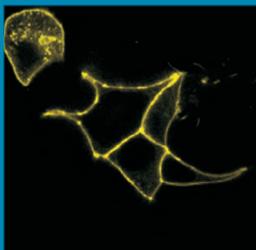
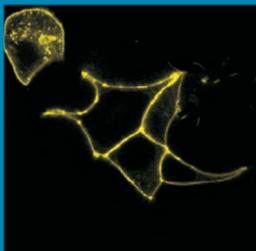
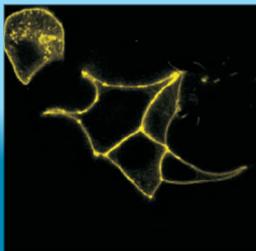


FUSIONSPROTEINE AUS β_2 -ADRENERGEM REZEPTOR UND GFP ALS PH-SENSIBLE SENSOREN



EVA HARTMANN

INAUGURAL-DISSERTATION

zur Erlangung des Grades eines
Dr. med. vet.
beim Fachbereich Veterinärmedizin
der Justus-Liebig-Universität Gießen

édition scientifique
VVB LAUFERSWEILER VERLAG

Das Werk ist in allen seinen Teilen urheberrechtlich geschützt.

Jede Verwertung ist ohne schriftliche Zustimmung des Autors oder des Verlages unzulässig. Das gilt insbesondere für Vervielfältigungen, Übersetzungen, Mikroverfilmungen und die Einspeicherung in und Verarbeitung durch elektronische Systeme.

1. Auflage 2006

All rights reserved. No part of this publication may be reproduced, stored in a retrieval system, or transmitted, in any form or by any means, electronic, mechanical, photocopying, recording, or otherwise, without the prior written permission of the Author or the Publishers.

1st Edition 2006

© 2006 by VVB LAUFERSWEILER VERLAG, Giessen
Printed in Germany



VVB LAUFERSWEILER VERLAG
édition scientifique

STAUFENBERGRING 15, D-35396 GIESSEN
Tel: 0641-5599888 Fax: 0641-5599890
email: redaktion@doktorverlag.de

www.doktorverlag.de

Aus dem „Institut für Pharmakologie und Toxikologie des Fachbereiches Veterinärmedizin der
Justus-Liebig-Universität Gießen“

Betreuer: Prof. Dr. E. Petzinger

und

dem „Institut für Pharmakologie der Julius-Maximilians-Universität Würzburg“

Betreuer: Prof. Dr. M. Lohse

Fusionsproteine aus β_2 -adrenergem Rezeptor und GFP als pH-sensible Sensoren

INAUGURAL-DISSERTATION
zur Erlangung des Grades eines
Dr. med. vet. beim
Fachbereich Veterinärmedizin
der Justus-Liebig-Universität Gießen

eingereicht von

Eva Hartmann

Tierärztin aus Saarbrücken

Gießen 2006

Mit Genehmigung des Fachbereichs Veterinärmedizin
der Justus-Liebig-Universität Gießen

Dekan:
Prof. Dr. M. Reinacher

Gutachter:
Prof. Dr. E. Petzinger
Prof. Dr. M. Lohse

Tag der Disputation: 18.10.2006

Erklärung

Hiermit erkläre ich ehrenwörtlich, dass ich die vorgelegte Dissertation selbstständig und ohne unerlaubte fremde Hilfe und nur mit den Hilfen angefertigt habe, die ich in der Dissertation angegeben habe. Alle Textstellen, die wörtlich oder sinngemäß aus veröffentlichten oder nicht veröffentlichten Schriften entnommen sind, und alle Angaben, die auf mündlichen Auskünften beruhen, sind als solche kenntlich gemacht. Bei den von mir durchgeführten und in der Dissertation erwähnten Untersuchungen habe ich die Grundsätze guter wissenschaftlicher Praxis, wie sie in der „Satzung der Justus-Liebig-Universität Gießen zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis“ niedergelegt sind, eingehalten.

Würzburg, den 25.1.06

Danksagung

Die vorliegende Arbeit wurde im Institut für Pharmakologie der Julius-Maximilians-Universität in Würzburg angefertigt.

Ich möchte mich bei allen bedanken, die mir diese Arbeit ermöglicht haben, vor allem:

Herrn Prof. Dr. E. Petzinger für seine Bereitschaft, meine Arbeit am Fachbereich Veterinärmedizin der Justus-Liebig-Universität zu vertreten. Ich konnte somit eine Doktorandenstelle in einem externen Institut annehmen.

Herrn Prof. Dr. M. Lohse, der mir erlaubte diese Arbeit mit den Mitteln des Institutes für Pharmakologie der Julius-Maximilians-Universität anzufertigen. Dies war eine große Chance, Einblick in ein neues Fachgebiet zu gewinnen.

Herrn Dr. C. Krasel, für die Vergabe und Betreuung der Arbeit. Er führte mich in das Gebiet des molekularbiologischen Experimentierens ein und stand mir bei allen Versuchen sachkundig und richtungsweisend zur Seite.

Frau Dr. U. Zabel hatte für alle Fragen ein offenes Ohr und unterstützte die Arbeit mit vielen Ideen und in zahlreichen Diskussionen. Neben der experimentellen Hilfe half sie mir mit ihrer konstruktiven Kritik auch über die Schwierigkeiten der ersten Schreibversuche hinweg.

Weiterer Dank gilt auch Herrn C. Dees, auf dessen experimentelle Erfahrung ich bei den Bindungsexperimenten und den Cyclaseassays zurückgreifen durfte.

Nicht zuletzt möchte ich meinen Eltern und meinen Geschwistern danken, deren uneingeschränkter Unterstützung ich mir auch auf diesem Weg sicher sein konnte.

Inhaltsverzeichnis

Erklärung	III
Danksagung	IV
Inhaltsverzeichnis	V
Abkürzungen	IX
1. Zusammenfassung	1
2. Einleitung	3
2.1. G-Protein gekoppelte Rezeptoren.....	3
2.1.1. Internalisierung von GPCR.....	6
2.2. Green fluorescent Protein (GFP= grün fluoreszierendes Protein).....	8
2.2.1. Biochemische Eigenschaften von GFP	8
2.2.2. Struktur des GFP.....	9
2.2.3. Klassifizierung von GFP.....	10
2.2.4. Red fluorescent Protein.....	12
2.2.5. Nutzungsmöglichkeiten von GFP.....	13
2.2.5.1. Passiver Einsatz von GFP.....	13
2.2.5.2. GFP als aktiver Indikator.....	13
2.3. Zielsetzung der Arbeit.....	14
3. Material und Methoden	17
3.1. Materialien.....	17
3.2. Molekularbiologische Methoden.....	19
3.2.1. Technik zur Klonierung von DNA.....	19
3.2.1.1. DNA- Spaltung mit Restriktionsendonukleasen.....	19
3.2.1.2. Gewinnung von DNA durch Polymerase Chain Reaction.....	19
3.2.1.3. Analyse und Isolierung von DNA-Fragmenten mittels	

	Agarosegelelektrophorese.....	19
	3.2.1.4. Ligierung	20
	3.2.1.5. Transformation	20
3.2.2.	Gewinnung von Plasmid-DNA	21
	3.2.2.1. Mini-Präparation	21
	3.2.2.2. Maxi-Präparation.....	21
	3.2.2.3. Konzentrationsbestimmung mittels Absorptions- spektrometrie	22
3.3.	Zellkultur.....	22
	3.3.1. HEK293-Zellen (HEK= Human Embryonic Kidney).....	22
	3.3.2. Lagerung von Zellen	23
	3.3.3. Expression in eukaryotischen Zellen	23
	3.3.3.1. Transiente Transfektion von Zellen mit Effectene.....	23
	3.3.3.2. Transiente Transfektion von Zellen mit Kalziumphosphat.	23
	3.3.3.3. Generierung einer stabil exprimierenden Zelllinie	23
3.4.	Versuche zur Charakterisierung der pH-Eigenschaften der Konstrukte	24
	3.4.1. Herstellung der Versuchspuffer	24
	3.4.2. Versuche am Spektrometer	24
	3.4.3. Vorbereitung der Zellen für Versuche am Mikroskop.....	24
	3.4.4. Photometrie	25
3.5.	Proteinchemische Methoden	25
	3.5.1. Membranpräparation	25
	3.5.2. Proteinbestimmung nach Bradford.....	26
	3.5.3. Proteinbestimmung mit Bicinochonin-Säure	26
	3.5.4. SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese	26
	3.5.5. Western Blot.....	27

3.6.	Rezeptorinternalisierung	29
3.6.1.	Internalisierungsassay von β_2 AR mit [3 H] CGP 12177	29
3.7.	Bindungsexperiment.....	29
3.7.1.	Radioligandenbindung	29
3.7.2.	Sättigungsexperiment.....	30
3.7.3.	Liganden-Kompetitions-Experimente.....	30
3.8.	Nachweis der „Second-messenger“ Bildung.....	31
3.8.1.	Cyclaseassay.....	31
4.	Ergebnisse	33
4.1.	Klonierung.....	33
4.2.	Charakterisierung der Rezeptormutanten.....	35
4.2.1.	Konfokalmikroskopie.....	35
4.2.2.	Western Blot.....	36
4.2.3.	Rezeptorbindung mit 125 J-Cyanopindolol	37
4.2.4.	Adenylatcyclaseassay	38
4.2.5.	Internalisierung der Rezeptormutanten	39
4.2.5.1.	Internalisierungsassay	39
4.2.5.2.	Konfokalmikroskopie.....	40
4.3.	pH-Abhängigkeit der Rezeptormutanten	41
4.3.1.	Untersuchung des pH-Verhaltens am Spektrometer	41
4.3.2.	Konfokalmikroskopie.....	42
4.3.3.	Photometrie	42
4.4.	Verhalten bei Neutralisierung der pH-Gradienten	45
4.4.1.	Konfokalmikroskopie.....	45
4.4.2.	Photometrie	47
5.	Diskussion	49

VIII

5.1.	Konstruktion der Fusionsproteine	49
5.2.	Charakterisierung der Rezeptormutanten.....	51
5.3.	pH-Abhängigkeit der Rezeptormutanten	54
5.4.	Ausblicke.....	56
	Literaturverzeichnis.....	57

Abkürzungen

ATP	Adenosin-5'-triphosphat
ADP	Adenosindiphosphat
AS	Aminosäure
β_2 AR	Beta-2-adrenerger Rezeptor (β_2 -adrenergic receptor)
BBS	Kochsalzlösung mit BES gepuffert (BES buffered saline)
BCECF	2'7'-Bis(2-carboxylethyl)-5(6)-carboxyfluorescein)
BCS	Bicinchonin Säure
BES	N,N-bis(2-Hydroxyethyl)-2-Aminoethansulfonsäure
BFP	Blau fluoreszierendes Protein (blue fluorescent protein)
BSA	Bovines Serumalbumin (bovine serum albumin)
cAMP	cyklisches Adenosinmonophosphat
CCP	Vesikel mit Clathrin Ummantellung (clathrin coated pits)
CFP	Cyan fluoreszierendes Protein (cyan fluorescent protein)
cpm	radioaktive Zerfälle pro Minute (Cerenkov)(counts per minute)
C-Terminus	Carboxyterminus
deGFP	pH-sensible Mutante des grün fluoreszierenden Proteins
DMEM	Zellkulturmedium (Dulbecco's Modified Eagle Medium)
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure (desoxyribonucleid acid)
DPBS	phosphathaltiger Puffer (Dulbecco's phosphate buffered saline)
DsRed	Rot fluoreszierendes Protein der Spezies Discosoma
DTT	Dithiothreitol
ECFP	Mutante des cyan fluoreszierenden Wildtypproteins (enhanced cyan fluorescent protein)
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EGFP	Mutante des grün fluoreszierenden Wildtypproteins (enhanced green fluorescent protein)
EYFP	Mutante des gelb fluoreszierenden Wildtypproteins (enhanced yellow fluorescent protein)
FCS	foetales Kälberserum (fetal calf serum)
FRET	Fluoreszenzresonanzenergietransfer (fluorescence resonance energy transfer)
GDP	Guanosindiphosphat
GEF	Guanin-Nukleotid Austauschfaktor (Guanin-nucleotide exchange factors)
GFP	Grün fluoreszierendes Protein (green fluorescent protein)
GIRK	Kaliumkanäle (G-protein coupled inwardly rectifying potassium channels)
G-Proteine	Guaninnukleotide bindendes Protein (Guanine-nucleotide binding proteins)
GPCR	G-Protein gekoppelte Rezeptoren (G-protein coupled receptors)
GRK	G-Protein gekoppelte Rezeptorkinasen (G-protein coupled receptor kinases)
GRP	G-Protein gekoppelte Phosphatase (G-protein coupled receptor phosphatase)
GTP	Guanosin-5'-triphosphat
HBS	Kochsalzlösung mit HEPES gepuffert (HEPES buffered saline)
HEK	menschliche Nierenepithelzellen (human embryonic kidney cells)
HEPES	4-(2-hydroxyethyl)piperazine-1-(2-ethansulfat)
HRP	Meerrettichperoxidase (horseradish peroxidase)
IC ₅₀	Konzentration eines Inhibitors, bei der die Aktivität des gehemmten Proteins nur noch die Hälfte des Maximalwertes erreicht
IBMX	3-Isobutyl-Methylxanthine

K_D	Dissoziationskonstante
kD	Kilodalton
MBS	Maleimidobenzoesäure-hydroxysuccinimid-ester
MES	4-Morpholinoethansulfonsäure
mRFP1	monomeres rot fluoreszierendes Protein (monomeric red fluorescent protein)
N-Terminus	Aminoterminus
PBS	phosphathaltige Kochsalzlösung (phosphate buffered saline)
PCR	Polymerase Kettenreaktion (polymerase chain reaction)
PDMPO	(2-(4-pyridyl)-5-((4-(2-dimethylaminoethylaminocarbonyl)methoxy)phenyl)oxazol
PEI	Polyethylenimin
PKA	Proteinkinase A
PKC	Proteinkinase C
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
RNA	Ribonukleinsäure (ribonucleic acid)
rpm	Umdrehung pro Minute (rotations per minute)
RT	Raumtemperatur
SNARF	Seminaphthorhodafluor
SDS	Sodiumdodecylsulfat
Tab	Tabelle
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin
TAE	Tris-Acetat-EDTA Puffer
UV	Ultraviolett
YFP	Gelb fluoreszierendes Protein (yellow fluorescent protein)

1. Zusammenfassung

Eukaryoten können über Rezeptormoleküle der Plasmamembran externe Reize in intrazelluläre Signale umwandeln. Bei G-Protein gekoppelten Rezeptoren (GPCR) wird die Signalübermittlung durch Vorgänge wie Desensibilisierung, Internalisierung und Resensibilisierung gesteuert. So auch beim β_2 -adrenergen Rezeptor (β_2 AR), welcher der am besten untersuchte GPCR ist. Er gelangt im Vorgang der Internalisierung auf seinem intrazellulären Weg in zytosolische Kompartimente, wie Endosomen und Lysosomen. Der in diesen Organellen vorliegende saure pH soll einerseits durch Konformationsänderungen die Dephosphorylierung und Resensibilisierung der Rezeptoren ermöglichen und dient andererseits in Lysosomen als Voraussetzung für die Aktivität der lysosomalen Hydrolase, welche Rezeptorstrukturen abbaut. Durch diese komplexen Vorgänge wird die Anzahl der Rezeptormoleküle an der Zelloberfläche reguliert und verhindert, dass durch länger andauernde Rezeptorstimulation eine Daueraktivierung der intrazellulären Signalkaskaden erfolgt.

Mit der Entdeckung des grün fluoreszierenden Proteins (GFP) wurde ein relativ indifferenter, genetisch kodierter zellulärer Fluoreszenzmarker zur Klärung von zellbiologischen Fragestellungen gefunden. Durch Strukturanalysen wurden Mutationsstellen identifiziert, welche die Konstruktion unterschiedlich pH-sensitiver und unterschiedlich farbiger GFP-Mutanten ermöglichten.

Durch Konstruktion von Fusionsproteinen aus dem β_2 AR und GFP sollten in dieser Arbeit pH-Sensoren erstellt werden, die pH-Veränderungen in der Umgebung des β_2 AR während des Vorgangs der Internalisierung nachweisen. Dazu wurde ein pH-sensitives GFP an den N-Terminus des Rezeptors und ein pH-insensitives Fluorophor an den C-Terminus des β_2 AR kloniert. Dadurch, dass der C-Terminus des Rezeptors beim Vorgang der Internalisierung im Zytosol verbleibt und der N-Terminus in die unterschiedlichen intrazellulären, kompartimentären Milieus eindringt, sollte durch Messung der Fluoreszenzverhältnisse von pH-sensitivem zu pH-insensitivem Fluorophor eine Aussage über den pH-Wert in der Umgebung des extrazytoplasmatischen Fluorophors möglich sein.

Durch genaue Charakterisierung der Rezeptormutanten konnte gezeigt werden, dass die β_2 AR-Funktion in den Fusionsproteinen unbeeinflusst blieb und diese auf physiologische Weise internalisierten. Die Rezeptormutanten zeigten außerdem die gewünschten pH-sensitiven Eigenschaften und konnten nachweisen, dass der β_2 AR im Vorgang der Internalisierung eine Veränderung seines Umgebungs-pH erfährt.

Summary

Eucaryotical organisms are able to transfer external signals into internal signals by receptors belonging to the plasmamembrane. G-protein coupled receptors (GPCR) can regulate the signaltransduction by mechanisms like desensitization, internalization and resenzitation. This is also the case with the β_2 AR who is a well characterized GPCR. GPCRs pass cytosolic compartments like endosomes and lysosomes in the cell during internalization. The acid pH in these organells is said to be important for conformational changes and allows the resenzitation of the internalized receptor by dephosphorylation. The acid pH is also needed for the activity of the lysosomal hydrolase, which destroys degraded receptor structures. With these complex mechanisms the number of receptor molecules in the cell surface is regulated and the overstimulation of the cell is prevented.

With the recovery of the green fluorescent protein as a useful fluorescent marker for experiments to answer cellbiological questions there was a great intrest in the structure of this protein. By structural analysis a lot of mutation points were found, which allowed the construction of different pH-sensitive and different coloured GFP-Mutants.

By making a construct consisting of GFP and β_2 AR a pH-sensor should be constructed which is able to show pH-changes in the surrounding of the β_2 AR during internalization. For this reason a pH-sensitive GFP was fused to the N-terminus of the receptor and a pH-insensitive fluorophore was cloned to the C-terminus of the β_2 AR. The idea was made of the knowledge that the C-terminus of the receptors remains staying in cytosol during internalization and that the N-terminus gets into the different intracellular compartments and is delivered to the changing pH-milieus. By measuring the fluorescence differences between the C-terminal and N-terminal GFP-mutants we wanted to show the changes of pH in the surrounding of the extracytoplasmatic fluorophor.

The characterization of the receptor mutant showed that the β_2 AR function in the protein remained untouched. The receptor internalized physiologically. The receptor mutants did also show the expected pH-sensitive qualities and showed that the β_2 AR passes different pH-mediums during internalization.

2. Einleitung

2.1. G-Protein-gekoppelte Rezeptoren

Zellen von Eukaryoten sind in der Lage, auf externe Reize wie Licht, Ionen, Duftstoffe, Hormone und Neurotransmitter, zu reagieren. Als Vermittler dieser Informationen zwischen Extrazellulär- und Intrazellulärraum dienen Rezeptormoleküle der Plasmamembran. Man unterscheidet drei Arten von Membranrezeptormolekülen. Neben spannungs- und ligandengesteuerten Ionenkanälen gibt es Rezeptoren mit enzymatischer Aktivität und G-Protein-gekoppelte Rezeptoren (GPCR= G-protein coupled receptors), die in großer Vielfalt im eukaryotischen Organismus vorkommen. Die Reaktion auf für sie spezifische Botenstoffe, erfolgt meist mit hoher Affinität und Selektivität. Die externen Reize werden durch Aktivierung intrazellulärer Signaltransduktionswege umgesetzt und die Information ins Zellinnere weitergeleitet. Im Falle der GPCR wird dabei das Signal über heterotrimere G-Proteine (Guanine-nucleotide binding proteins) übertragen.

Mittlerweile sind ca. 1000 unterschiedliche GPCR bekannt, die aufgrund ihrer Sequenzhomologie und Rezeptorfunktion in 100 Untergruppen eingeteilt werden können. Alle GPCR besitzen als strukturelle Gemeinsamkeit sieben Transmembranhelices (jeweils 20-27 Aminosäuren), welche drei extrazelluläre Schleifen (jeweils 5-230 Aminosäuren), einen extrazellulären Aminoterminus (N-Terminus mit 7-595 Aminosäuren) und einen intrazellulären Carboxylterminus (C-Terminus 12-356 Aminosäuren) bilden (Tae et al. 1998).

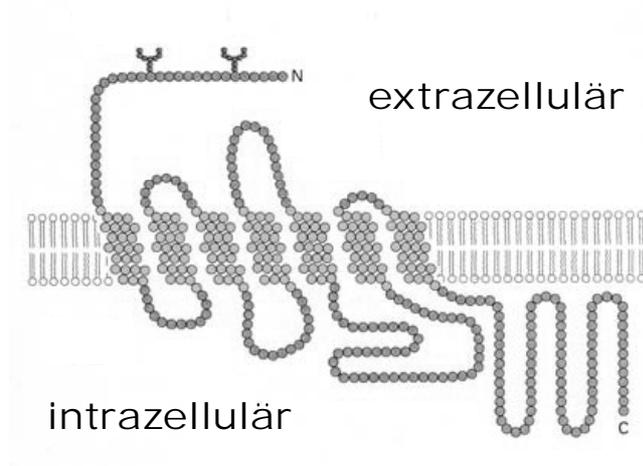


Abb.1: Topologie des β_2 -adrenergen Rezeptors. Jeder Kreis entspricht einer Aminosäure. Zu erkennen ist der extrazelluläre Bereich mit dem N-Terminus und der intrazytoplasmatische Bereich mit dem C-Terminus.

Es gibt drei große Gruppen, denen die wichtigsten GPCRs angehören (Tae et al. 1998; Gether 2000; Pierce et al. 2002):

1. Familie der Rhodopsin / β_2 -adrenergen Rezeptoren:

Die größte Gruppe ist charakterisiert durch ein DRY-Motiv aus den Aminosäuren Asp (130)-Arg (131)- Tyr (132) am zytosolischen Ende des dritten Transmembransegmentes. Ein sehr gut charakterisiertes Mitglied ist der β_2 -adrenerge Rezeptor.

2. Familie der Peptidhormonrezeptoren

Secretin-, Glucagon-, VIP-, GRH-, Calcitoninrezeptoren besitzen einen großen N-Terminus (116-147 Aminosäuren) mit mehreren Cysteinen, die ein Netzwerk von Disulfidbrücken ausbilden.

3. Familie der Rezeptoren für Neurotransmitter

GABA_B-, Kalzium-, Pheromon-, Geschmacksrezeptoren besitzen einen langen, extrazellulären N-Terminus mit 500-600 Aminosäuren.

In allen GPCR sind die sieben Transmembranhelices vermutlich als Bündel um die im Zentrum liegende dritte Transmembrandomäne angeordnet. Durch die Lage der Transmembransegmente 3, 4, 5, 6 und 7 wird eine Bindungstasche gebildet, die vor allem für kleine Ligandenmoleküle, wie Epinephrin, Serotonin und Dopamin, als Interaktionsstelle dient. Große Peptidliganden, wie Peptidhormone und Neuropeptide, binden an extrazelluläre Bereiche. An Rhodopsin, dem Lichtrezeptor, führt eine Konformationsänderung des Liganden zur Neuorientierung der Transmembransegmente und damit zur Aktivierung des Rezeptors (Gether 2000; Palczewski 2000). Im Falle des β_2 AR werden die Transmembransegmente drei und sechs verschoben. Dabei spielen das DRY-Motiv des dritten Transmembransegmentes und Glu268 des sechsten Transmembransegmentes eine wichtige Rolle. Vermutlich wird das Aspartat in Position 130 des DRY-Motives protoniert und dadurch die Konformationsänderung ausgelöst, welche zur Aktivierung des an den Rezeptor gekoppelten, heterotrimeren G-Proteins durch Freilegung von Bindungsstellen führt (Ballesteros et al. 2001).

G-Proteine dienen als Informationsvermittler zwischen aktiviertem Rezeptor und intrazellulärem Effektorsystem und bestehen aus drei Untereinheiten, der α - β - und γ -Untereinheit. Es sind unterschiedliche Varianten dieser Untereinheiten bekannt (20 α -, 6 β -, 12 γ - Untereinheiten) (Ray et al. 1995; Hamm 1998). Die α -Untereinheit besitzt Bindungsstellen für die Bindung von GDP und GTP. Die β - und γ -Untereinheiten sind zu einem festen $\beta\gamma$ -Komplex verknüpft. Die Klassifizierung der G-Proteine erfolgt anhand der α -Untereinheit. Man unterscheidet vier Gruppen von G-Proteinen G_s , G_i , G_q , $G_{12/13}$, die unterschiedliche Second-messenger aktivieren.

G_s : Stimulierung der Adenylatzyklase

G_i : Hemmung der Adenylatzyklase

$G_{q/11}$: Aktivierung der Phospholipase C

$G_{12/13}$: Aktivierung des Guanin-Nukleotid Austauschfaktors (Guanine nucleotide exchange factor= GEF) zur Aktivierung von Rho (stress-fibre formation) (Pierce et al. 2002)

Durch Aktivierung des Rezeptors kommt es in der α -Untereinheit zur Dissoziation von GDP (Guanosindiphosphat) und Bindung von GTP (Guanosintriphosphat) (Hamm 1998). Die dadurch hervorgerufene Konformationsänderung der α -Untereinheit führt dazu, dass sie sich vom $\beta\gamma$ -Komplex trennt. Beide Untereinheiten besitzen unabhängig voneinander die Fähigkeit unterschiedliche Effektorsysteme zu aktivieren. Die α -Untereinheit reguliert direkt die Aktivität von Second-messenger Kaskaden (s.o.). Die $\beta\gamma$ -Untereinheit aktiviert Effektoren, wie die Adenylatzyklase, Phospholipase A2, Phospholipase C, sowie Kalium- und Kalziumkanäle (Ray et al. 1995; Hamm 1998).

Es kommt anschließend zur Hydrolyse des gebundenen GTP in GDP und Phosphat. Dieser Vorgang kann durch RGS-Proteine (RGS= regulator of protein signalling) beschleunigt

werden und führt zur Reassoziierung der heterotrimeren Untereinheiten (De Vries et al. 2000a, b). Der G-Protein GTPase-Kreislauf wird geschlossen.

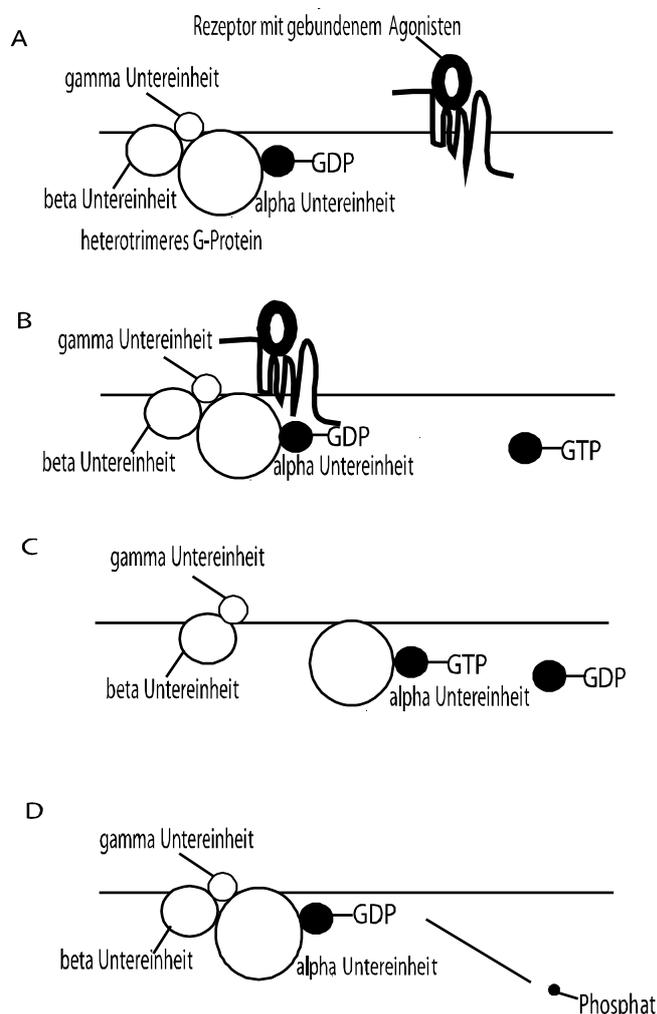


Abb.2: Abbildung (A) zeigt den durch einen Agonisten aktivierten β_2 AR und das heterotrimeres G-Protein, charakterisiert durch seine $\alpha\beta\gamma$ -Trimer Struktur mit dem im inaktiven Zustand gebundenen GDP. Ein durch einen Agonisten aktivierter Rezeptor (B) aktiviert G-Proteine dadurch, dass er den Austausch von GDP an der α -Untereinheit gegen GTP (C) katalysiert. Als Folge davon dissoziiert das G-Protein in α_{GTP} und das $\beta\gamma$ -Dimer (C). Der Aktivierung folgt eine Inaktivierung, indem das GTP zu $GDP+P$ gespalten wird. α_{GDP} und $\beta\gamma$ -Dimer reassoziieren zu einem inaktiven Trimer (D).

Diesem beschriebenen Modell, in dem jeder GPCR als ein Monomer existiert, das in einem 1:1 Verhältnis mit seinem G-Protein vorliegt, steht die Beobachtung gegenüber, dass Rezeptoren Dimere oder sogar Oligomere bilden. Je nachdem, ob sich homologe oder heterologe Rezeptoren funktionell zusammenschließen, spricht man von homodimeren oder monooligomeren bzw. heterodimeren und heterooligomeren Rezeptoren. Auf welche Art dieser Zusammenschluß allerdings in Rezeptorfunktion oder Rezeptorinternalisierung eingreift, ist bis jetzt noch nicht genau geklärt. Man vermutet, dass es zur Bildung neuer Bindungsstellen und zur Verstärkung von Signalkaskaden kommt. Vermutlich hat die Heterodimerisierung eine Wirkung auf die Internalisierung der Rezeptoren (Devi 2001; Rios et al. 2001; Pierce et al. 2002).

2.1.1. Internalisierung von GPCR

Viele GPCR durchlaufen nach Aktivierung durch Agonisten einen Zyklus, in dem die Rezeptoren: a) desensibilisiert
b) internalisiert
c) abgebaut oder an die Zellmembran zurücktransportiert werden. (Ferguson 2001; Tan et al. 2004)

Die Desensibilisierung von GPCR ist am besten für den β_2 AR untersucht und wird daher im Folgenden an diesem Beispiel erläutert.

Um die zelluläre Signaltransduktion genau zu überwachen, ist es notwendig, dass nach Rezeptorstimulierung keine Daueraktivierung der zellulären Signalkaskade erfolgt. Bei andauernder und wiederholter Rezeptorstimulierung kommt es daher durch den Vorgang der Desensibilisierung zur Abschwächung der intrazellulären Signalkaskaden.

Dieser Zustand wird durch Phosphorylierung des aktivierten Rezeptormoleküls induziert, wodurch die funktionelle Trennung von Rezeptor und G-Protein eingeleitet wird. Die Phosphorylierung erfolgt dabei durch Second-messenger Kinasen wie PKA und PKC, oder durch ein Mitglied der GRK-Familie (G-protein coupled receptor Kinases) (Pierce et al. 2002; Lefkowitz 2004).

Die Second-messenger abhängigen Proteinkinasen (Proteinkinase A= PKA; Proteinkinase C= PKC) werden durch Aktivierung der GPCR und Bildung von Second-messenger stimuliert. Dabei wird PKA durch cAMP stimuliert, das durch die Adenylatzyklase gebildet wurde. Die Adenylatzyklase wurde zuvor durch ein G_s -Protein aktiviert. PKA induziert die Phosphorylierung und damit Aktivierung intrazellulärer Enzyme. Außerdem kann es den aktivierten Rezeptor selbst phosphorylieren und durch eine verringerte Interaktion zwischen G-Protein und Rezeptor eine Rezeptordesensibilisierung unterstützen (Iwami et al. 1995). Die PKC wird durch Aktivierung von G_q -Proteinen stimuliert, die wiederum die Bildung von Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat und Diacylglycerin induzieren. PKC ist in der Lage, unterschiedliche Zielproteine zu phosphorylieren und dadurch zu aktivieren.

Von den GRKs sind sieben unterschiedliche Varianten bekannt, die in drei Familien eingeteilt werden:

GRK 1/7 \Rightarrow Rhodopsinkinase

GRK 2/3 \Rightarrow β -AR-Rezeptorkinase

GRK 4 \Rightarrow GRK 4, 5, 6 (in unterschiedlichen Organen vorkommend)

(Haga et al. 1994; Ferguson et al. 1996)

GRK 1-3 sind in unstimulierten Zellen im Zytosol zu finden und werden bei Aktivierung von Rezeptoren an die Zellmembran transportiert. GRK 4, 5 und 6 sitzen in der Zellmembran (Krupnick und Benovic 1998). GRKs phosphorylieren Serin- und Threonin-Reste des Rezeptors.

Die Phosphorylierung des β_2 AR erfolgt meist durch die GRK-2 und PKA. Durch die Phosphorylierung mit GRK-2 werden weitere regulatorische Proteine, sogenannte Arrestine (48 kDa), aktiviert (Lohse et al. 1992; Ferguson 2001).

Man unterscheidet zwei Gruppen von Arrestinen, solche die im optischen System zu finden sind und solche, die im ganzen Organismus auftreten (β -Arrestine 1 und 2) (Krupnick und Benovic 1998). β -Arrestine werden nach Rezeptoraktivierung innerhalb kürzester Zeit ($t_{1/2}$ = 2,3 Minuten) an die Plasmamembran transportiert. Dort interagieren sie mit den durch

Agonisten aktivierten und durch GRK phosphorylierten GPCRs (Ferguson 1998). Außerdem kommt es zur Interaktion mit der β -Untereinheit des Adaptorproteins-2 (AP-2) und Clathrin (Marchese et al. 2003). Dabei interagiert Clathrin mit einer Sequenz im C-terminalen β -Arrestin Ende (Stelle 373-377). Die Bindungsstelle für AP 2, das aus vier Untereinheiten besteht, ist noch nicht genau identifiziert (Laporte et al. 2000). Durch diesen Vorgang wird die Signalweiterleitung zwischen Rezeptor und G-Protein unterbrochen und die Internalisierung des Rezeptors in Clathrin-coated-pits (CCP) eingeleitet (Haga et al. 1994; Koenig und Edwardson 1997). Die Internalisierung des in CCP eingeschlossenen Rezeptorkomplexes erfolgt auf eine Dynamin-abhängige Weise. Dynamin dient als Vermittler der CCP Bildung (Liang et al. 2003; Tan et al. 2004).

Neben der Internalisierung durch CCPs sind noch weitere Wege bekannt, die allerdings wesentlich seltener beobachtet werden können. Es handelt sich dabei um die Internalisierung von Rezeptoren durch Ausbildung von Caveolae oder uncoated Vesikel (von Zastrow 2001; Pierce et al. 2002). Die CCPs gelangen ins Zellinnere und fusionieren mit frühen Endosomen. Der gebundene Ligand gelangt dadurch, zusammen mit dem N-terminalen Anteil des Rezeptors, in das Innere des Endosoms. Der C-terminale phosphorylierte Rezeptoranteil bleibt im Zytosol (Krueger et al. 1996). In den Endosomen liegt ein pH-Wert von pH 6,0-6,8 vor, welcher durch eine ATP-abhängige Protonenpumpe generiert wird. Unter diesen Bedingungen kommt es zur Dissoziation von Ligand und Rezeptor (Mellman 1996; Koenig und Edwardson 1997). Der Rezeptor wird durch Phosphatasen (GRP= G-protein coupled receptor Phosphatase) dephosphoryliert. Dieser Vorgang findet vermutlich nur statt, wenn sich der Rezeptor im sauren pH-Bereich aufhält und dadurch eine Konformationsänderung erfährt (Krueger et al. 1996; Liang et al. 2003).

Für die Rezeptoren sind im weiteren Verlauf zwei Wege bekannt. Sie werden entweder in Vesikeln an die Zellmembran zurücktransportiert oder zusammen mit dem Liganden in den frühen Endosomen angereichert und durch Transportvesikel in späte Endosomen, sogenannte prä-lysosomale Kompartimente, transportiert (von Zastrow und Kobilka 1992). Der Übergang zwischen den späten Endosomen und den Lysosomen ist fließend (Aniento et al. 1993). Späte Endosomen, die sich durch Fusion verdichten, wandeln sich in Lysosomen um. Bei einem pH-Wert von pH 5 werden mit Hilfe der lysosomalen Hydrolasen alle Strukturen abgebaut (Mellman 1996).

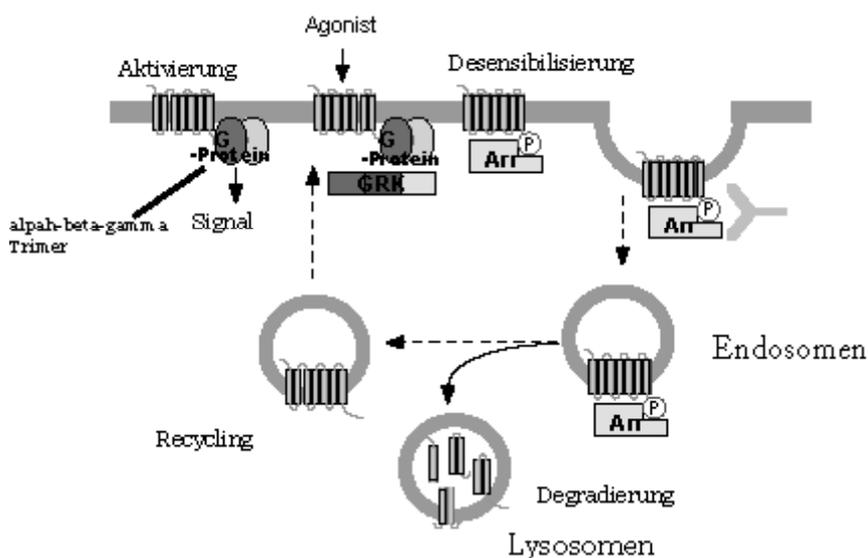


Abb.3: Die Abbildung zeigt die Signalkaskade, die nach Agonistenaktivierung des Rezeptors abläuft. Der Rezeptor wird nach Phosphorylierung durch die GRK und Anlagerung von Arrestin in CCPs internalisiert und gelangt in Endosomen. Dort entscheidet sich, ob er wieder an die Zellmembran zurücktransportiert oder in Lysosomen abgebaut wird.

Welchen Weg ein Rezeptor einschlägt, ist von einem Signal abhängig, das vermutlich im C-terminalen Ende des Proteins zu finden ist. Dieser Bereich reguliert die endosomale Verteilung der Rezeptoren. Möglicherweise ist die Ubiquitinierung des Rezeptors (Bindung von Ubiquitin mit Hilfe des Ubiquitin-Aktivierungs Enzymes, des Ubiquitin-Konjugierungsenzymes und der Ubiquitinligase), genauso wie die Zusammenlagerung von Rezeptoren, für die Entscheidung mitverantwortlich, dass der Rezeptor in Lysosomen abgebaut wird (von Zastrow und Kobilka 1992; Ferguson et al. 1996; Shenoy et al. 2001; Shenoy und Lefkowitz 2003).

Der Vorgang der Rezeptorinternalisierung und der Rücktransport der Rezeptoren an die Zellmembran erfolgen innerhalb von 60 Minuten (Kallal et al. 1998). Bei Dauerstimulierung der Rezeptoren kommt es zum Verlust von Ligandenbindungsstellen in der Zelle. Diese „Downregulierung“ mit dem Verlust an Bindungsstellen erfolgt vermutlich durch einen vermehrten Abbau von Rezeptoren in Lysosomen, sowie eine verminderte Neusynthese und soll eine Überstimulierung der Zellen verhindern (Moore et al. 1999; Ferguson 2001).

2.2. Green Fluorescent Protein (=GFP, grün fluoreszierendes Protein)

Das GFP wurde neben Aequorin, einem chemifluoreszenten Protein der Quallenart *Aequorea*, entdeckt. Es wurde als der Bestandteil beschrieben, der in einer Lösung von Aequorin bei Sonnen- oder UV-Licht zu einer grünlichen Färbung führt.

Das Protein wurde daraufhin isoliert, genauer untersucht und sein Spektrum beschrieben. Da sich die Aequorin-Emissionsfrequenz (470 nm) mit der Exzitationsfrequenz des GFPs überschneidet, wurde vermutet, dass Aequorin in der Lage ist, Lumineszenzenergie auf GFP zu übertragen. Diese Vermutung wurde dadurch gestützt, dass die blaue Fluoreszenz des Aequorins durch die Anwesenheit des GFPs in eine grüne Fluoreszenz umgewandelt wurde. Die Möglichkeit eines Energietransfers zwischen fluoreszierenden Coelenteraten-Proteinen wurde in Betracht gezogen (Tsien 1998). Neben GFP aus *Aequorea* konnten weitere GFPs in anderen Coelenteraten nachgewiesen werden, wie in *Obelia*-, *Phialidium*- und *Renilla*-Arten. Die GFPs aus *Aequorea* und *Renilla* Arten zeigen strukturelle Ähnlichkeiten und vergleichbare Eigenschaften. Übereinstimmungen mit GFPs anderer Arten sind allerdings kaum zu beobachten (Cubitt et al. 1995). Das *Aequorea*-GFP konnte kloniert werden. Dadurch entstand die Möglichkeit, die biochemischen Eigenschaften des GFP genauer zu untersuchen, seine Struktur zu charakterisieren und durch Mutationen neue Varianten zu erstellen.

2.2.1. Biochemische Eigenschaften von GFP

Das GFP ist ein Protein aus 238 Aminosäuren. Es besitzt zwei Exzitationsmaxima, ein größeres Maximum bei 395 nm und ein kleineres bei 475 nm. (Heim et al. 1994) Die Größe des Extinktionskoeffizienten beträgt 21-30 bzw. 7-15 $\text{mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$. Das Emissionsmaximum bei Anregung mit 395 nm liegt bei 508 nm und die Emission bei Anregung mit 475 nm bei 503 nm. Der angeregte Zustand des GFP hält 3,25 ns an. Das reine GFP ist sehr stabil und behält seine Fluoreszenzeigenschaften bis zu einer Temperatur von 65°C. Bei einer weiteren Temperaturerhöhung kommt es zur Denaturierung des Proteins, weshalb bei 78°C nur noch eine 50 %ige Fluoreszenzintensität zu beobachten ist. GFP behält seine strukturelle Stabilität bis zu einem pH von 11 und zeigt auch in 1 % SDS, 6 M Guanidinium-Chlorid oder bei Inkubation mit unterschiedlichen Proteasen für mehrere Stunden kaum Veränderungen (Cubitt et al. 1995).

Das GFP ist im Vergleich zu anderen Fluorophoren relativ widerstandsfähig gegenüber dem Vorgang der Photobleichung, bei dem es durch vermehrte Oxidation des Fluorophors zu einer Abnahme der Fluoreszenzintensität kommt (Tsien 1998).

Im Vergleich zu anderen Fluorophoren ist die Fluoreszenz des GFP relativ unabhängig von speziellen zellulären Substraten oder anderen organismusspezifischen Bedingungen. Die Fluoreszenz des GFP ist autokatalytisch (Ehring et al. 1995). Außerdem ist GFP nicht giftig und chemisch indifferent (Kneen et al. 1998). Mit Hilfe von starken Promotern, wie dem CMV-Promotor (Cytomegalievirus), konnte es in einer Vielzahl anderer Organismen exprimiert werden, wie *Saccharomyces cerevisiae*, *Drosophila melanogaster*, *Xenopus laevis* und *Caenorhabditis elegans*, oder anderen transgenen Tieren (Heim et al. 1994; Cubitt et al. 1995; Griesbeck 2004). Das GFP verliert bei einem pH von 11-12 sein Exzitationsmaximum bei 395 nm. Außerdem erlischt die Fluoreszenz unter sehr sauren pH-Bedingungen ($\text{pH} < 5$) (Tsien 1998).

2.2.2. Struktur des GFPs

Um die beobachteten biochemischen Eigenschaften zu erklären, wurde die Struktur des GFP genauer untersucht und somit die Grundlage für die Erstellung von GFP-Varianten geschaffen.

Die Sequenz des Wildtyps *Aequorea*-GFP wurde entschlüsselt. Im Vergleich zum ursprünglichen Wildtyp unterscheiden sich die meisten cDNA Konstrukte durch eine Q80R Mutation, die vermutlich auf einem PCR Fehler beruht. Die Struktur des GFP entspricht einer aus 11 Strängen gebildeten β -Fassform. Im Inneren liegt als α -Helix Strang axial das Chromophor (siehe Abb.4).

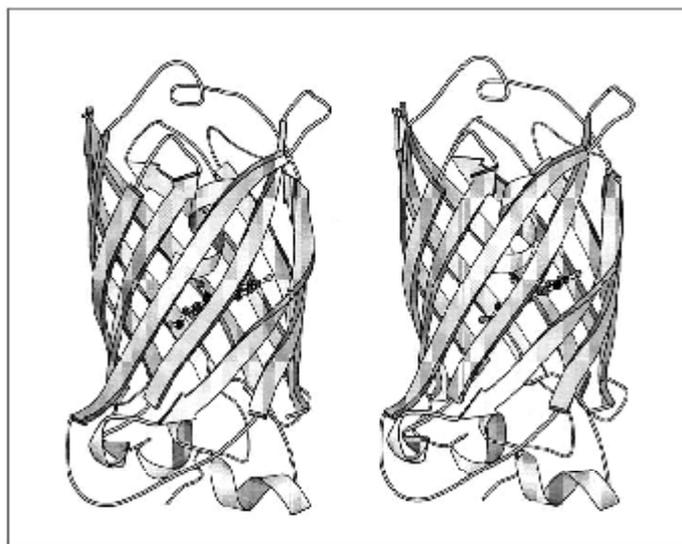


Abb.4: Die Abbildung zeigt eine 3D-Struktur des GFP-Wildtypproteins. Man erkennt die durch 11-Stränge gebildete Form mit dem axialen, im Zentrum liegenden Chromophor. (Tsien 1998)

Durch das Chromophor, ein *p*-Hydroxybenzylidenimidazolinon, erhält das GFP seine Fluoreszenzeigenschaft (Heim et al. 1994). Das Chromophor wird durch Ringbildung der Ser65-Tyr66-Gly67 Gruppe gebildet (Wachter et al. 1998). Dabei bindet die nukleophile Aminogruppe des Gly67 an die Carbonylgruppe in Position 65, wodurch es zur Bildung eines Fünfringes und der Freisetzung von Wasser kommt (Heim et al. 1994). Der letzte Schritt zur Faltung des Chromophores erfolgt durch Oxidation der Hydroxybenzylgruppe des Tyr66 bei

Anwesenheit von Sauerstoff. Kann die Oxidation nicht erfolgen, weil das GFP z.B. unter anaeroben Bedingungen in kultivierten E.coli exprimiert wurde, so fluoresziert das Protein nicht. Durch nachträglichen Kontakt mit O₂ wird die Fluoreszenzeigenschaft entwickelt (Heim et al. 1994; Cubitt et al. 1995; Brejc et al. 1997; Tsien 1998; Elsliger et al. 1999). Die Struktur des Chromophores ist in Abb.5 dargestellt. Allgemein ist GFP ein sehr komplexes Protein. Durch Versuche konnte bestätigt werden, dass die Aminosäuren 7-229 für die Aufrechterhaltung der GFP-Funktion essentiell sind. Größere Verluste in diesem Bereich führen zu einer falschen Faltung des Proteins und zum Verlust der Fluoreszenzeigenschaften. Einzelne Punktmutationen werden teilweise toleriert (Li et al. 1997).

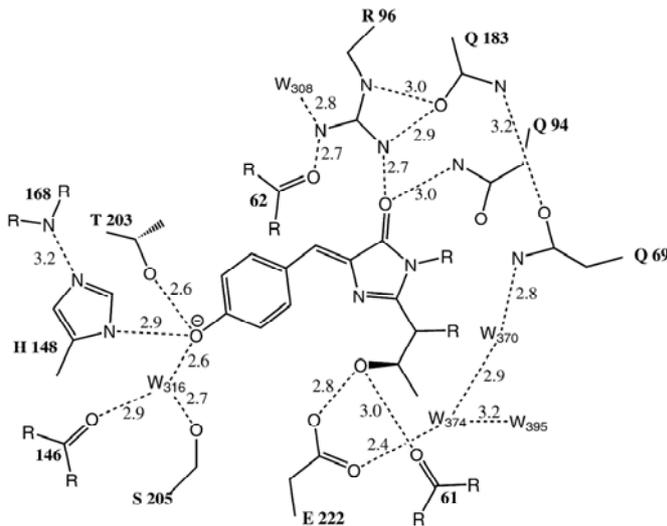


Abb.5: Die Abbildung zeigt den strukturellen Aufbau des GFP-S65T Chromophores. (Tsien 1998)

2.2.3. Klassifizierung von GFP

Die mittlerweile bekannten GFP-Mutanten werden aufgrund ihrer Chromophore in 7 Klassen eingeteilt:

1. Klasse: Wildtyp GFP mit neutraler und anionischer Phenolgruppe im Chromophor

Das Wildtyp-GFP hat ein sehr komplexes Spektrum. Es absorbiert blaues Licht bei 395 nm und emittiert grünes Licht mit einer Wellenlänge von 508 nm. Ein kleineres Exzitationsmaximum ist zusätzlich bei 475 nm zu beobachten. Das dazugehörige Emissionsmaximum ist bei 503 nm zu finden. Da das Wildtyp-GFP zwei unterschiedliche Anregungszustände zeigt, wurde vermutet, dass es in zwei Konformationszuständen auftreten kann (Haupts et al. 1998). Es wurde angenommen, dass die Absorption bei 395 nm durch eine neutrale Phenolgruppe und das Exzitationsmaximum bei 475 nm durch ein anionisches Phenol im Chromophor hervorgerufen wird. Das neutrale und anionische Fluorophor treten dabei im molaren Verhältnis von 6:1 auf. Durch Einflüsse, wie Temperatur, Licht oder pH, kann dieses Verhältnis verschoben werden. Zwischen beiden Konformeren kommt es dabei zum Protonentransfer zwischen Glu222 und Ser205 (Brejc et al. 1997). Der ionisierte Zustand des Chromophores wird zusätzlich durch die Neuorientierung der Seitengruppe Thr203 und His148 stabilisiert. Da die Zerteilung der Exzitationsamplitude bei vielen Experimenten hinderlich ist, wurden GFPs konstruiert, die nur ein Absorptions- und Emissionsmaximum

besitzen (Heim et al. 1994; Brejc et al. 1997; Kneen et al. 1998; Tsien 1998; Hanson et al. 2002).

2. Klasse: GFP mit anionischem Phenol im Chromophor

Diese Gruppe der GFPs wird sehr häufig für routinemäßige, zellbiologische Untersuchungen genutzt. Im Gegensatz zum Wildtyp-GFP wurde durch Mutationen die Bildung des anionischen Chromophores begünstigt und die des neutralen Chromophores unterdrückt. Die so gebildeten GFPs zeigen ein Exzitationsmaximum bei 489 nm und ein Emissionsmaximum bei 508 nm. Um ein Chromophor mit anionischer Phenolgruppe zu konstruieren, wurde Serin in Position 65 durch Thr ersetzt. Andere Mutationen mit Gly, Ala, Cys und Leu, anstelle des Thr, haben die gleiche Wirkung. Das Serin in Position 65 ermöglicht im Wildtyp-GFP die Ionisierung des Glu222. Wird S65 mutiert, so bleibt das Glu222 in einem neutralen Zustand, wodurch der ionisierte Zustand des Chromophores begünstigt wird. Diese Hypothese wird dadurch gestützt, dass der direkte Ersatz von Glu222 durch Gly gleiche Veränderungen hervorruft (Brejc et al. 1997). Neben einer fünffach stärkeren Fluoreszenzintensität und einer geringeren Rate an falschgefalteten und nichtfluoreszierenden Fluorophoren zeigen die Mutanten eine verlangsamte Photobleichung. Allerdings wurde beobachtet, dass bei Temperaturen ab 37°C die Anzahl an nichtfluoreszierenden GFPs zunimmt. Daher wurden weitere Mutationen eingefügt, welche die Faltung des Chromophores stabilisieren sollen. Durch Mutation von F64L, V163A, S72A, N149K, M153T und I167T wurde die korrekte Ausbildung des Fluorophores begünstigt und die Fluoreszenzintensität weiter verstärkt (Cubitt et al. 1995; Ehring et al. 1995; Tsien 1998; Hanson et al. 2002).

Eine der wichtigsten GFP-Mutanten der Klasse ist das EGFP mit den Mutationen S65T und F64L. Es zeigt in vivo und vitro eine starke pH-Abhängigkeit (pH 6,4-8,0) und wird aufgrund seiner starken Fluoreszenz und geringen Photobleichung häufig als Marker für zellbiologische Fragestellungen genutzt (Deo und Daunert 2000). Das Exzitationsmaximum dieser Mutante liegt bei 488 nm, das Emissionsmaximum bei 509 nm. Durch Überlappung mit den Emissionsfrequenzen von anderen GFP-Mutanten kann EGFP in Konjugationsversuchen eingesetzt werden (Robey et al. 1998).

3. Klasse: GFP mit neutralem Phenol im Chromophor

Bei diesen GFP-Mutanten kommt es durch Mutation des Thr203 in Ile zur Unterdrückung des 475 nm Exzitationsmaximum und zur verstärkten Absorption bei 395 nm. Durch den Verlust der Thr203 OH-Gruppe wird die neutrale Form des Chromophores favorisiert. Das Emissionsmaximum liegt bei 511 nm. Da diese Mutanten kein Absorptionsspektrum bei 475 nm mehr besitzen, können sie in Verbindung mit Klasse 2-GFPs in Konjugationsversuchen eingesetzt werden (Cubitt et al. 1995; Ehring et al. 1995; Tsien 1998).

4. Klasse: Chromophor mit anionischer Phenolgruppe und einem in direkter Nachbarschaft angeordneten Elektronensystem

Durch Mutation des Serin in Position 65 in Gly oder Thr und durch Ersatz von Thr in Position 203 mit His, Trp, Phe und Tyr (Aminosäuren mit aromatischem Ring), konnten neue GFP-Varianten konstruiert werden (Wachter et al. 1998). Durch die Mutationen kommt es zur Interaktion eines aromatischen Ringsystems mit dem in direkter Nachbarschaft liegenden Chromophor. Dadurch werden die Exzitations- und Emissionsmaxima im Vergleich zum

Wildtyp-GFP um 20 nm verschoben. Die gebildeten Mutanten zeigen ein Emissionsmaximum bei 529 nm, wodurch die Fluoreszenzfarbe von grün zu gelb wechselt. Diese Gruppe der GFPs wurde deshalb als YFP (Yellow fluorescent proteins; gelb fluoreszierendes Protein) bezeichnet. YFPs zeigen eine starke pH-Sensitivität (pK_a 6,9-7,1), Interaktion mit Chloriden und eine geringe Photostabilität (Tsien 1998; Wachter et al. 1998; Griesbeck et al. 2001; Griesbeck 2004). Die pH-Sensitivität äußert sich bei YFP durch eine geringe Fluoreszenzintensität in saurer Umgebung (Mizuno et al. 2001).

YFP wurde aufgrund seines Exzitationsmaximum häufig in Konjugationsversuchen mit CFP eingesetzt. Gut geeignet für solche Versuche ist die YFP-Mutante T203Y/S65G/V68L/S72A. Die T203Y Mutation ist dabei verantwortlich für die gelbe Fluoreszenz der Mutante. Im Vergleich zum „Wildtyp-YFP“ verstärken die anderen Mutationen die Fluoreszenzintensität und Stabilität dieses YFP (Wachter et al. 1998).

5. Klasse: Chromophore mit Indolbildung durch Mutation Y66W

Durch Mutation von Tyr66 in Trp (Y66W) wurde im Chromophor die Phenolgruppe durch ein Indol ersetzt. Die Exzitations- und Emissionsmaxima der Mutanten liegen bei 436 nm bzw. 476 nm. Aufgrund ihrer blauen bzw. cyanen Fluoreszenz wurden diese GFP-Mutanten als cyan-fluorescent-proteins (CFP; cyan-fluoreszierende Proteine) bezeichnet (Heim et al. 1994; Tsien 1998; Wachter et al. 1998). CFPs sind keine sehr starken Fluorophore und sehr empfindlich gegenüber Photobleichung. Sie sind wenig pH-sensibel, da die Mutation Y66W eine Protonenübertragung auf Tyr verhindert und somit eine titrierbare Gruppe im Chromophor fehlt. CFPs wurden aufgrund ihrer Emissionsmaxima von 476 nm und ihrer charakteristischen Fluoreszenzfarbe häufig in Konjugationsversuchen mit anderen Fluorophoren eingesetzt (Yang et al. 1998; Griesbeck 2004).

6. Klasse: GFPs mit Imidazolbildung im Chromophor durch Y66H Mutation

Durch Substitution des Tyr66 durch His (Y66H) wurde in das Chromophor ein Imidazol eingebracht. Dadurch wurden GFP-Mutanten mit einer Emissionsfrequenz von 447 nm und einem Exzitationsmaximum bei 383 nm gebildet. Aufgrund der blauen Fluoreszenz wurde die Klasse als blue fluorescent protein (BFP; blau fluoreszierendes Protein) bezeichnet. BFPs sind gute Partner für Experimente mit anderen GFP Varianten. Ihr pK_a liegt bei 6,1, sie sind nicht pH-sensitiv. Allerdings zeigen sie eine relativ geringe Fluoreszenzintensität und starke Photobleichung (Heim et al. 1994; Tsien 1998; Wachter et al. 1998; Hanson et al. 2002).

7. Klasse: GFPs mit Phenylbildung im Chromophor durch Y66F Mutation

Die Klasse entstand durch Ersatz von Tyr66 durch Phe. Die Gruppe zeigt Exzitations- und Emissionsmaxima mit sehr kurzen Wellenlängen und ist noch wenig erforscht (Tsien 1998).

2.2.4. Red fluorescent Protein

Neben den in unterschiedlichen Farben fluoreszierenden Proteinen, die von der Quallenart *Aequorea* abstammen, wie BFP, CFP und YFP, gibt es Proteine der Korallenart *Discosoma*, die rot fluoreszieren. Das bekannteste Protein wurde als DsRed bezeichnet und hat ein Molekulargewicht von 100 kDa und zeigt in vitro und vivo eine Tetramerstruktur. DsRed hat

ein Exzitationsmaximum bei 558 nm und ein Emissionsmaximum bei 583 nm. Es wurde mit dem Ziel untersucht, neue Varianten als Partner für FRET-Messungen mit GFP zu entwickeln. Es stellte sich heraus, dass die Eigenschaften des DsRed mit langsamer unvollständiger Faltung, geringer Fluoreszenzintensität, geringer pH-Sensitivität und obligater Tetramerbildung nicht für einen erfolgreichen Einsatz geeignet waren (Mizuno et al. 2001). Es wurde daher eine neue Variante von DsRed konstruiert, die eine korrekte Faltung zeigt. Außerdem wurde ein monomeres DsRed konstruiert, das mRFP1, welches im Vergleich zu DsRed 33 Mutationen aufweist. mRFP1 besitzt ein Exzitationsmaximum bei 584 nm, zeigt eine schnelle korrekte Faltung, eine gute Fluoreszenz und einen pK_a von 4,5. Allerdings ist es sehr anfällig für Photobleichung. Mit seinem Emissionsmaximum bei 607 nm sollte es für die Bildung von Fusionproteinen mit farbigen GFPs zur Messung von FRET eingesetzt werden (Campbell et al. 2002; Fischer et al. 2004).

2.5. Nutzungsmöglichkeiten von GFP

2.2.5.1. Passiver Einsatz von GFP

GFPs sind wichtige, nicht invasive, fluoreszierende Marker, um intrazelluläre Vorgänge in vivo zu detektieren. Sie wurden in Bakterien, Pflanzen, Säugetierzellen und ganzen Organismen exprimiert. Eines der wichtigsten Einsatzgebiete ist die genetische Fusion mit Fremdproteinen, um deren Expression, Lokalisation und intrazellulären Transport zu erforschen. Auf diese Weise konnten GFP-Mutanten schon in viele zelluläre Strukturen eingebracht werden. GFPs konnten selektiv in der Plasmamembran, Zellkern, endoplasmatischen Retikulum, Golgi-Apparat, sekretorischen Vesikeln, Mitochondrien, Peroxisomen, Vakuolen und Phagosomen exprimiert werden. Unterschiedliche pH-Werte oder Zellbarrieren waren bei diesen Versuchen nicht nachteilig. Die genetische DNA für GFP kann leicht N- oder C-terminal an die zu untersuchenden Proteine kloniert werden (Romoser et al. 1997; Royston und Sorokin 1998; Deo und Daunert 2000; Lippincott-Schwartz et al. 2000).

2.2.5.2. GFP als aktiver Indikator

Eigenschaften eines guten pH-Indikators

- ➔ hohe pH -Sensitivität
- ➔ hohe pH-Spezifität
- ➔ schnelle Antwort auf pH-Veränderungen
- ➔ gute optische Bedingungen

Durch Mutationen wurden die Eigenschaften des GFP-Wildtyps verändert und neue Varianten geschaffen, die sich für die Untersuchung von unterschiedlichen zellbiologischen Fragestellungen besonders eignen. So wurden GFP-Mutanten entdeckt, die aufgrund ihres strukturellen Aufbaus und der Existenz von titrierbaren Gruppen besonders pH-sensitiv sind (z.B. YFP, EGFP). Es wurde beobachtet, dass diese Mutanten sehr sensibel auf pH-Veränderungen mit Änderung ihrer Fluoreszenzintensität reagieren. GFP zeigt bei wechselnden pH-Werten teilweise eine Fluoreszenzänderung um 50%. Die YFP-Fluoreszenz erlischt im sauren Milieu. Die Reaktionen sind gut zu messen und erfolgen außerdem schnell und reversibel. Nach Charakterisierung der GFP-pH-Eigenschaften in vitro wurde durch Transfektion von eukaryotischen Zellen nachgewiesen, dass die pH-Sensitivität auch in vivo erhalten bleibt. GFPs sind chemisch indifferent und unabhängig von zellulären Substraten

oder anderen organismusspezifischen Eigenschaften. Mangelnde Fluoreszenzintensitäten oder verstärkte Photobleichung konnten durch gezielte Mutationen beeinflusst werden. Aufgrund seiner unabhängigen und widerstandsfähigen Eigenschaften nehmen GFP-Mutanten, wie YFP und EGFP neben pHluorinen (Miesenböck et al. 1998), deGFPs (Hanson et al. 2002; McAnaney et al. 2002) und Fluoresceinen (Babcock 1982) einen wichtigen Platz in der Reihe der pH-sensitiven fluoreszierenden Marker ein.

deGFPs und pHluorine sind Weiterentwicklungen pH-sensitiver GFP-Mutanten. Sie sollen im Weiteren kurz erwähnt werden, da sie bekannte, pH-sensitive, auf GFP basierende Konstrukte sind. Beide Mutanten wurden mit der Idee entwickelt, neue pH-sensitive GFP-Mutanten zu klonieren. Dazu griff man auf schon bekannte und beschriebene Mutationsstellen zurück, welche die pH-Sensitivität der unterschiedlichen GFP-Klassen beeinflusst haben. Im Falle der pHluorine wurde dabei ein Konstrukt gebildet, das zwischen pH 7,5 und 5,5 pH-Änderungen durch einen Wechsel im Exzitationsspektrum von 395 nm zu 475 nm anzeigt.

Von den deGFPs wurden 4 Varianten konstruiert. Die wichtigste Variante ist deGFP 4 mit den Mutationen C48S, S65T, H148G und T203C. deGFPs zeigen pH-Veränderungen durch einen Wechsel der Emission zwischen grün (alkalischer pH; 515 nm Emissionsmaximum; anionisches Chromophor) und blau (saurer pH; 460 nm Emissionsmaximum; neutrales Chromophor) (McAnaney et al. 2002).

Die Konstrukte wurden zur Messung von intrazellulären pH-Werten eingesetzt. pHluorine zeigten pH-Veränderungen in Vesikeln (Sankaranarayanan et al. 2000) und Peroxisomen (Jankowski et al. 2001) an.

Um intrazelluläre Bewegungen von Makromolekülpartnern in vivo zu erforschen, konnte bei den GFPs eine wichtige spektrometrische Methode eingesetzt werden. Zwischen zwei GFPs kann das Auftreten von Fluoreszenzresonanzenergietransfer (= FRET) beobachtet werden. FRET ist eine genaue quantitative Methode, um einzelne Zellen mit hoher Auflösung zu untersuchen. FRET beruht auf einem quantenmechanischen Phänomen, das auftritt, wenn zwei Fluorophore in einem Makromolekül oder in zwei Molekülen, weniger als 10 nm voneinander entfernt sind und sich das Emissionsspektrum des einen Fluorophores (Donor) mit dem Exzitationsspektrum des anderen Fluorophores (Akzeptor) überlappt (Emptage 2001). Nach Anregung des Donors kommt es zu einer verzögerten Anregung des Akzeptors und das Verhältnis beider Fluoreszenzintensitäten kann gemessen werden. Das Ausmaß der Energieübertragung ist stark vom Abstand und der relativen Orientierung der beiden Fluorophore abhängig. Die Abstandsabhängigkeit kann anhand folgender Formel abgeschätzt werden:

$$R_0^6 / (R_0^6 + r^6)$$

R_0 : der Abstand, bei dem der FRET 50 % des Maximalwertes beträgt (Förster-Radius)

r : ist der Abstand zwischen dem Zentrum der beiden Fluorophore
(Tsien 1998)

2.3. Zielsetzung der Arbeit

Das Ziel der Doktorarbeit ist, pH-sensitive β -adrenerge Rezeptoren durch Fusion von GFP-Mutanten mit dem β_2 AR zu konstruieren.

Der β_2 AR ist einer der am besten charakterisierten GPCR. Seine durch Aktivierung angeregte Rezeptorbewegung ist gut untersucht (s.o.). Man weiß, dass der Rezeptor während seiner Internalisierung in endosomale Kompartimente gelangt, in denen im Vergleich zum Zytosol eine pH-Absenkung stattfindet. Auf seinem Weg verbleibt der C-Terminus des Rezeptors im

Zytosol, während der N-Terminus dem Milieu der Kompartimente ausgesetzt wird (Llopis et al. 1998).

Als pH-Sensoren sollen GFP-Mutanten an den β_2 AR kloniert werden. Da insbesondere der N-Terminus des β_2 AR wechselnden pH-Werten ausgesetzt ist, soll davor eine pH-sensitive GFP-Mutante (EGFP oder EYFP) kloniert werden. Um einen Sensor zu erstellen, der eine Messung der pH-Veränderungen möglich macht, wird an den C-Terminus ein pH-insensitives GFP (CFP oder mRFP1) fusioniert. Es wird erwartet, dass eine pH-Veränderung im Extrazellulärraum, wie sie in Endosomen auftritt, die Fluoreszenzintensität der sensitiven GFPs beeinflusst.

Da das Verhältnis der beiden Fluorophore im Fusionsprotein 1:1 ist, soll durch die Messung ihrer Fluoreszenzverhältnisse eine Aussage über den pH-Wert in der Umgebung des extrazytoplasmatischen Fluorophores möglich sein und nachgewiesen werden, dass der β_2 AR während seines Aufenthalts im Zellinneren niedrigeren pH-Werten ausgesetzt wird.

Diese pH-Unterschiede sollen, wenn möglich, gemessen werden. Die GFP-Mutanten wurden dabei entsprechend ihrer pH-Eigenschaften, Emissions- und Exzitationsmaxima eingesetzt. (siehe Abb.6 und Tabelle 1)

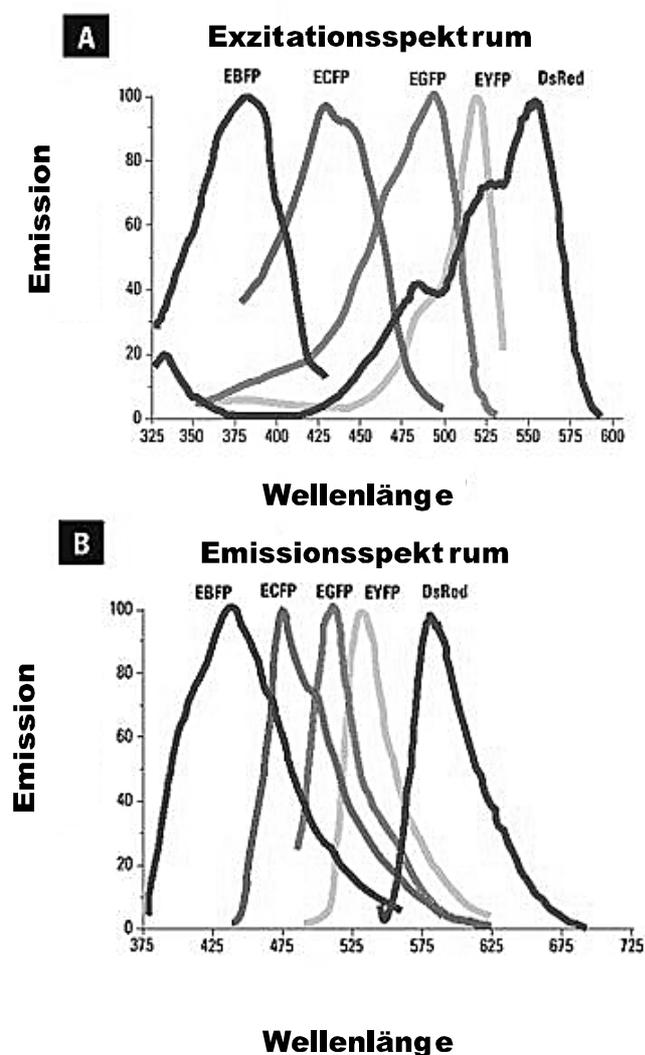


Abb.6: Dargestellt sind die Emissions- und Exzitationsspektren unterschiedlicher GFP-Mutanten. (Abbildung Clontech BD Bioscience).

	Mutationen	Exzitationsmaximum	Emissionsmaximum	pK _a
EGFP	F65L,S65T	488 nm	509 nm	6,15
EYFP	S65G,V68L,S72A, T203Y	514 nm	527 nm	6,15-7,1
ECFP	F65L,S65T, Y66W	434 nm	480 nm	7,1
mRFP1	I125R	584 nm	607 nm	4,5

(Tsien 1998)

Tabelle 1:

Es werden die Exzitations- und Emissionsmaxima sowie der pK_a der verwendeten GFP-Mutanten gezeigt.

3. Materialien und Methoden

3.1. Materialien

Bakterienstämme

E. coli JM 109: *recA1*, *end A1*, *gyr A96*, *thi-1*, *hsdR17*, *sup E44*, *rel A1*, Δ (*lac-proAB*), [F *tra* D36, *pro A⁺B⁺*, *laqI^q*, Δ (*lacZ*)M15]

Zelllinien

HEK 293: menschliche, embryonale Nierenepithel-Zelllinien, Adenovirus 5-transformiert

Chemikalien und Verbrauchsmaterial

In der Regel wurden die Chemikalien von Sigma^R oder Merck^R im Reinheitsgrad „pro analysis“ bezogen.

Agarose	Gibco
Alpha ³² p-ATP	Amersham
Anionenaustauschsäulen zur DNA-Reinigung	Quiagen
Bradford-Reagenz	Biorad
Chromatographie-Säulen	Biorad
Deckgläschen	Hartenstein
DMEM	Pan
DNA-Größenstandard	BioLabs
DNA-Extraktions-Kit	Qiagen
DPBS	Pan
Effectene	Qiagen
Foetales Kälberserum	Sigma
G418	Gibco
GF/B Glasfaserfilter	Millipore
[³ H]CGP 12177	Amersham
¹²⁵ J-Cyanopindolol	Amersham
Oligonukleotide	MWG
Penicillin/Streptomycin für Zellkultur	Pan
Polylysin	Sigma
Ponceau-S-Lösung	Serva
Protein-Standards für SDS-Gelelektrophorese	peqLab
Szintillatorflüssigkeit Lumasafe Plus	Lumac LSC
Trypsin	Pan
Zellkulturmaterialien	Nunc

Enzyme

Pfu DNA-Polymerase	Promega
Restriktionsenzyme	NEB
T4 DNA Ligase	NEB

Plasmidvektoren

pcDNA3 : AP^R, ColE1, Expressionsvektor (P_{CMV}): Invitrogen

Oligonukleotidprimer

s-YFP: 5`-AAA AAA GGA TCC ATG AAG ACG ATC ATC GCC CTG AGC TAC ATC
TTC TGC CTG GTA TTC GCC GGC GAG CTG TTC AC-3`

YFP-Xba: 5`-AAA AAA TCT AGA CTT GTA CAG CTC GTC CAT-3`

Antikörper

polyklonaler Kaninchenantikörper gegen GFP Santa Cruz Biotechnology
Peroxidasemarkierter anti-Kaninchen Dianova
Antikörper

3.2. Molekularbiologische Methoden

3.2.1. Techniken zur Klonierung von DNA

3.2.1.1. DNA-Spaltung mit Restriktionsendonukleasen

Die für die Klonierung erforderlichen DNA-Fragmente wurden durch Inkubation mit Restriktionsenzymen gewonnen. Die DNAs wurden mit 1 Unit Restriktionsenzym pro μg DNA für 1 Stunde in dem vom Hersteller empfohlenen Puffersystem und bei der vom Hersteller angegebenen Temperatur inkubiert.

Durch Analyse der gewonnenen DNA-Fragmente mittels Agarosegelelektrophorese wurde die Größe der Fragmente kontrolliert.

3.2.1.2. Gewinnung von DNA durch Polymerase Chain Reaction (PCR)

Die PCR ist eine Methode, durch die DNA-Fragmente mit Hilfe von Oligonukleotiden (Primern) und hitzestabilen Polymerasen in sich mehrfach wiederholenden Zyklen vermehrt werden.

Jeder Zyklus besteht aus der Denaturierung der Matrizen-DNA, der Hybridisierung der Oligonukleotide und der Elongation der DNA (siehe Tabelle 2).

Als PCR-Gerät wurde der DNA-Thermal-Cycler von Perkin Elmer benutzt.

Denaturierung	1 Minute bei 94°C
Hybridisierung	1 Minute bei 52°C
Elongation	2 Minuten bei 74°C

Tabelle 2

PCR-Ansatz:

1. 83,5 μl H₂O
2. 10 μl Puffer (10x Reaktionspuffer, Promega^R)
3. 2,5 μl Primer 1 (20 μM)
4. 2,5 μl Primer 2 (20 μM)
5. 0,5 μl Matrizen DNA sYFP- β_2 AR (1 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$)
6. 1 μl Pfu (Promega^R)

100 μl Gesamtvolumen

Primer 1 (S-YFP) : 5`-AAA AAA GGA TCC ATG AAG ACG ATC ATC GCC CTG AGC TAC ATC TTC TGC CTG GTA TTC GCC GGC GAG CTG TTC AC- 3`

Primer 2 (YFP-Xba) : 5`- AAA AAA TCT AGA CTT GTA CAG CTC GTC CAT- 3`

3.2.1.3. Analyse und Isolierung von DNA-Fragmenten mittels Agarosegelelektrophorese

In 1 % igen Agarosegelen in TAE-Puffer wurden Größe, Menge und Reinheit von DNA-Fragmenten analysiert. Die Agarosegele enthielten 0,4 $\mu\text{g}/\text{ml}$ Ethidiumbromid, um die DNA im UV-Transilluminator sichtbar zu machen. 20 μl der zu analysierenden DNA wurden mit 5 μl 5x DNA Probenpuffer versetzt und aufgetragen. Als DNA-Größenstandard wurde ein 1 kb

Marker von NEB^R verwendet. Die Auftrennung der DNA erfolgte bei 90 Volt für 1 Stunde in TAE-Puffer. Die Gele wurden anschließend durch Fluoreszenzanregung unter dem UV-Transilluminator betrachtet und mit dem Herolab E.A.S.V. RH-3 fotografiert. Bei präparativen Gelen wurden die gewünschten Banden aus dem Gel herausgeschnitten und die DNA durch Zentrifugation in DNA-Extraktionstubes (DNA-Extraktions Kit von Amicon^R) von der Agarose getrennt.

TAE-Puffer:

Modified Tris-Acetate EDTA Puffer Millipore^R

5x DNA Probenpuffer:

50 % Glycerin

75 mM EDTA

0,125% Bromphenolblau

3.2.1.4. Ligierung

Es wurden 15 ng Vektor-DNA mit 6 ng Insert-DNA in einem Gesamtvolumen von 20 µl im vom Hersteller mitgelieferten Puffer mit 2 Units T4 DNA (NEB^R) Ligase ligiert. Die Proben wurden dazu für 1 Stunde bei Raumtemperatur inkubiert.

3.2.1.5. Transformation

Kompetente Zellen:

Eine Bakterienkultur E.coli (JM 109) wurde in 250 ml LB Medium bis zu einer OD_{600nm} von 0,3-0,6 gezogen und die Bakterien durch Zentrifugation (Rotor JA 17, Beckmann Centrifuge Avanti, 5000 rpm für 10 Minuten bei 4°C) geerntet. Das Pellet wurde auf Eis in 25 ml TSD aufgenommen und die Zellen in flüssigem Stickstoff eingefroren. Die erzielbare Transformationseffizienz beträgt 1-2 x 10⁸ Kolonien / µg pBR 322.

5 µl eines Ligationsansatzes wurden mit 100 µl kompetenten Zellen (E.coli JM 109) und 100 µl 1x KCM Puffer gemischt, zuerst 20 Minuten auf Eis und anschließend 10 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Nach Zugabe von 1000 µl LB Medium wurden die Ansätze für 45 Minuten bei 37°C im Schüttelinkubator gehalten. 100 µl des Transformationsansatzes wurden auf eine Agarplatte mit Ampicillin (1µg/ml LB) plattiert.

TSD

10% Polyethylenglykol 3000

5% DMSO

20 mM MgCl₂

in LB Medium pH 6,5

LB-Medium

1 % Trypton

0,5 % Hefeextrakt

1% NaCl

pH 6,1

1x KCM Puffer

100 mM KCl
 30 mM CaCl₂
 50 mM MgCl₂

3.2.2. Gewinnung von Plasmid-DNA3.2.2.1. Mini-Präparation

Zur Präparation von Plasmid-DNA für analytische Zwecke wurden 1,5 ml einer Über-Nacht-Kultur abzentrifugiert (5000 rpm für 5 Minuten, Eppendorf Centrifuge 5417) und das Bakteriensediment in 300 µl Puffer 1 resuspendiert.

Durch Zugabe von 300 µl Puffer 2 und Inkubation für 5 Minuten bei Raumtemperatur, wurden die Bakterien lysiert. Die DNA wurde durch Zugabe von 300 µl Puffer 3 separiert. Die Plasmid-DNA blieb in Lösung, während Membranbestandteile, Proteine und Bakterien-DNA gefällt wurden. Nach Zentrifugation bei 14000 rpm (Eppendorf Centrifuge 5417) für 15 Minuten wurden 700 µl des plasmidhaltigen Überstandes mit 500 µl Isopropanol gefällt und für 15 Minuten bei 14000 rpm (Eppendorf Centrifuge 5417) zentrifugiert.

Das DNA- Pellet wurde mit 600 µl 70% igem Ethanol gewaschen und in 30 µl Aqua dest. gelöst.

Puffer 1:

50 mM Tris-Cl pH 8,0
 10 mM EDTA
 100 µg /ml RNaseA

Puffer 2:

200 mM NaOH
 1% SDS

Puffer 3:

3 M Kaliumacetat, pH 5,5

3.2.2.2. Maxi-Präparation

Die Isolierung von hochreiner Plasmid-DNA in größerem Umfang erfolgte durch Chromatographie an Anionenaustauschsäulen (Qiagen^R).

Es wurden 250 ml einer Über-Nacht-Kultur bei 5000 rpm für 10 Minuten (Beckmann Avanti Centrifuge J-25 Rotor JA 14) zentrifugiert. Das entstandene Bakterienpellet wurde zunächst in 10 ml Puffer 1 resuspendiert und dann mit 10 ml Puffer 2 versetzt. Nach Inkubation bei Raumtemperatur für 5 Minuten wurden 10 ml Puffer 3 zugegeben. Der Ansatz wurde für 30 Minuten auf Eis inkubiert und anschließend bei 15000 rpm (Beckmann Avanti Centrifuge J-25 Rotor JA 17) für 30 Minuten bei 4°C zentrifugiert.

Der Überstand wurde auf eine mit QBT-Puffer äquilibrierte Anionenaustauschsäule (Qiagentip 500) aufgetragen. Die Säule wurde mit 2x 30 ml QC-Puffer gewaschen, danach wurde die Plasmid-DNA mit 15 ml QF-Puffer eluiert, anschließend mit 11 ml Isopropanol gefällt und durch Zentrifugation (30 Minuten bei 4500 rpm und 4°C, Hettich Zentrifuge Rotanta 96R) sedimentiert. Das Pellet wurde in 300 µl Aqua dest. gelöst und nochmals mit

1000 µl Ethanol (100%) gefällt. Nach Zentrifugation bei 13000 rpm (Eppendorf Centrifuge 5417) für 10 Minuten wurde das entstandene Pellet mit 100 µl Aqua dest. gelöst.

Puffer 1,2,3: siehe 3.2.2.1.

Puffer QBT:

750 mM NaCl

50 mM MOPS pH 7,0

15% Isopropanol

0,15% Triton x-100

Puffer QC:

1 M NaCl

50 mM MOPS pH 7,0

15% Isopropanol

Puffer QF:

1,25 M NaCl

50 mM Tris-HCl pH 8,5

15% Isopropanol

3.2.2.3. Konzentrationsbestimmung mittels Absorptionsspektrometrie

Die Bestimmung der DNA-Konzentration erfolgte durch photometrische Messung im Spectrophotometer UV-1601 (Shimadzu). Dazu wurde die Extinktion der Plasmid-DNA in 1:100 Verdünnung in Wasser bei 260 nm und 280 nm gemessen.

Das Extinktionsverhältnis E_{260}/E_{280} sollte dabei zwischen 1,75-1,85 liegen. Ein niedrigerer Wert spricht für eine Proteinverunreinigung der Proben und verhindert eine erfolgreiche Transfektion eukaryotischer Zellen.

Die DNA-Konzentration wurde nach folgender Formel berechnet:

$$\text{DNA} = 50 \times E_{260} \times \text{Verdünnungsfaktor (ng/}\mu\text{l)}$$

3.3. Zellkultur

3.3.1. HEK293-Zellen (HEK= Human Embryonic Kidney)

Die HEK-Zellen wurden in Medium bei 7% CO₂ und 37°C gehalten. Sie wurden als Monolayerkulturen gezogen und alle 2-3 Tage passagiert, wenn die Dichte der Zellen Konfluenz erreicht hatte. Dazu wurden die adhärenenten Zellen mit Trypsin (Pan^R) abgelöst, sedimentiert und in frischem Medium resuspendiert.

Medium:

500 ml DMEM Pan^R

5 ml Penicillin (100000 U/ml) und Streptomycin (10 mg/ml) Pan^R

5 ml Glutamin (200 mM) Pan^R

10% foetales Kälberserum Sigma^R

3.3.2. Lagerung von Zellen

Zellen einer 9 cm Ø großen Petrischale wurden bei 850 rpm (Hettich Zentrifuge Rotanta 48 R) für 3 Minuten abzentrifugiert, in 1 ml Einfriermedium resuspendiert und in Kryoröhrchen überführt. Die Proben wurden auf Eis abgekühlt. Anschließend wurden die Röhrchen schrittweise auf -20°C (1 Tag) und -70°C (1 Tag) heruntergekühlt und schließlich in flüssigem Stickstoff gelagert.

Einfriermedium:

70% Medium (s.o.)

20% foetales Kälberserum

10% DMSO

3.3.3. Expression in eukaryotischen Zellen

3.3.3.1. Transiente Transfektion von HEK-Zellen mit Effectene

Da die Transfektionsmethode sehr zellschonend ist, wurde sie bei Zellen verwendet, die für Experimente am Mikroskop eingesetzt wurden.

Um DNA in HEK-Zellen einzubringen, wurde ein Effectene^R Transfektions Kit (Qiagen^R) nach Angabe des Herstellers verwendet. 2 µg der gewünschten DNA wurden mit 200 µl EC Puffer und 16 µl Enhancer (5 Minuten bei RT) inkubiert. Nach Zugabe von 22 µl Effectene wurde der Ansatz weitere 20 Minuten bei RT inkubiert. Die Lösung wurde vorsichtig auf Zellen aufgetropft, die auf 5 cm Ø großen Petrischalen zu 80 %iger Konfluenz gewachsen waren. Nach 24 Stunden wurden die Zellen je nach Versuch auf Deckgläschen oder Wells verteilt und anschließend für weitere 24 Stunden bei 37°C inkubiert.

3.3.3.2. Transiente Transfektion von Zellen mit Kalziumphosphat

Diese Methode wurde eingesetzt, um große Mengen an transfizierten Zellen, z.B. für Membranpräparationen, zu gewinnen.

20 µg DNA wurden mit 450 µl H₂O, 50 µl 2,5 M CaCl₂ und 500 ml 2-fach konzentriertem BBS versetzt und für 20 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Der Transfektionsansatz wurde anschließend auf die in 9 cm Ø großen Petrischalen konfluent gewachsenen HEK-Zellen aufgetropft. Die Zellen wurden im Anschluß bei 3 % CO₂ und 37°C über Nacht inkubiert und am nächsten Tag im Versuch eingesetzt.

2x BBS Lösung:

280 mM NaCl

1,5 mM NaH₂PO₄

50 mM BES

pH 6,95

3.3.3.3. Generierung einer stabil exprimierenden Zelllinie

Um Zellen zu isolieren, die das gewünschte DNA-Produkt dauerhaft exprimieren, wurden HEK-Zellen mit Effectene^R (siehe oben) transfiziert, für 24 Stunden in DMEM kultiviert und dann mit 1 mg/ml Geneticin 418 (Gibco^R) selektiert. Bei der Selektion wurde die

Neomycin/Geneticin-Resistenz (Neo^R) der pcDNA3-Plamide genutzt. Die sich nach mehreren Tagen bildenden Kolonien von überlebenden Zellen wurden gepickt und auf 9 cm Ø großen Petrischalen mit DMEM und 200 µl/ml Geneticin weitergezogen. Mehrere Zelllinien wurden hinsichtlich ihrer Expression im Konfokalmikroskop überprüft. Anhand der Fluoreszenzintensität und Verteilung des exprimierten Rezeptors wurde eine Zelllinie ausgewählt und weiter kultiviert.

3.4. Versuche zur Charakterisierung der pH-Eigenschaften der Konstrukte

3.4.1. Herstellung der Versuchspuffer

Für die Versuche am Mikroskop und Spektrometer wurden unterschiedliche Versuchspuffer hergestellt. Es wurden Puffer mit pH 5,0 – pH 9,0 in 140 mM NaCl; 3,5 mM KCl; 1,5 mM CaCl₂ und 2 mM MgCl₂ eingesetzt.

HBS Puffer pH 7,0 und 7,4:

20 mM HEPES

Die pH-Einstellung auf den gewünschten Wert erfolgte mit Natronlauge.

MBS Puffer pH 5,4; 5,8; 6,2; 6,6 und 7,0:

20 mM MES

Die pH-Einstellung auf den gewünschten Wert erfolgte mit Natronlauge.

Tris-HCl Puffer pH 8,2; 8,6 und 9:

20 mM Tris

Die pH-Einstellung auf den gewünschten Wert erfolgte mit Salzsäure.

3.4.2. Versuche am Spektrometer

HEK-Zellen wurden auf 1 cm große, runde Deckgläschen (A.Hartenstein) transferiert. Dazu wurden die Deckgläschen zunächst in 12-Well-Petrischalen gelegt, mit 70 % Alkohol desinfiziert und mit einigen ml destilliertem Wasser gewaschen. Zur besseren Haftung der Zellen wurden die Gläschen mit einem Tropfen Polylysin (0,1 mg/ml in Wasser, Sigma^R) beschichtet und für 30 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Nach Absaugen des Polylysin wurde jedes Well mit DPBS (Pan^R) gewaschen. Konfluent gewachsene Zellen einer 5 cm Ø großen Petrischale wurden auf die 12 Wells verteilt und die Zellen für weitere 24 h bei 37°C inkubiert.

Die Deckgläschen wurden in die mit unterschiedlichen Puffern gefüllten Küvetten eingebracht. Als Versuchspuffer wurde HBS Puffer pH 7,4 und MBS Puffer 5,0 eingesetzt (siehe 3.4.1). Die Zellen wurden alle 100 ms mit 430±5 nm angeregt und die Emissionsfrequenz aufgezeichnet.

Der Versuch wurde am Fluoreszenzspektrometer von Perkim Elmer LS50B durchgeführt.

3.4.3. Vorbereitung der Zellen für Versuche am Mikroskop

Die Zellen wurden auf 2,4 cm Ø große Deckgläschen (A.Hartenstein) transferiert. Dazu wurden die Deckgläschen in 6 Well Petrischalen gelegt, mit 70% Alkohol desinfiziert und mit einigen ml destilliertem Wasser gewaschen. Anschließend wurde jedes Gläschen mit einem

Tropfen Polylysin (0,1 mg/ml Sigma^R) bedeckt und für 30 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert.

Nach Absaugen des Polylysin wurden die 6-Well mit DPBS (Pan^R) gewaschen. Konfluente Zellen einer 5 cm Ø großen Petrischale wurden auf die einzelnen Wells einer 6 Well-Petrischale verteilt und für weitere 24 h bei 37°C inkubiert.

Für die Versuche wurde das TCS SP2 Konfokalmikroskop mit Ölimmersionsobjektiv (HCXPL APO 63x1,2) von Leica^R verwendet.

Fluorophor	Laser	Strahlenteiler	Wellenlänge
EYFP	Argonlaser	DD 458/514	514 nm
EGFP	Argonlaser	RSP 500	488 nm
ECFP	Doppeldiodenlaser	RSP 455	430 nm
mRFP1	Argonlaser	DD 458/514	514 nm

Tabelle 3

Die Fluorophore der von den Zellen exprimierten β_2 AR-Fusionsproteine wurden mit Hilfe verschiedener Laser mit ihren charakteristischen Exzitationsfrequenzen angeregt. Mit Hilfe von Strahlenteilern konnten unerwünschte Anregungswellenlängen bei der Aufnahme der Emissionsspektren ausgeblendet werden (siehe Tabelle 3). Die Deckgläschen wurden zur Fixierung in eine Eisenhalterung eingeschraubt, die eine direkte Inkubation der Zellen mit unterschiedlichen Versuchspuffern erlaubte.

Von den in den unterschiedlichen Versuchspuffern (pH 5,4 bis 7,4 siehe 3.4.1.) inkubierten Zellen wurden Aufnahmen gemacht und mit der Leica^R Confocal Software bearbeitet.

Es wurden die Fluoreszenzintensitäten und die Fluoreszenzverteilung in den Zellen beurteilt.

3.4.4. Photometrie

Die Zellen wurden wie für die Konfokalmikroskopie vorbereitet (siehe 3.4.2.) und zunächst in HBS pH 7,4 inkubiert. Anschließend wurden die Zellen bei Raumtemperatur unter dem Zeiss Mikroskop (Axiovert 200) mit einem 100xÖlimmersionsobjektiv und einem photometrischen System (Till Photonics) betrachtet. Es wurde eine fluoreszierende Zelle ausgewählt und mit Licht aus dem Polychrome IV (Till Photonics) angeregt. Die Anregung erfolgte dabei mit einer Wellenlänge von 436 nm im Abstand von 100 ms pro Datenpunkt. Die Zelle wurde mit den unterschiedlichen Versuchspuffern (siehe 3.4.1.) mit Hilfe der Perfusionsanlage ALA-VM 8 (ALA Scientific Instruments) angespült. Die mit Photodioden aufgenommenen Signale wurden mit dem AD-Converter (Digidata 1322A, Axon Instruments) umgewandelt und mit der Clampex 8,1 Software (Axon Instruments) dargestellt. Dabei wurde das Verhältnis der Fluoreszenzintensitäten von YFP zu CFP bzw. GFP zu CFP gezeigt (F_{535}/F_{480}). F_{535} und F_{480} geben die Emissionsintensitäten bei 535 ± 5 nm und 480 ± 20 nm (Strahlenteiler DCLP 505 nm) bei Anregung mit 436 ± 10 nm (Strahlenteiler DCLP 460 nm) an.

3.5. Proteinchemische Methoden

3.5.1. Membranpräparation

Auf 9 cm Ø großen Petrischalen bis zu 80%iger Konfluenz gewachsene HEK-Zellen wurden in eiskaltem hypotonem Puffer (5 mM Tris-HCl pH 7,4 und 2 mM EDTA) auf Eis inkubiert,

von der Petrischale abgeschabt und 2x15 Sekunden mit dem Ultraturrax lysiert (maximale Umdrehungszahl). Durch Zentrifugation der Proben (3200 rpm für 10 Minuten, bei 4°C; Hettich Zentrifuge Rotanta 96 R) wurden die Zellkerne abgetrennt. Mittels Ultrazentrifugation (37000 rpm, 40 min, 4°C, Beckmann Ultrazentrifuge OptimaTML, Rotor 70 Ti) wurden Cytosol und Zellmembranen getrennt. Das Membranpellet wurde in 50 mM Tris-HCl pH 7,4 resuspendiert und in einem Glaspotter (Douncer) homogenisiert.

3.5.2. Proteinbestimmung nach Bradford

Die Proteinbestimmungen erfolgten photometrisch unter Verwendung des Biorad Protein-Assay-Reagenz. Durch Bindung von Coomassie Brilliant Blue G 250 an Proteine verschiebt sich das Absorptionsmaximum von 465 nm auf 595 nm. Die Membranen wurden nach Angaben des Herstellers in je 1 ml 1:5 in aqua bid. verdünntem Reagenz bei 595 nm gemessen.

Die Proteinmenge in Zellmembranen wurde anhand einer Standardkurve mit bovinem Serumalbumin berechnet.

3.5.3. Proteinbestimmung mit Bicinochonin-Säure

Grundlage der Bestimmung ist die Reduktion von Cu^{2+} zu Cu^+ durch Proteine in alkalischer Lösung und die spektrophotometrische Messung des Cu^+ -Komplexes mit Bicinochonin-Säure (BCA) bei 562 bzw. 570 nm.

Zur Bestimmung des Proteingehaltes einer Lösung wurden 10 µl der Lösung bzw. des BSA-Standards (Konzentration von 0,1 µg/µl in Lysepuffer) mit 200 µl BCA-Reagenz in eine Mikrotiterplatte pipettiert und 30 Minuten bei 37°C inkubiert. Anschließend wurde die Extinktion bei 562 nm gemessen (Elisa-Reader Molecular Devices). Der Proteingehalt der zu bestimmenden Probe ergibt sich aus dem Vergleich der Extinktion der Probe mit der aus den Standardwerten ermittelten Eichgerade.

3.5.4. SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Die Auftrennung von Proteinen erfolgte durch SDS-Polyacrylamid Gelelektrophorese in 10% Trenngelen. Durch Lyse transient transfizierter HEK-Zellen wurden Zellextrakte gewonnen. Dazu wurden die auf 9 Ø cm konfluent gezogenen HEK-Zellen mit 1,5 ml Lysispuffer inkubiert und abgeschabt. Die Proteinkonzentration wurde mittels BCA-Proteinassay (siehe 3.5.3.) bestimmt. Das Lysat wurde mit Protein-Probenpuffer versetzt und auf das Sammelgel aufgetragen. Zur Größenabschätzung wurde ein Marker (1,4 mg/ml peqLab^R) verwendet. Die Elektrophorese erfolgte bei einer Spannung von 120 Volt.

Lysispuffer:

50 mM Tris/HCl (pH 7,4)

5 mM EDTA

1% Triton

1mM PMSF

10 mM Jodacetamid

4xTrenngelpuffer:

4g SDS

500 ml 3 M Tris-HCl pH 8,8

Wasser ad 1000 ml

Sammelgelpuffer:

2g SDS

250 ml 1M Tris-HCl pH 6,8

Wasser ad 500 ml

Trenngel:

5 ml 4xTrenngelpuffer

6,7 ml Acrylamid (30%)/ Bisacrylamid (0,8%)

8,3 ml Wasser

10 µl TEMED (N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin)

130 µl Ammoniumpersulfat (10%)

Sammelgel:

1 ml Acrylamid (30%)/ Bisacrylamid (0,8%)

5 ml Wasser

80 µl Ammoniumpersulfat (10%)

2 ml 4x Sammelgelpuffer

8 µl TEMED (N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin)

5x Protein-Probenpuffer:

250 mM Tris-HCl pH 6,8

5% SDS

1% DTT (Dithiothreitol)

40% Glycerol

0,01% Bromphenolblau

10x SDS-Laufpuffer:

250 mM Tris

1,92 M Glycin

1% SDS

3.5.5. Western Blot

Der Transfer der Proteine nach SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese auf eine PVDF-Membran (Millipore^R) erfolgte mit einer Semi-dry-blot Apparatur der Firma Biorad^R.

Das in Transferpuffer gebadete SDS-Gel wurde dazu luftblasenfrei auf die mit Methanol aktivierte und mit Transferpuffer benetzte PVDF-Membran aufgelegt. Gel und Membran wurden zwischen jeweils 3 mit Transferpuffer getränkten 3 MM-Whatman Papieren in die Blotapparatur eingelegt. Der Transfer erfolgte bei 0,3 Ampere und 15 V für 1 Stunde.

Nach dem Transfer wurden die Proteinbanden auf der Membran mit Ponceau-S (Biorad^R) gefärbt und markiert. Die Membran wurde für 1 Stunde bei Raumtemperatur in Blockpuffer inkubiert, wodurch freie Bindungsstellen auf der Membran abgesättigt wurden. Im Anschluss wurde die Membran 3x für 5 Minuten mit PBS gewaschen und der 1. Antikörper, ein GFP-Antikörper (Santa Cruz Biotechnology), in einer 1:1000 Verdünnung in Blockpuffer

zugegeben. Der Ansatz wurde für 30 Minuten bei RT auf einem „Schaukler“ inkubiert. Danach wurde 3 mal für je 5 Minuten mit PBS gewaschen.

Anschließend wurde entsprechend der Herkunftspecies des ersten Antikörpers ein passender zweiter Antikörper, der mit Meerrettich-Peroxidase (horseradish peroxidase, HRP) gekoppelt war, in der Konzentration 1:3000 in Blockpuffer eingesetzt und die Ansätze für 30 Minuten bei Raumtemperatur auf einem „Schaukler“ inkubiert. Nach 3 maliger Waschung (PBS für je 3 Minuten) wurden zur Detektion gleiche Mengen (pro Blot je 5 ml) folgender Lösungen gemischt und der Blot darin mindestens 5 Minuten inkubiert:

Lösung A:

22 µl p-Cumarsäure (90 mM) in DMSO
50 µl Luminollösung (250 mM) in DMSO
ad 5 ml Tris-HCl (100 mM) pH 8,3

Lösung B:

3 µl Perhydrol (H₂O₂-Lösung, 30%)
ad 5 ml Tris-HCl (100 mM) pH 8,3

Zur Detektion der jeweils entstehenden Chemolumineszenz wurde ein Fuji LAS-1000 System verwendet.

Blockpuffer:

2% Magermilchpulver
1% Ovalbumin
in PBS

Transferpuffer:

20 mM Tris/HCl pH 8,3
150 mM Glycin
20 % Methanol

PBS:

137 mM NaCl
2,7 mM KCl
4,3 mM Na₂HPO
1,47 mM KH₂PO₄
pH 7,4

1. Antikörper :

GFP Antikörper (Santa Cruz Biotechnology) ist ein polyklonaler Kaninchenantikörper, der gegen die Aminosäuren 1-238 von GFP gerichtet ist.
200 µg IgG in 1ml PBS

2. Antikörper:

Antikörper anti-Kaninchen mit Meerrettich-Peroxidase gekoppelt.

3.6. Rezeptorinternalisierung

3.6.1. Internalisierungsassay von β_2 AR mit [3 H] CGP 12177

Transient transfizierte HEK-Zellen (siehe 3.3.3.1.) wurden 24 Stunden nach Transfektion auf mit Polylysin beschichtet 12 Wells transferiert und für weitere 24 Stunden bei 37°C inkubiert. Nach Absaugen des Mediums wurden die Zellen für 15 Minuten in 1ml vorgewärmtem HBS inkubiert und dann mit 1 μ M Isoprenalin für 10 oder 30 Minuten bei 37°C stimuliert. Unstimulierte Zellen dienten als Vergleich. Für alle Zeitpunkte wurden Triplikate erstellt. Die Reaktion wurde auf Eis abgestoppt und jedes Well anschließend 3x mit 1 ml eiskaltem PBS gewaschen. Pro Well wurden 250 μ l 3 H-CGP in HBS ((30 nM) ~250000 cpm/ Well) zugegeben. Zur Bestimmung der unspezifischen Bindung wurde je ein Well der unstimulierten Zellen bzw. der stimulierten Zellen zusätzlich mit 10 μ M Alprenolol inkubiert. Alle Ansätze wurden bei 4 °C für 2 Stunden auf einem „Schaukler“ inkubiert. Anschließend wurde jedes Well 3x mit 1ml eiskaltem PBS gewaschen. Die Zellen wurden mit 1 ml 0,5 M NaOH pro Well für 30 min bei RT auf einem „Schaukler“ lysiert. Danach wurden aus jedem Well 800 μ l Lysat in 4 ml Szintillationsflüssigkeit (LumaLSC^R) pipettiert und im Betacounter LS 1801 von Beckmann gezählt.

HBS:

10 mM HEPES (pH 7,4)
 150 mM NaCl
 2,5 mM KCl
 4 mM CaCl₂
 2 mM MgCl₂
 10 mM Glucose

PBS:

137 mM NaCl
 2,7 mM KCl
 4,3 mM Na₂HPO₄
 1,47 mM KH₂PO₄
 pH 7,4

3.7. Bindungsexperimente

3.7.1. Radioligandenbindung

Die Radioligandenbindung wurde sowohl zur Bestimmung der Rezeptorzahl und hochaffinen K_D durch Sättigungsexperimente als auch zur Ermittlung von IC_{50} -Werten durch Liganden-Kompetitionsexperimente eingesetzt.

Zellmembranen wurden, wie in 3.5.1. beschrieben, gewonnen und eine Proteinbestimmung, wie in 3.5.2. beschrieben, durchgeführt. Mit diesem Versuch wurde die Rezeptorzahl in 5 μ g Membranprotein bestimmt.

Ansatz:

5 μ g Membranprotein; 100 μ l in 50 mM Tris-HCl
 200000 cpm 125 J-Cyanopindolol; 50 μ l in 50 mM Tris-HCl (spez. Aktivität 3000 Ci/mmol)
 50 μ l 50 mM Tris-HCl

Zur Bestimmung der unspezifischen Bindung wurde Alprenolol in einer Endkonzentration von 10 μM eingesetzt. Der Auswertung der Daten wurde zu Grunde gelegt, dass 3000 cpm 1 fmol ^{125}J -Cyanopindolol entsprechen.

Die Ansätze wurden für 2 Stunden bei Raumtemperatur inkubiert und anschließend über einzelnen Glasfaserfiltern (GF/B Millipore) abgesaugt. Um die Membranbindung zu erhöhen, waren die Filter zuvor in 0,33 % PEI Lösung inkubiert worden. Jeder Filter wurde anschließend 3mal mit 2 ml eiskaltem 50 mM Tris-HCl pH 7,4 gewaschen. Die Filter wurden in Röhrchen gegeben und die gebundene Radioaktivität im Gammacounter LS 1801 von Beckmann gemessen. Anhand der eingesetzten Konzentration an ^{125}J -Cyanopindolol und den daraus resultierend Counts wurde, nach Abzug der durch Alprenolol bestimmten unspezifischen Bindung, die für die Sättigungsexperimente notwendige Menge an Membranprotein festgesetzt. Beabsichtigt war, 10 pmol Rezeptor einzusetzen.

3.7.2. Sättigungsexperiment

Es wurden 0,1 μg Membranprotein pro Probe (10 pmol Rezeptor) verwendet. Als Radioligand wurde ^{125}J -Cyanopindolol in unterschiedlichen Konzentrationen (5-500 pM) eingesetzt. Die Konzentrationen wurden mittels Verdünnungsreihe hergestellt und durch Messungen im Gammacounter überprüft.

Für jede ^{125}J -Cyanopindolol Konzentration wurde die totale Bindung in Duplikaten bestimmt. Zur Bestimmung der unspezifischen Bindung wurde eine weitere Probe zusätzlich mit 10 μM Alprenolol inkubiert.

Je Ansatz:

100 μl 0,1 μg Membranprotein in Tris-HCl pH 7,4

50 μl ^{125}J -Cyanopindolol (5-500 pM) in Tris-HCl pH 7,4

50 μl Assaypuffer Tris-HCl pH 7,4

jede 3. Probe Zusatz von Alprenolol (Endkonzentration 10 μM)

Die Ansätze wurden für 2 Stunden bei Raumtemperatur inkubiert und weiter wie in 3.7.1 verfahren. Die Radioligandenbindung wurde halblogarithmisch gegen die Ligandenkonzentration aufgetragen. Die Bestimmung von B_{max} und K_D erfolgte, gemäß der unten stehenden Gleichung, durch nichtlineare Regression mit der Software Kaleidagraph^R.

Die Bestimmung des K_D für verschiedene Rezeptormutanten erfolgte aus 3 unabhängigen Einzelerperimenten.

Sättigung der Radioligandenbindung:

$$\text{Spezifische Bindung} = \frac{[\text{Radioligand}] * B_{\text{max}}}{[\text{Radioligand}] + K_D}$$

3.7.3. Liganden- Kompetitions Experimente

Zunächst wurde die Isoprenalinkonzentration ermittelt, bei der 50% des Radioliganden (^{125}J -Cyanopindolol) verdrängt wurden (IC_{50}). Dazu wurden jeweils 1 μg Membranprotein mit 90 % sättigender ^{125}J -Cyanopindolol Konzentration (40 pM) sowie mit verschiedenen Isoprenalinkonzentrationen (10^{-11} - 10^{-3} M) versetzt. Dann wurde, wie in 3.7.1. beschrieben,

weiterverfahren. Gemäß der untenstehenden Gleichung wurden durch halblogarithmische Auftragung und Analyse mittels nichtlinearer Regression Verdrängungskurven erstellt, aus denen der IC_{50} -Wert für Isoprenalin bestimmt wurde. Als Software wurde Kaleidagraph^R eingesetzt.

Verdrängungskurve:

$$B = B_{\max} - \frac{B_{\max} * I [\text{Iso}]}{IC_{50} + I [\text{Iso}]}$$

Aus dem IC_{50} -Wert für Isoprenalin, der eingesetzten Radioligandenkonzentration (L) und der ermittelten Bindungsaffinität K_D des Rezeptors für den Radioliganden, wurde die Affinität von Isoprenalin zum Rezeptor nach der Gleichung von Cheng und Prusoff (1973) berechnet. Der K_D Iso wurde für die unterschiedlichen Rezeptormutanten in 3 Einzelexperimenten ermittelt.

$$K_D \text{ Iso (Affinität von Iso)} = \frac{IC_{50}(\text{Iso})}{1 + \frac{(L_{J\text{-Cyp}})}{K_D (J\text{-Cyp})}}$$

3.8. Nachweis der "Second-messenger" Bildung

3.8.1. Cyclaseassay

Die Zellmembranen wurden, wie in 3.5.1. beschrieben, gewonnen und die Proteinbestimmung erfolgte nach der in 3.5.2. beschriebenen Methode nach Bradford.

Für den Versuch wurden 50 µg Membranprotein (40 µl in H₂O) mit 50 µl 2x Rea-Mix-Lösung und Isoprenalin in unterschiedlichen Konzentrationen (0; 0,3; 0,1; 0,3; 1; 3; 10; 30; 100; 300 nM; Gesamt 10 µl in H₂O) versetzt und zunächst auf Eis gehalten. Die Ansätze wurden dann bei 37°C für 20 Minuten im Thermomixer inkubiert.

Zum Vergleich wurden Proben ohne Isoprenalin eingesetzt.

Durch Zugabe von 400 µl ZnAc (125 mM) und 500 µl Na₂CO₃ (144 mM) auf Eis wurde die Reaktion abgestoppt und ADP und ATP zusammen mit Zn₂CO₃ gefällt, während cAMP in Lösung blieb. Der Zn₂CO₃-Niederschlag wurde anschließend durch Zentrifugation für 5 Minuten bei maximaler Geschwindigkeit in der Eppendorf Centrifuge 5417 sedimentiert. 800 µl des ³²[P] cAMP enthaltenden Überstandes wurden auf Alumina-Säulen (Chromatography Colume BioRad^R 2 cm³ Al(OH₃) Säulen) aufgetragen, die zuvor mit 2 ml 100mM Tris-HCl äquilibriert worden waren. Anschließend wurde 2x mit 5 ml Tris-HCl (100 mM) eluiert. Die in den Szintillatorgefäßen aufgefangene Flüssigkeit wurde im Gamma Counter LS 1801 von Beckmann gezählt.

2x Reaktionsmix:

0,2 mM cAMP

20 µM GTP

0,2 mM ATP

0,4 % BSA

1 mM IBMX

2 mM MgCl₂

0,8 mg/ml Kreatinkinase

10 mM Kreatinphosphat

100 mM Tris-HCl pH 7,4

200000 cpm / Ansatz [alpha ³²P]- ATP

4. Ergebnisse

4.1. Klonierung

Als Vektor für die DNA der Rezeptormutanten wurden pcDNA3-Plasmide eingesetzt. Sie tragen die genetische Information für ein Ampicillinresistenzgen und eine CMV-Promotorregion, welche die Expression der DNA in eukaryotischen Zellen ermöglicht. Es wurden 3 β_2 AR-Rezeptormutanten konstruiert.

Ausgangskonstrukte β_2 AR mit C-terminaler GFP Mutante in pcDNA3:

- ⇒ β_2 AR-CFP
- ⇒ β_2 AR-mRFP1

Ausgangskonstrukte β_2 AR mit N-terminaler GFP Mutante in pcDNA3:

- ⇒ EYFP- β_2 AR
- ⇒ EGFP- β_2 AR

Endkonstrukte:

- ⇒ pc-EYFP- β_2 AR-CFP (Abb. 7)
- ⇒ pc-EYFP- β_2 AR-mRFP1 (Abb.8)
- ⇒ pc-EGFP- β_2 AR-CFP (Abb.9)

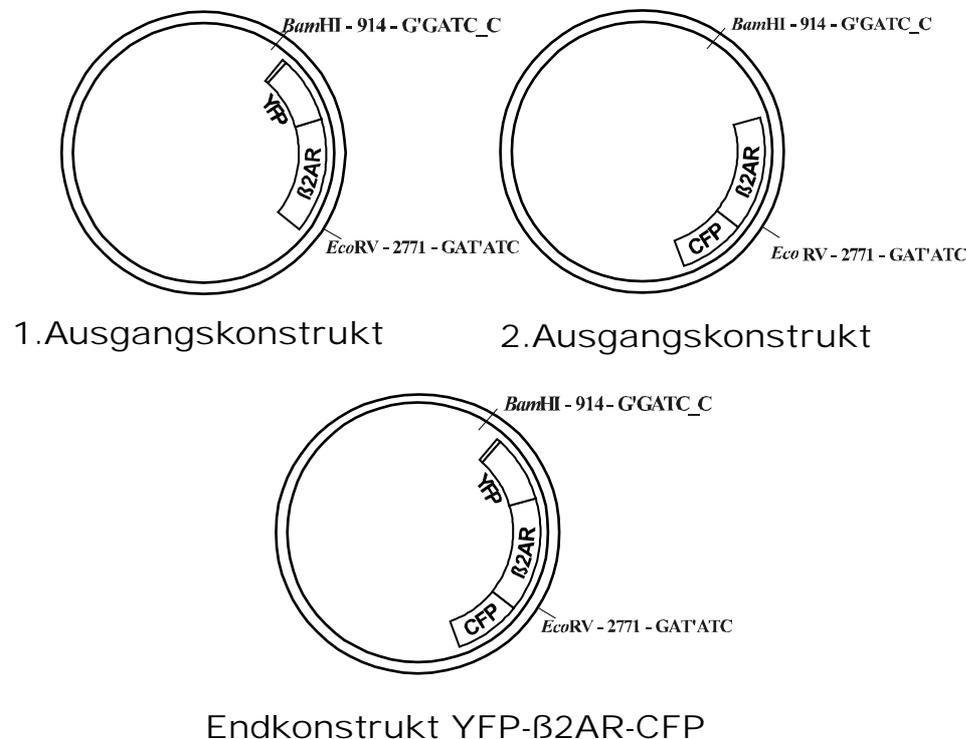


Abb.7: Klonierungsstrategie für die Erstellung des Endkonstruktes EYFP- β_2 AR-CFP. Neben der Anordnung der GFP-Mutanten (YFP,CFP) am β_2 AR werden die Restriktionsenzyme (BamHI, EcoRV) mit ihren Schnittstellen wiedergegeben.

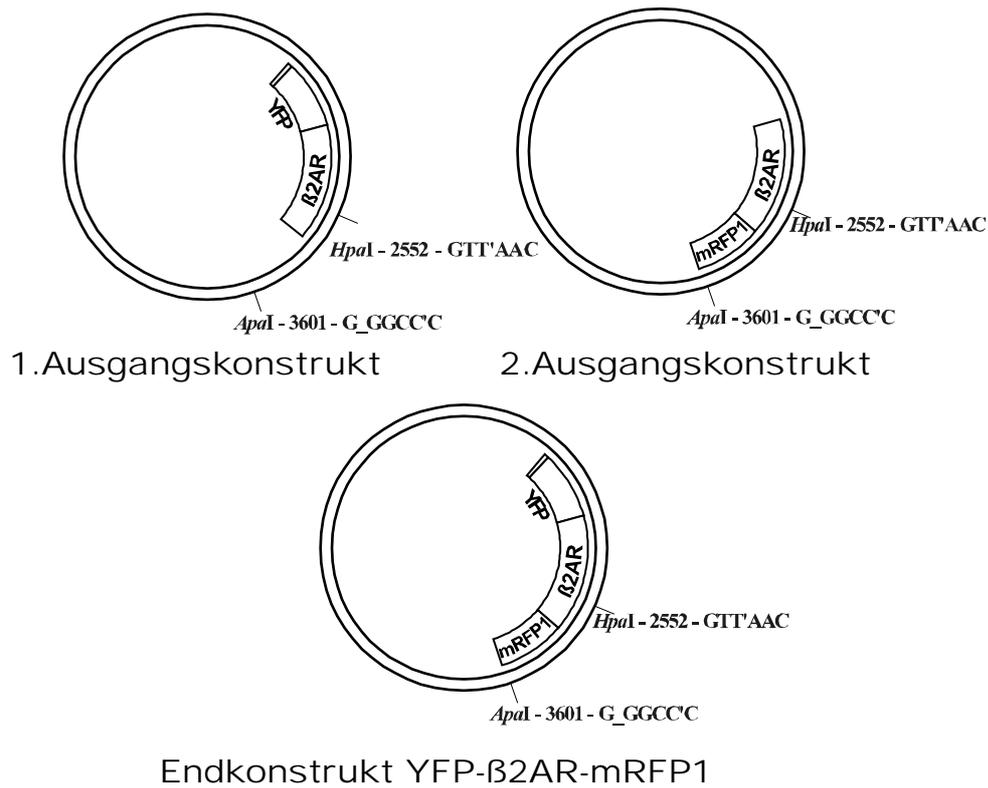


Abb.8: Klonierungsstrategie für die in ein pcDNA3 Plasmid klonierte Rezeptormutante EYFP-β₂AR-mRFP1 mit den eingesetzten Ausgangskonstrukten und den verwendeten Restriktionsschnittstelle (HpaI, ApaI).

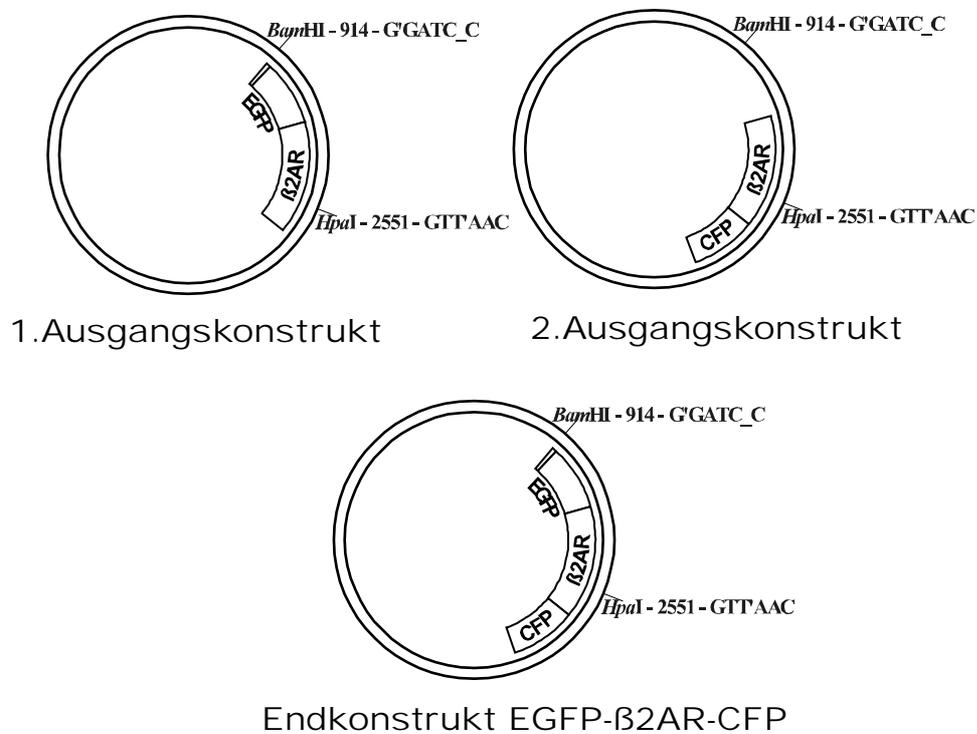


Abb.9: Klonierungsstrategie für die EGFP-β₂AR-CFP Rezeptormutante mit den verwendeten Ausgangsklonen. Es werden die Restriktionsschnittstellen für die entsprechenden Restriktionsenzyme (BamHI, HpaI) wiedergegeben.

4.2. Charakterisierung der Rezeptormutanten

4.2.1. Konfokalmikroskopie

Um die Expression und Fluoreszenzeigenschaften der Rezeptormutanten zu untersuchen, wurden HEK-Zellen transient transfiziert. Die Zellen wurden unter dem Konfokalmikroskop in MBS pH 7,0 inkubiert und die Fluorophore der Rezeptormutanten mit den charakteristischen Exzitationswellenlängen angeregt (siehe Tabelle 4). Es erfolgte die Beurteilung der Fluoreszenzintensität und Fluoreszenzverteilung der Zellen. Unter dem Mikroskop zeigten sie eine starke Fluoreszenz in den für die GFP-Mutanten charakteristischen Farben (=Emissionsspektren) (siehe Tabelle 4).

	Exzitationsmaximum	Fluoreszenz
EGFP	488 nm	Grün
EYFP	514 nm	Gelb
ECFP	434 nm	Blau
mRFP1	584 nm	Rot

Tabelle 4

Die Zellmembran fluoreszierte dabei am stärksten. Im Zytosol waren nur wenige fluoreszierende Bereiche zu erkennen. (siehe Abb. 10)

Man konnte daraus folgern, dass die konstruierten Rezeptormutanten in den HEK-Zellen exprimiert und in die Zellmembran inseriert wurden.

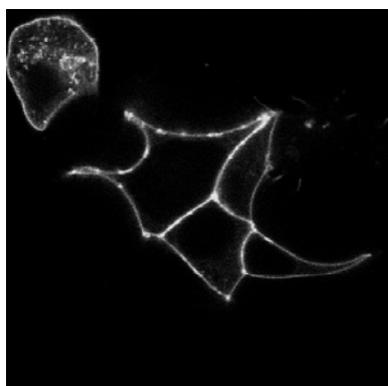


Abb.10: Konfokalmikroskopische Aufnahme von transient transfizierten EYFP- β_2 AR-CFP in HEK-Zellen. Man erkennt die deutliche Fluoreszenz der Rezeptormutanten in der Zellmembran. Das Zytosol zeigt keine fluoreszierenden Bereiche.

Im Verlauf der Arbeit fiel die Entscheidung, sich vermehrt auf die Charakterisierung der EYFP- β_2 AR-CFP Mutante zu konzentrieren. Diese Entscheidung erfolgte, da diese Mutante im Verlauf der Experimente die klarsten Ergebnisse zeigte. Von dieser Zelllinie wurden daher stabil transfizierte Zellen gezogen, um eine Rezeptorcharakterisierung durchzuführen und die durch transiente Transfektionen entstandenen Abweichungen zu minimieren.

Die Rezeptormutante EYFP- β_2 AR-mRFP1 wurde schon zu Beginn der Versuchsreihen verworfen. Das mRFP1 konnte im Molekül nicht ausreichend stimuliert werden, weshalb Versuche am Konfokalmikroskop und unter photometrischen Bedingungen nicht möglich waren.

Das EGFP- β_2 AR-CFP Konstrukt verhielt sich hingegen ähnlich wie die EYFP- β_2 AR-CFP Mutante. Es wurde daher in einigen Versuchen in transient transfizierten HEK 293-Zellen eingesetzt, um als Vergleich zu den Ergebnissen mit transient transfizierten EYFP- β_2 AR-CFP HEK 293-Zellen zu dienen. Dies ist an den entsprechenden Stellen des Material- und Ergebnissteiles ersichtlich.

4.2.2. Western Blot

Um Abbau- oder Spaltungsvorgänge auszuschließen, welche die physiologische Rezeptorfunktion des EYFP- β_2 AR-CFP Fusionsproteins beeinträchtigen könnten, wurde ein Western Blot durchgeführt. Als Vergleich kam das Fusionsprotein β_2 AR-GFP zum Einsatz.

Die Proteine wurden durch Lyse stabil bzw. transient mit EYFP- β_2 AR-CFP und mit β_2 AR-GFP transfizierter HEK-Zellen gewonnen. Eine Auftrennung des Lysates erfolgte auf einem 10 %igen SDS-Gel. In der Laufspur der stabilen bzw. transient transfizierten HEK-Zellen EYFP- β_2 AR-CFP wurden zwei Banden sichtbar (siehe Abb.11), eine breite, dichte Bande von ~100 kDa und eine deutlich schwächere Bande von ~75 kDa. Das Lysat der transient transfizierten HEK β_2 AR-GFP zeigte nur eine Bande von ~73 kDa (siehe Abb.11).

Die ~73 kDa Bande in der Laufspur des β_2 AR-GFP entsprach dem zu erwartenden Molekulargewicht des Fusionsproteins.

Den eingesetzten Fusionsproteinen EYFP- β_2 AR-CFP, mit einem Molekulargewicht von ~102 kDa, konnten die ~100 kDa Banden der HEK-Zellen EYFP- β_2 AR-CFP Lysate zugeordnet werden. Ein Großteil der Fusionsproteine wurde dadurch in unveränderter Form nachgewiesen.

Strittig war jedoch die Entstehungsursache der ~75 kDa Banden. Sie könnte durch proteolytische Spaltung des EYFP- β_2 AR-CFP Fusionsproteins entstanden sein. Ein EYFP- β_2 AR Restprotein würde eine ~75 kDa-Bande zeigen.

Andererseits werden Doppelbanden auch durch in unterschiedlichen Glykosylierungszuständen vorliegende Fusionsproteine gebildet.

Anhand der Dichte der ~100 kDa Bande wurde allerdings deutlich, dass ein Großteil der Fusionsproteine unverändert vorliegen und somit für weitere Versuche eingesetzt werden können.

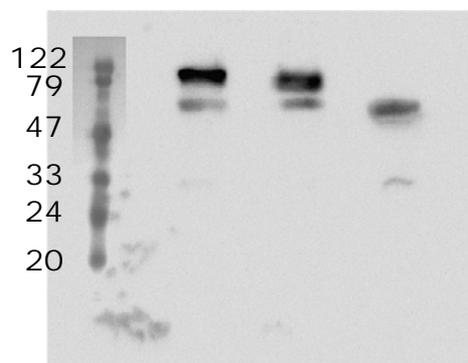


Abb.11: Western blot. Auf einem 10 % igen SDS-Gel wurden von links nach rechts das Lysat der stabil transfizierte HEK-Zellen EYFP- β_2 AR-CFP, der transient transfizierten HEK-Zellen EYFP- β_2 AR-CFP und der transient transfizierten β_2 AR-GFP HEK-Zellen aufgetragen. Nach dem Transfer wurde der Blot mit einem GFP-Antikörper entwickelt. Der Marker ist als Ponceau-S-Färbung eingeblendet.

4.2.3. Rezeptorbindung mit ^{125}J -Cyanopindolol

Durch Liganden-Kompetitions-Experimente mit HEK-Zellen, die transient mit EYFP- β_2 AR-CFP bzw. EGFP- β_2 AR-CFP transfiziert worden waren, wurde überprüft, ob die Mutationen am β_2 AR zu Veränderungen der Ligandenbindungseigenschaften führten. Als Wildtyp dienten mit Flag- β_2 AR transient transfizierte HEK-Zellen. Durch Verdrängung des an die Rezeptoren der Zellmembran gebundenen Radioliganden ^{125}J -Cyanopindolol mit unterschiedlichen Agonistenkonzentrationen wurde die Affinität des Rezeptors zum Agonisten bestimmt. Als Agonist diente Isoprenalin. Die Berechnung der Affinität des Liganden (Isoprenalin) zum Rezeptor, erfolgte mit der Cheng-Prussoff-Gleichung (siehe Material und Methoden). Anhand der Ergebnisse zeigte sich, dass die Ligandenbindungseigenschaften der überprüften Rezeptormutanten nicht erheblich unterschiedlich sind (siehe Tabelle 5).

Rezeptormutante	K_D in pM (^{125}J -Cyanopindolol)	K_D Iso (Affinität von Iso in nM) mit Standardabweichung
GFP- β_2 AR-CFP	$26,5 \pm 10,1$	$30,0 \pm 5,4$
YFP- β_2 AR-CFP	$18,9 \pm 7,6$	$65,4 \pm 4,8$
Flag- β_2 AR	$31,7 \pm 8,8$	$57,7 \pm 4,6$

Tabelle 5:

Es wird die in Liganden-Kompetitions-Experimenten ermittelte Affinität von Isoprenalin zu den einzelnen Rezeptormutanten mit den entsprechenden Standardabweichungen gezeigt. Weiter wird die in Sättigungsexperimenten für die Rezeptormutanten beobachtete halbmaximale Sättigung mit ^{125}J -Cyanopindolol angegeben. Die Daten wurden aus sechs Einzelexperimenten gemittelt.

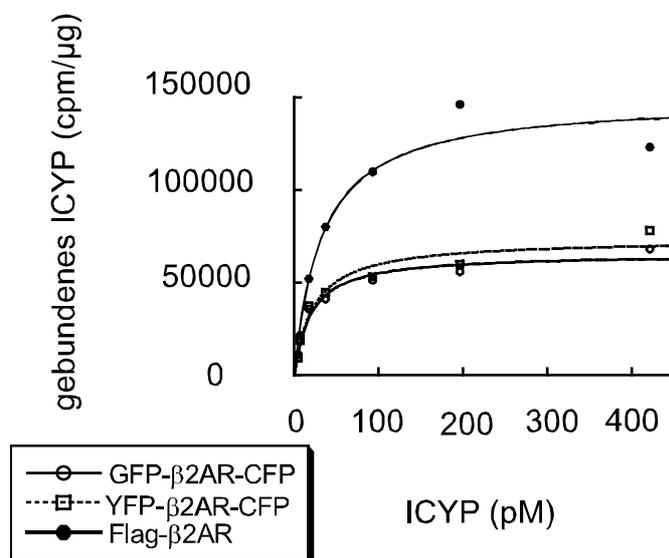


Abb.12: Die Abbildung zeigt das Ergebnis eines Sättigungsexperimentes. Durch dieses Experiment wurde die ^{125}J -Cyanopindololbindung der unterschiedlichen Rezeptormutanten bei unterschiedlichen ^{125}J -Cyanopindololkonzentrationen bestimmt und der K_D für die einzelnen Rezeptormutanten ermittelt.

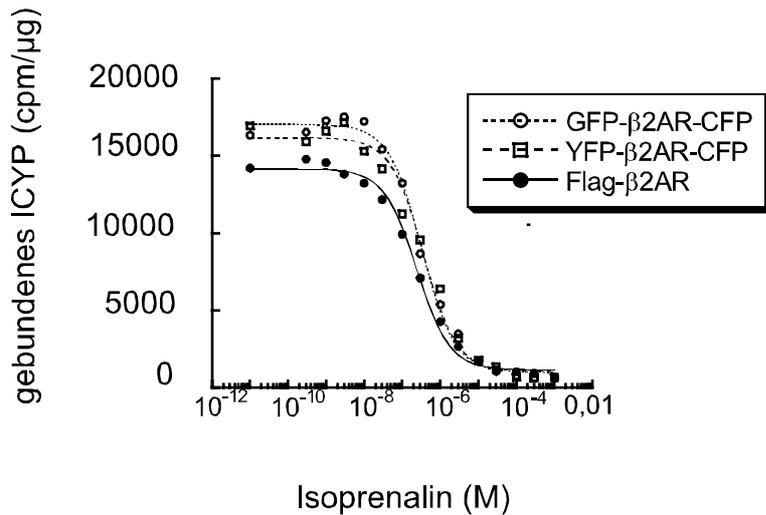


Abb.13: Die Abbildung zeigt die Verdrängungskurven eines Experimentes. Es wurde dabei die Verdrängung von gebundenem ^{125}J -Cyanopindolol mit unterschiedlichen Isoprenalinkonzentrationen dargestellt. Anhand der Kurven konnte die Isoprenalinkonzentration für die einzelnen Rezeptormutanten bestimmt werden, bei der 50% des Radioliganden verdrängt werden (IC_{50}).

4.2.4. Adenylatcyclaseassay

In diesem Versuch wurde die Funktionalität der Rezeptormutante EYFP- β_2 AR-CFP untersucht und hierzu stabil transfizierte HEK-Zellen eingesetzt. Um die Fähigkeit des Rezeptors zur Adenylatcyclase-Stimulation zu überprüfen, erfolgte die Messung der zellulären cAMP-Konzentration mit Hilfe der radioaktiven Substanz α - ^{32}P -ATP. Zur Stimulierung der Rezeptormutanten wurde Isoprenalin in unterschiedlichen Konzentrationen eingesetzt. Als Vergleich zu den stabil transfizierten EYFP- β_2 AR-CFP HEK-Zellen kamen stabil transfizierte HEK- β_2 AR Zellen zum Einsatz.

Anhand des Versuches konnte gezeigt werden, dass der konstruierte Rezeptor EYFP- β_2 AR-CFP die Adenylatcyclase weiterhin aktiviert (siehe Abb.14). Ein direkter Vergleich der durch die Agonistenstimulierung gebildeten cAMP-Konzentration von Wildtyprezeptor und Rezeptormutante ist allerdings nicht möglich, da die Rezeptorexpressionsrate der EYFP- β_2 AR-CFP HEK-Zellen rund 50fach stärker ist als die des Wildtyprezeptors (siehe Tabelle 6). Die für den Versuch eingesetzten Membranmengen differierten daher so stark in ihrer Rezeptor- und Cyclasekonzentration, dass eine vergleichende Beurteilung der Cyclaseaktivierung unmöglich war.

Allgemein kann dem Versuch entnommen werden, dass die Rezeptormutante ihre Eigenschaften an G_s zu koppeln und die Adenylatcyclase zu aktivieren nicht völlig verloren hat. Aufgrund der starken Rezeptorexpression der EYFP- β_2 AR-CFP HEK-Zellen hätte man allerdings erwartet, dass die gebildete cAMP-Konzentration der Zellen wesentlich höher ist, als die des Wildtypes. Eine entsprechende Linksverschiebung der YFP- β_2 AR-CFP Kurve wurde aber nicht beobachtet.

Konstrukte	B_{max}
β_2 AR	0,88 fmol/ μg
EYFP- β_2 AR-CFP	47,18 fmol/ μg

Tabelle 6

Die Tabelle gibt die Rezeptorexpressionsrate der für den Adenylatcyclaseassay verwendeten stabil transfizierten HEK-Zellen wieder.

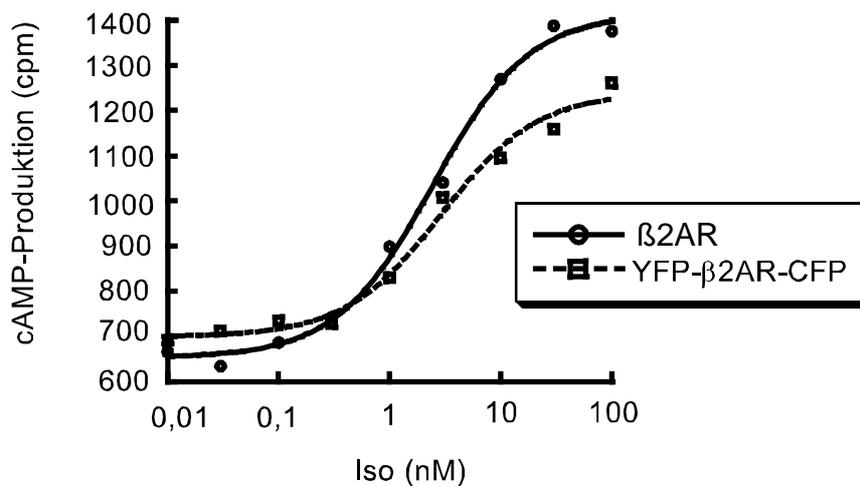


Abb.14: Rezeptorvermittelte Stimulation der Adenylcyclase. Membranen aus stabil transfizierten β_2 AR und EYFP- β_2 AR-CFP HEK-Zellen wurden mit unterschiedlichen Isoprenalinkonzentrationen stimuliert und die Bildung von [32 P]cAMP aus α - 32 P-ATP bestimmt. Anhand des Kurvenverlaufes kann man erkennen, dass die Rezeptormutante YFP- β_2 AR-CFP die cAMP-Bildung induziert.

4.2.5. Internalisierung der Rezeptormutanten

4.2.5.1. Internalisierungsassay

In diesem Versuch wurden die Rezeptormutanten EYFP- β_2 AR-CFP und EGFP- β_2 AR-CFP auf ihre Internalisierungseigenschaften untersucht. Als Wildtyp dienten Flag- β_2 AR HEK-Zellen. Die verwendeten HEK-Zellen wurden transient transfiziert.

Durch Agonistenstimulation mit 10 μ M Isoprenalin konnte die Rezeptorinternalisierung induziert und die Menge der internalisierten Rezeptoren durch Einsatz der Radioliganden 3 [H]CGP 12177 gemessen werden. CGP 12177 bindet an die Rezeptoren der Zelloberfläche. Um eine Aussage über die Schnelligkeit der Internalisierungsvorgänge zu erhalten, erfolgte eine unterschiedlich lange Inkubierung der Zellen mit Isoprenalin (0; 10; bzw. 30 Minuten).

Durch Zählung der gebundenen Radioaktivität im Betacounter konnte eine Aussage über die Internalisierungseigenschaften der Rezeptormutanten gemacht werden (siehe Tabelle 7 und Abb.15).

Zeit	EYFP- β_2 AR-CFP	EGFP- β_2 AR-CFP	FLAG- β_2 AR
0 Minuten	100 %	100 %	100 %
10 Minuten	82 %	69 %	87 %
30 Minuten	65 %	57 %	65 %

Tabelle 7:

Die Tabelle gibt den prozentualen Anteil der gezählten Counts (=Zellmembranrezeptoren) in Abhängigkeit von Rezeptormutante und Stimulierungsdauer (Isoprenalin) wieder. Die gezählte Rezeptormenge (Counts) bei 0 Minuten Stimulierung wurde als 100% Wert eingesetzt.

Anhand der Ergebnisse konnte bestätigt werden, dass die Fähigkeit der Rezeptoren, auf physiologische Weise zu internalisieren, durch die Mutationen nicht beeinträchtigt wurde.

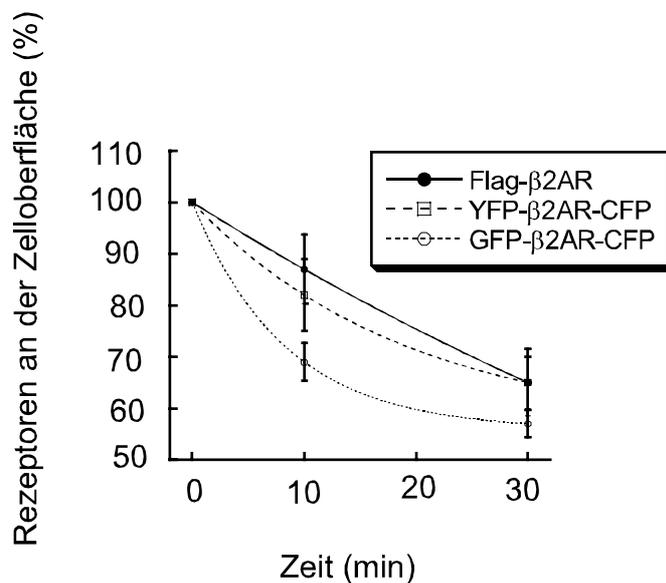


Abb. 15: Agonistenstimulierte Internalisierung von Rezeptoren, gemessen als [³H]CGP 12177-Bindung. Gezeigt sind Mittelwerte und Standardfehler aus 3 Experimenten.

4.2.5.2. Konfokalmikroskopie

Um die Internalisierungseigenschaften des EYFP-β₂AR-CFP weiter zu charakterisieren, erfolgten Versuche am Konfokalmikroskop. Die dazu transient transfizierten HEK-Zellen wurden für 20 Minuten mit 10 μM Isoprenalin vorinkubiert oder erst während des Versuches mit Isoprenalin stimuliert. Unter dem Mikroskop sollte man die internalisierenden Rezeptormutanten durch eine Zunahme von fluoreszierenden Strukturen im Zellinneren nachweisen können. Die Zellen wurden deshalb über einen Zeitraum von 1 Stunde immer wieder angeregt und anhand von Aufnahmen die Fluoreszenzverteilung in den Zellen beurteilt. Eine Zunahme an fluoreszierenden Punkten konnte festgestellt werden (siehe Abb.16). Die genaue Einschätzung wurde allerdings dadurch erschwert, dass sich die einzelnen transient transfizierten Zellen in ihrer Rezeptorexpression und Fluoreszenzintensität stark unterschieden und teilweise auch ohne Stimulierung fluoreszierende Strukturen im Zellinneren zeigten.

Der Versuch konnte keinen eindeutigen Nachweis für ein Rezeptorinternalisierung liefern.

Um die Variabilität der Zellen bezüglich ihrer Expressioneigenschaften zu verringern, wurden stabil transfizierte HEK-Zellen EYFP-β₂AR-CFP generiert.

Mit ihnen wurde der Versuch wiederholt. Auch mit den stabil transfizierten Zellen konnte kein besseres Ergebnis erzielt werden. Die einzelnen Zellen zeigten auch ohne Agonistenaktivierung durch Isoprenalin weiterhin fluoreszierende Strukturen im Zytosol.

Um welche Art von fluoreszierenden Strukturen es sich handelt, konnte nur vermutet werden. Es handelt sich vermutlich um schon in Lysosomen oder Endosomen internalisierte Rezeptormutanten, die abgebaut wurden oder um Rezeptoren, die nicht zur Zellmembran transportiert werden konnten.

Bei den durchgeführten Internalisierungsversuchen wurde beobachtet, dass die meisten fluoreszierenden zytosolischen Strukturen, nach Anregung der HEK-Zellen mit den für CFP

bzw. YFP charakteristischen Exzitationswellenlängen, nur eine für CFP charakteristische blaue Fluoreszenz zeigten. (vgl. Abb. 16b und 16d)

Nur wenige ließen sich mit der EYFP Exzitationsfrequenz anregen und fluoreszierten gelb. Es wurden weitere Versuche angeschlossen, um diese Beobachtung zu erklären.

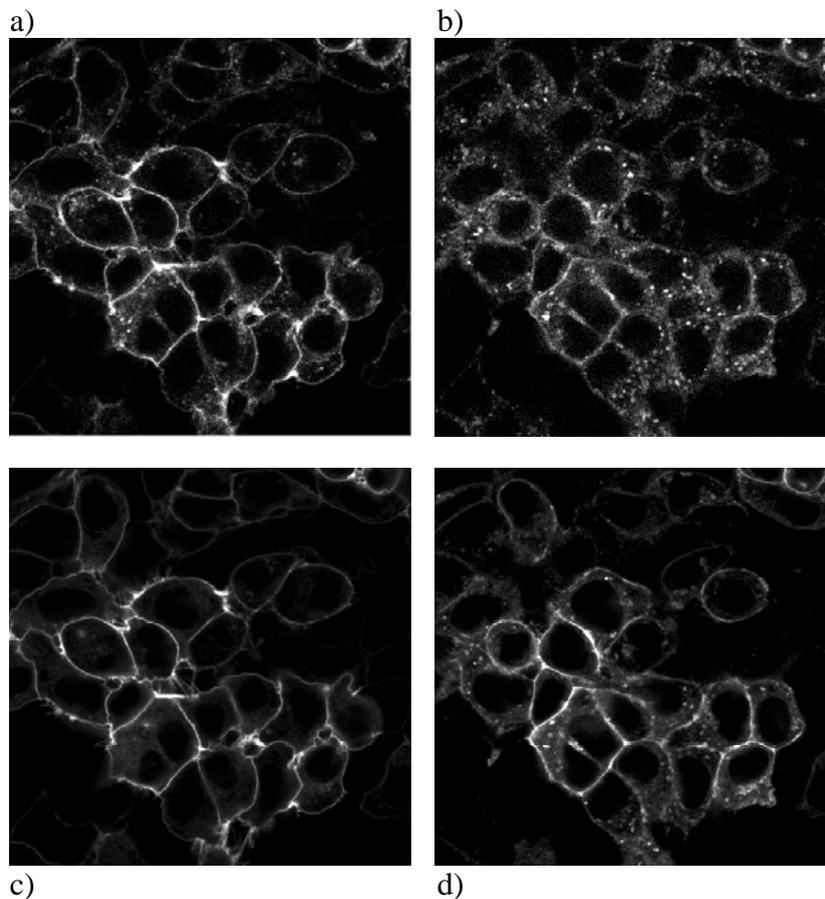


Abb.16: Die Bilder a) und c) geben den Zustand stabil transfizierter EYFP- β_2 AR-CFP Zellen vor Stimulierung mit Isoprenalin wieder. Die Zellen wurden dazu in a) mit der Wellenlänge des CFP beleuchtet, bzw. in c) mit der Wellenlänge für das YFP angeregt. Anschließend wurden die Zellen für eine Stunde mit 10 μ M Isoprenalin inkubiert (Bilder b) und d)). Beide Bilder zeigen eine Zunahme der fluoreszierenden Strukturen im Zytosol. Dabei zeigt sich, dass bei Anregung des CFP b) mehr Strukturen beobachtet werden können als bei Anregung des YFP d).

4.3. pH-Abhängigkeit der Rezeptormutanten

4.3.1. Untersuchung des pH-Verhaltens am Spektrometer

Die für diesen Versuch mit EYFP- β_2 AR-CFP transient transfizierten HEK-Zellen wurden auf Deckgläschen gesplittet und in mit unterschiedlichen Versuchspuffern gefüllte Küvetten eingebracht. Als Versuchspuffer wurden MBS Puffer pH 5,4 und HBS pH 7,4 (siehe 3.4.1.) eingesetzt.

Die Zellen wurden alle 100 ms mit einer Frequenz von 430 ± 5 nm angeregt und ein Emissionsspektrum aufgezeichnet. Die entstandenen Kurven variierten deutlich (siehe Abb.17). Selbst unter identischen Versuchsbedingungen konnten keine übereinstimmenden Emissionsspektren beobachtet werden. Zur Gewinnung reproduzierbarer Daten konnte diese Methode nicht verwendet werden.

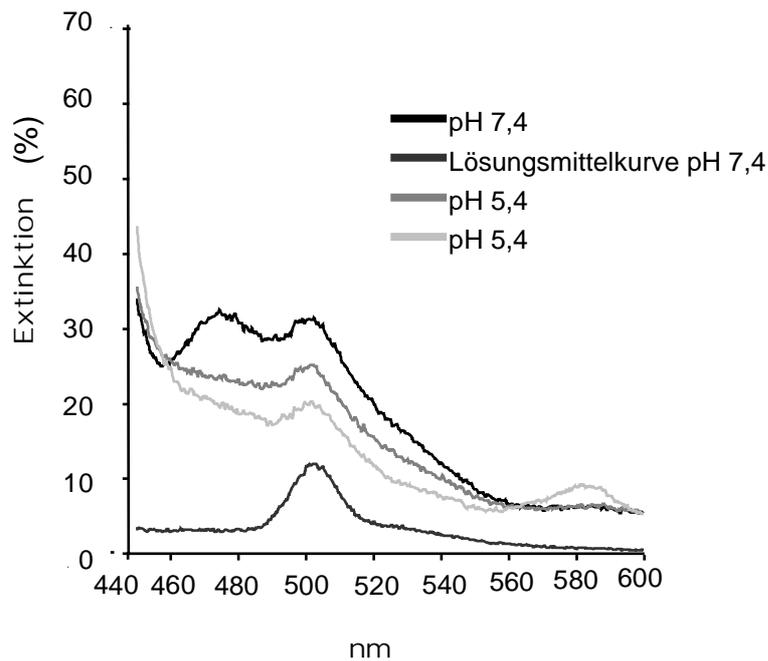


Abb.17: Im Spektrometer gemessene Emissionsspektren von EYFP- β_2 AR-CFP. Transient transfizierte HEK-Zellen wurden mit 430 ± 5 nm angeregt und die Emissionsspektren in unterschiedlichen Puffern aufgezeichnet.

4.3.2. Konfokalmikroskopie

Auf Deckgläschen gesplittete transient transfizierte HEK-Zellen EYFP- β_2 AR-CFP und EGFP- β_2 AR-CFP wurden mit den Versuchspuffern HBS (pH 7,0;7,4) und MBS (pH 5,4; 5,8; 6,2; 6,6; 7,0) inkubiert (siehe 3.4.1.).

Unter dem Mikroskop wurde eine Zelle ausgesucht. Es erfolgte eine Anregung mit den für die Fluorophore charakteristischen Exzitationsfrequenzen. Die daraus resultierende Fluoreszenzintensität wurde fotografisch dokumentiert.

Anschließend erfolgte ein Wechsel des Versuchspuffers. Dieselbe Zelle wurde erneut im Mikroskop gesucht, angeregt und fotografiert.

Auf diese Weise konnte die Veränderung der Fluoreszenzintensität der Fluorophore unter unterschiedlichen pH-Bedingungen untersucht werden.

Eine sinnvolle Auswertung der Daten aus den gewonnenen Messreihen gelang allerdings nicht, da die Zellen unter den Versuchsbedingungen ihre Gestalt veränderten. Dadurch wurde ein Vergleich der Fluoreszenzintensitäten von Aufnahme zu Aufnahme unmöglich.

Eine Beurteilung, im Hinblick auf eine sich in Abhängigkeit vom pH-Wert des Versuchspuffers ändernde Fluoreszenzintensität konnte nicht erfolgen.

4.3.3. Photometrie

Es wurden transient transfizierte EGFP- β_2 AR-CFP und stabil transfizierte EYFP- β_2 AR-CFP HEK-Zellen eingesetzt. Die Zellen wurden auf Deckgläschen gesplittet und in HBS pH 7,4 inkubiert. Mit Hilfe der Perfusionsanlage konnte eine im Mikroskop ausgewählte Zelle mit unterschiedlichen Versuchspuffern angespült werden. Als Versuchspuffer wurden MBS (pH 5,4; 5,8; 6,2; 6,6; 7,0), HBS (pH 7,0; 7,4) und Tris (pH 7,8; 8,2; 9,0) verwendet. Die

Dokumentation der Fluoreszenzintensitäten der Fluorophore erfolgte in einzelnen Kurven. Das Verhältnis der Intensitäten wurde separat in der Ratio-Kurve dargestellt.

Die CFP-Kurve wies während des Versuchs einen relativ konstanten Verlauf auf (siehe Abb.18/19).

Im Gegensatz dazu zeigte die YFP- bzw. GFP-Kurve in Abhängigkeit vom Versuchspuffer deutliche Änderungen (siehe Abb.18/19). Aus ihren wechselnden Fluoreszenzintensitäten resultierten die Änderungen der Ratio-Kurve.

Die deutlichen Veränderungen der Ratio-Kurve ließen eine Abhängigkeit von den wechselnden Versuchspuffern erkennen (siehe Abb.18/19). Bei einem Anstieg des pH zeigte die Kurve ein sprunghaftes Ansteigen. Die Abstände zwischen den Plateaus waren abhängig von der Stärke der pH-Änderung. Bei einem pH-Sprung von 0,8 pH war das Intervall zwischen den Plateaus deutlich größer als bei einer pH-Änderung um 0,4. Bei einem höheren pH als pH 7,8 wurden die Intervalle kleiner. Die Änderungen in der Ratio waren reversibel. Bei wiederholtem Einsatz der gleichen Puffer konnten gleiche Kurvenniveaus erreicht werden. Durch sinkende pH-Werte konnte die Ratiokurve stufenweise zum Anfangsniveau zurückgeführt werden. (siehe Abb.18/19)

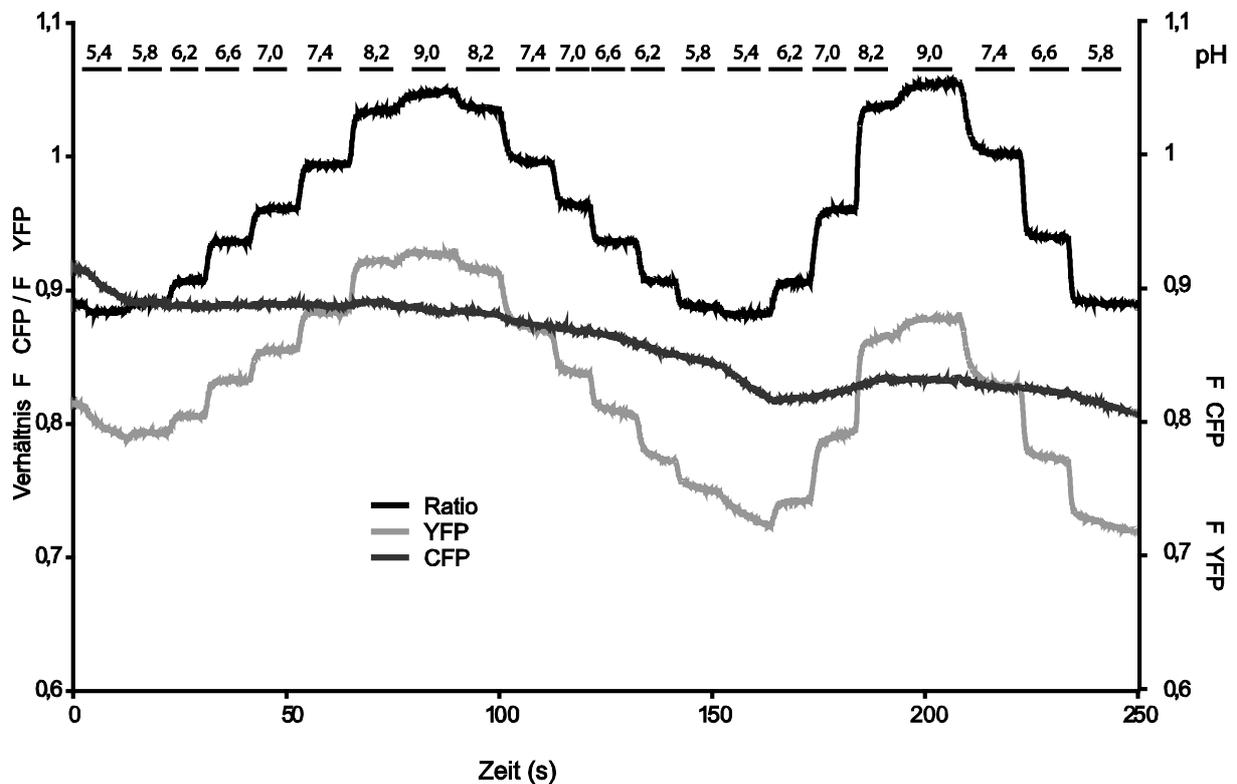


Abb.18: Es wurde eine transient transfizierte EYFP- β_2 AR-CFP HEK-Zelle mit unterschiedlichen Versuchspuffern angespült. Dabei wurde die Fluoreszenzintensität des CFP und des YFP, sowie das Fluoreszenzverhältnis von CFP/YFP (Ratio) aufgezeichnet. Die CFP-Kurve zeigt einen konstanten Verlauf. Die YFP-Kurve zeigt bei jedem Pufferwechsel eine deutliche Veränderung in der Fluoreszenzintensität. Das niedrigste Plateau in der Ratio-Kurve zeigt das Fluoreszenzverhältnis von CFP/YFP bei einem Puffer-pH von pH 5,4. Der entsprechende Puffer-pH wird für jedes Plateau oberhalb der Kurven angegeben. Es erfolgte eine Anregung der Zelle mit 436 nm alle 100ms.

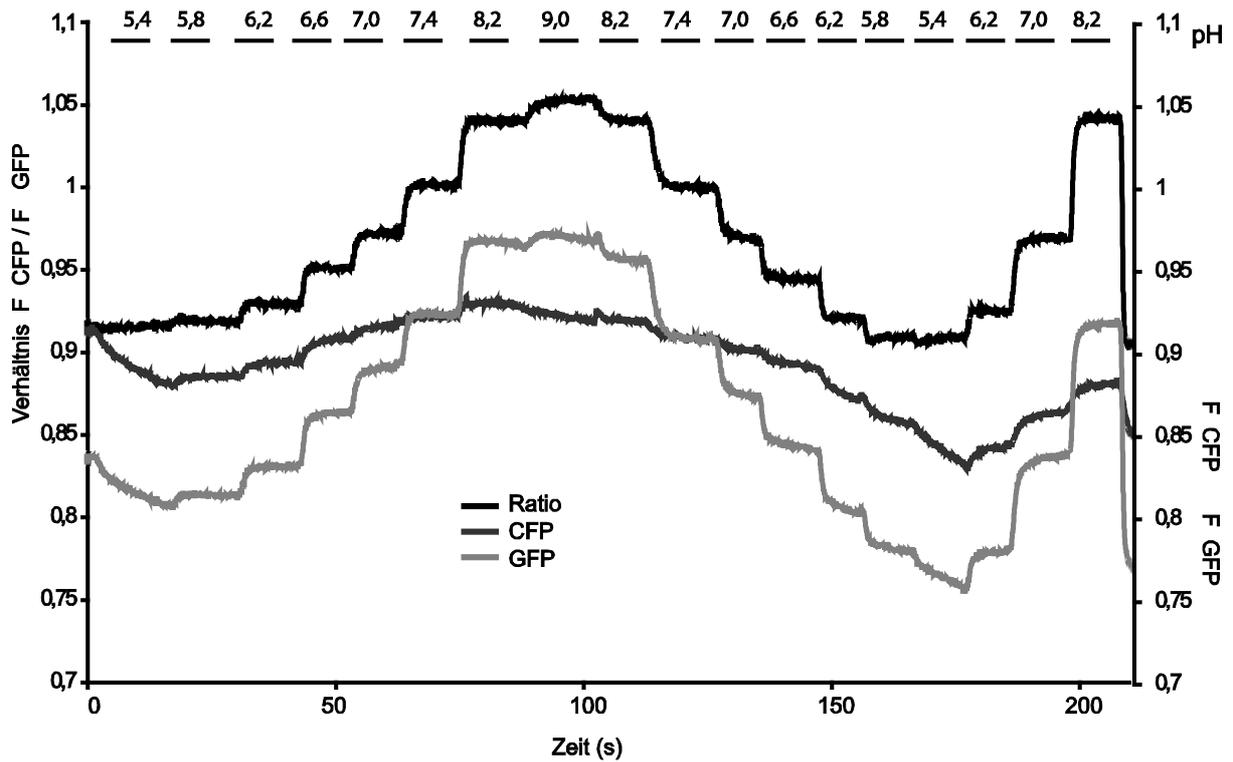


Abb.19: Es wurde eine transient transfizierte EGFP- β_2 AR-CFP HEK-Zelle mit verschiedenen Versuchspuffern angespült. Dabei wurde die Fluoreszenzintensität des CFP und des GFP sowie deren Fluoreszenzverhältnis CFP/GFP (Ratio) gemessen. Die CFP Kurve zeigt einen relativ konstanten Verlauf. Die GFP-Kurve lässt abhängig vom Puffer-pH eine Änderung der Fluoreszenzintensität erkennen. Die Ratio-Kurve steigt oder sinkt mit zu- oder abnehmenden Puffer-pH. Der entsprechende pH-Wert des eingesetzten Versuchspuffers ist oberhalb der Kurven für jedes Plateau angegeben. Die Zelle wurde mit 436 nm alle 100ms angeregt.

Die aufgetretenen pH-abhängigen Ratio-Änderungen waren so genau, dass die Konstrukte selbst zu quantitativen Messungen von pH-Veränderungen eingesetzt werden können (siehe Abb.20).

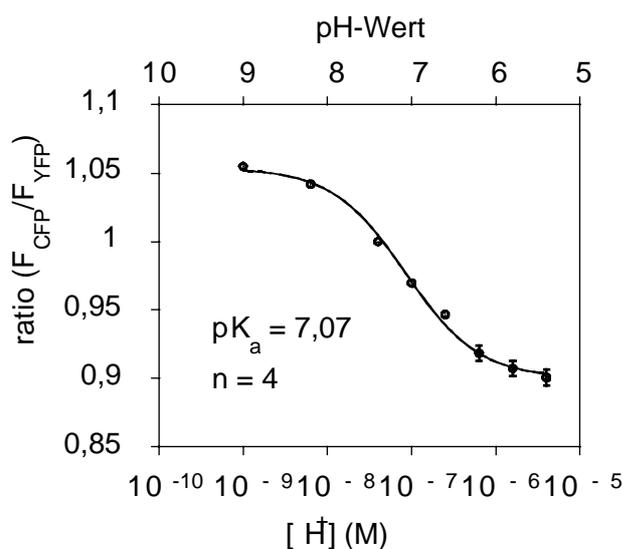


Abb.20: In dieser Kurve wurden die aufgezeichneten pH-abhängigen Ratioänderungen aus vier Versuchen gemittelt und mit der Standardabweichung gegen die pH-Werte aufgetragen. Es wurden stabil transfizierte EYFP- β_2 AR-CFP HEK-Zellen eingesetzt.

An diese Versuche anknüpfend wurde untersucht, ob die Rezeptormutanten nach Agonistenstimulierung internalisieren und dabei pH-Veränderungen in ihrer direkten Umgebung anzeigen. Dazu erfolgte die Inkubation der stabil transfizierte EYFP- β_2 AR-CFP HEK-Zellen in HBS pH 7,4. Um die Internalisierung der Rezeptoren zu induzieren, wurde eine im Mikroskop ausgewählte Zelle mit 10 μ M Isoprenalin angespült. Die erhoffte Ratio-Änderung konnte nicht beobachtet werden (siehe Abb.21). Es konnte nicht nachgewiesen werden, dass die Rezeptoren während ihrer Internalisierung pH-Veränderungen ausgesetzt sind.

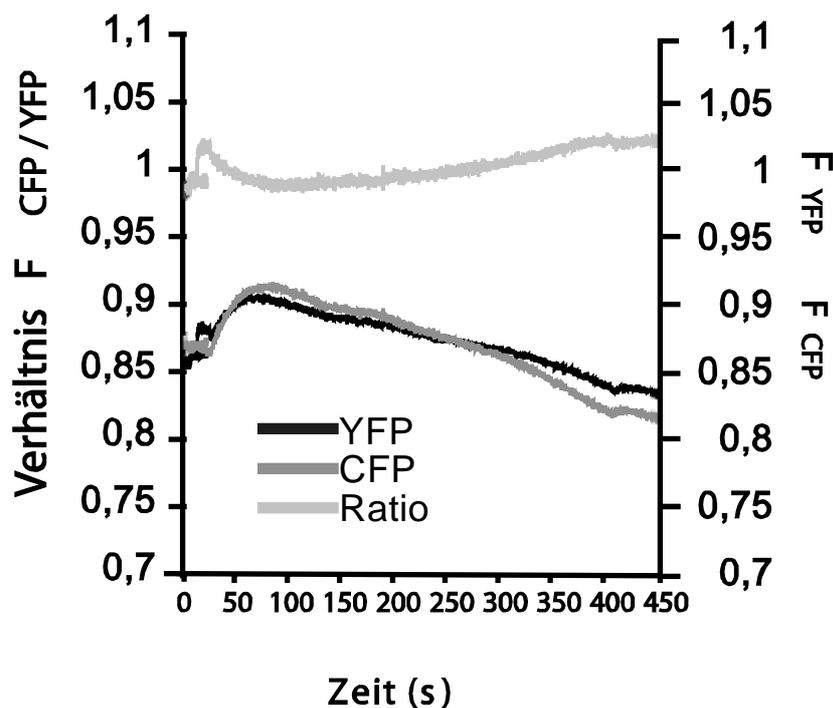


Abb.21: Es wurde eine transient transfizierte EYFP- β_2 AR-CFP HEK Zelle mit 10 μ M Isoprenalin stimuliert und die Fluoreszenzintensität des YFP bzw. CFP aufgezeichnet. Das Fluoreszenzverhältnis wurde durch die Ratio-Kurve wiedergegeben. Es konnte keine Änderung der Fluoreszenzintensitäten festgestellt werden.

4.4. Verhalten bei Neutralisierung der pH-Gradienten

4.4.1. Konfokalmikroskopie

Um die pH-abhängigen Veränderungen der Rezeptormutanten weiter zu charakterisieren, wurde ihr Verhalten nach Aufhebung der pH-Gradienten in den Zellen untersucht.

Hierzu wurde Ammoniumchlorid als pH-Modulator eingesetzt. Ammoniumchlorid diffundiert durch Zellmembranen und gelangt in alle Zellkompartimente. Dort bindet es als schwache Base Protonen und führt somit durch Alkalisierung der intrazellulären Kompartimente zur Aufhebung der sauren pH-Gradienten.

Der Versuch sollte darüber Aufschluss geben, weshalb die in 4.2.5.2. beobachteten zytosolischen Strukturen überwiegend eine CFP-Fluoreszenz zeigten, und ob diese Beobachtung auf einem pH-abhängigen Effekt beruht.

Dazu wurden stabil transfizierte HEK-Zellen EYFP- β_2 AR-CFP nach einstündiger Inkubation in 10 μ M Isoprenalin unter dem Mikroskop untersucht.

Die meisten fluoreszierenden im Zytosol befindlichen Strukturen zeigten bei Anregung die blaue Fluoreszenz des CFP, d.h. die für das CFP charakteristische Emissionsfrequenz. Nur wenige Punkte ließen sich mit der Exzitationsfrequenz des EYFP anregen. Anschließend wurde ein Pufferwechsel vorgenommen und HBS pH 7,4 mit 10 mM Ammoniumchlorid auf die Zellen gegeben. Direkt nach Zugabe des Ammoniumchlorids konnten vermehrt gelb fluoreszierende Strukturen beobachtet werden (siehe Abb.22). Eine Zunahme an blau fluoreszierenden Punkten wurde nicht beobachtet. Ihre Anzahl blieb fast konstant.

Der Versuch bestätigt die in der Literatur beschriebene Theorie (Mizuno et al. 2001), dass YFP als pH-sensitives GFP im sauren pH-Bereich keine Fluoreszenz zeigt. Erst mit Alkalisierung der intrazellulären pH-Gradienten konnte eine gelbe Färbung der zytosolischen Cluster durch die reaktivierte Fluoreszenz des YFP beobachtet werden. Die CFP-Fluoreszenz zeigte kaum Veränderung, da CFP wenig pH-sensitiv ist und im Zytosol keinen direkten pH-Änderungen ausgesetzt war.

Erschwerend für die Interpretation dieses Versuches war jedoch, wie auch bei anderen Versuchen am Konfokalmikroskop, dass die Zellen die Rezeptormutanten unterschiedlich stark exprimierten und schon zu Versuchsbeginn fluoreszierende Strukturen im Zytosol enthielten.

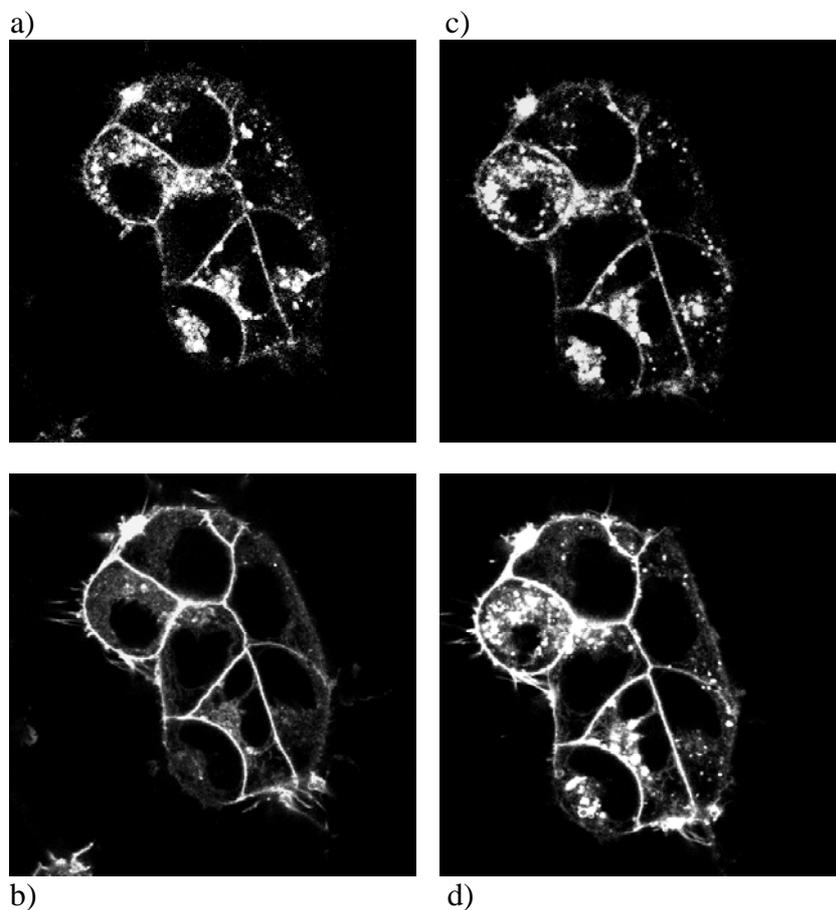


Abb.22: Die Bilder a) und b) zeigen stabil transfiziert EYFP- β_2 AR-CFP HEK-Zellen, die für eine Stunde mit 10 μ M Isoprenalin inkubiert wurden. Bei Anregung des CFP a) konnten deutlich mehr fluoreszierende Strukturen beobachtet werden, als bei b) unter Anregung mit der YFP-Exzitationsfrequenz.

Die Bilder c) und d) geben den Zustand der gleichen Zelle nach Zugabe von Ammoniumchlorid wieder. Während die bei c) unter CFP-Anregung beobachtete Menge an fluoreszierenden Strukturen gleich blieb, konnte bei d) unter YFP-Stimulierung, eine deutliche Zunahme von fluoreszierenden Strukturen beobachtet werden.

4.4.2. Photometrie

Um die in 4.4.1. gemachten Beobachtungen zu bestätigen, erfolgten Experimente mit Ammoniumchlorid unter dem Einsatz des Photometrie-Gerätes. Die auf Deckgläschen gesplitteten transfizierten HEK-Zellen EYFP- β_2 AR-CFP wurden in HBS pH 7,4 inkubiert. Um die Wirkung von Ammoniumchlorid auf die Fluoreszenzintensität unstimulierter Rezeptormutanten zu überprüfen, wurde eine im Mikroskop ausgewählte Zelle direkt mit 10 mM Ammoniumchlorid angespült. Die Ratio der Fluoreszenzintensitäten von CFP zu YFP blieb unverändert. YFP und CFP zeigten keine Veränderungen ihres Fluoreszenzverhältnisses (siehe Abb.23). NH_4Cl bewirkt keine unterschiedliche Fluoreszenzentwicklung an unstimulierten Zellen.

Der Versuch wurde nun mit Zellen wiederholt, die zuvor für 1,5 Stunden mit 10 μM Isoprenalin stimuliert worden waren. Direkt nach Zugabe konnte ein sprunghaftes Ansteigen der Ratio-Kurve beobachtet werden (siehe Abb.24). Auch die YFP-Kurve zeigte einen deutlichen Anstieg der Fluoreszenzintensität.

Anhand dieses Versuches und der Ergebnisse von 4.4.1. konnte abschließend gezeigt werden, dass die konstruierten Rezeptormutanten aus β_2 AR und GFP-Mutanten pH-sensitiv sind und EYFP als pH-sensitives GFP durch die Aufhebung eines sauren Umfeldes mit Zunahme der Fluoreszenzintensität reagiert. CFP ist weniger pH-sensitiv und daher als Bezugspunkt für die Messung von Fluoreszenzverhältnissen gut geeignet. Die pH-Eigenschaften beider Fluorophore wurden dadurch verstärkt, dass das N-terminale Fluorophor in die extrazytoplasmatischen Bereiche der Zellkompartimente eindringt und der C-Terminus im Zytosol verbleibt.

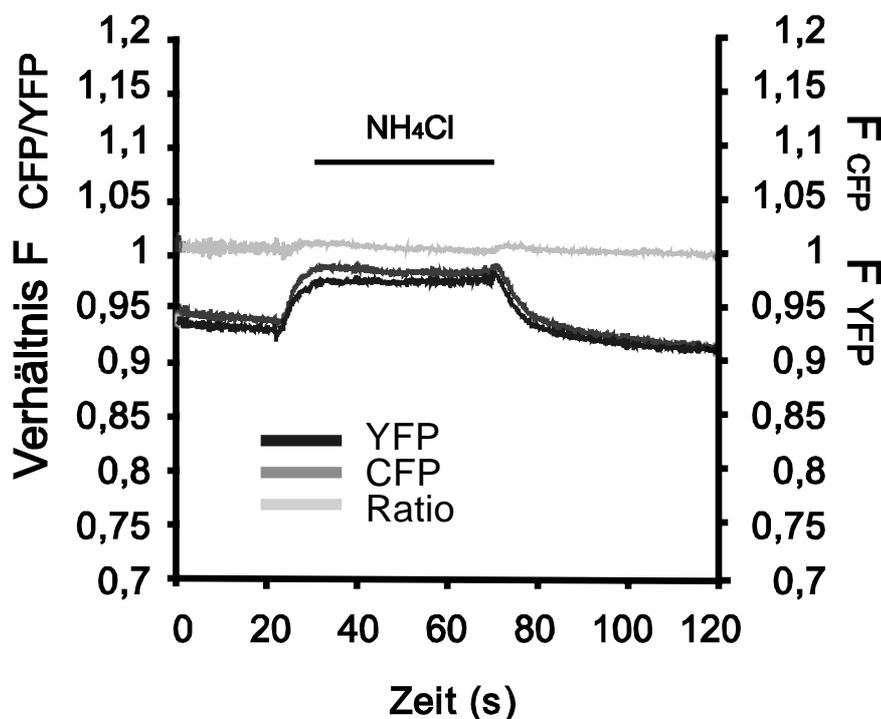


Abb.23: Es wurde eine stabil transfizierte EYFP- β_2 AR-CFP HEK-Zelle mit 10 mM Ammoniumchlorid angespült und die Fluoreszenz von CFP und YFP sowie ihr Fluoreszenzverhältnis beobachtet. Das Verhältnis der Fluoreszenzintensitäten von CFP zu YFP blieb unverändert (Ratio-Kurve).

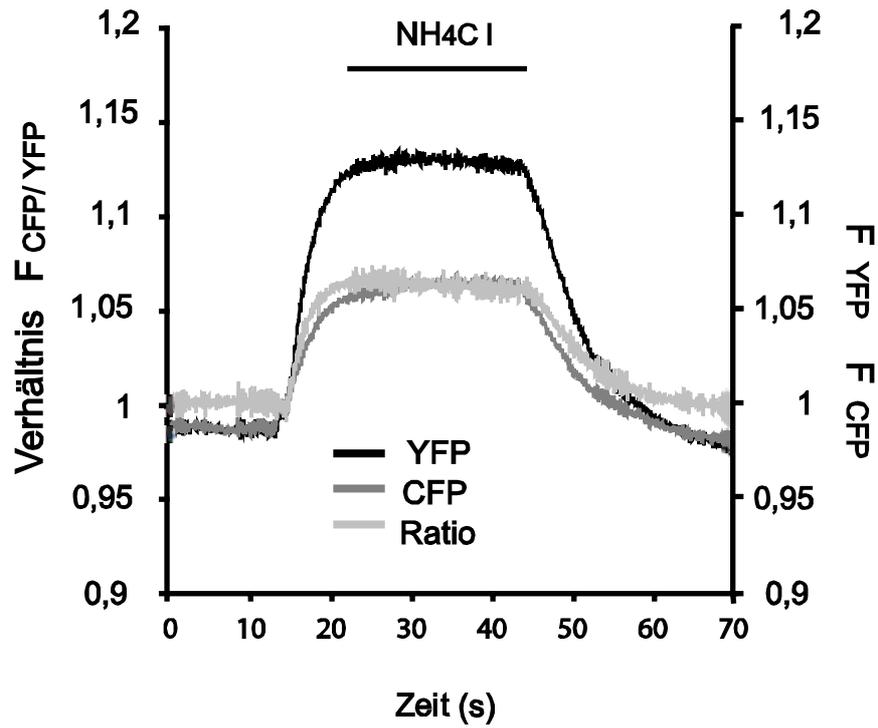


Abb.24: Eine stabil transfizierte EYFP- β_2 AR-CFP HEK-Zelle wurde für 90 Minuten mit 10 μ M Isoprenalin stimuliert und anschließend mit 10 mM Ammoniumchlorid angespült. Das Verhältnis der Fluoreszenzintensitäten von CFP zu YFP (Ratio) zeigte nach Zugabe einen deutlichen Anstieg. Die Veränderung in der Ratio beruht vor allem auf der deutlichen YFP-Fluoreszenzzunahme.

5. Diskussion

Das Ziel der Doktorarbeit war, pH-sensitive Rezeptoren durch Fusion von GFP-Mutanten mit dem β_2 AR zu konstruieren. Die Fusionsproteine aus β_2 AR und GFP sollten geeignet sein, den β_2 AR auf seinem Weg durch die Zelle im Vorgang der Desensibilisierung und Internalisierung bei unterschiedlichen pH-Werten zu verfolgen. Es wird in der Literatur diskutiert, dass diese pH-Veränderungen für Vorgänge wie die Dephosphorylierung des Rezeptors durch GRP (G-protein-coupled-receptor phosphatase) notwendig sind (Krueger et al. 1996).

5.1. Konstruktion der Fusionsproteine

Die Idee, unterschiedliche intrazelluläre pH-Werte mit fluoreszierenden pH-abhängigen Substraten nachzuweisen, ist nicht neu. Schon vor der Entdeckung der GFPs als Marker für die Klärung zellbiologischer Fragestellungen wurden Experimente mit fluoreszierenden pH-abhängigen Substraten, wie z.B. SNARF-1 (Seminaphthorhodafluor) oder PDMPO (2-(4-pyridyl)-5-((4-(2-dimethylaminoerythylaminocarbonyl)methoxyphenyl)oxazole) durchgeführt. SNARF-1 ist ein Fluorophor, dessen Fluoreszenz sich in Abhängigkeit von seinem Umgebungs-pH verändert (Emissionmaximum bei 590 nm (protonierte Form); Emissionsmaximum bei 635 nm (deprotonierte Form)) (Seksek und Bolard 1996). PDMPO ist ein Fluorophor, das in sauren Organellen (pH<5) wie Lysosomen akkumuliert und eine gelbe Fluoreszenz zeigt. Im weniger sauren Milieu (pH>6) fluoresziert es blau. pH-Veränderungen konnten somit durch die wechselnden Exzitations- und Emissionsmaxima gemessen werden (Diwu et al. 1999).

Durch die Entdeckung der GFPs, die unabhängig von organismusspezifischen Bedingungen sind, in einer Vielzahl von Organismen exprimiert werden und in unterschiedliche zelluläre Kompartimente eingebracht werden konnten, wurden diese Fluorophore verdrängt. Durch die Aufklärung des strukturellen Aufbaus von GFP und die damit verbundene Möglichkeit, bestimmte Eigenschaften von GFPs durch Mutationen zu verstärken, konnten viele pH-sensitive Mutanten entwickelt und durch Titrationsexperimente ihre genauen pH-Eigenschaften untersucht werden (Haupts et al. 1998; Kneen et al. 1998; Elsliger et al. 1999). So wurden pH-sensible Weiterentwicklungen des GFP-Grundmoleküles, wie die pHfluorine (Miesenböck et al. 1998) und deGFPs (Hanson et al. 2002), beschrieben und für die Messung intrazellulärer pH-Werte eingesetzt.

Man versuchte, für jeden pH-Bereich eine geeignete GFP-Mutante zu erstellen. So konnte z.B. eine GFP-Mutante mtAlpHi (mitochondrial alkaline pH-indicator) konstruiert werden, die sich im alkalischen Bereich als pH-sensitiv zeigte und mitochondriale pH-Werte wiedergab (Abad et al. 2004).

Durch Co-Transfektion unterschiedlicher pH-sensitiver GFP-Konstrukte, bzw. durch Vergleich mit anderen pH-sensitiven Fluorophoren wie BCECF (= 2',7'-Bis(2 carboxylethyl)-5(6)-carboxyfluorescein) wurden die einzelnen GFP-Mutanten charakterisiert (Robey et al. 1998; Abad et al. 2004).

Für die vorliegende Arbeit konnte daher auf eine Vielzahl gut beschriebener pH-sensibler GFP-Mutanten zurückgegriffen werden, um die Idee eines pH-sensiblen Fusionsproteins zu verwirklichen. Auch andere Arbeitsgruppen nutzten relativ schnell die pH-sensiblen Eigenschaften von GFP und versuchten durch Fusion mit geeigneten Transfersubstraten pH-

sensible Konstrukte zu erstellen und intrazelluläre pH-Unterschiede nachzuweisen. So gelang es die Untereinheit IV der Cytochromoxidase c für die Erfassung des mitochondrialen pH-Wertes und die Galaktosyltransferase für die Klärung der pH-Verhältnisse im Golgi-Apparat, mit pH-sensiblen GFPs zu koppeln (Llopis et al. 1998). Ihnen gelang neben dem Nachweis von pH-Unterschieden auch eine ratiometrische Messung dieser Unterschiede durch Einsatz von verschiedenen pH-sensiblen GFP-Mutanten (EYFP und ECFP).

Ebenso sollten die in dieser Arbeit erstellten Konstrukte im Idealfall nicht nur pH-Unterschiede anzeigen, sondern eine genaue quantitative Bestimmung der pH-Änderungen zulassen. Im Gegensatz zu anderen Versuchen, durch Mutationen von GFPs pH-sensitivere Mutanten zu konstruieren, wurden in dieser Arbeit „Standard“-GFPs an den β_2 AR kloniert (siehe 4.1.). Das Fluoreszenzverhältnis zweier schon untersuchter und charakterisierter Mutanten sollte hier als Parameter für die Messung von pH-Änderungen dienen. Die Auswahl der verwendeten GFP-Mutanten erfolgte anhand ihrer Eigenschaften bezüglich ihrer pH-Sensitivität, Exzitationsfrequenz und Emissionsmaxima.

Als pH-sensitive GFP-Mutanten wurden EYFP und EGFP an den N-Terminus des β_2 AR und ECFP oder mRFP1 als wenig pH-sensitive GFPs an den C-Terminus des β_2 AR kloniert. Neben der pH-Sensitivität erfolgte die Wahl der beiden Fluorophore so, dass sich das Emissionsspektrum des einen Fluorophors mit dem Exzitationsmaximum des anderen Fluorophors überschneidet, um eine FRET-Interaktion zwischen beiden GFPs zu erzielen und den ratiometrischen Effekt zu verstärken. Außerdem konnten beide Konstrukte mit einer Wellenlänge angeregt werden, was ebenfalls günstig für die ratiometrische Messung war und den Einsatz eines Photometriesystemes vereinfachte.

Das Verhältnis der Fluoreszenzintensitäten der beiden Fluorophore zueinander sollte dann Auskunft über die pH-Veränderungen in der Umgebung des Rezeptors geben, verstärkt durch die Beobachtung, dass während der Internalisierung der Rezeptormutanten der N-Terminus in Kontakt mit dem kompartimentären pH-Milieu kommt und der C-Terminus im Zytosol verbleibt.

Ein ähnlicher Ansatz wurde von der Arbeitsgruppe Awaji (Awaji et al. 2001) gewählt. Sie konstruierten neue pH-Indikatoren, indem sie Tandemkonstrukte aus pH-sensitiven GFPs (EGFP und EYFP) und pH-insensitivem GFP (GFPuv) erstellen. Beide Tandemkonstrukte zeigten bei Anregung mit der für die einzelnen GFP-Mutanten charakteristischen Exzitationsfrequenz eine pH-abhängige Änderung in der Fluoreszenzintensität. Dabei verändert sich die Fluoreszenzintensität des GFPuv wie erwartet deutlich weniger, als bei den pH-sensiblen GFP-Mutanten. Zusätzlich konnte bei dem EYFP-GFPuv Tandemkonstrukt eine FRET-Interaktion zwischen GFPuv und EYFP beobachtet werden.

Beide Konstrukte ließen auch in den Zellen die zuvor charakterisierten pH-Eigenschaften durch Änderung ihrer Fluoreszenzintensität erkennen und ermöglichten eine ratiometrische Messung von pH-Unterschieden.

Weiter gelang es durch Fusion der GFP-Tandemkonstrukte an den C-Terminus des α_{1B} AR, ein Fusionsprotein zu erstellen, das nach Agonistenstimulation mit Norepinephrin internalisierte und pH-Veränderungen durch ein verändertes Fluoreszenzverhalten anzeigte. Erstaunlicherweise entwickelte das Konstrukt diese pH-Sensitivität, obwohl sich beide GFPs, im Zytosol befanden (Awaji et al. 2001).

5.2. Charakterisierung der Rezeptormutanten

Wichtig für die Durchführbarkeit der Strategie, einen β_2 AR mit zwei GFPs zu konstruieren, war die Frage, ob die Fusionsproteine exprimiert werden und die Rezeptorfunktion erhalten bleibt. Wie frühere Experimente zeigten, eignen sich β_2 AR-GFP Konstrukte, um das Verhalten des β_2 AR im Vorgang der Internalisierung zu visualisieren (Barak et al. 1997). Es schien daher möglich, β_2 AR-GFP Fusionsproteine zu erstellen, ohne die Rezeptorfunktion des β_2 AR zu beeinträchtigen. Im Gegensatz dazu scheiterten Experimente mit pH-sensiblen GFP-Mutanten, den pHluorinen (Miesenböck et al. 1998), die schon zur Messung der pH-Werte in Peroxisomen (Jankowski et al. 2001) und synaptischen Vesikeln (Sankaranarayanan et al. 2000) eingesetzt worden waren. Die β_2 AR-pHluorin Konstrukte wurden bei Versuchen mit transient transfizierten HEK-Zellen nicht in die Plasmamembran transportiert, sondern aggregierten in intrazellulären Vesikeln (Ulrike Zabel, persönliche Mitteilung).

Da sich bei den in dieser Arbeit konstruierten β_2 AR-Rezeptormutanten zwei GFPs am β_2 AR befanden, bestand nun besonders die Gefahr, dass die Größe des Fusionsproteins zu einer Interaktion der Moleküle untereinander und somit zu einer Behinderung der Rezeptorfunktion führen könnte. Dadurch würden die gebildeten Fusionsproteine im Golgi-System verbleiben und nicht in die Plasmamembran transportiert werden.

Die Fluoreszenzeigenschaften der Rezeptoren erleichterten die Überprüfung dieser Frage. So konnte auf einfachste Weise im Frühstadium der Arbeit durch Konfokalmikroskopie festgestellt werden, dass die konstruierte DNA von HEK-Zellen exprimiert und die Rezeptoren korrekt in die Plasmamembran transportiert wurden (siehe 4.2.1.). Die Rezeptorfunktionalität des β_2 AR schien bezüglich dieser Eigenschaft durch das Vorhandensein der beiden Fluorophore nicht beeinträchtigt worden zu sein. Die Expression beider GFPs konnte durch Anregung mit den charakteristischen Exzitationsfrequenzen überprüft werden. Dabei zeigte sich anhand der Fluoreszenzfarbe, dass in allen Konstrukten beide Fluorophore exprimiert wurden und diese eine korrekte Faltung zeigen. Die korrekte Faltung des Chromophors ist dabei ausschlaggebend für die Fluoreszenzeigenschaften der GFP-Mutanten. In Experimenten mit GFP-Fusionsproteinen kommt es bei fehlerhaft exprimierten und falsch gefalteten Fluorophoren im schlimmsten Fall zur Ausbildung nicht fluoreszierender Konstrukte. Solche Probleme traten bei Experimenten mit deGFP- β_2 AR Fusionsproteinen auf (Hanson et al. 2002; McAnaney et al. 2002). Diese pH-sensitiven GFP-Mutanten zeigten intrazellulär keine Fluoreszenz und konnten damit nicht zur Aufklärung von pH-Unterschieden während des Internalisierungsvorgangs des β_2 AR eingesetzt werden (Ulrike Zabel, persönliche Mitteilung). Die für diese Arbeit konstruierten Rezeptormutanten hatten diese Probleme nicht.

Durch die Aufzeichnung der Emissionsmaxima der einzelnen Konstrukte wurden die geeigneten Rezeptormutanten ausgewählt. Dabei ergab sich, dass mRFP1 in seinem Konstrukt mit den zur Verfügung stehenden Filtern nicht ausreichend stimuliert werden konnte, um für YFP als Bezugspunkt zur Bestimmung ihrer Fluoreszenzverhältnisse genutzt zu werden (siehe 4.2.1.). Dieses Problem beruhte vermutlich darauf, dass mRFP1 ein schwaches Fluorophor ist, das nur die 25 %ige Fluoreszenzintensität seines DsRed Mutterkonstruktes aufweist und dadurch nur eine geringe Fluoreszenz entwickelt, wenn es nicht direkt mit 584 nm stimuliert wird. Diese Rezeptormutante wurde daher verworfen und nicht weiter charakterisiert. Die Mutanten mit N-terminalem ECFP bzw. EGFP und C-terminalen CFP ließen sich dagegen ausreichend stimulieren und wurden daher auf ihre Rezeptorfunktion weiterhin überprüft.

Bindungsexperimente ergaben, dass die Affinität der Rezeptormutanten für den Radioliganden (^{125}J -Cyanopindolol) und den Agonisten (Isoprenalin) im Vergleich zum Wildtyprezeptor unverändert blieb. Die eingesetzten GFP-Moleküle interagierten somit nicht mit den Bindungsstellen des Rezeptors, die für die Bindung eines Agonisten verantwortlich sind und ermöglichten dadurch eine ausreichende Stimulierung des Rezeptors. (siehe 4.2.3.)

Der Adenylatcyclaseassay zeigt, dass die konstruierten Rezeptormutanten weiterhin in der Lage, sind nach Agonistenstimulierung die cAMP-Bildung zu aktivieren. Die Bildung des cAMP erfolgt hierbei proportional zur eingesetzten Isoprenalinkonzentration (siehe 4.2.4. Abb. 14). Eine deutlich stärkere cAMP-Bildung der EYFP- β_2 AR-CFP HEK-Zellen im Vergleich zu den eingesetzten Wildtypzellen konnte allerdings nicht beobachtet werden. Dies hätte man erwartet, da in den eingesetzten EYFP- β_2 AR-CFP HEK-Zellen 50 mal mehr Rezeptoren nachgewiesen wurden als in den Wildtyp HEK-Zellen (siehe Tabelle 6).

Die Ursache für dieses Verhalten könnte darin begründet sein, dass die β_2 AR-Rezeptormutante eine geringere Affinität zu G_s besitzt als der Wildtyprezeptor. Die EYFP- β_2 AR-CFP Rezeptoren würden dadurch weniger an G_s koppeln und damit die externen Reize vermindert in intrazelluläre Signale umwandeln. Dadurch würde die messbare cAMP-Konzentration im beobachteten Verhältnis verbleiben.

Außerdem könnten die im Versuch eingesetzten Cyclasemengen variieren, da das Verhältnis der Rezeptormenge pro Zelle und der darin enthaltene Adenylatcyclasekonzentration ungleich ist. Es würde daher weniger cAMP gebildet, da den Rezeptormutanten im Vergleich zum Wildtyp weniger Cyclase zur Aktivierung zugeordnet wäre.

Eine weitere Erklärungsmöglichkeit ist die, dass nicht alle EYFP- β_2 AR-CFP Rezeptoren an die Zellmembran gelangen, sondern einige Rezeptoren von Anfang an im Zellinneren verbleiben und somit G_s nicht aktivieren. Dies würde sich mit der Beobachtung decken, dass im Konfokalmikroskop auch ohne Agonistenstimulierung mit Isoprenalin akkumulierte Rezeptoren im Zellinneren nachgewiesen werden konnten (siehe 4.2.5.2)

Ungeklärt bleibt allerdings, weshalb die konstruierte Rezeptormutante EYFP- β_2 AR-CFP in transient transfizierten HEK-Zellen 50mal stärker gebildet wird als der eingesetzte Wildtyprezeptor (siehe Tabelle 6).

Die Internalisierungseigenschaften des Rezeptors wurden durch Ligandenbindungsexperimente mit dem hydrophilen Liganden [^3H]CGP 12177 (Staehein und Simons 1982) überprüft. [^3H]CGP 12177 kann Membranen nicht durchdringen, so dass man damit die Menge von Rezeptoren auf der Zelloberfläche quantifizieren kann. Die Messungen wurden in stabilen HEK293-Zelllinien durchgeführt. Die Ergebnisse der Internalisierungsexperimente zeigten, dass die erstellten Konstrukte immer noch ähnliche Internalisierungseigenschaften wie der Wildtyprezeptor besitzen. (siehe 4.2.5.1. Abb.15)

Die Internalisierungseigenschaften der Rezeptormutanten wurden zusätzlich durch Aufnahmen von transfizierten Zellen im Konfokalmikroskop überprüft (siehe 4.2.5.2). Nach Stimulierung mit 10 μM Isoprenalin für 60 Minuten konnte eine Zunahme an fluoreszierenden Strukturen im Zytosol beobachtet werden. Anhand der Clusterbildung und der runden, punktförmigen Struktur wurde vermutet, dass die Rezeptoren internalisiert und in endosomale oder lysosomale Kompartimente gelangt waren. Eine ähnliche Clusterbildung beobachtete die Arbeitsgruppe Kobilka (von Zastrow und Kobilka 1992). Mit Hilfe von Immunfluoreszenz und Co-Lokalisation mit Transferrin Rezeptoren konnten sie in ihren Internalisierungsversuchen mit β_2 AR nachweisen, dass es sich bei diesen nach

Agonistenstimulierung mit Isoproterenol beobachteten, punktförmigen, zytosolischen Strukturen eindeutig um endosomale Kompartimente handelt.

Allerdings wurden bei den für diese Arbeit durchgeführten Internalisierungsversuchen auch schon vor der Agonistengabe fluoreszierende Vesikel in den Zellen beobachtet. Das Ausmaß der Rezeptorinternalisierung in den mikroskopischen Experimenten könnte durch Auszählung der fluoreszierenden Punkte vor und nach Agonistenstimulation bestimmt werden.

Die Identität der vor Stimulierung mit Isoprenalin schon vorhandenen fluoreszierenden Strukturen konnte im Rahmen dieser Arbeit nicht geklärt werden. Anhand der Form wurde ausgeschlossen, dass es sich um Rezeptoren in Mikrovilli, dem endoplasmatischen Retikulum oder dem Golgi-Apparat handelt. Für eine genauere Identifizierung dieser Vesikel müssen Co-Lokalisationsexperimente mit Markern für verschiedene intrazelluläre Kompartimente durchgeführt werden. Als Beispiel dafür lokalisierte die Arbeitsgruppe Benovic (Kallal et al. 1998) Lysosomen mit durch Rhodamin markierten Dextranen und Endosomen mit Rhodamin-Transferrin Konstrukten. Sie konnten dadurch die Internalisierungseigenschaften von GFP- β_2 AR Konstrukten erforschen und durch Co-Lokalisation nachweisen, dass das Fusionsprotein sowohl in Endosomen als auch Lysosomen degradiert wurde.

Es gelang weiter internalisierte β_2 AR in Lysosomen durch Co-Lokalisation mit BSA-Texas Red nachzuweisen (Moore et al. 1999).

Durch Einsatz solcher fluoreszierender Marker könnten einzelne Organellen angefärbt und somit überprüft werden, in welchen Organellen die bereits vor Stimulierung der Zellen zu beobachtenden fluoreszierende Fusionsproteine, bzw. deren Spaltprodukte, vorliegen.

Um Abbau oder Spaltungsvorgänge an den Fusionsproteinen auszuschließen, wurden Zelllysate auf einem 10 %igen SDS-Gel aufgetrennt und ein Western-blot mit GFP-Antikörper durchgeführt (siehe 4.2.2.). Dabei wurde bei den stabil transfizierten und transient transfizierten EYFP- β_2 AR-CFP HEK-Zelllysaten eine Doppelbande bei 75 kDa und 100 kDa beobachtet. Diese kann unterschiedliche Entstehungsursachen haben.

Bei Abspaltung eines GFPs vom Fusionsprotein könnte man im Blot das GFP- β_2 AR (~75kDa) zusammen mit dem Ursprungskonstrukt (~100kDa) als Doppelbande nachweisen. Da die 100 kDa-Bande allerdings eine wesentlich höhere Dichte aufweist, als die 75 kDa Bande, wurde gefolgert, dass wenn überhaupt nur ein geringer Anteil des Ausgangskonstruktes gespalten wurde. Dieser geringe Anteil würde die Funktionalität der verwendeten Rezeptormutanten und somit ihren Einsatz in weiteren Versuchen nicht einschränken. Gegen diese Theorie spricht auch die Beobachtung, dass die 75 kDa-Bande eine andere Größe zeigt als das β_2 AR-GFP, das zum Vergleich aufgetragen worden war und eine 73 kDa-Bande bildete.

Doppelbanden können außerdem auch auf andere Weise erklärt werden. Bei der elektrophoretischen Auftrennung von G-Protein-gekoppelten Rezeptoren kommt es häufig zur Ausbildung von Doppelbanden, da Rezeptoren unterschiedliche Glykosilierungszustände besitzen können. Eine ähnliche Doppelbandenbildung beschrieb die Arbeitsgruppe Caron (Barak et al. 1997). Sie verglichen ein β_2 AR-GFP Konstrukte mit C-terminalem GFP mit einem β_2 AR Wildtyprezeptor. Dabei beobachteten sie, dass die β_2 AR auf dem SDS-Gel zwei Banden bildeten. Diese Doppelbanden wurden auf eine glykosylierte, bzw. eine unglykosylierte Form des Rezeptors zurückgeführt. Die Rezeptormutanten zeigten nur eine Bande, als Ausdruck für die glykosylierte Form des Rezeptors. Eine Bande als Hinweis auf eine unglykosylierte Form der Rezeptormutanten fehlte. Durch Vergleich der Banden wurde deutlich, dass die β_2 AR-GFP Mutanten deutlich mehr glykosylierte Rezeptoren aufwiesen als

die β_2 AR-Wildtyprezeptoren. Anhand ihrer sonstigen Ergebnisse schlossen sie, dass die Rezeptorfunktion durch die Glykosylierungsvorgänge nicht beeinflusst wurde. Gegen die Theorie, dass die Doppelbanden in unserem Versuch durch Rezeptoren in unterschiedlichen Glykosylierungszuständen zustande kommen, spricht die Beobachtung, dass der eingesetzte Wildtyprezeptor keine Doppelbandenbildung zeigt. Normalerweise hätte man erwartet, dass auch der Wildtyprezeptor in glykosyliertem und unglykosyliertem Zustand auftritt. Allgemein ließ sich allerdings zeigen, dass ein Großteil der Rezeptormutanten in unveränderter Form in den Zellen gebildet wurden und diese daher in weiteren Versuchen eingesetzt werden können.

5.3. pH-Abhängigkeit der Rezeptormutanten

Nachdem gezeigt wurde, dass die Rezeptorfunktionalität des β_2 AR-Fusionsproteins erhalten blieb, wurde die pH-Abhängigkeit der konstruierten Rezeptormutanten überprüft. Da pH-sensitive GFP-Mutanten, wie unterschiedlichste Arbeitsgruppen nachgewiesen, auch unter in vivo Bedingungen ihre pH-abhängigen Eigenschaften behielten, hofften wir, dass die konstruierten Fusionsproteine ebenfalls die für die GFP-Mutanten charakteristischen pH-sensitiven Eigenschaften entwickeln würden (Kneen et al. 1998; Hanson et al. 2002).

Die konstruierten β_2 AR-Mutanten wurden dabei durch Photometrie unter Ausnutzung von FRET auf ihre pH-Sensoreigenschaften untersucht (siehe 4.3.3.). Durch Anspülung von transfizierten HEK-Zellen mit den Versuchspuffern konnte festgestellt werden, dass die Konstrukte pH-Veränderungen schnell und reversibel anzeigen (siehe 4.3.3. Abb.18/19). Für den photometrischen Einsatz entwickelten alle Fluorophore eine ausreichende Fluoreszenzintensität und zeigten eine geringe Photobleichung. Wie schon Tsien (Llopis et al. 1998) in seinen Experimenten mit co-transfizierten ECFP, EGFP und EYFP-Konstrukten beobachtete, entwickelten die extrazellulär lokalisierten Fluorophore EGFP und EYFP auch in unseren Versuchen pH-sensitive Eigenschaften und reagierten deutlich und reversibel auf wechselnde pH-Werte mit sich verändernden Fluoreszenzintensitäten. Da das intrazelluläre ECFP ein wenig pH-sensitives GFP ist, zeigte es, wie erwartet, auf die wechselnden pH-Werte kaum Veränderungen in seiner Fluoreszenzintensität. Es konnte daher als Bezugspunkt für die Messung der Fluoreszenzverhältnisse eingesetzt werden, wodurch die Ratio der beiden Fluorophore im Fusionsprotein bestimmt wurde. Das pH-insensitive Verhalten des ECFP wurde dabei sicherlich durch seine intrazelluläre Lokalisation noch begünstigt und verstärkt. Das ECFP verhielt sich daher so wie theoretisch vorhergesagt.

Es wurde weiter beobachtet, dass die Ratio, als Verhältnis der Fluoreszenzintensitäten von ECFP/EYFP, pH-Änderungen schnell und reversibel wiedergibt. Dabei konnte gezeigt werden, dass bei gleichen pH-Werten gleiche Ratio-Änderungen auftreten. Durch Auswertung der Ergebnisse wurde deutlich, dass die Ratio quantitative Auskunft über die eingetretenen pH-Veränderungen geben konnte. Die konstruierten Fusionsproteine sind somit nicht nur in der Lage, pH-Veränderungen anzuzeigen, sondern geben auch Auskunft über die Stärke der pH-Änderungen und lassen somit eine Messung des Umgebungs-pH-Wertes zu (siehe 4.3.3. Abb.20).

Die Konstrukte reagierten auf eine große Bandbreite von pH-Bereichen. In einem Intervall von 5,4-9,0 in 0,4 pH-Abständen zeigten sie mit wechselndem pH-Werten deutliche Ratio-Änderungen. Die Eigenschaft der Mutanten, in einem so großen pH-Bereich als gute pH-Sensoren zu reagieren, eröffnet die Möglichkeit, die Konstrukte auch für andere pH-abhängige Fragestellungen zu nutzen.

Es konnte allgemein bewiesen werden, dass die ausgewählten GFPs ihre in der Literatur beschriebenen pH-Eigenschaften auch als Bestandteil eines Fusionsproteins mit β_2 AR und einem anderem GFP behalten und für quantitativ ratiometrische pH-Messungen geeignet sind.

Leider gelang es nicht, die pH-Veränderungen in der Umgebung der β_2 AR-Konstrukte während ihrer agonistenstimulierten Internalisierung zu beobachten (siehe 4.3.3. Abb.21). Die eingesetzte photometrische Methode ermöglichte es nicht, die Fluoreszenz der transfizierten HEK-Zellen über einen ausreichend langen Zeitpunkt zu beobachten. Die über einen längeren Zeitraum auftretenden Fluoreszenzänderungen könnten auch zu gering sein, um sie mit dieser Methode darzustellen, da man bisher nicht sagen kann, wie schnell der Rezeptor während der Internalisierung in die sauren zellulären Kompartimente eindringt und somit eine Veränderung seines Umgebungs-pH erfährt. Zusätzlich verzerrt der Vorgang der Photobleichung der Fluorophore die Wahrnehmung kleinerer Änderungen, die über einen längeren Zeitraum auftreten würden.

Dass sich der Umgebungs-pH-Wert der Rezeptormutanten verändert und die Fusionsproteine im Vorgang der Internalisierung niedrigeren pH-Werten ausgesetzt werden, konnte allerdings auf indirektem Wege gezeigt werden.

Durch konfokalmikroskopische Aufnahmen von mit 10 μ M Isoprenalin stimulierten Zellen und der darin beobachteten Clusterbildung von fluoreszierenden Rezeptoren wurde vermutet, dass die Rezeptoren im Vorgang der Internalisierung in Endosomen oder Lysosomen transportiert und daher auch niedrigeren pH-Werten ausgesetzt werden (s.o.). Das pH-Veränderungen in der Umgebung der Fluorophore während des Internalisierungsvorgangs stattfinden und die Konstrukte dabei in Kompartimente mit niedrigem pH-Wert eindringen, ließ sich indirekt durch photometrische und konfokalmikroskopische Versuche mit NH_4Cl nachweisen (siehe 4.4.1 Abb.22). Nachdem es nicht gelang, die pH-Veränderungen während des Internalisierungsvorganges selbst zu dokumentieren, wurde mit Hilfe von NH_4Cl untersucht, welche Wirkung die Alkalisierung der zytosolischen Kompartimente auf die nach Agonistenstimulierung internalisierten Rezeptoren hat.

Bei den photometrischen Experimenten verursachte NH_4Cl an unstimulierten Zellen keine Änderung der Ratio (siehe 4.4.2. Abb.23). Die mit 10 μ M Isoprenalin stimulierten Zellen hingegen, zeigten nach Zugabe von NH_4Cl ein Ansteigen der Ratio (siehe 4.4.2. Abb.24). Diese Änderung wurde dabei hauptsächlich durch die starke Zunahme der YFP-Fluoreszenzintensität hervorgerufen.

Durch Aufnahmen am Konfokalmikroskop konnte gezeigt werden, dass in Clustern zusammengelagerte internalisierte Rezeptormutanten in mit Isoprenalin stimulierten Zellen durch Zugabe von NH_4Cl bei Anregung neben der cyanen auch eine gelbe Fluoreszenz entwickelten (siehe 4.4.1. Abb.22).

Beide Versuche zeigen, dass die internalisierten Rezeptoren vor Zugabe von NH_4Cl einem niedrigen Umgebungs-pH-Wert ausgesetzt waren. Als direkter Nachweis kann dabei die beobachtete YFP-Fluoreszenz gesehen werden. Das Fluorophor verhielt sich wie in der Literatur beschrieben. Aufgrund seiner pH-Abhängigkeit erlosch die YFP-Fluoreszenz im sauren Umgebungsmilieu und wurde erst durch Alkalisierung des Umgebungsmilieus mit NH_4Cl wieder reaktiviert. Deshalb entwickelten die internalisierten Fusionsproteine bei Anregung unter dem Konfokalmikroskop erst nach Zugabe von 10 mM Ammoniumchlorid die gelbe für das YFP charakteristische Fluoreszenz. Auch die photometrisch beobachtete Ratio-Änderung wurde erst durch Alkalisierung des Umgebungsmilieus mit NH_4Cl durch die

Zunahme der YFP-Fluoreszenzintensität hervorgerufen. Die CFP-Fluoreszenz blieb bei beiden Versuchen, wie erwartet, unabhängig von dem umgebenden pH-Milieu. Als pH-insensitives Fluorophor besaß es unbeeinflusst von pH-Änderungen eine relativ gleichbleibende Fluoreszenzintensität (siehe 4.4.1. Abb. 22a)c).

Mit dieser Arbeit wurde nachgewiesen, dass Fusionsproteine aus β_2 AR und zwei GFP-Mutanten funktionsfähig sind und dabei die Rezeptoreigenschaften des β_2 AR unberührt bleiben. Die eingesetzten GFPs zeigten die in der Literatur beschriebenen Eigenschaften. Durch ihren Einsatz konnten Rezeptormutanten konstruiert werden, die in der Lage sind, auf pH-Veränderungen reversibel und schnell zu reagieren. Unter Ausnutzung von FRET ist dabei eine relativ gute quantitative ratiometrische Erfassung der pH-Veränderung möglich. Es wurde bestätigt, dass die β_2 AR-Mutanten durch Internalisierungsvorgänge in Kompartimente mit niedrigerem pH-Wert gelangen und diese durch Änderung der Fluoreszenzintensität anzeigen können.

Leider gelang es nicht, die Konstrukte auf ihrem intrazellulären Weg direkt mikroskopisch zu beobachten und dabei die auftretenden pH-Veränderungen zu dokumentieren.

5.4. Ausblicke

In Zukunft sollte es das Ziel sein, die pH-Sensitivität der Mutanten noch genauer zu charakterisieren. Dazu könnte durch Verringerung der pH-Differenz zwischen den Versuchspuffern ermittelt werden, wie stark pH-Schwankungen sein müssen, damit sie von den Rezeptormutanten als Fluoreszenzänderungen wiedergegeben werden. Durch Einsatz von pH-sensitiveren GFP-Mutanten wäre es möglich neue pH-sensitive Konstrukte zu erstellen.

Die eingesetzte Methode eignet sich auch dazu, um pH-Werte in anderen zellulären Kompartimenten wie z.B. Mitochondrien nachzuweisen. GFP-Mutanten könnten an geeignete Transfersubstrate kloniert und dadurch pH-sensible „Tandem“-GFP-Konstrukte erstellt werden. Neben der Messung von pH-Veränderungen würde der Grundstein für die Aufklärung unterschiedlicher pH-abhängiger Funktionsmechanismen und Signalkaskaden gelegt werden.

Ein weiteres Ziel ist es aber, die Kinetik des Übergangs in saure Kompartimente zu messen. Dazu ist jedoch eine kontinuierliche Inkubation der Zellen bei 37°C notwendig, um ein physiologisches zelluläres Umfeld zu gewährleisten.

Weiterhin müsste die Identität der beobachteten sauren Kompartimente (Endosomen oder Lysosomen) geklärt werden. Möglicherweise ist der pH-Wert in verschiedenen Vesikeln unterschiedlich.

Literaturverzeichnis

- Abad, M. F. C., Benedetto Di, G., Magalhaes, P. M., Filippin, L. und Pozzan, T. (2004). "Mitochondrial pH monitored by a new engineered green fluorescent protein mutant." The Journal of Biological Chemistry **279**: 11521-11528.
- Aniento, F., Emans, N., Griffiths, G. und Gruenberg, J. (1993). "Cytoplasmic dynein-dependent vesicular transport from early to late endosomes." The Journal of Cell Biology **123**: 1373-1387.
- Awaji, T., Hirasawa, A., Shirakawa, H., Tsujimoto, G. und Miyazaki, S. (2001). "Novel green fluorescent protein-based ratiometric indicators for monitoring pH in defined intracellular microdomains." Biochemical and Biophysical Research Communications **289**: 457-462.
- Babcock, D. F. (1982). "Examination of the intracellular ionic environment and of ionophore action by null point measurements employing the fluorescein chromophore." The Journal of Biological Chemistry **258**: 6380-6389.
- Ballesteros, J. A., Jensen, A. D., Liapakis, G., Rasmussen, S. G. F., Shi, L., Gether, U. und Javitch, J. A. (2001). "Activation of the β_2 -adrenergic receptor involves disruption of an ionic lock between the cytoplasmic ends of transmembrane segments 3 and 6." The Journal of Biological Chemistry **276**: 29171-29177.
- Barak, L. S., Ferguson, S. S. G., Zhang, J., Martenson, C., Meyer, T. und Caron, M. G. (1997). "Internal trafficking and surface mobility of a functionally intact β_2 -adrenergic receptor-green fluorescent protein conjugate." Molecular Pharmacology **51**: 177-184.
- Brejck, K., Sixma, T. K., Kitts, P., Kain, S. R., Tsien, R. Y., Ormö, M. und Remington, S. J. (1997). "Structural basis for dual excitation and photoisomerization of the aequorea victoria green fluorescent protein." Proceedings of the National Academy of Science of the United States of America **94**: 2306-2311.
- Campbell, R. E., Tour, O., Palmer, A. E., Steinbach, O. E., Baird, G. E. und Zacharias, D. A. (2002). "A monomeric red fluorescent protein." Proceedings of the National Academy of Science of the United States of America **99**: 7877-7882.
- Cubitt, A. B., Heim, R., Adams, R. S., Boyd, A. E., Gross, L. A. und Tsien, R. Y. (1995). "Understanding, improving and using green fluorescent proteins." Trends in Pharmacological Science **20**: 448-455.
- De Vries, L., Zheng, B., Fischer, T., Elenko, E. und Farquhar, M. G. (2000a). "The Regulator of G Protein Signaling Family." Annual Review Pharmacology **40**: 235-271.
- De Vries, L., Zheng, B., Fischer, T., Elenko, E. und Farquhar, M. G. (2000b). "The regulator of G-protein signalling family." Annual Review Pharmacology **40**: 235-271.
- Deo, S. K. und Daunert, S. (2000). "Green fluorescent protein mutant as label in homogeneous assays for biomolecules." Analytical Biochemistry **289**: 52-59.

Devi, L. A. (2001). "Heterodimerization of G-protein-coupled receptors: pharmacology, signaling and trafficking." Trends in Pharmacological Science **22**: 532-537.

Diwu, Z., Chen, C.-S., Zhang, C., Klaubert, D. und Haugland, R. (1999). "A novel acidotropic pH indicator and its potential application in labeling acidic organelles of live cells." Chemistry and Biology **6**: 411-418.

Ehring, T., O`Kane, D. J. und Prendergast, G. F. (1995). "Green-fluorescent protein mutants with altered fluorescence excitation spectra." FEBS Letters **367**: 163-166.

Elslinger, M.-A., Wachter, R. M., Hanson, T. G., Kallio, K. und Remington, S. J. (1999). "Structural and spectral response of green fluorescent protein variants to change in pH." Biochemistry **38**: 5296-5301.

Emptage, N. J. (2001). "Fluorescent imaging in living systems." Current Opinion in Pharmacology **1**: 521-525.

Ferguson, S. S. G. (1998). "Using green fluorescent protein to understand the mechanisms of G-protein-coupled receptor regulation." Brazilian Journal of Medical and Biological Research **31**: 1471-1477.

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

Ferguson, S. S. G., Barak, L. S., Zhang, J. und Caron, M. G. (1996). "G-protein-coupled receptor regulation: role of G-protein-coupled receptor kinases and arrestin." Canadian Journal of Physiology and Pharmacology **74**: 1095-1110.

Fischer, M., Haase, I., Simmeth, E., Gerisch, G. und Müller-Taubenberger, A. (2004). "A brilliant monomeric red fluorescent protein to visualize cytoskeleton dynamics in Dictyostelium." FEBS Letters **577**: 227-232.

Gether, U. (2000). "Uncovering molecular mechanisms involved in activation of G-Protein-Coupled Receptors." Endocrine Reviews **21**: 90-113.

Griesbeck, O. (2004). "Fluorescent proteins as sensors for cellular functions." Current Opinion in Neurobiology **14**: 636-641.

Griesbeck, O., Baird, G. S., Campell, R. E., Zacharias, D. A. und Tsien, R. Y. (2001). "Reducing the environmental sensitivity of yellow fluorescent protein." The Journal of Biological Chemistry **276**: 29188-29194.

Haga, T., Haga, K. und Kameyama, K. (1994). "G protein-coupled receptor kinases." Journal of Neurochemistry **63**: 400-412.

Hamm, H. E. (1998). "The many faces of G protein signaling." The Journal of Biological Chemistry **273**: 669-672.

Hanson, G. T., Mc Ananey, T. B., Sun Park, E., Rendell, M. E. P., Yarbrough, D. K., Chu, S., Xi, L., Boxer, S. G., Montrose, H. M. und Remington, S. J. (2002). "Green fluorescent protein

- variants as ratiometric dual emission pH sensors. 1. Structural Characterization and Preliminary Application." Biochemistry **41**: 15477-15488.
- Haupts, U., Maiti, S., Schwille, P. und Webb, W. (1998). "Dynamics of fluorescence fluctuations in green fluorescent protein observed by fluorescence correlation spectroscopy." Proceedings of the National Academy of Science of the United States of America **95**: 13573-13578.
- Heim, R., Prasehr, D. C. und Tsien, R. Y. (1994). "Wavelength mutations and posttranslational autoxidation of green fluorescent protein." Proceedings of the National Academy of Science of the United States of America **91**: 12501-12504.
- Iwami, G., Kawabe, J., Ebina, T., Cannon, P., Homcy, C. und Ishikawa, Y. (1995). "Regulation of adenyl cyclase by protein kinase A." The Journal of Biological Chemistry **271**: 12481-12484.
- Jankowski, A., Hong Kim, J., Collins, R. F., Danemann, R., Walton, P. und Grinstein, S. (2001). "In situ measurements of the pH of mammalian peroxisomes using the fluorescent protein pHluorin." The Journal of Biological Chemistry **279**: 48748-48763.
- Kallal, L., Gagnon, A., Penn, R. und Benovic, J. (1998). "Visualization of agonist-induced sequestration and down-regulation of a green fluorescent protein-tagged β 2-adrenergic receptor." The Journal of Biological Chemistry **273**: 322-328.
- Kneen, M., Farinas, J., Li, Y. und Verkman, A. S. (1998). "Green fluorescent protein as a noninvasive intracellular pH indicator." Biophysical Journal **74**: 1591-1599.
- Koenig, J. A. und Edwardson, J. M. (1997). "Endocytosis and recycling of G protein-coupled receptors." Trends in Pharmacological Science **18**: 276-287.
- Krueger, K. K., Daaka, Y., Pitcher, J. A. und Lefkowitz, J. R. (1996). "The role of sequestration in G-protein-coupled receptor resensitization." The Journal of Biological Chemistry **272**: 5-8.
- Krupnick, J. G. und Benovic, J. L. (1998). "The role of receptor kinases and arrestins in G protein-coupled receptor regulation." Annual Review of Pharmacology and Toxicology **38**: 289-319.
- Laporte, A. S., Oakley, R. H., Holt, J. A., Barak, L. S. und Caron, M. G. (2000). "The interaction of β -arrestin with the AP-2 adaptor is required for the clustering of β 2 -adrenergic receptor into clathrin-coated pits." The Journal of Biological Chemistry **275**: 23120-23126.
- Lefkowitz, J. (2004). "Historical review: A brief history and personal retrospective of seven-transmembrane receptors." Trends in Pharmacological Science **25**: 413-422.
- Li, X., Zhang, G., Ngo, N., Zhao, X., Kain, S. R. und Huang, C.-C. (1997). "Deletions of the aequorea victoria green fluorescent protein define the minimal domain required for fluorescence." The Journal of Biological Chemistry **272**: 28545-28549.

- Liang, W., Patricia, K. C., Quang, H., Morelang, R. T. und H., F. P. (2003). "Differences in endosomal targeting of human β 1- and β 2- adrenergic receptors following clathrin-mediated endocytosis." Journal of Cell Science **117**: 723-734.
- Lippincott-Schwartz, J., Roberts, T. H. und Hirschberg, K. (2000). "Secretory protein trafficking and organelle dynamics in living cells." Annual Review of Cell and Developmental Biology **16**: 557-589.
- Llopis, J., McCaffery, M., Miyawaki, A., Farquhar, M. G. und Tsien, R. Y. (1998). "Measurement of cytosolic, mitochondrial, and golgi pH in single living cells with green fluorescent proteins." Proceedings of the National Academy of Science of the United States of America **95**: 6803-6808.
- Lohse, M. J., Andexinger, S., Pitcher, J., Trukawinski, S., Codina, J., Faure, J.-P., Caron, M. G. und Lefkowitz, J. R. (1992). "Receptor-specific desensitization with purified proteins." The Journal of Biological Chemistry **267**: 8558-8564.
- Marchese, A., Chen, C., Kim, Y.-M. und Benovic, J. L. (2003). "The ins and outs of G-protein-coupled receptor trafficking." Trends in Biochemical Science **28**: 329-376.
- McAnaney, T. B., Sun Park, E., Hanson, G. T., Remington, S. J. und Boxer, S. G. (2002). "Green fluorescent protein variants as ratiometric dual emission pH sensors. 2. Excited-State dynamics." Biochemistry **41**: 15489-15494.
- Mellman, I. (1996). "Endocytosis and molecular sorting." Annual Review of Cell and Developmental Biology **12**: 575-625.
- Miesenböck, G., De Angelis, D. A. und Rothman, E. (1998). "Visualizing secretion and synaptic transmission with pH-sensitive green fluorescent proteins." Nature Biotechnology **394**: 192-195.
- Mizuno, H., Sawano, A., Eli, P., Hama, H. und Miyawaki, A. (2001). "Red fluorescent protein from *Discosoma* as a fusion tag and a partner for fluorescence resonance energy transfer." Biochemistry **40**: 2502-2510.
- Moore, R. H., Tuffaha, A., Millman, E. E., Dai, W., Hall, H. S., Dickey, B. F. und Knoll, B. J. (1999). "Agonist- induced sorting of human β 2-adrenergic receptors to lysosomes during downregulation." Journal of Cell Science **112**: 329-338.
- Palczewski, K. (2000). "Crystal structure of rhodopsin a G-protein coupled receptor." Science **289**: 739-745.
- Pierce, K. L., Premont, R. T. und Lefkowitz, R. J. (2002). "Seven-transmembrane-receptors." Nature Reviews Molecular Cell Biology **3**: 639-649.
- Ray, K., Kunsch, C., Bonner, L. M. und Robishaw, J. D. (1995). "Isolation of cDNA clones, encoding eight different human G Protein gamma subunits, including three novel forms designated the gamma 4, gamma 10, and gamma 11 subunits." The Journal of Biological Chemistry **270**: 21765-21771.

- Rios, C. D., Jordan, B. A., Gomes, J. I. und Devi, L. A. (2001). "G-protein-coupled receptor dimerization: modulation of receptor function." Pharmacology and Therapeutics **92**: 71-87.
- Robey, R. B., Ruiz, O., Santos, A. V., Ma, J., Kear, F., Wang, L.-J., Li, C.-J., Bernado, A. A. und Arruda, J. A. (1998). "PH-dependent fluorescence of a heterologously expressed aequorea green fluorescent protein mutant: In situ spectral characteristics and applicability to intracellular pH estimation." Biochemistry **37**: 9894-9901.
- Romoser, V. A., Hinkle, P. M. und Persechini, A. (1997). "Detection in living cells of Ca²⁺-dependent changes in the fluorescence emission of an indicator composed of two green fluorescent protein variants linked by a calmodulin-binding sequence." The Journal of Biological Chemistry **272**: 13270-13274.
- Royston, C. und Sorkin, A. (1998). "Endocytosis of functional epidermal growth factor receptor-green fluorescent protein chimera." The Journal of Biological Chemistry: 35000-35007.
- Sankaranarayanan, S., De Angelis, D., Rothman, J. E. und Ryan, T. A. (2000). "The Use of pHluorins for optical measurements of presynaptic activity." Biophysical Journal **79**: 2199-2208.
- Seksek, O. und Bolard, J. (1996). "Nuclear pH gradient in mammalian cells revealed by laser microspectrofluorimetry." Journal of Cell Science **109**: 257-262.
- Shenoy, S. und Lefkowitz, J. (2003). "Trafficking patterns of β -arrestin and G protein-coupled receptors determined by the kinetics of β -arrestin deubiquitination." The Journal of Biological Chemistry **278**: 14498-14506.
- Shenoy, S., McDonald, P., Kohout, T. und Lefkowitz, J. (2001). "Regulation of receptor fate by ubiquitination of activated β 2-adrenergic receptor and β -arrestin." Science **294**: 1307-1313.
- Staehelin, M. und Simons, P. (1982). "Rapid and reversible disappearance of beta-adrenergic cell surface receptors." EMBO **1**: 187-190.
- Tae, H. J., Grossmann, M. und Ji, I. (1998). "G-protein-coupled receptors." The Journal of Biological Chemistry **273**: 17229-17302.
- Tan, C. M., Brady, A. E., Highfield Nickols, H., Wang, Q. und Limbird, L. E. (2004). "Membrane trafficking of G-protein-coupled receptors." Annual Review of Pharmacology and Toxicology **44**: 559-609.
- Tsien, R. Y. (1998). "The green fluorescent Protein." Annual Review Biochemistry **67**: 509-544.
- von Zastrow, M. (2001). "Endocytosis and downregulation of G protein-coupled receptors." Biochemical Society Transactions **7**: 265-271.
- von Zastrow, M. und Kobilka, B. (1992). "Ligand-regulated internalization and recycling of human β 2-adrenergic receptors between the plasma membrane and endosomes containing transferrin receptors." The Journal of Biological Chemistry **267**: 3530-3538.

Wachter, R. M., Elsliger, M.-A., Kallio, K., Hanson, G. T. und Remington, S. J. (1998). "Structural basis of spectral shifts in the yellow-emission variants of green fluorescent protein." Current Biology **6**: 1267-1277.

Yang, T.-T., Sinai, P., Green, G., Kitts, P. A., Chen, Y.-T., Lyabarger, L., Chervenak, R., Patterson, G. H., Piston, D. W. und Kain, S. R. (1998). "Improved fluorescence and dual colour detection with enhanced blue and green variants of the green fluorescent protein." The Journal of Biological Chemistry **273**: 8212-8216.

édition scientifique
VVB LAUFERSWEILER VERLAG

VVB LAUFERSWEILER VERLAG
STAUFENBERGRING 15
D - 3 5 3 9 6 G I E S S E N

Tel: 0641-5599888 Fax: -5599890
redaktion@doktorverlag.de
www.doktorverlag.de

ISBN 3-8359-5093-2



9 7 8 3 8 3 5 1 9 5 0 9 3 1 ©