



Vollständiger Abdruck der von der Fakultät für Medizin der Technischen Universität München zur Erlangung des akademischen Grades eines Dr. med. genehmigten Dissertation.

Oligomerization of β_2 -Adrenergic Receptors

Stephan Martin Skawran





FAKULTÄT FÜR MEDIZIN

INSTITUT FÜR PHARMAKOLOGIE UND TOXIKOLOGIE

Vollständiger Abdruck der von der Fakultät für Medizin der Technischen Universität München zur Erlangung des akademischen Grades eines Dr. med. genehmigten Dissertation.

Oligomerisierung von β_2 -Adrenozeptoren

Stephan Martin Skawran

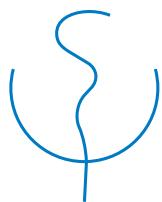
Vorsitzender: Prof. Dr. Dr. Stefan Engelhardt

Prüfer der Dissertation: 1.

2.

3.

Die Dissertation wurde am TODO: Submission date bei der Technischen Universität München eingereicht und durch die Fakultät für Medizin am TODO: Submission date 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 Abs. 6 und 7 Satz 2 angegebenen Hilfsmittel benutzt habe.

Danksagung

Verzeichnis der Abkürzungen

β_2 AR β_2 -Adrenorezeptor.

BG Benzyl-Guanin.

BRET Bioluminescence Resonance Energy Transfer.

CLIP-tag s. SNAP-tag.

DMSO Dimethylsulfoxid.

Epi Epinephrin.

FRET Fluorescence Resonance Energy Transfer.

GPCR G-Protein-gekoppelter-Rezeptor.

ICI ICI-118,551.

Iso Isoproterenol.

Lumi4 Markenname des trFRET-kompatiblen Terbium-Cryptats, das in vorliegender Arbeit als Donorfluorophor verwendet wurde.

MIS Membraninsertionssequenz.

PBS Dulbecco's Phosphate Buffered Saline.

SNAP-tag Markenname des auf der O⁶-Alkylguanin-DNA-Alkytransferase basierenden Proteinlabelingsystems.

tr-FRET time resolved Fluorescence Resonance Energy Transfer.

zB zum Beispiel.

Inhaltsverzeichnis

Danksagung	iii
Verzeichnis der Abkürzungen	vii
1 Einleitung	1
1.1 G-Protein-gekoppelte Rezeptoren (GPCR)	1
1.2 β -adrenerge Rezeptoren	1
1.2.1 Das β -adrenerge System	1
1.2.2 Polymorphismen der β -adrenergen Rezeptoren	1
1.2.3 Rezeptorinternalisierung	1
1.3 Oligomerisierung G-Protein-gekoppelter Rezeptoren	1
1.3.1 Homo- und Heterooligomerisierung G-Protein-gekoppelter Rezeptoren	1
1.3.2 Rezeptoroligomere als zukünftiges drug-target	1
1.4 Methoden zur Untersuchung der Oligomerisierung von Rezeptoren	1
1.4.1 time-resolved FRET	1
1.5 Zielsetzung dieser Arbeit	1
2 Material & Methoden	3
2.1 Material	3
2.1.1 Plasmide	3
2.1.2 Bakterien	3
2.1.3 Zelllinien & Zellkultur	3
2.1.4 Chemikalien & Reagenzien	4
2.1.5 SNAP-Substrate und fluoreszierende Liganden	4
2.1.6 Enzyme	5
2.1.7 Oligonukleotidprimer	5
2.1.8 Pharmaka	5
2.2 Molekularbiologische Methoden	6
2.2.1 DNA-Amplifikation mittels Polymerasekettenreaktion (PCR)	6
2.2.2 Agarose-Gelelektrophorese	6
2.2.3 Extraktion von DNA aus Agarosegelen	7
2.2.4 Restriktionsenzymverdau von PCR-Produkten und Plasmid-DNA	7
2.2.5 Ligation von DNA-Fragmenten	7
2.2.6 Klonierung mittels Gateway-Technologie	8
2.2.7 Mutagenese	8
2.2.8 Transformation elektrokompetenter DH10B-Bakterien	9

2.2.9	Mini/Maxi-Kultur und Mini/Maxi-DNA-Aufreinigung	9
2.2.10	Enzymatische Deglykosylierung	10
2.2.11	Messung der DNA-Konzentrationen	11
2.2.12	DNA-Sequenzierung	11
2.3	Methoden der eukaryotischen Zellbiologie	11
2.3.1	Kultivierung eukaryotischer Zelllinien	11
2.3.2	Auftauen und Einfrieren von Zellen	12
2.3.3	Transiente Transfektion von HEK293- und HeLa-Zellen mit Effectene	12
2.3.4	Generierung stabil exprimierender HEK293- und HeLa-Zelllinien	13
2.4	Mikroskopische Methoden	13
2.4.1	Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen	13
2.4.2	Fluoreszenzfärbungen mit SNAP-Substraten	14
2.4.3	Färbungen mit fluoreszierenden Liganden	14
2.5	Fluoreszenzoptische Methoden	14
2.5.1	trFRET mit SNAP-Substraten	15
2.5.2	trFRET mit fluoreszierenden Liganden	17
2.6	Statistische Methoden	17
3	Ergebnisse	19
3.1	Generierung von β_2 -Adrenezeptoren mit dem SNAP-tag	19
3.2	Fluoreszenzmikroskopie des β_2 -Adrenorezeptor (β_2 AR) mit dem SNAP-tag	21
3.3	Oligomerisierung des β_2 AR mit SNAP-tag	22
3.3.1	trFRET mit SNAP-Substraten	22
3.3.2	Einfluss der Stimulation mit Liganden des β_2 AR auf seine Oligomerisierung .	26
3.3.3	Einfluss der Rezeptorglykosylierung auf die Oligomerisierung des β_2 AR . . .	30
3.4	trFRET mit fluoreszierenden Liganden des β_2 AR	30
4	Diskussion	35
4.1	Untersuchung der Rezeptoroligomerisierung des β_2 -AR	35
4.2	Möglichkeiten und Grenzen von trFRET zur Analyse von Rezeptoroligomerisierung .	35
4.2.1	Etablierung der trFRET-Methode zwischen SNAP-getaggten Rezeptoren . . .	35
4.2.2	Modulation der Oligomergröße durch Ligandenstimulation	35
4.2.3	Anwendung auf trFRET zwischen Rezeptorliganden	35
4.2.4	trFRET zwischen fluoreszierenden Liganden auf nativen Zellen	35
4.3	Ausblick	36
5	Zusammenfassung	37
Abbildungsverzeichnis		39
Tabellenverzeichnis		41
Literatur		43

1 Einleitung

1.1 G-Protein-gekoppelte Rezeptoren (GPCR)

1.2 β -adrenerge Rezeptoren

1.2.1 Das β -adrenerge System

1.2.2 Polymorphismen der β -adrenergen Rezeptoren

1.2.3 Rezeptorinternalisierung

1.3 Oligomerisierung G-Protein-gekoppelter Rezeptoren

1.3.1 Homo- und Heterooligomerisierung G-Protein-gekoppelter Rezeptoren

1.3.2 Rezeptoroligomere als zukünftiges drug-target

1.4 Methoden zur Untersuchung der Oligomerisierung von Rezeptoren

1.4.1 time-resolved FRET

1.5 Zielsetzung dieser Arbeit

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 weitere Klonierung verwendet.

Vektor	Insert	Referenz
pSNAPf	-	New England Biolabs GmbH (Frankfurt a. M.)
pCLIPf	-	New England Biolabs GmbH (Frankfurt a. M.)
pSNAPf	5mis-SNAP-ADRB2-Gly16	New England Biolabs GmbH (Frankfurt a. M.)
pCLIPf	5mis-SNAP-ADRB2-Gly16	New England Biolabs GmbH (Frankfurt a. M.)
pENTR	ADRB2-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	Polymorphismus / Mutation
pSNAPf	5mis-SNAP-ADRB2	Arg16, Tyr284
pSNAPf	ADRB2	Arg16
pCLIPf	ADRB2	Arg16
pENTR	ADRB2-SNAP-ADRB2'	Arg16
pT-Rex Dest 30	ADRB2-SNAP-ADRB2'	Arg16

2.1.2 Bakterien

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

2.1.3 Zelllinien & Zellkultur

Zur Mikroskopie bzw. als Negativkontrollen wurden unverändert folgende Zelllinien verwendet:
Außerdem zur Transfektion wurden von diesen HEK293 und HeLa-Zellen verwendet.

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

2 Material & Methoden

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

Ende einer vom Serotonin (5HT₃)-Rezeptor abgeleitete Membraninsertionssequenz sowie direkt C-terminal anschließend den SNAP-Tag (SNAP-tag, New England Biolabs GmbH, Frankfurt a. M.).

Name	Stabil überexprimiertes Protein	Polymorphismen/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. Sie wurden wie angegeben bezogen.

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 β₂Adrenozeptoragonisten ICI-118,551 (ICI). Über einen passenden 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)

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 (Walldbronn)
N-Glykosidase F (PNGase F)	New England Biolabs (Frankfurt a. M.)
Restriktionsendonukleasen	New England Biolabs (Frankfurt a. M.)

2.1.6 Enzyme

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

2.1.8 Pharmaka

Name	Typ	Referenz
Alprenolol	β_2 Adrenozeptoranagonist	Sigma-Aldrich GmbH
ICI-118,551	inverser β_2 Adrenozeptoranagonist	Sigma-Aldrich GmbH
Isoproterenol	β_2 Adrenozeptoranagonist	Sigma-Aldrich GmbH
Epinephrin	natürlicher Adrenozeptoranagonist	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 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	
Annealing	57°C	30s	35
Elongation	68°C	60s / kb	
Finale Elongation	68°C	60s	1

2.2.2 Agarose-Gelelektrophorese

50xTAE-Puffer:	Tris	0,2M
	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 Elektophoresekammer (Peqlab, Erlangen) transferiert. Die DNA-Proben wurden 1:5 mit DNA-Ladepuffer verdünnt und in die Geltaschen geladen. Parallel wurden vorverdaute DNA-Stücke bekannter Länge (1-10kb) 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

ddH₂O 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 Destinations 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 so 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 des dimerisierungsdefizienten Variante Tyr284 des β_2 AR und der Klonierung des SNAP-tags in den zweiten extrazellulären Loop des β_2 AR 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 und Mini-DNA-Kultur und -aufreinigung amplifiziert und die Mutagenese über DNA-Sequenzierung verifiziert.

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

2.2.8 Transformation elektrokompetenter 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 elektrokompetenten DH10B-Bakterien gegeben, in eine 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, wenn nötig, weitere Amplifikation mittels Maxi-Kultur. Sollten die Klone weiter amplifiziert werden, 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 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 Geniticitin (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 adhärente 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)
+ 20% fötales Rinderserum (FBS)
+ 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 so 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 eukaryotischen 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

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

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 Genitcin versetzt war.

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

Im Folgenden beschriebene 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. Folgende Filtersets (Chroma Technology, Bellow Falls, USA) standen in Kombination mit dem jeweiligen Fluorophor zur Verfügung:

Fluorophor	Anregungsfilter	Strahlenteiler	Emissionsfilter
Alexa 488 d2	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 β_2 AR 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 trFRET-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 60µs bis 400µs nach initialer Exzitation gewählt.

2.5.1 trFRET mit SNAP-Substraten

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

Interaktion zwischen trFRET-Donor und trFRET-Akzeptor

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

10^5 Zellen pro Well der stabil oder transient exprimierenden HEK293- bzw. HeLa-Zellen wurden in 6-Tupeln für jede Bedingung in 30µL passenden Mediums in die Mikrotiterplatten ausgesät. Die Mikrotiterplatten wurden über Nacht bei 37°C und 5% CO₂ inkubiert.

In Experimenten, in denen eine Ligandenstimulation erfolgte, wurde im nächsten Schritt eine Prästimulation durchgeführt. In allen Wells wurde das Zellkulturmedium durch 20µL frisches Medium mit oder ohne dem gewünschten Liganden ersetzt.

Zur Reaktion mit den SNAP-Substraten wurden die in 2.1.5 angegebenen Donor- und Akzeptorfluorophore mit O⁶-Benzylguaniningruppen 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 Benzylguaniningruppe wurde das in den Wells vorhandene Zellkulturmedium durch 10µL 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 Waschschritt in einer PBS-Lösung aufgenommen, die den Liganden enthielt, sonst wurde reiner PBS-Puffer zugegeben.

Die Mikrotiterplatten wurden wie angegeben im Mikrotiterplattenlesegerät ausgelesen.

Messung des trFRET-Signals bei Ligandenstimulation

Zur Messung des trFRET-Signals SNAP-getagter 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 trFRET-Signal zu erwarten war ($[BG\text{-Lumi}4] = 10\text{nM}$; $[BG\text{-d2}] = 100\text{nM}$).

Dieser Versuch wurde in zwei Varianten durchgeführt:

In der ersten Variante erfolgte eine Prästimulation mit den Agonisten und Antagonisten, wie in 2.5.1 beschrieben. 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 trFRET-Signal

Zur Messung des Einflusses der transfizierten Plasmid-Masse auf die Intensität des trFRET-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% CO_2 inkubiert.

Wie in 2.3.3 beschrieben, wurden zwischen 1ng und 200ng Plasmid-DNA, die für einen SNAP-tag tragendes Protein codierte, transfiziert. Die Zellen wurden 5h bei 37°C und 5% CO_2 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% CO_2 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 trFRET-Intensität bei 665nm ($\Delta F665$) 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 trFRET-Intensität aufgetragen wurde.

2.5.2 trFRET mit fluoreszierenden Liganden

Ligandenbindung und -sättigung

Zur Bestimmung der Sättigungskonzentration des fluoreszierenden trFRET-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-ICl) 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 mit zuvor beschriebenen Einstellungen.

Interaktion zwischen trFRET-Donor-Ligand und trFRET-Akzeptor-Ligand

Zur Messung der spezifischen räumlichen Interaktion zwischen trFRET-Donor- und trFRET-Akzeptorligand wurden 8000 Zellen der beschriebenen Zelllinien pro Well in 384-well-Mikrotiterplatten ausgesät und über Nacht bei 37°C und 5% CO₂ inkubiert.

Zur Ligandenbindung wurde Zellkulturmedium mit variablen Akzeptorkonzentrationen und fixer Akzeptorkonzentration 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.

Wie in den Lebenswissenschaften üblich, sind Messwerte, wenn nicht anders angegeben, mit Mittelwert und Standardfehler dargestellt.

3 Ergebnisse

3.1 Generierung von β_2 -Adrenerzeptoren mit dem SNAP-tag

Zur Untersuchung der Oligomerisierung des β_2 AR 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 trFRET-kompatible, sind kommerziell verfügbar. Die Funktionsweise ist in Abbildung 3.1 dargestellt.

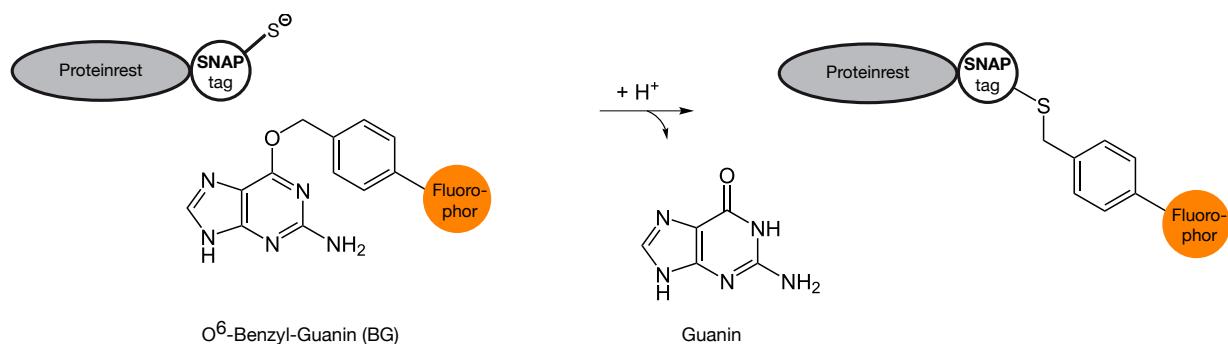


Abbildung 3.1: Funktionsweise des SNAP-tag

Darauf basierend wurden Vektoren kloniert, die den β_2 AR trugen, der N-terminal über den SNAP-tag verfügte.

Mittels Fluoreszenzmikroskopie konnte initial gezeigt werden, dass mit der N-terminalen Modifikation des β_2 AR keine Membranexpression des β_2 AR mehr erfolgte (s. Abb. 3.3). Infolgedessen wurde weiter N-terminal eine Proteinsequenz zur Membraninsertion (abgeleitet von einer Sequenz, die sich im Serotoninrezeptor findet) verwendet, die zur zufriedenstellenden Expression des β_2 AR führte.

In Abbildung 3.2 sind schematisch die Klonierungsstrategien zu den final verwendeten Vektoren dargestellt. Es wurden Expressionsvektoren erzeugt, die die SNAP-getaggenen natürlich vorkommenden Varianten Arg16 und Gly16 des β_2 AR exprimierten.

Darüber hinaus wurden zwei weitere Expressionssysteme generiert: Ein Vektor, der den β_2 AR mit dem SNAP-tag im zweiten extrazellulären Loop trug, sowie einen weiteren, 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 β_2 AR trugen (nicht dargestellt).

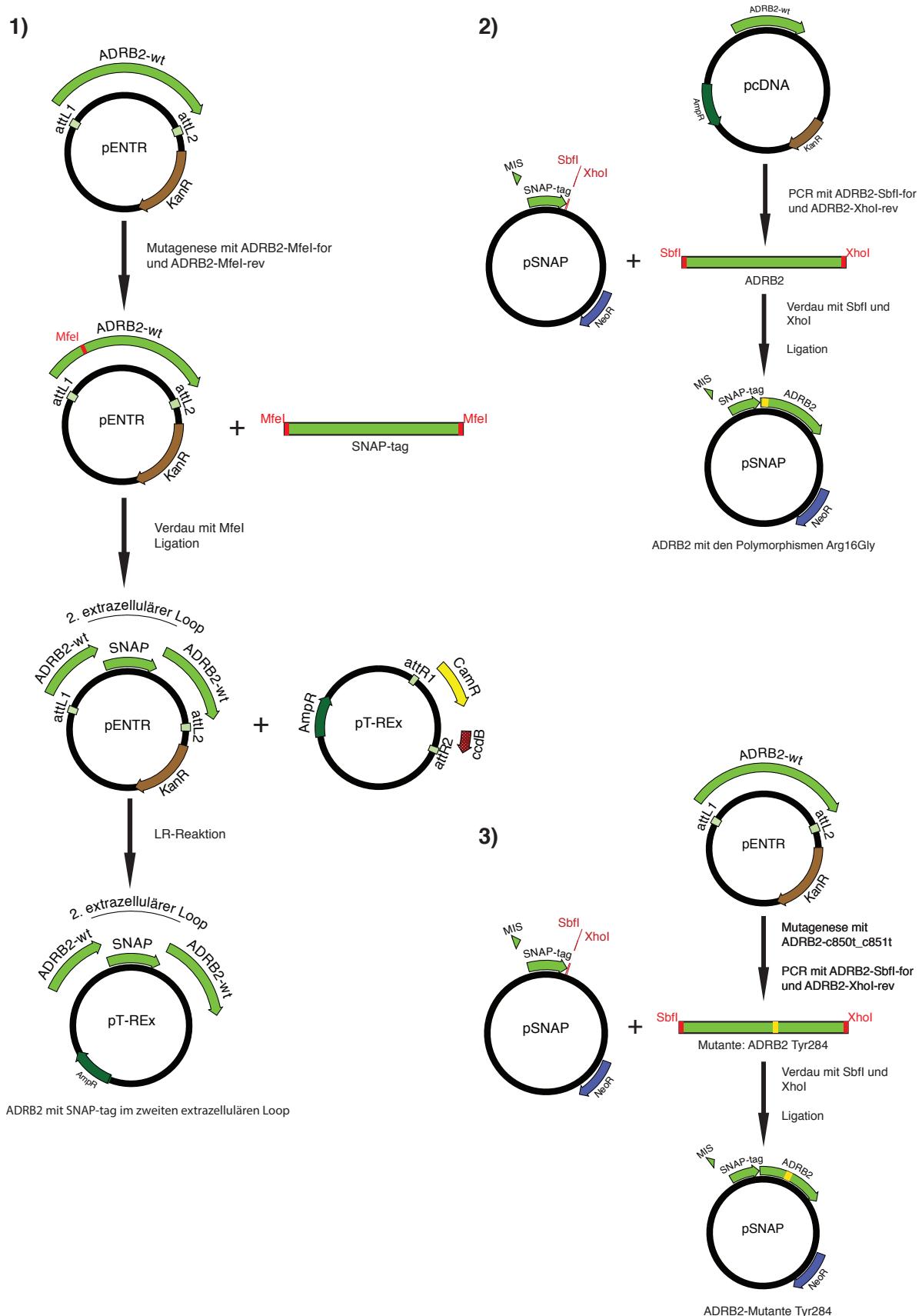


Abbildung 3.2: **Klonierungsstrategien:** 1 Generierung eines Expressionsvektors mit dem SNAP-tag im zweiten extrazellulären Loop des β_2 AR; 2 SNAP-tag am N-Terminus des β_2 AR; 3 SNAP-tag am N-Terminus der dimerisierungsdefizienten Mutante des β_2 AR

3.2 Fluoreszenzmikroskopie des β_2 AR mit dem SNAP-tag

Wie in 3.1 beschrieben, konnten erfolgreich Vektoren erzeugt werden, die den mit dem SNAP-tag versehenen β_2 AR trugen. Diese Plasmide konnten in die HeLa- und HEK293-Zelllinien transient transfiziert werden.

Die Charakterisierung der Oligomerisierung des β_2 AR 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.

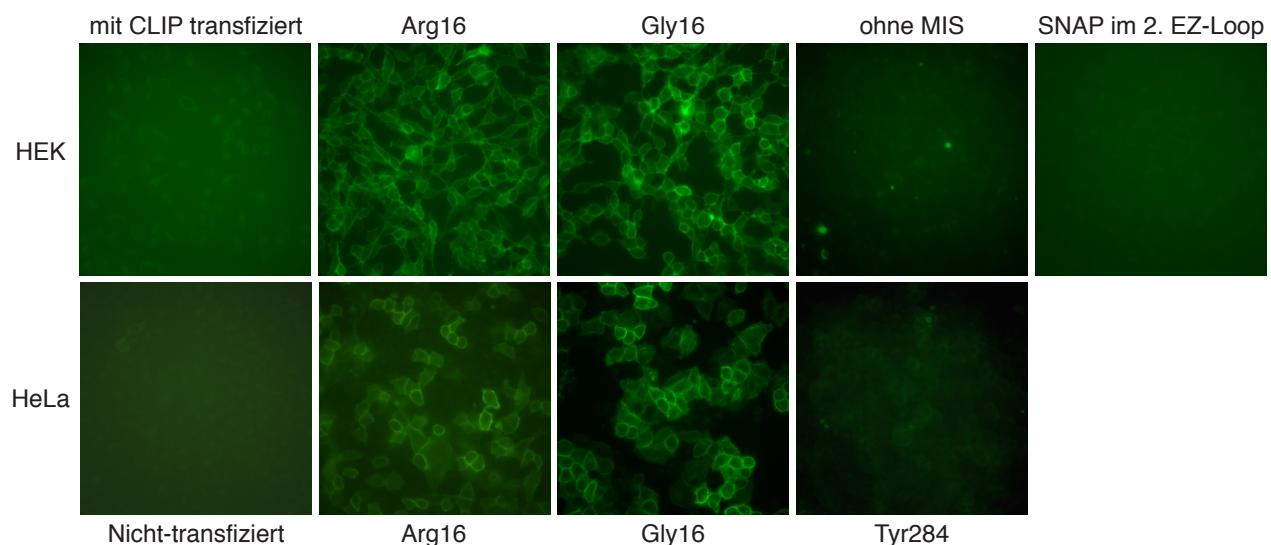


Abbildung 3.3: **Fluoreszenzfärbung mit SNAP-Substraten:** transient exprimierende HEK293- und stabile HeLa-Zellen.

Zunächst wurden direkt nach der Transfektion in HEK293-Zellen mit BG-Alexa-488 SNAP-basierte Fluoreszenzfärbungen durchgeführt. Dabei zeigten sich die in Abbildung 3.3 in der mit „HEK“ gekennzeichneten Zeile dargestellten Expressionsmuster: Als Negativkontrolle dienten entweder nicht transfizierte Zellen oder Zellen, die mit dem β_2 AR transfiziert worden waren, der den CLIP-tag trug. Für den Arg16Gly-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 β_2 AR, 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 erkennbar.

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 adhärenten HeLa-Zellen generiert. Diese zeigten in der Fluoreszenzmikroskopie eine den HEK293-Zellen vergleichbare Membranexpression. Die Ergebnisse sind in Abbildung 3.3 dargestellt. Sowohl bei der Arg16- als auch bei der Gly16-Variante des β_2 AR war eine klare lineare Membranfärbung feststellbar.

3.3 Oligomerisierung des β_2 AR mit SNAP-tag

Zur Analyse der Oligomerisierung des β_2 AR wurde der in der Einleitung beschriebene trFRET-Ansatz verwendet. Dazu wurden zuerst mit trFRET kompatible Fluorophore, die an Substrate des SNAP-tag gekoppelt waren, in unterschiedlichen Versuchsreihen zur Untersuchung der prinzipiellen Oligomerisierung des modifizierten β_2 AR eingesetzt. In den in Abschnitt 3.4 vorgestellten Ergebnissen konnten dann fluoreszierende Liganden des unveränderten β_2 AR in analogen Versuchsreihen die Oligomerisierung des Rezeptors zeigen.

3.3.1 trFRET mit SNAP-Substraten

Mit Hilfe der trFRET-Methode konnte die räumliche Interaktion von Molekülen des β_2 AR 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 Sättigungssassays durchgeführt. Dazu wurden steigende Konzentrationen des mit dem Donorfluorophor Lumi4 verbundenen SNAP-Substrats (Lumi4-BG) mit Zellen inkubiert, die die Gly16-Variante des SNAP-getaggten β_2 AR 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 3.4 dargestellt.

Über steigenden Konzentrationen des SNAP-Substrates zeigte sich ein sigmoider Intensitätsverlauf, der bei spezifischer sättigbarer Bindung zu erwarten ist. Die unspezifische Bindung erwies sich als gering. Für die weitere Analyse waren zwei Bedingungen 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 Bedingung 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 β_2 AR

Um zu untersuchen, ob eine räumliche Interaktion der Fluorophore innerhalb ihres FRET-Radius zu beobachten war, wurde das trFRET-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

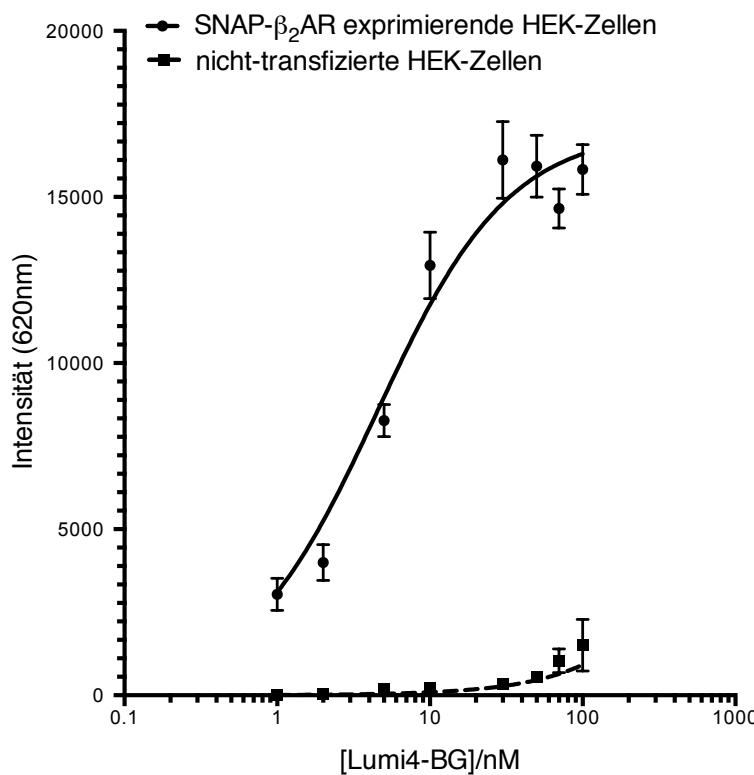


Abbildung 3.4: **Bindungskinetik** des SNAP-Substrates mit gekoppeltem Lumi4-Donorfluorophor

unterschiedlichen SNAP-Substrate war zuerst, wie schematisch in Abbildung 3.5 dargestellt, eine Optimierung der Konzentration vorzunehmen.

Dazu wurde über der zuvor festgelegten Konzentration des Donor-Substrates die Konzentration des Akzeptors variiert und das trFRET-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 Konzentration des Akzeptorfluorophors ist die Mehrheit der Rezeptor-Tags ausschließlich mit Donorfluorophoren besetzt, das trFRET-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 trFRET-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 trFRET-Intensität.

Im Experiment zeigte sich gemäß Abbildung 3.6 ein glockenkurvenförmiger Verlauf der Intensität der trFRET-Intensität mit steigender Akzeptordichte. Zur Elimination des Hintergrundsignals diente leeres SNAP-Substrat (O_6 -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 β_2 AR ein trFRET-typisches Signal messbar war, das auf räumliche Nähe der Rezeptoren hindeutet. Weiter

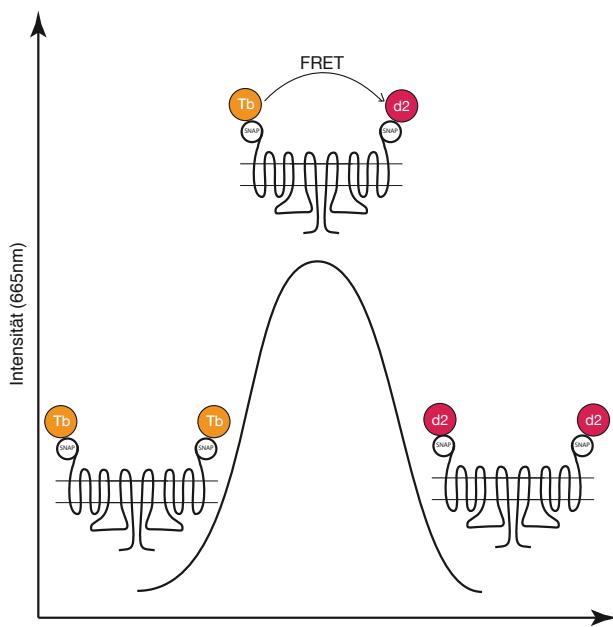


Abbildung 3.5: Optimierung des trFRET-Signals bei oligomerbildenden Rezeptoren: Über einer fest eingestellten Konzentration des trFRET-Donors (Tb) wird die Konzentration des trFRET-Akzeptors (d2) gesteigert. Befinden sich die trFRET-Partner in räumlicher Nähe, ergibt sich ein gauß-verteilter Intensitätsverlauf.

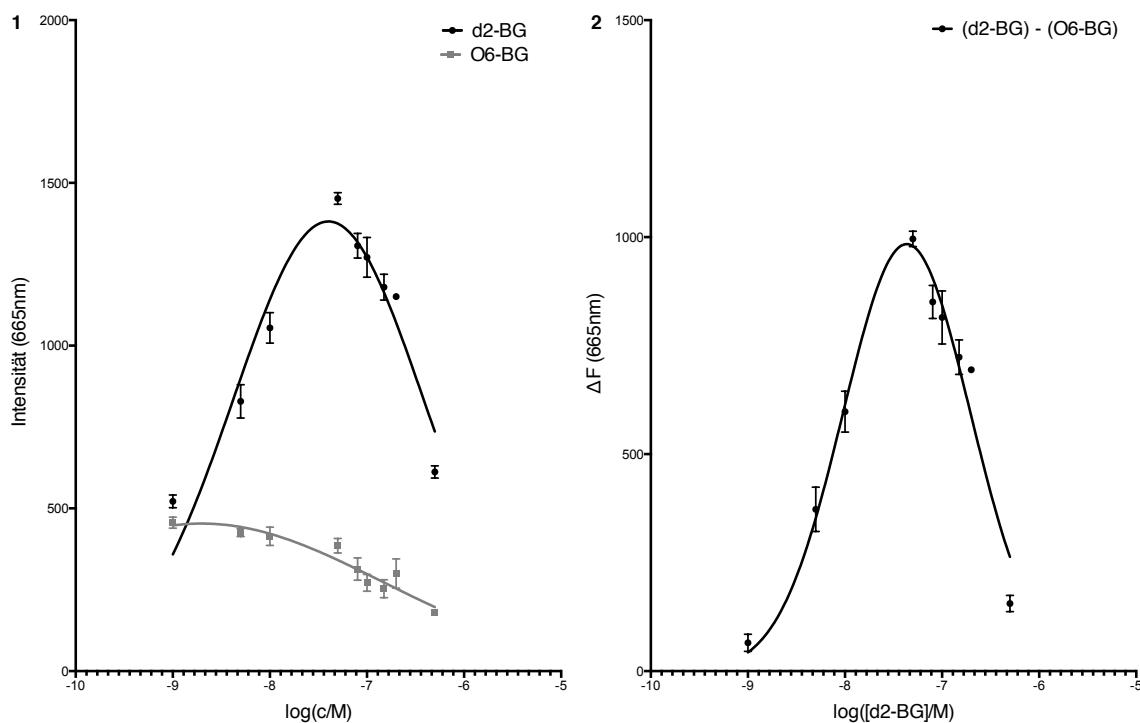


Abbildung 3.6: Optimierung des FRET-Signals: 1 Der Intensitätsverlauf des FRET-Signals ergab eine Glockenkurve; 2 ΔF -Kalkulation durch Subtraktion aus 1

konnte für die SNAP-Substrate die Konzentration bestimmt werden, bei der das trFRET-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 3.7 links in grau dargestellt. Beruht das trFRET-Signal auf zufälliger Interaktion, ist ein nicht-linearer Zusammenhang zwischen Rezeptordichte und trFRET-Intensität zu erwarten. Bei bloßer Kollision existieren kombinatorisch exponentiell ansteigende 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.

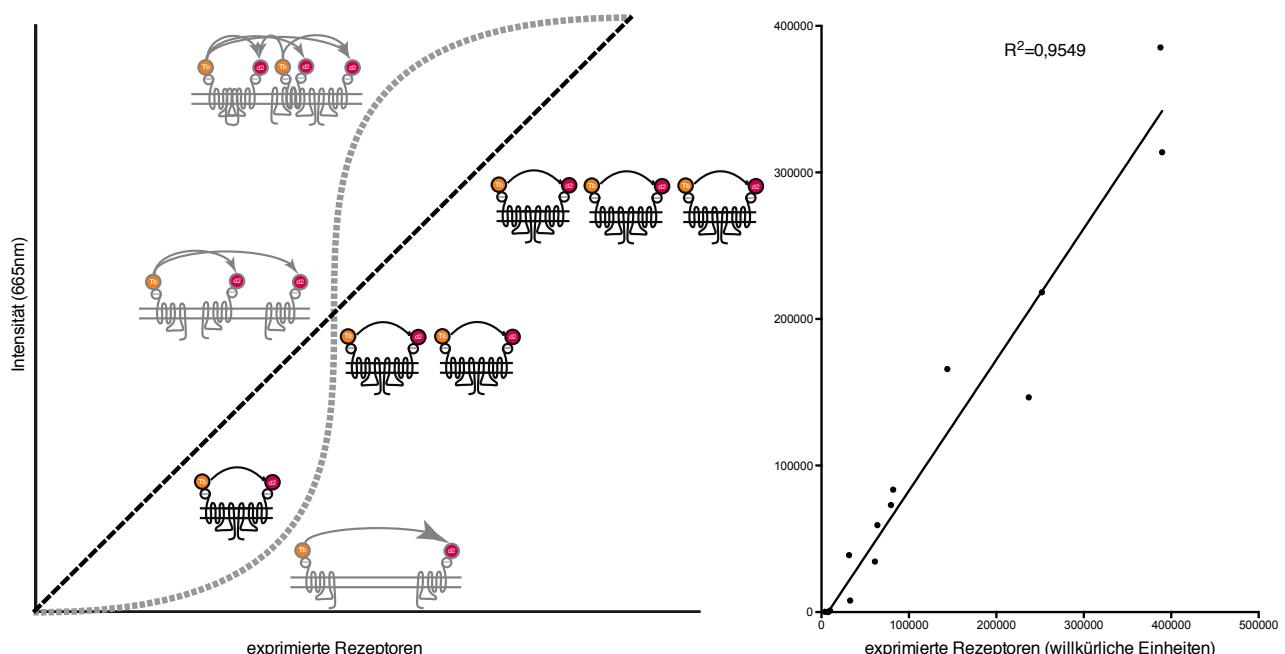


Abbildung 3.7: 1 Korrelation zwischen Rezeptordichte und trFRET-Signal, schematische Darstellung zufälliger Interaktion und FRET zwischen Rezeptoroligomeren; 2 Die Messung ergab eine starke lineare Korrelation

Im Experiment zeigte sich eine starke lineare Korrelation zwischen der fluoreszenzoptometrisch bestimmten Anzahl der Rezeptoren auf der Zelloberfläche und dem trFRET-Signal zwischen den mit Donor- und Akzeptorfluorophor besetzten β_2 ARs. Die statistische Auswertung ergab für den Korrelationskoeffizienten $R^2 = 0.9549$. Die gewonnenen Werte konnten mit hinreichender Sicherheit als linear interpretiert werden.

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

In Kombination mit dem glockenkurvenförmigen Verlauf im vorherigen Experiment konnte so

gezeigt werden, dass mit dem SNAP-tag versehene β_2 -Adrenozeptoren in der Zellmembran als Oligomere vorkommen. Über die Größe der Oligomere konnte, wie in der Diskussion erläutert, mit dieser Methode keine Aussage getroffen werden.

3.3.2 Einfluss der Stimulation mit Liganden des β_2 AR auf seine Oligomerisierung

Die Arg16Gly-Polymorphismen des β_2 AR besitzen unterschiedliche Aktivierungskinetiken (Ahles et al. 2011). Gibt es im Falle der Oligomerisierung bei der Stimulation mit Liganden ebenfalls ein Korrelat?

Die Stimulation mit Agonisten erhöht signifikant das trFRET-Signal des SNAP-getaggerten β_2 AR

Die zuvor optimierten Bedingungen für das Labeling mit SNAP-Substraten, unter denen gezeigt werden konnte, dass der β_2 AR 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 resultierte in Ergebnissen höherer Signifikanz und ist in Abbildung 3.8 dargestellt.

Gegenüber der basalen, nicht stimulierten Situation („ohne Ligand“) ergaben sich hochsignifikante Erhöhungen der trFRET-Ratio für die Stimulation mit Isoproterenol und dem natürlichen Agonisten Epinephrin. Sowohl in niedrigen (Iso/Epi 100nM) als auch in hohen Konzentrationen (Iso/Epi 1000nM) resultierte die Stimulation mit Agonisten in deutlicher Signalanhebung.

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

Agonistenstimulation verändert nicht die Größe der Rezeptoroligomere

Die Anhebung des trFRET-Signals bei Stimulation mit Agonisten wirft unweigerlich die Frage nach der Ursache auf. Denkbar 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 3.9 links ist der prinzipielle Vergleich zweier Glockenkurven wie in 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 trFRET-Signal erzeugt, ist bereits ursprungsnäher im Graphen eine 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 trFRET-Erhöhung bei Stimulation mit 1 μ M Isoproterenol angewandt. Das Experiment aus Abschnitt 3.3.1 wurde mit und ohne Stimulation durchgeführt

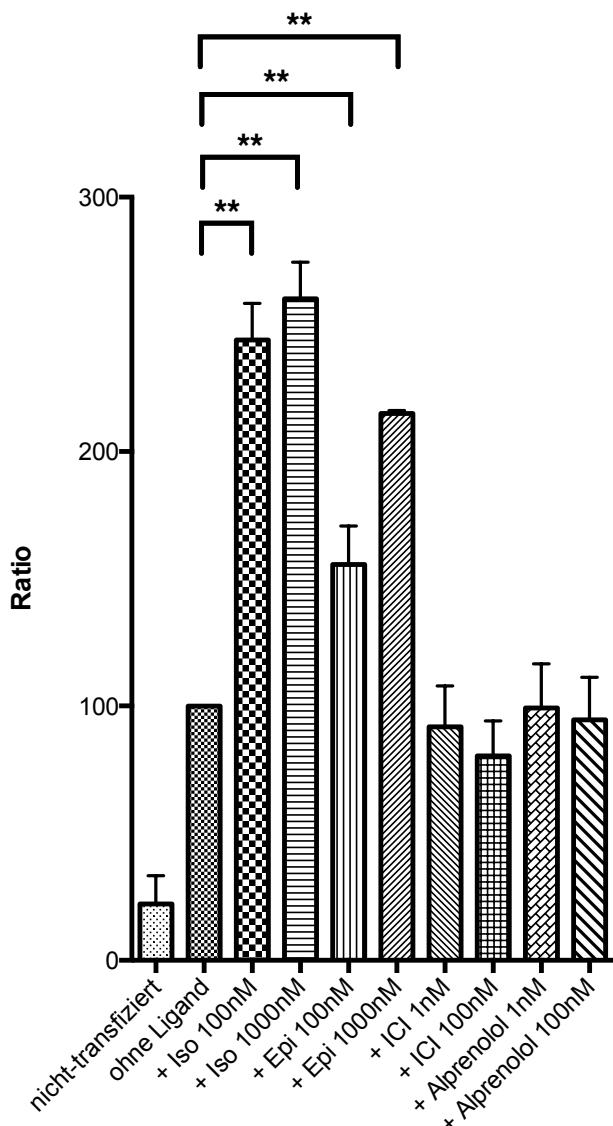


Abbildung 3.8: **Effekt der Stimulation mit Liganden des SNAP-getaggten β_2 AR auf das trFRET-Signal:** Signifikante Intensitätserhöhung bei Stimulation mit den Agonisten Isoproterenol (Iso) und Epinephrin (Epi), kein signifikanter Unterschied bei Stimulation mit dem inversen Agonisten ICI-118,551 (ICI) und dem Antagonisten Alprenolol. (Daten normiert auf das Signal des nicht stimulierten Rezeptors.)

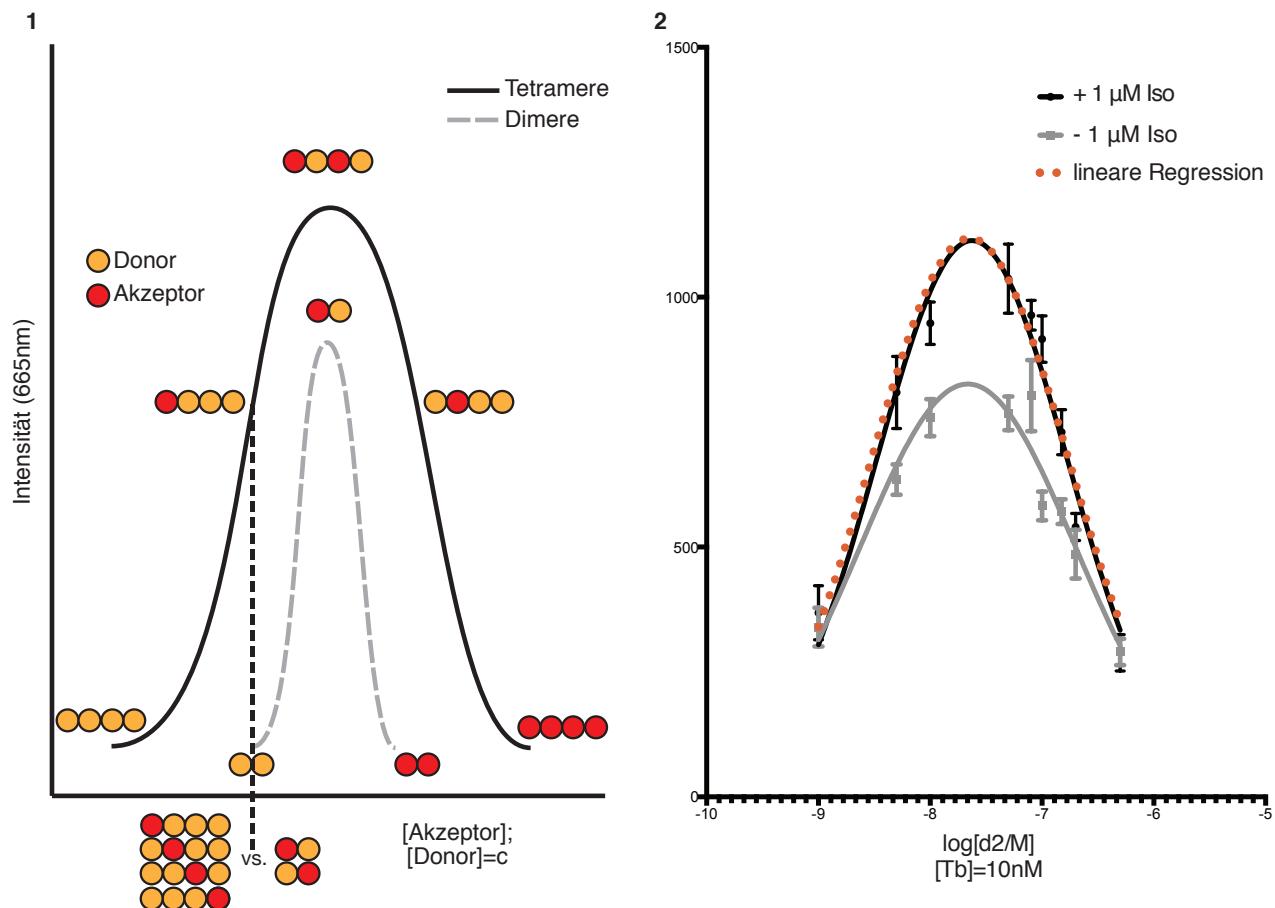


Abbildung 3.9: **1 Effekt der Anzahl der Rezeptoren in einem Oligomer:** Vergleicht man die Signalverteilung höhergradiger Rezeptoroligomere mit geringergradigen bei sonst konstanten Bedingungen, ist eine breitere Glockenkurve zu erwarten. **2 Variation der Akzeptorkonzentration ohne und mit Stimulation durch den Agonisten Isoproterenol:** Die Messwertpaare standen in strikter linearer Beziehung zueinander. Eine Verbreiterung der Gauß-Verteilung war nicht zu beobachten.

(s. Abbildung 3.9).

In der basalen Situation zeigte sich erwartungsgemäß eine Glockenkurve. Wurden die gleichen stabil exprimierende Zellen mit Isoproterenol 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 trFRET-Signals bei Stimulation ist zeitabhängig

Weitere Erklärungen für die Verstärkung des trFRET-Signals bei Agonistenstimulation liegen zum einen in der effizienteren Energieübertragung bei möglicher N-terminaler Konformationsänderung des ortsständigen Rezeptors. Zum anderen müssen insbesondere bei längerer Stimulation mit hohen Agonistenkonzentrationen Rezeptorinternalisierungseffekte bedacht werden.

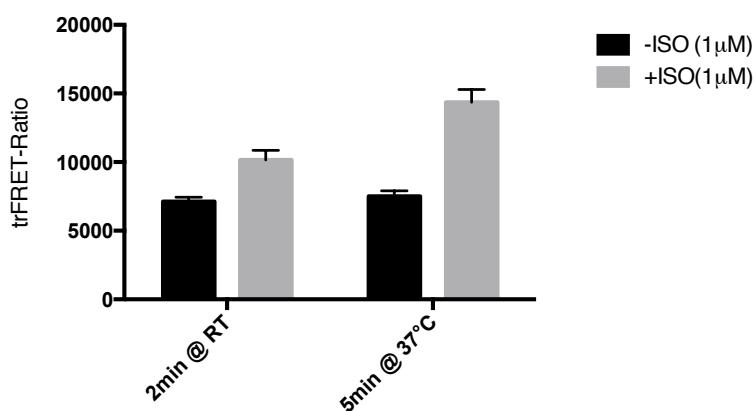


Abbildung 3.10: **Zeitabhängiger Effekt der Stimulation mit Liganden:** Bei längerer Stimulation unter Kulturbedingungen steigt die trFRET-Ratio stärker als bei zwei-minütiger Stimulation bei Raumtemperatur.

Dazu wurde die Zeitabhängigkeit der Signaländerung untersucht. In Abbildung 3.10 ist der gemessene Zusammenhang zwischen Dauer der Stimulation und Signaländerung dargestellt. Bei längerer Stimulation unter Kulturbedingungen ergab sich eine höhere trFRET-Ratio als bei kurzer Stimulation mit der gleichen Konzentration des Agonisten Isoproterenol. Die fünfminütige Stimulation veränderte die trFRET-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.

Rezeptorinternalisierung bei Stimulation mit Agonisten

Die Proteinlabellingtechnologie des SNAP-tags kann auch zur morphologischen 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 Isoproterenol bzw. ICI vorstimuliert.

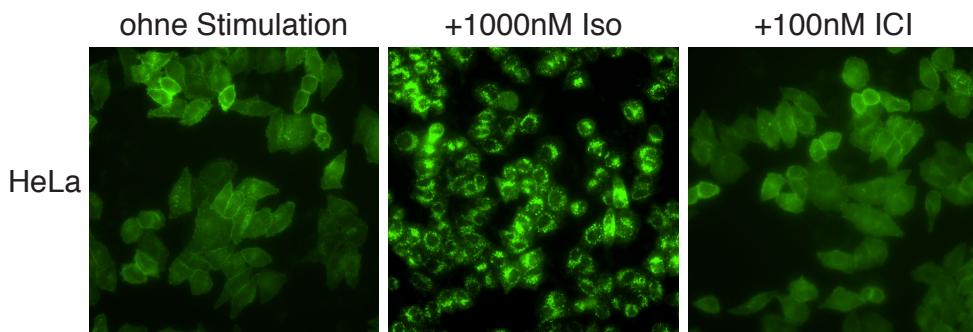


Abbildung 3.11: **Effekt der Stimulation mit Liganden auf die Lokalisation der SNAP-getaggten Rezeptoren:** Nach Stimulation mit Isoproterenol (Iso) morphologische Verlagerung der Rezeptoren nach intrazellulär. Keine Änderung der Morphologie nach Stimulation mit ICI 118,551 (ICI)

Die mikroskopische Analyse der Morphologie der Rezeptorlokalisierung lieferte folgendes Ergebnis: Bei Stimulation mit Isoproterenol (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 β_2 AR

Als weiterer Einflussfaktor sollte die Rezeptorglykosylierung untersucht werden. Das Enzym N-Glykosidase F (PNGase) hydrolysiert N-Glykan-Ketten. Somit konnte es für die Deglykosylierung des β_2 AR verwendet werden. Nach Deglykosylierung wurde die trFRET-Ratio mit oder ohne Stimulation durch Liganden gemessen. Die Ergebnisse sind in Abbildung 3.12 dargestellt.

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

3.4 trFRET mit fluoreszierenden Liganden des β_2 AR

Mit dem β_2 AR transfizierte HEK-Zellen zeigen sättigbare Affinität für den fluoreszierenden Liganden Lumi4-ICI

Für die Analyse des nicht-modifizierten β_2 AR 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 trFRET-Akzeptor das Fluorophor Alexa647 gekoppelt. Der

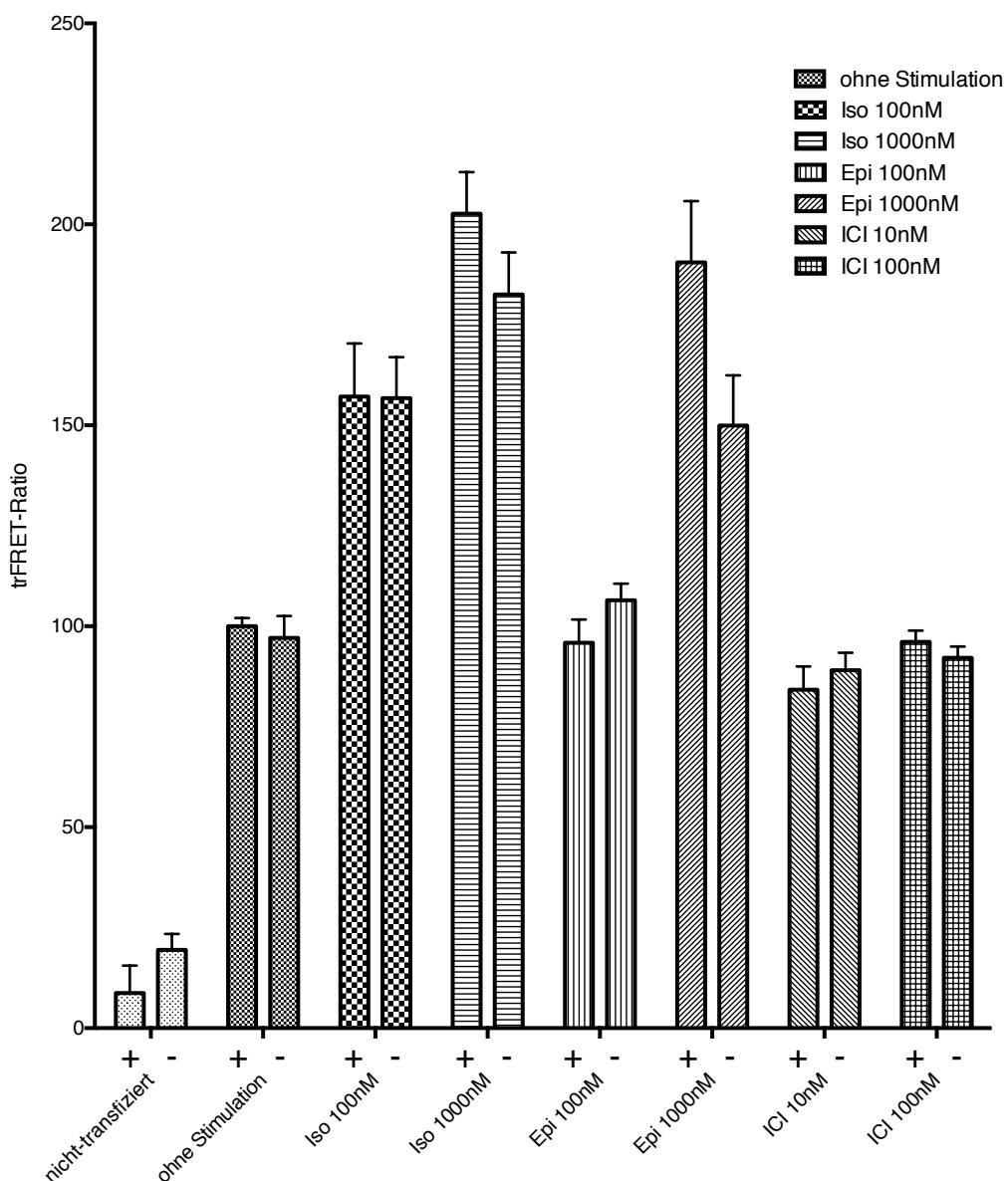


Abbildung 3.12: **Effekt der Inkubation mit PNGase:** Nach statistischer Analyse ergaben sich kein signifikanter Effekt der Deglykosylierung mit PNGase auf die Änderung der trFRET-Ratio.

nur kommerziell erhältliche trFRET-Donor Lumi4 wurde durch cisbio Bioassays (Codolet) an die ICI-118,551-Verbindung synthetisiert.

Da die Verbindung bisher in keinen Versuchen charakterisiert wurde, musste vor eigentlichen Experimenten zuerst ihre prinzipielle Funktionalität überprüft werden. Dies erfolgte fluoreszenzoptometrisch an mit β_2 AR transfizierten HEK293-Zellen. In Abbildung 3.13 ist das dosisabhängige ΔF -Signal (gegenüber nicht-transfizierten Zellen als Kontrolle der unspezifischen Bindung) des Donorliganden (Lumi4-ICI) dargestellt. Zu beobachten war eine sigmoidale Affinität des Liganden mit halbmaximaler Sättigung bei einer Ligandenkonzentration von 10nM.

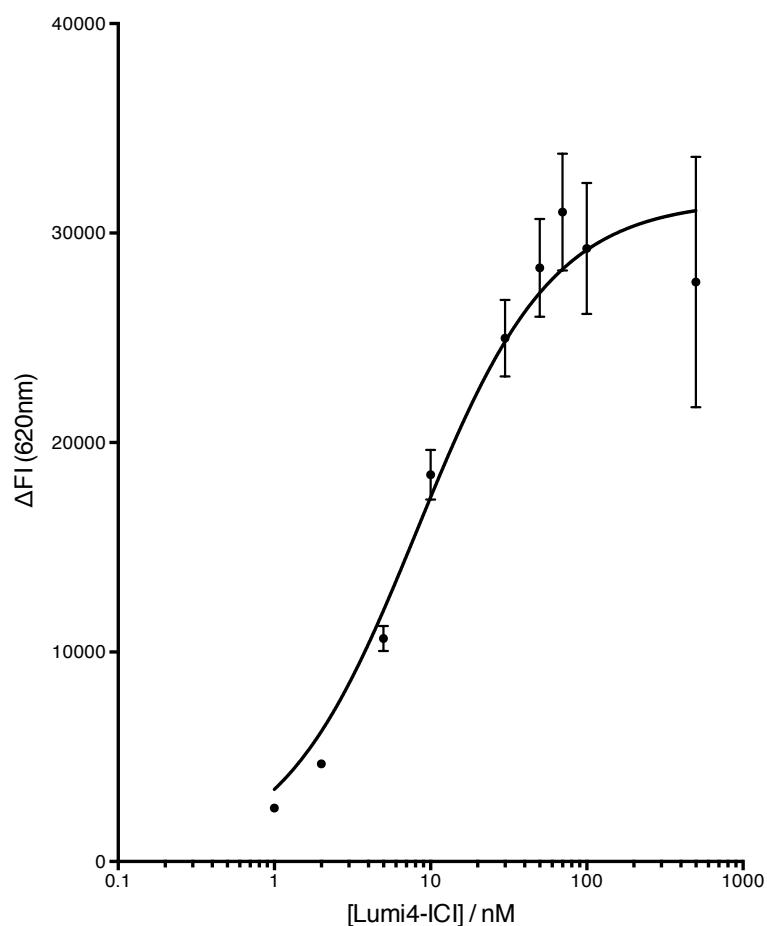


Abbildung 3.13: **Sättigung mit fluoreszierendem ICI-118,551:** Es konnte ein dosisabhängiges Signal für den Donorliganden gemessen werden. (ΔF gegenüber nicht-transfizierten HeLa-Zellen)

Bei mit β_2 AR transfizierten HEK293-Zellen war trFRET zwischen fluoreszierenden Liganden messbar

Mit der Methode, die bereits im Abschnitt über die räumliche Interaktion zwischen trFRET-Donor und Akzeptor beschrieben wurde, konnte auch für die fluoreszierenden Liganden eine Glockenkurve gemessen werden (Abbildung 3.14). Für transfizierte HEK-Zellen ergab sich ein gauß-verteiltes Signal. Damit konnte dynamisch der räumliche Bezug der trFRET-Liganden gezeigt werden.

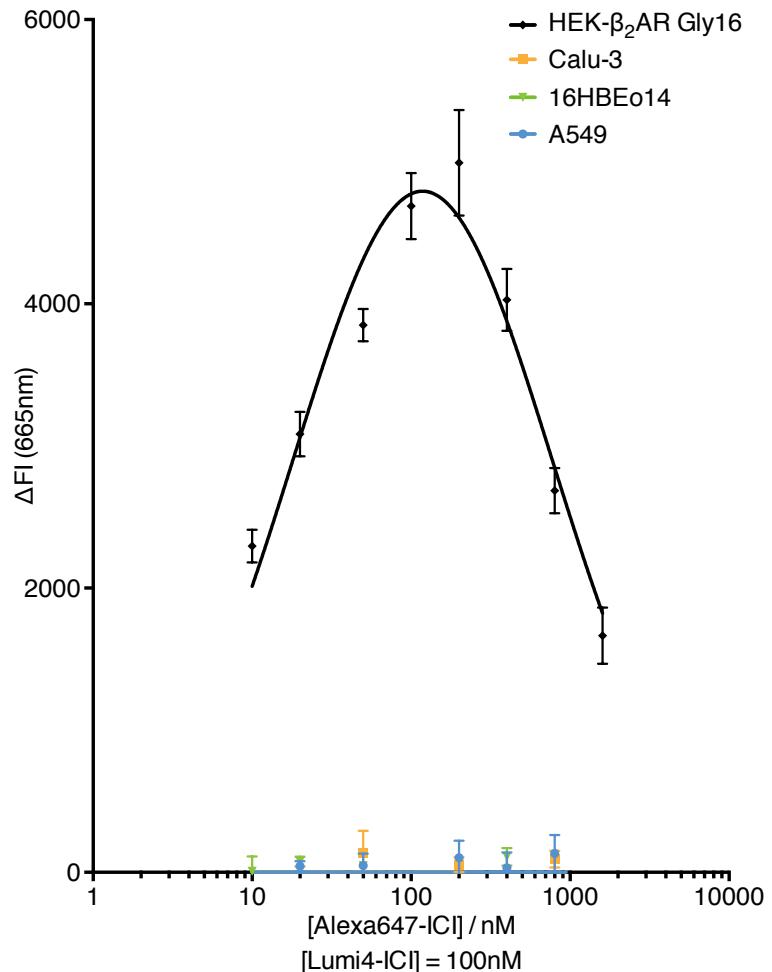


Abbildung 3.14: **Färbung mit fluoreszierenden Liganden:** Für die mit dem β_2 AR transfizierten Zellen ergab sich bei Variation der Akzeptorligandenkonzentration eine Gauß-Verteilung. Bei den Lungenepithelzellen war kein Signal messbar.

Das trFRET-Signal zwischen fluoreszierenden Liganden lässt sich kompetitiv inhibieren

Mit dem Ergebnis aus Abbildung 3.14 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 µM ICI) sank die trFRET-Ratio auf das Niveau des Signals der HEK293-Zellen auf denen im Vergleich zu den transfizierten Zellen praktisch kein Rezeptor exprimiert wurde (HEK-0).

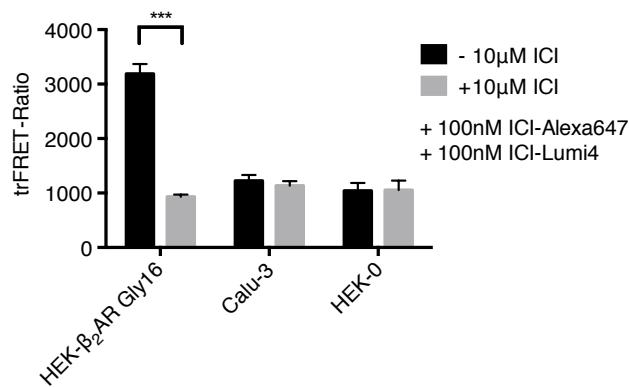


Abbildung 3.15: Verdrängung des fluoreszierenden Liganden durch unmarkiertes ICI-118,551:
Das trFRET-Signal war durch die Zugabe von ICI-118,551 in hoher Konzentration reversibel.

Mit dem β_2 AR transfizierte HEK-Zellen weisen oligomerisierte Rezeptoren auf

Für die mit dem β_2 AR 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 trFRET-Methode nicht auf ihre Oligomerisierungseigenschaften überprüft werden

Von weiterer Bedeutung ist die in-vivo-Analyse der Oligomerisierung des β_2 AR. 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 β_2 AR transfizierten HEK293-Zellen keine ausreichend hohe Signalausbeute erreicht werden. So war zum einen keine Gauß-Verteilung bei Variation des Akzeptorliganden messbar (s. Abb. 3.14) und zum anderen auch unter Zugabe einer hohen Konzentration unmarkierten Ligands keine Reversibilität des trFRET-Signals zu messen (s. Abb. 3.15). 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 β_2 -AR

In der Vergangenheit sind auf Bioluminescence Resonance Energy Transfer (BRET) und Fluorescence Resonance Energy Transfer (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 trFRET-Methode mit SNAP-getaggten Rezeptoren eine deutlich höhere Signalausbeute bei klar definierter Position der räumlichen Interaktion auf die Zellmembran. Darauf 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.

4.2 Möglichkeiten und Grenzen von trFRET zur Analyse von Rezeptoroligomerisierung

4.2.1 Etablierung der trFRET-Methode zwischen SNAP-getaggten Rezeptoren

4.2.2 Modulation der Oligomergröße durch Ligandenstimulation

4.2.3 Anwendung auf trFRET zwischen Rezeptorliganden

4.2.4 trFRET zwischen fluoreszierenden Liganden auf nativen Zellen

Mit den vorliegenden Ergebnissen ist es gelungen, Rezeptoroligomere des nicht-modifizierten β_2 AR nachzuweisen. Dabei wurden trFRET geeignete Liganden synthetisiert.

Aufgrund der möglichen funktionellen Interaktion mit den zu untersuchenden Rezeptoren, die in Abschnitt 3.3.2 festgestellt worden war und Beobachtungen in der Literatur, nach denen mit Agonisten teils geringere Signalausbeute erreicht wurde (Albizu et al. 2010; Emami-Nemini et al. 2013), 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 β_2 AR ($K_D = 4.6 \pm 2\text{nM}$) (Maurière 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 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 Liganden-derivats eine typische Affinitätskurve gemessen werden (s. Abb. 3.13). Damit war die Funktionalität des Liganden gezeigt. Die beiden Ligandenspezies (trFRET-Donor- und Akzeptorliganden) zeigten in einem Kompetitionsassay den für Rezeptoroligomere typischen gauß-verteilten Intensitätsverlauf des trFRET-Signals (s. Abb. 3.14). So konnte die für trFRET notwendige räumliche Nähe der Rezeptoren gezeigt werden. In Kompetition mit nicht-getaggten Liganden war das trFRET-Signal vollständig eliminierbar. Dies deutet abermals auf den spezifischen rezeptorgebundenen Ursprung des Signals hin.

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

Von weiterer Bedeutung ist die in-vivo-Analyse der Oligomerisierung des β_2 AR. 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 β_2 AR transfizierten HEK293-Zellen keine ausreichend hohe Signalausbeute erreicht werden. So war zum einen keine Gauß-Verteilung bei Variation des Akzeptorliganden messbar (s. Abb. 3.14) und zum anderen auch unter Zugabe einer hohen Konzentration unmarkierten Ligands keine Reversibilität des trFRET-Signals zu messen (s. Abb. 3.15). Es ist daher davon auszugehen, dass selbst mit dem hochaffinen fluoreszierenden Liganden keine ausreichende Sensitivität für das Expressionsniveau der Lungenepithelzellen erreicht werden konnte.

Welchen Grenzwert die Methode tatsächlich aufweist, ist schwer zu bewerten. In der Literatur ist mit ähnlichen Assays der Nachweis nativer 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).

4.3 Ausblick

5 Zusammenfassung

Mit dieser Arbeit sollte mittels der trFRET-Methode die Oligomerisierung des β_2 AR untersucht werden. Dazu waren mehrere Methoden zu etablieren und validieren. Zuerst konnten mittels SNAP-tag geeignete Expressionssysteme generiert werden, die die kovalente Bindung trFRET-kompatibler Fluorophore erlaubten (s. Abschnitt 3.1). Darauf gelang der Nachweis von Rezeptoroligomeren und damit zusammenhängenden Modulationen. Hierauf soll in Abschnitt 4.2 weiter eingegangen werden. Nach dem prinzipiellen Nachweis konnte der nicht-modifizierte β_2 AR weiter charakterisiert werden: trFRET zwischen bislang nicht verfügbaren Rezeptorliganden höchster Spezifität zeigte Rezeptoroligomere auf transfizierten HEK-Zellen. Mit der Etablierung der Methoden ergeben sich für zukünftige Anwendungen essentielle Grundlagen sowie die Möglichkeit des Transfers auf andere Rezeptoren.

Abbildungsverzeichnis

3.1	Funktionsweise des SNAP-tag	19
3.2	Klonierungsstrategien: 1 Generierung eines Expressionsvektors mit dem SNAP-tag im zweiten extrazellulären Loop des β_2 AR; 2 SNAP-tag am N-Terminus des β_2 AR; 3 SNAP-tag am N-Terminus der dimerisierungsdefizienten Mutante des β_2 AR	20
3.3	Fluoreszenzfärbung mit SNAP-Substraten: transient exprimierende HEK293- und stabile HeLa-Zellen.	21
3.4	Bindungskinetik des SNAP-Substrates mit gekoppeltem Lumi4-Donorfluorophor	23
3.5	Optimierung des trFRET-Signals bei oligomerbildenden Rezeptoren: Über einer fest eingestellten Konzentration des trFRET-Donors (Tb) wird die Konzentration des trFRET-Akzeptors (d2) gesteigert. Befinden sich die trFRET-Partner in räumlicher Nähe, ergibt sich ein gauß-verteilter Intensitätsverlauf.	24
3.6	Optimierung des FRET-Signals: 1 Der Intensitätsverlauf des FRET-Signals ergab eine Glockenkurve; 2 ΔF -Kalkulation durch Subtraktion aus 1	24
3.7	1 Korrelation zwischen Rezeptordichte und trFRET-Signal, schematische Darstellung zufälliger Interaktion und FRET zwischen Rezeptoroligomeren; 2 Die Messung ergab eine starke lineare Korrelation	25
3.8	Effekt der Stimulation mit Liganden des SNAP-getaggten β_2AR auf das trFRET-Signal: Signifikante Intensitätserhöhung bei Stimulation mit den Agonisten Isoproterenol (Iso) und Epinephrin (Epi), kein signifikanter Unterschied bei Stimulation mit dem inversen Agonisten ICI-118,551 (ICI) und dem Antagonisten Alprenolol. (Daten normiert auf das Signal des nicht stimulierten Rezeptors.)	27
3.9	1 Effekt der Anzahl der Rezeptoren in einem Oligomer: Vergleicht man die Signalverteilung höhergradiger Rezeptoroligomere mit geringergradigen bei sonst konstanten Bedingungen, ist eine breitere Glockenkurve zu erwarten. 2 Variation der Akzeptorkonzentration ohne und mit Stimulation durch den Agonisten Isoproterenol: Die Messwertpaare standen in strikter linearer Beziehung zueinander. Eine Verbreiterung der Gauß-Verteilung war nicht zu beobachten.	28
3.10	Zeitabhängiger Effekt der Stimulation mit Liganden: Bei längerer Stimulation unter Kulturbedingungen steigt die trFRET-Ratio stärker als bei zwei-minütiger Stimulation bei Raumtemperatur.	29
3.11	Effekt der Stimulation mit Liganden auf die Lokalisation der SNAP-getaggten Rezeptoren: Nach Stimulation mit Isoproterenol (Iso) morphologische Verlagerung der Rezeptoren nach intrazellulär. Keine Änderung der Morphologie nach Stimulation mit ICI 118,551 (ICI)	30

3.12 Effekt der Inkubation mit PNGase: Nach statistischer Analyse ergaben sich kein signifikanter Effekt der Deglykosylierung mit PNGase auf die Änderung der trFRET-Ratio.	31
3.13 Sättigung mit fluoreszierendem ICI-118,551: Es konnte ein dosisabhängiges Signal für den Donorliganden gemessen werden. (ΔF gegenüber nicht-transfizierten HeLa-Zellen)	32
3.14 Färbung mit fluoreszierenden Liganden: Für die mit dem β_2 AR transfizierten Zellen ergab sich bei Variation der Akzeptorligandenkonzentration eine Gauß-Verteilung. Bei den Lungenepithelzellen war kein Signal messbar.	33
3.15 Verdrängung des fluoreszierenden Liganden durch unmarkiertes ICI-118,551: Das trFRET-Signal war durch die Zugabe von ICI-118,551 in hoher Konzentration reversibel.	34

Tabellenverzeichnis

Literatur

- 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.“ In: *Biochim Biophys Acta* 1691.2-3, S. 169–79.
- Ahles, A., F. Rochais, T. Frambach, M. Büinemann & S. Engelhardt (2011). „A polymorphism-specific "memory" mechanism in the $\beta(2)$ -adrenergic receptor.“ In: *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.“ In: *Nat Chem Biol* 6.8, S. 587–94.
- De Jong, L. a. a., D. R. a. Uges, J. P. Franke & R. Bischoff (2005). „Receptor-ligand binding assays: Technologies and applications“. In: *J Chromatogr B Anal Technol Biomed Life Sci* 829.1-2, S. 1–25.
- 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.“ In: *Nat Protoc* 8.7, S. 1307–20.
- Gagne, a., P. Banks & S. D. Hurt (2002). „Use of fluorescence polarization detection for the measurement of fluopeptidem binding to G protein-coupled receptors.“ In: *J Recept Signal Transduct Res* 22.1-4, S. 333–343.
- Gronemeyer, T., C. Chidley, A. Juillerat, C. Heinis & K. Johnsson (2006). „Directed evolution of O6-alkylguanine-DNA alkyltransferase for applications in protein labeling“. In: *Protein Eng Des Sel* 19.7, S. 309–316.
- 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“. In: *Nature* 488.7413, S. 665–669.
- Maurière, 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.“ In: *J Lipid Res* 29.5, S. 587–601.
- 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.“ In: *J Biol Chem* 279.32, S. 33390–7.