



Fakultät für Medizin

Oligomerisierung von β_2 -Adrenozeptoren

Stephan Martin Skawran

Vollständiger Abdruck der von der Fakultät für Medizin der Technischen Universität München zur Erlangung des akademischen Grades eines

Doktors der Medizin (Dr. med.)

genehmigten Dissertation.

Vorsitzender: Prof. Dr. Jürgen Schlegel

Prüfer der Dissertation:

1. Prof. Dr. Dr. Stefan Engelhardt
2. Priv.-Doz. Dr. Antonio Sarikas

Die Dissertation wurde am 17.02.2017 bei der Technischen Universität München eingereicht und durch die Fakultät für Medizin am 21.02.2018 angenommen.

Ich erkläre an Eides statt, dass ich diese, bei der Fakultät für Medizin der TUM zur Promotionsprüfung vorgelegte Arbeit ohne sonstige Hilfe erstellt und bei der Abfassung nur die gemäß § 6 Absatz 6 und § 7 Satz 2 angegebenen Hilfsmittel benutzt habe.

München,

Stephan Martin Skawran

Danksagung

Besonders möchte ich Prof. Dr. Dr. Engelhardt, dem Leiter des Instituts für Pharmakologie und Toxikologie der Technischen Universität München für die Möglichkeit danken, meine Dissertation unter seiner Leitung durchführen zu dürfen.

Besonderer Dank gilt Dr. Andrea Ahles für ihre stete Diskussionsbereitschaft und Anregungen, die maßgeblich zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben.

Prof. Dr. Gmeiner und seiner Forschungsgruppe gebührt für die erfolgreiche Synthese und freundliche Bereitstellung eines anderweitig nicht erhältlichen Ligandenderivats spezieller Dank.

Für die optimistische und immer hilfsbereite Arbeitsatmosphäre des gesamten Laborteams möchte ich mich vielmals bedanken.

Verzeichnis der Abkürzungen

Adr Adrenalin	Iso Isoprenalin
ADRB2 Humaner β_2 -Adrenozeptor	LB Lysogeny Broth
ANOVA Analysis Of Variance = Varianzanalyse	LRET Lanthanide based Resonance Energy Transfer
Arg Arginin	Lumi4 Markenname des trFRET-kompatiblen Terbium-Cryptats, das in vorliegender Arbeit als Donorfluorophor verwendet wurde
BC O ² -Benzyl-Cytosin	
BG O ⁶ -Benzyl-Guanin	
BRET Biolumineszenz-Resonanzenergietransfer	
C-Terminus Carboxyterminus	
CLIP-tag Markenname des auf einer Mutante des O ⁶ -Alkylguanin-DNA-Alkyltransferase basierenden Proteinmarkierungssystems	M Molar
	MIS Membraninsertionssequenz
ddH₂O Bidestilliertes Wasser	N-Terminus Aminoterminus
DMEM Dulbecco's Modified Eagle Medium	OR Opioid-Rezeptor
DMSO Dimethylsulfoxid	PBS Dulbecco's Phosphate Buffered Saline
DNA Desoxyribonucleic Acid = Desoxyribonucleinsäure (DNS)	PCH Photon Counting Histogram
E. coli Escherichia coli	PCR Polymerase Chain Reaction = Polymerasekettenreaktion
EDTA Ethylendiamintetraacetat	PLA Proximity Ligation Assay
ER Endoplasmatisches Retikulum	RET Resonance Energy Transfer
FCS Fluorescence Correlation Spectroscopy	SNAP-tag Markenname des auf der O ⁶ -Alkylguanin-DNA-Alkyltransferase basierenden Proteinmarkierungssystems
FRAP Fluorescence Recovery After Photobleaching	SNP Single Nucleotide Polymorphism
FRET Fluoreszenz-Resonanzenergietransfer	tr-FRET Time Resolved Fluorescence Resonance Energy Transfer
G-Protein Guanosintriphosphat-bindendes Protein	TRIS 2-Amino-2-(hydroxymethyl)-propan-1,3-diol
Gln Glutamin	Tyr Tyrosin
Gly Glycin	U Unit, biochemisch
GPCR G-Protein-gekoppelter-Rezeptor	UV Ultraviolett
HEK Human Embryonic Kidney-Zelllinie	
HeLa HeLa-Zelllinie	
ICI ICI-118,551	

Inhaltsverzeichnis

Danksagung	iii
Verzeichnis der Abkürzungen	iv
1 Einleitung	1
1.1 G-Protein-gekoppelte Rezeptoren (GPCR)	1
1.1.1 Signaltransduktion	1
1.1.2 Rezeptordesensibilisierung und -internalisierung	3
1.2 Adrenerge Rezeptoren	3
1.2.1 Das adrenerge System	3
1.2.2 Polymorphismen der β -Adrenozeptoren	3
1.3 Oligomerisierung G-Protein-gekoppelter Rezeptoren	4
1.3.1 Homo- und Heterooligomerisierung G-Protein-gekoppelter Rezeptoren	4
1.3.2 Physiologische Relevanz von Rezeptoroligomeren	7
1.3.3 Rezeptoroligomere als Targets neuartiger Wirkstoffe	7
1.4 Methoden zur Untersuchung der Oligomerisierung von Rezeptoren	8
1.4.1 Überblick	8
1.4.2 BRET & FRET zur Analyse oligomerisierter Rezeptoren	9
1.4.3 Time-resolved FRET (tr-FRET)	9
1.5 Zielsetzung dieser Arbeit	11
2 Material & Methoden	12
2.1 Material	12
2.1.1 Plasmide	12
2.1.2 Bakterien	12
2.1.3 Zelllinien & Zellkultur	12
2.1.4 Chemikalien & Reagenzien	13
2.1.5 SNAP-Substrate und fluoreszierende Liganden	13
2.1.6 Enzyme	13
2.1.7 Oligonukleotidprimer	14
2.1.8 Pharmaka	14
2.2 Molekularbiologische Methoden	15
2.2.1 DNA-Amplifikation mittels Polymerasekettenreaktion (PCR)	15
2.2.2 Agarose-Gelelektrophorese	15
2.2.3 Extraktion von DNA aus Agarosegelen	16
2.2.4 Restriktionsenzymverdau von PCR-Produkten und Plasmid-DNA	16
2.2.5 Ligation von DNA-Fragmenten	16

2.2.6	Klonierung mittels Gateway-Technologie	17
2.2.7	Mutagenese	17
2.2.8	Transformation elektrokompenter DH10B-Bakterien	18
2.2.9	Mini/Maxi-Kultur und Mini/Maxi-DNA-Aufreinigung	18
2.2.10	Enzymatische Deglykosylierung	19
2.2.11	Messung der DNA-Konzentrationen	20
2.2.12	DNA-Sequenzierung	20
2.3	Methoden der eukaryotischen Zellbiologie	20
2.3.1	Kultivierung eukaryotischer Zelllinien	20
2.3.2	Auftauen und Einfrieren von Zellen	21
2.3.3	Transiente Transfektion von HEK293- und HeLa-Zellen mit Effectene	21
2.3.4	Generierung stabil exprimierender HEK293- und HeLa-Zelllinien	22
2.4	Mikroskopische Methoden	22
2.4.1	Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen	22
2.4.2	Fluoreszenzfärbungen mit SNAP-Substraten	23
2.4.3	Färbungen mit fluoreszierenden Liganden	23
2.5	Fluoreszenzoptische Methoden	23
2.5.1	tr-FRET mit SNAP-Substraten	24
2.5.2	tr-FRET mit fluoreszierenden Liganden	26
2.6	Statistische Methoden	26
3	Ergebnisse	27
3.1	Generierung von β_2 -Adrenozeptoren mit SNAP-tag	27
3.2	Fluoreszenzmikroskopie des ADRB2 mit SNAP-tag	29
3.3	Oligomerisierung des ADRB2 mit SNAP-tag	30
3.3.1	tr-FRET mit SNAP-Substraten	30
3.3.2	Einfluss der Stimulation mit Liganden des ADRB2 auf seine Oligomerisierung	34
3.3.3	Einfluss der Rezeptorglykosylierung auf die Oligomerisierung des ADRB2 . .	39
3.4	tr-FRET mit fluoreszierenden Liganden des ADRB2	40
4	Diskussion	43
4.1	Untersuchung der Rezeptoroligomerisierung des ADRB2	43
4.2	Möglichkeiten und Grenzen von tr-FRET zur Analyse von Rezeptoroligomerisierung	43
4.2.1	Etablierung der tr-FRET-Methode zwischen SNAP-getaggten Rezeptoren . . .	43
4.2.2	Hinreichende Kriterien zum Nachweis der Rezeptoroligomerisierung	45
4.2.3	Modulation der Oligomergröße und Rezeptorkonformationsänderungen durch Ligandenstimulation	45
4.2.4	tr-FRET zwischen Rezeptorliganden	48
5	Zusammenfassung und Ausblick	51
	Abbildungsverzeichnis	52
	Literatur	56

1 Einleitung

1.1 G-Protein-gekoppelte Rezeptoren (GPCR)

G-Protein-gekoppelte Rezeptoren (GPCRs) stellen die größte Familie der Membranproteine dar. Sie vermitteln zelluläre Antworten auf Hormone und Neurotransmitter, bilden die Rezeptoren des olfaktorischen Systems und können sogar Photonen in zelluläre Signale umsetzen (Rosenbaum et al. 2009). Allein für das olfaktorische System sind hunderte strukturell verwandter GPCRs bekannt. Damit bilden Moleküle, die GPCRs adressieren heute die Gruppe der am meisten verwendeten Medikamente (Pierce et al. 2002).

Alle GPCRs besitzen sieben hydrophobe alpha-helikale Transmembransegmente (7TM-Rezeptoren). Das Aminoende (N-Terminus) ist extrazellulär lokalisiert, das Carboxyende (C-Terminus) intrazellulär. Dazwischen liegen alternierend intra- und extrazelluläre Schleifen.

Bei beeindruckender funktioneller Diversität lassen sich die GPCRs aufgrund struktureller Homologien in fünf Familien unterteilen (Fredriksson et al. 2003): Rhodopsin- (Klasse A), Sekretin- (Klasse B), Glutamat- (Klasse C), Adhäsions- (Klasse D) und Frizzled/Taste-Rezeptoren (Klasse E). Die bei weitem größte unter ihnen bilden die rhodopsinverwandten Rezeptoren (dem „Lichtrezeptor“ ähnliche Rezeptoren), zu denen auch der in dieser Arbeit näher untersuchte β_2 -Adrenozeptor (ADRB2) gehört.

1.1.1 Signaltransduktion

GPCRs sind in der Lage, stimulatorische (G_s) und inhibitorische (G_i) guaninnukleotidbindende Proteine (G-Proteine) zu binden, die zu unterschiedlichen Signalkaskaden führen (s. Abb. 1.1):

Anhand der Funktion des ADRB2 kann die klassische Funktion eines GPCRs illustriert werden: Nach Bindung der natürlichen Agonisten, in diesem Fall Adrenalin oder Noradrenalin, wird die stimulatorische Untereinheit eines heterotrimeren G-Protein aktiviert ($G\alpha_s$). Diese führt zur Stimulation der Adenylatzyklase und damit zur Produktion von zyklischem AMP (cAMP). Das akkumulierte cAMP wiederum aktiviert die cAMP-abhängige Proteinkinase A (PKA), die Proteine phosphoryliert und inaktiviert, die für die Kontraktion glatter Muskelzellen verantwortlich sind (L-Typ-Kalziumkanäle) (Hoffman et al. 1982).

Die Aktivierung des ADRB2 führt zur Phosphorylierung durch G-Protein-gekoppelte Rezeptorkinasen (GRK). Die Phosphorylierung ermöglicht die Bindung des Proteins Arrestin, das seinerseits als regulatorisches und Signalprotein fungiert. Es deaktiviert den GPCR und führt über Clathrin zur Endozytose und damit zur Internalisierung des Rezeptors (s. Abschnitt 1.1.2), der danach entweder zur Membran recycled oder in Lysosomen degradiert wird.

Daneben bedingt Arrestin die Aktivierung extrazellulärer signalregulierter Kinasen (ERK 1,2).

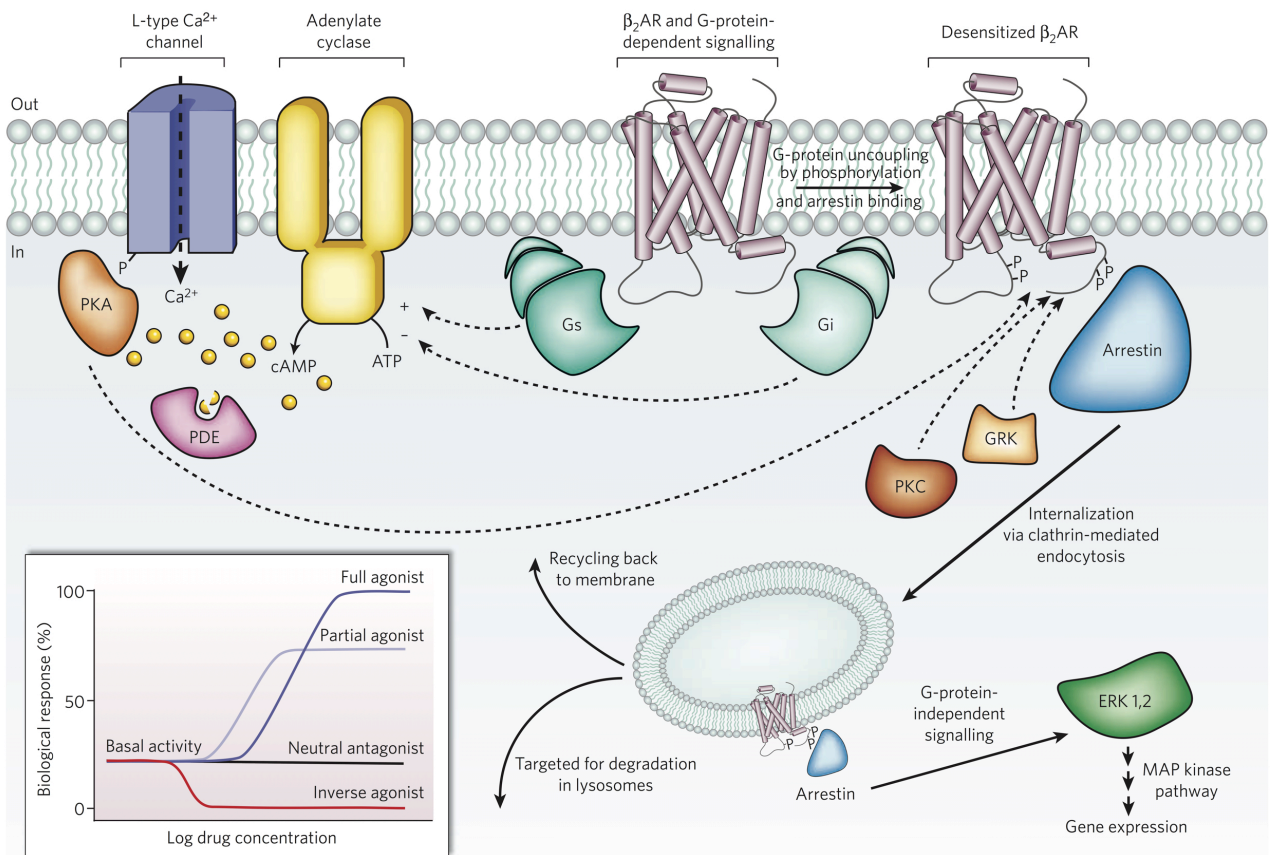


Abbildung 1.1: Signaltransduktion eines GPCRs am Beispiel des ADRB2 (hier β_2 AR) aus Rosenbaum et al. 2009.

Diese wiederum regulieren als Teil des MAP (mitogen-activated-pathway)-Kinase-Wegs die Genexpression.

1.1.2 Rezeptordesensibilisierung und -internalisierung

Naturgemäß führt dauerhafte Rezeptorstimulation über negative Rückkopplungsmechanismen zur Verminderung der Rezeptorantwort (Rezeptordesensibilisierung) (Zastrow et al. 2008). Mehrere im Folgenden beschriebene Mechanismen modulieren dabei die Rezeptorantwort.

Gleichzeitig zur Entdeckung, dass durch Agonisten der β -Adrenozeptoren ein zellulärer Signalprozess in Gang gesetzt wird, konnten bei Rezeptorstimulation Veränderungen der Rezeptordichte auf der Membran gefunden werden (Chuang et al. 1979).

Modernere Modelle beschreiben die Rezeptorhomöostase vielgestaltiger. Über ligandeninduzierte Rezeptordesensibilisierung wird demnach über Rezeptorphosphorylierung und anschließende Bindung von β -Arrestin schließlich auch Rezeptorendozytose und damit Internalisierung vermittelt (Zastrow et al. 2008).

1.2 Adrenerge Rezeptoren

1.2.1 Das adrenerge System

Die Klasse der adrenergen Rezeptoren umfasst als Subgruppe der rhodopsinverwandten Rezeptoren α - und β -Adrenozeptoren. Diese wiederum lassen sich in drei α_1 -Subtypen (α_{1A} , α_{1B} , α_{1D}), drei α_2 -Subtypen (α_{2A} , α_{2B} , α_{2C}) sowie in die drei β -Subtypen β_1 , den in dieser Arbeit betrachteten β_2 -Adrenozeptor (ADRB2) und β_3 unterteilen (<http://www.guidetopharmacology.org>).

Die Diversität der adrenergen Rezeptoren ist ihrem Vorhandensein in der Mehrzahl der menschlichen Zellen geschuldet. Die Effektoren des beta-adrenergen Systems haben somit physiologisch eine Vielzahl von Wirkungen an Endorganen. Eine Übersicht findet sich in Brunton et al. 2011.

Aufgrund der systemischen Bedeutung von β -Adrenozeptoren für den Organismus ergeben sich weitreichende klinische Einsatzmöglichkeiten. Von besonderer pharmakologischer und klinischer Relevanz sind die vasokonstriktischen und -dilatorischen Wirkungen. Im Zusammenhang mit Notfallmedizinischer Therapie bei Kreislaufversagen und atemwegsobstruktiven Krankheitsbildern gehören spezifische und effektive medikamentöse Therapeutika zur Grundausrüstung jedes kardiopulmonalen Therapieregimes. β -Adrenozeptorblocker sind prognoseverbessernde Medikamente bei der Therapie der Herzinsuffizienz (Brophy 2001), auf Agonisten des ADRB2 kann in der Asthmatherapie kaum verzichtet werden (Wood et al. 1995).

1.2.2 Polymorphismen der β -Adrenozeptoren

Aufgrund der funktionellen Eigenschaften des ADRB2 ist er häufiges Ziel von Medikamenten, die bei der Behandlung von obstruktiven bronchopulmonalen Erkrankungen eingesetzt werden (Ortega et al. 2007). Bei der Anwendung von Agonisten des ADRB2 konnten signifikante interindividuelle Unterschiede bei den Ansprechraten gefunden werden (Wechsler et al. 2006; Hawkins et al. 2006). Als in diesem Zusammenhang bedeutsam konnten mehrere genetische Unterschiede identifiziert werden. So existieren mindestens 13 Single Nucleotide Polymorphismen (SNPs) mit teils unterschiedlichen

pharmakologischen und klinischen Eigenschaften (Chung et al. 2011). Am besten untersucht ist der häufigste Polymorphismus im ADRB2, p.Gly16Arg. Hier ist an Position 16 im N-Terminus des Rezeptors Arginin durch Glycin substituiert.

Für p.Gly16Arg existieren zum einen in-vitro Untersuchungen, in denen der Gly¹⁶-Variante gegenüber der Arg¹⁶-Variante eine Hyperfunktionalität attribuiert wird. Diese beruht auf der Beobachtung schnellerer Konformationsänderung, schnellerer β -Arrestin-2-Interaktion (Ahles, Rochais et al. 2011) und damit Herabregulation (Green et al. 1994). Die Affinität von Agonisten am ADRB2 wurde dabei in-vitro als gleich bestimmt.

Zum anderen konnten in-vivo dagegen für den untersuchten Polymorphismus keine relevanten physiologischen Unterschiede beobachtet werden (Ahles & Engelhardt 2014). Im Bereich pharmakotherapeutischer Untersuchungen existieren variantenspezifisch divergente Beobachtungen: Bei lokaler Applikation von Isoprenalin oder Terbutalin konnte bei gesunden Probanden, die homozygot für die Gly¹⁶-Variante des Rezeptors waren, deutlichere Vasodilatation beobachtet werden. Bei systemischer Applikation zeigte demgegenüber die Gruppe der gesunden Probanden, die homozygot für die Arg¹⁶-Variante des ADRB2 waren, deutlichere Vasodilatation. Im ersten Fall korreliert die Beobachtung mit der in-vitro beobachteten Hyperfunktionalität der Gly¹⁶-Variante. Die Ursachen für die gegenläufige Beobachtung bei systemischer Applikation sind ungeklärt und beruhen möglicherweise auf physiologischen Gegenregulationsmechanismen.

Insofern können sich therapeutische Konsequenzen bei der Asthmatherapie ergeben, wobei zukünftig im Rahmen der personalisierten Medizin genetische Prädiktoren benannt werden können.

1.3 Oligomerisierung G-Protein-gekoppelter Rezeptoren

1.3.1 Homo- und Heterooligomerisierung G-Protein-gekoppelter Rezeptoren

Die klassische Annahme, GPCRs würden als monomere Proteine funktionieren, konnte durch eine große Zahl unterschiedlicher Studien widerlegt werden. Tatsächlich sind nach zahlreichen BRET- und FRET-gestützten Untersuchungen mittlerweile sowohl Hetero- als auch als Homodimere einer Vielzahl von GPCRs bekannt (Khelashvili et al. 2010, <http://www.gpcr-okb.org>).

Als Reaktion auf die stetig wachsenden Informationen über Rezeptoroligomerisierung veröffentlichte die International Union of Basic and Clinical Pharmacology (IUPHAR) drei Kriterien, von denen mindestens zwei erfüllt sein sollen, um die physiologische Relevanz der Oligomere einordnen zu können (Pin et al. 2007). Die drei Kriterien umfassen:

1. Den Nachweis der physischen Interaktion der am Oligomer beteiligten Rezeptoren in nativem Gewebe oder primären Zellen. Dabei wird hinreichende methodische Sicherheit gefordert: Bloße Co-Immunopräzipitationsstudien genügen beispielsweise nicht für den überzeugenden Nachweis physischer Interaktion.
2. Funktionelle oligomerspezifische Besonderheiten wie positive oder negative allosterische Interaktion oder auch den Nachweis eines oligomerspezifischen Liganden (s. Abschnitt 1.3.3). Auch der Nachweis einer spezifisch durch den Oligomer modifizierten Signalkaskade kann an dieser Stelle stehen.

3. Validierung des Rezeptoroligomers in-vivo mittels beispielsweise Knock-Out-Mäusen oder RNAi-basierten Methoden - unter der Voraussetzung, dass in heterologen Expressionssystemen bereits hinreichende Relevanz bestätigt werden konnte.

Für einige Steroidrezeptoren und Rezeptoren mit Tyrosinkinaseaktivität ist die Rolle ihrer Oligomerisierung seit längerer Zeit etabliert (Heldin 1995). Im Falle der GPCRs ist die Existenz der Rezeptoroligomere heute in vielen Fällen akzeptiert, doch führt die Bewertung ihrer funktionellen Bedeutung weiter zu kontroversen Diskussionen - etwa weil sich die meisten Untersuchungen heterologer Expressionssysteme bedienten, die beispielsweise Rezeptoren exprimierten, die in-vivo nicht gemeinsam exprimiert werden. Zum anderen wird weiter diskutiert, welche Untereinheiten der Rezeptoren tatsächlich das Interface der beobachteten Rezeptoroligomere bilden (Terrillon et al. 2004).

Ebenso bleibt Gegenstand der Diskussion, wie viele Rezeptoren in einem Oligomer gruppiert sind. Häufiger taucht die These auf, Dimere seien die vorherrschende stöchiometrische Einheit (Dorsch et al. 2009), erst mit steigender Expressionsstärke ergäben sich höhergradige Oligomere (Calebiro et al. 2013). Gleiches konnte für den GABA_B-Rezeptor beobachtet werden (Maurel et al. 2008; Comps-Agrar et al. 2011). Untersuchungen, die sich der Fluorescence-Correlation-Spectroscopy (FCS) und Photon-Counting-Histogram (PCH) bedienen, deuten ebenfalls darauf hin, dass Dimere bei mehreren GPCRs die funktionelle Einheit bilden (Herrick-Davis et al. 2013). In der vorliegenden Arbeit wird der Begriff „Oligomere“ bei weiter nicht vollständig geklärter Stöchiometrie bevorzugt, da die wahrscheinliche Dimer-Konfiguration einen Spezialfall des allgemeineren Begriffes darstellt.

Rezeptoroligomere haben eine Reihe denkbarer Implikationen. Fünf postulierte und beobachtete Rollen der Rezeptoroligomerisierung sind in Abbildung 1.2 illustriert:

- Biosynthese und korrekte posttranslationale Modifikationen im endoplasmatischen Retikulum (ER) sind möglicherweise Voraussetzung für Integration in die Zellmembran (Salahpour et al. 2004). Wurden GPCRs mit einem Retentions-Signal versehen, das den Export aus dem endoplasmatischen Retikulum verhindert, bedingte dies die Retention des untersuchten Heterooligomers (X. Zhu et al. 1998; Lee et al. 2000; Issafras et al. 2002; Floyd et al. 2003).
- Im Falle des Heterooligomers aus μ - und δ -Opioid-Rezeptoren wurde beobachtet, dass die Bindung eines für den einen Rezeptor spezifischen Liganden über Beeinflussung der Rezeptorkonformation die Affinität für den Agonisten des anderen verstärkt (Gomes et al. 2004). Ein Phänomen, das als positive Kooperativität bezeichnet wird.
- Auf der Ebene der durch G-Proteine vermittelten Signalkaskade konnten für die Dopaminrezeptoren D1 und D2 im Heterooligomer veränderte Bindungseigenschaften gegenüber dem G_{q/11}-Protein und somit veränderte Signaleigenschaften gemessen werden (Rashid et al. 2007).
- Schließlich konnte gezeigt werden, dass Rezeptorinternalisierung eines Protomers im Fall von Heterooligomeren effektiv auch zur Internalisierung des anderen führen, beziehungsweise diese verhindern kann (Hillion et al. 2002; Milligan 2010; Ward et al. 2011).

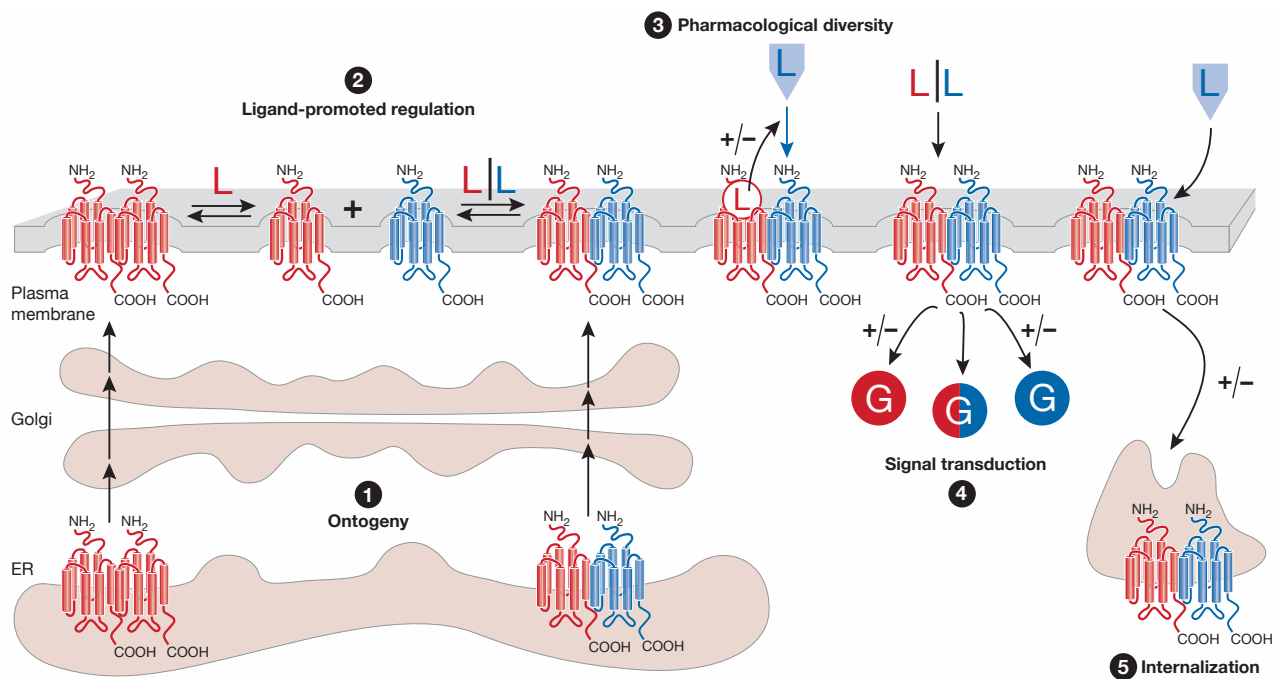


Abbildung 1.2: **Rolle der Rezeptoroligomerisierung (aus Terrillon et al. 2004):** 1 Rezeptorreifung; 2 Dynamische Regulierung der Oligomerisierung durch Ligandenbindung; 3 Heterodimerisierung von Rezeptoren bedingt positiv- oder negativ-kooperative Ligandenbindung; 4 verstärkte und inhibierte Signaltransduktion als Folge der Rezeptoroligomerisierung; 5 Heterooligomerisierung ruft möglicherweise Rezeptorinternalisierung schon bei Aktivierung nur eines Protomers hervor, beziehungsweise blockiert ein endozytoseresistenter Protomer die Internalisierung seines gekoppelten Rezeptors im Heterooligomer.

1.3.2 Physiologische Relevanz von Rezeptoroligomeren

In einer Reihe von Pathologien konnte eine Bedeutung von Rezeptoroligomerisierung im Zusammenhang mit den oben genannten Mechanismen identifiziert werden:

In der Asthmatherapie spielen beispielsweise Agonisten des ADRB2 als Bronchodilatoren eine führende Rolle. In einer Publikation von McGraw et al. 2006 wurde ein Cross-Talk zwischen dem Prostanoid-Rezeptor EP1 (EP1R) und dem ADRB2 gezeigt: Prostaglandin E2 (PGE2) führte zu verstärkter Dimerisierung des EP1R und des ADRB2 - mit geringerer cAMP-Produktion als Zeichen verminderter ADRB2-Aktivierung. Bei Patienten mit Major-Depression wurde der Anteil oligomerisierter D1- und D2-Rezeptoren in post-mortem-Studien mittels Co-Immunopräzipitation signifikant erhöht gegenüber gesunden Probanden gemessen (Pei et al. 2010). Möglicherweise können in Zukunft Medikamente, die die Oligomerisierung der beiden Rezeptoren beeinflussen, therapeutische Bedeutung für die Depression gewinnen. In mehreren Untersuchungen, unter anderem mit bivalenten Liganden (s. Abschnitt 1.3.3), wurde dem Heterooligomer aus δ - und μ -Opioidrezeptoren negative Kooperativität in-vivo beigemessen (Daniels et al. 2005; Lenard et al. 2007; He et al. 2011). Ähnlich wie beim Dopaminrezeptor (bei der Depression) könnte Beeinflussung der Oligomerisierung von Opioidrezeptoren von pharmakologischer Relevanz sein.

Weitere physiologisch bedeutsame Konstrukte konnten bei der Parkinson-Erkrankung (Tanganelli et al. 2004; Fuxe, Agnati et al. 2003; Fuxe, Ferré et al. 2005) sowie bei Prä-Eklampsie (Hypertonie) (AbdAlla et al. 2001) gefunden werden.

1.3.3 Rezeptoroligomere als Targets neuartiger Wirkstoffe

GPCR-Heterooligomere stellen bisher nicht adressierte Angriffspunkte für eine neue Klasse von Arzneimitteln dar (George et al. 2002; Hiller et al. 2013; Ferré et al. 2014). Denkbar ist die Entwicklung neuer Substanzen, die aufgrund höherer Selektivität und Affinität weniger unerwünschte Wirkungen aufweisen. Hinweise für gewebspezifische Heterooligomere bleiben Gegenstand der aktuellen Forschung.

Prinzipiell können mono- und bivalente Liganden, d.h. Substanzen, die aus einem oder zwei bekannten GPCR-Liganden bestehen, eingesetzt werden, um selektive Affinität für Oligomere zu erreichen (Waldhoer et al. 2005; Burford et al. 2014). Die Synthese birgt dabei einige Schwierigkeiten, da die chemischen Eigenschaften zum Teil erheblich von denen der Einzelliganden abweichen (Hiller et al. 2013).

Neben den klassischen orthosterischen Liganden seien die Möglichkeiten allosterischer Liganden erwähnt. Diese bewirken Rezeptormodulation bei Besatz einer nicht-physiologischen Bindungsstelle: In einer Studie von Waldhoer et al. 2005 zeigte beispielsweise ein monovalenter Ligand (6'-GNTI) bevorzugte Aktivierung des Heterodimers aus δ - und κ -Opioidrezeptoren. In-vivo bewirkte der Ligand bei intrathekaler Gabe Analgesie, nicht jedoch bei intrazerebroventrikulärer Gabe, was eventuell auf Gewebsspezifität hinweist.

Mittlerweile sind eine Reihe bivalenter Liganden synthetisiert worden, die unter anderem Serotonin-,

Histamin-, Dopamin-, Adenosin- Chemokin-, Cannabinoid-, Muskarin- und auch adrenerge Rezeptoren zum Ziel haben (Hiller et al. 2013).

1.4 Methoden zur Untersuchung der Oligomerisierung von Rezeptoren

1.4.1 Überblick

Es existieren eine Vielzahl von Methoden, die zum Nachweis von Rezeptoroligomerisierung verwendet worden sind. Die am häufigsten und aktuell verwendeten werden im folgenden dargestellt, um auf die Zielsetzung dieser Arbeit hinzuleiten.

Co-Immunopräzipitation

Eine der am häufigsten verwendeten Methoden stellt die Co-Immunopräzipitation dar (Hebert et al. 1996; Jordan et al. 1999; Hillion et al. 2002; Park et al. 2004). In der einfachsten Variante mit einem Protein-Epitop-tag und dem passenden spezifischen Antikörper war aufgefallen, dass die untersuchten Rezeptoren jeweils in den Banden ganzzahliger Vielfacher des Molekulargewichts liefen. Der Vermutung, es könnte sich um Oligomere handeln, liegt nahe. Allerdings konnte so nicht ausgeschlossen werden, dass es sich um unspezifische Rezeptor-Protein-Aggregate handelte. Genaue gelang der Nachweis mithilfe zweier Protein-Epitop-tags und zwei spezifischen Antikörpern. So konnten untersuchte Rezeptoren erst immunpräzipitiert und anschließend mit dem zweiten Antikörper geblottet werden.

Kristallstrukturen oligomerisierter Rezeptoren

Eine direkte Nachweismöglichkeit oligomerisierter Rezeptoren bietet die aufwändige Gewinnung der Kristallstruktur der Rezeptoren. Im Falle des CXCR4-Chemokin-Rezeptors und der Opioid-Rezeptor-Subtypen μ und κ konnten in den Kristallstrukturen strikte Rezeptordimere beobachtet werden (B. Wu et al. 2010; Manglik et al. 2012; H. Wu et al. 2012). Die mit dieser Methode identifizierten Oligomerisierungsinterfaces waren für die jeweiligen Rezeptoren unterschiedlich lokalisiert und werden in Zukunft Gegenstand weiterer Analysen werden.

Fluoreszenz-basierte Methoden

Fluoreszenz-basierte Methoden zur Analyse der Oligomerstruktur von GPCRs bedienen sich dem Resonanzenergietransfer (RET) zwischen biolumineszenten oder synthetischen Fluorophoren. In Abschnitt 1.4.2 sind die Methoden genauer dargestellt.

Funktionelle Untersuchungen

Weitere, insbesondere für in-vivo-Untersuchungen essentielle Verfahren, schließen über funktionelle Analyse indirekt auf die Existenz oligomerisierter Rezeptoren. Sie bedienen sich etwa bivalenter Liganden (Daniels et al. 2005) oder elektrophysiologischer Untersuchungen der G_i beziehungsweise G_q -Protein-assoziierten Signalwege (Fribourg et al. 2011).

1.4.2 BRET & FRET zur Analyse oligomerisierter Rezeptoren

Am häufigsten kommen Biolumineszenz- und Fluoreszenz-Resonanzenergietransfer (BRET/FRET) zum Einsatz. In beiden Fällen bedient man sich einem Effekt, der als Resonanzenergietransfer bekannt ist: Grundlage sind zwei kompatible Fluorophore. Bei Exzitation eines Donorfluorophors kommt es zu dipolvermitteltem, strahlungsfreiem Energietransfer auf einen Akzeptor, wenn sich die beiden beteiligten Fluorophore in geeignetem Abstand (Förster-Radius) zueinander befinden. Nach dem Energietransfer emittiert dann im Idealfall nur das Akzeptorfluorophor ein Photon seiner (größeren) Wellenlänge (Förster 1948). Alternativ lässt sich stattgehabter Resonanzenergietransfer auch als Verringerung der Intensität, Länge oder als Anisotropie der Donoremission messen (Rajapakse et al. 2010).

Dieser Effekt kann nun verwendet werden, um die räumliche Nähe im Bereich der Förster-Radien beliebiger Strukturen zu zeigen. Die notwendige Entfernung liegt üblicherweise bei $d < 10\text{nm}$.

Bei BRET-basierten Analysen werden Fusionsproteine generiert, die C-terminal über ein biolumineszentes Protein, beispielsweise Renilla-reniformis-Luciferase (Rluc) als Donor und fluoreszente Proteine wie YFP als Akzeptor verfügen (Pfleger et al. 2006). Die subzelluläre Lokalisation ist mit diesem Ansatz nicht eindeutig bestimmbar. Außerdem bietet die Methode geringere Signalausbeute als auf synthetischen Fluorophoren basierende Methoden.

Der Übersicht halber werden weitere, für speziellere Anwendungen benötigte Methoden kurz erläutert:

Die Fluorescence-Recovery-After-Photobleaching-(FRAP)-Methode ist eine ebenfalls fluoreszenzbasierte Methode, die sich nicht dem Resonanzenergietransfer bedient. Nach antikörpervermittelter Immobilisation beispielsweise einer Rezeptorfraktion, werden die Fluorophore, die sich auf einem definierten Membranabschnitt befinden durch lange Exzitation gebleicht. Anschließend wird die Repopulation als Maß der Rezeptoroligomerisierung gedeutet (Dorsch et al. 2009).

1.4.3 Time-resolved FRET (tr-FRET)

Die in dieser Arbeit verwendete Technik (tr-FRET) bietet gegenüber den zuvor erläuterten Methoden mehrere Weiterentwicklungen.

Bei der tr-FRET-Methode wird als Donor ein in einem Chelatkomplex gebundenes Lanthanid (beispielsweise Terbium- oder Europium) verwendet. Genaugenommen handelt es sich bei der Lanthanidemission nicht um Fluoreszenz, sondern um eine physikalisch anders begründete Strahlung (Singulett-Singulett-Zustandsübergang). Die Lanthanide bieten gegenüber synthetischen oder biolumineszenten Proteinen zum einen deutlich länger anhaltende Emission im Millisekundenbereich und zum anderen einen breiten Stokes-Shift (Wellenlängendifferenz zwischen Exzitation und Emission) bei äußerst schmalen Emissionsspektren (Selvin & Hearst 1994; Selvin 2002).

Beim tr-FRET kann nun aufgrund der Länge der Emissionsdauer die Messung der Akzeptoremission zeitversetzt zur Exzitation des Donors erfolgen. Das Prinzip ist in Abbildung 1.3 dargestellt: Erst nachdem die kurzlebige Autofluoreszenz der Umgebung, beispielsweise anderer Proteine oder unspezifische Fluoreszenz des Zellkulturmediums und durch direkte Exzitation des Akzep-

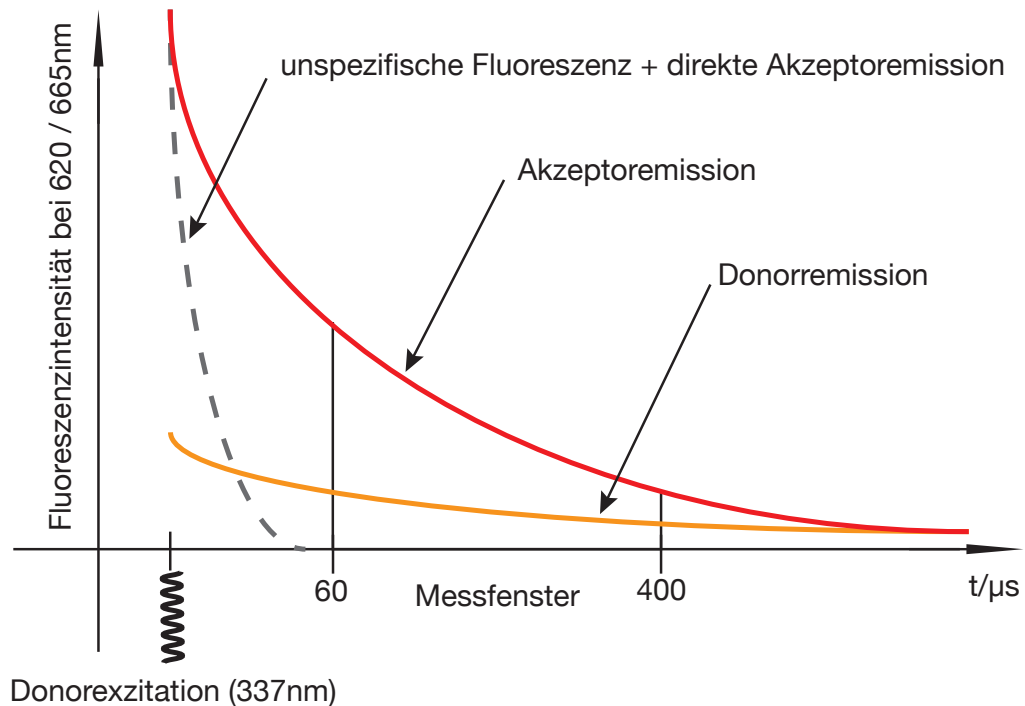


Abbildung 1.3: **Funktionsprinzip der tr-FRET-Methode:** Die Messung der Akzeptoremission erfolgt erst 60ns nach Exzitation des Donors. So können die Störsignale der kurzlebigen unspezifischen Matrixfluoreszenz und direkte Exzitation des Akzeptors durch den initialen Energiepuls minimiert werden.

tors entstehendes Signal größtenteils verschwunden sind, wird das eigentliche Akzeptorsignal als numerisches Integral über einem Messfenster (area under the curve) bestimmt (Selvin 2002).

Damit lässt sich das Verhältnis zwischen Signal und Hintergrund auf ein Niveau anheben, das ausreichend sein kann, Rezeptoroligomere in natürlich vorkommender Expressionsstärke nachzuweisen (Albizu et al. 2010).

Limitiert ist die Methode in Bezug auf den Nachweis der Anzahl der sich in einem Oligomer befindenden Protomere (s. Abschnitt 4.2).

Proteinmarkierung mit dem SNAP-tag

Zur spezifischen Adressierung von Proteinen wie den GPCRs existieren eine Reihe unterschiedlicher Systeme. Dazu zählen Verfahren wie das Proximity Ligation Assay (PLA) (Söderberg et al. 2006) oder N-terminale tags wie der Flag-tag, die sich auf strukturell große Antikörper stützen.

Daneben können tag-Systeme mit intrinsischer Enzymaktivität verwendet werden, um spezifische kovalente Bindungen mit den gewünschten Proteinuntereinheiten zu katalysieren (Gautier et al. 2008). Das in dieser Arbeit verwendete Prinzip beruht auf einem Proteinmarkierungssystem, das es erlaubt, Fluorophore kovalent an ein N-terminal lokalisiertes Fusionsprotein zu koppeln. Mittels eines mutierten DNA-Reparaturenzyms erfolgt die kovalente Bindung des tr-FRET-Fluorophors (s. 3.1). Dazu müssen die zu untersuchenden Proteine vor weiterer Charakterisierung jedoch zuerst um die Fusionsproteine erweitert werden, die die gewünschte Enzymaktivität besitzen. Es ist ersichtlich,

dass mit dieser Methode allein in primären Zellen noch kein Nachweis gelingen kann.

Nachweis von GPCR-Oligomeren mit fluoreszierenden Liganden

Mit einem komplizierteren Ansatz besteht die Möglichkeit, GPCRs mittels fluoreszierender Liganden auf ihre räumliche Nähe zu untersuchen. Fluoreszierende Liganden bieten den entscheidenden Vorteil, auch für nicht modifizierte, natürlich exprimierte Rezeptoren verwendet werden zu können. Es konnte bereits gezeigt werden, dass mit fluoreszierenden Liganden bei ausreichend hoher Expressionsstärke tr-FRET auch in primären Zellen, beziehungsweise Gewebstücken gemessen werden kann (Albizu et al. 2010).

1.5 Zielsetzung dieser Arbeit

Ziel dieser Arbeit war, die strukturelle Eigenschaft der Oligomerisierung des ADRB2 zu untersuchen. Dabei sollte zunächst unter Verwendung eines N-terminalen tag-Systems (SNAP-tag) in Kombination mit einem hochsensitiven trFRET-gestützten Ansatz die Methodik an transfizierten Zelllinien etabliert werden. In einem nächsten Schritt sollte mittels fluoreszierender Liganden der native ADRB2 auf seine Oligomerisierungseigenschaften geprüft werden. Schließlich sollte die Methode so weit optimiert werden, dass sie zukünftig für in-vivo-Untersuchungen etwa an Gewebstücken verwendet werden könnte.

Als grundlagenorientierte Untersuchung sollte diese Arbeit sich mit strukturell bedeutsamen Prinzipien befassen, die gegenwärtig Gegenstand der Arzneimittelforschung werden.

2 Material & Methoden

2.1 Material

2.1.1 Plasmide

Die folgenden Plasmide stammen entweder aus dem Laborbestand (IPT, TU München) oder wurden von New England Biolabs GmbH (Frankfurt a. M.) erworben. Sie wurden unverändert transfiziert bzw. für Klonierung verwendet.

Vektor	Insert	Referenz
pSNAPf	-	New England Biolabs GmbH (Frankfurt a. M.)
pCLIPf	-	New England Biolabs GmbH (Frankfurt a. M.)
pSNAPf	5mis-SNAP- <i>ADRB2</i> -Gly16	New England Biolabs GmbH (Frankfurt a. M.)
pCLIPf	5mis-SNAP- <i>ADRB2</i> -Gly16	New England Biolabs GmbH (Frankfurt a. M.)
pENTR	<i>ADRB2</i> -Arg16	IPT (TU München)
pT-REx Dest 30	-	IPT (TU München)

In die in der folgenden Tabelle aufgeführten Vektoren wurden die angegebenen Inserts kloniert. Dazu wurde die Methode der homologen Rekombination als Teil der Gateway-Technologie (Invitrogen GmbH, Karlsruhe) verwendet.

Vektor	Insert	Variante / Mutation
pSNAPf	5mis-SNAP- <i>ADRB2</i>	Arg16, Tyr284
pSNAPf	<i>ADRB2</i>	Arg16
pCLIPf	<i>ADRB2</i>	Arg16
pENTR	<i>ADRB2</i> -SNAP- <i>ADRB2'</i>	Arg16
pT-REx Dest 30	<i>ADRB2</i> -SNAP- <i>ADRB2'</i>	Arg16

2.1.2 Bakterien

Zur DNA-Amplifikation wurde der Bakterienstamm *E. coli* (DH10B) (IPT, TU München) verwendet.

2.1.3 Zelllinien & Zellkultur

Zur Transfektion und Mikroskopie bzw. als Negativkontrollen wurden die angegebenen Zelllinien verwendet.

Name	Ursprung (Organ)	Referenz
HEK293	humanes embryonales Nierenepithel	IPT (TU München)
HeLa	humanes Cervixepithel	IPT (TU München)
16HBE14o	humanes Lungenzellepithel	Getu Abraham (Universität Leipzig)
Calu-3	humanes Lungenzellepithel	Getu Abraham (Universität Leipzig)
A549	humanes Lungenzellepithel	Getu Abraham (Universität Leipzig)

Basierend auf den angegebenen HEK293- und HeLa-Zelllinien wurden folgende stabile Zelllinien generiert. Die mit *5-mis-SNAP* gekennzeichneten exprimierten Rezeptoren trugen am N-terminalen Ende eine vom Serotonin (5HT₃)-Rezeptor abgeleitete Membraninsertionssequenz, sowie direkt C-terminal anschließend den SNAP-Tag (New England Biolabs GmbH, Frankfurt a. M.).

Name	Stabil überexprimiertes Protein	Varianten/Mutation
SNAP- β_2 AR-HEK293	5mis-SNAP-ADRB2	Arg16, Gly16, Tyr284
SNAP- β_2 AR-HeLa	5mis-SNAP-ADRB2	Arg16, Gly16, Tyr284

2.1.4 Chemikalien & Reagenzien

Falls nicht anders angegeben, wurden alle Chemikalien und Reagenzien von Applichem (Darmstadt), Carl Roth (Karlsruhe), Merck (Darmstadt) und Sigma-Aldrich (Taufkirchen) bezogen.

2.1.5 SNAP-Substrate und fluoreszierende Liganden

Die SNAP-Substrate, die über eine O⁶-Benzylguanin-Gruppe verfügten, sind mit *BG* gekennzeichnet.

Die verwendeten Fluorophore waren mit der Methode des *Time Resolved Fluorescence Resonance Energy Transfer (tr-FRET)* kompatibel: Als Donorfluorophor wurde ein Tb³⁺-Cryptat (*Lumi4*, Cisbio Bioassays, Codolet, Frankreich) verwendet. Als Akzeptor wurde auf *d2* (ein kommerzielles Alexa 647-Derivat, Cisbio Bioassays, Codolet, Frankreich) und Alexa 647 zurückgegriffen.

Die fluoreszierenden Liganden basierten auf dem inversen β_2 Adrenozeptoragonisten ICI-118,551 (ICI). Über einen Linker waren die angegebenen Fluorophore an den Liganden kovalent gekoppelt. Die Verbindungen wurden wie angegeben zur Synthese in Auftrag gegeben.

Name	Referenz
BG-Alexa 488	New England Biolabs (Frankfurt a. M.)
BG-d2	Cisbio Bioassays (Codolet, Frankreich)
BG-Lumi4	Cisbio Bioassays (Codolet, Frankreich)
ICI-Alexa 647	Prof. Dr. Peter Gmeiner, Universität Erlangen-Nürnberg
ICI-Lumi4	Cisbio Bioassays (Codolet, Frankreich)

2.1.6 Enzyme

Die in der Tabelle angegebene Enzyme kamen zum Einsatz.

Name	Referenz
DNA Ligase T4	New England Biolabs (Frankfurt a. M.)
DNA Polymerase AccuPrime <i>Pfx</i>	Invitrogen (Karlsruhe)
DNA Polymerase Quikchange Lightning	Agilent Technologies (Waldbronn)
N-Glykosidase F (PNGase F)	New England Biolabs (Frankfurt a. M.)
Restriktionsendonukleasen	New England Biolabs (Frankfurt a. M.)

2.1.7 Oligonukleotidprimer

Die Oligonukleotidprimer wurden entweder von Eurofins MWG Biotech (Ebersberg) oder Sigma-Aldrich (München) synthetisiert. Sie wurden in bidestilliertem Wasser (*ddH₂O*) gelöst und auf 1mM eingestellt.

Name	Sequenz (5' → 3')	Produkt
Klonierung		
ADRB2-SbfI-for	AAA AAA CCT GCA GGC GGG CAA CCC GGG AAC GG	<i>SbfI</i> -ADRB2- <i>XhoI</i>
ADRB2-XhoI-rev	ATG ACT CAC TGC TGT AAC TCG AGT TTT TT	
SNAP-MfeI-for	AAA AAA CAA TTG CGA CAA AGA CTG CGA AAT GAA G	<i>MfeI</i> -SNAP-tag- <i>MfeI</i>
SNAP-MfeI-rev	AAA AAA CAA TTG ATA CCC AGC CCA GGC TTG CC	
Mutagenese		
ADRB2-c850t_t851a-for	CAT GGG CAC TTT CAC CTA CTG CTG GCT GCC CTT C	ADRB2(Leu284Tyr)
ADRB2-c850t_t851a-rev	GAA GGG CAG CCA GCA GTA GGT GAA AGT GCC CAT G	
ADRB2-c549t-for	CCC ACC AGG AAG CCA TCA ATT GCT ATG CCA ATG A	ADRB2-MfeI-ADRB2'
ADRB2-c549t-rev	TCA TTG GCA TAG CAA TTG ATG GCT TCC TGG TGG G	

2.1.8 Pharmaka

Name	Typ	Referenz
Alprenolol	β_2 -Adrenozeptorantagonist	Sigma-Aldrich GmbH
ICI-118,551	inverser β_2 -Adrenozeptorantagonist	Sigma-Aldrich GmbH
Isoprenalin	β_2 -Adrenozeptoragonist	Sigma-Aldrich GmbH
Adrenalin	Adrenozeptoragonist	Sigma-Aldrich GmbH

2.2 Molekularbiologische Methoden

2.2.1 DNA-Amplifikation mittels Polymerasekettenreaktion (PCR)

Zur Amplifikation von kodierender DNA wurde die Methode der Polymerasekettenreaktion (PCR) mittels des Enzyms AccuPrime *pfx* DNA Polymerase verwendet. Dabei wurde folgendes Reaktionsgemisch vorbereitet.

cDNA oder Plasmid-DNA	100ng
Vorwärtsprimer	20pmol
Rückwärtsprimer	20pmol
AccuPrime <i>pfx</i> Reaktionspuffer	5µL
AccuPrime <i>pfx</i> DNA Polymerase	1µL
ddH ₂ O	ad 50µL

Das Reaktionsgemisch wurde nach folgendem Protokoll in einem Mastercycler Pro (Eppendorf, Hamburg) zur DNA-Amplifikation den angegebenen Zyklen ausgesetzt.

	Temperatur	Dauer	Zyklen
Initiale Denaturierung	95°C	120s	1
Denaturierung	95°C	15s	35
Annealing	57°C	30s	
Elongation	68°C	60s/kb	
Finale Elongation	68°C	60s	1

2.2.2 Agarose-Gelelektrophorese

50xTAE-Puffer:	Tris	242g
	Essigsäure (0,5M)	57,1mL
	Na ₂ EDTA x 2H ₂ O	37,2mL
	ddH ₂ O	ad 1L

5xDNA-Ladepuffer:	Xylencyanol	0,025g
	EDTA (0,5M)	1,4mL
	Glycerol	3,6mL
	ddH ₂ O	7,0mL

Die Herstellung eines einprozentigen Agarosegels erfolgte mit 1g Agarose in 100mL 1xTAE-Puffer, die durch Erhitzen in einer Mikrowelle gelöst wurde. Nach Abkühlen auf etwa 45°C wurden 6,5µL Ethidiumbromid hinzugefügt und das Gel mit den gewünschten Kämmen gegossen. Nach dem Auspolymerisieren wurde das Gel in eine mit 1xTAE-Puffer befüllte Elektrophoresekammer (Peqlab, Erlangen) transferiert. Die DNA-Proben wurden 1:5 mit DNA-Ladepuffer verdünnt und in die Geltaschen geladen. Parallel wurden Marker (1-10kb, NEB) in eine Geltasche geladen.

An die so beladene Gelkammer wurde eine Spannung von 120V für 45min angelegt. Die negativ geladenen DNA-Fragmente liefen abhängig von ihrer Länge mit unterschiedlicher Geschwindigkeit

anodenwärts. Das sich im Gel befindliche Ethidiumbromid interkalierte in die doppelsträngige DNA.

Anschließend konnte unter UV-Licht (Wellenlänge 312nm) der Standard mit den gesuchten Fragmenten abgeglichen werden.

2.2.3 Extraktion von DNA aus Agarosegelen

Zur Extraktion von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen wurde die gewünschte DNA-Bande mit einem sterilen Skalpell ausgeschnitten und mithilfe des QIAquick Gel Extraction Kit (Qiagen, Hilden) gemäß dem Protokoll des Herstellers extrahiert. Schließlich wurde die DNA aus der Extraktionssäule mit 15µL ddH₂O eluiert.

2.2.4 Restriktionsenzymverdau von PCR-Produkten und Plasmid-DNA

PCR-Produkte und Plasmid-DNA wurden entsprechend den Empfehlungen des Enzymherstellers (New England Biolabs, Frankfurt a. M.) mit Restriktionsendonukleasen verdaut. Wenn möglich wurden die High-Fidelity-(HF)-Varianten der Restriktionsenzyme verwendet.

Für den vollständigen Verdau von Plasmid-DNA wurden 1-2U des gewünschten Enzyms mit 1µg DNA für 2,5h bei 37°C inkubiert. Zur Überprüfung der DNA-Fragmentlänge nach Mini-Präparation durchlief die verdaute DNA erneut eine Gelelektrophorese.

2.2.5 Ligation von DNA-Fragmenten

Zur Ligation von DNA-Fragmenten (Insert-DNA und Vektor-DNA) wurde die T4 DNA-Ligase (New England Biolabs, Frankfurt a. M.) verwendet.

Das Verhältnis der Insertkopienanzahl gegenüber dem Vektor wurde mindestens 3:1 gewählt. Die zu verwendende Masse des Inserts wurde dazu wie folgt berechnet:

$$m(\text{Insert}) = \frac{3 \times m(\text{Vektor}) \times \text{Länge des Inserts in Basenpaaren}}{\text{Länge des Vektors in Basenpaaren}}$$

Ein Ligationsansatz wurde folgendermaßen hergestellt:

10x T4-Ligase Puffer	1,5µL
T4 DNA-Ligase	1µL
Vektor-DNA	2,5µL ≙ 100ng
Insert-DNA	xx µL
ddH ₂ O	ad 15µL

Die Ligation erfolgte 30min – 60min bei 22°C oder über Nacht bei 16°C. Anschließend wurden 3µL für die Transformation von DH10B-Bakterien verwendet (s. 2.2.8).

2.2.6 Klonierung mittels Gateway-Technologie

Die Gateway Technologie (Invitrogen, Karlsruhe) ist ein kommerziell verfügbares System zur effizienten Klonierung und Transfektion mittels gelieferter wohldefinierter Vektoren. Es wird dabei zwischen „Entry-“ und „Destinationsvektoren“ unterschieden. In dieser Arbeit wurde ein bestehender „Entry-Vektor“ modifiziert und mit der LR-Reaktion in einen „Destinationsvektor“ kloniert.

LR-Reaktion

Die im Kit enthaltenen Enzyme „Excisionase“, „Integration Host Factor“ und „Integrase“ katalysieren die Rekombination zwischen der mit der *attL*-Sequenz flankierten DNA im Entryvektor und dem mit der *attR*-Sequenz flankiertem Abschnitt des Destinationsvektors (*LR-Reaktion*).

pENTR (Entryvektor)	150ng
pT-Rex DEST30	150ng
TE-Puffer, pH 8	ad 8µL
LR-Clonase II	2µL

Das so vorbereitete Reaktionsgemisch wurde 1h bei 25°C inkubiert. Darauf wurde 1µL Proteinase K zugegeben und die Reaktion durch 10min Inkubation bei 37°C gestoppt. 1µL des DNA-Reaktionsgemisches wurde wie beschrieben in DH10B-Bakterien elektroporiert und so amplifiziert.

2.2.7 Mutagenese

Zur Generierung der dimerisierungsdefizienten Variante Tyr284 des ADRB2 und der Klonierung des SNAP-tags in den zweiten extrazellulären Loop des ADRB2 wurde der „QuikChange Lightning Site-Directed Mutagenesis Kit“ (Agilent, Waldbronn) verwendet.

Die Mutagenese beruht auf einander komplementären „Vorwärts-“ und „Rückwärtsprimern“, die die gewünschte Mutation enthalten. Eine DNA-Polymerase katalysierte die Elongation der Plasmide. Das Reaktionsgemisch wurde den nachfolgend beschriebenen Zyklen ausgesetzt. Dadurch wurden die gewünschte Mutation tragende Plasmide generiert.

10x Reaktionspuffer	5µL
Ausgangsplasmid	100ng
Vorwärtsprimer	125ng
Rückwärtsprimer	125ng
dNTP-Mix	1µL
QuikSolution-Reagenz	1,5µL
ddH ₂ O	ad 50µL
DNA-Polymerase Quikchange Lightning	1µL

Das Reaktionsgemisch wurde nachfolgend mit 2µL des DpnI-Enzyms 5min bei 37°C verdaut. Mittels dieses Enzyms wurde methylierte und hemimethylierte DNA – damit das nicht mutierte Ausgangsplasmid – degradiert. Anschließend wurden 2µL des so verdauten PCR-Produktes mittels Transformation durch Elektroporation in DH10B-Bakterien amplifiziert.

Temperatur	Dauer	Zyklen
95°C	120s	1
95°C	20s	18
60°C	10s	
68°C	30s/kb	
68°C	300s	1

2.2.8 Transformation elektrokompeter DH10B-Bakterien

LB-Agar:	1% Bacto-Trypton	10g
	0,5% Hefeextrakt	5g
	0,5% NaCl	5g
	Agar	15g
	NaOH 1M	1mL
	ddH ₂ O	ad 1L

LB-Medium:	1% Bacto-Trypton	10g
	0,5% Hefeextrakt	5g
	0,5% NaCl	5g
	NaOH 1M	1mL
	ddH ₂ O	ad 1L

nach Resistenzgen des Plasmids: Ampicillin 100µg/mL
Kanamycin 33µg/mL

Zur DNA-Amplifikation von Plasmiden oder Ligationsprodukten wurden 0,5µL Plasmid-DNA bzw. 3µL Ligationsreaktion zu 50µL elektrokompeteren DH10B-Bakterien gegeben, in eine LB-Medium-gefüllte Küvette (Gene Pulser 0,1cm Cuvette, Bio-Rad GmbH, München) überführt und mit einem Elektroporationsgerät (MicroPulser, Bio-Rad GmbH, München) eine gepulste Spannung von initial 1,8kV angelegt. Das Elektroporationsprodukt wurde sofort in ein 1,5mL-Reaktionsgefäß überführt und in einem Schüttelinkubator (Thermomixer, Eppendorf AG, Hamburg) für 1h bei 37°C und 350rpm inkubiert.

Bei Plasmid-Amplifikation wurden verschiedene Verdünnungen um 1:10, bei Ligation das vollständige Bakterienvolumen auf Agarplatten ausgestrichen, die über das dem Resistenzgen des Vektors entsprechende Antibiotikum verfügten. Die Agarplatten wurden über Nacht bei 37°C inkubiert.

2.2.9 Mini/Maxi-Kultur und Mini/Maxi-DNA-Aufreinigung

Zur weiteren DNA-Amplifikation im Rahmen einer Mini-Kultur wurde mittels einer sterilen Pipettenspitze eine einzelne Bakterienkolonie von einer Agarplatte aufgenommen und in ein Reaktionsgefäß mit 4mL LB-Medium und dem Vektor entsprechenden Antibiotikum (Ampicillin 100µg/mL bzw. Kanamycin 33µg/mL) abgeworfen. In einem Schüttelinkubator (Thermoschüttler, Adolf-Kühner AG, Birsfelden) wurde die Kultur mindestens 6h oder über Nacht bei 37°C und

170rpm inkubiert.

Die im folgenden beschriebene DNA-Aufreinigung erfolgte unter Verwendung der Puffer des Plasmid Maxi Kits (Qiagen, Hilden).

Mini-DNA-Aufreinigung

1,5mL der Mini-Kultur wurden in einem 1,5mL Reaktionsgefäß für 15s bei 15000rpm abzentrifugiert, der Überstand verworfen. Zur Vergrößerung des Pellets wurde der Zentrifugationsschritt nach erneuter Zugabe von 1,5mL der Mini-Kultur wiederholt.

Das Pellet wurde in 250µL Resuspensionspuffer (P1) zur Degradation der bakteriellen RNA aufgenommen und 5min bei Raumtemperatur inkubiert. Nach Zugabe von 250µL Lysispuffer (P2) wurden die Proben gemischt und erneut 5min bei Raumtemperatur inkubiert. Die so in alkalischem Niveau lysierten Zellen wurden mit 300µL auf 4°C gekühltem Neutralisierungspuffer (P3) neutralisiert und 5min auf Eis inkubiert.

Nach Zentrifugation (10min, 15000rpm, 4°C) wurde die im Überstand befindliche DNA in ein neues Reaktionsgefäß überführt und mit 750µL reinem Ethanol für 5min bei Raumtemperatur präzipitiert. Mit einem weiteren Zentrifugationsschritt (5min, 15000rpm, 4°C) wurde die DNA pelletiert, mit 750µL 70%igem Ethanol gewaschen, nochmals eine Minute zentrifugiert, luftgetrocknet und in 10µL ddH₂O gelöst. Die Konzentration der DNA wurde photometrisch bestimmt.

Nach Restriktionsverdau zur Integritätsprüfung der über Mini-Präparation amplifizierten Plasmide erfolgte weitere Amplifikation mittels Maxi-Kultur. Zur weiteren Amplifikation wurden 2ml der Mini-Kultur in sterile Erlenmeyer-Reaktionsgefäße mit 100mL LB-Medium sowie dem entsprechenden Antibiotikum überführt und wiederum über Nacht im Schüttelinkubator inkubiert.

Maxi-DNA-Aufreinigung

Die Maxi-Kulturen wurden bei 6000g für 10min bei 4°C abzentrifugiert (Zentrifuge 5810R, Eppendorf, Hamburg), der Überstand verworfen. Die DNA-Aufreinigung der Maxi-Kultur erfolgte entsprechend den Vorgaben des Herstellers des Plasmid Maxi Kits von Qiagen (Hilden). Dazu wurde nach Degradation der in der Bakterienkultur befindlichen RNAasen eine alkalische Zellyse durchgeführt, der pH-Wert anschließend angepasst und in salzfreier Lösung bei passendem pH die negativ geladene DNA über eine Anionenaustauschersäule gebunden, eluiert und mit Isopropanol präzipitiert. Das luftgetrocknete DNA-Pellet wurde in 150µL ddH₂O gelöst und die Konzentration wie beschrieben bestimmt.

2.2.10 Enzymatische Deglykosylierung

N-Glykosidase F (PNGase F, New England Biolabs, Frankfurt am Main) ist ein Enzym, das N-Glykan-Ketten hydrolysiert. Es eignet sich damit zur Deglykosylierung von humanen Proteinen.

In 384-well-Mikrotiterplatten wurden mittels einer passenden Multipipette 7000 Zellen, die das zu deglykosylierende Protein exprimierten ausgesät und über Nacht inkubiert. Zur Deglykosylierung wurden 60U des PNGase-Enzyms mit DMEM++ gemischt. Das Zellkulturmedium wurde durch dieses Medium ersetzt. Zur enzymatischen Deglykosylierung wurden die Mikrotiterplatten 1h bei 37°C und 5%CO₂ inkubiert. Darauf wurden die Zellen für weitere fluoreszenzoptische Färbungen, wie in 2.5.1 beschrieben, verwendet.

2.2.11 Messung der DNA-Konzentrationen

Die Bestimmung der Konzentration in Wasser gelöster DNA erfolgte mittels des Spektrophotometers ND-1000 (NanoDrop, Wilmington, USA) und der vom Hersteller mitgelieferten Software. Mithilfe der NanoDrop Software konnte über die Absorption bei 260nm die Konzentration der gelösten DNA und über den Quotienten der Absorption bei 260nm und 280nm die Reinheit der Probe bestimmt werden. Lag der Quotient über 1,8, konnte von einem hohen Reinheitsgrad, d.h. geringer Kontamination mit Proteinen, Phenol oder anderen Kontaminanten ausgegangen werden.

2.2.12 DNA-Sequenzierung

Die Sequenzierung von Plasmid-DNA und PCR-Produkten wurde durch Eurofins MWG Biotech (Ebersberg) durchgeführt. Dazu wurden 20µL in ddH₂O gelöster DNA der Konzentration 0,1µg/µL zur Sequenzierung gegeben und die Sequenz anschließend mit der Software MacVector (MacVector, Inc.) mit der erwarteten Basenfolge abgeglichen.

2.3 Methoden der eukaryotischen Zellbiologie

2.3.1 Kultivierung eukaryotischer Zelllinien

HEK293-, HeLa-Zellen und die Lungenepithelzellen Calu-3, 16HBE14o, A549 wurden bei 5%CO₂ und 37°C in folgendem Zellkulturmedium inkubiert:

DMEM+++ Dulbecco's modified eagle's medium (DMEM) (Invitrogen, Karlsruhe)
+ 1% L-Glutamin
+ 1% Penicillin (10.000U/mL) / Streptomycin (10.000 µg/mL)
+ 10% fötales Rinderserum (FBS)

Transfizierte Zelllinien wurden zusätzlich mit folgendem Antibiotikum kultiviert:
+ 0,4g/L Genticin (G-418)

das Kulturmedium für Calu-3, 16HBE14o und A549 enthielt zusätzlich:
+ 1% Non-Essential-Amino-Acids (NEAA) (Invitrogen, Karlsruhe)

Die Zelllinien wurden in 6cm- bzw. 10cm-Zellkulturschalen (Nunc, Thermo Scientific, Braunschweig) kultiviert. Die Zelllinien verdoppelten ihre Zellzahl in Kultur nach etwa 24h und wuchsen als adhärenzte Monolayer. Alle drei bis vier Tage wurden die Zellen gesplittet. Nach Absaugen des Mediums und einmaligem Waschen mit Dulbecco's Phosphate Buffered Saline (PBS) wurden die Zellen mit Trypsin-EDTA-Lösung (0,5g/L Trypsin, 0,2g/L EDTA, Invitrogen, Karlsruhe) für 1min

bei 5%CO₂ und 37°C inkubiert, die Trypsin-EDTA-Lösung abgenommen und die nun abgelösten Zellen in Kulturmedium resuspendiert. Sie wurden 1:8 in neue Kulturschalen mit vorgelegtem Medium gesät.

2.3.2 Auftauen und Einfrieren von Zellen

Einfriermedium DMEM+++ (s. 2.3.1)
+ 10% Dimethylsulfoxid (DMSO)

Zum Auftauen von zuvor in flüssigem Stickstoff gefrorenen Zellen, wurden sie in Kryogefäßen (Sarstedt AG, Nümbrecht) in einem Wasserbad bei 37°C aufgetaut. Währenddessen wurden die beschriebenen Zellkulturmedien auf 37°C vorgewärmt und in Zellkulturschalen vorgelegt. Die aufgetaute Zellsuspension wurde zugegeben. Nach etwa vier Stunden, wenn die Zellen adhärent waren, wurde das Zellkulturmedium abgesaugt und durch frisches Medium ersetzt, das kein DMSO mehr enthielt.

Sollten kultivierte Zellen eingefroren werden, wurden sie mittels Trypsin-EDTA-Lösung von den Zellkulturschalen abgelöst (s. 2.3.1), in einem 15mL-Reaktionsgefäß bei 1200rpm für 5min bei Raumtemperatur zentrifugiert und in auf 4°C gekühltem Einfriermedium resuspendiert. Jeweils 1mL der Suspension wurde in vorgekühlte Kryogefäße gefüllt und bei -20°C gefroren. Nach 24h wurden sie weiter auf -80°C gekühlt. Nach weiteren 24h konnten die gefrorenen Zellen in flüssigen Stickstoff überführt werden.

2.3.3 Transiente Transfektion von HEK293- und HeLa-Zellen mit Effectene

Zur transienten Transfektion von HEK293- und HeLa-Zellen wurde Effectene (Qiagen, Hilden) benutzt.

Zum Zeitpunkt der Transfektion waren die Zellen in 6-Well-Platten bzw. 6cm-Zellkulturschalen zu 60-80% konfluent kultiviert. Unmittelbar vor der Transfektion wurden die Zellen einmal mit PBS gewaschen, daraufhin die unten beschriebene Menge DMEM vorgelegt.

Zur Herstellung des Transfektionsansatzes wurden angegebene Volumina der zu transfizierenden Plasmid-DNA, EC-Puffer und Enhancer vermischt und fünf Minuten bei Raumtemperatur inkubiert.

Mit dem Enhancer wurden die DNA-Moleküle in einem durch den EC-Puffer korrekt eingestellten Puffersystem zuerst kondensiert. Die anschließende Zugabe des Effectene-Reagenzes führte zur Komplexierung der DNA mit einem kationischen Lipid.

Nach ausreichendem Mischen und zehnminütiger Inkubation konnte die so komplexierte DNA tropfenweise auf die zu transfizierenden Zellen gegeben werden. Die DNA-Moleküle konnten damit in den Zellkern eingeschleust werden. Nun in großer Zahl im eukaryoten Zellkern vorhandene transfizierte DNA wurde von den Zellen abgelesen und führte zu einem ausreichend hohen Expressionslevel.

Mit dem verwendeten Reagenz konnte eine Transfektionseffizienz von etwa 70% erreicht werden.

	6-Well-Platte	6cm-Schale
DNA (1µg/µL)	0,4µg	1µg
EC-Puffer	100µL	150µL
Enhancer	3,2µL	8µL
1s vortexen und 5min bei Raumtemperatur inkubieren		
Effectene	5µL	10µL
10s vortexen und 10min bei Raumtemperatur inkubieren		
DMEM	600µL	1mL
DMEM vorgelegt	1,5mL	4mL

2.3.4 Generierung stabil exprimierender HEK293- und HeLa-Zelllinien

Mit den Plasmiden aus 2.1.1 wurden unter Verwendung der in 2.3.3 beschriebenen Methode HEK293- und HeLa-Zellen mit Effectene transfiziert. Danach wurden die überexprimierenden Zellen in 10cm-Zellkulturschalen ausgesät. 24h nach Transfektion wurden die Zellen täglich für ein bis zwei Wochen mit frischem Medium versorgt, das mit 0,8g/L Genticin versetzt war.

Alle verwendeten Plasmide besaßen das Neomycin-Genticin-Resistenzgen (Neo^r). Zellen, die die transfizierte Plasmid-DNA stabil in ihr Genom integriert hatten, konnten so mit Genticin (G-418, Invitrogen, Karlsruhe) selektioniert werden.

Als unter dem invertierten Mikroskop einzelne Kolonien erkennbar waren, wurden diese gepickt und in eigenen Zellkulturschalen ausgesät. Die so entstandenen heterogen exprimierenden Zellen wurden für fluoreszenzoptische Untersuchungen herangezogen.

2.4 Mikroskopische Methoden

2.4.1 Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen

Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen von lebenden Zellen wurden an einem Inversmikroskop (Axio Observer Z1, Zeiss, Göttingen) durchgeführt. Die Mikroskopie wurde mit den Plan-Apochromat 63x und Plan-Apochromat 40x Ölimmersionsobjektiv vorgenommen. Folgendes Filterset (Chroma Technology, Bellow Falls, USA) kam dabei zur Verwendung:

Fluorophor	Anregungsfilter	Strahlenteiler	Emissionsfilter
Alexa 488	ET470/40x	T495LPXR	ET525/50x

Mit einer Retiga 4000DC Kamera (Qimaging, Burnaby, Kanada) konnten hochauflösende Graustufenbilder mit einer Auflösung von 2048x2048 Bildpunkten aufgenommen werden.

2.4.2 Fluoreszenzfärbungen mit SNAP-Substraten

Zur Färbung von lebenden Zellen, die ein Protein exprimierten, das den SNAP-tag trug, wurden die in 2.1.4 angegebenen SNAP-Substrate verwendet.

Stabil oder transient exprimierende HEK293- bzw. HeLa-Zellen wurden in einer Zellkonzentration von $2,5 \times 10^5$ /mL in 100 μ L Medium schwarze, für die Fluoreszenzmikroskopie spezialisierte 96-well-Platten (μ -Plate, ibidi, Martinsried) ausgesät und mindestens fünf Stunden oder bevorzugt über Nacht im passenden Zellkulturmedium kultiviert, um ausreichende Adhärenz zu gewährleisten. Um die Adhärenz weiter zu verbessern wurden die Mikroskopieplatten vor Verwendung für 30min bei 37°C mit Poly-D-Lysin beschichtet und einmal mit PBS gewaschen.

Für jedes Well wurden SNAP-Substrat-Lösungen mit 1 μ M BG-Alexa 488 in 50 μ L DMEM++ vorbereitet.

Das Zellkulturmedium wurde abgesaugt, die Zellen mit 50 μ L des vorbereiteten Färbemediums mit den SNAP-Substraten für 30min bei 37°C und 5% CO₂ inkubiert. Nach dem Färben wurden die Zellen drei Mal mit 100 μ L PBS gewaschen, um freies SNAP-Substrat, sowie eventuell störende Einflüsse des im DMEM-Zellkulturmedium enthaltenen Indikators zu reduzieren. Die so gefärbten Zellen wurden in 50 μ L PBS mikroskopiert. Zur Mikroskopie wurde das in 2.4 angegebene Inversmikroskop mit dem passenden Filterset verwendet.

2.4.3 Färbungen mit fluoreszierenden Liganden

Zur Fluoreszenzfärbung von Zellen, die den nicht-modifizierten ADRB2 exprimierten, konnten die in 2.1.5 angegebenen extern synthetisierten fluoreszierenden Liganden verwendet werden. Dazu wurden 3×10^5 Zellen, sowie untransfizierte HeLa-Zellen als Negativkontrolle in 150 μ L in 96-well-Mikrotiterplatten (μ -Plate, ibidi, Martinsried) ausgesät und mindestens 5h bei 37°C und 5% CO₂ inkubiert.

Zur Färbung mit dem fluoreszierenden Liganden ICI wurden sättigende Konzentrationen des Derivates verwendet. Das Zellkulturmedium wurde durch frisches DMEM++ ersetzt, das mit 10nM bzw. 100nM der fluoreszierenden Liganden versetzt war. Nach einem einstündigen Inkubationsschritt bei 37°C und einmaligem Waschen mit PBS wurden die Zellen mit dem in 2.4 beschriebenen Inversmikroskop evaluiert.

2.5 Fluoreszenzoptische Methoden

Alle tr-FRET-Studien wurden entweder in 96-well-Platten (μ -Plate, ibidi, Martinsried) oder 384-well-Platten (Nunc, Thermo Fisher Scientific, Braunschweig) durchgeführt. Die Mikrotiterplatten wurden

in einem Mikrotiterplattenlesegerät (Pherastar FS, BMG Labtech, Ortenberg) ausgelesen.

In allen Versuchen wurde sowohl die Intensität bei 620nm als auch bei 665nm gemessen. Für jedes Well der Mikrotiterplatten wurden jeweils 60 Messzyklen (*flashes per well*) durchgeführt. Die Messwerte repräsentieren eine Fläche unter der Intensitätskurve im Zeitverlauf (*AUC*). Zur numerischen Integration wurden dazu die Messbereiche zwischen 60 μ s bis 400 μ s nach initialer Exzitation gewählt.

2.5.1 tr-FRET mit SNAP-Substraten

Zur Messung von intermolekularem tr-FRET zwischen β_2 -Adrenozeptoren, die mit dem SNAP-tag versehen waren, wurden unterschiedliche Versuchsreihen durchgeführt. In einem Schritt wurde die Interaktion zwischen tr-FRET-Donor und tr-FRET-Akzeptor geprüft. Im zweiten war zu überprüfen, ob eine lineare Korrelation zwischen transfizierter DNA-Menge und tr-FRET-Signal bestand.

Interaktion zwischen tr-FRET-Donor und tr-FRET-Akzeptor

Um ausreichende Zelladhärenz zu gewährleisten, mussten alle Mikrotiterplatten zuvor mit Poly-D-Lysin beschichtet werden. 384-well-Platten wurden dazu mit 25 μ L Poly-D-Lysin für 30min bei 37°C inkubiert und einmal mit PBS gewaschen.

10⁵ Zellen pro Well der stabil oder transient exprimierenden HEK293- bzw. HeLa-Zellen wurden in 6-Tupeln für jede Bedingung in 30 μ L passenden Mediums in die Mikrotiterplatten ausgesät. Die Mikrotiterplatten wurden über Nacht bei 37°C und 5% CO₂ inkubiert.

Zur Reaktion mit den SNAP-Substraten wurden die in 2.1.5 angegebenen Donor- und Akzeptorfluorophore mit O⁶-Benzylguaningruppen in doppelter Konzentration im Vergleich zur finalen Konzentration vorbereitet. Die Konzentration des Akzeptorfluorophors wurde dabei über die angegebenen Bereiche variiert, während die Konzentration des Donorfluorophors BG-Lumi4-Tb konstant auf eine finale Konzentration von 10nM festgesetzt wurde. Die SNAP-Substrate wurden im Vergleich zur Stock-Konzentration (teilweise DMSO-haltig) in starker Verdünnung in DMEM++ angesetzt. Anschließend wurden zum Erreichen der finalen Konzentration die Lösungen 1:1 gemischt.

Zur Reaktion zwischen SNAP-tag und Benzylguaningruppe wurde das in den Wells vorhandene Zellkulturmedium durch 10 μ L pro Well der vorbereiteten Lösungen ersetzt. Die Mikrotiterplatten wurden 1h bei 37°C und 5% CO₂ inkubiert.

Nach der Inkubation wurden die Zellen vier Mal mit reinem PBS gewaschen. Im Falle einer Ligandenstimulation wurden sie nach dem letzten Waschschrift in einer PBS-Lösung aufgenommen, die den Liganden enthielt, sonst wurde reiner PBS-Puffer zugegeben.

Die Mikrotiterplatten wurden wie angegeben im Mikrotiterplattenlesegerät ausgelesen. Die trFRET-Ratio wurde als Quotient aus den gemessenen Intensitäten bei 665 nm und 620 nm bestimmt.

Messung des tr-FRET-Signals bei Ligandenstimulation

Zur Messung des tr-FRET-Signals SNAP-getaggtter Rezeptoren im Falle einer Ligandenstimulation wurden Versuchsreihen analog zu 2.5.1 durchgeführt. Die Konzentration des Akzeptorfluorophors wurde jedoch auf den Wert festgesetzt, mit dem das maximale tr-FRET-Signal zu erwarten war ([BG-Lumi4] = 10nM; [BG-d2] = 100nM).

Dieser Versuch wurde in zwei Varianten durchgeführt:

In der ersten Variante erfolgte eine Prästimulation mit den Agonisten und Antagonisten. Die Inkubation erfolgte ebenfalls mit Lösungen, die sowohl Donor- und Akzeptorfluorophor als auch die Liganden enthielten. Schließlich wurde mit PBS-Lösungen gewaschen, die ebenfalls die Liganden enthielten.

In einer zweiten Variante wurden die Liganden ausschließlich in den letzten Puffer gegeben, in dem auch die Messung erfolgte.

Korrelation zwischen transfizierter DNA-Menge und tr-FRET-Signal

Zur Messung des Einflusses der transfizierten Plasmid-Masse auf die Intensität des tr-FRET-Signals wurden 2×10^5 Zellen pro Well in einer – wie beschrieben mit Poly-D-Lysin beschichteten – 96-well-Mikrotiterplatte (μ -Plate, ibidi, Martinsried) ausgesät und über Nacht bei 37°C und 5% CO₂ inkubiert.

Wie in 2.3.3 beschrieben, wurden zwischen 1ng und 200ng Plasmid-DNA, die für ein SNAP-tag tragendes Protein codierte, transfiziert. Die Zellen wurden 5h bei 37°C und 5% CO₂ inkubiert.

Anschließend wurden die transient exprimierenden Zellen mit entweder nur 10nM des SNAP-Substrat des Donor-Fluorophores BG-Lumi4 für 1h bei 37°C und 5% CO₂ oder mit 10nM BG-Lumi4 und 100nM BG-d2 inkubiert und vier Mal mit PBS gewaschen.

Die Mikrotiterplatten wurden im Mikrotiterplattenlesegerät Pherastar FS (BMG Labtech, Ortenberg) ausgelesen. Über die Messung der Signalintensität bei 620nm der nur mit dem Donor-Fluorophor gefärbten Zellen konnte die Menge des exprimierten Rezeptors bestimmt werden. Parallel konnte die tr-FRET-Intensität bei 665nm (ΔF_{665}) der mit Donor- und Akzeptorfluorophor gefärbten Zellen gemessen werden.

Es erfolgte eine statistische Regressionsanalyse mit Prism 6 (GraphPad, La Jolla, USA), bei der die Signalintensität bei 620nm gegen die tr-FRET-Intensität aufgetragen wurde.

2.5.2 tr-FRET mit fluoreszierenden Liganden

Ligandenbindung und -sättigung

Zur Bestimmung der Sättigungskonzentration des fluoreszierenden tr-FRET-Donor-Liganden wurden 8000 Zellen pro Well in Poly-D-Lysin beschichtete 384-Well-Mikrotiterplatten ausgesät und über Nacht bei 37°C und 5% CO₂ inkubiert.

Zur Ligandenbindung wurde Zellkulturmedium DMEM+++ mit steigenden Konzentrationen des Donor-Liganden (Lumi4-ICI) vorbereitet. Für jede Bedingung wurde ein 6-Tupel gemessen.

Das Zellkulturmedium wurde abgesaugt und durch das vorbereitete Medium, das den Liganden enthielt, ersetzt. Die Mikrotiterplatten wurden 1h bei 37°C und 5% CO₂ inkubiert.

Die Zellen wurden drei Mal mit PBS gewaschen. Die Messung erfolgte in 20µL PBS im Mikrotiterplattenlesegerät.

Interaktion zwischen tr-FRET-Donor-Ligand und tr-FRET-Akzeptor-Ligand

Zur Messung der spezifischen räumlichen Interaktion zwischen tr-FRET-Donor- und tr-FRET-Akzeptor-Ligand wurden 8000 Zellen der beschriebenen Zelllinien in 384-well-Mikrotiterplatten ausgesät und über Nacht bei 37°C und 5% CO₂ inkubiert.

Zur Ligandenbindung wurde Zellkulturmedium mit variablen Akzeptorkonzentrationen vorbereitet. Das Zellkulturmedium wurde vorsichtig abgesaugt und die Zellen 1h bei 37°C und 5% CO₂ mit den Lösungen inkubiert.

Nach dreimaligem Waschen mit PBS wurden die Mikrotiterplatten wie angegeben im Mikrotiterplattenlesegerät ausgelesen.

2.6 Statistische Methoden

Wann immer möglich, erfolgte die statistische Auswertung von Messwerten. Diese wurde mithilfe von Prism 6 (GraphPad, La Jolla, USA) vorgenommen. Statistische Signifikanz wurde mit dem Student's-t-Test überprüft. Auf Ergebnisse verschiedener Gruppen wurde eine Varianzanalyse (one-way bzw. two-way ANOVA) angewendet. Der Signifikanzwert (p-Wert) wurde in beiden Fällen auf 0,05 festgelegt.

Messwerte sind, wenn nicht anders angegeben, mit Mittelwert und Standardfehler dargestellt.

3 Ergebnisse

3.1 Generierung von β_2 -Adrenozeptoren mit SNAP-tag

Zur Untersuchung der Oligomerisierung des ADRB2 wurde der Rezeptor so modifiziert, dass er über eine extrazelluläre Komponente verfügte, die Untersuchungen mit fluoreszierenden Substraten ermöglichte. Der SNAP-tag ermöglicht über seine O⁶-Alkylguanin-DNA-Alkyltransferase-Aktivität die kovalente Bindung nahezu beliebiger Moleküle (Gronemeyer et al. 2006). Die gewünschten Fluorophore müssen dazu eine O⁶-Benzylguanin oder O⁶-Alkylguanin-Gruppe tragen. Viele Fluorophore, darunter tr-FRET-kompatible, sind kommerziell verfügbar. Die Funktionsweise ist in Abbildung 3.1 dargestellt.

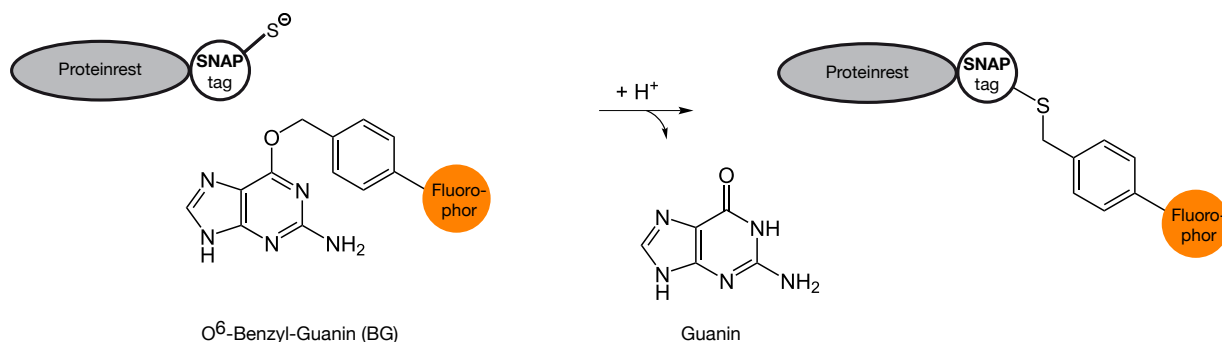


Abbildung 3.1: **Funktionsweise des SNAP-tag:** Ein Fluorophor, das eine O⁶-Benzylguanin-Gruppe trägt, kann kovalent an ein SNAP-getagtes Protein gekoppelt werden.

Darauf basierend wurden Vektoren kloniert, die den ADRB2 trugen, der N-terminal über den SNAP-tag verfügte.

Mittels Fluoreszenzmikroskopie konnte initial gezeigt werden, dass mit der N-terminalen Modifikation des ADRB2 keine Membranexpression des ADRB2 mehr erfolgte (s. Abb. 3.4). Infolgedessen wurde weiter N-terminal eine Proteinsequenz zur Membraninsertion (abgeleitet von der bekannten Signalsequenz des 5HT3A entsprechend der Angaben von NEB GmbH) verwendet, die zur Expression des ADRB2 führte.

In Abbildung 3.2 sind schematisch die Klonierungsstrategien zu den schließlich verwendeten Vektoren dargestellt. Es wurden Expressionsvektoren erzeugt, die die SNAP-getagten natürlich vorkommenden Varianten Arg¹⁶ und Gly¹⁶ des ADRB2 exprimierten.

Darüber hinaus wurden zwei weitere Expressionssysteme generiert: Ein Vektor, der den ADRB2 mit dem SNAP-tag im zweiten extrazellulären Loop trug, sowie ein weiterer, der die in der Literatur als dimerisierungsdefizient beschriebene Variante Tyr²⁸⁴ (Salahpour et al. 2004) enthielt.

Für zukünftige Anwendung wurden außerdem analog Vektoren kloniert, die den mit dem CLIP-tag versehenen ADRB2 trugen (nicht dargestellt).

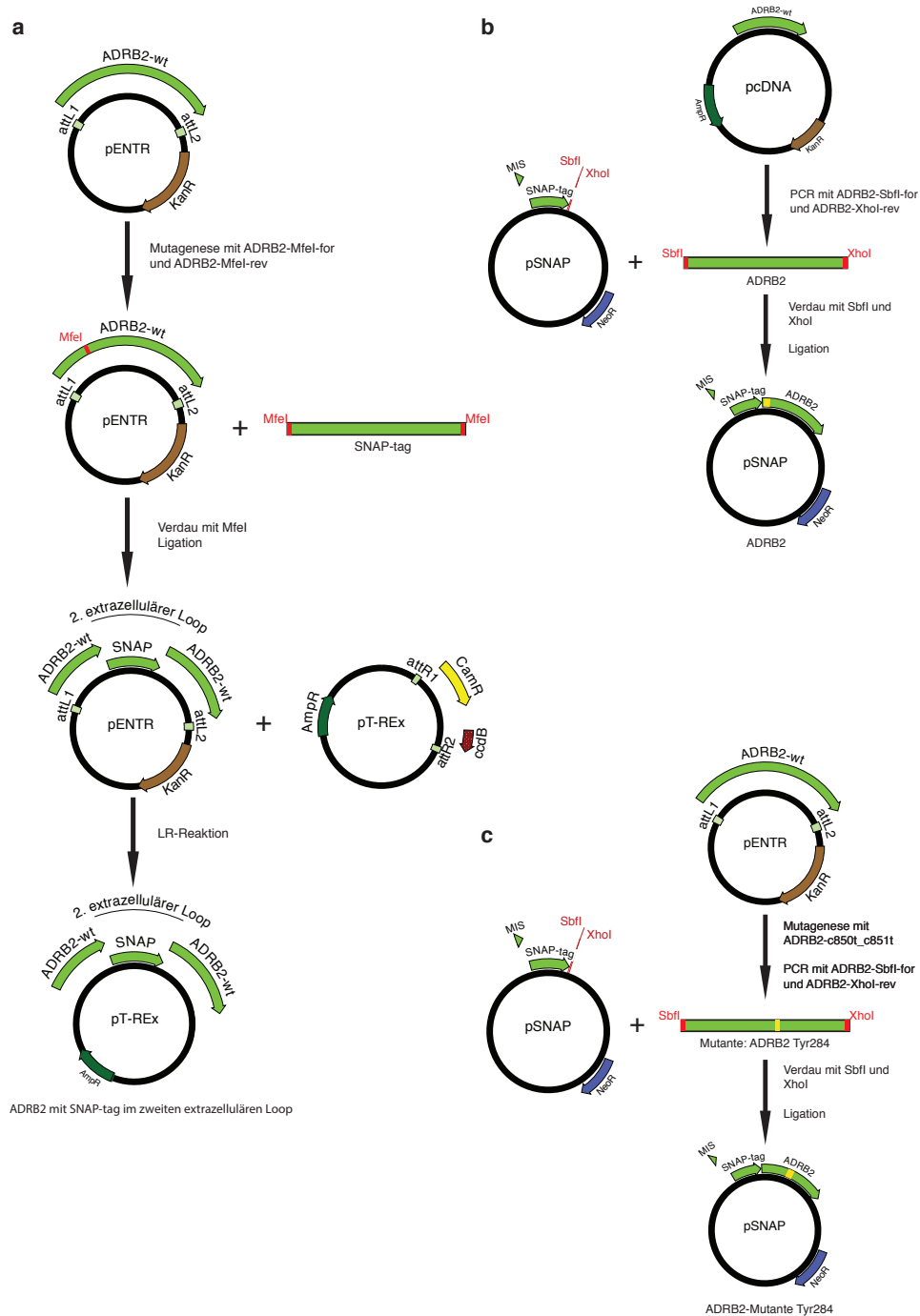


Abbildung 3.2: **Klonierungsstrategien:** **a** Generierung eines Expressionsvektors mit dem SNAP-tag im zweiten extrazellulären Loop des ADRB2. **b** SNAP-tag am N-Terminus des ADRB2. **c** SNAP-tag am N-Terminus der dimerisierungsdefizienten Mutante des ADRB2.

3.2 Fluoreszenzmikroskopie des ADRB2 mit SNAP-tag

Wie in Abschnitt 3.1 beschrieben, konnten erfolgreich Vektoren erzeugt werden, die den mit dem SNAP-tag versehenen ADRB2 trugen. Diese Plasmide wurden in die HeLa- und HEK293-Zelllinien transient transfiziert.

Die Charakterisierung der Oligomerisierung des ADRB2 zunächst außer Acht gelassen, wurden Fluoreszenzfärbungen mit SNAP-Substraten durchgeführt. Dabei sollte geprüft werden, ob der mit dem SNAP-tag versehene Rezeptor korrekt in die Zellmembran integriert wird, bzw. noch trivialer, ob die Transfektion mit zufriedenstellender Effizienz gelungen war.

Zunächst wurden direkt nach der Transfektion in HEK293-Zellen mit BG-Alexa-488 SNAP-basierte Fluoreszenzfärbungen durchgeführt (schematische Darstellung in Abbildung 3.3). Dabei zeigten sich die in Abbildung 3.4 in der mit „HEK“ gekennzeichneten Zeile dargestellten Expressionsmuster: Als Negativkontrolle dienten entweder nicht transfizierte Zellen oder Zellen, die mit dem ADRB2

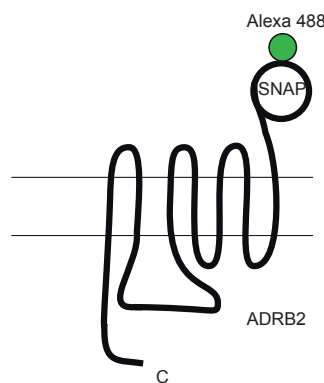


Abbildung 3.3: **Färbung mit SNAP-Substraten:** Schematische Darstellung eines SNAP-getaggen ADRB2 mit kovalent gebundenem Alexa Fluor 488.

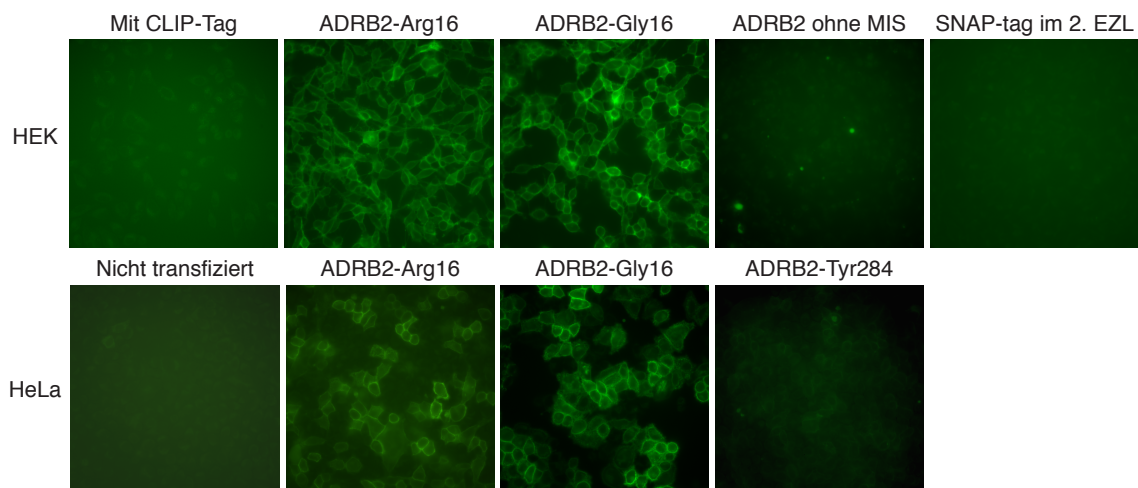


Abbildung 3.4: **Fluoreszenzfärbung** mit Alexa-488-tragenden SNAP-Substraten und transient / stabil die SNAP-getaggen ADRB2-Konstrukte exprimierenden HEK293- / HeLa-Zellen. Als Negativkontrollen dienten nicht transfizierte bzw. den CLIP-getaggen ADRB2 exprimierende Zellen. MIS = Membraninsertionssequenz. 2. EZL = Zweiter extrazellulärer Loop

transfiziert worden waren, der den CLIP-tag trug. Für den Polymorphismus zeigte sich in beiden Fällen ein deutliches Membranexpressionsmuster mit vernachlässigbarem Hintergrundsignal. Für die Variante des Vektors, der N-terminal vor dem SNAP-tag kein Membraninsertionssignal enthielt, war keine Membranfärbung nachweisbar. Auch die Variante des ADRB2, die den SNAP-tag im zweiten extrazellulären Loop trug, war fluoreszenzmikroskopisch kein Membranexpressionsmuster erkennbar. Die Tyr²⁸⁴-Variante, wurde in HeLa-Zellen transfiziert. Dort war keine Membranfärbung nachweisbar.

HEK293-Zellen eigneten sich aufgrund ihrer geringen Adhärenz nicht für die weiteren Versuchsreihen, die allesamt häufiges Waschen benötigten. Somit wurden stabile Zelllinien nur mit den stärker adhärennten HeLa-Zellen generiert. Diese zeigten in der Fluoreszenzmikroskopie eine den HEK293-Zellen vergleichbare Membranexpression. Die Ergebnisse sind in Abbildung 3.4 dargestellt. Sowohl bei der Arg¹⁶- als auch bei der Gly¹⁶-Variante des ADRB2 war eine klare Membranfärbung feststellbar.

3.3 Oligomerisierung des ADRB2 mit SNAP-tag

Zur Analyse der Oligomerisierung des ADRB2 wurde der in der Einleitung beschriebene tr-FRET-Ansatz verwendet. Dazu wurden zuerst mit tr-FRET kompatible Fluorophore, die an Substrate des SNAP-tag gekoppelt waren, in unterschiedlichen Versuchsreihen zur Untersuchung der prinzipiellen Oligomerisierung des modifizierten ADRB2 eingesetzt.

3.3.1 tr-FRET mit SNAP-Substraten

Mit Hilfe der tr-FRET-Methode konnte die räumliche Interaktion von Molekülen des ADRB2 nachgewiesen werden. Zum hinreichenden Nachweis waren mehrere Ansätze notwendig: In einem ersten Schritt wurde die optimale Konzentration des Donorfluorophor-gekoppelten SNAP-Substrates mittels seiner Sättigungskinetik bestimmt. Darauf konnte eine räumliche Interaktion gemessen werden. In einem letzten Schritt wurde gezeigt, dass diese spezifisch für Rezeptoroligomere war.

Bestimmung der Sättigungskinetik der SNAP-Substrate

Zur optimalen Einstellung der Konzentrationen der verwendeten SNAP-Substrate wurden Sättigungsassays durchgeführt. Dazu wurden steigende Konzentrationen des mit dem Donorfluorophor Lumi4 verbundenen SNAP-Substrats (Lumi4-BG) mit Zellen inkubiert, die die Gly¹⁶-Variante des SNAP-getaggen ADRB2 trugen. Diese Zellen waren zuvor fluoreszenzmikroskopisch auf ihre Expression untersucht worden. Als Negativkontrolle und zur Abschätzung unspezifischer Bindung des SNAP-Substrates dienten nicht-transfizierte Zellen. Über die Messung der Intensität der Fluoreszenz des Donorfluorophores bei 620nm konnte auf die Sättigung der SNAP-tags Rückschluss gezogen werden. Das Ergebnis ist in Abbildung 3.5 dargestellt.

Über steigenden Konzentrationen des SNAP-Substrates zeigte sich ein sigmoidaler Intensitätsverlauf, der bei spezifischer sättigbarer Bindung zu erwarten ist. Das Signal unspezifische Bindung im Falle nicht-transfizierter Zellen erwies sich als gering. Für die weitere Analyse waren zwei Bedingun-

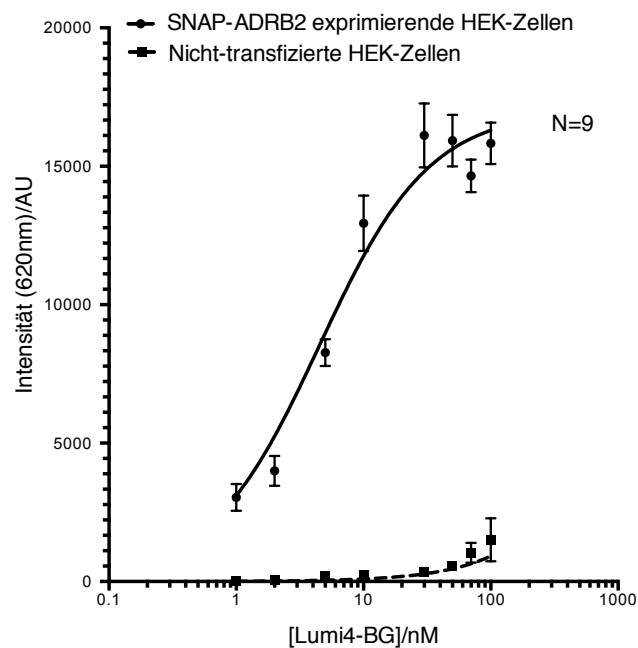


Abbildung 3.5: **Bindungskinetik des SNAP-Substrates mit gekoppeltem Lumi4-Donorfluorophor.** SNAP-ADRB2 exprimierende HEK-Zellen wurden mit Lumi4-tragendem SNAP-Substrat (Lumi4-BG) inkubiert und darauffolgend bei Donorexzitiation die Intensität seiner Emission bei 620nm gemessen. Die Intensität diente als Maß für die Anzahl der gebundenen Fluorophore. Als Negativkontrolle (unspezifische Bindung) dienten nicht-transfizierte HEK293-Zellen.

gen zu optimieren: Zum einen sollte die Konzentration der SNAP-Substrate gering gehalten werden, um nicht-spezifische Bindung vernachlässigen zu dürfen. Zum anderen war für eine ausreichend hohe signal-to-noise-ratio eine möglichst hohe Konzentration zu wählen.

Diese Bedingungen waren am besten bei der etwa halbmaximal sättigenden Konzentration des SNAP-Substrates gegeben. Für die Analyse der spezifischen Interaktion der SNAP-getaggten Rezeptoren wurde daher die Konzentration des Donor-Substrates auf 10nM festgelegt.

Räumliche Interaktion der SNAP-getaggten ADRB2

Um zu untersuchen, ob eine räumliche Interaktion der Fluorophore innerhalb ihres FRET-Radius zu beobachten war, wurde das tr-FRET-Signal (665nm) bei Anregung des Donors (620nm) gemessen.

Anders als in der zuvor beschriebenen Mikroskopie genügte es aber nicht, das FRET-Signal nur für eine Bedingung zu messen. Für einen einzelnen Messpunkt können nur begrenzt Aussagen über die Spezifität der Interaktion getroffen werden. Aufgrund unterschiedlicher Affinität der strukturell unterschiedlichen SNAP-Substrate war zuerst, wie schematisch in Abbildung 3.6 dargestellt, eine Optimierung der Konzentration vorzunehmen.

Dazu wurde über der zuvor festgelegten Konzentration des Donor-Substrates die Konzentration des Akzeptors variiert und das tr-FRET-Signal gemessen. In diesem Schritt wurde zum einen die Konzentration des Akzeptorfluorophors optimiert und zum anderen weitere Evidenz für die räumliche Nähe der Rezeptoren gezeigt, wie sie bei Oligomeren zu erwarten war. Bei niedriger

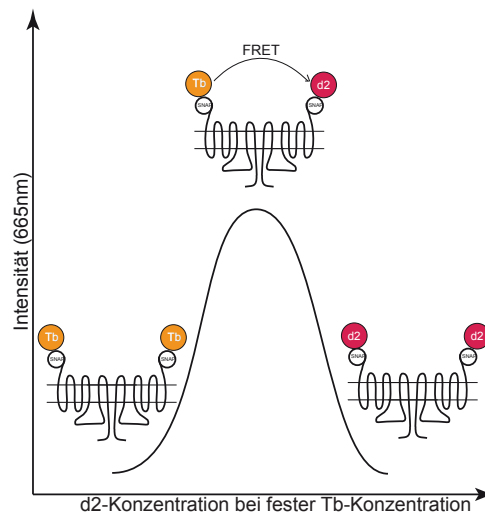


Abbildung 3.6: **Optimierung des tr-FRET-Signals bei oligomerbildenden Rezeptoren (schematische Darstellung):** Über einer fest eingestellten Konzentration des tr-FRET-Donors (Tb) wird die Konzentration des tr-FRET-Akzeptors (d2) gesteigert. Befinden sich die tr-FRET-Partner in räumlicher Nähe, ergibt sich bei Exzitation des Donorfluorophors ein gauß-verteilter Intensitätsverlauf des Akzeptorfluorophors.

Konzentration des Akzeptorfluorophors ist die Mehrheit der Rezeptor-tags ausschließlich mit Donorfluorophoren besetzt, das tr-FRET-Signal ist entsprechend gering. Bei sehr hohen Konzentrationen des Akzeptorfluorophors gegenüber dem Donorfluorophor ist zu erwarten, dass die getaggten Rezeptoren beinahe ausschließlich mit Akzeptoren besetzt sind. Auch dann ist nur ein geringes tr-FRET-Signal messbar. Im Bereich zwischen diesen beiden Situationen erwartet man - allerdings nur wenn die Rezeptoren sich tatsächlich in passender Entfernung zueinander befinden - ein Maximum der tr-FRET-Intensität.

Im Experiment zeigte sich gemäß Abbildung 3.7 ein glockenkurvenförmiger Verlauf der Intensität der tr-FRET-Intensität mit steigender Akzeptordichte. Zur Elimination des Hintergrundsignals diente leeres SNAP-Substrat (O6-BG) anstelle des mit Akzeptor-Fluorophor besetzten Substrates. Durch einfache Subtraktion konnte damit die um das Hintergrundsignal bereinigte Intensität ΔF berechnet werden.

Mit dem Ergebnis konnte geschlossen werden, dass für den mit dem SNAP-tag besetzten ADRB2 ein tr-FRET-typisches Signal messbar war, das auf räumliche Nähe der Rezeptoren hindeutet. Weiter konnte für die SNAP-Substrate die Konzentration bestimmt werden, bei der das tr-FRET-Signal maximal war.

Nachweis der spezifischen Interaktion zwischen Rezeptoroligomeren

Da für die vorher gemessenen Intensitätswerte keine absolute Bezugsskala existiert, ist so noch nicht ausgeschlossen, dass es sich um zufällige Interaktionen der Fluorophore aus einfacher Kollision monomerer Rezeptoren handelt, wie in Abbildung 3.8 links in grau dargestellt. Beruht das tr-FRET-Signal auf zufälliger Interaktion, ist ein nicht-linearer Zusammenhang zwischen Rezeptordichte und tr-FRET-Intensität zu erwarten. Bei bloßer Kollision existieren kombinatorisch exponentiell anstei-

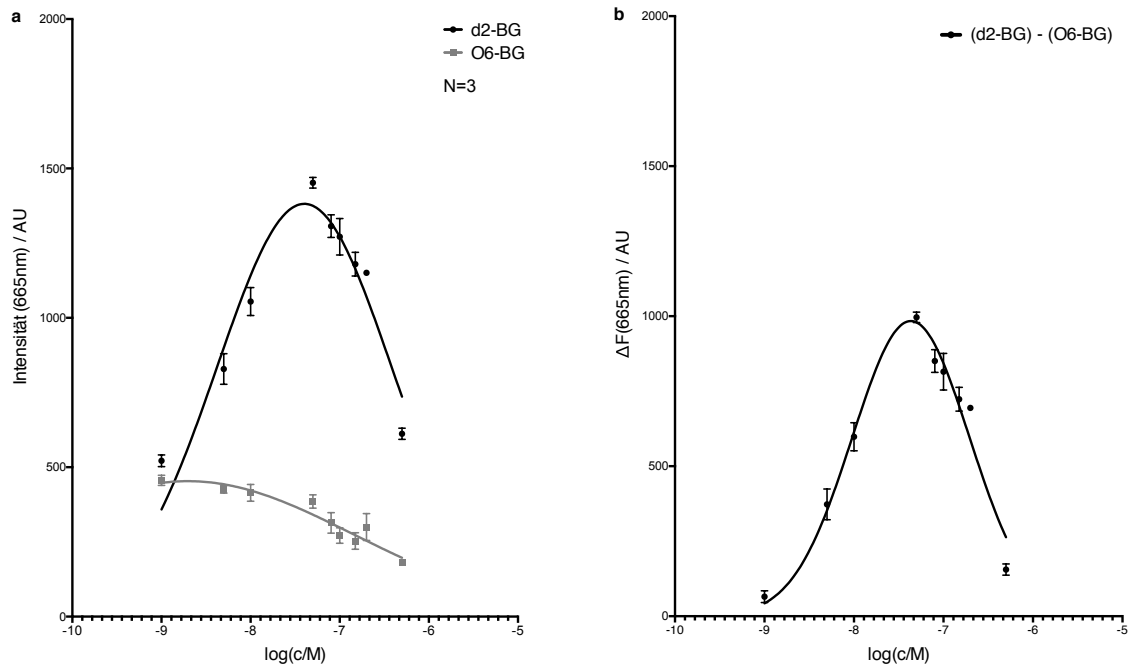


Abbildung 3.7: **Ermittlung der optimalen Ligandenkonzentration zur Optimierung des Signal-Rausch-Verhältnisses:** **a** Das SNAP-getaggte ADRB2-Konstrukt stabil exprimierende HeLa-Zellen wurden mit fester Konzentration des Donorfluorophors und steigenden Konzentrationen des Akzeptorfluorophors (d2-BG) inkubiert. Bei Exzitation des Akzeptors wurde das Signal des Akzeptorfluorophors bei 665nm gemessen (schwarz). Als Negativkontrolle (grau) diente ein nicht-fluorophor-tragendes SNAP-Substrat (O6-BG). Der Intensitätsverlauf des FRET-Signals ergab eine Glockenkurve. **b** Um das Hintergrundsignal bereinigt ΔF -Kalkulation durch Subtraktion aus (a).

gende Möglichkeiten einer Interaktion. Befinden sich die Fluorophore jedoch strikt in Oligomeren angeordnet, so ist ein linearer Zusammenhang nachzuweisen, da mit Erhöhung der Anzahl der Rezeptoroligomere die Signalerhöhung nur proportional steigen kann.

Im Experiment zeigte sich eine starke lineare Korrelation zwischen der fluoreszenzoptometrisch bestimmten Anzahl der Rezeptoren auf der Zelloberfläche und dem tr-FRET-Signal zwischen dem Donor- und Akzeptorfluorophor. Die statistische Auswertung ergab für den Korrelationskoeffizienten $R^2 = 0.9549$. Die gewonnenen Werte konnten mit hinreichender Sicherheit als proportional interpretiert werden.

Der so beobachtete lineare Zusammenhang schloss sowohl die zufällige Kollision zwischen Rezeptormonomeren als auch nicht-rezeptorgebundenes, rein konzentrationsabhängiges, unspezifisches tr-FRET aus.

In Kombination mit dem glockenkurvenförmigen Verlauf im vorherigen Experiment konnte so gezeigt werden, dass der mit dem SNAP-tag versehene ADRB2 in der Zellmembran als Oligomer vorkommt. Über die Größe der Oligomere konnte, wie in der Diskussion erläutert, mit dieser Methode keine Aussage getroffen werden.

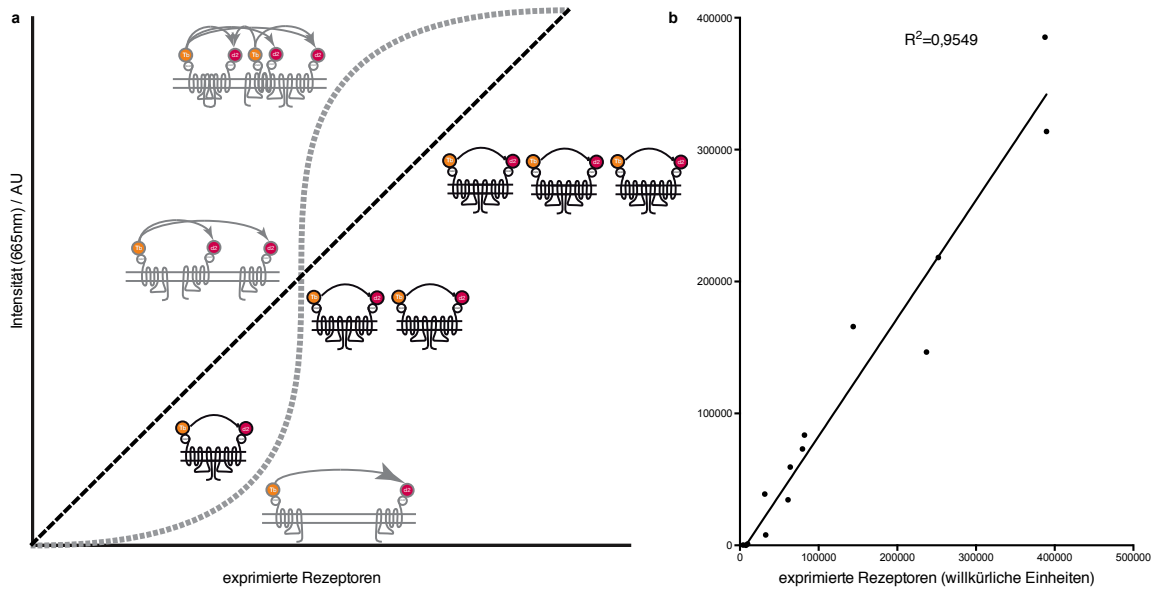


Abbildung 3.8: **Signalverhalten von in Oligomeren organisierten Fluorophoren gegenüber zufälliger Interaktion:** a Schematische Darstellung des zu erwartenden tr-FRET-Signals bei Variation der Rezeptordichte. Zufällige Interaktion (grau) liefert einen exponentiellen, Interaktion zwischen Oligomeren (schwarz) einen linearen Zusammenhang. b HEK293-Zellen wurden mit steigenden Mengen des zu exprimierenden ADRB2-Konstruktes transfiziert und die Rezeptordichte fluoreszenzoptometrisch bestimmt (Abszisse). Darauffolgend wurden trFRET-Messungen mit Donor- und Akzeptorsubstraten durchgeführt (Ordinate). Es ergab sich eine starke lineare Korrelation zwischen trFRET-Signal und Rezeptordichte.

3.3.2 Einfluss der Stimulation mit Liganden des ADRB2 auf seine Oligomerisierung

Die Stimulation mit Agonisten erhöht signifikant das tr-FRET-Signal des SNAP-getaggen ADRB2

Die zuvor optimierten Bedingungen für die Markierung mit SNAP-Substraten, unter denen gezeigt werden konnte, dass der ADRB2 in basalem Zustand ohne Ligandenkontakt oligomerisiert auf der Zellmembran vorkommt, wurden für die Analyse des Einflusses der Stimulation mit Liganden herangezogen. Die Stimulation wurde in zwei Varianten durchgeführt: In einer Versuchsreihe erfolgte die Stimulation vor dem Labelling und wurde danach fortgeführt, in einer zweiten wurden die Zellen nach dem Labelling mit einer Ligandenlösung versetzt. Beide Versuchsreihen lieferten qualitativ vergleichbare Ergebnisse. Die dauerhafte Stimulation über eine Stunde ist in Abbildung 3.9 dargestellt.

Gegenüber der basalen, nicht stimulierten Situation („ohne Ligand“) ergaben sich hochsignifikante Erhöhungen der tr-FRET-Ratio für die Stimulation mit Isoprenalin und dem natürlichen Agonisten Adrenalin. Sowohl in niedrigen (Iso/Adr 100nM) als auch in hohen Konzentrationen (Iso/Adr 1000nM) resultierte die Stimulation mit Agonisten in signifikanter Signalanhebung.

Demgegenüber waren für die Stimulation mit dem inversen Agonisten ICI-118,551 und dem Antagonisten Alprenolol in beiden Konzentrationen keine signifikanten Änderungen der tr-FRET-Ratio messbar.

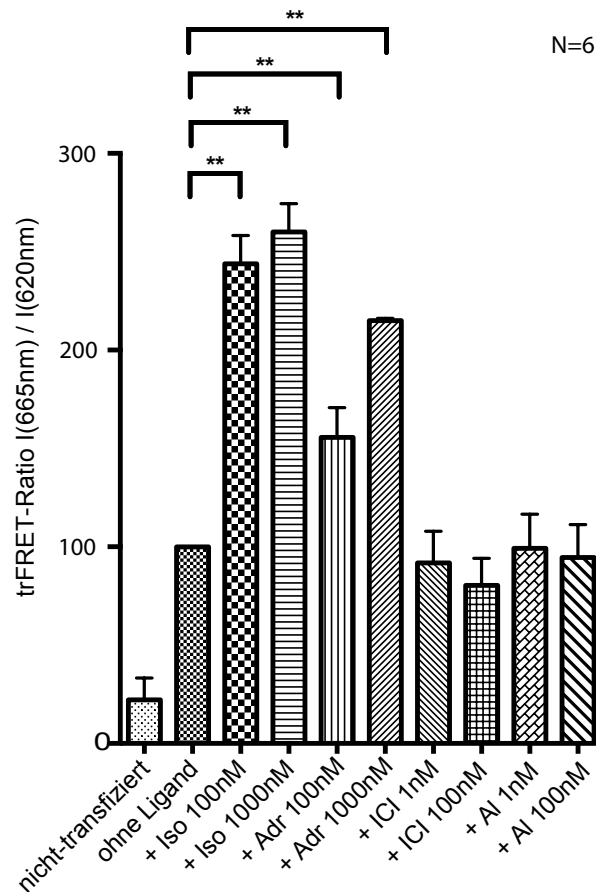


Abbildung 3.9: **Effekt der Stimulation mit Liganden des SNAP-getaggten ADRB2 auf das trFRET-Signal:** Das ADRB2-Konstrukt stabil exprimierende HeLa-Zellen wurden mit den angegebenen Liganden vorstimuliert. Danach erfolgte Inkubation mit Donor- und Akzeptorfluorophoren. Anschließend wurde unter erneuter Stimulation mit Liganden das trFRET-Signal gemessen. Bei Stimulation mit den Agonisten Isoprenalin (Iso) und Adrenalin (Adr) wurde ein signifikant höheres trFRET-Signal gemessen. Kein signifikanter Unterschied ergab sich bei Stimulation mit dem inversen Agonisten ICI-118,551 (ICI) und dem Antagonisten Alprenolol. Als Negativkontrolle dienten nicht-transfizierte Zellen. (Daten normiert auf das Signal des nicht stimulierten Rezeptors.)

Die polymorphen Varianten des ADRB2 unterscheiden sich nicht hinsichtlich ihrer Oligomerisierungseigenschaften

Die Arg¹⁶- und Gly¹⁶-Varianten des ADRB2 besitzen - wie in der Einleitung erläutert - unterschiedliche Aktivierungskinetik (Ahles, Rochais et al. 2011). Sind auch die Oligomerisierungseigenschaften variantenspezifisch?

Zur Klärung wurden Versuchsreihen analog zu den vorigen durchgeführt. Es erfolgte die statistische Analyse der Gly¹⁶-Gruppen gegen die Arg¹⁶-Gruppen. Die Ergebnisse sind in Abbildung 3.10 dargestellt. Dabei zeigte sich beim Vergleich zwischen den Gruppen der Varianten kein signifikanter Unterschied bei Stimulation mit den Agonisten Isoprenalin und Adrenalin, die in den Vorversuchen gegenüber der nicht stimulierten Situation zu einer signifikanten Elevation der tr-FRET-ratio geführt hatten.

Während dieser Versuchsreihe war die Stimulationsdauer mit 30 min kürzer gewählt worden, die bei der 100nM-Konzentration der Agonisten nicht zu den zuvor beobachteten Effekten führt. (Siehe hierzu auch Abschnitt 3.3.2).

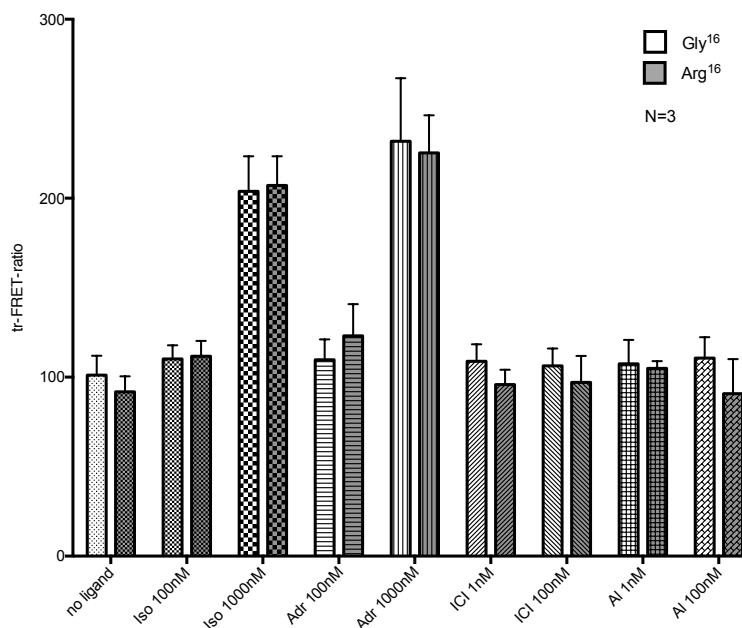


Abbildung 3.10: **Effekt der Stimulation mit Liganden auf die polymorphen Rezeptorvarianten Gly¹⁶ und Arg¹⁶ des ADRB2:** Zwischen den polymorphen Varianten Gly¹⁶ und Arg¹⁶ existieren bei Ligandenstimulation analog zur Messung in Abbildung 3.9 keine signifikanten Unterschiede in der tr-FRET-Ratio. (Daten normiert auf das Signal des nicht stimulierten Gly¹⁶-Rezeptors.)

Agoniststimulation verändert die Größe der Rezeptoroligomere nicht

Die Anhebung des tr-FRET-Signals bei Stimulation mit Agonisten wirft unweigerlich die Frage nach der Ursache auf. In Abschnitt 4.2.3 soll darauf genauer eingegangen werden. Für das Verständnis ist folgendem Ergebnis aber bereits an dieser Stelle die theoretische Überlegung vorangestellt.

Denkbar als Ursache der gestiegenen tr-FRET-Ratio bei Agoniststimulation ist unter anderem die Veränderung der Größe der Oligomere. Zur Überprüfung, ob tatsächlich eine Änderung der Rezeptoranzahl in einem Oligomer für die Signalanhebung verantwortlich ist, können die Glockenkurven der basalen Situation mit der Ligandenstimulation verglichen werden.

In Abbildung 3.11 links ist der prinzipielle Vergleich zweier Glockenkurven wie in Abschnitt 3.3.1 dargestellt. Da für Tetramere gegenüber Dimeren schon bei geringerer Akzeptorkonzentration eine höhere Wahrscheinlichkeit besteht, dass die Rezeptoren mit einer Kombination von Fluorophoren besetzt werden, die ein tr-FRET-Signal erzeugt, ist bereits ursprungsnäher im Graphen ein höheres Signal zu erwarten. Bei höheren Akzeptorkonzentrationen ergibt sich eine vice-versa-Situation mit entsprechend späterem Signalabfall. Insgesamt erhält man für höhergradige Oligomere eine breitere Gauß-Verteilung. Diese Überlegung wurde auf die signifikante tr-FRET-Erhöhung bei Stimulation mit 1µM Isoprenalin angewandt. Das Experiment aus Abschnitt 3.3.1 wurde mit und ohne Stimulation durchgeführt (s. Abbildung 3.11).

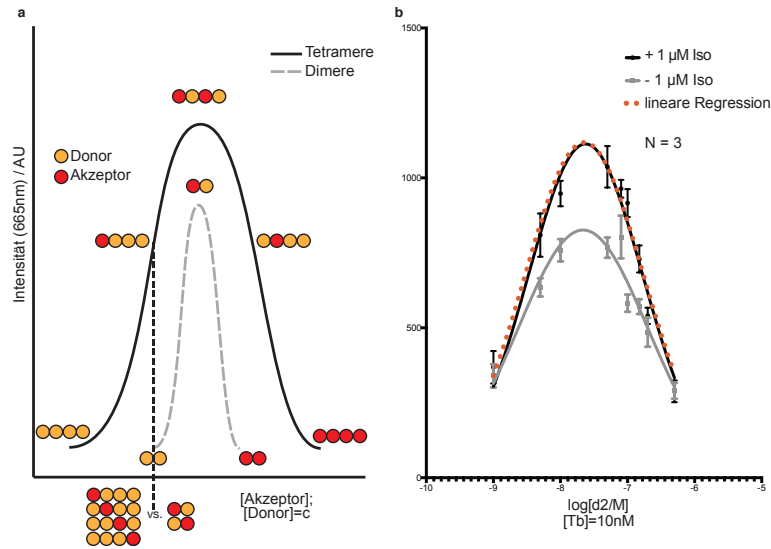


Abbildung 3.11: **Einfluss der Rezeptoranzahl in einem Oligomer auf das trFRET-Signalverhalten:**
a Schematische Darstellung der zu erwartenden Signalverteilung höhergradiger Rezeptoroligomere gegenüber geringergradigen bei Variation der Akzeptorfluorophorkonzentration, konstanter Donorkonzentration und sonst gleichen Bedingungen. **b** Messung des trFRET-Signals mit (+ 1 µM Iso, schwarz) und ohne Stimulation durch den Agonisten Isoprenalin (- 1 µM Iso, grau): Die Messwertpaare standen in strikter linearer Beziehung zueinander. (Lineare Interpolation in orange). Eine Verbreiterung der Gauß-Verteilung war nicht zu beobachten.

In der basalen Situation zeigte sich erwartungsgemäß eine Glockenkurve. Wurden die gleichen stabil exprimierende Zellen mit Isoprenalin stimuliert, war eine gleich breite Gauß-Verteilung der Messwerte mit größerem Maximum messbar. Aus der basalen Glockenkurve ließ sich durch lineare Regression mit einem Faktor mit hinreichender Sicherheit die Verteilung der stimulierten Messwerte berechnen. Die Messwertpaare standen in linearer Beziehung zueinander. Daraus ging hervor, dass sich die Anzahl der Rezeptoren in einem Oligomer nicht geändert hatte.

Die Änderung des tr-FRET-Signals bei Stimulation ist zeitabhängig

Weitere mögliche Erklärungen für die Verstärkung des tr-FRET-Signals bei Agoniststimulation liegen zum einen in der effizienteren Energieübertragung bei möglicher N-terminaler Konformationsänderung des ortständigen Rezeptors. Zum anderen müssen insbesondere bei längerer Stimulation mit hohen Konzentrationen Rezeptorinternalisierungseffekte bedacht werden.

Dazu wurde die Zeitabhängigkeit der Signaländerung untersucht. In Abbildung 3.12 ist der gemessene Zusammenhang zwischen Dauer der Stimulation und Signaländerung dargestellt. Bei fünf-minütiger Stimulation unter Kulturbedingungen ergab sich eine höhere tr-FRET-Ratio als bei zwei-minütiger Stimulation mit der gleichen Konzentration (1 µM) des Agonisten Isoprenalin. Die fünfminütige Stimulation veränderte die tr-FRET-Ratio vergleichbar zur durchgehenden Stimulation während der einstündigen Reaktion mit den SNAP-Substraten.

Mit der zeitlichen Signaländerung war zwar eine Konformationsänderung des Rezeptors nicht ausgeschlossen, dennoch sollte überprüft werden, ob mikroskopisch Unterschiede bei der Lokalisation des Rezeptors sichtbar gemacht werden konnten.

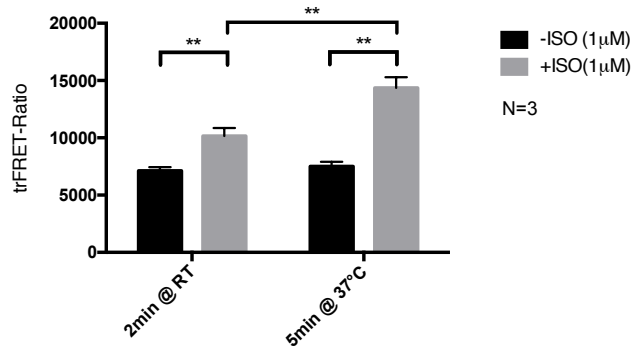


Abbildung 3.12: **Zeitabhängiger Effekt der Stimulation mit Liganden:** Die trFRET-Ratio wurde nach zwei- bzw. fünf-minütiger Stimulation mit (+ISO, grau) oder ohne Isoprenalin (-ISO, schwarz) gemessen. Nach fünf-minütiger Stimulation bei Kulturbedingungen stieg die tr-FRET-Ratio stärker als bei zwei-minütiger Stimulation bei Raumtemperatur.

Rezeptorinternalisierung bei Stimulation mit Agonisten

Die Proteinmarkierungstechnologie des SNAP-tags kann auch zur mikroskopischen Analyse der Internalisierung von Rezeptoren angewandt werden (Koo et al. 2012).

Wie zuvor beschrieben wurde der an das SNAP-Substrat gekoppelte Farbstoff Alexa-488 verwendet, um die Lokalisation der Rezeptoren in der Zellmembran zu charakterisieren. Die Färbung erfolgte analog zur Mikroskopie in Abschnitt 3.2. Lediglich wurden die Rezeptoren vor der einstündigen Reaktion mit den SNAP-Substraten für fünf Minuten mit Isoprenalin bzw. ICI vorstimuliert.

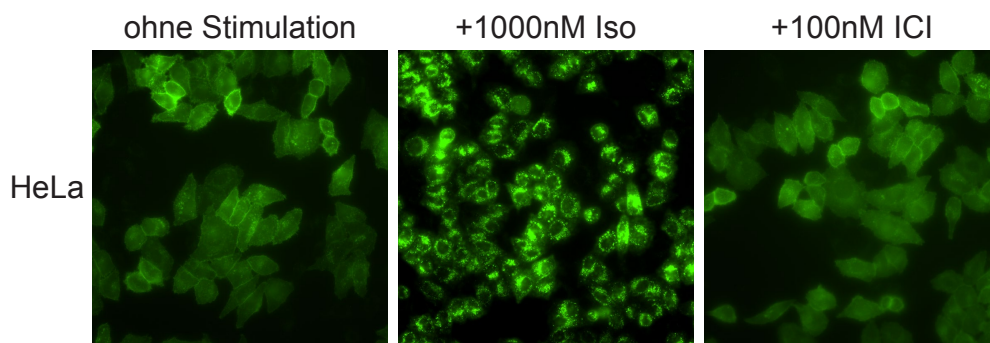


Abbildung 3.13: **Effekt der Stimulation mit Liganden auf die subzelluläre Lokalisation der SNAP-getaggten Rezeptoren:** Verlagerung der fluoreszenzmikroskopisch bestimmten Rezeptorlokalisierung nach intrazellulär nach Stimulation mit Isoprenalin (Iso). Keine Änderung der Lokalisation nach Stimulation mit ICI 118,551 (ICI).

Die mikroskopische Analyse der Rezeptorlokalisierung lieferte folgendes Ergebnis: Bei Stimulation mit Isoprenalin (Iso) war eine Veränderung der Lokalisation der Rezeptoren erkennbar, die in anderen Publikationen mit Rezeptorinternalisierung gleichgesetzt wird (Koo et al. 2012). Unter Stimulation mit ICI ergab sich ein mikroskopisches Bild, das mit der Situation ohne Stimulation vergleichbar war.

3.3.3 Einfluss der Rezeptorglykosylierung auf die Oligomerisierung des ADRB2

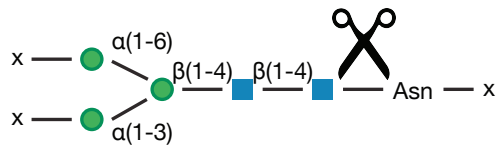


Abbildung 3.14: **Funktionsweise des Enzyms PNGase F:** Als Amidase schneidet das Enzym zwischen den innen gelegenen N-Acetylglucosamin- (GlcNAc) und Asparagin-Resten komplexer Oligosaccharide.

Als weiterer Einflussfaktor sollte die Rezeptorglykosylierung untersucht werden. Das Enzym N-Glykosidase F (PNGase) hydrolysiert N-Glykan-Ketten wie in Abb. 3.14 dargestellt. Somit konnte es für die Deglykosylierung des ADRB2 verwendet werden. Nach Deglykosylierung wurde die trFRET-Ratio mit oder ohne Stimulation durch Liganden gemessen. Die Ergebnisse sind in Abbildung 3.15 dargestellt.

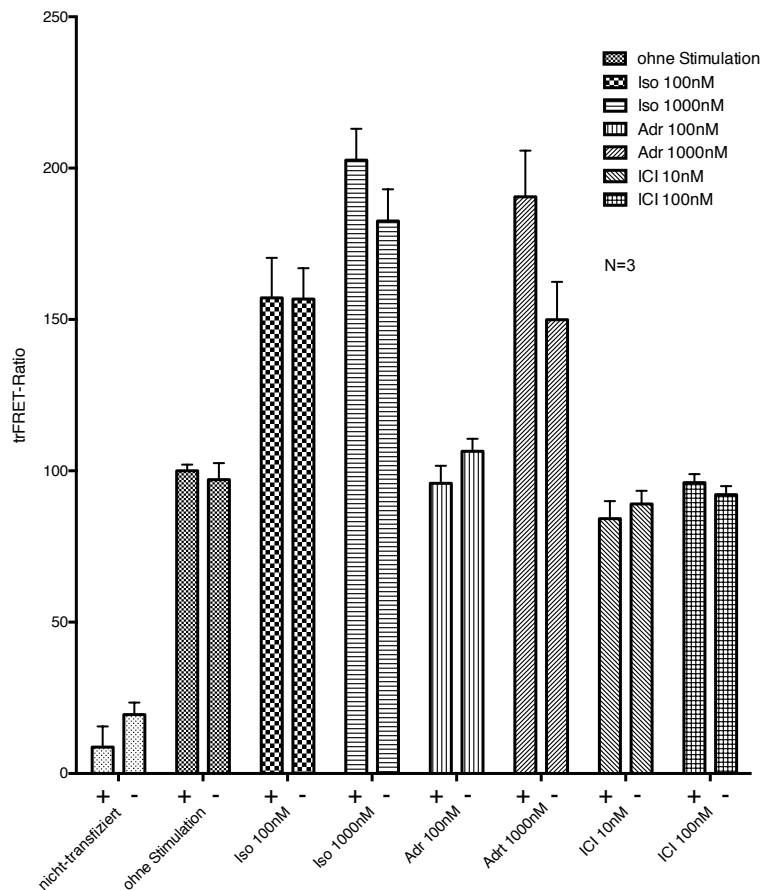


Abbildung 3.15: **Effekt einer Deglykosylierung auf die Oligomerisierung:** Die ADRB2 exprimierenden Hela-Zellen wurden ohne (-) oder mit 60 U PNGase F (+) zur Deglykosylierung inkubiert. Nach Markierung mit den SNAP-Substraten wurde die trFRET-Ratio unter Stimulation mit den angegebenen Rezeptorliganden gemessen. Die statistische Analyse ergab keinen signifikanten Effekt der Deglykosylierung auf die Änderung der tr-FRET-Ratio.

Für keine der Bedingungen ergab sich eine signifikante Änderung der tr-FRET-Ratio. Mit dem Ergebnis konnte ein Einfluss der Rezeptorglykosylierung auf den beobachteten Effekt ausgeschlossen werden.

3.4 tr-FRET mit fluoreszierenden Liganden des ADRB2

Mit dem ADRB2 transfizierte HEK-Zellen zeigen sättigbare Affinität für den fluoreszierenden Liganden Lumi4-ICI

Für die Analyse des nicht-modifizierten ADRB2 wurde vom Labor Prof. Dr. Peter Gmeiner (Universität Erlangen) eigens eine Verbindung synthetisiert, die auf dem inversen Agonisten ICI-118,551 basierte. Über einen Linker wurde als tr-FRET-Akzeptor das Fluorophor Alexa647 gekoppelt. Der nur kommerziell erhältliche tr-FRET-Donor Lumi4 wurde durch cisbio Bioassays (Codolet) an die ICI-118,551-Verbindung synthetisiert.

Da die Verbindung bisher nicht charakterisiert wurde, musste vor eigentlichen Experimenten zuerst ihre prinzipielle Funktionalität überprüft werden. Dies erfolgte fluoreszenzoptometrisch an mit dem ADRB2 transfizierten HEK293-Zellen. In Abbildung 3.16 ist das dosisabhängige ΔF -Signal (gegenüber nicht-transfizierten Zellen als Kontrolle der unspezifischen Bindung) des Donorliganden (Lumi4-ICI) dargestellt. Zu messen war eine sigmoidale ΔF mit halbmaximaler Sättigung bei einer Ligandenkonzentration von etwa 10nM ($K_D = 8.9 \pm 4.1\text{nM}$).

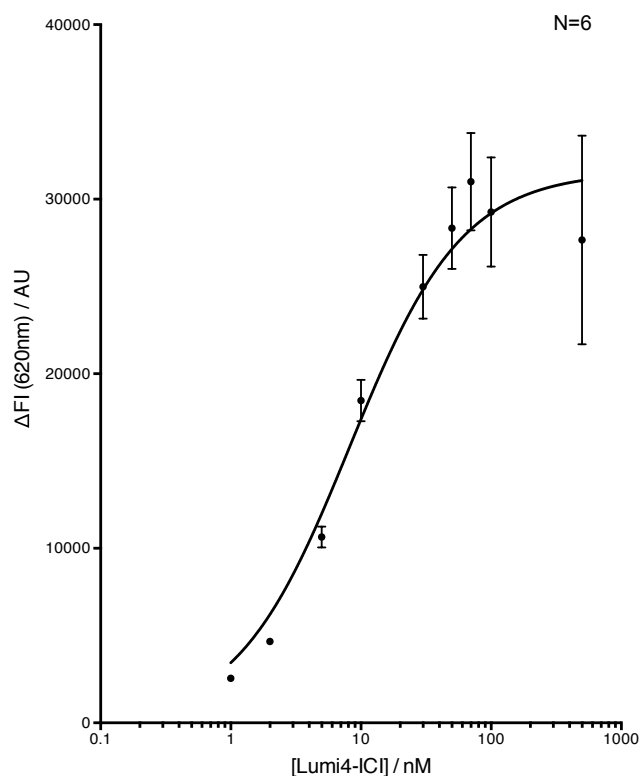


Abbildung 3.16: **Sättigung mit fluoreszierendem ICI-118,551:** Den ADRB2 transient exprimierende HEK293-Zellen wurden mit steigenden Konzentrationen des fluoreszierenden Liganden (Lumi4-ICI) inkubiert. Bei Exzitation konnte ein konzentrationsabhängiges Signal (ΔF gegenüber nicht transfizierten HEK293-Zellen) gemessen werden.

Bei mit dem ADRB2 transfizierten HEK293-Zellen ist tr-FRET zwischen fluoreszierenden Liganden messbar

Mit der Methode, die bereits im Abschnitt über die räumliche Interaktion zwischen tr-FRET-Donor und Akzeptor beschrieben wurde, konnte auch für die fluoreszierenden Liganden eine Glockenkurve gemessen werden (Abbildung 3.17). Für transfizierte HEK-Zellen ergab sich ein gauß-verteilttes Signal. Damit konnte dynamisch der räumliche Bezug der tr-FRET-Liganden gezeigt werden.

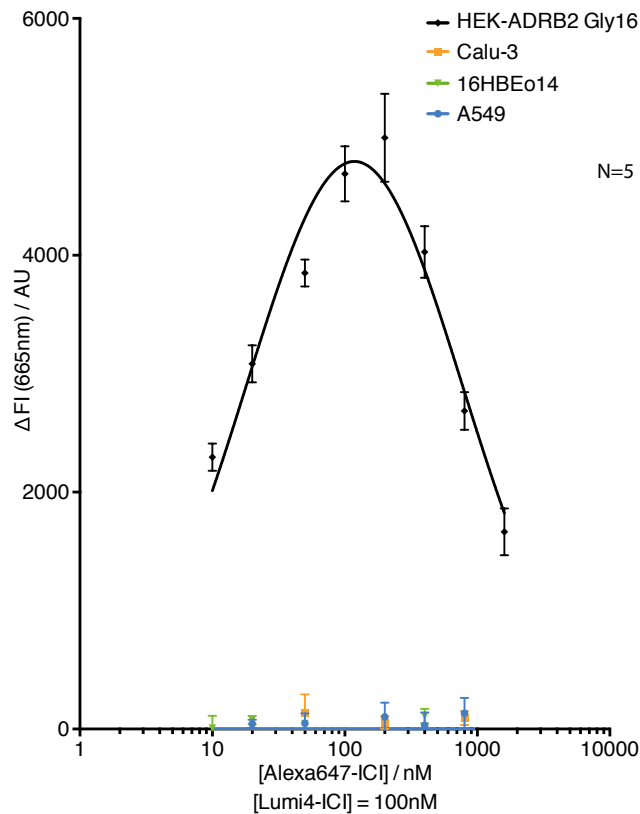


Abbildung 3.17: **Versuch der Detektion einer Oligomerisierung von endogen exprimiertem ADRB2 in humanen Lungenepithelzellen.** Für die mit dem ADRB2 transfizierten HEK293-Zellen ergab sich bei Variation der Konzentration des fluoreszierenden Akzeptorliganden und konstanter Konzentration des Donorliganden eine gauß-verteilte Intensitätskurve (Positivkontrolle). Bei den humanen Lungenepithelzellen Calu-3, 16HBEo14 und A549 war kein Signal messbar.

Das tr-FRET-Signal zwischen fluoreszierenden Liganden lässt sich kompetitiv inhibieren

Mit dem Ergebnis aus Abbildung 3.17 war noch nicht die Spezifität der Ligandeninteraktion gezeigt. In einem weiteren Experiment konnte die Reversibilität der Interaktion bei Zugabe des ausreichend charakterisierten nicht-modifizierten ICI-118,551 gezeigt werden. Unter Zugabe eines Überschuss des nicht-markierten Liganden (10 μ M ICI) sank die tr-FRET-Ratio auf das Niveau des Signals der HEK293-Zellen auf denen im Vergleich zu den transfizierten Zellen praktisch kein Rezeptor exprimiert wurde (HEK-0). Die Messdaten sind in Abbildung 3.18 dargestellt.

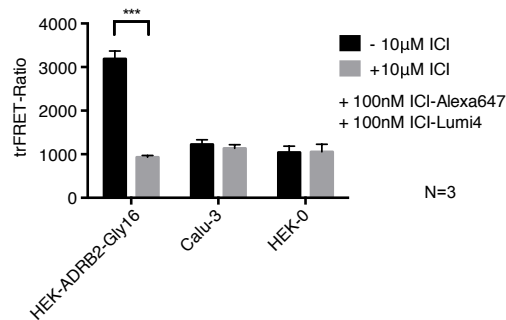


Abbildung 3.18: **Verdrängung des fluoreszierenden Liganden durch unmarkiertes ICI-118,551:** ADRB2-exprimierende HEK-293 Zellen (HEK-ADRB2-Gly16) wurden mit den Fluorophorliganden (ICI-Alexa647 und ICI-Lumi4) inkubiert und darauf folgend das tr-FRET-Signal gemessen. Durch die Zugabe von ICI-118,551 (+) in hoher Konzentration war dieses reversibel. Als Negativkontrolle dienten nicht-transfizierte HEK293-Zellen (HEK-0). Für die humane, endogen ADRB2 exprimierende Calu-3-Zelllinie konnte kein Signal gemessen werden.

Mit dem ADRB2 transfizierte HEK-Zellen weisen oligomerisierte Rezeptoren auf

Für die mit dem ADRB2 transfizierten HEK293-Zellen konnte erfolgreich eine kompetitiv reversible Interaktion zwischen fluoreszierenden Liganden in Form einer Gauß-Verteilung nachgewiesen werden. Die Kombination beider Ergebnisse lässt analog zu den Vorversuchen, bei denen SNAP-getaggte Rezeptoren zu ähnlichem Nachweis verwendet worden waren, schließen, dass die nicht veränderten β_2 -Adrenozeptoren oligomerisiert an der Membranoberfläche vorkommen.

Die Rezeptoren der Lungenepithelzelllinien Calu-3, 16HBEo14 und A549 können mit der tr-FRET-Methode nicht auf ihre Oligomerisierungseigenschaften überprüft werden

Von weiterer Bedeutung ist die in-vivo-Analyse der Oligomerisierung des ADRB2. Dazu wurden drei Lungenepithelzelllinien (LEC) untersucht, die endogen über ein hohes Expressionsniveau verfügen sollen (Abraham et al. 2004). Sowohl bei den Calu-3-, als auch bei 16HBEo14- und A549-Zellen konnte aber in Versuchsreihen analog zu den mit ADRB2 transfizierten HEK293-Zellen keine ausreichend hohe Signalausbeute erreicht werden. So war zum einen keine Gauß-Verteilung bei Variation des Akzeptorliganden messbar (s. Abb. 3.17) und zum anderen auch unter Zugabe einer hohen Konzentration unmarkierten Ligands keine Reversibilität des tr-FRET-Signals zu messen (s. Abb. 3.18). Es ist daher davon auszugehen, dass selbst mit dem hochaffinen fluoreszierenden Liganden keine ausreichende Sensitivität für das Expressionsniveau der Lungenepithelzellen erreicht werden konnte.

4 Diskussion

4.1 Untersuchung der Rezeptoroligomerisierung des ADRB2

In der Vergangenheit sind auf Biolumineszenz-Resonanzenergietransfer (BRET) und Fluoreszenz-Resonanzenergietransfer (FRET) basierende Methoden zur Untersuchung der Rezeptoroligomere in Zellmembranen verwendet worden. Aufgrund hoher Komplexität und relativ geringer Signalausbeute eignen sich diese Methoden jedoch nur bedingt zur systematischen Analyse. Insbesondere weil bei den genannten Methoden häufig Membranpräparationen oder permeabilisierte Zellen verwendet werden müssen, ist die Herkunft des Signals nur schwer tatsächlich auf Rezeptoren in der Zellmembran zurückzuführen. Demgegenüber bietet die tr-FRET-Methode mit SNAP-getaggten Rezeptoren eine deutlich höhere Signalausbeute bei klar definierter Position der räumlichen Interaktion auf die Zellmembran. Darüber hinaus findet die tatsächliche Analyse anders als in vielen älteren Assays, die die Rezeptoroligomerstruktur untersuchten, an lebenden Zellen statt. Dies bietet entscheidende Vorteile: So können beispielsweise direkt Modulatoren des Oligomerisierungsverhaltens beobachtet werden. Die Methode bietet weitere Vorteile bei der Untersuchung des „Crosstalk“ zwischen heterooligomerisierten Rezeptoren (wie beispielsweise in Fribourg et al. 2011), da mittels orthogonaler Färbetechniken wie dem SNAP- und CLIP-tag unterschiedliche Rezeptorspezies synchron untersucht werden können.

4.2 Möglichkeiten und Grenzen von tr-FRET zur Analyse von Rezeptoroligomerisierung

4.2.1 Etablierung der tr-FRET-Methode zwischen SNAP-getaggten Rezeptoren

Der SNAP-tag ermöglicht komfortable spezifische Proteinmarkierung. Mit 19,4kDa ist er etwas kleiner als die meisten autofluoreszierenden Proteine (sie besitzen Molekulargewichte von etwa 25kDa). Es gelang, ein Fusionsprotein aus ADRB2 und SNAP-tag zu klonieren. Mit dem N-terminalen Tag gelang es, zuverlässig und mit hoher Spezifität ausschließlich die in der Zellmembran liegenden ADRB2 mit fluoreszierenden Molekülen zu versehen.

Im Vergleich zu autofluoreszierenden Proteinen ergeben sich mit dem vorliegenden Ansatz mehrere Vorteile: Statt wenigen verfügbaren autofluoreszierenden Proteinen können mit dem Proteinmarkierungssystem beliebige, insbesondere synthetische Fluorophore mit deutlich günstigeren spektralen Eigenschaften, weniger Bleicheffekten und besserer Energieeffizienz (*quantum-yield*) an den zu untersuchenden Rezeptor gekoppelt werden. Außerdem ist bei einigen autofluoreszierenden Proteinen die Tendenz zur Oligomerisierung beobachtet worden, die es unbedingt auszuschließen gilt (Zhang et al. 2002; Keppler et al. 2004).

SNAP- und CLIP-basierte Membranfärbungen

Für die Färbung mithilfe des SNAP-tags erwiesen sich die mit Alexa-488 versehenen SNAP-Substrate als geeignete Fluorophore (dargestellt in Abbildung 3.2). In der Fluoreszenzmikroskopie konnten kontrastreiche Bilder mit geringer Hintergrundfluoreszenz und vernachlässigbarem unspezifischem Signal aufgenommen werden. Die Kreuzreaktivität der SNAP-Substrate mit der enzymatischen Aktivität des CLIP-tags konnte ausgeschlossen werden. Eine mit dem CLIP-tag versehene Variante des ADRB2 wurde kloniert - fand aber, da es bei den vorliegenden Versuchsreihen primär um den Nachweis von Homooligomeren ging, vorerst keine Anwendung. Für spätere Untersuchungen, die sich an Heterooligomere richten, kommt dem orthogonal zum SNAP-tag gleichzeitig nutzbaren CLIP-tag große Bedeutung zu.

Membranintegration des SNAP-getaggten ADRB2

Anfangs konnte mit dem bloßen SNAP-tag am N-Terminus des ADRB2 keine Membranfärbung realisiert werden (s. Abb. 3.4). Dabei darf nicht vergessen werden, dass es sich beim SNAP-tag um ein Protein der Größe von 20kDa handelt und Einflüsse auf die korrekte Membraninsertion denkbar sind. Insertion in die Membran war folglich erst mit einer Membraninsertionssequenz zu bewerkstelligen. Der verwendete Proteinrest ist dem murinen Htr3a-(Serotonin)-Rezeptor entnommen. Die ersten 72 Basenpaare dessen Sequenz genügen den Angaben des den SNAP-tag vermarktenden Herstellers New England Biolabs GmbH (Frankfurt a. M.) empirisch, um den mit dem SNAP-tag versehenen ADRB2 in die Zellmembran lokalisieren zu können. Damit ist gleichzeitig eine Limitation der Methode beschrieben. Zwar ist nicht davon auszugehen, dass eine N-terminale Modifikation dieser Länge entscheidenden Einfluss auf die Funktion des ADRB2 nimmt, doch ist bei jedem Experiment naturgemäß die geringste Komplexität zu bevorzugen. Der Versuch, auf die Membraninsertionssequenz zu verzichten und den SNAP-tag in den zweiten extrazellulären Loop zu klonieren, schlug fehl. Da es Hinweise gibt, dass die extrazellulären Loops außerdem als Interface der Dimerisierung fungieren könnten (Salahpour et al. 2004), ergab sich folglich der sinnvollere Kompromiss zu dem N-terminal lokalisierten SNAP-tag.

Mögliche Determinanten für eine Beeinflussung der Rezeptoroligomerisierung

Im gleichen Zusammenhang sollte eine *dimerisierungsdefiziente* Mutation des ADRB2 untersucht werden. In einer Publikation von Salahpour et al. (2004) war mit einem BRET-basierten Assay die Dimerisierung als Voraussetzung für die Lokalisation des ADRB2 in die Zellmembran gefunden worden. Interessanterweise deckt sich die Lokalisation mit der beim CXCR4-Chemokin-Rezeptor in der Kristallstruktur gefundenen Transmembrandomäne als Dimerisierungsinterface (B. Wu et al. 2010). Die Daten bezüglich des ADRB2 finden sich jedoch danach nicht mehr erneut durch andere Gruppen verifiziert. In der Versuchsreihe der vorliegenden Arbeit gelang mit der beschriebenen Mutation Tyr²⁸⁴ in der sechsten Transmembrandomäne des ADRB2 keine Expression des Rezeptors. Nicht ausgeschlossen ist die Vermutung, dass die Oligomerisierung tatsächlich Voraussetzung für die korrekte Membraninsertion sein könnte.

Auch ein in einer anderen Arbeit (Hebert et al. 1996) publiziertes Peptid der sechsten Transmembrandomäne (*TM VI*) fand in Publikationen weiter keine Beachtung und war insofern nicht

überzeugend in den vorliegenden Aufbau zu integrieren, als mit einfacher Zugabe eines Peptids nicht von seiner Integration in die Zellmembran auszugehen ist.

Weitere mögliche Determinanten für unterschiedliche Oligomerisierungszustände bei Rezeptoraktivierung waren schließlich die polymorphen Rezeptorvarianten p.Gly16Arg des ADRB2. Von den über 49 existierenden Varianten wurden diese beiden auf ihre Eigenschaften überprüft, da bei ihnen sowohl pharmakologische als auch klinische Unterschiede gemessen werden konnten.

Die tr-FRET-ratio als Maß für den Oligomerisierungszustand bei Aktivierung zeigte jedoch keine signifikanten Unterschiede. Damit besteht zwischen den unterschiedlichen Rezeptorkinetiken und dem Oligomerisierungszustand unter Stimulation keine Korrelation. Die Hypothese, dass eine Rolle der Oligomerisierung bezüglich der funktionellen Unterschiede der Rezeptorvarianten existiert, musste verworfen werden.

4.2.2 Hinreichende Kriterien zum Nachweis der Rezeptoroligomerisierung

Tr-FRET-basierte Studien bieten Sensitivität, die auch für den Nachweis von Rezeptoroligomeren auf nativen Gewebestücken ausreichend sein kann (Albizu et al. 2010). Streng genommen kann die Rezeptoroligomerisierung mit der vorliegenden Methode nicht direkt beobachtet werden. Um zu zeigen, dass die Messergebnisse auf oligomerisierten SNAP-getaggten Rezeptoren beruhen bedarf es mehrerer Versuchsreihen:

Zuerst war, wie im vorigen Abschnitt diskutiert, die korrekte Lokalisation des Fusionsproteins nachzuweisen. Diese war mit mikroskopischer Methoden gelungen und notwendig, weil alle weiteren Untersuchungen readerbasiert durchgeführt wurden und der Reader stets nur die Gesamtintensität eines Wells messen konnte - ungeachtet der subzellulären Lokalisation (s. Abschnitt 2.5). Dabei war unspezifische Hintergrundfluoreszenz durch die beschriebenen intrinsischen Vorteile der genutzten Fluorophore und der tr-FRET-Methode per se reduziert. Weiter konnte durch das zügige Readout multipler Wells jeweils einer Bedingung statistische Signifikanz schnell identifiziert und Messfehler minimiert werden.

Bei jedem Experiment, das die räumliche Nähe von Proteinen untersucht, ist auszuschließen, dass es sich nicht lediglich um der Rezeptordichte geschuldete und somit direkt von der Expressionsstärke abhängige Interaktion handelt. Im vorliegenden Fall war dazu die im Ergebnisteil erläuterte Methode verwendet worden. Erst mit der Beobachtung, dass die tr-FRET-Intensität direkt den exprimierten Rezeptoren proportional war - und nicht etwa in exponentiellem Zusammenhang stand - konnte die Kollisionshypothese verworfen werden.

4.2.3 Modulation der Oligomergröße und Rezeptorkonformationsänderungen durch Ligandenstimulation

In Abschnitt 3.3.2 konnte beobachtet werden, dass Stimulation mit Agonisten einen signifikanten Effekt auf die tr-FRET-Ratio der SNAP-getaggten Rezeptoren nimmt. Die Steigerung des tr-FRET-Signals war nicht bei Behandlung mit inversen Agonisten oder Antagonisten zu beobachten.

De-novo-Formation von Rezeptorligomeren

Es ist denkbar, dass durch die Behandlung mit Agonisten des ADRB2 neue Rezeptoroligomere aus zuvor monomeren Rezeptoreinheiten rekrutiert werden. Geht man davon aus, dass diese neu geformten Oligomere von der gleichen Größe wie die ursprünglichen waren, ergibt sich ein zusätzliches tr-FRET-Signal (bei 665nm) bei gleichzeitig verringertem Donor-Signal (bei 620nm); das am neu geformten Oligomer beteiligte Donorfluorophor verliert den größten Teil seiner Strahlungsintensität an die Förster-Interaktion mit dem Akzeptor. In den Ergebnissen wurde stets die Ratio, also der Quotient aus Akzeptor- und Donorintensität gemessen. Wenn man nun bedenkt, dass auch die nicht-oligomerisierten Rezeptorprotomere mit jeweils geringeren Beträgen der Akzeptor- und höheren Beträgen der Donorwellenlänge in die ursprüngliche tr-FRET-Ratio eingegangen waren, ergibt sich in der Summe eine Erhöhung der tr-FRET-Ratio bei Neubildung eines Oligomers aus primär nicht oligomerisierten Rezeptoren. Neubildung von Rezeptoroligomeren würde sich mit der vorliegenden Methode als größere tr-FRET-Ratio äußern bzw. kann als Ursache einer gegenüber der Ausgangssituation gestiegenen tr-FRET-Ratio nicht ausgeschlossen werden.

Änderung der Anzahl der Protomere in einem Rezeptoroligomer

Ebenso für die Signaländerung verantwortlich könnte neben der de-novo-Formation von Rezeptoroligomeren auch eine Änderung der Anzahl der an einem Rezeptoroligomer beteiligten Rezeptoren sein. Analog zu obiger Kalkulation würde, wenn zuvor monomere Rezeptoren zu einem Rezeptoroligomer hinzukommen, eine erhöhte tr-FRET-Ratio resultieren. Ein bloßer Zusammenschluss von bereits zuvor oligomerisierten, am tr-FRET-Signal beteiligten Rezeptoren, würde demgegenüber nicht zu veränderter tr-FRET-Ratio beitragen.

Verfügt man nur über die tr-FRET-Ratio an einem Messpunkt mit festgesetzter Donor- und Akzeptorkonzentration, können keine Aussagen über die Anzahl der Rezeptoren in einem Oligomer getroffen werden. Insofern ist auch die Änderung dieser Anzahl bei Stimulation a priori nicht als Ursache des größeren Signals auszuschließen. An dieser Stelle wurde daher erneut das Experiment durchgeführt, bei dem die Akzeptorkonzentration gegenüber fester Donorkonzentration variiert wird. Wie bereits in 3.3.2 geschildert, würde sich bei zunehmender Oligomergröße eine breitere Gauß-Verteilung des Signals ergeben. Da aber die erhaltene Gauß-Verteilung in direkter proportionaler Beziehung zur ursprünglichen stand, d.h. die neue Gauß-Verteilung sich durch Multiplikation mit einem für alle Funktionswerte konstanten Faktor aus der alten transformieren ließ, kann gefolgert werden, dass sich die Größe der Oligomere mit Ligandenstimulation nicht geändert hatte.

Rezeptorkonformationsänderungen

Das tr-FRET-Signal ist für einen effizienten Energietransfer von einer optimalen Entfernung zwischen den interagierenden Fluorophoren abhängig. Der optimale Energietransfer findet bei einem festen Radius statt. Bei dem definierten Radius R_0 (Förster-Radius) beläuft sich die Effizienz des Energietransfers konstitutiv auf 50%. Variation der Entfernung zwischen Donor- und Akzeptorfluorophoren um einen Betrag ΔR führt demnach zu einer neuen FRET-Effizienz $E = R_0^6 / (\Delta R^6 + R_0^6)$. Dabei befindet sich R_0 für Fluorophore wie die hier verwendeten üblicherweise im Bereich von

46nm (Doumazane et al. 2011; Maurel et al. 2008). Es ergibt sich, dass eine Änderung der Entfernung der FRET-Partner einen signalerhöhenden Effekt auf die tr-FRET-Ratio haben kann. Somit ist denkbar, dass bereits minimale Rezeptorkonformationsänderungen mit messbarer Änderung des tr-FRET-Signals einhergehen können.

Bei Untersuchungen der Kristallstruktur des ADRB2 wurde dem unstrukturierten N-Terminus insbesondere bei der Ligandenbindung Bedeutung beigemessen (Cherezov et al. 2007). Im vorliegenden Aufbau war der SNAP-tag N-terminal an das Fusionsprotein kloniert worden.

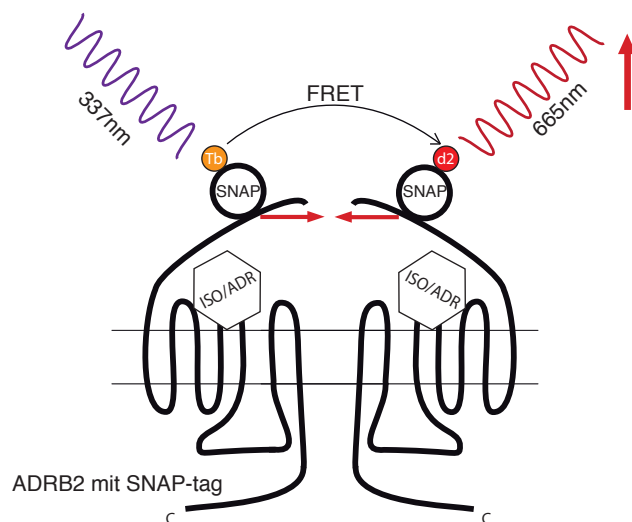


Abbildung 4.1: **N-terminale Veränderung bei Stimulation des ADRB2 mit Agonisten:** In einem denkbaren Szenario bewirken agonistische Liganden eine Bewegung des N-Terminus des ADRB2 und führen so zu höherer tr-FRET-Intensität.

Führt nun die Bindung von Agonisten - im Gegensatz zu der Bindung von Antagonisten - zu Konformationsänderungen des N-Terminus wie in Abbildung 4.1 illustriert, resultiert ein möglicherweise optimierter Abstand zwischen den tr-FRET-Partnern und damit ein höheres tr-FRET-Signal. Andere Studien, die auch intramolekulare FRET-Effekte, und damit rezeptorinterne Konformationsänderungen in Betracht zogen, attribuierten Agonisteneffekte den Konformationsänderungen in Transmembrandomäne VI (TM VI) (Fung et al. 2009; Latif et al. 2002; C. C. Zhu et al. 2002).

Die agonistabhängigen tr-FRET-Änderungen sind also gut mit Rezeptorkonformationsänderungen erklärbar. Mit dem Ansatz lässt sich jedoch nicht bestimmen, an welcher Stelle des Rezeptors die entscheidenden Konformationsänderungen stattfinden würden.

Rezeptorinternalisierung

In Abbildung 3.13 konnten morphologische Anhaltspunkte der Rezeptorinternalisierung bei Stimulation mit Agonisten gefunden werden. Dabei war das primär zellimpermeable Fluorophor Alexa Fluor 488 nach kovalenter Bindung an den SNAP-tag unter Stimulation innerhalb der Zellmembran zu sehen. Ursprünglich sollte die Oligomerisierung des ADRB2 an der Zellmembran untersucht werden. Die mögliche Internalisierung des ADRB2 stellt dabei eine Situation dar, unter der das tr-FRET-Signal nicht mehr eindeutig verwertbar ist.

Bereits kurze Stimulation mit Agonisten unter Kulturbedingungen führt im Falle des ADRB2

zu Endozytose und Rezeptorinternalisierung aus der Zellmembran (Von Zastrow et al. 1994). N-terminal SNAP-getaggte Rezeptoren sind in neueren Publikationen zur Untersuchung von Rezeptorinternalisierung verwendet worden (Roed et al. 2014). In der Publikation von Roed et al. (2014) diente der ADRB2 als Referenz für Rezeptorinternalisierung. Bereits nach zehnminütiger Stimulation mit Isoproterenol bei der Konzentration 1nM konnte tr-FRET-basiert die Internalisierung eines Großteils der Rezeptoren beobachtet werden.

In einer BRET-basierten Studie war geschlossen worden, dass Rezeptorinternalisierung des ADRB2 zur Dissoziation der Rezeptoroligomere führte (Lan et al. 2011). Davon ist mit den hier gewonnenen Daten nicht auszugehen. Im Gegenteil suggeriert das angehobene tr-FRET-Signal eher einen dichteren Rezeptorverbund.

Zusammenfassend ist eine Signalanhebung bei Ligandenstimulation, wie unter den hier beschriebenen Bedingungen, gut mit der dichteren Agglomeration von Rezeptoren vereinbar, die unter endozytotischen Bedingungen zu erwarten ist.

Interpretation

In der Literatur wird über eine mögliche Rolle der Assoziation bzw. Dissoziation von Oligomeren bei Stimulation mit Liganden berichtet. In einigen Publikationen führte Stimulation mit Liganden zu postulierter Assoziation (Angers et al. 2000), andere berichten über keine Änderung der Anzahl der an einem Oligomer beteiligten Protomere (Dorsch et al. 2009). In einer weiteren Publikation wird die Konformationsänderung der Protomere gegenüber den angrenzenden als Ursache agonistenbedingter Signaländerung angeführt (Fung et al. 2009). Die Anzahl der in einem Oligomer befindlichen Protomere scheint von Rezeptor zu Rezeptor unterschiedlich zu sein. FRAP-basiert gemessen ergaben sich für den ADRB2 Hinweise auf höhergradige Oligomere (Dorsch et al. 2009). Eine neuere Publikation, die sich aufwendiger FCS- und PCH-Untersuchungen bedient (Herrick-Davis et al. 2013), kommt zum Schluss, dass es sich unter anderem im Fall des ADRB2 um strikte Dimere handelt und höhergradige Oligomere wiederum nicht vorkommen. Die hier gefundenen Ergebnisse widersprechen diesen nicht, liefern jedoch - der Eigenschaften der tr-FRET-Methode geschuldet - per se keine eindeutige Gradierung der Oligomere.

Die mit der vorliegenden Methode gewonnenen Ergebnisse sind sowohl mit Rezeptorkonformationsänderungen als auch mit Effekten der Rezeptorinternalisierung vereinbar.

Der beobachtete Effekt nahm bei längerer Stimulation zu. Ebenso verhielten sich die mikroskopisch bestimmten Veränderungen der Rezeptorlokalisierung. Es existiert also eine positive Korrelation zwischen Rezeptorinternalisierung und vergrößerter tr-FRET-Ratio. Gleichmaßen wahrscheinlich sind Konformationsänderungen innerhalb des Rezeptors oder im räumlichen Verhalten der Protomere zueinander. Dagegen konnten Assoziations- oder Dissoziationseffekte von Protomeren als Ursache des veränderten tr-FRET-Signals ausgeschlossen werden.

4.2.4 tr-FRET zwischen Rezeptorliganden

tr-FRET zwischen fluoreszierenden Liganden des ADRB2 in HEK293-Zellen

Mit den vorliegenden Ergebnissen ist es gelungen, Rezeptoroligomere des nicht-modifizierten ADRB2 nachzuweisen. Dabei wurden tr-FRET-geeignete Liganden synthetisiert.

Dabei war signalalterierende Interaktion der Liganden mit den zu untersuchenden Rezeptoren, wie sie in Abschnitt 3.3.2 festgestellt worden war, zu minimieren. Ferner gibt es Beobachtungen in der Literatur, nach denen mit Agonisten teils geringere Signalausbeute erreicht wurde (Albizu et al. 2010; Emami-Nemini et al. 2013). Daher erfolgte die de-novo Synthese eines in Bezug auf Rezeptorinternalisierung und Affinitätsänderung durch Phosphorylierungseffekte inerten Ligandenderivats. Der inverse Agonist ICI-118,551 besitzt äußerst hohe Affinität und Spezifität für den ADRB2 ($K_D = 4.6 \pm 2\text{nM}$) (Mauriège et al. 1988). Dem Labor von Prof. Dr. Peter Gmeiner (Universität Erlangen) war die Synthese eines funktionellen Liganden mit einem Linker und den daran gekoppelten Fluorophoren Lumi4 und Alexa647 gelungen. Erst mit dieser Verbindung waren die beschriebenen Experimente möglich.

Zum Nachweis der Spezifität des FRET-Signals für die Rezeptoroligomere wurden mehrere Experimente durchgeführt: Es konnte im Assay zur Analyse der spezifischen Bindung des Ligandenderivats eine typische Affinitätskurve gemessen werden (s. Abb. 3.16). Die K_D betrug für den fluorophortragenden Antagonisten $8.9 \pm 4\text{nM}$. Damit war die Funktionalität des Liganden gezeigt. Die beiden Ligandenspezies (tr-FRET-Donor- und Akzeptorliganden) zeigten in einem Kompetitionsassay den für Rezeptoroligomere typischen gauß-verteilten Intensitätsverlauf des tr-FRET-Signals (s. Abb. 3.17). So konnte die für tr-FRET notwendige räumliche Nähe der Rezeptoren gezeigt werden. In Konkurrenz mit nicht-getaggten Liganden war das tr-FRET-Signal vollständig eliminierbar. Dies zeigt den spezifischen rezeptorgebundenen Ursprung des Signals.

In der Zusammenschau mit den Ergebnissen aus den SNAP-tag-gestützten Untersuchungen konnte die Hypothese verworfen werden, dass das tr-FRET-Signal lediglich der Kollision monomerer Rezeptoren geschuldet war (s. Abb. 3.8).

Analog zu den Ergebnissen, die bei SNAP-getaggten Rezeptoren gewonnen werden konnten, stellt sich die Frage nach dem Verhalten der nicht-modifizierten Rezeptoren unter Stimulation. Da aber die Ligandenbindungsstelle durch die fluoreszierenden Liganden bereits zumindest zum Teil für Agonisten nicht mehr zugänglich ist und die Rezeptoreigenschaften durch die Interaktion mit dem inversen Agonisten ICI-118,551 verändert sind, bestand diese Möglichkeit in der vorliegenden Versuchsreihe nicht mehr.

Untersuchungen des nativ exprimierten ADRB2

Für zukünftige Experimente mit dem nativ exprimierten ADRB2 etwa bei der Analyse von Gewebestücken kann folgendes geschlossen werden: Unter nativen Umständen ist mit deutlich geringerer Expression (s.u.) zu rechnen als im Falle eines Überexpressionssystems. Die Kollisionshypothese konnte aber schon unter Bedingungen der Überexpression der SNAP-getaggten Rezeptoren ausgeschlossen werden. Somit erscheint für den ADRB2 die zufällige Kollision als Ursache für das gemessene tr-FRET-Signal als unwahrscheinlich.

In anderen Versuchsreihen war unter sonst gleichen Bedingungen mit Rezeptoragonisten ein geringeres tr-FRET-Signal als mit -antagonisten beobachtet worden. Der Effekt ist auf das negativ-kooperative Bindungsverhalten von Agonisten im Vergleich zu den Antagonisten zurückgeführt worden und liefert weitere Evidenz für die Existenz von Rezeptoroligomeren im Gegensatz zur Kollisionshypothese (Cottet et al. 2012). Träfe die Kollisionshypothese zu, sollten mit Rezeptorant-

agonisten und -agonisten Signale gleicher Größenordnung zu beobachten sein. Gleichzeitig wird eine prinzipielle Limitation bei dem alleinigen Einsatz der ligandenbasierten Methode ersichtlich: Der Einsatz von Liganden selbst hat möglicherweise Einfluss auf die Oligomerisierung. Statt allein ligandenbasierte Assays durchzuführen, können durch den Einsatz von Fusionsproteinen aus dem zu untersuchenden Rezeptor und einem Proteinmarkierungssystem wie in der vorliegenden Arbeit zusätzlich Aussagen über den Einfluss der Liganden erst getroffen werden.

Die Rezeptoren der Lungenepithelzelllinien Calu-3, 16HBEo14 und A549 können mit der tr-FRET-Methode nicht auf ihre Oligomerisierungseigenschaften überprüft werden

Von weiterer Bedeutung ist die in-vivo-Analyse der Oligomerisierung des ADRB2. Dazu wurden drei humane Lungenepithelzelllinien (LEC) untersucht, die endogen über ein hohes Expressionsniveau verfügen sollen (Abraham et al. 2004). Sowohl bei den Calu-3-, als auch bei 16HBEo14- und A549-Zellen konnte aber in Versuchsreihen analog zu den mit ADRB2 transfizierten HEK293-Zellen keine ausreichend hohe Signalausbeute erreicht werden. So war zum einen keine Gauß-Verteilung bei Variation des Akzeptorliganden messbar (s. Abb. 3.17) und zum anderen auch unter Zugabe einer hohen Konzentration unmarkierten Ligands keine Reversibilität des tr-FRET-Signals zu messen (s. Abb. 3.18). Es ist daher davon auszugehen, dass selbst mit dem hochaffinen fluoreszierenden Liganden keine ausreichende Sensitivität für das Expressionsniveau der Lungenepithelzellen erreicht werden konnte.

Welche Sensitivität die Methode tatsächlich aufweist, ist schwer zu bewerten. In der Literatur ist mit ähnlichen Assays der Nachweis endogen exprimierter Rezeptoren bei einer Expressionsstärke von etwa 1 – 3pmol/mg Protein gelungen (Albizu et al. 2010). Demgegenüber ist die Rezeptordichte bei den verwendeten Lungenepithelzellen mit nach Radioligandenbindung gemessenen 10000 Rezeptoren pro Zelle um etwa das 30-fache geringer (Abraham et al. 2004). Die Detektionsschwelle für fluoreszierende Liganden bei der vergleichbaren Methode der Fluoreszenzpolarisation liegt ebenfalls bei etwa 1pmol/mg Protein (Gagne et al. 2002; De Jong et al. 2005).

5 Zusammenfassung und Ausblick

Entgegen dem klassischen Paradigma, die Gruppe der G-Protein-gekoppelten Rezeptoren sei strukturell auf Einzeleinheiten (Monomeren) basiert, geht man heute vom Vorhandensein konstitutiver Rezeptoroligomere als erstem Signaltransduktor bei der zellulären Signalisierung aus. Zwar existierten bislang eine Reihe von Untersuchungsmethoden, die diese These stützten, doch fehlten zur substantiellen Validierung noch Systeme, die unter in-vivo-Bedingungen spezifische Evidenz liefern können.

Mit dieser Arbeit konnte mittels einer auf tr-FRET basierenden Methode speziell die Oligomerisierung des humanen β_2 -Adrenozeptors (ADRB2) untersucht werden. Dazu wurden zunächst mehrere Untersuchungsmethoden etabliert und validiert. Zuerst konnten unter Verwendung des SNAP-tag geeignete Expressionssysteme generiert werden, die die kovalente Bindung tr-FRET-kompatibler Fluorophore erlaubten. Mit dieser Methode gelang der Nachweis von Rezeptoroligomeren und die Untersuchung von modulierenden Faktoren. Es konnte gezeigt werden, dass der zellmembrangebundene ADRB2 Oligomere mindestens der Größenordnung zwei bildet. Weiter zeigte die Bindung von Agonisten, nicht jedoch die von Antagonisten oder inversen Agonisten einen signifikanten Signalanstieg des tr-FRET-Signals zwischen oligomerisierten Rezeptoren. Es ist davon auszugehen, dass die Anhebung des Signals nicht mit einer denkbaren Änderung der Anzahl der sich in einem Rezeptoroligomer befindlichen Protomere in Verbindung gebracht werden kann, sondern mit N-terminalen Konformationsänderungen der untersuchten Rezeptorspezies oder im Rahmen von Internalisierung unter Agonistenstimulation einhergeht. Durch die ausbleibende Signaländerung bei Stimulation mit einem inversen Agonisten konnte dieser als in Bezug auf die Rezeptoroligomerisierung neutral eingestuft und für die folgende Ligandensynthese priorisiert werden. Weiter konnte gezeigt werden, dass weder den bekannten Rezeptorvarianten noch der Rezeptorglykosylierung des ADRB2 im Zusammenhang mit der Oligomerisierung eine Rolle zukommt.

Nach dem prinzipiellen Nachweis der Oligomerisierung konnte der nicht-modifizierte ADRB2 mittels fluoreszierender Liganden weiter charakterisiert werden. Dazu wurden mit den Fluorophoren Lumi4 und Alexa 647 verknüpfte Liganden synthetisiert. Mit diesen, bislang nicht verfügbaren, invers antagonistischen Rezeptorliganden höchster Spezifität, konnten membrangebundene Rezeptoroligomere auf transfizierten HEK-Zellen nachgewiesen werden. Damit konnte die prinzipielle Eignung eines tr-FRET-basierten Ansatzes im Falle des ADRB2 auch für native Zellen gezeigt werden. Mit der Etablierung der hier beschriebenen Methodik ergeben sich für zukünftige Anwendungen essentielle Grundlagen, sowie die Möglichkeit des Transfers auf andere Rezeptoren. Mit ligandengebundenen tr-FRET-Fluorophoren können im Hochdurchsatzverfahren neue Verbindungen auf ihre Eigenschaften an Rezeptoren getestet werden.

Abbildungsverzeichnis

1.1	Signaltransduktion eines GPCRs am Beispiel des ADRB2 (hier β_2 AR) aus Rosenbaum et al. 2009.	2
1.2	Rolle der Rezeptoroligomerisierung (aus Terrillon et al. 2004): 1 Rezeptorreifung; 2 Dynamische Regulierung der Oligomerisierung durch Ligandenbindung; 3 Heterodimerisierung von Rezeptoren bedingt positiv- oder negativ-kooperative Ligandenbindung; 4 verstärkte und inhibierte Signaltransduktion als Folge der Rezeptoroligomerisierung; 5 Heterooligomerisierung ruft möglicherweise Rezeptorinternalisierung schon bei Aktivierung nur eines Protomers hervor, beziehungsweise blockiert ein endozytoseresistenter Protomer die Internalisierung seines gekoppelten Rezeptors im Heterooligomer.	6
1.3	Funktionsprinzip der tr-FRET-Methode: Die Messung der Akzeptoremission erfolgt erst 60ns nach Exzitation des Donors. So können die Störsignale der kurzlebigen unspezifischen Matrixfluoreszenz und direkte Exzitation des Akzeptors durch den initialen Energiepuls minimiert werden.	10
3.1	Funktionsweise des SNAP-tag: Ein Fluorophor, das eine O ⁶ -Benzylguanin-Gruppe trägt, kann kovalent an ein SNAP-getaggtetes Protein gekoppelt werden.	27
3.2	Klonierungsstrategien: a Generierung eines Expressionsvektors mit dem SNAP-tag im zweiten extrazellulären Loop des ADRB2. b SNAP-tag am N-Terminus des ADRB2. c SNAP-tag am N-Terminus der dimerisierungsdefizienten Mutante des ADRB2.	28
3.3	Färbung mit SNAP-Substraten: Schematische Darstellung eines SNAP-getaggteten ADRB2 mit kovalent gebundenem Alexa Fluor 488.	29
3.4	Fluoreszenzfärbung mit Alexa-488-tragenden SNAP-Substraten und transient / stabil die SNAP-getaggteten ADRB2-Konstrukte exprimierenden HEK293- / Hela-Zellen. Als Negativkontrollen dienten nicht transfizierte bzw. den CLIP-getaggteten ADRB2 exprimierende Zellen. MIS = Membraninsertionssequenz. 2. EZL = Zweiter extrazellulärer Loop	29
3.5	Bindungskinetik des SNAP-Substrates mit gekoppeltem Lumi4-Donorfluorophor. SNAP-ADRB2 exprimierende HEK-Zellen wurden mit Lumi4-tragendem SNAP-Substrat (Lumi4-BG) inkubiert und darauffolgend bei Donorexzitation die Intensität seiner Emission bei 620nm gemessen. Die Intensität diente als Maß für die Anzahl der gebundenen Fluorophore. Als Negativkontrolle (unspezifische Bindung) dienten nicht-transfizierte HEK293-Zellen.	31

-
- 3.6 **Optimierung des tr-FRET-Signals bei oligomerbildenden Rezeptoren (schematische Darstellung):** Über einer fest eingestellten Konzentration des tr-FRET-Donors (Tb) wird die Konzentration des tr-FRET-Akzeptors (d2) gesteigert. Befinden sich die tr-FRET-Partner in räumlicher Nähe, ergibt sich bei Exzitation des Donorfluorophors ein gauß-verteilter Intensitätsverlauf des Akzeptorfluorophors. 32
- 3.7 **Ermittlung der optimalen Ligandenkonzentration zur Optimierung des Signal-Rausch-Verhältnisses:** **a** Das SNAP-getaggte ADRB2-Konstrukt stabil exprimierende HeLa-Zellen wurden mit fester Konzentration des Donorfluorophors und steigenden Konzentrationen des Akzeptorfluorophors (d2-BG) inkubiert. Bei Exzitation des Akzeptors wurde das Signal des Akzeptorfluorophors bei 665nm gemessen (schwarz). Als Negativkontrolle (grau) diente ein nicht-fluorophor-tragendes SNAP-Substrat (O6-BG). Der Intensitätsverlauf des FRET-Signals ergab eine Glockenkurve. **b** Um das Hintergrundsignal bereinigte ΔF -Kalkulation durch Subtraktion aus (a). 33
- 3.8 **Signalverhalten von in Oligomeren organisierten Fluorophoren gegenüber zufälliger Interaktion:** **a** Schematische Darstellung des zu erwartenden tr-FRET-Signals bei Variation der Rezeptordichte. Zufällige Interaktion (grau) liefert einen exponentiellen, Interaktion zwischen Oligomeren (schwarz) einen linearen Zusammenhang. **b** HEK293-Zellen wurden mit steigenden Mengen des zu exprimierenden ADRB2-Konstruktes transfiziert und die Rezeptordichte fluoressenzoptometrisch bestimmt (Abszisse). Daraufaufgehend wurden trFRET-Messungen mit Donor- und Akzeptor-substraten durchgeführt (Ordinate). Es ergab sich eine starke lineare Korrelation zwischen trFRET-Signal und Rezeptordichte. 34
- 3.9 **Effekt der Stimulation mit Liganden des SNAP-getaggten ADRB2 auf das tr-FRET-Signal:** Das ADRB2-Konstrukt stabil exprimierende HeLa-Zellen wurden mit den angegebenen Liganden vorstimuliert. Danach erfolgte Inkubation mit Donor- und Akzeptorfluorophoren. Anschließend wurde unter erneuter Stimulation mit Liganden das trFRET-Signal gemessen. Bei Stimulation mit den Agonisten Isoprenalin (Iso) und Adrenalin (Adr) wurde ein signifikant höheres trFRET-Signal gemessen. Kein signifikanter Unterschied ergab sich bei Stimulation mit dem inversen Agonisten ICI-118,551 (ICI) und dem Antagonisten Alprenolol. Als Negativkontrolle dienten nicht-transfizierte Zellen. (Daten normiert auf das Signal des nicht stimulierten Rezeptors.) 35
- 3.10 **Effekt der Stimulation mit Liganden auf die polymorphen Rezeptorvarianten Gly¹⁶ und Arg¹⁶ des ADRB2:** Zwischen den polymorphen Varianten Gly¹⁶ und Arg¹⁶ existieren bei Ligandenstimulation analog zur Messung in Abbildung 3.9 keine signifikanten Unterschiede in der tr-FRET-Ratio. (Daten normiert auf das Signal des nicht stimulierten Gly¹⁶-Rezeptors.) 36

-
- 3.11 **Einfluss der Rezeptoranzahl in einem Oligomer auf das trFRET-Signalverhalten:**
a Schematische Darstellung der zu erwartenden Signalverteilung höhergradiger Rezeptoroligomere gegenüber geringergradigen bei Variation der Akzeptorfluorophorkonzentration, konstanter Donorkonzentration und sonst gleichen Bedingungen.
b Messung des trFRET-Signals mit (+ 1 μ M Iso, schwarz) und ohne Stimulation durch den Agonisten Isoprenalin (- 1 μ M Iso, grau): Die Messwertpaare standen in strikter linearer Beziehung zueinander. (Lineare Interpolation in orange). Eine Verbreiterung der Gauß-Verteilung war nicht zu beobachten. 37
- 3.12 **Zeitabhängiger Effekt der Stimulation mit Liganden:** Die trFRET-Ratio wurde nach zwei- bzw. fünf-minütiger Stimulation mit (+ISO, grau) oder ohne Isoprenalin (-ISO, schwarz) gemessen. Nach fünf-minütiger Stimulation bei Kulturbedingungen stieg die tr-FRET-Ratio stärker als bei zwei-minütiger Stimulation bei Raumtemperatur. . . 38
- 3.13 **Effekt der Stimulation mit Liganden auf die subzelluläre Lokalisation der SNAP-getaggten Rezeptoren:** Verlagerung der fluoreszenzmikroskopisch bestimmten Rezeptorlokalisierung nach intrazellulär nach Stimulation mit Isoprenalin (Iso). Keine Änderung der Lokalisation nach Stimulation mit ICI 118,551 (ICI). 38
- 3.14 **Funktionsweise des Enzyms PNGase F:** Als Amidase schneidet das Enzym zwischen den innen gelegenen N-Acetylglucosamin- (GlcNAc) und Asparagin-Resten komplexer Oligosaccharide. 39
- 3.15 **Effekt einer Deglykosylierung auf die Oligomerisierung:** Die ADRB2 exprimierenden Hela-Zellen wurden ohne (-) oder mit 60 U PNGase F (+) zur Deglykosylierung inkubiert. Nach Markierung mit den SNAP-Substraten wurde die trFRET-Ratio unter Stimulation mit den angegebenen Rezeptorliganden gemessen. Die statistische Analyse ergab keinen signifikanten Effekt der Deglykosylierung auf die Änderung der tr-FRET-Ratio. 39
- 3.16 **Sättigung mit fluoreszierendem ICI-118,551:** Den ADRB2 transient exprimierende HEK293-Zellen wurden mit steigenden Konzentrationen des fluoreszierenden Liganden (Lumi4-ICI) inkubiert. Bei Exzitation konnte ein konzentrationsabhängiges Signal (ΔF gegenüber nicht transfizierten HEK293-Zellen) gemessen werden. 40
- 3.17 **Versuch der Detektion einer Oligomerisierung von endogen exprimiertem ADRB2 in humanen Lungeneithelzellen.** Für die mit dem ADRB2 transfizierten HEK293-Zellen ergab sich bei Variation der Konzentration des fluoreszierenden Akzeptorliganden und konstanter Konzentration des Donorliganden eine gauß-verteilte Intensitätskurve (Positivkontrolle). Bei den humanen Lungeneithelzellen Calu-3, 16HBEo14 und A549 war kein Signal messbar. 41
- 3.18 **Verdrängung des fluoreszierenden Liganden durch unmarkiertes ICI-118,551:** ADRB2-exprimierende HEK-293 Zellen (HEK-ADRB2-Gly16) wurden mit den Fluorophorliganden (ICI-Alexa647 und ICI-Lumi4) inkubiert und daruffolgend das tr-FRET-Signal gemessen. Durch die Zugabe von ICI-118,551 (+) in hoher Konzentration war dieses reversibel. Als Negativkontrolle dienten nicht-transfizierte HEK293-Zellen (HEK-0). Für die humane, endogen ADRB2 exprimierende Calu-3-Zelllinie konnte kein Signal gemessen werden. 42
-

4.1 **N-terminale Veränderung bei Stimulation des ADRB2 mit Agonisten:** In einem denkbaren Szenario bewirken agonistische Liganden eine Bewegung des N-Terminus des ADRB2 und führen so zu höherer tr-FRET-Intensität. 47

Literatur

- AbdAlla, S., H. Lothar, A. el Massiery & U. Quitterer (2001). Increased AT(1) receptor heterodimers in preeclampsia mediate enhanced angiotensin II responsiveness. *Nat Med* 7.9, S. 1003–9.
- Abraham, G., C. Kneuer, C. Ehrhardt, W. Honscha & F. R. Ungemach (2004). Expression of functional beta2-adrenergic receptors in the lung epithelial cell lines 16HBE14o(-), Calu-3 and A549. *Biochim Biophys Acta* 1691.2-3, S. 169–79.
- Ahles, A. & S. Engelhardt (2014). Polymorphic Variants of Adrenoceptors: Pharmacology, Physiology, and Role in Disease. *Pharmacol Rev* 66.3, S. 598–637.
- Ahles, A., F. Rochais, T. Frambach, M. Bünemann & S. Engelhardt (2011). A polymorphism-specific "memory" mechanism in the $\beta(2)$ -adrenergic receptor. *Sci Signal* 4.185, ra53.
- Albizu, L., M. Cottet, M. Kralikova, S. Stoev, R. Seyer, I. Brabet, T. Roux, H. Bazin, E. Bourrier, L. Lamarque, C. Breton, M.-L. Rives, A. Newman, J. Javitch, E. Trinquet, M. Manning, J.-P. Pin, B. Mouillac & T. Durroux (2010). Time-resolved FRET between GPCR ligands reveals oligomers in native tissues. *Nat Chem Biol* 6.8, S. 587–94.
- Angers, S., a. Salahpour, E. Joly, S. Hilairret, D. Chelsky, M. Dennis & M. Bouvier (2000). Detection of beta 2-adrenergic receptor dimerization in living cells using bioluminescence resonance energy transfer (BRET). *Proc Natl Acad Sci U S A* 97.7, S. 3684–9.
- Brophy, J. M. (2001). β -Blockers in Congestive Heart Failure: A Bayesian Meta-Analysis. *Ann Intern Med* 134.7, S. 550.
- Brunton, L., B. Chabner & B. Knollman (2011). *Goodman and Gilman's The Pharmacological Basis of Therapeutics, Twelfth Edition*, S. 203.
- Burford, N. T., T. Wehrman, D. Bassoni, J. O'Connell, M. Banks, L. Zhang & A. Alt (2014). Identification of Selective Agonists and Positive Allosteric Modulators for μ - and δ -Opioid Receptors from a Single High-Throughput Screen.
- Calebiro, D., F. Rieken, J. Wagner, T. Sungkaworn, U. Zabel, A. Borzi, E. Cocucci, A. Zürn & M. J. Lohse (2013). Single-molecule analysis of fluorescently labeled G-protein-coupled receptors reveals complexes with distinct dynamics and organization. *Proc Natl Acad Sci U S A* 110.2, S. 743–8.
- Cherezov, V., D. M. Rosenbaum, M. a. Hanson, S. G. F. Rasmussen, F. S. Thian, T. S. Kobilka, H.-J. Choi, P. Kuhn, W. I. Weis, B. K. Kobilka & R. C. Stevens (2007). High-resolution crystal structure of an engineered human beta2-adrenergic G protein-coupled receptor. *Science* 318.5854, S. 1258–65.
- Chuang, D. M. & E. Costa (1979). Evidence for internalization of the recognition site of beta-adrenergic receptors during receptor subsensitivity induced by (-)-isoproterenol. *Proc Natl Acad Sci U S A* 76.6, S. 3024–3028.
- Chung, L. P., G. Waterer & P. J. Thompson (2011). Pharmacogenetics of β 2 adrenergic receptor gene polymorphisms, long-acting β -agonists and asthma. *Clin Exp Allergy* 41.3, S. 312–26.

- Comps-Agrar, L., D. Maurel, P. Rondard, J.-p. Pin, E. Trinquet & L. Prézeau (2011). *Signal Transduction Protocols*. Hrsg. von L. M. Luttrell & S. S. G. Ferguson. Bd. 756. Methods in Molecular Biology. Totowa, NJ: Humana Press.
- Cottet, M., O. Faklaris, D. Maurel, P. Scholler, E. Doumazane, E. Trinquet, J.-P. Pin & T. Durroux (2012). BRET and Time-resolved FRET strategy to study GPCR oligomerization: from cell lines toward native tissues. *Front Endocrinol (Lausanne)* 3, July, S. 92.
- Daniels, D. J., N. R. Lenard, C. L. Etienne, P.-Y. Law, S. C. Roerig & P. S. Portoghese (2005). Opioid-induced tolerance and dependence in mice is modulated by the distance between pharmacophores in a bivalent ligand series. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102.52, S. 19208–13.
- De Jong, L. a. a., D. R. a. Uges, J. P. Franke & R. Bischoff (2005). Receptor-ligand binding assays: Technologies and applications. *J Chromatogr B Anal Technol Biomed Life Sci* 829.1-2, S. 1–25.
- Dorsch, S., K.-N. Klotz, S. Engelhardt, M. J. Lohse & M. Bünemann (2009). Analysis of receptor oligomerization by FRAP microscopy. *Nat Methods* 6.3, S. 225–30.
- Doumazane, E., P. Scholler, J. M. Zwier, T. Eric, P. Rondard & J.-P. Pin (2011). A new approach to analyze cell surface protein complexes reveals specific heterodimeric metabotropic glutamate receptors. *FASEB J* 25.1, S. 66–77.
- Emami-Nemini, A., T. Roux, M. Leblay, E. Bourrier, L. Lamarque, E. Trinquet & M. J. Lohse (2013). Time-resolved fluorescence ligand binding for G protein-coupled receptors. *Nat Protoc* 8.7, S. 1307–20.
- Ferré, S., V. Casadó, L. a. Devi, M. Filizola, R. Jockers, M. J. Lohse, G. Milligan, J.-P. Pin & X. Guitart (2014). G protein-coupled receptor oligomerization revisited: functional and pharmacological perspectives. *Pharmacol Rev* 66.2, S. 413–34.
- Floyd, D. H., A. Geva, S. P. Bruinsma, M. C. Overton, K. J. Blumer & T. J. Baranski (2003). C5a receptor oligomerization. II. Fluorescence resonance energy transfer studies of a human G protein-coupled receptor expressed in yeast. *J Biol Chem* 278.37, S. 35354–35361.
- Förster, T. (1948). Zwischenmolekulare Energiewanderung und Fluoreszenz. *Ann Phys* 437.1-2, S. 55–75.
- Fredriksson, R., M. C. Lagerström, L.-G. Lundin & H. B. Schiöth (2003). The G-protein-coupled receptors in the human genome form five main families. Phylogenetic analysis, paralogon groups, and fingerprints. *Mol Pharmacol* 63.6, S. 1256–1272.
- Fribourg, M., J. L. Moreno, T. Holloway, D. Provasi, L. Baki, R. Mahajan, G. Park, S. K. Adney, C. Hatcher, J. M. Eltit, J. D. Ruta, L. Albizu, Z. Li, A. Umali, J. Shim, A. Fabiato, A. D. MacKerell, V. Brezina, S. C. Sealfon, M. Filizola, J. González-Maeso & D. E. Logothetis (2011). Decoding the Signaling of a GPCR Heteromeric Complex Reveals a Unifying Mechanism of Action of Antipsychotic Drugs. *Cell* 147.5, S. 1011–1023.
- Fung, J. J., X. Deupi, L. Pardo, X. J. Yao, G. a. Velez-Ruiz, B. T. Devree, R. K. Sunahara & B. K. Kobilka (2009). Ligand-regulated oligomerization of beta(2)-adrenoceptors in a model lipid bilayer. *EMBO J* 28.21, S. 3315–28.
- Fuxe, K., L. F. Agnati, K. Jacobsen, J. Hillion, M. Canals, M. Torvinen, B. Tinner-Staines, W. Staines, D. Rosin, A. Terasmaa, P. Popoli, G. Leo, V. Vergoni, C. Lluís, F. Ciruela, R. Franco & S. Ferré (2003). Receptor heteromerization in adenosine A2A receptor signaling: relevance for striatal function and Parkinson's disease. *Neurology* 61.11 Suppl 6, S19–23.

- Fuxe, K., S. Ferré, M. Canals, M. Torvinen, A. Terasmaa, D. Marcellino, S. R. Goldberg, W. Staines, K. X. Jacobsen, C. Lluís, A. S. Woods, L. F. Agnati & R. Franco (2005). Adenosine A2A and dopamine D2 heteromeric receptor complexes and their function. *J Mol Neurosci* 26.2-3, S. 209–20.
- Gagne, a., P. Banks & S. D. Hurt (2002). Use of fluorescence polarization detection for the measurement of fluopeptidtm binding to G protein-coupled receptors. *J Recept Signal Transduct Res* 22.1-4, S. 333–343.
- Gautier, A., A. Juillerat, C. Heinis, I. R. Corrêa, M. Kindermann, F. Beaufils & K. Johnsson (2008). An engineered protein tag for multiprotein labeling in living cells. *Chem Biol* 15.2, S. 128–36.
- George, S. R., B. F. O'Dowd & S. P. Lee (2002). G-Protein-coupled receptor oligomerization and its potential for drug discovery. *Nat Rev Drug Discov* 1.10, S. 808–820.
- Gomes, I., A. Gupta, J. Filipovska, H. H. Szeto, J. E. Pintar & L. a. Devi (2004). A role for heterodimerization of mu and delta opiate receptors in enhancing morphine analgesia. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101.14, S. 5135–5139.
- Green, S. A., J. Turki, M. Innis & S. B. Liggett (1994). Amino-terminal polymorphisms of the human beta 2-adrenergic receptor impart distinct agonist-promoted regulatory properties. *Biochemistry* 33.32, S. 9414–9.
- Gronemeyer, T., C. Chidley, A. Juillerat, C. Heinis & K. Johnsson (2006). Directed evolution of O6-alkylguanine-DNA alkyltransferase for applications in protein labeling. *Protein Eng Des Sel* 19.7, S. 309–316.
- Hawkins, G. A., K. Tantisira, D. A. Meyers, E. J. Ampleford, W. C. Moore, B. Klanderman, S. B. Liggett, S. P. Peters, S. T. Weiss & E. R. Bleecker (2006). Sequence, haplotype, and association analysis of ADRbeta2 in a multiethnic asthma case-control study. *Am J Respir Crit Care Med* 174.10, S. 1101–9.
- He, S.-Q., Z.-N. Zhang, J.-S. Guan, H.-R. Liu, B. Zhao, H.-B. Wang, Q. Li, H. Yang, J. Luo, Z.-Y. Li, Q. Wang, Y.-J. Lu, L. Bao & X. Zhang (2011). Facilitation of μ -opioid receptor activity by preventing δ -opioid receptor-mediated codegradation. *Neuron* 69.1, S. 120–31.
- Hebert, T. E., S. Moffett, J. P. Morello, T. P. Loisel, D. G. Bichet, C. Barret & M. Bouvier (1996). A peptide derived from a beta2-adrenergic receptor transmembrane domain inhibits both receptor dimerization and activation. *J Biol Chem* 271.27, S. 16384–92.
- Heldin, C. H. (1995). Dimerization of cell surface receptors in signal transduction. *Cell* 80.2, S. 213–23.
- Herrick-Davis, K., E. Grinde, A. Cowan & J. E. Mazurkiewicz (2013). Fluorescence Correlation Spectroscopy Analysis of Serotonin, Adrenergic, Muscarinic, and Dopamine Receptor Dimerization: The Oligomer Number Puzzle. *Mol Pharmacol* 84.4, S. 630–642.
- Hiller, C., J. Kühhorn & P. Gmeiner (2013). Class A G-protein-coupled receptor (GPCR) dimers and bivalent ligands. *J Med Chem* 56.17, S. 6542–6559.
- Hillion, J., M. Canals, M. Torvinen, V. Casadó, R. Scott, A. Terasmaa, A. Hansson, S. Watson, M. E. Olah, J. Mallol, E. I. Canela, M. Zoli, L. F. Agnati, C. F. Ibáñez, C. Lluís, R. Franco, S. Ferré & K. Fuxe (2002). Coaggregation, cointernalization, and codesensitization of adenosine A2A receptors and dopamine D2 receptors. *J Biol Chem* 277.20, S. 18091–18097.
- Hoffman, B. B. & R. J. Lefkowitz (1982). Adrenergic receptors in the heart. *Annu Rev Physiol* 44.1, S. 475–484.

- Issafras, H., S. Angers, S. Bulenger, C. Blanpain, M. Parmentier, C. Labbé-Jullié, M. Bouvier & S. Marullo (2002). Constitutive agonist-independent CCR5 oligomerization and antibody-mediated clustering occurring at physiological levels of receptors. *J Biol Chem* 277.38, S. 34666–34673.
- Jordan, B. A. & L. A. Devi (1999). G-protein-coupled receptor heterodimerization modulates receptor function. *Nature* 399.6737, S. 697–700.
- Keppeler, A., H. Pick, C. Arrivoli, H. Vogel & K. Johnsson (2004). Labeling of fusion proteins with synthetic fluorophores in live cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101.27, S. 9955–9959.
- Khelashvili, G., K. Dorff, J. Shan, M. Camacho-Artacho, L. Skrabanek, B. Vroiling, M. Bouvier, L. a. Devi, S. R. George, J. a. Javitch, M. J. Lohse, G. Milligan, R. R. Neubig, K. Palczewski, M. Parmentier, J.-P. Pin, G. Vriend, F. Campagne & M. Filizola (2010). GPCR-OKB: the G Protein Coupled Receptor Oligomer Knowledge Base. *Bioinformatics* 26.14, S. 1804–5.
- Koo, B.-K., M. Spit, I. Jordens, T. Y. Low, D. E. Stange, M. van de Wetering, J. H. van Es, S. Mohammed, A. J. R. Heck, M. M. Maurice & H. Clevers (2012). Tumour suppressor RNF43 is a stem-cell E3 ligase that induces endocytosis of Wnt receptors. *Nature* 488.7413, S. 665–669.
- Lan, T.-H., S. Kuravi & N. a. Lambert (2011). Internalization dissociates β 2-adrenergic receptors. *PLoS One* 6.2, e17361.
- Latif, R., P. Graves & T. F. Davies (2002). Ligand-dependent inhibition of oligomerization at the human thyrotropin receptor. *J Biol Chem* 277.47, S. 45059–45067.
- Lee, S. P., B. F. O'Dowd, G. Y. Ng, G. Varghese, H. Akil, A. Mansour, T. Nguyen & S. R. George (2000). Inhibition of cell surface expression by mutant receptors demonstrates that D2 dopamine receptors exist as oligomers in the cell. *eng. Mol Pharmacol* 58.1, S. 120–128.
- Lenard, N. R., D. J. Daniels, P. S. Portoghese & S. C. Roerig (2007). Absence of conditioned place preference or reinstatement with bivalent ligands containing mu-opioid receptor agonist and delta-opioid receptor antagonist pharmacophores. *Eur J Pharmacol* 566.1-3, S. 75–82.
- Manglik, A., A. C. Kruse, T. S. Kobilka, F. S. Thian, J. M. Mathiesen, R. K. Sunahara, L. Pardo, W. I. Weis, B. K. Kobilka & S. Granier (2012). Crystal structure of the [micro]-opioid receptor bound to a morphinan antagonist. *Nature* 485.7398, S. 321–326.
- Maurel, D., L. Comps-Agrar, C. Brock, M.-I. Rives, E. Bourrier, M. A. Ayoub, H. Bazin, N. Tinel, T. Durroux, L. Prézeau, E. Trinquet & J.-P. Pin (2008). Cell-surface protein-protein interaction analysis with time-resolved FRET and snap-tag technologies: application to GPCR oligomerization. *Nat Methods* 5.6, S. 561–7.
- Mauriège, P., G. De Pergola, M. Berlan & M. Lafontan (1988). Human fat cell beta-adrenergic receptors: beta-agonist-dependent lipolytic responses and characterization of beta-adrenergic binding sites on human fat cell membranes with highly selective beta 1-antagonists. *J Lipid Res* 29.5, S. 587–601.
- McGraw, D. W., K. A. Mihlbachler, M. R. Schwarb, F. F. Rahman, K. M. Small, K. F. Almoosa & S. B. Liggett (2006). Airway smooth muscle prostaglandin-EP1 receptors directly modulate beta2-adrenergic receptors within a unique heterodimeric complex. *J Clin Invest* 116.5, S. 1400–9.
- Milligan, G. (2010). The role of dimerisation in the cellular trafficking of G-protein-coupled receptors. *Curr Opin Pharmacol* 10.1, S. 23–29.
- Ortega, V. E., G. A. Hawkins, S. P. Peters & E. R. Bleecker (2007). Pharmacogenetics of the beta 2-adrenergic receptor gene. *Immunol Allergy Clin North Am* 27.4, S. 665–84, vii.

- Park, P. S.-H. & J. W. Wells (2004). Oligomeric potential of the M2 muscarinic cholinergic receptor. *J Neurochem* 90.3, S. 537–548.
- Pei, L., S. Li, M. Wang, M. Diwan, H. Anisman, P. J. Fletcher, J. N. Nobrega & F. Liu (2010). Uncoupling the dopamine D1-D2 receptor complex exerts antidepressant-like effects. *Nat Med* 16.12, S. 1393–5.
- Pfleger, K. D. G. & K. A. Eidne (2006). Illuminating insights into protein-protein interactions using bioluminescence resonance energy transfer (BRET). *Nat Methods* 3.3, S. 165–74.
- Pierce, K. L., R. T. Premont & R. J. Lefkowitz (2002). Seven-transmembrane receptors. *Nat Rev Mol Cell Biol* 3.9, S. 639–650.
- Pin, J.-P., R. Neubig, M. Bouvier, L. Devi, M. Filizola, J. a. Javitch, M. J. Lohse, G. Milligan, K. Palczewski, M. Parmentier & M. Spedding (2007). International Union of Basic and Clinical Pharmacology. LXVII. Recommendations for the recognition and nomenclature of G protein-coupled receptor heteromultimers. *Pharmacol Rev* 59.1, S. 5–13.
- Rajapakse, H. E., N. Gahlaut, S. Mohandessi, D. Yu, J. R. Turner & L. W. Miller (2010). Time-resolved luminescence resonance energy transfer imaging of protein-protein interactions in living cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 107.31, S. 13582–13587.
- Rashid, A. J., C. H. So, M. M. C. Kong, T. Furtak, M. El-Ghundi, R. Cheng, B. F. O’Dowd & S. R. George (2007). D1-D2 dopamine receptor heterooligomers with unique pharmacology are coupled to rapid activation of Gq/11 in the striatum. *Proc Natl Acad Sci* 104.2, S. 654–659.
- Roed, S. N., P. Wismann, C. R. Underwood, N. Kulahin, H. Iversen, K. A. Cappelen, L. Schäffer, J. Lehtonen, J. Hecksher-Soerensen, A. Secher, J. M. Mathiesen, H. Bräuner-Osborne, J. L. Whistler, S. M. Knudsen & M. Waldhoer (2014). Real-time trafficking and signaling of the glucagon-like peptide-1 receptor. *Mol Cell Endocrinol* 382.2, S. 938–949.
- Rosenbaum, D. M., S. G. F. Rasmussen & B. K. Kobilka (2009). The structure and function of G-protein-coupled receptors. *Nature* 459.7245, S. 356–363.
- Salahpour, A., S. Angers, J.-F. Mercier, M. Lagacé, S. Marullo & M. Bouvier (2004). Homodimerization of the beta2-adrenergic receptor as a prerequisite for cell surface targeting. *J Biol Chem* 279.32, S. 33390–7.
- Selvin, P. R. & J. E. Hearst (1994). Luminescence energy transfer using a terbium chelate: improvements on fluorescence energy transfer. *Proc Natl Acad Sci* 91.21, S. 10024–10028.
- Selvin, P. R. (2002). Principles and biophysical applications of lanthanide-based probes. *Annu Rev Biophys Biomol Struct* 31, S. 275–302.
- Söderberg, O., M. Gullberg, M. Jarvius, K. Ridderstråle, K.-J. Leuchowius, J. Jarvius, K. Wester, P. Hydbring, F. Bahram, L.-G. Larsson & U. Landegren (2006). Direct observation of individual endogenous protein complexes in situ by proximity ligation. *Nat Methods* 3.12, S. 995–1000.
- Tanganelli, S., K. Sandager Nielsen, L. Ferraro, T. Antonelli, J. Kehr, R. Franco, S. Ferré, L. F. Agnati, K. Fuxe & J. Scheel-Krüger (2004). Striatal plasticity at the network level. Focus on adenosine A2A and D2 interactions in models of Parkinson’s Disease. *Parkinsonism Relat Disord* 10.5, S. 273–80.
- Terrillon, S. & M. Bouvier (2004). Roles of G-protein-coupled receptor dimerization. *EMBO Rep* 5.1, S. 30–34.
- Von Zastrow, M. & B. K. Kobilka (1994). Antagonist-dependent and -independent steps in the mechanism of adrenergic receptor internalization. *J Biol Chem* 269.28, S. 18448–18452.

- Waldhoer, M., J. Fong, R. M. Jones, M. M. Lunzer, S. K. Sharma, E. Kostenis, P. S. Portoghese & J. L. Whistler (2005). A heterodimer-selective agonist shows in vivo relevance of G protein-coupled receptor dimers. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102.25, S. 9050–9055.
- Ward, R. J., J. D. Pediani & G. Milligan (2011). Heteromultimerization of Cannabinoid CB1 Receptor and Orexin OX1 Receptor Generates a Unique Complex in Which Both Protomers Are Regulated by Orexin A. *J Biol Chem* 286.43, S. 37414–37428.
- Wechsler, M. E., E. Lehman, S. C. Lazarus, R. F. Lemanske, H. a. Boushey, A. Deykin, J. V. Fahy, C. a. Sorkness, V. M. Chinchilli, T. J. Craig, E. DiMango, M. Kraft, F. Leone, R. J. Martin, S. P. Peters, S. J. Szeffler, W. Liu & E. Israel (2006). β -Adrenergic Receptor Polymorphisms and Response to Salmeterol. *Am J Respir Crit Care Med* 173.5, S. 519–526.
- Wood, A. J. & H. S. Nelson (1995). β -Adrenergic Bronchodilators. *N Engl J Med* 333.8, S. 499–507.
- Wu, B., E. Y. T. Chien, C. D. Mol, G. Fenalti, W. Liu, V. Katritch, R. Abagyan, A. Brooun, P. Wells, F. C. Bi, D. J. Hamel, P. Kuhn, T. M. Handel, V. Cherezov & R. C. Stevens (2010). Structures of the CXCR4 Chemokine GPCR with Small-Molecule and Cyclic Peptide Antagonists. *Science (80-)* 330.6007, S. 1066–1071.
- Wu, H., D. Wacker, M. Mileni, V. Katritch, G. W. Han, E. Vardy, W. Liu, A. A. Thompson, X.-P. Huang, F. I. Carroll, S. W. Mascarella, R. B. Westkaemper, P. D. Mosier, B. L. Roth, V. Cherezov & R. C. Stevens (2012). Structure of the human kappa-opioid receptor in complex with JD1c. *Nature* 485.7398, S. 327–332.
- Zastrow, M. von & A. C. Hanyaloglu (2008). Regulation of GPCRs by Endocytic Membrane Trafficking and Its Potential Implications. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 48, S. 537–568.
- Zhang, J., R. E. Campbell, A. Y. Ting & R. Y. Tsien (2002). Creating new fluorescent probes for cell biology. *Nat Rev Mol Cell Biol* 3.12, S. 906–918.
- Zhu, C. C., L. B. Cook & P. M. Hinkle (2002). Dimerization and phosphorylation of thyrotropin-releasing hormone receptors are modulated by agonist stimulation. *J Biol Chem* 277.31, S. 28228–28237.
- Zhu, X. & J. Wess (1998). Truncated V2 vasopressin receptors as negative regulators of wild-type V2 receptor function. *Biochemistry* 37.45, S. 15773–84.