



**Rezeptor-Rezeptor-Interaktion  $\beta$ -adrenerger  
Rezeptoren**

**Receptor-Receptor Interaction of  $\beta$ -adrenergic  
Receptors**

Doctoral thesis for a doctoral degree  
at the Graduate School of Life Sciences,  
Julius-Maximilians-Universität Würzburg,  
Section Biomedicine

submitted by

**Sandra Dorsch**

from

Würzburg

Würzburg 2009

Submitted on: .....

Office stamp

Members of the *Promotionskomitee*:

Chairperson: Prof. Dr. Paul Pauli

Primary Supervisor: Prof. Dr. Moritz Bünemann

Supervisor (Second): Prof. Dr. Karl-Norbert Klotz

Supervisor (Third): Prof. Dr. Ulrike Holzgrabe

Date of Public Defence: .....

Date of receipt of Certificates: .....

## **Erklärung**

Hiermit erkläre ich an Eides statt, dass ich die Dissertation „Rezeptor-Rezeptor-Interaktion  $\beta$ -adrenerger Rezeptoren“ selbstständig angefertigt habe und keine anderen als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt habe.

Ich erkläre außerdem, dass diese Dissertation weder in gleicher oder anderer Form bereits in einem anderen Prüfungsverfahren vorgelegen hat.

Ich habe früher außer den mit dem Zulassungsgesuch urkundlich vorgelegten Graden keine weiteren akademischen Grade erworben oder zu erwerben versucht.

## **Affidavit**

I hereby declare that my thesis entitled “Receptor-Receptor Interaction of  $\beta$ -adrenergic Receptors” is the result of my own work. I did not receive any help or support from third parties, i.e. commercial consultants or others. All sources and/or materials applied are listed and specified in the thesis.

Furthermore, I verify that this thesis, neither in identical nor in similar form has not yet been submitted as a part of another examination process.

I confirm that the information which I have given in this application is complete and true.

Würzburg.....



---

**INHALTSVERZEICHNIS**

<b>I. Einleitung</b>	<b>1-27</b>
1. G-Protein-gekoppelte Rezeptoren	1
2. $\beta$ -adrenerge Rezeptoren	3
3. Di- bzw. Oligomerisierung G-Protein-gekoppelter Rezeptoren	6
4. Grün fluoreszierendes Protein	10
5. Biolumineszenz-Resonanz-Energie-Transfer	12
6. Vor- und Nachteile der verschiedenen Methoden zur Detektion von Protein-Protein-Interaktionen	20
7. Fluorescence Recovery after Photobleaching	24
8. Ziel dieser Arbeit	26
<b>II. Material und Methoden</b>	<b>28-65</b>
1. Material	28-36
1.1 Plastikwaren und Verbrauchsmaterialien	28
1.2 Chemikalien, Reagenzien und Enzyme	28
1.3 Geräte und Software	31
1.4 Biologisches Material	32
2. Methoden	36-65
2.1 Molekularbiologische Methoden	36-43
2.1.1 Polymerasekettenreaktion (PCR)	36
2.1.2 Agarose-Gelelektrophorese	37
2.1.3 DNA-Extraktion aus Agarose-Gelen	38
2.1.4 Restriktionsverdau	38
2.1.5 Ligation von DNA-Fragmenten	39
2.1.6 Kompetente E. coli	40
2.1.7 Transformation kompetenter E. coli mittels Hitzeschock	41
2.1.8 Mini-Präparation	41
2.1.9 Maxi-Präparation	42
2.1.10 Sequenzierung	43
2.2 Zellbiologische Methoden/Zellkultur	44-49
2.2.1 Permanente Zellkultur: HEK-Zellen	44-47
2.2.1.1 Auftauen von Zellen	44
2.2.1.2 Kultur von Zellen	44
2.2.1.3 Einfrieren von Zellen	45
2.2.1.4 Transiente Transfektion von Zellen	45
2.2.1.5 Zellzahlbestimmung mittels Neubauer-Zählkammer	47
2.2.1.6 Passagieren von Zellen auf Deckgläschen	47
2.2.2 Primäre Zellkultur: Isolierung und Transfektion von NRCM	48-49
2.3 Proteinbiochemische Methoden	49-56
2.3.1 SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese	49

2.3.2	Western Blot	51
2.3.3	Immunochemische Detektion	51
2.3.4	Strippen von PVDF-Membranen	52
2.3.5	Proteinquantifizierung nach Bradford	53
2.3.6	Membranpräparation für Cyclase-Assays	53
2.3.7	Radioligandenbindung	54
2.3.8	Reinigung von $\alpha$ - <sup>32</sup> P-ATP	54
2.3.9	Adenylylcyclase-Assay	55
2.4	Biophysikalische Methoden	56-65
2.4.1	Biolumineszenz-Resonanz-Energie-Transfer (BRET)	56-58
2.4.1.1	BRET-Messungen	56
2.4.1.2	Fluoreszenz- und Lumineszenzmessungen	57
2.4.1.3	Verhältnis zwischen Rezeptorexpression und Fluoreszenz bzw. Lumineszenz	57
2.4.2	Fluorescence Recovery after Photobleaching (FRAP)	58-65
2.4.2.1	Antikörperbehandlung der Proben	58
2.4.2.2	FRAP-Mikroskopie	59
2.4.2.3	Bestimmung des relativen Expressionsverhältnisses der Fluorophore	60
2.4.2.4	Analyse von FRAP-Experimenten	61
2.4.2.5	Korrektur des Durchblutens	62
2.4.2.6	Analyse von Zwei-Farben-FRAP-Experimenten, relatives FRAP	62
2.4.2.7	Fitten von FRAP-Kurven	64
2.4.2.8	Theoretisches FRAP	65
<b>III.</b>	<b>Ergebnisse</b>	<b>66-112</b>
1.	Untersuchung der Di-/Oligomerisierung $\beta_1$ - und $\beta_2$ -adrenerger Rezeptoren mittels Biolumineszenz-Resonanz-Energie-Transfer (BRET)	66-74
1.1	Klonierung, Expression und Funktionalität der $\beta_1$ - und $\beta_2$ -AR BRET-Fusionsproteine	66
1.2	Bestimmung des Rluc-Anteils am YFP-Signal	69
1.3	Korrelation zwischen Fluoreszenz bzw. Lumineszenz und Expression YFP- bzw. Rluc-markierter $\beta$ -AR	70
1.4	Homointeraktion zwischen $\beta_1$ -AR bzw. $\beta_2$ -AR	71
1.5	Heterointeraktion zwischen $\beta_1$ - und $\beta_2$ -AR	73
2.	Etablierung einer Zwei-Farben-FRAP-Methode zur Untersuchung von Rezeptor-Rezeptor-Interaktionen	75-93
2.1	Modifizierte Zwei-Farben-FRAP-Methode	75
2.2	Monomere (CD86) und kovalent dimere (CD28) FRAP-Fusionsproteine	77-79
2.2.1	Klonierung der CD86- und CD28-Fusionsproteine	78
2.2.2	Überprüfung der Dimerisierungsfähigkeit von CD28-Fusionsproteinen	79

---

2.3	Spezifische Immobilisierung extrazellulär-markierter Proteine mittels Antikörper gegen YFP	80
2.4	Ein-Farben-FRAP versus Zwei-Farben-FRAP	84
2.5	Unspezifische Immobilisierung nicht-interagierender Proteine	87
2.6	FRAP des monomeren Proteins CD86	89
2.7	FRAP des kovalent dimeren Proteins CD28	91
3.	Untersuchung der Di-/Oligomerisierung $\beta_1$ - und $\beta_2$ -adrenerger Rezeptoren mittels der Zwei-Farben-FRAP-Methode	93-112
3.1	Klonierung, Expression und Funktionalität der $\beta_1$ - und $\beta_2$ -AR FRAP-Fusionsproteine	94
3.2	Mobilität und spezifische Immobilisierung $\beta_1$ - und $\beta_2$ -AR	96
3.3	Di-/Oligomerisierung von $\beta_1$ -AR	99
3.4	Di-/Oligomerisierung von $\beta_2$ -AR	101
3.5	Interaktionsmessungen bei physiologischen Temperaturen	103
3.6	Di-/Oligomerisierungszustand nach Präinkubation mit Agonist bzw. Antagonist	104
3.7	Interaktionen in neonatalen Rattenkardiomyozyten	107
3.8	Stabilität der Homointeraktion zwischen $\beta_1$ -AR	109
3.9	Dimerisierung versus Oligomerisierung von $\beta_2$ -AR	110
3.10	Heterointeraktion zwischen $\beta_1$ -AR und $\beta_2$ -AR	111
<b>IV.</b>	<b>Diskussion</b>	<b>113-128</b>
1.	Untersuchung der Di-/Oligomerisierung $\beta_1$ - und $\beta_2$ -adrenerger Rezeptoren mittels BRET	113
2.	Etablierung und Validierung der Zwei-Farben-FRAP-Methode	119
3.	Anwendung der Zwei-Farben-FRAP-Methode zur Untersuchung der Interaktionen zwischen $\beta$ -AR	124
4.	Perspektiven	128
<b>V.</b>	<b>Zusammenfassung/Summary</b>	<b>129-132</b>
<b>VI.</b>	<b>Literaturverzeichnis</b>	<b>133-144</b>
<b>VII.</b>	<b>Abkürzungsverzeichnis</b>	<b>145-147</b>
<b>VIII.</b>	<b>Anhang</b>	<b>148-149</b>
1.	Danksagung	148
2.	Curriculum Vitae	149





## I. EINLEITUNG

Für die Entwicklung und für das Verständnis der Wirkungsweise von Medikamenten ist es wichtig zu wissen, wie ein Organismus auf Substanzen reagiert, aber auch auf welche Art und an welchen Angriffspunkten Substanzen einen Organismus bzw. dessen Funktion modulieren.

Die Erforschung der molekularen Zielstrukturen und deren Interaktionen mit anderen zellulären Vorgängen ist essenziell für die Weiterentwicklung und Verbesserung vorhandener Medikamente, um durch zielgerichtete Substanzen und Arzneiformulierungen Nebenwirkungen zu vermindern, aber auch um Angriffspunkte für neue Wirkstoffklassen zu finden.

### 1. G-Protein-gekoppelte Rezeptoren

Die Erkennung und Weiterleitung von extrazellulären Signalen in das Zellinnere zur Steuerung von Zellen erfolgt über eine Vielzahl von Rezeptoren. Zahlreiche endogene Substanzen, aber auch Pharmaka wirken über Rezeptoren. Diese können entweder intrazellulär im Zytoplasma bzw. Zellkern oder in der Plasmamembran verankert vorkommen. Membranrezeptoren lassen sich funktionell in drei Gruppen einteilen:

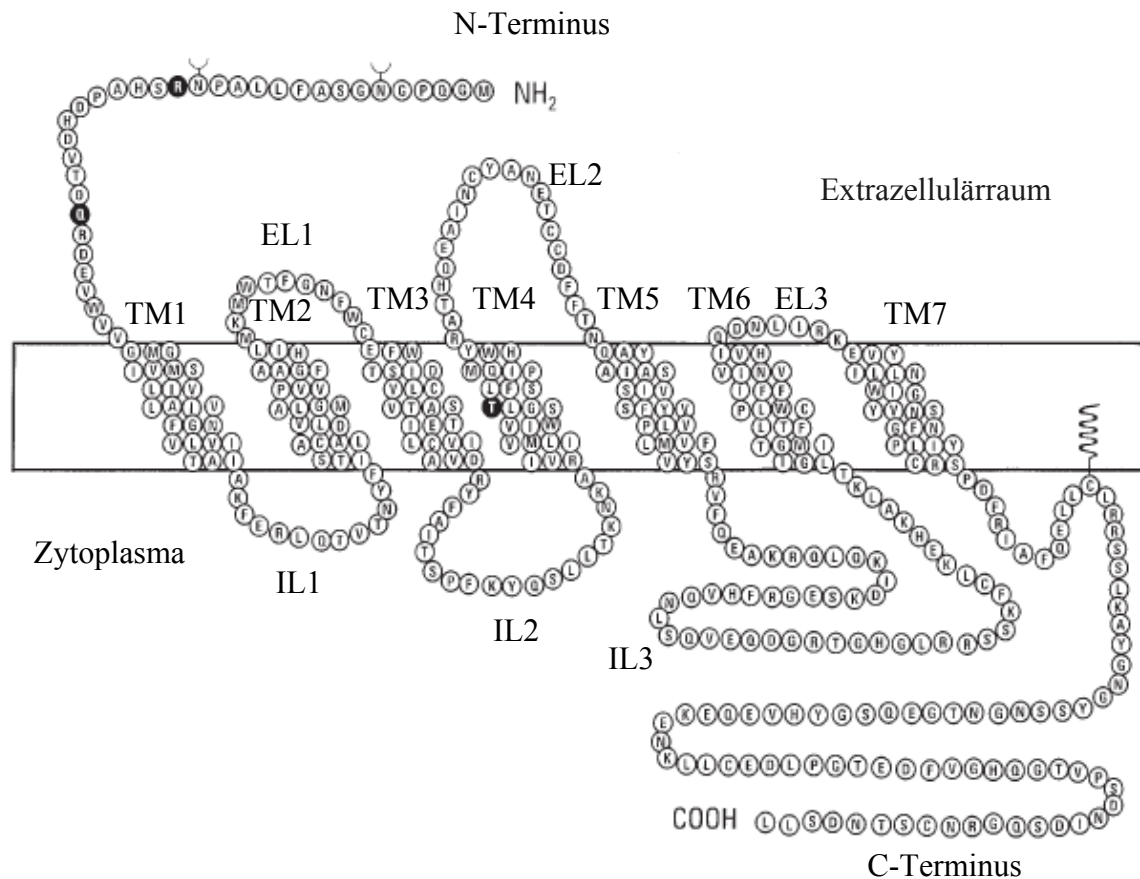
(1) G-Protein-gekoppelte Rezeptoren (GPCR, z. B. Rhodopsin, adrenerge Rezeptoren, Opioid-, GABA<sub>B</sub>-Rezeptoren), (2) Ligandengesteuerte Ionenkanäle (z. B. GABA<sub>A</sub>-, Glutamatrezeptoren) und (3) Enzym-assoziierte Rezeptoren (z. B. Rezeptoren mit Guanylatzyklase-Aktivität oder Rezeptoren mit assoziierten Tyrosinkinasen).

GPCR sind die größte, am weitesten verbreitete und vielfältigste Familie von Membranrezeptoren<sup>1</sup>. GPCR werden von über 800 Genen kodiert und die Familie hat ca. 2000 Mitglieder<sup>2</sup>. So unterschiedliche Substanzen wie Hormone, Neurotransmitter, Chemokine, Ca<sup>2+</sup>, Purine und Nucleotide, Lipide, Peptide, sensorische Proteine für verschiedene Gerüche, bitteren und süßen Geschmack und Photonen vermitteln ihre Signale über GPCR<sup>1-3</sup>. Deshalb ist diese Familie oft der Angriffspunkt von Pharmaka. Über 50% aller Medikamente zielen auf GPCR und stellen ca. 25% der 100 meist verkauften Medikamente dar<sup>3</sup>.

Trotz der Vielfalt an Liganden gibt es erstaunliche Ähnlichkeiten innerhalb dieser Rezeptorklasse. Ihr gemeinsames Strukturmerkmal sind sieben  $\alpha$ -Helices, welche die Zellmembran durchspannen und durch intra- und extrazelluläre Schleifen verbunden sind (Abb. 1)<sup>4</sup>. Das N-terminale Ende der Polypeptidkette ist extrazellulär, der C-Terminus intrazellulär lokalisiert. Der N-Terminus ist neben den Transmembrandomänen (TM) bei manchen Rezeptoren für die Ligandenbindung wichtig, der C-Terminus und die dritte intrazelluläre Schleife dagegen für die Kopplung an die heterotrimeren G-Proteine.

Die Ligandenbindung induziert eine Konformationsänderung des Rezeptors<sup>5</sup>. Über G-Proteine, welche an den aktivierten Rezeptor binden, erfolgt die Regulation und Kommunikation mit weiteren Effektoren. Die Signalkaskade kann zu einer beachtlichen Signalverstärkung führen und ein Rezeptor kann mehrere G-Proteine aktivieren. Während eines Aktivierungszyklus werden einige 1000 „second messenger“-Moleküle produziert, um den erwünschten zellulären Effekt auszulösen. Neben der Aktivierung von G-Proteinen können Rezeptoren auch alternative Signalwege, wie zum Beispiel  $\beta$ -Arrestin vermittelte Signalkaskaden aktivieren<sup>1</sup>. Ein weiteres Merkmal der GPCR sind viele gemeinsame Regulations- und Desensibilisierungsmechanismen.

GPCR können hinsichtlich der Sequenzhomologien phylogenetisch in die Hauptklassen I bis V eingeteilt werden. Die größte und am besten erforschte Gruppe innerhalb der GPCR sind die Rhodopsin-ähnlichen Rezeptoren der Klasse I (z. B. Somatostatin-, muskarinische Acetylcholin-, Dopamin-, Adrenerge-, Histamin-, Serotonin-, Opioid- oder olfaktorische Rezeptoren). Diese Klasse ist durch ein DRY- (Asp-Arg-Tyr) bzw. ERY- (Glu-Arg-Tyr) Motiv in der cytoplasmatischen Seite der dritten Transmembrandomäne gekennzeichnet. Die Glukagon-Rezeptor ähnlichen Rezeptoren bilden die Klasse II. Diese ist durch einen großen extrazellulären N-Terminus (ca. 100 AS) gekennzeichnet, der einige Cysteine enthält und somit Disulfidbrücken ausbildet. Die metabotropen Neurotransmitter-Rezeptoren (GABA<sub>B</sub>-, metabotroper Glutamat-, Calcium-Rezeptor) der Klasse III besitzen einen noch größeren N-Terminus (500-600 AS) als die Rezeptoren der Klasse II. Die Pheromon-Rezeptoren gehören zur Klasse IV und die cAMP-Rezeptoren (Dictyostelium) bilden die Klasse V.



**Abb. 1: Schematische Darstellung eines GPCR (β<sub>2</sub>-AR) modifiziert nach Johnson<sup>6</sup>**  
 GPCR besitzen sieben Transmembrandomänen (TM), die durch jeweils 3 intrazelluläre (IL) und 3 extrazelluläre (EL) Schleifen miteinander verbunden sind. Das N-terminale Ende ragt in den Extrazellulärraum und der C-Terminus in das Zytoplasma.

## 2. β-adrenerge Rezeptoren

Adrenerge Rezeptoren (AR) lassen sich in 3 Gruppen einteilen: α<sub>1</sub>-Rezeptoren (α<sub>1A</sub>, α<sub>1B</sub>, α<sub>1D</sub>), α<sub>2</sub>-Rezeptoren (α<sub>2A</sub>, α<sub>2B</sub>, α<sub>2C</sub>) und β-Rezeptoren (β<sub>1</sub>, β<sub>2</sub>, β<sub>3</sub>)<sup>7</sup>. Sie sind in allen großen Organsystemen zu finden und stellen die Schnittstelle zwischen dem sympathischen Nervensystem und den entsprechenden Zielorganen dar. Bei Aktivierung des Sympathikus z. B. durch Stress werden Katecholamine als endogene Neurotransmitter freigesetzt. Diese bewirken eine erhöhte Leistungsfähigkeit des Körpers. Schlagkraft (positive Inotropie), Schlagfrequenz (positive Chronotropie) und Erregungsausbreitung (positive Dromotropie) des Herzens werden erhöht<sup>7</sup>. Dieser Effekt wird über β<sub>1</sub>-AR vermittelt. Ebenfalls über β<sub>1</sub>-AR wird in der Niere die Reninfreisetzung erhöht, was zu einer Steigerung des Blutdruckes führt. Über β<sub>2</sub>-AR

werden Bronchodilatation, Tokolyse des Uterus und Vasodilatation der Gefäße in den Skelettmuskeln hervorgerufen. Weiterhin wird über Aktivierung von  $\beta_2$ -AR die Insulinfreisetzung des Pankreas und die Glykogenolyse in der Leber erhöht. Einen weiteren Beitrag zur dieser Energiebereitstellung liefert die über  $\beta_2$ - und  $\beta_3$ -AR vermittelte Lipolyse. Über  $\alpha_1$ - und  $\alpha_2$ -AR wird die glatte Muskulatur kontrahiert.  $\alpha_1$ -AR ist ferner für Mydriasis und die Kontraktion der Prostata verantwortlich. Die Aktivierung von  $\alpha_{2A}$ -AR führt zu einer Thrombozytenaggregation, Inhibierung der Neurotransmitterausschüttung an cholinergen und adrenergen Nervenenden und zu einer Vielzahl an Effekten an postsynaptischen ZNS-Rezeptoren.

Die Fragen in dieser Arbeit wurden fokussiert auf die Untersuchung von  $\beta_1$ - und  $\beta_2$ -AR.  $\beta_1$ -AR dominieren im Herzen mit einem Verhältnis von etwa 70:30 gegenüber  $\beta_2$ -AR und vermitteln die maximale Kontraktilitätssteigerung<sup>7</sup>.  $\beta_2$ -AR sind für die Relaxation der glatten Gefäßmuskelzellen am bedeutendsten, obwohl in diesem Gewebe ebenfalls die beiden anderen  $\beta$ -AR Subtypen vorkommen. Die pulmonale  $\beta_2$ -AR Dichte beträgt 10,9 pmol/g Gewebe, was ca. 30000-40000 Rezeptoren pro glatter Muskelzelle entsprechen soll<sup>6</sup>. Im Herzen finden sich dagegen ca. 8,8 pmol  $\beta_2$ -AR pro g Gewebe<sup>6</sup>. Gemeinsames Merkmal der  $\beta$ -AR ist die Aktivierbarkeit durch Isoproterenol sowie durch die endogenen Liganden Adrenalin und Noradrenalin. Dabei zeigen sich Unterschiede zwischen den Subtypen:  $\beta_1$ -AR bindet Adrenalin und Noradrenalin mit gleicher Affinität, wohingegen  $\beta_2$ -AR eine deutlich größere Affinität für Adrenalin zeigt<sup>8</sup>. Ein weiteres gemeinsames Merkmal von  $\beta_1$ - und  $\beta_2$ -AR ist die Kopplung an  $G_s$  und somit eine Stimulation der cAMP-Produktion bei Aktivierung der Rezeptoren<sup>6</sup>.

Die cDNA für den humanen  $\beta_1$ -AR wurde 1987 kloniert und codiert ein Protein mit 477 Aminosäuren<sup>9</sup>.  $\beta_2$ -AR besteht aus 413 Aminosäuren<sup>4</sup>. Bei der Klonierung der Säuger  $\beta_2$ -AR cDNA 1986 wurde eine hohe Sequenzhomologie zu bovinem Rhodopsin festgestellt<sup>10</sup>. So entstand die Idee einer großen Genfamilie von Rezeptoren<sup>1</sup>. Zwischen  $\beta_1$ - und  $\beta_2$ -AR besteht eine 54% Sequenzidentität (Abb. 2)<sup>9</sup>. 2007 wurde die Kristallstruktur des humanen  $\beta_2$ -AR in einem Komplex mit Carazolol (inverser Agonist) und einem Fab-Fragment<sup>11</sup> oder Lysozym<sup>12</sup> und 2008 die Kristallstruktur des Truthahn  $\beta_1$ -AR im Komplex mit dem Antagonisten Cyanopindolol<sup>13</sup> bestimmt (Abb. 3). Neben der Kristallstruktur von Rhodopsin<sup>14</sup> sind dies die bislang ersten Kristallstrukturen von GPCR.

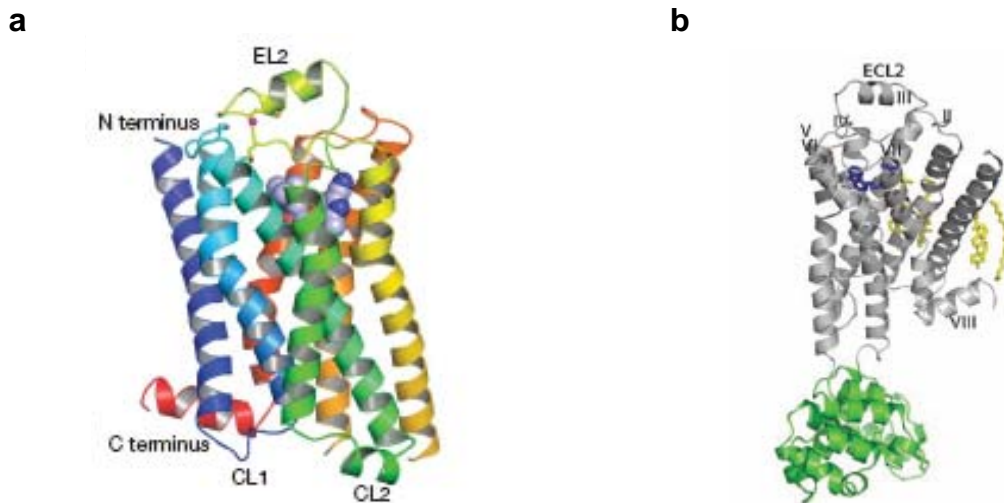
		TM1				
$\beta_1$ -AR	35	...PASPPASLLPPA-SESEPE-PLSQQ----	WTAGMGLLMALIVLLIVAGNVLVIVAIKTPR		88	
$\beta_2$ -AR	4	...PGNGSAFLLAPNRSHPDHDVTTQQRDEVV	VVVMGIVMSLIVLAIVFGNVLVITAIKFER		63	
		TM2		TM3		
$\beta_1$ -AR	89	LQTLTNLF	IIMSLASADLVMGLLVVVFAGATIVVWGRWEYGSFFCELWTSVDVLCVTASIET		148	
$\beta_2$ -AR	64	LQVTNRYFI	ITSLACADLVMGLAVVVFGAHILMKMWTFGNFWCEFWTSIDVLCVTASIET		123	
		TM4				
$\beta_1$ -AR	149	LCVIALDRYLAI	TSPPFRYQSLLTRARARGLVCTVWATISALVSFLPIIMHWWRAESDEARR		208	
$\beta_2$ -AR	124	LCVIAVD	RYFAITSPFKYQSLLTKNKARVIIIMVWIVSGLTSFLPIQMHYRATHQEAIN		183	
		TM5				
$\beta_1$ -AR	209	CYNDPKCCDFVTNR	AYAIASSVVSFYVPLCIMA	FVYLRVRFREAQKQVKKIDSCERRFLGG	268	
$\beta_2$ -AR	184	CYANETCCDFVTNQ	AYAIASSIVSFYVPLVIMVFVYS	RVFQEAQRQLQKIDKSEGRF---	240	
$\beta_1$ -AR	269	PARPPSPSPSPVPAPAPPPGPPR	AAAAATAPLANGRAGK--RRPSRLVALREQKALKTL		326	
$\beta_2$ -AR	241	----HVQNL	SQVE-----QDGR	TGHGLRRSSKF-CLKEHKALKTL	275	
		TM6		TM7		
$\beta_1$ -AR	327	GIIMGVFTLCWLPFF	LANVVKAFHRELVPDRLVFFNW	LYANSANFNPIIYCRSPDFRKA	386	
$\beta_2$ -AR	276	GIIMGTF	FTLCWLPFFIVNIVHVIQDNLIRKEVYILLN	WIGYVNSGFNPLIYCRSPDFRIA	335	
$\beta_1$ -AR	387	FQGLLCAR---	RAARRRHATHGDRPRASG...	413		
$\beta_2$ -AR	336	FQELLC	LRSSLKAYGNGYSSNGTGEQSG...	365		

### Abb. 2: Sequenzvergleich zwischen $\beta_1$ - und $\beta_2$ -AR

Aminosäuren, die bei beiden Subtypen identisch sind, sind in blau dargestellt, alle anderen in schwarz. Die Transmembrandomänen sind grau hinterlegt. Es besteht eine Sequenzidentität von 54%.

Die  $\beta_2$ -AR Kristallstruktur unterscheidet sich von der des Rhodopsins dadurch, dass die Interaktionen zwischen den zytoplasmatischen Enden von TM 3 und 6 schwächer sind. Dieser Unterschied soll für die relativ hohe Basalaktivität und der strukturellen Instabilität von  $\beta_2$ -AR verantwortlich sein<sup>11</sup>. Obwohl die Lokalisierung von Carazolol im  $\beta_2$ -AR sehr ähnlich zu der des Retinal im Rhodopsin ist, wurden strukturelle Unterschiede in der Ligandenbindungsstelle und anderen Regionen postuliert<sup>12</sup>. Die Bindung von Cyanopindolol an  $\beta_1$ -AR und von Carazolol an  $\beta_2$ -AR soll ähnliche Interaktionen beinhalten. Dagegen gibt es bei  $\beta_1$ -AR eine kurze Helix in der zytoplasmatischen Schleife 2, die weder bei Rhodopsin noch bei  $\beta_2$ -AR gefunden wurde<sup>13</sup>. Ein Tyrosin-Rest dieser Helix interagiert direkt mit dem hoch konservierten DRY-Motiv am Ende von Helix 3, welche essenziell für die Rezeptoraktivierung sein soll.

Ein weiterer Unterschied zwischen  $\beta_1$ - und  $\beta_2$ -AR wurde in Kardiomyozyten gefunden. Während  $\beta_1$ -AR ein weitreichendes cAMP-Signal induziert, wurde eine lokale Begrenzung des  $\beta_2$ -AR induzierten cAMP-Signals postuliert<sup>15,16</sup>.



**Abb. 3: Kristallstrukturen von  $\beta_1$ -AR und  $\beta_2$ -AR**

(a) Struktur von  $\beta_1$ -AR (N-Terminus in blau, C-Terminus in rot) kristallisiert mit Cyanopindolol nach Warne<sup>13</sup> und (b) Struktur von  $\beta_2$ -AR (grau) kristallisiert mit T4-Lysozym (grün) und Carazolol (blau) nach Cherezov<sup>12</sup>.

**3. Di- bzw. Oligomerisierung G-Protein-gekoppelter Rezeptoren**

Viele Tyrosinkinase-Rezeptoren wie z. B. der Insulin-Rezeptor, Typ-I-Insulin-ähnlicher Wachstumsfaktor-Rezeptor und Insulin-Rezeptor-ähnlicher Rezeptor existieren als über Disulfidbrücken-verbundene Dimere<sup>17</sup>. In diesen Fällen ist es methodisch einfach, die Dimerisierung nachzuweisen. Auch das Konzept der Beteiligung der Dimerisierung an der Rezeptoraktivierung ist für viele Wachstumsfaktor- und Zytokinrezeptoren weithin akzeptiert<sup>18</sup>. Bei den GPCR galt bis vor einigen Jahren die Meinung, dass ein monomerer Rezeptor mit einem einzelnen heterotrimeren G-Protein interagiert. Mitte der 1970er Jahre gab es einige indirekte pharmakologische Beobachtungen, wie negative oder positive Kooperativität, aus denen geschlossen wurde, dass GPCR als Dimere funktionieren<sup>18,19</sup>. Trotzdem hielt sich die Monomer-Theorie bis Mitte der 1990er Jahre. Die erste funktionelle trans-Komplementationsstudie zeigte, dass die Coexpression chimärer  $\alpha_2$ -adrenerger/ $M_3$ -muskarinischer Rezeptoren die Bindung und die Signaltransduktion beider Rezeptoren wiederherstellte<sup>20</sup>. Auch konnte bei Coexpression von Palmitoylierungs- oder Phosphorylierungs-defizienten  $\beta_2$ -AR Mutanten mit dem  $\beta_2$ -Wildtyp-Rezeptor die Funktionalität hinsichtlich Internalisierungsfähigkeit und Agonist-Antwort wiederhergestellt werden<sup>21</sup>. In Übereinstimmung mit dem Konzept der Dimerbildung war auch, dass sich einige

Rezeptormutanten als dominant-negative Mutanten verhielten, wenn sie mit den entsprechenden Wildtyp-Rezeptoren coexprimiert wurden<sup>18</sup>.

Noch immer herrscht eine intensive Debatte über die Funktion von Rezeptordi- oder -oligomeren. Für den GABA<sub>B</sub>-Rezeptor beispielsweise soll die Dimerisierung eine funktionelle Konsequenz haben<sup>22</sup>. Der GABA<sub>B</sub>-Rezeptor soll als Heterodimer bestehend aus GABA<sub>B</sub>R1 und GABA<sub>B</sub>R2 vorliegen<sup>23-27</sup>. GABA<sub>B</sub>R1 bindet Agonisten nur schwach und koppelt nicht effektiv an Signaltransduktionskaskaden. In transfizierten Zellen wird GABA<sub>B</sub>R1 als unreifes Glycoprotein exprimiert und bleibt an intrazellulären Membranen hängen. Bei Coexpression mit GABA<sub>B</sub>R2 soll das Heterodimer an der Zelloberfläche als reifes Glycoprotein exprimiert werden. Aber auch eine Zunahme der Agonistpotenz und die Fähigkeit nach Coexpression beider Dimeruntereinheiten GIRK-Kanäle zu aktivieren, wurde gezeigt. Somit scheint die Heterodimerisierung essenziell für die Signaltransduktion zu sein<sup>18,26-28</sup>. Unterstützt wird diese These auch dadurch, dass beispielsweise Signaltransduktions-defiziente LH-Rezeptoren keine Dimerisierung zeigten<sup>29</sup> und ein Peptid von der angenommenen Dimer-Kopplungsstelle des  $\beta_2$ -AR sowohl die Dimerisierung als auch die Signaltransduktion dieses Rezeptors verhindern konnte<sup>30</sup>. Neben der Rolle der Dimerisierung bei der Signaltransduktion<sup>18,31</sup> könnte die Interaktion zwischen GPCR weitere Rollen haben. Die Dimerisierung könnte an der Rezeptorfaltung, am Export der Proteine aus dem endoplasmatischen Retikulum (ER) und beim Transport an die Zelloberfläche beteiligt sein, wie u. a. für GABA<sub>B</sub>-Rezeptoren<sup>25,26</sup>, Vasopressin-Rezeptoren<sup>32-34</sup>,  $\alpha_{1B}$ -AR<sup>35</sup> und  $\beta_2$ -AR<sup>36</sup> gezeigt. Auch könnten Heterointeraktionen die Rezeptordiversität erweitern. Es wurden Heterooligomere mit einer anderen Ligandpharmakologie als die entsprechenden Homooligomere (z. B. bei DOR und MOR Heterodimere oder DOR und KOR Heterodimere)<sup>18,22,31</sup> und einer veränderten Signaltransduktion durch Interaktion mit anderen G-Proteinen<sup>31</sup> beobachtet. Ferner könnten auch endozytische Eigenschaften durch Heterodimerisierung moduliert werden<sup>31</sup>. So wurde beispielsweise durch Heterodimerisierung von  $\beta_2$ -AR mit  $\beta_1$ -AR die Internalisierung von  $\beta_2$ -AR inhibiert und die ERK1/2-MAPK-Signalkaskade konnte nicht mehr aktiviert werden<sup>37</sup>. Andererseits, obwohl spekuliert wurde, dass Dimere für eine effiziente Aktivierung von G-Proteinen nötig sein könnten, gibt es auch Untersuchungen die postulieren, dass einzelne Rezeptoren nachgeschaltete Signalwege anschalten können. Beispielsweise wurde für Rhodopsin gefunden, dass die Interaktion eines Rhodopsin-Moleküls mit einem G-Protein ausreichend sein soll, um dieses zu aktivieren<sup>38</sup>. Auch für  $\beta_2$ -AR soll ein

$\beta_2$ -AR Monomer genügen, um  $G_s$  effizient zu aktivieren<sup>39</sup>. Diese Daten geben einen Hinweis darauf, dass ein monomerer Rezeptor die minimal-funktionelle Einheit darstellt, die für die Signaltransduktion nötig ist. Somit bleibt die biologische Funktion der Di- oder Oligomerisierung für die meisten Rezeptoren unklar.

Für Tyrosinkinase- und Zytokinrezeptoren und Rezeptoren der TNF- $\alpha$  Familie wird eine Homo- oder Heterodimerisierung durch Agonist-Gabe gesteigert und ein Gleichgewicht zwischen Monomer und Dimer soll Teil des Rezeptoraktivierungsprozesses sein<sup>31</sup>. Für GPCR ist unklar, ob eine Ligandgabe das Interaktionsausmaß verändert, denn es wurden alle möglichen Variationen gefunden: Agonisten erhöhten, erniedrigten oder zeigten keinen Effekt ( $\beta_2$ -AR,  $\beta_1$ -AR<sup>40</sup>) auf das gemessene Signal<sup>18,22,41</sup>. Diese Variabilität könnte durch die Messmethode bedingt sein<sup>18</sup>. Wie einige Studien, u. a. für den  $\beta_2$ -AR zeigten<sup>36</sup>, soll die Dimerisierung bereits im ER passieren, lange bevor der Agonist die Dimerbildung beeinflussen kann<sup>42,43</sup>. Deshalb wurde eine konstitutive Interaktion zwischen GPCR angenommen.

Einen generellen Mechanismus der GPCR Di- oder Oligomerisierung scheint es nicht zu geben. Bei der Interaktion zwischen GABA<sub>B</sub>-Rezeptoren spielen sogenannte „coiled-coil“ Domänen im C-Terminus beider Rezeptor-Subtypen eine Rolle. Diese „coiled-coil“ Domänen sind in vielen Proteinen zu finden und sind gut charakterisierte Mediatoren von Protein-Protein-Interaktionen. Dies scheint aber kein allgemeiner Mechanismus zu sein<sup>22</sup>. Klasse-III-GPCR haben große extrazelluläre Verlängerungen mit einigen Cysteinresten und Disulfidbrücken. Diese könnten eine Dimerisierung vermitteln oder zumindest dazu beitragen<sup>44</sup>. Beim mGlu1-Rezeptor beispielsweise verhinderte das Fehlen der extrazellulären Domäne eine Dimerisierung<sup>45</sup>. Beim Bradykinin-B2-Rezeptor (Klasse-I-GPCR) soll der N-Terminus an der Dimerisierung beteiligt sein. Ergebnisse mathematischer Berechnungen und experimenteller Studien z. B. mit dem  $\beta_2$ -AR postulierten weiterhin, dass auch hydrophobe Interaktionen zwischen den Grenzflächen der Transmembran-Helices V und VI involviert sein sollen<sup>22,30</sup>. Für den  $\beta_1$ -AR gibt es eine Studie, welche einen Zusammenhang zwischen der Glycosylierung und der Dimerisierung vorschlägt. Eine Glycosylierungs-defiziente Mutante des  $\beta_1$ -AR zeigte eine signifikant niedrigere Oberflächenexpression und merklich verringerte Fähigkeit zu dimerisieren<sup>46</sup>.

Die Studien über GPCR-Interaktionen wurden mittels verschiedener Methoden durchgeführt. Bis vor ungefähr 10 Jahren waren Coimmunopräzipitation und Western Blot-Analyse weit verbreitet und werden auch heutzutage noch angewendet. Unter



Verwendung dieser Methoden wurde eine Vielzahl an Homointeraktionen z. B. zwischen DOR<sup>47</sup>, muskarinischen M<sub>3</sub>-Rezeptor<sup>48</sup>,  $\beta_2$ -AR<sup>30,49,50</sup>, und  $\beta_1$ -AR<sup>46</sup> und Heterointeraktionen zwischen verwandten und auch entfernter verwandten Rezeptoren z. B. zwischen D<sub>1</sub>-Dopamin-Rezeptor mit A<sub>1</sub>-Adenosin-Rezeptor<sup>51</sup>, DOR mit MOR<sup>52</sup>, SST<sub>2A</sub>-Rezeptor mit SST<sub>3</sub>-Rezeptor<sup>53</sup>, DOR mit KOR<sup>54</sup>, AT<sub>1</sub>-Angiotensin-Rezeptor mit B<sub>2</sub>-Bradykinin-Rezeptor<sup>55</sup>, D<sub>2</sub>-Dopamin-Rezeptor mit D<sub>3</sub>-Dopamin-Rezeptor<sup>56</sup>,  $\alpha_{2C}$ - mit  $\beta_2$ -AR<sup>57</sup>,  $\alpha_{1D}$ - mit  $\beta_2$ -AR<sup>58</sup>,  $\alpha_{1B}$ - mit  $\alpha_{1D}$ -AR<sup>59</sup>,  $\alpha_{1B}$ - mit  $\alpha_{1A}$ -AR<sup>59</sup>,  $\alpha_{2A}$ - mit  $\beta_1$ -AR<sup>60</sup> und  $\beta_1$ - mit  $\beta_2$ -AR<sup>37,61</sup> beschrieben. Aber durch die Hydrophobizität der GPCR und aufgrund der Verwendung von Detergenzien könnten diese Methoden eine artifizielle Aggregation der Rezeptoren bewirken. Dies führte zur Sorge über die Spezifität und Relevanz dieser Studien-Ergebnisse (siehe I.6).

Rhodopsin ist der einzige GPCR, für den Oligomere höherer Ordnung in nativen Membranen direkt visualisiert wurden. Mittels „Atomic Force Microscopy“ und Elektronenmikroskopie sah man, dass Rhodopsin in der Maus als strukturelle Dimere in parakristallinen Reihen angeordnet zu sein scheint<sup>62-64</sup>. Dabei waren fast alle Rhodopsin-Moleküle als Dimere in diesen Reihen zu finden. Nur wenige lagen als Monomer oder als einzelnes Rhodopsin-Paar vor<sup>63</sup>. Am Intradimer-Kontakt sind wahrscheinlich Helix IV und V beteiligt, während der Kontakt zwischen Helices I und II und der zytoplasmatischen Schleife, die Helices V und VI verbindet, die Bildung der Rhodopsin-Dimer-Reihen ermöglichen soll. Kontakte zwischen den Reihen sind auf der extrazellulären Seite lokalisiert. An diesen Kontakten soll Helix I beteiligt sein<sup>62</sup>. 30000-55000 Rhodopsin-Moleküle wurden pro  $\mu\text{m}^2$  gefunden<sup>63</sup>. Diese hohe endogene Rezeptor-Dichte ist auch der Grund der direkten Visualisierbarkeit dieser Interaktion, was für die übrigen GPCR wegen der weitaus niedrigeren endogenen Expressionsdichte nicht möglich ist.

Heutzutage werden meist Fluoreszenz-basierte Methoden wie Fluoreszenz-Resonanz-Energie-Transfer (FRET) oder Biolumineszenz-Resonanz-Energie-Transfer (BRET, siehe I.5) zur Detektion von Protein-Protein-Interaktionen verwendet. Mittels FRET wurden beispielsweise Interaktionen zwischen DOR<sup>47</sup>, SST<sub>5</sub>- mit SST<sub>1</sub>-Rezeptor<sup>65</sup>,  $\alpha_{1A}$ - mit  $\alpha_{1B}$ -AR<sup>66</sup>,  $\alpha_{1B}$ -AR mit Drei-Farben-FRET (Oligomer)<sup>67</sup>, P<sub>2Y11</sub>- mit P<sub>2Y1</sub>-Rezeptor<sup>68</sup> und Heteromere zwischen CB<sub>1</sub>-Cannabinoid-Rezeptor, D<sub>2</sub>-Dopamin-Rezeptor und A<sub>2A</sub>-Adenosin-Rezeptor mittels sequenziellem BRET-FRET<sup>69</sup> vorgeschlagen. Die erste BRET-Studie, die eine Interaktion zwischen GPCR untersuchte, wurde im Jahre 2000 durchgeführt. Hierin wurde eine Homodimerisierung von  $\beta_2$ -AR gefunden<sup>70</sup>.

Nachfolgend wurde eine Di- oder Oligomerisierung einer großen Zahl von GPCR postuliert, u. a. von DOR<sup>47</sup>, Calicum-Rezeptor<sup>71</sup>, Opsin (Oligomere)<sup>72</sup>, A<sub>2A</sub>-Adenosin-Rezeptor (Oligomere mit kombinierter BRET-Bimolekulare Fluoreszenz-komplementations-Technik)<sup>73</sup>, KOR<sup>74</sup>,  $\beta_2$ -AR<sup>49,70</sup>,  $\beta_1$ -AR<sup>40</sup>,  $\beta_1$ - mit  $\beta_2$ -AR<sup>37,40</sup> und  $\beta_2$ - mit  $\beta_3$ -AR<sup>75</sup>.

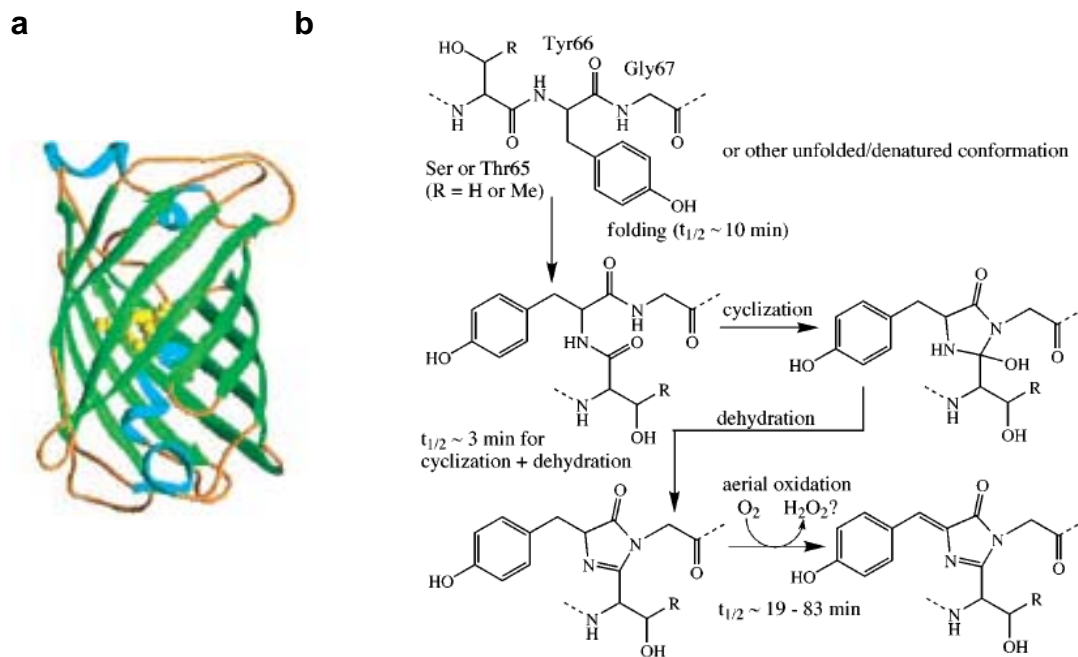
Nicht nur die Funktion, sondern auch die Existenz von GPCR-Di- oder Oligomeren wird noch immer intensiv diskutiert. So zeigte eine andere Studie ebenfalls mittels BRET, dass  $\beta_2$ -AR als Monomere vorliegen sollen<sup>76</sup>. Eine Ursache dieser widersprüchlichen Resultate ist, dass die Methoden zur Untersuchung von Rezeptorinteraktionen trotz ihrer teilweise hohen Sensitivitäten einige Grenzen aufweisen (siehe I.6).

Grundlage der (Weiter-)Entwicklung der sensitiven Nachweismethoden wie BRET und FRET und somit des aufkommenden Konzeptes der GPCR-Di- oder Oligomerisierung war die Entdeckung des grün fluoreszierenden Proteins.

#### **4. Grün fluoreszierendes Protein**

Erster Vertreter einer immer größer werdenden Familie war das grün fluoreszierende Protein GFP. Shimomura hat 1961 GFP, welches zusammen mit Aequorin vorkommt, in der Qualle *Aequorea victoria* (Abb. 5) entdeckt<sup>77</sup>. GFP besteht aus 238 Aminosäuren und besitzt die Form eines Zylinders bestehend aus 11  $\beta$ -Faltblättern (Abb. 4)<sup>78</sup>. Diese Struktur wird auch „ $\beta$ -barrel“ genannt. Im Inneren des Zylinders befindet sich eine  $\alpha$ -Helix, die den Fluorophor im Zentrum des Zylinders hält. Kurze  $\alpha$ -helicale Segmente verschließen den Zylinder beidseitig und schützen somit den Fluorophor. 1993 wurde die Struktur des Chromophors aufgedeckt<sup>79</sup>. Die drei Aminosäuren Serin, Tyrosin und Glycin an den Positionen 65-67 bilden die fluorogene Gruppe, die posttranslational zu einem p-Hydroxybenzylidenimidazolidin modifiziert wird (Abb. 4)<sup>78,80</sup>. Wenn das Protein seine nahezu endgültige native Form gebildet hat, erfolgt ein nucleophiler Angriff des Amids von Glycin67 auf die Carbonylgruppe von Serin an Position 65 mit anschließender Dehydrierung. Molekularer Sauerstoff oxidiert die  $\alpha$ - $\beta$ -Bindung der Aminosäure an Position 66, um die aromatische Gruppe mit dem Imidazolinon, das im vorherigen Schritt gebildet wurde, zu konjugieren<sup>80</sup>. Nach dieser autokatalytischen

Zyklisierungsreaktion besitzt GFP eine sichtbare Fluoreszenz mit zwei Absorptionsmaxima bei 395 und 475 nm und einem Emissionsmaximum bei 508 nm.



#### Abb. 4: Grün fluoreszierendes Protein

(a) GFP besteht aus 11 sog.  $\beta$ -Faltblättern (grün), die zylindrisch angeordnet sind. Der Zylinder wird oben und unten mit jeweils einer  $\alpha$ -Helix (blau) verschlossen. Im Zentrum des Zylinders befindet sich das Fluorophor (gelb). Der Durchmesser des Zylinders beträgt 4,2 nm und die Höhe 2,4 nm. Abbildung nach Lippincott-Schwartz<sup>81</sup>. (b) Bildung des Fluorophors bestehend aus den Aminosäuren Serin65, Tyrosin66 und Glycin67. Zuerst erfolgt ein nucleophiler Angriff des Amids von Glycin67 auf die Carbonylgruppe von Serin65 unter Dehydrierung. Anschließend wird die  $\alpha$ - $\beta$ -Bindung von Tyrosin66 durch molekularen Sauerstoff oxidiert. Diese Reaktion erfolgt autokatalytisch. Schema nach Tsien<sup>80</sup>.

Es wurden auch anders farbige fluoreszierende Proteine, wie beispielsweise 1999 das erste rot fluoreszierende Protein DsRed aus einer Discosoma-Spezies entdeckt<sup>82,83</sup>. Durch zufällige oder zielgerichtete Mutagenese ist nun das ganze Farbspektrum von nicht-fluoreszierend violett-blau bis zum nahen Infrarot-Bereich abgedeckt<sup>84</sup>. Mutationen, meist in räumlicher Nähe zu dem Fluorophor oder im Fluorophor selbst, liefern fluoreszierende Proteine mit veränderten Absorptions- oder Emissionsspektren, erhöhter Helligkeit und Quantenausbeute, schnellerer und verbesserter Proteinfaltung (besonders bei 37 °C), erhöhter Photostabilität, niedrigerer Sensitivität gegenüber pH-Wert, Halogen- oder Metallionen und verminderter Neigung zur Oligomerisierung<sup>85,86</sup>.

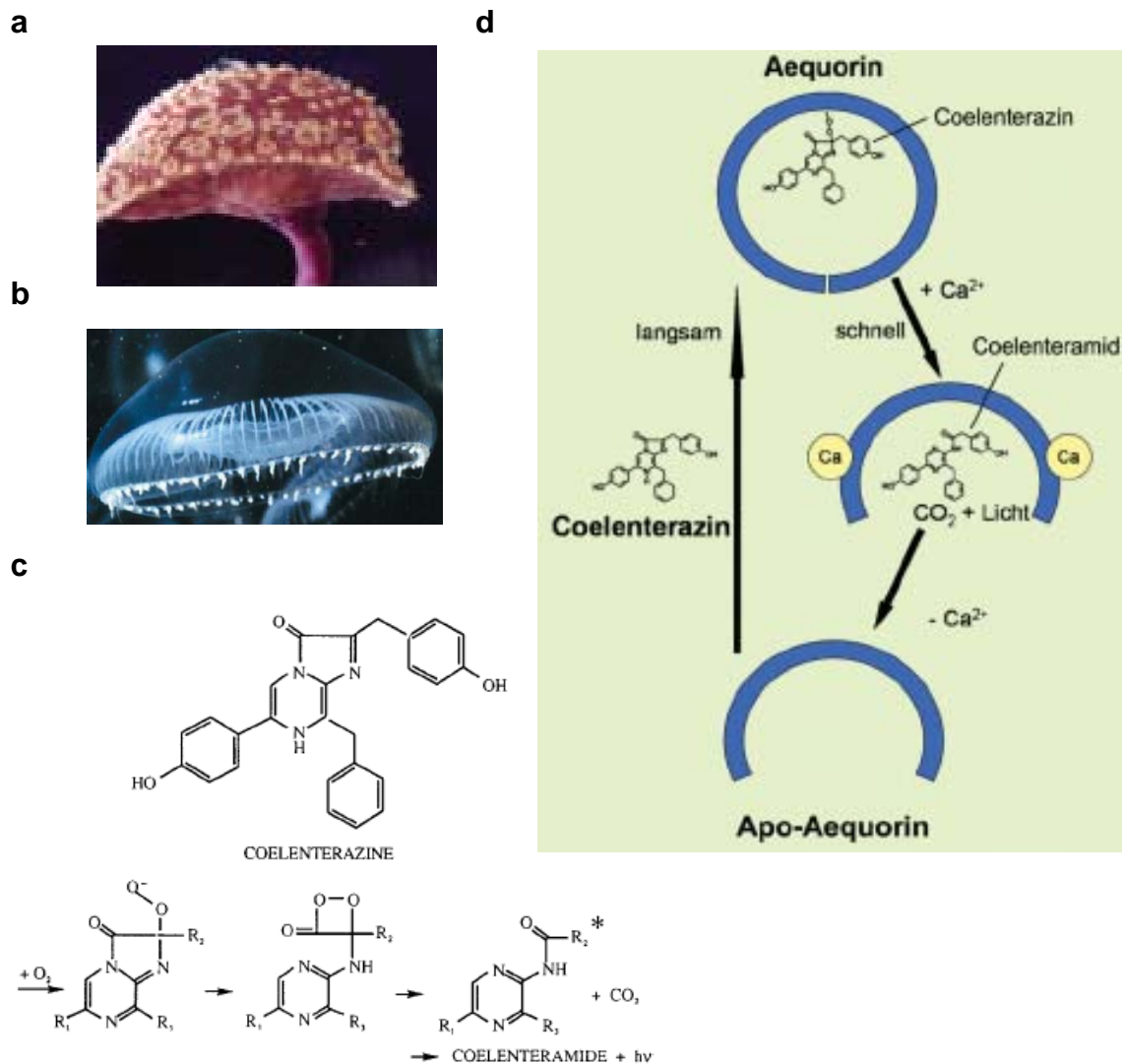
Nachdem die GFP-cDNA 1992 von Prasher et al. kloniert wurde<sup>87</sup>, konnte GFP auch in anderen Organismen wie Viren, Bakterien, Hefen, Pilzen, Pflanzen und Tieren erfolgreich ohne Cofaktoren zum Leuchten gebracht werden<sup>78,86</sup>. Neben der Einführbarkeit der GFP-Varianten in lebende Organismen, besitzen sie weitere Vorteile gegenüber den vorher verwendeten organischen Farbstoffen: Fluoreszierende Proteine können (1) auf eine größere Vielfalt biologischer Ereignisse und Signale reagieren, (2) auch subzellulär lokalisiert sein und (3) besitzen eine geringe Phototoxizität<sup>88</sup>. Dies führte zu einer Renaissance und Neuentwicklung einer Vielzahl von Fluoreszenz-basierten Methoden wie (Multi-Color-) „Imaging“, Biolumineszenz-Resonanz-Energie-Transfer (BRET), Fluoreszenz-Resonanz-Energie-Transfer (FRET) und FRET-Varianten, „Fluorescence Lifetime Imaging“ (FLIM), „Fluorescence Recovery after Photobleaching“ (FRAP), „Fluorescence Loss in Photobleaching“ (FLIP), „Fluorescence Correlation Spectroscopy“ (FCS) und „Bimolecular Fluorescence Complementation“ (BiFC).

Das zusammen mit GFP in *Aequorea victoria* vorkommende Aequorin dient zur Erzeugung des blauen Lichtes, welches für die Anregung von GFP benötigt wird. In der Qualle wird das von Aequorin erzeugte blaue Licht nicht sichtbar, da die Energie strahlungslos in einer Art BRET direkt auf das benachbarte GFP übertragen wird. Die Klonierung von Aequorin wurde 1985 erstmals beschrieben<sup>89,90</sup>. Aequorin ist ein kleines, globuläres Protein mit drei Calcium-Bindungsstellen und einem Molekül Coelenterazin, ein für das Leuchten von Aequorin verantwortlicher Chromophor-Ligand<sup>86,91</sup>. Nach Bindung von  $\text{Ca}^{2+}$  an Aequorin erfolgt eine Konformationsänderung und der Proteinkomplex zerfällt unter Lichtfreisetzung in Apo-Aequorin,  $\text{CO}_2$  und Coelenteramid<sup>86,91</sup>. In Abwesenheit von  $\text{Ca}^{2+}$  kann Apo-Aequorin durch Inkubation mit Coelenterazin,  $\text{O}_2$  und einem Thiol regeneriert werden (Abb. 5)<sup>86,91</sup>.

## **5. Biolumineszenz-Resonanz-Energie- Transfer**

Biolumineszenz-Resonanz-Energie-Transfer (BRET) ist eine natürliche, z. B. in der Seefeder *Renilla reniformis* oder der Qualle *Aequorea victoria* (Abb. 5) auftretende Erscheinung, welche aus dem strahlungslosen Energietransfer zwischen biolumineszierendem Donor und fluoreszierendem Akzeptor resultiert<sup>92,93</sup>. In *Renilla reniformis* resultiert die Lumineszenz vom katalytischen Abbau des intrinsisch

produzierten Substrates Coelenterazin zu Coelenteramid (Abb. 5) durch das Enzym Renilla Luciferase (Rluc)<sup>92</sup>. Renilla Luciferase ist ein 35 kDa großes Protein mit 311 Aminosäuren und wurde 1990 kloniert<sup>94</sup>. Bei dieser Oxidation wird Energie in Form von blauem Licht frei (Emissionsmaximum 480 nm). In *A. victoria* wird die Reaktion durch Aequorin katalysiert (siehe oben). Das Emissionsmaximum liegt hier bei 486 nm. Das Emissionsspektrum ist also sowohl vom Enzym als auch dem Substrat abhängig<sup>94</sup>.

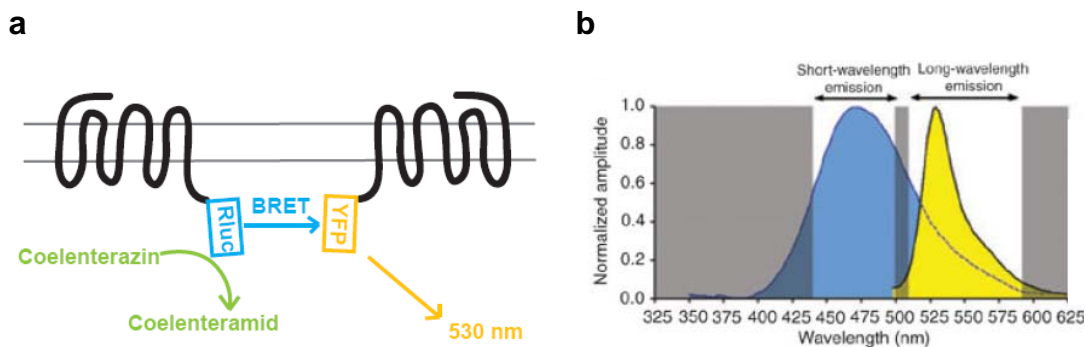


### Abb. 5: Biolumineszenz

(a) Die Seefeder *Renilla luciferase* (nach Veith<sup>86</sup>) und (b) die Qualle *Aequorea victoria* (nach Shimomura<sup>77</sup>) erzeugen Biolumineszenz. (c) Dabei wird Coelenterazin zu Coelenteramid unter Lichtemission umgewandelt (nach Wilson<sup>95</sup>). (d) Coelenterazin ist in der Qualle *A. victoria* im Inneren von Aequorin kovalent gebunden. Nach Bindung von Calcium-Ionen an Aequorin ändert sich die Konformation des Proteins, wodurch CO<sub>2</sub>, Apo-Aequorin und blaues Licht entstehen. Dabei geschieht die Oxidation von Coelenterazin zu Coelenteramid, welches von Aequorin abgespalten wird. Das entstandene Apo-Aequorin kann in Anwesenheit von Sauerstoff Coelenterazin kovalent binden und zu Aequorin regeneriert werden (nach Veith<sup>86</sup>).

Befindet sich das endogene Akzeptorprotein GFP in räumlicher Nähe (10-100 Å), ist ein strahlungsloser Energietransfer möglich. GFP seinerseits emittiert dann Licht der Wellenlänge 510 nm.

Diese hoch sensitive biophysikalische Methode kann als Forschungswerkzeug verwendet werden, um z. B. Protein-Protein-Interaktionen wie Di- oder Oligomerisierung von Rezeptoren in lebenden Zellen in Echtzeit zu identifizieren und zu charakterisieren<sup>92,93</sup>, da der Detektionsbereich mit der Dimension von biologischen Makromolekül-Protein-Komplexen vergleichbar ist<sup>93</sup>. Die erste BRET-Studie wurde 1999 durchgeführt<sup>96</sup>. Hierzu werden die potenziellen Interaktionspartner (z. B. Rezeptoren) entsprechend an ein Donor- und Akzeptormolekül gekoppelt. Findet keine Interaktion zwischen den beiden Proteinen statt, d. h. sind Donor- und Akzeptormolekül weiter als 100 Å entfernt, wird vom Donormolekül Licht abgegeben. Interagieren jedoch beide Proteine, d. h. Donor- und Akzeptormolekül sind in räumlicher Nähe, findet der Energietransfer statt und das Akzeptormolekül strahlt Licht ab, während die Intensität des Donorlichtes abnimmt (Abb. 6)<sup>97</sup>.



**Abb. 6: Biolumineszenz-Resonanz-Energie-Transfer (BRET)**

(a) Intrazellulär mit Renilla Luciferase (Rluc)- und YFP-markierte Rezeptoren werden coexprimiert. Sind diese weniger als 10 nm voneinander entfernt, findet nach Zugabe des Rluc-Substrates Coelenterazin H ein Energietransfer von Rluc zu YFP statt, welches dann Licht der Wellenlänge 530 nm abstrahlt. Sind die Proteine weiter als 10 nm voneinander entfernt, kann kein Energietransfer erfolgen und Rluc sendet Licht mit der Wellenlänge 480 nm aus. (b) Die Emissionsspektren von Rluc und YFP überlappen sehr stark. Deshalb ist die Auswahl des Detektionsbereiches sehr wichtig (nach Pflieger<sup>93</sup>).

FRET ist ein verwandter Prozess, bei welchem ein geeignetes Fluorophor anstelle der Luciferase als Donormolekül verwendet wird.

Der Energietransfer und die Effektivität dessen ist von mehreren Faktoren abhängig<sup>92,93,97,98</sup>: (1) Das Emissionsspektrum des Donors und das Absorptionsspektrum

des Akzeptors müssen sich signifikant überlappen. Je nach eingesetztem Substrat der Luciferase und verwendetem Akzeptorprotein variiert das Maß der Überlappung. Bei der sog. BRET<sup>2</sup>-Methode wird „Deep Blue Coelenterazin“ (DeepBlueC) als Rluc-Substrat (Emissionsmaximum 400 nm) und GFP<sup>2</sup>, eine Variante des Wildtyp-GFP, als Akzeptor verwendet (Emissionsmaximum 510 nm). Bei der in dieser Arbeit benutzten, sog. originalen BRET-Methode (oder BRET<sup>1</sup>), ist die spektrale Überlappung größer. Hierbei wird Coelenterazin H als Substrat der Rluc (Emissionsmaximum 480 nm) und eYFP als Akzeptorprotein (Emissionsmaximum 530 nm) eingesetzt. Durch die größere Überlappung ist aber die spektrale Auflösung des Donors und Akzeptors gefährdet und es resultiert ein niedriges Signal-zu-Rausch-Verhältnis. Bei BRET<sup>2</sup> ist durch die geringere Überlappung der Spektren die Auflösung verglichen zu der originalen BRET-Methode verbessert. (2) Das Verhältnis von Donor- zu Akzeptormolekülen spielt eine wichtige Rolle. Eine Erhöhung der Akzeptorkonzentration erhöht auch die Wahrscheinlichkeit von Donor-Akzeptor-Interaktionen. Dagegen wird in Situationen, in denen Akzeptor-Fusionsproteine miteinander interagieren (z. B. Rezeptorhomodimerisierung) ein Punkt erreicht, bei welchem die Akzeptor-Akzeptor-Interaktionen mit den Donor-Akzeptor-Interaktionen konkurrieren und somit das BRET-Signal inhibieren. Deshalb wird bei der Cotransfektion einer konstanten Menge Rezeptor-Rluc und steigender Mengen Rezeptor-YFP in Falle einer Interaktion irgendwann eine Sättigung erreicht, da die Zahl der Donormoleküle limitierend wird. (3) Weiterhin ist das BRET-Signal sehr stark abhängig von der Dipol-Dipol-Orientierung des Donors und Akzeptors und der Distanz dieser beiden Proteine. Donor und Akzeptor dürfen nicht weiter als 100 Ångström voneinander entfernt sein. Wie aus der Förster-Gleichung ersichtlich, ist der nicht-radiative Energietransfer invers proportional der 6. Potenz der Distanz zwischen Donor und Akzeptor. Dabei ist E die Energie, r ist die Distanz zwischen Donor und Akzeptor und  $R_0^6$  ist die Förster-Distanz, bei der 50% Energietransfer stattfindet.

Förster-Gleichung: 
$$E = R_0^6 / (R_0^6 + r^6)$$

Es ist möglich kein BRET-Signal zu detektieren, auch wenn beide Proteine miteinander interagieren<sup>92</sup>. Zum einen kann der Abstand beider Fluorophore für einen Energietransfer zu groß sein, zum anderen ist es auch möglich, dass die relative Orientierung der Fluorophore zueinander unpassend ist und somit kein Energietransfer

stattfinden kann. (4) Auch die Stärke und Stabilität der Interaktion spielt eine Rolle. Hoch-transiente Interaktionen können in einem Energietransfer resultieren, dieser kann aber zu schnell für die Detektion sein.

Abstand und Orientierung der Donor- und Akzeptormoleküle können davon abhängen, an welcher Stelle die zu untersuchenden Proteine mit diesen markiert wurden. Donor und Akzeptor können jeweils entweder C- oder N-terminal an das Protein von Interesse fusioniert werden<sup>92</sup>. Diese könnten aber auch in z. B. intra- oder extrazellulären Schleifen platziert werden. Auch sind Fusions-Konstrukte möglich, bei denen z. B. der Donor am N-Terminus oder in der dritten intrazellulären Schleife und der Akzeptor am intrazellulären C-Terminus lokalisiert sind<sup>99</sup>. Diese können, wie ebenfalls für FRET-Studien beschrieben<sup>100,101</sup>, z. B. zur Untersuchung konformationeller Änderungen nach Ligandengabe oder als Biosensoren<sup>99,102</sup> verwendet werden. Es sollte dabei grundsätzlich überprüft werden, ob sich diese Fusionsproteine hinsichtlich Expression, „Trafficking“ und Funktion wie die unmarkierten Proteine verhalten<sup>92</sup>.

Für BRET-Messungen können transient transfizierte oder stabile lebende Zellen, Zellysate oder gereinigte Proteine verwendet werden<sup>93</sup>. Auch in Mäusen wurden bereits Protein-Protein-Interaktionen mittels BRET gezeigt<sup>103</sup>. Versuche können bei Raumtemperatur, bei 37 °C oder, falls erwünscht oder nötig, auch bei anderen Temperaturen durchgeführt werden. Messungen können auch in Gegenwart von Liganden, Aktivatoren und Inhibitoren ausgeführt werden<sup>92</sup>.

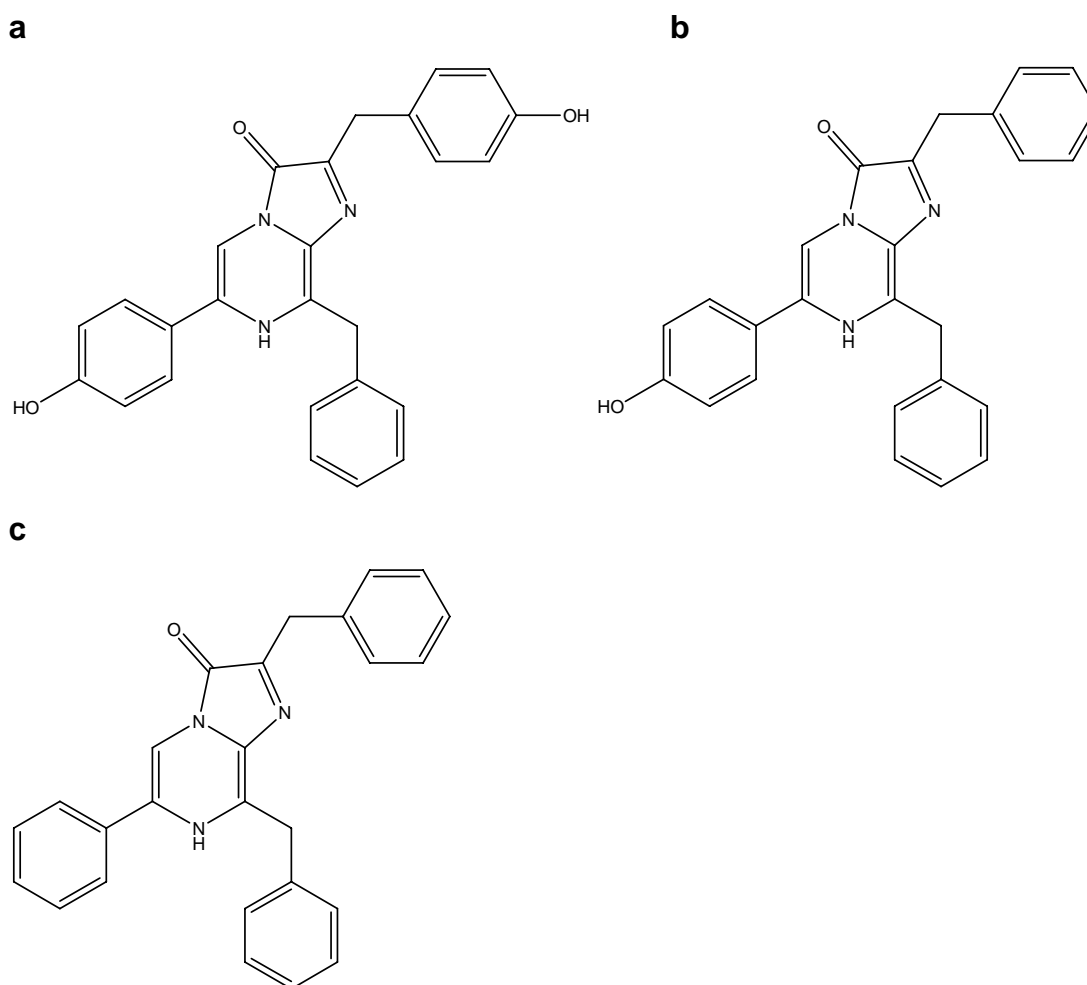
Die Energie, welche in den beiden verschiedenen Wellenlängenbereichen emittiert wird, kann sequenziell oder simultan detektiert werden<sup>92</sup>. Bei der originalen BRET-Methode werden Filter verwendet, die die Energieemission bei ca. 480 nm und ca. 530 nm messen. Bei BRET<sup>2</sup> hingegen verwendet man Filter, die im Bereich von 395 nm und 510 nm detektieren. Der Unterschied der Emissionswellenlänge rührt von der Verwendung der verschiedenen Substrate Coelenterazin H und „DeepBlueC“.

BRET-Messungen werden meist mittels „Multiplate Reader“ oder „Scanning Spectroscopy“ durchgeführt, da für die Mikroskopie aufgrund der geringen Quantenausbeute spezielle Detektionssysteme nötig sind<sup>93</sup>.

Wie bereits oben erwähnt, gibt es verschiedene Coelenterazin-Varianten (Abb. 7). Alle sind hydrophobe Moleküle, die die Zellmembran schnell durchdringen und somit auch eine Analyse intakter Zellen erlauben. Verglichen mit Coelenterazin H (Benzyl-Coelenterazin) hat „DeepBlueC“ (Bisdeoxycoelenterazin, Coelenterazin-400a, Di-dehydro-Coelenterazin) eine über 100-fach niedrigere Quantenausbeute und zerfällt sehr



schnell (Signaldauer bei einigen Sekunden)<sup>93,104</sup>. Deshalb sind für BRET<sup>2</sup> mehr Zellen als für BRET<sup>1</sup> nötig, um ausreichend hohe Lumineszenzlevel zu erreichen<sup>93</sup>. Diese beiden Rluc-Substrate sind in wässriger Lösung, besonders bei 37 °C instabil<sup>105</sup>. ViviRen® ist ein weiteres Coelenterazin-Derivat mit hellerer Lichtemission<sup>98,106</sup>. Eine verlängerte Lichtemission soll EnduRen® besitzen. Dieses Coelenterazin-Derivat ist eine geschützte Form von Coelenterazin H mit gleichen spektralen Eigenschaften, welches durch Esterasen der Zelle zu Coelenterazin H gespalten wird<sup>93,104,105</sup>. Somit soll die Detektionsperiode auf mehrere Stunden bei eBRET mit EnduRen® als Substrat ausgedehnt werden können<sup>93,98,104,105</sup>.



**Abb. 7: Coelenterazin-Derivate**

Strukturformeln von nativem Coelenterazin (a), Coelenterazin H = Benzyl-Coelenterazin (b) und „DeepBlueC“ = Bisdeoxycoelenterazin (c).

Neben den bereits beschriebenen BRET<sup>1</sup> und BRET<sup>2</sup> gibt es weitere BRET-Varianten. Bei BRET<sup>3</sup> wird die sog. „Firefly Luciferase“ (62 kDa) als Donor verwendet<sup>98,107,108</sup>.

Diese Luciferase emittiert Licht bei 565 nm in Gegenwart des Substrates D-Luciferin, ATP, O<sub>2</sub> und Mg<sup>2+</sup>. Als Akzeptoren dienen DsRed, Cy3 oder Cy3,5. Vorteile von BRET<sup>3</sup> sind niedrigere zelluläre Autofluoreszenz bei der Emissionswellenlänge und stärkere Lichtemission der „Firefly Luciferase“ verglichen zu Renilla Luciferase<sup>98,107</sup>. Aber bisherige BRET<sup>3</sup> Assays sind durch extrem schwache Signale und einer starken Überlappung des Donor- und Akzeptoremissionspeaks limitiert<sup>98</sup>. Außerdem hat der Akzeptor DsRed die Tendenz zu multimerisieren, was für die Untersuchung von Protein-Protein-Interaktionen hinderlich sein kann. Kürzlich wurde auch eine BRET-Variante mit Quantum Dots (QD) als Akzeptoren beschrieben<sup>98,109</sup>. Quantum Dots sind Halbleiter-Nanokristalle, die bei jeder Wellenlänge von UV bis 530 nm angeregt werden können<sup>98,110</sup>. Die Emissionswellenlänge hängt von deren Durchmesser ab und deckt das Spektrum von Blau bis zum nahen IR ab. QD-BRET wurde bisher nur mit Rluc und Coelenterazin H durchgeführt, ist grundsätzlich aber auch mit „DeepBlueC“ möglich<sup>98</sup>. Nachteil von QD-BRET ist der große Durchmesser der Quantum Dots und sie können nicht genetisch codiert und somit nicht in lebenden Zellen produziert werden. Ein Vorteil ist die klare Trennung zwischen Donor- und Akzeptoremissionspeaks<sup>98</sup>.

Neben der „Firefly Luciferase“ (62kDa) aus *Hotaria parvula* ist die Luciferase aus *Gaussia princeps* ein alternativer BRET-Donor. Die *Gaussia princeps* Luciferase hat ähnliche spektrale Eigenschaften wie Rluc, aber den Vorteil der geringeren Größe (19,9 kDa vs. 35 kDa) und einer höheren Biolumineszenzintensität<sup>93</sup>. Die Signaldauer ist dagegen kürzer als bei Rluc<sup>93</sup>. Es wurden auch Punktmutanten der Renilla Luciferase (Rluc2 und Rluc8) gefunden, die eine erhöhte Lichtausbeute und eine bessere Stabilität bei 37 °C im Serum verglichen zu Rluc besitzen sollen<sup>104,111,112</sup>. Diese sollen sich besonders zur Detektion von schwachen und transienten Protein-Protein-Interaktionen eignen<sup>104</sup>.

BRET-Experimente können ratiometrisch analysiert werden. Dadurch werden an verschiedenen Messtagen durchgeführte Experimente vergleichbar, da durch die ratiometrische Darstellung u. a. Variationen in der Substrat- und Probenkonzentration keine Rolle spielen<sup>93</sup>. Das Verhältnis der Emission detektiert bei beiden Wellenlängenbereichen kann dazu verwendet werden, das Ausmaß des Energietransfers und somit das Vorhandensein und die Stärke einer Interaktion abzuschätzen<sup>92</sup>. Die BRET-Verhältnisse von Zellen, die beide Partner exprimieren, werden mit denen von Zellen, die nur das Donor-Fusionsprotein alleine exprimieren, verglichen.

BRET-Verhältnis = (Emission bei 530 nm / Emission bei 480 nm) – Cf

Cf = Emission<sub>Rluc</sub> bei 530 nm / Emission<sub>Rluc</sub> bei 480 nm

Cf ist das Hintergrundsignal von Rluc-Konstrukten alleine exprimiert bei gleicher Rluc-Intensität.

Die Höhe des BRET-Signals korreliert nicht direkt mit der Affinität zwischen zwei Proteinen, da die Höhe des BRET-Verhältnisses von der Effektivität des Energietransfers (siehe oben) abhängt<sup>93</sup>. Wie lässt sich die Spezifität einer Interaktion zeigen, da auch hohe Expressionslevel markierter Rezeptoren in einer zufälligen unspezifischen Interaktion, „Bystander“-BRET genannt, resultieren können? Zum einen sind gute Negativ-Kontrollen nötig. Zum anderen kann durch Zugabe von Liganden oder dem experimentellen Design, wie Sättigungs- oder Verdrängungsexperimente, die Spezifität überprüft werden<sup>40,43,93</sup>. Bei Sättigungsexperimenten wird eine konstante Menge Donor und steigende Mengen Akzeptor exprimiert. Spezifische Interaktionen sollen in einem BRET-Signal resultieren, das bei hohen Akzeptorkonzentrationen Sättigung erreicht. Dagegen ergeben unspezifische Interaktionen ein mit steigender Akzeptorkonzentration linear ansteigendes BRET-Signal<sup>40,93</sup>. Auch Verdrängungsexperimente können die Spezifität einer konstitutiven Interaktion zeigen. Mit Coexpression des entsprechenden unmarkierten Proteins sollte das BRET-Verhältnis abnehmen, dagegen bei Coexpression eines unmarkierten nicht-interagierenden Proteins unverändert bleiben<sup>93</sup>. Sowohl bei Sättigungs- als auch bei Verdrängungsexperimenten sollte die Expression des Donor und Akzeptors überprüft werden<sup>93</sup>.

In einer anderen Studie wurden sogenannte Typ-I- und Typ-II-Experimente durchgeführt<sup>76</sup>. Bei den Typ-I-Experimenten wurde das Akzeptor-Donor-Verhältnis bei einer konstanten Gesamtexpression variiert, bei den Typ-II-Experimenten dagegen wurde die Gesamtexpressionsmenge variiert, während das Akzeptor-Donor-Verhältnis konstant gehalten wurde. Auf diese Art soll zwischen Monomeren, Dimeren und Oligomeren unterschieden werden und auch schwache Dimere erkannt werden können. Die Unterscheidung von zufälligen Interaktionen und spezifischen transienten oder sehr schwachen Interaktionen nicht-kovalenter Natur ist problematisch. Eine Modulation des BRET-Signals durch Zugabe von Liganden kann ein Zeichen für die Spezifität der Interaktion sein<sup>93</sup>. Diese Änderung könnte aber auch eine Konformationsänderung darstellen<sup>31</sup>. Ein Beweis für eine spezifisch konstitutive Interaktion dagegen kann nur

geliefert werden, wenn die erhaltenen BRET-Ratios substanziell höher als die von Negativ-Kontrollen sind, die den Hintergrundlevel durch zufällige oder unspezifische Interaktionen angeben. Als Negativkontrolle kann ein Akzeptor, der nicht an ein anderes Protein fusioniert ist, dienen<sup>40,92,93</sup>. Aber diese Kontrolle ist nicht ideal, da sie wahrscheinlich mit anderer Stärke und in anderen zellulären Kompartimenten als die zu testenden Proteine exprimiert wird<sup>93</sup>. Bessere Kontrollen sind ähnliche Proteine, die gleich stark und im gleichen Kompartiment exprimiert werden, aber nicht spezifisch miteinander interagieren<sup>93,93</sup>. Die Verwendung ähnlicher Proteine als Kontrollen ist ratsam, da das „Bystander“-BRET wahrscheinlich in Abhängigkeit davon variiert, ob das Protein löslich ist und frei diffundieren kann, in einer Membran, in einem zellulären Kompartiment oder einer Mikrodomäne lokalisiert ist<sup>93</sup>.

## **6. Vor- und Nachteile der verschiedenen Methoden zur Detektion von Protein-Protein-Interaktionen**

Zur Detektion von Protein-Protein-Interaktionen wurden vor allem die folgenden Methoden verwendet. Diese besitzen diverse Vor- und Nachteile.

**Kolokalisierungsstudien:** Mittels Konfokalmikroskopie ist zwar feststellbar, dass Proteine in der gleichen Zellregion lokalisiert sind, was eine Interaktion nahe legen könnte. Jedoch ist die Auflösung zu schlecht, um zu beurteilen, ob eine Interaktion tatsächlich stattfindet oder nicht<sup>92</sup>.

**Coimmunopräzipitation:** Die hydrophobe Natur von GPCR kann zu einer artifiziellen Aggregation führen<sup>31,92,113</sup>. Diese invasive Methode ändert den natürlichen Zustand der Zelle und spiegelt deshalb evtl. nicht die reale Struktur wider<sup>113,114</sup>. Auch die Lokalisation der Interaktion bleibt unbekannt<sup>114</sup>.

### **Biolumineszenz-Resonanz-Energie-Transfer (BRET):**

Vorteile: Eine Messung in lebenden Zellen ist bei 37 °C in Echtzeit möglich<sup>92,93,114</sup>. Die Proteine werden in nahezu physiologischem Umfeld analysiert, wenn die GPCR korrekt in die Membran integriert sind<sup>92,114</sup> und bei der Messung in lebenden Säugerzellen wird die Integrität der zellulären Kompartimente bewahrt<sup>92</sup>. Es können auch verschiedene Modulatoren über die Zeit<sup>92</sup> getestet werden. Da das Donormolekül ein Enzym ist, dessen Aktivität in einer Energieemission resultiert, wird kein Anregungslicht benötigt. Das Anregungslicht kann das zu untersuchende Gewebe schädigen und ist z. B. für

Licht-empfindliche Gewebe wie die Retina oder die Mehrzahl von Pflanzengeweben ungeeignet<sup>92,93</sup>. Da keine Direktanregung des Akzeptors stattfindet<sup>92,97</sup>, soll BRET sensitiver als FRET sein und Interaktionen auch bei physiologischen Konzentrationen detektiert werden können<sup>92</sup>. Das BRET-Signal wird als Verhältnis der Donor- über der Akzeptoremission dargestellt und ist deshalb unabhängig von der Substratkonzentration und der Zellzahl, was einen Vergleich der Ergebnisse über die Zeit und zwischen den Experimenten erlaubt, wenn andere Faktoren wie z. B. die Proteinexpression kontrolliert werden<sup>92</sup>. Die Expressionslevel von Donor und Akzeptor können unabhängig voneinander bestimmt werden, indem die Lumineszenz des Donors und die Fluoreszenz des Akzeptors gemessen werden<sup>97</sup>. Auch „high-throughput Screening“ ist möglich<sup>92,93</sup>. Um eine simultane Interaktion zwischen drei Partnern zu zeigen, kann eine Kombination von BRET<sup>1</sup> und BRET<sup>2</sup> oder eine Kombination zwischen BRET und FRET verwendet werden<sup>19,93</sup>. Letztlich sind Geräte für BRET-Messungen einfach und günstig, da keine Anregungslichtquelle benötigt wird<sup>92,97</sup>.

Nachteile: BRET liefert keine Information darüber, wo in der Zelle die beobachtete Protein-Protein-Interaktion stattfindet<sup>22,92,93</sup>. Die Stöchiometrie der interagierenden Partner kann nicht einfach bestimmt werden, da die Signalhöhe durch einige Parameter beeinflusst wird, von denen eine multiple Protein-Interaktion nur ein Faktor ist<sup>92</sup>. Eine mikroskopische Beobachtung von Protein-Protein-Interaktionen in einzelnen Zellen auf subzellulären Level ist nur schwer möglich, da die Lichtemission von Luciferasen sehr niedrig ist<sup>97</sup>. Endogene Interaktionen sind nicht messbar, da unmarkierte Proteine nicht detektiert werden können<sup>92</sup>. Dagegen können artifiziell hohe Proteinkonzentrationen in nicht-physiologischen Interaktionen resultieren, die man als BRET-Signal detektieren kann<sup>92</sup>. Bei Untersuchungen, ob eine Ligandenbindung die Interaktion beeinflusst, muß beachtet werden, dass Änderungen im BRET-Signal auch von einer konformationellen Änderung anstelle eines Anstiegs oder Verlusts von Interaktionen herrühren, da das BRET-Signal durch die relative Orientierung der Donor- und Akzeptormoleküle beeinflusst wird<sup>92</sup>.

**Fluoreszenz-Resonanz-Energie-Transfer (FRET):** Es gibt verschiedene Varianten von FRET wie Akzeptor-Photobleichen, Donor-Photobleichen, „Ratio-Imaging“, „Fluorescence lifetime measurements“ (FLIM) und „Sensitized Emission“ FRET. Diese sind alle als „single cell“- oder „whole cell population“-Messungen durchführbar<sup>114,115</sup>.

Vorteile: Die Proteine werden ebenfalls in nahezu physiologischem Umfeld analysiert, wenn die GPCR korrekt in die Membran integriert sind<sup>92,114,116</sup>, und eine Messung in

lebenden Zellen ist bei 37 °C in Echtzeit möglich<sup>92,93,114</sup>. Die mikroskopische Beobachtung von Protein-Protein-Interaktionen ist in einzelnen Zellen auf subzellulären Level möglich<sup>97</sup>, aber auch „high-throughput Screening“ ist machbar<sup>92,93</sup>.

Nachteile: Das Donor-Fluorophor muß mit monochromatischem Licht angeregt werden. Da sich die Spektren beider Fluorophore überlappen, kommt es zu einer Direktanregung des Akzeptor-Fluorophors. Dies erschwert die Ergebnisinterpretation<sup>92,97,115</sup>. Weiterhin kann der Donor photobleichen und so zu einem Signalverlust über die Zeit führen<sup>92,97</sup>. Das Anregungslicht kann das Gewebe schädigen und ist z. B. für Licht-sensitive Gewebe wie die Retina oder die meisten Pflanzengewebe ungeeignet<sup>92,93</sup>. Auch kann die Belichtung der Probe eine Autofluoreszenz, hervorgerufen durch endogene Zellkomponenten, bewirken. Dies kann im „high-throughput Screening“ problematisch sein<sup>97</sup>. Eine Unterscheidung zwischen Dimeren und Oligomeren höherer Ordnung ist nur schwer und technisch aufwendig mittels Drei-Farben-FRET möglich<sup>19,117</sup>.

Eine Variante von FRET ist „**Time-resolved FRET**“ (TR-FRET): Donor und Akzeptor können an Antikörper konjugiert sein<sup>93</sup>.

Vorteile: Mittels TR-FRET umgeht man teilweise Probleme wie Photobleichen, Autofluoreszenz und simultane Anregung von Donor- und Akzeptorprotein<sup>93</sup>. Die Methode zeigt ein hohes Signal-zu-Rausch-Verhältnis<sup>113</sup> und es ist keine Überexpression der zu untersuchenden Proteine nötig<sup>113</sup>. Die Donor- und Akzeptormoleküle sind mit Antikörpern gegen das zu untersuchende Epitop verbunden. Mit Antikörpern, die die Membran nicht durchdringen können, wird ausschließlich die Interaktion von Rezeptoren an der Zelloberfläche gemessen<sup>22,93,113</sup>.

Nachteil: Die Spezifität der Antikörper ist wichtig für den Erfolg der Methode<sup>113</sup>.

#### **„Fluorescence lifetime imaging microscopy“ (FLIM):**

Vorteile: Die Messungen sind unabhängig von Änderungen in der Anregung, Probenkonzentration, Photobleichen und Lichtstreuung<sup>118</sup>. Kombiniert mit FRET erreicht man eine hohe räumliche und zeitliche Auflösung<sup>118</sup>. Auch die Distanz zwischen den interagierenden Proteinen ist bestimmbar<sup>118</sup>.

#### **Protein-Fragment-Komplementations-Assays wie „Bimolecular Fluorescence Complementation“ (BiFC):**

Vorteile: Die direkte Visualisierung der Proteinkomplexe in lebenden Zellen ermöglicht die Untersuchung von Interaktionen in ihrer normalen Umgebung und in Echtzeit<sup>114,117,119-121</sup>. Es gibt keine Interferenzen durch Änderungen in der Fluoreszenzintensität oder der Fluoreszenzlebensdauer, die durch andere zelluläre

Bedingungen als Protein-Interaktionen zustande kommen<sup>116</sup>. Außerdem müssen die Proteine keine bestimmte Orientierung oder bestimmte Distanz zueinander haben<sup>116</sup> und die Interaktionspartner müssen keinen langlebigen Komplex bilden, da durch die Assoziation der Fragmente die Interaktionspartner zusammengehalten werden<sup>116</sup>. Auch die subzelluläre Lokalisation und Translokation von Proteinkomplexen kann bestimmt werden<sup>119</sup>. Diese Methode ist günstig, erfordert keine speziellen Reagenzien und ist für „high-throughput Screening“ automatisierbar<sup>119</sup>. Zur Detektion von Proteinkomplexen ist die Verwendung verschiedener Reporter möglich<sup>119</sup> oder multicolor-BiFC mittels Split-Rluc und Split-GFP mit anschließender BRET-Messung<sup>93,116,121,121</sup>.

Nachteile: Einerseits können sterische Einschränkungen die Fragmentassoziation behindern<sup>116,120</sup>, andererseits dürfen die Fragmente in Abwesenheit der zu untersuchenden Proteine nicht miteinander assoziieren, was besonders bei hohen Expressionsleveln passieren kann<sup>114,116,119</sup>. Teilweise assoziieren die Protein-Fragmente irreversibel<sup>114</sup>. Diese Methode ist nicht für Studien der Dynamik oder Kinetik von Protein-Protein-Interaktionen im Zeitraum von Sekunden oder Minuten geeignet<sup>119,120</sup>. Weiterhin können die Fusionsproteine ein anderes Verhalten als die Wildtyp-Proteine zeigen<sup>114</sup>.

#### **„Yeast two-hybrid Screen“:**

Vorteile: Eine quantitative Analyse der Enzymlevel erlaubt eine Abschätzung der Interaktionsstärke. Bei einer schwachen oder transienten Bindung der Protein ist auch die transkriptionelle Aktivierung schwach, was eine niedrige Enzymaktivität zur Folge hat<sup>123</sup>.

Nachteile: Die zu untersuchenden Proteine müssen im Hefe-Nukleus exprimiert werden. Dies ist für Proteine, die sich nicht korrekt falten oder keiner passenden post-translationalen Modifikation unterliegen, ein Problem<sup>92,120,123</sup>. Auch können Proteine, welche in einer physiologischen, zellulären Umgebung durch Kompartimentierung getrennt sind, im Hefe-Nukleus in artifiziellen Interaktionen resultieren<sup>92</sup>. Das Reporterprotein könnte durch Selbst-Bindung einiger Proteine an die DNA oder einer transkriptionellen Aktivierung der Reportergene fälschlicherweise aktiviert werden<sup>123</sup>. Andere Proteine können toxisch sein und so das Wachstum hemmen<sup>123</sup>. Auch ist eine Bindung von Proteinen möglich, die normalerweise nicht binden oder nicht im gleichen Zellkompartiment einer normalen Zelle lokalisiert sind<sup>123</sup>. Schließlich kann durch eine andere Tertiärstruktur des Fusionsproteins eine Interaktion mit dem Bindungspartner verhindert werden<sup>123</sup>.

## 7. Fluorescence Recovery after Photobleaching

„Fluorescence Recovery after Photobleaching“ (FRAP) Experimente wurden erstmals Mitte der 1970er Jahre mit hydrophilen oder lipophilen Fluorophoren wie Fluorescein gekoppelt an Proteine oder Lipide durchgeführt<sup>124,125,126</sup>. Die Entdeckung und Klonierung von GFP und GFP-Varianten erweiterte und vereinfachte die Anwendung von FRAP: GFP-markierte Proteine können an verschiedene Stellen in der Zelle platziert werden; außerdem ist das GFP-Molekül sehr photostabil, deshalb ist eine Beobachtung über längere Perioden möglich; weiterhin beeinflusst das Markieren mit GFP kaum die Funktion und Lokalisierung von Fusionsproteinen<sup>127</sup>. GFP-Fusionsproteine sind ideal, da sie schnell und irreversibel gebleicht werden können, ohne detektierbaren Schaden an der Zelle anzurichten. Dies ist wahrscheinlich aufgrund der kompakten  $\beta$ -Zylinderstruktur des GFP möglich, welche die externe Umgebung von schädigenden Effekten, die durch reaktive Zwischenstufen durch das Photobleichen gebildet werden, abschirmen soll<sup>128</sup>. Das Photobleichen ist eine photoinduzierte Zerstörung eines Fluorophors, welche reversibel oder irreversibel ablaufen kann. GFP hat weiterhin eine hohe Fluoreszenzausbeute und die Fluoreszenz ist relativ unempfindlich von Umgebungseinflüssen<sup>128</sup>.

Bei FRAP werden Fluorophor-markierte Proteine in einer kleinen definierten Region der Zelle z. B. in der Zellmembran mit einem Laserstrahl hoher Intensität gebleicht (Abb. 8). Die Bewegung der nicht-gebleichten fluoreszierenden Proteine in diese gebleichte Region, wird mit niedriger Laserstärke in Abhängigkeit der Zeit beobachtet. Aus diesen Messungen können zwei Parameter bestimmt werden: die Fraktion mobiler Proteine und die Geschwindigkeit der Wiederkehr fluoreszierend-markierter Proteine.

Die mobile Fraktion gibt das Ausmaß der Fluoreszenzwiederkehr an und stellt die Fraktion dar, die während der Zeit des Experimentes in das gebleichte Gebiet zurückkommen kann. Die mobile Fraktion wird bestimmt durch das Verhältnis der finalen zu der initialen Fluoreszenz in der gebleichten Region, korrigiert um die Fluoreszenz, die durch das Photobleichen verloren ging. Für eine mobile Fraktion kleiner 100% gibt es verschiedene Ursachen. Einige Moleküle sind irreversibel an ein fixiertes oder verankertes Substrat gebunden. Das Protein könnte immobile Aggregate bilden oder in einem Kompartiment eingeschränkt sein und kann nicht zu der Fluoreszenzwiederkehr in einem separatem, unverbundenen Kompartiment beitragen. Alternativ sind Faktoren wie Diffusionsbarrieren oder Diskontinuitäten in der Struktur,



in der ein Protein lokalisiert ist, für die reduzierte Mobilität verantwortlich<sup>127,128</sup>. Falls die mobile Fraktion erhöht ist, besteht die Möglichkeit, dass ein Protein aus einem begrenzten Kompartiment oder einem fixierten makromolekularem Komplex freigesetzt wurde<sup>128</sup>.

Die Geschwindigkeit des FRAP wird durch Zeitkonstanten oder die Diffusionskonstante angegeben und ist ein Maß für die Rate der Proteinbewegung in Abwesenheit von aktivem Transport<sup>128</sup>. Die Diffusionskonstante gibt die mittlere quadratische Verschiebung an, die ein Protein während einer zufälligen Bewegung über die Zeit erfährt. Alle Proteine unterliegen dieser Art der Brownschen Bewegung, falls sie nicht immobilisiert sind oder einen aktiven Transport erfahren<sup>128</sup>. Die Diffusionskonstante wird durch die Stokes-Einstein-Gleichung angegeben.

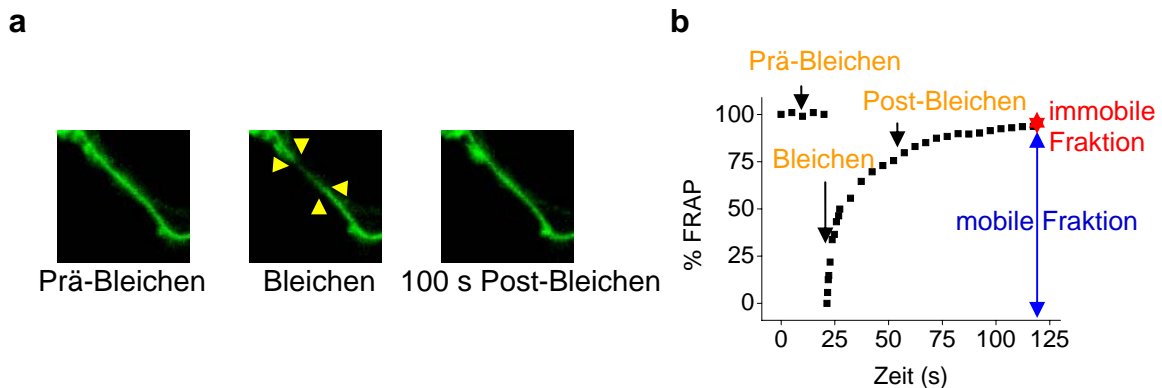
Stokes-Einstein-Gleichung:  $D = kT/6\pi\eta R$

Dabei ist  $D$  die Diffusionskonstante,  $k$  die Boltzmannkonstante,  $T$  die absolute Temperatur,  $\eta$  die Viskosität und  $R$  der hydrodynamische Radius des Partikels, wobei  $\eta$  und  $R$  die wichtigsten Faktoren darstellen. Abweichungen von der theoretischen Diffusionskonstante können Informationen über die Umgebung von Proteinen geben. Eine langsamere Diffusion als erwartet kann ein Zeichen für eine Protein-Protein-Interaktion, Bindung an eine Matrix, die ein Protein immobilisieren oder verlangsamen kann oder für eine Kollision mit anderen Molekülen sein, welche eine freie Diffusion behindern<sup>127,128</sup>. Ist die Diffusion schneller als erwartet, ist entweder die Viskosität erniedrigt oder das Protein zeigt kein Diffusionsverhalten, sondern eine direkte Bewegung durch aktiven Transport<sup>128</sup>. Wegen der höheren Viskosität der Zellmembran gegenüber dem Zytoplasma, ist die Diffusion von Membranproteinen langsamer als von löslichen Proteinen. Für die freie Diffusion gibt es kein Größenlimit *in vivo*. Sogar große Proteinkomplexe können im Zytoplasma und Nukleus frei diffundieren<sup>127</sup>.

FRAP kann nicht nur zur Bestimmung der Diffusionsgeschwindigkeit genutzt werden, sondern beispielsweise auch um Fragen zur Proteinlokalisierung, Dynamik und Interaktion mit anderen Komponenten in lebenden Zellen oder Protein-Protein-Interaktionen zu untersuchen.

Neben Ein-Farben-FRAP, bei welchem nur ein Fluorophor gebleicht und dessen Mobilität beobachtet wird, gibt es auch Zwei-Farben-FRAP. Bei Zwei-Farben-FRAP

Experimenten werden beide Fluorophore gebleicht und die Wiederkehr beider gemessen.



**Abb. 8: FRAP**

(a) Konfokalbilder der Zellmembran einer Zelle transfiziert mit einem Fluoreszenz-markierten Protein vor, direkt nach und 100 Sekunden nach dem Bleichen (ca. 50-75% der Ausgangsfluoreszenz) eines  $3 \times 1 \mu\text{m}$  großen Rechtecks (gelbe Pfeile). Bei FRAP-Experimenten werden fluoreszierende Moleküle in einer kleinen definierten Region der Zelle irreversibel gebleicht und die nachfolgende Fluoreszenzwiederkehr in das gebleichte Gebiet beobachtet. (b) Da bei einem FRAP-Experiment zu vielen Zeitpunkten Bilder aufgenommen werden, kann das prozentuale FRAP in das gebleichte Gebiet über die Zeit als Kurve aufgetragen werden. Aus dieser FRAP-Kurve können die mobile und die immobile Fraktion des untersuchten Fusionsproteins bestimmt werden.

## 8. Ziel dieser Arbeit

In den letzten Jahren gab es immer mehr Hinweise darauf, dass G-Protein-gekoppelte Rezeptoren nicht nur als monomere Funktionseinheiten, sondern auch als Homodimere oder -oligomere bzw. Heterodimere oder -oligomere in der Zellmembran existieren. Da Klasse-I-GPCR nicht, wie beispielsweise Tyrosinkinase-Rezeptoren, als über Disulfidbrücken-verbundene Dimere vorliegen, ist der Nachweis einer potenziellen Interaktion schwieriger zu erbringen.

Weiterhin stellt sich die Frage nach der Stabilität dieser Interaktionen. Mit den bisher verwendeten Methoden ist eine Unterscheidung zwischen stabilen und transienten Interaktionen nicht möglich. Auch die Größe der Komplexe und die an der Interaktion beteiligten Rezeptordomänen und Aminosäuren sind noch weitgehend ungeklärt. Liegen Dimere, primäre Oligomere oder Komplexe bestehend aus Dimer-Untereinheiten vor? Ändert sich der Oligomerisierungszustand in Abhängigkeit des Aktivierungszustandes der Rezeptoren?

Darüber hinaus ist die Funktion der Di- oder Oligomerisierung von GPCR noch nicht bekannt. Für den GABA<sub>B</sub>-Rezeptor beispielsweise wurde eine funktionelle Konsequenz der Dimerisierung gefunden<sup>22</sup>. Andererseits gibt es aber auch Untersuchungen die zeigen, dass einzelne Rezeptoren nachgeschaltete Signalwege anschalten können<sup>38,39</sup>.

Die Existenz und Funktion von GPCR-Di- oder Oligomeren wird momentan intensiv diskutiert. Dies ist u. a. auch auf die Grenzen der zur Untersuchung der Rezeptor-Homo- und Heteromerisierung in lebenden Zellen verwendeten Techniken zurückzuführen. Neben Coimmunopräzipitation werden meist Resonanz-Energie-Transfer-Verfahren wie FRET (Fluoreszenz-Resonanz-Energie-Transfer) und BRET (Biolumineszenz-Resonanz-Energie-Transfer) angewendet. Trotz hoher Sensitivität dieser Methoden kann die Stabilität und das Ausmaß der Rezeptor-Rezeptor-Interaktion nicht quantitativ bestimmt werden und eine Unterscheidung zwischen Dimerisierung und Oligomerisierung ist technisch sehr schwierig.

Deshalb gab es folgende Ziele:

1. Um eine Vergleichsgrundlage für die Resultate zu haben, die mittels der neu entwickelten Methode erhalten werden, sollte die Homo- und Heterointeraktion von  $\beta_1$ - und  $\beta_2$ -AR mittels BRET unter Verwendung einer geeigneten Negativkontrolle untersucht werden.
2. Dann sollte eine neue, unabhängige Methode zur Untersuchung von Protein-Protein-Interaktionen basierend auf „Fluorescence Recovery after Photobleaching“ (FRAP) entwickelt werden. Mittels monomerer und dimerer Kontrollproteine sollte eine Validierung der Methode durchgeführt werden, um die Anwendbarkeit zur Abschätzung der Größe und Stärke der Protein-Komplexe zu bestätigen.
3. Mittels dieser neu entwickelten Zwei-Farben-FRAP-Methode sollte anschließend sowohl die Homo- als auch Heterointeraktionen zwischen  $\beta_1$ - und  $\beta_2$ -AR untersucht werden. Weiterhin sollten die Resultate beider Methoden (BRET und Zwei-Farben-FRAP) miteinander verglichen werden, um die Unterschiede und Vorteile beider Methoden festzustellen.

## II. Material und Methoden

### 1. Material

#### 1.1 Plastikwaren und Verbrauchsmaterialien

Blotting-Papier, 190 g/m <sup>2</sup>	Hartenstein
Deckgläschen 24 mm	Assistent
Einwegküvetten	Sarstedt
Falcon Blue Max	Becton Dickinson Labware
Glasfaserfilter Skatron Filter MAT (SK11731)	Skatron
Immobilon PVDF-Membran	Millipore
Optiplate 96-Well weiß/schwarz	Perkin Elmer Life Sciences
Poly Prep Chromatography Columns	Biorad
Ultrafree-DA Gelextraktionskit	Roth
X-ray film, Super RX Fuji medical	Fuji Film
Zellkulturschalen, Kryoröhrchen	Nunc

#### 1.2 Chemikalien, Reagenzien und Enzyme

(-) Isoproterenolhydrochlorid	Sigma
<sup>125</sup> Iod-Cyanopindolol	Perkin Elmer
2-Propanol	Fluka
Agar für die Bakteriologie	AppliChem
Agarose	PeqLab
Alprenolol	Sigma
Alumina, für Säulenchromatographie	Sigma
Ammoniumacetat	Merck
Ammoniumperoxodisulfat	Merck
Ampicillin-Natriumsalz	AppliChem
ATP	Sigma
Benzamidinhydrochlorid	AppliChem
Bio-Rad Protein Assay	Bio Rad Laboratories GmbH

BrdU	Sigma
Bromphenolblau	Merck
BSA 10 mg/ml	New England Biolabs
BSA	AppliChem
CaCl <sub>2</sub>	AppliChem
cAMP	Sigma
Coelenterazin H	P.J.K.
Creatinkinase	Roche
Cumarsäure	Fluka
DMEM	PAN
DMSO	Merck
DNA Leiter, 1 kBp und 100 Bp	New England Biolabs
dNTPs (je 100 mM)	Eppendorf
Dowex-1 Cl-Form Säulenmaterial	Sigma
DPBS	PAN
DTT	AppliChem
EDTA Dinatriumsalz Dihydrat	Roth
Effectene Transfection Reagent	Qiagen
Entwicklerlösung	Kodak
Ethanol	Riedel de Haën
Ethidiumbromid	Sigma
FCS	Sigma
Fixiererlösung	Kodak
Glucose · H <sub>2</sub> O	Merck
Glycerol	Merck
Glycin	AppliChem
Glykogen for molecular biology	Roche
GTP	Sigma
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> , 30%	AppliChem
HCl	Merck
Hefeextrakt	AppliChem
HEPES	AppliChem
Kanamycinsulfat	AppliChem
KCl	AppliChem

KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	Roth
L-Glutamin	PAN
Lipofectamine 2000	Invitrogen
Luminol	Sigma
Magermilchpulver	AppliChem
Maxi Kit	Qiagen
MEM (Eagle)	Sigma
Methanol	Sigma
MgCl <sub>2</sub> (25 mM)	Eppendorf
MgCl <sub>2</sub> · 6 H <sub>2</sub> O	AppliChem
MgSO <sub>4</sub> · 7 H <sub>2</sub> O	Merck
MnCl <sub>2</sub>	AppliChem
Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub>	Merck
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> · 7 H <sub>2</sub> O	Merck
NaCl	AppliChem
NaHCO <sub>3</sub>	Merck
NaOH-Plätzchen	AppliChem
Natriumdesoxycholat	AppliChem
NP-40	Sigma
OptiMEM	Gibco
Penicillin/Streptomycin	PAN
Pepton aus Casein	AppliChem
Pfu-Polymerase (3U/μl) & Puffer	Promega
Phosphokreatin	Roche
Pipes für die Molekularbiologie	AppliChem
PMSF	Sigma
Poly-D-lysine hydrobromide	Sigma
Polyethylenimine	Sigma
Proteinmarker V	PeqLab
Restriktionsenzyme & Puffer	New England Biolabs
RO-20-1724	Roche
Roti-Load 1 bzw. 2 (4-fach konz.)	Roth
Rotiphorese 30	Roth
SDS	AppliChem

T4-DNA-Ligase & Puffer	New England Biolabs
TAE Buffer Concentrate (50 x)	Millipore
Temed	Merck
Triethanolamin	Sigma
Tris	AppliChem
Trypsin/EDTA; 0,05/0,02%ig in PBS	PAN
Trypsininhibitor	AppliChem
Tween 20	AppliChem
Vitamin B12	Sigma
Xylencyanol	Sigma
Zinkacetat	Sigma
$\alpha$ - <sup>32</sup> P-ATP	GE Healthcare, Amersham

### 1.3 Geräte und Software

AT261 Delta Range Feinwaage	Mettler
Automatic $\gamma$ -Counter 1480 Wizard 3''	Wallac
Avanti J-25 Centrifuge	Beckman Coullter GmbH
Blue Power 200 (Western Blotting)	Serva
Centrifuge 5417	Eppendorf
Electrophoresis Power Supply EPS301	Pharmacia Biotech
InLab 410 Einstab pH-Elektrode	Mettler Toledo
Labovert Mikroskop	Leitz
LB 122 Kontaminationsmonitor	Berthold
LE-70 Ultrazentrifuge	Beckman Coullter GmbH
LS1801 Counter Microbeta	Beckman Coullter GmbH
Multimode Microplate Reader Mithras LB 940	Berthold Technologies
Neubauer Zählkammer	HGB
pH Meter pH 526 MultiCal	WTW
PM4800 Delta Range Waage	Mettler
PS 500 XT DC Power Supply (für PAGE)	Hoefer Instruments
Rotana 96 R Zentrifuge	Hettich Zentrifugen
SE 600 Series Electrophoresis unit (für PAGE)	Hoefer Instruments

Skatron Semiautomatic cell harvester 11019	Skatron, Norway
SP5 Laser Scanning Konfokalmikroskop	Leica
Spektrophotometer UV-1601	Shimadzu
TE 62 tank transfer unit (Western Blotting)	Hoefler Instruments
Thermocycler T3	Biometra
Thermomixer 5436	Eppendorf
Ultraturax T25	Janke&Kunkel, IKA Labortechnik
Universal 16 R Zentrifuge	Hettich Zentrifugen
UV-Lampe	Biometra
Vortex-Genie 2	Scientific Industries
Excel	Microsoft
LAS AF	Leica Software
Origin 6.1	Origin Lab

## 1.4 Biologisches Material

### Bakterienstämme

E. coli Stamm DH5  $\alpha$

### Eukaryotische Zelllinien

HEK 293-Zellen

HEK 293T-Zellen

### Primer/Oligonucleotide

Alle Oligonucleotide wurden von Eurofins MWG Operon, Ebersberg, bezogen.

Enthaltene Schnittstellen für Restriktionsenzyme sind unterstrichen. Grau unterlegt ist eine Signal-Sequenz, damit das Protein besser an der Zellmembran exprimiert wird.

#### für $\beta_1$ -Rluc:

b1linkob	5'-TCG AGC CTG GAC GAG CCG TGC CGC CCC GGC TTC GCC TCG GAA TCG AAG GTG T-3'
b1SchP2m	5'-GTC CGC GCC CCG CGC CGG <u>TCT AGA</u> CAC CTT GGA TTC CGA GGC-3'



für YFP-β<sub>1</sub>:

b1ApaI 5'-CTC CTC GTT CCC CTG GGA AGC CGT GCC CGG AGT  
CCG-3'  
Xba-beta1 5'-ATT CTG CAG ATC GCC TCT AGA ATG GGC GCG GGG  
GTG-3'

für β<sub>2</sub>-CER:

EGFP-Stop 5'-AAA AAA GCG GCC GCT TAC TTG TAC AGC TCG  
TCC-3'  
Xba-EGFP 5'-AAA AAA TCT AGA GTG AGC AAG GGC GAG G-3'

für YFP-ARIIB:

XbaARIIBf 5'-AAA AAA TCT AGA ATG GCG GCG CCC TGG GCG-3'  
ARIIBXhor 5'-AAA AAA CTC GAG CTA CAC ATG GCC GTA GGG  
AGG-3'

für siCD28:

SiCD28f 5'-AAA AAA GGA TCC ATG AAG ACG ATC ATC GCC CTG  
AGC TAC ATC TTC TGC CTG GTA TTC GCC ATG CTC  
AGG CTG CTC TTG-3'  
CD28Apar 5'-AAA AAA GGG CCC TAC CTG CTC CTC TTA CTC-3'

für siCD28-CFP und siCD28-YFP:

SiCD28f 5'-AAA AAA GGA TCC ATG AAG ACG ATC ATC GCC CTG  
AGC TAC ATC TTC TGC CTG GTA TTC GCC ATG CTC  
AGG CTG CTC TTG-3'  
CD28Xbar 5'-AAA AAA TCT AGA CCT GCT CCT CTT ACT CCT-3'

für CD28-CFP und CD28-YFP:

BamCD28f 5'-AAA AAA GGA TCC ATG CTC AGG CTG CTC TTG-3'  
CD28Xbar 5'-AAA AAA TCT AGA CCT GCT CCT CTT ACT CCT-3'

für YFP-CD28:

XbaCD28f 5'-AAA AAA TCT AGA ATG CTC AGG CTG CTC TTG-3'  
CD28Apar 5'-AAA AAA GGG CCC TAC CTG CTC CTC TTA CTC-3'

für CD86-CFP und CD86-YFP:

BamCD86f 5'-AAA AAA GGA TCC ATG GAC CCC CAG TGC ACT-3'  
CD86Xbar 5'-AAA AAA TCT AGA GCG AGG CCG CTT CTT CTT-3'

für YFP-CD86:

XbaCD86f 5'-AAA AAA TCT AGA ATG GAC CCC CAG TGC ACT-3'  
CD86Apar 5'-AAA AAA GGG CCC TAG CGA GGC CGC TTC TTC-3'

Plasmidvektoren:

Als Expressionssystem rekombinanter Proteine in eukaryotischen Zellen wurde der pcDNA3 Vektor von Invitrogen, welcher ein Ampicillin-Resistenzgen enthält, verwendet.

Plasmide:

Alle die cDNA des humanen  $\beta_1$ -adrenergen Rezeptors ( $\beta_1$ -AR) enthaltenden Plasmide haben die Polymorphismen 49-Ser und 389-Gly. Der humane  $\beta_2$ -adrenerge Rezeptor ( $\beta_2$ -AR) besitzt die Polymorphismen 16-Arg, 27-Gln und 164-Thr. Die cDNA des humanen CD28 wurde an 185-Arg trunziert und die des humanen CD86 an 277-Arg. Der murine Activin-Rezeptor Typ-2B (ARIIB) wurde an 170-Val trunziert.

$\beta_1$ -Rluc	$\beta_1$ -AR mit Renilla Luciferase am C-Terminus (Linker TCTAGA)
$\beta_1$ -YFP	$\beta_1$ -AR mit YFP am C-Terminus (Linker TCTAGA)
$\beta_1$ -CFP	$\beta_1$ -AR mit CFP am C-Terminus (Linker TCTAGA)
YFP- $\beta_1$	$\beta_1$ -AR mit einer Signal-Sequenz (siehe Primer/Oligonucleotide) und sYFP am N-Terminus (Linker TCTAGA)
$\beta_2$ -Rluc	$\beta_2$ -AR mit Renilla Luciferase am C-Terminus (Linker TCTAGA)
$\beta_2$ -YFP	$\beta_2$ -AR mit YFP am C-Terminus (Linker TCTAGA), freundlicherweise von U. Zabel, Würzburg zur Verfügung gestellt.
$\beta_2$ -CFP	$\beta_2$ -AR mit CFP am C-Terminus (Linker TCTAGA), freundlicherweise von U. Zabel, Würzburg zur Verfügung gestellt.
$\beta_2$ -CER	$\beta_2$ -AR mit CER am C-Terminus (Linker TCTAGA)
YFP- $\beta_2$	$\beta_2$ -AR mit einer Signal-Sequenz (siehe Primer/Oligonucleotide) und sYFP am N-Terminus (Linker TCTAGA), freundlicherweise von U. Zabel, Würzburg zur Verfügung gestellt.
YFP- $\beta_2$ -CFP	enthält cDNA des $\beta_2$ -AR mit sYFP am N-Terminus (Linker TCTAGA) und CFP am C-Terminus (Linker TCTAGA), freundlicherweise von U. Zabel, Würzburg zur Verfügung gestellt.

CFP- $\beta_2$	$\beta_2$ -AR mit CFP am N-Terminus, freundlicherweise von N.A. Lambert, Augusta, GA zur Verfügung gestellt.
CD28-CFP	CD28 mit CFP am trunkierten C-Terminus (Linker TCT AGA)
CD28-YFP	CD28 mit YFP am trunkierten C-Terminus (Linker TCT AGA)
siCD28	CD28 N-terminal mit Signal-Sequenz (siehe Primer/Oligonucleotide)
siCD28-CFP	CD28 N-terminal mit Signal-Sequenz (siehe Primer/Oligonucleotide) und am trunkierten C-Terminus mit CFP (Linker TCT AGA)
siCD28-YFP	CD28 N-terminal mit Signal-Sequenz (siehe Primer/Oligonucleotide) und am trunkierten C-Terminus mit YFP (Linker TCT AGA)
YFP-CD28	CD28 mit einer Signal-Sequenz (siehe Primer/Oligonucleotide) und sYFP am N-Terminus (Linker TCTAGA)
CD86-CFP	CD86 mit CFP am trunkierten C-Terminus (Linker TCT AGA)
CD86-YFP	CD86 mit YFP am trunkierten C-Terminus (Linker TCT AGA)
YFP-CD86	CD86 mit einer Signal-Sequenz (siehe Primer/Oligonucleotide) und sYFP am N-Terminus (Linker TCTAGA)
ARIIB-CFP	ARIIB mit CFP am trunkierten C-Terminus (Linker TCT AGA), freundlicherweise von K. Heinecke, Würzburg zur Verfügung gestellt.
YFP-ARIIB	ARIIB mit einer Signal-Sequenz (siehe Primer/Oligonucleotide) und sYFP am N-Terminus (Linker TCTAGA)
mYFP	YFP mit cDNA für eine Lipidmodifikationsstelle (MGCINSKRKD), die Membranlokalisierung des YFP bewirkt, freundlicherweise von V. Nikolaev, Würzburg zur Verfügung gestellt.
mCFP	CFP mit cDNA für eine Lipidmodifikationsstelle (MGCINSKRKD), die Membranlokalisierung des YFP bewirkt, freundlicherweise von V. Nikolaev, Würzburg zur Verfügung gestellt.

### Antikörper (für FRAP und „Western Blot“)

Monoklonaler Maus-Antikörper gegen GFP	Rockland, USA
Polyklonaler Ziegen-Antikörper gegen GFP, biotinyliert	Rockland, USA
Ziegen-Antikörper gegen Maus IgG, HRP-gekoppelt	Dianova, Deutschland
Esel-Antikörper gegen Ziegen IgG, HRP-gekoppelt	Dianova, Deutschland

## **2. Methoden**

### **2.1 Molekularbiologische Methoden**

#### **2.1.1 Polymerasekettenreaktion (PCR)**

Die Polymerasekettenreaktion („polymerase chain reaction“ = PCR) ist eine Methode, um DNA mittels eines Enzyms (DNA-Polymerase) exponentiell in vitro zu vervielfältigen. Die PCR kann aber auch zum Klonieren von Genen eingesetzt werden und um gezielt Mutationen in die DNA einzufügen.

Typischer PCR-Ansatz:

200 ng	„Template“
1 µl	Primer vorwärts (100 pmol/µl)
1 µl	Primer rückwärts (100 pmol/µl)
10 µl	Polymerasepuffer (10x)
4 µl	Desoxynucleosidtriphosphate (dATP, dCTP, dGTP, dTTP, je 10 mM)
2 µl	MgCl <sub>2</sub> (1 mM)
5 µl	DMSO
2 µl	Pfu-Polymerase (3 U/µl)
H <sub>2</sub> O	ad 100 µl

Das „DNA-Template“ enthält die DNA-Region, die amplifiziert oder mutiert werden soll. Die Primer sind zu den DNA-Einzelsträngen komplementäre Oligonukleotide und stellen jeweils den Startpunkt der DNA-Synthese dar. Will man Mutationen in eine DNA-Region einführen, so ist die Verwendung von Primern, die die entsprechende

Mutation enthalten, möglich. Mit zwei Primern wird somit der zu vervielfältigende Bereich von beiden Seiten begrenzt. Im ersten Schritt der PCR, der Denaturierung, wird der PCR-Ansatz auf 94-96 °C erhitzt, um die DNA in Einzelstränge aufzutrennen. Nach Abkühlung auf 50-65 °C (abhängig von Länge und Sequenz der Primer) lagern sich die Primer an die DNA-Einzelstränge an. Dieser Schritt wird Primerhybridisierung oder „Annealing“ genannt. Wählt man die „Annealing-Temperatur“ zu niedrig, können sich die Primer auch unspezifisch an andere DNA-Regionen anlagern. Im 3. Schritt, der „Elongation“, knüpft die DNA-Polymerase dann Desoxynucleosidtriphosphate (dNTP) an die Oligonucleotide vom 5'- zum 3'-Ende hin an, wobei der DNA-Einzelstrang als Matrize dient. Für optimale Aktivität der Polymerase ist der Zusatz von Magnesiumionen essenziell und außerdem ist ein geeignetes chemisches Milieu nötig, das durch die Pufferlösung gegeben wird. Die Temperatur und Geschwindigkeit der „Elongation“ ist abhängig von der verwendeten Polymerase, liegt aber meist zwischen 68-72 °C und 1 kbp/min. Diese 3 Schritte wurden zyklisch 12-50 mal wiederholt. Deshalb ist es wichtig eine thermostabile Polymerase wie beispielsweise Pfu-Polymerase zu verwenden. Diese wurde aus dem thermophilen Archaeobakterium *Pyrococcus furiosus* isoliert. Weiterhin besitzt Pfu-Polymerase eine Korrekturlesefunktion, d. h. der Einbau eines unpassenden Nukleotids wird erkannt und korrigiert. Deshalb ist diese Polymerase für sequenzexakte Amplifikation gut geeignet.

PCR-Zyklus:

1.	Denaturierung	94 °C	3 min	
2.	Denaturierung	94 °C	30 s	
3.	„Annealing“	55-60 °C	30 s	} 32x
4.	„Elongation“	72 °C	je nach Länge des zu amplifizierenden DNA-Stücks (1-2 min/kBp)	
5.	„Elongation“	72 °C	3 min	
6.	Kühlen	4 °C	∞	

### 2.1.2 Agarose-Gelelektrophorese

Die Agarose-Gelelektrophorese dient zum Auftrennen eines DNA-Gemisches nach Fragmentgrößen in einem Spannungsfeld, da kleinere Fragmente schneller als größere DNA-Fragmente zur Anode wandern. Eine DNA-Fragmentlösung, vermischt mit 5x DNA-Ladepuffer, wurde in 0,8-1,3% Agarose in TAE-Puffer (Millipore) für ca. 1 h bei

konstanter Spannung (100 V) in einer horizontalen Gelkammer aufgetrennt. Zur Visualisierung der DNA unter UV-Licht ( $\lambda = 365 \text{ nm}$ ) wurde dem Agarose-Gel 0,05 mg Ethidiumbromid zugesetzt. Die Größenabschätzung der DNA-Fragmente erfolgte anhand des Vergleichs mit DNA-Größenstandards (100 Bp-Leiter, 1 kBp-Leiter, jeweils 1 mg pro Geltasche).

<u>Agarose Gel 1%</u>		<u>DNA-Ladepuffer (5-fach konzentriert)</u>	
Agarose	1 g	Bromphenolblau	0,2%
TAE-Puffer	110 g	Xylencyanol	0,2%
Ethidiumbromid	50 $\mu\text{g}$	Glycerol	30% (v/v)
		in TE-Puffer	

<u>TE-Puffer (pH 7,4)</u>	
Tris	10 mM
EDTA · 2 Na · 2 H <sub>2</sub> O	1 mM

### 2.1.3 DNA-Extraktion aus Agarose-Gelen

Nach elektrophoretischer Auftrennung der DNA-Fragmente können die benötigten DNA-Banden unter UV-Licht ausgeschnitten werden. Anschließend wurde die DNA mittels Ultrafree-DA Gelextraktionskit (Roth) aus der Agarose extrahiert. Hierzu wurde das entsprechende Gelstück in den Filterteil eines Ultrafree-DA Gefäßes überführt und 10 min bei 6800g in einer Tischzentrifuge zentrifugiert. Das Volumen der entstandenen DNA-Lösung wurde mittels TE-Puffer auf 400  $\mu\text{l}$  aufgefüllt. Daraufhin wurden 1,5  $\mu\text{l}$  Glykogen, 140  $\mu\text{l}$  Ammoniumacetatlösung (7,5 M) und 1 ml Ethanol 100% zugegeben, die Lösung gut durchmischt und entweder über Nacht bei  $-20 \text{ }^\circ\text{C}$  oder für 30 min bei  $-80 \text{ }^\circ\text{C}$  aufbewahrt. Nach Zentrifugation (20 min, 20800g) wurde ein DNA-Pellet sichtbar. Dieses wurde erst mit 70%, dann mit 100% Ethanol gewaschen und nach dem Trocknen in H<sub>2</sub>O gelöst.

### 2.1.4 Restriktionsverdau

Um zwei DNA-Fragmente miteinander ligieren zu können, müssen diese entsprechende 5'- und 3'-Enden besitzen. Dies erreicht man durch einen Restriktionsverdau mit entsprechenden Restriktionsenzymen, die doppelsträngige DNA an spezifischen Stellen

schneiden. Will man ein DNA-Fragment in einen Vektor klonieren, so ist es geschickter mit zwei verschiedenen Restriktionsenzymen zu arbeiten, die im Vektor und am Rande des Inserts jeweils nur einmal schneiden. So kann die richtige Richtung des Einbaus des Inserts gewährleistet werden.

Der Restriktionsverdau kann aber auch zu analytischen Zwecken herangezogen werden, um z. B. festzustellen, ob ein DNA-Fragment in einen Vektor eingebaut wurde.

Beispiel eines Restriktionsverdau-Ansatzes:

2-3µl	DNA (2 µg)
2 µl	Reaktionspuffer (10x)
2 µl	BSA (1 µg/µl)
0,5-2 µl	Restriktionsenzym(e) (typischerweise 4-50 U/µl)
H <sub>2</sub> O ad 20 µl	

Für analytische Verdaue sind kleinere, für präparative Verdaue größere Ansätze möglich, in denen auch die Menge an DNA und Restriktionsenzym variiert wurde. Der Zusatz von BSA, die Wahl des Reaktionspuffers und die Reaktionstemperatur ist von den verwendeten Restriktionsenzymen abhängig. Hierfür wurden die Angaben des Herstellers beachtet. Falls ein simultaner Verdau mit zwei Enzymen nicht möglich war, wurde die Reaktion sequenziell durchgeführt. Die Reaktionszeiten betragen zwischen 1-18 h. Die gewünschten Schnittstücke wurden mittels Agarose-Gelelektrophorese von den nicht benötigten Fragmenten separiert bzw. wurde die Agarose-Gelelektrophorese zur Überprüfung der Größe der Schnittstücke herangezogen.

### 2.1.5 Ligation von DNA-Fragmenten

Bei der Ligation werden zwei DNA-Fragmente mittels eines Enzyms (Ligase) verbunden. Die T4-DNA-Ligase ist in der Lage, freie 3'-Hydroxylenden mit 5'-Phosphatenden von doppelsträngiger DNA zu verknüpfen. Beide, sowohl DNA-Fragment (Insert) als auch Plasmid (Vektor) müssen daher zuvor mit entsprechenden Restriktionsenzymen verdaut worden sein. Insert und Vektor wurden in gepufferter wässriger Lösung mittels T4-DNA-Ligase entweder 30 min bei RT oder über Nacht bei 4 °C ligiert. Je nach Größenverhältnis des Inserts zum Vektor wurden die Mengen beider variiert.

Typischer Ligations-Ansatz:

1 µl	Vektor (ca. 5 µg)
16 µl	Insert (ca. 5-25 µg)
2 µl	Ligase-Puffer (10x)
<u>1 µl</u>	T4-DNA-Ligase (400 U/µl)
20 µl	

### 2.1.6 Kompetente E. coli

Bei einigen Bakterien, z. B. E. coli, besteht keine natürliche Kompetenz, d. h. Fremd-DNA kann nicht einfach aus der umgebenden Lösung in die Bakterienzelle aufgenommen werden. Deshalb können E. coli Bakterien zur Amplifikation von Plasmiden nur verwendet werden, wenn diese z. B. durch Behandlung mit  $\text{Ca}^{2+}$  Ionen kompetent gemacht wurden. Hierfür wurden 250 ml SOC-Medium mit 20 µl E. coli angeimpft. Die Kultur wurde bei 25 °C solange geschüttelt, bis eine optische Dichte (OD) von 0,6 bei 600 nm erreicht wurde. Die Messung der OD erfolgte in einem Spektrophotometer mit SOC-Medium als Referenzwert. Darauf hin wurde die Bakteriensuspension 10 min auf Eis gestellt und anschließend zentrifugiert (10 min, 4 °C, 1940g) zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Bakterienpellet in 80 ml eiskaltem TB-Puffer, der  $\text{Ca}^{2+}$  enthält, resuspendiert. Nach 10 min auf Eis wurde wiederum zentrifugiert (10 min, 4 °C, 1940g), der Überstand verworfen und das Pellet nun in 20 ml eiskaltem TB-Puffer resuspendiert. Nach Zugabe von 1,6 ml DMSO, entsprechend 7% des Gesamtvolumens, wurde die Suspension nochmals für 10 min auf Eis gestellt. Aliquots der gewünschten Mengen wurden abgefüllt, in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80 °C gelagert.

#### SOC-Medium (pH 7), steril filtriert

Pepton	2%
Hefe Extrakt	0,5%
NaCl	10 mM
KCl	2,5 mM
MgCl <sub>2</sub>	10 mM
MgSO <sub>4</sub>	10 mM
Glucose	20 mM

#### TB-Puffer (pH 6,7), steril filtriert

Pipes	10 mM
CaCl <sub>2</sub>	15 mM
KCl	250 mM
MnCl <sub>2</sub>	55 mM
MnCl <sub>2</sub> nach pH-Wert Einstellung zugeben.	



### 2.1.7 Transformation kompetenter E. coli mittels Hitzeschock

Die Transformation ist eine Methode, die die Vervielfältigung von aufgenommener Fremd-DNA in kompetenten Bakterien erlaubt. 10 µl des Ligationsansatzes wurden mit 100 µl kompetenten E. coli DH5α gemischt und 30 min auf Eis inkubiert. Dann erfolgte ein Hitzeschock für 45-50 s bei 42 °C und eine weitere Inkubation auf Eis für 2 min. Nach Zugabe von 900 ml LB-Medium wurden die Bakterien für ca. 1 h bei 37 °C geschüttelt. Die Bakteriensuspension wurde anschließend zentrifugiert (2 min, 1700g), 90% des Überstandes verworfen und das Pellet im restlichen Überstand resuspendiert. Diese Suspension wurde auf LB-Agar-Platten (entsprechendes Antibiotikum enthaltend, je nach Resistenzgen auf Plasmid) ausgestrichen und über Nacht bei 37 °C im Brutschrank inkubiert.

Für eine Maxi-Präparation wurden nur 1 µg DNA mit 100 µl kompetenten E. coli DH5α gemischt und nur ein Bruchteil (20-30 µl) der Bakteriensuspension auf LB-Agar-Platten ausgestrichen. Die anderen Transformationsschritte erfolgten wie oben beschrieben.

#### LB-Medium (Lysogeny Broth Medium, pH 7), autoklaviert

NaCl	5 g
Pepton	10 g
Hefeextrakt	5 g
H <sub>2</sub> O	ad 1 l

#### LB-Agar-Platten mit Ampicillin oder Kanamycin

Agar 1%  
in LB-Medium

Nach dem Autoklavieren Zusatz von 100 mg/l Ampicillin-Natriumsalz oder 30 mg/l Kanamycinsulfat und Gießen der Platten.

### 2.1.8 Mini-Präparation

Die Mini-Präparationsmethode wird verwendet, um kleine Mengen Plasmid-DNA aus Bakterien zu isolieren, z. B. wenn der Klonierungserfolg mittels Restriktionsverdau überprüft werden sollte.

Nach der Transformation wurden gewachsene Kolonien von der LB-Agar-Platte in jeweils ca. 5 ml LB-Medium mit Antibiotikumzusatz (Ampicillin-Natriumsalz 100 mg/l

oder Kanamycinsulfat 30 mg/l) überführt und über Nacht bei 37 °C und ca. 180 rpm geschüttelt.

Am Folgetag wurden ca. 1,5 ml Bakteriensuspension in ein entsprechendes Reaktionsgefäß überführt und zentrifugiert (5 min, 2700g). Der Großteil des Überstandes wurde verworfen und das Pelett im verbleibenden Teil des Überstandes resuspendiert. Anschließend wurden 250 µl Resuspensionspuffer P1 sowie 250 µl Lysepuffer P2 zugegeben und der Ansatz gut gemischt. Nach 4 min Inkubation bei RT wurde mit 300 µl Neutralisationspuffer P3 neutralisiert und nach gutem Vermischen 20 min bei 20800g zentrifugiert. Der Überstand wurde in ein neues Reaktionsgefäß gegeben und nochmals 10 min bei gleicher Geschwindigkeit zentrifugiert. 700 µl des Überstandes wurden dann mit 700 µl Isopropanol vermischt, 20-30 min bei -80 °C gelagert und danach zentrifugiert (20 min, 20800g). Das ausgefallene DNA-Pellet wurde mit 200 µl Ethanol 70% gewaschen, getrocknet und in 20 µl H<sub>2</sub>O gelöst.

Resuspensionspuffer P1

Tris (pH 8,0)	50 mM
EDTA	10 mM
RNase A	100 µg/ml
LyseBlue	1 µl/ml

Lysepuffer P2

NaOH	200 mM
SDS	1% (w/v)

Neutralisationspuffer P3 (pH 5,0)

Kaliumacetat	3 M
--------------	-----

### 2.1.9 Maxi-Präparation

Die Maxi-Präparation wird zur Gewinnung größerer Mengen DNA (> 500 µg) eingesetzt. Hierzu wurde ein Kit (Qiagen Plasmid Maxi Kit) verwendet.

Am Vortag wurden ca. 200 ml LB-Medium mit Antibiotikum-Zusatz mit einer transformierten E. coli-Kolonie angeimpft und über Nacht bei 37 °C und 180 rpm geschüttelt. Am Folgetag wurde die Bakteriensuspension 7 min bei 4 °C und 7500g zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Bakterien-Pellet in 10 ml Resuspensionspuffer P1 resuspendiert. Nach Zugabe von 10 ml Lysepuffer P2 wurde das Gemisch solange geschüttelt, bis es eine homogen blaue Färbung hatte. Die vierminütige alkalische Lyse der Bakterien wurde mittels Zugabe von 10 ml eiskaltem Neutralisationspuffer P3 beendet. Eine gute Durchmischung wurde durch einen

kompletten Farbumschlag nach weiß sichtbar. Der Ansatz wurde nach 15-20 min auf Eis zentrifugiert (30 min, 4 °C, 35300g). Währenddessen wurden die Qiatip-tip 500 Säule mit 10 ml Puffer QBT equilibriert. Nachfolgend wurde der Überstand auf die Ionenaustauscher-Säule gegeben und durchlaufen gelassen. Die Säule wurde dann zweimal mit jeweils 30 ml Waschpuffer QC gewaschen. Anschließend wurde die DNA mittels Elutionspuffer QF von der Säule eluiert, das Eluat mit 10,5 ml Isopropanol vermischt und für 30 min bei -80 °C aufbewahrt. Das DNA-Pellet fiel nach einer Zentrifugation (30 min, 4 °C, 4370g) aus. Es wurde mit 10 ml Ethanol 70% gewaschen und nochmals 10 min zentrifugiert. Der Ethanol wurde entfernt, das DNA-Pellet getrocknet und in H<sub>2</sub>O gelöst. Mittels Spektrophotometer wurde die DNA-Konzentration bestimmt und auf 1 µg/µl eingestellt.

#### Equilibrierungspuffer QBT

NaCl	750 mM
MOPS (pH 7,0)	50 mM
Isopropanol	15% (v/v)
Triton X-100 (v/v)	0,15%

#### Waschpuffer QC

NaCl	1,0 M
MOPS (pH 7,0)	50 mM
Isopropanol	15% (v/v)

#### Elutionspuffer QF

NaCl	1,25 M
Tris (pH 8,5)	50 mM
Isopropanol	15% (v/v)

### **2.1.10 Sequenzierung**

Wurden DNA-Fragmente mittels PCR amplifiziert oder mutiert, so wurde das resultierende Plasmid zur Überprüfung der Korrektheit zur Sequenzierung eingeschickt. Wurde ein DNA-Fragment durch enzymatischen Verdau von einem Vektor in einen anderen Vektor eingebracht, so wurde die Anwesenheit des neuen DNA-Fragments bzw. zusätzlich die Abwesenheit des entfernten DNA-Fragments durch weitere enzymatische Verdaue mittels geeigneter Enzyme bestätigt.

## 2.2 Zellbiologische Methoden/Zellkultur

Allgemeines:

Alle Arbeiten mit Zellen wurden mit sterilen Arbeitsgeräten und sterilen Medien unter einer Sterilwerkbank im Zellkulturlabor durchgeführt.

### 2.2.1 Permanente Zellkultur: HEK-Zellen

#### 2.2.1.1 Auftauen von Zellen

Um in flüssigem Stickstoff oder bei  $-80\text{ °C}$  eingefrorene Zellen wieder in Kultur zu nehmen, werden diese möglichst schnell im Wasserbad bei  $37\text{ °C}$  aufgetaut und in ein Falcon-Röhrchen mit 10 ml DMEM-Komplett-Medium überführt. Nach der Zentrifugation (3 min, 250g) wird der Überstand abgesaugt, das Zellpellet in 5 ml DMEM-Komplett-Medium vorsichtig resuspendiert und in ein entsprechendes Zellkulturgefäß überführt.

#### DMEM-Komplett-Medium für HEK-Zellen („human embryonic kidney cells“)

DMEM (mit 4,5% Glucose)	89%
FCS	9%
L-Glutamin	1%
Penicillin/Streptomycin	1%

#### 2.2.1.2 Kultur von Zellen

HEK 293- und HEK 293T-Zellen wurden bei 7%  $\text{CO}_2$  und  $37\text{ °C}$  in DMEM-Komplett-Medium kultiviert. Zum Passagieren der Zellen wurde das Medium abgesaugt, die Zellen zweimal mit DPBS-Puffer gewaschen und mittels Trypsin-EDTA-Lösung von der Zellkulturschale gelöst. Nach Zugabe eines Überschusses Komplett-Mediums wurden die Zellen (250g, 3 min) zentrifugiert und der Überstand abgesaugt. Das Zellpellet wurde in Medium resuspendiert und je nach Teilungsverhältnis und Konfluidität wurde ein entsprechendes Teilvolumen in ein neues Zellkulturgefäß mit

Medium gegeben. Das Passagieren erfolgte im Ein- bis Dreitagerrhythmus und das Teilungsverhältnis lag dementsprechend zwischen 1:2 und 1:20.

### 2.2.1.3 Einfrieren von Zellen

Um Zellen für Jahre aufbewahren zu können, wurden sie wie oben beschrieben von der Kulturschale abgelöst, zentrifugiert und der Überstand abgesaugt. Das Zell-Pellet wurde in eiskaltem Einfriermedium resuspendiert (1 ml bei 10 cm Platte) und die Zellsuspension in ein gekühltes Kryoröhrchen gefüllt. Dieses wurde zunächst für einige Stunden bei -20 °C eingefroren und dann entweder für die Kurzzeitlagerung in -80 °C oder für die längerfristige Lagerung in flüssigen Stickstoff überführt.

#### Einfriermedium

DMEM (mit 4,5% Glucose)	70%
FCS	20%
DMSO	10%

### 2.2.1.4 Transiente Transfektion von Zellen

Allgemein:

Bei der transienten Transfektion wird die eingebrachte DNA in den Zellkern eingeschleust, aber nicht ins Chromosom integriert und geht somit bei der Mitose wieder verloren.

#### Transfektion mit Polyethylenimin (PEI)

PEI ist ein kationisches Polymer, das mit DNA Komplexe bilden kann. Diese PEI-DNA-Komplexe können an Zelloberflächen-Reste binden und in die Zelle durch Endozytose aufgenommen werden. Die Endosomen entlassen die PEI-DNA-Komplexe ins Zytoplasma, woraufhin die DNA zum Nukleus gelangen kann<sup>129</sup>.

Am Vortag der Transfektion wurden die Zellen entweder auf 10 cm Platten oder 6-Loch-Platten gesplittet, so dass entweder die Zellen am Tag der Transfektion ca. 50% konfluent waren oder es wurde eine bestimmte Zellzahl ausgesät. Als Medium wurde

DMEM-Medium mit 10% FCS verwendet, da das Medium zum Zeitpunkt der Transfektion keine Antibiotika enthalten darf. Am darauf folgenden Tag wurde folgender Transfektionsansatz, je nach Zellkulturschalengröße, angesetzt:

6-Loch-Platte (pro Loch)      10 cm Platte

2 µg	10 µg	DNA
200 µl	1 ml	DMEM-Medium (ohne Zusätze)
2 µg	10 µg	PEI (1 µg/µl in sterilem Wasser)

Der Ansatz wurde gut vermischt, 30 min bei RT stehen gelassen und anschließend auf die Zellen gegeben. Nach 5-12 h bei 37 °C und 7% CO<sub>2</sub> wurde auf Komplett-Medium gewechselt oder die Zellen auf Deckgläschen verteilt (Komplett-Medium). Sollte weniger DNA transfiziert werden, wurde mit Leervektor auf die entsprechende DNA-Menge aufgefüllt. Die transfizierten Zellen wurden 20-48 h nach Transfektion für Experimente verwendet.

Transfektion mit Effectene®

Effectene® ist eine nicht-liposomale Lipid-Formulierung, die zusammen mit „Enhancer“ und DNA-Kondensations-Puffer (EC-Puffer) verwendet wird. Im ersten Schritt wird die DNA mittels Interaktion mit dem „Enhancer“ in einem definiertem Puffersystem kondensiert. Bei der Zugabe von Effectene® entstehen kondensierte Effectene-DNA-Komplexe, die von den Zellen aufgenommen werden.

Die Zellen wurden 24 h vor der Transfektion entweder auf 10 cm Platten oder 6-Loch-Platten gesplittet, so dass entweder die Zellen am Tag der Transfektion ca. 30% konfluent waren oder es wurde eine bestimmte Zellzahl ausgesät. Je nach Zellkulturschalengröße wurde folgende Transfektionslösung angesetzt:

6-Loch-Platte (pro Loch)      10 cm Platte

0,5 µg	3 µg	DNA
100 µl	600 µl	EC-Puffer
4 µl	24 µl	„Enhancer“

Dieser Ansatz wurde gut gemischt und 2-5 min bei RT inkubiert. Dann wurden

10 µl	30 µl	Effectene®
-------	-------	------------

zugegeben, 10 s gemischt und 5-10 min bei RT stehen gelassen. Zu diesem Ansatz wurden 600 µl Komplett-Medium gegeben, gut gemischt und diese Transfektionslösung auf die Zellen getropft. Nach 24 h bei 37 °C und 7% CO<sub>2</sub> wurde das Medium gewechselt oder die Zellen auf Deckgläschen gesplittet. Sollte weniger DNA transfiziert werden, wurde mit Leervektor auf die entsprechende DNA-Menge aufgefüllt. Die transfizierten Zellen wurden 48 h nach Transfektion für Experimente verwendet

### **2.2.1.5 Zellzahlbestimmung mittels Neubauer-Zählkammer**

Die Neubauer-Zählkammer wird zur Zählung aller Arten von Teilchen verwendet, besonders aber zur Zählung von Zellen. Die auszuzählende Zellsuspension wird seitlich auf die mit einem Deckgläschen versehene Zählkammer pipettiert (ca. 20 µl). Die Suspension wird durch die Kapillarkräfte in den Raum mit definierter Höhe (0,1 mm) zwischen der vertieften Mittelfläche und dem Deckgläschen gesaugt. In diese Mittelfläche ist ein Liniennetz (Zählfläche) bestehend aus 3 x 3 Großquadraten von je 1 mm Kantenlänge eingraviert. Vier der neun Großquadrate sind jeweils in 16 Unterquadrate mit 0,25 mm Kantenlänge unterteilt. Die Anzahl der Zellen in diesen vier Großquadraten wurde unter dem Lichtmikroskop ausgezählt, gemittelt und mit einem Kammer-spezifischen Faktor (10000) multipliziert, um die Anzahl der Zellen pro ml Zellsuspension zu erhalten.

### **2.2.1.6 Passagieren von Zellen auf Deckgläschen**

Die Zellen wurden wie oben beschrieben von der Kulturschale abgelöst, zentrifugiert und in Medium resuspendiert. In der Zwischenzeit wurden autoklavierte Deckgläschen mit ca. 500 µl Poly-D-lysin (0,1 mg/ml) pro Deckgläschen in einer 6-Loch-Platte für ca. 10 min beschichtet. Danach wurde das Poly-D-lysin abgenommen und die Deckgläschen zweimal mit DPBS-Puffer gewaschen. Danach wurde ein definiertes Volumen der Zellsuspension auf die beschichteten Deckgläschen verteilt und die Zellen anwachsen gelassen.

## 2.2.2 Primäre Zellkultur: Isolierung und Transfektion von NRCM

### Isolierung von NRCM

Die Isolierung von neonatalen Rattenkardiomyozyten (NRCM) erfolgte aus Herzen neugeborener Sprague-Dawley-Ratten. Nach Entnahme der Herzen wurden die Vorhöfe entfernt, das Ventrikelgewebe in kleine Stücke geschnitten und mittels DNase-haltiger Trypsin-Lösung repetitiv verdaut. Der Zusatz von DNase dient bei der Trypsinierung von Geweben zur Minimierung der Einzelzell-Aggregation durch freigesetzte DNA. Nach vollständigem Verdau der Gewebestücke wurde durch Zugabe von FCS Trypsin und DNase inaktiviert. Die Zellsuspension wurde zentrifugiert (700g, 10 min) und das Pellet anschließend in MEM-Medium mit 5% FCS und 1% Penicillin/Streptomycin resuspendiert. Um die Kardiomyozyten von Endothelzellen, kardialen Fibroblasten und glatten Muskelzellen abzutrennen, wurde die Zellsuspension für 1 h bei 37 °C in unbeschichteten Kulturschalen inkubiert. Während dieser Zeit heften sich alle anderen Zellarten an der Kulturschale an, während die Kardiomyozyten weiterhin im Medium schwimmen. Der NRCM-enthaltende Überstand wurde abgenommen und die Zellzahl einer entnommenen Probe nach Zugabe einer 4% Trypanblau-Lösung (1:1) bestimmt. Die Zugabe von Trypanblau dient zur Erkennung der toten Zellen, welche blau gefärbt werden und so nicht mitgezählt werden. Danach wurden die NRCM bei 1% CO<sub>2</sub> und 37 °C in NRCM-Medium mit 1% FCS und 0,1 mM BrdU, einem Fibroblastenwachstumsinhibitor, kultiviert.

#### Trypsin-Lösung

Trypsin	300 mg
DNase	2 ml
	(Stammlösung: 10 mg/5 ml 0,15M NaCl)
Penicillin/Streptomycin	1% (v/v)
CBFHH-Medium	ad 200 ml

#### CBFHH-Medium

NaCl	137 mM
KCl	5,36 mM
MgSO <sub>4</sub> · 7 H <sub>2</sub> O	0,81 mM
Dextrose	5,55 mM
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0,44 mM
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> · 7 H <sub>2</sub> O	0,34 mM
Hepes pH 7,3	20,06 mM



NRCM-Medium für neonatale Rattenkardiomyocyten (pH 7,3), steril gefiltert

MEM (Eagle)	10,8 g
Vitamin B 12	2 mg
NaHCO <sub>3</sub>	350 mg
H <sub>2</sub> O	ad 1 l

Transfektion von NRCM mittels Lipofectamine 2000®

Lipofectamine 2000® ist eine kationische Lipid-Formulierung. Die zu transfizierende, negativ geladene Plasmid-DNA wird an der Oberfläche der kationischen Lipidvesikel komplexiert. Diese Komplexe werden dann von den Zellen aufgenommen.

Einen Tag nach Isolation der NRCM wurden diese mit Lipofectamine 2000® transfiziert. Hierfür wurde folgender Transfektionsansatz gemacht:

6-Loch-Platte (pro Vertiefung)

- a) 4 µg DNA + 250 µl OptiMEM
- b) 10 µl Lipofectamine 2000® + 250 µl OptiMEM

Beide Ansätze wurden 5 min bei RT inkubiert. Dann wurden Ansatz a) und b) vereinigt und 20 min bei RT inkubiert. Zwischenzeitlich wurde das Medium gewechselt und 1,5 ml neues NRCM-Medium mit 5% FCS auf die NRCM gegeben. Der Transfektionsansatz wurde hinzu pipettiert und 4-6 h bei 1% CO<sub>2</sub> und 37 °C inkubiert. Anschließend erfolgte ein Mediumwechsel (NRCM-Medium mit 5% FCS, 1% Penicillin/Streptomycin und 0,1 mM BrdU). Nun folgte ein täglicher Mediumwechsel (NRCM-Medium mit 1% FCS, 1% Penicillin/Streptomycin und 0,1 mM BrdU). Die transfizierten Zellen wurden 48-96 h nach Transfektion für FRAP-Messungen verwendet.

**2.3 Proteinbiochemische Methoden****2.3.1 SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese**

Die SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE) ist ein Verfahren, um Proteingemische im elektrischen Feld aufzutrennen. Das anionische Tensid

Natriumdodecylsulfat (SDS) besitzt eine negative Ladung und überdeckt durch Komplexbildung die Eigenladungen von Proteinen. Ungefähr 1,4 g SDS werden pro g Protein gebunden, sodass die Proteine ein etwa konstantes Ladungs- zu Masseverhältnis aufweisen und einzig nach der Größe aufgetrennt werden.

Bevor Proteine mittels SDS-PAGE aufgetrennt werden können, muß eine Proteinaufbereitung stattfinden. Hierzu wurden die Zellen (transfiziert oder untransfiziert) mit eiskaltem CMF-PBS zweimal gewaschen, eine entsprechende Menge Lysepuffer hinzugegeben und 10 min bei 4 °C lysiert. Zur Denaturierung der Proteine wurde das Zelllysate mit vierfach konzentriertem Lämmli-Puffer versetzt. Es wurde zum einen reduzierender Lämmli-Puffer (Roti-Load 1), um Disulfidbrücken zu spalten, und zum anderen auch nicht-reduzierender Lämmli-Puffer (Roti-Load 2), um Disulfidbrücken zu bewahren, verwendet. Die Lysate wurden dann einer kurzen Ultraschallbehandlung (10 s) unterzogen, 5 min bei 95 °C inkubiert und für 10 min bei 8600g zentrifugiert.

Die Proben und ein Molekulargewichtsmarker wurden auf ein Polyacrylamid-Gel geladen, im Sammelgel konzentriert und in einem 8% Polyacrylamid-Gel bei einer konstanten Stromstärke von 70 mA in einem SDS-haltigem Lauf-Puffer aufgetrennt.

	<u>Polyacrylamid-Trenngel 8%</u>	<u>Polyacrylamid-Sammelgel</u>
H <sub>2</sub> O	7,25 ml	3,75 ml
Aa/Bis (Rotiphorese 30)	4 ml	0,75 ml
Puffer	3,75 ml	1,5 ml
Temed	7,5 µl	6 µl
APS 10%	<u>97,5 µl</u>	<u>60 µl</u>
	15 ml	6 ml

	<u>Trenngel-Puffer</u>	<u>Sammelgel-Puffer (pH 6,8)</u>
SDS	4 g	2 g
Tris (3 M, pH 8,8)	500 ml (3M, pH 8,8)	250 ml (1M)
H <sub>2</sub> O	ad 1000 ml	ad 500 ml

Ammoniumperoxodisulfat 10% (APS 10%)

APS	10 g
H <sub>2</sub> O	100 ml

Laufpuffer (pH 8,3), 10-fach konzentriert

Tris	250 mM
Glycin	1,92 M
SDS	1%

Lysepuffer

NaCl	150 mM
NP-40	1%
Natriumdesoxycholat	0,5%
SDS	0,1%
Tris (pH 8,0)	50 mM
Trypsininhibitor	0,001%
Benzamidinhydrochlorid	0,192 mM
Phenylmethylsulfonylfluorid (PMSF)	1 mM
Iodoacetamid	20 mM
Dithiothreitol (DTT, reduzierend)	1 mM

**2.3.2 Western Blot**

Beim Western Blot werden Proteine mittels eines senkrecht zur Ebene des Polyacrylamid-Gels gerichteten elektrischen Feld auf eine Trägermembran übertragen. Die negativ geladenen Proteine wandern in Richtung Anode. Aufgrund hydrophober Wechselwirkungen bleiben die Proteine an der Membranoberfläche hängen und sind so z. B. für Antikörper zugänglich.

Für den elektrophoretischen Transfer wurde das Polyacrylamid-Gel auf eine kurz mit Methanol vorbehandelte Polyvinylidendifluorid (PVDF)-Membran gelegt und beides zwischen jeweils zwei Lagen Blotting-Papier eingebettet. Bei einer Spannung von 100 Volt wurden die Proteine 1,25 h in Gegenwart von Transfer-Puffer im sog. „Wet-Blot“ Verfahren vom Gel auf die PVDF-Membran transferiert. Um freie Bindungsstellen der Membran zu blockieren und somit ein unspezifisches Binden der Nachweisreagenzien zu verhindern, wurde die PVDF-Membran über Nacht bei 4 °C in Block-Milch gelegt.

Transfer-Puffer

Tris	20 mM
Glycin	150 mM
Methanol	20%
H <sub>2</sub> O	ad 1000 ml

Block-Milch

Magermilchpulver	5%
NaCl	100 mM
Tris (1 mM, pH 7,4)	1%
Tween 20	0,1%

**2.3.3 Immunochemische Detektion**

Die Proteinbanden können nun mittels Antikörper auf der Membran detektiert werden. Hierzu wurde die Membran für ca. 2 h bei RT mit einem Primärantikörper (Verdünnung

meist 1:1000 in Block-Milch), der spezifisch gegen das zu detektierende Protein gerichtet ist, inkubiert. Der Antikörper wurde entfernt und die Membran für 1 h mit PBS + 0,05% Tween 20 gewaschen (Waschpuffer dabei 5 mal wechseln), um unspezifisch gebundene Antikörper zu entfernen. Dann wurde die Membran für 1 h bei RT mit einem Sekundärantikörper (Verdünnung 1:10000 in Block-Milch) behandelt. Die Sekundärantikörper binden spezifisch an die Fc-Region des Primärantikörpers. An einen Primärantikörper können mehrere Sekundärantikörper binden, was zu einer Signalamplifikation führt. Um den Antigen-Antikörper-Komplex sichtbar zu machen, kann man z. B. an Meerrettichperoxidase (HRP)-gekoppelte Sekundärantikörper verwenden. Nach einem weiteren Wasch-Schritt für 1 h mit PBS + 0,05% Tween 20 (Waschpuffer mehrmals wechseln) erfolgte die Detektion mittels „enhanced Chemolumineszenz“ (ECL). Hierfür wurde die Membran ca. 5 min in der Dunkelkammer in eine Chemolumineszenzlösung bestehend aus Luminol und H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> gelegt. Die Meerrettichperoxidase katalysiert die Oxidation von Luminol. Durch die dabei entstehende Chemolumineszenz wurde ein Film belichtet. Die Belichtungsdauer ist von der Stärke der Lumineszenz abhängig. Der belichtete Film wurde mittels Entwickler- und Fixierer-Lösung in der Dunkelkammer entwickelt. Durch schwarz gefärbte Banden wird die Lage der detektierten Proteine angezeigt.

#### Chemolumineszenzlösung

##### Lösung 1:

H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> (konz.)	7,5 µl
Tris (100 mM, pH 8,3)	12,5 ml

##### Lösung 2:

Cumarsäure (90 mM in DMSO)	55 µl
Luminol (250 mM in DMSO)	125 µl
Tris (100 mM, pH 8,3)	12,5 ml

Lösung 1 und Lösung 2 unmittelbar vor der ECL-Detektion mischen.

### **2.3.4 Strippen von PVDF-Membranen**

Die an die Proteinbanden gebundenen Antikörper können mittels eines „Stripping-Puffers“ wieder abgelöst werden (Behandlungsdauer 1 h). So kann die Membran erneut nach Behandlung mit Block-Milch z. B. mit Antikörpern gegen ein weiteres Epitop inkubiert werden.

„Stripping-Puffer“ (pH 2,5)

Glycin	100 mM
SDS	0,1%

**2.3.5 Proteinquantifizierung nach Bradford**

Die Bestimmung von Proteinkonzentrationen erfolgte photometrisch mittels Biorad-Proteinassay nach der Methode von Bradford. Diese Methode basiert darauf, dass bei Bindung von Proteinen an den Farbstoff Coomassie Brilliant Blau G-250 sein Absorptionsmaximum in saurer Lösung von 465 nm nach 595 nm verschoben wird. Anhand einer Eichgeraden mit BSA-Standardlösungen konnten die Proteinkonzentrationen bestimmt werden. Die Durchführung erfolgte nach Herstellerangaben.

**2.3.6 Membranpräparation für Cyclase-Assays**

Von den konfluent gewachsenen Zellen wird das Medium entfernt und zweimal mit eiskaltem CMF-PBS Puffer gewaschen. Nach Zugabe von 5/2 Puffer (Lysepuffer) wurden die Zellen von den Zellkulturschalen geschabt. Mittels Ultraturrax wurden die Zellen weiter zerkleinert. Dann erfolgte eine Zentrifugation bei 75000g und 4 °C für 25 min. Der Überstand wurde verworfen, das Zellmembran-Pellet in 50 mM Tris resuspendiert und homogenisiert. Alle Schritte wurden entweder bei 4 °C oder auf Eis durchgeführt.

CMF-PBS Puffer (pH 7,4), 10-fach konzentriert

NaCl	1,37 M
KCl	26,82 mM
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> · 7 H <sub>2</sub> O	80,89 mM
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	14,70 mM

5/2 Puffer (Lysepuffer, pH 7,4)

Tris	5 mM
EDTA · 2 Na · 2 H <sub>2</sub> O	2 mM

### 2.3.7 Radioligandenbindung

Die Messung des Ausmaßes der Bindung eines Radioliganden liefert Informationen über die Anzahl der Bindungsstellen und deren Affinität und Zugänglichkeit für verschiedene Substanzen. Neben der spezifischen Bindung des Radioliganden z. B.  $^{125}\text{I}$ -Cyanopindolol an  $\beta$ -adrenerge Rezeptoren, kann er auch an andere Stellen oder Rezeptoren binden. Dieses Phänomen nennt man unspezifische Bindung. Subtrahiert man die unspezifische Bindung von der im Experiment gemessenen totalen Bindung, ergibt sich die spezifische Bindung. Die spezifische Bindung wurde in fmol Rezeptor pro  $\mu\text{g}$  Protein ausgedrückt.

Untransfizierte oder transfizierte HEK 293- oder HEK 293T-Zellen wurden mittels BRET-Puffer vorsichtig abgelöst, 1 min bei 420g zentrifugiert und in 50 mM Tris-Puffer pH 7,4 resuspendiert. Der Proteingehalt (totales Protein) wurde photometrisch nach Bradford bestimmt.

Ansatz:

50  $\mu\text{l}$  Tris 50 mM (totale Bindung)/Alprenolol 400  $\mu\text{M}$  (unspezifische Bindung)  
50  $\mu\text{l}$  GTP 400  $\mu\text{M}$   
50  $\mu\text{l}$  Zellsuspension (0,1-2  $\mu\text{g}$  Protein)  
50  $\mu\text{l}$   $^{125}\text{I}$ -Cyanopindolol (35-80 pM)  
200  $\mu\text{l}$

Der Ansatz wurde 90 min bei 30 °C inkubiert. Danach wurde die Reaktion durch Filtration über Glasfaserfilter mittels einer semiautomatischen Absaugvorrichtung gestoppt. Mit eiskaltem Tris-Puffer 50 mM pH 7,4 wurde dreimal gewaschen. Die Proben wurden aus dem Glasfaserfilter gestantzt und mittels eines  $\gamma$ -Counters gezählt (1 min pro Probe). Pro Bedingung wurden Doppel- oder Dreifachwerte gemessen.

### 2.3.8 Reinigung von $\alpha$ - $^{32}\text{P}$ -ATP

Die Reinigung von  $\alpha$ - $^{32}\text{P}$ -ATP erfolgte mittels DOWEX, eines Ionenaustauschermaterials. Bevor das  $\alpha$ - $^{32}\text{P}$ -ATP auf die Säule pipettiert wurde, wurde das Säulenmaterial mit 5 ml Wasser gewaschen. Dann wurde zweimal mit je 5 ml HCl pH 1,5 (0,0316 N) und 150  $\mu\text{l}$  0,25 N HCl gespült. Die Elution erfolgte fraktioniert mit

dreimal 1 ml 0,25 N HCl. Zu jeder Fraktion wurden 1  $\mu$ l nicht-radioaktives ATP 10 mM pipettiert und mit Triethanolamin 50% ein pH  $\leq$  7 eingestellt. Die  $\alpha$ -<sup>32</sup>P-ATP Aliquots wurden bei -20 °C aufbewahrt.

### 2.3.9 Adenylylcyase-Assay

Die Adenylylcyase ist ein Enzym, welches Adenosintriphosphat (ATP) zu zyklischem Adenosinmonophosphat (cAMP) umsetzt. G-Protein-gekoppelte Rezeptoren können, abhängig davon, an welches G-Protein sie gekoppelt sind, die Adenylylcyase entweder inhibieren ( $G_i$ ) oder stimulieren ( $G_s$ ). Bei Stimulation eines  $G_s$ -gekoppelten Rezeptors durch einen Agonisten steigt durch Aktivierung der Adenylylcyase die cAMP-Konzentration an. Bei Vorhandensein von  $\alpha$ -<sup>32</sup>P-ATP entsteht somit je nach Ausmaß der Stimulation eine bestimmte Menge an  $\alpha$ -<sup>32</sup>P-cAMP, die gemessen werden kann. Dieser Assay kann u. a. dazu verwendet werden, um die Stimulierbarkeit von Rezeptor-Mutanten oder Rezeptor-Fusionskonstrukten zu untersuchen.

Ansatz (100  $\mu$ l):

- 10  $\mu$ l Substanz (Isoproterenol, in verschiedenen Konzentrationen) bzw. H<sub>2</sub>O (Basalwert)
- 40  $\mu$ l Membranprotein (75-150  $\mu$ g)
- 50  $\mu$ l REA-Mix (enthält  $\alpha$ -<sup>32</sup>P-ATP, ca. 200000 counts/Probe)

Nach gründlichem mischen wurden die Proben 20 min bei 37 °C inkubiert und zum Abstoppen der Reaktion auf Eis gestellt. Dann wurden 400  $\mu$ l 125 mM ZnAc und 500  $\mu$ l 144 mM Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> zugesetzt, gemischt und 10 min auf Eis inkubiert. Der sich bildende Zn<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>-Niederschlag kopräzipitiert gleichzeitig nicht umgesetztes  $\alpha$ -<sup>32</sup>P-ATP. Nach Abtrennen des Präzipitats (Zentrifugation 5 min bei 20800g) wurden 800  $\mu$ l Überstand auf Alumina (Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub>)-Säulen aufgetragen, die zuvor zweimal mit 5 ml 100 mM Tris pH 7,4 äquilibriert wurden. Die Elution erfolgte mit zweimal 2 ml 100 mM Tris pH 7,4. Das Eluat wurde in Zählröhrchen aufgefangen und für 5 min in einem  $\beta$ -Counter gezählt. Die Datenauswertung wurde mit der Software Origin 6.1 durchgeführt. Als Blindprobe wurden 50  $\mu$ l H<sub>2</sub>O und 50  $\mu$ l REA-Mix ebenso wie die zu untersuchenden Proben behandelt. Pro Bedingung wurden Doppel- oder Dreifachwerte gemessen.

REA-Mix

Tris (pH 7,4)	100 mM
cAMP	0,2 mM
BSA	0,4%
GTP	20 $\mu$ M
ATP	0,2 mM
MgCl <sub>2</sub> · 6 H <sub>2</sub> O	2 mM
RO-20-1724 (Phosphodiesterasehemmer)	1 mM
Phosphokreatin	0,59%
Creatinkinase	0,08%
$\alpha$ - <sup>32</sup> P-ATP	ca. 200000 counts/Probe

## 2.4 Biophysikalische Methoden

### 2.4.1 Biolumineszenz-Resonanz-Energie-Transfer (BRET)

Mittels BRET können wie unter I.5 erläutert, Protein-Protein-Interaktionen wie Di- oder Oligomerisierung von Rezeptoren in lebenden Zellen gemessen werden. Hierzu werden die potenziellen Interaktionspartner entsprechend an den Donor Rluc und an den Akzeptor YFP gekoppelt. Findet keine Interaktion zwischen den beiden Proteinen statt, d. h. sind Rluc und eYFP weiter als 100 Å voneinander entfernt, wird von Rluc Licht der Wellenlänge 480 nm abgegeben. Interagieren jedoch beide Proteine, findet der Energietransfer statt und eYFP strahlt Licht der Wellenlänge 530 nm ab.

Der Biolumineszenz-Resonanz-Energie-Transfer, auch BRET-Verhältnis genannt, ergibt sich aus folgender Formel:

$$\text{BRET} = (\text{Emission bei 530 nm} / \text{Emission bei 480 nm}) - \text{Cf}$$

wobei Cf dem Hintergrundsignal von Rezeptor-Rluc alleine exprimiert bei gleicher Rluc-Intensität entspricht ( $\text{Cf} = \text{Emission}_{\text{Rluc}} \text{ bei } 530 \text{ nm} / \text{Emission}_{\text{Rluc}} \text{ bei } 480 \text{ nm}$ ).

#### 2.4.1.1 BRET-Messungen

Die Zellen wurden 48 h nach Transfektion mit Effectene® oder PEI mittels BRET-Puffer nach zweimaligem Waschen von den 6-Loch-Zellkulturschalen abgelöst, 3 min bei 250g zentrifugiert und in 600  $\mu$ l BRET-Puffer resuspendiert. Die Zellzahl wurde mittels Neubauer-Zählkammer bestimmt. Pro Loch einer weißen 96-Loch-Platte wurden



100 µl der Zellsuspension eingesetzt, was einer Zellzahl von etwa 200000 Zellen pro Vertiefung entsprach. Eine Sekunde nachdem 100 µl Coelenterzin H (Endkonzentration 5 µM) pro Vertiefung hinzuinjiziert wurden, wurde die Lichtemission jeweils bei 480 nm und 530 nm mittels des LB 940 Mithras Gerätes 1 s lang gemessen. Von jedem Transfektionsansatz wurden Doppel- oder Dreifachwerte bestimmt. Die Messungen wurden bei Raumtemperatur durchgeführt.

#### BRET-Puffer

Glucose                    0,1%  
in DPBS-Puffer

### **2.4.1.2 Fluoreszenz- und Lumineszenzmessungen**

Da das BRET-Verhältnis abhängig ist von der relativen Expression von Donor und Akzeptor muß die Proteinexpression kontrolliert werden.

Die Zellen wurden abgelöst, gezählt und resuspendiert wie bei 2.4.1.1 beschrieben.

Für Fluoreszenzmessungen wurden je 100 µl (ca. 200000 Zellen) der Zellsuspension in eine schwarze 96-Loch-Platte pipettiert. Die totale Fluoreszenz wurde mittels Mithras LB 940 mit einem Exzitationsfilter von 485 nm und einem Emissionsfilter von 535 nm für 1 s bei einer Lampenenergie von 10000 gemessen.

Für Lumineszenzmessungen wurden die Zellen (100 µl Zellsuspension, ca. 200000 Zellen) in eine weiße 96-Loch-Platte gegeben und mit Coelenterazin H (100 µl, Endkonzentration 5 µM) inkubiert. Die totale Lumineszenz wurde 1 s nach Coelenterazin-Zugabe für 1 s bei 480 nm gemessen.

Für Fluoreszenz- und Lumineszenzmessungen wurden meist Mittelwerte aus Messungen von zwei oder drei Vertiefungen einer 96-Loch-Platte berechnet.

### **2.4.1.3 Verhältnis zwischen Rezeptorexpression und Fluoreszenz bzw. Lumineszenz**

HEK 293-Zellen wurden mit steigenden Mengen von entweder Rezeptor-Rluc oder Rezeptor-YFP in 6-Loch-Platten transfiziert wie unter 2.2.1.4 beschrieben. 48 h nach Transfektion wurden die Zellen abgelöst und ein Teil der Zellsuspension wurde für

Fluoreszenz- bzw. Lumineszenzmessungen verwendet wie unter 2.4.1.2 beschrieben. Der andere Teil der Zellsuspension wurde für 2 min bei 400g zentrifugiert und in 50 mM Tris-Puffer pH 7,4 resuspendiert. Die Bestimmung des Proteingehaltes und die Radioligandenbindung wurden wie oben beschrieben (2.3.5, 2.3.6) durchgeführt.

Da das Verhältnis zwischen Rezeptordichte ausgedrückt in fmol Rezeptor pro  $\mu\text{g}$  Protein und Fluoreszenz bzw. Lumineszenz für  $\beta_1$ - und  $\beta_2$ -AR Konstrukte vergleichbar war, wurden beide zusammen in ein Diagramm eingetragen. Die erhaltene Regressionsgerade wurde für die Umrechnung von Fluoreszenz oder Lumineszenz in Expressionslevel von Rezeptor-YFP oder Rezeptor-Rluc verwendet.

## **2.4.2 Fluorescence Recovery after Photobleaching (FRAP)**

Bei dieser Methode werden fluoreszierende Proteine in einer kleinen definierten Region der Zelle z. B. in der Zellmembran mit einem Laserstrahl hoher Intensität gebleicht und die Fluoreszenzwiederkehr der nicht-gebleichten fluoreszierenden Proteine in diese gebleichte Region in Abhängigkeit der Zeit beobachtet. Somit kann die Mobilität von Proteinen bestimmt werden. FRAP kann auch zur Bestimmung von Protein-Protein-Interaktionen genutzt werden. Neben Ein-Farben-FRAP, bei welchem nur ein Fluorophor gebleicht und dessen Fluoreszenzwiederkehr beobachtet wird, gibt es auch Zwei-Farben-FRAP. Bei diesen Experimenten werden beide Fluorophore gebleicht und die Fluoreszenzwiederkehr beider gemessen.

### **2.4.2.1 Antikörperbehandlung der Proben**

Transient transfizierte HEK 293T-Zellen oder neonatale Rattenkardiomyozyten auf Deckgläschen wurden dreimal mit BE-Puffer oder modifiziertem BE-Puffer gewaschen. Die Zellen wurden dann bei RT oder 37 °C für 30 min mit Antikörpern in einer 1:100 Verdünnung in BE-Puffer mit 2,5% BSA inkubiert. Die Antikörper waren entweder polyklonal (biotinylierter Ziegen-Antikörper gegen GFP) oder monoklonal (Maus-Antikörper gegen GFP) und gegen GFP und GFP-Varianten wie CFP und YFP gerichtet. Um gebundene monoklonale Antikörper zu vernetzen, wurde nachfolgend mit einem Ziegen-Antikörper gegen Maus IgG gerichtet, inkubiert. Falls nicht anders

angegeben, wurde der polyklonale Antikörper verwendet. Nach dieser Behandlung wurden die Zellen für die FRAP-Mikroskopie-Experimente verwendet.

	<u>BE-Puffer (pH 8,0)</u>	<u>BE-Puffer für Kardiomyozyten (pH 8,0)</u>
NaCl	150 mM	52,5 mM
HEPES	10 mM	10 mM
Glucose	12,8 mM	12,8 mM
KCl	2,5 mM	100 mM
MgCl <sub>2</sub>	0,5 mM	0,5 mM
CaCl <sub>2</sub>	0,5 mM	0,5 mM

#### 2.4.2.2 FRAP-Mikroskopie

Die FRAP-Experimente wurden mit dem FRAP-Wizard eines Leica TCS SP5 Laser Scanning Konfokalmikroskops bei 22 °C (falls nichts anderes angegeben) durchgeführt. Die auf Deckgläschen befindlichen lebenden Zellen waren mit BE-Puffer überschichtet. Zur Anregung von CFP und Cerulean wurde die 405 nm Laserlinie eines UV-Lasers verwendet und die Emission im Bereich von 461-488 nm detektiert. YFP wurde bei 514 nm angeregt (Linie eines Argon-Ionen Lasers) und die Emission zwischen 518-600 nm gemessen. Bei Ein-Farben-FRAP wird nur ein Fluorophor mittels des entsprechenden Lasers gebleicht und detektiert, bei Zwei-Farben-FRAP dagegen werden beide Fluorophore mittels der beiden entsprechenden Laserlinien gebleicht und detektiert. Durch die Verwendung der 405 nm Laserlinie für die Anregung von CFP und Cerulean wurde die direkte Anregung von YFP vermieden. Zum Bleichen der entsprechenden Fluorophore wurden dieselben Wellenlängen verwendet.

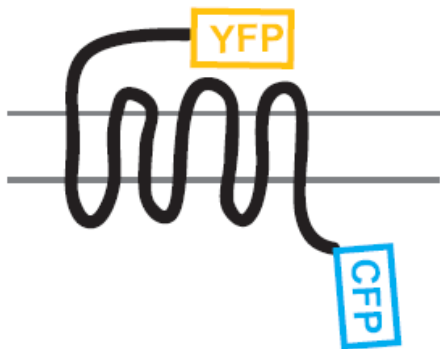
Die Messungen wurden mit dem 63x 1.4 Öl-Immersionsobjektiv bei einer Scangeschwindigkeit von 1000 Hz, 10-fach Zoom, Bildformat 256 x 256 und einem „Pinhole“ von 95,55 µm durchgeführt. Die gebleichte Region (ROI) in der Äquatorialebene der Zellmembran war 3 x 1 µm groß. Die Laserintensitäten für das Photobleichen wurden so gewählt, dass mit einem einzigen Bleich-Scan (Dauer 0,278 s) 50-75% der ursprünglichen Fluoreszenz verloren gingen. Für das „Imaging“ vor und nach dem Bleichen wurden niedrige Laserintensitäten gewählt. Das FRAP wurde für 80-270 s beobachtet. Alle Einstellungen wurden nicht verändert, nur die Laserintensitäten für das „Imaging“ und das Photobleichen variierten.

Standard-Bleichprotokoll:

	Prä-Bleichen	Bleichen	Post-Bleichen (Pb)1	Pb2	Pb3
Anzahl Bilder	5	1	3 / 5	5	18 / 20
Zeitl. Abstand [s]	5	0,278	0,278	1	5

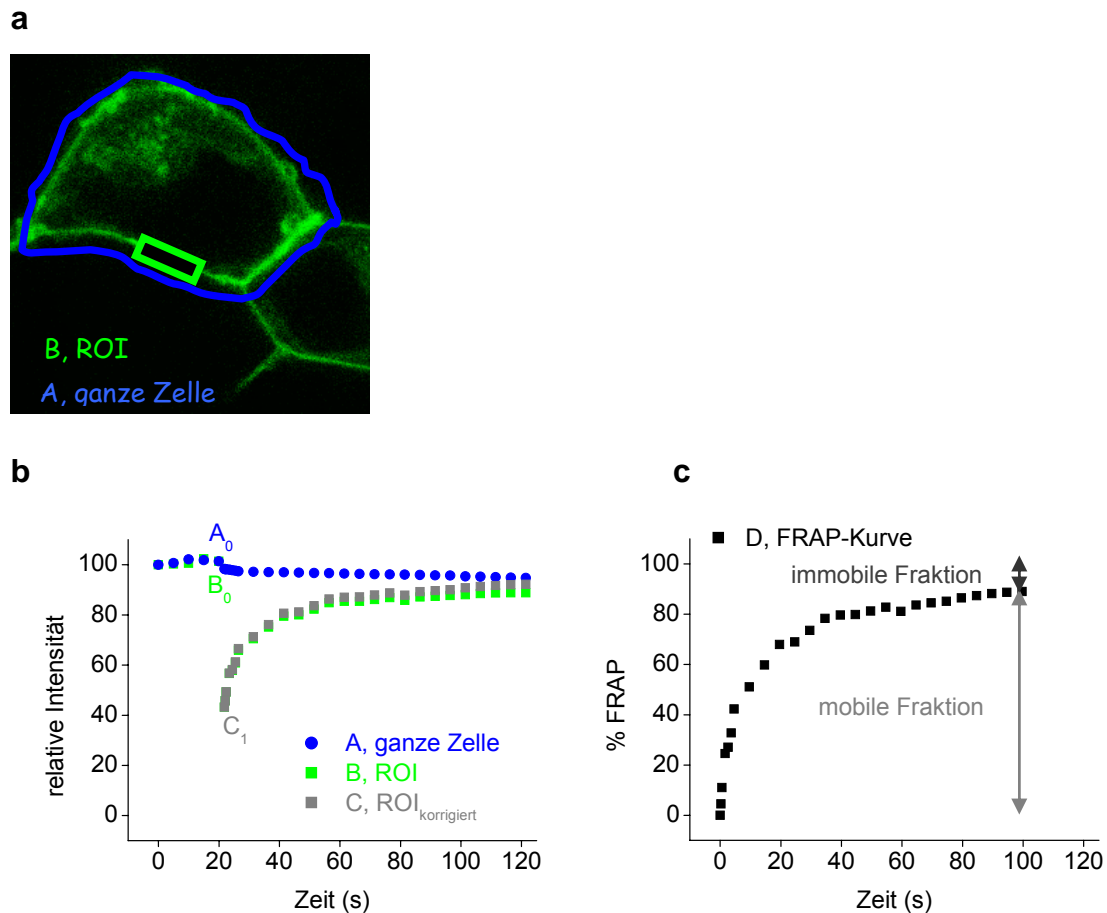
**2.4.2.3 Bestimmung des relativen Expressionsverhältnisses der Fluorophore**

Bei Zwei-Farben-FRAP-Experimenten, in denen das Verhältnis der relativen Expressionslevel der Fluorophore bestimmt werden sollte, wurden Bilder von CFP und YFP bei festgelegten Anregungs- und Emissionsparametern vor dem Bleichen aufgenommen. Alle anderen Parameter waren ebenfalls fixiert. Das CFP/YFP-Verhältnis in der gebleichten Region wurde mit dem von Kontrollzellen verglichen, die ein Referenzkonstrukt (Abb. 9) mit extrazellulärem YFP und intrazellulärem CFP in einem einzigen Polypeptid enthielten (YFP- $\beta_2$ -CFP). Somit konnte das relative CFP/YFP-Expressionsverhältnis bei einer 1:1 Stöchiometrie bestimmt werden und daraus relative Expressionsverhältnisse anderer Stöchiometrien berechnet werden.



**Abb. 9:** Referenzkonstrukt bestehend aus einem  $\beta_2$ -AR mit N-terminalem YFP und C-terminalem CFP

### 2.4.2.4 Analyse von FRAP-Experimenten



**Abb. 10: Analyse von FRAP-Experimenten**

(a) Konfokalbild einer transfizierten Zelle, um welche zur Auswertung ein ROI (blau) gelegt wurde. Außerdem ist das ROI, in dem die mit einem Fluorophor markierten Proteine gebleicht wurden, in grün dargestellt. (b) Die mittlere Fluoreszenzintensität in einer gebleichten Region wurde gegen die Zeit während eines FRAP-Experimentes aufgetragen (B). Der Datensatz der mittleren Fluoreszenzintensität der ganzen Zelle (A) wurden für die Korrektur des Datensatzes B für Schwankungen in der Laserintensität und Ausbleichen der Fluorophore während des Experimentes verwendet. Daraus ergibt sich Datensatz C. (c) Um die FRAP-Kurve D und die mobile bzw. immobile Fraktion zu erhalten, wurde der Datensatz C normalisiert.

Die bei den FRAP-Messungen erhaltenen Daten wurden mittels LAS AF-Software (Leica) in ein Excel-Arbeitsblatt exportiert.

Die Fluoreszenzwiederkehr in die gebleichte Region von Interesse (ROI) wurde als mittlere Fluoreszenzintensität gegen die Zeit dargestellt (Datensatz B, Abb. 10). Während der Messung kann die Laserintensität leicht schwanken. Außerdem können je nach Dauer der Messung, Anzahl der Datenpunkte und gewählter Laserintensität die Fluorophore während einer Messung ausbleichen. Um diese Variationen und das

Ausbleichen zu korrigieren, wurde ein weiteres ROI um die ganze Zelle gelegt, was den Datensatz A ergibt (Abb. 10). Die um diese oben genannten Faktoren korrigierte Kurve C wurde nach folgender Formel berechnet:  $C = (A_0/A) \cdot B$ , wobei  $A_0$  den letzten Datenpunkt des Datensatzes A vor dem Photobleichen darstellt.

Die normierte FRAP-Kurve D wurde mit der Formel  $D = ((B_0 - C_1) / (C - C_1)) \cdot 100$  berechnet. Dabei ist  $B_0$  der letzte Datenpunkt des Datensatzes B vor dem Photobleichen und  $C_1$  der erste Datenpunkt von C nach dem Photobleichen. Diese Berechnungen wurden mittels eines individuell konzipierten Excel-Arbeitsblattes durchgeführt.

#### **2.4.2.5 Korrektur des „Durchblutens“**

Bei Zwei-Farben-FRAP-Experimenten wurden die YFP-Fluoreszenzintensitäten für das „Durchbluten“ des CFP bzw. Cerulean in den YFP-Kanal korrigiert. Dies war nötig, da im „FRAP-Wizard“ die Detektion von CFP bzw. Cerulean und YFP simultan und nicht sequenziell stattfindet.

Hierzu wurde ein CFP-markiertes Protein gebleicht (Messbedingungen und Einstellungen wie unter 2.4.2.2 beschrieben) und dessen Wiederkehr sowohl im CFP-Kanal (20-30% Laserintensität) als auch im YFP-Kanal (0% Laserintensität) detektiert. Für jeden gemessenen Zeitpunkt wurde der Prozentsatz des „Durchblutens“ von CFP in den YFP-Kanal berechnet. Als mittleres „Durchbluten“ ergab sich ein Wert von 42,4% ( $n = 20$ ). Dieser Prozentsatz der CFP-Fluoreszenzintensität wurde von der YFP-Fluoreszenzintensität subtrahiert (sowohl für das gebleichte ROI als auch für das Kontroll-ROI um die ganze Zelle).

#### **2.4.2.6 Analyse von Zwei-Farben-FRAP-Experimenten, relatives FRAP**

Um den korrekten Anteil der interagierenden Proteine zu berechnen, mussten zwei unvollkommene experimentelle Situationen berücksichtigt werden:

Zum einen führte die Vernetzung extrazellulär-markierter Proteine zu einer geringen Verminderung der Mobilität nicht-interagierender intrazellulär-markierter Proteine verglichen zu der Mobilität dieser vor der Antikörper-induzierten Vernetzung (unspezifische Immobilisierung). Deshalb wurde jedes Experiment um die

entsprechende Fraktion korrigiert. Zum anderen wurde die Mobilität extrazellulär-markierter Proteine nicht komplett durch die Antikörperbehandlung eingeschränkt. Aus diesem Grunde wurde die FRAP-Kurve für direkt Antikörper-immobilisierte Proteine von der FRAP-Kurve der mobilen intrazellulär-markierten Proteine (korrigiert um die unspezifische Immobilisierung) subtrahiert.

Die FRAP-Kurven für das CFP-markierte und das YFP-markierte Protein (korrigiert um das „Durchbluten“) wurden, wie unter 2.4.2.4 beschrieben, berechnet.

Zur Ermittlung der unspezifischen Immobilisierung durch das Vernetzen extrazellulär YFP-markierter Proteine wurden folgende Kombinationen nicht miteinander interagierender Proteine verwendet: ARIIB-CFP + YFP-CD86, ARIIB-CFP + YFP-CD28, CD86-CFP + YFP- $\beta_1$ , CD86-CFP + YFP- $\beta_2$ . Dabei wurde ein Überschuss an extrazellulär YFP-markierten Proteinen exprimiert. Aus den letzten 3 Messpunkten jeder individuellen FRAP-Kurve wurde das mittlere FRAP berechnet. Aufgrund der Tatsache, dass die Kinetik der Wiederkehr dieser nicht-interagierenden Proteine und die der Proteine von Interesse verschieden sein könnte, verglichen wir nur das mittlere FRAP der letzten drei Messpunkte vor und nach Behandlung mit Antikörpern gegen YFP. Daraus ergaben sich die Korrekturfaktoren für die unspezifische Immobilisierung (Tab. 1).

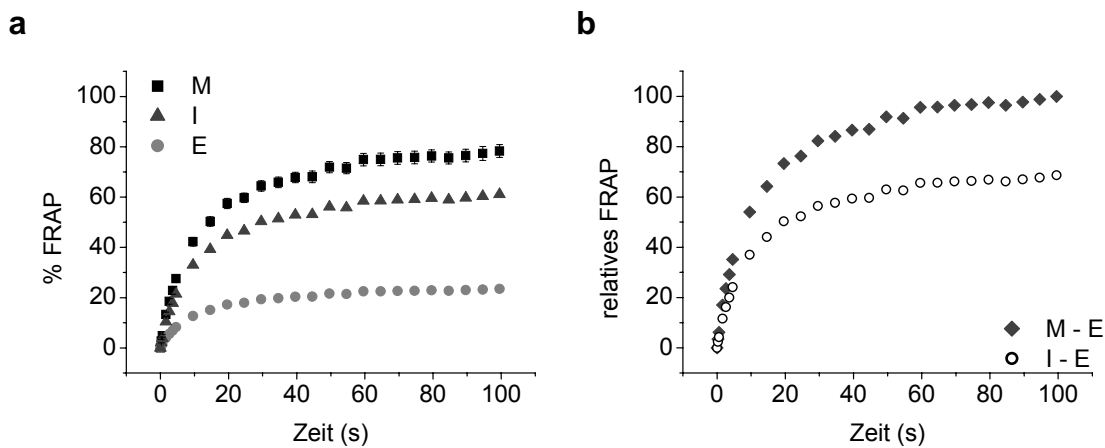
Oberflächenprotein	Unspezifische Immobilisierung
CD86	13%
CD28	13%
$\beta_1$ -AR	16%
$\beta_2$ -AR	18%

**Tab. 1: Korrekturfaktoren für die unspezifische Immobilisierung für die angegebenen Oberflächenproteine**

Um relative FRAP-Kurven zu erhalten, ist neben den FRAP-Kurven des intrazellulär (I) und des Antikörper-vernetzten extrazellulär (E) markierten Proteins, die coexprimiert wurden, eine weitere FRAP-Kurve nötig: die um den Faktor der entsprechenden unspezifischen Immobilisierung verminderte, mittlere FRAP-Kurve des entsprechenden alleine exprimierten intrazellulär-markierten Proteins (M) (Abb. 11). Die Differenz zwischen der mittleren FRAP-Kurve des intrazellulär-markierten Proteins alleine transfiziert und um die unspezifische Immobilisierung korrigiert (M) und der FRAP-Kurve immobilisierter extrazellulär-markierter Proteine (E) wurde berechnet. Hierzu

wurden mittels Origin 6.1 die Datenpunkte der FRAP-Kurven bei den entsprechenden Zeitpunkten subtrahiert und auf 100% normalisiert (M-E, Abb. 11). Die Differenz zwischen der Fluoreszenzwiederkehr der coexprimierten intrazellulär-markierten Rezeptoren (I) und der immobilisierten extrazellulär-markierten Rezeptoren (E) wurde ebenfalls bestimmt (Subtraktion der Datenpunkte der FRAP-Kurven bei entsprechenden Zeitpunkten). Diese Differenz wurde mit dem Normalisierungsfaktor der Kurve M-E multipliziert, was in der relativen FRAP-Kurve I-E resultierte.

Experimente, bei denen der extrazellulär-markierte Rezeptor nicht genügend durch die Behandlung mit Antikörper gegen YFP immobilisiert war (FRAP > 40%), wurden von der Datenanalyse ausgeschlossen.



**Abb. 11: Analyse von Zwei-Farben-FRAP-Experimenten, relatives FRAP**

(a) FRAP-Kurven (erhalten wie unter 2.4.2.4 beschrieben) von intrazellulär (I) und extrazellulär (E) markierten Rezeptoren, die coexprimiert und durch Antikörper gegen YFP immobilisiert wurden und mittlere FRAP-Kurve vom intrazellulär-markierten Rezeptor alleine exprimiert und um die unspezifische Immobilisierung vermindert (M). (b) Um relative FRAP-Kurven zu erhalten, wurde die Differenz zwischen M und E gebildet und normalisiert (M-E). Die Differenz zwischen I und E wurde ebenfalls berechnet und mit dem Normalisierungsfaktor von Kurve M-E multipliziert, was die relative FRAP-Kurve I-E ergibt.

#### 2.4.2.7 Fitten von FRAP-Kurven

Resultierende FRAP-Kurven oder relative FRAP-Kurven wurden gemittelt und als Mittelwert  $\pm$  S.E.M. von durchschnittlich 10-50 Experimenten dargestellt. Diese wurden am besten mittels einer doppelt-exponentiellen Gleichung mit dem Programm Origin 6.1 gefittet. Die angegebenen Fehler der mobilen und immobilen Fraktionen und der Zeitkonstanten sind Standardfehler der Parameter des Fits. Die Fraktion unterhalb der



Asymptote der FRAP-Kurve entspricht der mobilen Fraktion, der Anteil oberhalb der immobilen Fraktion.

#### 2.4.2.8 Theoretisches FRAP

Um die Übereinstimmung von experimentell ermittelten FRAP-Kurven mit der theoretischen Fluoreszenzwiederkehr abschätzen zu können, wurden theoretische FRAP-Kurven für ein Dimer bei verschiedenen relativen CFP/YFP Expressionsverhältnissen berechnet.

Die kinetischen Parameter der theoretischen FRAP-Kurven des Dimers basierten auf den experimentell bestimmten Wert individuell transfizierter CD28-Konstrukte. Das theoretische Ausmaß der Fluoreszenzwiederkehr des intrazellulären Fluorophors ( $TR_i$ ) wurde nach  $TR_i = [CFP]/([CFP]+[YFP])$  berechnet, wobei CFP und YFP die relative Expression der CFP- und YFP-markierten Proteine darstellt.

Zum Beispiel sind bei einem 1:1 Expressionsverhältnis von intrazellulär CFP-markiertem Protein und extrazellulär YFP-markiertem Protein 1/4 der Dimere YFP-YFP „Homodimere“, 1/4 CFP-CFP „Homodimere“ und 2/4 sind CFP-YFP „Heterodimere“. Da alle Dimer-Kombinationen mit einem extrazellulär YFP-markiertem Protein durch das Vernetzen mittels anti-YFP immobilisiert werden können, sind nur die CFP-CFP „Homodimere“ mobil, also 1/4 der Dimere. Da ein CFP-CFP „Homodimer“ zwei CFP enthält, resultieren 50% der CFP-Fluoreszenz von CFP-CFP „Homodimeren“ und 50% von CFP-YFP „Heterodimeren“. Das wiederum bedeutet, dass bei einem 1:1 Expressionsverhältnis von CFP zu YFP 50% des CFP mobil sind. Die oben erwähnte Formel ergibt ebenfalls  $TR_i = 1/(1+1) = 1/2$  und wurde für die Berechnung des theoretischen FRAP bei anderen relativen CFP/YFP-Expressionsverhältnissen eingesetzt.

### III. ERGEBNISSE

#### 1. Untersuchung der Di-/Oligomerisierung $\beta_1$ - und $\beta_2$ -adrenerger Rezeptoren mittels Biolumineszenz-Resonanz-Energie-Transfer (BRET)

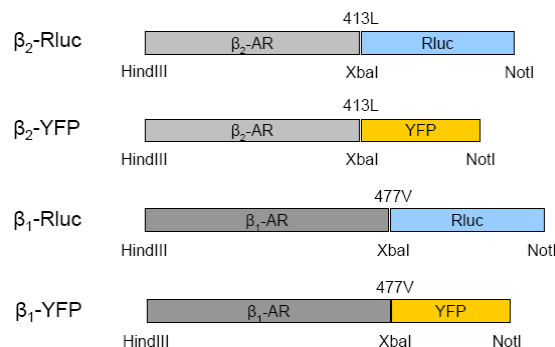
Da eine unabhängige, auf „Fluorescence Recovery after Photobleaching“ (FRAP)-basierende Methode zur Untersuchung von Rezeptor-Rezeptor-Interaktionen entwickelt werden sollte, wurde zunächst mit einer herkömmlichen Methode das gleiche Rezeptorsystem ( $\beta$ -AR) untersucht, um eine Vergleichsgrundlage zu schaffen. Mittels Biolumineszenz-Resonanz-Energie-Transfer (BRET) wurde geprüft, ob eine Homo- bzw. Heterointeraktion zwischen  $\beta_1$ - und  $\beta_2$ -AR feststellbar ist. Die BRET-Methode wurde gewählt, da diese bereits in verschiedenen Arbeitsgruppen zur Untersuchung von  $\beta$ -AR-Interaktionen herangezogen wurde<sup>37,40,49,70</sup>.

##### 1.1 Klonierung, Expression und Funktionalität der $\beta_1$ - und $\beta_2$ -AR BRET-Fusionsproteine

Um Interaktionen zwischen  $\beta_1$ - bzw.  $\beta_2$ -adrenergen Rezeptoren mittels BRET untersuchen zu können, wurden zunächst entsprechende Fusionsproteine bestehend aus  $\beta$ -AR und Renilla Luciferase (Rluc) bzw. „yellow fluorescent protein“ (YFP) generiert. An den C-Terminus von  $\beta_1$ - oder  $\beta_2$ -AR wurde über einen Aminosäure-Linker (Serin-Arginin) entweder Rluc oder YFP fusioniert (Abb. 12). Dies ergab folgende BRET-Fusionsrezeptoren:  $\beta_1$ -Rluc,  $\beta_1$ -YFP,  $\beta_2$ -Rluc und  $\beta_2$ -YFP.

Durch das Fusionieren mittelgroßer Proteine (YFP: 238 AS, ca. 26 kDa; Rluc: 311 AS, ca. 35 kDa) an  $\beta$ -adrenerge Rezeptoren ( $\beta_1$ -AR: 477 AS, ca. 53 kDa;  $\beta_2$ -AR: 413 AS, ca. 46 kDa) könnten diese in ihrer Expression und Funktionalität verändert werden. Deshalb wurden die Rezeptorfusionsproteine zunächst hinsichtlich ihrer Expression und ihrer Funktionalität mit den entsprechenden  $\beta_1$ -AR- bzw.  $\beta_2$ -AR-Wildtyp-Rezeptoren ( $\beta_1$ -WT,  $\beta_2$ -WT) verglichen.

Die Expression der  $\beta$ -AR-Fusionsproteine wurde durch das Ausmaß der Bindung des unselektiven Radioliganden <sup>125</sup>I-Cyanopindolol, welcher sowohl an  $\beta_1$ -AR als auch an  $\beta_2$ -AR als Antagonist wirkt, bestimmt.



**Abb. 12: Schematische Darstellung der β<sub>1</sub>- und β<sub>2</sub>-AR-BRET-Fusionskonstrukte**

Ausgangskonstrukt war β<sub>2</sub>-YFP, bei welchem YFP über einen kurzen Linker (2 Aminosäuren) direkt an den C-Terminus von β<sub>2</sub>-AR fusioniert wurde. Über die angegebenen Schnittstellen konnte YFP gegen Rluc ausgetauscht werden. Für die β<sub>1</sub>-AR-Fusionsproteine wurde mittels PCR eine XbaI-Schnittstelle direkt an den C-Terminus des β<sub>1</sub>-AR angefügt und β<sub>2</sub>-AR durch β<sub>1</sub>-AR im jeweiligen Fusionsprotein ersetzt.

Für β<sub>1</sub>-WT und β<sub>1</sub>-YFP war die Expression vergleichbar (Tab. 2), während β<sub>1</sub>-Rluc etwa halb so stark exprimiert wurde. Die Expressionslevel von β<sub>2</sub>-YFP waren etwas höher als von β<sub>2</sub>-Rluc und β<sub>2</sub>-WT. Auffallend war, dass die Expression von β<sub>1</sub>-AR-Konstrukten gegenüber der von β<sub>2</sub>-AR-Konstrukten vier- bis fünffach höher war. Die Menge der endogen in HEK 293-Zellen enthaltenen β<sub>2</sub>-AR war mit 0,02 fmol/μg Protein vernachlässigbar.

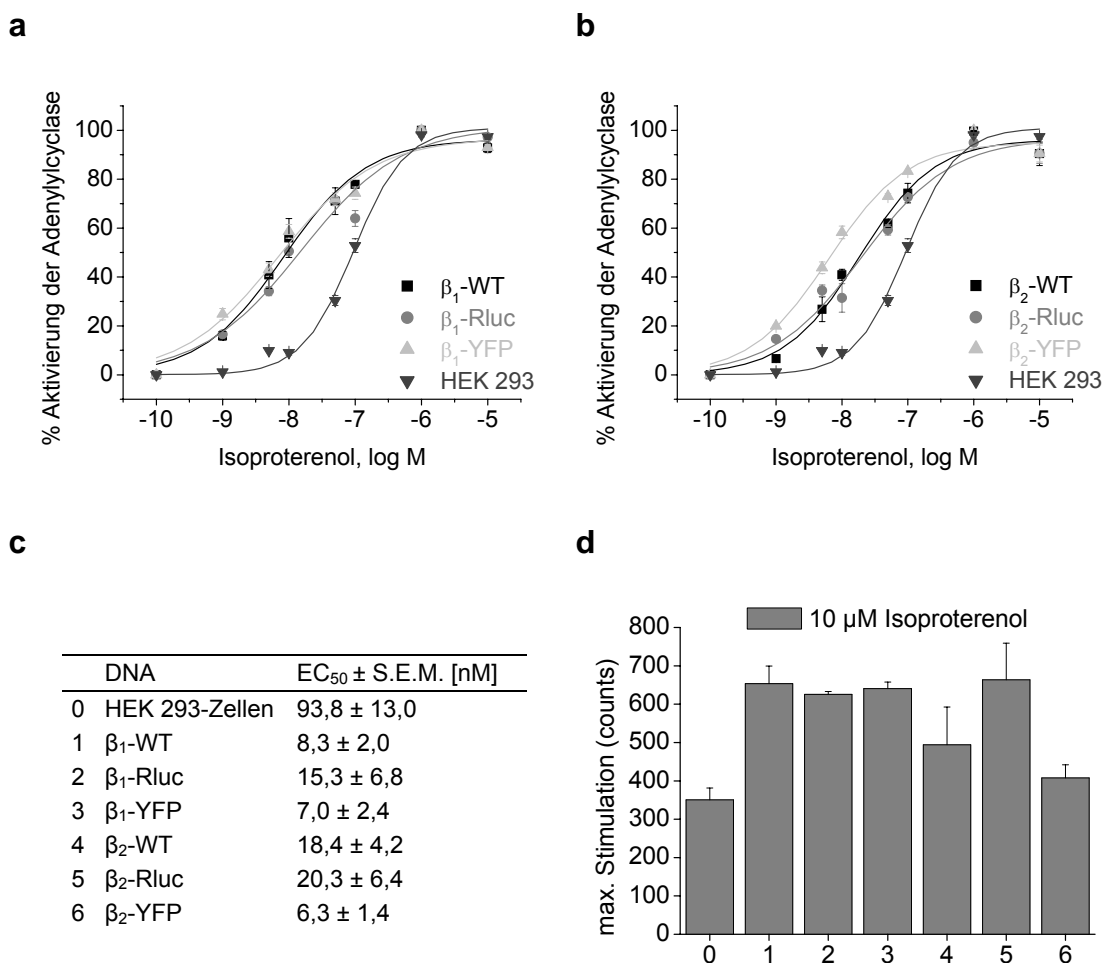
DNA	0,25 μg	0,5 μg
β <sub>1</sub> -Rluc	4,7 ± 0,4	5,2 ± 0,3
β <sub>1</sub> -YFP	8,7 ± 0,6	11,2 ± 1,6
β <sub>1</sub> -WT	9,2 ± 2,2	8,9 ± 1,3
β <sub>2</sub> -Rluc	1,0 ± 0,1	0,6 ± 0,2
β <sub>2</sub> -YFP	1,8 ± 0,3	2,3 ± 0,4
β <sub>2</sub> -WT	1,1 ± 0,3	1,3 ± 0,3
HEK 293 Zellen (endogener Rezeptor)	0,02 ± 0,004	

**Tab. 2: Expressionslevel der β-AR-Fusionsproteine in Abhängigkeit der DNA-Menge**

HEK 293-Zellen wurden mit verschiedenen Mengen DNA (0,25 μg, 0,5 μg), die für die angegebenen β-AR-Fusionsproteine codiert, mit Effectene® transient transfiziert. Die Rezeptorexpression wurde mittels Bindung des Radioliganden <sup>125</sup>I-Cyanopindolol bestimmt. Die Daten sind gegeben als Mittelwerte in fmol Rezeptor pro μg Protein ± S.E.M. von zwei bis drei verschiedenen Experimenten gemessen als Doppel- oder Dreifachwerte.

Die Funktionalität der Rezeptorfusionsproteine wurde über die Fähigkeit nach Stimulation mit Isoproterenol cAMP-Produktion zu aktivieren, mittels eines

Adenylylcyclase-Assays nachgewiesen. Die Konzentrations-Wirkungskurven der Aktivierung der Adenylylcyclase waren für die Fusionsproteine deckungsgleich zu den Kurven der Wildtyp-Rezeptoren (Abb. 13a, b), was sich auch in den sehr ähnlichen  $EC_{50}$ -Werten ausdrückte (Abb. 13c). Die Steigung dieser Kurven war etwas flacher verglichen zu der Kurve der endogenen Rezeptoren der HEK 293-Zellen. Dies ist durch die in den transfizierten Zellen enthaltenen endogenen Rezeptoren zu begründen. Weiterhin war die Kurve der endogenen Rezeptoren der HEK 293-Zellen deutlich nach rechts verschoben. Die maximale Stimulation der Adenylylcyclase über die Fusionsproteine war ebenfalls nicht von der maximalen Stimulation über die Wildtyp-Rezeptoren unterscheidbar.



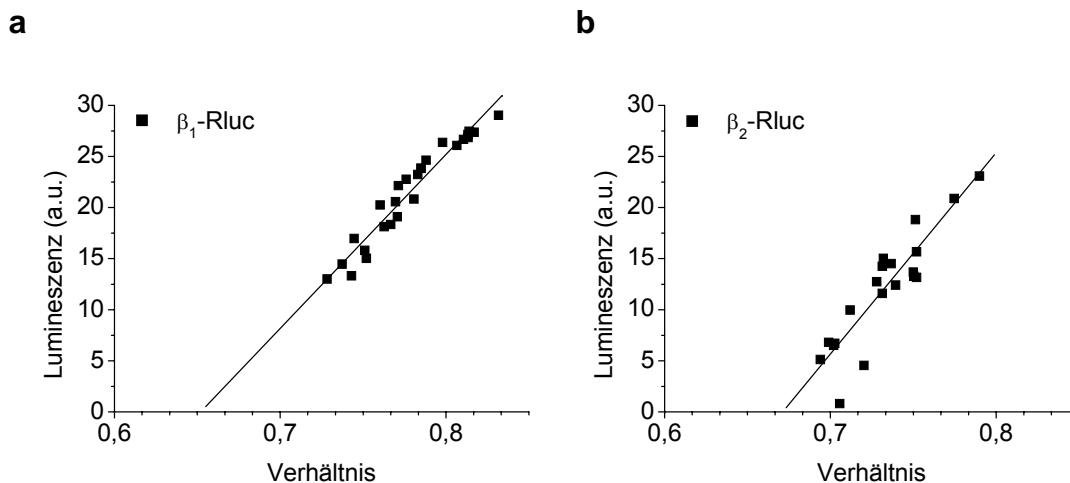
**Abb. 13: Funktionelle Eigenschaften der  $\beta$ -AR-BRET-Fusionsproteine verglichen mit  $\beta$ -WT-AR**

Die Aktivierung der Adenylylcyclase wurde nach Stimulation der transfizierten  $\beta_1$ -AR- (a) oder  $\beta_2$ -AR- (b) Fusionsproteine oder in untransfizierten (endogener  $\beta_2$ -AR) HEK 293-Zellen mit steigenden Konzentrationen Isoproterenol gemessen. Die aus den Konzentrations-Wirkungskurven ermittelten  $EC_{50}$ -Werte sind in (c) dargestellt. Die  $EC_{50}$ -Werte und die maximale Stimulation (d) der Adenylylcyclase nach Inkubation mit angegebenen Konzentrationen an Isoproterenol repräsentieren Mittelwerte  $\pm$  S.E.M. von mindestens zwei Experimenten gemessen als Dreifachwerte.

Die Fusionsproteine waren also weder in ihrer Expression noch in ihrer Funktionalität von den Wildtyp-Rezeptoren zu unterscheiden.

## 1.2 Bestimmung des Rluc-Anteils am YFP-Signal

Wie im Emissionsspektrum der Rluc (siehe I.5) ersichtlich, emittiert die Luciferase auch Licht bei 530 nm. Somit stammt ein Teil des bei 530 nm gemessenen YFP-Signals von der Renilla Luciferase. Dieser Anteil des „Durchblutens“ der Rluc in den YFP-Kanal wurde bestimmt. Hierzu wurde die Lumineszenz bei 480 nm und 530 nm gemessen. Die bei 480 nm detektierte Lumineszenz wurde gegen das Emissionsverhältnis 530nm/480nm, Verhältnis genannt, aufgetragen, um für jeden gemessenen Lumineszenzwert das Verhältnis bestimmen zu können. Subtrahiert man das Verhältnis der alleine exprimierten Rezeptor-Rluc (aus Abb. 14 ermittelbar) von dem gemessenen Gesamtverhältnis von coexprimierten Rezeptor-Rluc und Rezeptor-YFP bei gleichen Lumineszenzintensitäten, erhält man das ausschließlich von Rezeptor-YFP emittierte Signal. Das Bestimmen des „Durchblutens“ der Rluc in den YFP-Kanal ist für die Berechnung des BRET-Verhältnisses (Formel siehe II.2.4.1) nötig.



**Abb. 14: Auftragung der Lumineszenz gegen das YFP/Rluc-Verhältnis**

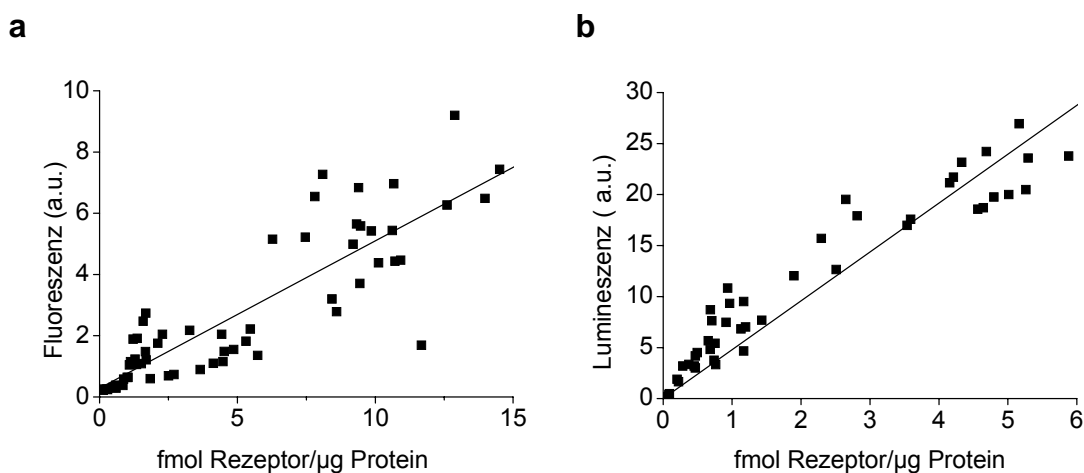
Die Emission bei 480 nm und 530 nm von HEK 293-Zellen transient transfiziert mit verschiedenen DNA-Mengen  $\beta_1$ -Rluc (a) oder  $\beta_2$ -Rluc (b) wurde nach Coelenterazin H Zugabe gemessen. Die Lumineszenz bei 480 nm wurde gegen das Emissions-Verhältnis 530nm/480nm (Verhältnis) aufgetragen.

Wie erwartet, zeigte sich für beide,  $\beta_1$ -Rluc und  $\beta_2$ -Rluc, eine lineare Korrelation zwischen Lumineszenz bei 480 nm und 530nm/480nm-Verhältnis und da das Emissionsspektrum eine intrinsische Eigenschaft der Renilla Luciferase ist, war der Anteil des „Durchblutens“ für die beiden Rezeptorfusionsproteine  $\beta_1$ -Rluc und  $\beta_2$ -Rluc gleich hoch.

### 1.3 Korrelation zwischen Fluoreszenz bzw. Lumineszenz und Expression YFP- bzw. Rluc-markierter $\beta$ -AR

Das BRET-Verhältnis wird von der relativen Expression der Donor- ( $\beta$ -Rluc) und Akzeptor-Fusionsproteine ( $\beta$ -YFP) beeinflusst. Deshalb muß die Proteinexpression bei BRET-Experimenten sorgfältig überprüft werden.

Da sich im Falle der Coexpression eines Rluc- und YFP-markierten Rezeptors über Radioligandenbindungsexperimente nur deren Gesamt-Expression bestimmen lässt, wurden jeweils die Lumineszenz- und Fluoreszenzintensitäten gemessen. Um diese in  $\beta$ -Rluc- bzw.  $\beta$ -YFP-Expression umwandeln zu können, wurde die Korrelation zwischen Fluoreszenz und Expression von  $\beta$ -YFP und die Korrelation zwischen Lumineszenz und  $\beta$ -Rluc-Expression jeweils separat bestimmt (siehe Methoden).



**Abb. 15: Lineare Korrelation zwischen Fluoreszenz und Expression von  $\beta$ -YFP bzw. Lumineszenz und Expression von  $\beta$ -Rluc**

HEK 293-Zellen wurden transient mit verschiedenen DNA-Mengen  $\beta_1$ -YFP oder  $\beta_2$ -YFP (a) bzw.  $\beta_1$ -Rluc oder  $\beta_2$ -Rluc (b) transfiziert. Pro Bedingung wurde ein Teil der Zellen für Fluoreszenz- bzw. Lumineszenz-Messungen verwendet und der andere Teil wurde zur Bestimmung der Rezeptorexpressionslevel mittels Radioligandenbindung herangezogen. Die gemessene Fluoreszenz (a) bzw. Lumineszenz (b) in „arbitrary units“ (a.u.) wurde gegen die Rezeptorexpression, ausgedrückt in fmol Rezeptor pro  $\mu$ g Protein, aufgetragen.

Abb. 15a zeigt, dass mit steigender Expression von  $\beta$ -YFP die Fluoreszenzintensität linear zunimmt (Korrelationskoeffizient  $r = 0,87$ ). Auch zwischen der Lumineszenzintensität und der Expression von Rluc-markierten  $\beta$ -AR (Abb. 15b) besteht eine lineare Beziehung (Korrelationskoeffizient  $r = 0,96$ ). Die  $\beta$ -YFP- bzw.  $\beta$ -Rluc-Expression wurde somit aus diesen Eichgeraden über die gemessenen Fluoreszenz- bzw. Lumineszenzintensitäten bestimmt.

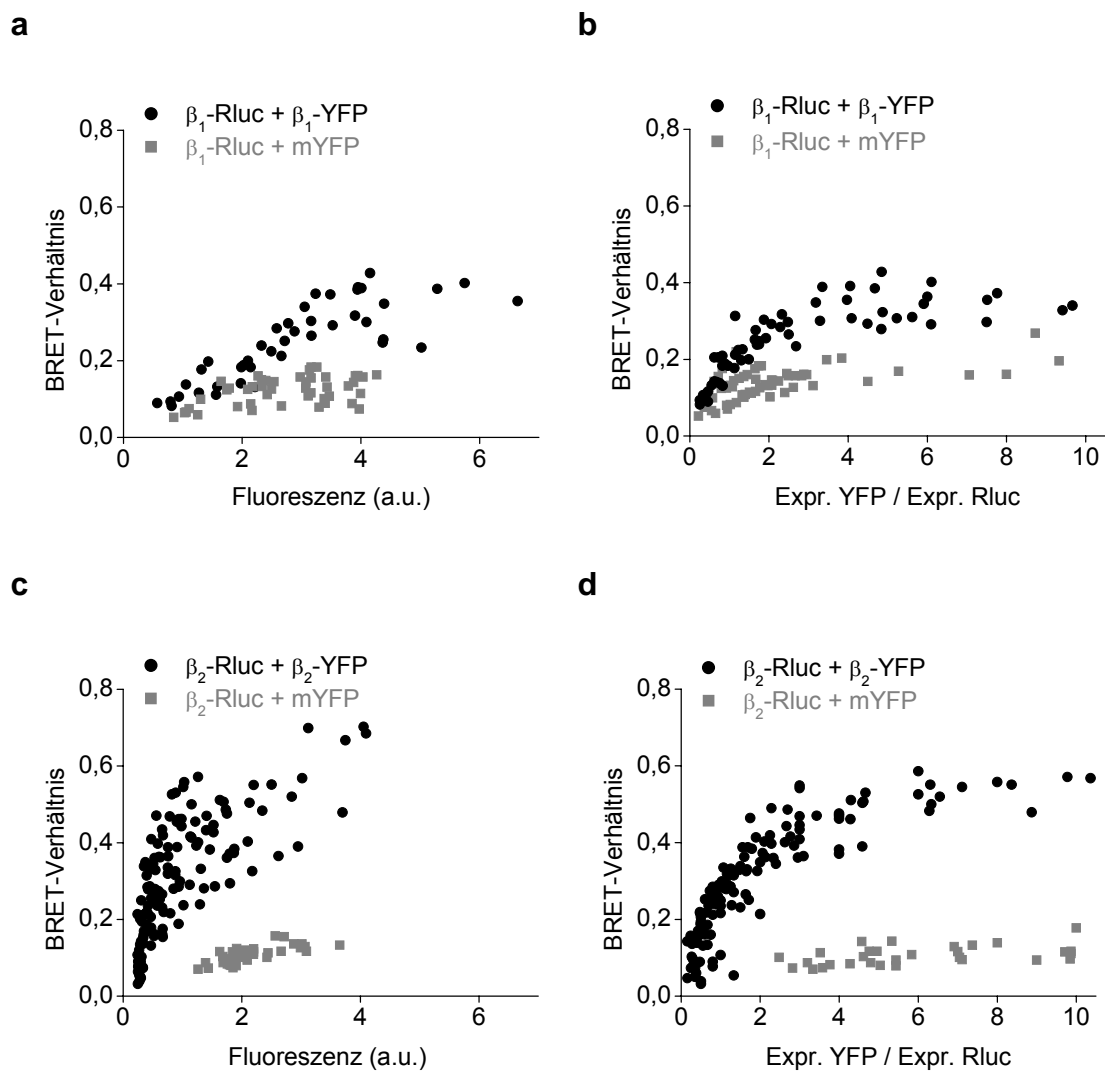
#### 1.4 Homointeraktion zwischen $\beta_1$ -AR bzw. $\beta_2$ -AR

Zur Untersuchung von  $\beta_1$ -AR- bzw.  $\beta_2$ -AR-Homointeraktionen wurden konstante Mengen  $\beta_1$ -Rluc bzw.  $\beta_2$ -Rluc und steigende Mengen  $\beta_1$ -YFP bzw.  $\beta_2$ -YFP coexprimiert. Das erhaltene BRET-Verhältnis wurde gegen die Fluoreszenz (Abb. 16a, c) oder dem Expressionsverhältnis aus  $\beta$ -YFP und  $\beta$ -Rluc (Abb. 16b, d) aufgetragen. Dabei wurden die in Abb. 15 dargestellten Eichgeraden für die Umrechnung von Fluoreszenz- bzw. Lumineszenzintensitäten in Rezeptorexpression verwendet. Vorteil der Auftragung des BRET-Verhältnisses gegen das Verhältnis aus YFP- und Rluc-Expression ist eine von der Expression unabhängige Darstellung der BRET-Kurven. Natürlich können auch Signale durch unspezifische Interaktionen und zufällige Kollisionen, hervorgerufen durch hohe Rezeptordichten, entstehen. Um dieses sog. „Bystander“-BRET zu bestimmen, wurden steigende Mengen eines an der Zellmembran lokalisierten YFP (mYFP) mit einer konstanten Menge  $\beta_1$ -Rluc bzw.  $\beta_2$ -Rluc coexprimiert. Dabei wurde angenommen, dass zwischen  $\beta$ -Rluc und mYFP keine spezifische Interaktion stattfindet. Da gleiche DNA-Mengen mYFP und  $\beta_1$ -YFP gleiche Fluoreszenzintensitäten ergaben, wurden die oben dargestellten Eichgeraden (Abb. 15) ebenfalls zur Konversion der mYFP-Fluoreszenz in Expressionslevel verwendet.

Die hyperbolisch-geformten BRET-Sättigungskurven für  $\beta_1$ -AR (Abb. 16b) und  $\beta_2$ -AR (Abb. 16d) erreichten mit steigenden YFP/Rluc-Verhältnissen ein Plateau. Die Sättigung kommt dadurch zustande, dass bei konstanter Menge Donor-markierter Rezeptoren und steigender Menge Akzeptor-markierter Rezeptoren der Donor bei einer Interaktion irgendwann limitierend wird.

Im Gegensatz dazu zeigte das „Bystander“-BRET sowohl für  $\beta_1$ -AR als auch für  $\beta_2$ -AR ein niedrigeres Signal mit einem linearen Anstieg bei steigenden Expressionsverhältnissen. Dieses lineare Verhältnis ist ein Zeichen für eine

unspezifische Interaktion. Der Vergleich der BRET-Sättigungskurven und des „Bystander“-BRET für  $\beta_1$ -AR und  $\beta_2$ -AR ergab für  $\beta_2$ -AR eine größere Anfangssteigung der Kurve, ein höheres Maximum des BRET-Verhältnisses und die Sättigung wurde bei höheren YFP/Rluc-Expressionsverhältnissen erreicht. Dagegen war das „Bystander“-BRET für  $\beta_1$ -AR etwas höher. Diese Ergebnisse erlauben die Schlussfolgerung, dass ein spezifisches BRET-Signal für  $\beta_1$ -AR nur bei YFP/Rluc-Expressions-Verhältnissen größer 2 detektierbar ist, während für  $\beta_2$ -AR ein spezifisches BRET-Signal schon bei niedrigen Expressionsverhältnissen gemessen wurde.



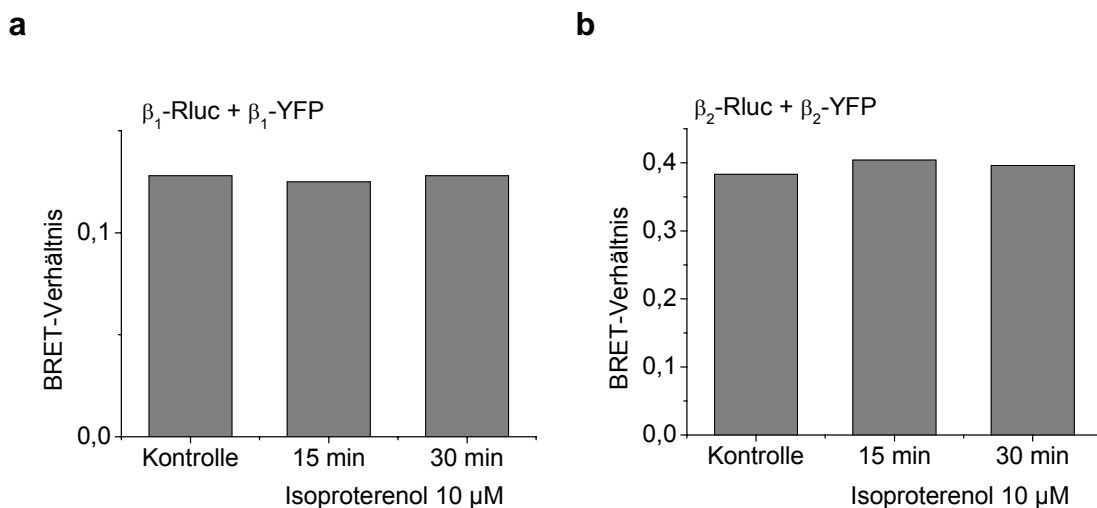
**Abb. 16: Verhältnis zwischen Fluoreszenz bzw. YFP/RL-Expressionsverhältnis und BRET-Verhältnis für  $\beta_1$ -AR und  $\beta_2$ -AR**

HEK 293- oder HEK293T-Zellen wurden mit konstanten Mengen  $\beta_1$ -Rluc bzw.  $\beta_2$ -Rluc und steigenden Mengen  $\beta_1$ -YFP oder mYFP (a, b) bzw.  $\beta_2$ -YFP oder mYFP (c, d) cotransfiziert. Die Ergebnisse wurden entweder als BRET-Verhältnis gegen die Fluoreszenz (a, c) oder als BRET-Verhältnis gegen das Expressionsverhältnis  $\beta$ -YFP/ $\beta$ -Rluc aufgetragen (b, d). Coexpression von  $\beta$ -Rluc mit mYFP wurde für die Abschätzung des sog. „Bystander“-BRET verwendet.



Wurden die Daten als BRET-Verhältnis gegen die Fluoreszenz des entsprechenden Akzeptor-Konstruktes aufgetragen, so war deutlich ersichtlich, dass für  $\beta_2$ -AR (Abb. 16c) eine spezifische Interaktion schon bei niedriger YFP-Expression stattfindet, während für  $\beta_1$ -AR (Abb. 16a) nur bei höherer Akzeptorexpression spezifische Interaktionen detektierbar waren. Dies könnte bedeuten, dass  $\beta_2$ -AR di- oder oligomerisieren, dagegen scheint  $\beta_1$ -AR nur bei höheren Akzeptor-Expressionsleveln spezifisch zu interagieren.

Weder für  $\beta_1$ -AR noch für  $\beta_2$ -AR wurde das BRET-Signal durch Stimulation mit Agonist (10  $\mu$ M Isoproterenol) messbar verändert (Abb. 17). Dies lässt darauf schließen, dass Rezeptor-Aktivierung keinen Einfluß auf den Oligomerisierungsgrad hat.

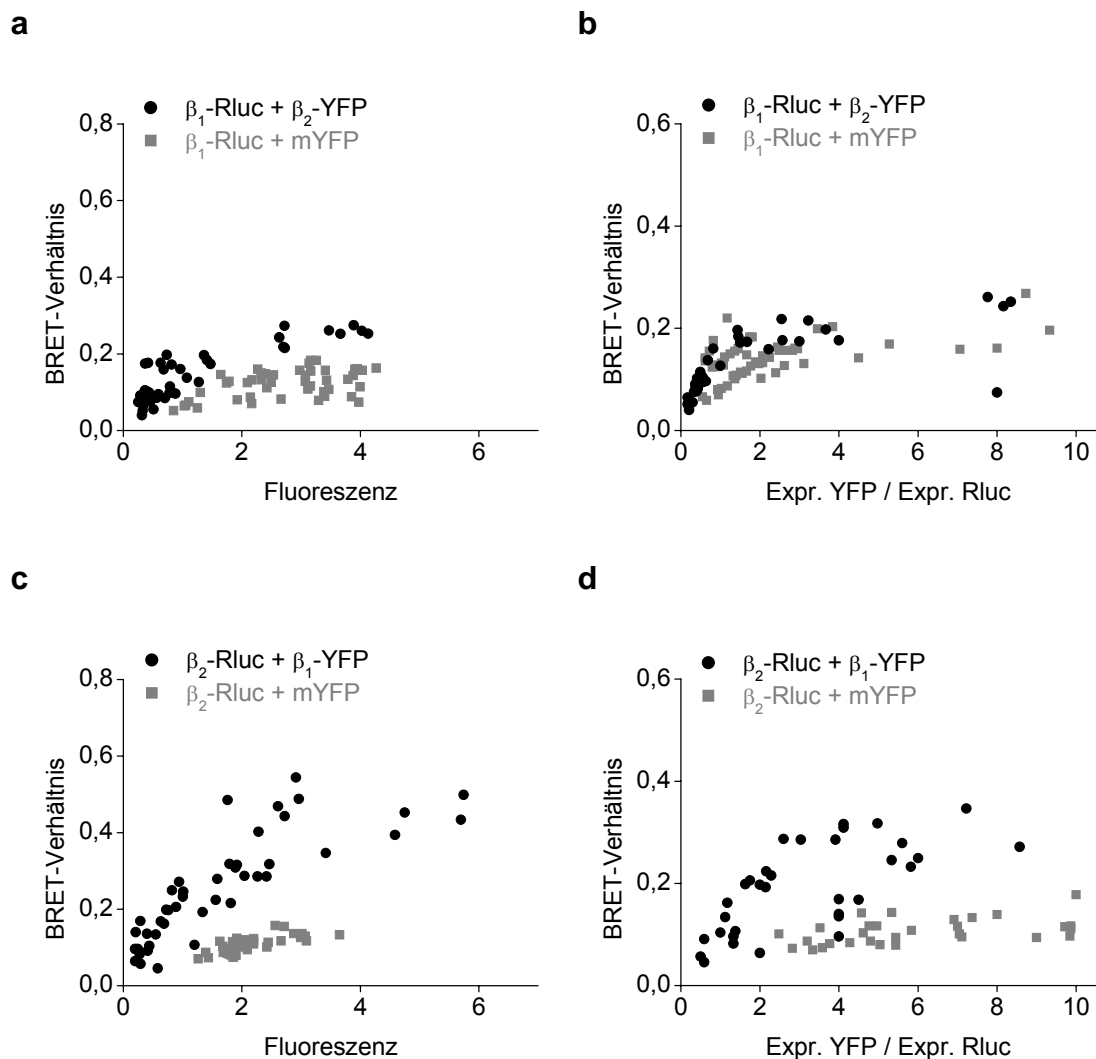


**Abb. 17:  $\beta_1$ -AR- bzw.  $\beta_2$ -AR-Homointeraktion nach Stimulation mit 10  $\mu$ M Isoproterenol**  
BRET von HEK 293-Zellen transient transfiziert mit  $\beta_1$ -Rluc und  $\beta_1$ -YFP (a) bzw.  $\beta_2$ -Rluc und  $\beta_2$ -YFP (b) wurde entweder 15 min oder 30 min nach Stimulation mit 10  $\mu$ M Isoproterenol oder ohne Agonist-Stimulation (Kontrolle) gemessen.

### 1.5 Heterointeraktion zwischen $\beta_1$ - und $\beta_2$ -AR

Weiterhin wurde untersucht, ob eine Heterointeraktion zwischen  $\beta_1$ - und  $\beta_2$ -AR stattfindet. Hierzu wurden konstante Mengen  $\beta_1$ -Rluc bzw.  $\beta_2$ -Rluc und steigende Mengen  $\beta_2$ -YFP bzw.  $\beta_1$ -YFP coexprimiert. Für die Kombination  $\beta_1$ -Rluc cotransfiziert mit  $\beta_2$ -YFP war keine spezifische Interaktion zwischen  $\beta_1$ - und  $\beta_2$ -AR feststellbar (Abb. 18a, b), da das BRET-Signal im Bereich des unspezifischen „Bystander“-BRET

( $\beta_1$ -Rluc + mYFP) lag. Bei der Variante  $\beta_2$ -Rluc coexprimiert mit  $\beta_1$ -YFP konnte dagegen interessanterweise ein spezifisches Signal detektiert werden (Abb. 18c, d), welches auf eine Interaktion zwischen  $\beta_1$ - und  $\beta_2$ -AR hinweist. Mittels BRET scheint es somit nicht möglich, eine eindeutige Aussage über eine Heterointeraktion zwischen  $\beta_1$ - und  $\beta_2$ -AR zu machen.



**Abb. 18: Verhältnis zwischen Fluoreszenz bzw. YFP/RL-Expressionsverhältnis und BRET-Verhältnis für  $\beta_1$ - $\beta_2$ -AR-Heterointeraktion**

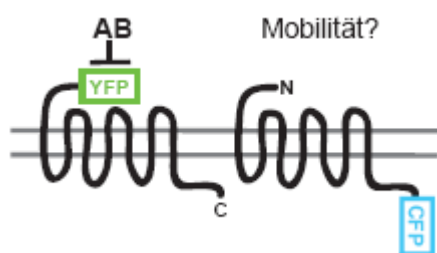
HEK 293- oder HEK293T-Zellen wurden mit konstanten Mengen  $\beta_1$ -Rluc bzw.  $\beta_2$ -Rluc und steigenden Mengen  $\beta_2$ -YFP oder mYFP (a, b) bzw.  $\beta_1$ -YFP oder mYFP (c, d) cotransfiziert. Die Auftragung der Ergebnisse erfolgte entweder als BRET-Verhältnis gegen die Fluoreszenz (a, c) oder als BRET-Verhältnis gegen das Expressionsverhältnis  $\beta$ -YFP/ $\beta$ -Rluc (b, d). Das „Bystander“-BRET wurde mittels Coexpression von  $\beta$ -Rluc mit mYFP abgeschätzt.

## 2. Etablierung einer Zwei-Farben-FRAP-Methode zur Untersuchung von Rezeptor-Rezeptor-Interaktionen

### 2.1 Modifizierte Zwei-Farben-FRAP-Methode

FRAP ist eine Methode, um die Proteinmobilität in lebenden Zellen zu untersuchen, indem man das Ausmaß der Fluoreszenzwiederkehr an einer gebleichten Stelle bestimmt. Bei Ein-Farben-FRAP wird ein einzelnes Fluorophor gebleicht und seine Mobilität beobachtet. Bei Zwei-Farben-FRAP werden zwei Fluoreszenz-markierte Proteine simultan gebleicht und die Wiederkehr beider Fluorophore detektiert. Um Di- oder Oligomerisierung von Rezeptoren untersuchen zu können, war es notwendig eine modifizierte Zwei-Farben-FRAP-Methode zu entwickeln.

Unterscheiden sich zwei Proteine in ihrer Mobilität und interagieren beide Proteine miteinander, so erfährt das Protein mit der höheren Mobilität durch die Interaktion mit dem weniger mobilen Protein eine Mobilitätsreduktion. Um eine potenzielle Homointeraktion untersuchen zu können, müssen somit zwei Protein-Fraktionen differenzierbar sein. Eine solche Situation wurde durch Markierung der zu untersuchenden Proteine mit verschiedenen farbigen fluoreszierenden Proteinen an unterschiedlichen Stellen geschaffen (Abb. 19). Eine Rezeptor-Fraktion wurde extrazellulär (N-terminal) mit YFP („yellow fluorescent protein“) versehen, was gleichzeitig ermöglicht die Mobilität dieser Fraktion mittels Quervernetzung über einen Antikörper gegen YFP einschränken zu können. Um eine potenzielle homomerische Interaktion untersuchen zu können, wurde die andere Fraktion dagegen intrazellulär (C-terminal) mit CFP („cyan fluorescent protein“) oder Cerulean (CER) markiert, welche für die Antikörper nicht zugänglich ist.

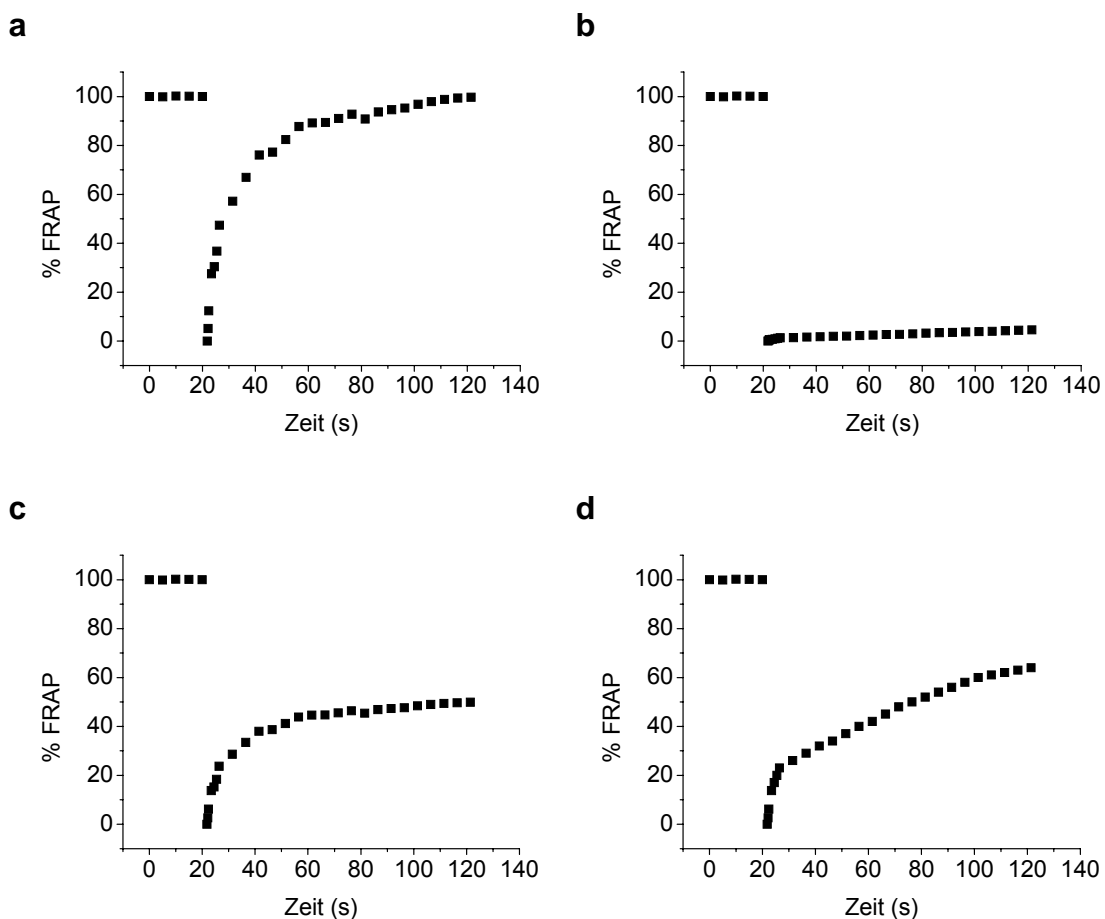


**Abb. 19: Schematische Darstellung extra- und intrazellulär-markierter Rezeptoren**

Eine Fraktion der Rezeptoren wird extrazellulär mit YFP, die andere Fraktion intrazellulär mit CFP oder Cerulean markiert. Die extrazellulär YFP-markierten Rezeptoren werden mittels eines Antikörpers gegen YFP immobilisiert und die Mobilität der intrazellulär-markierten Rezeptoren untersucht, was eine Aussage über eine potenzielle Interaktion zwischen beiden Rezeptorfraktionen zulässt.

Mittels Zwei-Farben-FRAP wurden beide Fluorophore gebleicht und die Wiederkehr beider Fraktionen simultan gemessen. Die Messung der durch Antikörper vernetzten, extrazellulär-markierten Fraktion diente zur Überprüfung, ob die Immobilisierung ausreichend war.

Aufgrund der Geschwindigkeit und des Ausmaßes der Wiederkehr können Rückschlüsse über Interaktionen zwischen mobilen und immobilisierten Rezeptoren gemacht werden (Abb. 20): Eine ungebremste und vollständige Wiederkehr des intrazellulär-markierten Proteins zeigt, dass beide Proteinfractionen nicht miteinander interagieren, eine verlangsamte Wiederkehr ist ein Zeichen für eine transiente Interaktion und ein unvollständiges FRAP Hinweis auf Di- oder Oligomerisierung.



**Abb. 20: Mögliche Ergebnisse der modifizierten Zwei-Farben-FRAP-Methode**

(a) Die vollständige Wiederkehr des intrazellulär-markierten Proteins zeigt, dass keine Interaktion zwischen den beiden untersuchten Proteinen stattfindet. (b) Wird keine oder nur eine sehr geringe Wiederkehr bei gleichem Expressionsverhältnis des intra- und extrazellulär-markierten Proteins detektiert, oligomerisieren die Proteine wahrscheinlich. (c) Ist die Mobilität ca. 50% bei äquivalentem Expressionsverhältnis und erreicht die Kurve eine Sättigung, dimerisieren die untersuchten Proteine. (d) Ist das FRAP unvollständig, aber erreicht die Kurve keine Sättigung, ist dies ein Hinweis auf eine transiente Interaktion zwischen den Proteinen.

Diese Methode ermöglicht somit die Stabilität der Interaktion zu bestimmen, die Fraktion der interagierenden Proteine zu quantifizieren und bei einer stabilen Interaktion zwischen Dimerisierung und Oligomerisierung zu unterscheiden.

## 2.2 Monomere (CD86) und kovalent dimere (CD28) FRAP-Fusionsproteine

Um die Zwei-Farben-FRAP-Methode zur Untersuchung der Größe und Stabilität von Rezeptor-Komplexen zuverlässig anwenden zu können, wurde die Methode hinsichtlich der Unterscheidbarkeit zwischen Monomeren, Dimeren und Oligomeren und zwischen stabilen und transienten Interaktionen validiert. Hierzu wurden Proteine bekannter Interaktion verwendet: als monomerisches Kontrollprotein wurde CD86 und als stabiles Dimer CD28 gewählt.

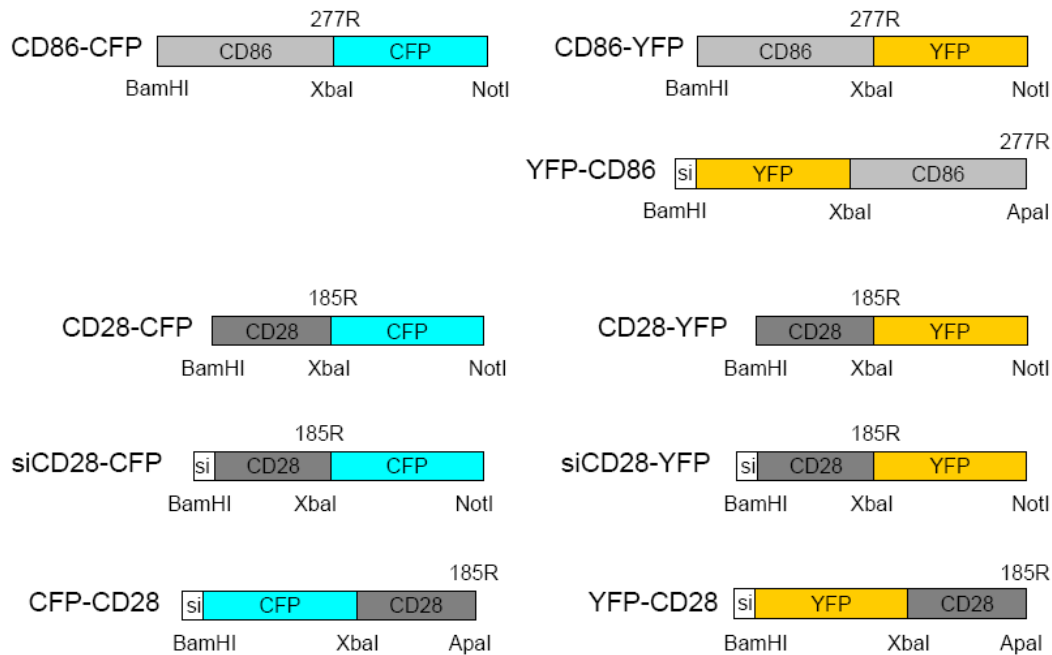
CD86, auch B7-2 bezeichnet, ist ein Glykoprotein, das auf Antigen-präsentierenden Zellen früh in der Immunantwort exprimiert wird<sup>130</sup>. CD86 gehört zur Immunglobulin-(Ig) Superfamilie und besteht aus IgV und IgC. Das 329 Aminosäuren große Protein liegt, wie mittels Western Blot-Analyse<sup>131</sup> und „photobleaching“-FRET<sup>132</sup> gezeigt wurde, als Monomer vor.

CD28 wird konstitutiv auf der Oberfläche humaner T-Zellen exprimiert<sup>133-135</sup>. Das hoch glykosylierte Protein gehört ebenfalls zur Ig-Superfamilie (IgV) und ist der Rezeptor für CD80 und CD86<sup>134,135</sup>. Bei Bindung der Liganden CD80 und CD86 an CD28 werden costimulatorische Signale erzeugt, die für die Aktivierung von T-Zellen notwendig sind. CD28 (220 AS) liegt als kovalentes Dimer vor. Die Dimerisierung der beiden Untereinheiten erfolgt über eine extrazelluläre Disulfidbrücke (Cys123)<sup>136</sup>. Mittels Western Blot-Analyse<sup>136</sup> und Coimmunopräzipitation<sup>133</sup> unter reduzierenden und nicht-reduzierenden Bedingungen wurde die dimere Natur von CD28 bestätigt.

Auch mit BRET wurde deren Existenz als Monomer (CD86) bzw. Dimer (CD28) gezeigt<sup>76</sup>.

### 2.2.1 Klonierung der CD86- und CD28-Fusionsproteine

Um FRAP-Messungen mit diesen Proteinen durchführen zu können, mussten entsprechende intrazellulär CFP- oder YFP- und extrazellulär CFP- oder YFP-markierte CD86- und CD28-Fusionsproteine generiert werden (Abb. 21). Diese enthielten teilweise eine Signalsequenz für eine bessere Membranlokalisierung und Expression.



**Abb. 21: Schematische Darstellung der in- und extrazellulär CFP- und YFP-markierten CD86- und CD28-Fusionsproteine**

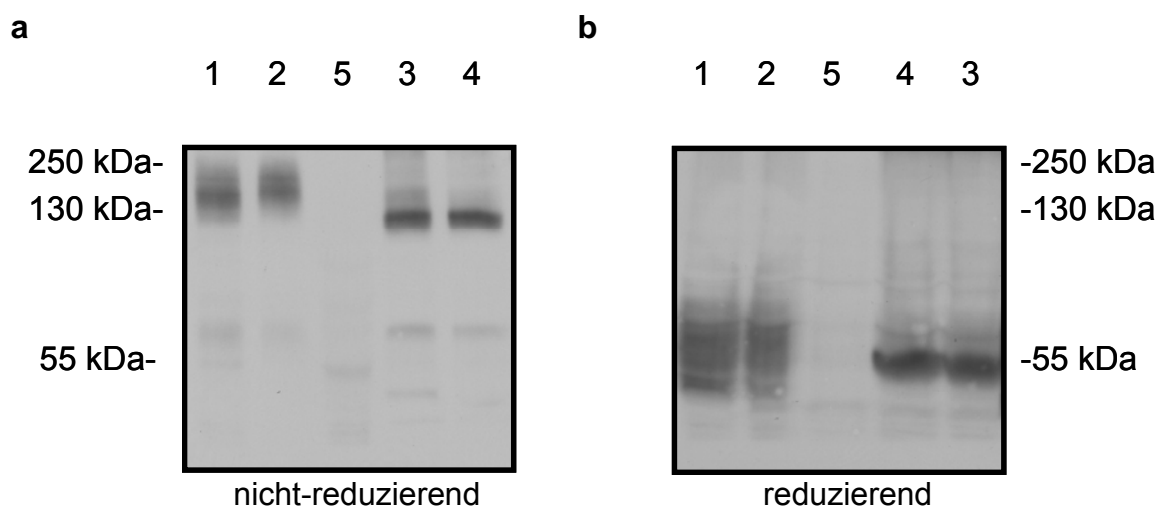
Für die intrazellulär-markierten Konstrukte wurden CD86 bzw. CD28 mittels PCR N-terminal mit einer BamHI-Schnittstelle und nach der Aminosäure 277R (CD86) bzw. 185R (CD28) mit einer XbaI-Schnittstelle versehen. Dieses DNA-Fragment wurde derart in einen CFP- bzw. YFP-enhaltenden Vektor ligiert, dass CFP bzw. YFP jeweils über einen Linker (2 Aminosäuren) entsprechend am trunkierten C-Terminus von CD86 bzw. CD28 angefügt wurde. Dies ergab die Fusionskonstrukte CD86-CFP, CD86-YFP, CD28-CFP und CD28-YFP. Es wurden auch CD28-Fusionskonstrukte mittels PCR generiert, die vor der CD28-cDNA eine Signalsequenz für eine bessere Membranlokalisierung und Expression enthielten (siCD28-CFP und siCD28-YFP).

Bei den extrazellulär mit CFP- oder YFP-markierten Fusionsproteinen wurde an CD86 bzw. CD28 mittels PCR jeweils ein XbaI- und ApaI-Schnittstelle angefügt und derart in einen CFP- oder YFP-enhaltenden Vektor eingefügt, dass sich CFP bzw. YFP am N-Terminus des jeweiligen Proteins befanden. Vor dem Fluorophor war eine Signalsequenz für eine bessere Membranlokalisierung und Expression lokalisiert. Die resultierenden Konstrukte waren YFP-CD86, CFP-CD28 und YFP-CD28.

## 2.2.2 Überprüfung der Dimerisierungsfähigkeit von CD28-Fusionsproteinen

Mittels Western Blot-Analyse wurde untersucht, ob das intra- oder extrazelluläre Anfügen von Fluorophoren an CD28 die kovalente Dimerisierung beeinträchtigt.

Unter nicht-reduzierenden Bedingungen werden Disulfidbrücken erhalten und unter reduzierenden Bedingungen dagegen gespalten. Für CD28-Konstrukte bedeutet das, dass unter nicht-reduzierenden Bedingungen CD28 als kovalentes Dimer und unter reduzierenden Bedingungen CD28 als Monomer vorliegt. Die Proteinbanden von allen getesteten intra- und extrazellulär-markierten CD28-Konstrukten waren unter reduzierenden Bedingungen bei ca. der Hälfte des Molekulargewichtes wie unter nicht-reduzierenden Bedingungen zu finden (Abb. 22). Das lässt darauf schließen, dass unter reduzierenden Bedingungen die Disulfidbrücken gespalten wurden und die CD28-Konstrukte als Monomere vorliegen, unter nicht-reduzierenden Bedingungen dagegen, ist die Disulfidbrücke erhalten und die CD28-Fusionskonstrukte liegen als Dimere vor. Somit zeigte weder das intra- noch das extrazelluläre Fusionieren mit CFP oder YFP einen Einfluß auf die effiziente kovalente Dimerisierung von CD28.



**Abb. 22: Immunoblot intra- und extrazellulär-markierter CD28-Konstrukte**

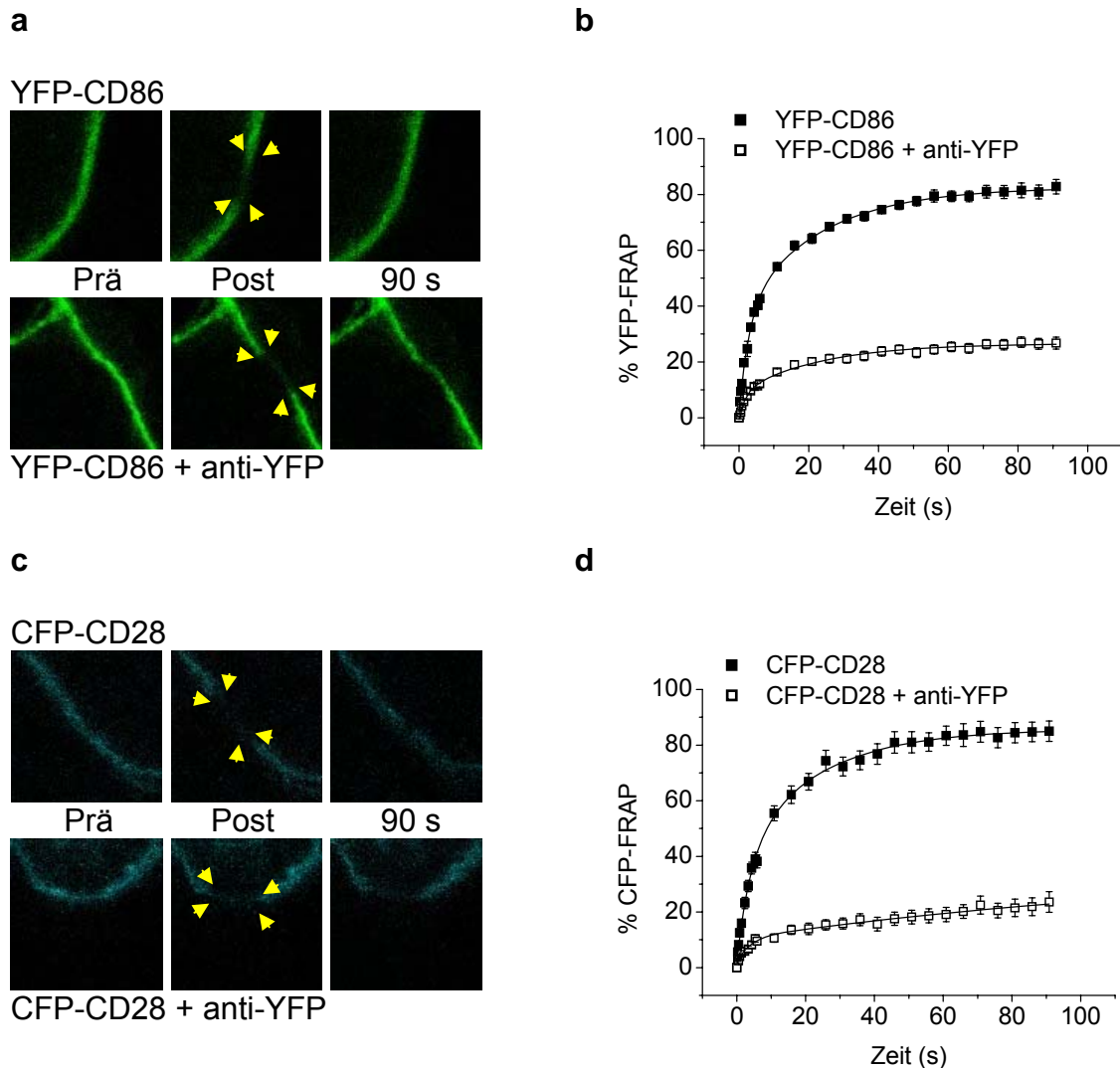
Immunoblot (polyklonaler Antikörper gegen YFP) von Zellen transfiziert mit CD28-YFP (1), CD28-CFP (2), CFP-CD28 (3), YFP-CD28 (4) oder von untransfizierten HEK 293T-Zellen (5) unter nicht-reduzierenden (a) und reduzierenden (b) Bedingungen.

### **2.3 Spezifische Immobilisierung extrazellulär-markierter Proteine mittels Antikörper gegen YFP**

Mittels Ein-Farben-FRAP wurde zunächst die Mobilität der individuell exprimierten Proteine untersucht und geprüft, ob und in welchem Ausmaß sich extrazellulär CFP- bzw. YFP-markierte Proteine mit einem Antikörper gegen das entsprechende Fluorophor immobilisieren lassen.

Extrazellulär YFP-markiertes CD86 war, wie in einem Konfokalbild ca. 90 s nach dem Bleichen von 50-75% der Ausgangsfluoreszenz im ROI zu sehen, sehr mobil, da kein Unterschied zum Zustand vor dem Bleichen sichtbar war (Abb. 23a). Bereits 10 s nach Bleichen war über die Hälfte YFP-CD86 in das gebleichte ROI zurück gekommen (Abb. 23b). Die mobile Fraktion, das ist der Anteil, der in das gebleichte Gebiet zurück diffundiert, betrug ca. 83%. Es gab also eine kleine immobile Fraktion (17%). Für alle in dieser Arbeit untersuchten Proteine wurde eine immobile Fraktion gleicher Größenordnung detektiert. Solche immobile Fraktionen werden in der Literatur häufig beschrieben und haben verschiedene Ursachen<sup>127,128,137,138</sup>. Die Inkubation mit einem polyklonalen Antikörper gegen YFP führte zu einer spezifischen Immobilisierung des extrazellulär YFP-markierten CD86 (Abb. 23a, b). Im Konfokalbild ist 90 s nach Bleichen noch deutlich die gebleichte Region zu erkennen (Abb. 23a). Nur noch ca. 27% der Proteine waren nach der Behandlung mit polyklonalem Antikörper gegen YFP mobil (Tab. 3). Nicht nur YFP, sondern auch extrazelluläres CFP konnte mit dem polyklonalen Antikörper effizient immobilisiert werden, obwohl CFP-CD28 vor der Antikörperbehandlung ebenfalls sehr mobil war (Abb. 23c, d; Tab. 3).



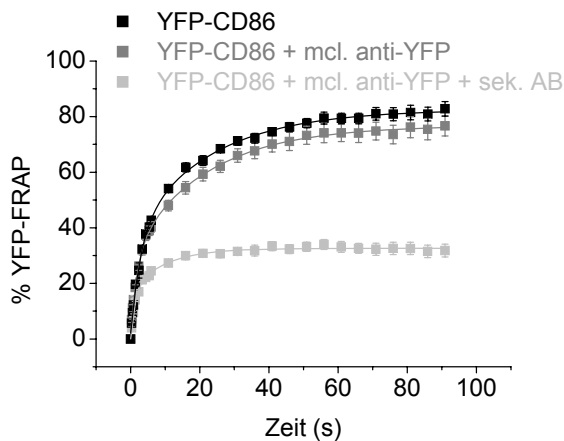


**Abb. 23: Spezifische Immobilisierung extrazellulär YFP-markierter CD86 bzw. CFP-markierter CD28 mit polyklonalem Antikörper gegen YFP**

(a, c) Konfokalbilder von HEK 293T-Zellen, die extrazellulär YFP-markiertes CD86 (a) oder CFP-markiertes CD28 (c) exprimieren, in Anwesenheit (30 min Inkubation, untere Reihe) oder Abwesenheit (obere Reihe) eines polyklonalen Antikörpers gegen YFP (anti-YFP) vor (Prä), sofort nach (Post) oder 90 s nach dem Photobleichen eines  $3 \times 1 \mu\text{m}$  großen rechteckigen ROI (gelbe Pfeile). Etwa 50-75% der Ausgangsfluoreszenz wurden im ROI weggebleicht. CFP wurde mit Laserlicht der Wellenlänge 405 nm, YFP mit Laserlicht der Wellenlänge 514 nm gebleicht und detektiert. (b, d) Mittleres FRAP  $\pm$  S.E.M. gemessen in Zellen, die entweder unbehandelt waren (YFP-CD86  $n = 21$ , CFP-CD28  $n = 20$ ) oder mit polyklonalem Antikörper gegen YFP (YFP-CD86 + anti-YFP  $n = 32$ , CFP-CD28 + anti-YFP  $n = 19$ ) vorbehandelt wurden. Die Kurven wurden mittels einer bi-exponentiellen Gleichung (siehe Methoden) gefittet.

Dagegen führte die Behandlung mit einem monoklonalen Antikörper gegen YFP nicht zu einer Immobilisierung von YFP-CD86 (Abb. 24). Erst nach Inkubation mit einem Sekundärantikörper gegen die Fc-Domäne des monoklonalen Antikörpers gerichtet,

konnte eine Immobilisierung des extrazellulär-markierten CD86 erreicht werden (Abb. 24). Die polyklonalen Antikörper gegen YFP können an verschiedene Epitope von YFP binden und so einige verschiedene YFP-Moleküle miteinander vernetzen und immobilisieren, was den monoklonalen Antikörpern nicht möglich ist.

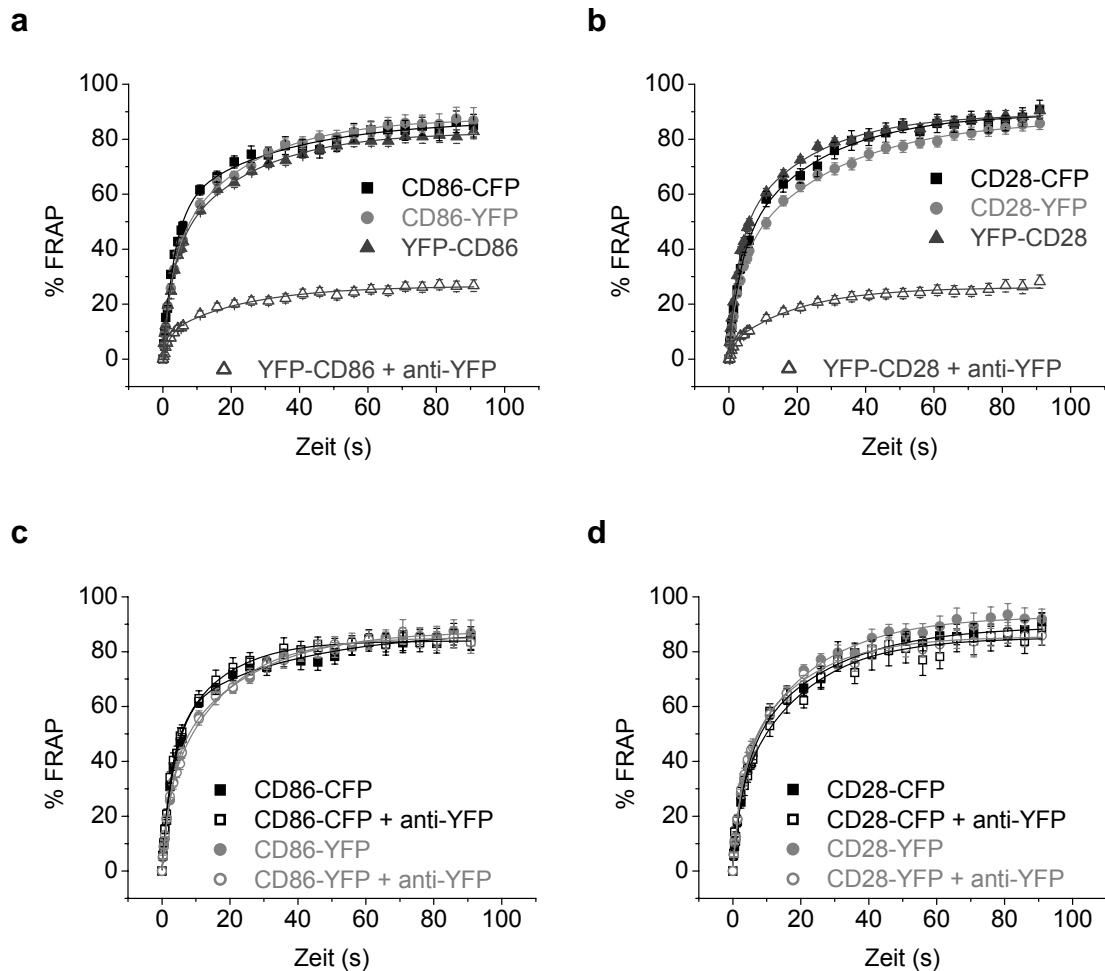


**Abb. 24: Immobilisierung extrazellulär-markierter YFP-CD86 durch monoklonalen Antikörper gegen YFP**

Die Mobilität von YFP-CD86 wurde nicht durch die Behandlung mit monoklonalem Antikörper gegen YFP (+ mcl. anti-YFP,  $n = 37$ ) verglichen zu unbehandelten Zellen ( $n = 21$ ) beeinflusst. Erst die Zugabe eines Sekundär-Antikörpers gegen den monoklonalen Antikörper (+ mcl. anti-YFP + sek. AB,  $n = 24$ ) führte zu einer Restriktion der Mobilität extrazellulär-markierter CD86-Proteine.

Wie in Abb. 25a, b ersichtlich, war sowohl für CD86 als auch für CD28 die Mobilität in HEK 293T-Zellen unabhängig von der Art des Fluorophors (CFP oder YFP) und unabhängig von der Markierungsstelle (intrazellulär oder extrazellulär). Dies drückte sich auch in der Übereinstimmung der mobilen Fraktion (% FRAP) und der Zeitkonstanten  $t_1$  und  $t_2$  der jeweiligen Fusionsproteine aus (Tab. 3). Während sich extrazellulär-markierte Proteine merklich durch die Behandlung mit einem polyklonalen Antikörper gegen YFP (anti-YFP) immobilisieren ließen (Abb. 23b, d; Abb. 25a, b) wurde die Mobilität (Ausmaß des FRAP und Zeitkonstanten) intrazellulär Fluorophor-markierter Proteine durch die Anwesenheit eines anti-YFP nicht beeinträchtigt (Abb. 25c, d; Tab. 3).

Diese Ergebnisse bestätigen, dass polyklonale Antikörper gegen YFP ein gut geeignetes Instrument darstellen, selektiv extrazellulär YFP-markierte Proteine auf der Zelloberfläche zu immobilisieren.



**Abb. 25: Einfluß der Behandlung mit polyklonalem Antikörper gegen YFP auf HEK 293T-Zellen, die entweder intrazellulär oder extrazellulär mit Fluorophoren markierte CD28 oder CD86 exprimieren**

(a-d) Mittleres FRAP  $\pm$  S.E.M. von individuell exprimiertem CD86 (a) oder CD28 (b) entweder intrazellulär (CD86-CFP n = 22, CD86-YFP n = 17, CD28-CFP n = 18, CD28-YFP n = 31) oder extrazellulär (YFP-CD86 n = 21, YFP-CD28 n = 29) mit fluoreszierenden Proteinen markiert. Die Wiederkehr von intra- und extrazellulär-markierten Proteinen war vergleichbar (a, b). FRAP der extrazellulär-markierten Proteine wurde merklich nach Inkubation mit Antikörper gegen YFP (anti-YFP) reduziert (YFP-CD86 + anti-YFP n = 32, YFP-CD28 + anti-YFP n = 23) (a, b) während intrazellulär-markiertes CD86 (c) (CD86-CFP n = 22, CD86-CFP + anti-YFP n = 18, CD86-YFP n = 17, CD86-YFP + anti-YFP n = 13) oder CD28 (d) (CD28-CFP n = 18, CD28-CFP + anti-YFP n = 14, CD28-YFP n = 31, CD28-YFP + anti-YFP n = 33) nicht durch die Behandlung mit polyklonalem anti-YFP in ihrer Mobilität beeinträchtigt wurden.

Konstrukt	% FRAP	t <sub>1</sub>	t <sub>2</sub>	n
CD28-CFP	89,4 ± 6,9	3,5 ± 2,8	24,1 ± 18,5	18
CD28-CFP + anti-YFP	86,0 ± 4,6	2,0 ± 1,7	19,5 ± 8,0	14
CD28-YFP	87,1 ± 8,7	3,3 ± 2,4	29,1 ± 20,8	31
CD28-YFP + anti-YFP	78,4 ± 4,9	1,2 ± 1,0	23,0 ± 8,0	33
CFP-CD28	85,3 ± 5,8	3,7 ± 3,7	20,8 ± 16,8	20
CFP-CD28 + anti-YFP	42,3 ± 157,3	4,2 ± 4,5	186,1 ± 1216,9	19
YFP-CD28	89,1 ± 5,6	2,7 ± 1,7	21,4 ± 14,7	29
YFP-CD28 + anti-YFP	26,1 ± 2,4	1,2 ± 1,4	19,7 ± 10,1	23
CD86-CFP	86,9 ± 10,2	3,5 ± 1,7	31,3 ± 39,7	22
CD86-CFP + anti-YFP	84,0 ± 3,6	2,8 ± 1,7	14,4 ± 9,6	18
CD86-YFP	87,6 ± 6,1	2,9 ± 2,1	23,0 ± 15,3	17
CD86-YFP ± anti-YFP	85,3 ± 4,0	1,9 ± 1,6	17,1 ± 6,9	13
YFP-CD86	82,5 ± 5,9	3,0 ± 2,2	22,7 ± 16,4	21
YFP-CD86 + anti-YFP	26,6 ± 3,0	1,8 ± 2,0	22,7 ± 16,8	32
YFP-CD86 + mcl. anti-YFP	76,8 ± 4,9	2,0 ± 1,5	21,8 ± 11,3	37
YFP-CD86 + mcl. anti-YFP + sek. AB	32,6 ± 1,8	1,2 ± 1,1	9,8 ± 10,5	24

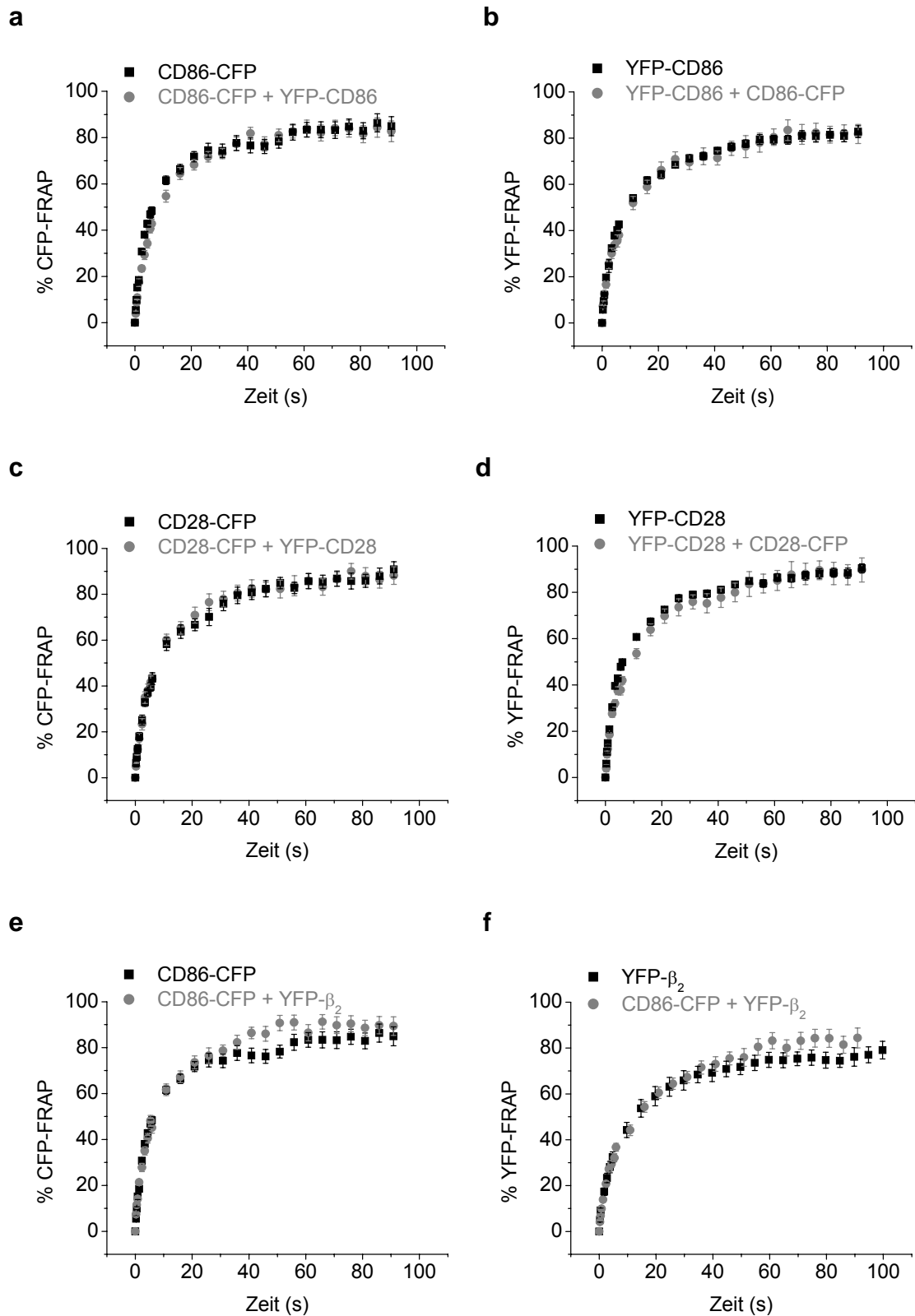
**Tab. 3: Mittleres FRAP und Zeitkonstanten ± S.E.M. der angegebenen CD28- und CD86-Fusionsproteine**

Die Mittelwerte der gemessenen Daten wurden mittels einer biphasisch-exponentiellen Gleichung, wie unter Methoden beschrieben, gefittet. Die Daten sind als Mittelwerte ± S.E.M. angegeben.

## 2.4 Ein-Farben-FRAP versus Zwei-Farben-FRAP

Um eine Interaktion mittels Zwei-Farben-FRAP detektieren zu können, muß gewährleistet werden, dass die Mobilität der Proteine mit Zwei-Farben-FRAP in gleicher Weise wie mittels Ein-Farben-FRAP detektiert werden kann. Weiterhin muß sichergestellt werden, dass das „Durchbluten“ von CFP in den YFP-Kanal, verursacht durch die simultane Fluorophor-Anregung, korrekt korrigiert werden kann.

Wie aus Abb. 26 ersichtlich gab es keinen Unterschied in der mittels Ein-Farben-FRAP gemessenen Mobilität der alleine exprimierten intrazellulär CFP-markierten CD86 (Abb. 26a) bzw. CD28 (Abb. 26c) und der mittels Zwei-Farben-FRAP gemessenen Mobilität von CD86-CFP coexprimiert mit YFP-CD86 bzw. von CD28-CFP coexprimiert mit YFP-CD28. Die Mobilität der einzeln exprimierten YFP-CD86 (Abb. 26b) bzw. YFP-CD28 (Abb. 26d) mittels Ein-Farben-FRAP gemessen war ebenfalls identisch zu der Mobilität von YFP-CD86 coexprimiert mit CD86-CFP bzw. von YFP-CD28 coexprimiert mit CD28-CFP und mittels Zwei-Farben-FRAP bestimmt.



**Abb. 26: Vergleich Ein-Farben-FRAP versus Zwei-Farben-FRAP**

CD86-CFP (a, e), YFP-CD86 (b), CD28-CFP (c), YFP-CD28 (d) und YFP- $\beta_2$  (f) wurden individuell in HEK 293T-Zellen transfiziert und die Wiederkehr mittels Ein-Farben-FRAP gemessen. Diese wurde verglichen mit der entsprechenden Wiederkehr von CD86-CFP cotransfiziert mit YFP-CD86 (a, b), CD28-CFP cotransfiziert mit YFP-CD28 (c, d) bzw.

CD86-CFP cotransfiziert mit YFP- $\beta_2$  (e, f) gemessen mit Zwei-Farben-FRAP. Dabei wurde das „Durchbluten“ des CFP in den YFP-Kanal wie unter Methoden beschrieben, korrigiert.

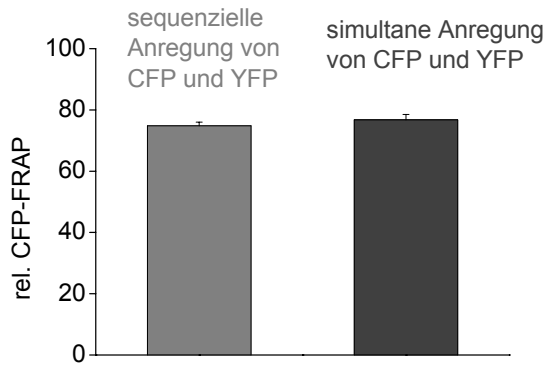
Auch bei der Verwendung zweier unterschiedlicher Proteine wie CD86-CFP und YFP- $\beta_2$  (Abb. 26e, f) war keine signifikante Abweichung des Zwei-Farben-FRAP zum Ein-Farben-FRAP sichtbar.

Dies zeigt, wie man auch erwarten würde, dass mittels Zwei-Farben-FRAP die mittels Ein-Farben-FRAP separat für beide Proteine gemessenen Ergebnisse reproduzierbar waren. Somit ist die Beobachtung der Mobilität zweier unterschiedlich Fluoreszenzmarkierter Proteine am gleichen Ort (gebleichtes ROI) zur gleichen Zeit möglich. Weiterhin ist die Übereinstimmung der Wiederkehr von YFP-markierten Proteinen von Ein-Farben- und Zwei-Farben-FRAP ein Hinweis auf die Richtigkeit der „Durchblutkorrektur“ des YFP-Signals.

Da gerätebedingt mittels des zur Verfügung stehenden FRAP-Protokolls im Zwei-Farben-FRAP die beiden Fluorophore CFP und YFP nur simultan angeregt und gemessen werden können, musste überprüft werden, ob die nach einer Korrektur für das „Durchbluten“ des CFP in den YFP-Kanal erhaltenen Werte identisch mit Werten gemessen mit sequenzieller Fluorophor-Anregung waren.

Hierfür wurde ein Pseudo-Zwei-Farben-FRAP-Protokoll erstellt, mit dem beide Fluorophore entweder simultan oder sequenziell beobachtbar waren. Dabei konnte jedoch die Größe und Position des ROI nicht so exakt wie im Standard-FRAP-Protokoll gewählt werden. Die mit sequenzieller Messung ermittelten Daten wurden nach Abzug der unvollständigen Immobilisierung mit den „durchblut“-korrigierten (siehe Methoden), mittels simultaner Messung erhaltenen Daten (abzüglich der unvollständigen Immobilisierung durch anti-YFP) verglichen. Abb. 27 zeigt, dass kein Unterschied im relativen FRAP zwischen beiden FRAP-Protokollen bestand.

Somit konnte das Protokoll mit simultaner Fluorophor-Anregung in Kombination mit einer Korrektur für das „Durchbluten“ für Zwei-Farben-FRAP-Experimente verwendet werden.



**Abb. 27: Vergleich sequenzielle und simultane Anregung von CFP und YFP bei Zwei-Farben-FRAP**

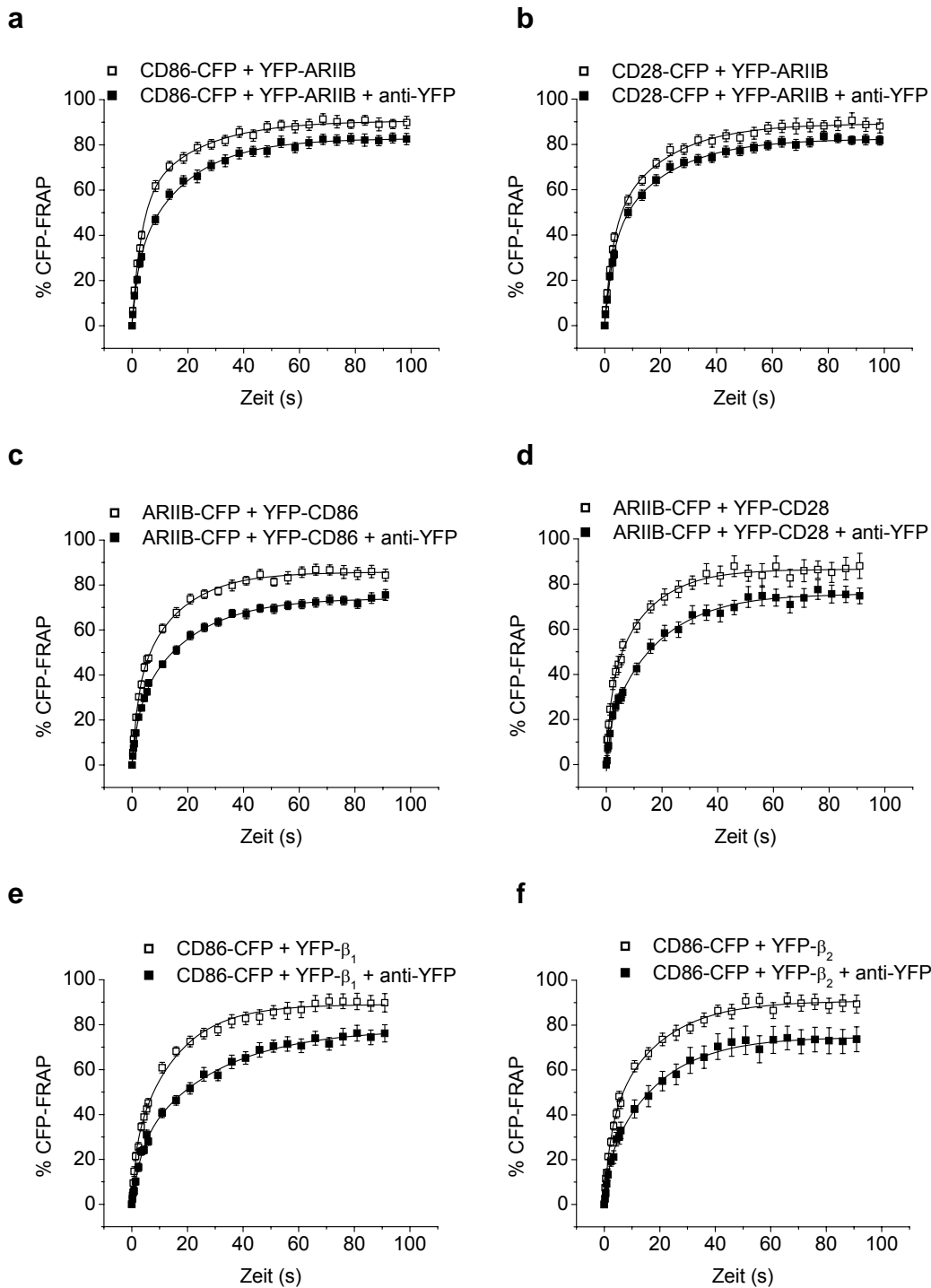
HEK 293T-Zellen transient transfiziert mit CD86-CFP und YFP- $\beta_1$  wurden nach der Inkubation mit anti-YFP entweder einem Pseudo-Zwei-FRAP-Protokoll mit sequenzieller Fluorophor-Anregung ( $n = 12$ ) oder einem Pseudo-Zwei-FRAP-Protokoll mit simultaner CFP- und YFP-Anregung ( $n = 16$ ) unterzogen. Das mittlere relative FRAP  $\pm$  S.E.M. der letzten 3 Zeitpunkte aller individuellen relativen FRAP-Kurven wurde berechnet.

## 2.5 Unspezifische Immobilisierung nicht-interagierender Proteine

Das Behandeln extrazellulär YFP-markierter Proteine mit Antikörper gegen YFP führte wie unter 2.3 gezeigt über Vernetzung zu deren Immobilisierung. Es stellte sich die Frage, ob diese Vernetzung die Mobilität nicht-interagierender Proteine beeinflussen kann.

Hierzu wurden das FRAP der in Tab. 4 genannten Kombinationen nicht-interagierender Proteine vor und nach Inkubation mit polyklonalem anti-YFP miteinander verglichen. Als mit CD86, CD28,  $\beta_1$ -AR und  $\beta_2$ -AR nicht-interagierendes Protein wurde auch der Activin-Rezeptor IIB (ARIIB) eingesetzt (Abb. 28; Tab. 4). Es gibt Activin-Rezeptoren-Typ-I und Typ-II. Activin-Rezeptoren-Typ-II wiederum unterscheiden sich in 2 Typen (ActRII und ActRIIB). Diese Rezeptoren sind Mitglied einer größeren Familie von Rezeptor-Serin-Kinasen<sup>139</sup>.

Die Immobilisierung des Proteins von Interesse (YFP-CD86, YFP-CD28, YFP- $\beta_1$  und YFP- $\beta_2$ ) führte zu einer geringen Reduktion der Mobilität nicht-interagierender Proteine (ARIIB-CFP, mCFP und CD86-CFP) (Abb. 28c-f; Tab. 4). Ebenso war umgekehrt bei Immobilisierung nicht-interagierender Proteine (YFP-ARIIB, YFP- $\beta_1$  und YFP- $\beta_2$ ) eine leichte Mobilitäts-Einschränkung der Proteine von Interesse (CD86-CFP, CD28-CFP,  $\beta_1$ -CFP und  $\beta_2$ -CFP) feststellbar (Abb. 28a, b; Tab. 4).



**Abb. 28: Einfluß der Immobilisierung extrazellulär-markierter Proteine durch Behandlung mit Antikörper gegen YFP auf die Mobilität nicht-interagierender Proteine**

(a-f) Um eine unspezifische Immobilisierung hervorgerufen durch die Antikörper-induzierte Vernetzung eines Überschusses extrazellulär YFP-markierter Proteine abzuschätzen, wurde FRAP von coexprimierten nicht-interagierenden Proteinen vor und nach anti-YFP Behandlung gemessen (a: CD86-CFP + YFP-ARIIB n = 28, CD86-CFP + YFP-ARIIB + anti YFP n = 41; b: CD28-CFP + YFP-ARIIB n = 24, CD28-CFP + YFP-ARIIB + anti-YFP n = 44; c: ARIIB-CFP + YFP-CD86 n = 23, ARIIB-CFP + YFP-CD86 + anti-YFP n = 44; d: ARIIB-CFP + YFP-CD28 n = 11, ARIIB-CFP + YFP-CD28 + anti-YFP n = 20; e: CD86-CFP + YFP- $\beta_1$  n = 22, CD86-CFP + YFP- $\beta_1$  + anti-YFP n = 41; f: CD86-CFP + YFP- $\beta_2$  n = 24, CD86-CFP + YFP- $\beta_2$  + anti-YFP n = 21).



Diese geringen Effekte in Höhe von ungefähr 10% wurden für alle getesteten Proteinkombinationen detektiert und wurden deshalb als unspezifisch angesehen. Für die Berechnung des relativen FRAP wurde dieser Effekt wie unter Methoden beschrieben, berücksichtigt.

Zelloberflächenproteine	FRAP $\pm$ S.E.M. vor anti-YFP Inkubation		FRAP $\pm$ S.E.M. nach anti-YFP Inkubation		unspezifische Immobilisierung [%]
ARIIB-CFP + YFP-CD86	84,4 $\pm$ 1,5	n = 69	73,4 $\pm$ 1,3	n = 132	13
ARIIB-CFP + YFP-CD28	85,2 $\pm$ 3,0	n = 29	74,5 $\pm$ 1,3	n = 57	13
CD28-CFP + YFP-ARIIB	89,1 $\pm$ 1,8	n = 72	81,9 $\pm$ 1,2	n = 132	8
CD86-CFP + YFP-ARIIB	87,8 $\pm$ 1,5	n = 84	82,5 $\pm$ 1,3	n = 123	6
$\beta_1$ -CFP + YFP-ARIIB	82,5 $\pm$ 1,8	n = 36	78,5 $\pm$ 1,6	n = 93	5
$\beta_2$ -CFP + YFP-ARIIB	78,6 $\pm$ 2,3	n = 54	72,4 $\pm$ 1,8	n = 57	8
ARIIB-CFP + YFP- $\beta_1$	76,0 $\pm$ 1,6	n = 69	70,4 $\pm$ 2,2	n = 39	7
mCFP + YFP- $\beta_1$	78,5 $\pm$ 1,9	n = 78	73,1 $\pm$ 1,6	n = 105	7
CD86-CFP + YFP- $\beta_1$	89,9 $\pm$ 2,1	n = 66	75,4 $\pm$ 2,0	n = 126	16
ARIIB-CFP + YFP- $\beta_2$	74,7 $\pm$ 2,1	n = 66	64,4 $\pm$ 2,4	n = 33	14
mCFP + YFP- $\beta_2$	82,7 $\pm$ 2,8	n = 60	74,0 $\pm$ 2,6	n = 45	11
CD86-CFP + YFP- $\beta_2$	89,3 $\pm$ 2,1	n = 72	73,2 $\pm$ 3,2	n = 63	18

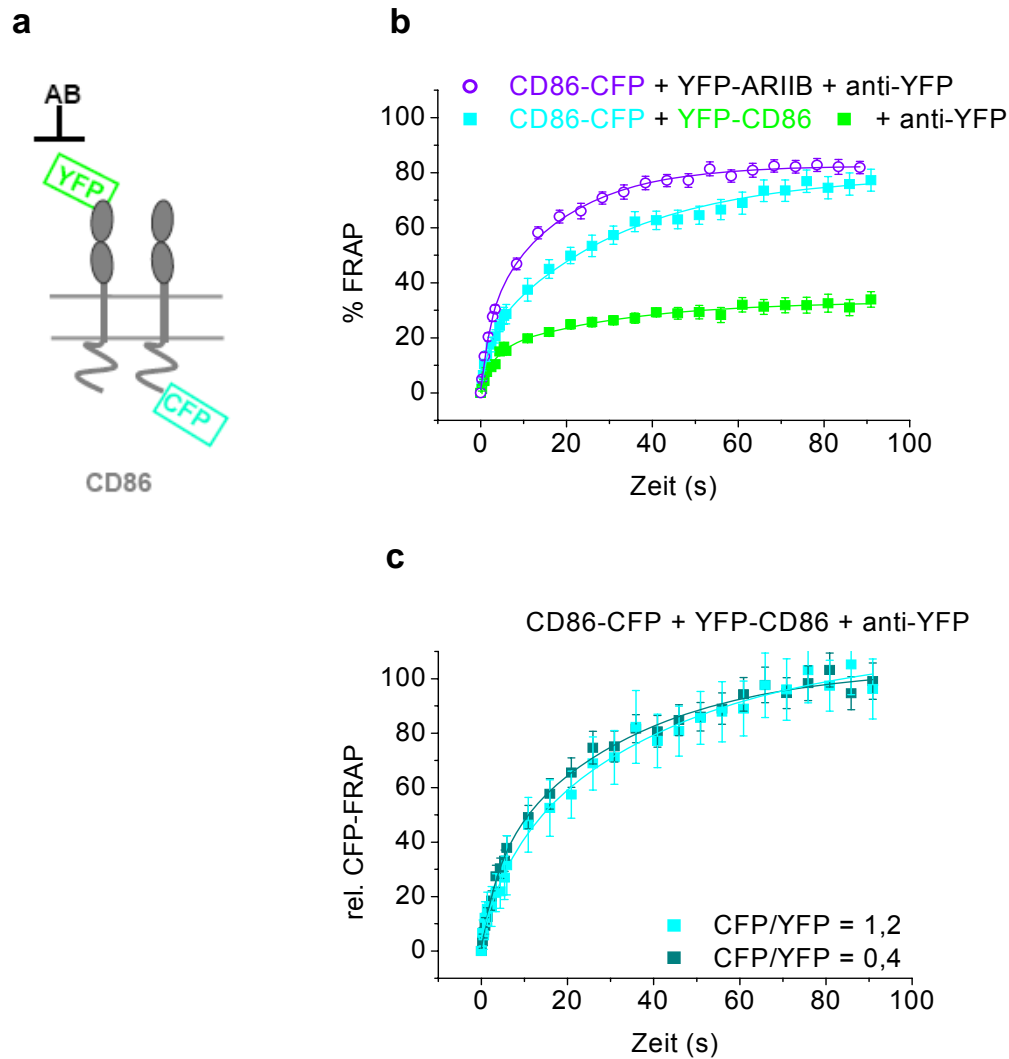
**Tab. 4: Unspezifische Immobilisierung aller gemessenen nicht-interagierenden Proteinkombinationen induziert durch Antikörper gegen YFP**

FRAP von nicht-interagierenden Proteinen gemessen vor und nach Inkubation mit polyklonalem anti-YFP. Das mittlere FRAP  $\pm$  S.E.M. der letzten 3 Zeitpunkte aller individuellen FRAP-Kurven wurde berechnet. Die unspezifische Immobilisierung durch die Antikörperbehandlung wurde durch Vergleich des mittleren FRAP dieser nicht-interagierenden Proteine vor und nach der Antikörperbehandlung bestimmt. Diese Faktoren wurden bei der Berechnung des relativen FRAP berücksichtigt (siehe Methoden).

## 2.6 FRAP des monomeren Proteins CD86

Da CD86 ein monomeres Protein ist, sollte zwischen den intrazellulär CFP- und extrazellulär YFP-markierten Spezies keine Interaktion detektierbar sein (Abb. 29a).

CD86-CFP zeigte, wie erwartet, in Antikörper-behandelten Zellen, die einen leichten Überschuss CD86-CFP über YFP-CD86 exprimierten (CFP/YFP  $\approx$  1,2), eine hohe Wiederkehr in das gebleichte ROI (80,9  $\pm$  11,3% mobile Fraktion; Abb. 29b). Diese FRAP-Kurve war vergleichbar mit der Kurve von CD86-CFP in Zellen, die Antikörper-immobilisiertes YFP-ARIIB coexprimierten (82,8  $\pm$  4,0%; Abb. 29b).



**Abb. 29: Validierung der Zwei-Farben-FRAP-Methode mittels des monomeren Proteins CD86**

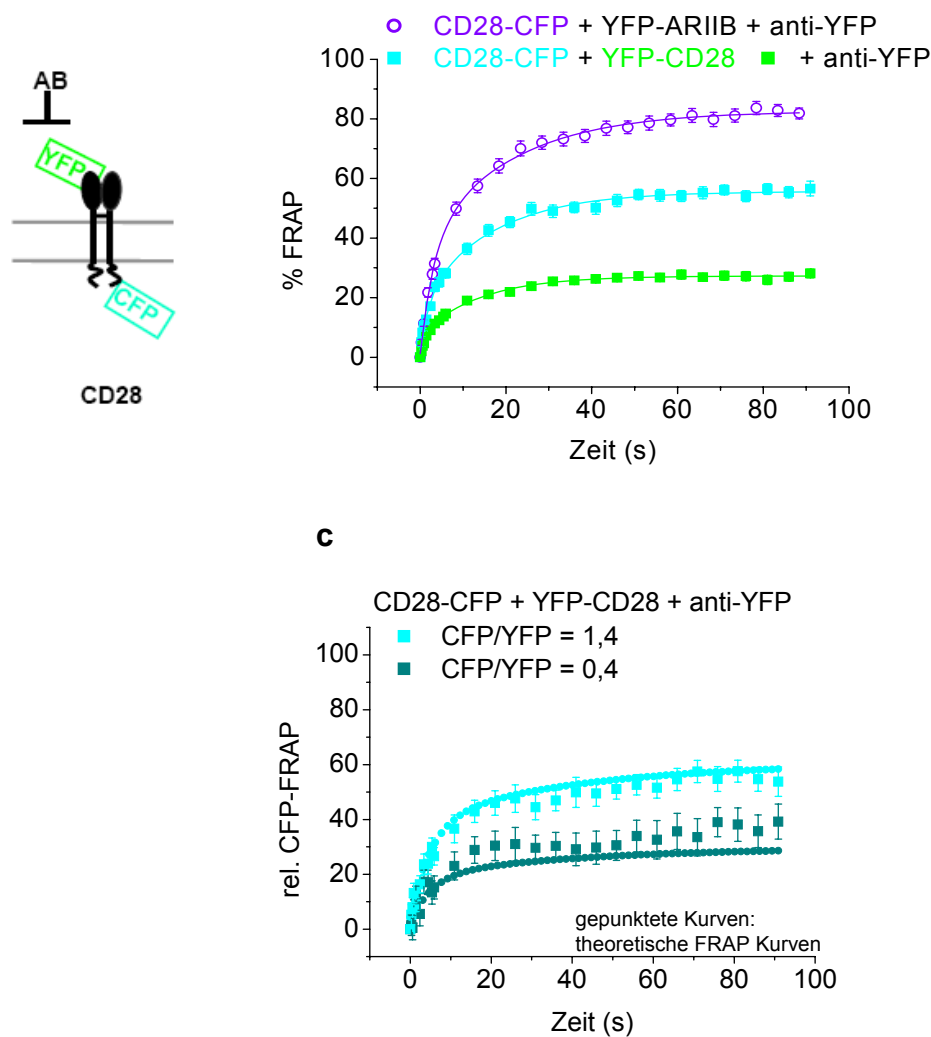
(a) Schematische Darstellung des monomeren CD86 intrazellulär mit CFP bzw. extrazellulär mit YFP markiert. (b) Mittlere FRAP-Kurven  $\pm$  S.E.M. von Antikörper-behandelten Zellen, die einen 1,2-fachen Überschuss an CD86-CFP über YFP-CD86 exprimieren ( $n = 17$ ). Die FRAP-Kurve von CD86-CFP ist in cyan und die simultan detektierte FRAP-Kurve des coexprimierten, Antikörper-immobilisierten YFP-CD86 ist in grün dargestellt. Als Referenzkurve ist die Wiederkehr von CD86-CFP coexprimiert mit nicht-interagierendem Antikörper-behandeltem YFP-ARIIB ( $n = 41$ ) in lila gezeigt. (c) Die cyan-farbene Kurve aus (b) wurde um die unvollständige Immobilisierung extrazellulär-markierter Proteine nach Antikörper-Behandlung und um die unspezifische Immobilisierung korrigiert (siehe Methoden). Die normalisierte Kurve ergab die mittlere relative FRAP-Kurve  $\pm$  S.E.M. für CD86-CFP. Das relative FRAP von CD86-CFP wurde in zwei Gruppen entsprechend der relativen Expressionsverhältnisse klassifiziert: mehr als zweifach höhere Expression von YFP-CD86 über CD86-CFP ( $\text{CFP/YFP} = 0,4 \pm 0,02$ ;  $n = 49$ , dunkelcyan-farbene Kurve) und leichter Überschuss von intrazellulär-markiertem CD86-CFP über extrazellulär-markiertem YFP-CD86 ( $\text{CFP/YFP} = 1,2 \pm 0,05$ ;  $n = 17$ , cyan-farbene Kurve).

Um nun beidem, dem individuellen Grad der Immobilisierungseffizienz in jedem Experiment und dem unspezifischen Immobilisierungseffekt Rechnung zu tragen, wurde das relative FRAP, wie im Methodenteil beschrieben, berechnet. Weiterhin wurden zwei Gruppen entsprechend der relativen Expressionsverhältnisse gebildet: mehr als zweifach höhere Expression von YFP-CD86 über CD86-CFP und leichter Überschuß von CD86-CFP über YFP-CD86. Die relativen Expressionsverhältnisse wurden über den Vergleich mit einem Referenzkonstrukt, welches beide Fluorophore in entsprechender Anordnung enthält, ermittelt (siehe Methoden). Die Kurven von CD86-CFP beider relativer Expressionsverhältnis-Klassen erreichten 100% relatives FRAP und waren deckungsgleich (Abb. 29c). Die relativen Expressionsverhältnisse von CFP- und YFP-markiertem CD86 hatte somit keinen Einfluß auf die Mobilität des intrazellulär-gekennzeichneten Rezeptors. Dies lässt den Schluss zu, dass auch bei der Expression eines Überschusses immobilisierter YFP-CD86 keine Interaktion mit CD86-CFP stattfindet und CD86 tatsächlich als Monomer vorliegt und als solches detektiert werden kann.

## 2.7 FRAP des kovalent dimeren Proteins CD28

Weiterhin wurde untersucht, ob sich mittels der Zwei-Farben-FRAP-Methode ein dimeres Protein auch als solches nachweisen lässt.

Bei einem 1,4-fachen Überschuß CD28-CFP über immobilisiertem YFP-CD28 war nur ca. die Hälfte des CD28-CFP ( $55,6 \pm 3,3\%$ ) mobil, während mit YFP-ARIIB cotransfiziertes CD28-CFP in Antikörper-behandelten Zellen sehr mobil ( $82,5 \pm 4,6\%$ ) war (Abb. 30b). Nach Berechnung des relativen FRAP ergab sich für ein relatives Expressionsverhältnis von CFP/YFP  $\approx 1,4$  eine Mobilität für CD28-CFP von  $61,2 \pm 5,6\%$  (Abb. 30c). Dagegen war bei einem Verhältnis CFP/YFP  $\approx 0,4$ , also einem Überschuß immobilisierter YFP-CD28, die Mobilität auf  $39,6 \pm 3,7\%$  reduziert (Abb. 30c). Die Mobilität von intrazellulär-markiertem CD28 war somit von dem relativen Expressionsverhältnis CFP- und YFP-markierter Rezeptoren (CFP/YFP) abhängig, was auf eine spezifische Interaktion zwischen CD28-Monomeren schließen lässt.



**Abb. 30: Validierung der Zwei-Farben-FRAP-Methode mittels des kovalent dimeren Proteins CD28**

(a) Schematische Darstellung des dimeren, kovalent über eine Disulfidbrücke verbundenen, intrazellulär mit CFP bzw. extrazellulär mit YFP markierten CD28. (b) Mittlere FRAP-Kurven  $\pm$  S.E.M. von Zellen, die einen 1,4-fachen Überschuss an CD28-CFP (cyan-farbene Kurve) über immobilisiertem YFP-CD28 (grüne Kurve) exprimieren ( $n = 35$ ) oder von CD28-CFP (lila Kurve,  $n = 18$ ) coexprimiert mit immobilisiertem YFP-ARIIB. Die cyan-farbene Kurve wurde um unvollständige Immobilisierung extrazellulär-markierter Proteine und um unspezifische Immobilisierung korrigiert (siehe Methoden). Die normalisierte Kurve ergab die mittlere relative FRAP-Kurve  $\pm$  S.E.M. für CD28-CFP. (c) Das relative FRAP von CD28-CFP wurde entsprechend der relativen Expressionsverhältnisse in zwei Gruppen eingeteilt: mehr als zweifach höhere Expression von YFP-CD28 über CD28-CFP ( $\text{CFP/YFP} = 0,4 \pm 0,02$ ,  $n = 33$ , dunkelcyan-farbene Kurve) und leichter Überschuss von intrazellulär-markiertem CD28-CFP über extrazellulär-markiertem YFP-CD28 ( $\text{CFP/YFP} = 1,4 \pm 0,06$ ,  $n = 35$ , cyan-farbene Kurve). Die gepunkteten Linien stellen die theoretisch berechneten FRAP-Kurven eines Dimers bei entsprechenden relativen Expressionsverhältnissen dar.

Um herauszufinden wie sich die Mobilität mit den relativen Expressionsverhältnissen für ein Dimer ändern sollte, wurden theoretische Überlegungen angestellt (siehe Methoden). Bei einem CFP/YFP-Verhältnis von 1 zu 1 sind 25% der Rezeptoren CFP-CFP „Homodimere“, 25% YFP-YFP „Homodimere“ und 50% CFP-YFP „Heterodimere“. Wird YFP mittels Antikörper immobilisiert, bedeutet dies wiederum, dass nur die CFP-CFP „Homodimere“, also 50% der CFP-Moleküle mobil bleiben. Für Expressionverhältnisse CFP/YFP von 0,4 und 1,4 ergab sich entsprechend im Falle einer konstitutiven Dimerisierung eine mobile Fraktion von 28,6% und 58,3% (siehe Methoden). Diese auf theoretischen Überlegungen basierenden Werte stimmen sehr gut mit den experimentell ermittelten relativen FRAP-Werten überein (Abb. 30c).

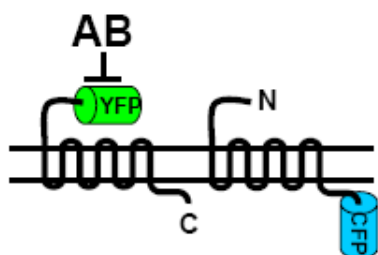
Somit konnte mit der Zwei-Farben-FRAP-Methode ein dimeres Protein auch als Dimer erkannt werden.

Zusammengefasst lässt sich sagen, dass die experimentell ermittelten Daten für ein monomeres und ein dimeres Kontrollprotein in guter Übereinstimmung mit den theoretisch erwarteten Werten waren. Dies bestätigt die verlässliche Anwendbarkeit der Zwei-Farben-FRAP-Methode zur Untersuchung von Membranprotein-Interaktionen.

### 3. Untersuchung der Di-/Oligomerisierung $\beta_1$ - und $\beta_2$ -adrenerger Rezeptoren mittels der Zwei-Farben-FRAP-Methode

Nach der erfolgreichen Validierung wurde diese Zwei-Farben-FRAP-Methode für die Untersuchung des Oligomerisierungszustandes  $\beta$ -adrenerger Rezeptoren verwendet.

Hierfür wurden N- und C-terminal markierte  $\beta$ -AR coexprimiert, die extrazellulär YFP-markierten  $\beta$ -AR mit einem polyklonalen Antikörper immobilisiert und die Mobilität der intrazellulär CFP-markierten Fusionsproteine untersucht (Abb. 31).

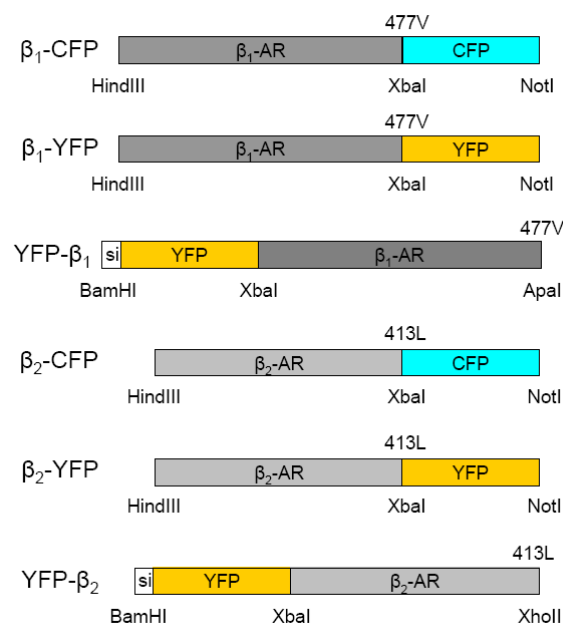


**Abb. 31: Detektion der Di-/Oligomerisierung von  $\beta$ -AR mittels Zwei-Farben-FRAP**

Zellen, die vergleichbare Mengen YFP- $\beta$  und  $\beta$ -CFP bzw.  $\beta$ -CER coexprimierten, wurden zur spezifischen Immobilisierung extrazellulär-markierter Rezeptoren mit Antikörper gegen YFP behandelt. Diese Zellen wurden nachfolgend für Zwei-Farben-FRAP-Experimente verwendet.

### 3.1 Klonierung, Expression und Funktionalität der $\beta_1$ - und $\beta_2$ -AR FRAP-Fusionsproteine

Um Interaktionen zwischen  $\beta_1$ - und  $\beta_2$ -adrenergen Rezeptoren mittels FRAP untersuchen zu können, wurden entsprechende intrazellulär CFP- oder YFP- und extrazellulär YFP-markierte  $\beta_1$ - und  $\beta_2$ -AR-Fusionsproteine generiert (siehe Abb. 32). Die extrazellulär-gekennzeichneten Rezeptoren enthielten eine Signalsequenz für eine bessere Membranlokalisierung und Expression.



**Abb. 32: Schematische Darstellung intra- und extrazellulär CFP- und YFP-markierter  $\beta_1$ - und  $\beta_2$ -AR-Fusionsproteine**

$\beta_1$ -YFP und  $\beta_2$ -YFP wurden bereits in Abb. 12 beschrieben. Für  $\beta_1$ -CFP und  $\beta_2$ -CFP wurde YFP mit den entsprechenden Restriktionsenzymen ausgeschnitten und gegen CFP ersetzt. Für die extrazellulär mit YFP-markierten Fusionsproteine wurde an  $\beta_1$ - bzw.  $\beta_2$ -AR mittels PCR jeweils eine XbaI- und ApaI-Schnittstelle angefügt und derart in einen YFP-enthaltenden Vektor eingefügt, dass sich YFP am N-Terminus des jeweiligen Proteins befand. Vor dem Fluorophor war eine Signalsequenz für eine bessere Membranlokalisierung und Expression lokalisiert.

Die FRAP-Rezeptorfusionsproteine wurden, ebenso wie schon für die BRET-Rezeptorfusionsproteine beschrieben, hinsichtlich ihrer Expression und ihrer Funktionalität mit den entsprechenden Wildtyp-Rezeptoren verglichen.

Die Expression von  $\beta_1$ -CFP und YFP- $\beta_1$  waren mit der des Wildtyp-Rezeptors vergleichbar (Tab. 5). Die Expressionslevel von den verschiedenen  $\beta_2$ -AR-Fusionsproteinen war bei geringen DNA-Mengen teilweise sehr verschieden, gleichen

sich jedoch bei höheren DNA-Mengen an und waren immer etwa so hoch wie die des  $\beta_2$ -WT-Rezeptors (Tab. 5). Auch bei den FRAP-Fusionsproteinen war, wie schon für die BRET-Konstrukte beschrieben, die Expression der  $\beta_1$ -Konstrukte höher als die der  $\beta_2$ -Konstrukte. Die Menge der endogen in HEK 293T-Zellen enthaltenen  $\beta$ -AR war vernachlässigbar.

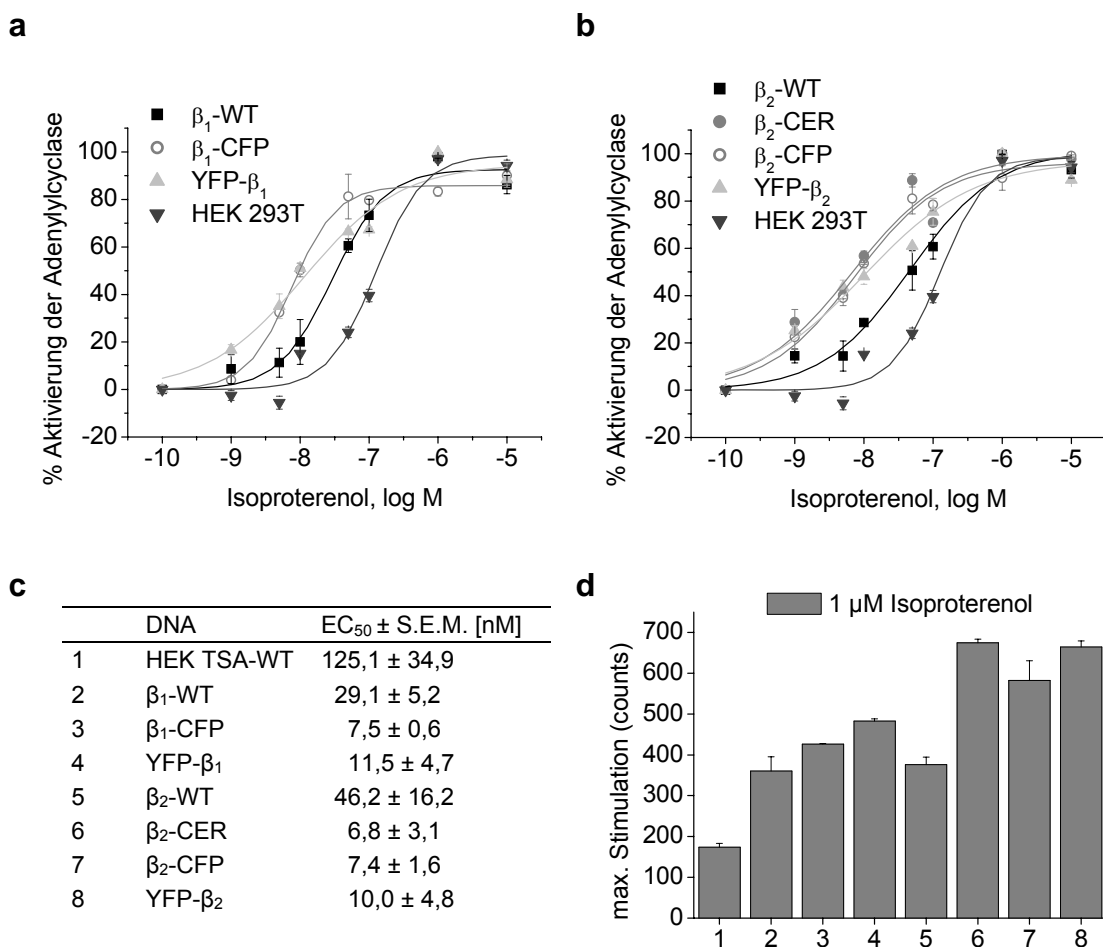
DNA	0,25 $\mu$ g	0,5 $\mu$ g	0,75 $\mu$ g	1,0 $\mu$ g
$\beta_1$ -WT	3,2 $\pm$ 1,6	5,5 $\pm$ 3,2	5,8 $\pm$ 2,9	
$\beta_1$ -CFP	6,1 $\pm$ 1,5	5,9 $\pm$ 1,8	6,6 $\pm$ 0,9	
YFP- $\beta_1$	3,4 $\pm$ 1,9	4,1 $\pm$ 2,0	5,0 $\pm$ 2,5	
$\beta_2$ -WT	0,3 $\pm$ 0,1	0,8 $\pm$ 0,5	1,3 $\pm$ 0,9	1,6 $\pm$ 0,4
$\beta_2$ -CER	1,3 $\pm$ 0,3	1,8 $\pm$ 0,8	1,6 $\pm$ 0,9	2,2 $\pm$ 0,5
$\beta_2$ -CFP	0,8 $\pm$ 0,5	1,1 $\pm$ 0,9	1,7 $\pm$ 0,8	1,8 $\pm$ 0,7
YFP- $\beta_2$	3,1 $\pm$ 1,2	3,3 $\pm$ 1,5	1,9 $\pm$ 0,1	3,1 $\pm$ 0,8
HEK 293T-Zellen (endogener Rezeptor)	0,01 $\pm$ 0,008			

**Tab. 5: Expressionslevel der  $\beta$ -AR Fusionsproteine in Abhängigkeit der DNA-Menge.**

HEK 293T-Zellen wurden mit verschiedenen Mengen DNA (0,25  $\mu$ g, 0,5  $\mu$ g, 0,75  $\mu$ g, 1,0  $\mu$ g), die für die angegebenen  $\beta$ -AR-Fusionsproteine codiert, transient transfiziert. Die Rezeptorexpression wurde mittels Bindung des Radioliganden  $^{125}$ I-Cyanopindolol bestimmt. Die Daten geben Mittelwerte in fmol Rezeptor pro  $\mu$ g Protein  $\pm$  S.E.M. von 2-3 verschiedenen Experimenten gemessen als Doppel- oder Trippelwerte an.

Die Funktionalität der FRAP-Rezeptorfusionsproteine wurde, wie die Funktionalität der BRET-Fusionsproteine, ebenfalls mittels eines Adenylylcyclase-Assays nachgewiesen. Die  $EC_{50}$ -Werte waren sowohl für  $\beta_1$ - als auch für  $\beta_2$ -Fusionsproteine etwas niedriger als für die entsprechenden Wildtyp-Rezeptoren (Abb. 33a-c). Die Kurve der endogenen Rezeptoren der HEK 293T-Zellen zeigt einen etwas höheren  $EC_{50}$ -Wert. Die maximale Stimulation der Adenylylcyclase über die Fusionsproteine war für  $\beta_1$ -Rezeptorkonstrukte vergleichbar und für  $\beta_2$ -Fusionsproteine etwas höher als die maximale Stimulation des Wildtyp-Rezeptors (Abb. 33d).

Folglich wurden die Rezeptorfusionsproteine gut exprimiert und waren in ihrer Funktionalität nicht beeinträchtigt.



**Abb. 33: Funktionelle Eigenschaften der β-AR-FRAP-Fusionsproteine verglichen mit β-WT-AR**

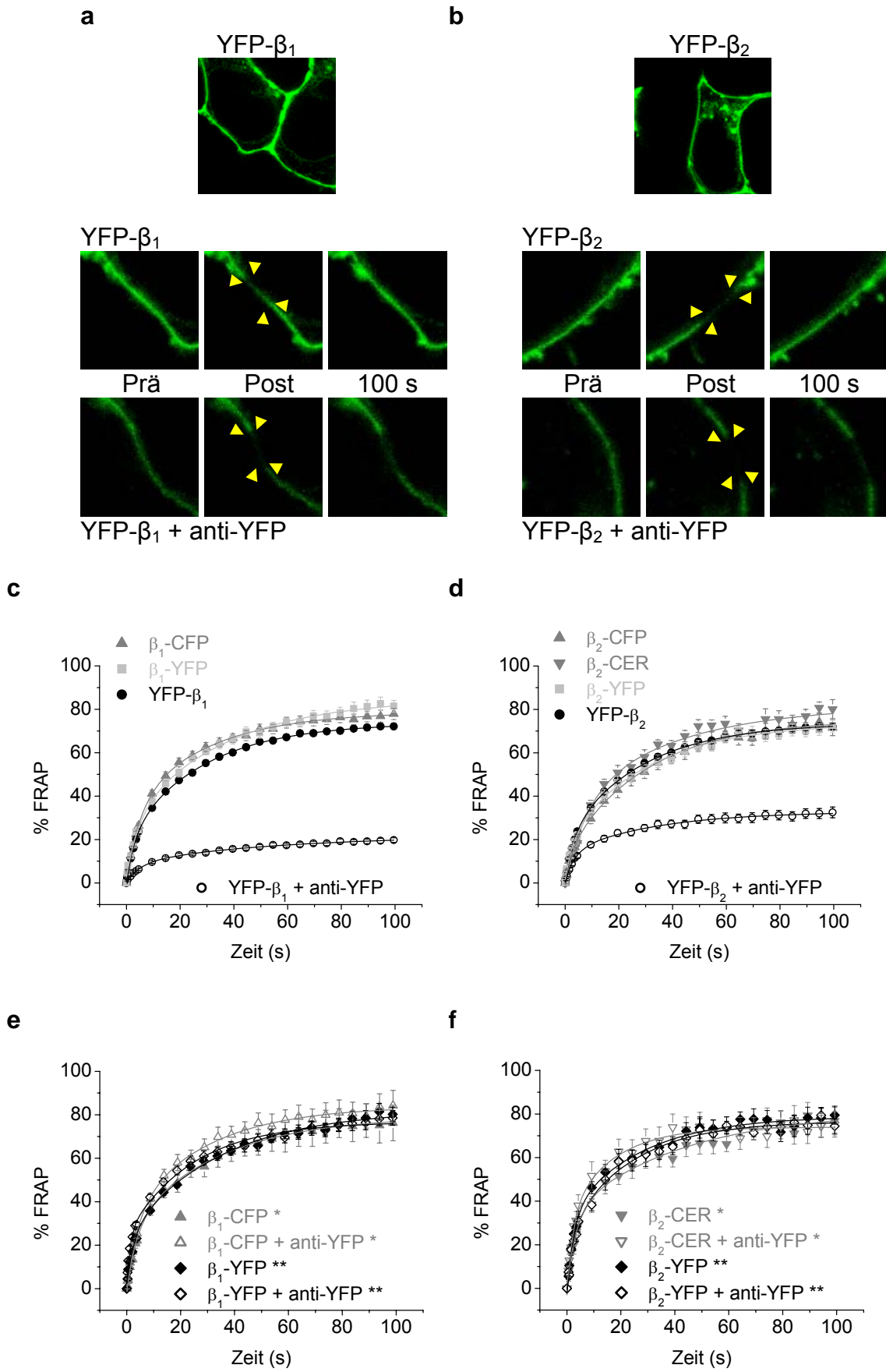
Die Aktivierung der Adenylyl cyclase nach Stimulation mit verschiedenen Konzentrationen Isoproterenol wurde in mit angegebenen β<sub>1</sub>-AR-Fusionsproteinen (a) oder β<sub>2</sub>-AR-Fusionsproteinen (b) transfizierten oder untransfizierten (endogener β-AR) HEK 293T-Zellen gemessen. Die aus den in (a) und (b) gezeigten Kurven ermittelten EC<sub>50</sub>-Werte sind in (c) dargestellt. Die EC<sub>50</sub>-Werte und die maximale Stimulation (d) der Adenylyl cyclase nach Inkubation mit angegebenen Konzentrationen an Isoproterenol repräsentieren Mittelwerte ± S.E.M. von mindestens zwei Experimenten gemessen als Dreifachwerte.

### 3.2 Mobilität und spezifische Immobilisierung β<sub>1</sub>- und β<sub>2</sub>-adrenerger Rezeptoren

Bevor die Homointeraktion von β<sub>1</sub>-AR bzw. β<sub>2</sub>-AR erforscht werden konnte, wurde die Mobilität und Immobilisierbarkeit der individuell transfizierten Rezeptorfusionsproteine überprüft.

Sowohl für β<sub>1</sub>- als auch für β<sub>2</sub>-AR-Fusionsproteine war die Mobilität unabhängig von der Art (CFP, CER, YFP) und der Insertionsstelle (N-Terminus, C-Terminus) des Fluorophors (Abb. 34c, d; Tab. 6).





**Abb. 34: Einfluß der Behandlung mit Antikörper gegen YFP auf HEK 293T-Zellen, die entweder intrazellulär- oder extrazellulär-markierte  $\beta_1$ - oder  $\beta_2$ -AR exprimieren**

(a, b) Konfokalbilder von HEK 293T-Zellen transient transfiziert mit extrazellulär-markierten  $\beta_1$ - oder  $\beta_2$ -AR entweder unbehandelt oder 30 min nach Inkubation mit anti-YFP vor (Prä), sofort nach (Post) oder 100 s nach Bleichen eines  $3 \times 1 \mu\text{m}$  großen ROI (gelbe Pfeile). Die Wiederkehr der unbehandelten Rezeptoren war fast vollständig (obere Reihe), während nur eine geringfügige Wiederkehr nach Inkubation mit anti-YFP (untere Reihe) verzeichnet werden konnte. (c, d) Mittleres FRAP  $\pm$  S.E.M. individuell exprimierter Fluoreszenz-markierter  $\beta_1$ - (c) und  $\beta_2$ -AR (d). FRAP intrazellulär-markierter Rezeptoren ( $\beta_1$ -CFP n = 42,  $\beta_1$ -YFP n = 24,  $\beta_2$ -CER n = 18,  $\beta_2$ -CFP n = 17,  $\beta_2$ -YFP n = 25) und extrazellulär-markierter Rezeptoren (YFP- $\beta_1$  n = 74, YFP- $\beta_2$  n = 12) war vergleichbar. Das FRAP extrazellulär-markierter Rezeptoren war nach Präinkubation mit Antikörper gegen YFP (YFP- $\beta_1$  + anti-YFP n = 42, YFP- $\beta_2$  + anti-YFP n = 32) merklich reduziert. (e, f) Intrazellulär-markierte  $\beta_1$ -AR ( $\beta_1$ -CFP n = 9,  $\beta_1$ -CFP + anti-YFP n = 10,  $\beta_1$ -YFP n = 17,  $\beta_1$ -YFP + anti-YFP n = 21) oder  $\beta_2$ -AR ( $\beta_2$ -CER n = 13,  $\beta_2$ -CER + anti-YFP n = 18,  $\beta_2$ -YFP n = 9,  $\beta_2$ -YFP + anti-YFP n = 7) wurden durch die Behandlung mit anti-YFP nicht in ihrer Mobilität verändert.

Wie schon für CD86 und CD28 beobachtet, gab es eine kleine immobile Fraktion (ca. 20%). Extrazellulär YFP-markierte  $\beta$ -AR konnten ebenfalls spezifisch mit einem polyklonalen Antikörper gegen YFP immobilisiert werden (Abb. 34c, d), ohne dabei intrazellulär-markierte Rezeptoren in ihrer Mobilität zu beeinflussen (Abb. 34e, f). Auch für  $\beta$ -AR war die Immobilisierung nicht vollständig und der Anteil der mobil gebliebenen extrazellulär-markierten  $\beta$ -AR belief sich gleichfalls auf 20-30% (Tab. 6).

Konstrukt	% FRAP	$t_1$	$t_2$	n
$\beta_1$ -CFP	78,9 $\pm$ 8,0	5,0 $\pm$ 4,2	29,3 $\pm$ 27,7	42
$\beta_1$ -YFP	83,7 $\pm$ 7,6	2,6 $\pm$ 2,3	31,5 $\pm$ 15,9	24
YFP- $\beta_1$	73,7 $\pm$ 6,2	3,1 $\pm$ 3,1	28,2 $\pm$ 15,3	74
YFP- $\beta_1$ + anti-YFP	21,6 $\pm$ 11,9	5,6 $\pm$ 7,9	53,7 $\pm$ 139,6	42
$\beta_1$ -CFP *	79,3 $\pm$ 8,4	3,7 $\pm$ 2,7	32,5 $\pm$ 21,8	9
$\beta_1$ -CFP + anti-YFP *	84,0 $\pm$ 7,6	4,3 $\pm$ 3,7	28,4 $\pm$ 22,0	10
$\beta_1$ -YFP **	82,3 $\pm$ 8,7	2,7 $\pm$ 2,3	34,5 $\pm$ 18,8	17
$\beta_1$ -YFP + anti-YFP **	75,1 $\pm$ 4,0	1,0 $\pm$ 0,9	22,0 $\pm$ 7,4	21
$\beta_2$ -CFP	80,8 $\pm$ 12,3	6,4 $\pm$ 5,9	35,1 $\pm$ 41,1	17
$\beta_2$ -CER	75,3 $\pm$ 6,4	2,6 $\pm$ 3,8	30,0 $\pm$ 12,7	18
$\beta_2$ -YFP	73,9 $\pm$ 7,4	3,6 $\pm$ 4,2	31,2 $\pm$ 18,7	25
YFP- $\beta_2$	76,5 $\pm$ 3,9	2,6 $\pm$ 3,4	18,7 $\pm$ 10,2	12
YFP- $\beta_2$ + anti-YFP	32,8 $\pm$ 5,2	3,4 $\pm$ 3,7	32,0 $\pm$ 36,0	32
$\beta_2$ -CER *	80,6 $\pm$ 11,4	3,2 $\pm$ 2,2	39,7 $\pm$ 31,4	13
$\beta_2$ -CER + anti-YFP *	73,6 $\pm$ 2,9	1,3 $\pm$ 1,2	14,1 $\pm$ 6,4	18
$\beta_2$ -YFP **	78,8 $\pm$ 5,6	2,8 $\pm$ 2,4	25,6 $\pm$ 15,6	9
$\beta_2$ -YFP + anti-YFP **	76,4 $\pm$ 1,1	2,2 $\pm$ 0,9	22,1 $\pm$ 2,8	7

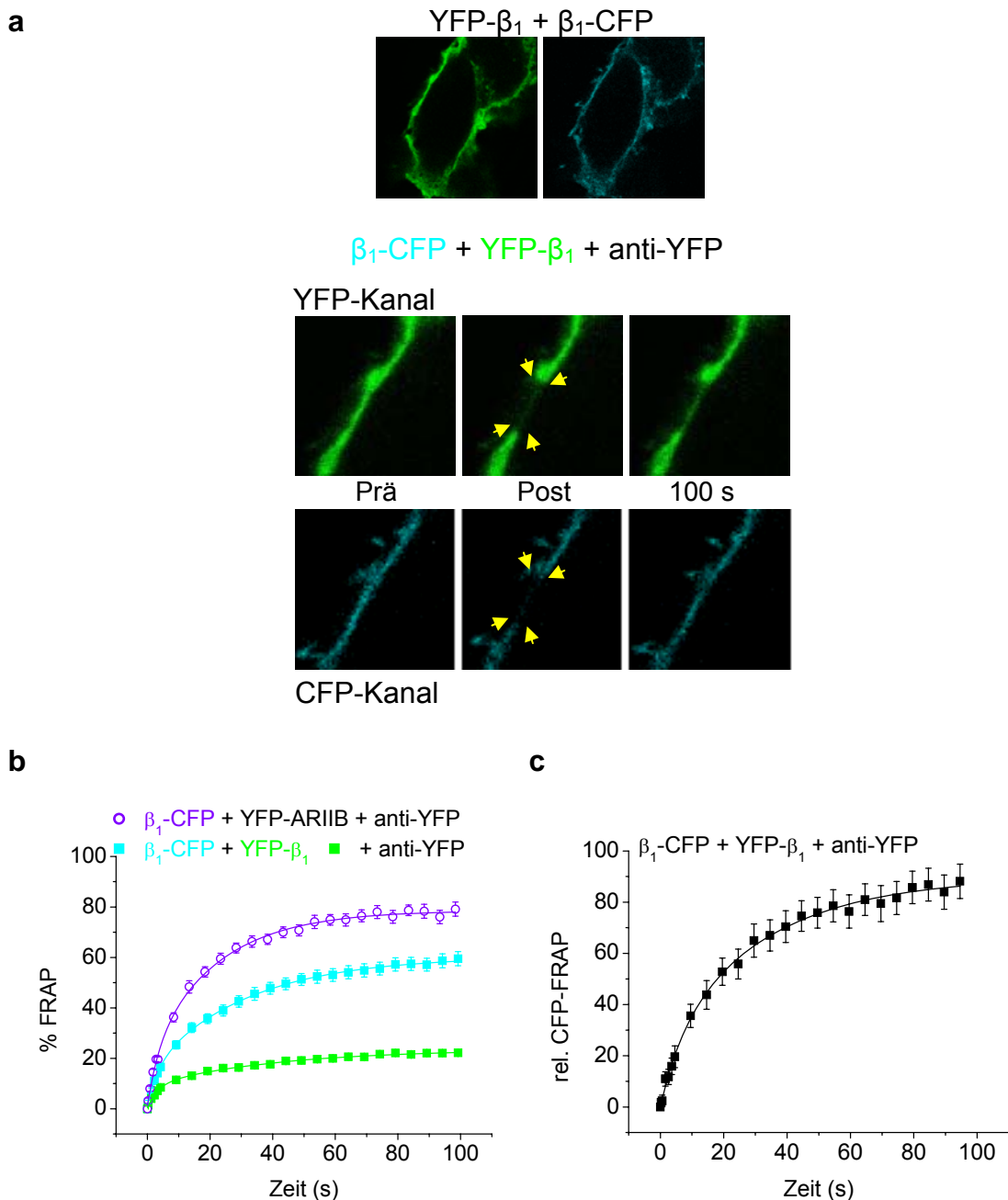
**Tab. 6: Mittleres FRAP und Zeitkonstanten  $t$  der angegebenen  $\beta_1$ - und  $\beta_2$ -Fusionsproteine**  
Die Mittelwerte der gemessenen Daten wurden mittels einer biphasisch-exponentiellen Gleichung (siehe Methoden) gefittet. Die Daten sind als Mittelwerte  $\pm$  S.E.M. angegeben.

### 3.3 Di-/Oligomerisierung von $\beta_1$ -AR

Mittels BRET wurde eine spezifische Interaktion zwischen  $\beta_1$ -AR nur bei höheren Akzeptor-Expressionsleveln gesehen. Nun sollte mittels der Zwei-Farben-FRAP-Methode herausgefunden werden, ob  $\beta_1$ -AR tatsächlich homointeragieren.

Wie in den Konfokalbildern zu sehen, zeigten Zellen mit vergleichbaren Mengen an  $\beta_1$ -CFP und YFP- $\beta_1$  eine merkliche Wiederkehr von  $\beta_1$ -CFP in das gebleichte ROI, während nur eine kleine Fraktion YFP- $\beta_1$  nach Inkubation mit anti-YFP mobil war (Abb. 35a), was auf eine ausreichende Immobilisierung durch den Antikörper schließen lässt. Aus den Konfokalbildern ist weiterhin eine gute Membranlokalisierung von  $\beta_1$ -CFP und YFP- $\beta_1$  sichtbar. Die mittleren FRAP-Kurven zeigen ebenfalls, dass ein merklicher Anteil  $\beta_1$ -CFP in die gebleichte Region diffundiert und YFP- $\beta_1$  gut immobilisiert wurde (Abb. 35b). Die Berechnung des relativen FRAP (siehe Methoden) ergab, dass die Immobilisierung von YFP- $\beta_1$  die Mobilität von coexprimierten  $\beta_1$ -CFP um ca. 15% einschränkte (Abb. 35c).

Es liegt also eine Interaktion zwischen  $\beta_1$ -AR vor, da ein kleiner Teil der  $\beta_1$ -CFP-Rezeptoren im Beobachtungszeitraum nicht in das gebleichte Gebiet diffundiert, sondern von den durch Antikörperbehandlung immobilisierten YFP- $\beta_1$ -Rezeptoren festgehalten wird. Aber diese Interaktion scheint entweder zeitlich begrenzt und schwach zu sein oder nur ein kleiner Anteil der Rezeptoren ist an der Interaktion beteiligt.



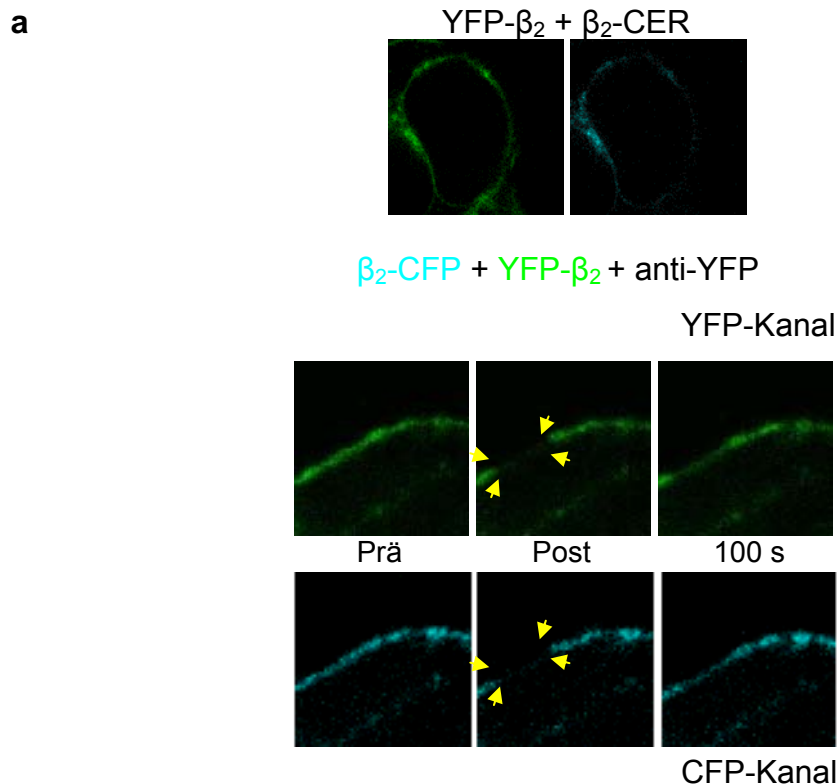
### Abb. 35: Detektion der Di-/Oligomerisierung von $\beta_1$ -AR mittels Zwei-Farben-FRAP

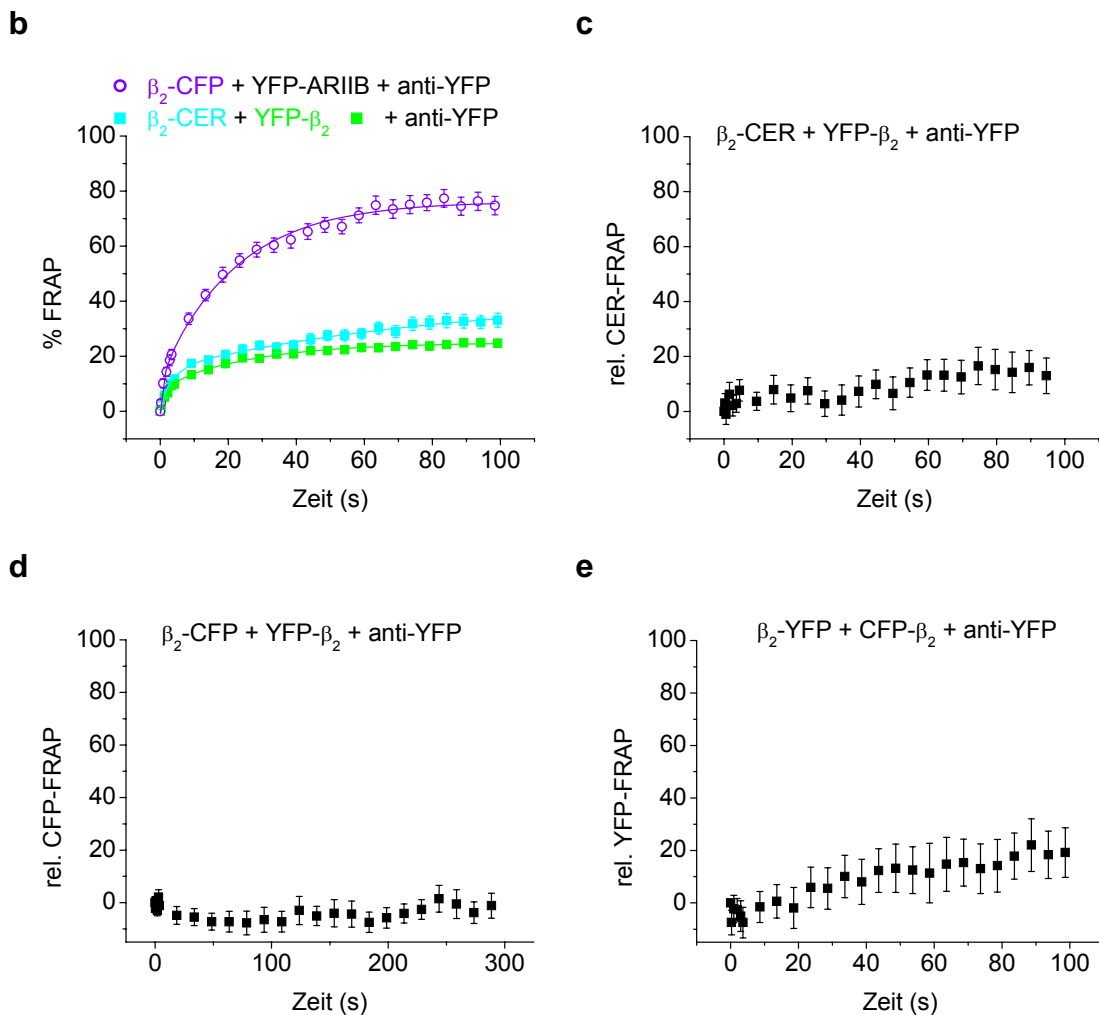
(a) Konfokalbilder der CFP- und YFP-Fluoreszenz von Zellen, die  $\beta_1$ -CFP und YFP- $\beta_1$  exprimieren (obere Reihe). Die Bilder wurden vor (Prä), sofort nach (Post) und 100 s nach dem Photobleichen eines  $3 \times 1 \mu\text{m}$  großen ROI (gelbe Pfeile) von  $\beta_1$ -CFP (untere Reihe) und YFP- $\beta_1$  (mittlere Reihe) coexprimierenden Zellen, die mit anti-YFP vorbehandelt wurden, aufgenommen. Für YFP- $\beta_1$  war nur eine geringe Wiederkehr der Plasmamembranfluoreszenz zu sehen, was auf eine ausreichende Immobilisierung durch die Antikörper-Behandlung schließen lässt. (b) Mittleres FRAP  $\pm$  S.E.M. von Antikörper behandelten Zellen, die  $\beta_1$ -CFP and YFP- $\beta_1$  ( $n = 43$ ) oder  $\beta_1$ -CFP und YFP-ARIIB ( $n = 31$ ) coexprimierten. (c) Nach Analyse der in (b) dargestellten Daten wie unter Methoden beschrieben, wurde die mittlere relative FRAP-Kurve  $\pm$  S.E.M. von  $\beta_1$ -CFP erhalten.

### 3.4 Di-/Oligomerisierung von $\beta_2$ -AR

Aus den BRET-Messungen ging hervor, dass  $\beta_2$ -AR miteinander interagieren. Nun wurde untersucht, ob auch mittels der Zwei-Farben-FRAP-Methode eine Interaktion detektiert werden konnte.

Intra- und extrazellulär-markierte  $\beta$ -AR sind, wie in den Konfokalbildern in Abb. 36a zu sehen, gut an der Zellmembran lokalisiert. Antikörper behandelte Zellen, die etwa gleiche Mengen  $\beta_2$ -CER und YFP- $\beta_2$  coexprimierten, zeigten nur ein geringes FRAP sowohl von YFP- $\beta_2$  als auch von  $\beta_2$ -CER in die gebleichte Region (Abb. 36a, b). Nach Berechnung des relativen FRAP wurde noch deutlicher, dass die CER-markierten  $\beta_2$ -AR beinahe vollständig durch die immobilisierten YFP- $\beta_2$ -Rezeptoren festgehalten wurden (Abb. 36c). Auch nach einem längeren Beobachtungszeitraum von ca. 5 min war kein FRAP messbar (Abb. 36d). Weiterhin hatte die als intrazellulär- bzw. extrazellulär-verwendete GFP-Variante keinen Einfluß auf die Rezeptorinteraktion, da bei Verwendung von YFP als intrazellulärem und CFP als extrazellulärem Marker ebenfalls nur eine geringe Wiederkehr von  $\beta_2$ -YFP zu sehen war (Abb. 36e).





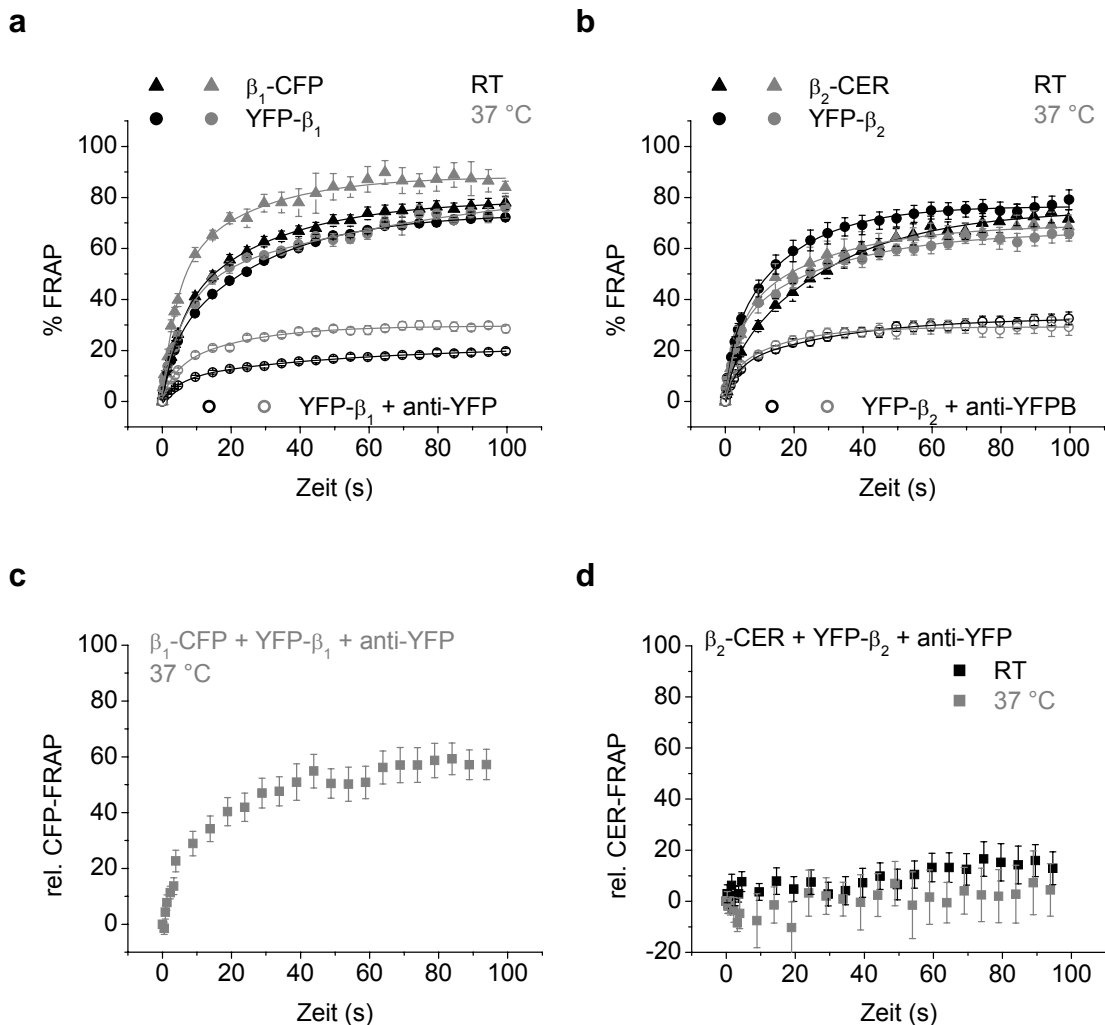
**Abb. 36: Detektion der Di-/Oligomerisierung von  $\beta_2$ -AR mittels Zwei-Farben-FRAP**

(a) Konfokalbilder der CFP- und YFP-Fluoreszenz von Zellen, die  $\beta_2$ -CFP und YFP- $\beta_2$  exprimieren (obere Reihe). Die Bilder wurden vor (Prä), sofort nach (Post) und 100 s nach dem Photobleichen eines  $3 \times 1 \mu\text{m}$  großen ROI (gelbe Pfeile) von  $\beta_2$ -CER (untere Reihe) und YFP- $\beta_2$  (mittlere Reihe) coexprimierenden Zellen, die mit anti-YFP vorbehandelt wurden, aufgenommen. Gebleicht wurden ca. 50-75% der ursprünglichen Fluoreszenz im ROI. (b) Mittlere Fluoreszenzwiederkehr  $\pm$  S.E.M. von  $\beta_2$ -CER und YFP- $\beta_2$  ( $n = 38$ ) oder  $\beta_2$ -CFP und YFP-ARIIB ( $n = 24$ ), coexprimiert in Antikörper präinkubierten Zellen. (c) Nach Analyse der in (b) dargestellten Daten wie unter Methoden beschrieben, wurde die mittlere relative FRAP-Kurve  $\pm$  S.E.M. von  $\beta_2$ -CER erhalten. (d) Relatives FRAP von  $\beta_2$ -CFP über 5 min beobachtet. (e) Die Fluorophoranordnung bei  $\beta_2$ -AR wurde vertauscht (YFP intrazellulär und CFP extrazellulär), die Konstrukte coexprimiert und FRAP nach Immobilisierung von CFP- $\beta_2$  bestimmt ( $n = 28$ ).

Angenommen, dass die CFP- und YFP-markierten Rezeptoren ungefähr in einem 1:1 Verhältnis exprimiert wurden, müsste bei einer Dimerisierung ca. 50% relative CFP-Wiederkehr detektiert werden (siehe III.2.7 und Methoden). Da aber fast kein FRAP in das gebleichte Gebiet festzustellen war, deuten die Daten auf die Bildung von  $\beta_2$ -AR-Komplexen größer als Dimere hin.

### 3.5 Interaktionsmessungen bei physiologischen Temperaturen

FRAP-Messungen wurden auch bei 37 °C durchgeführt, um eine artifizielle Aggregation der Rezeptoren durch eine veränderte Fluidität der Membranproteine bei Raumtemperatur (RT) auszuschließen.



**Abb. 37:  $\beta_1$ - und  $\beta_2$ -AR Homointeraktion bei 37 °C**

Vergleich des mittleren FRAP  $\pm$  S.E.M. von  $\beta_1$ -CFP, YFP- $\beta_1$  und YFP- $\beta_1$  nach Behandlung mit anti-YFP (a) bzw.  $\beta_2$ -CER, YFP- $\beta_2$  und YFP- $\beta_2$  nach Behandlung mit anti-YFP (b) bei Raumtemperatur (RT) und 37 °C (RT:  $\beta_1$ -CFP n = 42, YFP- $\beta_1$  n = 74, YFP- $\beta_1$  + anti-YFP n = 42; 37 °C:  $\beta_1$ -CFP n = 7, YFP- $\beta_1$  n = 5, YFP- $\beta_1$  + anti-YFP n = 12; RT:  $\beta_2$ -CER n = 16, YFP- $\beta_2$  n = 12, YFP- $\beta_2$  + anti-YFP n = 35; 37 °C:  $\beta_2$ -CFP n = 16, YFP- $\beta_2$  n = 9, YFP- $\beta_2$  + anti-YFP n = 10). (c) Mittleres relatives FRAP  $\pm$  S.E.M. von  $\beta_1$ -CFP in Antikörper behandelten Zellen, die YFP- $\beta_1$  coexprimieren (n = 19). (d) Vergleich des mittleren relativen FRAP  $\pm$  S.E.M. von  $\beta_2$ -CER coexprimiert mit YFP- $\beta_2$  in Antikörper behandelten Zellen bei Raumtemperatur (n = 38) und 37 °C (n = 16).

Bei  $\beta_1$ -CFP wurde bei 37 °C verglichen zu Raumtemperatur eine um ca. 10% größere mobile Fraktion detektiert (Abb. 37a). Obwohl für YFP- $\beta_1$  die FRAP-Kurven bei beiden Temperaturen deckungsgleich waren, konnte YFP- $\beta_1$  bei 37 °C nicht so effizient wie bei Raumtemperatur durch anti-YFP immobilisiert werden. Die durchschnittliche Mobilität in Gegenwart von anti-YFP lag dennoch mit ca. 30% ähnlich niedrig wie bei RT.

Die mobile Fraktion von  $\beta_2$ -CER unterschied sich bei beiden Temperaturen nicht signifikant (Abb. 37b), während für YFP- $\beta_2$  die Wiederkehr bei RT etwas höher als bei 37 °C war. Die Geschwindigkeit der Wiederkehr schien bei 37 °C etwas schneller als bei Raumtemperatur zu sein. Die Immobilisierbarkeit durch anti-YFP war unter beiden Bedingungen gleich.

Wie in Abb. 37c zu sehen, scheint eine Interaktion zwischen  $\beta_1$ -AR auch bei physiologischen Temperaturen stattzufinden. Da die relativen Expressionsverhältnisse nicht bestimmt wurden, kann keine Aussage darüber gemacht werden, ob diese in einem höheren oder geringeren Ausmaß als bei Raumtemperatur stattfindet. Für  $\beta_2$ -AR wurde bei 37 °C verglichen zu Raumtemperatur ebenfalls keine Wiederkehr in das gebleichte ROI festgestellt (Abb. 37d). Dies lässt darauf schließen, dass eine Interaktion auch bei physiologischen Temperaturen stattfindet und kein Artefakt veränderter Membranfluidität bei niedrigen Temperaturen ist.

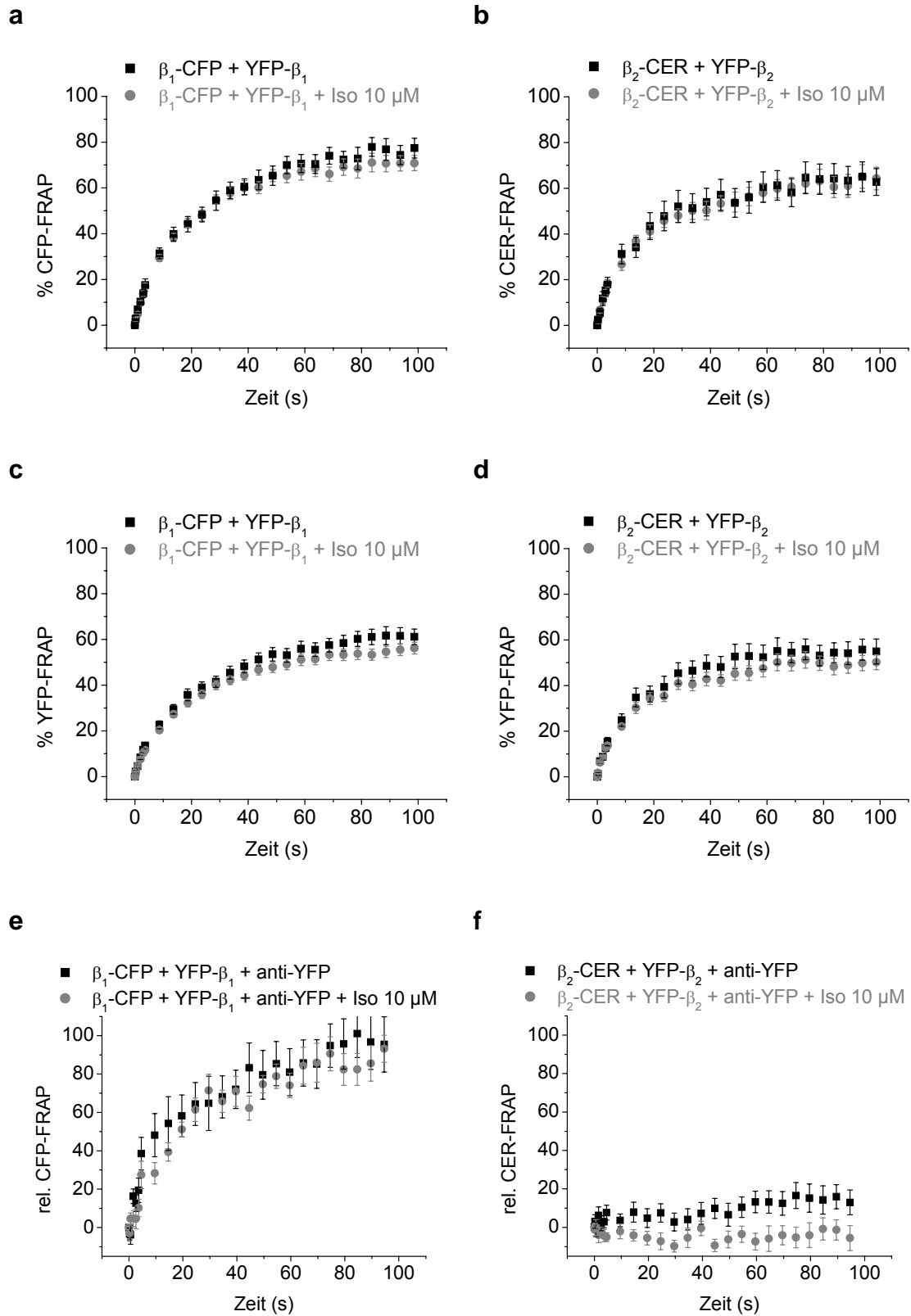
### **3.6 Di-/Oligomerisierungszustand nach Präinkubation mit Agonist bzw. Antagonist**

Weiterhin wurden FRAP-Messungen auch nach Inkubation mit einem  $\beta$ -AR-Agonisten (Isoproterenol) oder Inkubation mit einem  $\beta$ -AR-Antagonisten (Propranolol) durchgeführt, um zu sehen, ob eine Aktivierung bzw. Deaktivierung der Rezeptoren eine Änderung des Di-/Oligomerisierungszustandes bewirkt.

Bei  $\beta_1$ -AR war weder für  $\beta_1$ -CFP (Abb. 38a) noch für YFP- $\beta_1$  (Abb. 38c) eine Änderung der Mobilität nach Inkubation mit 10  $\mu$ M des  $\beta$ -AR-Agonisten Isoproterenol zu sehen. Auch für  $\beta_2$ -AR war nach Coexpression beider Rezeptor-Spezies und Behandlung mit Isoproterenol sowohl für  $\beta_2$ -CER also auch für YFP- $\beta_2$  die Wiederkehr vergleichbar mit der Wiederkehr vor Agonist-Inkubation. Ebenfalls nach vorhergehender Antikörperbehandlung war weder für  $\beta_1$ -AR (Abb. 38e) noch für  $\beta_2$ -AR



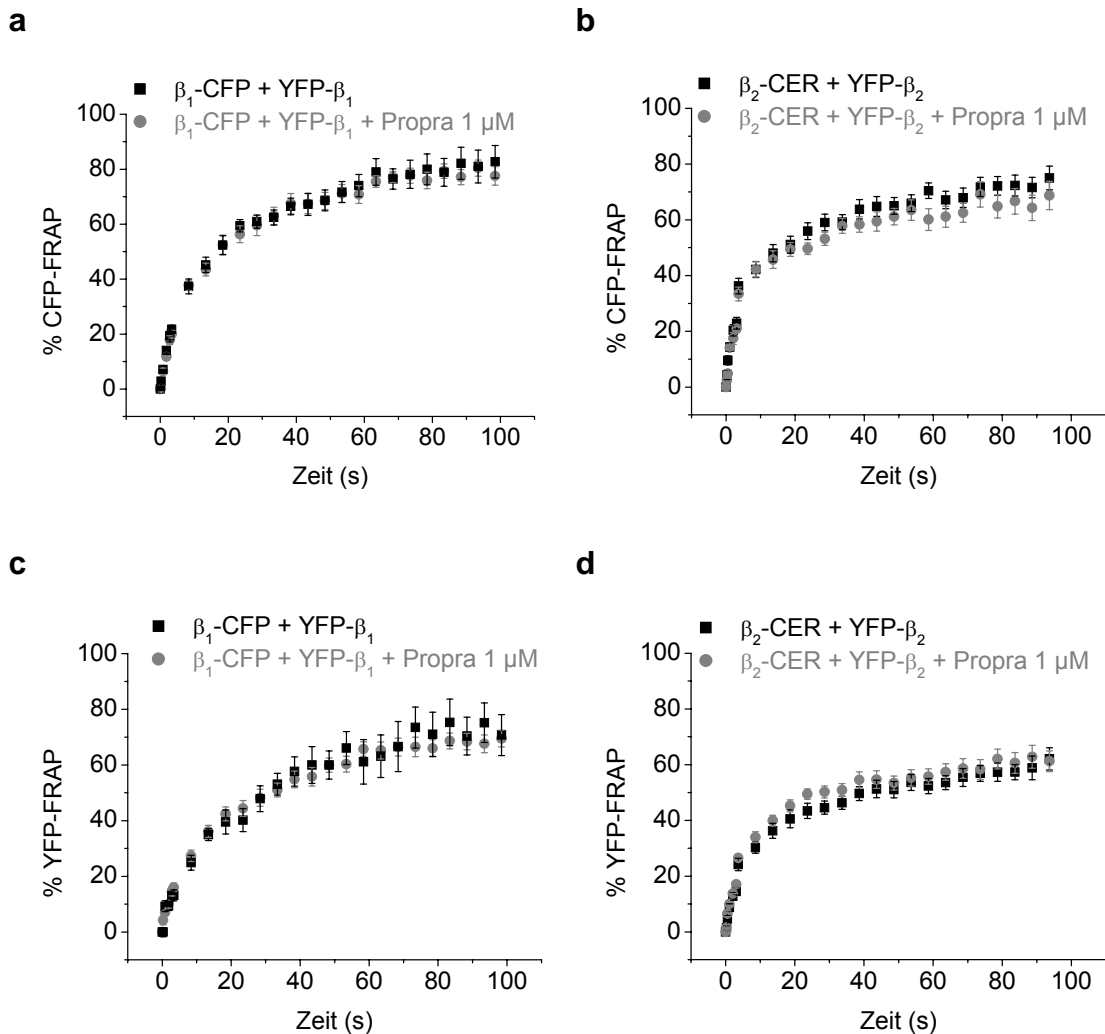
(Abb. 38f) ein Unterschied in der Mobilität zwischen Agonist-behandelten und unbehandelten Rezeptoren zu erkennen.

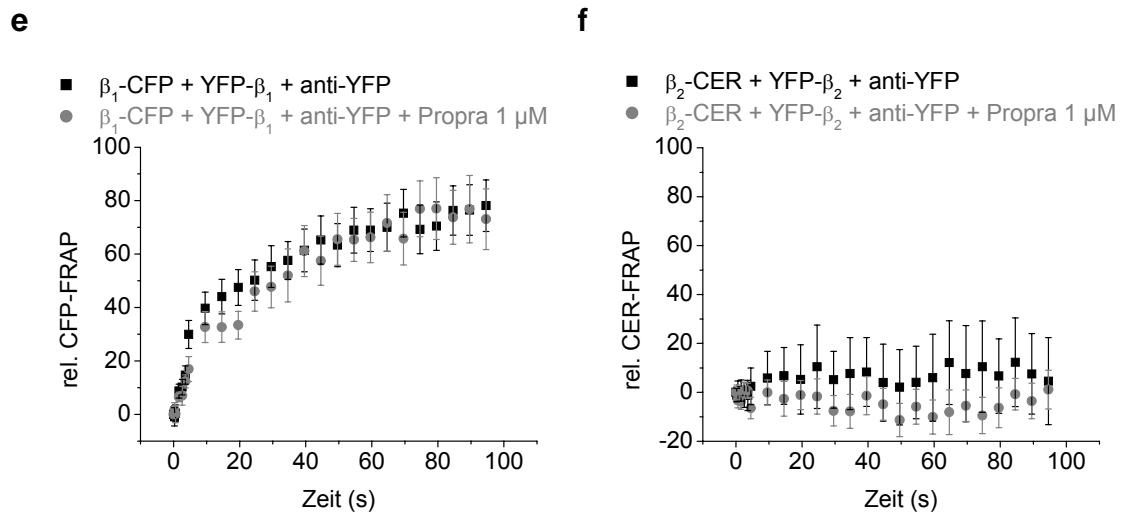


**Abb. 38: Interaktion von  $\beta_1$ -AR bzw.  $\beta_2$ -AR nach Agonist-Behandlung**

Interaktion von  $\beta_1$ -CFP mit YFP- $\beta_1$  (a, c, e) bzw.  $\beta_2$ -CER mit YFP- $\beta_2$  (b, d, f) vor und nach 30-minütiger Inkubation mit dem  $\beta$ -Agonisten Isoproterenol (Iso). Die Wiederkehr wurde sowohl für  $\beta_1$ -CFP (a) als auch für YFP- $\beta_1$  (c) jeweils cotransfiziert ( $\beta_1$ -CFP + YFP- $\beta_1$  n = 17,  $\beta_1$ -CFP + YFP- $\beta_1$  + Iso n = 24), bzw. für  $\beta_2$ -CER (b) als auch YFP- $\beta_2$  (d) ebenfalls cotransfiziert ( $\beta_2$ -CER + YFP- $\beta_2$  n = 10,  $\beta_2$ -CER + YFP- $\beta_2$  + Iso n = 17) ohne Antikörperbehandlung bestimmt. Weiterhin erfolgte eine Messung des relativen FRAP von  $\beta_1$ -CFP (e) und  $\beta_2$ -CER (f) nach Behandlung mit anti-YFP vor und nach 30-minütiger Inkubation mit 10  $\mu$ M Isoproterenol ( $\beta_1$ -CFP + YFP- $\beta_1$  + anti-YFP n = 12,  $\beta_1$ -CFP + YFP- $\beta_1$  + anti-YFP + Iso n = 8,  $\beta_2$ -CER + YFP- $\beta_2$  + anti-YFP n = 38,  $\beta_2$ -CER + YFP- $\beta_2$  + anti-YFP + Iso n = 15).

Auch nach Behandlung mit dem Antagonisten Propranolol (1  $\mu$ M) war keine Mobilitätsänderung von coexprimiertem  $\beta_1$ -CFP und YFP- $\beta_1$  (Abb. 39a, c) bzw.  $\beta_2$ -CER und YFP- $\beta_2$  (Abb. 39b, d) sichtbar. Ebenfalls bei Antikörper-behandelten Zellen zeigte der Antagonist keinen Effekt auf die Interaktion zwischen  $\beta_1$ -AR (Abb. 39e) und  $\beta_2$ -AR (Abb. 39f).





### Abb. 39: Interaktion von $\beta_1$ -AR bzw. $\beta_2$ -AR nach Antagonist-Behandlung

Interaktion von  $\beta_1$ -CFP mit YFP- $\beta_1$  (a, c, e) bzw.  $\beta_2$ -CER mit YFP- $\beta_2$  (b, d, f) vor und nach 30-minütiger Inkubation mit dem  $\beta$ -Antagonisten Propranolol (Propra). Die Wiederkehr wurde sowohl für  $\beta_1$ -CFP (a) als auch für YFP- $\beta_1$  (c) jeweils cotransfiziert ( $\beta_1$ -CFP + YFP- $\beta_1$  n = 13,  $\beta_1$ -CFP + YFP- $\beta_1$  + Propra n = 15), bzw. für  $\beta_2$ -CER (b) als auch YFP- $\beta_2$  (d) ebenfalls cotransfiziert ( $\beta_2$ -CER + YFP- $\beta_2$  n = 19,  $\beta_2$ -CER + YFP- $\beta_2$  + Propra n = 17) ohne Antikörperbehandlung bestimmt. Weiterhin erfolgte eine Messung des relativen FRAP von  $\beta_1$ -CFP (e) und  $\beta_2$ -CER (f) nach Behandlung mit anti-YFP vor und nach 30-minütiger Inkubation mit 1  $\mu$ M Propranolol ( $\beta_1$ -CFP + YFP- $\beta_1$  + anti-YFP n = 26,  $\beta_1$ -CFP + YFP- $\beta_1$  + anti-YFP + Propra n = 12,  $\beta_2$ -CER + YFP- $\beta_2$  + anti-YFP n = 9,  $\beta_2$ -CER + YFP- $\beta_2$  + anti-YFP + Propra n = 18).

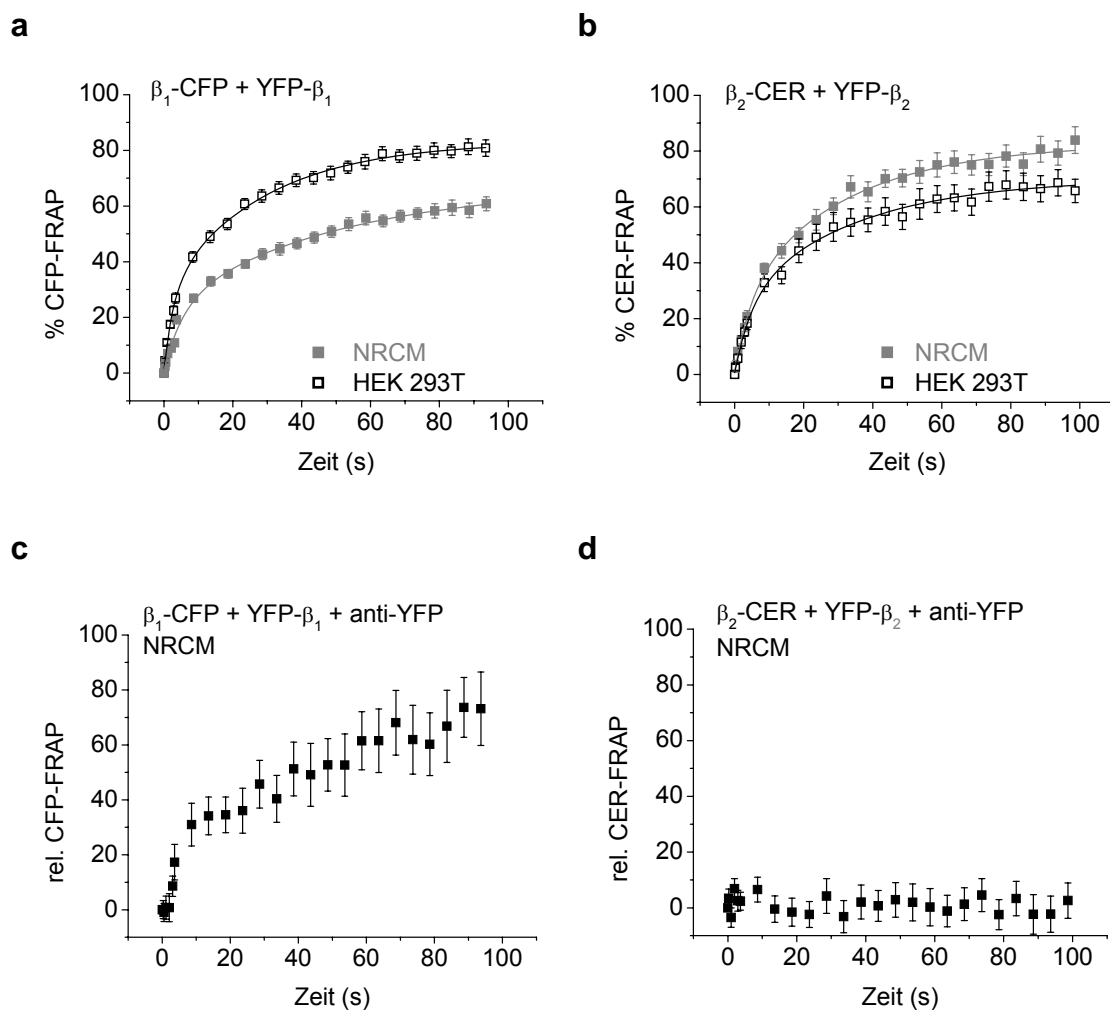
Der Di-/Oligomerisierungszustand von  $\beta_1$ -AR und  $\beta_2$ -AR war somit sowohl für Antikörper-unbehandelte als auch Antikörper-behandelte Zellen unabhängig vom Aktivierungszustand der Rezeptoren.

### 3.7 Interaktionen in neonatalen Rattenkardiomyozyten

Zusätzlich zu den Studien in HEK 293T-Zellen wurde untersucht, ob eine Interaktion zwischen  $\beta$ -AR auch in Zellen geschieht, die physiologisch  $\beta$ -AR exprimieren. Dazu wurden neonatale Rattenkardiomyozyten mit den entsprechenden Rezeptorfusionsproteinen cotransfiziert.

Für  $\beta_1$ -CFP cotransfiziert mit YFP- $\beta_1$  war die Mobilität in neonatalen Rattenkardiomyozyten etwas niedriger als in HEK 293T-Zellen (Abb. 40a). Trotzdem war das relative FRAP nach Antikörper-Behandlung bei 70% (rel. Expressionsverhältnis CFP/YFP =  $0,9 \pm 0,1$ ) (Abb. 40c), was mit dem relativen FRAP

in HEK 293T-Zellen übereinstimmt. Bei  $\beta_2$ -CER dagegen war die Mobilität in neonatalen Rattenkardiomyozyten größer als in HEK 293T-Zellen (Abb. 40b). Nichtsdestotrotz bewirkte die Antikörper-induzierte Immobilisierung von YFP- $\beta_2$  in Kardiomyozyten ebenfalls eine effektive Co-Immobilisierung von  $\beta_2$ -CER (Abb. 40d). Diese Ergebnisse lassen den Schluss zu, dass die in HEK 293T-Zellen beobachteten Interaktionen in gleichem Ausmaß auch in neonatalen Rattenkardiomyozyten, einem Zelltyp der nativ  $\beta$ -AR exprimiert, stattfinden.

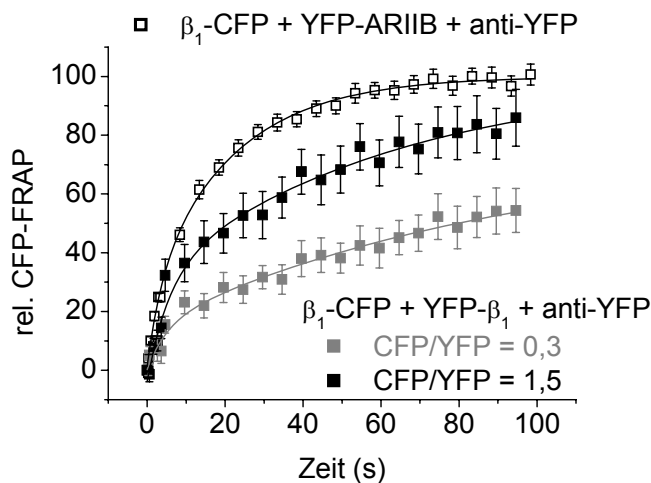


**Abb. 40:  $\beta$ -AR Interaktion in neonatalen Rattenkardiomyozyten**

Vergleich der Mobilität von  $\beta_1$ -CFP cotransfiziert mit YFP- $\beta_1$  (a) bzw.  $\beta_2$ -CER cotransfiziert mit YFP- $\beta_2$  (b) in HEK 293T-Zellen (HEK 293T) und in neonatalen Rattenkardiomyozyten (NRCM) ( $\beta_1$ -CFP + YFP- $\beta_1$ : HEK 293T n = 15, NRCM n = 24). Mittleres relatives FRAP  $\pm$  S.E.M. von  $\beta_1$ -CFP cotransfiziert mit Antikörper-immobilisierten YFP- $\beta_1$  (c) (n = 36) bzw. von  $\beta_2$ -CER cotransfiziert mit Antikörper-immobilisierten YFP- $\beta_2$  (d) (n = 31) in neonatalen Rattenkardiomyozyten.

### 3.8 Stabilität der Homointeraktion zwischen $\beta_1$ -AR

Unter III.3.3 wurde gezeigt, dass eine Mehrheit von  $\beta_1$ -CFP-Rezeptoren nach Immobilisierung von coexprimierten YFP- $\beta_1$ -Rezeptoren mobil blieb, was eine schwache oder transiente Interaktion zwischen diesen Rezeptoren nahe legt. Um das Ausmaß und die Stabilität dieser Interaktion weiter zu charakterisieren, wurden die relativen Expressionsverhältnisse mittels eines Referenzkonstruktes bestimmt. Danach wurden die FRAP-Kurven entsprechend der verschiedenen Expressionsverhältnisse, wie schon für CD86 und CD28 durchgeführt, klassifiziert.



**Abb. 41: Effekt der Variation der Expressionsverhältnisse intrazellulär- und extrazellulär-markierter  $\beta_1$ -AR auf die Rezeptor-vermittelte Immobilisierung.**

Expressionsverhältnisse von  $\beta_1$ -CFP über YFP- $\beta_1$  wurden in zwei Gruppen klassifiziert: Expression von  $\beta_1$ -CFP ein- bis zweifach höher als YFP- $\beta_1$ -Expression (CFP/YFP =  $1,5 \pm 0,1$ , n = 23) oder Expression von YFP- $\beta_1$  mehr als zweifach höher als Expression von  $\beta_1$ -CFP (CFP/YFP =  $0,3 \pm 0,02$ , n = 30). Die normalisierte FRAP-Kurve von  $\beta_1$ -CFP (n = 31) in Antikörper-behandelten Zellen, die YFP-ARIIB coexprimierten, ist ebenfalls gezeigt.

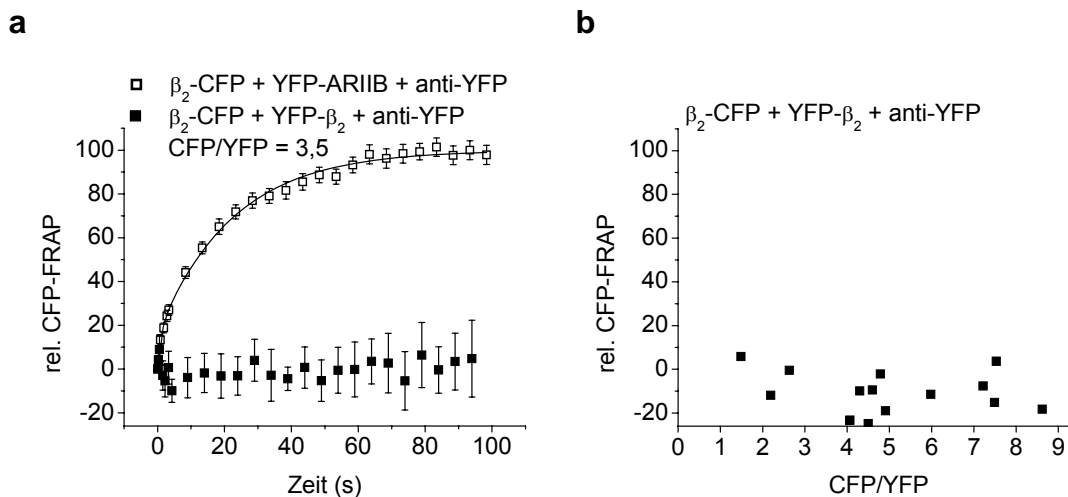
Abb. 41 zeigt, dass die  $\beta_1$ -AR Interaktion abhängig von den Expressionsverhältnissen der extrazellulär- und intrazellulär-markierten Rezeptoren ist. Die Immobilisierung von YFP- $\beta_1$ -Rezeptoren hatte nur einen geringen Effekt auf das Ausmaß der Immobilisierung von  $\beta_1$ -CFP. Dagegen war die Zeit, die für die Fluoreszenzwiederkehr nötig war, merklich verlängert. Innerhalb der Messzeit wurde das volle Ausmaß der Wiederkehr noch nicht erreicht. Bei einem Expressionsverhältnis CFP/YFP  $\approx 1,5$  in Antikörper-inkubierten Zellen, war die Zeitkonstante für  $\beta_1$ -CFP auf 63 s und bei einem

Verhältnis von CFP/YFP  $\approx 0,3$  auf 155 s verlängert, verglichen zu 22 s in Antikörper-behandelten Zellen, die YFP-ARIIB coexprimierten. Bei einem Expressionsverhältnis CFP/YFP  $\approx 0,3$  sind  $\beta_1$ -CFP-Homodimere vernachlässigbar (lt. theoretischem CFP-FRAP ca. 23%). Die Zeitkonstanten  $t_1$  unterschieden sich dabei nicht ( $3,6 \pm 4,4$  s für  $\beta_1$ -CFP + YFP-ARIIB;  $\beta_1$ -CFP + YFP- $\beta_1$ :  $4,8 \pm 1,5$  s bei CFP/YFP  $\approx 1,5$  und  $5,6 \pm 2,2$  s bei CFP/YFP  $\approx 0,3$ ).

Diese Ergebnisse implizieren, dass die Interaktion zwischen  $\beta_1$ -AR nicht stabil ist, sondern eher dynamisch in einem Bereich von Sekunden.

### 3.9 Dimerisierung versus Oligomerisierung von $\beta_2$ -AR

Wie unter III.3.4 bereits gesehen, scheinen  $\beta_2$ -AR größere Komplexe als Dimere zu bilden. Mit anderen Methoden wie z. B. BRET ist es schwierig zwischen Dimerisierung und Oligomerisierung von Rezeptoren zu unterscheiden. Um einen besseren Einblick in den Oligomerisierungszustand der  $\beta_2$ -AR zu gewinnen, wurden Bedingungen mit verschiedenen relativen Expressionsverhältnissen verglichen.



#### Abb. 42: Dimerisierung versus höhergradige Oligomerisierung von $\beta_2$ -AR

(a) Selbst wenn ein ca. vierfacher Überschuss (im Mittel  $3,5 \pm 0,5$ )  $\beta_2$ -CFP über YFP- $\beta_2$  exprimiert wurde, war kein FRAP von  $\beta_2$ -CFP detektierbar ( $n = 10$ ). Die normalisierte FRAP-Kurve von  $\beta_2$ -CFP ( $n = 24$ ) in Antikörper-behandelten Zellen, die YFP-ARIIB coexprimieren, ist ebenfalls gezeigt. (b) Relatives FRAP 84 s nach dem Photobleichen von  $\beta_2$ -CFP bei allen gemessenen Expressionsverhältnissen ( $n = 14$ ).

Selbst in Zellen, die einen ca. 3,5-fachen Überschuss  $\beta_2$ -CFP über Antikörper-immobilisierte YFP- $\beta_2$  exprimierten, war keine Diffusion von  $\beta_2$ -CFP in das gebleichte Gebiet detektierbar (Abb. 42a). Im Falle einer exklusiven und stabilen Dimerbildung sollten 78% der  $\beta_2$ -CFP-Rezeptoren unter diesen Bedingungen mobil bleiben (siehe Methoden). Außerdem war bei allen gemessenen CFP/YFP-Verhältnissen die Mobilität von  $\beta_2$ -CFP komplett eingeschränkt (Abb. 42b). Diese Ergebnisse lassen darauf schließen, dass ein YFP- $\beta_2$ -Rezeptor die Mobilität von mindestens vier  $\beta_2$ -CFP-Rezeptoren einschränken kann. Dies bedeutet, dass  $\beta_2$ -AR als Komplexe höherer Ordnung vorliegen.

### 3.10 Heterointeraktion zwischen $\beta_1$ -AR und $\beta_2$ -AR

Mittels BRET wurde einerseits ein spezifisches Signal bei der Kombination  $\beta_2$ -Rluc coexprimiert mit  $\beta_1$ -YFP gesehen, andererseits war bei der umgekehrten Variante  $\beta_1$ -Rluc cotransfiziert mit  $\beta_2$ -YFP keine spezifische Interaktion zwischen  $\beta_1$ - und  $\beta_2$ -AR feststellbar (siehe III.1.5). Dies sollte nun mittels Zwei-Farben-FRAP näher betrachtet werden.

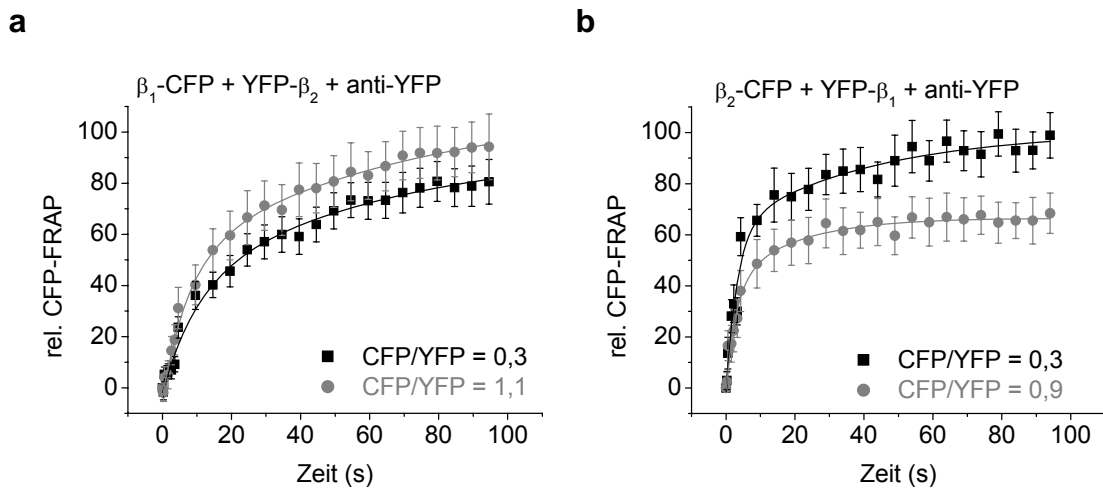
Hierfür wurden die beiden möglichen Rezeptor-Fluorophor-Kombinationen  $\beta_1$ -CFP und YFP- $\beta_2$  oder  $\beta_2$ -CFP und YFP- $\beta_1$  in HEK 293T-Zellen exprimiert. Die relativen Expressionsverhältnisse wurden, wie oben beschrieben, mittels eines Referenzkonstruktes bestimmt und das relative FRAP in entsprechende Klassen eingeteilt.

Für die Kombination  $\beta_1$ -CFP und YFP- $\beta_2$  war das relative FRAP bei einem ungefähren 1:1 Expressions-Verhältnis vollständig (Abb. 43a). Auch bei einem über dreifachen Überschuss an YFP- $\beta_2$  über  $\beta_1$ -CFP war das FRAP von  $\beta_1$ -AR fast vollständig ( $93,9 \pm 58,2\%$  mobile Fraktion). Die Zeitkonstante für das FRAP von  $\beta_1$ -CFP war bei diesem Expressionsverhältnis aber auf 62,7 s verlängert, verglichen zu 22 s in Antikörper-behandelten Zellen, die YFP-ARIIB coexprimieren (siehe III.3.8). Dies könnte ein Hinweis auf eine sehr schwache, transiente Interaktion sein.

Bei  $\beta_2$ -CFP coexprimiert mit YFP- $\beta_1$  war die Wiederkehr bei einem ungefähren 1:1 Verhältnis interessanterweise nur ca. 70%. Dies könnte durch die Komplexbildung von  $\beta_2$ -AR zu erklären sein. Einige der YFP- $\beta_1$  könnten in einem solchen  $\beta_2$ -CFP-Komplex eingeschlossen sein und nach Immobilisierung somit den  $\beta_2$ -CFP-Komplex festhalten. Wurde hingegen ein ca. dreifacher Überschuss YFP- $\beta_1$  über  $\beta_2$ -CFP exprimiert, war die

Wiederkehr vollständig ( $100,3 \pm 15,8\%$ ). Auch die Zeitkonstante unterschied sich nicht sehr stark (41 s) verglichen mit  $\beta_2$ -CFP in Antikörper-behandelten YFP-ARIIB coexprimierenden Zellen (22 s).

Somit war bei Raumtemperatur keine oder eine nur sehr schwache Heterointeraktion zwischen  $\beta_1$ - und  $\beta_2$ -AR mittels Zwei-Farben-FRAP detektierbar.



**Abb. 43: Heterointeraktion von  $\beta_1$ -AR mit  $\beta_2$ -AR**

HEK 293T-Zellen wurden entweder mit  $\beta_1$ -CFP und YFP- $\beta_2$  (a) oder  $\beta_2$ -CFP und YFP- $\beta_1$  (b) cotransfiziert und anschließend mit anti-YFP behandelt. Die relativen FRAP-Kurven wurden nach relativen Expressionsverhältnissen in zwei Gruppen klassifiziert: Expression von CFP und YFP ca. 1:1 ( $\beta_1$ -CFP + YFP- $\beta_2$  + anti-YFP n = 27, CFP/YFP =  $1,1 \pm 0,2$ ;  $\beta_2$ -CFP + YFP- $\beta_1$  + anti-YFP n = 13, CFP/YFP =  $0,9 \pm 0,1$ ) und YFP-Expression mindestens doppelt so hoch wie CFP-Expression ( $\beta_1$ -CFP + YFP- $\beta_2$  + anti-YFP n = 33, CFP/YFP =  $0,3 \pm 0,02$ ;  $\beta_2$ -CFP + YFP- $\beta_1$  + anti-YFP n = 22, CFP/YFP =  $0,3 \pm 0,03$ ).

Für  $\beta_1$ -AR wurde eine dynamische Interaktion festgestellt, während  $\beta_2$ -AR als Komplexe höherer Ordnung vorliegen. Zwischen  $\beta_1$ - und  $\beta_2$ -AR war nur eine schwache Heterointeraktion mittels Zwei-Farben-FRAP detektierbar.



## IV. DISKUSSION

Die hier präsentierte Arbeit hatte das Ziel, eine unabhängige, auf Mobilitätsmessungen basierende Methode zur Untersuchung der Größe und Stabilität von Proteinkomplexen in lebenden Zellen zu etablieren, zu validieren und zur Analyse von Interaktionen zwischen  $\beta$ -AR anzuwenden. Die Existenz und Funktionalität von Rezeptor Di- oder Oligomeren ist für die meisten GPCR noch immer ungeklärt. Eine Ursache hierfür ist, dass die bisher verwendeten Detektionsverfahren wie Coimmunopräzipitation, FRET und BRET die Stabilität der Interaktion, die Größe der Rezeptorkomplexe und das Ausmaß der Rezeptor-Rezeptor-Interaktion nicht oder nur technisch aufwendig bestimmen können.

Vor der Anwendung der Zwei-Farben-FRAP-Methode zur Untersuchung der Größe und Stabilität von Interaktionen zwischen  $\beta$ -AR wurde die Methode hinsichtlich der Unterscheidbarkeit zwischen Monomeren, Dimeren und Oligomeren und zwischen stabilen und transienten Interaktionen mittels eines monomeren und eines kovalent dimeren Proteins erfolgreich validiert. Wichtig hierfür war auch die Bestimmung der relativen Expressionsverhältnisse intra- und extrazellulär-markierter Proteine mittels eines Referenzkonstruktes.

Für  $\beta_1$ -AR wurde eine transiente Interaktion festgestellt, während  $\beta_2$ -AR als Komplexe höherer Ordnung vorlagen. Zwischen  $\beta_1$ - und  $\beta_2$ -AR war nur eine schwache Heterointeraktion mittels Zwei-Farben-FRAP detektierbar. Diese Unterschiede waren bisher unter Verwendung der oben erwähnten Messtechniken nicht beschrieben worden.

### **1. Untersuchung der Di-/Oligomerisierung $\beta_1$ - und $\beta_2$ -adrenerger Rezeptoren mittels Biolumineszenz-Resonanz-Energie-Transfer (BRET)**

Zunächst wurde in dieser Arbeit mittels BRET die Interaktion zwischen  $\beta_1$ - und  $\beta_2$ -AR untersucht, um dann diese Resultate mit den Ergebnissen der entwickelten Zwei-Farben-FRAP-Methode vergleichen zu können.

Zwischen  $\beta_1$ -AR und  $\beta_2$ -AR wurden Unterschiede im BRET-Assay festgestellt. Für  $\beta_1$ -AR war ein spezifisches BRET-Signal nur bei YFP/Rluc-Expressionsverhältnissen größer zwei detektierbar, d. h. das Signal war ab diesem Expressionsverhältnis merklich

höher als das gemessene „Bystander“-BRET. Dagegen wurde für  $\beta_2$ -AR ein spezifisches BRET-Signal schon bei niedrigeren Expressionsverhältnissen gemessen, da das Signal schon bei einem 1:1 Expressionsverhältnis von Donor- und Akzeptorfusionskonstrukt merklich über dem „Bystander“-BRET-Signal lag. Somit scheint  $\beta_2$ -AR tatsächlich zu di- oder oligomerisieren, während eine Interaktion zwischen  $\beta_1$ -AR erst bei höheren Expressionsverhältnissen in detektierbarem Maße stattzufinden scheint. Der beobachtete Unterschied zwischen  $\beta_1$ -AR und  $\beta_2$ -AR könnte an verschiedenen Affinitäten der Rezeptoren zueinander liegen, d. h. dass die Interaktion zwischen  $\beta_2$ -AR stabiler als die Interaktion zwischen  $\beta_1$ -AR ist. Transiente Interaktionen resultieren meist in einem Energietransfer, dieser kann aber zu schnell für die Detektion sein<sup>92</sup>. Da bei einem höheren relativen Expressionsverhältnis mehr Energietransfer-Ereignisse stattfinden, könnte eine transiente Interaktion besser detektierbar sein und somit das Signal dann über dem „Bystander“-BRET-Niveau liegen. Zum anderen ist der Energietransfer auch abhängig von der Distanz und Orientierung des Donors und Akzeptors<sup>92</sup>. Obwohl  $\beta_1$ -AR- und  $\beta_2$ -AR-Fusionskonstrukte den gleichen primären Aufbau haben, können sich diese in ihrer Tertiärstruktur unterscheiden oder durch die Interaktion eine Konformationsänderung erfahren, resultierend in einer unterschiedlichen Entfernung und Orientierung der Donor- und Akzeptormoleküle. Ein niedrigerer absoluter Expressionslevel von  $\beta_1$ -AR verglichen zu  $\beta_2$ -AR kann nicht Ursache des niedrigeren Signals sein, da  $\beta_1$ -AR meist vier- bis fünffach stärker als  $\beta_2$ -AR exprimiert wurde. Zudem soll die BRET-Methode sensitiv genug sein, Interaktionen auch bei physiologischen Rezeptorkonzentrationen zu detektieren<sup>92</sup>.

Die Stärke des BRET-Signals von  $\beta_1$ -AR und  $\beta_2$ -AR wurde nicht messbar durch die Stimulation der Rezeptoren mit Agonist (10  $\mu$ M Isoproterenol) verändert (Abb. 17). Es könnte sein, dass die Änderungen so gering sind und somit nicht zu einer messbaren Änderung im Signal führen, da schon ohne Agonistgabe ein Signal gemessen wurde. Dieses basale Signal lässt auf eine konstitutive Interaktion schließen und darauf, dass Rezeptor-Aktivierung bei  $\beta$ -AR wahrscheinlich keinen Einfluß auf den Oligomerisierungsgrad hat. Eine vom Aktivierungszustand des Rezeptors unabhängige Interaktion wurde auch für weitere GPCR wie beispielsweise zwischen DOR<sup>47</sup>,  $\alpha_{1A}$ -AR<sup>59</sup>,  $\alpha_{1B}$ -AR<sup>59</sup> und  $\alpha_{1D}$ -AR<sup>59</sup> gefunden.

Ob eine Heterointeraktion zwischen  $\beta_1$ - und  $\beta_2$ -AR stattfindet, geht aus den vorliegenden BRET-Messungen nicht eindeutig hervor. Für die Kombination  $\beta_2$ -Rluc

coexprimiert mit  $\beta_1$ -YFP konnte ein spezifisches Signal detektiert werden (Abb. 18c, d), während für  $\beta_1$ -Rluc cotransfiziert mit  $\beta_2$ -YFP keine spezifische Interaktion zwischen  $\beta_1$ - und  $\beta_2$ -AR feststellbar (Abb. 18a, b) war. Mögliche Ursache für die Unterschiede beider Kombinationen könnte eine unterschiedliche Distanz und/oder Orientierung der Fluorophore zueinander sein. Für das BRET-Paar  $\beta_2$ -Rluc- $\beta_1$ -YFP scheinen die Bedingungen für einen Energietransfer günstig zu sein, dagegen für  $\beta_1$ -Rluc- $\beta_2$ -YFP anscheinend ungünstig. Da der Energietransfer, wie aus der Förster-Gleichung ersichtlich (siehe I.5), stark von der Distanz der Fluorophore und der Orientierung der Dipole zueinander abhängt, können kleine Unterschiede zu einem großen Effekt führen. Somit ist es durchaus möglich, dass eine Interaktion zwischen markierten Proteinen stattfindet, diese jedoch nicht detektiert werden kann.

Bevor Messungen mit den Rezeptor-Fusionsproteinen durchgeführt wurden, wurde deren Funktionsfähigkeit hinsichtlich Expression und Adenylylcyclase-Aktivierung überprüft. Ein solcher Funktionalitätstest ist wichtig, da in einer Studie geringe Unterschiede in der Ligandenbindung und der Internalisierung zwischen GFP-markierten  $\beta_1$ - und  $\beta_2$ -AR verglichen zu den entsprechenden Wildtyp-Rezeptoren beobachtet wurden<sup>140</sup>.

Zwischen den Expressionsleveln und den Lumineszenz- bzw. Fluoreszenzintensitäten von  $\beta_1$ -AR- und  $\beta_2$ -AR-Fusionsproteinen bestand ein linearer Zusammenhang, wobei dieser für  $\beta_1$ - und  $\beta_2$ -AR jeweils gleiche Steigungen aufwies (Abb. 15). Eine lineare Korrelation wurde schon früher beschrieben<sup>40,43</sup>, jedoch wurden für  $\beta_1$ - und  $\beta_2$ -AR-Fusionskonstrukte jeweils unterschiedliche Steigungen festgestellt, deren exakte Ursache jedoch unbekannt sei<sup>40</sup>. Die Art des GPCR wurde als möglicher Grund genannt, da verschiedene GPCR die Proteinfaltung und somit beispielsweise die Enzymaktivität der Rluc beeinflussen könnten<sup>19</sup>.

Die hyperbolisch-geformten BRET-Sättigungskurven für  $\beta_1$ -AR (Abb. 16b) und  $\beta_2$ -AR (Abb. 16d) erreichten mit steigenden YFP/Rluc-Verhältnissen ein Plateau. Dieses kommt dadurch zustande, dass bei konstanter Menge  $\beta$ -Rluc und steigender Menge Akzeptor-markierter Rezeptoren bei einer Interaktion der Donor zunehmend limitierend wird. Im Gegensatz dazu zeigte das „Bystander“-BRET eine lineare Korrelation, langsam zunehmend mit steigenden Expressionsverhältnissen. Dieses lineare Verhältnis ist ein Zeichen für eine unspezifische Interaktion, da mit steigender Akzeptorexpression die Wahrscheinlichkeit zunimmt auf einen Donor zu treffen. Das sogenannte

„Bystander“-BRET entsteht durch unspezifische Interaktionen und zufällige Kollisionen, hervorgerufen durch hohe Rezeptordichten.

Zur Bestimmung des „Bystander“-BRET wurde in dieser Arbeit ein an der Zellmembran lokalisiertes YFP (mYFP) verwendet. Dabei wurde angenommen, dass zwischen  $\beta$ -Rluc und mYFP keine spezifische Interaktion stattfindet. Bei der Auswahl der Kontrollproteine ist darauf zu achten, dass diese mit gleicher Stärke im gleichen Kompartiment wie die zu untersuchenden Proteine exprimiert werden<sup>93</sup>. Ein anderer GPCR würde sich hierfür eignen. Jedoch ist eine Interaktion mit dem zu untersuchenden Rezeptor nicht auszuschließen. Auch eine Interaktion des Kontrollproteins mit sich selbst muß in Betracht gezogen werden<sup>76</sup>. Dies würde die Anzahl der für die unspezifische Interaktion zur Verfügung stehenden Rezeptoren verringern, was zu einer falschen Abschätzung des „Bystander“-BRET führen könnte. Somit erschien mYFP als geeignete Negativkontrolle, da es in der Zellmembran lokalisiert ist und ähnlich stark wie  $\beta_1$ -AR exprimiert wurde.

Bisherige Studien zur Detektion von Interaktionen zwischen  $\beta_1$ - und  $\beta_2$ -AR wurden fast ausschließlich mittels Coimmunopräzipitation und BRET durchgeführt. Für  $\beta_1$ -AR fand man mit Coimmunopräzipitation, dass die Glykosylierung eine Rolle in der Regulation der  $\beta_1$ -AR-Oberflächenexpression und Dimerisierung hat, da eine Glykosylierungsdefiziente Mutante einer verringerten Oberflächenexpression und Fähigkeit zur Dimerisierung verglichen zum Wildtyp-Rezeptor zeigte<sup>46</sup>. Mit Hilfe von BRET wurde die Existenz von konstitutiven  $\beta_1$ -AR-Homodimeren bestätigt<sup>37,40</sup>. Nach Agonistgabe konnte keine Änderung im Interaktionsausmaß festgestellt werden<sup>40</sup>.

Auch eine Heterointeraktion zwischen  $\beta_1$ - und  $\beta_2$ -AR wurde bereits untersucht. Ebenfalls mittels Coimmunopräzipitation und BRET wurden  $\beta_1$ - $\beta_2$ -AR-Heterodimere gefunden<sup>37,40,61</sup>. Die Rezeptoren sollen dabei die gleiche Neigung zeigen, Homo- und Heteromere zu bilden<sup>40</sup>. Für das Heterodimer wurden andere Eigenschaften hinsichtlich Internalisierung und Aktivierung des ERK1/2 MAPK-Signalweges verglichen zu  $\beta_2$ -AR gefunden<sup>37</sup>.

Für  $\beta_2$ -AR wurde ebenfalls mittels Coimmunopräzipitation und Western Blot-Analyse gezeigt, dass  $\beta_2$ -AR in Sf9-Zellen als Homodimer vorliegt<sup>30</sup>. Die Homodimerisierung und die Agonist-vermittelte Stimulation der Adenylylcyclase kann durch ein Peptidfragment der Transmembrandomäne VI, welche Teil der Dimer-Grenzfläche sein soll, inhibiert werden<sup>30</sup>. Mittels Zellfraktionierungsstudien wurde herausgefunden, dass die Homodimerisierung schon im endoplasmatischen Retikulum (ER) ablaufen soll und

dass das Zerstören des ER-Exportmotivs oder des angenommenen Dimerisierungsmotivs den normalen Transport der Rezeptoren an die Zelloberfläche verhindert<sup>36</sup>. In einer Studie wurden neben Dimeren auch Oligomere höherer Ordnung gefunden<sup>50</sup>. Für die Stabilität der Oligomere sollen Disulfidbrücken verantwortlich sein, während die Dimere auch in Gegenwart von hohen Konzentrationen reduzierender und alkylierender Reagenzien detektiert wurden. Es wurde postuliert, dass die verschiedene biochemische Natur der Dimere und Oligomere eine unterschiedliche Rolle in Zellen anzeigen könne<sup>50</sup>. Hinweise auf eine  $\beta_2$ -AR-Dimerisierung kommen auch aus Untersuchungen mit  $\beta_2$ -AR-Mutanten, die alleine exprimiert eine reduzierte Antwort auf Agonist und nur eine geringe Internalisierung zeigen. Bei Coexpression mit  $\beta_2$ -Wildtyp-Rezeptor oder einer anderen Mutante wurden die Eigenschaften des Wildtyp-Rezeptors wiederhergestellt<sup>21</sup>. Weiterhin wurde gezeigt, dass  $\beta_2$ -AR als Dimer internalisiert wird und dabei die Agonist-Besetzung einer der Bindungsstellen ausreichend ist<sup>141</sup>. Auch mittels BRET wurde eine konstitutive Dimerisierung von  $\beta_2$ -AR detektiert<sup>40,49</sup>, deren Ausmaß nicht durch Agonist beeinflusst wurde<sup>40</sup>. Tri- oder Tetramere wurden ausgeschlossen<sup>40</sup>. Die Beobachtung, dass GPCR Homo- und Heterodi- oder -oligomere bilden können, führte zu der Spekulation, dass die Dimerisierung für eine effiziente Aktivierung der G-Proteine notwendig sei. Es wurde aber gezeigt, dass ein einzelner monomerer  $\beta_2$ -AR rekonstituiert mit Gs in einer Phospholipid-Doppelschicht effizient Gs aktivieren kann<sup>39</sup>. Somit scheint ein monomerer Rezeptor die minimal funktionelle Einheit für die Signaltransduktion zu sein und Dimerisierung keine Rolle zu spielen. Die Hypothese von  $\beta_2$ -AR Monomeren wurde unterstützt durch eine weitere, sorgfältig kontrollierte BRET-Studie, die postulierte, dass  $\beta_2$ -AR als Monomere vorliegen sollen<sup>76</sup>. Dies rief eine intensive Diskussion über die Existenz von GPCR-Dimeren, den verwendeten Methoden zur Untersuchung von Rezeptorinteraktionen und deren Interpretation hervor<sup>76,142,143</sup>.

Es gibt bereits zahlreiche Hinweise auf eine konstitutive Interaktion zwischen GPCR in der Literatur, da Di- oder Oligomerisierung von GPCRs schon im Endoplasmatischen Retikulum beobachtet wurde und die Rezeptoren die Zelloberfläche bereits als Di- oder Oligomere erreichen sollen<sup>42,43</sup>. Daher könne eine Aktivierung der Rezeptoren keine Änderung mehr am Ausmaß der Interaktion zwischen Zelloberflächen-Rezeptoren bewirken. Eine Studie, in der die Homo-Interaktion zwischen  $\beta_1$ - bzw.  $\beta_2$ -AR untersucht wurde, konnte ebenfalls keine Änderung des BRET-Signals feststellen<sup>40</sup>, während eine andere Untersuchung<sup>70</sup> geringe Zunahmen des BRET-Signals zwischen  $\beta_2$ -AR

detektierten, welche jedoch später als konformationelle Änderungen und nicht als Änderung im Oligomerisierungsgrad gedeutet wurden<sup>18</sup>.

Die BRET-Messungen dieser Arbeit zeigten hinsichtlich der Interaktion zwischen  $\beta_2$ -AR eine gute Übereinstimmung mit den Studien, bei denen eine Dimerisierung vorgeschlagen wurde<sup>40,49</sup>. Das Vorliegen von  $\beta_2$ -AR-Monomeren, wie in [76] postuliert, konnte nicht bestätigt werden. Für  $\beta_1$ -AR dagegen wurden Unterschiede zu den bisher publizierten Arbeiten festgestellt. Eine spezifische Interaktion wurde erst bei höheren relativen YFP/Rluc-Expressionsverhältnissen detektiert, während in der Literatur schon bei niedrigen Expressionsverhältnissen eine Interaktion gesehen wurde<sup>40</sup>. Eine Ursache für diesen Unterschied könnte die Verwendung einer anderen Negativkontrolle zur Bestimmung des „Bystander“-BRET sein. Aufgrund der nicht eindeutigen Resultate der Heterointeraktions-Untersuchung zwischen  $\beta_1$ - und  $\beta_2$ -AR ist ein Vergleich mit den bisherigen Studien, die eine Heterointeraktion zwischen  $\beta_1$ - und  $\beta_2$ -AR bei Untersuchung beider BRET-Kombinationen feststellten<sup>37,40</sup>, schwer.

Diese hier und in publizierten Studien dargestellten BRET-Experimente zeigen einige Probleme und Grenzen von Methoden zur Untersuchung von Protein-Protein-Interaktionen, wie Resonanzenergie-Transfer-Verfahren, auf. Wird kein BRET-Signal detektiert, kann nicht automatisch gefolgert werden, dass keine Interaktion zwischen den untersuchten Proteinen stattfindet. Da BRET u. a. abhängig von der Distanz und Orientierung der Donor- und Akzeptormoleküle ist, kann eine ungünstige Konstellation den Energietransfer verhindern. Andererseits kann durch hohe Proteinkonzentrationen ein hohes „Bystander“-BRET Signal, hervorgerufen durch zufällige und unspezifische Interaktionen, erzeugt werden. Um diese unspezifischen von spezifischen Signalen zu unterscheiden sind geeignete Negativkontrollen nötig, deren Auswahl problematisch sein kann. Vor allem aber liefern diese Messungen keine Information darüber, (1) wo in der Zelle die Interaktion stattfindet, (2) wie stark (transient oder stabil) diese Interaktion ist, (3) wie groß die Fraktion der interagierenden Proteine ist und schließlich (4) wie groß die Komplexe sind (Dimere oder Oligomere höherer Ordnung). Deshalb war es wichtig eine unabhängige Methode zu entwickeln, um diese Fragen adressieren zu können.

## 2. Etablierung und Validierung der Zwei-Farben-FRAP-Methode

Die in dieser Arbeit präsentierte Zwei-Farben-FRAP-Methode bestimmt die laterale Mobilität zweier Rezeptorpopulationen an der Oberfläche von lebenden Zellen. Änderungen in der lateralen Mobilität einer Rezeptorpopulation durch experimentelle Immobilisierung der anderen Rezeptorpopulation werden genutzt, um Informationen über Interaktionen zwischen diesen beiden Populationen zu erhalten.

Um diese Zwei-Farben-FRAP-Methode zu validieren und kalibrieren, wurden monomere und dimere Referenzproteine gewählt. Das Monomer CD86<sup>131,132</sup> und das kovalente Dimer CD28<sup>133,136</sup> wurden bereits in einer BRET-Studie<sup>76</sup> als Referenzproteine verwendet. Die gemessene Mobilität von Proteinen mit bekanntem Oligomerisierungszustand lässt sich mit der theoretisch erwarteten Mobilität vergleichen und erlaubt eine Abschätzung der Präzision der Methode.

Die Validierung mit den monomeren und dimeren Referenzproteinen lieferte mit theoretischen Erwartungen übereinstimmende Ergebnisse. Das monomere Referenzprotein CD86 zeigte, wie für ein Monomer erwartet, eine vollständige, von den relativen Expressionsverhältnissen unabhängige FRAP. Dies macht deutlich, dass extra- und intrazellulär-fluoreszierend-markiertes CD86 nicht miteinander interagiert und tatsächlich als Monomer vorliegt. Ein Monomer war somit als solches mittels der Zwei-Farben-FRAP-Methode detektierbar. Als relative Expressionsverhältnisse wurde ein leichter Überschuss des intrazellulär-markierten über den extrazellulär-markierten Rezeptor und umgekehrt ein mehr als zweifacher Überschuss des extrazellulär-markierten Proteins über das intrazellulär-markierte Protein gewählt. Die Bestimmung erfolgte über den Vergleich mit einem Referenzkonstrukt. Die Variation der relativen Expressionsverhältnisse diente zur besseren Erkennung von Rezeptor-Rezeptor-Interaktionen, da bei einer Interaktion im Falle eines Überschusses von immobilisierten extrazellulär-markierten Rezeptoren die Wiederkehr entsprechend geringer als bei einem Überschuss intrazellulär-markierter Rezeptoren sein muß. Im Gegensatz zu CD86 wurde für CD28 eine Expressionsverhältnis-abhängige Mobilität festgestellt. Dies lässt auf eine spezifische Interaktion zwischen CD28 Monomeren schließen. Das experimentell ermittelte FRAP bei beiden relativen Expressionsverhältnissen stimmte gut mit den theoretisch erwarteten Werten für Dimere überein (Abb. 30). Bei einem relativen Expressionsverhältnis von 1,4 war die Abweichung der experimentell ermittelten Daten von den theoretisch erwarteten Werten nur 5%. Ein mögliche Ursache

für die Abweichung bei dem relativen Expressionsverhältnis 0,4 ist eine unvollständige Dimerisierung, obwohl intra- oder extrazelluläres Markieren von CD28 mit einem Fluorophor die Dimerisierung nicht merklich beeinflusste (Abb. 22), wie für CD28-YFP schon früher gezeigt<sup>136</sup>. Mit der Zwei-Farben-FRAP-Methode war folglich ein stabiles Dimer als solches messbar.

Die Zwei-Farben-FRAP-Methode besitzt wichtige Vorteile gegenüber anderen Methoden zur Untersuchung von Protein-Protein-Interaktionen. Die Messungen werden in einzelnen, lebenden Zellen in Echtzeit mit hoher zeitlicher und räumlicher Auflösung durchgeführt. Diese können auch bei 37 °C ausgeführt werden. Wenn die GPCR-Fusionsproteine korrekt in die Membran integriert sind, werden die Proteine in nahezu physiologischem Umfeld analysiert und die Integrität der zellulären Kompartimente wird bewahrt. Aufgrund der Tatsache, dass FRAP-Experimente mittels Konfokalmikroskop durchgeführt werden, kann man sicher sein, dass die detektierte Protein-Protein-Interaktion tatsächlich in der Zellmembran und nicht irgendwo im Zellinneren stattfindet, was bei Assays mit ganzen Zellen ohne Bildgebung nicht auszuschließen ist. Bei Untersuchungen, ob Modulatoren die Interaktion beeinflussen, muß nicht mit artifiziellen Signalveränderungen, ausgelöst z. B. durch Konformationsänderungen, gerechnet werden. Weiterhin müssen die untersuchten Fusionsproteine keine bestimmten Orientierungs- oder Distanzkriterien erfüllen, damit ein Signal detektierbar wird. Durch Vergleich der Mobilitäten von Proteinen mit unbekanntem Oligomerisierungszustand bei verschiedenen relativen Expressionsverhältnissen mit monomeren und kovalent dimeren Referenzproteinen sind quantitative Aussagen über Stärke (transient, stabil) und Ausmaß (teilweise, alle) der Interaktion und bei einer stabilen Interaktion auch eine Unterscheidung zwischen Dimerisierung und Oligomerisierung höherer Ordnung möglich. Diese Informationen erhält man nicht oder nur umständlich mit anderen Methoden wie Tripel-FRET<sup>67,117</sup>, sequenziellem BRET-FRET<sup>69</sup> und Proteinkomplementationsassays<sup>73</sup>.

Nachteil der Zwei-Farben-FRAP-Methode ist die simultane Anregung beider Fluorophore mit monochromatischem Licht. Die fluoreszierenden Proteine können während der Messung ungewollt photobleichen. Dies muß individuell bei jedem Experiment und für jedes Fluorophor korrigiert werden. Weiterhin ist bei jedem Experiment der Anteil des „Durchblutens“ aufgrund der simultanen Anregung beider Fluorophore rechnerisch zu berücksichtigen. Auch gibt es nur einen eingeschränkten,



definierten Detektionsbereich, der die Abschätzung der genauen Größe großer Komplexe erschwert.

Voraussetzung dieser Methode ist, dass sich zwei Rezeptorpopulationen unterscheiden lassen. Dies wurde durch extra- und intrazelluläres markieren mit bei verschiedenen Wellenlängen fluoreszierenden Proteinen erreicht. Natürlich müssen die zu untersuchenden Rezeptoren ein bestimmtes Maß an Mobilität aufweisen. Die mobile Fraktion der Referenzproteine und der untersuchten  $\beta$ -AR lag zwischen 74% und 89% (Tab. 3, 6). Hierbei war weder ein Unterschied in der mobilen Fraktion noch in den Wiederkehr-Zeiten für extrazellulär- und intrazellulär-markierte Proteine feststellbar. Die wässrige Phase der Transmembranmoleküle beeinflusste kaum die Diffusion, da die Viskosität der Membran viel höher ist und somit hauptsächlich der Radius des Transmembransegments die Diffusion bestimmt<sup>127,128</sup>. Deshalb gab es wahrscheinlich auch keinen Unterschied in der Mobilität intra- und extrazellulär-markierter Proteine.

Für alle in dieser Arbeit untersuchten Proteine wurde eine immobile Fraktion gleicher Größenordnung (11-26%) gesehen. Immobile Fraktionen, besonders von Membranproteinen, werden häufig beschrieben<sup>127,128,137,138</sup>. Die immobile Fraktion beschreibt den Anteil Fluoreszenz-markierter Proteine, die nicht frei diffundieren können oder zu langsam diffundieren und im Beobachtungszeitraum nicht detektiert werden. Die genaue Ursache der Immobilisierung in Abwesenheit des Antikörpers ist unbekannt. Mögliche Gründe wären (1) eine Interferenz mit größeren immobilen Hindernissen<sup>127,128,138</sup>, (2) Siebeffekte der Membran hervorgerufen durch Membranstrukturen<sup>137,138</sup> oder (3) Rezeptoren, die in einem Kompartiment eingeschlossen sind und nicht zum FRAP beitragen können<sup>128</sup>.

Eine weitere Grundlage der Methode ist die effektive spezifische Immobilisierbarkeit extrazellulär YFP-markierter Rezeptoren durch polyklonale Antikörper gegen YFP. Durch die Verwendung von Antikörpern gegen die extrazelluläre Markierung ist eine spezifische Immobilisierung extrazellulär-markierter Rezeptoren möglich (Abb. 25, 34). Die Mobilität intrazellulär-markierter Rezeptoren wurde nicht beeinflusst (Abb. 25, 34), da zum einen die Antikörper die Membran lebender Zellen nicht durchdringen können und zum anderen extrazellulär keine Epitope, gegen die der Antikörper gerichtet ist, vorhanden sind. Andere Methoden zur Immobilisierung, wie Quervernetzung biotinylierter Proteine durch Streptavidin<sup>144,145</sup>, wären grundsätzlich auch geeignet, jedoch müssten einige Punktmutationen durchgeführt werden, um intrazellulär markierte Rezeptoren nicht zu biotinylieren und somit zu immobilisieren. Antikörper

wurden bereits zuvor verwendet, um die Mobilität von Zelloberflächenproteinen zu verringern<sup>146-149</sup>. Die Immobilisierung durch polyklonale Antikörper kommt wahrscheinlich durch Bindung an verschiedene YFP-Epitope zustande, was zu einer Vernetzung mehrerer extrazellulär-markierter YFP-Rezeptoren führt. Dies wird unterstützt durch die Beobachtung, dass monoklonale Antikörper erst nach Inkubation mit einem Sekundärantikörper gegen die Fc-Domäne des monoklonalen Antikörpers gerichtet, eine Immobilisierung des extrazellulär-markierten CD86 erreichten (Abb. 24). Nach Behandlung der Zellen mit polyklonalem Antikörper gegen YFP waren noch ca. 22-33% der extrazellulär-markierten Proteine mobil (Tab. 3, 6). Wahrscheinlich werden nicht alle Epitope von Antikörpern erfasst, deshalb ist die Immobilisierung nicht vollständig. Bei niedrigen Expressionsverhältnissen extrazellulär-markierter Rezeptoren ist der Grad der Immobilisierung niedriger. Deshalb wurde jedes Experiment individuell um die unvollständige Immobilisierung korrigiert und Experimente mit FRAP > 40% ausgeschlossen.

Der verwendete Antikörper gegen YFP kann extrazellulär CFP-markierte Proteine ebenso effizient immobilisieren wie YFP-markierte Rezeptoren (Abb. 23), da sich CFP und YFP nur durch einige Punktmutationen unterscheiden<sup>86</sup>.

Eine weitere unvollkommene experimentelle Situation musste in Betracht gezogen werden: Die Antikörper-induzierte Immobilisierung extrazellulär-markierter Proteine bewirkte auch eine geringe unspezifische Immobilisierung nicht-interagierender Proteine (Abb. 28, Tab. 4). Dabei waren die Unterschiede zwischen den einzelnen Protein-Kombinationen zwar klein, aber es ist nicht auszuschließen, dass das Ausmaß der unspezifischen Immobilisierung vom immobilisierten Rezeptor abhängt. So war bei der Immobilisierung von YFP- $\beta_2$  ein etwas größerer Effekt als bei den anderen Proteinen zu sehen, was wahrscheinlich auf die Bildung größerer Komplexe von  $\beta_2$ -AR zurückzuführen ist. Der genaue Mechanismus dieser unspezifischen Immobilisierung bleibt ungeklärt. Interferenz mit den durch die Antikörperbehandlung gebildeten immobilen Hindernissen<sup>127,128,138</sup> dient als mögliche Erklärung. Bei der Berechnung des relativen FRAP wurden die Experimente um die entsprechende unspezifische Immobilisierung korrigiert. Die hierfür verwendeten Korrekturfaktoren wurden mittels eines nicht-interagierenden Proteins coexprimiert mit dem extrazellulär-markierten Protein von Interesse vor und nach Antikörper-Behandlung ermittelt (Methoden). Da die Kinetik der Wiederkehr dieser nicht-interagierenden Proteine und die der Proteine von Interesse verschieden sein könnte, wurden nur die Differenz der letzten drei

Messpunkte und nicht die Differenz der ganzen Kurven für die Korrektur herangezogen. Von den verschiedenen gemessenen Kombinationen wurden diejenigen mit der größten unspezifischen Immobilisierung verwendet.

Die Messung der Mobilität der intrazellulär-markierten Proteine hätte auch mit Ein-Farben-FRAP durchgeführt werden können. Dies hätte den Nachteil, dass die ausreichende Immobilisierung nicht in jedem Experiment hätte überprüft werden können und jede Messung individuell hätte korrigiert werden können. Da die beiden wichtigsten Kriterien zur erfolgreichen Etablierung von Zwei-Farben-FRAP-Experimenten (Art und Position der Fluorophore ohne Mobilitätsänderung austauschbar und Mobilität detektiert mittels Zwei-Farben-FRAP und Ein-Farben-FRAP separat für beide Proteine nicht unterscheidbar<sup>150</sup>) erfüllt waren, wurde die Zwei-Farben-FRAP Methode bevorzugt.

Die Korrektur des „Durchblutens“ hätte umgangen werden können, wenn nicht CFP und YFP, sondern eine andere Fluorophor-Kombination, wie beispielsweise CFP und RFP, gewählt worden wäre, welche kein „Durchbluten“ in den anderen Kanal zeigen. Bei Anfertigung dieser Arbeit lagen leider noch keine Fusionsproteine mit einer geeigneten Variante des rot-fluoreszierenden Proteins vor. Auch bei einer sequenziellen Anregung anstelle der simultanen Anregung der Fluorophore wäre eine Korrektur des „Durchblutens“ nicht notwendig gewesen. Leider ist ein FRAP-Protokoll mit sequenziellem Linien-Scan-Modus von der Firma Leica nicht erhältlich. Deshalb wurde mittels eines eigens erstellten, sequenziellen FRAP-Protokolls die Korrektheit der „Durchblut“-Korrektur bestätigt (Abb. 27). Jedoch konnte hierbei die Größe und Position des ROI nicht so exakt wie mittels des Standard-FRAP-Protokolls gewählt werden. Somit wurde dieses FRAP-Protokoll nur dazu verwendet, um zu zeigen, dass es keinen Unterschied zwischen Messungen mit sequenziellem Linien-Scan und Messungen mit simultaner Fluorophor-Anregung und anschließender „Durchblut“-Korrektur gab.

Die FRAP-Kurven für alle in dieser Arbeit untersuchten Membranproteine zeigten ein biphasisches Muster. Biphasische Kurven wurden auch in anderen Studien als generelles Phänomen beobachtet<sup>137,151</sup>. Die biologische Bedeutung besonders der schnellen Wiederkehr ist schwer zu deuten, da sie für alle untersuchten Proteine nicht bemerkenswert unterschiedlich war. In dieser Arbeit wurde nicht auf die schnelle Phase der Wiederkehr Bezug genommen, sondern vielmehr auf das unterschiedliche Ausmaß

der Wiederkehr und im Falle von  $\beta_1$ -AR auf eine Änderung in der langsamen Phase der Wiederkehr.

### **3. Anwendung der Zwei-Farben-FRAP-Methode zur Untersuchung der Interaktionen zwischen $\beta$ -AR**

Für  $\beta_1$ -AR wurde eine relative Expressionsverhältnis-abhängige Mobilität detektiert (Abb. 41). Dabei war der Effekt auf das Ausmaß des FRAP eher gering, während die Zeitkonstante der langsamen Phase der Wiederkehr bei einem Überschuss von YFP- $\beta_1$  über  $\beta_1$ -CFP merklich verlängert war (Abb. 41). Dies ließ den Schluss zu, dass eine spezifische Interaktion zwischen  $\beta_1$ -AR vorliegt. Diese Interaktion ist aber nicht stabil, sondern von schwacher transienter Natur und die meisten Rezeptoren sind wahrscheinlich an dieser dynamischen Interaktion beteiligt. Das Ausmaß der Verlangsamung des FRAP durch Immobilisierung einer Fraktion von Rezeptoren stellt dabei ein indirektes Maß für die Stabilität des oligomeren Rezeptor-Komplexes dar. Diese Interpretation wird unterstützt durch Vergleich der  $\beta_1$ -AR Mobilität mit dem Verhalten der monomeren und dimeren Referenzproteine. Das Monomer CD86 zeigte dagegen eine relative Expressionsverhältnis-unabhängige Mobilität, bei welcher auch keine Verlangsamung in der langsamen Phase beobachtet wurde. Deshalb ist auszuschließen, dass  $\beta_1$ -AR vorwiegend als Monomer vorliegt. Auch zeigt die Mobilität des kovalenten Dimers CD28 und die theoretischen Überlegungen über die Mobilität von dimeren Proteinen, dass das FRAP für ein stabiles Dimer zwar abhängig von den relativen Expressionsverhältnissen ist, aber bei den entsprechenden relativen Expressionsverhältnissen geringer wäre. Auch wäre bei einem stabilen Dimer keine Verzögerung der Wiederkehr der langsamen Phase zu verzeichnen. Somit kann die Prädominanz eines stabilen Dimers ebenfalls ausgeschlossen werden. Es muß also eine transiente Interaktion zwischen  $\beta_1$ -AR vorliegen, wobei nicht zwischen transienten Dimeren oder Oligomeren höherer Ordnung mit niedriger Stabilität unterschieden werden kann. Mittels BRET konnte in dieser Arbeit dagegen nur eine Interaktion bei höheren relativen Expressionsverhältnissen gesehen werden, was auf eine spezifische Interaktion hinwies, die aber nicht einfach zu interpretieren war. Mit Hilfe der Zwei-Farben-FRAP-Methode konnte dagegen festgestellt werden, dass die Interaktion zwischen  $\beta_1$ -AR von transienter Natur ist.

Im Gegensatz zu  $\beta_1$ -AR ging für  $\beta_2$ -AR bereits aus den Versuchen mit einer ca. 1:1 Expression hervor, dass die Interaktionseinheit größer als ein Dimer sein muß, da kein FRAP in das gebleichte Gebiet stattfand (Abb. 36). Bei einer Dimerisierung müssten 50% der  $\beta_2$ -CFP Rezeptoren bei einer 1:1 Expression mobil sein, wie aus den Versuchen mit dem kovalenten Dimer CD28 und den theoretischen Überlegungen ersichtlich. Da ebenfalls bei einem großen Überschuss von  $\beta_2$ -CFP über YFP- $\beta_2$  (3,5-fach) kein FRAP detektiert wurde (Abb. 42), müssen Komplexe größer als Dimere vorliegen und alle Rezeptoren an dieser Interaktion beteiligt sein. Außerdem scheinen diese Komplexe verglichen zu  $\beta_1$ -AR stabil zu sein, da auch nach 5 Minuten keine Wiederkehr messbar war (Abb. 36). Mittels BRET wurde in dieser Arbeit zwar ebenfalls eine Interaktion festgestellt (Abb. 16), aber es konnte nicht zwischen Dimerisierung und Oligomerisierung höherer Ordnung unterschieden werden und keine Aussagen über die Stabilität getroffen werden. Dies zeigt das Potenzial der Zwei-Farben-FRAP-Methode und lässt den Schluss zu, dass ein immobilisierter YFP- $\beta_2$  die Mobilität von mindestens vier  $\beta_2$ -CFP einschränken kann. Der genaue Aufbau der Oligomere bleibt unklar. Es können primär gebildete Oligomere vorliegen oder ähnlich wie bei Rhodopsin und GABA<sub>B</sub>-Rezeptoren sekundäre Di- oder Oligomere aus Dimerbausteinen<sup>62,63,152</sup>. Obwohl bei allen gemessenen CFP/YFP-Verhältnissen keine Wiederkehr von  $\beta_2$ -CFP festgestellt wurde (Abb. 42), ist die exakte Größe der  $\beta_2$ -AR-Oligomere aus folgenden Gründen schwer vorherzusagen: Der totale Expressionslevel ist im zellulären Modellsystem limitiert. Somit kann die  $\beta_2$ -CFP-Expression nicht beliebig erhöht werden. Auch kann die Expression von YFP- $\beta_2$  nicht unter einen bestimmten Level gesenkt werden, da zum einen die Fluoreszenz bei sehr niedrigen Expressionsleveln nicht mehr detektiert werden kann und zum anderen die extrazellulär-markierten Rezeptoren nicht mehr ausreichend immobilisiert werden können, da die Antikörper nicht genügend Epitope in der Umgebung finden, um diese zu binden und somit die Rezeptoren zu vernetzen.

Ein Hinweis darauf, dass die bei Raumtemperatur und in HEK 293T-Zellen beobachteten Interaktionen zwischen  $\beta_1$ - bzw.  $\beta_2$ -AR auch unter physiologischen Bedingungen stattfindet, lieferten Versuche bei 37 °C und Versuche in primären Zellen wie neonatalen Rattenkardiomyozyten, die physiologisch  $\beta$ -AR exprimieren. Bei beiden Bedingungen war kein wesentlicher Unterschied zu den Standardbedingungen (HEK 293T-Zellen bei 22 °C) festzustellen. Somit konnte ausgeschlossen werden, dass die Interaktion ein Temperatur- oder Zelltyp-abhängiges Artefakt ist.

Weder die Stabilität noch das Ausmaß der Interaktion zwischen  $\beta_1$ - bzw.  $\beta_2$ -AR wurde durch Agonist oder Antagonist messbar beeinflusst. Der Oligomerisierungsgrad von  $\beta_1$ - bzw.  $\beta_2$ -AR scheint somit unabhängig vom Aktivierungszustand der Rezeptoren zu sein. Dies ist in Übereinstimmung mit BRET-Experimenten dieser Arbeit und mit früheren BRET-Studien<sup>40</sup> und unterstützt die Hypothese, dass die Dimerisierung von  $\beta_2$ -AR und GPCR bereits während ihrer Entstehung stattfindet<sup>36</sup> und eine Voraussetzung für das „Zellmembran-Targeting“ ist<sup>36,46</sup>. Eine weitere Studie in welcher gezeigt wurde, dass  $\beta_2$ -AR als Di- oder Oligomere internalisieren<sup>141</sup>, unterstützt das Konzept der konstitutiven Interaktion.

Die Zwei-Farben-FRAP-Methode deckte mit Coimmunopräzipitation und BRET nicht detektierbare, unbekannte Unterschiede in der Stabilität und Größe der Rezeptor-Interaktion zwischen  $\beta_1$ - und  $\beta_2$ -AR auf. Diese Unterschiede zwischen  $\beta_1$ - und  $\beta_2$ -AR wurden unter gleichen experimentellen Bedingungen erhalten. FRAP beruht, wie andere Fluoreszenz-basierte Methoden auch, auf einer Überexpression von Fluoreszenz-markierten Proteinen. Endogene Expressionslevel von GPCRs werden hierbei meist überschritten. In dieser Arbeit wurden keine Anzeichen für den Einfluß steigender Expressionslevel auf den Grad der Interaktion zwischen Rezeptoren gefunden. Weiterhin wurden  $\beta_1$ -AR-Fusionsproteine ca. zwei- bis dreifach stärker als  $\beta_2$ -AR-Fusionsproteine exprimiert. Dabei blieb  $\beta_1$ -AR nach Immobilisierung einer Subfraktion wesentlich mobiler als  $\beta_2$ -AR, was dagegen spricht, dass die beobachtete Oligomerisierung zwischen  $\beta_2$ -AR ein Expressionslevel-Artefakt ist. Dies stimmt mit Ergebnissen einer BRET-Studie überein, in der ein über einen großen Expressionsbereich (1.4-26.3 pmol/mg) vom Expressionslevel unabhängiges Ausmaß der Di-/Oligomerisierung von  $\beta_2$ -AR beobachtet wurde<sup>40</sup>.

Auch die Heterointeraktion zwischen  $\beta_1$ - und  $\beta_2$ -AR wurde mittels Zwei-Farben-FRAP untersucht. Aus den in dieser Arbeit durchgeführten BRET-Messungen ging nicht eindeutig hervor, ob eine Heterointeraktion zwischen  $\beta_1$ - und  $\beta_2$ -AR stattfindet (Abb. 18). Mittels FRAP wurde für die Kombination  $\beta_1$ -CFP und YFP- $\beta_2$  auch bei einem über dreifachen Überschuß an immobilisiertem YFP- $\beta_2$  eine nahezu vollständiges FRAP detektiert. Nur die Zeitkonstante der langsamen Phase der Wiederkehr war etwas erhöht, was auf eine sehr schwache transiente Interaktion schließen lässt. Bei der inversen Kombination  $\beta_2$ -CFP coexprimiert mit YFP- $\beta_1$  wurde bei einem über dreifachen Überschuß an immobilisiertem YFP- $\beta_1$  ebenfalls eine vollständige Wiederkehr mit einer kaum verlängerten Zeitkonstante detektiert. Bei einem 1:1

Verhältnis dagegen kamen nur ca. 70% der  $\beta_2$ -CFP-Rezeptoren zurück. Dies könnte durch die Komplexbildung von  $\beta_2$ -AR zu erklären sein. Einige der YFP- $\beta_1$  könnten in einem solchen  $\beta_2$ -CFP-Komplex eingeschlossen sein und nach Immobilisierung somit den  $\beta_2$ -CFP-Komplex festhalten. Somit besteht zwischen  $\beta_1$ - und  $\beta_2$ -AR wahrscheinlich nur eine sehr schwache transiente oder keine Interaktion.

Wie für die Referenzproteine CD28 und CD86, war die Mobilität von  $\beta_1$ -AR und  $\beta_2$ -AR ebenfalls unabhängig von der Art und der Insertionsstelle des Fluorophors (Abb. 34). Auch hier wurde eine immobile Fraktion, die etwas größer als für CD86 und CD28 war, detektiert. Dies könnte damit zu tun haben, dass CD86 und CD28, die im Vergleich zu den  $\beta$ -AR nur eine Transmembrandomäne und somit einen geringeren Radius besitzen, bei ihrer Diffusion nicht so stark von immobilen Hindernissen beeinträchtigt werden. Auch die Zeitkonstante  $t_2$  der langsamen Phase des FRAP (Tab. 3 und Tab. 6) war für  $\beta$ -AR etwas höher als für die Referenzproteine CD86 und CD28. Zwischen  $\beta_1$ -AR und  $\beta_2$ -AR gab es dabei keinen sichtbaren Unterschied. Die spezifische Immobilisierung extrazellulär-markierter  $\beta$ -AR mit Antikörper gegen YFP erfolgte genauso effektiv (Abb. 34) und der Anteil der nicht-immobilisierbaren extrazellulär-markierten  $\beta$ -AR lag in der gleichen Größenordnung wie für die Referenzproteine. Dies hat möglicherweise Antikörper- oder Methoden-intrinsische Ursachen.

Die Messungen wurden hauptsächlich bei 22 °C durchgeführt, da bei dieser Temperatur weniger Artefakte durch Fokusverlust und Bewegung der Zellen während der Messung als bei 37 °C stattfanden. Somit war die Qualität der FRAP-Kurven besser. Auch lieferten die bei 22 °C detektierten FRAP-Kurven eine bessere Auflösung möglicher Protein-Protein-Interaktionen. Die Hauptbefunde (transiente Interaktion zwischen  $\beta_1$ -AR, stabile Oligomerisierung zwischen  $\beta_2$ -AR) wurden bei physiologischer Temperatur bestätigt (Abb. 37).

Mit der Zwei-Farben-FRAP-Methode kann man nicht zwischen einer direkten Interaktion der Rezeptoren oder einer indirekten Wechselwirkung z. B. über Rezeptor-assoziierte Proteine unterscheiden. Hierfür sind komplementäre Methoden wie beispielsweise BRET oder FRET besser geeignet, obwohl auch mit diesen Methoden eine indirekte Interaktion nicht ganz ausgeschlossen werden kann. Eine direkte Interaktion zwischen Rezeptoren lässt sich nur mit aufgereinigten Proteinen bestimmen, wobei aber das physiologische Umfeld verloren geht.

#### 4. Perspektiven

Die durch Verwendung der Zwei-Farben-FRAP-Methode entdeckten Unterschiede zwischen  $\beta_1$ - und  $\beta_2$ -AR werfen einige Fragen auf.

Obwohl  $\beta_1$ -AR und  $\beta_2$ -AR nahe verwandt sind, zeigen sie merkbare Unterschiede im Interaktionsverhalten: Für  $\beta_1$ -AR wurde eine transiente Interaktion festgestellt, während  $\beta_2$ -AR dagegen stabile Komplexe höherer Ordnung bildet. Mittels Zwei-Farben-FRAP-Experimenten unter Verwendung chimärer Rezeptoren bestehend aus Teilen von  $\beta_1$ - und Teilen von  $\beta_2$ -AR könnten die entsprechenden Strukturen untersucht werden, welche für eine transiente oder eine stabile Interaktion verantwortlich sind und den Unterschied zwischen  $\beta_1$ - und  $\beta_2$ -AR ausmachen.

Weiterhin kann mittels chimärer Rezeptoren oder Rezeptormutanten überprüft werden, ob die bereits postulierten Segmente eines Rezeptors, wie Transmembrandomänen oder N-Terminus, tatsächlich an der Interaktion beteiligt sind. Möglicherweise lässt sich so auch der genaue Mechanismus der Di- oder Oligomerisierung herausfinden.

Die Funktion von Rezeptordi- oder Oligomeren bleibt bisher unbekannt. Jedoch stellt sich die Frage, ob die Unterschiede im Interaktionsverhalten zwischen  $\beta_1$ - und  $\beta_2$ -AR nicht auch für funktionelle Unterschiede verantwortlich sein könnten. Einen Hinweis darauf gibt z. B. eine Studie, die zeigte, dass Stimulation von  $\beta_1$ -AR in Kardiomyozyten ein weitreichendes cAMP-Signal bewirken kann, während das von  $\beta_2$ -AR hervorgerufene cAMP-Signal nur lokal begrenzt war<sup>15</sup>.

Diese Methode kann natürlich auch zur Überprüfung einer Vielzahl von angenommenen Rezeptor-Rezeptor-Interaktionen verwendet werden. Außerdem können nun die Stabilität und das Ausmaß der Interaktion, die Größe der Komplexe und eine Modulation durch Liganden genauer bestimmt werden.



## V. ZUSAMMENFASSUNG

Viele Membranrezeptoren liegen als über Disulfidbrücken-verbundene Dimere vor. Ein Nachweis der Dimerisierung ist in diesen Fällen methodisch klar und einfach zu erbringen. Für die meisten G-Protein-gekoppelten Rezeptoren dagegen ist weder die Existenz von Di- oder Oligomeren noch deren Funktion eindeutig belegt. Meist wurden Methoden wie Coimmunopräzipitation und Resonanz-Energie-Transfer-Verfahren wie BRET oder FRET verwendet, um Protein-Protein-Interaktionen zu untersuchen. Trotz ihrer hohen Sensitivität besitzen diese Methoden einige Grenzen und können je nach experimentellem Ansatz und Verwendung verschiedener Kontrollen, unterschiedliche Ergebnisse hinsichtlich des Vorliegens einer Protein-Protein-Interaktion liefern. Weder die Stabilität der Interaktion, noch die Fraktion der interagierenden Proteine kann mittels Resonanz-Energie-Transfer-Assays zuverlässig ermittelt werden. Auch die Größe der Komplexe ist nicht oder nur technisch aufwendig bestimmbar.

Deshalb wurde in dieser Arbeit eine neue, unabhängige Methode entwickelt, um Rezeptor-Rezeptor-Interaktionen in lebenden Zellen genauer untersuchen zu können. Diese auf „Fluorescence Recovery after Photobleaching“ basierende Mikroskopiemethode erlaubt die Mobilität von Proteinen zu bestimmen. Um Homointeraktionen zwischen Proteinen messen zu können, müssen zwei Protein-Fraktionen mit unterschiedlicher Mobilität vorliegen. Deshalb wurde eine Rezeptor-Fraktion extrazellulär mit YFP markiert und mit Hilfe polyklonaler Antikörper gegen YFP spezifisch immobilisiert. Die andere Rezeptorfraktion wurde intrazellulär mit CFP oder Cerulean markiert und wurde deshalb nicht von extrazellulären Antikörpern erkannt. So konnten mittels Zwei-Farben-FRAP potenzielle Interaktionen zwischen den immobilisierten extrazellulär-markierten Rezeptoren und den intrazellulär-markierten Rezeptoren durch eine Mobilitätsänderung letzterer detektiert werden.

Diese Methode wurde mittels eines monomeren (CD86) und kovalent dimeren (CD28) Rezeptors validiert. Es zeigte sich, dass eine spezifische Immobilisierung extrazellulär-markierter Proteine nur durch polyklonale, nicht aber durch monoklonale Antikörper gegen YFP erreicht werden konnte. Intrazellulär-markierte Proteine wurden hierbei in ihrer Mobilität nicht durch die extrazellulären Antikörper beeinflusst. Bei Immobilisierung des extrazellulär-markierten CD86 war das coexprimierte, intrazellulär-markierte CD86-CFP weiterhin voll mobil. Außerdem zeigte das Monomer CD86 eine vom relativen CFP-YFP-Expressionsverhältnis unabhängige Mobilität.

Dieses Ergebnis ließ den Schluss zu, dass extra- und intrazellulär-markiertes CD86 nicht miteinander interagieren und als Monomer vorliegen. Die Mobilität des kovalenten Dimers CD28 war dagegen abhängig vom CFP–YFP-Expressionsverhältnis und stimmte gut mit theoretisch erwarteten Werten für ein Dimer überein.

Die Anwendung der Zwei-Farben-Methode zur Untersuchung von Interaktionen zwischen  $\beta_1$ - und  $\beta_2$ -adrenergen Rezeptoren zeigte Unterschiede zwischen beiden Rezeptor-Subtypen.  $\beta_1$ -AR zeigte eine spezifische transiente Interaktion,  $\beta_2$ -AR dagegen lagen als stabile Oligomere höherer Ordnung vor. Die transiente Interaktion zwischen  $\beta_1$ -AR und die stabile Oligomerisierung von  $\beta_2$ -AR wurde nicht nur in HEK 293T-Zellen sondern auch in neonatalen Rattenkardiomyozyten und bei 37 °C beobachtet. Ferner hatte der Aktivierungszustand des jeweiligen Rezeptors keinen Einfluß auf das Ausmaß der Interaktion. Zwischen  $\beta_1$ - und  $\beta_2$ -AR wurde nur eine sehr schwache und instabile Heterointeraktion mittels der Zwei-Farben-FRAP-Methode beobachtet.

Um zu überprüfen, ob eine direkte Interaktion zwischen den adrenergen Rezeptoren vorliegt, wurde die BRET-Methode verwendet. Mittels BRET wurde eine direkte Interaktion zwischen  $\beta_2$ -AR festgestellt, jedoch konnte nicht zwischen Dimeren und Oligomeren höherer Ordnung unterschieden werden. Bei  $\beta_1$ -AR fand bei höheren YFP-Rluc-Expressionsverhältnissen ein spezifischer Energietransfer statt. Bei niedrigeren Expressionsverhältnissen lag das Signal jedoch im unspezifischen Bereich. Auch bei Untersuchung der Heterointeraktion zwischen  $\beta_1$ - und  $\beta_2$ -AR konnte keine klare Aussage über eine spezifische Interaktion zwischen beiden Rezeptor-Subtypen getroffen werden.

## SUMMARY

Many membrane receptors exist as disulfide-bond dimers. In these cases dimerization is methodological clearly and easily provable. However, for most G-protein coupled receptors the postulated existence of di- or oligomerization nor their function is definitely demonstrated. Mostly, methods like co-immunoprecipitation and resonance energy transfer techniques like BRET and FRET were used to investigate protein-protein interactions. Despite their high sensitivity these methods have some limits and reveal sometimes distinct results regarding the occurrence of a protein-protein interaction depending on experimental approach and use of different controls. Neither the stability of the interaction nor the fraction of interacting proteins are determinable using resonance energy transfer assays. Furthermore the size of complexes is not or only technically difficult determinable.

Therefore in this work a novel independent approach was developed to allow a more detailed investigation of receptor-receptor interactions in living cells. This method based on fluorescence recovery after photobleaching microscopy allows to determine the mobility of proteins. In order to measure homo-interactions between proteins two protein fractions with different mobility have to be distinguishable. Therefore one receptor fraction was extracellularly tagged with YFP and specifically immobilized using polyclonal antibodies against YFP. The other receptor fraction was intracellularly labeled with CFP or Cerulean and therefore not recognized by the extracellular antibodies. In this way using dual-color FRAP potential interactions between immobilized extracellularly-tagged receptors and intracellularly-tagged receptors were detectable due to a change of mobility of the latter.

This method was validated using monomeric (CD86) and covalent dimeric (CD28) receptors. A specific immobilization of extracellularly-tagged proteins was achievable only by using polyclonal but not monoclonal antibodies against YFP. Intracellularly tagged proteins were not influenced in their mobility by extracellular antibodies.

After immobilization of the extracellularly-labeled CD86 the coexpressed intracellularly-tagged CD86-CFP was still fully mobile. Furthermore the monomeric CD86 showed a relative CFP–YFP expression ratio independent mobility. This result led to the conclusion that extra- and intracellularly labeled CD86 did not interact with each other and exist as a monomer. The mobility of the covalent dimer CD28 however

was depending on the relative CFP-YFP expression ratio and was in good agreement with theoretically expected values for a dimer.

The application of the dual-color FRAP approach for the investigation of interactions between  $\beta_1$ - and  $\beta_2$ -adrenergic receptors showed differences between both receptor subtypes.  $\beta_1$ -AR exhibited a specific transient interaction, however  $\beta_2$ -AR existed as stable higher order oligomers. The transient interaction between  $\beta_1$ -AR and the stable higher order oligomerization of  $\beta_2$ -AR were not only observed in HEK 293T cells but also in neonatal rat cardiac myocytes and at 37°C. Furthermore the activation state of the respective receptor had no influence on the extent of the interaction. Between  $\beta_1$ - and  $\beta_2$ -AR only a weak and unstable hetero-interaction was observed using the dual-color FRAP approach.

In order to control if a direct interaction between the adrenergic receptors is occurring the BRET method was applied. Using BRET a direct interaction between  $\beta_2$ -AR was observed, but it was not possible to distinguish between dimers and higher order oligomers. For  $\beta_1$ -AR a specific energy transfer occurred at higher YFP-Rluc expression ratios. At lower expression ratios the signal was in the unspecific range. Also the investigation of hetero-interactions between  $\beta_1$ - and  $\beta_2$ -AR revealed no clear conclusion about a specific interaction between both receptor subtypes.

**VI. LITERATURVERZEICHNIS**

- 1 Pierce, K. L., Premont, R. T. & Lefkowitz, R. J. Seven-transmembrane receptors. *Nat Rev Mol Cell Biol* **3**, 639-50 (2002).
- 2 Perez, D. M. The evolutionarily triumphant G-protein-coupled receptor. *Mol Pharmacol* **63**, 1202-5 (2003).
- 3 Flower, D. R. Modelling G-protein-coupled receptors for drug design. *Biochim Biophys Acta* **1422**, 207-34 (1999).
- 4 Strosberg, A. D. Structure, function, and regulation of adrenergic receptors. *Protein Sci* **2**, 1198-209 (1993).
- 5 Gether, U. et al. Agonists induce conformational changes in transmembrane domains III and VI of the beta2 adrenoceptor. *Embo J* **16**, 6737-47 (1997).
- 6 Johnson, M. The beta-adrenoceptor. *Am J Respir Crit Care Med* **158**, S146-53 (1998).
- 7 Brodde, O. E. & Michel, M. C. Adrenergic and muscarinic receptors in the human heart. *Pharmacol Rev* **51**, 651-90 (1999).
- 8 Hoffmann, C., Leitz, M. R., Oberdorf-Maass, S., Lohse, M. J. & Klotz, K. N. Comparative pharmacology of human beta-adrenergic receptor subtypes--characterization of stably transfected receptors in CHO cells. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* **369**, 151-9 (2004).
- 9 Frielle, T. et al. Cloning of the cDNA for the human beta 1-adrenergic receptor. *Proc Natl Acad Sci U S A* **84**, 7920-4 (1987).
- 10 Dixon, R. A. et al. Cloning of the gene and cDNA for mammalian beta-adrenergic receptor and homology with rhodopsin. *Nature* **321**, 75-9 (1986).
- 11 Rasmussen, S. G. et al. Crystal structure of the human beta2 adrenergic G-protein-coupled receptor. *Nature* **450**, 383-7 (2007).
- 12 Cherezov, V. et al. High-resolution crystal structure of an engineered human beta2-adrenergic G protein-coupled receptor. *Science* **318**, 1258-65 (2007).
- 13 Warne, T. et al. Structure of a beta1-adrenergic G-protein-coupled receptor. *Nature* **454**, 486-91 (2008).
- 14 Stenkamp, R. E., Teller, D. C. & Palczewski, K. Crystal structure of rhodopsin: a G-protein-coupled receptor. *Chembiochem* **3**, 963-7 (2002).

- 15 Nikolaev, V. O., Bunemann, M., Schmitteckert, E., Lohse, M. J. & Engelhardt, S. Cyclic AMP imaging in adult cardiac myocytes reveals far-reaching beta1-adrenergic but locally confined beta2-adrenergic receptor-mediated signaling. *Circ Res* **99**, 1084-91 (2006).
- 16 Vandecasteele, G., Rochais, F., Abi-Gerges, A., and Fischmeister, R., Functional localization of cAMP signalling in cardiac myocytes. *Biochem Soc Trans* **34** (Pt 4), 484 (2006).
- 17 Lawrence, M. C., McKern, N. M. & Ward, C. W. Insulin receptor structure and its implications for the IGF-1 receptor. *Curr Opin Struct Biol* **17**, 699-705 (2007).
- 18 Bouvier, M. Oligomerization of G-protein-coupled transmitter receptors. *Nat Rev Neurosci* **2**, 274-86 (2001).
- 19 Milligan, G. & Bouvier, M. Methods to monitor the quaternary structure of G protein-coupled receptors. *Febs J* **272**, 2914-25 (2005).
- 20 Maggio, R., Vogel, Z. & Wess, J. Coexpression studies with mutant muscarinic/adrenergic receptors provide evidence for intermolecular "cross-talk" between G-protein-linked receptors. *Proc Natl Acad Sci U S A* **90**, 3103-7 (1993).
- 21 Hebert, T. E. et al. Functional rescue of a constitutively desensitized beta2AR through receptor dimerization. *Biochem J* **330** ( Pt 1), 287-93 (1998).
- 22 Milligan, G. Oligomerisation of G-protein-coupled receptors. *J Cell Sci* **114**, 1265-71 (2001).
- 23 Kuner, R. et al., Role of heteromer formation in GABAB receptor function. *Science* **283** (5398), 74 (1999).
- 24 White, J. H. et al., Heterodimerization is required for the formation of a functional GABA(B) receptor. *Nature* **396** (6712), 679 (1998).
- 25 Kaupmann, K. et al., GABA(B)-receptor subtypes assemble into functional heteromeric complexes. *Nature* **396** (6712), 683 (1998).
- 26 Jones, K. A. et al., GABA(B) receptors function as a heteromeric assembly of the subunits GABA(B)R1 and GABA(B)R2. *Nature* **396** (6712), 674 (1998).
- 27 Galvez, T. et al., Allosteric interactions between GB1 and GB2 subunits are required for optimal GABA(B) receptor function. *EMBO J* **20** (9), 2152 (2001).
- 28 Ng, G. Y. et al., Identification of a GABAB receptor subunit, gb2, required for functional GABAB receptor activity. *J Biol Chem* **274** (12), 7607 (1999).

- 
- 29 Roess, D. A., Horvat, R. D., Munnely, H. & Barisas, B. G. Luteinizing hormone receptors are self-associated in the plasma membrane. *Endocrinology* **141**, 4518-23 (2000).
- 30 Hebert, T. E. et al. A peptide derived from a beta2-adrenergic receptor transmembrane domain inhibits both receptor dimerization and activation. *J Biol Chem* **271**, 16384-92 (1996).
- 31 Angers, S., Salahpour, A. & Bouvier, M. Dimerization: an emerging concept for G protein-coupled receptor ontogeny and function. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* **42**, 409-35 (2002).
- 32 Terrillon, S. et al. Oxytocin and vasopressin V1a and V2 receptors form constitutive homo- and heterodimers during biosynthesis. *Mol Endocrinol* **17**, 677-91 (2003).
- 33 Zhu, X. & Wess, J. Truncated V2 vasopressin receptors as negative regulators of wild-type V2 receptor function. *Biochemistry* **37**, 15773-84 (1998).
- 34 Morello, J. P. et al. Pharmacological chaperones rescue cell-surface expression and function of misfolded V2 vasopressin receptor mutants. *J Clin Invest* **105**, 887-95 (2000).
- 35 Canals, M., Lopez-Gimenez, J. F. & Milligan, G. Cell surface delivery and structural re-organization by pharmacological chaperones of an oligomerization-defective alpha(1b)-adrenoceptor mutant demonstrates membrane targeting of GPCR oligomers. *Biochem J* **417**, 161-72 (2009).
- 36 Salahpour, A. et al., Homodimerization of the beta2-adrenergic receptor as a prerequisite for cell surface targeting. *J Biol Chem* **279** (32), 33390 (2004).
- 37 Lavoie, C. et al. Beta 1/beta 2-adrenergic receptor heterodimerization regulates beta 2-adrenergic receptor internalization and ERK signaling efficacy. *J Biol Chem* **277**, 35402-10 (2002).
- 38 Ernst, O. P. et al., Monomeric G protein-coupled receptor rhodopsin in solution activates its G protein transducin at the diffusion limit. *Proc Natl Acad Sci U S A* **104** (26), 10859 (2007).
- 39 Whorton, M. R. et al., A monomeric G protein-coupled receptor isolated in a high-density lipoprotein particle efficiently activates its G protein. *Proc Natl Acad Sci U S A* **104** (18), 7682 (2007).
- 40 Mercier, J. F. et al., Quantitative assessment of beta 1- and beta 2-adrenergic receptor homo- and heterodimerization by bioluminescence resonance energy transfer. *J Biol Chem* **277** (47), 44925 (2002).
- 41 Pflieger, K. D. & Eidne, K. A. Monitoring the formation of dynamic G-protein-coupled receptor-protein complexes in living cells. *Biochem J* **385**, 625-37 (2005).

- 42 Issafras, H. et al. Constitutive agonist-independent CCR5 oligomerization and antibody-mediated clustering occurring at physiological levels of receptors. *J Biol Chem* **277**, 34666-73 (2002).
- 43 Wang, D., Sun, X., Bohn, L. M., and Sadee, W., Opioid receptor homo- and heterodimerization in living cells by quantitative bioluminescence resonance energy transfer. *Mol Pharmacol* **67** (6), 2173 (2005).
- 44 Pin, J. P. et al. International Union of Basic and Clinical Pharmacology. LXVII. Recommendations for the recognition and nomenclature of G protein-coupled receptor heteromultimers. *Pharmacol Rev* **59**, 5-13 (2007).
- 45 Ray, K. & Hauschild, B. C. Cys-140 is critical for metabotropic glutamate receptor-1 dimerization. *J Biol Chem* **275**, 34245-51 (2000).
- 46 He, J., Xu, J., Castleberry, A. M., Lau, A. G. & Hall, R. A. Glycosylation of beta(1)-adrenergic receptors regulates receptor surface expression and dimerization. *Biochem Biophys Res Commun* **297**, 565-72 (2002).
- 47 McVey, M. et al. Monitoring receptor oligomerization using time-resolved fluorescence resonance energy transfer and bioluminescence resonance energy transfer. The human delta -opioid receptor displays constitutive oligomerization at the cell surface, which is not regulated by receptor occupancy. *J Biol Chem* **276**, 14092-9 (2001).
- 48 Zeng, F. Y. & Wess, J. Identification and molecular characterization of m3 muscarinic receptor dimers. *J Biol Chem* **274**, 19487-97 (1999).
- 49 Angers, S., Salahpour, A. & Bouvier, M. Biochemical and biophysical demonstration of GPCR oligomerization in mammalian cells. *Life Sci* **68**, 2243-50 (2001).
- 50 Salahpour, A., Bonin, H., Bhalla, S., Petaja-Repo, U. & Bouvier, M. Biochemical characterization of beta2-adrenergic receptor dimers and oligomers. *Biol Chem* **384**, 117-23 (2003).
- 51 Gines, S. et al. Dopamine D1 and adenosine A1 receptors form functionally interacting heteromeric complexes. *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**, 8606-11 (2000).
- 52 Gomes, I. et al. Heterodimerization of mu and delta opioid receptors: A role in opiate synergy. *J Neurosci* **20**, RC110 (2000).
- 53 Pfeiffer, M. et al. Homo- and heterodimerization of somatostatin receptor subtypes. Inactivation of sst(3) receptor function by heterodimerization with sst(2A). *J Biol Chem* **276**, 14027-36 (2001).
- 54 Jordan, B. A. & Devi, L. A. G-protein-coupled receptor heterodimerization modulates receptor function. *Nature* **399**, 697-700 (1999).



- 55 AbdAlla, S., Lothar, H. & Quitterer, U. AT1-receptor heterodimers show enhanced G-protein activation and altered receptor sequestration. *Nature* **407**, 94-8 (2000).
- 56 Scarselli, M. et al. D2/D3 dopamine receptor heterodimers exhibit unique functional properties. *J Biol Chem* **276**, 30308-14 (2001).
- 57 Prinster, S. C., Holmqvist, T. G. & Hall, R. A. Alpha2C-adrenergic receptors exhibit enhanced surface expression and signaling upon association with beta2-adrenergic receptors. *J Pharmacol Exp Ther* **318**, 974-81 (2006).
- 58 Uberti, M. A., Hague, C., Oller, H., Minneman, K. P. & Hall, R. A. Heterodimerization with beta2-adrenergic receptors promotes surface expression and functional activity of alpha1D-adrenergic receptors. *J Pharmacol Exp Ther* **313**, 16-23 (2005).
- 59 Uberti, M. A., Hall, R. A. & Minneman, K. P. Subtype-specific dimerization of alpha 1-adrenoceptors: effects on receptor expression and pharmacological properties. *Mol Pharmacol* **64**, 1379-90 (2003).
- 60 Xu, J. et al. Heterodimerization of alpha 2A- and beta 1-adrenergic receptors. *J Biol Chem* **278**, 10770-7 (2003).
- 61 Zhu, W. Z. et al. Heterodimerization of beta1- and beta2-adrenergic receptor subtypes optimizes beta-adrenergic modulation of cardiac contractility. *Circ Res* **97**, 244-51 (2005).
- 62 Liang, Y. et al., Organization of the G protein-coupled receptors rhodopsin and opsin in native membranes. *J Biol Chem* **278** (24), 21655 (2003).
- 63 Fotiadis, D. et al., Atomic-force microscopy: Rhodopsin dimers in native disc membranes. *Nature* **421** (6919), 127 (2003).
- 64 Fotiadis, D. et al., The G protein-coupled receptor rhodopsin in the native membrane. *FEBS Lett* **564** (3), **281** (2004).
- 65 Rocheville, M. et al. Subtypes of the somatostatin receptor assemble as functional homo- and heterodimers. *J Biol Chem* **275**, 7862-9 (2000).
- 66 Stanasila, L., Perez, J. B., Vogel, H. & Cotecchia, S. Oligomerization of the alpha 1a- and alpha 1b-adrenergic receptor subtypes. Potential implications in receptor internalization. *J Biol Chem* **278**, 40239-51 (2003).
- 67 Lopez-Gimenez, J. F., Canals, M., Padiani, J. D. & Milligan, G. The alpha1b-adrenoceptor exists as a higher-order oligomer: effective oligomerization is required for receptor maturation, surface delivery, and function. *Mol Pharmacol* **71**, 1015-29 (2007).

- 68 Ecke, D. et al. Hetero-oligomerization of the P2Y11 receptor with the P2Y1 receptor controls the internalization and ligand selectivity of the P2Y11 receptor. *Biochem J* **409**, 107-16 (2008).
- 69 Carriba, P. et al. Detection of heteromerization of more than two proteins by sequential BRET-FRET. *Nat Methods* **5**, 727-33 (2008).
- 70 Angers, S. et al., 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), 3684 (2000).
- 71 Jensen, A. A., Hansen, J. L., Sheikh, S. P. & Brauner-Osborne, H. Probing intermolecular protein-protein interactions in the calcium-sensing receptor homodimer using bioluminescence resonance energy transfer (BRET). *Eur J Biochem* **269**, 5076-87 (2002).
- 72 Vrecl, M., Drinovec, L., Elling, C., and Heding, A., Opsin oligomerization in a heterologous cell system. *J Recept Signal Transduct Res* **26** (5-6), 505 (2006).
- 73 Gandia, J. et al. Detection of higher-order G protein-coupled receptor oligomers by a combined BRET-BiFC technique. *FEBS Lett* **582**, 2979-84 (2008).
- 74 Ramsay, D., Kellett, E., McVey, M., Rees, S. & Milligan, G. Homo- and hetero-oligomeric interactions between G-protein-coupled receptors in living cells monitored by two variants of bioluminescence resonance energy transfer (BRET): hetero-oligomers between receptor subtypes form more efficiently than between less closely related sequences. *Biochem J* **365**, 429-40 (2002).
- 75 Breit, A., Lagace, M. & Bouvier, M. Hetero-oligomerization between beta2- and beta3-adrenergic receptors generates a beta-adrenergic signaling unit with distinct functional properties. *J Biol Chem* **279**, 28756-65 (2004).
- 76 James, J. R. et al., A rigorous experimental framework for detecting protein oligomerization using bioluminescence resonance energy transfer. *Nat Methods* **3** (12), 1001 (2006).
- 77 Shimomura, O. The discovery of aequorin and green fluorescent protein. *J Microsc* **217**, 1-15 (2005).
- 78 Yang, F., Moss, L. G. & Phillips, G. N., Jr. The molecular structure of green fluorescent protein. *Nat Biotechnol* **14**, 1246-51 (1996).
- 79 Cody, C. W., Prasher, D. C., Westler, W. M., Prendergast, F. G. & Ward, W. W. Chemical structure of the hexapeptide chromophore of the Aequorea green-fluorescent protein. *Biochemistry* **32**, 1212-8 (1993).
- 80 Tsien, R. Y. The green fluorescent protein. *Annu Rev Biochem* **67**, 509-44 (1998).

- 81 Lippincott-Schwartz, J. & Patterson, G. H. Development and use of fluorescent protein markers in living cells. *Science* **300**, 87-91 (2003).
- 82 Matz, M. V. et al. Fluorescent proteins from nonbioluminescent Anthozoa species. *Nat Biotechnol* **17**, 969-73 (1999).
- 83 Shaner, N. C., Patterson, G. H. & Davidson, M. W. Advances in fluorescent protein technology. *J Cell Sci* **120**, 4247-60 (2007).
- 84 Shaner, N. C., Steinbach, P. A. & Tsien, R. Y. A guide to choosing fluorescent proteins. *Nat Methods* **2**, 905-9 (2005).
- 85 Giepmans, B. N., Adams, S. R., Ellisman, M. H. & Tsien, R. Y. The fluorescent toolbox for assessing protein location and function. *Science* **312**, 217-24 (2006).
- 86 Veith, D. & Veith, M. Biologie fluoreszierender Proteine. *Biol. Unserer Zeit* **35**, 394-404 (2005).
- 87 Prasher, D. C., Eckenrode, V. K., Ward, W. W., Prendergast, F. G. & Cormier, M. J. Primary structure of the *Aequorea victoria* green-fluorescent protein. *Gene* **111**, 229-33 (1992).
- 88 Zhang, J., Campbell, R. E., Ting, A. Y. & Tsien, R. Y. Creating new fluorescent probes for cell biology. *Nat Rev Mol Cell Biol* **3**, 906-18 (2002).
- 89 Prasher, D., McCann, R. O. & Cormier, M. J. Cloning and expression of the cDNA coding for aequorin, a bioluminescent calcium-binding protein. *Biochem Biophys Res Commun* **126**, 1259-68 (1985).
- 90 Inouye, S. et al. Cloning and sequence analysis of cDNA for the luminescent protein aequorin. *Proc Natl Acad Sci U S A* **82**, 3154-8 (1985).
- 91 Head, J. F., Inouye, S., Teranishi, K. & Shimomura, O. The crystal structure of the photoprotein aequorin at 2.3 Å resolution. *Nature* **405**, 372-6 (2000).
- 92 Pflieger, K. D. & Eidne, K. A. New technologies: bioluminescence resonance energy transfer (BRET) for the detection of real time interactions involving G-protein coupled receptors. *Pituitary* **6**, 141-51 (2003).
- 93 Pflieger, K. D. & Eidne, K. A. Illuminating insights into protein-protein interactions using bioluminescence resonance energy transfer (BRET). *Nat Methods* **3**, 165-74 (2006).
- 94 Lorenz, W. W., McCann, R. O., Longiaru, M. & Cormier, M. J. Isolation and expression of a cDNA encoding *Renilla reniformis* luciferase. *Proc Natl Acad Sci U S A* **88**, 4438-42 (1991).
- 95 Wilson, T. & Hastings, J. W. Bioluminescence. *Annu Rev Cell Dev Biol* **14**, 197-230 (1998).

- 96 Xu, Y., Piston, D. W. & Johnson, C. H. A bioluminescence resonance energy transfer (BRET) system: application to interacting circadian clock proteins. *Proc Natl Acad Sci U S A* **96**, 151-6 (1999).
- 97 Boute, N., Jockers, R. & Issad, T. The use of resonance energy transfer in high-throughput screening: BRET versus FRET. *Trends Pharmacol Sci* **23**, 351-4 (2002).
- 98 Bacart, J., Corbel, C., Jockers, R., Bach, S. & Couturier, C. The BRET technology and its application to screening assays. *Biotechnol J* **3**, 311-24 (2008).
- 99 Charest, P. G., Terrillon, S. & Bouvier, M. Monitoring agonist-promoted conformational changes of beta-arrestin in living cells by intramolecular BRET. *EMBO Rep* **6**, 334-40 (2005).
- 100 Rochais, F. et al. Real-time optical recording of beta1-adrenergic receptor activation reveals supersensitivity of the Arg389 variant to carvedilol. *J Clin Invest* **117**, 229-35 (2007).
- 101 Vilardaga, J. P., Bunemann, M., Krasel, C., Castro, M. & Lohse, M. J. Measurement of the millisecond activation switch of G protein-coupled receptors in living cells. *Nat Biotechnol* **21**, 807-12 (2003).
- 102 Nikolaev, V. O., Bunemann, M., Hein, L., Hannawacker, A. & Lohse, M. J. Novel single chain cAMP sensors for receptor-induced signal propagation. *J Biol Chem* **279**, 37215-8 (2004).
- 103 De, A. & Gambhir, S. S. Noninvasive imaging of protein-protein interactions from live cells and living subjects using bioluminescence resonance energy transfer. *Faseb J* **19**, 2017-9 (2005).
- 104 Kocan, M., See, H. B., Seeber, R. M., Eidne, K. A. & Pflieger, K. D. Demonstration of improvements to the bioluminescence resonance energy transfer (BRET) technology for the monitoring of G protein-coupled receptors in live cells. *J Biomol Screen* **13**, 888-98 (2008).
- 105 Pflieger, K. D. et al. Extended bioluminescence resonance energy transfer (eBRET) for monitoring prolonged protein-protein interactions in live cells. *Cell Signal* **18**, 1664-70 (2006).
- 106 Otto-Duessel, M. et al. In vivo testing of Renilla luciferase substrate analogs in an orthotopic murine model of human glioblastoma. *Mol Imaging* **5**, 57-64 (2006).
- 107 Arai, R., Nakagawa, H., Kitayama, A., Ueda, H. & Nagamune, T. Detection of protein-protein interaction by bioluminescence resonance energy transfer from firefly luciferase to red fluorescent protein. *J Biosci Bioeng* **94**, 362-4 (2002).

- 108 Yamakawa, Y., Ueda, H., Kitayama, A. & Nagamune, T. Rapid homogeneous immunoassay of peptides based on bioluminescence resonance energy transfer from firefly luciferase. *J Biosci Bioeng* **93**, 537-42 (2002).
- 109 Yao, H., Zhang, Y., Xiao, F., Xia, Z. & Rao, J. Quantum dot/bioluminescence resonance energy transfer based highly sensitive detection of proteases. *Angew Chem Int Ed Engl* **46**, 4346-9 (2007).
- 110 Chan, W. C. et al. Luminescent quantum dots for multiplexed biological detection and imaging. *Curr Opin Biotechnol* **13**, 40-6 (2002).
- 111 Loening, A. M., Fenn, T. D., Wu, A. M. & Gambhir, S. S. Consensus guided mutagenesis of *Renilla* luciferase yields enhanced stability and light output. *Protein Eng Des Sel* **19**, 391-400 (2006).
- 112 De, A., Loening, A. M. & Gambhir, S. S. An improved bioluminescence resonance energy transfer strategy for imaging intracellular events in single cells and living subjects. *Cancer Res* **67**, 7175-83 (2007).
- 113 Gandia, J., Lluís, C., Ferré, S., Franco, R. & Ciruela, F. Light resonance energy transfer-based methods in the study of G protein-coupled receptor oligomerization. *Bioessays* **30**, 82-9 (2008).
- 114 Ciruela, F. Fluorescence-based methods in the study of protein-protein interactions in living cells. *Curr Opin Biotechnol* **19**, 338-43 (2008).
- 115 Piston, D. W. & Kremers, G. J. Fluorescent protein FRET: the good, the bad and the ugly. *Trends Biochem Sci* **32**, 407-14 (2007).
- 116 Kerppola, T. K. Visualization of molecular interactions by fluorescence complementation. *Nat Rev Mol Cell Biol* **7**, 449-56 (2006).
- 117 Galperin, E., Verkhusha, V. V. & Sorkin, A. Three-chromophore FRET microscopy to analyze multiprotein interactions in living cells. *Nat Methods* **1**, 209-17 (2004).
- 118 Elangovan, M., Day, R. N. & Periasamy, A. Nanosecond fluorescence resonance energy transfer-fluorescence lifetime imaging microscopy to localize the protein interactions in a single living cell. *J Microsc* **205**, 3-14 (2002).
- 119 Michnick, S. W., Ear, P. H., Manderson, E. N., Remy, I. & Stefan, E. Universal strategies in research and drug discovery based on protein-fragment complementation assays. *Nat Rev Drug Discov* **6**, 569-82 (2007).
- 120 Massoud, T. F., Paulmurugan, R., De, A., Ray, P. & Gambhir, S. S. Reporter gene imaging of protein-protein interactions in living subjects. *Curr Opin Biotechnol* **18**, 31-7 (2007).

- 121 Kerppola, T. K. Bimolecular fluorescence complementation (BiFC) analysis as a probe of protein interactions in living cells. *Annu Rev Biophys* **37**, 465-87 (2008).
- 122 Hu, C. D. & Kerppola, T. K. Simultaneous visualization of multiple protein interactions in living cells using multicolor fluorescence complementation analysis. *Nat Biotechnol* **21**, 539-45 (2003).
- 123 Coates, P. J. & Hall, P. A. The yeast two-hybrid system for identifying protein-protein interactions. *J Pathol* **199**, 4-7 (2003).
- 124 Edidin, M., Zagyansky, Y. & Lardner, T. J. Measurement of membrane protein lateral diffusion in single cells. *Science* **191**, 466-8 (1976).
- 125 Axelrod, D. et al. Lateral motion of fluorescently labeled acetylcholine receptors in membranes of developing muscle fibers. *Proc Natl Acad Sci U S A* **73**, 4594-8 (1976).
- 126 Axelrod, D., Koppel, D. E., Schlessinger, J., Elson, E. & Webb, W. W. Mobility measurement by analysis of fluorescence photobleaching recovery kinetics. *Biophys J* **16**, 1055-69 (1976).
- 127 Reits, E. A. & Neefjes, J. J. From fixed to FRAP: measuring protein mobility and activity in living cells. *Nat Cell Biol* **3**, E145-7 (2001).
- 128 Lippincott-Schwartz, J., Snapp, E. & Kenworthy, A. Studying protein dynamics in living cells. *Nat Rev Mol Cell Biol* **2**, 444-56 (2001).
- 129 Godbey, W. T., Wu, K. K. & Mikos, A. G. Tracking the intracellular path of poly(ethylenimine)/DNA complexes for gene delivery. *Proc Natl Acad Sci U S A* **96**, 5177-81 (1999).
- 130 Ikemizu, S. et al. Structure and dimerization of a soluble form of B7-1. *Immunity* **12**, 51-60 (2000).
- 131 Collins, A. V. et al. The interaction properties of costimulatory molecules revisited. *Immunity* **17**, 201-10 (2002).
- 132 Bhatia, S., Edidin, M., Almo, S. C. & Nathenson, S. G. Different cell surface oligomeric states of B7-1 and B7-2: implications for signaling. *Proc Natl Acad Sci U S A* **102**, 15569-74 (2005).
- 133 Aruffo, A. & Seed, B. Molecular cloning of a CD28 cDNA by a high-efficiency COS cell expression system. *Proc Natl Acad Sci U S A* **84**, 8573-7 (1987).
- 134 Edmead, C. E., Lamb, J. R. & Hoyne, G. F. The T cell surface protein, CD28. *Int J Biochem Cell Biol* **29**, 1053-7 (1997).

- 135 Linsley, P. S. et al. Binding stoichiometry of the cytotoxic T lymphocyte-associated molecule-4 (CTLA-4). A disulfide-linked homodimer binds two CD86 molecules. *J Biol Chem* **270**, 15417-24 (1995).
- 136 Lazar-Molnar, E., Almo, S. C. & Nathenson, S. G. The interchain disulfide linkage is not a prerequisite but enhances CD28 costimulatory function. *Cell Immunol* **244**, 125-9 (2006).
- 137 Sprague, B. L. & McNally, J. G. FRAP analysis of binding: proper and fitting. *Trends Cell Biol* **15**, 84-91 (2005).
- 138 Feder, T. J., Brust-Mascher, I., Slattery, J. P., Baird, B. & Webb, W. W. Constrained diffusion or immobile fraction on cell surfaces: a new interpretation. *Biophys J* **70**, 2767-73 (1996).
- 139 Zimmerman, C. M. & Mathews, L. S. Activin receptors: cellular signalling by receptor serine kinases. *Biochem Soc Symp* **62**, 25-38 (1996).
- 140 McLean, A. J. & Milligan, G. Ligand regulation of green fluorescent protein-tagged forms of the human beta(1)- and beta(2)-adrenoceptors; comparisons with the unmodified receptors. *Br J Pharmacol* **130**, 1825-32 (2000).
- 141 Sartania, N., Appelbe, S., Padiani, J. D., and Milligan, G., Agonist occupancy of a single monomeric element is sufficient to cause internalization of the dimeric beta2-adrenoceptor. *Cell Signal* **19** (9), 1928 (2007).
- 142 Bouvier, M., Heveker, N., Jockers, R., Marullo, S. & Milligan, G. BRET analysis of GPCR oligomerization: newer does not mean better. *Nat Methods* **4**, 3-4; author reply 4 (2007).
- 143 Salahpour, A. & Masri, B. Experimental challenge to a 'rigorous' BRET analysis of GPCR oligomerization. *Nat Methods* **4**, 599-600; author reply 601 (2007).
- 144 Lober, R. M., Pereira, M. A. & Lambert, N. A. Rapid activation of inwardly rectifying potassium channels by immobile G-protein-coupled receptors. *J Neurosci* **26**, 12602-8 (2006).
- 145 Digby, G. J., Lober, R. M., Sethi, P. R. & Lambert, N. A. Some G protein heterotrimers physically dissociate in living cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* **103**, 17789-94 (2006).
- 146 Eisenberg, S., Shvartsman, D. E., Ehrlich, M. & Henis, Y. I. Clustering of raft-associated proteins in the external membrane leaflet modulates internal leaflet H-ras diffusion and signaling. *Mol Cell Biol* **26**, 7190-200 (2006).
- 147 Henis, Y. I., Katzir, Z., Shia, M. A. & Lodish, H. F. Oligomeric structure of the human asialoglycoprotein receptor: nature and stoichiometry of mutual complexes containing H1 and H2 polypeptides assessed by fluorescence photobleaching recovery. *J Cell Biol* **111**, 1409-18 (1990).

- 148 Klausner, R. D., Bhalla, D. K., Dragsten, P., Hoover, R. L. & Karnovsky, M. J. Model for capping derived from inhibition of surface receptor capping by free fatty acids. *Proc Natl Acad Sci U S A* **77**, 437-41 (1980).
- 149 Shvartsman, D. E., Kotler, M., Tall, R. D., Roth, M. G. & Henis, Y. I. Differently anchored influenza hemagglutinin mutants display distinct interaction dynamics with mutual rafts. *J Cell Biol* **163**, 879-88 (2003).
- 150 Picard, D., Suslova, E. & Briand, P. A. 2-color photobleaching experiments reveal distinct intracellular dynamics of two components of the Hsp90 complex. *Exp Cell Res* **312**, 3949-58 (2006).
- 151 Webb, W. W., Barak, L. S., Tank, D. W. & Wu, E. S. Molecular mobility on the cell surface. *Biochem Soc Symp*, **191**-205 (1981).
- 152 Maurel, D. et al. Cell-surface protein-protein interaction analysis with time-resolved FRET and snap-tag technologies: application to GPCR oligomerization. *Nat Methods* **5**, 561-7 (2008).



## VII. ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

A	Adenin
Å	Ångström
a.u.	„arbitrary units“
Aa/Bis	Acrylamid/N,N-methylenbisacrylamid
APS	Ammoniumperoxodisulfat
AR	adrenerge(r) Rezeptor(en)
Arg	Arginin
ARIIB	Activin Rezeptor Typ-2B
AS	Aminosäure(n)
Asp	Asparaginsäure
BiFC	„Bimolecular Fluorescence Complementation“
Bp	Basenpaar
BrdU	Bromdesoxyuridin
BRET	Biolumineszenz-Resonanz-Energie-Transfer
BSA	Bovines Serumalbumin
C	kontextabhängig Cystein oder Cytosin
CD	„Cluster of Differentiation“
CER	Cerulean
CFP	„Cyan Fluorescent Protein“
Cy	Cyanine
Cys	Cystein
D	kontextabhängig Diffusionskonstante oder Asparaginsäure
Da	Dalton
dATP	Desoxyadenosintriphosphat
dCTP	Desoxycytidintriphosphat
dGTP	Desoxyguanosintriphosphat
DMEM	„Dulbecco's Modified Eagle's Medium“
DMSO	Dimethylsulfoxid
dNTP	Desoxynucleosidtriphosphat
DOR	$\delta$ -Opioid-Rezeptor
DPBS	„Dulbecco's Phosphate Buffered Saline“
DTT	Dithiothreitol
dTTP	Desoxythymidintriphosphat
E	Energie
E. coli	Escherichia coli
EC <sub>50</sub>	effektive Dosis/Konzentration, bei der ein halbmaximaler Effekt beobachtet wird
ECL	„Enhanced Chemoluminescence“
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EL	„Extracellular Loop“ = extrazelluläre Schleife
ER	endoplasmatisches Retikulum
ERK	Extracellular Signal-regulated Kinase
eYFP	„enhanced“ YFP

FCS	kontextabhängig Fötale Kälberserum oder „Fluorescence Correlation Spectroscopy“
FLIM	„Fluorescence Lifetime Imaging“
FLIP	„Fluorescence Loss in Photobleaching“
FRAP	„Fluorescence Recovery after Photobleaching“
FRET	Fluoreszenz-Resonanz-Energie-Transfer
G	kontextabhängig Glycin oder Guanin
GABA	$\gamma$ -Aminobuttersäure
GFP	„Green Fluorescent Protein“
G <sub>i</sub>	Guaninnucleotid-bindendes Protein, inhibierend
Glu	Glutaminsäure
Gly	Glycin
GPCR	G-Protein-gekoppelter Rezeptor
G <sub>s</sub>	Guaninnucleotid-bindendes Protein, stimulierend
HEK-Zellen	„Human Embryonic Kidney Cells“
HEPES	2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure
HRP	„Horseradish Peroxidase“
I	Isoleucin
IgG	Immunglobulin G
IL	„Intracellular Loop“ = intrazelluläre Schleife
IR	Infrarot
Iso	Isoproterenol
k	Boltzmannkonstante
K	Lysin
kBp	Kilobasenpaare = 1000 Bp
kDa	Kilo-Dalton
KOR	$\kappa$ -Opioid-Rezeptor
L	Leucin
LB-Medium	„Lysogeny Broth“-Medium
LH-Rezeptor	Luteinisierendes Hormon
M	kontextabhängig Molar oder Methionin
MAPK	„Mitogen-activated Protein Kinase“
MEM	„Minimal Essential Medium“
mGlu-Rezeptor	metabotroper Glutamat-Rezeptor
MOPS	3-Morpholinopropansulfonsäure
MOR	$\mu$ -Opioid-Rezeptor
N	kontextabhängig Normalität oder Asparagin
NP-40	Nonidet P-40
NRMC	neonatale Rattenkardiomyozyten
OD	optische Dichte

PAGE	Polyacrylamidgelelektrophorese
PBS	„Phosphate Buffered Saline“
PCR	„Polymerase Chain Reaction“ = Polymerasekettenreaktion
PEI	Polyethylenimin
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
Propra	Propranolol
PVDF	Polyvinylidenfluorid
R	kontextabhängig hydrodynamischer Radius oder Arginin
R <sub>0</sub>	Förster Distanz
RFP	„Red Fluorescent Protein“
Rluc	Renilla Luciferase
ROI	„Region of Interest“
RT	Raumtemperatur
S	Serin
S.E.M.	„Standard Error of the Mean“, Standardfehler
SDS	„Sodium Dodecylsulfate“ = Natriumdodecylsulfat
Ser	Serin
SST-Rezeptor	Somatostatin-Rezeptor
T	kontextabhängig absolute Temperatur oder Thymin
t <sub>1</sub> , t <sub>2</sub>	Zeitkonstanten
TAE-Puffer	Tris-Acetat-EDTA-Puffer
Temed	N,N,N',N'-Tetramethylethan-1,2-diamin
Thr	Threonin
TM	Transmembrandomäne
TNF- $\alpha$	Tumornekrosefaktor- $\alpha$
TR-FRET	„Time-resolved FRET“
TRIS	2-Amino-2-(hydroxymethyl)-propan-1,3-diol
Tyr	Tyrosin
U	Unit
V	kontextabhängig Volt oder Valin
v/v	Volume by Volume, Volumen pro Volumen
Val	Valin
vs.	versus
w/v	„Weight by Volume“, Masse pro Volumen
WT	Wildtyp
YFP	„Yellow Fluorescent Protein“
ZnAc	Zinkacetat
ZNS	zentrales Nervensystem
$\eta$	Viskosität
$\lambda$	Wellenlänge

## VIII. ANHANG:

### DANKSAGUNG

Ich möchte mich ganz herzlich bei Herrn Professor Martin J. Lohse, Herrn Prof. Karl-Norbert Klotz und Herrn Prof. Moritz Bünemann für die Zusammenarbeit und für die Möglichkeit diese Arbeit auf verschiedenen Kongressen zu präsentieren, bedanken.

Besonders bedanke ich mich bei Moritz Bünemann für seine engagierte Betreuung, seine fachlich fundierten Ratschläge und für die Förderung der Weiterentwicklung dieser Arbeit.

Ganz herzlich möchte ich mich auch bei Charly Klotz für die Betreuung und Hilfestellung, aber auch Freiheiten bei der Umsetzung der Aufgabenstellung bedanken.

Herrn Prof. Martin J. Lohse danke ich besonders für die wertvollen Anregungen und konstruktive Kritik, die zum erfolgreichen Gelingen dieses Projektes beigetragen haben.

Frau Prof. Holzgrabe danke ich für die Vertretung dieser Arbeit vor der Fakultät für Chemie und Pharmazie.

Weiterhin bedanke ich mich bei Sonja Kachler und Nico Falgner, die mich in Zellkultur, Bindungs- und Cyclaseassays einarbeiteten, bei Dr. Carsten Hoffmann und Nicole Ziegler, die mir die Grundlagen des Klonierens nahe brachten und bei Michaela Hoffmann, Dr. Christoph Klenk und Rahul Yadav für die Ratschläge und Einführung in Western Blot-Experimente.

Bei Dr. Ulrike Zabel, Dr. Cornelius Krasel und Dr. Slava Nikolaev möchte ich mich für die Bereitstellung von DNA-Konstrukten bedanken, die essenziell für diese Arbeit waren.

Dank geht auch an Nadine Yurdagül-Hemmerich für die Präparation von neonatalen Rattenkardiomyozyten.

Ich möchte mich auch bei allen Mitgliedern und ehemaligen Mitgliedern der Arbeitsgruppe und des Institutes bedanken, die mir bei verschiedensten Fragen zur Durchführung dieser Arbeit Hilfestellungen leisteten.

Schließlich gilt mein besonderer Dank meinen Eltern, die mich stets voll unterstützt haben.