %-Amplitude). Zellysate sowie Proteinmarker wurden mit einer Hamiltonspritze in die Taschen des Gels

eingbracht. Zu Beginn wurde für etwa 15 min eine Spannung von 70 V angelegt, die anschließend auf 120 V erhöht wurde. Die Stromstärke betrug konstant 300 mA.

2.11.3 Immunoblot

Der Immunoblot, auch bekannt unter dem Begriff Western Blot (WB), wurde zur Visualisierung der in der SDS-PAGE aufgetrennten Proteine durchgeführt. Aus dem Trenngel wurden die Proteine durch Anlegen einer elektrischen Spannung auf eine Nitrozellulosemembran überführt. Dieser Prozess wurde mit einem „Semi-Dry Blotter“ durchgeführt, in dem das Gel zwischen zwei doppellagigen Filterpapieren positioniert wurde. Die Nitrozellulosemembran befand sich unmittelbar auf der zur Anode hin orientierten Seite des Gels. Vor Anschluss einer Stromspannung wurde ausgeschlossen, dass sich Luftblasen zwischen den Schichten befanden. Der Proteintransfer fand binnen 60 min bei 200 mA und 25 V statt.

Im Anschluss wurde die Nitrozellulosemembran für 60 min in BSA-TBS-T (1 % bis 5 %) geblockt und mit Primärantikörpern in BSA-TBS-T (1 %) für 16 h bei 4°C inkubiert. Nach dreifachem Waschen mit TBS-T für je 15 min bei RT erfolgte die Inkubation mit Sekundärantikörpern in BSA-TBS-T (0,5 %) für 60 min bei RT.

Die Kombination aus HRP-konjugierten Sekundärantikörpern und hinzugefügter ECL-Lösung (4 bis 8 ml) erzeugte eine chemische Lichtreaktion, welche per Immunoblotkamera dokumentiert wurde. Die Bilder wurden in sechs Zyklen à 2 min aufgenommen.

Zur erneuten Detektion von Proteinen auf derselben Nitrozellulosemembran mit einem weiteren Antikörper wurde diese mit *Stripping*-Puffer behandelt (56°C, 30 min). Nach mehrfachem Waschen mit TBS-T (1x) wurde die Nitrozellulosemembran wiederum mit BSA-TBS-T (5 %) geblockt und konnte wie oben beschrieben mit Antikörpern inkubiert werden.

2.12 Funktionsassays

2.12.1 Kalziummobilisierungsassay

Um Rezeptordesensibilisierung analysieren zu können, wurde die intrazelluläre Kalziumkonzentration vor und nach der Ligandenstimulation der Rezeptoren erfasst. Dazu wurden HEK-293-Zellen mit dem Farbstoff Indo-1 AM beladen, dessen Emissionsmaximum sich durch Erhöhung der intrazellulären Kalziumkonzentration von ~475 nm hin zu ~410 nm verschiebt.

Pro Versuchsansatz wurden 6×10^5 stabil transfizierte HEK-293-Zellen zwei Tage vor der Messung ausplattiert. Die proliferierten Zellen der Versuchsansätze wurden unmittelbar vor dem Stimulationsstartpunkt für eine entsprechende Zeitdauer in Zellkulturmedien mit AP21967 (500 nM, 37°C, 1 h) oder PTX (200 nM, 37°C, 16 h) vorbehandelt. Nach

Auszählung von $1,5 \times 10^6$ der vorbehandelten HEK-293-Zellen wurden diese in 700 μl DMEM mit FCS (5 %) suspendiert. Ansätze für die AP21967-Stimulation enthielten auch während des Versuchsablaufs AP21967 (500 nM) im Medium. Anschließend wurden die Zellen mit einem Gemisch aus Indo-1 AM (1 μM) und Pluronsäure F127 (0,015 %) inkubiert (30°C, 350 rpm, 25 min, Dunkelheit). Es folgte ein weiterer Inkubationsschritt (37°C, 350 rpm, 10 min) in 700 μl DMEM mit FCS (10 %). Nach einem Waschschrift mit Krebs-Ringer-Lösung wurden die Zellen in 400 μl Krebs-Ringer-Lösung mit Zusatz von CaCl_2 (1 mM) bis zur Messung resuspendiert (27°C, 350 rpm).

Die Ratio des Indo-1 AM-Emissionsspektrums (405 nm/530 nm) wurde durchflusszytometrisch bestimmt. Vor der Ligandenstimulation (50 nM) wurde eine Basislinie aufgezeichnet (25 sek). Diese diente der in der Auswertung erfolgten Normalisierung der ratiometrischen Messergebnisse nach Ligandenstimulation.

2.12.2 Quantifizierung der Rezeptorexpression und Rezeptorinternalisierungsprozesse

Die Rezeptorexpression auf der Zelloberfläche wurde durchflusszytometrisch erfasst. HEK-293-Zellen mit transfizierten Chemokinrezeptoren wurden mit Hilfe von Trypsin abgelöst (2.9.1) und in Mikrotiterplatten mit V-Boden überführt. Zur besseren Vergleichbarkeit der Ansätze wurden die Zellen auf eine definierte Zelldichte eingestellt.

Für die Auswahl stabil transfizierter Zelllinien anhand ihrer Rezeptorexpression (2.10.4) wurden die in Mikrotiterplatten überführten Zellen abzentrifugiert (4°C, 1 200 rpm, 2 min) und in 200 μl FACS-Puffer resuspendiert.

Zur Quantifizierung der Rezeptorinternalisierung nach Ligandenstimulation oder nach AP21967-Stimulation wurden 6×10^6 HEK-293-Zellen aus Zellkulturschalen abgelöst und in 2 ml BM überführt (37°C). Nach Entnahme zweier Ansätze à 200 μl (0 min) wurde AP21967 (500 nM) oder der jeweilige Ligand (125 nM) zum Gesamtansatz hinzugeben. Es folgten weitere Probenentnahmen (à 200 μl) nach 15 bis 240 min aus dem Gesamtansatz, die jeweils in Mikrotiterplatten überführt wurden. Die Zellen wurden unmittelbar nach Entnahme gekühlt (4°C), abzentrifugiert und nacheinander mit PBS und BM gewaschen, um zelluläre Reaktionen zu stoppen, bevor sie in 200 μl FACS-Puffer resuspendiert wurden (4°C). Ligandenstimulierte Zellen wurden nach der Probenentnahme zusätzlich zweimal mit EM-Medium gewaschen.

Es folgte eine Inkubation der in FACS-Puffer suspendierten Zellen mit PE-markierten Anti-CCR5-Antikörpern (Klon T21/8; 1:40) bzw. Anti-CXCR4-Antikörpern (Klon 12G5; 1:10) in FACS-Puffer (50 μl pro Ansatz, 4°C, 60 min, Dunkelheit). Daraufhin wurden die Zellen mit FACS-Puffer gewaschen und darin bis zur Analyse gekühlt (4°C).

Zur Kalibrierung des Durchflusszytometers wurden unmarkierte HEK-293-Zellen verwendet. Pro Messansatz wurden 10 000 Zellen erfasst.

2.12.3 Doppelimmunfluoreszenz und Konfokalmikroskopie

Mittels Doppelimmunfluoreszenz und konfokaler Lasermikroskopie wurden Translokationsprozesse von Chemokinrezeptoren und β -Arrestin-1 auf und in HEK-293-Zellen gezeigt. Dazu wurden die Proteine mit einer Kombination aus Primärantikörpern (Tabelle 13) und Fluoreszenzfarbstoff-markierten Sekundärantikörpern (Tabelle 14) detektiert.

Pro Ansatz wurden $1,5 \times 10^5$ Zellen auf zuvor mit Poly-L-Lysin beschichtete runde Deckgläschen ausplattiert und auf diesen in Zellkulturplatten (24 Kavitäten pro Platte) mit DMEM kultiviert (16 h). Am Folgetag inkubierten die Zellen 0 bis 4 h mit Liganden (125 nM) oder AP21967 (500 nM) und wurden anschließend zum Stoppen der zellulären Prozesse mit PBS (1x) gewaschen und mit PFA-Lösung (3 %) fixiert (37°C, 20 min). Nach erneutem Waschen mit PBS (1x) folgte eine Inkubation mit NH_4Cl (50 nM) um freie Aldehydgruppen abzusättigen (30 min, 37°C). Die Inkubation mit einer PBS-Gelatine-Saponin-Lösung permeabilisierte die Zellmembran (15 min, 37°C). Chemokinrezeptoren wurden mit Anti-CXCR4-Antikörpern (Klon 12G5; 5 $\mu\text{g}/\text{ml}$) bzw. Anti-CCR5-Antikörpern (Klon T21/8; 5 $\mu\text{g}/\text{ml}$) in Kombination mit FITC-konjugierten Anti-Maus-Sekundärantikörpern markiert. β -Arrestin-1 wurde mit Anti-Hemagglutinin (HA)-Antikörpern (Klon 3F10, 700 ng/ml) in Kombination mit Streptavidin Alexa Fluor®647 (2 $\mu\text{g}/\text{ml}$) markiert. Jegliche Antikörperinkubation erfolgte einzeln (60 min, 4°C). Dreifache Zwischenwaschschritte erfolgten mit der PBS-Gelatine-Saponin-Lösung. Vor der Inkubation mit Anti-HA-Antikörpern wurde der Ansatz mit Anti-Maus-IgG-Antikörpern aus der Ratte (Klon 14D4; 1:100; 30 min) abgesättigt, um Kreuzreaktionen zwischen dem verwendeten ersten Sekundärantikörper gegen Maus und dem aus Ratte stammenden Anti-HA-Antikörper zu verhindern. Es folgten drei Waschschritte mit PBS-Gelatine-Saponin-Lösung, bevor die Deckgläschen mit *Mounting*-Medium zwischen Objektträger und Deckgläschen versiegelt wurden und trockneten (16 h, RT, Dunkelheit). Die Analyse der Translokationsprozesse erfolgte am konfokalen Lasermikroskop (63x1,3-Objektiv in Verbindung mit Ölimmersion).

2.12.4 MAP-Kinase-Phosphorylierungsassay

In Lysin-beschichteten Zellkulturplatten (6 Kavitäten pro Platte) inkubierten pro Ansatz 6×10^5 Zellen über Nacht in FCS-freiem DMEM mit BSA (0,02 %). Am Folgetag inkubierten die Zellen in frischem DMEM mit Zusatz von BSA (0,02 %) für 60 min bei 37°C. Unmittelbar nach der Stimulation mit Liganden (50 nM) für 0 bis 60 min oder mit PMA (200 nM) für 30 min bei 37°C wurden die Zellen mit PBS (1x) gewaschen und auf Eis gestellt. Zur Zellyse wurden die Zellen im *Treatment*-Puffer aufgeschabt, erhitzt (95°C, 350 rpm, 5 min) und zusätzlich mit Ultraschall behandelt.

Die Lysate wurden mittels SDS-PAGE (2.11.2) aufgetrennt und phosphorylierte ERK1/2-Proteine im Immunoblot (2.11.3) mit Anti-phospho-p44/p42-Antikörpern (Klon

D13.14.E; 1:1 000) in Kombination mit HRP-markierten Sekundärantikörpern (1:10 000) detektiert. Zur Beladungskontrolle wurde der Blot gestrippt und anschließend mit Anti-pan-p44/42-Antikörpern (Klon 137F5; 1:1 000) inkubiert. In der quantitativen Analyse bezogen sich alle Phosphorylierungswerte auf den jeweiligen PMA-Wert (maximale Stimulation = 100 %) der Zelllinie.

3 Ergebnisse

3.1 Molekularbiologie

Um zu ermitteln, welche G-Protein-unabhängigen Einflüsse die chemisch induzierte β -Arrestin-1- bzw. β -Arrestin-1R169E-Translokation hinsichtlich Desensibilisierung, Internalisierung und Signalweiterleitung auf die beiden Chemokinrezeptoren CXCR4 und CCR5 haben, wurden stabile HEK-293-Zelllinien etabliert, die die Chemokinrezeptoren CXCR4 bzw. CCR5 in Kombination mit β -Arrestin-1 bzw. β -Arrestin-1R169E überexprimierten. Das dabei verwendete Heterodimerisierungssystem ermöglichte die G-Protein-unabhängige Translokation des β -Arrestin-1 bzw. β -Arrestin-1R169E an den Chemokinrezeptor. Dazu wurden die Chemokinrezeptoren um eine C-terminale DmrA-Domäne sowie β -Arrestin-1 bzw. β -Arrestin-1R169E um eine C-terminale DmrC-Domäne erweitert. Die beiden Domänen banden an das Heterodimerisierungssagens AP21967 und ermöglichten darüber eine induzierbare räumliche Zusammenführung beider Fusionspartner.

HEK-293-Zellen wurden stabil mit zwei Plasmiden kotransfiziert (2.10.2): pHet-1 mit inseriertem β -Arrestin-1 bzw. β -Arrestin-1R169E (Abbildung 6, C und D) und pEF1/*myc*-HisA mit inseriertem CXCR4-DmrA bzw. CCR5-DmrA (Abbildung 6, A und B). Für sämtliche Versuche wurden auf pHet-1-basierende Plasmide mit β -Arrestin-1 bzw. β -Arrestin-1R169E neu etabliert. Die Plasmide mit Chemokinrezeptor (CCR5 bzw. CXCR4) und DmrA-Domäne wurden bereits zuvor von Liebick (2015) etabliert und freundlicherweise für diese Arbeit zur Verfügung gestellt.

3.1.1 Konstruktion des Plasmids pHet-1 mit β -Arrestin-1-DmrC oder β -Arrestin-1R169E-DmrC

Zur Etablierung stabiler Zelllinien mit Expression von β -Arrestin-1 oder der konstitutiv aktiven Mutante β -Arrestin-1R169E wurde ein pHet-1-Plasmid mit darin enthaltener DmrC-Domäne und β -Arrestin-1 bzw. β -Arrestin-1R169E konstruiert (Abbildung 6; C und D).

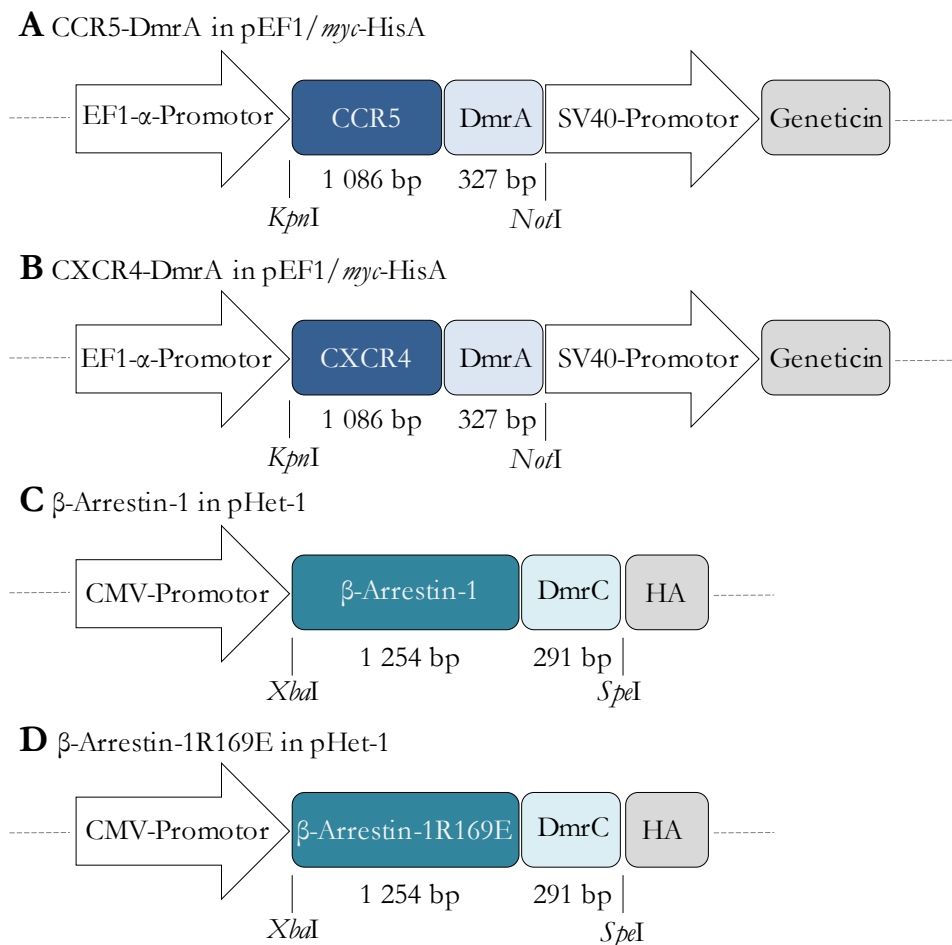


Abbildung 6: Konstruktion der Vektorensysteme mit Chemokinrezeptor oder β -Arrestin-1.

Die Expression des Chemokinrezeptor-DmrA (1 413 bp) wird durch den humanen Elongationsfaktor 1α gesteuert. Der Vektor pEF1/*myc*-HisA enthält zusätzlich das Resistenzgen gegen Geneticin, dessen Expression dem SV40-Promotor unterliegt (A und B). Die Expression des β -Arrestin-1-DmrC bzw. β -Arrestin-1R169E-DmrC (1 545 bp) in Kombination mit dem *human influenza hemagglutinin Tag* (HA-Tag) wird durch den Promotor des Cytomegalievirus (CMV) gesteuert (C und D).

Zum Verdau des geschlossenen Vektorsystems wurde das Restriktionsenzym *Xba*I verwendet (2.8.4). Das geöffnete Vektorsystem wurde dephosphoryliert und somit in seiner offenen Form stabilisiert. Die entsprechenden Schnittstellen für *Xba*I und *Spe*I an der vorliegenden β -Arrestin-1-GFP-cDNA bzw. β -Arrestin-1R169E-cDNA wurden durch PCR-Amplifikation (2.8.1) mit den spezifischen Primern „*Xba*I-bov β -Arr-1 for“ und „Bov β -Arr-1-*Spe*I rev“ eingebracht (Tabelle 10). Anschließend wurden die mit *Xba*I und *Spe*I verdaute β -Arrestin-1- bzw. β -Arrestin-1R169E-DNA und der mit *Xba*I verdaute Vektor pHet-1 ligiert, sodass die DmrC-Domäne am C-terminalen Ende des β -Arrestin-1 bzw. β -Arrestin-1R169E angefügt wurde (2.8.5).

3.1.2 Kontrollverdau amplifizierter Plasmid-DNA

Zur Plasmidamplifikation wurde das Konstrukt in *E. coli* transformiert (2.8.6). Die korrekte Plasmidexpression wurde durch Amplifizierung der DNA verschiedener Bakterienkolonien und Auftrennung in der Agarosegelelektrophorese kontrolliert (2.8.7; 2.8.2). Positive Klone wurden expandiert und gereinigte DNA extern sequenziert (2.8.8; 2.8.9). Plasmide mit korrekter β -Arrestin-1-DmrC-DNA- bzw. β -Arrestin-1R169E-DmrC-DNA-Sequenz wurden einem finalen Kontrollverdau mit *Xba*I und *Spe*I unterzogen (Abbildung 7). Für herausgeschnittenes β -Arrestin-1-DmrC oder β -Arrestin-1R169E-DmrC zeigten sich im Agarosegel Banden auf Höhe von etwa 1 600 bp. Die obere Bande auf Höhe von 5 500 bp entsprach dem leeren Vektor pHet-1. Zur Veranschaulichung wurden auch die zuvor etablierten Vektorsysteme mit pEF1/*myc*-HisA-Chemokinrezeptor-DmrA mit *Kpn*I und *Not*I kontrollverdaut.

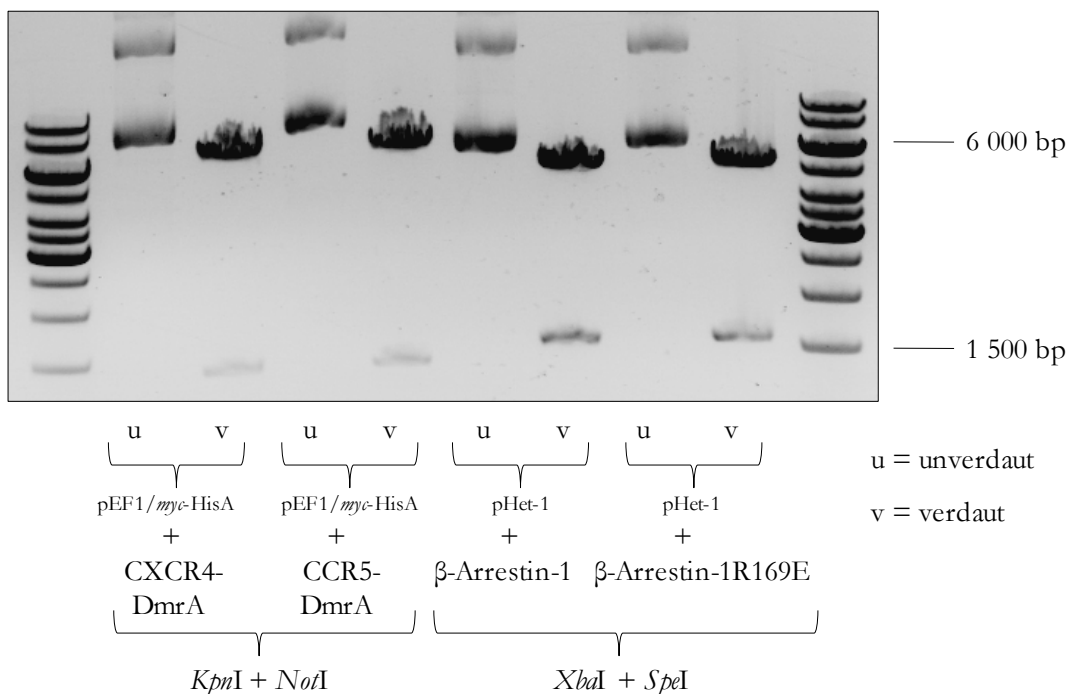


Abbildung 7: Kontrollverdau von pEF/*myc*-HisA-Chemokinrezeptor-DmrC und pHet-1- β -Arrestin-1-DmrC. Jeweils 15 μ g von pEF1/*myc*-HisA-CXCR4-DmrA, pEF1/*myc*-HisA-CCR5-DmrA, pHet-1- β -Arrestin-1 sowie pHet-1- β -Arrestin-1R169E wurden mit *Kpn*I und *Not*I oder mit *Xba*I und *Spe*I verdaut (2 h, 37°C). Die Konzentration der Restriktionsenzyme entsprach den Herstellerangaben. Pro Tasche wurden 200 ng DNA aufgetragen. Die elektrophoretische Auftrennung erfolgte bei 120 V und 220 mA für 1 h in einem Agarosegel (1,5 %).

Die gereinigte DNA wurde im weiteren Verlauf für die stabile Kotransfektion von HEK-293-Zellen außerhalb der für die Proteinexpression relevanten Regionen mit dem Restriktionsenzym *Mlu*I linearisiert (2.10.1).

3.2 Charakterisierung von HEK-293-Zellen mit Koexpression von Chemokinrezeptor-DmrA und β -Arrestin-1-DmrC

3.2.1 Stabile Expression von CCR5-DmrA oder CXCR4-DmrC in HEK-293-Zellen

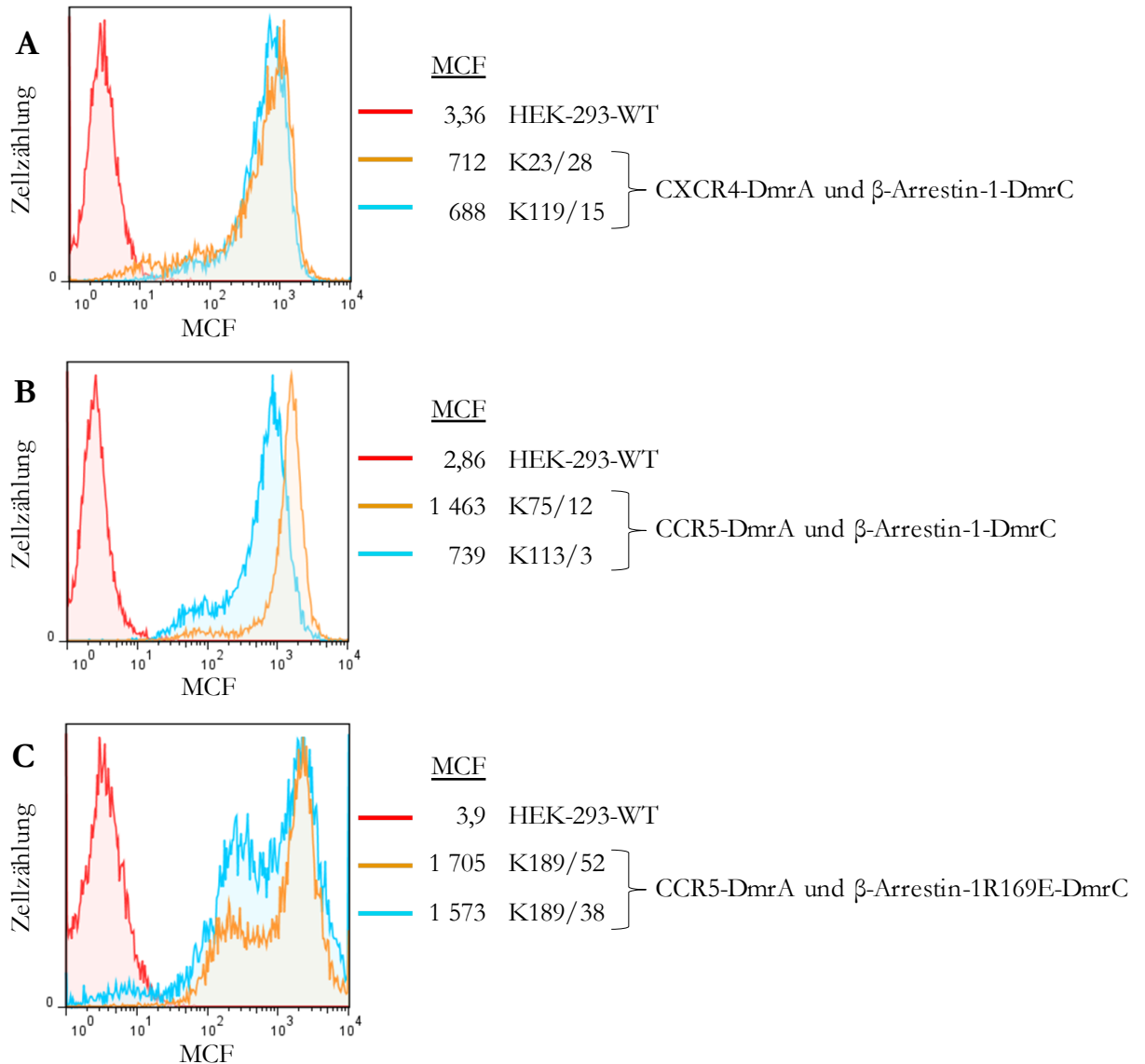


Abbildung 8: Chemokinrezeptorexpression in stabil transfizierten HEK-293-Zelllinien. CXCR4-DmrA (A) bzw. CCR5-DmrA (B, C) und β -Arrestin-1-DmrC (A, B) bzw. β -Arrestin-1R169E-DmrC-koexprimierende (C) HEK-293-Zellen (orange und blau) sowie HEK-293-Wildtypzellen (rot) wurden für 60 min bei 4°C mit monoklonalen PE-konjugierten Anti-CXCR4-Antikörpern (Klon 12G5; 125 nM) bzw. Anti-CCR5-Antikörpern (Klon T21/8; 125 nM) inkubiert. Pro Ansatz wurden 10 000 Zellen im Durchflusszytometer erfasst.

Zur stabilen Kotransfektion von CXCR4-DmrA bzw. CCR5-DmrA zusammen mit β -Arrestin-1-DmrC bzw. β -Arrestin-1R169E-DmrC in HEK-293-Zellen wurde die Kalziumphosphat-Präzipitationstechnik angewendet (2.10.2). Rezeptorpositive Zellen

wurden durch den Einsatz von Geneticin selektioniert (2.9.2). Die Auswahl der Zellklone mit hoher und zugleich untereinander vergleichbarer Chemokinrezeptorexpression erfolgte durchflusszytometrisch mit PE-konjugierten Anti-CCR5-Antikörpern bzw. mit PE-konjugierten Anti-CXCR4-Antikörpern (2.12.2). Um eine homogene Zusammensetzung der resultierenden Zellpopulation sicherzustellen, erfolgten Subklonierungsschritte (2.10.4). Abbildung 8 zeigt die Rezeptorexpression einer Auswahl von Subklonen im Vergleich zu HEK-293-WT-Zellen. Dabei liegt der mittlere Fluoreszenzintensitätswert (MCF) bei allen gezeigten Klonen im Vergleich zu Wildtypzellen in einem deutlich höheren Bereich.

3.2.2 Stabile Expression von β -Arrestin-1-DmrC oder β -Arrestin-1R169E-DmrC in HEK-293-Zellen

Zum Nachweis des koexprimierten β -Arrestin-1 bzw. β -Arrestin-1R169E wurden Zellysate in der Gelelektrophorese (SDS-PAGE) aufgetrennt und anschließend im Western Blot dargestellt (2.11.2; 2.11.3). Zum β -Arrestin-Nachweis wurden monoklonale Anti-HA-Antikörper eingesetzt. Um die Expression der β -Arrestin-1- bzw. β -Arrestin-1R169E-Proteine und der DmrC-Domäne zu überprüfen, wurden diese transient in HEK-293-Zellen transfiziert (2.10.3). In Abbildung 9 ist neben der positiven Expression ein deutlicher Größenunterschied zwischen β -Arrestin-1-DmrC bzw. β -Arrestin-1R169E-DmrC und β -Arrestin-2-FLAG von etwa 10 kDa zu erkennen, welcher dem Molekulargewicht der DmrC-Domäne entspricht.

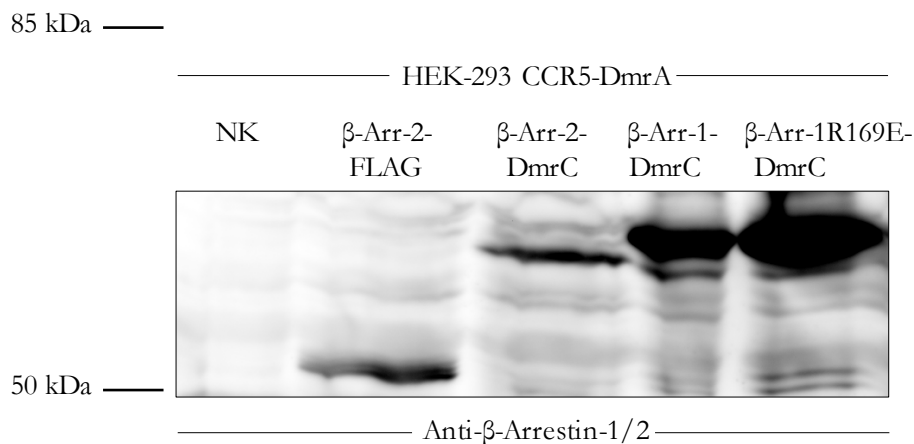


Abbildung 9: Verschiedene β -Arrestin-Varianten mit und ohne DmrC-Domäne nach transienter Transfektion. Zum Nachweis der Expression der DmrC-Domäne wurden CCR5-DmrA-exprimierende HEK-293-Zellen transient mit β -Arrestin-Varianten transfiziert. Untransfizierte HEK-293-Zellen dienen als Negativkontrolle (NK). Lysierte Zellen wurden mittels SDS-PAGE aufgetrennt und β -Arrestin-Proteine im WB mit Anti- β -Arrestin-1/2 (Klon 21B1; 10 μ l/ml) markiert. Zur Detektion wurden HRP-konjugierte Sekundärantikörper verwendet (1:10 000).

Abbildung 10 zeigt eine Auswahl positiv transfizierter Zellen mit Expression von β -Arrestin-1-DmrC bzw. β -Arrestin-1R169E-DmrC (A) im Vergleich zu HEK-293-WT-Zellen und β -Arrestin-2-Zelllinien (B). In allen transfizierten Zelllinien ist im Vergleich zur Kontrolle eine stabile β -Arrestin-Expression zu erkennen, wobei sich das größere β -Arrestin-1 vom β -Arrestin-2 durch eine höhere Bande im Western Blot unterscheidet (B).

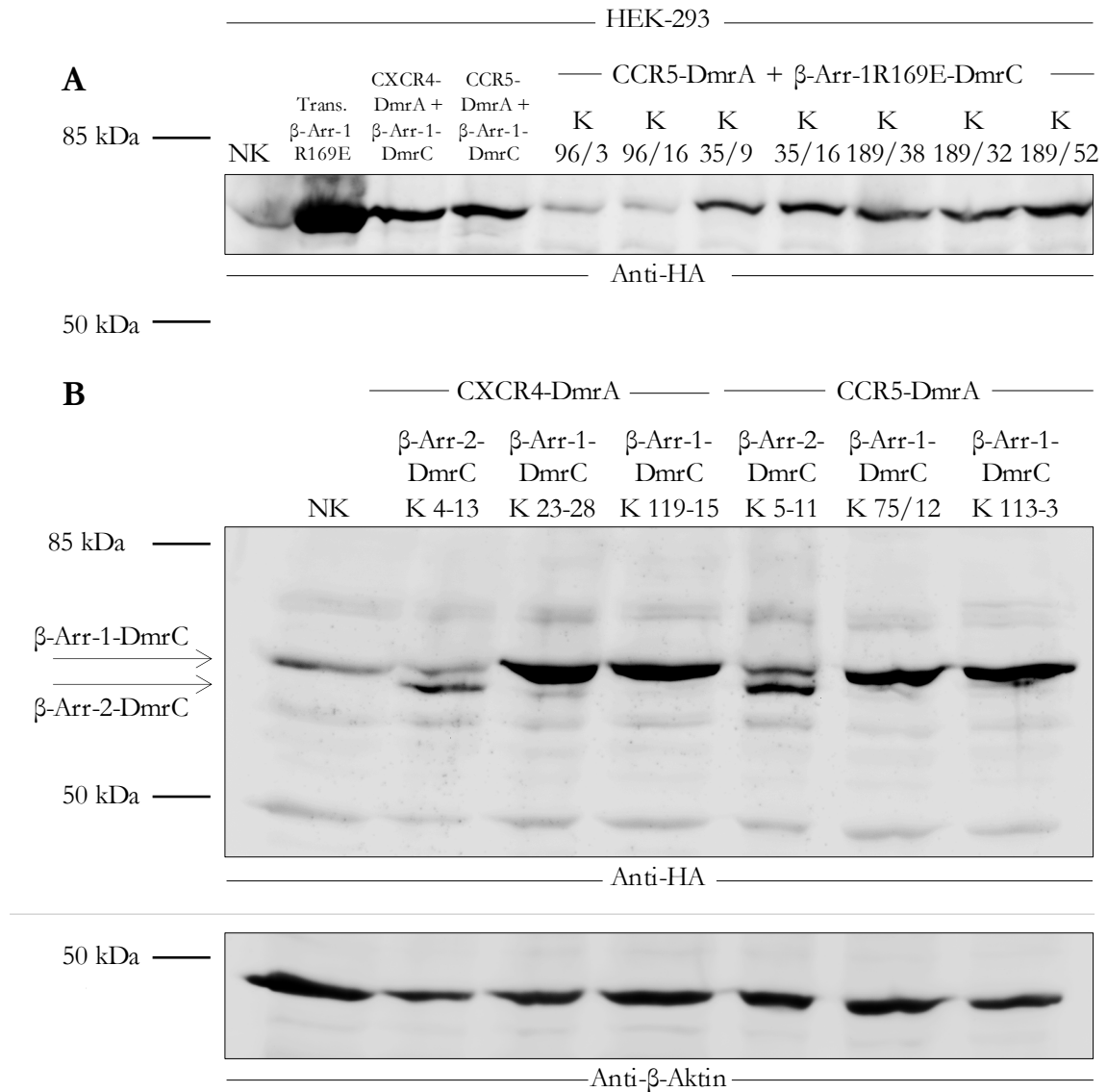


Abbildung 10: β -Arrestin-Expression in stabil transfizierten HEK-293-Zelllinien. Die Detektion stabiler Expression von β -Arrestin-1R169E-DmrC (A) bzw. β -Arrestin-1-DmrC (B) im Vergleich zu HEK-293-WT-Zellen (NK) und stabil transfizierten β -Arrestin-2-DmrC-Zelllinien erfolgte mittels Anti-HA-Antikörpern (Klon 3F10; 1:1 000) und HRP-konjugierten Sekundärantikörpern (1:10 000) im Immunoblot, die Darstellung mittels Chemilumineszenz. Zur Beladungskontrolle wurden Anti- β -Aktin-Antikörper (1:1 000) verwendet.

3.3 AP21967-induzierte Translokation von β -Arrestin-1-DmrC an die Zellmembran

Die Fähigkeit des eingesetzten Heterodimerisierungssystems, die Dimerisierungsdomänen DmrA und DmrC mit den gekoppelten Proteinen (Chemokinrezeptor und β -Arrestin-1) in räumliche Nähe zueinander zu bringen, wurde überprüft. Um die Translokation von β -Arrestin-1-DmrC an den Chemokinrezeptor und somit an die Zellmembran zu testen, wurden stabil mit CXCR4-DmrA und β -Arrestin-1-DmrC kotransfizierte HEK-293-Zellen mit AP21967 für 0 bis 240 min stimuliert und die Membranfraktion mittels Sucrosegradienten-Ultrazentrifugation von Zelllysaten isoliert (2.11.1).

In der Membranfraktion zeigte sich in Abhängigkeit von der Zeit eine zunehmende Menge β -Arrestin-1-DmrC, welche nach 2 h ihr relatives Maximum erreichte (Abbildung 11). Im Zytoplasma war β -Arrestin-1-DmrC während der gesamten Stimulationszeit mit AP21967 in gleichbleibender Menge vorhanden. Damit zeigte sich, dass β -Arrestin-1-DmrC nach AP21967-Stimulation zeitabhängig in räumliche Nähe zum CXCR4-Chemokinrezeptor an die Zellmembran translozierte.

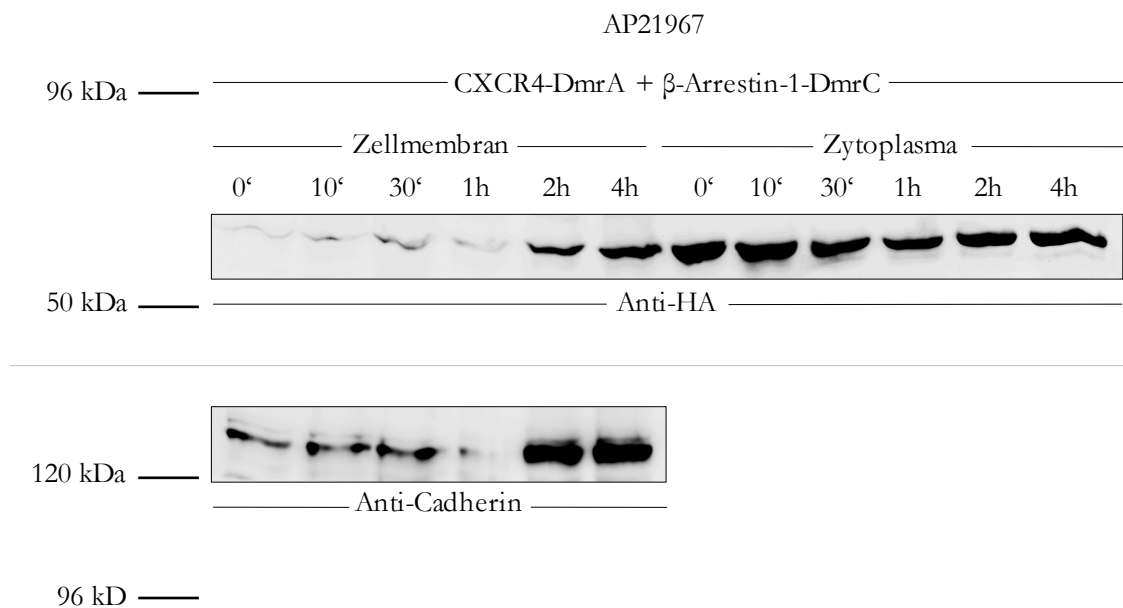


Abbildung 11: Kinetik der AP21967-induzierten Translokation von β -Arrestin-1-DmrC an die Zellmembran. CXCR4-DmrA- und β -Arrestin-1-DmrC-koexprimierende Zellen wurden 0 min bis 4 h bei 37°C mit AP21967 (500 nM) stimuliert und die Membranfraktion mittels Ultrazentrifugation über einen Sucrosegradienten isoliert. Die Membranfraktion und die Zytoplasmafraktion wurden gelelektrophoretisch aufgetrennt und β -Arrestin-1-DmrC mit Anti-HA-Antikörpern (Klon 3F10; 1:1 000) mittels Immunoblot und Chemilumineszenz-Visualisierung nachgewiesen. Zur Beladungskontrolle wurden Anti-pan-Cadherin-Antikörper (1:10 000) verwendet.

3.4 Rezeptordesensibilisierung nach AP21967-Stimulation

Das klassische Modell der GPCR-Regulation geht davon aus, dass Chemokinrezeptoren nach Ligandenstimulation in G-Protein-abhängiger Weise durch Rekrutierung von GRKs und β -Arrestinen an die Rezeptoren desensibilisiert werden (Ferguson 2001). Es ergab sich die Frage, ob alleinige β -Arrestin-1-Rekrutierung an den Chemokinrezeptor, unabhängig von vorausgegangener G-Protein-Aktivierung und Rezeptorphosphorylierung durch GRKs, einen inhibitorischen Effekt im Sinne einer Desensibilisierung des Rezeptors ausübt.

Als Maß für die Rezeptoraktivierung diente die ligandeninduzierte intrazelluläre Kalziummobilisierung, die durch Emissionsmessung des Kalziumkonzentrations-abhängigen Fluoreszenzfarbstoffs Indo-1 AM erfasst wurde (2.12.1). Durch den Einsatz des Heterodimerisierungssystems wurde eine ligandenunabhängige Translokation von β -Arrestin-1 hin zum membranständigen Chemokinrezeptor realisiert.

Hierzu wurden HEK-293-Zelllinien mit Koexpression von CCR5-DmrA bzw. CXCR4-DmrA und β -Arrestin-1-DmrC für 1 h mit AP21967 vorbehandelt und anschließend mit dem jeweiligen Liganden CCL5 bzw. CXCL12 stimuliert. In Kontrollansätzen wurden Zellen mit PTX als Positivkontrolle vorbehandelt (16 h, 200 nM) oder im Sinne einer Negativkontrolle nicht vorbehandelt (Abbildung 12). Weitere Kontrollansätze mit Expression von CXCR4-DmrA bzw. CCR5-DmrA ohne koexprimiertem β -Arrestin-DmrC zeigten bei Vorbehandlung mit AP21967 eine uneingeschränkte Kalziummobilisierung. Eine Rezeptordesensibilisierung durch alleinige AP21967-Vorbehandlung ohne β -Arrestin-1-Rekrutierung wurde dadurch ausgeschlossen (Liebick 2015).

In nicht vorbehandelten Zellen (Abbildung 12; grau) wurde eine intrazelluläre Kalziummobilisierung im Sinne einer uneingeschränkten Rezeptoraktivität detektiert. Im Vergleich dazu war die intrazelluläre Kalziumfreisetzung nach einstündiger Vorbehandlung der Zellen mit AP21967 sowohl in den CXCR4-DmrA- als auch in den CCR5-DmrA-exprimierenden Zellen deutlich reduziert (Abbildung 12; rot). Der mit PTX vorbehandelte Kontrollansatz zeigte einen gleichgerichteten Effekt in noch deutlicherer Ausprägung. Die Kalziumfreisetzung war hier nahezu komplett inhibiert (Abbildung 12; grün).

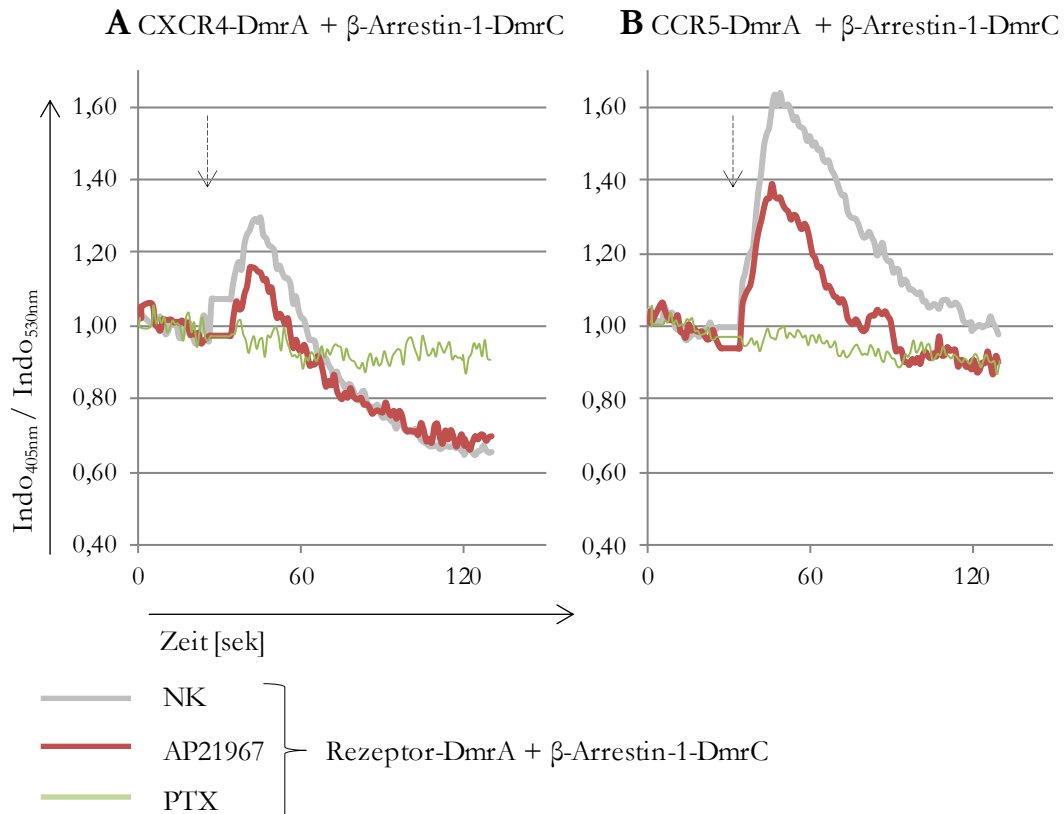


Abbildung 12: Ligandeninduzierte Kalziummobilisierung nach AP21967-Vorbehandlung in CXCR4-DmrA- bzw. CCR5-DmrA- und β -Arrestin-1-DmrC-koexprimierenden Zelllinien. HEK-293-Zellen mit Koexpression von CXCR4-DmrA (A) bzw. CCR5-DmrA (B) und β -Arrestin-1-DmrC wurden mit AP21967 (500 nM, 1 h) oder mit PTX (200 nM, 16 h) vorbehandelt sowie mit Indo-1 AM beladen und mit CXCL12 (50 nM) bzw. CCL5 (50 nM) stimuliert (gestrichelte Pfeile). NK ohne Vorbehandlung. Kalziummobilisierung wurde durchflusszytometrisch als Ratio zweier Emissionsspektren von Indo-1 AM (405 nm/530 nm) bestimmt. Die Messwerte wurden zum Mittelwert der Basislinie angepasst.

Das Ergebnis zeigt, dass Translokation des zytoplasmatischen β -Arrestin-1 zum membranständigen Chemokinrezeptor CXCR4 bzw. CCR5 mit der Rezeptoraktivität interferiert. Es resultiert eine verminderte intrazelluläre Kalziummobilisierung als Antwort auf Agonistenstimulation des Rezeptors im Sinne einer Rezeptorblockade. Das Ausmaß der Rezeptorblockade nach AP21967-Vorbehandlung ist vergleichbar mit der Rezeptordesensibilisierung nach ligandeninduzierter Rezeptoraktivierung.

An den Chemokinrezeptor rekrutiertes β -Arrestin-1 ist – unabhängig von klassischer G-Protein-abhängiger Aktivierung und Rezeptorphosphorylierung durch GRKs – im Stande, diesen in seiner kalziummobilisierenden Funktionsfähigkeit einzuschränken, also zu desensibilisieren.

3.5 Rezeptorinternalisierung nach AP21967-Stimulation versus Ligandenstimulation

Um festzustellen, ob ligandenunabhängige Translokation des β -Arrestin-1 in seiner nicht aktivierten Konformation an die Chemokinrezeptoren CCR5 oder CXCR4 eine Internalisierungsreaktion zu induzieren vermag, wurden Internalisierungsstudien nach AP21967- und nach Ligandenstimulation durchgeführt (2.12.2). Zudem wurde die Frage nach Unterschieden im Internalisierungsverhalten der konstitutiv aktiven β -Arrestin-1R169E-Mutante im Vergleich zum β -Arrestin-1-Wildtyp gestellt.

3.5.1 Induzierte Internalisierung des Chemokinrezeptors CXCR4-DmrA in β -Arrestin-1-DmrC-koexprimierenden Zelllinien: AP21967 versus CXCL12

CXCR4-DmrA- und β -Arrestin-1-DmrC-koexprimierende HEK-293-Zellen wurden für Zeiträume zwischen 0 und 240 min mit dem Liganden CXCL12 oder AP21967 stimuliert. Die CXCR4-Expression auf der Zelloberfläche wurde mit PE-konjugierten Anti-CXCR4-Antikörpern in der Durchflusszytometrie erfasst.

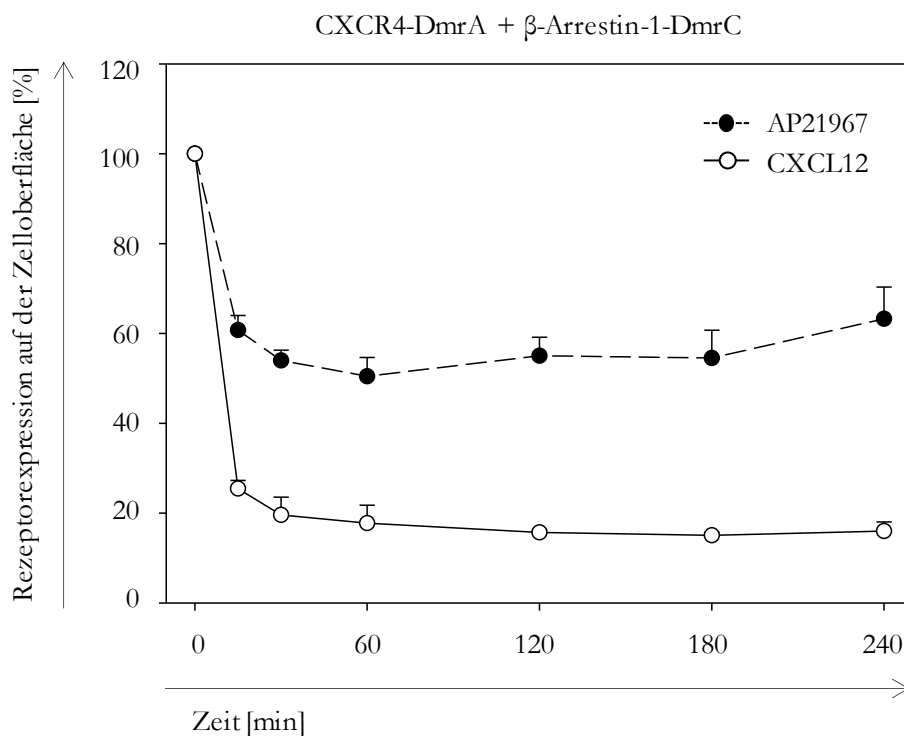


Abbildung 13: Internalisierung des Chemokinrezeptors CXCR4-DmrA in β -Arrestin-1-DmrC-koexprimierenden Zellen nach Stimulation mit AP21967 oder CXCL12. CXCR4-DmrA- und β -Arrestin-1-DmrC-koexprimierende HEK-293-Zellen wurden mit AP21967 (500 nM) bzw. CXCL12 (125 nM) für 0 bis 240 min bei 37°C stimuliert und mit PE-konjugierten Anti-CXCR4-Antikörpern (Klon 12G5; 1:10) inkubiert. Die Rezeptorinternalisierung wurde durchflusszytometrisch detektiert und auf Basis der Rezeptorexpression unstimulierter Zellen berechnet. Die gezeigten Ergebnisse entsprechen dem Mittelwert \pm Standardabweichung aus mindestens drei voneinander unabhängigen Experimenten.

Nach Ligandenstimulation war eine Internalisierung von zelloberflächenständigen CXCR4-Chemokinrezeptoren zu beobachten (Abbildung 13). Die Internalisierung nahm in Abhängigkeit von der Zeit zu und erreichte nach 60 min ein Maximum von etwa 80 % Rezeptorinternalisierung im Vergleich zum Anfangszeitpunkt. Ein kleiner Anteil der Rezeptoren verblieb dabei an der Zelloberfläche.

Für die Stimulation mit AP21967 ergab sich ein ähnliches Bild, wobei der maximale Anteil internalisierter Rezeptoren (45 %) geringer ausfiel.

Im Negativkontrollansatz zeigten HEK-293-Zellen mit Expression von CXCR4-DmrA ohne β -Arrestin-1-DmrC-Koexpression nach Stimulation mit AP21967 für 0 bis 240 min keine Rezeptorinternalisierung, sodass ein internalisierender Effekt allein durch Stimulation mit AP21967 ausgeschlossen werden konnte (Liebick 2015).

Das Ergebnis zeigt, dass CXCR4-Chemokinrezeptoren auch ohne vorherige Ligandenstimulation internalisieren, sobald nicht aktiviertes β -Arrestin-1 und CXCR4 durch AP21967-Stimulation dimerisieren. Die maximale Internalisierungsrate des Chemokinrezeptors CXCR4 war nach AP21967-Stimulation (45 %) in β -Arrestin-1-DmrC-koexprimierenden Zellen jedoch geringer ausgeprägt als nach Ligandenstimulation mit CXCL12 (80 %).

3.5.2 Induzierte Internalisierung des Chemokinrezeptors CCR5-DmrC in β -Arrestin-1-DmrC-koexprimierenden Zelllinien: AP21967 versus CCL5

Analog zur Versuchsanordnung in 3.5.1 wurden CCR5-DmrA- und β -Arrestin-1-DmrC-koexprimierende HEK-293-Zellen mit dem Liganden AP21967 oder CCL5 stimuliert. CCR5-Chemokinrezeptoren wurden mit PE-konjugierten Anti-CCR5-Antikörpern markiert und durchflusszytometrisch erfasst.

In einem Kontrollansatz zeigten HEK-293-Zellen mit Expression von CCR5-DmrA ohne β -Arrestin-DmrC-Koexpression nach Stimulation mit AP21967 für 0 bis 240 min keine Rezeptorinternalisierung, sodass ein internalisierender Effekt allein durch Stimulation mit AP21967 ausgeschlossen werden konnte (Liebick 2015).

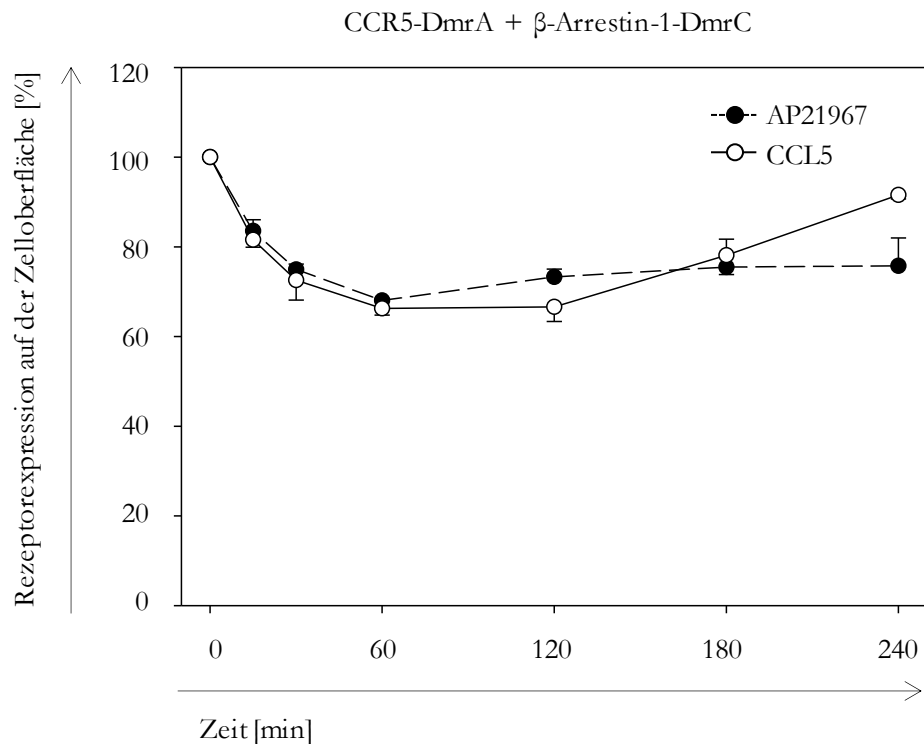


Abbildung 14: Internalisierung des Chemokinrezeptors CCR5-DmrA in β -Arrestin-1-DmrC-koexprimierenden Zellen nach Stimulation mit AP21967 oder CCL5. CCR5-DmrA- und β -Arrestin-1-DmrC-koexprimierende HEK-293-Zellen wurden mit AP21967 (500 nM) bzw. CCL5 (125 nM) für 0 bis 240 min bei 37°C stimuliert und mit PE-konjugierten Anti-CCR5-Antikörpern (Klon T21/8; 1:40) inkubiert. Rezeptorinternalisierung wurde durchflusszytometrisch detektiert und auf Basis der Rezeptorexpression unstimulierter Zellen berechnet. Die gezeigten Ergebnisse entsprechen dem Mittelwert \pm Standardabweichung aus mindestens drei voneinander unabhängigen Experimenten.

In Abbildung 14 ist das Ausmaß von AP21967-induzierter und CCL5-induzierter Rezeptorinternalisierung in HEK-293-Zellen mit Koexpression von CCR5-DmrA und β -Arrestin-1-DmrC gegenübergestellt. CCR5-Rezeptoren internalisierten nach CCL5-Stimulation sowie nach AP21967-Stimulation in ähnlichem Ausmaß. Das Maximum der Internalisierung von etwa 30 % war nach 60 min erreicht. β -Arrestin-1 vermittelte durch chemisch induzierte Dimerisierung die Internalisierung von CCR5 ohne vorausgegangene Ligandenaktivierung des Rezeptors.

3.5.3 Induzierte Internalisierung des Chemokinrezeptors CCR5-DmrC in Zelllinien mit Koexpression der konstitutiv aktiven β -Arrestin-1R169E-DmrC-Mutante: AP21967 versus CCL5

Um einen direkten Vergleich zwischen dem CCR5-Internalisierungsverhalten vom β -Arrestin-1-Wildtyp und der β -Arrestin-1R169E-Mutante zu erhalten, wurden weitere durchflusszytometrische Rezeptorinternalisierungsstudien (2.12.2) mit CCR5-DmrA- und

β -Arrestin-1-DmrC- bzw. β -Arrestin-1R169E-DmrC-koexprimierenden HEK-293-Zellen durchgeführt. Der Versuchsaufbau entsprach dem Vorgehen in 3.5.1.

Sowohl nach Ligandenstimulation als auch nach AP21967-Stimulation zeigten β -Arrestin-1R169E-DmrC-exprimierende Zellen eine signifikante Rezeptorinternalisierung (Abbildung 15). Hierbei betrug die maximale Rezeptorinternalisierung nach AP21967-Stimulation etwa 65 % und nach Ligandenstimulation etwa 45 %.

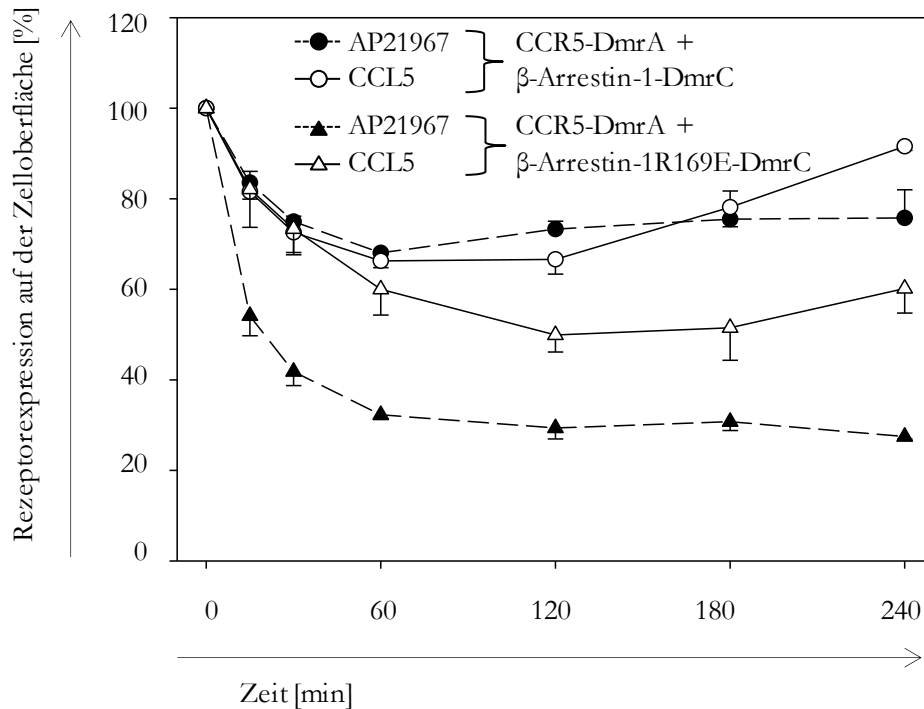


Abbildung 15: Internalisierung des Chemokinrezeptors CCR5-DmrA nach Stimulation mit AP21967 oder CCL5 in β -Arrestin-1R169E-DmrC-koexprimierenden Zellen im Vergleich zu den β -Arrestin-1-WT-DmrC-koexprimierenden Zellen. CCR5-DmrA- und β -Arrestin-1R169E-DmrC-koexprimierende HEK-293-Zellen wurden mit AP21967 (500 nM) bzw. CCL5 (125 nM) für 0 bis 240 min bei 37°C stimuliert und mit PE-konjugierten Anti-CCR5-Antikörpern (Klon T21/8; 1:40) inkubiert. Die Rezeptorinternalisierung wurde durchflusszytometrisch detektiert und auf Basis der Rezeptorexpression unstimulierter Zellen berechnet. Die gezeigten Ergebnisse entsprechen dem Mittelwert \pm Standardabweichung aus mindestens drei voneinander unabhängigen Experimenten.

Der Vergleich dieser Internalisierungswerte mit denen der β -Arrestin-1-DmrC-exprimierenden Zelllinie aus 3.5.2 ergab sowohl nach AP21967- als auch nach Ligandenstimulation eine gesteigerte maximale Rezeptorinternalisierung für Zellen mit Expression der β -Arrestin-1R169E-DmrC-Mutation. Die Ergebnisse zeigen, dass die konstitutiv aktive β -Arrestin-1R169E-Mutante eine gesteigerte rezeptorinternalisierende Eigenschaft im Vergleich zum β -Arrestin-1-Wildtyp aufweist.

3.6 Intrazelluläre Lokalisation von Chemokinrezeptoren und β -Arrestin-1 nach AP21967-induzierter versus ligandeninduzierter Rezeptorinternalisierung

Nach den durchflusszytometrischen Internalisierungsmessungen stellte sich die Frage nach der intrazellulären Distribution der internalisierten CXCR4- bzw. CCR5-Rezeptoren und β -Arrestin-Proteine nach AP21967- bzw. Ligandenstimulation. Dazu wurden konfokale Doppelimmunfluoreszenzanalysen durchgeführt, um die intrazelluläre Verteilung der fluoreszenzmarkierten Rezeptoren und β -Arrestine zu erfassen (2.12.3).

HEK-293-Zellen mit Koexpression von CXCR4-DmrA bzw. CCR5-DmrA und β -Arrestin-1-DmrC bzw. β -Arrestin-1R169E-DmrC wurden dafür analog zu den Internalisierungsexperimenten (3.5) für 0 bis 240 min mit Liganden oder AP21967 stimuliert. Die Detektion der Rezeptoren erfolgte mit Anti-CXCR4- bzw. Anti-CCR5-Antikörpern (FITC, grün). β -Arrestin-1 und β -Arrestin-1R169E wurden mit Anti-HA-Antikörpern über eine Proteinmarkierung mit Epitop des humanen Influenzavirus (HA-Tag) detektiert (Alexa Fluor®647, rot). Sämtliche Bilder wurden mit einem 60x-Objektiv eines konfokalen Laserscannmikroskops aufgenommen.

3.6.1 CXCR4-DmrA-Internalisierung nach Stimulation mit AP21967 versus CXCL12 in β -Arrestin-1-DmrC-koexprimierenden Zellen

Abbildung 16 zeigt die Lokalisation von CXCR4-Rezeptoren und β -Arrestin-1 in unstimulierten (0 min) und stimulierten HEK-293-Zellen. Im unstimulierten Zustand war eine deutliche Ringfluoreszenz der Zellen zu erkennen, die durch singuläre zytoplasmatische Signale ergänzt wurde (0 min, grün). β -Arrestin-1 war zu diesem Zeitpunkt homogen im Zytoplasma verteilt (0 min, rot).

Nach 30 min AP21967-Stimulation reduzierte sich diese Ringfluoreszenz und CXCR4 akkumulierten zunehmend in intrazellulären Vesikeln, wobei auch Anteile der Rezeptoren disseminiert im Zytoplasma verteilt waren. Das homogene Verteilungsmuster des β -Arrestin-1 veränderte sich in geringem Ausmaß, indem es ebenfalls in intrazellulären Vesikeln akkumulierte (Abbildung 12; 30 min, rot). Die räumliche Überlappung in vesikulärer Form zwischen CXCR4 und β -Arrestin-1 verstärkte sich nach 240 min Inkubationszeit mit AP21967 (Abbildung 12; Overlay). Nach 30 min Ligandenstimulation mit CXCL12 nahmen die CXCR4-Rezeptoren ebenfalls eine disseminiert intrazelluläre Verteilung mit einzelnen Vesikeln an, während das Verteilungsmuster des β -Arrestin-1 homogen zytoplasmatisch blieb.

Diese Ergebnisse zeigen, dass chemisch induzierte β -Arrestin-1-Translokation an CXCR4 zu Rezeptorinternalisierung mit vesikulärem Verteilungsmuster wie nach gewöhnlicher Ligandenstimulation des Chemokinrezeptors führt. Die AP21967-induzierte Bindung führt zudem zur Koakkumulation des β -Arrestin-1 mit CXCR4 in vesikulären Strukturen.

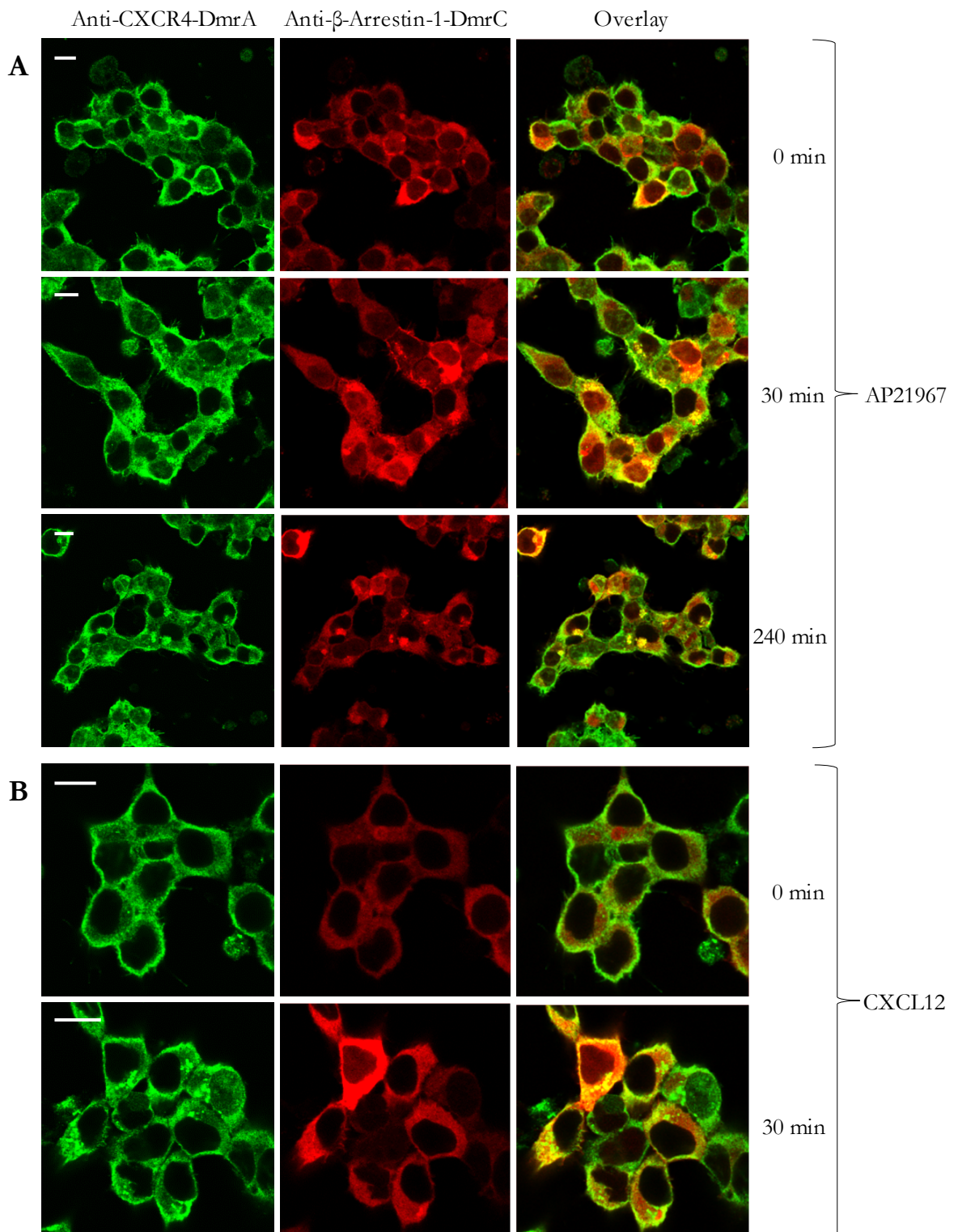


Abbildung 16: Immunfluoreszenzbasierte Darstellung der AP21967-induzierten versus CXCL12-induzierten Rezeptorinternalisierung in CXCR4-DmrA- und β -Arrestin-1-DmrC-koexprimierenden HEK-293-Zellen. CXCR4-DmrA- und β -Arrestin-1-DmrC-koexprimierende Zellen inkubierten 0 bis 240 min mit (A) AP21967 (500 nM) bzw. (B) CXCL12 (125 nM). CXCR4 wurde mit Anti-CXCR4-Antikörpern (Klon 12G5; 5 μ g/ml) und FITC-konjugierten Sekundäntikörpern (1:100) markiert (grün). β -Arrestin-1 wurde primär mit biotinylierten Anti-HA-Antikörpern (Klon 3F10; 700 ng/ml) und sekundär mit Streptavidin Alexa Fluor®647-Antikörpern (2 μ g/ml) markiert (rot). Maßstab: Längenmaß 10 μ m.

3.6.2 CCR5-DmrA-Internalisierung nach AP21967- versus CCL5-Stimulation in β -Arrestin-1-DmrC oder β -Arrestin-1R169E-DmrC-koexprimierenden Zellen

Um die CCR5-Distribution zu untersuchen sowie mögliche Unterschiede in den Internalisierungsmustern zwischen β -Arrestin-1-WT- und β -Arrestin-1R169E-exprimierenden Zellen festzustellen, wurden Immunfluoreszenzanalysen analog zu dem in 3.6.1 beschriebenen Vorgehen durchgeführt. Lokalisationen von CCR5 und β -Arrestin-1 bzw. β -Arrestin-1R169E in unstimuliertem und stimuliertem Zustand der CCR5-DmrA- und β -Arrestin-1-DmrC- bzw. β -Arrestin-1R169E-DmrC-koexprimierenden Zellen werden in Abbildung 17 und Abbildung 18 gezeigt.

In den Zelllinien mit β -Arrestin-1-DmrC-Expression war in unstimulierten Zellen eine prägnante Ringfluoreszenz erkennbar, ergänzt durch punktuelle intrazelluläre Signale (Abbildung 17; 0 min, grün). Zelllinien mit β -Arrestin-1R169E-DmrC-Expression zeigten unstimuliert zwar eine ähnliche Ringfluoreszenz (Abbildung 18; 0 min, grün), der Anteil an Rezeptoren in intrazellulären Vesikeln war jedoch größer als in den Zellen mit β -Arrestin-1-WT-Expression. β -Arrestin-1 sowie β -Arrestin-1R169E waren in unstimulierten Zellen homogen im Zytoplasma verteilt (Abbildung 17; Abbildung 18; 0 min, rot).

Nach 30 min AP21967-Inkubation zeigte sich in beiden Zelllinien eine deutlich reduzierte Membranfluoreszenz, die mit einer Zunahme von intrazellulären Rezeptoraggregationen im perinukleären Kompartiment einherging (Abbildung 17 und Abbildung 18; 30 min, grün). Die Intensität der perinukleären Rezeptoraggregate war in β -Arrestin-1R169E-DmrC-exprimierenden Zellen nach 30 min höher als in β -Arrestin-1-DmrC-exprimierenden. Nach 240 min war in beiden Zelllinien nahezu keine Ringfluoreszenz mehr detektierbar. Ebenfalls im zeitlichen Verlauf zu erkennen war, dass β -Arrestin-1 bzw. β -Arrestin-1R169E unter fortbestehendem AP21967-Stimulus zusammen mit CCR5 in vesikulären Strukturen des perinukleären Bereichs akkumulierte (Abbildung 17; Abbildung 18; 240 min, rot; 240 min, Overlay).

Nach Inkubation mit CCL5 ähnelten die CCR5-Verteilungsmuster beider Zelllinien denjenigen nach AP21967-Stimulation. Die zirkuläre membranständige Rezeptorfraktion (Abbildung 17; Abbildung 18; 0 min, grün) verteilte sich zeitabhängig zugunsten einer Akkumulation in perinukleären Vesikeln (30 min, grün). β -Arrestin-1 verblieb dabei in einem intrazellulär disseminierten Verteilungsmuster, wohingegen β -Arrestin-1R169E in geringem Ausmaß mit den CCR5-Rezeptoren koakkumulierte (Abbildung 18; 30 min, rot).

Damit wurde gezeigt, dass chemisch induzierte β -Arrestin-1-Translokation an CCR5 zu Rezeptorinternalisierung mit perinukleärem Verteilungsmuster wie nach regulärer Ligandenstimulation des Chemokinrezeptors führt. Nach AP21967-induzierter Dimerisierung koakkumulierte β -Arrestin-1 bzw. β -Arrestin-1R169E mit CCR5 in perinukleären Strukturen. Im Vergleich zum β -Arrestin-1-Wildtyp fanden sich auch nach Ligandenstimulation partielle Überlappungen zwischen β -Arrestin-1R169E und CCR5 (Abbildung 18; 30 min, Overlay).

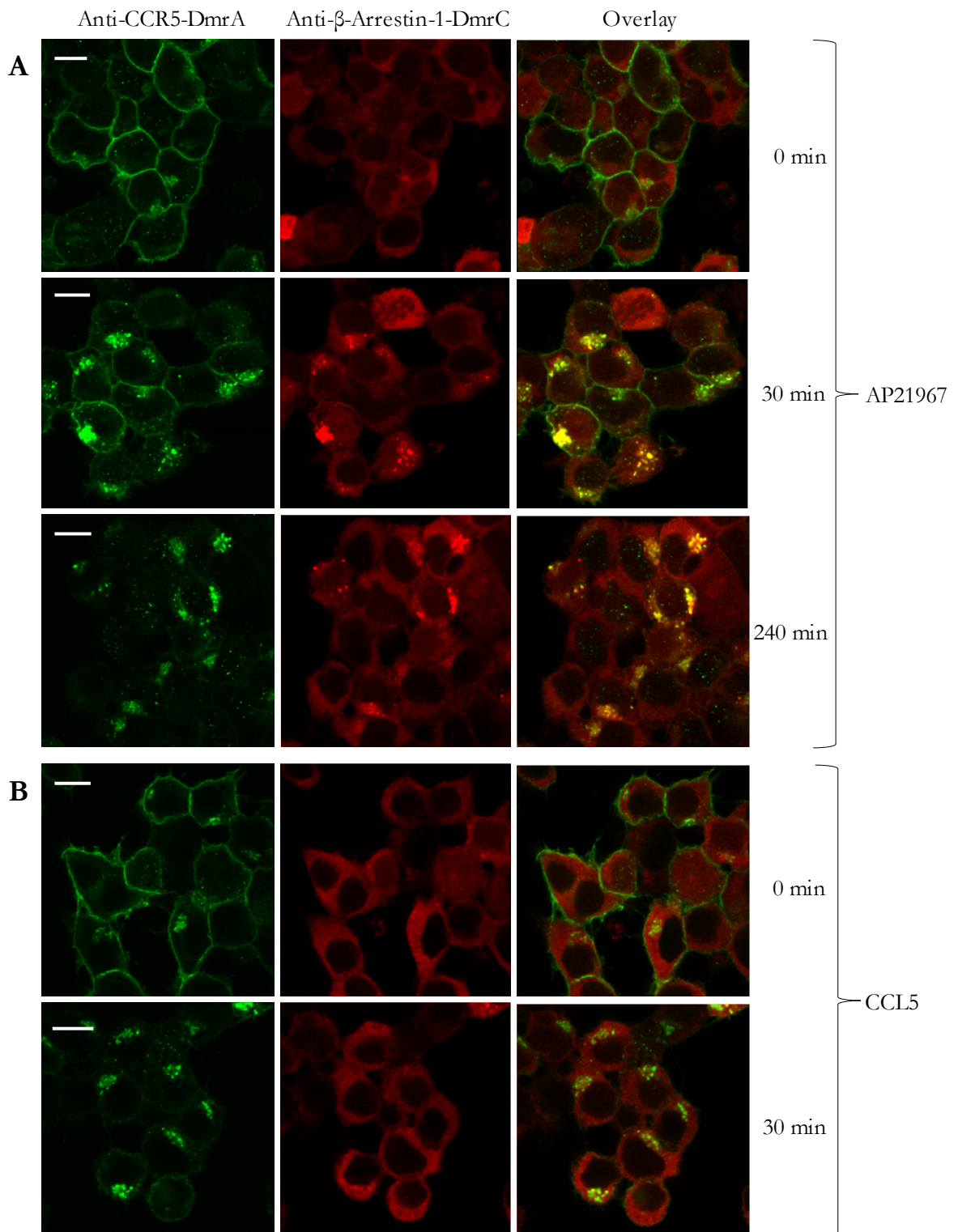


Abbildung 17: Immunfluoreszenzbasierte Darstellung der AP21967-induzierten versus CCL5-induzierten Rezeptorinternalisierung in CCR5-DmrA- und β -Arrestin-1-DmrC-koexprimierenden HEK-293-Zellen. CCR5-DmrA- und β -Arrestin-1-DmrC-koexprimierende Zellen inkubierten 0 bis 240 min mit (A) AP21967 (500 nM) bzw. (B) CCL5 (125 nM). CCR5 wurde mit Anti-CCR5-Antikörpern (Klon T21/8; 5 μ g/ml) und FITC-konjugierten Sekundärantikörpern (1:100) markiert (grün). β -Arrestin-1 wurde primär mit biotinylierten Anti-HA-Antikörpern (Klon 3F10; 700 ng/ml) und sekundär mit Streptavidin Alexa Fluor®647-Antikörpern (2 μ g/ml) markiert (rot). Maßstab: Längenmaß 10 μ m.

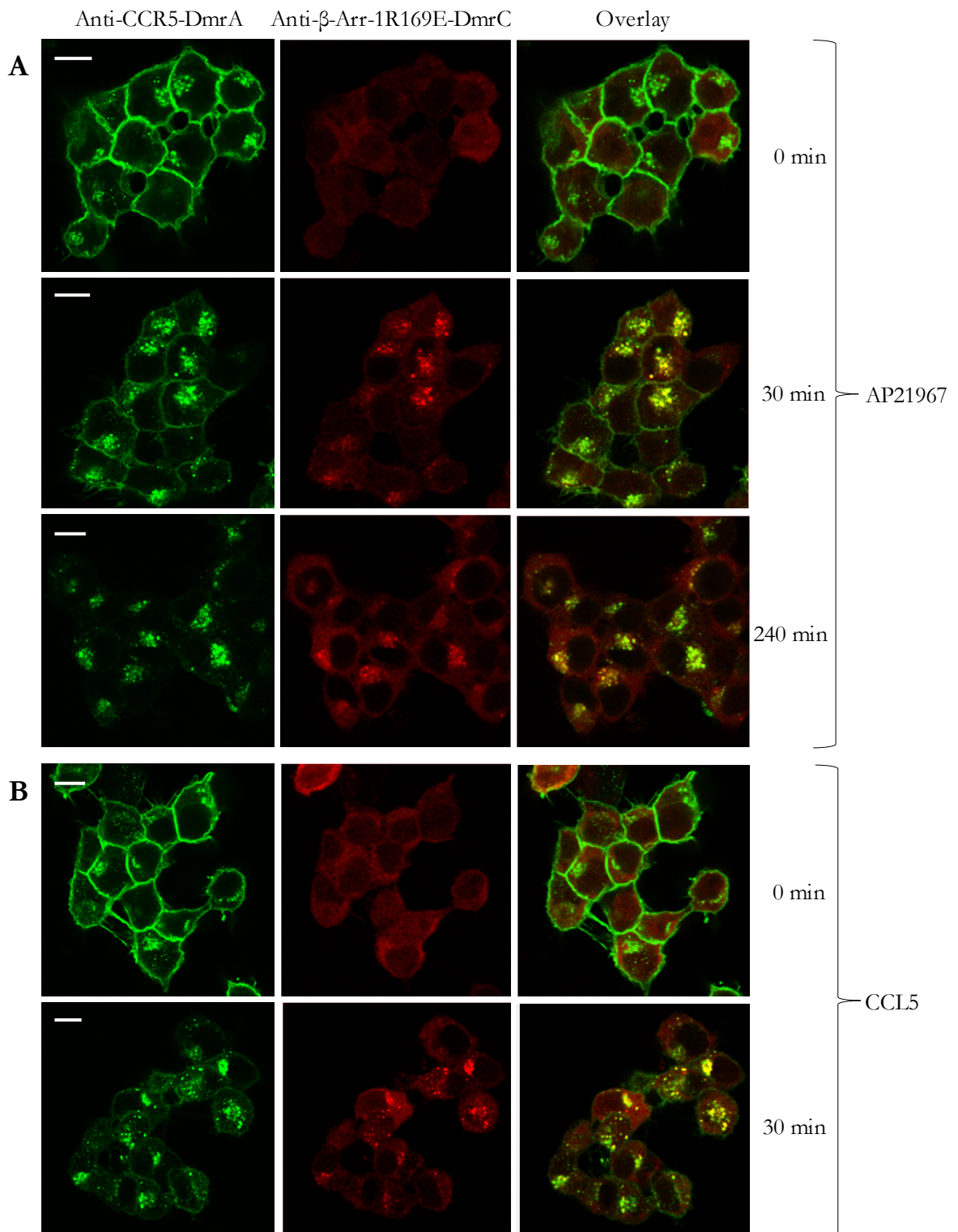


Abbildung 18: Immunfluoreszenzbasierte Darstellung der AP21967-induzierten versus CCL5-induzierten Rezeptorinternalisierung in CCR5-DmrA- und β -Arrestin-1R169E-DmrC-koexprimierenden HEK-293-Zellen. CCR5-DmrA- und β -Arrestin-1R169E-DmrC-koexprimierende Zellen inkubierten 0 bis 240 min mit (A) AP21967 (500 nM) bzw. (B) CCL5 (125 nM). CCR5 wurde mit Anti-CCR5-Antikörpern (Klon T21/8; 5 μ g/ml) und FITC-konjugierten Sekundärantikörpern (1:100) markiert (grün). β -Arrestin-1R169E wurde primär mit biotinylierten Anti-HA-Antikörpern (Klon 3F10; 700 ng/ml) und sekundär mit Streptavidin Alexa Fluor®647-Antikörpern (2 μ g/ml) markiert (rot). Maßstab: Längenmaß 10 μ m.

3.7 Einfluss der AP21967-induzierten β -Arrestin-1-Translokation an den Chemokinrezeptor auf nachgeschaltete Signalprozesse am Beispiel von MAP-Kinasen

Da β -Arrestin-1 im Zusammenhang mit vorausgegangener ligandeninduzierter G-Protein-Aktivierung an diversen Signalweiterleitungsprozessen beteiligt ist (Luttrell und Lefkowitz 2002), wurde in den nachfolgenden Versuchen der Frage nachgegangen, ob β -Arrestin-1 auch in Abwesenheit von Rezeptoraktivierung durch G-Proteine in der Lage ist, intrazelluläre Signalkaskaden zu induzieren. Dazu wurde die Aktivierung der beiden MAP-Kinasen ERK1 und ERK2 nach AP21967- sowie nach Ligandenstimulation detektiert (2.12.4). Die Phosphorylierung bzw. Aktivierung von ERK1/2 wurde mittels phosphorylierungsspezifischer Antikörper gegen p44/p42 im Immunoblot nachgewiesen (2.11.3).

3.7.1 Phosphorylierungskinetik von ERK1/2 nach AP21967-induzierter β -Arrestin-1-DmrC-Translokation

Um den Zeitpunkt der maximalen ERK1/2-Aktivierung zu bestimmen, wurden CXCR4-DmrA- und β -Arrestin-1-DmrC-koexprimierende HEK-293-Zellen 0 bis 60 min mit AP21967 inkubiert. Aktivierte ERK1/2 wurden mit Anti-phospho-p44/p42-Antikörpern im Immunoblot nachgewiesen (Abbildung 19).

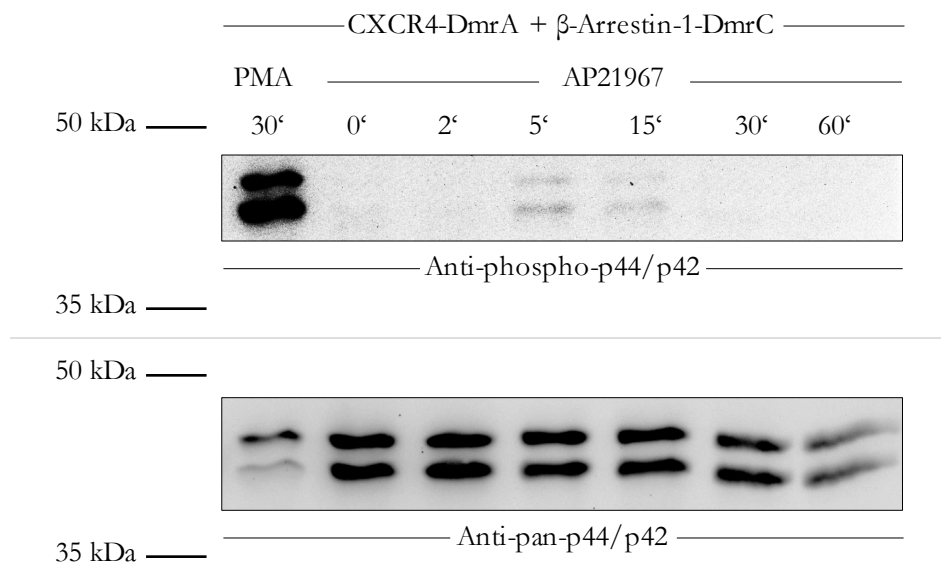


Abbildung 19: Kinetik der AP21967-induzierten ERK1/2-Phosphorylierung in CXCR4-DmrA- und β -Arrestin-1-DmrC-koexprimierenden Zellen. CXCR4-DmrA- und β -Arrestin-1-DmrC-koexprimierende HEK-293-Zellen inkubierten 0 bis 60 min mit AP21967 (500 nM, 37°C). Als Positivkontrolle diente die Stimulation mit PMA (200 nM, 30 min, 37°C). Die ERK1/2-Phosphorylierung wurde mit Anti-phospho-p44/p42-Antikörpern (Klon D13.14.E; 1:2 000) in Kombination mit HRP-gekoppelten Sekundärantikörpern (1:10 000) detektiert. Der Blot wurde gestrippt und mit Anti-pan-p44/p42-Antikörpern (Klon 137F5; 1:1 000) erneut inkubiert. Blotanalysen erfolgten mittels Chemilumineszenz.

Nach AP21967-Stimulation der Zellen mit Chemokinrezeptor-DmrA und β -Arrestin-DmrC zeigte sich nach 5 min ein geringer ERK1/2-Aktivierungsgrad, welcher bereits nach 15 min wieder an Intensität verlor. Nach 30 min sowie nach 60 min war keine zusätzliche ERK1/2-Phosphorylierung zu detektieren.

Ein Negativkontrollansatz von HEK-293-Zellen mit Expression von CCR5-DmrA ohne koexprimiertem β -Arrestin-DmrC zeigte nach 5-minütiger Stimulation mit AP21967 keine ERK1/2-Aktivierung. Damit wurde eine aktivierende ERK1/2-Phosphorylierung allein durch AP21967-Stimulation ausgeschlossen (Liebick 2015).

Somit wurde gezeigt, dass die AP21967-induzierte Translokation von β -Arrestin-1 zum Chemokinrezeptor CXCR4 zu einer schwachen zeitabhängigen Aktivierung von ERK1/2 führt. Das Aktivierungsmaximum von ERK1/2 war dabei, ähnlich wie bei der ligandenvermittelten Stimulation, nach 5 min Inkubation mit AP21967 erreicht.

3.7.2 Induzierte ERK1/2-Aktivierung in HEK-293-Zellen mit Koexpression von CXCR4-DmrA oder CCR5-DmrA und β -Arrestin-1-DmrC oder β -Arrestin-1R169E-DmrC: AP21967 versus Liganden

Um potentielle Unterschiede in der ligandenunabhängigen ERK1/2-Aktivierung von CXCR4-DmrA- bzw. CCR5-DmrA- und β -Arrestin-1-DmrC- bzw. β -Arrestin-1R169E-DmrC-koexprimierenden HEK-293-Zellen zu detektieren, wurden stabil transfizierte Zellen für 5 min bzw. 30 min mit Liganden (CXCL12 bzw. CCL5) oder AP21967 inkubiert. ERK1/2-Aktivierung wurde im Immunoblot erfasst (2.11.3).

Wie in Abbildung 20 dargestellt, zeigte keine der eingesetzten Zelllinien zum Startzeitpunkt (0 min) eine ERK1/2-Aktivierung, die über das Aktivierungsniveau in HEK-293-Wildtypzellen (A) hinausging.

Nach 5-minütiger Ligandenstimulation (CXCL12 oder CCL5) zeigten alle β -Arrestin-1-DmrC- bzw. β -Arrestin-1R169E-DmrC-überexprimierenden Zelllinien im Vergleich zu HEK-293-Wildtypzellen eine deutliche ERK1/2-Aktivierung (Abbildung 20). Nach längerer Ligandenstimulation (30 min) war keine ERK1/2-Phosphorylierung mehr zu detektieren.

Nach 5-minütiger AP21967-Stimulation zeigten CXCR4-DmrA- bzw. CCR5-DmrA- und β -Arrestin-1-DmrC-koexprimierende Zelllinien eine deutliche ERK1/2-Aktivierung im Vergleich zu HEK-293-Wildtypzellen (Abbildung 20; A, B und C). Dabei zeigte sich kein signifikanter Unterschied zwischen CXCR4-DmrA- und CCR5-DmrA-exprimierenden Zellen (Abbildung 20; B und C).

Im Vergleich zum Wildtyp zeigte die konstitutiv aktive β -Arrestin-1R169E-DmrC-Mutante keine gesteigerte ERK1/2-Aktivierung nach AP21967-Stimulation. Ebenfalls konnte keine eindeutige Aussage über eine Prolongation der ERK1/2-Aktivierung nach 30-minütiger AP21967-Stimulation getroffen werden (Abbildung 20; D).

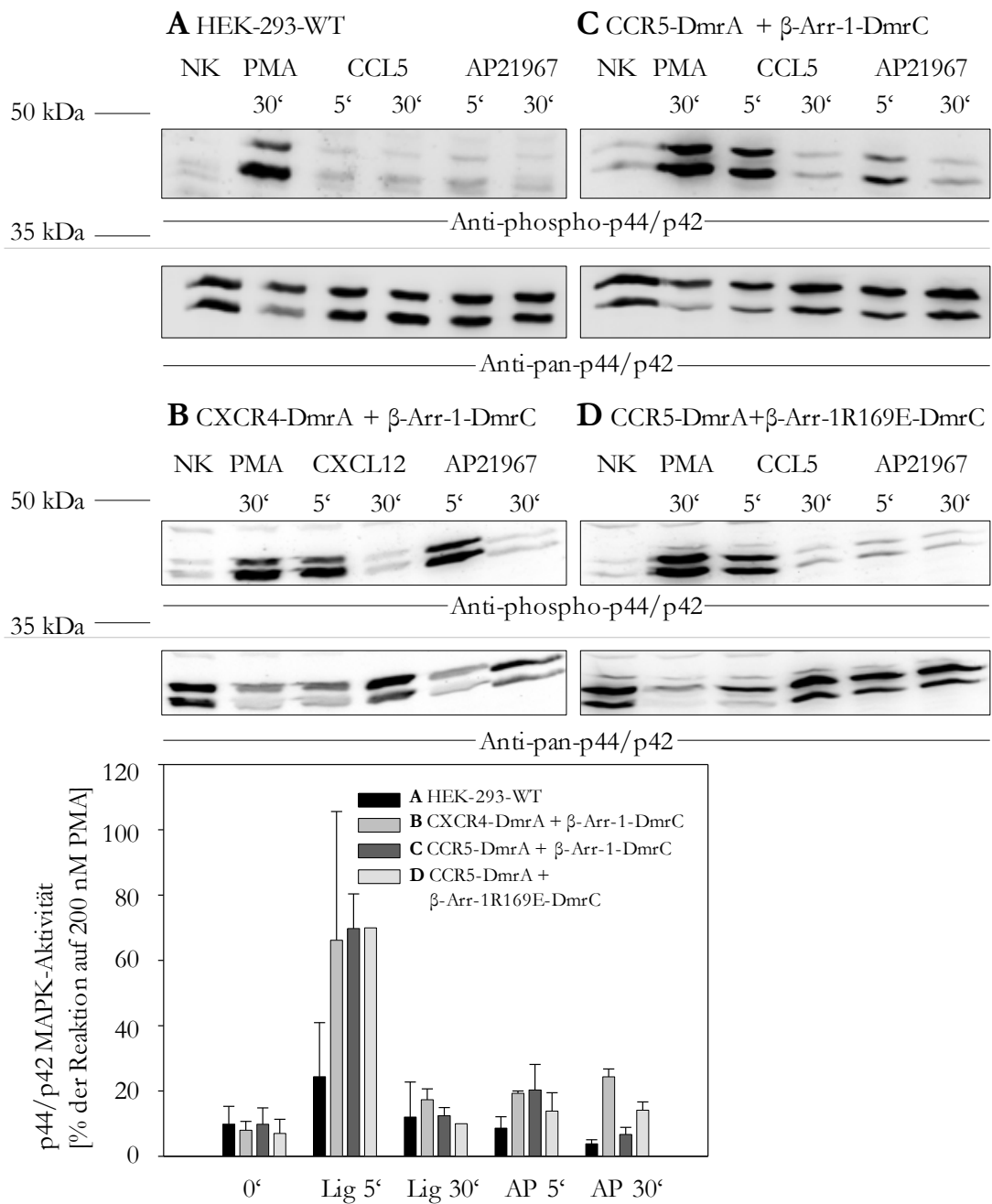


Abbildung 20: ERK1/2-Phosphorylierung nach AP21967-induzierter versus liganden-induzierter Translokation von β -Arrestin-1-DmrC bzw. β -Arrestin-1R169E-DmrC. HEK-293-Zellen mit Koexpression von CXCR4-DmrA (B) bzw. CCR5-DmrA (C) und β -Arrestin-1-DmrC (B und C) bzw. β -Arrestin-1R169E-DmrC (D) sowie HEK-293-WT-Zellen (A) wurden mit AP21967 (500 nM) oder dem Liganden CXCL12 bzw. CCL5 (50 nM) stimuliert (37°C, 5 bis 30 min). PMA-Stimulation (200 nM, 30 min) diente als Positivkontrolle. Als NK wurden HEK-293-WT-Zellen verwendet (A). Die ERK1/2-Aktivierung wurde mit phosphospezifischen Antikörpern gegen phospho-p44/p42 (Klon D13.14.E; 1:2 000) nachgewiesen. Der Blot wurde gestrippt und mit Anti-pan-p44/p42-Antikörpern (Klon 137F5; 1:1 000) inkubiert. Die Blotentwicklung erfolgte mittels Chemilumineszenz. Zur quantitativen Analyse wurde ImageJ genutzt. Dazu wurden die ermittelten Daten in Relation zur PMA-Kontrolle gesetzt (100 % Phosphorylierung). Die gezeigten Ergebnisse repräsentieren den Mittelwert \pm Standardabweichung aus drei unabhängigen Experimenten.

Die erhobenen ERK1/2-Aktivierungsdaten zeigen, dass chemisch induzierte β -Arrestin-1-Dimerisierung mit den Chemokinrezeptoren ohne vorausgegangene G-Protein-Aktivierung eine Signalweiterleitung in Form von MAP-Kinase-Aktivierung hervorruft. Beim Vergleich mit der nach Ligandenstimulation detektierbaren ERK1/2-Aktivierung war das Ausmaß des AP21967-induzierten Signals zwar signifikant vom Hintergrundniveau zu unterscheiden, insgesamt jedoch deutlich schwächer. Hinsichtlich der ERK1/2-Aktivierung zeigten sich keine Intensitätsunterschiede zwischen der β -Arrestin-1R169E-Mutante und dem β -Arrestin-1-Wildtyp.

4 Diskussion

Die Bedeutung von β -Arrestinen in der GPCR-Regulation und ihrer Funktionalität als eigenständige Signaltransduktoren hat sich im Verlauf der letzten Jahrzehnte gewandelt. Wurde β -Arrestin ursprünglich analog zum visuellen Arrestin als Gegenspieler von G-Protein-gekoppelter Aktivierung β -adrenerger Rezeptoren identifiziert, so erweiterte sich das Funktionsspektrum vom „arrestierenden“, im Sinne eines hemmenden Interventionspartners, hin zu einem modulierbar multifunktionalen Akteur, der zelluläre Prozesse ubiquitär zu beeinflussen und sogar zu steuern vermag (Wilden et al. 1986b; Benovic et al. 1987; Lohse et al. 1990; Luttrell et al. 2001; Lefkowitz und Shenoy 2005).

Seit mehr als 30 Jahren ist der desensibilisierende Einfluss von β -Arrestinen auf aktivierte GPCRs bekannt, indem Rezeptorinteraktionen mit G-Proteinen sterisch unterbunden und somit Signaltransduktionsprozesse gestoppt werden (Benovic et al. 1987; Lohse et al. 1992). Hierzu wird der ligandenaktivierte Rezeptor durch GRKs C-terminal an Serin- und Tyrosinresten phosphoryliert und zum Zielpunkt der β -Arrestin-Rekrutierung, welches seinerseits die aktivierte Konformation und Phosphorylierung des Rezeptors erkennt und selbst Konformationsänderungen im Sinne einer Aktivierung durchläuft (Krasel et al. 2005; Kara et al. 2006; Shukla et al. 2008). Als Adapterprotein ermöglicht β -Arrestin zudem im Zusammenspiel mit AP2 die Clathrin-vermittelte Rezeptorinternalisierung nach ligandeninduzierter Rezeptoraktivierung (Goodman et al. 1996).

Doch nicht allein G-Protein-abhängige Signale vermag β -Arrestin zu regulieren, sondern G-Protein-unabhängige Signalprozesse wie beispielsweise die Aktivierung von MAP-Kinasen auszulösen (Luttrell et al. 2001; Wei et al. 2003). Auf die Entdeckung der G-Protein-unabhängigen, durch β -Arrestin vermittelten Signalprozesse baute die Theorie des *biased signaling* auf. Dieser Erklärungsansatz für die distinkte Ansteuerung unterschiedlicher Signaltransduktionswege erweiterte die bisherigen Kenntnisse über GPCR-Agonisten: Spezifische Liganden führen zur Stabilisierung bestimmter Rezeptorkonformationen, die Interaktionen nur mit ausgewählten Partnern in speziellen Konformationen oder mit bestimmten GRK- oder β -Arrestin-Isoformen zulassen und so einen spezifischen Weg der nachgeordneten Signalwege unterhalb des Rezeptors favorisieren (Azzi et al. 2003; Violin und Lefkowitz 2007).

Bisherige Studien zu den β -Arrestin-vermittelten regulatorischen und signaltransduktoriischen Effekten beschäftigten sich überwiegend mit den durch β -Arrestin vermittelten Effekten in Folge von Ligandenstimulation am GPCR. Daraufhin wurde die eingangs formulierte Hypothese A aufgestellt, dass β -Arrestin-1 ohne vorausgegangene ligandeninduzierte Rezeptoraktivierung in der Lage ist, allein durch Translokation an den nicht aktivierten Rezeptor spezifische Effektorfunktionen auszuüben. Diese β -Arrestin-1-vermittelten Effekte ohne vorausgegangene ligandeninduzierte

Rezeptoraktivierung wurden in der vorliegenden Arbeit anhand drei verschiedener Parameter durch chemisch induzierte Translokation an die Chemokinrezeptoren CXCR4 und CCR5 untersucht:

1. Rezeptordesensibilisierung: Einfluss auf die intrazelluläre Kalziummobilisierung in Folge von Rezeptoraktivierung (3.4)
2. Rezeptorinternalisierung: Internalisierungsausmaß und Distribution der Interaktionspartner in zellulären Kompartimenten (3.5; 3.6)
3. Signaltransduktion: Aktivierung von MAP-Kinasen (3.7)

Die zweite Hypothese B der vorliegenden Arbeit besagte, dass die R169E-Mutation mit konstitutiv aktiver Eigenschaft des β -Arrestin-1 zu gesteigerten Effektorfunktionen führt.

Voraussetzung für eine induzierbare Translokation des nicht aktivierten β -Arrestin-1 an den Chemokinrezeptor CXCR4 bzw. CCR5 war die Etablierung eines Systems, in dem sich die Rekrutierung des β -Arrestin-1 an den Rezeptor G-Protein-unabhängig hervorrufen ließ. In diesem System würde der Rezeptor vor der β -Arrestin-1-Rekrutierung nicht durch Liganden aktiviert werden. Ein derartiges experimentelles System, in dem zwei intrazelluläre Interaktionspartner nach Zugabe eines Adaptermoleküls gezielt dimerisieren, wurde zuvor von anderen Arbeitsgruppen erprobt und eingesetzt (Terrillon und Bouvier 2004; Putyrski und Schultz 2012; DeRose et al. 2013).

Zur Ausführung der vorliegenden Funktionsstudien wurden Chemokinrezeptor-DNA und β -Arrestin-1-DNA mit den Dimerisierungsdomänen DmrA bzw. DmrC eines kommerziellen, chemisch induzierbaren Heterodimerisierungssystems fusioniert und in HEK-293-Zellen kotransfiziert (2.8; 2.10). Dabei entsprechen die Dimerisierungsdomänen den Proteinen FKBP12 und FRB, die einen ternären Komplex mit dem Rapamycinanalogon AP21967 bilden (DeRose et al. 2013; Takara Bio USA Inc. 2017). Unter Hinzugabe von AP21967 wurde zytoplasmatisch lokalisiertes β -Arrestin-1-DmrC an CXCR4-DmrA rekrutiert. Mittels Auftrennung des Zelllysates in Zytoplasma- und Membranfraktion über einen ultrazentrifugierten Sucrosegradienten mit nachfolgendem Nachweis im Immunoblot wurde die Translokation des β -Arrestin-1 an die Zellmembran gezeigt (2.11.1). In weiterführenden Experimenten kann die Annahme verifiziert werden, dass β -Arrestin-1 und Chemokinrezeptoren eine feste Bindung über das AP21967-Molekül eingehen, um miteinander interagieren zu können. Denkbar wären Nachweistechiken wie Koimmunopräzipitation oder Förster-Resonanzenergietransfer (FRET), die einen unmittelbaren Nachweis der Protein-Protein-Interaktion ermöglichen (Phizicky und Fields 1995; Eidne et al. 2002). In vorläufigen Koimmunopräzipitationsexperimenten der eigenen Arbeitsgruppe (nicht gezeigt) erwies sich die Fragilität der Transmembranrezeptor-Arrestin-Komplexe als ein experimentelles Problem. Für einen FRET-basierten Nachweis müssten zunächst Zelllinien mit Koexpression der Lumineszenzproteine etabliert werden.

4.1 Rezeptordesensibilisierung

Bislang wurden für GPCRs zwei verschiedene Arten der Rezeptordesensibilisierung beschrieben. Homologe Rezeptordesensibilisierung findet nach Agonistenstimulation der Rezeptoren mit einhergehender Aktivierung und Phosphorylierung durch GRKs und β -Arrestin-Rekrutierung statt. Hingegen vermitteln PKA oder PKC die heterologe Rezeptordesensibilisierung, indem die Rezeptorphosphorylierung nach Aktivierung anderer Rezeptoren hervorgerufen wird und somit unabhängig vom Aktivierungsstatus des zu phosphorylierenden Rezeptors stattfindet (Benovic et al. 1986; Lohse et al. 1990; Pitcher et al. 1992). Gemeinsam ist den beiden Arten die Rezeptorphosphorylierung durch Serin/Threonin-Proteinkinasen als Bedingung für die Rezeptordesensibilisierung.

Die Rezeptorphosphorylierung ist jedoch nicht unabdingbar, um desensibilisierende Effekte auszulösen. Nach Entfernung von Phosphorylierungsstellen am GPCR wird durch Ligandenstimulation zwar eine Inhibition des schnellen Anteils der Rezeptordesensibilisierung binnen Sekunden bis Minuten beobachtet, der verzögerte Anteil der Rezeptordesensibilisierung nach etwa 60 min bleibt dabei jedoch phosphorylierungsunabhängig bestehen (Bouvier et al. 1988). β -Arrestin bindet mit niedriger Affinität sogar unphosphorylierte GPCRs, wohingegen hochaffine Bindungen nur mit Agonisten-aktivierten und phosphorylierten Rezeptoren erreicht werden, was am Beispiel des β_2 -AR gezeigt wurde (Gurevich et al. 1995).

Die vorliegenden Ergebnisse dieser Arbeit belegen, dass Rezeptordesensibilisierung allein durch Translokation des β -Arrestin-1-DmrC an den Chemokinrezeptor CXCR4-DmrA bzw. CCR5-DmrA hervorgerufen wird und dabei unabhängig von ligandeninduzierter Rezeptoraktivierung und -phosphorylierung ist (3.4). Die räumliche Nähe zwischen Rezeptor und β -Arrestin-1 scheint demnach für Rezeptordesensibilisierung entscheidender als der Phosphorylierungsstatus des Rezeptors zu sein.

Diese Ergebnisse stehen im Einklang mit der Desensibilisierungstheorie, dass G-Proteine sterisch daran gehindert werden, an den Rezeptor zu binden (Lohse et al. 1992; Luttrell und Lefkowitz 2002). Angenommen, dass räumliche Konkurrenz der einzige Grund für die durch β -Arrestin-1 vermittelte Rezeptordesensibilisierung sei, könnten diverse Moleküle durch räumliche Intervention in der Lage sein, den Rezeptor zu desensibilisieren. Die Moleküle scheinen dazu jedoch eine vergleichbare Größe wie β -Arrestin-1 aufweisen zu müssen, was u. a. dadurch deutlich wird, dass wesentlich kleinere Moleküle, wie beispielsweise AP21967 allein, den Effekt bei Bindung an den Rezeptor nicht induzieren konnten (Liebick 2015). β -Arrestin-1 besitzt demnach bestimmte strukturelle Eigenschaften, die ihm einen desensibilisierenden Effekt zu eigen machen.

Bei Bindung an den ligandenaktivierten Rezeptor verändert sich β -Arrestin-1 konformationell und erreicht so eine hochaffine Bindung zum membranständigen Rezeptor (Gurevich und Benovic 1997). Neuere Erkenntnisse geben Aufschluss darüber, dass diese aktive β -Arrestin-1-Konformation zweischrittig erfolgt: Zunächst nimmt

β -Arrestin die *Tail*-Konformation ein, im Anschluss daran die *Core*-Konformation. In den zwei Phasen werden unterschiedliche Aktivitätsniveaus bezüglich der Rezeptordesensibilisierung, -internalisierung und Signaltransduktion erlangt. Dabei stellt für den desensibilisierenden Effekt der β -Arrestin-1-Rekrutierung an den GPCR nur die zweite Phase eine ausreichend enge Bindung zum Rezeptor dar (Cahill et al. 2017). Die Rezeptorendozytose und die β -Arrestin-vermittelte Signaltransduktion finden bereits in der *Tail*-Konformation statt. Gemäß aktueller Modellvorstellungen ertastet β -Arrestin-1 die C-terminalen Phosphorylierungsstellen des Rezeptors, der inaktive *polar core* im Zentrum des β -Arrestin-1 wird instabil und die C-terminale Domäne (*C-tail*) löst sich heraus, um Adapterfunktionen zu vermitteln. Eine Teilbindung zum Rezeptor und damit die sogenannte *Tail*-Konformation wird erreicht. Daraufhin findet eine Bewegung in der Scharnierregion (*interdomain hinge*) des β -Arrestin-1 statt, bei der sich N- und C-Domänen aufeinander zubewegen. Die aus β -Faltblattstrukturen bestehenden Domänen schmiegen sich dem Rezeptor an und ermöglichen einen engen Kontakt zwischen der Kernregion (*core*) des β -Arrestin-1 und den Transmembrandomänen des GPCR, in die der *finger loop* des β -Arrestin-1 hineinragt – die *Core*-Konformation ist besiegelt (Vishnivetskiy et al. 2000; Shukla et al. 2013; Shukla et al. 2014; Cahill et al. 2017).

Möglicherweise wird die β -Arrestin-1-Anlagerung an den Rezeptor in dem in dieser Arbeit verwendeten System bereits dadurch erleichtert, dass sich die DmrC-Domäne am C-terminalen Ende des β -Arrestin-1 befindet und bei Stimulation mit AP21967 bereits mit dem *C-tail* ausklappt. Dadurch könnte das β -Arrestin-1 leichter mit dem Chemokinrezeptor interagieren, ohne seine aktivierte *Core*-Konformation einzunehmen. Diese semi-aktivierte Charakteristik des β -Arrestin-1 spiegelt sich in der Teilinhibition der Kalziummobilisierung in CXCR4-DmrA- bzw. CCR5-DmrA- und β -Arrestin-1-DmrC-koexprimierenden HEK-293-Zellen nach Vorbehandlung mit AP21967 wider. Die AP21967-Stimulation erzeugt eine im Vergleich zur PTX-Stimulation weniger effektive, aber immer noch deutlich sichtbare Rezeptordesensibilisierung. Die vollständig aktive *Core*-Konformation nimmt β -Arrestin-1 demnach bei AP21967-Induktion nicht ein.

Bei genauerer Betrachtung des Versuchsaufbaus mit einstündiger AP21967-Stimulation und unter Einbeziehung der Internalisierungsergebnisse (3.5) dieser Arbeit, ist zu vermuten, dass der rezeptordesensibilisierende Effekt durch Rezeptorinternalisierung überlagert wird. Denn die internalisierten Rezeptoren sind der extrazellulären Stimulation durch Liganden nicht mehr zugänglich (Ferguson 2001). Eine klare Trennung der beiden Effekte wäre somit nicht möglich. Bei Analyse des Internalisierungsverhaltens der Chemokinrezeptoren CXCR4 und CCR5 ist festzustellen, dass nach AP21967-Stimulation stets ein Anteil der Rezeptoren an der Zelloberfläche detektierbar bleibt. Somit sind Rezeptoren kontinuierlich an der Zelloberfläche der Ligandenstimulation zugänglich. Es ist anzunehmen, dass das Ausmaß der intrazellulären Kalziummobilisierung durch eine reduzierte oberflächliche Rezeptorenanzahl wahrscheinlich nur geringfügig beeinträchtigt wird, weil von *second-messenger*-bedingter Amplifizierung intrazellulär weitergeleiteter Signale

auszugehen ist (Berridge und Irvine 1984). Beispielsweise sind physiologische CXCL12-Konzentrationen (0,17 nM) im Vergleich zu den Konzentrationen in den hier durchgeführten Versuchen (50 nM) geringer und ermöglichen dennoch Zellantworten wie Chemotaxis in einem Zellsystem ohne Rezeptorüberexpression (Sun et al. 2002; Ratajczak et al. 2010). Somit ist davon auszugehen, dass die Rezeptordesensibilisierung nicht allein ein zwangsläufig durch Rezeptorinternalisierung vermittelter Nebeneffekt ist. Vielmehr weisen weitere Einflüsse, wie die hier induzierte Rekrutierung des β -Arrestin-1 an den zellmembranständigen Rezeptor, desensibilisierende Effekte auf.

Der erste Teil der Hypothese A kann demnach verifiziert werden: Chemisch induzierte β -Arrestin-1-Translokation an die Chemokinrezeptoren CXCR4 und CCR5 vermittelt Rezeptordesensibilisierung.

4.2 Rezeptorinternalisierung

Modifikationen des Rezeptors in Form von ligandeninduzierter Aktivierung und Phosphorylierung wurden nicht nur als Auslöser und Bedingung der homologen Rezeptordesensibilisierung, sondern auch als Voraussetzung für nachfolgende Rezeptorinternalisierung verstanden (Ferguson et al. 1995; Gurevich und Benovic 1997).

In der vorliegenden Arbeit konnte jedoch gezeigt werden, dass diese Voraussetzungen bei der β -Arrestin-1-vermittelten Rezeptorinternalisierung nach AP21967-induzierter β -Arrestin-1-Translokation an den Rezeptor nicht zwingend vorliegen müssen (3.5). Bedingung für die Rezeptorinternalisierung ist demnach vielmehr die räumliche Assoziation von β -Arrestin-1 und dem Rezeptor, als vorausgegangene Rezeptoraktivierung mit konsekutiver Rezeptorphosphorylierung durch GRKs. Diese Annahme wird auch dadurch gestützt, dass β -Arrestin-1 in Assoziation zum Rezeptor als Adaptermolekül agiert. Es bringt den Rezeptor mit anderen Interaktionspartnern der Endozytosesmaschinerie wie Clathrin und AP2 in Kontakt (Goodman et al. 1996; Laporte et al. 1999). Erst das durch β -Arrestin-1 induzierte Zusammenspiel weiterer an der Internalisierung beteiligter Moleküle wie Phosphoinositiden und Dynamin ermöglicht die Endozytose der Rezeptoren in frühe Endosomen (Zhang et al. 1996; Gaidarov et al. 1999).

Wie in den durchflusszytometrischen Analysen gezeigt, sind zwischen CXCR4-DmrA und CCR5-DmrA Unterschiede im Ausmaß der AP21967-induzierten und ligandeninduzierten Rezeptorinternalisierung erkennbar (3.5.1; 3.5.2). Während in den CCR5-DmrA-koexprimierenden Zellen AP21967 und CCL5 ähnliche Internalisierungsausmaße erzielten, fiel das Ausmaß der durch CXCL12 vermittelten CXCR4-DmrA-Internalisierung deutlich größer aus. Dieses Phänomen beruht auf der Zugehörigkeit von CXCR4 zu Klasse B-Rezeptoren und CCR5 zu Klasse A-Rezeptoren (Marchese und Benovic 2001; Mueller et al. 2002). Das erweiterte Internalisierungsausmaß CXCL12-stimulierter CXCR4-DmrA-Rezeptoren lässt sich dadurch erklären, dass Klasse B-Rezeptoren nach Internalisierung eine stabilere und länger bestehende Bindung mit β -Arrestinen eingehen als Klasse A-

Rezeptoren (Oakley et al. 1999; 2000). Der Unterschied in der Bindungsdauer und daraus resultierender Rezeptordistribution ist nicht dem β -Arrestin-1, sondern den Rezeptor eigenen C-terminalen Sequenzen geschuldet (Oakley et al. 2000). Modifikationen wie De-/Ubiquitylierung von Rezeptor und β -Arrestin sowie De-/Phosphorylierungsprozesse am β -Arrestin sind darüber hinaus an der Regulation von Stabilität und Dissoziation des Rezeptor- β -Arrestin-Komplexes beteiligt (Lin et al. 1997; Shenoy et al. 2001; Shenoy et al. 2009).

Interessanterweise wurden diese rezeptorklassenspezifischen Effekte nach Stimulation der Zellen mit AP21967 nicht beobachtet. Wie gezeigt, internalisieren CXCR4-DmrA-Rezeptoren nach AP21967-Stimulation in geringerem Ausmaß als nach CXCL12-Stimulation (3.5.1). Das Ausmaß der AP21967-induzierten CXCR4-Internalisierung ist jedoch mit demjenigen der AP21967-induzierten CCR5-Internalisierung vergleichbar. Die Bindungsdauer und Bindungsaffinität zwischen Rezeptor und β -Arrestin-1 scheint demnach durch die Dimerisierungscharakteristik des AP21967-Moleküls in Verbindung mit DmrA und DmrC bestimmt zu werden (DeRose et al. 2013).

Das Rezeptorinternalisierungsausmaß wird zudem auch durch die Konformation des β -Arrestin-1 beeinflusst: Im ligandeninduzierten Prozess der Rezeptorinternalisierung durchläuft das an den Rezeptor rekrutierte β -Arrestin konformationelle Veränderungen, in deren Folge eine hochaffine Bindung entsteht (Charest et al. 2005; Shukla et al. 2014). Im Hinblick auf die Frage, ob die Rezeptorinternalisierung gesteigert werden könnte, indem anstelle des Wildtyp- β -Arrestin-1 eine Mutante mit konstitutiv aktiver Eigenschaft eingesetzt würde (Kovoor et al. 1999), bestätigen sich folgende Annahmen: Zelllinien mit Koexpression von CCR5-DmrA und β -Arrestin-1R169E-DmrC zeigen im Vergleich zur Wildtyp- β -Arrestin-1-DmrC-Zelllinie sowohl nach AP21967- als auch nach Ligandenstimulation tatsächlich eine gesteigerte Rezeptorinternalisierung (3.5.3). Die Internalisierung erfolgt zum einen schneller als in β -Arrestin-1-Wildtypzellen und überschreitet zum anderen das Maximum der Internalisierung (65 %) jenes der β -Arrestin-1-Wildtypzelllinie (45 %).

Diese Ergebnisse können darauf zurückgeführt werden, dass β -Arrestin-1R169E eine höhere Affinität zum Rezeptor aufweist als β -Arrestin-1-WT (Gray et al. 2003; Carter et al. 2005). Je affiner die Bindung zwischen β -Arrestin-1 und dem Rezeptor ist, desto größer ist das Ausmaß der Rezeptorinternalisierung. Zudem spielt auch die Adapterfunktion in den gesteigerten Internalisierungseffekt hinein. Die präaktivierte β -Arrestin-1R169E-Mutante bindet die β -Adaptin-Untereinheit von AP2 mit höherer Affinität als β -Arrestin-WT und stellt dadurch einen sicheren Kontakt zur Endozytosemaschinerie her (Milano et al. 2002). Vor dem Hintergrund gesteigerter Rezeptorinternalisierung durch die β -Arrestin-1R169E-Mutante ist anzunehmen, dass nicht allein die Rezeptorklasse ausschlaggebend für die Bindungscharakteristik von β -Arrestin-1 und Rezeptor sowie für das Ausmaß der

Internalisierung ist, sondern auch spezifische Konformationseigenschaften des β -Arrestin-1 (Oakley et al. 1999).

An V2R wurde gezeigt, dass die Ausbildung der *Core*-Konformation des β -Arrestin-1 mit einhergehendem Kontakt zwischen dem *finger loop* des β -Arrestin-1 und den Transmembrandomänen des GPCR zu stärker ausgeprägter Kolokalisation des Rezeptors und des β -Arrestin-1 in frühen Endosomen führt, als es die *Tail*-Konformation ermöglicht (Cahill et al. 2017). Der konformationsbedingt gesteigerten Rezeptorinternalisierung könnte die gesteigerte Affinität der präaktivierten β -Arrestin-1R169E-Mutante zu Clathrin und AP2 im Vergleich zum inaktiven β -Arrestin-1-WT zugrunde liegen (Kim und Benovic 2002). Darüber hinaus ist nicht zu vernachlässigen, dass die Bindung zwischen β -Arrestin-1 und dem Rezeptor auch durch Dephosphorylierungs- und Ubiquitylierungsprozesse bestimmt wird (Lin et al. 1997; Ferguson et al. 1998; Shenoy et al. 2001; Lin et al. 2002; Marchese et al. 2003).

Hinsichtlich der Frage, ob die β -Arrestin-1-Konformation Einfluss auf die intrazelluläre Rezeptordistribution der internalisierten Rezeptoren nimmt, wurden in dieser Arbeit folgende Feststellungen getroffen: Immunfluoreszenzbasierte Internalisierungsassays zeigen erwartete Rezeptorinternalisierungsmuster sowohl für CXCR4-DmrA- als auch für CCR5-DmrC-exprimierende β -Arrestin-1-Zelllinien nach AP21967-induzierter sowie ligandeninduzierter Rezeptorinternalisierung. CXCR4-Rezeptoren, der Klasse B zugehörig, sind durch β -Arrestin-1 vermittelte Internalisierung lysosomal lokalisiert und werden nach Ubiquitylierung durch AIP4 überwiegend degradiert (Marchese und Benovic 2001; Marchese et al. 2003; Malik und Marchese 2010). Demgegenüber sind internalisierte CCR5-Rezeptoren, die der Klasse A zugeordnet werden, nach Dissoziation vom β -Arrestin in Zellmembrannähe vornehmlich in distinkten perinukleären Kompartimenten lokalisiert und durchlaufen einen dephosphorylierenden Recyclingprozess, sodass sie in resensitiverter Form erneut an der Zelloberfläche exprimiert werden (Krueger et al. 1997; Mueller et al. 2002; Pollok-Kopp et al. 2003).

Wie in den Immunfluoreszenzanalysen (3.6) dargestellt, ähnelt die AP21967-induzierte Rezeptordistribution hinsichtlich der intrazellulären Rezeptorlokalisierung der ligandeninduzierten Verteilung sowohl in CXCR4-DmrA- als auch in CCR5-DmrA- und β -Arrestin-1-DmrC- bzw. β -Arrestin-1R169E-DmrC-koexprimierenden HEK-293-Zellen. Trotz veränderter Bindungsaffinitäten durch Stimulation mit AP21967 oder durch Einsatz der β -Arrestin-1R169E-Mutante ändern sich die intrazellulären Verteilungsmuster der Rezeptoren nicht. Dies lässt darauf schließen, dass die Rezeptorklassendeterminierung von C-terminalen Motiven innerhalb der Rezeptorsequenz abhängt (Oakley et al. 1999).

Zwar zeigten die Zelllinien mit β -Arrestin-1R169E-DmrC-Expression gegenüber β -Arrestin-1-WT-DmrC keine veränderten Rezeptordistributionsmuster nach ligandeninduzierter oder AP21967-induzierter Rezeptorinternalisierung, jedoch wurde eine konstitutive Rezeptorinternalisierung in unstimulierten Zellen nachgewiesen (3.6.2). Die

präaktivierte Konformation des β -Arrestin-1R169E-DmrC führt deshalb vermutlich durch spontane affinitätsgesteigerte Bindung an den CCR5-DmrA-Rezeptor zu dessen Internalisierung, ohne dass der Rezeptor aktiviert wird oder die Translokation des β -Arrestin-1R169E induziert werden muss. Demnach hat die gesteigerte Bindungsaffinität zwischen β -Arrestin-1R169E und den Chemokinrezeptoren zwar Einfluss auf das Internalisierungsausmaß, nicht jedoch auf die Rezeptordistribution in intrazelluläre Kompartimente.

Die AP21967-induzierte Rezeptorinternalisierung ging sowohl in CXCR4-DmrA- als auch in CCR5-DmrA-exprimierenden Zelllinien mit einer im Vergleich zur ligandeninduzierten Internalisierung gesteigerten Akkumulation von β -Arrestin-1 einher (3.6.1; 3.6.2). So wurden im Overlaymodus der Immunfluoreszenzanalysen Überlappungen in der Akkumulation von Chemokinrezeptoren und β -Arrestin-1 bzw. β -Arrestin-1R169E nach AP21967-Stimulation gezeigt. Darüber hinaus wiesen Zelllinien mit β -Arrestin-1R169E auch nach Ligandenstimulation mit CCL5 derartige Kollokationen von CCR5-Rezeptoren und β -Arrestin-1R169E auf. Dies legt die Bedeutung der (prä)aktivierten β -Arrestin-1-Konformation für eine prolongierte Bindung zwischen β -Arrestin-1 und dem Chemokinrezeptor nahe.

Wider Erwarten konnte eine vergleichbare β -Arrestin-1-Akkumulation nicht nach ligandeninduzierter CXCR4-Internalisierung beobachtet werden (3.6.1), obwohl sich nach Oakley et al. (1999) Klasse B-Rezeptoren nach Internalisierung für längere Zeit mit β -Arrestin-1 in einem Komplex befinden sollten. Diese Feststellung steht im Kontrast zu AP21967-induzierten durch β -Arrestin-2 vermittelten Effekten in V2R-exprimierenden HEK-293-Zellen (Terrillon und Bouvier 2004): β -Arrestin-2 kollokalisiert mit V2R sowohl nach Ligandeninduktion als auch nach AP21967-Induktion. Terrillon und Bouvier etablierten das Heterodimerisierungssystem mit der DmrC-Domäne am N-Terminus des β -Arrestin-2, was möglicherweise die agonisteninduzierte Rekrutierung des β -Arrestin-2 an V2R mit Ausbildung der *Tail*-Konformation weniger beeinflusst als es die C-terminal angefügte DmrC-Domäne am β -Arrestin-1 der vorliegenden Arbeit tat. Die natürliche Bindung zwischen DmrC- β -Arrestin-2 und V2R-DmrA kann vermutlich ungehindert fortbestehen.

Im Gegensatz zur Rezeptordistribution konnten rezeptorklassenbedingte Unterschiede der β -Arrestin-1-Lokalisation nach ligandeninduzierter Rezeptorinternalisierung in den Immunfluoreszenzanalysen nicht bestätigt werden. In dieser Hinsicht ist zu beachten, dass die immunfluoreszenzbasierten Bilder nur begrenzt aussagekräftig sind, da die konfokalmikroskopischen Aufnahmen eine limitierte Auflösung haben. Hinzu tritt, dass das homogene Farbsignal des überexprimierten β -Arrestin-1 ubiquitär im Zytoplasma vorhanden ist und die Abgrenzung distinkter Akkumulationen des β -Arrestin-1 erschwert.

Zusammenfassend ist festzuhalten, dass sich der zweite Teil der eingangs formulierten Hypothese A zwar bestätigt, jedoch differenzierter zu betrachten ist: Chemisch induzierte

β -Arrestin-1-Translokation an die Chemokinrezeptoren CXCR4 und CCR5 vermittelt Rezeptorinternalisierung und Rezeptordistribution in die zuvor bekannten klassenspezifischen Kompartimente. Die Kolo-kalisation der β -Arrestin-1-Proteine mit dem Rezeptor wird durch AP21967-Induktion rezeptorklassenunabhängig verstärkt. Chemisch induzierte β -Arrestin-1-Translokation erreicht das ligandeninduzierte Internalisierungsausmaß vom Klasse A-Rezeptor CCR5, jedoch nicht das vom Klasse B-Rezeptor CXCR4.

Die Hypothese B wird dahingehend bestätigt, dass die chemisch induzierte Translokation der β -Arrestin-1R169E-Mutante ein gesteigertes Rezeptorinternalisierungsausmaß aufweist. Darüber hinaus haben unstimulierte Zellen einen größeren präinternalisierten Rezeptoranteil.

4.3 Signaltransduktion

Neben regulatorischen Funktionen übernehmen β -Arrestine Aufgaben in der intrazellulären Signalweiterleitung, die ursprünglich über die Aktivierung von MAP-Kinasen entdeckt wurden (Daaka et al. 1998; Wei et al. 2003). Vor dem Hintergrund der bereits erwähnten Theorie des *biased signaling* sind die Einflüsse der durch G-Proteine und β -Arrestine vermittelten Signalweiterleitungen vielschichtiger und komplexer als vormals angenommen und treten zunehmend auch in den Fokus pharmakologischer Forschung (Reiter et al. 2012; Rajagopal et al. 2013; Kenakin 2014). Signaltransduktion scheint nicht länger ein unidimensionaler Prozess zu sein, in dem nach Rezeptoraktivierung ein bestimmter Signalweg eingeschlagen und in der gesamten Zelle amplifiziert oder gestoppt wird.

β -Arrestine übernehmen dabei wichtige Funktionen und ermöglichen mehr als nur eine einfache Alternative zu der durch G-Proteine vermittelten Signalweiterleitung. Laut Smith et al. (2018) ist *biased signaling* nicht länger als „Entweder-Oder“-Prinzip zu verstehen. β -Arrestine sind vielmehr sogenannte *multistate allosteric microprocessors*, die Signale spezifischer Liganden in Form distinkter struktureller Informationen weiterleiten und in ein konkretes funktionelles *output* umwandeln (Smith et al. 2018). Unterschiedliche β -Arrestin-Konformationen ermöglichen divergierende intrazelluläre Signalweiterleitungen (Shukla et al. 2008; Reiter et al. 2012; Gurevich und Gurevich 2014). Daran beteiligt sind Muster aus Phosphopeptidresten am Rezeptor, die wie ein Barcode angeordnet sind und einen stabilisierenden Effekt auf bestimmte Konformationen des gebundenen β -Arrestins haben. In Folge dessen wird ein *biased downstream signaling* im Sinne eines definierten Signalweiterleitungsweges ermöglicht (Yang et al. 2015). Auf Ebene der durch β -Arrestin vermittelten Signaltransduktion entsteht durch isoformabhängig differenzierende Signalweiterleitungen eine weiterreichende Komplexität (DeFea 2008; Srivastava et al. 2015).

MAP-Kinasen sind bekannte Zielstrukturen der durch G-Proteine und durch β -Arrestine vermittelten Signaltransduktion (Daaka et al. 1998; Lefkowitz und Shenoy 2005). Am

konkreten Beispiel der ERK1/2-Aktivierung wurde gezeigt, dass diese nicht allein ligandenabhängig und damit G-Protein-vermittelt induziert werden kann, sondern bereits durch Translokation von β -Arrestin-1 an die unstimulierten Chemokinrezeptoren CXCR4 und CCR5 erfolgt.

Die ERK1/2-Aktivierung kann durch Ansteuerung verschiedener Signalkaskaden erfolgen, deren gemeinsame Endstrecke in der konsekutiven Aktivierung von Raf, MEK und ERK1/2 mündet (Crespo et al. 1994; Chang et al. 2003). Als *scaffold* für den aktivierten Rezeptor, Raf, MEK und ERK1/2 erleichtert β -Arrestin die Aktivierung von ERK1/2. Ferner agiert β -Arrestin als c-Src-Adapter und stellt somit die Verknüpfung zur klassischen durch G-Proteine vermittelten ERK1/2-Phosphorylierung nach Ca^{2+} -induzierter PKC- mit einhergehender Ras-Aktivierung her (Luttrell et al. 1997; Miller et al. 2000; Luttrell et al. 2001). Die Vermutung, dass bereits die Komplexbildung allein eine Aktivierung der MAPK-Signalkaskade zur Folge hat, liegt nahe. Jedoch wird diese Kaskade nicht aktiviert, solange sich der Komplex frei im Zytoplasma befindet. Dass Rezeptorendozytose für ERK1/2-Aktivierung notwendig sei, wurde widerlegt, indem ERK1/2-Aktivierung nach chemisch induzierter β -Arrestin-2-Translokation an die Zellmembran ohne Kontakt zu einem GPCR gezeigt wurde (DeFea et al. 2000; Terrillon und Bouvier 2004). Diese These kann nun zu Teilen auf die β -Arrestin-1-Isoform übertragen werden. Denn wie gezeigt, wird ERK1/2 durch Translokation von β -Arrestin-1 an die Chemokinrezeptoren CXCR4 und CCR5 aktiviert.

Im Vergleich zu Ergebnissen von Terrillon und Bouvier (2004) fielen in dieser Arbeit Unterschiede hinsichtlich der zeitlichen Dimension der AP21967-induzierten ERK1/2-Aktivierung auf: Die AP21967-induzierte durch β -Arrestin-1-DmrC vermittelte ERK1/2-Aktivierung in Zellen mit CXCR4-DmrA bzw. CCR5-DmrA-Koexpression trat im Vergleich zu den durch DmrC- β -Arrestin-2 vermittelten Effekten in HEK-293-Zellen mit Überexpression von V2R (20 bis 30 min) bereits früher auf (5 min) und zeigte keine vergleichbare späte Komponente (Terrillon und Bouvier 2004). Ligandeninduzierte und AP21967-induzierte ERK1/2-Aktivierungen unterschieden sich in CXCR4-DmrA bzw. CCR5-DmrA- und β -Arrestin-1-DmrC-koexprimierenden Zelllinien zeitlich nicht voneinander und traten nach 5 min AP21967- oder Ligandenstimulation auf (3.7).

Eine ähnlich frühe β -Arrestin-2-vermittelte ERK1/2-Aktivierung mit einem Maximum nach 5 bis 10 min wurde auch in ligandenstimulierten Zellen mit Überexpression des $\text{AT}_{1\text{A}}\text{R}$ nach PKC-Inhibition und Blockade von G-Protein-Bindung am Rezeptor gezeigt (Ahn et al. 2004b). Dabei konnten zwischen der durch G-Proteine vermittelten und der durch β -Arrestin-2 vermittelten ERK1/2-Aktivierung zusätzlich Unterschiede in der räumlichen Dimension im Sinne einer Ansteuerung bestimmter Zellkompartimente festgestellt werden: Im Vergleich zu der G-Protein-vermittelten ERK1/2-Aktivierung war die β -Arrestin-2-vermittelte Komponente auf das Zytoplasma beschränkt und beinhaltete keine nukleäre ERK1/2-Translokation mit einhergehender Transkriptionsaktivierung

(DeFea et al. 2000; Ahn et al. 2004b). Diese Erkenntnisse von Ahn et al. wurden insofern erweitert, als dass Unterschiede im ERK1/2-Aktivierungsverhalten der zwei β -Arrestin-Isoformen festgestellt wurden: β -Arrestin-1 zeigte hinsichtlich der ERK1/2-Aktivierung in AT_{1A}R-überexprimierenden HEK-293-Zellen eine antagonistische Funktion und inhibierte selbige sogar (Ahn et al. 2004a). Allerdings sind in Zusammenschau mit anderen Ergebnissen der eigenen Arbeitsgruppe vergleichbare isoformabhängige Unterschiede in Zellen mit CXCR4- oder CCR5-Koexpression nicht feststellbar (Liebick 2015; Liebick et al. 2017).

Neuere Erkenntnisse über endosomal lokalisierte Signalweiterleitungen ergänzen die Erkenntnisse im Bereich der zeitlich zu trennenden Signalwege. Anhand verschiedener Rezeptoren konnte gezeigt werden, dass G-Protein-abhängige Signale nicht allein von zellmembranständigen Rezeptoren ausgelöst werden können, sondern auch von bereits internalisierten Rezeptoren, die vermeintlich als desensibilisiert galten (Calebiro et al. 2009). Die Kopplung an Untereinheiten von G-Proteinen ist somit auch in subzellulären Kompartimenten möglich und wird durch die synergistische Adapterfunktion des β -Arrestins erleichtert. Auf diese Weise können zweiteilige Signalwellen entstehen, die sich zeitlich und räumlich voneinander unterscheiden (Feinstein et al. 2013; Wehbi et al. 2013).

Diese Hinweise auf zeitlich und räumlich unterschiedlich koordinierte Signalweiterleitungen deuten auf noch unvollständig geklärte Mechanismen einer modifizierbaren Signalweiterleitung in der Zelle hin (Irannejad et al. 2013; Irannejad und von Zastrow 2014). Verallgemeinernde Zuordnungen der frühen ERK1/2-Aktivierung binnen 0 bis 5 min zu einer durch G-Proteine vermittelten Phase und späterer ERK1/2-Aktivierung nach mehr als 5 min zu einer durch β -Arrestin vermittelten Phase sind nicht eindeutig möglich. Zum Teil sind derartige Zuordnungen der durch β -Arrestin vermittelten ERK1/2-Aktivierung zu definierten zeitlichen Phasen widersprüchlicher Art: ERK1/2-Aktivierung kann sowohl vor als auch nach der durch G-Proteine vermittelten Komponente stattfinden (Ahn et al. 2004b; Gesty-Palmer et al. 2006; Gong et al. 2008; Luo et al. 2008). Variablen wie das gewählte Rezeptorsystem, der eingesetzte Ligand, die β -Arrestin-Isoform und der Zellinentyp erschweren einen Vergleich der Ergebnisse untereinander, verdeutlichen aber die Komplexität der Theorie des *biased signaling* (Ahn et al. 2004a; Violin und Lefkowitz 2007; Drake et al. 2008).

Inzwischen wurde die G-Protein-Unabhängigkeit der durch β -Arrestin vermittelten ERK1/2-Aktivierung in Frage gestellt. Die Forschungsgruppe um Grundmann konnte mittels CRISP/Cas9-Methode in HEK-293-Zellen zeigen, dass die β -Arrestin-vermittelte ERK1/2-Aktivierung in vollständiger G-Protein-Abwesenheit durch genetische Deletion nicht stattfindet, wohingegen die Rezeptorinternalisierung nach wie vor funktioniert (Grundmann et al. 2018). β -Arrestin-Abhängigkeit ist laut Luttrell et al. (2018) allerdings nicht mit G-Protein-Unabhängigkeit gleichzusetzen. Selbst wenn die G-Proteine ein elementarer Bestandteil zur Vermittlung jeglicher ERK1/2-Aktivierungspfade sein sollten,

so zeigen β -Arrestin-Knockout-Versuche wie einflussreich und einzigartig die durch β -Arrestin vermittelten *Scaffold*- und Regulationsfunktionen in der zelllinienspezifischen Signaltransduktion sind: Je nach Rezeptor oder Zelllinie verstärken oder reduzieren β -Arrestine die ERK1/2-Signalintensität, indem sie G-Protein-abhängige ERK1/2-Aktivität dämpfen und eigens vermittelte ERK1/2-Aktivität in spezifischen Kompartimenten lokalisieren (Luttrell et al. 2018).

Die vorliegenden ERK1/2-Aktivierungsergebnisse dieser Arbeit zeigten im Immunoblot Intensitätsunterschiede zwischen ligandeninduzierter und AP21967-induzierter ERK1/2-Phosphorylierung (3.7.1). Die AP21967-induzierte β -Arrestin-1-DmrC-Translokation erreichte keine so robuste ERK1/2-Aktivierung wie durch CXCR4-DmrA- bzw. CCR5-DmrA-Ligandenstimulation. Eine Erklärung durch isoformbedingte Unterschiede des ERK1/2-Aktivierungsausmaßes wurde bereits widerlegt (Cheng et al. 2000). Die vorliegende Arbeit bestätigt in Zusammenschau mit Daten der eigenen Arbeitsgruppe für die Translokation beider β -Arrestin-Isoformen an die Chemokinrezeptoren CXCR4 und CCR5 vergleichbar starke ERK1/2-Aktivierungseffekte, die jedoch weniger robust als ligandeninduzierte ERK1/2-Aktivierung waren (Liebick 2015; Liebick et al. 2017).

Eine mögliche Erklärung für die weniger robust ausgeprägte AP21967-induzierte ERK1/2-Aktivierung liegt in stöchiometrischen Gegebenheiten der transfizierten Zelllinien (CXCR4-DmrA bzw. CCR5-DmrA in Kombination mit β -Arrestin-1 bzw. β -Arrestin-1R169E). Da nicht bekannt ist, welches quantitative Verhältnis transfizierte β -Arrestin-1-Proteine und Chemokinrezeptorproteine zueinander aufwiesen, ist folgende Überlegung anzustellen: Falls ein deutliches Ungleichgewicht zugunsten des β -Arrestin-1 vorgelegen haben sollte, wäre es möglich, dass freies (nicht an den Rezeptor gebundenes) β -Arrestin-1 die nachgeschalteten intrazellulären Interaktionspartner (MAP-Kinasen) gebunden hat und somit sterisch derartig interferierte, dass Chemokinrezeptor-DmrA- β -Arrestin-DmrC-Komplexe nach AP21967-Stimulation keine Effektorfunktionen mehr auslösen konnten, da die notwendigen Interaktionspartner fehlten. In dieser Theorie wären die überschüssigen freien β -Arrestine in ihren Eigenschaften mit einer dominant-negativen Mutante vergleichbar.

Eine Punktmutation (Arg307Ala) im β -Arrestin-1 verhindert bereits die Bindung von Raf und damit die ERK1/2-Aktivierung (Coffa et al. 2011a). Möglicherweise erschwert die angefügte DmrC-Domäne am C-Terminus des β -Arrestin-1 die Bindung von Raf, MEK oder ERK1/2 (Luttrell et al. 2001; Coffa et al. 2011a). Für die gleiche DmrC-Domäne in N-terminaler Position des β -Arrestin-2 wurde im Zusammenhang mit dem V2R keine vergleichbare Auffälligkeit beschrieben (Terrillon und Bouvier 2004).

Hinweise darauf, dass die Rezeptorbindung des β -Arrestins mit einhergehender Konformationsänderung Einfluss auf dessen ERK1/2-Bindungsfähigkeit hat, führten zu der Frage, ob die konstitutiv aktive β -Arrestin-1R169E-Mutante eine gesteigerte ERK1/2-Aktivierung zeigen würde, weil sie bereits in der präaktivierten Konformation

vorliegt, die sich gewöhnlich nach Bindung an den aktivierten Rezeptor ausbildet. Bekannt ist, dass ERK1 und ERK2 höhere Affinitäten zu rezeptorgebundenem aktiviertem β -Arrestin als zu zytosolischem inaktivem β -Arrestin aufweisen (Coffa et al. 2011b).

In HEK-293-Zellen mit Koexpression von CCR5-DmrA und der β -Arrestin-1R169E-Mutante führte die AP21967-Stimulation wider Erwarten zu keiner Steigerung der ERK1/2-Aktivierung im Vergleich zu Zellen mit β -Arrestin-1-WT-Expression (3.7.2). Im Gegensatz zur Rezeptorinternalisierung hatte die präaktivierte β -Arrestin-1-Konformation hinsichtlich der ERK1/2-Aktivierung keine effektsteigernde Funktion. Damit scheint die präaktivierte Konformation keinen Einfluss auf die MAPK-Aktivierung durch β -Arrestin-1 zu nehmen. Auch die Interaktionsweise von β -Arrestin-2 mit einer anderen MAP-Kinase spricht für diese Annahme: β -Arrestin-2 in inaktiver Konformation bindet JNK3 und aktiviert diese sogar, ohne dabei eine aktive Konformation anzunehmen (McDonald et al. 2000; Miller et al. 2001; Song et al. 2006). Die Induktion räumlicher Nähe zwischen dem nicht aktivierten Adaptermolekül β -Arrestin-1 und Chemokinrezeptoren kann β -Arrestin-1-vermittelte Signaltransduktion auslösen. Dass jedoch die GPCR-Aktivierung durch Liganden zu robusterer ERK-Aktivierung führt, ist dabei nicht außer Acht zu lassen. Möglicherweise ist die vollständige Aktivierung des β -Arrestins dafür notwendig. Wahrscheinlich ist aber die Amplifikation des durch G-Proteine vermittelten ERK1/2-Signals effektiver, als diejenige, die durch β -Arrestin vermittelt wird.

Zusammenfassend ist im Hinblick auf den dritten Teil der Hypothese A festzustellen, dass die chemisch induzierte β -Arrestin-1-Translokation an die Chemokinrezeptoren CXCR4 und CCR5 zu früher ERK1/2-Aktivierung führt, die zwar deutlich, aber weniger robust als nach Ligandenstimulation der Rezeptoren ist.

Hypothese B wurde im Kontext der durch β -Arrestin-1 vermittelten Signaltransduktion widerlegt: Die konstitutiv aktive β -Arrestin-1R169E-Mutation nimmt keinen effektsteigernden Einfluss auf die Aktivierung von ERK1 und ERK2. Im Bereich der β -Arrestin-1-vermittelten Signalprozesse nehmen konformationelle Änderungen damit vermutlich weniger Einfluss als in Internalisierungsprozessen von GPCRs.

4.4 Vergleich der β -Arrestin-Isoformen 1 und 2

Die DNA-Sequenzen von β -Arrestin-1 und β -Arrestin-2 stimmen zu etwas mehr als 70 % überein. Die beiden Isoformen unterscheiden sich insofern voneinander, als dass Differenzen im funktionellen Outcome der durch β -Arrestin vermittelten Desensibilisierungs-, Internalisierungs- und Signaltransduktionseffekte auftreten können, die bislang in Zellsystemen mit GPCRs wie beispielweise β_2 -AR oder AT_{1A} R untersucht wurden (Ahn et al. 2003; Ahn et al. 2004a; Srivastava et al. 2015). Isoformbasierte Unterschiede gelten nicht generell für alle Rezeptorsysteme, sondern weisen Spezies-, Zelltyp- und Rezeptorspezifitäten auf (Srivastava et al. 2015).

Unterschiede zwischen den β -Arrestin-Isoformen 1 und 2 wurden im Zusammenhang mit weiteren Ergebnissen der eigenen Arbeitsgruppe in der vorliegenden Arbeit hinsichtlich signaltransduktorischer (3.7) und desensibilisierender (3.4) Effekte in HEK-293-Zellen mit CXCR4- oder CCR5-Koexpression nicht festgestellt.

In der Literatur beschriebene isoformbedingte Unterschiede, denen zufolge CXCR4 nach Ligandenstimulation in β -Arrestin-2-überexprimierenden HEK-293-Zellen in weitreichenderem Ausmaß internalisiert als in β -Arrestin-1-überexprimierenden Zelllinien, konnten mit den Ergebnissen der vorliegenden Arbeit (3.5.1) im Vergleich mit weiteren β -Arrestin-2-basierten Ergebnissen der eigenen Arbeitsgruppe nicht bestätigt werden (Cheng et al. 2000).

Hingegen überstieg das AP21967-induzierte Internalisierungsausmaß des Chemokinrezeptors CCR5-DmrA in β -Arrestin-2-DmrC-koexprimierenden HEK-293-Zellen das Ausmaß der CCR5-Internalisierung in β -Arrestin-1-DmrC-koexprimierenden Zellen (3.5.2). Dieses Ergebnis steht mit dem Modell höherer Affinität von Klasse A-Rezeptoren zu β -Arrestin-2 im Einklang und wurde analog auch in Zellen mit Überexpression von β_2 -AR, einem weiteren Klasse A-Rezeptor, beobachtet (Oakley et al. 2000; Ahn et al. 2003).

5 Zusammenfassung

In dieser Dissertationsarbeit wurden Funktionsstudien über das Desensibilisierungs-, Internalisierungs- und Signaltransduktionsverhalten der Chemokinrezeptoren CXCR4 und CCR5 in β -Arrestin-1-koexprimierenden HEK-293-Zellen nach Heterodimerisierung beider Interaktionspartner durchgeführt. Dabei wurden Effekte einer chemisch induzierten Translokation der β -Arrestin-1-Isoform an den jeweiligen Chemokinrezeptor mit denen nach gewöhnlicher Ligandenstimulation verglichen. Darüber hinaus wurde die Auswirkung einer konstitutiv aktiven β -Arrestin-1R169E-Mutation im Vergleich zum Wildtyp untersucht. Am Beispiel der Chemokinrezeptoren CXCR4 und CCR5 wurden vergleichend auch Rezeptorklassenunterschiede mit in die Auswertungen einbezogen.

Festzustellen ist, dass Rezeptorinternalisierung und Rezeptordesensibilisierung ligandenunabhängig allein durch chemisch induzierten Kontakt zwischen den Interaktionspartnern β -Arrestin-1 und Chemokinrezeptor induziert werden können. Die ligandenunabhängige β -Arrestin-1-Translokation hat ein vergleichbares CCR5-Internalisierungsausmaß wie nach Ligandenstimulation des Rezeptors zur Folge. Das CXCR4-Internalisierungsausmaß bleibt hinter demjenigen nach Ligandenstimulation zurück, obgleich auch durch chemisch induzierte β -Arrestin-1-Translokation eine deutliche Internalisierung erzielt wird. Die intrazelluläre Verteilung internalisierter Chemokinrezeptoren nach chemisch induzierter β -Arrestin-1-Translokation gleicht demjenigen nach Ligandenstimulation. β -Arrestin-1 koakkumuliert nach chemisch induzierter Translokation an den Chemokinrezeptor mit diesem in denselben intrazellulären Kompartimenten. Dieser Effekt kann durch Ligandenstimulation in Zellen mit β -Arrestin-1-Wildtyp nicht gezeigt werden, jedoch in Zellen mit konstitutiv aktivem β -Arrestin-1R169E. Die Expression dieser β -Arrestin-Mutante führt bereits in unstimulierten Zellen zu einer Koakkumulation zusammen mit Rezeptoren und weist zudem ein höheres Internalisierungspotential als β -Arrestin-1-Wildtyp auf. Darüber hinaus wird eine ligandenunabhängige MAPK-Aktivierung durch β -Arrestin-1-Translokation an die Chemokinrezeptoren CXCR4 und CCR5 nachgewiesen. Die β -Arrestin-1R169E-Mutante zeigt hierbei keine Effektsteigerung.

Die Ergebnisse zeigen die ligandenunabhängigen Effekte einer β -Arrestin-1-Translokation an unstimulierte Chemokinrezeptoren. β -Arrestin-1 ist unabhängig von G-Protein-Aktivierung in der Lage, Chemokinrezeptoren zu desensibilisieren, zu internalisieren und Signaltransduktion im Sinne von ERK1/2-Aktivierung zu induzieren. Dabei weist die konstitutiv aktive β -Arrestin-1R169E-Mutante besonders im Hinblick auf Rezeptorinternalisierung stärkere Effekte als der Wildtyp auf. Diese Ergebnisse unterstreichen die Bedeutung sekundärer β -Arrestin-1-Konformationsänderungen im Hinblick auf regulatorische Prozesse in der Zelle.

6 Literaturverzeichnis

- Ahn S, Nelson CD, Garrison TR, Miller WE, Lefkowitz RJ (2003): Desensitization, internalization, and signaling functions of β -arrestins demonstrated by RNA interference. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100, 1740-1744
- Ahn S, Wei H, Garrison TR, Lefkowitz RJ (2004a): Reciprocal regulation of angiotensin receptor-activated extracellular signal-regulated kinases by β -arrestins 1 and 2. *J Biol Chem* 279, 7807-7811
- Ahn S, Shenoy SK, Wei H, Lefkowitz RJ (2004b): Differential kinetic and spatial patterns of β -arrestin and G protein-mediated ERK activation by the angiotensin II receptor. *J Biol Chem* 279, 35518-35525
- Alexander SPH, Benson HE, Faccenda E, Pawson AJ, Sharman JL, Spedding M, Peters JA, Harmar AJ (2013): The concise guide to pharmacology 2013/14: G protein-coupled receptors. *Br J Pharmacol* 170, 1459-1581
- Algood HMS, Flynn JL (2004): CCR5-deficient mice control mycobacterium tuberculosis infection despite increased pulmonary lymphocytic infiltration. *J Immunol* 173, 3287-3296
- Alkhatib G, Combadiere C, Broder CC, Feng Y, Kennedy PE, Murphy PM, Berger EA (1996): CC CKR5: A RANTES, MIP-1 α , MIP-1 β receptor as a fusion cofactor for macrophage-tropic HIV-1. *Science* 272, 1955-1958
- Andjerkovic AV, Spencer DD, Pachter JS (1999): Visualization of chemokine binding sites on human brain microvessels. *J Cell Biol* 145, 403-412
- Attramadal H, Arriza JL, Aoki C, Dawson TM, Codina J, Kwatra MM, Snyder SH, Caron MG, Lefkowitz RJ (1992): β -Arrestin2, a novel member of the arrestin/ β -arrestin gene family. *J Biol Chem* 267, 17882-17890
- Azzi M, Charest PG, Angers S, Rousseau G, Kohout T, Bouvier M, Piñeyro G (2003): β -Arrestin-mediated activation of MAPK by inverse agonists reveals distinct active conformations for G protein-coupled receptors. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100, 11406-11411
- Bachelier F, Ben-Baruch A, Burkhardt AM, Combadiere C, Farber JM, Graham GJ, Horuk R, Sparre-Ulrich AH, Locati M, Luster AD et al. (2014): International Union of Basic and Clinical Pharmacology. LXXXIX. Update on the extended family of chemokine receptors and introducing a new nomenclature for atypical chemokine receptors. *Pharmacol Rev* 66, 1-79
- Baldwin JM (1994): Structure and function of receptors coupled to G proteins. *Curr Opin Cell Biol* 6, 180-190
- Balkwill F (2004): The significance of cancer cell expression of the chemokine receptor CXCR4. *Semin Cancer Biol* 14, 171-179

- Banaszynski LA, Liu CW, Wandless TJ (2005): Characterization of the FKBP·rapamycin·FRB ternary complex. *J Am Chem Soc* 127, 4715-4721
- Bannert N, Craig S, Farzan M, Sogah D, Santo NV, Choe H, Sodroski J (2001): Sialylated O-glycans and sulfated tyrosines in the NH₂-terminal domain of CC chemokine receptor 5 contribute to high affinity binding of chemokines. *J Exp Med* 194, 1661-1674
- Barak LS, Ferguson SSG, Zhang J, Caron MG (1997): A β -Arrestin/green fluorescent protein biosensor for detecting G protein-coupled receptor activation. *J Biol Chem* 272, 27497-27500
- Barmania F, Pepper MS (2013): C-C chemokine receptor type five (CCR5): An emerging target for the control of HIV infection. *Appl Transl Genomics* 2, 3-16
- Bathgate-Siryk A, Dabul S, Pandya K, Walklett K, Rengo G, Cannavo A, De Lucia C, Liccardo D, Gao E, Leosco D et al. (2014): Negative impact of β -arrestin-1 on post-myocardial infarction heart failure via cardiac and adrenal-dependent neurohormonal mechanisms. *Hypertension* 63, 404-412
- Benovic JL, Strasser RH, Caron MG, Lefkowitz RJ (1986): β -Adrenergic receptor kinase: identification of a novel protein kinase that phosphorylates the agonist-occupied form of the receptor. *Proc Natl Acad Sci U S A* 83, 2797-2801
- Benovic JL, Kühn H, Weyand I, Codina J, Caron MG, Lefkowitz RJ (1987): Functional desensitization of the isolated β -adrenergic receptor by the β -adrenergic receptor kinase: potential role of an analog of the retinal protein arrestin (48-kDa protein). *Proc Natl Acad Sci U S A* 84, 8879-8882
- Berger EA, Murphy PM, Farber JM (1999): Chemokine receptors as HIV-1 coreceptors: roles in viral entry, tropism, and disease. *Annu Rev Immunol* 17, 657-700
- Berridge MJ, Irvine RF (1984): Inositol trisphosphate, a novel second messenger in cellular signal transduction. *Nature* 312, 315-321
- Bhandari D, Trejo J, Benovic JL, Marchese A (2007): Arrestin-2 interacts with the ubiquitin-protein isopeptide ligase atrophin-interacting protein 4 and mediates endosomal sorting of the chemokine receptor CXCR4. *J Biol Chem* 282, 36971-36979
- Birnbaumer M (1995): Mutations and diseases of G protein coupled receptors. *J Recept Signal Transduct Res* 15, 131-160
- Blanpain C, Migeotte I, Lee B, Vakili J, Doranz BJ, Govaerts C, Vassart G, Doms RW, Parmentier M (1999): CCR5 binds multiple CC-chemokines: MCP-3 acts as a natural antagonist. *Blood* 94, 1899-1905
- Blanpain C, Wittamer V, Vanderwinden JM, Boom A, Renneboog B, Lee B, Le Poul E, Asmar LE, Govaerts C, Vassart G et al. (2001): Palmitoylation of CCR5 is critical for receptor trafficking and efficient activation of intracellular signaling pathways. *J Biol Chem* 276, 23795-23804
- Bleul CC, Farzan M, Choe H, Parolin C, Clark-Lewis I, Sodroski J, Springer TA (1996a): The lymphocyte chemoattractant SDF-1 is a ligand for LESTR/fusin and blocks HIV-1 entry. *Nature* 382, 829-833

- Bleul CC, Fuhlbrigge RC, Casasnovas JM, Aiuti A, Springer TA (1996b): A highly efficacious lymphocyte chemoattractant, stromal cell-derived factor 1 (SDF-1). *J Exp Med* **184**, 1101-1109
- Bleul CC, Wu L, Hoxie JA, Springer TA, Mackay CR (1997): The HIV coreceptors CXCR4 and CCR5 are differentially expressed and regulated on human T lymphocytes. *Proc Natl Acad Sci U S A* **94**, 1925-1930
- Bohn LM, Lefkowitz RJ, Gainetdinov RR, Peppel K, Caron MG, Lin FT (1999): Enhanced morphine analgesia in mice lacking β -arrestin 2. *Science* **286**, 2495-2498
- Boring L, Gosling J, Monteclaro FS, Lulis AJ, Tsou CL, Charo IF (1996): Molecular cloning and functional expression of murine JE (monocyte chemoattractant protein 1) and murine macrophage inflammatory protein 1 α receptors. Evidence for two closely linked C-C chemokine receptors on chromosome 9. *J Biol Chem* **271**, 7551-7558
- Bouvier M, Hausdorff WP, De Blasi A, O'Dowd BF, Kobilka BK, Caron MG, Lefkowitz RJ (1988): Removal of phosphorylation sites from the β 2-adrenergic receptor delays onset of agonist-promoted desensitization. *Nature* **333**, 370-373
- Busillo JM, Benovic JL (2007): Regulation of CXCR4 signaling. *Biochim Biophys Acta* **1768**, 952-963
- Busillo JM, Armando S, Sengupta R, Meucci O, Bouvier M, Benovic JL (2010): Site-specific phosphorylation of CXCR4 is dynamically regulated by multiple kinases and results in differential modulation of CXCR4 signaling. *J Biol Chem* **285**, 7805-7817
- Cahill TJ, Thomsen ARB, Tarrasch JT, Plouffe B, Nguyen AH, Yang F, Huang LY, Kahsai AW, Bassoni DL, Gavino BJ et al. (2017): Distinct conformations of GPCR- β -arrestin complexes mediate desensitization, signaling, and endocytosis. *Proc Natl Acad Sci U S A* **114**, 2562-2567
- Calebiro D, Nikolaev VO, Gagliani MC, de Filippis T, Dees C, Tacchetti C, Persani L, Lohse MJ (2009): Persistent cAMP-signals triggered by internalized G-protein-coupled receptors. *PLoS Biol* **7**, e1000172
- Carman CV, Benovic JL (1998): G-protein-coupled receptors: turn-ons and turn-offs. *Curr Opin Neurobiol* **8**, 335-344
- Carter JM, Gurevich VV, Prossnitz ER, Engen JR (2005): Conformational differences between arrestin2 and pre-activated mutants as revealed by hydrogen exchange mass spectrometry. *J Mol Biol* **351**, 865-878
- Castellino F, Huang AY, Altan-Bonnet G, Stoll S, Scheinecker C, Germain RN (2006): Chemokines enhance immunity by guiding naive CD8⁺ T cells to sites of CD4⁺ T cell-dendritic cell interaction. *Nature* **440**, 890-895
- Chang F, Steelman LS, Lee JT, Shelton JG, Navolanic PM, Blalock WL, Franklin RA, McCubrey JA (2003): Signal transduction mediated by the Ras/Raf/MEK/ERK pathway from cytokine receptors to transcription factors: potential targeting for therapeutic intervention. *Leukemia* **17**, 1263-1293
- Charest PG, Terrillon S, Bouvier M (2005): Monitoring agonist-promoted conformational changes of β -arrestin in living cells by intramolecular BRET. *EMBO Rep* **6**, 334-340

- Cheng ZJ, Zhao J, Sun Y, Hu W, Wu YL, Cen B, Wu GX, Pei G (2000): β -Arrestin differentially regulates the chemokine receptor CXCR4-mediated signaling and receptor internalization, and this implicates multiple interaction sites between β -arrestin and CXCR4. *J Biol Chem* 275, 2479-2485
- Cocchi F, DeVico AL, Garzino-Demo A, Arya SK, Gallo RC, Lusso P (1995): Identification of RANTES, MIP-1 α , and MIP-1 β as the major HIV-suppressive factors produced by CD8+ T cells. *Science* 270, 1811-1815
- Coffa S, Breitman M, Spiller BW, Gurevich VV (2011a): A single mutation in arrestin-2 prevents ERK1/2 activation by reducing c-Raf1 binding. *Biochemistry* 50, 6951-6958
- Coffa S, Breitman M, Hanson SM, Callaway K, Kook S, Dalby KN, Gurevich VV (2011b): The effect of arrestin conformation on the recruitment of c-Raf1, MEK1, and ERK1/2 activation. *PLoS One* 6, e28723
- Combadiere C, Ahuja SK, Tiffany HL, Murphy PM (1996): Cloning and functional expression of CC CKR5, a human monocyte CC chemokine receptor selective for MIP-1 α , MIP-1 β , and RANTES. *J Leukoc Biol* 60, 147-152
- Craft CM, Whitmore DH, Wiechmann AF (1994): Cone arrestin identified by targeting expression of a functional family. *J Biol Chem* 269, 4613-4619
- Crespo P, Xu N, Simonds WF, Gutkind JS (1994): Ras-dependent activation of MAP kinase pathway mediated by G-protein $\beta\gamma$ subunits. *Nature* 369, 418-420
- Daaka Y, Luttrell LM, Ahn S, Della Rocca GJ, Ferguson SSG, Caron MG, Lefkowitz RJ (1998): Essential role for G protein-coupled receptor endocytosis in the activation of mitogen-activated protein kinase. *J Biol Chem* 273, 685-688
- De Clercq E (2009): The AMD3100 story: the path to the discovery of a stem cell mobilizer (Mozobil). *Biochem Pharmacol* 77, 1655-1664
- Dean M, Carrington M, Winkler C, Huttley GA, Smith MW, Allikmets R, Goedert JJ, Buchbinder SP, Vittinghoff E, Gomperts E et al. (1996): Genetic restriction of HIV-1 infection and progression to AIDS by a deletion allele of the CKR5 structural gene. *Science* 273, 1856-1862
- DeFea K (2008): β -Arrestins and heterotrimeric G-proteins: collaborators and competitors in signal transduction. *Br J Pharmacol* 153, 298-309
- DeFea KA, Zalevsky J, Thoma MS, Déry O, Mullins RD, Bunnett NW (2000): β -Arrestin-dependent endocytosis of proteinase-activated receptor 2 is required for intracellular targeting of activated ERK1/2. *J Cell Biol* 148, 1267-1281
- DeGraff JL, Gurevich VV, Benovic JL (2002): The third intracellular loop of α 2-adrenergic receptors determines subtype specificity of arrestin interaction. *J Biol Chem* 277, 43247-43252
- DeRose R, Miyamoto T, Inoue T (2013): Manipulating signaling at will: chemically-inducible dimerization (CID) techniques resolve problems in cell biology. *Pflugers Arch* 465, 409-417
- DeWire SM, Kim J, Whalen EJ, Ahn S, Chen M, Lefkowitz RJ (2008): β -Arrestin-mediated signaling regulates protein synthesis. *J Biol Chem* 283, 10611-10620

- Dorr P, Westby M, Dobbs S, Griffin P, Irvine B, Macartney M, Mori J, Rickett G, Smith-Burchnell C, Napier C et al. (2005): Maraviroc (UK-427,857), a potent, orally bioavailable, and selective small-molecule inhibitor of chemokine receptor CCR5 with broad-spectrum anti-human immunodeficiency virus type 1 activity. *Antimicrob Agents Chemother* 49, 4721-4732
- Dragic T, Litwin V, Allaway GP, Martin SR, Huang Y, Nagashima KA, Cayanan C, Maddon PJ, Koup RA, Moore JP, Paxton WA (1996): HIV-1 entry into CD4+ cells is mediated by the chemokine receptor CC-CKR-5. *Nature* 381, 667-673
- Dragic T, Trkola A, Thompson DAD, Cormier EG, Kajumo FA, Maxwell E, Lin SW, Ying W, Smith SO, Sakmar TP, Moore JP (2000): A binding pocket for a small molecule inhibitor of HIV-1 entry within the transmembrane helices of CCR5. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97, 5639-5644
- Drake MT, Violin JD, Whalen EJ, Wisler JW, Shenoy SK, Lefkowitz RJ (2008): β -Arrestin-biased agonism at the β 2-adrenergic receptor. *J Biol Chem* 283, 5669-5676
- Eidne KA, Kroeger KM, Hanyaloglu AC (2002): Applications of novel resonance energy transfer techniques to study dynamic hormone receptor interactions in living cells. *Trends Endocrinol Metab* 13, 415-421
- Farzan M, Mirzabekov T, Kolchinsky P, Wyatt R, Cayabyab M, Gerard NP, Gerard C, Sodroski J, Choe H (1999): Tyrosine sulfation of the amino terminus of CCR5 facilitates HIV-1 entry. *Cell* 96, 667-676
- Feinstein TN, Yui N, Webber MJ, Wehbi VL, Stevenson HP, King JD, Hallows KR, Brown D, Bouley R, Vilaradaga JP (2013): Noncanonical control of vasopressin receptor type 2 signaling by retromer and arrestin. *J Biol Chem* 288, 27849-27860
- Feng Y, Broder CC, Kennedy PE, Berger EA (1996): HIV-1 entry cofactor: functional cDNA cloning of a seven-transmembrane, G protein-coupled receptor. *Science* 272, 872-877
- Ferguson SSG (2001): Evolving concepts in G protein-coupled receptor endocytosis: the role in receptor desensitization and signaling. *Pharmacol Rev* 53, 1-24
- Ferguson SSG, Ménard L, Barak LS, Koch WJ, Colapietro AM, Caron MG (1995): Role of phosphorylation in agonist-promoted β 2-adrenergic receptor sequestration. Rescue of a sequestration-defective mutant by β ARK1. *J Biol Chem* 270, 24782-24789
- Ferguson SSG, Downey WE, Colapietro AM, Barak LS, Ménard L, Caron MG (1996): Role of β -arrestin in mediating agonist-promoted G protein-coupled receptor internalization. *Science* 271, 363-366
- Ferguson SSG, Zhang J, Barak LS, Caron MG (1998): Molecular mechanisms of G protein-coupled receptor desensitization and resensitization. *Life Sci* 62, 1561-1565
- Fredriksson R, Lagerström MC, Lundin LG, Schiöth HB (2003): The G-protein-coupled receptors in the human genome form five main families. Phylogenetic analysis, paralogon groups, and fingerprints. *Mol Pharmacol* 63, 1256-1272
- Gaidarov I, Krupnick JG, Falck JR, Benovic JL, Keen JH (1999): Arrestin function in G protein-coupled receptor endocytosis requires phosphoinositide binding. *EMBO J* 18, 871-881

- Ganju RK, Dutt P, Wu L, Newman W, Avraham H, Avraham S, Groopman JE (1998a): β -Chemokine receptor CCR5 signals via the novel tyrosine kinase RAFTK. *Blood* 91, 791-797
- Ganju RK, Brubaker SA, Meyer J, Dutt P, Yang Y, Qin S, Newman W, Groopman JE (1998b): The α -chemokine, stromal cell-derived factor-1 α , binds to the transmembrane G-protein-coupled CXCR-4 receptor and activates multiple signal transduction pathways. *J Biol Chem* 273, 23169-23175
- Garcia-Perez J, Rueda P, Alcami J, Rognan D, Arenzana-Seisdedos F, Lagane B, Kellenberger E (2011): Allosteric model of maraviroc binding to CC chemokine receptor 5 (CCR5). *J Biol Chem* 286, 33409-33421
- Gesty-Palmer D, Chen M, Reiter E, Ahn S, Nelson CD, Wang S, Eckhardt AE, Cowan CL, Spurney RF, Luttrell LM, Lefkowitz RJ (2006): Distinct β -arrestin- and G protein-dependent pathways for parathyroid hormone receptor-stimulated ERK1/2 activation. *J Biol Chem* 281, 10856-10864
- Glass WG, Liu MT, Kuziel WA, Lane TE (2001): Reduced macrophage infiltration and demyelination in mice lacking the chemokine receptor CCR5 following infection with a neurotropic coronavirus. *Virology* 288, 8-17
- Glass WG, McDermott DH, Lim JK, Lekhong S, Yu SF, Frank WA, Pape J, Cheshier RC, Murphy PM (2006): CCR5 deficiency increases risk of symptomatic West Nile virus infection. *J Exp Med* 203, 35-40
- Goldstein JL, Anderson RGW, Brown MS (1979): Coated pits, coated vesicles, and receptor-mediated endocytosis. *Nature* 279, 679-685
- Gong K, Li Z, Xu M, Du J, Lv Z, Zhang Y (2008): A novel protein kinase A-independent, β -arrestin-1-dependent signaling pathway for p38 mitogen-activated protein kinase activation by β 2-adrenergic receptors. *J Biol Chem* 283, 29028-29036
- Goodman OB, Krupnick JG, Santini F, Gurevich VV, Penn RB, Gagnon AW, Keen JH, Benovic JL (1996): β -Arrestin acts as a clathrin adaptor in endocytosis of the β 2-adrenergic receptor. *Nature* 383, 447-450
- Gosling J, Monteclaro FS, Atchison RE, Arai H, Tsou CL, Goldsmith MA, Charo IF (1997): Molecular uncoupling of C-C chemokine receptor 5-induced chemotaxis and signal transduction from HIV-1 coreceptor activity. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94, 5061-5066
- Gray JA, Bhatnagar A, Gurevich VV, Roth BL (2003): The interaction of a constitutively active arrestin with the arrestin-insensitive 5-HT(2A) receptor induces agonist-independent internalization. *Mol Pharmacol* 63, 961-972
- Grundmann M, Merten N, Malfacini D, Inoue A, Preis P, Simon K, Rüttiger N, Ziegler N, Benkel T, Schmitt NK et al. (2018): Lack of β -arrestin signaling in the absence of active G proteins. *Nat Commun* 9, 341
- Gupta SK, Lysko PG, Pillarisetti K, Ohlstein E, Stadel JM (1998): Chemokine receptors in human endothelial cells. Functional expression of CXCR4 and its transcriptional regulation by inflammatory cytokines. *J Biol Chem* 273, 4282-4287

- Gurevich EV, Gurevich VV (2006): Arrestins: ubiquitous regulators of cellular signaling pathways. *Genome Biol* 7, 236
- Gurevich VV, Benovic JL (1992): Cell-free expression of visual arrestin. Truncation mutagenesis identifies multiple domains involved in rhodopsin interaction. *J Biol Chem* 267, 21919-21923
- Gurevich VV, Benovic JL (1993): Visual arrestin interaction with rhodopsin. Sequential multisite binding ensures strict selectivity toward light-activated phosphorylated rhodopsin. *J Biol Chem* 268, 11628-11638
- Gurevich VV, Benovic JL (1997): Mechanism of phosphorylation-recognition by visual arrestin and the transition of arrestin into a high affinity binding state. *Mol Pharmacol* 51, 161-169
- Gurevich VV, Gurevich EV (2004): The molecular acrobatics of arrestin activation. *Trends Pharmacol Sci* 25, 105-111
- Gurevich VV, Gurevich EV (2014): Extensive shape shifting underlies functional versatility of arrestins. *Curr Opin Cell Biol* 27, 1-9
- Gurevich VV, Dion SB, Onorato JJ, Ptasienski J, Kim CM, Sterne-Marr R, Hosey MM, Benovic JL (1995): Arrestin interactions with G protein-coupled receptors. Direct binding studies of wild type and mutant arrestins with rhodopsin, β 2-adrenergic, and m2 muscarinic cholinergic receptors. *J Biol Chem* 270, 720-731
- Gurevich VV, Pals-Rylaarsdam R, Benovic JL, Hosey MM, Onorato JJ (1997): Agonist-receptor-arrestin, an alternative ternary complex with high agonist affinity. *J Biol Chem* 272, 28849-28852
- Han M, Gurevich VV, Vishnivetskiy SA, Sigler PB, Schubert C (2001): Crystal structure of β -arrestin at 1.9 Å: possible mechanism of receptor binding and membrane translocation. *Structure* 9, 869-880
- Haribabu B, Richardson RM, Fisher I, Sozzani S, Peiper SC, Horuk R, Ali H, Snyderman R (1997): Regulation of human chemokine receptors CXCR4. Role of phosphorylation in desensitization and internalization. *J Biol Chem* 272, 28726-28731
- Hellier S, Frodsham AJ, Hennig BJW, Klenerman P, Knapp S, Ramaley P, Satsangi J, Wright M, Zhang L, Thomas HC et al. (2003): Association of genetic variants of the chemokine receptor CCR5 and its ligands, RANTES and MCP-2, with outcome of HCV infection. *Hepatology* 38, 1468-1476
- Hernandez PA, Gorlin RJ, Lukens JN, Taniuchi S, Bohinjec J, Francois F, Klotman ME, Diaz GA (2003): Mutations in the chemokine receptor gene CXCR4 are associated with WHIM syndrome, a combined immunodeficiency disease. *Nat Genet* 34, 70-74
- Hershko A, Ciechanover A (1992): The ubiquitin system for protein degradation. *Annu Rev Biochem* 61, 761-807
- Hesseltger J, Halks-Miller M, DeVecchio V, Peiper SC, Hoxie J, Kolson DL, Taub D, Horuk R (1997): CD4-independent association between HIV-1 gp120 and CXCR4: functional chemokine receptors are expressed in human neurons. *Curr Biol* 7, 112-121

- Hirsch JA, Schubert C, Gurevich VV, Sigler PB (1999): The 2.8 Å crystal structure of visual arrestin: a model for arrestin's regulation. *Cell* 97, 257-269
- Hüttenrauch F, Nitzki A, Lin FT, Höning S, Oppermann M (2002): β -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
- Hütter G, Nowak D, Mossner M, Ganepola S, Müßig A, Allers K, Schneider T, Hofmann J, Kücherer C, Blau O et al. (2009): Long-term control of HIV by CCR5 delta32/delta32 stem-cell transplantation. *N Engl J Med* 360, 692-698
- Hütter G, Bodor J, Ledger S, Boyd M, Millington M, Tsie M, Symonds G (2015): CCR5 targeted cell therapy for HIV and prevention of viral escape. *Viruses* 7, 4186-4203
- Irannejad R, von Zastrow M (2014): GPCR signaling along the endocytic pathway. *Curr Opin Cell Biol* 27, 109-116
- Irannejad R, Tomshine JC, Tomshine JR, Chevalier M, Mahoney JP, Steyaert J, Rasmussen SGF, Sunahara RK, El-Samad H, Huang B et al. (2013): Conformational biosensors reveal GPCR signalling from endosomes. *Nature* 495, 534-538
- Kang J, Shi Y, Xiang B, Qu B, Su W, Zhu M, Zhang M, Bao G, Wang F, Zhang X et al. (2005): A nuclear function of β -arrestin1 in GPCR signaling: regulation of histone acetylation and gene transcription. *Cell* 123, 833-847
- Kara E, Crépieux P, Gauthier C, Martinat N, Piketty V, Guillou F, Reiter E (2006): A phosphorylation cluster of five serine and threonine residues in the C-terminus of the follicle-stimulating hormone receptor is important for desensitization but not for β -arrestin-mediated ERK activation. *Mol Endocrinol* 20, 3014-3026
- Kenakin T: The application of signaling bias to new therapeutic drug therapy for seven transmembrane (G protein-coupled) receptors: quantifying bias. In: Arey BJ (Hrsg.): *Biased Signaling in Physiology, Pharmacology and Therapeutics*. Academic Press, San Diego 2014, 81-102
- Kim J, Ahn S, Ren XR, Whalen EJ, Reiter E, Wei H, Lefkowitz RJ (2005): Functional antagonism of different G protein-coupled receptor kinases for β -arrestin-mediated angiotensin II receptor signaling. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102, 1442-1447
- Kim YM, Benovic JL (2002): Differential roles of arrestin-2 interaction with clathrin and adaptor protein 2 in G protein-coupled receptor trafficking. *J Biol Chem* 277, 30760-30768
- Klein RS, Williams KC, Alvarez-Hernandez X, Westmoreland S, Force T, Lackner AA, Luster AD (1999): Chemokine receptor expression and signaling in macaque and human fetal neurons and astrocytes: implications for the neuropathogenesis of AIDS. *J Immunol* 163, 1636-1646
- Kobilka BK, Deupi X (2007): Conformational complexity of G-protein-coupled receptors. *Trends Pharmacol Sci* 28, 397-406
- Koch WJ, Inglese J, Stone WC, Lefkowitz RJ (1993): The binding site for the beta-gamma-subunits of heterotrimeric G proteins on the β -adrenergic receptor kinase. *J Biol Chem* 268, 8256-8260

- Koenig JA, Edwardson JM (1997): Endocytosis and recycling of G protein-coupled receptors. *Trends Pharmacol Sci* 18, 276-287
- Kohlmeier JE, Miller SC, Smith J, Lu B, Gerard C, Cookenham T, Roberts AD, Woodland DL (2008): The chemokine receptor CCR5 plays a key role in the early memory CD8⁺ T cell response to respiratory virus infections. *Immunity* 29, 101-113
- Kohout TA, Lin FT, Perry SJ, Conner DA, Lefkowitz RJ (2001): β -Arrestin 1 and 2 differentially regulate heptahelical receptor signaling and trafficking. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98, 1601-1606
- Kong G, Penn R, Benovic JL (1994): A β -adrenergic receptor kinase dominant negative mutant attenuates desensitization of the β 2-adrenergic receptor. *J Biol Chem* 269, 13084-13087
- Kook S, Zhan X, Kaoud TS, Dalby KN, Gurevich VV, Gurevich EV (2013): Arrestin-3 binds c-Jun N-terminal kinase 1 (JNK1) and JNK2 and facilitates the activation of these ubiquitous JNK isoforms in cells via scaffolding. *J Biol Chem* 288, 37332-37342
- Kook S, Zhan X, Cleghorn WM, Benovic JL, Gurevich VV, Gurevich EV (2014): Caspase-cleaved arrestin-2 and BID cooperatively facilitate cytochrome C release and cell death. *Cell Death Differ* 21, 172-184
- Kook S, Vishnivetskiy SA, Gurevich VV, Gurevich EV (2019): Cleavage of arrestin-3 by caspases attenuates cell death by precluding arrestin-dependent JNK activation. *Cell Signal* 54, 161-169
- Kovoor A, Celver J, Abdryashitov RI, Chavkin C, Gurevich VV (1999): Targeted construction of phosphorylation-independent β -arrestin mutants with constitutive activity in cells. *J Biol Chem* 274, 6831-6834
- 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
- Krasel C, Bünemann M, Lorenz K, Lohse MJ (2005): β -Arrestin binding to the β 2-adrenergic receptor requires both receptor phosphorylation and receptor activation. *J Biol Chem* 280, 9528-9535
- Krueger KM, Daaka Y, Pitcher JA, Lefkowitz RJ (1997): The role of sequestration in G protein-coupled receptor resensitization. Regulation of β 2-adrenergic receptor dephosphorylation by vesicular acidification. *J Biol Chem* 272, 5-8
- Krupnick JG, Benovic JL (1998): The role of receptor kinases and arrestins in G protein-coupled receptor regulation. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 38, 289-319
- Kühn H (1978): Light-regulated binding of rhodopsin kinase and other proteins to cattle photoreceptor membranes. *Biochemistry* 17, 4389-4395
- Lagane B, Ballet S, Planchenault T, Balabanian K, Le Poul E, Blanpain C, Percherancier Y, Staropoli I, Vassart G, Oppermann M et al. (2005): Mutation of the DRY motif reveals different structural requirements for the CC chemokine receptor 5-mediated signaling and receptor endocytosis. *Mol Pharmacol* 67, 1966-1976

- Lagane B, Chow KYC, Balabanian K, Levoye A, Harriague J, Planchenault T, Baleux F, Gunera-Saad N, Arenzana-Seisdedos F, Bachelier F (2008): CXCR4 dimerization and β -arrestin-mediated signaling account for the enhanced chemotaxis to CXCL12 in WHIM syndrome. *Blood* 112, 34-44
- Laporte SA, Oakley RH, Zhang J, Holt JA, Ferguson SSG, Caron MG, Barak LS (1999): The β 2-adrenergic receptor/ β arrestin complex recruits the clathrin adaptor AP-2 during endocytosis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96, 3712-3717
- Le Y, Honczarenko M, Glodek AM, Ho DK, Silberstein LE (2005): CXC chemokine ligand 12-induced focal adhesion kinase activation and segregation into membrane domains is modulated by regulator of G protein signaling 1 in pro-B cells. *J Immunol* 174, 2582-2590
- Lefkowitz RJ (2013): A brief history of G-protein coupled receptors (Nobel lecture). *Angew Chem Int Ed Engl* 52, 6366-6378
- Lefkowitz RJ, Shenoy SK (2005): Transduction of receptor signals by β -arrestins. *Science* 308, 512-517
- Liebick M: Chemokine receptors CXCR4 and CCR5: cell surface expression, signaling and modulation by β -arrestin 2. *Naturwiss. Diss. Göttingen* 2015
- Liebick M, Henze S, Vogt V, Oppermann M (2017): Functional consequences of chemically-induced β -arrestin binding to chemokine receptors CXCR4 and CCR5 in the absence of ligand stimulation. *Cell Signal* 38, 201-211
- Lin FT, Krueger KM, Kendall HE, Daaka Y, Fredericks ZL, Pitcher JA, Lefkowitz RJ (1997): Clathrin-mediated endocytosis of the β -adrenergic receptor is regulated by phosphorylation/dephosphorylation of β -arrestin1. *J Biol Chem* 272, 31051-31057
- Lin FT, Chen W, Shenoy S, Cong M, Exum ST, Lefkowitz RJ (2002): Phosphorylation of β -arrestin2 regulates its function in internalization of β 2-adrenergic receptors. *Biochemistry* 41, 10692-10699
- Liu R, Paxton WA, Choe S, Ceradini D, Martin SR, Horuk R, MacDonald ME, Stuhlmann H, Koup RA, Landau NR (1996): Homozygous defect in HIV-1 coreceptor accounts for resistance of some multiply-exposed individuals to HIV-1 infection. *Cell* 86, 367-377
- Loetscher M, Geiser T, O'Reilly T, Zwahlen R, Baggiolini M, Moser B (1994): Cloning of a human seven-transmembrane domain receptor, LESTR, that is highly expressed in leukocytes. *J Biol Chem* 269, 232-237
- Lohse MJ, Benovic JL, Codina J, Caron MG, Lefkowitz RJ (1990): β -Arrestin: a protein that regulates β -adrenergic receptor function. *Science* 248, 1547-1550
- 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 β -arrestin and arrestin in the β 2-adrenergic receptor and rhodopsin systems. *J Biol Chem* 267, 8558-8564
- Luo J, Busillo JM, Benovic JL (2008): M3 muscarinic acetylcholine receptor-mediated signaling is regulated by distinct mechanisms. *Mol Pharmacol* 74, 338-347

- Luo J, Busillo JM, Stumm R, Benovic JL (2017): G protein-coupled receptor kinase 3 and protein kinase C phosphorylate the distal C-terminal tail of the chemokine receptor CXCR4 and mediate recruitment of β -arrestin. *Mol Pharmacol* 91, 554-566
- Luttrell LM (2003): 'Location, location, location': activation and targeting of MAP kinases by G protein-coupled receptors. *J Mol Endocrinol* 30, 117-126
- Luttrell LM, Lefkowitz RJ (2002): The role of β -arrestins in the termination and transduction of G-protein-coupled receptor signals. *J Cell Sci* 115, 455-465
- Luttrell LM, Miller WE: Arrestins as Regulators of Kinases and Phosphatases. In: Luttrell LM (Hrsg.): *The Molecular Biology of Arrestins (Progress in Molecular Biology and Translational Science)*. Academic Press, Oxford 2013, 115-147
- Luttrell LM, Spiller BW: Arrestin-dependent ERK activation and its disruption. In: Gurevich VV (Hrsg.): *The structural basis of arrestin functions*. Springer International Publishing, Cham 2017, 199-217
- Luttrell LM, Della Rocca GJ, van Biesen T, Luttrell DK, Lefkowitz RJ (1997): G $\beta\gamma$ subunits mediate Src-dependent phosphorylation of the epidermal growth factor receptor: a scaffold for G Protein-coupled receptor-mediated Ras activation. *J Biol Chem* 272, 4637-4644
- Luttrell LM, Ferguson SSG, Daaka Y, Miller WE, Maudsley S, Della Rocca GJ, Lin FT, Kawakatsu H, Owada K, Luttrell DK et al. (1999): β -Arrestin-dependent formation of β 2 adrenergic receptor-Src protein kinase complexes. *Science* 283, 655-661
- 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 U S A* 98, 2449-2454
- Luttrell LM, Wang J, Plouffe B, Smith JS, Yamani L, Kaur S, Jean-Charles PY, Gauthier C, Lee MH, Pani B et al. (2018): Manifold roles of β -arrestins in GPCR signaling elucidated with siRNA and CRISPR/Cas9. *Sci Signal* 11, eaat7650
- Ma Q, Jones D, Borghesani PR, Segal RA, Nagasawa T, Kishimoto T, Bronson RT, Springer TA (1998): Impaired B-lymphopoiesis, myelopoiesis, and derailed cerebellar neuron migration in CXCR4- and SDF-1-deficient mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95, 9448-9453
- Mack M, Luckow B, Nelson PJ, Cihak J, Simmons G, Clapham PR, Signoret N, Marsh M, Stangassinger M, Borlat F et al. (1998): Aminooxypentane-RANTES induces CCR5 internalization but inhibits recycling: a novel inhibitory mechanism of HIV infectivity. *J Exp Med* 187, 1215-1224
- Malik R, Marchese A (2010): Arrestin-2 interacts with the endosomal sorting complex required for transport machinery to modulate endosomal sorting of CXCR4. *Mol Biol Cell* 21, 2529-2541
- Marchese A, Benovic JL (2001): Agonist-promoted ubiquitination of the G protein-coupled receptor CXCR4 mediates lysosomal sorting. *J Biol Chem* 276, 45509-45512
- Marchese A, Raiborg C, Santini F, Keen JH, Stenmark H, Benovic JL (2003): The E3 ubiquitin ligase AIP4 mediates ubiquitination and sorting of the G protein-coupled receptor CXCR4. *Dev Cell* 5, 709-722

- Marion S, Oakley RH, Kim KM, Caron MG, Barak LS (2006): A β -arrestin binding determinant common to the second intracellular loops of rhodopsin family G protein-coupled receptors. *J Biol Chem* 281, 2932-2938
- McDonald PH, Chow CW, Miller WE, Laporte SA, Field ME, Lin FT, Davis RJ, Lefkowitz RJ (2000): β -Arrestin 2: a receptor-regulated MAPK scaffold for the activation of JNK3. *Science* 290, 1574-1577
- McDougal JS, Nicholson JK, Cross GD, Cort SP, Kennedy MS, Mawle AC (1986): Binding of the human retrovirus HTLV-III/LAV/ARV/HIV to the CD4 (T4) molecule: conformation dependence, epitope mapping, antibody inhibition, and potential for idiotypic mimicry. *J Immunol* 137, 2937-2944
- Milano SK, Pace HC, Kim YM, Brenner C, Benovic JL (2002): Scaffolding functions of arrestin-2 revealed by crystal structure and mutagenesis. *Biochemistry* 41, 3321-3328
- Miller WE, Maudsley S, Ahn S, Khan KD, Luttrell LM, Lefkowitz RJ (2000): β -Arrestin1 interacts with the catalytic domain of the tyrosine kinase c-SRC. Role of β -arrestin1-dependent targeting of c-SRC in receptor endocytosis. *J Biol Chem* 275, 11312-11319
- Miller WE, McDonald PH, Cai SF, Field ME, Davis RJ, Lefkowitz RJ (2001): Identification of a motif in the carboxyl terminus of β -arrestin2 responsible for activation of JNK3. *J Biol Chem* 276, 27770-27777
- Mueller A, Kelly E, Strange PG (2002): Pathways for internalization and recycling of the chemokine receptor CCR5. *Blood* 99, 785-791
- Murphy PM, Baggiolini M, Charo IF, Hébert CA, Horuk R, Matsushima K, Miller LH, Oppenheim JJ, Power CA (2000): International union of pharmacology. XXII. Nomenclature for chemokine receptors. *Pharmacol Rev* 52, 145-176
- Murphy PM (2002): International union of pharmacology. XXX. Update on chemokine receptor nomenclature. *Pharmacol Rev* 54, 227-229
- Nagasawa T, Kikutani H, Kishimoto T (1994): Molecular cloning and structure of a pre-B-cell growth-stimulating factor. *Proc Natl Acad Sci U S A* 91, 2305-2309
- Oakley RH, Laporte SA, Holt JA, Barak LS, Caron MG (1999): Association of β -arrestin with G protein-coupled receptors during clathrin-mediated endocytosis dictates the profile of receptor resensitization. *J Biol Chem* 274, 32248-32257
- Oakley RH, Laporte SA, Holt JA, Caron MG, Barak LS (2000): Differential affinities of visual arrestin, β arrestin1, and β arrestin2 for G protein-coupled receptors delineate two major classes of receptors. *J Biol Chem* 275, 17201-17210
- Oberlin E, Amara A, Bachelier F, Bessia C, Virelizier JL, Arenzana-Seisdedos F, Schwartz O, Heard JM, Clark-Lewis I, Legler DF et al. (1996): The CXC chemokine SDF-1 is the ligand for LESTR/fusin and prevents infection by T-cell-line-adapted HIV-1. *Nature* 382, 833-835
- Oppermann M (2004): Chemokine receptor CCR5: insights into structure, function, and regulation. *Cell Signal* 16, 1201-1210

- Oppermann M, Mack M, Proudfoot AEI, Olbrich H (1999): Differential effects of CC chemokines on CC chemokine receptor 5 (CCR5) phosphorylation and identification of phosphorylation sites on the CCR5 carboxyl terminus. *J Biol Chem* 274, 8875-8885
- Orsini MJ, Parent JL, Mundell SJ, Benovic JL (1999): Trafficking of the HIV coreceptor CXCR4. Role of arrestins and identification of residues in the C-terminal tail that mediate receptor internalization. *J Biol Chem* 274, 31076-31086
- Palczewski K, Buczylo J, Imami NR, McDowell JH, Hargrave PA (1991): Role of the carboxyl-terminal region of arrestin in binding to phosphorylated rhodopsin. *J Biol Chem* 266, 15334-15339
- Pearse BMF, Robinson MS (1990): Clathrin, adaptors, and sorting. *Annu Rev Cell Biol* 6, 151-171
- Pearson G, Robinson F, Beers Gibson T, Xu B, Karandikar M, Berman K, Cobb MH (2001): Mitogen-activated protein (MAP) kinase pathways: regulation and physiological functions. *Endocr Rev* 22, 153-183
- Percherancier Y, Planchenault T, Valenzuela-Fernandez A, Virelizier JL, Arenzana-Seisdedos F, Bachelier F (2001): Palmitoylation-dependent control of degradation, life span, and membrane expression of the CCR5 receptor. *J Biol Chem* 276, 31936-31944
- Phizicky EM, Fields S (1995): Protein-protein interactions: methods for detection and analysis. *Microbiol Rev* 59, 94-123
- Pierce KL, Premont RT, Lefkowitz RJ (2002): Seven-transmembrane receptors. *Nat Rev Mol Cell Biol* 3, 639-650
- Pitcher J, Lohse MJ, Codina J, Caron MG, Lefkowitz RJ (1992): Desensitization of the isolated β_2 -adrenergic receptor by β -adrenergic receptor kinase, cAMP-dependent protein kinase, and protein kinase C occurs via distinct molecular mechanisms. *Biochemistry* 31, 3193-3197
- Pitcher JA, Freedman NJ, Lefkowitz RJ (1998): G protein-coupled receptor kinases. *Annu Rev Biochem* 67, 653-692
- Pollok-Kopp B, Schwarze K, Baradari VK, Oppermann M (2003): Analysis of ligand-stimulated CC chemokine receptor 5 (CCR5) phosphorylation in intact cells using phosphosite-specific antibodies. *J Biol Chem* 278, 2190-2198
- Popik W, Pitha PM (1998): Early activation of mitogen-activated protein kinase kinase, extracellular signal-regulated kinase, p38 mitogen-activated protein kinase, and c-Jun N-terminal kinase in response to binding of simian immunodeficiency virus to jurkat T cells expressing CCR5 receptor. *Virology* 252, 210-217
- Prahalad S (2006): Negative association between the chemokine receptor CCR5- Δ 32-polymorphism and rheumatoid arthritis: a meta-analysis. *Genes Immun* 7, 264-268
- Premont RT, Gainetdinov RR (2007): Physiological roles of G protein-coupled receptor kinases and arrestins. *Annu Rev Physiol* 69, 511-534
- Pusic I, DiPersio JF (2010): Update on clinical experience with AMD3100, an SDF-1/CXCL12-CXCR4 inhibitor, in mobilization of hematopoietic stem and progenitor cells. *Curr Opin Hematol* 17, 319-326

- Putyrski M, Schultz C (2012): Protein translocation as a tool: the current rapamycin story. *FEBS Lett* **586**, 2097-2105
- Rajagopal S, Rajagopal K, Lefkowitz RJ (2010): Teaching old receptors new tricks: biasing seven-transmembrane receptors. *Nat Rev Drug Discov* **9**, 373-386
- Rajagopal S, Bassoni DL, Campbell JJ, Gerard NP, Gerard C, Wehrman TS (2013): Biased agonism as a mechanism for differential signaling by chemokine receptors. *J Biol Chem* **288**, 35039-35048
- Raport CJ, Gosling J, Schweickart VL, Gray PW, Charo IF (1996): Molecular cloning and functional characterization of a novel human CC chemokine receptor (CCR5) for RANTES, MIP-1 β , and MIP-1 α . *J Biol Chem* **271**, 17161-17166
- Ratajczak MZ, Lee H, Wysoczynski M, Wan W, Marlicz W, Laughlin MJ, Kucia M, Janowska-Wieczorek A, Ratajczak J (2010): Novel insight into stem cell mobilization-plasma sphingosine-1-phosphate is a major chemoattractant that directs the egress of hematopoietic stem progenitor cells from the bone marrow and its level in peripheral blood increases during mobilization due to activation of complement cascade/membrane attack complex. *Leukemia* **24**, 976-985
- Reiter E, Ahn S, Shukla AK, Lefkowitz RJ (2012): Molecular mechanism of β -arrestin-biased agonism at seven-transmembrane receptors. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* **52**, 179-197
- Rizzuto CD, Wyatt R, Hernández-Ramos N, Sun Y, Kwong PD, Hendrickson WA, Sodroski J (1998): A conserved HIV gp120 glycoprotein structure involved in chemokine receptor binding. *Science* **280**, 1949-1953
- Samson M, Labbe O, Mollereau C, Vassart G, Parmentier M (1996a): Molecular cloning and functional expression of a new human CC-chemokine receptor gene. *Biochemistry* **35**, 3362-3367
- Samson M, Libert F, Doranz BJ, Rucker J, Liesnard C, Farber CM, Saragosti S, Lapoumèroulie C, Cognaux J, Forceille C et al. (1996b): Resistance to HIV-1 infection in caucasian individuals bearing mutant alleles of the CCR-5 chemokine receptor gene. *Nature* **382**, 722-725
- Shenoy SK, Lefkowitz RJ (2003a): Trafficking patterns of β -arrestin and G protein-coupled receptors determined by the kinetics of β -arrestin deubiquitination. *J Biol Chem* **278**, 14498-14506
- Shenoy SK, Lefkowitz RJ (2003b): Multifaceted roles of β -arrestins in the regulation of seven-membrane-spanning receptor trafficking and signalling. *Biochem J* **375**, 503-515
- Shenoy SK, Lefkowitz RJ (2005a): Receptor-specific ubiquitination of β -arrestin directs assembly and targeting of seven-transmembrane receptor signalosomes. *J Biol Chem* **280**, 15315-15324
- Shenoy SK, Lefkowitz RJ (2005b): Seven-transmembrane receptor signaling through β -arrestin. *Sci STKE*, **2005**, cm10
- Shenoy SK, McDonald PH, Kohout TA, Lefkowitz RJ (2001): Regulation of receptor fate by ubiquitination of activated β 2-adrenergic receptor and β -arrestin. *Science* **294**, 1307-1313

- Shenoy SK, Drake MT, Nelson CD, Houtz DA, Xiao K, Madabushi S, Reiter E, Premont RT, Lichtarge O, Lefkowitz RJ (2006): β -Arrestin-dependent, G protein-independent ERK1/2 activation by the β_2 adrenergic receptor. *J Biol Chem* 281, 1261-1273
- Shenoy SK, Modi AS, Shukla AK, Xiao K, Berthouze M, Ahn S, Wilkinson KD, Miller WE, Lefkowitz RJ (2009): β -Arrestin-dependent signaling and trafficking of 7-transmembrane receptors is reciprocally regulated by the deubiquitinase USP33 and the E3 ligase Mdm2. *Proc Natl Acad Sci U S A* 106, 6650-6655
- Shukla AK, Violin JD, Whalen EJ, Gesty-Palmer D, Shenoy SK, Lefkowitz RJ (2008): Distinct conformational changes in β -arrestin report biased agonism at seven-transmembrane receptors. *Proc Natl Acad Sci U S A* 105, 9988-9993
- Shukla AK, Xiao K, Lefkowitz RJ (2011): Emerging paradigms of β -arrestin-dependent seven transmembrane receptor signaling. *Trends Biochem Sci* 36, 457-469
- Shukla AK, Manglik A, Kruse AC, Xiao K, Reis RI, Tseng WC, Staus DP, Hilger D, Uysal S, Huang LY et al. (2013): Structure of active β -arrestin-1 bound to a G-protein-coupled receptor phosphopeptide. *Nature* 497, 137-141
- Shukla AK, Westfield GH, Xiao K, Reis RI, Huang LY, Tripathi-Shukla P, Qian J, Li S, Blanc A, Oleskie AN et al. (2014): Visualization of arrestin recruitment by a G-protein-coupled receptor. *Nature* 512, 218-222
- Signoret N, Pelchen-Matthews A, Mack M, Proudfoot AEI, Marsh M (2000): Endocytosis and recycling of the HIV coreceptor CCR5. *J Cell Biol* 151, 1281-1294
- Smith JS, Rajagopal S (2016): The β -arrestins: multifunctional regulators of G protein-coupled receptors. *J Biol Chem* 291, 8969-8977
- Smith JS, Lefkowitz RJ, Rajagopal S (2018): Biased signalling: from simple switches to allosteric microprocessors. *Nat Rev Drug Discov* 17, 243-260
- Soergel DG, Subach RA, Burnham N, Lark MW, James IE, Sadler BM, Skobieranda F, Violin JD, Webster LR (2014): Biased agonism of the μ -opioid receptor by TRV130 increases analgesia and reduces on-target adverse effects versus morphine: a randomized, double-blind, placebo-controlled, crossover study in healthy volunteers. *Pain* 155, 1829-1835
- Song X, Raman D, Gurevich EV, Vishnivetskiy SA, Gurevich VV (2006): Visual and both non-visual arrestins in their "inactive" conformation bind JNK3 and Mdm2 and relocalize them from the nucleus to the cytoplasm. *J Biol Chem* 281, 21491-21499
- Song X, Coffa S, Fu H, Gurevich VV (2009): How does arrestin assemble MAPKs into a signaling complex? *J Biol Chem* 284, 685-695
- Sorkin A, von Zastrow M (2009): Endocytosis and signalling: intertwining molecular networks. *Nat Rev Mol Cell Biol* 10, 609-622
- Sriram K, Insel PA (2018): GPCRs as targets for approved drugs: how many targets and how many drugs? *Mol Pharmacol* 93, 251-258
- Srivastava A, Gupta B, Gupta C, Shukla AK (2015): Emerging functional divergence of β -arrestin isoforms in GPCR function. *Trends Endocrinol Metab* 26, 628-642

- Sterne-Marr R, Gurevich VV, Goldsmith P, Bodine RC, Sanders C, Donoso LA, Benovic JL (1993): Polypeptide variants of β -arrestin and arrestin3. *J Biol Chem* 268, 15640-15648
- Sun Y, Cheng Z, Ma L, Pei G (2002): β -Arrestin2 is critically involved in CXCR4-mediated chemotaxis, and this is mediated by its enhancement of p38 MAPK activation. *J Biol Chem* 277, 49212-49219
- Sun Y, Huang J, Xiang Y, Bastepe M, Jüppner H, Kobilka BK, Zhang JJ, Huang XY (2007): Dosage-dependent switch from G protein-coupled to G protein-independent signaling by a GPCR. *EMBO J* 26, 53-64
- Szabo I, Wetzel MA, Zhang N, Steele AD, Kaminsky DE, Chen C, Liu-Chen LY, Bednar F, Henderson EE, Howard OMZ et al. (2003): Selective inactivation of CCR5 and decreased infectivity of R5 HIV-1 strains mediated by opioid-induced heterologous desensitization. *J Leukoc Biol* 74, 1074-1082
- Tachibana K, Hirota S, Iizasa H, Yoshida H, Kawabata K, Kataoka Y, Kitamura Y, Matsushima K, Yoshida N, Nishikawa S et al. (1998): The chemokine receptor CXCR4 is essential for vascularization of the gastrointestinal tract. *Nature* 393, 591-594
- Takara Bio USA Inc. (2017): iDimerize™ inducible heterodimer system user manual. 1-16
- Tan Q, Zhu Y, Li J, Chen Z, Han GW, Kufareva I, Li T, Ma L, Fenalti G, Li J et al. (2013): Structure of the CCR5 chemokine receptor-HIV entry inhibitor Maraviroc complex. *Science* 341, 1387-1390
- Tarasova NI, Stauber RH, Michejda CJ (1998): Spontaneous and ligand-induced trafficking of CXC-chemokine receptor 4. *J Biol Chem* 273, 15883-15886
- Tashiro K, Tada H, Heilker R, Shirozu M, Nakano T, Honjo T (1993): Signal sequence trap: a cloning strategy for secreted proteins and type I membrane proteins. *Science* 261, 600-603
- Taub DD, Ortaldo JR, Turcovski-Corrales SM, Key ML, Longo DL, Murphy WJ (1996): β Chemokines costimulate lymphocyte cytolysis, proliferation, and lymphokine production. *J Leukoc Biol* 59, 81-89
- Terrillon S, Bouvier M (2004): Receptor activity-independent recruitment of β arrestin2 reveals specific signalling modes. *EMBO J* 23, 3950-3961
- Tobin AB, Butcher AJ, Kong KC (2008): Location, location, location...site-specific GPCR phosphorylation offers a mechanism for cell-type-specific signalling. *Trends Pharmacol Sci* 29, 413-420
- Venkatesan S, Rose JJ, Lodge R, Murphy PM, Foley JF (2003): Distinct mechanisms of agonist-induced endocytosis for human chemokine receptors CCR5 and CXCR4. *Mol Biol Cell* 14, 3305-3324
- Violin JD, Lefkowitz RJ (2007): β -Arrestin-biased ligands at seven-transmembrane receptors. *Trends Pharmacol Sci* 28, 416-422
- Vishnivetskiy SA, Schubert C, Climaco GC, Gurevich YV, Velez MG, Gurevich VV (2000): An additional phosphate-binding element in arrestin molecule. Implications for the mechanism of arrestin activation. *J Biol Chem* 275, 41049-41057

- Vishnivetskiy SA, Hirsch JA, Velez MG, Gurevich YV, Gurevich VV (2002): Transition of arrestin into the active receptor-binding state requires an extended interdomain hinge. *J Biol Chem* 277, 43961-43967
- Wang JM, McVicar DW, Oppenheim JJ, Kelvin DJ (1993): Identification of RANTES receptors on human monocytic cells: competition for binding and desensitization by homologous chemotactic cytokines. *J Exp Med* 177, 699-705
- Wang P, DeFea KA (2006): Protease-activated receptor-2 simultaneously directs β -arrestin-1-dependent inhibition and G α q-dependent activation of phosphatidylinositol 3-kinase. *Biochemistry* 45, 9374-9385
- Wang P, Wu Y, Ge X, Ma L, Pei G (2003): Subcellular localization of β -arrestins is determined by their intact N domain and the nuclear export signal at the C terminus. *J Biol Chem* 278, 11648-11653
- Watari K, Nakaya M, Nishida M, Kim KM, Kurose H (2013): β -Arrestin2 in infiltrated macrophages inhibits excessive inflammation after myocardial infarction. *PLoS One* 8, e68351
- Wehbi VL, Stevenson HP, Feinstein TN, Calero G, Romero G, Vilardaga JP (2013): Noncanonical GPCR signaling arising from a PTH receptor-arrestin-G $\beta\gamma$ complex. *Proc Natl Acad Sci U S A* 110, 1530-1535
- Wei H, Ahn S, Shenoy SK, Karnik SS, Hunyady L, Luttrell LM, Lefkowitz RJ (2003): Independent β -arrestin 2 and G protein-mediated pathways for angiotensin II activation of extracellular signal-regulated kinases 1 and 2. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100, 10782-10787
- Wilden U, Hall SW, Kühn H (1986a): Phosphodiesterase activation by photoexcited rhodopsin is quenched when rhodopsin is phosphorylated and binds the intrinsic 48-kDa protein of rod outer segments. *Proc Natl Acad Sci U S A* 83, 1174-1178
- Wilden U, Wüst E, Weyand I, Kühn H (1986b): Rapid affinity purification of retinal arrestin (48 kDa protein) via its light-dependent binding to phosphorylated rhodopsin. *FEBS Lett* 207, 292-295
- Woehler A, Ponimaskin EG (2009): G protein-mediated signaling: same receptor, multiple effectors. *Curr Mol Pharmacol* 2, 237-248
- Yang F, Yu X, Liu C, Qu CX, Gong Z, Liu HD, Li FH, Wang HM, He DF, Yi F et al. (2015): Phospho-selective mechanisms of arrestin conformations and functions revealed by unnatural amino acid incorporation and ^{19}F -NMR. *Nat Commun* 6, 8202
- Yun Y, Kim DK, Seo MD, Kim KM, Chung KY (2015): Different conformational dynamics of β -arrestin1 and β -arrestin2 analyzed by hydrogen/deuterium exchange mass spectrometry. *Biochem Biophys Res Commun* 457, 50-57
- Zaremba S, Keen JH (1983): Assembly polypeptides from coated vesicles mediate reassembly of unique clathrin coats. *J Cell Biol* 97, 1339-1347
- Zhan X, Gimenez LE, Gurevich VV, Spiller BW (2011): Crystal structure of arrestin-3 reveals the basis of the difference in receptor binding between two non-visual subtypes. *J Mol Biol* 406, 467-478

- Zhang J, Ferguson SSG, Barak LS, Ménard L, Caron MG (1996): Dynamin and β -arrestin reveal distinct mechanisms for G protein-coupled receptor internalization. *J Biol Chem* 271, 18302-18305
- Zhou Y, Kurihara T, Ryseck RP, Yang Y, Ryan C, Loy J, Warr G, Bravo R (1998): Impaired macrophage function and enhanced T cell-dependent immune response in mice lacking CCR5, the mouse homologue of the major HIV-1 coreceptor. *J Immunol* 160, 4018-4025
- Zidar DA, Violin JD, Whalen EJ, Lefkowitz RJ (2009): Selective engagement of G protein coupled receptor kinases (GRKs) encodes distinct functions of biased ligands. *Proc Natl Acad Sci U S A* 106, 9649-9654

Danksagung

Großer Dank gilt meinem Doktorvater Prof. Dr. med. Martin Oppermann, der meine Begeisterung für die Immunologie in seiner Vorlesungsreihe im zweiten klinischen Semester weckte und meine Promotionsstelle einrichtete.

Meinem Betreuer Dr. rer. nat. Marcel Liebick verdanke ich ein fachlich wertvolles und strukturiertes Forschungssemester im Labor.

Ich bedanke mich bei beiden für die praktische Wissensvermittlung und ferner für die Bereitstellung des technischen Equipments.

Dem Institut für Zelluläre und Molekulare Immunologie unter der Leitung von Prof. Dr. rer. nat. J. Wienands richte ich an dieser Stelle ein großes Dankeschön für alle wissenschaftlichen Impulse und die freundliche Aufnahme in die Laborgemeinschaft aus.

Grundlegend gilt der Dank meiner Alma Mater, der Georg-August-Universität Göttingen.