

Analyse der Aktivierung β -adrenerger Rezeptoren

Analysis of β -adrenergic receptor activation

Dissertation zur Erlangung des naturwissenschaftlichen Doktorgrades
der Graduate School of Life Sciences,
Julius-Maximilians-Universität Würzburg,
Klasse Biomedizin

vorgelegt von

Andrea Ahles

aus

Nürnberg

Würzburg 2011

Eingereicht am:

Mitglieder des Promotionskomitees:

- Vorsitzender: Prof. Dr. Thomas Müller
1. Betreuer: Prof. Dr. Dr. Stefan Engelhardt
2. Betreuer: Prof. Dr. Martin Lohse
3. Betreuer: Prof. Dr. Bernhard Nieswandt

Tag des Promotionskolloquiums:

Doktorurkunden ausgehändigt am:

Eidesstattliche Erklärung

Hiermit erkläre ich an Eides statt, die Dissertation „Analyse der Aktivierung β -adrenerger Rezeptoren“ eigenständig, d.h. insbesondere selbstständig und ohne Hilfe eines kommerziellen Promotionsberaters, angefertigt und keine anderen als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel verwendet zu haben.

Ich erkläre außerdem, dass die Dissertation weder in gleicher noch in ähnlicher Form bereits in einem anderen Promotionsverfahren vorgelegen hat.

Würzburg,

Datum

Unterschrift

Affidavit

I hereby declare that my thesis entitled “Analysis of β -adrenergic receptor activation” is the result of my own work. I did not receive any help or support from commercial consultants. All sources and/or materials applied are listed and specified in the thesis.

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

Würzburg,

Date

Signature

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	1
1.1	Das β -adrenerge System	1
1.2	G-Protein-gekoppelte Rezeptoren	2
1.3	Modelle zur Aktivierung von GPCRs	5
1.4	Visualisierung der Rezeptoraktivierung durch Kristallstrukturanalyse	8
1.5	Dynamische Echtzeitmessung der Rezeptoraktivierung mit FRET	10
1.6	Signaltransduktion über β -adrenerge Rezeptoren	13
1.7	Desensibilisierung und Internalisierung β -adrenerger Rezeptoren	15
1.8	Physiologie β -adrenerger Rezeptoren	19
1.9	Polymorphismen in β -adrenergen Rezeptoren	24
1.10	Zielsetzung dieser Arbeit	28
2	Material und Methoden	29
2.1	Chemikalien und Reagenzien	29
2.2	Plasmide	29
2.3	Gensynthese	30
2.4	Enzyme	31
2.5	Bakterienstämme	31
2.6	Eukaryotische Zelllinien	31
2.7	Small interfering RNA (siRNA)	32
2.8	Oligonukleotid-Primer	32
2.9	Antikörper	33
2.10	Pharmaka	33
2.11	Molekularbiologische Methoden	34
2.12	Methoden der eukaryotischen Zellbiologie	42
2.13	Proteinbiochemische Methoden	46
2.14	Mikroskopische Techniken	53
2.15	Untersuchung von Patientenproben	57
2.16	Statistische Auswertung	60
3	Ergebnisse	61
3.1	Das „Aktivierungsgedächtnis“ des β_2 AR	61
3.2	<i>In vivo</i> Relevanz von β_2 AR-Polymorphismen bei Tokolysebehandlung	87
3.3	Das „Aktivierungsgedächtnis“ des β_1 AR	91

4	Diskussion	102
4.1	β AR-FRET-Sensoren	102
4.2	Das „Aktivierungsgedächtnis“ des β_2 AR	107
4.3	Das „Aktivierungsgedächtnis“ des β_1 AR im Vergleich zum β_2 AR	113
4.4	Der Einfluss der β AR-Polymorphismen auf die Rezeptorfunktion	117
5	Zusammenfassung / Summary	120
6	Literaturverzeichnis	122
7	Publikationen und Konferenzbeiträge	139
7.1	Publikationen	139
7.2	Konferenzbeiträge	139
8	Anhang	140
8.1	Sequenzen der synthetisierten Genabschnitte	140
8.2	Abkürzungsverzeichnis	142
8.3	Danksagung	144
8.4	Lebenslauf	145

1 Einleitung

1.1 Das β -adrenerge System

Die Einstellung auf eine Stresssituation koordiniert der menschliche Organismus über das sympathische Nervensystem. Mediatoren des Systems sind die Katecholamine Noradrenalin und Adrenalin. Diese interagieren über spezifische Zelloberflächenrezeptoren, den α - und β -adrenergen Rezeptoren, wie den in dieser Arbeit untersuchten β_1 - und β_2 -adrenergen Rezeptoren (β_1 AR und β_2 AR) (Abbildung 1) (1).

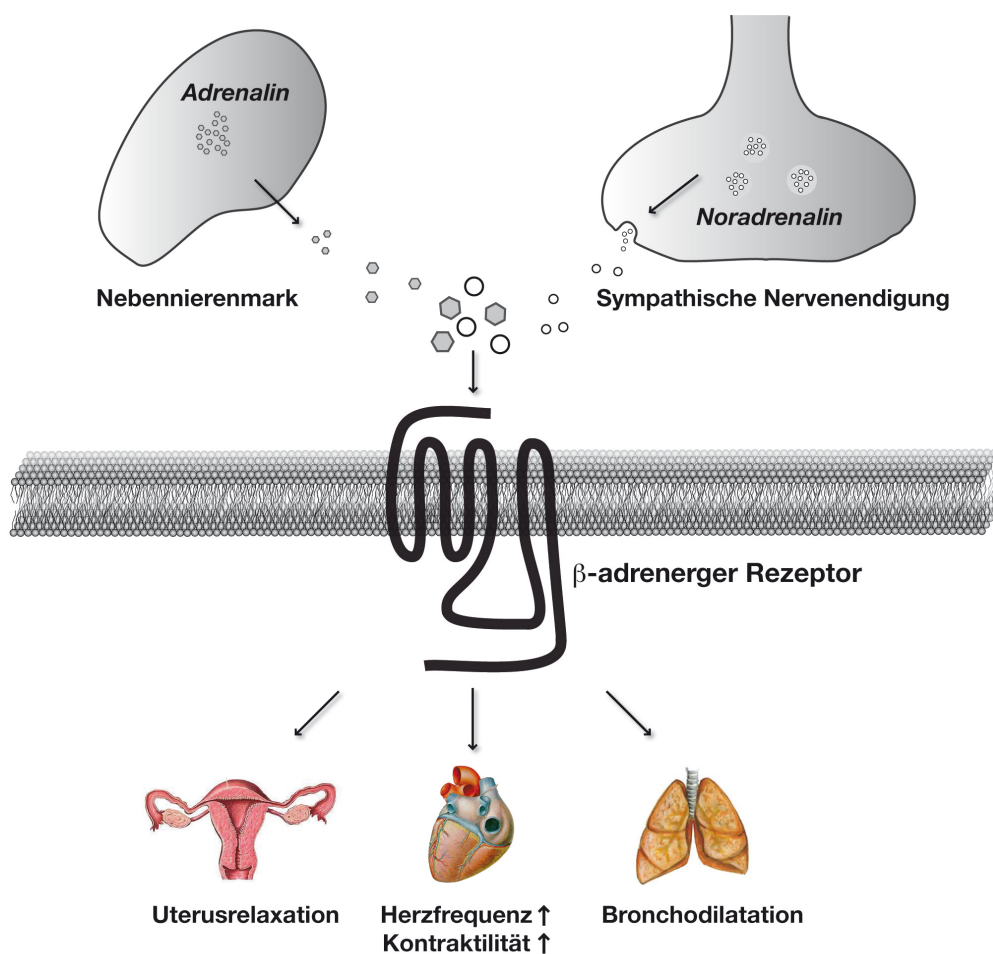


Abbildung 1. Das β -adrenerge System. β AR werden durch aus sympathischen Nervenendigungen freigesetztes Noradrenalin sowie durch Adrenalin, das aus dem Nebennierenmark sezerniert wird und über den Blutkreislauf zu den Zielzellen gelangt, stimuliert. Beispiele ihrer Wirkung im Organismus sind die Erhöhung der Pumpfunktion des Herzens sowie die Relaxation der Bronchien und des Myometriums.

1.2 G-Protein-gekoppelte Rezeptoren

β -adrenerge Rezeptoren gehören den G-Protein-gekoppelten Rezeptoren (GPCRs, G protein-coupled receptors) an, der größten Familie an Zelloberflächenrezeptoren. GPCRs sind transmembranäre Proteine, die extrazelluläre Stimuli über Guaninnukleotid-bindende Proteine (G-Proteine) ins Zellinnere weiterleiten (2). Etwa 950 für GPCRs kodierende Gene wurden bei der Analyse des menschlichen Genoms identifiziert, die Hälfte etwa kodiert für Geruchs- und Geschmacksrezeptoren (3). Das gemeinsame Strukturmerkmal der GPCRs sind sieben hochkonservierte hydrophobe Domänen, welche die Plasmamembran in Form von α -Helices alternierend durchspannen und die bei Sicht von extrazellulär auf den Rezeptor entgegen dem Uhrzeigersinn angeordnet sind. Verbunden sind die Helices durch je drei extrazelluläre und drei intrazelluläre Schleifen. Der Aminoterminus (N-Terminus) liegt extrazellulär, der Carboxyterminus (C-Terminus) im Zellinneren (Abbildung 2).

Aufgrund von Sequenzhomologie in den Transmembrandomänen werden GPCRs in fünf Klassen eingeteilt (4-6): Die Familie rhodopsinähnlicher GPCRs (Klasse A), die Sekretin- (Klasse B), Glutamat- (Klasse C), Adhäsions- (Klasse D) und Frizzled-Taste2-Familie (Klasse E). β AR sind Mitglieder der Klasse A, der größten und funktionell wohl bedeutendsten GPCR-Familie, und zeichnen sich durch ihre strukturelle Ähnlichkeit zum „Lichtrezeptor“ Rhodopsin aus, die 1986 durch die Klonierung der cDNA des β_2 AR erkannt wurde (7).

Zwei Sequenzmotive sind in fast allen Rhodopsin-ähnlichen Rezeptoren hochkonserviert: das E/DRY-Motiv in Transmembrandomäne (TM) 3 und das NP-XX-Y-Motiv der TM7. Beide Motive sind jeweils am zytoplasmatischen Ende der Transmembrandomänen lokalisiert und spielen eine wichtige Rolle bei der Rezeptoraktivierung (Abbildung 2, B und C) (8, 9).

Die transmembranären Helices und der extrazelluläre N-Terminus des Rezeptors sind für die Bindung des Liganden verantwortlich. Der intrazelluläre C-Terminus und insbesondere die dritte zytoplasmatische Schleife vermitteln die Kopplung an G-Proteine, die für die Weiterleitung des Signals im Zellinneren verantwortlich sind (10, 11). Die meisten Rezeptoren der Klasse A, β_1 AR und β_2 AR eingeschlossen, besitzen innerhalb des C-Terminus einen oder mehrere Cysteinreste, die palmitoyliert werden. Dadurch wird der Rezeptor zusätzlich in der Membran verankert und eine „vierte“ intrazelluläre Schleife entsteht, die rezeptorabhängig eine Bedeutung bei der Kopplung an „alternative Signalwege“ über MAP-Kinasen zu haben scheint (12).

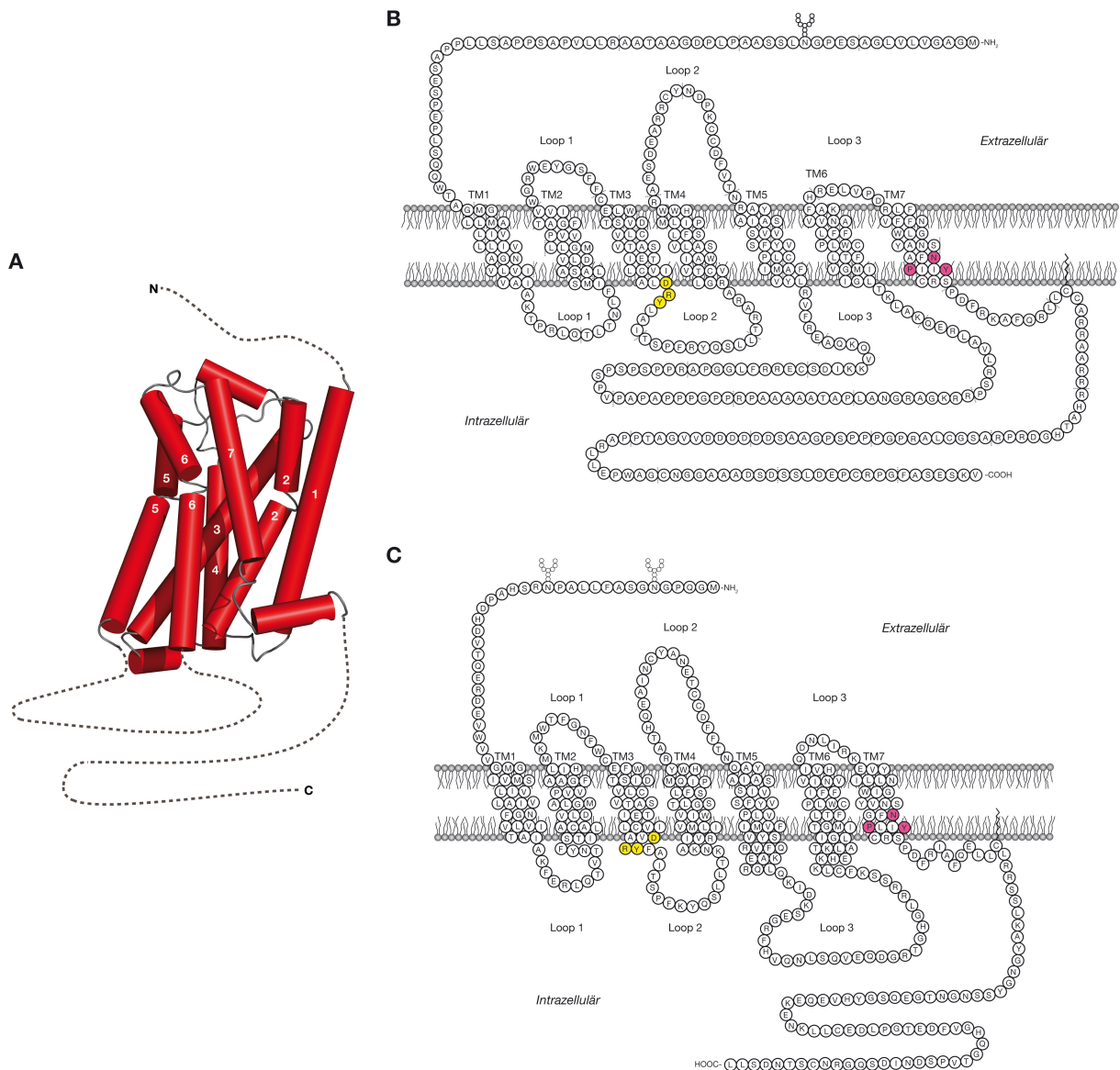


Abbildung 2. Struktureller Aufbau der βAR. (A) Zylinderrepräsentation der Kristallstruktur des Truthahn-β₁AR (13). α-helikale Strukturen sind in rot dargestellt, nicht-helikale Strukturen in grau. In der Kristallstruktur nicht sichtbare Bereiche (N- und C-Terminus, dritte intrazelluläre Schleife) sind arbiträr als gestrichelte Linie hinzugefügt. Die Transmembranhelices sind teilweise gebrochen. Die Anfertigung der Strukturrepräsentation erfolgte mit der Hilfe von Prof. Hermann Schindelin (RVZ, Universität Würzburg). Primärsequenz des humanen (B) β₁AR und (C) β₂AR. Die Grundstruktur der GPCRs wird durch sieben Transmembrandomänen (TM) gebildet, welche die Zellmembran als α-Helices durchspannen. Die Helices sind durch intra- und extrazytoplasmatische Schleifen (jeweils Loop 1-3) miteinander verbunden. Beide Subtypen sind N-terminal an Asparagine N-glycosyliert und durch palmitoylierte Cysteine im C-Terminus zusätzlich in der Membran verankert. Hervorgehoben sind zwei in GPCRs der Rhodopsinfamilie hochkonservierte Sequenzmotive: das E/DRY-Motiv am zytoplasmatischen Ende von TM3 (gelb) und das NP-XX-Y-Motiv in TM7 (rosa).

Der strukturellen Ähnlichkeit der GPCRs steht eine große Zahl von molekular diversen Liganden gegenüber, die an die Rezeptoren auf der extrazellulären Seite binden, diese aktivieren und damit spezifisch intrazelluläre Signalwege anschalten (14). Die Liganden reichen von Photonen, die den retinalen GPCR Rhodopsin aktivieren, über Geschmacksstoffe und Ionen (H^+ und Ca^{2+}), kleinen organischen Molekülen wie Adrenalin bis zu Peptiden und Proteinen. Ihre Vielfalt und zentrale Bedeutung in der interzellulären Kommunikation zufolge sind GPCRs und die G-Protein-vermittelte Signaltransduktion Angriffspunkt von etwa 30% der momentan zugelassenen Medikamente (15).

Die Familie der adrenergen Rezeptoren umfasst neun Mitglieder: drei α_1 AR-Subtypen (α_{1A} , α_{1B} , α_{1D}), drei α_2 AR-Subtypen (α_{2A} , α_{2B} , α_{2C}) sowie die drei β AR (β_1 , β_2 , β_3) (IUPAR Database, <http://www.iuphar-db.org>). Die in dieser Arbeit im Mittelpunkt stehenden Subtypen β_1 AR und β_2 AR werden von intronlosen Genen auf Chromosom 10q24-26 beziehungsweise 5q31-32 kodiert (16, 17). Die Proteinsequenzen von β_1 AR und β_2 AR sind zu 53% identisch, wobei die größte Sequenzhomologie in den Transmembrandomänen festzustellen ist (Abbildung 3). Seit der Klonierung des ersten adrenergen Rezeptors, des β_2 AR, im Jahr 1986 dient dieser neben Rhodopsin als "Modell-GPCR" zur Untersuchung von Ligandenbindung, Rezeptoraktivierung und Signaltransduktion.

```

β1AR  MGAGVLVLGASE PGNLSSAAPLPDGAATAARLLVPASPPASLLPPASESPEPLSQQWTAG
β2AR  MGQ-----PGNGS-----AFL LAPNRSHA----PDHDVTVQQRDEVWVVG

β1AR  MGLLMALIVLLIVAGNVLVIVAIKTPRLQTLTNLFIMSLASADLVMGLLVVFPFATIVV
β2AR  MGIVMSLIVLAIVFGNVLVITAIKFERLQTVTNYFITSLACADLVMGLAVVFPFGAAHIL

β1AR  WGRWEYGSFFCELWTSVDVLCVTASIELTLCVIALDRYLAIITSPFRYQSLLTRARARGLVC
β2AR  MKMWTFGNFWCFEFTSIDVLCVTASIELTLCVIAVDRYFAITSPFKYQSLLTRKNKARV IIL

β1AR  TVWAI SALSFLPI LMHWRAESDEARCYNDPKCCDFVTNRAYAIASSVVSFYVPLCIM
β2AR  MVWIVSGLT SFLPI QMHWYRATHQEA INCYANETCCDFVTNQAYAIASSIVSFYVPLVIM

β1AR  AFVYLRVFRFAQKQVKKIDSCERRFLGGPARPPSPSPSPVPAPAPPPGPPRPA AAAATAP
β2AR  VFVYSRVFQEAQRQLQKIDKSEGRFH-----VQNLSQVEQ-----

β1AR  LANGRAGK-RRPSRLVALREQKALKTLGIIMGVFTLCWLPFFLANVVKAFHRELVPDRLF
β2AR  --DGR TGHGLRRSSKFLKEHKALKTLGIIMGTFTLCWLPFFIVNIVHVIQDNLIRKEVY

β1AR  VFFNWLGYANS AFNPIIYCRSPDFRKA FQRLLCARRAARRRHATHGDRPRASGCLARPG
β2AR  ILLNWI GYVNSGFNPLIYCRSPDFRI AFQELLC LRRSSLK----AYNGYSSNGNTGEQ-

β1AR  PPPSPGAASDDDDDDVVGATPPARLLEPWAGCNGGAAADSDSSLDEPCRPGFASESKV
β2AR  ---SGYHVEQEKENKLLCEDLPG--TEDFVGHQGTVPSDNIDSQGRNCS---TND SLL

```

Abbildung 3. Vergleich der Proteinsequenz von humanem β_1 AR und β_2 AR. Konservierte Aminosäuren sind in rot dargestellt und befinden sich vorrangig in den Transmembrandomänen (grau unterlegt), während die Sequenzen an N- und C-Terminus sowie in der dritten intrazellulären Schleife kaum konserviert sind. Weiterhin sind Aminosäuren, die der gleichen Gruppe angehören, in violett dargestellt, schwache Gruppenhomologie ist blau gekennzeichnet. Das DRY-Motiv ist gelb markiert, das NP-XX-Y-Motiv rosa unterlegt. (Clustal W Alignment mit dem Programm Biology Workbench, <http://workbench.sdsc.edu>).

1.3 Modelle zur Aktivierung von GPCRs

Die spezifische Bindung eines Liganden, ob endogen wie Adrenalin und Noradrenalin, oder synthetisch, an β AR ist die Voraussetzung für seine intrazelluläre Wirkung. Ein Maß für die Stärke der Bindung des Liganden an den Rezeptor ist seine Affinität, die den Gesetzen der Thermodynamik folgt und durch die Dissoziationskonstante K_D bestimmt wird:

$$[R]_f \cdot [L]_f / [RL] = k_{+1} / k_{-1} = K_D$$

Dabei sind $[R]_f$ und $[L]_f$ jeweils die freien Konzentrationen von Rezeptor (R) und Ligand (L), k_{+1} und k_{-1} die Geschwindigkeitskonstanten für die Hin- und Rückreaktion. Je kleiner der K_D -Wert ist, desto höher ist die Affinität des Liganden zum Rezeptor. Ist die freie Konzentration des Liganden gleich K_D , dann ist die Hälfte der Rezeptoren mit Ligand besetzt. Die Konstanten wurden indirekt über Radioligandenbindungsversuche über die Cheng-Prusoff-Gleichung (18) bestimmt und sind in Tabelle 1 für die für diese Arbeit relevanten Liganden am β_1 AR und β_2 AR aufgeführt.

Tabelle 1. Affinität ausgewählter Liganden für die Rezeptorsubtypen β_1 AR und β_2 AR (K_i -Werte) (19).

	β_1 AR	β_2 AR
Agonisten		
Adrenalin	4,0 μ M	0,74 μ M
Noradrenalin	3,6 μ M	26 μ M
Isoprenalin	0,22 μ M	0,46 μ M
Partialagonist		
Fenoterol	13,6 μ M	0,72 μ M
Antagonist		
Propranolol	1,8 nM	0,8 nM

Der Vorstellung über die Aktivierung von GPCRs lag lange Zeit das klassische pharmakologische Modell zweier Rezeptorzustände zugrunde („Two-state model“) (20). In diesem Modell kommen GPCRs in einem Gleichgewicht zwischen dem inaktiven (R) und dem aktiven (R*) Zustand vor. Abhängig von der Art des Liganden, der an den Rezeptor bindet, wird das Gleichgewicht in die eine oder andere Richtung verschoben oder es wird stabilisiert. Bereits ohne Ligand zeichnen sich β AR durch eine basale Aktivität aus, was darauf hindeutet, dass sich immer ein Teil der Rezeptoren im aktivierten Zustand befindet. Diese Basalaktivität ist für den β_2 AR fünfmal höher als für den β_1 AR (21). Die Bindung von Agonisten erhöht die Wahrscheinlichkeit des Übergangs in den R* Zustand. Dabei

unterscheiden sich die Liganden in ihrer „Efficacy“ (Wirksamkeit, intrinsische Aktivität), vereinfacht ausgedrückt in der physiologischen Antwort, die sie initiieren. Die Idee der „Ligand Efficacy“ wurde 1956 von Stephenson eingeführt (22). Agonisten wie die endogenen Liganden Adrenalin und Noradrenalin haben eine höhere Affinität zu R^* , der aktiven Rezeptorkonformation, und lösen damit nach dem „Two-state“ Modell eine volle Aktivierung der intrazellulären Signalwege aus. Partialagonisten wie Fenoterol vermindern die Wirkung, weil sie einen Teil der Rezeptoren in den inaktiven Zustand überführen. Ein Antagonist oder neutraler Agonist bindet mit gleicher Affinität an R und R^* und verschiebt damit das Gleichgewicht nicht und ruft keine physiologische Antwort hervor. Ein inverser Agonist bindet den inaktiven Rezeptor (R) und vermindert somit dessen Basalaktivität (23, 24).

Eine erste Vorstellung der entscheidenden Aminosäuren und der Bewegungen der Transmembrandomänen und des C-Terminus zur Aktivierung von GPCRs brachten biochemische und Mutagenesestudien von Rhodopsin sowie des β_2AR (25-30). Der erste direkte Beleg für ligandenspezifische Konformationsänderungen in einem βAR erfolgte durch Fluoreszenzspektroskopie für den β_2AR . Hier wurden aufgereinigte Rezeptoren mit konformationssensitiven Fluorophoren markiert, in Lipiddoppelschichten rekonstituiert und ligandeninduzierte Änderungen der Fluoreszenzintensität in Abhängigkeit von der Zeit aufgenommen (31-34). Diese Studien zeigten ein agonistinduziertes Rearrangement der Transmembranhelices, insbesondere eine relative Bewegung von TM3 und TM6 sowie die Drehung im Uhrzeigersinn von TM6 und/oder (abhängig vom Agonisten) die Neigung des zytoplasmatischen Endes von TM6 in Richtung TM5. Durch diese Umlagerungen, so die Vorstellung, wurden auf der zytosolischen Seite Epitope für G-Protein-Aktivierung exponiert.

Bei der Rezeptoraktivierung werden nicht-kovalente intramolekulare Interaktionen, die zur Stabilität des basalen Zustandes beitragen, aufgebrochen, sozusagen molekulare „Schalter“ umgelegt. Die dabei essentiellen Aminosäuren wurden durch konstitutiv aktive Rezeptormutanten identifiziert. Dabei kommt es sowohl liganden- als auch rezeptorabhängig zu zahlreichen strukturellen Umlagerungsvorgängen. Als Hauptmechanismen der Rezeptoraktivierung von GPCRs der Rhodopsinfamilie sind dabei erstens der „Rotamer toggle switch“, eine Rotationsbewegung der TM6 um Trp286 im β_2AR (27, 33, 35-37), und zweitens das Aufbrechen von ionischen Interaktionen und Wasserstoffbrücken zwischen dem E/DRY-Motiv am zytoplasmatischen Ende der TM3 und konservierten Strukturen am zytoplasmatischen Ende der TM6 („Ionic lock“, im β_2AR Arg131 in TM3 und Glu268 in TM6) (38) konserviert (Abbildung 4).

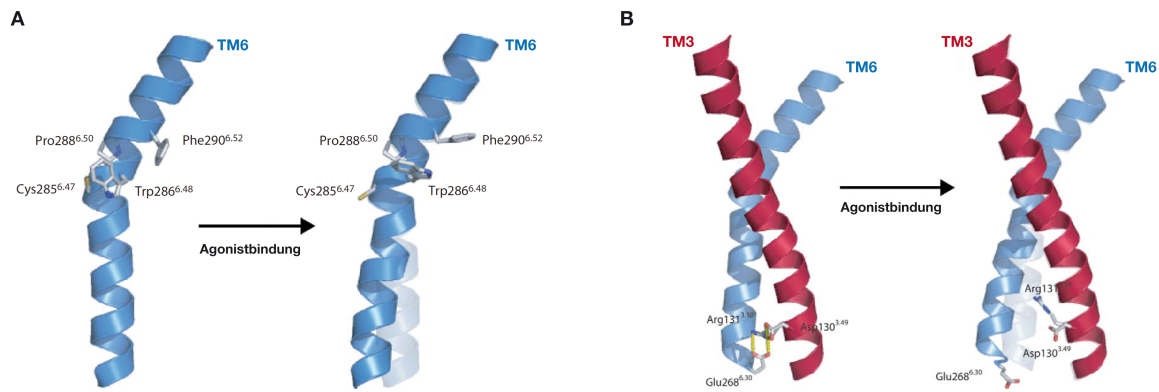


Abbildung 4. „Rotamer toggle switch“ und „Ionic lock“ im β_2 AR. (A) Agonistbindung führt zu Veränderungen im Rotamerzustand der aromatischen Aminosäurereste in TM6. Daraus resultiert eine Veränderung des Winkels des helikalen Knicks, der durch das hochkonservierte Pro288^{6.50} hervorgerufen wird. (B) Der „ionic lock“ stabilisiert die Interaktion zwischen den zytoplasmatischen Enden von TM3 und TM6. Diese Interaktion wird durch Agonistbindung zerstört. Asp130^{3.49} und Arg131^{3.50} gehören dem hochkonservierten DRY-Motiv in TM3 an. Die Nomenklatur X.YY erfolgt hier nach Ballesteros und Weinstein: X stellt das Transmembransegment dar, YY die Position der Aminosäure relativ zu der am stärksten konservierten Aminosäure in der entsprechenden Transmembrandomäne, die wiederum willkürlich die Nummer 50 erhält (39) (Abbildung modifiziert nach (40)).

Zwei Beobachtungen machen jedoch den Bedarf eines komplexeren Modells für die Aktivierung von GPCRs deutlich: Erstens können unterschiedliche Agonisten unterschiedliche Konformationen hervorrufen (36, 41). Daraus resultiert eine alternative Erklärung zur Wirkung partieller Agonisten, nämlich die, dass der Partialagonist am Rezeptor eine andere Konformation als der reine Agonist induziert, die eine weniger effiziente Aktivierung des G-Proteins auslöst und damit eine geringere Signaltransduktion bewirkt. Auch spektroskopische Untersuchungen an aufgereinigten Rezeptoren zeigten die Existenz von intermediären Konformationsstadien des β_2 AR. Agonistbindung induziert demnach eine Sequenz aufeinanderfolgender Konformationsänderungen mit untereinander verschiedenen kinetischen Eigenschaften zur Rezeptoraktivierung, die abhängig ob voller oder partieller Agonist, voll oder nur teilweise durchlaufen werden (41-43). Eine Limitation der Methode der Fluoreszenzspektroskopie ist jedoch die niedrige Geschwindigkeit, mit der die Konformationsänderungen ablaufen. So konnten die agonistinduzierten Änderungen der Fluoreszenzintensität nur in einem Zeitbereich von Minuten beobachtet werden, was nicht die biologische Situation widerspiegelt und was daran liegen kann, dass hier aufgereinigte und dann wieder in Lipiddoppelschichten rekonstituierte Rezeptoren verwendet wurden, deren natürliches Umfeld (G-Proteine u.a.) fehlt. Zweitens kommt es durch die Aktivierung des Rezeptors auch zur Anschaltung G-Protein-unabhängiger Signalwege durch Interaktion mit Arrestinen, die je nach Ligand, mehr oder weniger starke Auswirkung haben (44). Das von Terry Kenakin vorgeschlagene „Konzept multipler Rezeptorkonformationen“ schließt diese Möglichkeiten mit ein und ist daher viel komplexer. Es vereinigt die Existenz multipler,

ligandenabhängiger Rezeptorkonformationen, die nachgeschaltete Signalwege unterschiedlich stark aktivieren (45). Dies geht einher mit einer modifizierten Definition der „Efficacy“ eines Liganden, die nun als der Effekt eines Liganden auf die funktionellen Eigenschaften seines Rezeptors betrachtet wird (46, 47).

1.4 Visualisierung der Rezeptoraktivierung durch Kristallstrukturanalyse

Eine Bestätigung der Umlagerungsvorgänge durch Kristallstrukturanalyse beschränkte sich lange Zeit auf die ersten Strukturen von Rhodopsin (9). In den letzten Jahren erweiterte sich das Repertoire um aktive Formen von Rhodopsin (48-50) sowie um Klasse A Rezeptorstrukturen durch die Kristallisation des humanen β_2 AR (51-56), des Truthahn- β_1 AR (13, 57) und des humanen A_{2A} -Rezeptors (58, 59) jeweils in der inaktiven und der aktiven Konformation.

Durch die Modifikation seiner flexibelsten Regionen, der dritten intrazellulären Schleife und des C-Terminus (60) gelang es im Jahr 2007 der Arbeitsgruppe von Brian Kobilka, große Teile der Struktur des humanen β_2 AR in seinem inaktiven Zustand aufzuklären. Der C-Terminus wurde gekürzt und der dritte Loop durch Bindung eines Fab-Antikörperfragments (52) oder durch Ersatz durch T4-Lysozym (53) stabilisiert. In den resultierenden Strukturen konnten die allgemeine Rezeptorstruktur ähnlich dem Rhodopsin mit sieben Transmembranhelices und einer achten Helix, die parallel zum Zytoplasma der Membran verläuft, sichtbar gemacht werden. Die extrazellulären Regionen konnten jedoch nicht gelöst werden. Während die Struktur an der extrazellulären Oberfläche offen ist, um die Ligandenbindungstasche zu formen, sind die Helices in der intrazellulären Hälfte des Rezeptors dicht gepackt. Diese Kompaktheit macht große Bewegungen der Helices unwahrscheinlich und lässt vermuten, dass Konformationsänderungen schon durch Umlagerung von Seitenketten erwirkt werden können, die dann ein Interaktionsnetzwerk formen. Dabei ist jedoch in beiden Strukturen der „Ionic lock“, der die inaktive Struktur des Rezeptors stabilisiert, nicht intakt. Dies mag entweder ein durch die Modifikationen im Rezeptorprotein hervorgerufenes Kristallisationsartefakt sein oder der Wirklichkeit entsprechen und verlangt damit ein kritisches Hinterfragen seiner Bedeutung in GPCRs mit höherer Basalaktivität als Rhodopsin. Auch könnten die inversen Agonisten Carazolol und Timolol eine Konformation des Rezeptors hervorrufen, die die Intaktheit des Ionic lock zerstört.

Zur Kristallisation des β_2 AR in seiner aktiven Konformation sind Bindungsereignisse sowohl an der extrazellulären als auch der intrazellulären Seite Voraussetzung, das heißt es ist sowohl ein Agonist als auch ein gebundenes G-Protein nötig (61). Die Generierung eines

Komplexes aus humanem β_2 AR und einem Camelid-Antikörperfragment (Nb80, „nanobody“) (55), das G-Protein-ähnliches Verhalten zeigt, sowie einem Komplex aus β_2 AR, Nb80 und Gs (56) ermöglichte die Auflösung der Kristallstruktur des Rezeptors im aktiven Zustand. Verglichen mit dem inaktiven Zustand sind nur geringe Unterschiede in der Ligandenbindungstasche festzustellen, die sich allerdings besonders in einer 11 Å bzw. 14 Å Auswärtsbewegung des zytoplasmatischen Endes von TM6 und in einer α -helikalen Extension des zytoplasmatischen Endes von TM5 auswirken (Abbildung 5). Weiterhin kommt es zu einer Umlagerung der Transmembransegmente 5 und 7 und zur Einwärtsbewegung von TM3 und TM7 relativ zur inaktiven Struktur, was den Vorhersagen aus biochemischen und fluoreszenzspektroskopischen Untersuchungen entspricht.

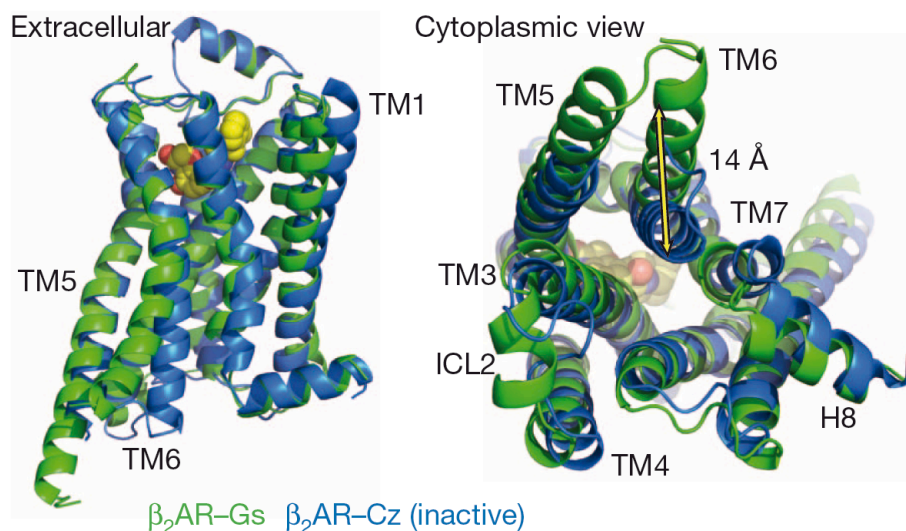


Abbildung 5. Vergleich der aktiven und inaktiven Konformation des β_2 AR (aus (56)). In der Kristallstruktur des inaktiven Rezeptors (blau) ist der inverse Agonist Carazolol gebunden, die Struktur des aktivierten Rezeptors (grün) besteht aus einem Komplex mit G_s-Protein und Ligand BI-167107. Gezeigt sind die seitliche Ansicht (links) und die Sicht von Zytosol aus (rechts). Unterschiede sind für die intrazellulären Domänen von TM5 und TM6 zu beobachten: TM5 ist im aktiven Rezeptor um zwei helikale Drehungen verlängert, TM6 bewegt sich um 14 Å nach außen (gemessen am α -Kohlenstoff von Glu269 (gelber Pfeil) beider Strukturen).

Auch die Struktur des β_1 AR des Truthahns (*Meleagris gallopavo*) wurde dank der Kürzung des Rezeptors an N- und C-Terminus und der Einführung von sechs thermostabilisierenden Mutationen gelöst (13, 62). Der Truthahn- β_1 AR ist zu 67% mit dem humanen Rezeptorprotein homolog, wobei die Transmembranregionen konserviert sind. Die Bindung eines Agonisten induziert im β_1 AR eine 1 Å Verengung der Katecholamin-Bindungstasche relativ zum Antagonist-gebundenen Rezeptor. Dabei zeigte sich die Helix in der zweiten intrazellulären Schleife, die direkt durch ein Tyrosin mit dem DRY-Motiv am Ende von Helix 3 interagiert, als essentiell für die Aktivierung des Rezeptors. Die publizierten Strukturen

zum β_1 AR geben Hinweise auf bindungsbedingte Unterschiede zwischen vollen Agonisten (Carmoterol und Isoprenalin) und Partialagonisten (Salbutamol und Dobutamin) und lassen damit auf eine molekulare Basis für ihre Wirksamkeit schließen: Volle Agonisten bilden Wasserstoffbrücken mit zwei konservierten Serinresten in TM5 (Ser212 und Ser215) aus, die ligandeninduzierte Rotamer-Konformationsänderungen durchmachen, während Partialagonisten nur mit Ser212 interagieren (57).

Vergleicht man die Subtyp-Selektivität zwischen β_1 AR und β_2 AR hinsichtlich der Ligandenbindung, so unterscheiden sich die beiden Subtypen nur in einer der 15 Aminosäuren, die die Antagonisten-Bindungstasche formen, (Tyr308 in TM7 des β_2 AR versus Phe in β_1 AR) (13). Strukturelle Diversität lässt sich bei den Aminosäuren, die den Eingang in die Ligandenbindungstasche bilden, beobachten (63).

Obwohl die Strukturen das Verständnis der Signaltransduktion von GPCRs erweitern und die Entwicklung neuer Liganden mit weniger Nebenwirkungen erleichtern werden, so können sie doch nicht komplett erklären, wie eine extrazellulär stattfindende Ligandenbindung intrazellulär spezifische Signalwege aktiviert. Dies erfordert zusätzlich eine dynamische Charakterisierung der Vorgänge der Konformationsänderungen des Rezeptors, wenn er aktiviert wird.

1.5 Dynamische Echtzeitmessung der Rezeptoraktivierung mit FRET

Die Entdeckung und Weiterentwicklung des aus der Qualle *Aequoria victoria* stammenden grün-fluoreszierenden Proteins GFP öffnete ein weiteres Spektrum der Analyse von GPCRs (64, 65). GFP besteht aus 238 Aminosäuren und hat eine Molekülmasse von 27 kDa. Das eigentliche Fluorophor des GFP bildet sich autokatalytisch aus einer Tripeptidsequenz (Ser65-Tyr66-Gly67) (66). Durch Anregung der Fluoreszenz von GFP kann so die räumliche und zeitliche Verteilung eines mit GFP oder einem seiner weiterentwickelten Varianten fusionierten Proteins in lebenden Zellen, Geweben oder ganzen Organismen direkt beobachtet werden.

Eine Reihe von mikroskopischen Techniken macht sich seine Fluoreszenz zunutze, unter anderem ist es auch die Basis für Fluoreszenz-Resonanz-Energietransfers (FRET, auch Förster-Resonanz-Energietransfer nach Theodor Förster, der die Methode 1948 entwickelte (67)). FRET erlaubt die Aufzeichnung der Aktivierung der in Zellen exprimierten Rezeptoren dynamisch in Echtzeit (68). Es beschreibt einen Prozess, bei dem ein angeregtes fluoreszierendes Molekül (der Donor) seine Energie strahlungsfrei über Dipol-Dipol-Wechselwirkungen auf ein benachbartes Akzeptorfluorophor überträgt. Das populärste FRET-Paar besteht aus den beiden GFP-Varianten CFP (cyan-fluoreszierendes Protein) und

YFP (gelb-fluoreszierendes Protein). Dabei nimmt die Emission des Donor-Moleküls ab, während die des Akzeptors zunimmt. Drei wesentliche Kriterien müssen erfüllt sein, um eine möglichst effiziente strahlungsfreie Energieübertragung von Donor auf Akzeptor zu gewährleisten. 1) Die Spektren der Emission des Donors und der Absorption des Akzeptors müssen überlappen. 2) FRET tritt auf, wenn sich Donor- und Akzeptormolekül in enger räumlicher Nähe befinden ($0,1-10 \text{ nm} = 1-100 \text{ \AA}$). Dabei nimmt die Effizienz des Energietransfers mit der sechsten Potenz des Abstandes der beiden Fluorophore ab. Die Distanz zweier zu FRET befähigter Fluorophore, bei der die Effizienz des strahlungsfreien Energietransfers halbmaximal ist, wird als Förster-Radius (R_0) bezeichnet. 3) Donor und Akzeptor sollten möglichst parallel orientierte elektromagnetische Schwingungsebenen haben (Abbildung 6).

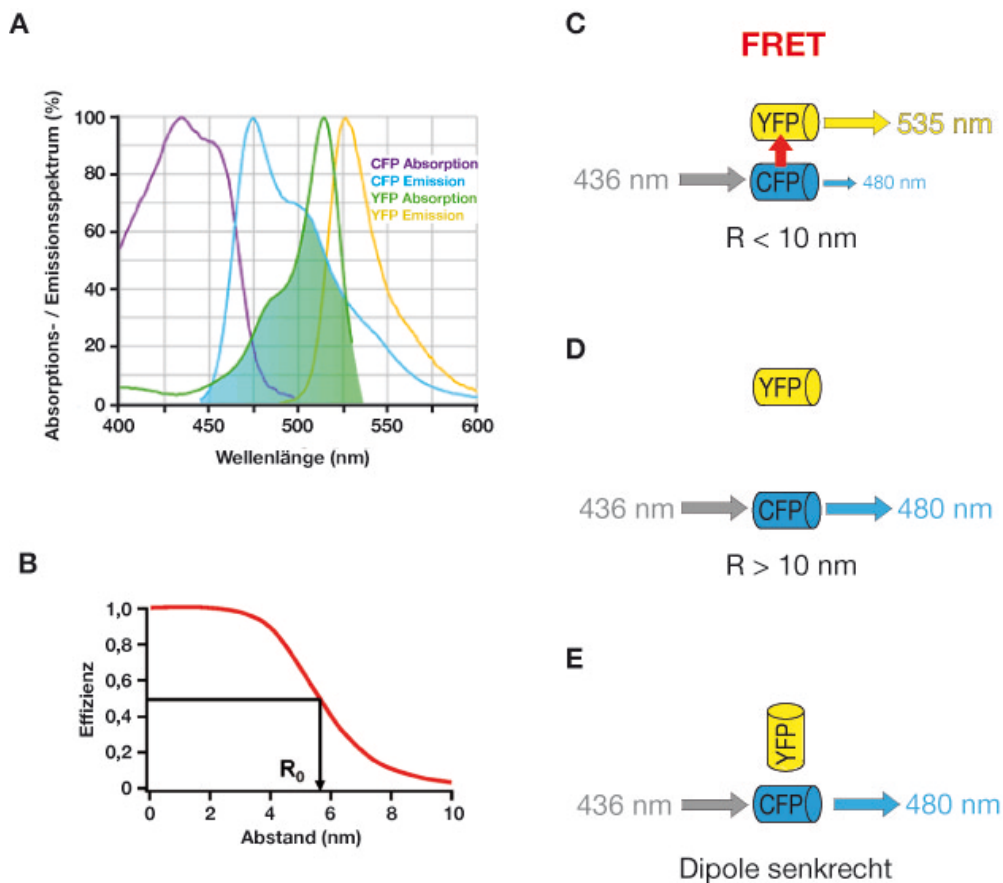


Abbildung 6. Prinzip des Fluoreszenz-Resonanz-Energietransfers (FRET). (A) Absorptions- und Emissionsspektren von CFP und YFP. Der Wellenlängenbereich, in dem sich das Emissionsspektrum des CFP und das Absorptionsspektrum des YFP überlappen, ist grün dargestellt. (B) Die FRET-Effizienz hängt von der sechsten Potenz der Distanz zwischen Donor und Akzeptor ab. Zur Detektion von FRET sollte der Abstand 1-10 nm betragen. Der Förster-Radius R_0 , d.h. der Abstand, bei dem der Energietransfer halbmaximal ist, beträgt für das FRET-Paar CFP/YFP etwa 5 nm. (C) und (D) Schematische Darstellung der Abhängigkeit der FRET-Effizienz vom Abstand der Fluorophore CFP und YFP. (C) Ist $R < 10 \text{ nm}$, so kommt es zum FRET, (D) ist $R > 10 \text{ nm}$, gibt es keinen Energietransfer. (E) Abhängigkeit der FRET-Effizienz von der relativen Orientierung der Fluorophore. Sind die Dipolachsen senkrecht zueinander angeordnet, findet kein FRET statt.

All diese Faktoren gehen in die Bestimmung des Förster-Radius und damit indirekt der FRET-Effizienz E ein: $E = r^{-6} / (r^{-6} + R_0^{-6})$, mit r als Distanz zwischen den Fluorophoren. Ist der Förster-Radius konstant, so ist die FRET-Effizienz direkt von der Distanz der beiden Fluorophore abhängig. Der Förster-Radius setzt sich aus folgenden Parametern zusammen: $R_0 = (JK^2Q_0n^{-4})^{1/6} \cdot 9,7 \cdot 10^3 \text{ \AA}$ (n = refraktiver Index des umgebenden Mediums, Q = Quantenausbeute des Donors in Abwesenheit des Akzeptors, K^2 = Orientierungsfaktor der Dipol-Dipol Interaktion der beiden Fluorophore, J = spektrale Überlappung zwischen Donor-Emission und Akzeptor-Anregung) (67).

Basierend auf der beschriebenen Bewegung von TM6 und damit der sich anschließenden dritten intrazellulären Schleife entstanden durch die Integration der Fluoreszenzmoleküle in der dritten intrazellulären Schleife sowie am C-Terminus Rezeptorkonstrukte (Sensoren), die es ermöglichen den schnellen Übergang in den aktiven Rezeptorzustand durch die Veränderung im intramolekularen FRET live aufzunehmen. Die ersten FRET-Sensoren visualisierten durch Integration von CFP in die dritte intrazelluläre Schleife und durch Fusion von YFP an einen verkürzten C-Terminus die Aktivierung des PTH-Rezeptors nach Stimulation mit Parathormon sowie des α_{2A} -AR durch Aktivierung mit Noradrenalin (69).

In weiteren Studien wurde (neben anderen GPCRs) auch bereits erfolgreich die Aktivierung der β AR-Subtypen β_1 AR (70) und β_2 AR (71, 72) nachvollzogen. Bei allen GPCR-FRET-Sensoren, die an das stimulatorische G_s -Protein koppeln, konnte eine schnelle Abnahme der FRET-Ratio, die sich aus dem Quotienten von YFP- zu CFP-Emission ergibt, beobachtet werden (68) (Abbildung 7). Die Abnahme im Energietransfer reflektiert eine Vergrößerung der Distanz von drittem Loop und C-Terminus bzw. eine räumliche Umorientierung der Fluorophore bedingt durch die Konformationsänderung des Rezeptors bei seiner Aktivierung und dadurch verminderten Energietransfer. Die Kristallstrukturen der aktiven und inaktiven Konformation untermauern eine solche Bewegung, denn sie weisen ein alterniertes Arrangement der Transmembrandomänen 5 und 6 (entspricht dem dritten Loop) und von TM7, der der C-Terminus folgt, auf. Partielle Agonisten geben nur eine partielle Änderung der FRET-Ratio (69, 72, 73), inverse Agonisten zeigen einen Anstieg im FRET (70).

Die FRET-Sensoren ermöglichen nicht nur das Ausmaß der Rezeptoraktivierung zu visualisieren, sondern sie erlauben auch die Kinetiken der Aktivierung und Deaktivierung der Rezeptoren in ihrem intakten Zellmilieu zu bestimmen (74). Die Kinetiken der Rezeptoraktivierung hängen sowohl vom Rezeptor als auch vom Liganden und dessen Konzentration ab (72, 73). Die Aktivierung der β AR hat eine Zeitkonstante τ von etwa 60 ms, liegt damit im Bereich der anderen Klasse A GPCR-Sensoren, repräsentiert durch einen monoexponentiellen Abfall des FRET-Signals (70, 72).

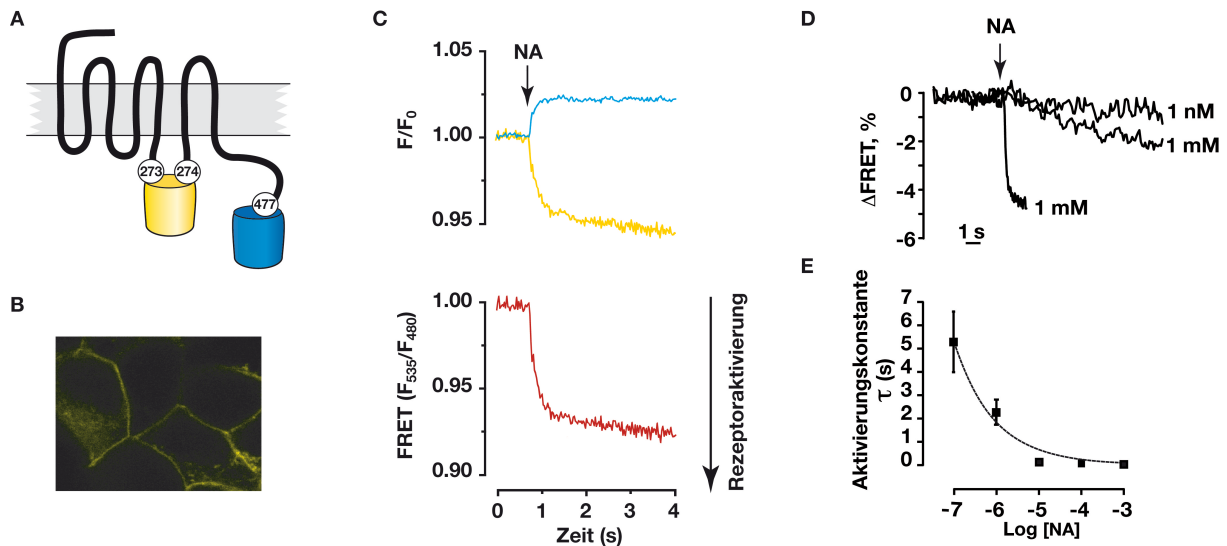


Abbildung 7. β_1 AR-FRET-Sensor (aus (70)). (A) Schematische Darstellung des Sensorkonstrukts, in dem YFP in den dritten intrazellulären Loop integriert wurde und die Cerulean-Variante (75) des GFP mit einer Linkersequenz von 5xGly an den C-Terminus fusioniert wurde. (B) Visualisierung des β_1 AR-FRET-Sensors nach transientser Expression in HEK293-Zellen mittels Konfokalmikroskopie. (C) Zeitabhängige Änderung von Cer- (480 nm, blau) und YFP-Emission (535 nm, gelb) sowie der FRET-Ratio F_{535}/F_{480} (rot) in einer Einzelzelle, die den β_1 AR-FRET-Sensor exprimiert, nach Applikation von 10 μ M Noradrenalin (NA, Pfeil). (D) Zeitabhängige Änderung der FRET-Ratio F_{535}/F_{480} in HEK293-Zellen, die den β_1 AR-FRET-Sensors transient exprimieren, unter Zugabe verschiedenen Noradrenalin (NA)-Konzentrationen. (E) Zusammenhang zwischen Aktivierungskonstante τ und Agonistkonzentration für den β_1 AR-FRET-Sensor. Bei niedrigen Agonistkonzentrationen ist τ direkt proportional zur Konzentration, bei höheren Konzentrationen wird ein Maximum von etwa 60 ms erreicht.

1.6 Signaltransduktion über β -adrenerge Rezeptoren

Das Signal des aktivierten Rezeptors wird intrazellulär über heterotrimere Guaninnukleotid bindende Proteine (G-Proteine) zu Effektorproteinen weitergeleitet. G-Proteine bestehen aus einer α -, einer β - und einer γ -Untereinheit. Die α - und die γ -Untereinheit sind durch eine posttranslationale Lipidmodifikation an der Zellmembran verankert.

Für die Interaktion von GPCR und G-Protein existieren zwei Modelle: Das „collision-coupling“-Modell (76-78) geht von einer freien lateralen Diffusion von GPCR und G-Protein in der Zellmembran aus. Die Aktivierung des G-Proteins erfolgt hier infolge einer zufälligen Kollision eines aktiven GPCRs und eines inaktiven G-Proteins, was zu deren Interaktion führt. Das „Precoupling-Modell“ (79, 80) dagegen setzt einen stabilen Komplex von inaktivem Rezeptor und G-Protein voraus. Die Aktivierung des Rezeptors resultiert hier in einer Konformationsänderung des Rezeptor-G-Protein-Komplexes. Die Vorgänge, die bei der G-Protein-Aktivierung ablaufen, sind in Abbildung 8 schematisch dargestellt.

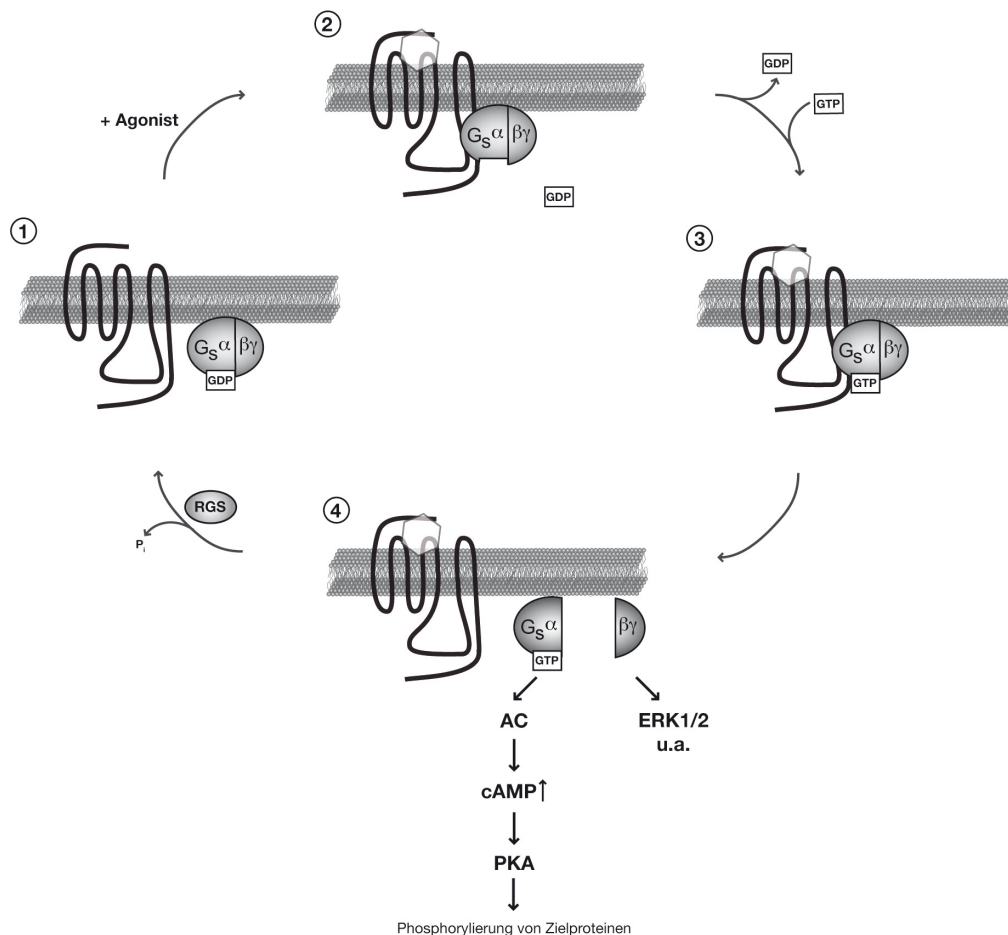


Abbildung 8. Schema des Mechanismus G_s-Protein-vermittelter Signaltransduktion (erläutert in (81)). 1) Im inaktiven Zustand liegt das G-Protein als Heterotrimer (G_sαβγ) vor und die Guaninnukleotid-Bindestelle der G_s-Untereinheit ist mit GDP besetzt. 2) Nach Agonistbindung kommt es zur Interaktion des G-Proteins mit einem aktivierten Rezeptor, was eine Konformationsänderung im G-Protein induziert. Die Affinität des G-Proteins für GDP ist erniedrigt und GDP diffundiert aus der Bindung. Der resultierende Komplex aus aktivem GPCR und nukleotidfreiem G-Protein ist sehr stabil, und wird auch „ternary complex“ genannt (20). 3) Im ternären Komplex ist die Affinität des G-Proteins für GDP und GTP gleich, und es kommt durch die höhere Konzentration in der Zelle mit großer Wahrscheinlichkeit zu einer Bindung von GTP. Das G-Protein wird dadurch aktiviert und zeigt im Folgenden eine erniedrigte Affinität zum aktiven GPCR. 4) Die G_s- und G_{βγ}-Untereinheiten dissoziieren und interagieren mit intrazellulären Effektorproteinen. Nach Hydrolyse von GTP durch die intrinsische GTPase-Aktivität der G_s-Untereinheit erfolgt die Abschaltung der Signaltransduktion und die Reassoziierung mit G_{βγ}. Dieser Vorgang wird durch RGS-Proteine (Regulator of protein signaling) beschleunigt (82, 83).

Die Prozesse der Rezeptor-G-Protein-Interaktion (84-86) und der G-Protein-Aktivierung (87-90) sind mittels FRET visualisiert worden. Dabei zeigte sich eine schnelle Kinetik der β₁AR-G_s-Protein-Aktivierung (Zeitkonstante 60 ms), die damit der Rezeptoraktivierung selbst äquivalent war. Die so gemessene Interaktion hält so lange an, wie der Agonist an den Rezeptor bindet. Das FRET-Signal, das aus der G-Protein-Aktivierung nach Stimulation des β₁AR resultierte, wies eine zehnmal langsamere Kinetik von etwa 500 ms auf (85).

Die Zusammensetzung aus jeweils einer von mindestens 23 α-, sechs β- und zwölf γ-Untereinheiten (81, 91) resultiert in einer Vielzahl von G-Protein-Subtypen, die diverse intrazelluläre Effektorproteine und Signalwege jeweils verschiedenartig regulieren können.

Die Spezifität wird vorrangig durch die $G\alpha$ -Untereinheit bestimmt und ist durch einzelne Aminosäuren in deren C- und N-Terminus und in ihrer α -helikalen Domäne festgelegt (92). Basierend auf Sequenzhomologie und funktioneller Analogie werden G-Proteine in die vier Gruppen G_s , $G_{i/o}$, $G_{q/11}$ und $G_{12/13}$ unterteilt (93, 94). G_s stimuliert die Adenylatzyklase, während G_i diese inhibiert und wiederum GIRK-Kanäle aktiviert. G_q aktiviert Phospholipase C (PLC) und $G_{12/13}$ sind an der Aktivierung kleiner GTP-bindender Proteine beteiligt.

Eine Zelle exprimiert etwa 100 verschiedene GPCRs (95). Wie es zur Präferenz eines Rezeptors für ein bestimmtes G-Protein kommt, ist bis heute unklar. Der β_1 AR und der β_2 AR gehören zu den G_s -gekoppelten Rezeptoren, für den β_2 AR wurde zusätzlich eine Interaktion mit G_i nachgewiesen (96). Durch G_s -Aktivierung wird die membranständige Adenylatzyklase aktiviert, die daraufhin zelluläres ATP (Adenosintriphosphat) in den sekundären Botenstoff cAMP (zyklisches Adenosinmonophosphat) umwandelt. Zur Visualisierung des Anstiegs der cAMP-Konzentration in der Zelle mit der FRET-Methodik sind zahlreiche Sensoren generiert worden, unter anderem basierend auf Proteinkinase A (PKA) (97) oder Epac (Exchange protein activated by cAMP) (98). cAMP aktiviert die Serin/Threonin-Kinase PKA, die im folgenden subtyp-spezifisch Phosphatreste auf Zielproteine überträgt (99). Diese Signalkaskade führt zu einer enormen Verstärkung des ursprünglichen Signals.

1.7 Desensibilisierung und Internalisierung β -adrenerger Rezeptoren

Kontinuierliche Aktivierung von GPCRs führt allerdings mit der Zeit zur Abnahme der Rezeptorantwort, das heißt der Rezeptormechanismus wird unempfindlich gegenüber einem Stimulus, der Rezeptor desensibilisiert. Desensibilisierung stellt einen negativen Rückkopplungsmechanismus dar, der eine Zelle bzw. einen Gewebeverband vor akuter oder chronischer Überstimulation schützt, führt aber gleichzeitig auch zur Aktivierung alternativer Signalwege innerhalb der Zelle und passt langfristig die Signalstärke an den Bedarf des Organismus an. Das Ausmaß der Desensibilisierung entsteht aus der Kombination verschiedener intrazellulärer Mechanismen nach Bindung eines Agonisten. Diese Mechanismen bestehen 1) in der Phosphorylierung des Rezeptors und seiner darauffolgenden Entkopplung von seinem G-Protein (traditionell als Rezeptordesensibilisierung definiert) (100-103), 2) in der Internalisierung von Zelloberflächenrezeptoren in intrazelluläre Kompartimente (104, 105) und 3) in der Herabregulation der Rezeptorzahl an der Membran infolge reduzierter mRNA- und Proteinsynthese sowie infolge von lysosomaler Degradation der Rezeptoren an der Plasmamembran (106-110). Der Beitrag der einzelnen Mechanismen hängt von vielfältigen Faktoren wie der Art des Liganden, des Zelltyps und des Rezeptors ab.

1.7.1 Rezeptorphosphorylierung

Zusätzlich zur Aktivierung von G-Proteinen resultiert die Stimulation der β AR in der Phosphorylierung der Liganden-besetzten Rezeptoren an zytosolischen Serin- und Threoninresten in der dritten intrazellulären Schleife und im C-Terminus durch PKA, Proteinkinase C (PKC) sowie durch G-Protein-gekoppelte-Rezeptorkinasen (GRKs) (Abbildung 9), mit jeweils spezifischer Modulation intrazellulärer Signaltransduktion.

Die Aktivierung der Effektor kinase PKA durch intrazelluläre Botenstoffe führt neben der Phosphorylierung von anderen Zielproteinen (siehe 1.8) auch zur Phosphorylierung der β AR an einem Serin in der dritten zytoplasmatischen Schleife und im C-Terminus (Konsensussequenz (Arg/Lys)-Arg-X-Ser/Thr-Y, X und Y sind bevorzugt kleine, hydrophobe Aminosäuren, Y kein Prolin). Für den β_2 AR ist hier gezeigt, dass durch diese Phosphorylierung die Konformation des Rezeptors so geändert wird, dass seine Interaktion mit dem G_s -Protein vermindert und die Interaktion mit dem G_i -Protein erhöht wird. Dieser Vorgang erfolgt mit einer Halbwertszeit von etwa 3-4 min (96). Da diese Phosphorylierung nicht nur durch die Aktivierung des β_2 AR selbst, sondern auch durch die Aktivierung anderer Rezeptoren cAMP-abhängig erfolgen kann, wird diese Art der Rezeptordesensibilisierung als heterolog (agonistunspezifisch) bezeichnet.

Im Gegensatz dazu erfolgt die homologe, agonist- und rezeptorspezifische Desensibilisierung des β_2 AR innerhalb von Sekunden bis Minuten nach Agoniststimulation. Aktiviert durch die Interaktion mit $G\beta\gamma$ und PIP2 erkennen GRKs spezifisch die aktive Konformation des Rezeptors und phosphorylieren den Liganden-besetzten Rezeptor an zytosolischen Serin und Threonin-Resten, was die Affinität des cytoplasmatischen Proteins β -Arrestin 10- bis 30fach erhöht. Für die Phosphorylierung durch GRKs ist bis heute keine Konsensussequenz bekannt. Die spezifisch phosphorylierten Stellen im β_2 AR sind durch Mutagenesestudien sowie Massenspektrometrieanalysen gut definiert (100, 111-115), dies ist jedoch nicht der Fall für den humanen β_1 AR.

Dabei zeichnet sich mehr und mehr ab, dass die GRK-Subtypen spezifische, eventuell auch von Zelltyp zu Zelltyp verschiedene Phosphorylierungsmuster erzeugen können. Sieben GRK-Isoformen sind bekannt, deren Vorkommen in Tabelle 2 aufgelistet ist. GRK1-3 sind in unstimulierten Zellen im Zytosol lokalisiert und translozieren bei Aktivierung der Rezeptoren durch Interaktion mit $G\beta\gamma$ an die Zellmembran, während GRK4-6 dagegen konstitutiv membranständig sind. Für ihre Funktion ist ihre hochkonservierte katalytische Domäne entscheidend (116-119).

Tabelle 2. GRKs und Arrestine.

	Alternativer Name	Vorkommen	Referenz
GRKs			
GRK1	Rhodopsinkinase	Retina, zytosolisch	(120)
GRK2	β -adrenerge-Rezeptor-Kinase-1 (β ARK-1)	ubiquitär, zytosolisch	(121)
GRK3	β -adrenerge-Rezeptor-Kinase-2 (β ARK-2)	Ubiquitär, zytosolisch	(117)
GRK4	IT-11	Hoden, membranständig	(122)
GRK5		Ubiquitär, membranständig	(123, 124)
GRK6		Ubiquitär, membranständig	(125)
GRK7	GRK der retinalen Zapfen	Retina	(126)
Arrestine			
Arrestin 1	Visuelles Arrestin	Retina	(127, 128)
Arrestin 2	β -Arrestin-1	Ubiquitär außerhalb der Retina	(103)
Arrestin 3	β -Arrestin-2	Ubiquitär außerhalb der Retina	(129)
Arrestin 4	Arrestin der retinalen Zapfen, X-Arrestin	Retina	(130, 131)

1.7.2 Entkopplung und Internalisierung

Phosphorylierung der β AR reicht jedoch für eine vollständige Inaktivierung des Rezeptors nicht aus. Dazu wird noch ein „arresting agent“ benötigt – Arrestin, das an den agonistaktivierten und GRK-phosphorylierten Rezeptor bindet (132).

Arrestin 2 (β -Arrestin1) und Arrestin 3 (β -Arrestin2) sind dabei die zwei Arrestin-Isoformen, die ubiquitär exprimiert werden und deren Beteiligung an der Regulation der β AR sowie vieler anderer GPCRs nachgewiesen ist (129, 133, 134) (Tabelle 2). Die Bindung von Arrestin verhindert sterisch die Bindung und Aktivierung von G_s in Anwesenheit des Stimulus, entkoppelt den Rezeptor damit von seinem G-Protein und reduziert seine Potenz der klassischen Signalweiterleitung. Dabei zeigt β -Arrestin2 eine 2,5fach höhere Affinität zum β_2 AR als β -Arrestin1 (135).

Die Kinetik der Interaktion von β -Arrestin2 mit dem β_2 AR wurde mittels intermolekularem FRET durch Markierung von Rezeptor und Arrestin mit YFP bzw. CFP untersucht. Die Geschwindigkeit hängt dabei von der Verfügbarkeit der GRKs ab und damit von der Rezeptorphosphorylierung. Ein zweiter Agonistpuls dagegen reflektiert die Geschwindigkeit der β -Arrestin-Translokation an den bereits phosphorylierten Rezeptor (136).

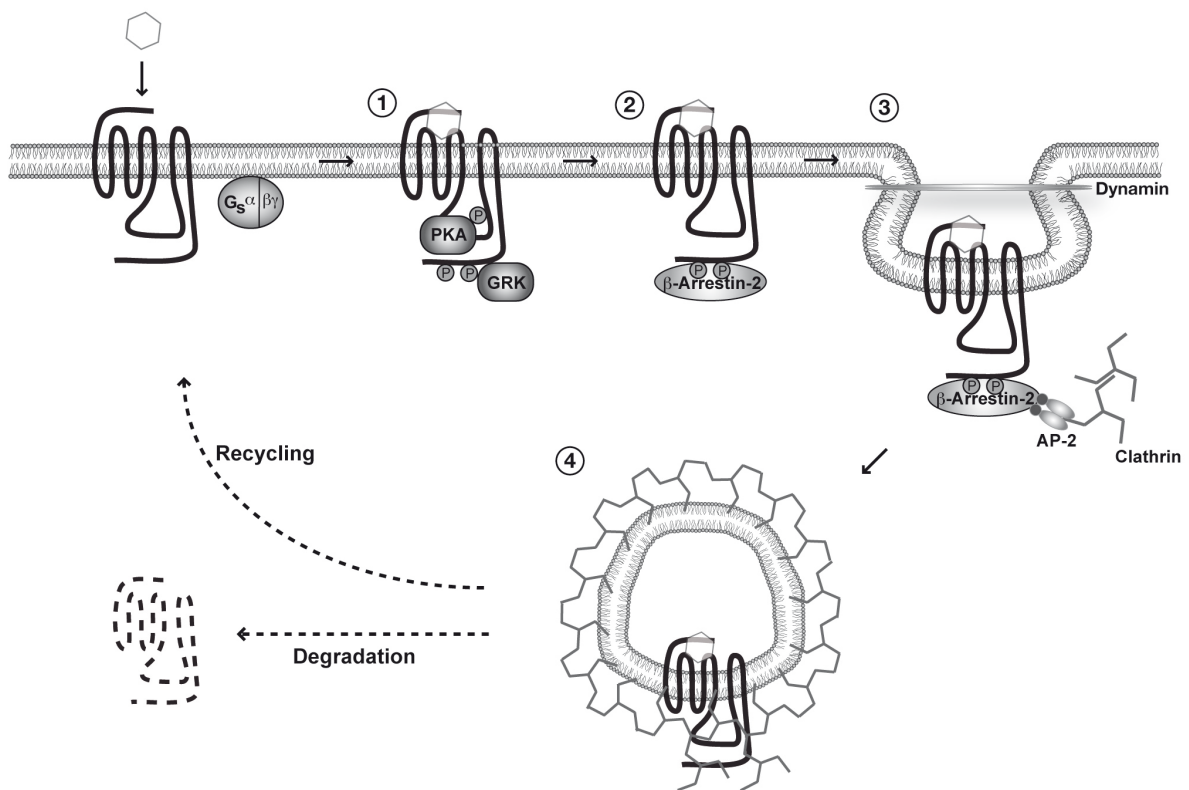


Abbildung 9. Desensibilisierung des β_2 AR. 1) Nach Rezeptoraktivierung durch Agonistbindung wird der β_2 AR durch PKA bzw. GRK phosphoryliert. 2) Letztere Modifikation führt zur Entkopplung des Rezeptors von seinem G-Protein und zur Rekrutierung von β -Arrestin an den Rezeptor. 3) Der Rezeptor-Arrestin-Komplex akkumuliert in Clathrin-beschichteten Ausstülpungen, die durch das Protein Dynamin von der Zellmembran abgekapselt werden und 4) damit Endozytosevesikel bilden. Die internalisierten Rezeptoren aktivieren keine G-Proteine mehr, können voll funktionell an die Zellmembran zurückkehren oder werden degradiert.

Im folgenden vermitteln Arrestine die Clathrin-abhängige Endozytose durch Interaktion mit Elementen der Endozytosemaschinerie, wie der schweren Kette von Clathrin oder dem Clathrin-Adaptorprotein AP2 (137, 138). Clathrin-beschichtete Vesikel schnüren sich von der Plasmamembran Dynamin-abhängig ab. Nach endozytotischer Aufnahme wird der Rezeptor-Arrestin-Komplex im sauren Milieu des Vesikels dephosphoryliert. Hierdurch dissoziieren Arrestin und der Ligand vom Rezeptor, und der Rezeptor kehrt voll funktionell an die Plasmamembran zurück oder er wird in interne Membranen von späten Lysosomen transferiert, ein Ereignis, das ihn für lysosomale Degeneration bereit macht. Die Internalisierung der Rezeptoren passiert innerhalb von Minuten nach Agoniststimulation (139).

Ob diese Prozesse für den β_1 AR analog ablaufen, ist noch nicht klar erwiesen. So begehen β_2 AR Agonist-induzierte Endozytose in Kardiomyozyten, während der β_1 AR dagegen an der Zellmembran verbleibt. Interaktion des PDZ-Motivs am C-Terminus des β_1 AR mit PSD-95 oder einem verwandten Protein diktiert Signalspezifität, hält den Rezeptor an der

Zellmembran und verhindert Interaktion eine mit G_i (140). Phosphorylierung des murinen β_1 AR durch PKA kann Agonist-induzierte Internalisierung des Rezeptors triggern, PKA-medierte Phosphorylierung führt zu Internalisierung über den Caveolae-Signalweg, GRK Phosphorylierung des β_2 AR zu Internalisierung durch Clathrin-beschichtete Vesikel (141).

1.7.3 Alternative Signaltransduktion

Zusätzlich sind GRKs und Arrestine an Signalweiterleitung, kooperativen Effekten in der Zusammenführung von makromolekularen Komplexen in der Umgebung des Rezeptors sowie an der Interaktion mit verschiedenen Signaltransduktionskomponenten beteiligt (119, 142-145). Dies geschieht unabhängig von der Aktivierung der G-Proteine und schließt unter anderem die Aktivierung der Signalwege von MAPK, AKT und PI3K sowie die Transaktivierung des EGF-Rezeptors ein (47). Noch ist die molekulare Basis, die das Ausmaß der Aktivierung G-Protein-abhängiger und G-Protein-unabhängiger Signalwege bestimmt, unklar. In der Diskussion stehen Phosphorylierungsmuster („Barcodes“) für jeden Agonist, die das intrazelluläre Signal bestimmen. Hier würde ein bestimmter Agonist und eine bestimmte GRK-Isoform (möglicherweise zelltypabhängig) ein bestimmtes Phosphorylierungsmuster des Rezeptors hervorrufen, das wiederum eine bestimmte Antwort auslösen kann (115, 146). Neue Erkenntnisse, dass verschiedene Liganden unterschiedlich stark G-Protein-abhängige und G-Protein-unabhängige Signalwege aktivieren können, unterstützen die Idee der Existenz ligandenselektiver Konformationen sowie das Konzept der funktionellen Selektivität (auch als „Biased agonism“ oder „agonist-selektivem Stimulus-Trafficking oder Liganden-selektivem Agonismus“ bezeichnet) (147, 148). Die molekularen Grundlagen und funktionellen Konsequenzen des „Biased agonism“ sind Gegenstand der aktuellen Forschung.

1.8 Physiologie β -adrenerger Rezeptoren

β AR sind auf der Oberfläche zahlreicher Zelltypen diverser Organe exprimiert, darunter im Herzen, der glatten Muskulatur und im Fettgewebe. Im gesunden Herzen führt die Aktivierung der β AR zu einer Steigerung der Herzleistung und Herzfrequenz (99). In der Niere kommt es β_1 AR-vermittelt zur Sekretion von Renin. In der glatten Muskulatur der Bronchien, der Gebärmutter und der Blutgefäße führt die Aktivierung des β_2 AR zur Erschlaffung und damit zur Erweiterung der Organe. Zusätzlich werden über den β_2 AR Glukoneogenese und Glykogenoyse in der Leber angeregt, im Pankreas die Insulinsekretion

induziert und in Mastzellen kommt es zu einer verminderten Degranulation (149). β AR sind Angriffspunkte der Therapie zahlreicher Erkrankungen des Herz-Kreislaufsystems, die in Tabelle 3 zusammengefasst sind. Der β_3 AR wurde vorwiegend im braunen Fettgewebe gefunden und führt dort zu Lipolyse und Thermogenese (150).

Tabelle 3. β AR als Zielmoleküle pharmakologischer Beeinflussung (modifiziert aus (151)).

Erkrankung	Substanzklasse	Effekt
Asthma	β_2 -Agonisten	Bronchodilatation
Vorzeitige Wehen	β_2 -Agonisten	Uterusrelaxation
Anaphylaktischer Schock	β -Agonisten	Vasokonstriktion, Histaminfreisetzung ↓
Ischämische Herzerkrankung	β -Blocker	Kardialer Sauerstoffbedarf ↓, antiarrhythmisch
Bluthochdruck	β -Blocker	Herzzeitvolumen ↓, Reninsekretion ↓
Herzinsuffizienz	β -Blocker	Protektion vor toxischen Katecholamin-Effekten, antiarrhythmisch
Arrhythmie	β -Blocker	antiarrhythmisch
Glaukom	β -Blocker	Produktion von Kammerwasser ↓

1.8.1 Physiologische Wirkung der β -adrenergen Rezeptoren am Herzen

Im Herzen werden nach Stimulation der β AR zahlreiche für die Steigerung der Herzfunktion entscheidende Proteine phosphoryliert (Abbildung 10): L-Typ Ca^{2+} -Kanäle (152, 153), Phospholamban (154), Troponin I (155), Ryanodinrezeptoren (156), Myosin-bindendes Protein C (MyBP-C) (157), und Protein-Phosphatase-Inhibitor-1 (158). Dies erhöht die Kontraktilität der Kardiomyozyten durch den Anstieg des Ca^{2+} -Einstroms (vermittelt über Ca^{2+} -Kanäle vom L-Typ), eine erhöhte Wiederaufnahme von Ca^{2+} in das sarkoplasmatische Retikulum (über die Aufhebung des inhibitorischen Effekts von nichtphosphoryliertem Phospholamban auf die Aktivität der sarkoplasmatischen Ca^{2+} Pumpe SERCA – Beschleunigung der Relaxation) sowie durch eine Modulation der Ca^{2+} Sensitivität der Myofilamente (über Troponin I und MyBP-C). Zusätzlich öffnet cAMP direkt HCN-Schrittmacherkanäle (159).

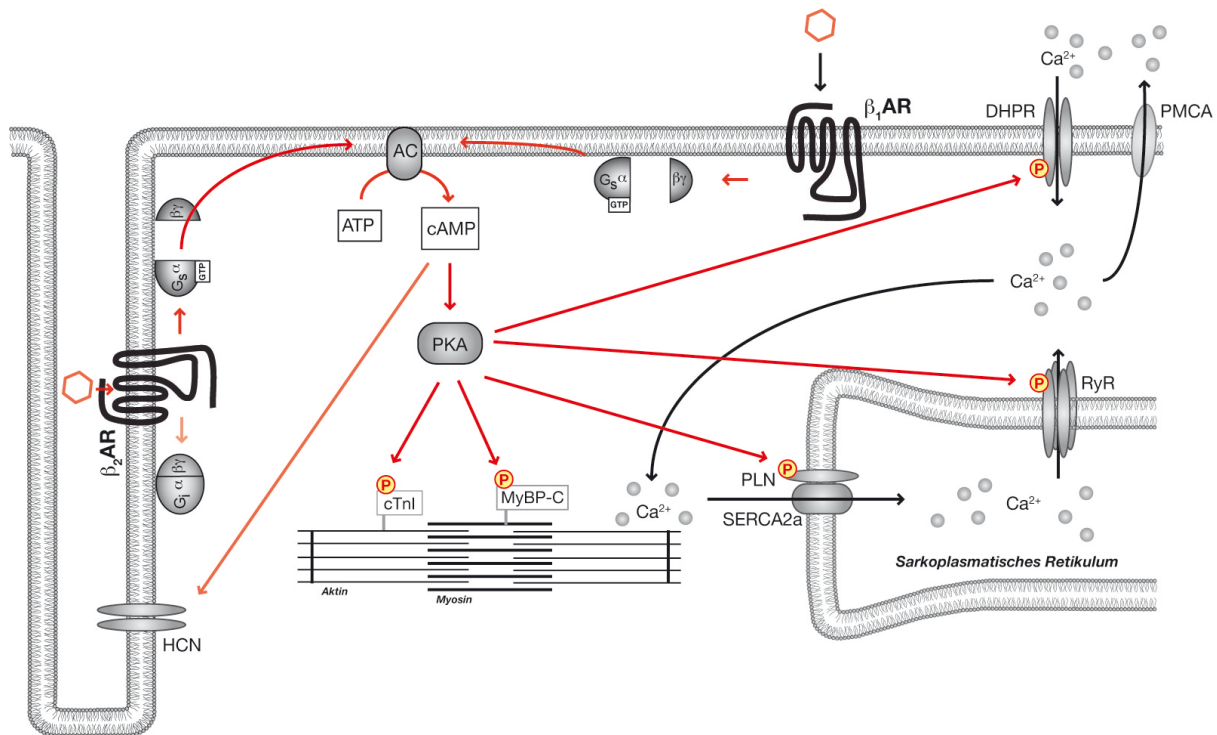


Abbildung 10. Signaltransduktion über β AR im Kardiomyozyten. Agonistaktivierung der β AR führt über Gs-Kopplung zur Aktivierung der Adenylatzyklase (AC). Dadurch wird der cAMP-Spiegel im Kardiomyozyten erhöht und die Proteinkinase A (PKA) wird aktiviert. PKA phosphoryliert spezifisch Zielproteine und reguliert dadurch die zytosolische Ca^{2+} -Konzentration. Der β_2 AR kann zusätzlich das inhibitorische Gi-Protein koppeln. RyR – Ryanodinrezeptor, PLB – Phospholamban, SERCA – sarkoplasmatische Ca^{2+} -ATPase, DHPR – Dihydropyridinrezeptor, PMCA – Plasmamembran- Ca^{2+} -ATPase, HCN – hyperpolarisationsaktivierter, durch zyklische Nukleotide modulierter Kationenkanal.

Der cAMP-Signalweg im Kardiomyozyten wird sowohl durch β_1 AR als auch durch β_2 AR vermittelt, jedoch trägt der β_1 AR wesentlich mehr zu den funktionellen Effekten bei. Dafür gibt es mehrere Gründe: 1. Im gesunden Herzen sind der β_1 AR und der β_2 AR in einem Verhältnis 70:30 exprimiert (160). 2. Die endogenen Liganden Noradrenalin und Adrenalin haben unterschiedliche Affinitäten für die Rezeptor-Subtypen (Tabelle 1) (19). 3. Während die cAMP-Akkumulation im Falle der Stimulation des β_1 AR über die ganze Zelle verläuft, ist diese bei Aktivierung des β_2 AR lokal beschränkt. Dies geht einher mit einer unterschiedlichen Lokalisation von β_2 AR (in den T-Tubuli) und β_1 AR (über die Zelle verteilt). (161, 162) 4. Auch Phosphodiesterasen sind Subtyp-spezifisch lokalisiert (163). 5. β AR bewirken distinkte PKA-Phosphorylierungsmuster (164). 6. Der β_2 AR kann auch an G_i koppeln (165), diese Kopplung ist durch PKA-Phosphorylierung des Rezeptors begünstigt (96). 7. β_2 AR desensibilisieren über GRK/Arrestin, dies bedeutet gleichzeitig, dass G-Protein unabhängige alternative Signalwege durch den β_2 AR spezifisch angeschaltet werden (166). Darüber hinaus sind β AR auch auf Nicht-Kardiomyozyten exprimiert und können so zum

Beispiel über die Vermittlung parakriner Effekte in die Funktion der Herzmuskelzellen und damit in die Funktion des Herzens eingreifen.

Unterschiede sind auch bei chronischer Stimulation zu beobachten: Hier resultiert die Aktivierung des β_1 AR in der Hypertrophie von kultivierten Rattenkardiomyozyten, nicht so bei Aktivierung des β_2 AR (167). Im Einklang mit dieser Beobachtung entwickeln transgene Mäuse, die den β_1 AR in Kardiomyozyten überexprimieren, eine progressive Hypertrophie und schließlich einen Herzinsuffizienz-Phänotyp (168), Überexpression des β_2 AR dagegen resultiert in einem Anstieg der Herzfunktion ohne Kardiomyopathie (169). Dies könnte auf eine protektive, anti-apoptotische Rolle des β_2 AR zurückzuführen und durch seine Kopplung an G_i bedingt sein, während chronische Stimulation des β_1 AR proapoptotisch (170) und damit toxisch für das Herz zu sein scheint.

Das β -adrenerge System spielt eine zentrale Rolle in der Pathologie der Herzinsuffizienz, einer der häufigsten Todesursachen in den westlichen Industrieländern. Die Pumpleistung des Herzens ist reduziert, so dass die Blutversorgung des Körpers seinem metabolischen Bedarf nicht mehr gerecht wird. Hier ist das sympathische Nervensystem chronisch aktiviert und es kommt zu einem Anstieg der zirkulierenden Noradrenalin-Konzentration, der mit der Schwere der Krankheit korreliert. Die heutige Standardtherapie der Herzinsuffizienz sind daher β -Blocker, die die chronische Stimulation des β_1 AR antagonisieren (171).

Darüber hinaus ist die Expression des prädominanten β_1 AR herabreguliert und die verbleibenden Rezeptoren sind, vermutlich bedingt durch eine erhöhte Aktivität der GRK-Isoformen 2 und 5, von G_s entkoppelt. Zugleich nimmt die G_i -Dichte zu, die der klassischen β -adrenergen Signaltransduktion entgegenwirkt. Darüber hinaus kommt es zu einer Auflösung der T-tubulären Strukturen im Kardiomyozyten und damit zu einer Umverteilung der Rezeptoren (162). Die Bedeutung der Rezeptordesensibilisierung für die Progression der Herzinsuffizienz ist bis heute unklar, denn auf der einen Seite kann dies einen Adaptationsmechanismus darstellen, um das Herz vor den schädlichen Effekten chronischer Stimulation des β_1 AR zu schützen, auf der anderen Seite könnte die Situation dadurch aber verschlimmert werden, denn so ist das Herz noch weniger in der Lage, die Anforderungen des Körpers zu erfüllen.

1.8.2 Physiologische Effekte einer Stimulation der β AR am glatten Muskel

Die Basis für die Kontraktilität der glatten Muskulatur, unter anderem der Gefäßwände und des Uterus, ist die Interaktion zwischen Aktin und Myosin. Calciumabhängig können sich durch eine Konformationsänderung dieser beiden Moleküle die Aktinfilamente zwischen die

Myosinfilamente schieben und so zur Verkürzung der Myozyten führen. Myosin wird durch die Myosin-Leichtketten(= light chain)-Kinase (MLCK) reguliert. Steigt der Calciumspiegel in der Zelle, bindet dieses an Calmodulin und der Ca^{2+} -Calmodulin-Komplex aktiviert die MLCK. Die aktivierte MLCK wiederum phosphoryliert die regulative leichte Kette des Myosins. Das phosphorylierte Myosin interagiert mit Aktin und formt einen funktionsfähigen Struktur-Komplex, der fähig ist, die chemische Energie von ATP in die mechanische Energie einer Kontraktion zu konvertieren (172).

Über die Stimulation des $\beta_2\text{AR}$ kann die Kontraktion inhibiert werden, denn die MLCK kann durch die cAMP-abhängige Proteinkinase A phosphoryliert werden, was zu einer herabgesetzten Affinität für den Ca^{2+} -Calmodulin-Komplex und letztlich zu einer Inaktivierung der MLCK und Muskelrelaxation führt (Abbildung 11).

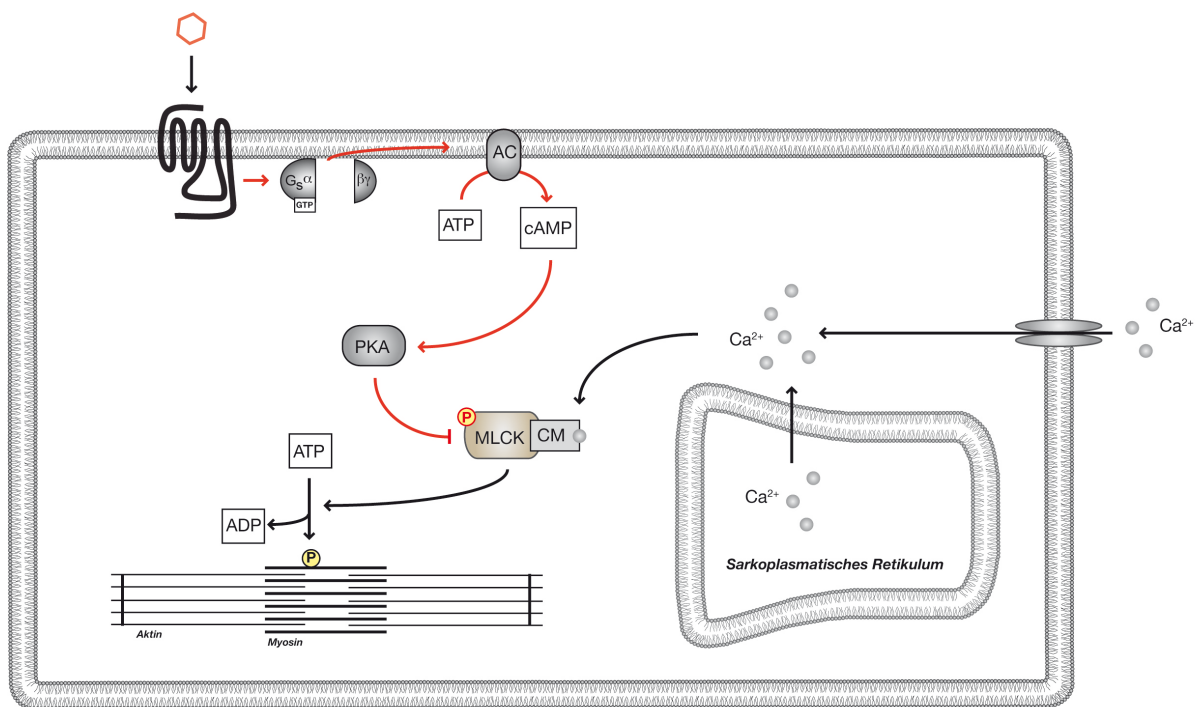


Abbildung 11. Signaltransduktion über den $\beta_2\text{AR}$ in der Glattmuskelzelle. Phosphorylierung durch PKA inhibiert MLCK (Myosinleichtkettenkinase). MLCK kann daraufhin kein ATP mehr spalten und die leichte Kette des Myosinmoleküls nicht mehr phosphorylieren. Somit kann die Interaktion zwischen Aktin und Myosin nicht ablaufen, die Muskelzelle kontrahiert nicht. CM – Calmodulin.

Am Ende einer Schwangerschaft (Woche 40) kommt es zu einer Kontraktion des Uterusmuskels, den Wehen, die die Geburt einleiten. Wehen können aber ungewollt auch zu früh auftreten. Frühgeburten sind für 75–95% aller neonatalen Todesfälle verantwortlich; bei den überlebenden Kindern vor der 37. Schwangerschaftswoche beträgt das Gesamtrisiko für Behinderungen 10–15% (173). Damit ist die Abwendung einer zu frühen Geburt vor der

34. Woche unabdinglich und wird in der Praxis durch pharmakologische Eingriffe (Tokolytika), die zur Uterusrelaxation führen, verhindert. Eine Möglichkeit, ein zu frühes Auftreten der Wehen symptomatisch zu behandeln, stellt die Gabe von β_2 -Agonisten wie Fenoterol dar. Tokolytika sind in der Lage, die Geburt um zwei bis sieben Tage hinauszuschieben, und ermöglichen damit eine Induktion der Lungenreife und den Transfer in ein Perinatalzentrum.

1.9 Polymorphismen in β -adrenergen Rezeptoren

Die physiologische Antwort auf an β AR angreifenden Medikamenten (Agonisten und Antagonisten) und damit die Funktionalität β -adrenerger Rezeptoren variiert beträchtlich zwischen verschiedenen Individuen. Dies stellt ein Problem für die Klinik bei der Behandlung von Herzinsuffizienz und Asthma sowie bei der Tokolyse dar. Als mögliche Erklärung für die von Patient zu Patient variierende Antwort auf Medikamente wird der Einfluss von Polymorphismen in der kodierenden Region der β AR Gene diskutiert.

Einzelnukleotid-Polymorphismen (SNPs, Single Nucleotide Polymorphisms) sind Variationen einzelner Basenpaare in einem DNA-Strang. SNPs stellen ca. 90% aller genetischen Varianten im menschlichen Genom dar. Kodiert das Basentriplett mit dem Austausch eines Nukleotids weiterhin für die gleiche Aminosäure, spricht man von einem synonymen SNP. Resultiert der Austausch in einer veränderten Aminosäure, liegt ein nicht-synonymer SNP vor. Dies kann sich auf die Proteinfunktion auswirken.

1.9.1 Nichtsynonyme SNPs im β_1 AR

In der kodierenden Region des β_1 AR wurden bisher 13 nichtsynonyme SNPs entschlüsselt (1). Die Lokalisation der SNPs und die zugehörigen Allelhäufigkeiten sind in Abbildung 12 dargestellt. Die beiden häufigsten im humanen β_1 AR vorkommenden und funktionell in zahlreicher Hinsicht untersuchten Polymorphismen sind Ser49Gly (174, 175) im extrazellulären N-Terminus des Rezeptors und Gly389Arg, im proximalen α -helikalen Teil des C-Terminus, der eine kritische Rolle für die G-Protein-Kopplung spielt (176, 177). Obwohl Gly389 die seltenere β_1 AR-Variante ist, wird sie hier als erste genannt, da sie im zuerst klonierten β_1 AR vorkam (178, 179). Bei Codon 49 und Codon 389 besteht ein Kopplungsungleichgewicht, dies führt dazu dass der Haplotyp Gly49Gly-Gly389Gly (180) sehr selten existiert.

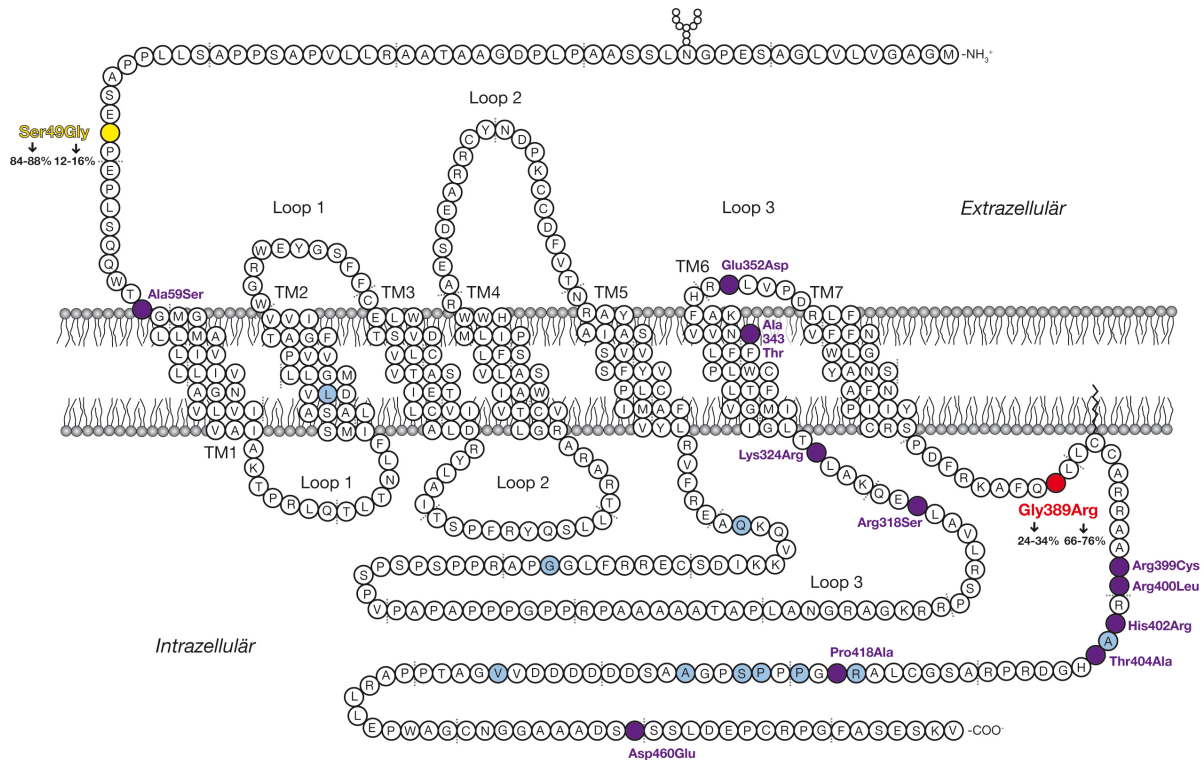


Abbildung 12. Polymorphismen im β_1 AR. Synonyme Polymorphismen sind in hellblau gekennzeichnet, nichtsynonyme Polymorphismen, deren Funktionalität nicht weiter untersucht wurde, sind in violett markiert, die beiden am häufigsten vorkommenden SNPs sind Ser49Gly (gelb) und Gly389Arg (rot). Die Allelhäufigkeit in der weißen Bevölkerung ist in % angegeben.

Die SNPs Ser49Gly und Gly389Arg bewirkten nach Überexpression der β_1 AR in heterologen Zellsystemen keine veränderten Ligandenbindungsaffinitäten. Sowohl die N-terminale Gly49-Variante als auch der Arg389- β_1 AR zeigen im Vergleich zur Ser49- bzw- Gly389-Variante eine erhöhte basale und agonistinduzierte Adenylatzyklaseaktivität (177, 181, 182). Die erhöhte Funktionalität von Arg389 wurde auf eine effizientere Kopplung an G_s zurückgeführt. Für beide funktionell effizienteren Varianten, Gly49 und Arg389, sowie für den Haplotyp Gly49Arg389 wurde darüber hinaus eine verstärkte Desensibilisierung und Herabregulation bei langanhaltender Agoniststimulation (> 18 h) festgestellt (181, 183-185). Die *in vitro* Analysen lassen somit auf eine Hypofunktionalität des Gly389- β_1 AR schließen, die sich auch in einer FRET-basierten Analyse bei Gabe des β -Blockers Carvedilol zeigte (70). Darüber hinaus war die basale und Dobutamin-vermittelte Kontaktilität in jungen Mäusen bei transgener ventrikulärer Überexpression der Arg389- β_1 AR-Variante im Vergleich zu Gly389 erhöht. Nach sechs Monaten kam es spezifisch bei Arg389-Mäusen zur Desensibilisierung des Rezeptors einhergehend mit erhöhter GRK-Aktivität (186).

1.9.2 Nichtsynonyme SNPs im β_2 AR

Für den β_2 AR wurden fünf nichtsynonyme Polymorphismen identifiziert, davon vier in der kodierenden Region und einer an Position -47 innerhalb eines kurzen Leserahmens in der 5'-untranslatierten Region, der ein 19 Aminosäuren langes Leaderpeptid kodiert, das Beta Upstream Peptide (BUP), welches die Expression des Rezeptors auf der Ebene der Translation reguliert (187). Drei Polymorphismen in der kodierenden Region wurden funktionell untersucht: Arg16Gly und Gln27Glu in N-Terminus sowie Thr164Ile in TM4 (nur heterozygot, 2-4%) (Abbildung 13). Ein Kopplungsungleichgewicht zwischen 16 und 27 führt hier zur fixen Kombination von Arg16 mit Gln27 (188), Position 16 ist dominant (189). Auch hier gebührt der Kombination, die der zuerst klonierte β_2 AR enthielt, Arg16Gln27, die Bezeichnung als Wildtyp, ungeachtet der Allelverteilung Arg16 versus Gly16.

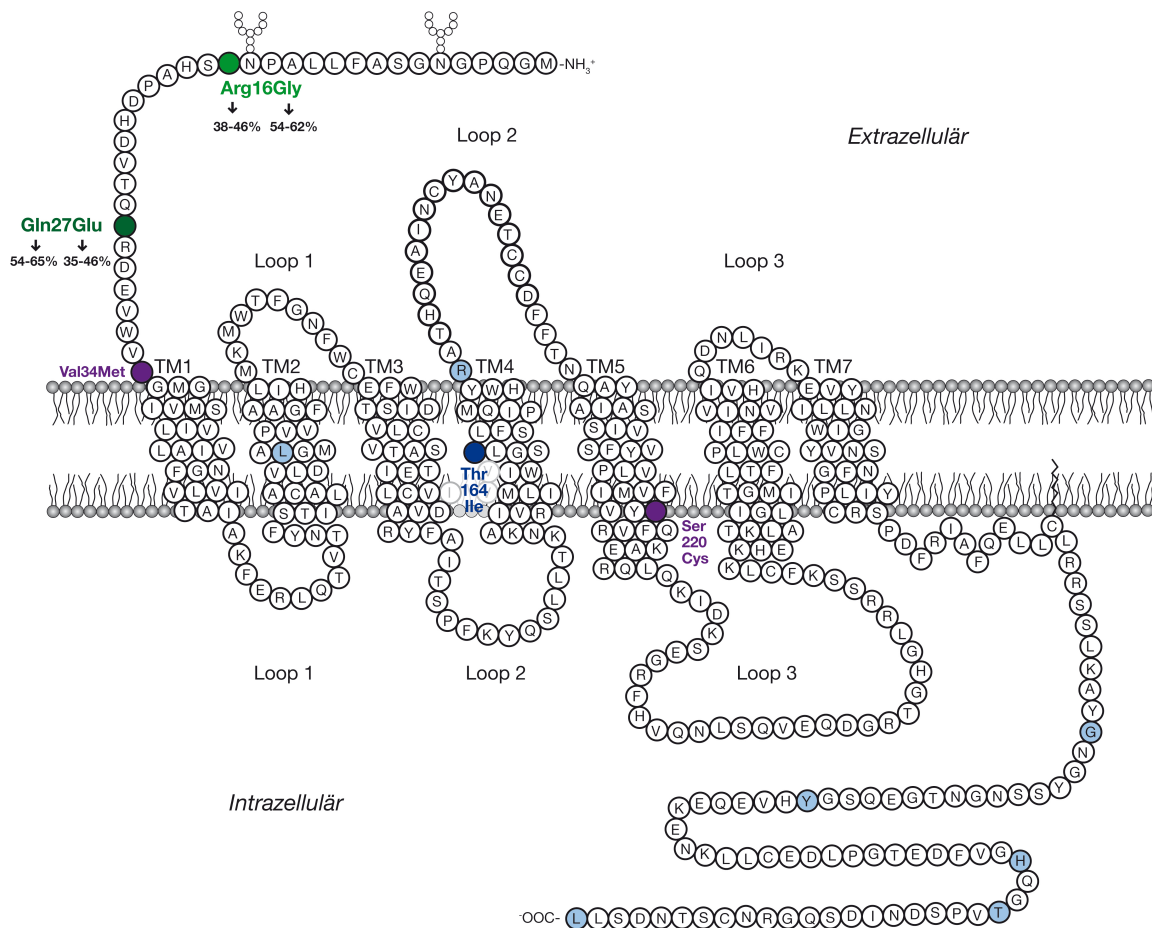


Abbildung 13. Polymorphismen im β_2 AR. Synonyme Polymorphismen sind in hellblau gekennzeichnet, nichtsynonyme Polymorphismen, deren Funktionalität nicht weiter untersucht wurde, sind in violett markiert, die beiden am häufigsten vorkommenden SNPs sind Arg16Gly und Gln27Glu (grün), der dritte funktionell relevante SNP ist Thr164Ile (dunkelblau). Die Allelhäufigkeit in der weißen Bevölkerung ist in % angegeben.

Der Aminosäureaustausch von Thr zu Ile an Position 164 in TM4 resultiert *in vitro* und im transgenen Mausmodell in einer Rezeptorvariante mit massiven Signaltransduktionsdefiziten. Dies schließt eine vierfach geringere Bindungsaffinität für die endogenen Liganden Adrenalin und Noradrenalin sowie eine reduzierte basale und agonist-induzierte Adenylatzyklaseaktivierung ein und lässt auf eine weniger effiziente Interaktion der Ile164-Variante mit dem G-Protein schließen (190, 191). Dagegen zeigen die N-terminal lokalisierten SNPs Arg16Gly und Gln27Glu weder Unterschiede in ihrer Affinität für Agonisten noch in der Adenylatzyklaseaktivierung. Jedoch unterschieden sich die Varianten in ihrer agonistvermittelten Desensibilisierung. Bei langanhaltender (24 h) Stimulation wurden die Gly16-Varianten signifikant stärker herabreguliert als der Wildtyp Arg16Gln27 (189).

1.9.3 *In vivo* Relevanz der SNPs

Der therapeutische Effekt von an GPCRs angreifenden Medikamenten ist individuell sehr unterschiedlich, was in der Klinik zu Problemen führt. Die Relevanz der Polymorphismen im β_1 AR und im β_2 AR auf den Verlauf und die Therapie kardiovaskulärer Erkrankungen oder Asthma ist Gegenstand der aktuellen Forschung.

Analysen an gesunden Probanden und an Patienten weisen SNPs nicht als Krankheitsauslöser oder Krankheitsverlauf-fördernd aus, jedoch kann der Genotyp die Wirksamkeit von therapeutisch eingesetzten Agonisten und Antagonisten, die an den β AR angreifen, beeinflussen. So sind β -Blocker in gesunden Probanden, Bluthochdruckpatienten und Patienten mit chronischer Herzinsuffizienz mit dem β_1 AR-Genotyp Arg389 und besonders dem Haplotyp Gly49Arg389 signifikant besser wirksam (192-194).

Durch die oft geringe Probandenzahl der Studien, die teilweise schlechte Definition der Gruppen, deren unterschiedliche ethnische Herkunft und der komplexen funktionellen Parameter und Krankheitsbilder, die analysiert wurden, bleiben klare Aussagen über die klinische Relevanz der SNPs in β AR jedoch oft schwierig (zusammengefasst unter anderem in (1, 195, 196)).

1.10 Zielsetzung dieser Arbeit

Ziel dieser Arbeit war es, unter Verwendung einer FRET-basierten Strategie Polymorphismus-bedingte und β AR-Subtyp-bedingte Unterschiede in der Aktivierung der β AR auf molekularer Ebene zu analysieren. Dabei sollte nicht nur der Agonist-naive, erstmalig stimulierte Rezeptor betrachtet, sondern die Kinetik eines bereits vorstimulierten, und damit die physiologische Situation im Körper reflektierenden Rezeptors analysiert werden. Die funktionellen Auswirkungen der SNPs im β_2 AR auf die Signaltransduktion sollten zum einen *in vitro* untersucht werden, zum anderen wurde unabhängig davon der Einfluss des β_2 AR-Genotyps als *in vivo* in einer Tokolyse-Studie analysiert.

Diese Arbeit soll einen Beitrag zur molekularen Aufklärung interindividueller Unterschiede liefern und somit die Diskussion über personalisierte Medizin erweitern.

2 Material und Methoden

2.1 Chemikalien und Reagenzien

Alle eingesetzten Chemikalien wurden, soweit nicht anders angegeben, in pro analysi (p.a.) Qualität von AppliChem (Darmstadt), Carl Roth (Karlsruhe), Merck (Darmstadt) und Sigma-Aldrich (Taufkirchen) bezogen. Geschützte Warennamen und Marken sind in dieser Arbeit nicht gekennzeichnet.

2.2 Plasmide

Folgende Plasmide waren im Labor vorhanden und dienten als Basis für die in dieser Arbeit hergestellten Konstrukte:

Vektor	Insert	Referenz
pDONR221		Invitrogen (Karlsruhe)
pENTR1A		Invitrogen (Karlsruhe)
pT-Rex DEST30		Invitrogen (Karlsruhe)
pAD/CMV/V5-DEST		Invitrogen (Karlsruhe)
pcDNA ₃	β_1 AR	Pharmakologie, Uni Würzburg
pcDNA ₃	β_2 AR	Pharmakologie, Uni Würzburg
pcDNA ₃	β_2 AR Δ Phos (100)	Pharmakologie, Uni Würzburg
pcDNA ₃	GRK2	M. Bünemann (Pharmakologie, Uni Würzburg)
pcDNA ₃	EYFP (F46L) (197)	Pharmakologie, Uni Würzburg
pcDNA ₃	ECFP (198)	Pharmakologie, Uni Würzburg
pENTR1A	Cerulean (Cer) (75)	F. Rochais (RVZ, Uni Würzburg)
pTagRFP-N		Evrogen (Moskau, Russland)
pT-Rex-DEST30	β_1 AR(Ser49/Gly389)-YFP/Cer	(70)
pT-Rex-DEST30	β_1 AR(Ser49/Arg389)-YFP/Cer	(70)
pT-Rex-DEST30	β_1 AR(Gly49/Arg389)-YFP/Cer	F. Rochais (RVZ, Uni Würzburg)
pAd/CMV/V5 DEST	Epac1-YFP/CFP	V. Nikolaev (Pharmakologie, Uni Würzburg)

Folgende Sequenzen wurden per homologer Rekombination (Gateway Technologie, Invitrogen, Karlsruhe) in den Expressionsvektor pT-Rex-DEST30 inseriert:

Inseriertes Gen	Protein	Polymorphe Varianten
<i>ADRB2</i> *	β_2 AR	Arg16 Gln27, Gly16 Gln27, Gly16 Glu27
<i>ADRB2-YFP</i> *	β_2 AR-YFP	Arg16 Gln27
<i>ADRB2-CFP</i> *	β_2 AR-CFP	Arg16 Gln27, Gly16 Gln27, Gly16 Glu27
<i>ADRB2-YFP/CFP</i> *	β_2 AR-YFP/CFP	Arg16 Gln27, Arg16 Glu27, Gly16 Gln27, Gly16 Glu27
<i>ADRB2ΔPhos-YFP/CFP</i> *	β_2 AR Δ Phos-YFP/CFP	Arg16 Gln27, Gly16 Gln27, Gly16 Glu27
<i>ADRB2-TEV-YFP/CFP</i>	β_2 AR-TEV-YFP/CFP	Arg16 Gln27
<i>ADRB1</i>	β_1 AR	Ser49 Gly389, Ser49 Arg389, Gly49 Gly389, Gly49 Arg389
<i>ADRB1-YFP/Cer</i>	β_1 AR-YFP/Cer	Gly49 Gly389
<i>ADRB1ΔPhos-YFP/Cer</i>	β_1 AR Δ Phos-YFP/Cer	Ser49 Gly389, Ser49 Arg389, Gly49 Arg389
<i>ARRB2-YFP</i> *	β -Arrestin2-YFP	
<i>ARRB2-RFP</i> *	β -Arrestin2-RFP	
<i>RFP</i>	RFP	
<i>ADRBK1</i>	GRK2	
<i>ADRBK1 (K220R)</i> *	dnGRK2	

Allen exprimierten Proteinen lag die humane Nukleotidsequenz zugrunde. ARRB2 wurde aus cDNA, die aus RNA-Extrakten von HEK293-Zellen gewonnen wurde, amplifiziert. Die Sequenzen von β_2 AR(Arg16/Gln27)-YFP/CFP und β_2 AR(Arg16/Gln27) wurden zur Generierung von Adenoviren zusätzlich in den Vektor pAd/CMV/V5-DEST rekombiniert.

2.3 Gensynthese

Die Nukleotidsequenz der C-terminal phosphoryierungsdefizienten Mutante (Δ Phos) des β_1 AR sowie die N-terminale Nukleotidsequenz des β_2 AR mit integrierter TEV-Protease-Schnittstelle wurden zur Synthese in Auftrag gegeben (Sequenzen siehe Anhang).

Plasmidname	Insert	Bezugsquelle
pUC57- β_1 AR Δ Phos-YFP/CFP	β_1 AR(1186-1431, Ser/Thr→Ala)	GenScript (Piscataway, USA)
1058317_b2ARnterm_20-TEV-21_pMA-T	β_2 AR (1-60 - GAA AAT CTA TAC TTC CAA GGA - 61-552)	Geneart (Regensburg)

* Diese Konstrukte waren auch Bestandteil der Veröffentlichung in *Science Signaling* (199).

2.4 Enzyme

AccuPrime Pfx DNA Polymerase	Invitrogen (Karlsruhe)
AcTEV Protease	Invitrogen (Karlsruhe)
Antarctic Phosphatase	New England Biolabs (Frankfurt am Main)
Benzonase	Merck (Darmstadt)
Gateway BP Clonase II enzyme mix	Invitrogen (Karlsruhe)
Gateway LR Clonase II enzyme mix	Invitrogen (Karlsruhe)
N-Glykosidase F (PNGase F)	New England Biolabs (Frankfurt am Main)
PfuUltra DNA Polymerase	Agilent Technologies (Waldbronn)
Restriktionsendonukleasen	New England Biolabs (Frankfurt am Main)
Restriktionsenzym DpnI	Agilent Technologies (Waldbronn)
T4 DNA Ligase	New England Biolabs (Frankfurt am Main)

2.5 Bakterienstämme

Stamm	Genotyp	Bezugsquelle
<i>E. coli</i> DH10B	F- <i>mcrA</i> Δ (<i>mrr-hsdRMS-mcrBC</i>) Φ 80 <i>lacZ</i> Δ M15 Δ <i>lacX74</i> <i>recA1</i> <i>endA1</i> <i>araD139</i> Δ (<i>ara leu</i>) 7697 <i>galU</i> <i>galK</i> <i>rpsL</i> <i>nupG</i> λ -	Invitrogen (Karlsruhe)
<i>E. coli</i> XL1 blue	<i>recA1</i> <i>endA1</i> <i>gyrA96</i> <i>thi-1</i> <i>hsdR17</i> <i>supE44</i> <i>relA1</i> <i>lac</i> [F' <i>proAB</i> <i>lacIqZ</i> Δ M15 Tn10 (Tetr)]	Agilent Technologies (Waldbronn)

2.6 Eukaryotische Zelllinien

Name	Beschreibung	Bezugsquelle
HEK293-Zellen	Humane embryonale Nierenepithelzellen	Invitrogen (Karlsruhe)
CHO-K1-Zellen	Ovarialzellen des chinesischen Hamsters	DSMZ (Braunschweig)

Folgende stabile Zelllinien wurden basierend auf HEK293 (Invitrogen, Karlsruhe) generiert:

Name	Stabil überexprimiertes Protein	Polymorphe Varianten
HEK293- β_2 AR-YFP/CFP *	β_2 AR-Sensor	Arg16 Gln27, Arg16 Glu27, Gly16 Gln27, Gly16 Glu27
HEK293- β_2 AR	β_2 AR	Arg16 Gln27, Gly16 Gln27, Gly16 Glu27
HEK293- β_2 AR Δ Phos	β_2 AR mit Mutation der putativen GRK-Phosphorylierungsstellen	Arg16 Gln27, Gly16 Gln27, Gly16 Glu27
HEK293- β_2 AR Δ Phos-YFP/CFP	β_2 AR-Sensor mit Mutation der putativen GRK-Phosphorylierungsstellen	Arg16 Gln27, Gly16 Gln27, Gly16 Glu27
HEK293-TEV- β_2 AR-YFP/CFP	β_2 AR-Sensor mit N-terminaler TEV-Protease-Schnittstelle	Arg16 Gln27
HEK293- β_1 AR	β_1 AR	Ser49 Gly389, Gly49 Gly389, Ser49 Arg389, Gly49 Arg389
HEK293- β_1 AR-YFP/Cer	β_1 AR-Sensor	Ser49 Gly389, Gly49 Gly389, Ser49 Arg389, Gly49 Arg389

* Diese stabilen Zelllinien waren auch Bestandteil der Veröffentlichung in *Science Signaling* (199).

2.7 Small interfering RNA (siRNA)

Folgende chemisch synthetisierte Doppelstrang-siRNA-Duplexe mit 3' dTdT-Überhängen wurden von Sigma-Aldrich bezogen:

Ziel-mRNA	Sequenz
GRK2	5'-GAAAUUCAUUGAGAGCGAU-3'
GRK3	5'-CAGUUUAUGAAGCAGUAAA-3'
GRK5	5'-GCAGUAUCGAGUGCUAGGA-3'
GRK6	5'-CACCUUCAGGCAAUACCGA-3'
Scrambled (Negativkontrolle)	5'-GCUUAGGAGCAUUAGUAAA-3'

2.8 Oligonukleotid-Primer

Alle Oligonukleotide wurden in HSPF („High Purity Salt Free“) Qualität von Eurofins MWG Biotech (Ebersberg), Invitrogen oder Sigma-Aldrich lyophilisiert bezogen. Sie wurden in bidestilliertem (dd) H₂O gelöst und auf eine Stockkonzentration von 1 mM eingestellt. Für die Versuche wurden 20 µM Gebrauchslösungen verwendet.

Primername	Sequenz (5'→3')	Produkt
Konventionelles Klonieren		
EcoNI -YFPfor YFPI(10)EcoNIrev	AAA CCT TAG CCA GGT GAG CAA GGG CGA GGA G AAA CCT GGC TAA GGC CTT CTC CAC TTC CGC CTT CTC CAC TTC CCT TGT ACA GCT CGT CCA TGC C	EcoNI- YFP-I(10) -EcoNI
Beta2drafor Beta2bamhrev	AAA TTT AAA ACC ATG GGG CAA CCC GGG AAC GGC AAA GGA TCC ACC TCC GCC GCC CAG CAG TGA GTC ATT TGT ACT	DraI- ADRB2-YFP -BamHI
CERBamfor CERXhorev	AAA GGA TCC AAG GGC GAG GAG CTG TTC AAA CTC GAG TTA CTT GTA CAG CTC GTC CAT GCC	BamHI- CFP, YFP -XhoI
RFP-BamHI-for RFP-XhoI-rev	AAA GGA TCC AAG GGC GAA GAG CTG ATT AAG AAA CTC GAGTTA AGT TTG TGC CCC AGT TTG	BamHI- RFP -XhoI
ARRB2-DraIfor ARRB2-BamHIG5rev	AAA TTT AAA ATG GGG GAG AAA CCC GGG A AAA GGA TCC ACC TCC GCC GCC GCA GAG TTG ATC ATC ATA GTC	DraI- ARRB2 -BamHI
Klonieren mit Gateway Technologie		
GRK2-GW-for GRK2-GW-rev	GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCTATGGCGGACCTGGAGGCT GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGTCTAGAGCCGTTGCTGTTTC	<i>attB1</i> - ADRBK1 - <i>attB2</i>
Mutagenese		
b2AR(Gly16)-for b2AR(Gly16)-rev	CTG GCA CCC AAT GGA AGC CAT GCG CCG CGG CGC ATG GCT TCC ATT GGG TGC CAG	pENTR1A- ADRB2 (Gly16)
b2AR(Glu27)-for b2AR(Glu27)-rev	GAC GTC ACG CAG GAA AGG GAC GAG GTG CAC CTC GTC CCT TTC CTG CGT GAC GTC	pENTR1A- ADRB2 (Glu27)
GRK2_K220R-for GRK2_K220R-rev	ACG CCA TGA GGT GCC TGG A TCC AGG CAC CTC ATG GCG T	pENTR1A- ADRBK1 (Arg220)

2.9 Antikörper

Epitop	Spezies	Eigenschaft	Bezugsquelle
<i>Primärantikörper</i>			
β_2 AR	Kaninchen	polyklonal	Santa Cruz (Heidelberg)
p- β_2 AR (Ser355/Ser356)	Kaninchen	polyklonal	Santa Cruz (Heidelberg)
GNB	Kaninchen	polyklonal	Santa Cruz (Heidelberg)
GFP (FL)	Kaninchen	polyklonal	Santa Cruz (Heidelberg)
GRK2	Kaninchen	polyklonal	Santa Cruz (Heidelberg)
GRK3	Kaninchen	polyklonal	Santa Cruz (Heidelberg)
GRK5	Kaninchen	polyklonal	Santa Cruz (Heidelberg)
GRK6	Kaninchen	polyklonal	Santa Cruz (Heidelberg)
<i>Sekundärantikörper</i>			
Kaninchen-IgG	Ziege	Meerrettich-Peroxidase gekoppelt	Dianova (Hamburg)

2.10 Pharmaka

Stocklösungen aus 10^{-1} M (-)-Adrenalin, 10^{-1} M (-)-Noradrenalin, 10^{-1} M Fenoterol, 10^{-2} M Alprenolol und 10^{-2} M S-(-)-Propranolol wurden in ddH₂O angesetzt. Isoproterenol wurde in einer 1mg/ml Ascorbinsäurelösung gelöst, um seine Oxidation zu verhindern. Alle Stocklösungen wurden bei -20°C gelagert, Gebrauchsverdünnungen wurden jeweils frisch hergestellt. GTP γ S (Guanosin-5'-[γ -thio]triphosphat) wurde direkt vor jedem Experiment in ddH₂O auf die Stockkonzentration 10 mM verdünnt.

2.11 Molekularbiologische Methoden

2.11.1 Polymerasekettenreaktion (PCR) *

Zur Amplifikation von kodierenden Sequenzen aus cDNA oder aus Plasmid-DNA wurde die AccuPrime Pfx DNA Polymerase mit 3'-5' Exonukleaseaktivität verwendet.

Ein Reaktionsmix enthielt:	cDNA oder Plasmid-DNA	100 ng
	Primer vorwärts	20 pmol
	Primer rückwärts	20 pmol
	AccuPrime Pfx Reaktionsmix (10x)	5 µl
	AccuPrime Pfx DNA Polymerase	1 µl (2,5 U)
	ddH ₂ O	ad 50 µl

Die Amplifikation erfolgte in einem Mastercycler pro (Eppendorf, Hamburg) bei folgenden Einstellungen:

Vorgang	Temperatur	Zeit	Anzahl der Zyklen
Prädenaturierung	95°C	2 min	1
Denaturierung	95°C	15 s (Fragment ≈ 700 bp)	35
		20 s (Fragment ≈ 2000 bp)	
Annealing	55-57°C	30 s	
Elongation	68°C	1 min (Fragment ≈ 700 bp)	
		2,5 min (Fragment ≈ 2000 bp)	
Finale Elongation	68°C	1 min	1

2.11.2 Agarose-Gelelektrophorese

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

50x TAE-Puffer:	Tris	0,2 M
	Essigsäure	57,1 ml
	Na ₂ EDTA x 2H ₂ O	37,2 g
	ddH ₂ O	ad 1 l

Zur Herstellung eines 1%igen Agarosegels wurde 1g Agarose in 100 ml 1x TAE Puffer durch Erhitzen in der Mikrowelle gelöst. Nach Abkühlen wurden 6,5 µl Ethidiumbromid (Stocklösung: 1 mg/ml) pro 100 ml zugefügt und das Gel sofort gegossen. Das

* Die Methode wurde in ähnlicher Form von Ahles *et al.* in *Science Signaling* publiziert (199).

auspolymerisierte Gel wurde in eine mit 1x TAE befüllte Elektrophoresekammer (Peqlab, Erlangen) transferiert, die Proben wurden 1:5 mit DNA-Ladepuffer verdünnt und in die Geltaschen geladen. Bei einer angelegten Spannung von 70 bis 140 V wurde die negativ geladene DNA in den Proben nach Größe in Richtung Anode aufgetrennt. Zur Bestimmung der Größe der DNA-Fragmente wurde ein entsprechender Standard aufgetragen (1kb, 100 bp oder λ HindIII, New England Biolabs, Frankfurt am Main). Ethidiumbromid interkalierte dabei in die doppelsträngige DNA und machte diese durch seine Fluoreszenz unter UV-Licht (312 nm) sichtbar (Geldokumentationsgerät E.A.S.Y. Win 32 von Herolab, Wiesloch, oder DeVision DBOX von Decon Science Tec, Hohengandern).

Zusätzlich wurden Agarosegele von 0,5-0,8% und 1,2% verwendet, um im Einzelfall eine bessere Auftrennung der DNA-Banden zu gewährleisten.

2.11.3 Extraktion von DNA aus Agarosegelen

Zur Extraktion von DNA aus Agarosegelen wurde die gewünschte Bande mit einem sterilen Skalpell ausgeschnitten und mit dem "QIAQuick Gel Extraction Kit" (Qiagen, Hilden) entsprechend den Anweisungen des Herstellers aufgereinigt. Die DNA wurde im finalen Schritt mit 20 μ l ddH₂O eluiert.

2.11.4 DNA-Präzipitation mit Natriumacetat

Zum Aufreinigen der DNA für die Herstellung von Adenoviren wurden 15 μ g mit Pacl verdautes Adenovirus-Konstrukt (pAd- β_2 AR oder pAd- β_2 AR-YFP/CFP) mit 1/10 Volumen Natriumacetat (3 M) präzipitiert. Nach Zugabe von 2,5 Volumina Ethanol wurde die Probe gemischt, 20 min bei -80°C inkubiert und anschließend 15 min bei 20000 g und 4°C zentrifugiert. Das resultierende Pellet wurde mit 70%-igem Ethanol gewaschen, nach erneuter einminütiger Zentrifugation kurz getrocknet und in 20 μ l ddH₂O aufgenommen. Die Konzentration der DNA nach der Präzipitation wurde im Photometer (BioPhotometer Plus, Bio-Rad, München) bestimmt.

2.11.5 Restriktionsverdau von Plasmid-DNA und PCR-Produkten

Zur Überprüfung von Klonen nach Mini-Präparation wurden 3 μ l DNA mit 1 U des entsprechenden Restriktionsenzym mit dem vom Hersteller empfohlenen Puffer 1 h bei 37°C verdaut. Die resultierenden Fragmentgrößen wurden mit Hilfe einer Softwareanalyse mit Gene Construction Kit (GCK, Textco, New Hampshire, USA) überprüft.

Die Inkubation von PCR-Produkten und Plasmid-DNA für Klonierungsschritte erfolgte mit 1-3 Enzymeinheiten pro μg DNA für 2,5 h bei 37°C, um einen vollständigen Verdau zu gewährleisten. Die geschnittene DNA wurde erneut auf ein Agarosegel aufgetragen oder gegebenenfalls direkt dephosphoryliert.

2.11.6 Dephosphorylierung von DNA

Nach der Linearisierung eines Vektors mit nur einer Restriktionsendonuklease wurden die 5'-Phosphatgruppen durch Behandlung mit Antarktische Phosphatase entfernt, um seine Religation zu verhindern. Dazu wurden 2 μg verdauter Vektor mit 5 μl des zugehörigen Puffers, 5 U Antarktische Phosphatase und ddH₂O in einem Endvolumen von 50 μl gemischt.

Der Ansatz wurde zunächst 30 min bei 37°C und anschließend weitere 30 min bei 50°C inkubiert. Nach Hitzedeaktivierung des Enzyms für 5 min bei 65°C wurde der dephosphorylierte Vektor direkt für die Ligation verwendet.

2.11.7 Ligation von DNA-Fragmenten

Die Konzentration der zur Ligation benötigten Fragmente von Vektor und Insert wurde mittels Gelelektrophorese abgeschätzt. Zur Ligation wurde die T4 DNA Ligase verwendet. Das Enzym katalysiert die Verknüpfung des 3'-Hydroxy-Endes mit dem 5'-Phosphat-Ende der DNA-Fragmente durch Ausbildung einer Phosphodiesterbindung. Für einen Reaktionsansatz in einem finalen Volumen von 15 μl wurden verwendet:

Vektor	100-200 ng
Insert	600-1000 ng
5x Ligase Puffer	1,5 μl
T4 DNA Ligase	1 μl

Die Ligation erfolgte für 30 min bis 1h bei Raumtemperatur (22°C) oder über Nacht bei 16°C.

2.11.8 Klonierung mittels Gateway Technologie *

Die Gateway Technologie (Invitrogen, Karlsruhe) basiert auf der homologen Rekombination spezifischer DNA Sequenzen (*att*-Anhänge), die durch Clonase-Enzymmischungen

* Die Methode wurde in ähnlicher Form von Ahles *et al.* in *Science Signaling* publiziert (199).

katalysiert wird. Sie besteht aus zwei Schritten und dient der Generierung von Vektoren zur Expression eines Proteins in mammalen Zelllinien sowie zur Herstellung von adenoviralen Vektoren.

2.11.8.1 BP-Reaktion

Ziel des ersten Schritts ist die Herstellung eines „Entry-Klons“. Dazu wurden der Zielgen-Sequenz per PCR *attB*-Anhänge hinzugefügt und diese lineare DNA anschließend per BP-Reaktion in den Vektor pDONR221 integriert. Der BP-Clonase-Enzymmix enthält die Proteine „Integrase“ und „Integration Host Factor“, die die Rekombination des PCR-Produkts (mit *attB*-Anhängen) und des Donorvektors (mit *attP*-Anhängen) katalysieren, um einen Entry-Klon zu generieren.

Reaktionsmix:	PCR Produkt	150 ng
	pDONR221 (Entry Vector)	150 ng
	TE Puffer pH 8,0	ad 8 µl
	BP Clonase II Enzymmix	2 µl

Der Ansatz wurde 1-2 h bei Raumtemperatur inkubiert. Die Reaktion wurde im Anschluss durch Zugabe von Proteinase K (2 µg) für 10 min bei 37°C abgestoppt.

2.11.8.2 LR-Reaktion

Die vom Hersteller modifizierten Enzyme „Integrase“, „Integration Host Factor“ und „Excisionase“ katalysierten im zweiten Schritt die Rekombination zwischen dem mit *attL*-Anhängen, die den Entry-Klon nach erfolgreicher Rekombination (pDONR221) oder herkömmlicher Ligation (pENTR1A) flankierten, und einem Destinationsvektor mit *attR*-Anhängen. Daraus resultierte ein Expressionplasmid.

Reaktionsmix:	Entry-Klon	150 ng
	pT-Rex DEST30 / pAD/CMV/V5 DEST (Destinationsvektor)	150 ng
	TE Puffer, pH 8,0	ad 8 µl
	LR Clonase II Enzymmix	2 µl

Der Reaktionsmix wurde kurz gemischt und im folgenden 1 h bei 25°C inkubiert. Die Reaktion wurde durch Zugabe von Proteinase K (2 µg) und Inkubation bei 37°C für 10 min abgestoppt.

Durch ein in den Ausgangsvektoren integriertes *CcdB* Gen wurde sowohl bei der BP-Reaktion als auch bei der LR-Reaktion eine Vorselektion erfolgreich mit dem richtig rekombinierten Vektor transformierter Bakterienzellen vorgenommen. Das *CcdB* Protein interferiert mit der DNA Gyrase von *E. coli* und verhindert damit das Zellwachstum.

2.11.9 Mutagenese *

Zur Generierung der polymorphen Varianten des β_2 AR sowie der dominant negativen Mutante der GRK2 wurde der „QuikChange II Site-Directed Mutagenesis Kit“ (Agilent Technologies, Oberhaching) verwendet. Dabei wurde das Protokoll des Herstellers befolgt. Grundlage der Reaktion waren zyklische superhelikale doppelsträngige (ds) DNA und Oligonukleotid-Primer, die die gewünschte Mutation enthielten und komplementär zueinander waren. Sie wurden während der Zyklen durch die PfuUltra HF DNA Polymerase verlängert, und es entstanden die Mutation tragende Plasmide.

Reaktionsmix:	10x Reaktionspuffer	5 μ l
	dsDNA Ausgangsvektor	50 ng
	Primer 1	125 ng
	Primer 2	125 ng
	dNTP Mix	1 μ l
	ddH ₂ O	ad 50 μ l
	PfuUltra HF DNA Polymerase	2,5 U

Vorgang	Temperatur	Zeit	Anzahl der Zyklen
Prädenaturierung	95°C	30 s	1
Denaturierung	95°C	30 s	
Annealing	55°C	1 min	16
Elongation	68°C	1 min pro kb Plasmidlänge	
Finale Elongation	68°C	1 min	1

Das PCR-Produkt wurde direkt mit dem Restriktionsenzym DpnI verdaut. Die Zielsequenz von DpnI ist 5'-Gm⁶ATC-3', das Enzym verdaut methylierte und hemimethylierte DNA und damit das nicht mutierte Ausgangsplasmid (dam Methylierung durch Herstellung in *E. coli*). Die anschließende Transformation erfolgte durch Elektroporation (siehe 2.11.10) oder Hitzeschock (siehe 2.11.11). Mittels Sequenzierung von Plasmid-DNA aus Einzelkolonien nach Mini-Präparation wurde der Erfolg der Mutagenese überprüft.

* Die Methode wurde in ähnlicher Form von Ahles et al. in Science Signaling publiziert (199).

2.11.10 Transformation elektrokompeterer DH10B-Bakterienzellen

LB Agar:	1% Bacto-Trypton	10 g
	0,5% Hefeextrakt	5 g
	0,5% NaCl	5 g
	Agar	15 g
	NaOH 1 M	1 ml
	ddH ₂ O	ad 1 l
	→ autoklaviert	

2 µl Ligationsreaktion oder 1 µl LR- bzw. BP-Reaktion wurden zu 50 µl elektrokompeteren DH10B-Bakterienzellen gegeben, durch Auf- und Abpipettieren gemischt und in eine Küvette (Gene Pulser® 0.1 cm Cuvette, Bio-Rad, München) überführt. Nach einem kurzen elektromagnetischen Puls von 1,8 kV (MicroPulser™, Bio-Rad, München) wurden sofort 200 µl bzw. 450 µl LB-Medium ohne Antibiotikum zugegeben, der gesamte Inhalt der Küvette in ein 1,5ml-Gefäß überführt und für 1 h bei 37°C und 350 rpm im Thermomixer (Eppendorf, Hamburg) geschüttelt. Anschließend wurden 100 µl des Transformationsansatzes der BP- oder LR-Reaktion bzw. der gesamte Ansatz bei Ligationen auf Agarplatten ausgestrichen, die das dem Resistenzgen des Vektors entsprechende Antibiotikum (100 µg/ml Ampicillin oder 33 µg/ml Kanamycin) trugen. Die Platten wurden über Nacht bei 37°C inkubiert.

2.11.11 Hitzeschocktransformation

NZY ⁺ Broth:	NZ-Amine (Caseinhydrolysat)	10 g
	Hefeextrakt	5 g
	NaCl	5 g
	ddH ₂ O	ad 1 l
	pH 7,5 → autoklaviert	
	1 M MgCl ₂ (steril)	12,5 ml
	1 M MgSO ₄ (steril)	12,5 ml
	20% (w/v) Glukose (steril)	20 ml

1 µl mit DpnI-behandelte DNA aus einem Mutagenese-Ansatz wurde mit 50 µl XL1-Blue superkompetenten Bakterienzellen gemischt und 30 min auf Eis inkubiert. Im Anschluss erfolgte ein Hitzeschock bei 42°C für 45 s und eine erneute Inkubation auf Eis für 2 min. Nach Zugabe von 500 µl NZY⁺ Medium (auf 42°C vorgeheizt) wurde der Ansatz 1 h bei 37°C und 350 rpm geschüttelt und auf Agarplatten mit der entsprechenden Antibiotikaresistenz ausgestrichen.

2.11.12 Mini-Kultur und Mini-DNA-Aufreinigung

LB Medium:	1% Bacto-Trypton	10 g
	0,5% Hefeextrakt	5 g
	0,5% NaCl	5 g
	NaOH 1 M	1 ml
	ddH ₂ O	ad 1 l
	→ autoklaviert	

Für eine Mini-Kultur wurde eine einzelne Bakterienkolonie von einer Agarplatte mit einer sterilen gelben Pipettenspitze gepickt und in 4 ml LB Medium, das das dem im Zielvektor enthaltene Resistenzgen entsprechende Antibiotikum enthielt (100 µg/ml Ampicillin oder 33 µg/ml Kanamycin), abgeworfen. Die Kultur wurde unter Schütteln (170 rpm, Thermoschüttler Adolf-Kühner AG, Birsfelden) bei 37°C für 6 h oder über Nacht hochgezogen. Zur Analyse der Klone wurden die Puffer des „Plasmid Maxi Kits“ (Qiagen, Hilden) verwendet.

1,5 ml der Mini-Kultur wurden 30 s bei 13200 rpm abzentrifugiert (Zentrifuge 5415 R, Eppendorf, Hamburg). Das Pellet wurde in 250 µl Resuspensionspuffer (P1) aufgenommen. Die darin enthaltene RNase degradierte die bakterielle RNA. Nach Zugabe von 250 µl Lysispuffer (P2) wurden die Proben gemischt und 5 min bei Raumtemperatur inkubiert, was zur alkalischen Lyse der Zellen führte. Zur Neutralisierung des pHs wurden anschließend 300 µl Neutralisierungspuffer (P3) zugefügt und 5 min auf Eis inkubiert. Nach Zentrifugation (13200 rpm, 10 min, 4°C) wurde die im Überstand enthaltene DNA in ein neues Gefäß überführt und mit 750 µl Ethanol 5 min bei Raumtemperatur präzipitiert. Die DNA wurde mittels Zentrifugation (5min, 4°C) pelletiert, mit 750 µl 70 % Ethanol gewaschen, nach erneuter Zentrifugation (1min) luftgetrocknet und in 20 µl ddH₂O gelöst.

2.11.13 Midi-/ Maxi-Kultur und Midi-/Maxi-DNA-Aufreinigung

Für die Amplifikation von Plasmid-DNA aus positiven Klonen wurden der „Plasmid Midi Kit“ oder der „Plasmid Maxi Kit“ von Qiagen (Hilden) verwendet. Diese basieren auf einer alkalischen Lyse, gefolgt von Bindung der Plasmid-DNA an ein Anionenaustauschgranulat bei entsprechend niedriger Salzkonzentration und pH.

50-500 µl der entsprechenden Mini-Kultur wurden in einen sterilen Erlenmeyerkolben mit 50 ml (Midi-Kultur) oder 100 ml LB-Medium (Maxi-Kultur) mit Antibiotikum als Selektionmarker (100 µg/ml Ampicillin oder 33 µg/ml Kanamycin) über Nacht (12-16 h) bei 37°C und 170 rpm geschüttelt (Thermoschüttler Adolf-Kühner AG, Birsfelden). Die Bakterienzellen wurden durch Zentrifugation bei 6000 g und 4°C für 15 min geerntet (Zentrifuge 5810 R, Eppendorf,

Hamburg). Die Aufreinigung der Plasmid-DNA erfolgte nach dem Protokoll des Herstellers. Nach der Präzipitation mit Isopropanol wurde das Pellet in 300 µl ddH₂O gelöst und in ein 2ml-Reaktionsgefäß überführt. Nach Zugabe von 700 µl Ethanol wurde die Probe 10 min bei 4°C und 15000 g zentrifugiert (Zentrifuge 5415 R, Eppendorf, Hamburg), das resultierende Pellet luftgetrocknet und in 50 µl (Midi-Präparation) oder 150 µl (Maxi-Präparation) gelöst.

2.11.14 Endotoxinfreie Maxi-DNA-Aufreinigung

Endotoxine, auch bekannt als Lipopolysaccharide oder LPS, sind Bestandteile der Zellmembran Gram-negativer Bakterien wie *E.coli*. Sie können die Transfektionseffizienz beeinflussen. Ihre chemische Zusammensetzung und ihre Vorliebe, Micellen zu formen, führt zur ihrer Aufreinigung mit der Plasmid-DNA. Zur Gewinnung endotoxinfreier, ultrareiner DNA wurde der „EndoFree Plasmid Maxi Kit“ (Qiagen, Hilden) nach den Anweisungen des Herstellers verwendet, und die endotoxinfreie Plasmid-DNA schließlich in 100 µl endotoxinfreiem H₂O aufgenommen.

2.11.15 Messung der DNA-Konzentration

Die Konzentration (c) der DNA wurde entweder auf einem Agarosegel abgeschätzt, indem die Intensität der entsprechenden Bande mit den Markerbanden bekannter DNA-Menge verglichen wurde, oder in einem BioPhotometer Plus (Bio-Rad, München) vermessen (Absorption bei 260 nm, H₂O als Referenz). Die DNA-Konzentration wurde wie folgt errechnet: $c \text{ (}\mu\text{g}/\mu\text{l)} = A_{260} * 0,05 * \text{Verdünnungsfaktor}$. Dabei stellte der Faktor 0,05 die Proportionalitätskonstante für doppelsträngige DNA dar ($1 A_{260} = 50 \mu\text{g/ml}$). Zusätzlich wurde die Absorption bei 280 nm bestimmt. Die Ratio aus A_{260}/A_{280} repräsentierte die Reinheit der Probe und lag zwischen 1,7 und 2,0.

2.11.16 Sequenzierung der Plasmid-DNA

Die Sequenzierung der Plasmid-DNA wurde von Eurofins MWG Biotech (Ebersberg) durchgeführt. Dazu wurden 2 µg DNA in 20 µl ddH₂O verdünnt. Die resultierenden Sequenzen wurden mit der erwarteten Sequenz mit Hilfe des Alignment-Tools “BL2SEQ” von SDSC Biology WorkBench (<http://seqtool.sdsc.edu>) verglichen.

2.12 Methoden der eukaryotischen Zellbiologie

2.12.1 Kultivierung eukaryotischer Zelllinien

Die Kultivierung von HEK293-Zellen und CHO-K1-Zellen erfolgte bei 5% CO₂ und 37°C im entsprechenden Medium (alle Reagenzien stammten von PAN-Biotech, Aidenbach):

HEK293	Dulbecco's modified eagle's medium (DMEM) + 1% L-Glutamin + 1% Penicillin (10.000 U/ml) / Streptomycin (10.000 µg/ml) + 10% fötales Rinderserum (FBS)
CHO-K1	Dulbecco's modified eagle's medium / Ham's F12 (DMEM/F12) + 1% Penicillin (10.000 U/ml) / Streptomycin (10.000 µg/ml) + 10% fötales Rinderserum (FBS)

Die Zellen teilten sich in etwa alle 24h und wuchsen als adhärenter Monolayer in der Zellkulturschale (Nunc, Langensfeld). Sie wurden routinemäßig alle drei bis vier Tage gesplittet. Dafür wurde das Kulturmedium abgesaugt und die Zellen einmal mit DPBS (Dulbecco's Phosphate Buffered Saline, PAN-Biotech, Aidenbach) gewaschen. Nach Zugabe von Trypsin-EDTA-Lösung (0,5 g/l Trypsin, 0,2 g/l EDTA, PAN-Biotech, Aidenbach) wurden die Zellen unter einem invertierten Mikroskop beobachtet. Bevor sich die Zellen von der Kulturschale lösten, wurde die Trypsin/EDTA-Lösung wieder abgenommen, die Zellen in frischem Kulturmedium resuspendiert und in neue Kulturschalen mit bereits vorgelegtem Medium verteilt. Die Zellen wurden maximal bis Passage 30 in Kultur gehalten, bevor ein neues Aliquot mit Zellen aufgetaut wurde.

2.12.2 Auftauen und Einfrieren von Zellen

Einfriermedium:	entsprechendes Kulturmedium	80%
	FBS	10%
	DMSO	10%

Um in flüssigem Stickstoff in Kryo-Röhrchen eingefrorene Zellen wieder in Kultur zu nehmen, wurden diese zügig im Wasserbad bei 37°C aufgetaut und in eine 6cm²- oder 10cm²-Zellkulturschale mit vorgelegtem Medium überführt. Nach etwa 5 h wurde das Medium gewechselt, um die schädlichen Auswirkungen vom im Einfriermedium enthaltenen DMSO zu minimieren.

Zum Einfrieren von Zellen wurden diese wie unter 2.12.1 von der Kulturschale abgelöst und 5 min bei 1200 rpm in einem 50ml-Röhrchen zentrifugiert. Das Zellpellet wurde in eiskaltem

Einfriermedium resuspendiert (4 ml pro 10cm²-Schale) und jeweils 1 ml der Suspension in vorgekühlte Kryoröhrchen gefüllt. Diese wurden für 24h bei -20°C weggefroren, im folgenden mehrere Tage auf -80°C gestellt und schließlich in Flüssigstickstoff gelagert.

2.12.3 Transiente Transfektion von HEK293-Zellen mit Effectene *

Zur transienten Transfektion mit Effectene (Qiagen, Hilden) wurden HEK293-Zellen bis zu einer Konfluenz von 60-70% kultiviert. Kurz vor Zugabe des Transfektionsansatzes wurden die Zellen einmal mit PBS gewaschen und die in der Tabelle aufgeführte Menge Kulturmedium zugegeben.

Zunächst wurden Plasmid-DNA, Puffer EC und Enhancer miteinander vermischt und fünf Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Dieser erste Schritt diente der Kondensierung der DNA durch Interaktion mit dem Enhancer in einem definierten Puffersystem. Zur so kondensierten DNA wurde anschließend das Transfektionsreagenz Effectene zugegeben. Die Komplexbildung mit der DNA fand nach Mischen in einer Inkubationsphase von 10 Minuten statt. Der Transfektionsmix wurde im Folgenden direkt tropfenweise auf die HEK293-Zellen gegeben. Die DNA wurde in den Zellkern geschleust, integrierte dort jedoch nicht in die chromosomale DNA der Zelle. Die DNA war in hoher Kopienzahl im Zellkern vorhanden und wurde dort abgelesen, was zu einem hohen Expressionslevel des resultierenden Proteins führte. Die Transfektionseffizienz betrug etwa 70%.

	6-Well	6 cm ² -Schale	10 cm ² -Schale
DNA	0,4 µg	1 µg	2 µg
Puffer EC	100 µl	150 µl	250 µl
Enhancer	3,2 µl	8 µl	16 µl
→ 1 s vortexen, 5 min bei RT inkubieren			
Effectene	10 µl	25 µl	60 µl
→ 10 s vortexen, 10 min bei RT inkubieren			
DMEM	600 µl	1 ml	3 ml
DMEM vorgelegt	1,5 ml	4 ml	7 ml

* Die Methode wurde in ähnlicher Form von Ahles *et al.* in *Science Signaling* publiziert (199).

2.12.4 Transfektion von HEK293-Zellen mit siRNA *

Zur Transfektion von siRNA wurde das Transfektionsreagenz HiPerFect (Qiagen, Hilden) verwendet. Dabei wurden die siRNA-Duplexe in einer Konzentration von 200 nM eingesetzt und das „Fast-forward“ Transfektionsprotokoll des Herstellers befolgt. Um einen effizienten Knockdown zu gewährleisten, wurden die Zellen drei Tage im Brutschrank inkubiert. Die Herabregulation der Proteinexpression wurde mittels Western Blot verifiziert.

	6-Well	12-Well
Zellen	500.000	200.000
DMEM (ohne Zusätze)	250 µl	100 µl
siRNA	200 nM (5,2 µl aus 50 µM Stock)	200 nM (2,4 µl aus 50 µM Stock)
→ 5 min bei RT inkubieren		
HiPerFect	17 µl	7 µl
→ vortexen, 10 min bei RT inkubieren		
Medium im Well	500 µl	200 µl
Medium (nach 4h)	1,5 ml	500 µl

Die Zählung der Zellen erfolgte mit einer Neubauer-Zählkammer oder mit einem automatisierten Zellzähler (Countess Automated Cell Counter, Invitrogen, Karlsruhe).

2.12.5 Generierung und Titrierung von Adenoviren

15 µg des aufgereinigten adenoviralen Vektors mit dem Gerüst pAd/CMV/V5/DEST wurden mit dem Restriktionsenzym PacI verdaut und mit Natriumacetat präzipitiert. 1 µg des linearisierten Vektors wurde für die Effectene-Transfektion (Qiagen, Hilden, siehe 2.12.3) von einer 70% konfluent bewachsenen 6cm-Schale mit HEK293 Zellen verwendet.

Zwei Wochen nach der Transfektion wurden die Virus-beladenen Zellen durch wiederholte Frier-Tau-Zyklen (3x -80°C für 30 min, 37°C für 15 min) lysiert und damit die intrazellulären Viruspartikel freigesetzt. Nach Zentrifugation für 15 Minuten bei 3000 rpm wurde der Überstand direkt zur Infektion neuer Zellen verwendet. Dieser Vorgang wurde in einem dritten Amplifikationsschritt wiederholt, um eine Aufkonzentrierung und Vermehrung des Virus zu erreichen.

Die Viruskonzentration wurde mit einem Plaque-Test in HEK293-Zellen in einer 6-Well-Platte durchgeführt. Die Zellen wurde mit verschiedenen Verdünnungen des Virusstocks (10^{-9} - 10^{-11}) infiziert und nach Inkubation 24 h bei 37°C und 5% CO₂ mit 4%iger Agarose

* Die Methode wurde in ähnlicher Form von Ahles *et al.* in *Science Signaling* publiziert (199).

überschichtet. Nach sieben Tagen erfolgte eine zweite Überschichtung mit Agarose und nach insgesamt 12 Tagen wurden die durch Virusinfektion bedingte Lyse der Zellen entstandenen Plaques durch Kontrastfärbung mit MTT (3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazoliumbromid) sichtbar gemacht und gezählt. Dabei entsprach ein Plaque der Lyse eines Verbandes von HEK293-Zellen, die durch einen einzelnen Virus hervorgerufen worden war. Durch Spaltung des Tetrazoliumrings durch aktive, mitochondriale Dehydrogenasen lebender Zellen wurde das lösliche MTT in unlösliches, violette Formazan umgewandelt. Plaques, also tote Zellen oder daraus resultierende Löcher im Zellverband, konnten den Farbstoff MTT nicht umsetzen und bleiben farblos. Die Bestimmung des Virustiters erfolgte schließlich durch Berechnung der „plaque forming units“ (pfu), d.h. der Anzahl der infektiösen Viren (in einem Milliliter Lösung) bezogen auf die Gesamtzahl an Plaques bei der jeweiligen Viruskonzentration.

2.12.6 Infektion von CHO-K1-Zellen mit Adenovirus *

Zur Expression von β_2 AR und β_2 AR-Sensor für funktionelle Studien wurden CHO-K1-Zellen, die endogen keine β AR exprimierten, in 6-Well-Platten mit den entsprechenden Adenoviren infiziert. Es erfolgte eine Koinfektion mit pAd-Epac1-camps (98) mit jeweils einer MOI (multiplicity of infection) von 100 (= 100 Viruspartikel pro Zelle). 24 h später wurden die Zellen auf mit Polylysin beschichtete Glasplättchen in neue 6 Wells gesplittet und weitere 24 h danach vermessen.

2.12.7 Generierung stabiler Zelllinien *

HEK293-Zellen wurden in 10cm²-Schalen mit Effectene transfiziert (siehe 2.12.3). Das Expressionsplasmid pT-Rex enthielt das Resistenzgen Neomycin, sodass Zellen, die die eingebrachte Plasmid-DNA stabil in ihr Genom integriert hatten, mithilfe von Geneticin (G-418, Invitrogen, Karlsruhe) selektioniert werden konnten. Dazu wurde ab 24 h nach Transfektion täglich für zwei bis drei Wochen frisches Medium mit 0,8 g/l Geneticin zugegeben. Die weitere Kultivierung erfolgte in Medium mit 0,2-0,4 g/l Geneticin. Das Expressionsniveau der heterogenen stabilen Zelllinien erfolgte mittels Radioligandenbindung.

* Die Methode wurde in ähnlicher Form von Ahles *et al.* in *Science Signaling* publiziert (199).

2.12.8 Permeabilisierung von HEK293 Zellen mit Saponin *

Intrazellulärlösung:	K ⁺ -Aspartat	100 mM
	KCl	30 mM
	NaCl	10 mM
	MgCl ₂	1 mM
	EGTA	5 mM
	Hepes	10 mM
	pH 7,35	

HEK293-Zellen wurden auf Glasplättchen, die vorher mit Poly-D-Lysin beschichtet worden waren, ausgesät. Ein Glasplättchen wurde für die Messung in eine Messkammer (Invitrogen, Karlsruhe) eingespannt. Um lösliche intrazelluläre Proteine aus den Zellen auszuschleusen, wurden die Zellen für 3 min mit 0,05% Saponinlösung behandelt. Hierfür wurde eine 10%-Stocklösung in PBS angesetzt und bei 4°C aufbewahrt. Die Verdünnung auf 0,05% erfolgte in Intrazellulärlösung. Nach einmaligem Waschen mit Intrazellulärlösung und damit dem Entfernen der löslichen Proteine wurden die Zellen mit Intrazellulärlösung überschichtet und am Mikroskop vermessen.

2.13 Proteinbiochemische Methoden

2.13.1 Proteinlysate aus HEK293-Zellen *

Lysispuffer:	Tris pH 6,7	50 mM
	SDS	2% (m/v)
	Na ₃ VO ₄	1 mM
	pro 10 ml Lysispuffer eine Tablette cComplete Mini (Roche, Mannheim)	
	pro 10 ml Lysispuffer eine Tablette PhosSTOP (Roche, Mannheim)	

Ladepuffer:	Glycerin	50% (v/v)
	Bromphenolblau	0,001% (m/v)

Verdünnungspuffer:	Lysispuffer
	1/40 Vol. β-Mercaptoethanol
	1/10 Vol. Ladepuffer

Zur Proteingewinnung wurden die HEK293-Zellen in 6-Well- oder 12-Well-Platten ausgesät und entsprechend behandelt und stimuliert. Die Platten wurden auf Eis gestellt und nach einmaligem Waschen mit eisgekühltem DPBS wurde ebenfalls kalter Lysispuffer zugegeben.

* Die Methode wurde in ähnlicher Form von Ahles *et al.* in *Science Signaling* publiziert (199).

Die Zellen wurden im Folgenden mit einem Zellschaber abgeschabt und die Zellsuspension in ein 1,5 ml Gefäß überführt. Nach Sonifikation wurden die Proben mit 1/10 Volumen 5% (v/v) Benzonase (Merck, Darmstadt) versetzt und zehn Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Benzonase ist eine gentechnisch veränderte Endonuklease, die spezifisch Nukleinsäuren abbaut, ohne rekombinante Proteine zu zerstören. Das Enzym wurde anschließend durch fünfminütige Inkubation bei 4°C in einem Ultraschallbad deaktiviert. Von dem so gewonnenen Lysat wurde eine Proteinbestimmung mit BCA durchgeführt. Final wurden die Proben mit 1/40 Volumen β -Mercaptoethanol und 1/10 Volumen Ladepuffer versetzt. Bis zur weiteren Verwendung wurden die Proben bei -20°C gelagert. Zur Analyse durch Western Blot wurden je nach Antikörper 5-25 μ g Protein eingesetzt.

2.13.2 Proteinlysate aus humanem Gewebe

Die in Flüssigstickstoff gefrorenen Gewebebiopsien wurden in eisgekühlten Lysispuffer transferiert und sofort mit einem Ultraturrax homogenisiert. Die weitere Behandlung erfolgte analog zu den Zelllysaten. Für Western Blot wurden 50 μ g Protein eingesetzt. Die Proben wurden mit Verdünnungspuffer auf gleiche Konzentration und gleiches Volumen eingestellt.

2.13.3 Quantifizierung der Proteinkonzentration mittels BCA

Die Proteinbestimmung in Lysaten wurde in Triplikaten mit Bicinchoninsäure (bicinchoninic acid, BCA Protein Assay Kit, Thermo Scientific, Rockford, USA) kolorimetrisch nach Anweisung des Herstellers bestimmt. Dabei reagierten zweiwertige Kupferionen quantitativ mit Protein zu einwertigen Kupferionen. Diese ergaben mit der Bicinchoninsäure einen violetten Farbstoff, dessen Absorption bei einer Wellenlänge von 562 nm photometrisch ausgewertet wurde (Photometer SpectraMax 340 von Molecular Devices, Sunnyvale, USA oder Infinite 200 von Tecan, Männedorf). Gegen einen internen Kalibrationsstandard mit BSA im Bereich von $A_{562}=0,1-1,0$ konnte die Proteinkonzentration berechnet werden.

2.13.4 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) *

10x SDS Laufpuffer:	Tris-HCl	30 g
	Glycin	144 g
	SDS	15 g
	ddH ₂ O	ad 1 l

* Die Methode wurde in ähnlicher Form von Ahles *et al.* in *Science Signaling* publiziert (199).

Sammelgelpuffer (4x):	Tris/HCl	61 g
	10% SDS	40 ml
	ddH ₂ O	ad 1 l
	pH 6,7	
Trenngelpuffer (4x):	Tris/HCl	182 g
	10% SDS	40 ml
	ddH ₂ O	ad 1 l
	pH 8,8	

Je nach Größe des detektierten Proteins wurden 8-12% Polyacrylamidgele verwendet:

	Sammelgel	Trenngel		
		8%	10%	12%
Acrylamid/Bisacrylamid 30%/0,8% (w/v)	0,5 ml	4 ml	5 ml	6 ml
ddH ₂ O	3,2 ml	4,7 ml	3,7 ml	2,6 ml
Trenngelpuffer (4x)	-	3,8 ml	3,8 ml	3,8 ml
Sammelgelpuffer (4x)	1,25 ml	-	-	-
Glycerin	-	2,5 ml	2,5 ml	2,5 ml
Tetramethylethyldiamin (TEMED)	6 µl	12 µl	12 µl	12 µl
Ammoniumperoxodisulfat-Lösung (10%)	48 µl	72 µl	72 µl	72 µl

Als Gelelektrophoresesystem wurde Protean 4 Mini (Bio-Rad, München) oder Mini-Vertical Units SE260 (GE Healthcare, München, früher Amersham Biosciences) verwendet. Vor dem Auftragen wurden die Proben 5 min bei 95°C erhitzt. Die Gelkammer wurde mit 1x SDS-Laufpuffer gefüllt. Die Gelelektrophorese wurde bei 25 mA pro Gel bei maximaler Voltzahl durchgeführt. Als Marker wurde der BenchMark Prestained Protein Ladder (Invitrogen, Karlsruhe) oder der PageRuler Prestained Protein Ladder (Fermentas, St. Leon-Rot) benutzt.

2.13.5 Western Blot *

Transferpuffer:	Tris-HCl (1 M, pH 8,3)	25 ml
	Glycin	11,26 g
	Methanol	100 ml
	ddH ₂ O	ad 1 l

In SDS-Gelen aufgetrennte Proteine wurden durch elektrischen Strom auf PVDF-Membranen (Millipore, Billerica, USA) transferiert. Dazu wurde ein Sandwich bestehend aus

* Die Methode wurde in ähnlicher Form von Ahles *et al.* in *Science Signaling* publiziert (199).

1-3 Lagen Filterpapier, in 100% Methanol equilibrierter PVDF-Membran, SDS-Gel und weiteren 1-3 Lagen Filterpapier aufgebaut. Der Transfer der Proteine wurde in einer Transferkammer (Tank Blotting Apparat, Biorad, München oder TE77 EC Semi-Dry Transfer Unit, Amersham Biosciences, München) bei maximaler Voltzahl und 350 mA durchgeführt. Die Transferzeit wurde abhängig von der Gelstärke und der Proteingröße gewählt und betrug mindestens 90 min.

2.13.6 Immundetektion *

PBS:	NaCl	137 mM
	KCl	2,7 mM
	Na ₂ HPO ₄	4,3 mM
	KH ₂ PO ₄	1,4 mM
	pH 7,4	
PBS-T:	1x PBS	
	0,1 % (v/v) Tween-20	
Milchblockpuffer:	NaCl	100 mM
	Tris-HCl, pH 7,4	10 mM
	Tween-20	0,1% (v/v)
	Milchpulver	5% (w/v)
BSA-Blockpuffer:	Tris-HCl pH 7,5	50 mM
	NaCl	150 mM
	BSA	2% (m/v)
	Nonidet P40	0,2% (v/v)
	NaN ₃	0,03% (m/v)
BSA-Waschpuffer:	Tris-HCl pH 7,5	50 mM
	NaCl	150 mM
	BSA	0,5% (m/v)
	Nonidet P40	0,2% (v/v)

Nach dem Transfer der Proteine auf die PVDF-Membran wurde diese zunächst zur Absättigung unspezifischer Bindungsstellen für 2 h bei Raumtemperatur oder über Nacht bei 4°C in Blockpuffer geschwenkt. Im folgenden wurde der Primärantikörper in geeigneter Verdünnung (1:1000 - 1:5000) in Blockpuffer zugegeben und erneut für 2 h bei Raumtemperatur oder über Nacht bei 4°C inkubiert. Wurde Milchblockpuffer verwendet, so

* Die Methode wurde in ähnlicher Form von Ahles *et al.* in *Science Signaling* publiziert (199).

wurden die Membranen in folgenden mit PBS-T gewaschen und der Sekundärantikörper in Blockpuffer verdünnt. Nach viermaligem Waschen für jeweils 8 min in Waschpuffer wurde die Membran mit Sekundärantikörper (Verdünnung 1:10000) für 2 h bei Raumtemperatur unter Schwenken inkubiert. Der dabei ungebunden gebliebene Antikörper wurde im Anschluss durch viermaliges Waschen für 8 min entfernt. Erfolgte das Blocken unspezifischer Bindungen in BSA-Blockpuffer, so wurde die Membran in BSA-Waschpuffer gewaschen und der Sekundärantikörper in BSA-Waschpuffer zugegeben, da hier das im Blockpuffer enthaltene Natriumazid mit dem Detektionsreagenz interferierte.

Durch das an den Zweitantikörper gebundene Enzym Peroxidase konnte eine Chemilumineszenzreaktion katalysiert werden. Für den Nachweis des Proteins durch Chemilumineszenz wurde ECL Plus (GE Healthcare, München) entsprechend den Angaben des Herstellers verwendet. Die Detektion erfolgte zum einen durch Belichtung von Röntgenfilmen (Fujifilm, Düsseldorf) mit unterschiedlichen Belichtungszeiten. Die Filme wurden mit einem Scanner (Epson) digitalisiert. Zum anderen wurde das Signal in einem Fujifilm LASmini4000 Detektionsgerät (Bio-Rad, München) sichtbar gemacht.

2.13.7 Isolierung von Zellmembranen *

Hypotoner Puffer:	Tris pH 7,5	5 mM
	EDTA	2 mM

80% konfluent gewachsene HEK293-Zellen in wurde mit DPBS gewaschen und bei -20°C gelagert. Zur Membranpräparation wurden die Zellen mit einem Zellschaber in 5 ml eiskaltem hypotonem Puffer pro 15cm²-Kulturschale gelöst und in ein 15ml-Gefäß transferiert. Es folgte der Aufbruch der Zellen mit einem Ultra-Turrax T25 (Jahnke & Kunkel, Staufen) für 2x 15 s bei maximaler Stufe auf Eis. Um Zellkerne und intakte gebliebene Zellen zu entfernen, wurde das Homogenat für 10 min bei 1000 g in einer Avanti J25 Zentrifuge (Beckman Coulter, Krefeld, Rotor JA-17) zentrifugiert. Die Membranfraktion wurde aus dem Überstand durch Ultrazentrifugation für 40 min bei 100.000 g in einer Optima LE70 Ultrazentrifuge (Beckman Coulter, Krefeld, Rotor 70 Ti) gewonnen. Das aus der Ultrazentrifugation resultierende Pellet wurde in hypotonem Puffer mit einem Glashomogenisator resuspendiert. Der Proteingehalt der Membranfraktion wurde mittels Bradford Proteinbestimmung ermittelt und die Proben bei -80°C weggefroren.

* Die Methode wurde in ähnlicher Form von Ahles *et al.* in *Science Signaling* publiziert (199).

2.13.8 Proteinbestimmung nach Bradford

Die Bradford-Lösung (Bio-Rad, München) basiert darauf, dass der Triphenylmethanfarbstoff Coomassie-Brillant-Blau G-250 in saurer Lösung mit kationischen und unpolaren Seitenketten von Proteinen Komplexe bildet. Die ungebundene (kationische), rote Form des Farbstoffs hatte im Absorptionsspektrum ein Maximum bei 470 nm. Durch die Komplexbildung mit Proteinen wurde der Farbstoff in seiner blauen, unprotonierten, anionischen Sulfonatform stabilisiert und das Absorptionsmaximum verschob sich auf 595 nm. Als Referenz wurde ein BSA-Proteinstandard bekannter Konzentration verwendet.

2.13.9 Radioligandenbindung an Zellmembranen *

Die Radioligandenbindungen an Membranpräparationen von HEK293-Zellen wurden mit ¹²⁵I-Cyanopindolol (Hartmann Analytic, Braunschweig) unter Zugabe von GTP von Christian Dees (Institut für Pharmakologie und Toxikologie, Universität Würzburg) durchgeführt.

2.13.10 Radioligandenbindung an intakten Zellen *

HEK293-Zellen, die β AR stabil exprimierten, wurden in mit Polylysin beschichtete 24-Well-Platten ausgesät. Bindungsexperimente an intakten Zellen wurden in serumfreien DMEM mit dem Radioliganden ³H-CGP-12177 (Hartmann Analytic, Braunschweig, 1 nM) durchgeführt. Die Zellen wurden für 1-1,5 h bei 37°C und 5% CO₂ inkubiert. Danach wurde zweimal mit PBS gewaschen und mit 500 μ l 1M NaOH 30 min bei Raumtemperatur oder über Nacht bei 4°C lysiert. Die Lysate wurden in Szintillationsflüssigkeit (Rotiszint eco plus) überführt und in einem β -Counter (Tri-Carb 2100TR Liquid Scintillation Analyser, Packard, Waltham, USA) vermessen. Unspezifische Bindung wurde mit 10 μ M Alprenolol bestimmt.

2.13.11 Enzymatische Deglykosylierung

20 μ g Lysat aus HEK293-Zellen (siehe 2.13.1) wurden über Nacht mit 10 Volumina 100% Ethanol bei -20°C präzipitiert und anschließend bei 4°C zentrifugiert und in ddH₂O gelöst. Diese Proteinlösung wurde einer PNGase-Behandlung unterzogen. N-Glykosidase F (PNGase F, NEB, Frankfurt am Main) ist eine Amidase, die zwischen der Aminosäure Aspartat und dem ersten GlcNAc komplexer Oligosaccharidketten von N-glykosylierten Proteinen angreift und damit alle N-Glykan-Ketten hydrolysiert. Die Behandlung bestand

* Die Methode wurde in ähnlicher Form von Ahles *et al.* in *Science Signaling* publiziert (199).

aus zwei Schritten: Einer anfänglichen Denaturierung der Proteine folgte die eigentliche Deglykosyierung.

Denaturierung:	Proteinlysate	20 µg (vor EtOH-Präzipitation)
	10x Denaturierungspuffer	1 µl
	ddH ₂ O	ad 10 µl
	→ 10 min Inkubation bei 99°C	
Deglykosyierung:	Denaturierungsansatz (s.o.)	10 µl
	10x G7 Reaktionspuffer	2 µl
	10% NP40	2 µl
	PNGase (500 U/µl)	1,5 µl
	ddH ₂ O	ad 20 µl
	→ 1 h Inkubation bei 37°C	

2.13.12 TEV-Protease-Behandlung des β_2 AR-TEV-FRET-Sensors

Die AcTEV-Protease (Invitrogen, Karlsruhe) ist eine weiterentwickelte Form der Tobacco Etch Virus (TEV) Protease, die sehr spezifisch die Sequenz aus den sieben Aminosäuren Glu-Asn-Leu-Tyr-Phe-Gln-Gly erkennt und zwischen Gln und Gly schneidet.

24 h vor der AcTEV-Behandlung wurden HEK293-Zellen, die den β_2 AR-TEV-Sensor stabil exprimierten, auf mit Polylysin beschichtete Glasplättchen in 6-Wellen gesplittet. Ein Ansatz (für \approx 500.000 Zellen) enthielt:

20x TEV Puffer (50mM Tris-HCl, pH 8,0, 0,5 M EDTA)	50 µl
0,1 M DTT	10 µl
AcTEV Protease (10 U/µl)	10-40 µl
DMEM + 1% Glutamin	ad 1 ml

Die Zellen wurde für 2 h oder 4 h bei 37°C und 5% CO₂ inkubiert, anschließend wurde die Reaktion durch Mediumwechsel auf DMEM abgestoppt.

2.13.13 Messung der intrazellulären Akkumulation von cAMP *

24-Well-Platten wurden zur Beschichtung 1 h mit Polylysin inkubiert und anschließend einmal mit DPBS gewaschen. In jedes Well wurden 200.000 Zellen (stabil die β_2 AR-Sensorvarianten exprimierende HEK293-Zellen sowie Kontrollzellen) im normalen Kulturmedium ausgesät. Nach 24 h wurde das Medium auf DMEM ohne FBS gewechselt und die Zellen für 8 h ausgehungert. Danach wurden die Zellen für die entsprechende

* Die Methode wurde in ähnlicher Form von Ahles *et al.* in *Science Signaling* publiziert (199).

Zeitspanne mit 100 nM Adrenalin stimuliert. Intrazelluläres cAMP wurde mit dem Parameter Cyclic AMP Assay Kit (R&D Systems, Wiesbaden-Nordenstadt) quantifiziert. Dafür wurden die Zellen nach der Stimulation mit DPBS gewaschen und mit 500 µl 1x Lysispuffer lysiert. Nach drei Frier-Tau-Zyklen wurde das Lysat in eine Antikörper-gecodete 96well-Platte überführt und den Angaben des Herstellers folgend behandelt. Die finale Messung der cAMP-Konzentration erfolgte bei 450 nm im Reader Infinite 200 (Tecan, Männedorf). Der Referenzwert bei 570 nm wurde subtrahiert. Von allen Lysaten wurde parallel die Proteinkonzentration mittels BCA (Pierce BCA Protein Assay Kit, Thermo Scientific, Rockford, USA) bestimmt und die cAMP-Ergebnisse darauf normalisiert.

2.14 Mikroskopische Techniken *

2.14.1 Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen

Nichtkonfokale Aufnahmen von lebenden Zellen vor und nach Permeabilisierung mit Saponin wurden an einem Inversmikroskop (Axio Observer Z1, Zeiss, Göttingen), das mit einem Plan-Apochromat 63x oder Plan-Apochromat 40x Ölimmersionsobjektiv und einer Retiga 4000DC Kamera (Qimaging, Burnaby, Kanada) ausgestattet war, aufgenommen. Als externe Lichtquelle diente Lumen 200Pro (Prior Scientific, Jena).

Folgende Filtersets von Chroma Technology Corp. (Bellows Falls, USA) wurden verwendet:

Fluorophor	Anregungsfilter	Strahlenteiler	Emissionsfilter
CFP / Cer (ET CFP)	ET436/20x	T455LP	ET480/40m
GFP (ET GFP)	ET470/40x	T495LPXR	ET525/50x
YFP (ET YFP)	ET500/20	T515LP	ET535/30
RFP (ET mCherry/Texas Red)	ET560/40x	T585LP	ET630/75m

2.14.2 Konfokale Laser Scanning Mikroskopie

FRET-Puffer:	NaCl	137 mM
	KCl	5,4 mM
	Hepes	10 mM
	CaCl ₂	2 mM
	MgCl ₂	1 mM
	pH 7,3	

* Die hier beschriebenen mikroskopischen Techniken wurden in ähnlicher Form von Ahles *et al.* in *Science Signaling* publiziert (199).

HEK293-Zellen wurden auf runden 24 mm Deckgläschen ausgesät und 24 h später in einer Attofluor-Messkammer (Invitrogen, Karlsruhe) in FRET-Puffer mikroskopiert. Folgende Mikroskopsysteme wurden verwendet:

1. Die Konfokalmikroskopie am Institut für Pharmakologie und Toxikologie der Universität Würzburg wurde an einem TCS SP2 System von Leica (Wetzlar) durchgeführt. Dieses war mit einem HCXPL APO 63x1,32 Ölimmersionsobjektiv ausgestattet. Zur Anregung von CFP und YFP standen ein Krypton/Argon-Laser und ein Diodenlaser zur Verfügung. Die Aufnahmen wurden in einem Format von 512x512 Pixeln bei 400 Hz durchgeführt und mit der LASAF-Software (Leica, Wetzlar) aufgezeichnet.

Fluorophor	Laser	Strahlenteiler	Anregungs-wellenlänge	Emissionsbereich
eCFP / Cer	Doppeldiodenlaser	RSP 455	430 nm	467-550 nm
eYFP	Argonlaser	DD 458/514	514 nm	525-600 nm

2. Die Aufnahmen am Institut für Pharmakologie und Toxikologie der TU München wurden an einem LSM 510 System von Zeiss (Göttingen) mit einem Plan-Apochromat 63x/1.4Oil DIC Objektiv durchgeführt. Die Bilder wurden in einem Format von 1024x1024 Pixeln mit der zugehörigen Zeiss LSM Software aufgenommen.

Fluorophor	Laser	Strahlenteiler	Anregungs-wellenlänge	Emissionsbereich
eYFP	Argon2 Laser	HFT 458/514	514 nm	530-600 nm (LP530)

3. Zusätzlich wurden in Kollaboration mit dem Institut für Neurowissenschaften der TU München (Prof. Thomas Misgeld / Dr. Monika Brill) Aufnahmen mit einem Olympus Konfokal FV1000 System durchgeführt. Das hier verwendete Auflichtmikroskop war mit einem 100x Wasserobjektiv sowie einem Filterset zur Aufnahme der Fluoreszenz von YFP bzw. RFP (Anregung YFP: 515 nm, Anregung RFP: 559 nm) ausgestattet.

2.14.3 Qualitative Untersuchung der Rezeptorinternalisierung

Zur Analyse der Internalisierung der β AR-FRET-Sensoren wurden HEK293-Zellen, die die Sensoren stabil exprimierten, auf Glasplättchen ausgesät, in einen Attofluorhalter (Invitrogen, Karlsruhe) eingespannt und mit 300 μ l FRET-Puffer überschichtet. Nach Aufnahme der Zellen vor Stimulation wurden 300 μ l Agonistlösung mit der Pipette

zugegeben. Die Analyse zur Internalisierung der FRET-Sensoren nach Agoniststimulation erfolgte am Konfokalmikroskop. Wurde die Lokalisation der Sensoren über bis zu 1 h visualisiert, so wurde automatisiert alle 5 min oder 10 min ein Bild aufgenommen.

2.14.4 Akzeptor-Photobleichen

FRET zwischen CFP und YFP im basalen Zustand des Rezeptors wurde mittels Photobleichen des Akzeptors (YFP) und damit Dequenchen des Donors (CFP) nachgewiesen. Durch das Bleichen des Akzeptors eines FRET-Paares erhöhte sich bei bestehendem FRET die Emissionsintensität des Donors. Nach einer initialen Aufzeichnung der Emissionen von CFP und YFP bei Anregung von 436 nm wurde YFP durch kontinuierliche Beleuchtung für 8 min bei 490 nm gebleicht. Anschließend wurde erneut die Emissionsintensität von CFP und YFP bei 436 nm Anregung gemessen. Die Aufnahmen wurden mit dem Photodiodensystem durchgeführt (siehe 2.14.5.1).

2.14.5 Dynamische FRET-Messungen an lebenden Zellen

HEK293-Zellen (stabil die β AR-Sensoren exprimierend oder 24 h nach Transfektion) wurden in 6-Well-Platten auf mit Polylysin beschichteten Glasplättchen ausgesät. Sie wurden weitere 24 h in Kultur gehalten. Für die FRET-Experimente wurden die Glasplättchen mit den adhärierenden Zellen in einer Attofluor-Messkammer (Invitrogen, Karlsruhe) montiert und in FRET-Puffer bzw. bei Permeabilisierungsexperimenten in Intrazellulärlösung bei Raumtemperatur vermessen. CFP diente als Donor, YFP als Akzeptormolekül für FRET.

2.14.5.1 Intramolekulares FRET - Rezeptor-Konformationsänderungen

Die FRET-Messungen im Institut für Pharmakologie und Toxikologie der Universität Würzburg für Rezeptorstudien wurden mit einem Zeiss Axiovert200 Mikroskop mit einem Plan-Neofluar 100x/1,3 Ölimmersionsobjektiv (Zeiss, Göttingen) und einem dualen Photodioden-Emissionssystem (Till Photonics, Gräfelfing) durchgeführt. Die Anregung erfolgte über eine externe Lichtquelle Polychrom IV (Till Photonics, Gräfelfing), die über die Software TillVision angesteuert wurde. Der Lichtstrahl wurde dazu über einen Strahlenteiler (DCLP 455 nm) durch einen Anregungsfilter (436 ± 10 nm, Chroma Technology Corp, Bellows Falls, USA) zur Probe gelenkt. Um das Photobleichen möglichst gering zu halten, wurde die Belichtungszeit auf 10-40 ms bei einer Frequenz von 10-100 Hz je nach Messung

festgelegt. Bei Kinetikmessungen wurde eine Belichtungsfrequenz von 25 ms festgesetzt. In allen Experimenten wurden Zellen mit ähnlicher Fluoreszenzintensität ausgewählt. Das Signal wurde im Idealfall von einer gesamten Einzelzelle aufgenommen. Das von der Probe emittierte Licht wurde durch einen Strahlenteiler (DLCP 505 nm) und nachgeschalteten Emissionsfiltern (Chroma Technology Corp., CFP 480 ± 20 nm, YFP 535 ± 15 nm) geteilt, über Photodioden detektiert und über einen A/D-Umwandler (Digidata1322A, Molecular Devices, Sunnyvale, USA) digitalisiert. Die Emissionsintensitäten der einzelnen Kanäle sowie die Ratio aus Akzeptor- zu Donor-Emission wurden mit der Clampex 9.0 Software (Molecular Devices, Sunnyvale, USA) aufgezeichnet. Die Auswertung der Ergebnisse erfolgte mit Clampfit 9.0 (Molecular Devices, Sunnyvale, USA) und Origin 6.1 (OriginLab, Northhampton, USA).

Die FRET-Messungen am Institut für Pharmakologie und Toxikologie der TU München erfolgten analog. Hier diente ein Polychrom V (Till Photonics, Gräfelfing) als Lichtquelle, es wurde der A/D-Wandler Digidata1440 (Molecular Devices, Sunnyvale, USA) verwendet. Die Arbeiten erfolgten an einem Zeiss Axiovert Z1 Mikroskop (Göttingen) und wurden mit den weiterentwickelten Softwareversionen Clampex 10.2 und Clampfit 10.2 aufgezeichnet bzw. analysiert.

Die detektierte YFP-Emission wurde für das Durchbluten des Donor- in den Akzeptorkanal und die direkte Akzeptoranregung, die am Ende jedes Experiments aufgezeichnet wurde, korrigiert. Die Faktoren für das Durchbluten des CFP- in den YFP-Kanal bzw. für die Direktanregung des YFP bei 436 nm wurden zuvor mit CFP- bzw. YFP-markierten Rezeptoren ermittelt:

	Direkte Akzeptoranregung	Durchbluten
Setup Würzburg		
β_1 AR	0,8	0,014
β_2 AR	0,8	0,014
Setup München		
β_1 AR	0,38	0,015
β_2 AR	0,53	0,015

Weiterhin wurden allen Messungen auf agonistenunabhängige FRET-Änderungen durch Photobleichen korrigiert. Für die Berechnung der finalen FRET-Ratio wurde die korrigierte Akzeptorfluoreszenz durch die Donorfluoreszenz geteilt.

Für die Berechnung der Kinetik, mit der sich die FRET-Ratio ändert, wurde folgende Gleichung verwendet: $A(t) = A * e^{-t/\tau}$, wobei τ (in ms) die Zeitkonstante und A die Signaländerung repräsentiert.

Um ligandenabhängige FRET-Änderungen aufzuzeichnen, wurden die Zellen kontinuierlich mit FRET-Puffer umspült. Die Liganden wurden in FRET-Puffer verdünnt und mittels eines Computer-gesteuerten Magnetventil-Superfusionssystems (ALA-VM8, ALA Scientific Instruments, Farmingdale, USA) direkt auf die ausgewählte Zelle gegeben (Lösungswechsel innerhalb von 5-10 ms). Bei wiederholter Stimulation erfolgt die erste Agonistapplikation entweder für 5 s oder für 5 min. Nach vollständigem Auswaschen des Agonisten und damit der Rückkehr des FRET-Signals auf die anfängliche Basislinie, wurde die gleiche Zelle erneut stimuliert.

2.14.5.2 Intermolekulares FRET - Interaktion von Proteinen

Die agonistabhängige Interaktion von β -Arrestin2-YFP und β_2 AR-CFP wurde mit einem Kamerasystem bestimmt. Ein Polychrome 5000 (Till Photonics, Gräfelfing) diente als Lichtquelle an einem Axio Observer Z1 inversem Mikroskop von Zeiss (Göttingen, ausgestattet mit einem 100x Objektiv), einem DualView2 als Strahlenteiler und einer Evolve Kamera (Photometrics, Marlow, Buckinghamshire, Vereinigtes Königreich). FRET-Änderungen wurden mit der MetaFluor Software (Visitron Systems, Puchheim) aufgenommen. Die Agonistzugabe erfolgte analog zu 2.14.5.1.

2.15 Untersuchung von Patientenproben

2.15.1 Biopsientnahme bei Patienten

Die Patientenproben wurden von Dr. Torsten Frambach (Frauenklinik, Universitätsklinikum Würzburg) bereitgestellt. Die Biopsientnahme und Untersuchung erfolgte im Einklang mit den Richtlinien der Erklärung von Helsinki und wurde durch das Ethikkomitee der Medizinischen Fakultät der Universität Würzburg bewilligt (Studennummer 92/98). Alle Patientinnen unterschrieben eine Einverständniserklärung. Die Gewebeproben aus dem Myometrium wurden von Frauen während der Kaiserschnitt-Operation in der 24 bis 34 Schwangerschaftswoche gewonnen. Ein schmales Stück Myometrium wurde dabei vom oberen Rand des Einschnitts im unteren Segment des Uterus entnommen, sofort in

flüssigem Stickstoff eingefroren und bis zum Gebrauch bei -80°C gelagert. Die Patientinnen wurden in folgende drei Gruppen unterteilt: (I) Kontrollgruppe von Schwangeren ohne vorzeitige Wehen und damit ohne Tokolysebehandlung, (II) Gruppe charakterisiert durch eine erfolgreiche Tokolysetherapie mit Fenoterol und (III) Gruppe charakterisiert durch eine erfolgreiche Therapie mit Fenoterol. Folgende Kriterien wurden bei der Patientenauswahl für die Studie berücksichtigt: (a) Behandlung zwischen der 24. und 34. Schwangerschaftswoche, (b) Dauer der Tokolysebehandlung < 7 d, (c) nur Einzel- und Zwillingsgeburten und (d) Patientinnen, deren Kaiserschnitt-Operation aus anderen Gründen als Wehen vorgenommen wurde, wurden herausgenommen.

2.15.2 SNP Genotypisierung mittels 5'-Nuklease-Assay

Aus humanen Gewebeproben (Uterus, $1-2\text{ mm}^3$) wurden mithilfe des Sample-to-SNP Kits (Applied Biosystems, Darmstadt) genomische DNA extrahiert. Dazu wurde eine bei -80°C gefrorene Probe mit $50\ \mu\text{l}$ Lysisreagenz versetzt und 3 min bei 95°C erhitzt. Anschließend wurden $50\ \mu\text{l}$ Stabilisierungsreagenz zugegeben und die Lösung gemischt. Die so behandelten Gewebeproben wurden entweder direkt in den 5'-Nuklease-Assay zur Alleldiskriminierung eingesetzt oder bei -20°C gelagert.

Das Prinzip des Assays ist in Abbildung 15A dargestellt. Die Methode basierte auf zweifach markierten Oligonukleotid-Sonden, die zum einen ein fluoreszierendes Molekül (FAM für Allel 1, VIC für Allel 2) und zum anderen ein Quencher-molekül beinhalten. Die Sonden wurden zusätzlich durch ein „Minor Groove Binder“ (MGB) Molekül stabilisiert. In der intakten Sonde kommt es zum FRET vom Reporter auf den Quencher und somit zu einer geringen Emission des Fluoreszenzreporters. Von einer an der genomischen DNA hybridisierten Sonde wird der Quencher durch die 5'-Nukleasaktivität der im Reaktionsmix enthaltenen Taq Polymerase abgespalten, so dass eine Anlagerung der Sonde in einem Anstieg der FAM oder VIC Fluoreszenz oder beiden, je nachdem, ob Homo- oder Heterozygotie vorliegt, resultiert (Abbildung 15B). Drei Faktoren tragen zur erfolgreichen Diskriminierung basierend auf einem einzelnen nichtkomplementären Nukleotid („Mismatch“) bei: 1. Ein Basen-Mismatch geht mit einer niedrigeren Schmelztemperatur verglichen mit einem perfekten Match einher. Dieser Unterschied kann durch geeignete Wahl der Temperaturen für Annealing und Elongation genutzt werden, um eine exakte Sondenhybridisierung zu begünstigen. 2. Beide Sonden konkurrieren zeitgleich um die Bindung an die DNA, die exakt passende Sonde bindet jedoch stabiler. 3. Das 5'-Ende der Sonde muss vor der Abspaltung des Quencher-moleküls durch die Taq Polymerase durch

die Katalyse eben dieser ersetzt werden. Da bei Mismatch die Sonde nicht stabil bindet, kommt es bei der Strangverlängerung eher zur Abdissoziation der ganzen Sonde als zur Abspaltung des Quenchers bei bestehender Bindung.

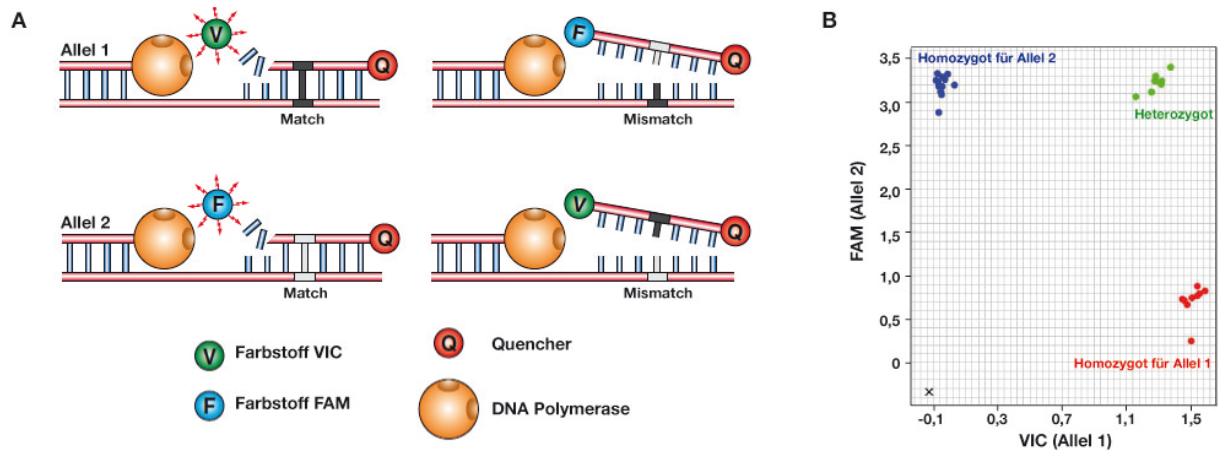


Abbildung 14. Prinzip des TaqMan SNP Genotypisierungsassays. (A) Diskriminierung zwischen zwei Allelen durch Verwendung von zwei fluoreszierenden Sonden in einem 5'-Nuklease-Assay. Ein Mismatch zwischen Sonde und Zielsequenz destabilisiert die Bindung der Sonde während der Strangverlängerung und reduziert damit die Wahrscheinlichkeit der Abspaltung des Quencher-moleküls. Abbildung adaptiert aus dem Protokoll von Applied Biosystems. (B) Beispiel eines Arg16Gly- β_2 AR-Genotypisierungsergebnisses mit aus Uterusgewebe extrahierter DNA und einer VIC-markierten Sonde für Arg16 sowie einer 6FAM-markierten Sonde für Gly16 (Assay C_2084764_20).

Zur Analyse der SNPs im β_2 AR wurden die TaqMan SNP Genotyping Assays C_2084764_20 (für Arg16Gly) und C_2084765_20 (für Gln27Glu) von Applied Biosystems (Darmstadt) verwendet. Die PCR wurde in einem 7900HT oder Step-One Plus Real-Time PCR System (Applied Biosystems, Darmstadt) durchgeführt.

Reaktionsmix:	DNA-Lysat	2 μ l
	TaqMan GTXpress Master Mix (2x)	5 μ l
	TaqMan Genotypisierungsassay Mis (20x) (=Sonden)	0,5 μ l
	DNase-freies H ₂ O	2,5 μ l

Vorgang	Temperatur	Zeit	Anzahl der Zyklen
Aktivierung der DNA Polymerase	95°C	20 s	1
Zyklen	95°C	3 s	40
	60°C	20s	

2.16 Statistische Auswertung

Die Datensätze sind, soweit nicht anders angegeben, durch Mittelwert und Standardfehler dargestellt. Die Auswertung und statistische Darstellung von Datensätzen erfolgte mithilfe von Prism 4.0 und 5.0 (GraphPad Software, La Jolla, USA) und Origin 6.1 (OriginLab, Northhampton, USA). Zur Prüfung auf statistische Signifikanz wurde der Student t Test verwendet. Für vergleichende Analysen verschiedener Gruppen wurde eine Varianzanalyse (One-way ANOVA) mit anschließendem Bonferroni-Test durchgeführt. Werte mit $p < 0,05$ wurden als statistisch signifikant betrachtet.

Mikroskopische Aufnahmen wurden mit Adobe Photoshop und Fiji erstellt, Western Blot Banden mit FUJIFILM Multi Gauge (Tokyo, Japan) und Adobe Photoshop analysiert und quantifiziert.

3 Ergebnisse

Die in der Literatur beschriebenen Analysen zur Aktivierung von GPCRs untersuchen in der Regel das Verhalten der Rezeptoren während der ersten Agoniststimulation, die ein Rezeptormolekül nach seiner Translation erfährt. Da eine erstmalige Ligandenbindung an einen zuvor Agonist-naiven Rezeptor ein insgesamt sehr seltenes Ereignis ist, sind Untersuchungen an vorstimulierten Rezeptoren von großer Bedeutung. Im folgenden werden zunächst die Befunde zur Existenz eines Rezeptorgedächtnisses bei wiederholter Stimulation des Modell-GPCRs β_2 AR sowie die *in vivo* Relevanz der SNPs im β_2 AR behandelt, um anschließend anhand dieser Resultate Parallelen und Unterschiede zum β_1 AR aufzuzeigen.

3.1 Das „Aktivierungsgedächtnis“ des β_2 AR

Der Großteil der Daten zum Aktivierungsgedächtnis des β_2 AR wurden in *Science Signaling* publiziert (199). Die Abschnitte sind jeweils mit * markiert und umfassen auch die dazugehörigen Abbildungen.

3.1.1 Generierung von β_2 AR-FRET-Sensoren (Masterarbeit) *

Die Aktivierung des β_2 AR wurde in lebenden Zellen in Echtzeit in Abhängigkeit der Polymorphismen Arg16Gly und Gln27Glu sowie der Phosphorylierung der Rezeptoren untersucht. Zur direkten Analyse der Konformationsänderungen wurden β_2 AR-FRET-Sensoren generiert, indem das gelb-fluoreszierende Protein (YFP) in die dritte intrazelluläre Schleife des Rezeptors integriert und das cyan-fluoreszierende Protein (CFP) C-terminal an den β_2 AR fusioniert wurde. Die Klonierungsstrategie der in dieser Arbeit verwendeten Sensorkonstrukte ist schematisch in Abbildung 15 dargestellt. Dabei wurde der Wildtyp- β_2 AR-Sensor im Rahmen meiner Masterarbeit am Rudolf-Virchow-Zentrum für Experimentelle Biomedizin der Universität Würzburg (200) kloniert und durch die Insertion eines flexiblen Linkers aus zehn Aminosäuren (Gly-Ser-Gly-Glu-Gly)² (201) direkt hinter der YFP-Sequenz optimiert.

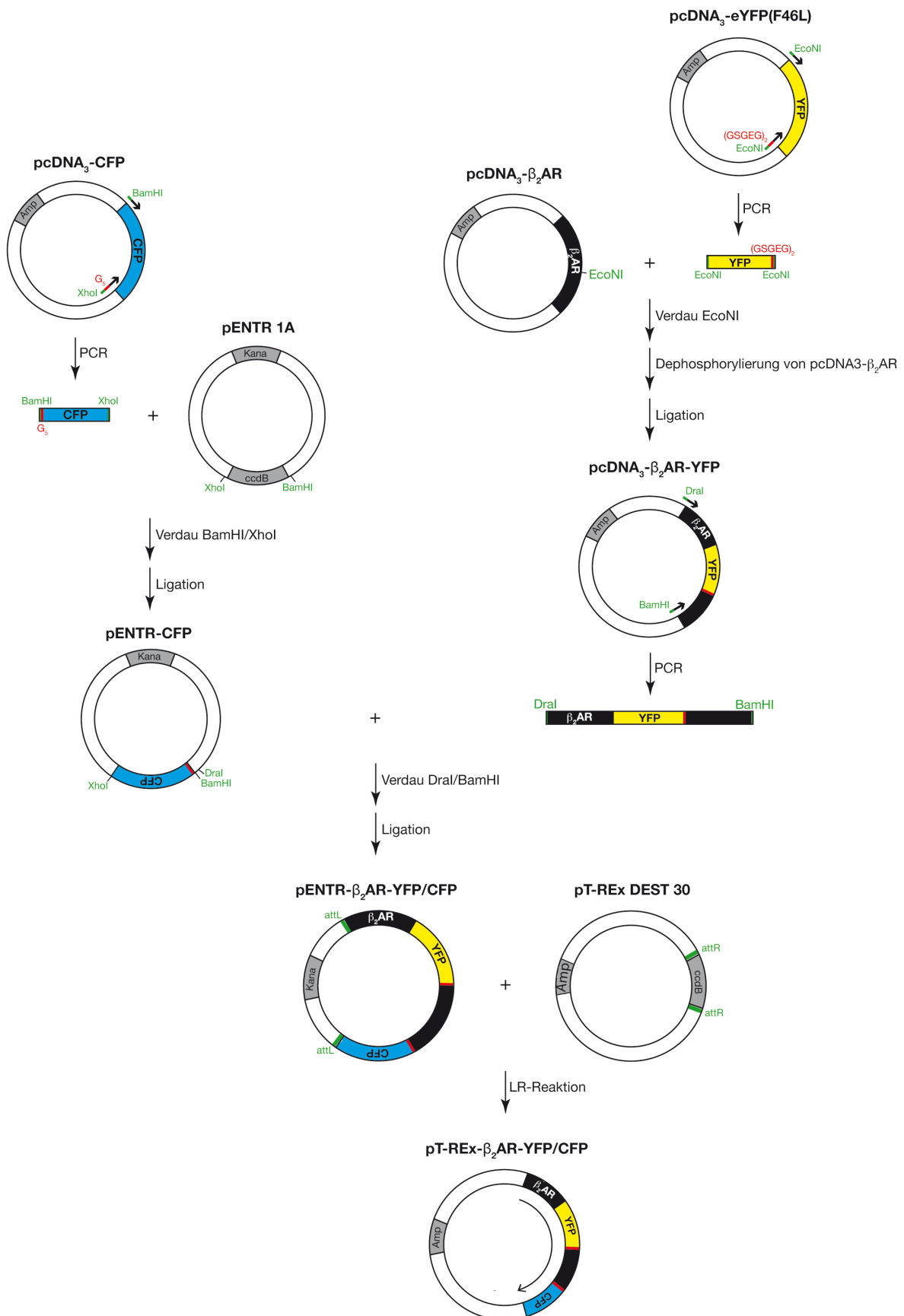


Abbildung 15. Klonierungsstrategie zur Generierung des β_2 AR-FRET-Sensors (siehe auch (200)) und des β_2 AR Δ Phos-FRET-Sensors (siehe 3.1.8).

3.1.2 Intramolekularer Energietransfer im β_2 AR-FRET-Sensor *

Die Sensorkonstrukte wurden im Folgenden in HEK293-Zellen transient oder stabil exprimiert und polyklonale HEK293-Zelllinien generiert, welche die β_2 AR-FRET-Sensoren jeweils stabil exprimierten. Die Expression des Wildtyp- β_2 AR-Sensor-Konstruktes in HEK293-Zellen resultierte in der Lokalisation des Sensors an der Zelloberfläche (Abbildung 16, A und B).

Zunächst wurde durch Photobleichen des Akzeptors YFP untersucht, ob die räumliche Lage und Orientierung der intrazellulär in das Rezeptormolekül integrierten, zu FRET befähigten Fluorophore CFP und YFP einen Energietransfer im basalen, agonistfreien Zustand erlaubt. Das Wegfallen von YFP als Akzeptor nach dem Photobleichen, das sich in einer Abnahme der YFP-Emission manifestierte, resultierte in einem Anstieg in der Emission des CFP. Die Differenz lässt auf basalen Energietransfer von CFP auf YFP schließen und damit auf räumliche Nähe der Fluorophore im unstimulierten Zustand (Abbildung 16C).

Wurde ein Agonist mittels computergesteuerter Superfusionsanlage gezielt auf eine Zelle appliziert, wie im Beispiel in Abbildung 16D Adrenalin, so kam es zu einem Abfall der YFP-Emission und einem simultanen Anstieg der CFP-Emission. Das bedeutet, dass die Stimulation des Rezeptors eine Konformationsänderung hervorruft, die die räumliche Lage der Fluorophore verändert und im Folgenden eine Abnahme des Energietransfers bewirkt. Die FRET-Ratio, berechnet aus dem Quotienten der YFP- und CFP-Emissionen, nahm ab. Die Amplitude der Änderung betrug im Mittel 4-5%.

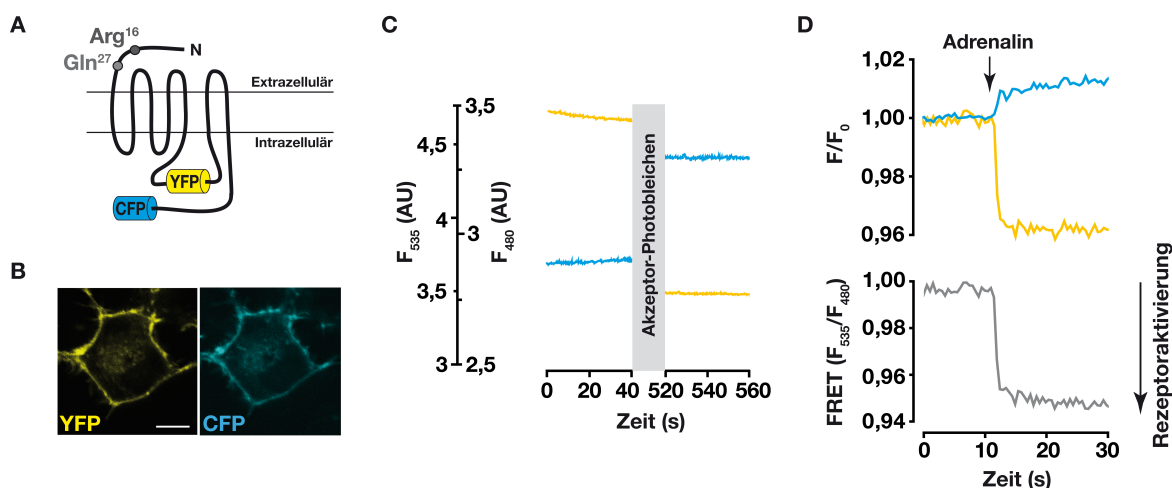


Abbildung 16. Der β_2 AR-FRET-Sensor. (A) Schematischer Aufbau des Sensors. (B) Subzelluläre Lokalisation des β_2 AR-Sensors nach Expression in HEK293-Zellen. Konfokalmikroskopische Aufnahme einer repräsentativen Einzelzelle (Maßeinheit 10 μ m). (C) Akzeptor-Photobleichen. Die Emissionsintensitäten von YFP (535 nm, gelb) und CFP (480 nm, cyan) wurden vor und nach Bleichen des Akzeptorfluorophors YFP für 8 min mit Licht der Wellenlänge 490 nm aufgenommen. (D) Aufnahme der Emissionsintensitäten von YFP (535 nm, gelb) und CFP (480 nm, cyan) sowie der FRET-Ratio F_{535}/F_{480} nach Stimulation mit Adrenalin (10 μ m, Pfeil). Die Abnahme der FRET-Ratio zeigt die Aktivierung des Rezeptors an.

Es bleibt jedoch unklar, ob es sich um einen Energietransfer von CFP auf YFP im gleichen Rezeptormolekül (intramolekulares FRET) oder um die Energieübertragung von CFP in einem Rezeptormolekül auf YFP in einem sich in räumlicher Nähe befindlichen zweiten Rezeptormolekül (intermolekulares FRET) handelt. Zwei Punkte machen letztgenannten Punkt möglich: 1. Der β_2 AR-FRET-Sensor wird an der Zellmembran überexprimiert, d.h. die räumliche Dichte der Sensoren ist hoch. 2. Eine Dimer- und Oligomerisierung des β_2 AR ist in der Literatur beschrieben (202, 203). Um den Einfluss von intermolekularem FRET auf die FRET-Ratio-Änderung des β_2 AR-FRET-Sensors zu detektieren, wurden einzelmarkierte Rezeptoren (β_2 AR-YFP und β_2 AR-CFP) in HEK293-Zellen koexprimiert. Die Insertion der Fluorophore erfolgte jeweils an exakt derselben Stelle wie im β_2 AR-FRET-Sensor. Der Vergleich der FRET-Effizienz im basalen Zustand durch Photobleichen in Abbildung 17 (A und B) lässt auf einen nur geringen Einfluss von intermolekularen Wechselwirkungen zwischen den Fluorophoren schließen: Die exemplarisch gezeigten Kurven sind im gleichen Maßstab gezeigt und demonstrieren einen deutlich geringeren Anstieg der CFP-Emission nach dem Photobleichen für die einzelmarkierten Rezeptoren und damit eine geringere FRET-Effizienz für die Dimere. Auch die Amplitude des FRET-Signals nach Stimulation mit Adrenalin zeigt nur einen geringen Einfluss von Dimerisierung (Abbildung 17C).

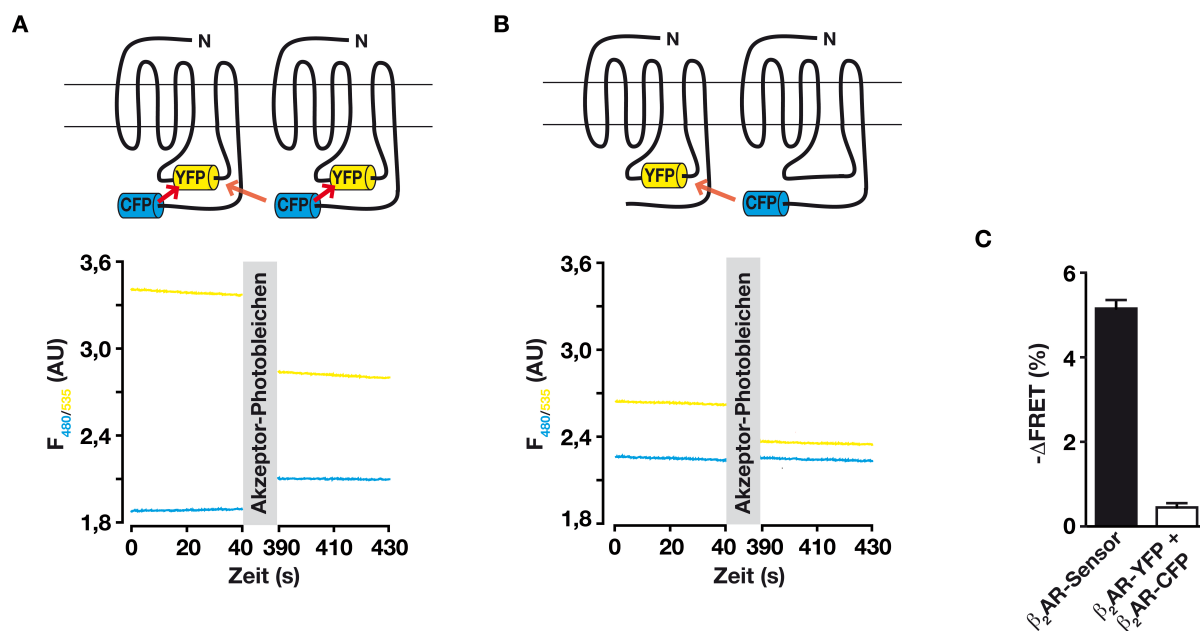


Abbildung 17. Einfluss von Rezeptordimerisierung auf das Signal des β_2 AR-FRET-Sensors. (A) Akzeptor-Photobleichen des YFP in HEK293-Zellen, die mit dem β_2 AR-FRET-Sensors transfiziert oder (B) mit den einzelmarkierten Rezeptoren β_2 AR-YFP und β_2 AR-CFP kotransfiziert wurden. Die Emissionsintensitäten von YFP (535 nm, gelb) und CFP (480 nm, cyan) wurden vor und nach Bleichen bei 490 nm aufgenommen. (C) Amplitude der FRET-Ratio nach Stimulation mit 10 μ M Adrenalin (n=5-6).

Die Änderung der FRET-Ratio nach Agonistzugabe spiegelt also hauptsächlich die Konformationsänderung in jedem einzelnen Rezeptormolekül, das auf der Zelloberfläche exprimiert ist, und damit die Aktivierung der β_2 AR-Sensoren wider. Eine wesentliche Rolle bei dieser Konformationsänderung könnte dabei auch die Interaktion des Rezeptors mit seinem G-Protein spielen, da dieses den aktiven Zustand des β_2 AR stabilisiert (56).

3.1.3 Charakterisierung des β_2 AR-FRET-Sensors *

Ob der β_2 AR-FRET-Sensor sich aber wirklich wie der native β_2 AR verhält, oder ob die beiden jeweils 27 kDa großen Fluorophore die Affinität von Agonisten bzw. die Signaltransduktion des Rezeptors beeinflussen, wurde durch eine vielseitige Charakterisierung des Sensors untersucht. Die Affinität der Agonisten Isoprenalin und Adrenalin wurde mittels Radioligandenbindung an Membranpräparationen von HEK293-Zellen, die entweder den β_2 AR-FRET-Sensor oder den nicht modifizierten β_2 AR exprimierten, analysiert und ergab keine signifikanten Unterschiede in der halbmaximalen inhibitorischen Konstante K_i (Tabelle 4).

Tabelle 4. K_i -Werte für Isoprenalin und Adrenalin. Die IC_{50} wurde jeweils durch Radioligandenbindung mit ^{125}I -Iodcyanopindolol in Membranpräparationen von HEK293-Zellen, die entweder den β_2 AR-FRET-Sensor oder nativen β_2 AR überexprimierten, ermittelt. Die Berechnung der K_i -Werte erfolgte mit der Gleichung nach Cheng und Prusoff (18).

	β_2 AR-FRET-Sensor	β_2 AR
K_i (μ M) für Isoprenalin	$2,6 \pm 0,1$ (n=3)	$2,9 \pm 0,2$ (n=6)
K_i (μ M) für Adrenalin	$5,4 \pm 0,1$ (n=3)	$5,4 \pm 0,3$ (n=3)

Die Analyse der Konzentrations-Wirkungskurve der Aktivierung des β_2 AR-FRET-Sensors mit Isoprenalin in Abbildung 18A ergibt einen Wert von 465 ± 111 nM für die halbmaximale effektive Wirkkonzentration von Isoprenalin, der dem nativen Rezeptor sehr nahe kommt (K_i [Iso] = 458 nM) (19). Die schnelle agonistinduzierte Abnahme des FRET-Signals, die die Aktivierung des Rezeptors repräsentiert, war komplett reversibel durch Zugabe des unspezifischen β -Blockers Propranolol. Der Antagonist allein beeinflusste die FRET-Ratio nicht (Abbildung 18B).

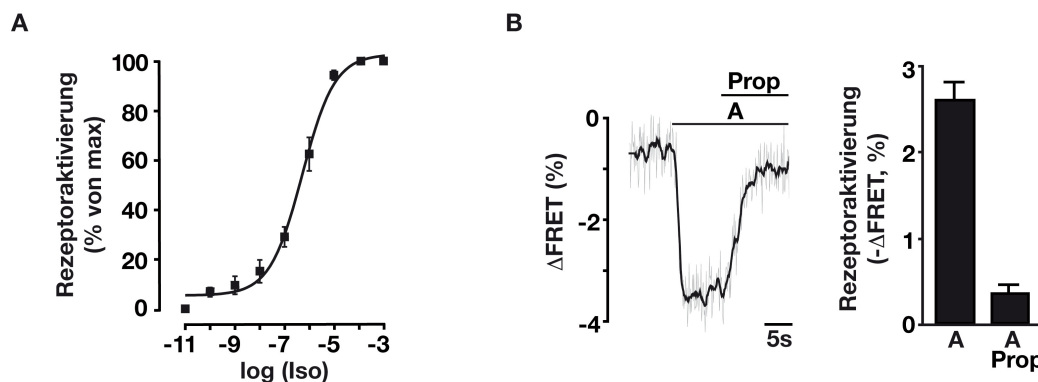


Abbildung 18. Pharmakologisches Verhalten des β_2 AR-FRET-Sensors. (A) Konzentrations-Wirkungs-Beziehung der FRET-Ratio-Änderung in Antwort auf Isoprenalin in den β_2 AR-Sensor exprimierenden HEK293-Zellen (n = 5-11 pro Konzentration). (B) Die durch Adrenalin (10 μ M) induzierte FRET-Ratio-Abnahme ist durch Zugabe von Propranolol (10 μ M) reversibel (n=5). Die Daten wurden im Rahmen der Masterarbeit erhoben (200).

Damit konnten dem β_2 AR-FRET-Sensor Ligandenbindungscharakteristika, die mit dem nativen Rezeptor vergleichbar waren, bescheinigt werden. Daneben war eine wichtige Frage, ob der Sensor im gleichen Ausmaß wie der nichtmarkierte Rezeptor in der Lage ist, intrazelluläre Signalwege zu aktivieren.

Dies wurde mit dem FRET-basierten cAMP-Sensor Epac1-camps (98) (schematische Darstellung in Abbildung 19A) gemessen. Hier wurden CHO-K1-Zellen, die endogen keine β AR exprimieren, mit Adenoviren infiziert, die den Epac1-camps-Sensor und entweder den β_2 AR-FRET-Sensor oder den nativen β_2 AR exprimierten. Die Stimulation der Signalkaskade erfolgte durch Zugabe von Isoprenalin in einer submaximalen Konzentration (1 nM) und resultierte in einem FRET-Ratio-Abfall von etwa 8% für den Sensor sowie den nativen Rezeptor (Abbildung 19B). Somit brachte die Stimulation des Sensors mit Isoprenalin einen dem nativen Rezeptor vergleichbaren Anstieg des intrazellulären cAMP-Spiegels hervor. Folgende Argumente belegen, dass das aufgezeichnete FRET-Signal spezifisch der Produktion von cAMP innerhalb der Zelle zuzuordnen ist: 1. Eine Konzentration von 1 nM ruft kaum eine detektierbare Konformationsänderung des β_2 AR-FRET-Sensors hervor (< 5% der maximalen Amplitude, siehe Konzentrations-Wirkungskurve in Abbildung 18A). 2. Die EC_{50} ist in den der Rezeptoraktivierung nachgeschalteten Signalwege hin zu niedrigeren Konzentrationen verschoben. Dies ist auf eine Rezeptorreserve zurückzuführen: Bedingt durch die Überexpression steht relativ eine große Zahl von Rezeptoren an der Zellmembran einer kleinen Zahl an intrazellulären Effektormolekülen (G-Proteinen) gegenüber und die Besetzung eines Teils der Rezeptoren, und damit eine geringere Agonistkonzentration reicht aus, um intrazellulär die maximale Wirkung zu erreichen. So genügte hier 1 nM, um eine deutliche cAMP-Produktion in der Zelle nachzuweisen. Dies deutet darauf hin, dass der

β_2 AR-FRET-Sensor effizient an endogen vorhandene G-Proteine koppeln kann und damit effizient extrazelluläre Signale ins Zellinnere vermitteln kann.

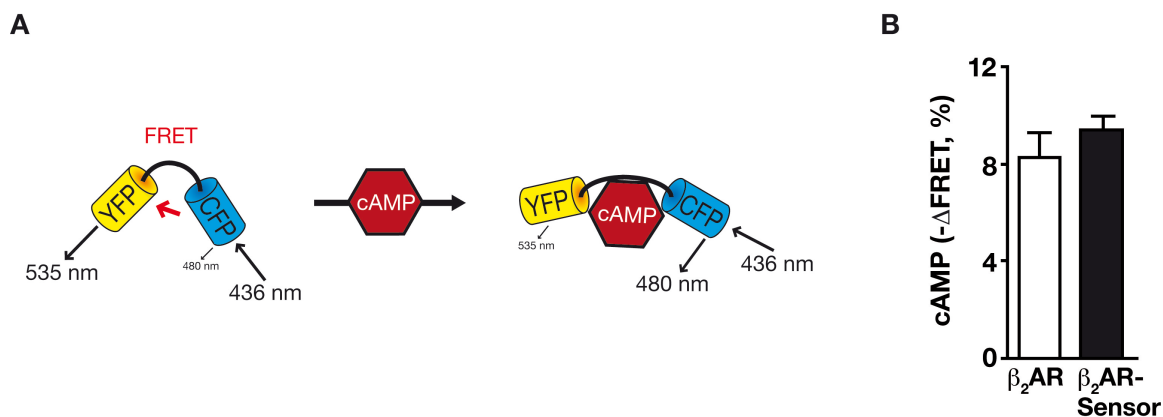


Abbildung 19. Untersuchung der Funktionalität des β_2 AR-FRET-Sensors durch Messung der cAMP-Akkumulation mit dem Epac1-camps-Sensor. (A) Prinzip des Epac1-camps-Sensors zur Visualisierung der cAMP-Akkumulation in lebenden Zellen in Echtzeit (98). (B) Vergleich der Signaltransduktionseigenschaften des β_2 AR-FRET-Sensors mit denen des nichtmarkierten β_2 AR in CHO-K1-Zellen, die mit Rezeptor-kodierenden Adenoviren sowie dem Epac-Sensor koinfiziert (MOI 100) und mit 1 nM Isoprenalin stimuliert wurden.

Ein weiteres Indiz für eine volle Funktionalität eines β_2 AR wäre seine Interaktion mit dem Scaffold-Protein β -Arrestin2 nach Agonistbindung, was ein wichtiger Bestandteil des Prozesses der Rezeptordesensibilisierung und der Interruption des Rezeptors von seinem G-Protein darstellt und die Internalisierung des Rezeptors initiiert. Um die Translokation von β -Arrestin2 zu visualisieren, wurden der β_2 AR-FRET-Sensor und β -Arrestin2-RFP in HEK293-Zellen koexprimiert und die Translokation von β -Arrestin2-RFP an die Membran nach Stimulation des β_2 AR-FRET-Sensors mit 100 μ M Adrenalin zeitabhängig untersucht. Eine Beispielzelle in Abbildung 20A zeigt, dass spezifisch nach Stimulation des β_2 AR-FRET-Sensors β -Arrestin2 an die Zellmembran transloziert, um mit dem Rezeptor zu interagieren. Auch kommt es nach Stimulation des β_2 AR-FRET-Sensors zu einer effizienten Internalisierung, was der zeitliche Verlauf der Rezeptorlokalisierung in Abbildung 20B belegt. Damit ähnelt der β_2 AR-FRET-Sensor hinsichtlich seiner pharmakologischen und funktionellen Charakteristika dem β_2 AR und eignet sich als Instrument zur Visualisierung der Rezeptoraktivierung sowie zur Analyse der Kinetik der Konformationsänderungen nach Stimulierung des Rezeptors.

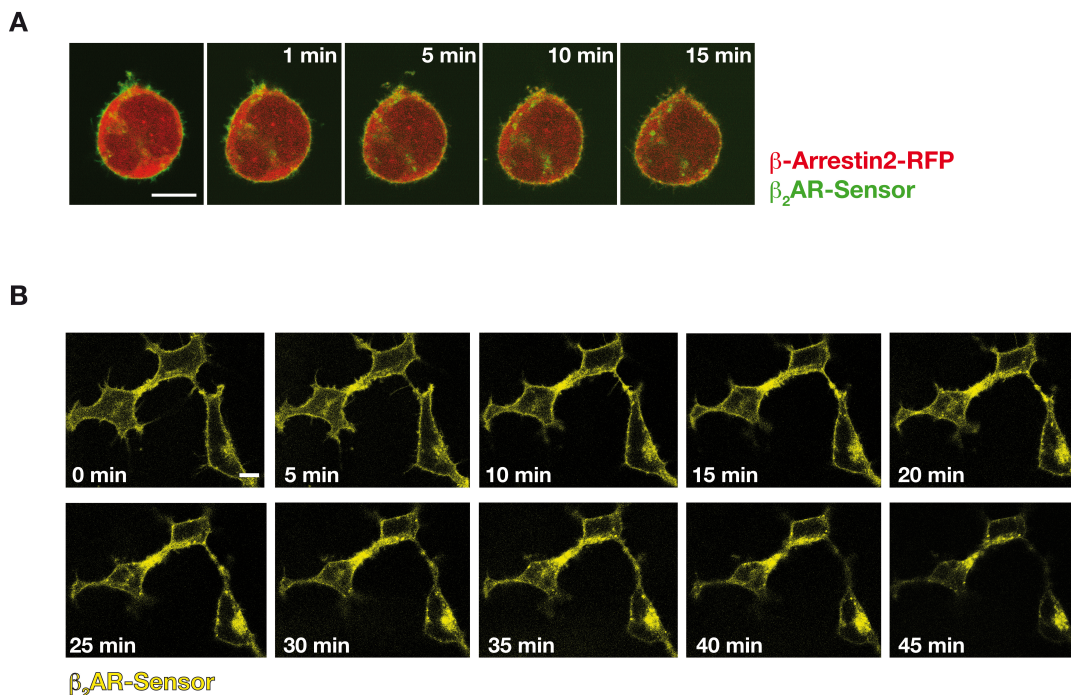


Abbildung 20. Visualisierung der Desensibilisierung des β AR-FRET-Sensors. (A) Zeitverlauf der Rekrutierung von β -Arrestin2 (rot) an die Zellmembran nach Stimulation des β AR-FRET-Sensors (grün) mit Adrenalin (100 μ M). Kolokalisierung an der Membran ist durch gelbe Farbgebung angezeigt (Olympus Konfokal FV1000, n=10, Maßeinheit: 10 μ m). (B) Zeitabhängige Internalisierung des β AR-FRET-Sensors nach Stimulation mit 100 μ M Adrenalin (Zeiss LSM510, Maßeinheit: 10 μ m).

3.1.4 Der β AR besitzt ein Gedächtnis für vorangegangene Aktivierung *

Mit der Analyse der Charakteristika der dynamischen Änderung der FRET-Ratio nach Rezeptorstimulation kann die Kinetik der Aktivierung und der Deaktivierung des β AR bestimmt werden. Die Geschwindigkeit der Konformationsänderung, die durch das FRET-Signal detektiert wurde, erfolgte im Zeitbereich von Millisekunden und erhöhte sich konzentrationsabhängig bis auf ein Maximum von etwa 70 ms für die Zeitkonstante τ (Dauer, den ein exponentiell absinkender Prozess braucht, um auf 1/e, etwa 36,8%, seines Ausgangswertes abzusinken) bei Applikation von sättigenden Agonistkonzentrationen (100 μ M - 1 mM Adrenalin). Die Deaktivierung des Rezeptors, die durch Wechsel auf Pufferlösung und damit Auswaschen des Agonisten erfolgte, führte zur Rückkehr der FRET-Ratio auf ihren Ausgangswert mit einer Zeitkonstante τ von etwa 1,5 s, und war damit deutlich langsamer als die Aktivierung des Rezeptors. Ob der Rückgang auf das Ausgangsniveau die Rückkehr des Rezeptors in seine ursprüngliche Konformation widerspiegelt oder ob der Rezeptor eine alternative Konformation einnimmt, die eine vergleichbare Distanz und Orientierung der Fluorophore für FRET hervorruft, kann nicht aufgelöst werden.

Physiologisch sind β AR stetig sich ändernden Katecholaminkonzentration ausgesetzt. Ein Rezeptor hat vermutlich unmittelbar nach seinem Einbau in die Zellmembran seine allererste Berührung mit einem Agonist. Nach diesem Kontakt ist der Rezeptor nicht mehr „agonistnaiv“, sondern er ist vorstimuliert. Ein solcher Zustand kommt vermutlich der physiologischen Realität näher als ein naiver Rezeptor. Daher wurden im Folgenden die Aktivierungseigenschaften des β_2 AR nach wiederholter Stimulation untersucht. Dabei wurden die Kinetiken der Rezeptoraktivierung und –deaktivierung sowie die Amplitude des FRET Signals unter sättigenden Agonistkonzentrationen bestimmt, um alle Rezeptoren zu besetzen. Der experimentelle Ansatz ist in Abbildung 21 an einer Originalkurve gezeigt.

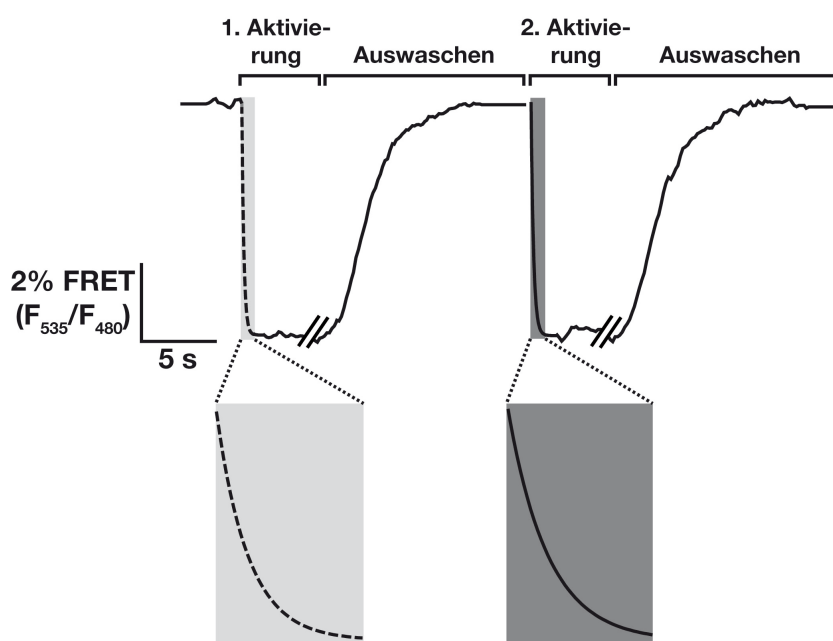


Abbildung 21. Schematische Darstellung des experimentellen Ansatzes zur Untersuchung der Aktivierungskinetiken bei wiederholter Stimulation der β AR-Sensoren.

Der Vergleich der Aktivierungsgeschwindigkeit der ersten und zweiten Aktivierung des Wildtyp- β_2 AR mit dem Genotyp Arg16 Gln27 ergab eine signifikante Verlangsamung der Aktivierungskinetik der zweiten Stimulation um 30 ms. Dieses Phänomen konnte sowohl bei einem kurzen ersten Stimulationspuls von 5 s als auch bei einer ersten Stimulation über 5 min beobachtet werden (Abbildung 22). Erfolgte eine weitere Stimulation, so blieb die verlangsamte Geschwindigkeit erhalten (Tabelle 5).

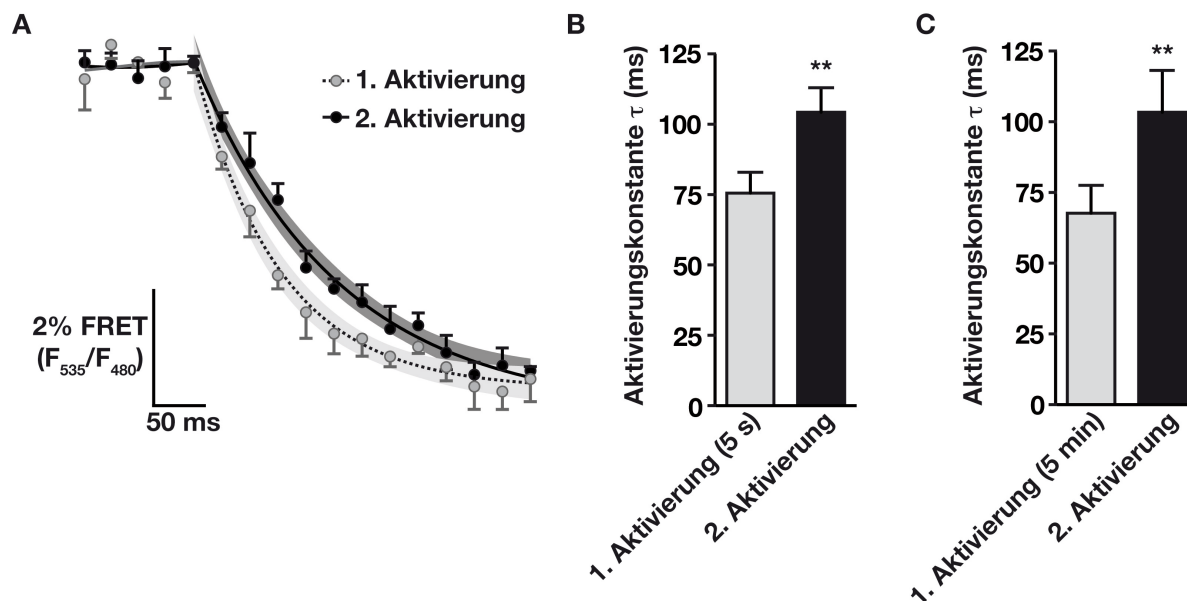


Abbildung 22. Aktivierungskinetik des β_2 AR-FRET-Sensors bei wiederholter Stimulation mit 100 μ M Adrenalin. Die Zeitkonstanten wurden durch einen monoexponentiellen Fit der Kurven der ersten (grau) und zweiten (schwarz) Aktivierung ermittelt. (A) Mittelwert + Standardfehler aus $n=5$ gemittelten Kurven der ersten (5 s) und zweiten Aktivierung. Die entsprechenden 95%-Konfidenzintervalle sind in hellgrau (erste Aktivierung) bzw. dunkelgrau (zweite Aktivierung) dargestellt. (B) und (C) Zeitkonstanten für die erste und nach kompletten Auswaschen des Agonisten folgende zweite Aktivierung bei einer ersten Aktivierung von (B) 5 s bzw. (C) 5 min ($n=7-10$), ** $p < 0,01$ (Student's t Test).

Dies deutet darauf hin, dass der Rezeptor sich an seine erste Aktivierung „erinnert“ und daraufhin mit einer Änderung der Aktivierungskinetik reagiert. Dieses Phänomen wird hier als „Aktivierungsgedächtnis“ des β_2 AR bezeichnet. Die entsprechenden Deaktivierungskinetiken sowie die Amplitude des FRET-Signals zeigten keine signifikante Veränderung zwischen erster und zweiter Stimulation (Tabelle 5).

3.1.5 Die Bedeutung des N-Terminus für Rezeptoraktivierung

Im weiteren Verlauf wurden der Einfluss der N-terminalen SNPs des β_2 AR, Arg16Gly und Gln27Glu, auf die Rezeptoraktivierung betrachtet. Durch fehlende Kristallstrukturen des Rezeptorteils kann über seine Bedeutung in der Aktivierung des Rezeptors nur spekuliert werden. Um zu untersuchen, ob der N-Terminus für die Aktivierung des β_2 AR benötigt wird, wurde diese in einem trunkierten β_2 AR-Sensor analysiert, dem die ersten 20 N-terminalen Aminosäuren fehlten. Da ein N-terminal trunkierter Rezeptor nicht mehr richtig an der Membran exprimiert wird, wählten wir einen Weg, den Rezeptor mit intaktem N-Terminus an der Oberfläche von HEK293-Zellen zu exprimieren und die 20 ersten Aminosäuren *in vivo* abzuschneiden. Dies wurde durch die Insertion einer TEV-Protease-Schnittstelle in die Sequenz des β_2 AR-Sensor realisiert. Dies resultierte in einer Insertion von sieben

Aminosäuren Glu-Asn-Leu-Tyr-Phe-Gln-Gly (Abbildung 23A). Die Protease schneidet zwischen Gln und Gly, was einen Sensor ergibt, dem die ersten 20 Aminosäuren fehlen, und an dessen Beginn ein Glycin angefügt ist.

Da die TEV-Protease spezifisch im N-Terminus von an der Zelloberfläche exprimierten β_2 AR-„TEV“-FRET-Sensoren schneidet, wurde eine stabil exprimierende HEK293-Zelllinie generiert. Dies erhöhte die Effizienz des Nachweises der Proteaseaktivität, da eine intrazelluläre Aggregation unfertig prozessierter Sensormoleküle, wie es bei transienter Transfektion unvermeidbar ist, verhindert wird. Wie die nicht-konfokalen Aufnahmen von β_2 AR-„TEV“-Sensor-HEK293-Zellen zeigen, exprimiert der Sensor mit einem um sieben Aminosäuren verlängerten N-Terminus an der Zelloberfläche (Abbildung 23D).

Zum Nachweis der Effizienz der TEV-Protease wurden mit Protease (bei variierender Konzentration und Inkubationszeit) behandelte Zellen lysiert und per Western Blot analysiert. Die Abspaltung der 20 Aminosäuren resultiert in einer Größendifferenz von 3 kDa. Durch die Abspaltung werden jedoch auch zwei Asparaginreste eliminiert, die hochglykosyliert im fertig prozessierten und modifizierten Rezeptormolekül vorliegen. Damit lässt sich die sich ergebende Differenz im Molekulargewicht zwischen geschnittenem und ungeschnittenem Sensor schwer vorhersagen. Um den Einfluss der Glykosylierung auf das Molekulargewicht des intakten β_2 AR-„TEV“-FRET-Sensors abschätzen zu können, wurde ein Verdau mit PNGase F angewandt, einem Enzym, das spezifisch N-Glykoside am Asparagin abspaltet. In den Abbildungen 23B und 23C ist das Ergebnis der TEV-Protease-Behandlung in verschiedenen Konzentrationen sowie die Verschiebung des Molekulargewichts nach Deglykosylierung zu sehen. Durch einen zusätzlichen Präzipitationsschritt des Gesamtproteins mit Ethanol kam es zu einem beträchtlichen Verlust an Proteinmenge, was aus den schwachen Banden des Sensors sowie der Ladekontrolle ersichtlich wird. Dennoch wird deutlich, dass Deglykosylierung des β_2 AR-„TEV“-FRET-Sensors eine Differenz von 15-20 kDa ausmacht. Die TEV-Protease-Behandlung bewirkte eine noch etwas größere Differenz im Molekulargewicht, was für eine Abspaltung der 20 N-terminalen Aminosäuren und damit auch den N-glykosylierten Aminosäuren 6 und 15 spricht.

Im Folgenden wurden 100 U pro 500.000 Zellen der Protease verwendet (siehe Abbildung 23B, vierte Probe von links) und zunächst die Lokalisation des Sensors nach Behandlung mit Protease untersucht. Wie Abbildung 23D zeigt, ist die Membranexpression intakt und keine Internalisierung des Sensors nach N-terminaler Trunkierung ersichtlich. Betrachtet man jedoch die Aktivierung des Sensors vor und nach Deletion des N-terminalen Teils, so wird deutlich, dass eine Konformationsänderung mittels FRET kaum noch detektiert werden kann (Abbildung 23E), was auf einen signifikanten Einfluss des N-Terminus auf

Agonistbindung und Rezeptoraktivierung schließen lässt, vorausgesetzt, die TEV-Behandlung selbst hat keinen Einfluss auf die Rezeptorkonformation.

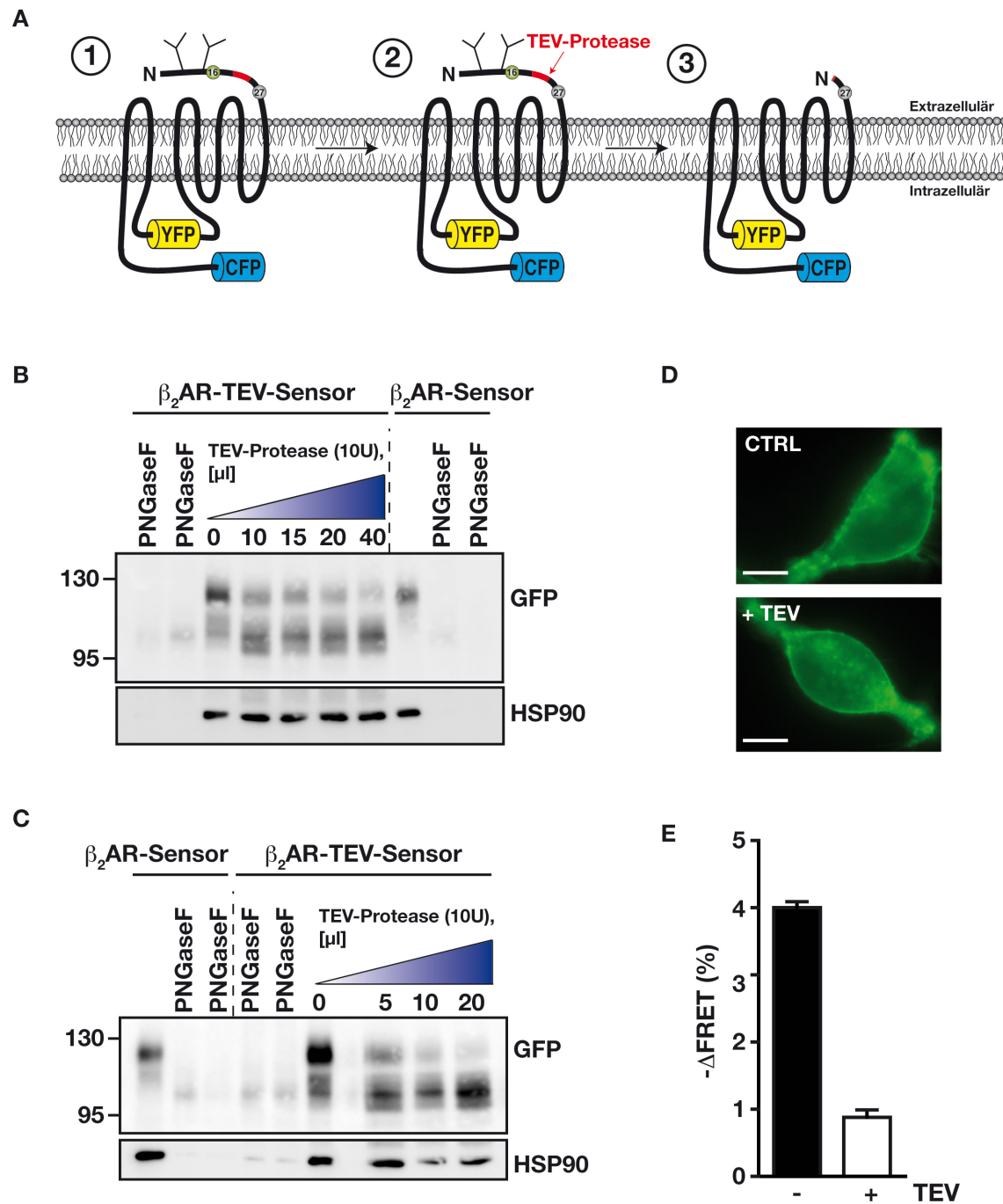


Abbildung 23. Bedeutung des N-Terminus des β_2 AR auf die Rezeptoraktivierung mittels „in vivo“-TEV-Protease-Behandlung. (A) 1) Schematische Darstellung des β_2 AR-TEV-Sensors sowie 2,3) der enzymatischen Spaltung durch die TEV-Protease. (B) und (C) Western Blot von Lysaten aus HEK293-Zellen, die den β_2 AR-Sensor oder den β_2 AR-TEV-Sensor stabil exprimieren. Die Behandlung mit TEV-Protease erfolgte für (B) 2 h oder (C) 4 h in der angegebenen Konzentration. Der Verdau mit PNGase F führte zur Deglykosylierung der Sensorproteine. HSP90 (Heat shock protein 90) diente als Ladekontrolle. (D) Lokalisation des β_2 AR-TEV-Sensors in HEK293-Zellen nach TEV-Protease-Behandlung, Aufnahme im GFP-Kanal (100 U, 2 h, 37°C). (E) FRET-Ratio-Abnahme nach Stimulation mit 100 μM Adrenalin, β_2 AR-TEV-Sensor (stabil in HEK293-Zellen exprimiert) mit und ohne TEV-Protease-Behandlung (100 U, 2 h, 37°C).

3.1.6 Die Abhängigkeit der Aktivierungskinetiken von β_2 AR-Polymorphismen *

Die Befunde des TEV-Sensors implizieren eine potentielle Bedeutung N-terminal lokalisierter Polymorphismen im β_2 AR für die Rezeptoraktivierung und damit einen etwaigen Einfluss auf die Signaltransduktion an der Synapse. Mit der Untersuchung der Aktivierungscharakteristika vorstimulierter β_2 AR mit den häufig vorkommenden polymorphen Varianten Arg16→Gly16 und Gln27→Glu27 wurde diese Hypothese im Folgenden überprüft.

Die Varianten Gly16Gln27- β_2 AR und Gly16Glu27- β_2 AR zeigten nach stabiler Expression in HEK293-Zellen eine intakte Oberflächenexpression in vergleichbarer Intensität wie der „Wildtyp“-Rezeptor Arg16Gln27- β_2 AR (Abbildung 24A). In Übereinstimmung mit bereits publizierten Untersuchungen(195) war die Affinität aller drei Varianten für den endogenen Agonisten Adrenalin in etwa gleich (n=3, gemessen an Membranpräparationen, Tabelle 5).

Tabelle 5. Vergleich der Expression, Affinität und Aktivierungscharakteristika der polymorphen Varianten der β_2 AR-Sensoren.

	Arg16 Gln27	Gly16 Gln27	Gly16 Glu27
Expressionsniveau			
YFP-Intensität (AU)	51 ± 4	53 ± 4	49 ± 4
Radioligandenbindung			
K _i (µM) für Adrenalin	5,7 ± 0,2	5,7 ± 1,6	4,3 ± 0,9
Aktivierung			
τ (ms) für die 3. Aktivierung (1. Stimulation für 5 s, siehe Abbildung 24C)	96 ± 12	66 ± 6	62 ± 9
Deaktivierung			
τ (s) der 1. Antwort	1,44 ± 0,25	1,66 ± 0,28	1,51 ± 0,30
τ (s) der 2. Antwort	1,56 ± 0,30	1,65 ± 0,20	1,45 ± 0,11
FRET-Amplitude			
-ΔFRET (%) (1. Aktivierung mit 10 µM Adrenalin)	4,55 ± 0,23	4,45 ± 0,18	4,52 ± 0,16

In einer initialen Stimulation mit Agonist unterschieden sich die Varianten weder im Ausmaß der Amplitudenänderung noch in ihren Aktivierungs- und Deaktivierungskinetiken (Abbildung 24, C und E, Tabelle 5). Wir konnten jedoch Polymorphismus-bedingte Unterschiede bei wiederholter Stimulation beobachten. Während die vorstimulierte Arg16Gln27-Variante, wie in bereits in Abbildung 22 gezeigt, langsamer aktiviert wurde, nahm die Geschwindigkeit der Rezeptorvarianten für die Gly16-Varianten bei wiederholter

Stimulation signifikant zu (Abbildung 24). Die langsamere bzw. schnellere Aktivierungskinetik blieb jeweils bei einem dritten Stimulationspuls erhalten (Tabelle 5).

Die vierte, im Menschen kaum vorkommende β_2 AR-Variante Arg16 Glu27, zeigte mit den anderen Varianten vergleichbare Kinetiken nach initialer Stimulation, jedoch keine signifikante Veränderung der Aktivierungsgeschwindigkeit nach einer zweiten Aktivierung ($\tau_1 = 78 \pm 9$ ms, $\tau_2 = 80 \pm 11$ ms, bei einer ersten Aktivierung für 5 s).

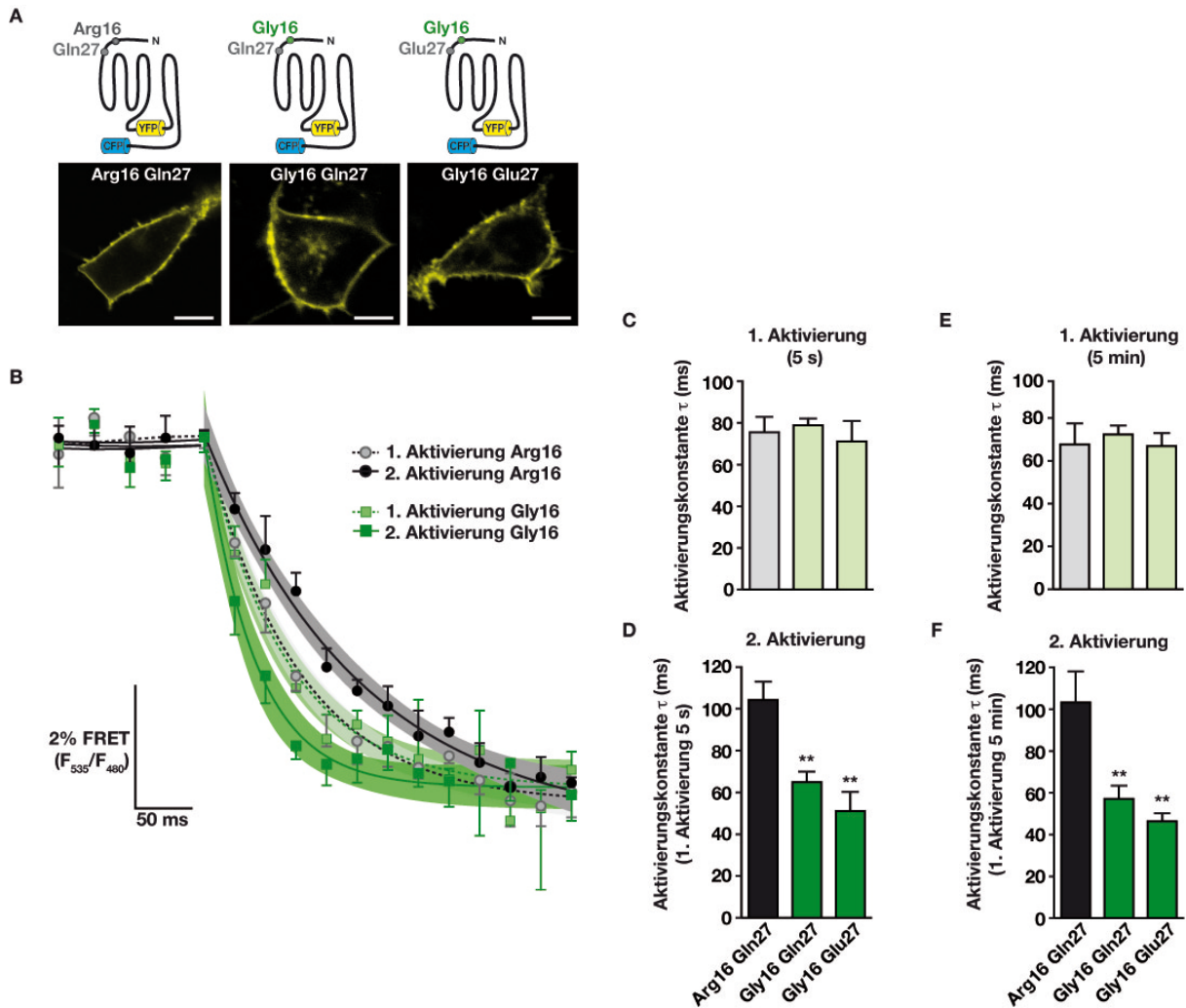


Abbildung 24. β_2 AR-Polymorphismen determinieren die Aktivierungskinetiken des Rezeptors. (A) oben - Schemata der β_2 AR-Sensoren mit den natürlich vorkommenden Kombinationen der Polymorphismen Arg16Gln27 und Gly16Gln27. unten - Subzelluläre Lokalisation der Varianten nach Expression in HEK293-Zellen (Maßinheit: 10 μ m). (B) bis (F) Repetitive Stimulation der β_2 AR-Sensorvarianten mit 100 μ M Adrenalin. (B) Mittelwert + Standardfehler aus $n=5$ monoexponentiell gemittelten Kurven der ersten (5 s) und zweiten Aktivierung (95% Konfidenzintervall, siehe Abbildung 22A). (C) Zeitkonstanten für eine erste Aktivierung für 5 s und (D) die darauffolgende zweite Aktivierung ($n=7$). (E) Zeitkonstanten für eine erste Aktivierung für 5 min und (F) die darauffolgende zweite Aktivierung ($n=7$). ** $p < 0,01$ (One-way ANOVA mit anschließendem Bonferroni Test).

Dass die gefundenen Unterschiede in der Aktivierungskinetik der polymorphen Varianten des β_2 AR tatsächlich die Situation *in vivo* reflektieren könnten, lassen die folgenden

Beobachtungen wahrscheinlich erscheinen: Zum einen sind die Polymorphismus-spezifischen Unterschiede auch detektierbar, wenn die erste Stimulation mit einer niedrigen Adrenalindosis (100 nM) erfolgt (Abbildung 25A). Zum anderen verändern sich die Kinetiken Polymorphismus-abhängig in gegensätzliche Richtungen (Arg16 schneller, Gly16 langsamer werdend), was ein Artefakt durch Bleichen oder unvollständiges Auswaschen ausschließt. Letzteres ist auch in Abbildung 30 ersichtlich: Die FRET-Ratio kehrt nach dem Auswaschen des Agonisten auf ihren Basalwert zurück. Auch Internalisierung spielt in dem für die FRET-Aufnahmen relevanten Zeitraum keine Rolle, denn konfokalmikroskopische Aufnahmen vor und nach Stimulation mit 100 μ M Adrenalin zeigen keine sichtbare Internalisierung innerhalb von 5 min (Abbildung 25B).

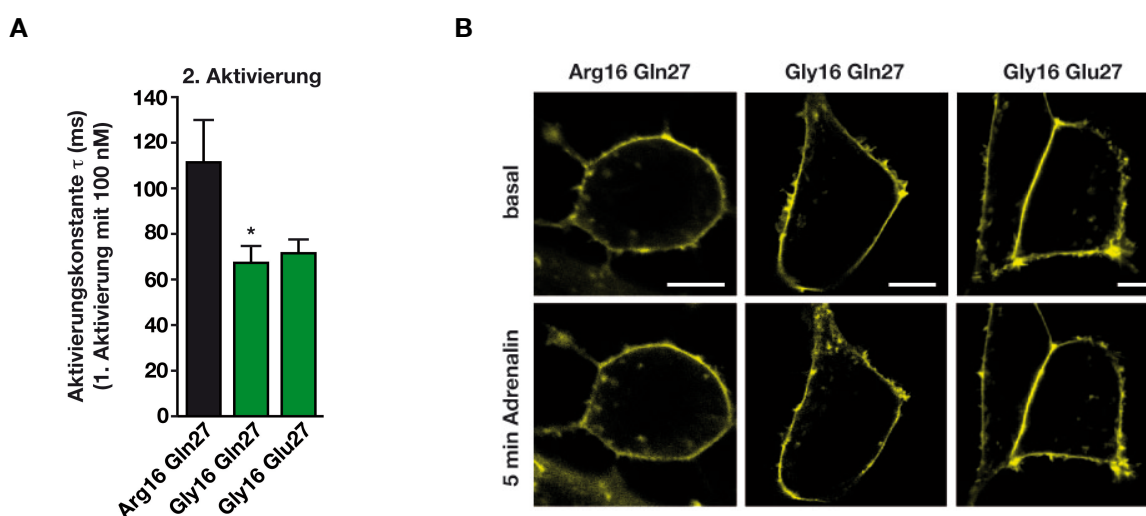


Abbildung 25. Einfluss von Agonistkonzentration und Internalisierung auf das polymorphismusspezifische Aktivierungsgedächtnis des β_2 AR. (A) 2. Aktivierung (100 μ M Adrenalin) nach einer initialen Stimulation mit 100 nM Adrenalin (n=6, One-way ANOVA, gefolgt von Bonferroni Test, * $p < 0,05$). (B) Repräsentative konfokalmikroskopische Aufnahmen von HEK293-Zellen, die die β_2 AR-Sensor-Varianten stabil exprimieren, vor und nach Stimulation mit 100 μ M Adrenalin für 5 min (n=10, Maßeinheit: 10 μ m).

3.1.7 Abhängigkeit des β_2 AR-Gedächtnisses von löslichen intrazellulären Faktoren *

Im folgenden galt es herauszufinden, welche Faktoren an der Ausbildung des Rezeptorgedächtnisses beteiligt sind.

Um den Beitrag von intrazellulären Proteinen, die nach Rezeptoraktivierung an den β_2 AR binden, zu analysieren, wurden stabil die polymorphen β_2 AR-FRET-Sensoren exprimierende HEK293-Zellen vor der ersten Stimulation bzw. nach der initialen Rezeptoraktivierung durch Adrenalinapplikation mit Saponin permeabilisiert. Dies bewirkte eine Freisetzung aller löslichen zellulären Proteine in die Lösung und ließ für die folgenden FRET-Messungen die Sensoren sowie alle in der Membran verankerten Proteine übrig, sowie an diese assoziierte Moleküle. Das Experiment ist schematisch in Abbildung 26A und 26B gezeigt.

Die Effizienz der Permeabilisierung wurde durch die schnelle Diffusion von β -Arrestin2-RFP als transfiziertem fluoreszierendem Markerprotein aus den Zellen in die umgebende Lösung sichtbar gemacht (Abbildung 26C). Erfolgte die Permeabilisierung vor der ersten Aktivierung, das heißt es waren schon bei der ersten Stimulation keine intrazellulären Faktoren mehr vorhanden, so war das Aktivierungsgedächtnis nicht mehr vorhanden. Es konnten weder Unterschiede in der Kinetik von erster und zweiter Aktivierung noch zwischen den polymorphen Varianten festgestellt werden, was auf die Notwendigkeit eines zytosolischen Faktors schließen lässt, der durch Interaktion mit dem Rezeptor eine Polymorphismus-spezifische Modifikation des Rezeptormoleküls erwirkt (Abbildung 26D).

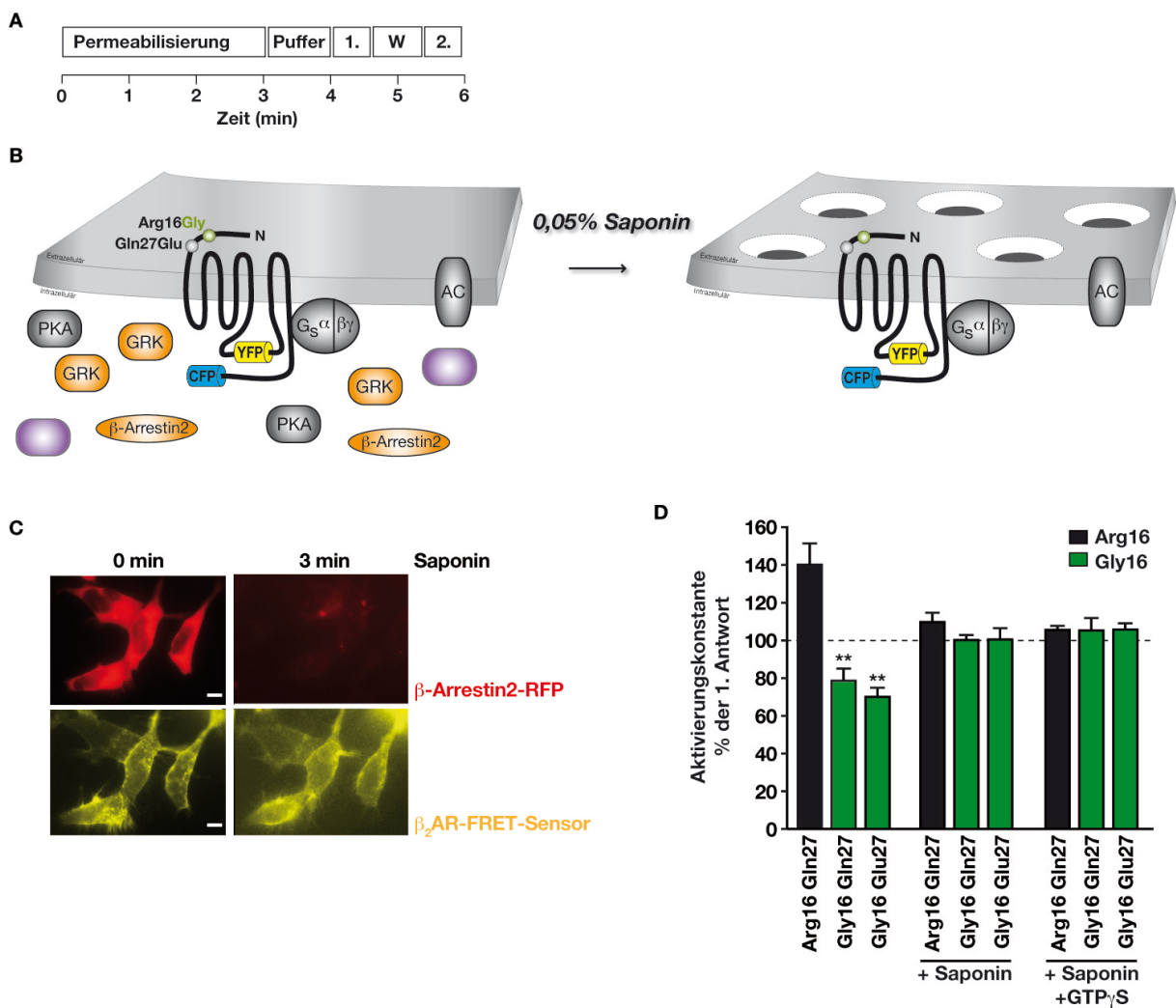


Abbildung 26. Die Unterschiede in der Aktivierungskinetik der β_2 AR sind von löslichen intrazellulären Faktoren abhängig – Permeabilisierung vor der ersten Stimulation. (A) Zeitverlauf des Experiments (1. = 1. Stimulation mit 100 μ M Adrenalin, W = Auswaschen des Agonisten, 2. = 2. Stimulation mit 100 μ M Adrenalin). (B) Schematische Darstellung des Permeabilisierungsexperiments „Permeabilisierung vor der ersten Aktivierung“. (C) HEK293-Zellen, die den β_2 AR-Sensor an der Zellmembran und β -Arrestin2-RFP im Zytosol exprimieren, vor und nach Permeabilisierung der Zellen mit 0,05% Saponin für 3 min (Maßeinheit: 10 μ m). (D) Aktivierungskinetiken der polymorphen β_2 AR-Sensoren bei Permeabilisierung der Zellen mit 0,05% Saponin für 3 min vor der ersten Stimulation. GTP γ S (100 μ M) wurde zur permanenten Aktivierung der G-Proteine zugegeben. One-way ANOVA, gefolgt von Bonferroni Test, ** $p < 0,01$.

Im Gegensatz dazu blieb das Polymorphismus-spezifische Aktivierungsgedächtnis bestehen, wenn die Rezeptoren zunächst zwei Minuten mit Adrenalin stimuliert und anschließend drei Minuten in fortwährender Gegenwart des Agonisten permeabilisiert wurden. Dies ermöglichte es intrazellulären Faktoren, an den Rezeptor zu binden, die Interaktion blieb während der Permeabilisierung bestehen. Nach Auswaschen des Agonisten konnten in der (aufgezeichneten) Aktivierung die bestehenden Unterschiede detektiert werden (Abbildung 27).

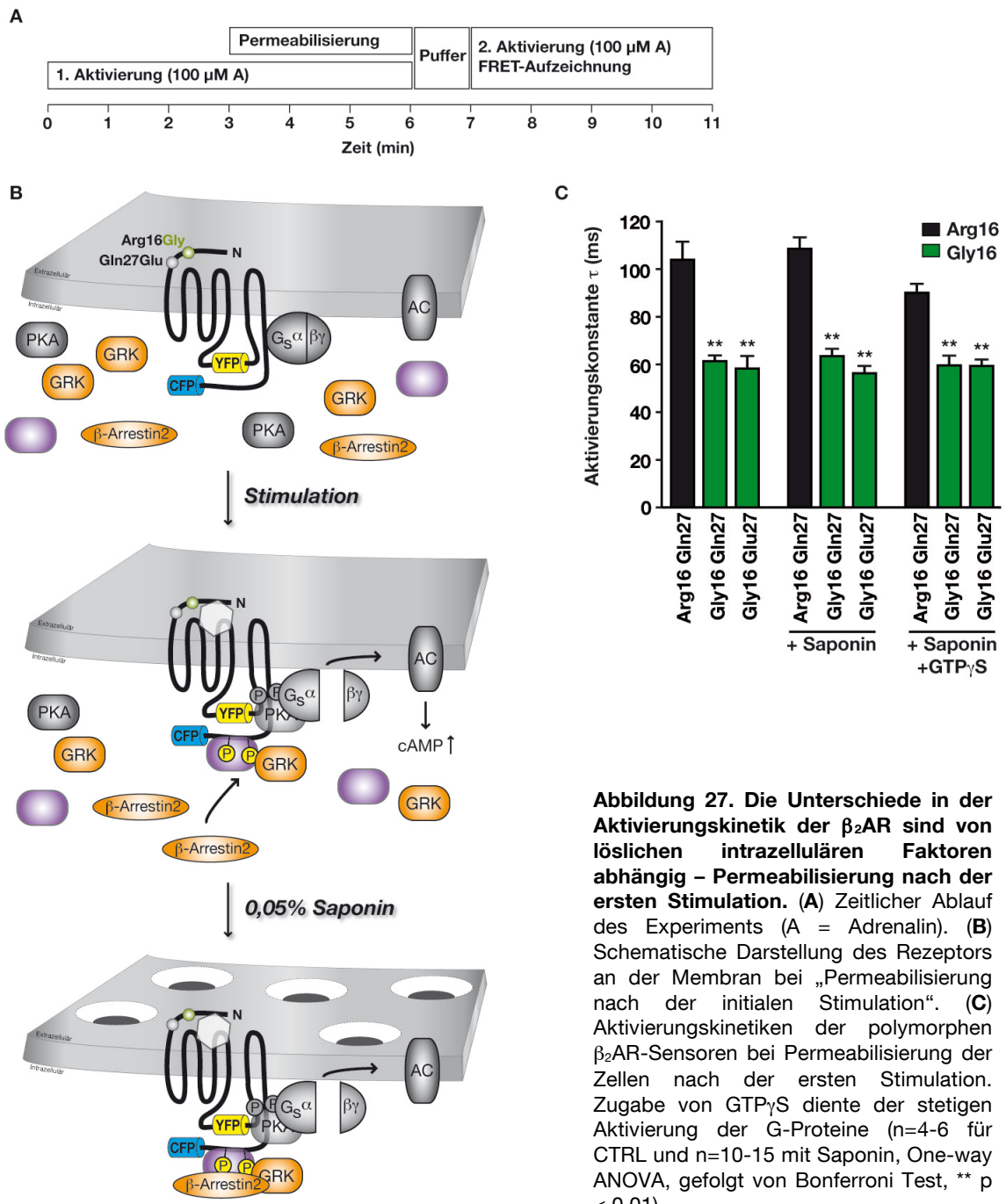


Abbildung 27. Die Unterschiede in der Aktivierungskinetik der β_2 AR sind von löslichen intrazellulären Faktoren abhängig – Permeabilisierung nach der ersten Stimulation. (A) Zeitlicher Ablauf des Experiments (A = Adrenalin). (B) Schematische Darstellung des Rezeptors an der Membran bei „Permeabilisierung nach der initialen Stimulation“. (C) Aktivierungskinetiken der polymorphen β_2 AR-Sensoren bei Permeabilisierung der Zellen nach der ersten Stimulation. Zugabe von GTP γ S diente der stetigen Aktivierung der G-Proteine (n=4-6 für CTRL und n=10-15 mit Saponin, One-way ANOVA, gefolgt von Bonferroni Test, ** p < 0,01).

Um zu untersuchen, inwieweit die einer Rezeptorstimulation nachgeschaltete Aktivierung des G-Proteins eine Rolle für das Aktivierungsgedächtnis spielen könnte, wurden die Experimente auch unter kontinuierlicher Aktivierung aller G-Proteine durch GTP γ S durchgeführt. Die Rezeptoraktivierung blieb davon unbeeinflusst.

Damit scheint die Interaktion des β_2 AR mit einem oder mehreren zytosolischen Faktoren essentiell für die Ausbildung des Rezeptorgedächtnisses zu sein. Sobald dieses ausgebildet ist, bleibt es - unabhängig von der Aktivierung von G-Proteinen - bestehen.

3.1.8 Phosphorylierungsabhängigkeit der Aktivierungskinetik des β_2 AR *

Eine gut charakterisierte Modifikation des β_2 AR nach Agonistbindung ist seine Phosphorylierung in der dritten intrazellulären Schleife und im C-Terminus und stellt damit einen möglichen dem Aktivierungsgedächtnis zugrundeliegenden Mechanismus dar. Hier spielen vor allem GRKs und die Proteinkinase A eine entscheidende Rolle. Während die Phosphorylierung durch PKA erst nach Minuten der Agoniststimulation erfolgt und deshalb nicht näher untersucht wurde, wird der Rezeptor schon nach Sekunden durch GRKs phosphoryliert (204), was zeitlich mit dem sehr schnell etablierten Aktivierungsgedächtnis des β_2 AR harmonieren würde. Außerdem ist gezeigt, dass die GRK-Phosphorylierung mindestens zwei Minuten nach Auswaschen des Agonisten bestehen bleibt (136).

Die Phosphorylierung des β_2 AR wurde mit Western Blot von HEK293-Zelllysaten bestimmt, wobei ein Antikörper verwendet wurde, der spezifisch die von GRKs phosphorylierten Aminosäurereste Ser355 und Ser356 des β_2 AR erkennt. Im basalen Zustand konnte keine Phosphorylierung der Rezeptoren detektiert werden. Abbildung 28A zeigt die stimulationsabhängige Phosphorylierung des β_2 AR an Ser355/Ser356 schon nach wenigen Sekunden. Die Gly16-Varianten wurden dabei im Vergleich zum Arg16Gln27- β_2 AR stärker phosphoryliert (Abbildung 28B). Analog wurden auch die die Gly16-Varianten tragenden β_2 AR-FRET-Sensoren an diesen Stellen im C-Terminus stärker phosphoryliert, was ein weiteres Indiz für die intakte Funktionalität der Sensoren darstellt (Abbildung 28, C und D).

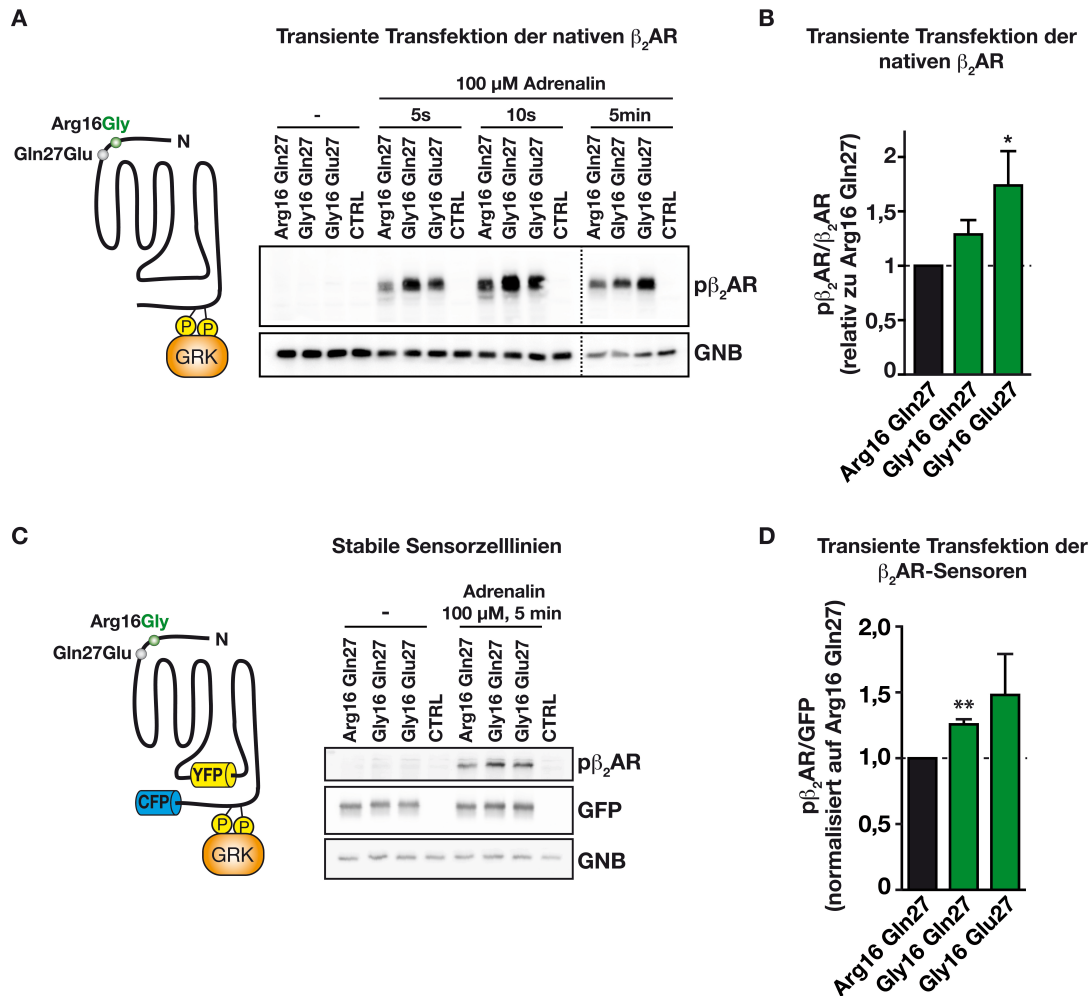


Abbildung 28. GRK-Phosphorylierung des β_2 AR und des β_2 AR-Sensors. (A) Lysate aus HEK293-Zellen transfiziert mit den polymorphen Rezeptorvarianten, Detektion der Phosphorylierung des β_2 AR nach Stimulation mit Adrenalin mit einem phosphospezifischen Antikörper gegen die von GRKs phosphorylierten Aminosäuren Ser355 und Ser356 (p β_2 AR). Die Detektion der G-Protein- β -Untereinheiten 1-4 (GNB) diente als Ladekontrolle. (B) Quantifizierung der Phosphorylierung des β_2 AR bei Stimulation mit Adrenalin für 5 min (n=5). (C) Detektion der Phosphorylierung von Ser355 und Ser356 in Lysaten aus HEK293-Zellen, die stabil die polymorphen Sensorvarianten exprimierten. (D) Quantifizierung der Phosphorylierung der β_2 AR-Sensoren bei Stimulation mit Adrenalin für 5 min in HEK293-Zelllysaten bei transienter Überexpression (n=3).

Um zu ermitteln, ob GRK-medierte Phosphorylierung des β_2 AR notwendig für das Ausbilden des Rezeptorgedächtnisses ist, wurden drei Ansätze gewählt, um die Phosphorylierung des β_2 AR zu inhibieren. Erstens wurden alle GRK-Phosphorylierungsstellen in den polymorphen β_2 AR-FRET-Sensoren mutiert (Abbildung 29A). Die resultierenden β_2 AR Δ Phos-FRET-Sensoren exprimierten wie die ursprünglichen Sensoren an der Zellmembran (Abbildung 29B). Zweitens wurde eine dominant-negative Mutante der GRK2 (dnGRK2) mit den β_2 AR-FRET-Sensoren koexprimiert und drittens ein siRNA-Cocktail gegen GRK2, GRK3, GRK5 und GRK6 in die Sensor-exprimierenden HEK293-Zellen transfiziert (Abbildung 29C).

Weder die eingeführten Mutationen im C-Terminus noch die Transfektion des Plasmids für dnGRK2 oder die siRNA-Transfektion beeinträchtigte die Kinetiken der ersten Aktivierung. Hier ergab sich kein Unterschied zwischen den polymorphen Varianten (Abbildung 29D). Das Aufheben der GRK-Phosphorylierung mit allen drei experimentellen Ansätzen hob jedoch die Unterschiede in den Kinetiken zwischen erster und zweiter Aktivierung sowie zwischen den polymorphen Varianten des β_2 AR in der zweiten Aktivierung auf, so dass die Polymorphismus-spezifische Phosphorylierung des β_2 AR einen entscheidenden Beitrag zu dessen Aktivierungsgedächtnis liefert (Abbildung 29E).

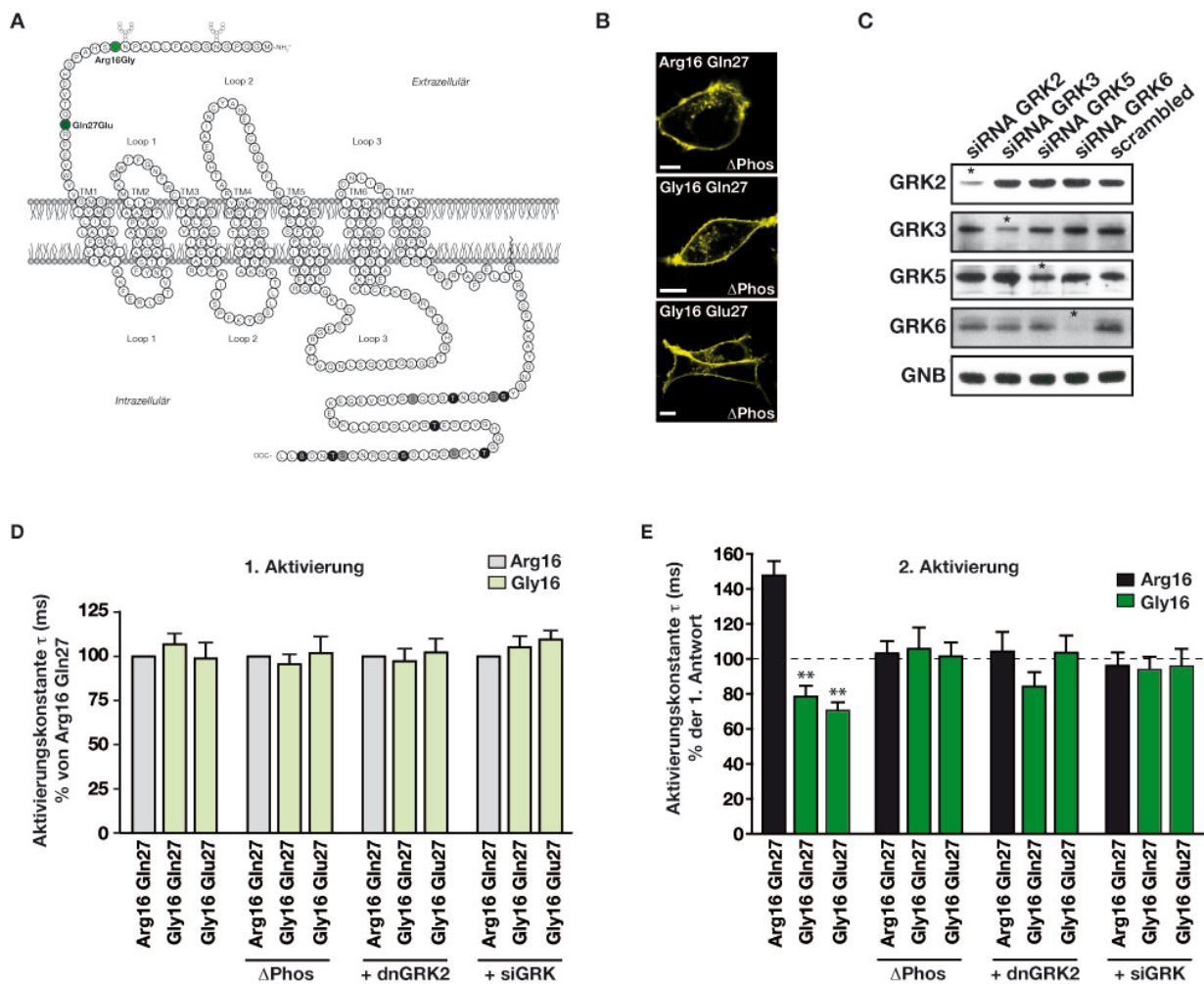


Abbildung 29. Die agonistinduzierten Änderungen der β_2 AR-Aktivierungskinetiken sind phosphorylierungsabhängig. (A) Schema des β_2 AR mit Hervorhebung der Serin- und Threoninreste, die zur Generierung von GRK-phosphorylierungsdefizienten FRET-Sensoren zu Alanin (schwarz) oder Glycin (grau) mutiert wurden. (B) Subzelluläre Lokalisation der GRK-phosphorylierungsdefizienten (Δ Phos) β_2 AR-Sensormutanten nach transientser Expression in HEK293-Zellen. Repräsentative Zellen aufgenommen mit Kofokalmikroskopie, Maßeinheit: 10 μ m. (C) Lysate von HEK293-Zellen, die mit siRNAs gegen GRK2, GRK3, GRK5 und GRK6 bzw. Scrambled-Kontrolle transfiziert wurden, wurden mit GRK-subtypspezifischen Antikörpern detektiert. GNB diente als Ladekontrolle. (D) und (E) Aktivierungskinetiken der ersten (5 min, D) und darauffolgenden zweiten (E) Stimulation mit 100 μ M Adrenalin ohne weitere Eingriffe (Werte aus Abbildung 24), für die phosphorylierungsdefizienten FRET-Sensoren (Δ Phos), bei Co-Transfektion einer dominant-negativen Form der GRK2 (dnGRK2), oder eines siRNA-Cocktails gegen GRK2, GRK3, GRK5 und GRK6 ($n=6-8$, ** $p<0,01$, One-Way ANOVA mit Bonferroni Posttest).

3.1.9 Analyse der Ligandenbindungsaffinität polymorpher β_2 AR *

Ungeklärt bleibt weiter, welche strukturelle und funktionelle Auswirkung die Interaktion des β_2 AR mit intrazellulären Proteinen und insbesondere die Phosphorylierung durch GRKs auf den Rezeptor hat. Was passiert während der ersten Aktivierungsphase, damit die Aktivierungskinetik des vorstimulierten β_2 AR sich Polymorphismus-spezifisch ändert?

Nimmt man an, dass nach Stimulation der FRET-Sensoren die Aktivierungsgeschwindigkeit die on-rate (k_{+1}) des Rezeptors darstellt und dass die Deaktivierungsgeschwindigkeit die off-rate (k_{-1}) widerspiegelt, so müsste sich die Affinität von Adrenalin in der zweiten Aktivierung ändern.

Die Amplitude der FRET-Änderung ist konzentrationsabhängig. Die halbmaximale Konzentration resultiert in einer halbmaximalen FRET-Änderung (Abbildung 18A). Die halbmaximale Konzentration für Adrenalin ist 735 nM (19). Würde sich die Affinität für den Agonisten nach Vorstimulation mit Adrenalin Polymorphismus-abhängig ändern, so müsste es in einer zweiten Aktivierung mit K_i -Konzentration zu einer Änderung der prozentualen FRET-Amplitude kommen. Eine solche Änderung konnte mit diesem Ansatz jedoch nicht festgestellt werden (Abbildung 30, Tabelle 6).

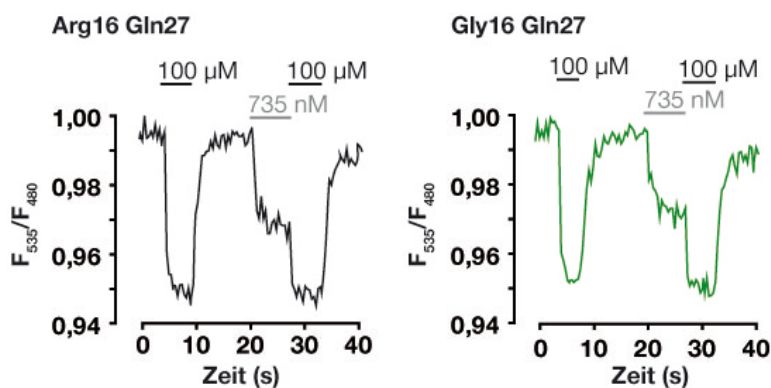


Abbildung 30. Aktivierung der polymorphen β_2 AR-Varianten bei halbmaximaler Agonistkonzentration. Beispielkurven für Arg16 (links) und Gly16 (rechts) bei repetitiver Stimulation mit Adrenalin: Einer ersten Aktivierung mit 100 μ M folgte eine zweite Aktivierung mit 735 nM (K_i -Wert für Adrenalin am β_2 AR) mit anschließender maximaler Stimulation mit 100 μ M.

Auch die Analyse der Affinität der polymorphen β_2 AR-Varianten in intakten Zellen, also mit intakter intrazellulärer Interaktion, ergab keine Änderung der Affinität. Hier können jedoch polymorphismusspezifische Desensibilisierungs- und Internalisierungsprozesse dazu führen, dass eventuelle Unterschiede nicht sichtbar werden (Tabelle 6).

Tabelle 6. Einfluss der SNPs Arg16Gly und Gln27Glu auf die Affinität der β_2 AR. FRET-Amplitude bei wiederholter Stimulation mit halbmaximaler Adrenalin-Konzentration (n=13-18) und Ergebnisse der Radioligandenbindung mit 3 H-CGP-12177 an intakten Zellen (n=3).

	Arg16 Gln27	Gly16 Gln27	Gly16 Glu27
FRET-Antwort (siehe Abbildung 30)			
$-\Delta$ FRET (%) bei 0,7 μ M (= K_D)	2,21 \pm 0,09	2,15 \pm 0,10	2,43 \pm 0,08
$-\Delta$ FRET (%) bei 100 μ M (=max.)	4,44 \pm 0,13	4,28 \pm 0,15	4,57 \pm 0,17
% K_D von max	50,1 \pm 2,1	52,1 \pm 2,7	53,6 \pm 1,3
Radioligandenbindung			
K_i (μ M) für Adrenalin	5,8 \pm 0,9	4,4 \pm 0,3	6,2 \pm 0,2

3.1.10 Auswirkungen auf intrazelluläre Signalwege *in vitro* *

Im Folgenden wurde die Relevanz einer schnelleren bzw. langsameren Aktivierung auf die Aktivierung nachgeschalteter Signalwege untersucht. Wir nahmen an, dass es physiologisch zu aufeinanderfolgenden kurzlebigen Ligand-Rezeptor-Interaktionen unter nicht-gesättigten Agonistkonzentrationen kommt. Diese Vorstellung führt zur Hypothese, dass in der Summe eine schnellere Aktivierung einen längeren aktiven Zustand der Gly16-Rezeptoren und damit potentiell eine schnellere und in der Summe stärkere Signalweiterleitung in der Zelle bewirkt.

3.1.10.1 cAMP-Produktion

Die cAMP-Produktion wurde nach Stimulation mit nicht-sättigenden Adrenalkonzentrationen gemessen (Schema Abbildung 31A). Hierfür wurden HEK293-Zelllinien verwendet, die die β_2 AR-FRET-Sensor-Varianten in vergleichbarer Menge exprimierten (bestimmt durch Radioligandenbindung mit 125 I-Cyanopindolol an Membranpräparationen: Arg16Gln27 1,33 \pm 0,11 pmol/mg, Gly16Gln27 1,31 \pm 0,20 pmol/mg, Gly16Glu27 1,29 \pm 0,17 pmol/mg, n=4 unabhängige Experimente). Die Stimulation erfolgte mit einer submaximalen Adrenalkonzentration von 100 nM für fünf Minuten, um den Zeitrahmen der Kinetikanalysen zu wahren. Sie resultierte in einer signifikant erhöhten cAMP-Produktion der Gly16-Varianten im Vergleich zum Arg16- β_2 AR (Abbildung 31B), was auf eine erhöhte Funktionalität der Gly16-Varianten schließen lässt.

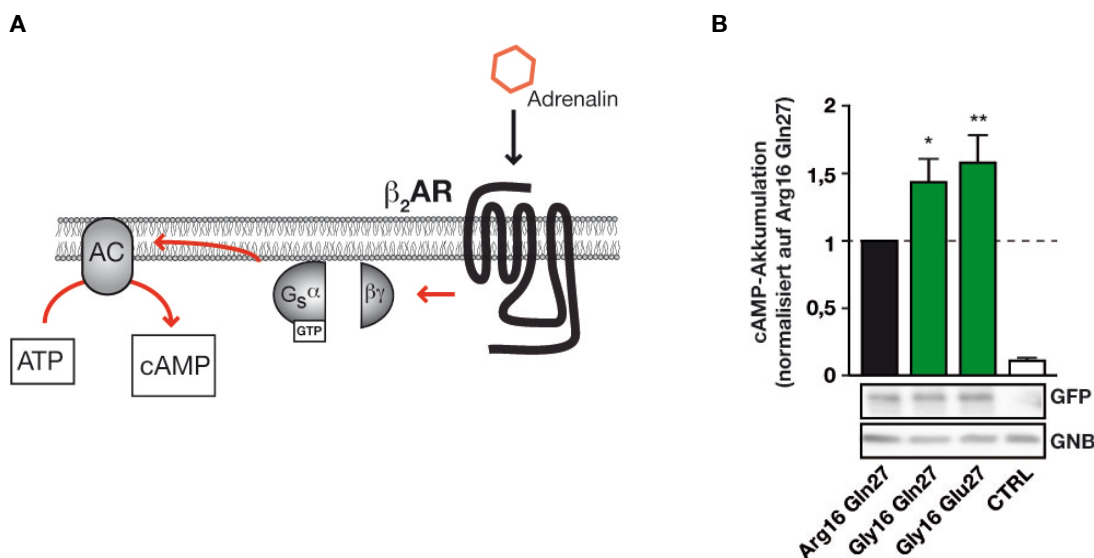


Abbildung 31. Bestimmung der cAMP-Bildung bei submaximaler Agonistkonzentration. (A) Schematische Übersicht der Signaltransduktion. (B) cAMP-Produktion in HEK293-Zellen, die die β_2 AR-Sensoren stabil in vergleichbarer Dichte exprimierten, sowie in nichttransfizierten Kontrollzellen (Stimulation mit 100 nM Adrenalin für 5 min). Die Werte sind auf Arg16Gln27 normalisiert (n=7). Zusätzlich ist ein Western Blot mit Antikörpern gegen GFP (für die Sensorexpression) und GNB (als Ladekontrolle) gezeigt. *p<0,05, **p<0,01, One-way ANOVA mit anschließendem Bonferroni Test.

3.1.10.2 Desensibilisierung durch β -Arrestin-Rekrutierung und Internalisierung

Als zweiter intrazellulärer Signaltransduktionsmechanismus wurde die Translokation von β -Arrestin2 an die Zellmembran und Bindung an den Rezeptor analysiert, die der Phosphorylierung des β_2 AR durch GRKs folgt. Da die schneller aktivierten Gly16-Varianten stärker phosphoryliert werden (Abbildung 28), könnte die Interaktion mit β -Arrestin2 polymorphismusspezifische Charakteristika zeigen. Um diese Hypothese zu testen, wurden in HEK293-Zellen β -Arrestin2-YFP und β_2 AR-CFP transient exprimiert (Abbildung 32A). Die polymorphen CFP-markierten Rezeptoren waren dabei an der Plasmamembran lokalisiert, β -Arrestin im Zytosol (Abbildung 32B, 1. und 2. Aufnahme von rechts).

Die Veränderung im intermolekularen FRET wurde nach Stimulation mit 100 μ M Adrenalin, also einer sättigenden Agonistkonzentration, gemessen. Nach der Zugabe von Adrenalin nahm die Intensität der CFP-Emission ab und die der YFP-Emission zu, was einer Zunahme des ratiometrischen FRET entspricht (Abbildung 32B). Die Aktivierung des β_2 AR resultierte in einem Anstieg des Energietransfers und damit in einer Translokation von β -Arrestin an den Rezeptor. Der Anstieg im FRET erreichte nach etwa fünf Minuten ein Maximum von 24% bei allen drei Rezeptorvarianten (Tabelle 7) und war partiell reversibel durch Auswaschen des Agonisten mit Puffer.

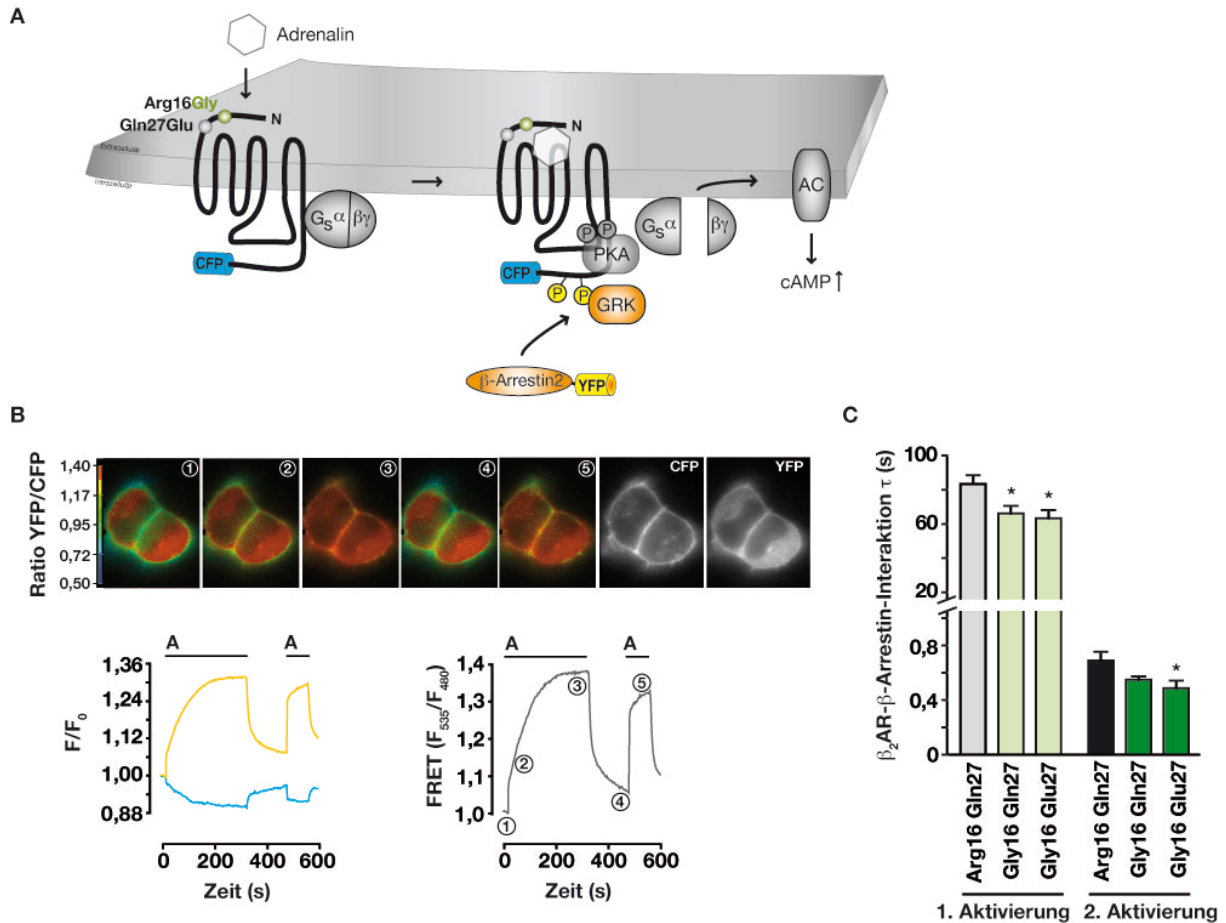


Abbildung 32. Interaktion der polymorphen β_2 AR-Varianten mit β -Arrestin2. (A) Schematische Darstellung des Versuchsaufbaus. (B) Visualisierung der Interaktion von β_2 AR-CFP mit β -Arrestin2-YFP mittels FRET-Mikroskopie nach Stimulation mit 100 μ M Adrenalin (A). (oberer Teil) Aufnahmen der FRET-Ratio (1) vor, (2) 30 s und (3) 5 min nach der initialen Stimulation des β_2 AR, (4) nach dem Auswaschen des Agonisten und (5) nach der zweiten Stimulation. Aufnahmen der Intensitäten von CFP und YFP sind zur Demonstration der Membranlokalisation von β_2 AR-CFP und der zytoplasmatischen Lokalisation von β -Arrestin2-YFP rechts gezeigt. (unterer Teil) Repräsentative Kurve für CFP-Emission, korrigierte YFP-Emission und die FRET-Ratio. (C) Zeitkonstanten für die Arrestin-Rezeptor-Interaktion an der Zellmembran abhängig vom polymorphen Status der β_2 AR für zwei aufeinanderfolgende Stimulationen mit 100 μ M Adrenalin.

Wie in Abbildung 32 zu erkennen, ist die Kinetik der β_2 AR- β -Arrestin-Interaktion biphasisch, mit einer schnellen Komponente zu Beginn und einer daran anschließenden langsameren Komponente, die Analyse zeigte keinen Unterschied im Anteil der schnellen Komponente zwischen Arg16 und Gly16, jedoch resultierte ein signifikanter Unterschied in der Zeitkonstante für die langsame Komponente. Die Gly16-Varianten des β_2 AR rekrutierten β -Arrestin2 schneller im Vergleich zum Arg16 Gln27- β_2 AR. Die FRET-Ratio kehrte nicht auf ihren Basalwert zurück, was dafür spricht, dass ein Teil der Arrestin-Moleküle an der Membran mit dem Rezeptor assoziiert bleibt. Eine zweite Stimulation führte bei allen Varianten zu einer im Vergleich zur ersten Interaktion signifikant schnelleren Assoziation von β -Arrestin, wobei auch hier die schneller aktivierten Gly16-Varianten β -Arrestin schneller rekrutierten (Abbildung 32C). Der große Unterschied in der Interaktionsgeschwindigkeit

zwischen erster und zweiter Aktivierung ist auf eine anhaltende Phosphorylierung des Rezeptors zurückzuführen (136).

Tabelle 7. Charakteristika der β_2 AR- β -Arrestin-Interaktion gemessen durch FRET zwischen β_2 AR-CFP und β -Arrestin2-YFP.

	Arg16 Gln27	Gly16 Gln27	Gly16 Glu27
FRET-Amplitude			
1. Stimulation - Δ FRET (%)	24,4 \pm 2,5	22,5 \pm 1,6	25,4 \pm 2,2
2. Stimulation - Δ FRET (%)	13,1 \pm 1,2	11,6 \pm 1,2	13,8 \pm 1,7
Deaktivierung			
1. Stimulation - τ (s)	17,1 \pm 1,3	16,2 \pm 1,7	17,4 \pm 2,1
2. Stimulation - τ (s)	7,6 \pm 0,6	8,4 \pm 0,6	9,1 \pm 1,4

Analysiert man die cAMP-Akkumulation über einen Zeitraum von 30 Minuten oder einer Stunde, eine Spanne, in der Rezeptordesensibilisierung eine wichtige Rolle spielt (136), so beobachtet man zunächst eine verringerte Menge an cAMP im Vergleich zur Messung nach fünf Minuten (75% weniger). Dies ist durch zelluläre Regulationsmechanismen zu erklären, die auf eine Dauerstimulation reagieren, wie beispielsweise der Abbau von cAMP durch Phosphodiesterasen, aber auch die Desensibilisierung und Internalisierung der Rezeptoren selbst. Vergleicht man die polymorphen Varianten des β_2 AR, so wird der Unterschied zwischen Arg16 und Gly16 geringer, vermutlich begründet in einer stärkeren Anschaltung von Desensibilisierungsprozessen bei Gly16 (Abbildung 33). Damit scheint eine verstärkte Desensibilisierung der Gly16-Varianten deren Hyperfunktionalität zumindest teilweise zu kompensieren.

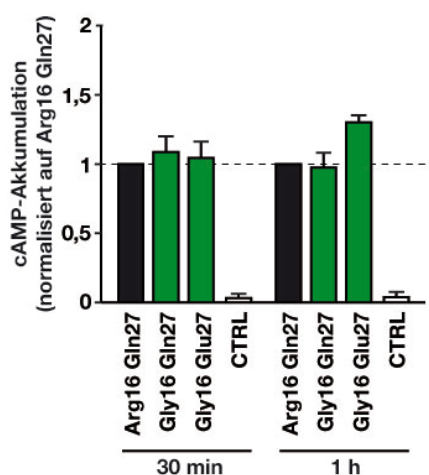


Abbildung 33. Bestimmung der cAMP-Bildung bei submaximaler Agonistkonzentration bei parallel ablaufender Rezeptordesensibilisierung. cAMP-Produktion in HEK293-Zellen, die die β_2 AR-Sensoren stabil in vergleichbarer Dichte exprimierten, sowie in nichttransfizierten Kontrollzellen (Stimulation mit 100 nM Adrenalin für 30 min oder 1 h). Die Werte sind auf Arg16Gln27 normalisiert (n=3).

Die Aktivierung von β_2 AR führt wie gezeigt zur Translokation von β -Arrestin an den Rezeptor, was letztendlich auch die Internalisierung des Rezeptors initialisiert. Für alle drei polymorphen Varianten konnte qualitativ die Internalisierung des FRET-Sensors, der stabil in HEK293-Zellen exprimiert wurde, nachgewiesen werden (Abbildung 34). Ob es auch hier Unterschiede zwischen Arg16 und Gly16-Rezeptoren gibt, genauer ob die Gly16-Varianten nach Stimulation schneller internalisiert werden, kann aus den hier qualitativ aufgenommenen konfokalen Aufnahmen nicht bestimmt werden. Ebenfalls nicht weiter analysiert wurde eine potentielle Auswirkung der Hyperfunktionalität der Gly16- β_2 AR auf die Geschwindigkeit und das Ausmaß des Recycling des Rezeptors zurück an die Zellmembran nach dessen Internalisierung.

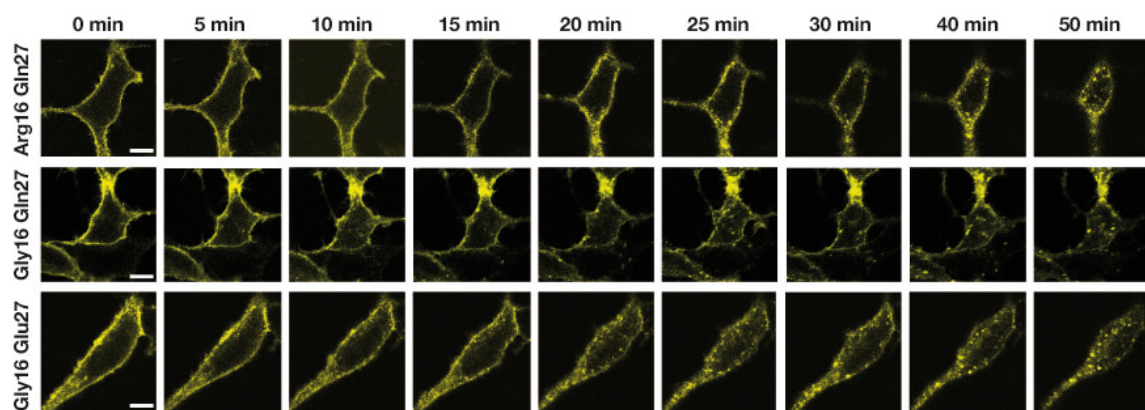


Abbildung 34. Zeitabhängige Internalisierung der polymorphen Varianten des β_2 AR-FRET-Sensors nach Stimulation mit 100 μ M Adrenalin (Maßeinheit: 10 μ m).

Zusammenfassend ergeben die *in vitro*-Analysen der Signaltransduktion nach Aktivierung der β_2 AR folgendes Bild: Vorstimulierte Gly16- β_2 AR kommen schneller in den aktiven Zustand und aktivieren nachgeschaltete Signalwege (cAMP-Produktion und β -Arrestin-Interaktion) schneller im Vergleich zum langsamer aktivierten Arg16- β_2 AR.

3.2 *In vivo* Relevanz von β_2 AR-Polymorphismen bei Tokolysebehandlung

Um eine mögliche Relevanz *in vivo* zu untersuchen, wurde der Einfluss des Arg16Gly-Polymorphismus auf die Wirksamkeit von β_2 -Agonisten bei Tokolysebehandlung anhand einer definierten Patientengruppe untersucht. Tokolytika sind in der Lage, die Geburt um zwei bis sieben Tage hinauszuschieben (Induktion der Lungenreifung, In-utero-Transfer in ein Perinatalzentrum). Zur medikamentösen Wehenhemmung wird in Deutschland bevorzugt der partielle β_2 AR-Agonist Fenoterol eingesetzt.

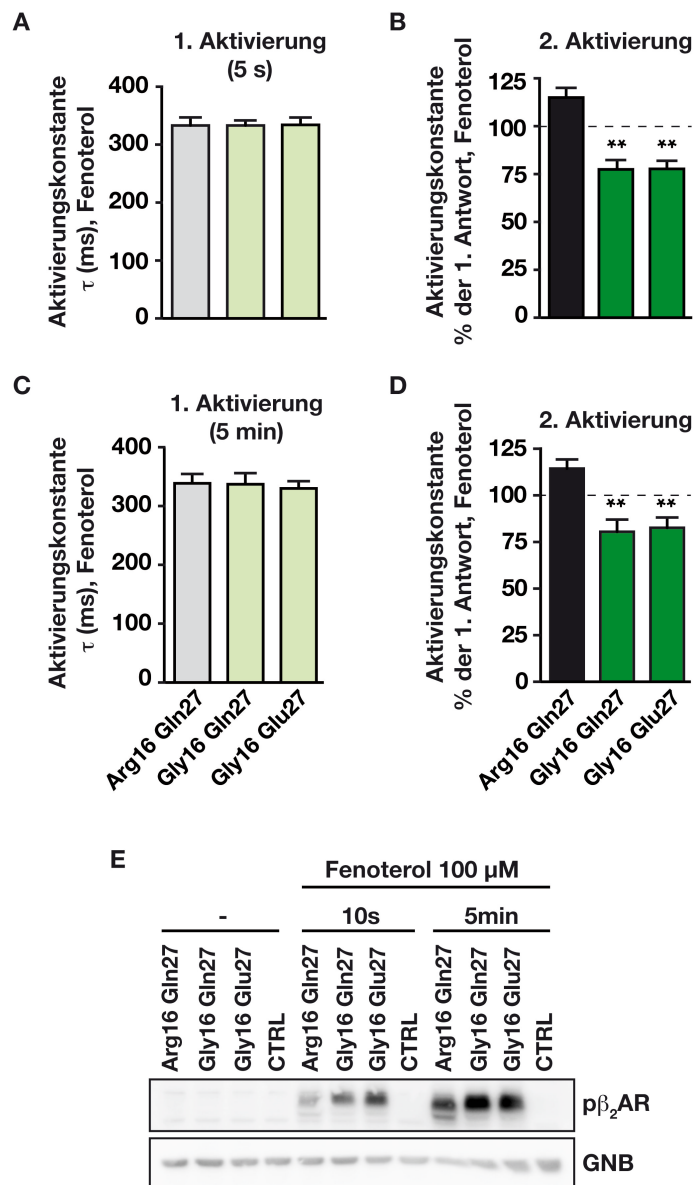


Abbildung 35. Das polymorphismusabhängige Aktivierungsgedächtnis des β_2 AR bei Stimulation mit dem Partialagonisten Fenoterol. (A) bis (D) Repetitive Stimulation der β_2 AR-Sensorvarianten mit 100 μ M Fenoterol. (A) Zeitkonstanten für eine erste Aktivierung für 5 s und (B) die darauffolgende zweiter Aktivierung (n=8-10). (C) Zeitkonstanten für eine erste Aktivierung für 5 min und (D) die darauffolgende zweiter Aktivierung (n=7). ** p<0,01. (E) Lysate aus HEK293-Zellen transfiziert mit den β_2 AR-Varianten, Detektion der Phosphorylierung des β_2 AR durch GRK an Ser355 und Ser356 (p β_2 AR). GNB diente als Ladekontrolle.

In vitro entwickelt der β_2 AR auch für Fenoterol ein Polymorphismus-spezifisches Aktivierungsgedächtnis. Als Partialagonist erreichte die Amplitude des FRET-Signals nur etwa 50% des Wertes für den vollen Agonisten Adrenalin (Daten nicht gezeigt und (72)) und die Aktivierungskinetiken waren langsamer. Darüber hinaus führte auch Stimulation der polymorphen β_2 AR-Varianten zu einer agonist- und zeitabhängigen Phosphorylierung der β_2 AR durch GRKs (Abbildung 35).

Wir analysierten im Folgenden die Wirksamkeit von Fenoterol auf die Tokolysebehandlung von Frauen mit vorzeitigen Wehen in der 24. bis 34. Schwangerschaftswoche. Ein Aufschub der Geburt um 48 h wurde als erfolgreiche Therapie gewertet.

Tabelle 8. Klinische Charakteristika der Patientinnen. Gezeigt sind Mittelwert \pm Standardfehler.

Patient	Alter (Jahre)	Schwangerschaftswoche (+ Tag)	Fenoterol (mg/min)	Dauer (h)	Genotyp		Wirkung der Tokolyse
1	39	32 + 1	2	5	Arg16	Gln27	-
2	34	33 + 0	3	4	Arg16	Gln27	-
3	32	32 + 0	1	26	Arg16	Gln27	-
4	32	31 + 3	2	40	Arg16	Gln27	-
5	30	28 + 5	1	12	Arg16	Gln27	-
6	32	33 + 0	2	24	Arg16	Gln27	-
7	38	31 + 3	3	24	ArgGly16	Gln27	-
8	25	34 + 0	2	18	ArgGly16	GlnGlu27	-
9	31	32 + 0	1	4	Gly16	GlnGlu27	-
32,6 \pm 1,4		32,0 \pm 0,5	1,89 \pm 0,26	17,4 \pm 4,1			
10	23	33 + 0	2	34	Arg16	Gln27	+
11	30	33 + 0	3	38	ArgGly16	Gln27	+
12	35	32 + 1	1	33	ArgGly16	Gln27	+
13	32	28 + 3	2	64	ArgGly16	GlnGlu27	+
14	34	26 + 5	2	96	ArgGly16	Gln27	+
15	38	29 + 3	1	72	ArgGly16	GlnGlu27	+
16	23	31 + 1	2	144	Gly16	GlnGlu27	+
17	30	28 + 1	2	72	Gly16	GlnGlu27	+
18	41	29 + 1	2	40	Gly16	GlnGlu27	+
19	33	25 + 6	1	72	Gly16	GlnGlu27	+
20	36	26 + 3	2	48	Gly16	GlnGlu27	+
21	27	26 + 0	1	72	Gly16	GlnGlu27	+
22	39	30 + 0	1	168	Gly16	Glu27	+
32,4 \pm 1,6		29,2 \pm 0,7	1,69 \pm 0,17	73,3 \pm 11,5			

Wir fanden einen signifikanten Zusammenhang zwischen dem Genotyp der Patientinnen und dem Therapieerfolg: 87,5% der Frauen, die homozygot für Gly16 waren, wurden erfolgreich mit Fenoterol behandelt, während nur bei einer von sieben Arg16-homozygoten Patientinnen die Wehentätigkeit erfolgreich unterbrochen werden konnte. Die Ergebnisse der Studie sind in Abbildung 36A und 36B sowie in Tabelle 8 dargestellt, zwei repräsentative Tokogramme (Arg16 – Wehentätigkeit bleibt trotz Fenoterolgabe bestehen, Gly16 – Wehentätigkeit ist durch Fenoterol aufgehoben) sind in 36C gezeigt. Die geringere Wirksamkeit der Tokolysetherapie in den Arg16-Patientinnen spiegelt sich in einer im Vergleich zu Gly16-Trägern signifikant verkürzten Dauer zwischen Behandlungsbeginn und Geburt wieder (Abbildung 36A).

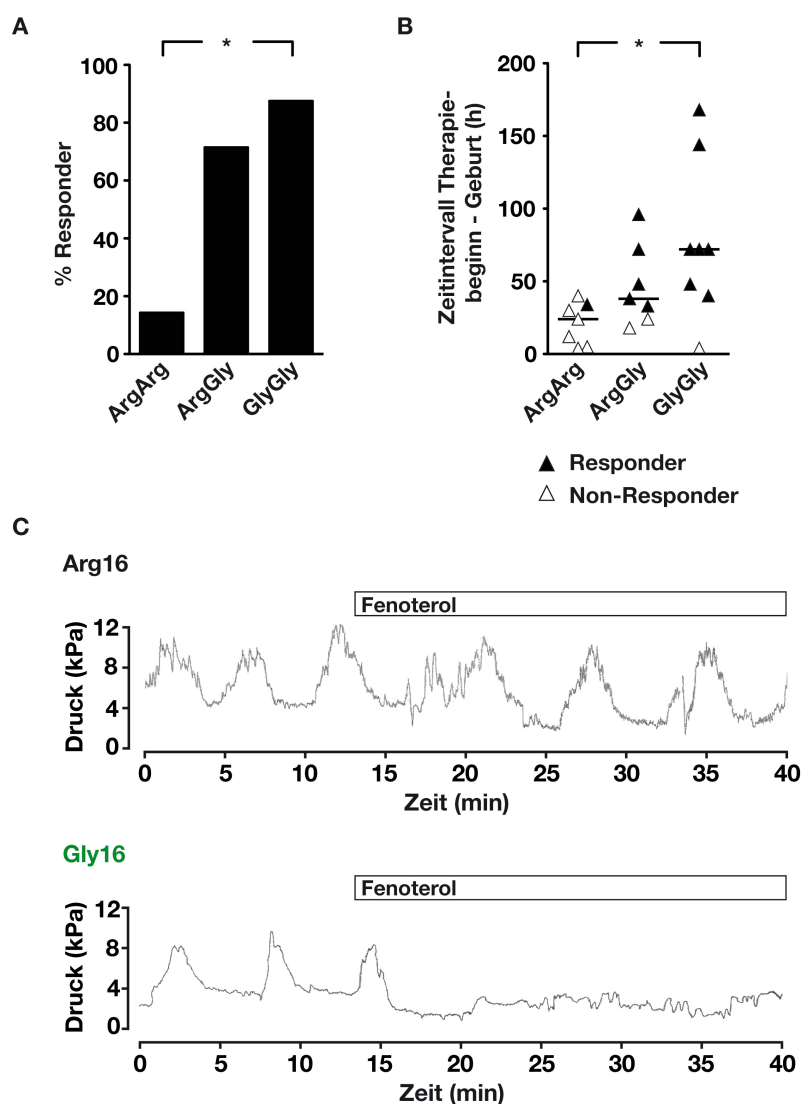


Abbildung 36. Wirksamkeit der Tokolysebehandlung mit Fenoterol in Patientinnen, die homozygot oder heterozygot für den Arg16Gly Polymorphismus waren. (A) Häufigkeit der Patienten, deren Tokolysetherapie erfolgreich war, abhängig vom Genotyp (n=7-8 Patientinnen pro Gruppe). **(B)** Zeit zwischen Therapiebeginn und Geburt als Parameter für die Behandlungseffizienz. Responder sind in schwarz dargestellt, Nonresponder in weiß. **(C)** Repräsentative Tokogramme einer Arg16- bzw. Gly16-homozygoten Patientin.

Damit konnte eine „Hypofunktionalität“ der langsamer aktivierten Arg16-Rezeptoren auch bei Langzeitstimulation (Stunden bis Tage) mit dem β_2 -Partialagonisten Fenoterol gezeigt werden. Die zugrundeliegenden zellulären Mechanismen, das Zusammenspiel von Aktivierung, Hemmung der Kontraktion und Rezeptordesensibilisierung in Abhängigkeit des Arg16Gly Polymorphismus bleibt jedoch noch zu klären.

Die beobachteten Unterschiede in der Tokolysebehandlung sind nicht auf ein unterschiedliches Expressionsniveau der Rezeptoren zwischen den Genotypen zurückzuführen (Daten nicht gezeigt). Die Verteilung der Genotypen (siehe Tabelle 8) entspricht annähernd den publizierten Werten für die Allelfrequenz von Arg16Gly und Gln27Glu in der weißen Bevölkerung (205).

3.3 Das „Aktivierungsgedächtnis“ des β_1 AR

Analog zum β_2 AR wurden auch die Charakteristika der Aktivierung des β_1 AR bei wiederholter Stimulation untersucht. Zur Stimulation wurde der endogene Ligand Noradrenalin verwendet. Dieser dient *in vivo* als Überträgerstoff an der Synapse.

3.3.1 Repetitive Stimulation des β_1 AR (Ser49 Gly389)

Hier wurde das β_1 AR-Sensorkonstrukt pT-Rex- β_1 AR(Ser49Gly389)-YFP/Cer stabil in HEK293-Zellen exprimiert. Dies führte zu einer konstanten Expression des Rezeptor-Sensors an der Zellmembran (Abbildung 37, A und B).

In früheren Arbeiten im Labor konnte bereits gezeigt werden, dass dieser Sensor die pharmakologischen und funktionellen Eigenschaften des naiven β_1 AR reflektiert (70). Zusätzlich ergab eine Analyse der Affinität in Membranpräparationen mittels Radioligandenbindung keine Unterschiede zwischen Sensor und naivem Rezeptor (Tabelle 9). Sowohl für Isoprenalin als auch für Noradrenalin konnte kein signifikanter Unterschied in der Affinität zwischen nativem Rezeptor und Sensor festgestellt werden.

Tabelle 9. K_i -Werte für Isoprenalin und Adrenalin. Die IC_{50} wurde jeweils durch Radioligandenbindung mit ^{125}I -Iodcyanopindolol in Membranpräparationen von HEK293-Zellen, die entweder den β_2 AR-FRET-Sensor oder den nativen β_2 AR überexprimierten, ermittelt. Die Berechnung der K_i -Werte erfolgte mit der Gleichung nach Cheng und Prusoff (18) (n=3).

	β_1 AR-FRET-Sensor	β_1 AR
K_i (μ M) für Isoproterenol	1,4 \pm 0,04	1,4 \pm 0,2
K_i (μ M) für Noradrenalin	4,9 \pm 0,3	4,7 \pm 0,4

Die Stimulation des β_1 AR mit Noradrenalin resultierte in einer schnellen Abnahme der FRET-Ratio von 2-3% ((70) und Tabelle 10). Die Auswertung der Aktivierungscharakteristika des β_1 AR (Ser49 Gly389) erbrachte keinen signifikanten Unterschied in der Geschwindigkeit der ersten und zweiten Aktivierung bei einer ersten Stimulation von 5 s (Abbildung 37C), jedoch eine signifikant langsamere Aktivierung nach fünfminütiger Vorstimulation ($\Delta \approx 30$ ms, Abbildung 37D). Diese äußerte sich in einem langsameren monoexponentiellen Abfall der Aktivierungskurve, was wiederum in einer langsameren, und damit größeren Aktivierungskonstante resultierte. Damit „erinnert“ sich auch der β_1 AR an eine vorangegangene Stimulation, wenn er lange genug (5 min) vorstimuliert wurde. Die

Divergenz zwischen kurzer (5 s) und fünfminütiger Vorstimulation stellt einen Unterschied zum β_2 AR dar, der schon nach 5 s sein Rezeptorgedächtnis ausgebildet hatte. Dies legt subtypspezifische Interaktionen der β AR mit intrazellulären Proteinen nahe.

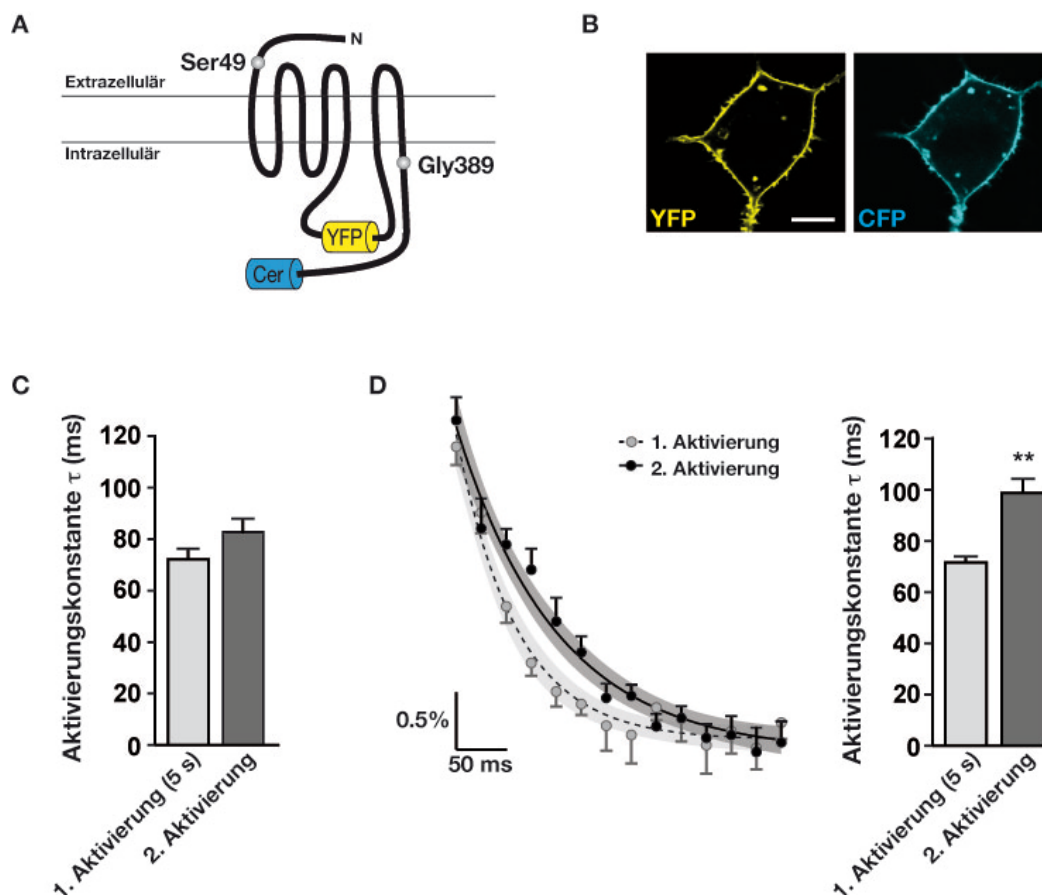


Abbildung 37. Aktivierungskinetik des β_1 AR-FRET-Sensors bei wiederholter Stimulation mit 100 μ M Noradrenalin. (A) Schematischer Aufbau des β_1 AR-Sensors. (B) Subzelluläre Lokalisation des β_1 AR-Sensors nach stabiler Expression in HEK293-Zellen. Konfokalmikroskopische Aufnahme einer repräsentativen Einzelzelle (Maßeinheit: 10 μ m). (C) Dauer der ersten Stimulation: 5 s. Zeitkonstanten für die erste und zweite Aktivierung des β_1 AR-FRET-Sensors exprimiert in HEK293-Zellen (n=14). (D) Stimulationsdauer der ersten Aktivierung: 5 min. (Links) Mittelwert + Standardfehler aus n=5 gemittelten Kurven der ersten und zweiten Aktivierung. Die entsprechenden 95%-Konfidenzintervalle sind in hellgrau (erste Aktivierung) bzw. dunkelgrau (zweite Aktivierung) dargestellt. (Rechts) Zeitkonstante für die erste und zweite Aktivierung (n=20). **p<0,01.

3.3.2 Polymorphismus-spezifische Aktivierungsgeschwindigkeit des β_2 AR

Im Folgenden wurden auch für den β_1 AR die häufigsten polymorphen Varianten betrachtet. Dabei wurde zusätzlich zum in 3.3.1 gezeigten Ser49Gly389- β_1 AR die Varianten Ser49Arg389 und Gly49Arg389 betrachtet (Abbildung 38).

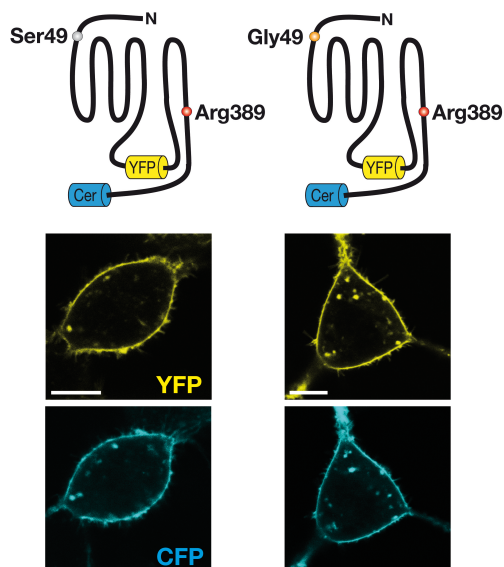


Abbildung 38. Visualisierung der β_1 AR-Sensor-Varianten Ser49Arg389 (links) und Gly49Arg389 (rechts) nach stabiler Expression in HEK293-Zellen. Die Aufnahmen der repräsentativen Einzelzellen wurden mit einem Konfokalsetup gemacht (Maßeinheit: 10 μ m).

Radioligandenbindungsexperimente an isolierten Membranen von HEK293-Zellen, die die polymorphen Varianten stabil exprimierten, zeigten keinen Unterschied in der Affinität zu Noradrenalin zwischen den polymorphen Varianten. Die Stimulation der Agonist-naiven Sensoren führte bei allen drei Varianten zu einem vergleichbaren Aktivierungsprofil, also zu keinem signifikanten Unterschied in der FRET-Amplitude, der Aktivierungs- und Deaktivierungskonstante (Tabelle 10 und Abbildung 39, B und D).

Verglichen zum bereits gezeigten Ser49Gly389- β_1 AR verhielten sich die polymorphen Varianten ähnlich im Falle einer kurzen (5 s) Vorstimulation. Hier konnte weder ein signifikanter Unterschied zwischen den polymorphen β_1 AR-Varianten, noch zwischen erster und zweiter Aktivierung festgestellt werden. Dies änderte sich jedoch bei einer ersten kontinuierlichen Stimulation über fünf Minuten. Während der Wildtyp-Rezeptor Ser49 Gly389 nach fünfminütiger Vorstimulation langsamer aktiviert wurde, konnte kein Unterschied in den Kinetiken für die Ser49Arg389-Variante festgestellt werden. Der Gly49Arg389- β_1 AR aber wurde schneller aktiviert, sodass auch für den β_1 AR ein polymorphismusspezifisches Aktivierungsgedächtnis aufgedeckt wurde, dass jedoch verglichen mit dem β_2 AR eine längere Vorstimulation benötigt, um sich auszubilden (Abbildung 39).

Weiterhin erwies sich im Gegensatz zum β_2 AR keiner der beiden SNPs dominant, so dass die Änderung der Aktivierungskinetik in divergente Richtungen durch ein Zusammenspiel beider Aminosäurepositionen bedingt ist. Die vierte, sehr selten vorkommende Variante des β_1 AR, Gly49 Gly389, verhielt sich ähnlich dem Ser49Arg389- β_1 AR und zeigte keine signifikante Änderung der Aktivierungsgeschwindigkeit nach repetitiver Stimulation ($\tau_1 = 69 \pm 6$ ms, $\tau_2 = 66 \pm 3$ ms, $n=5$, bei einer ersten Aktivierung für 5 min).

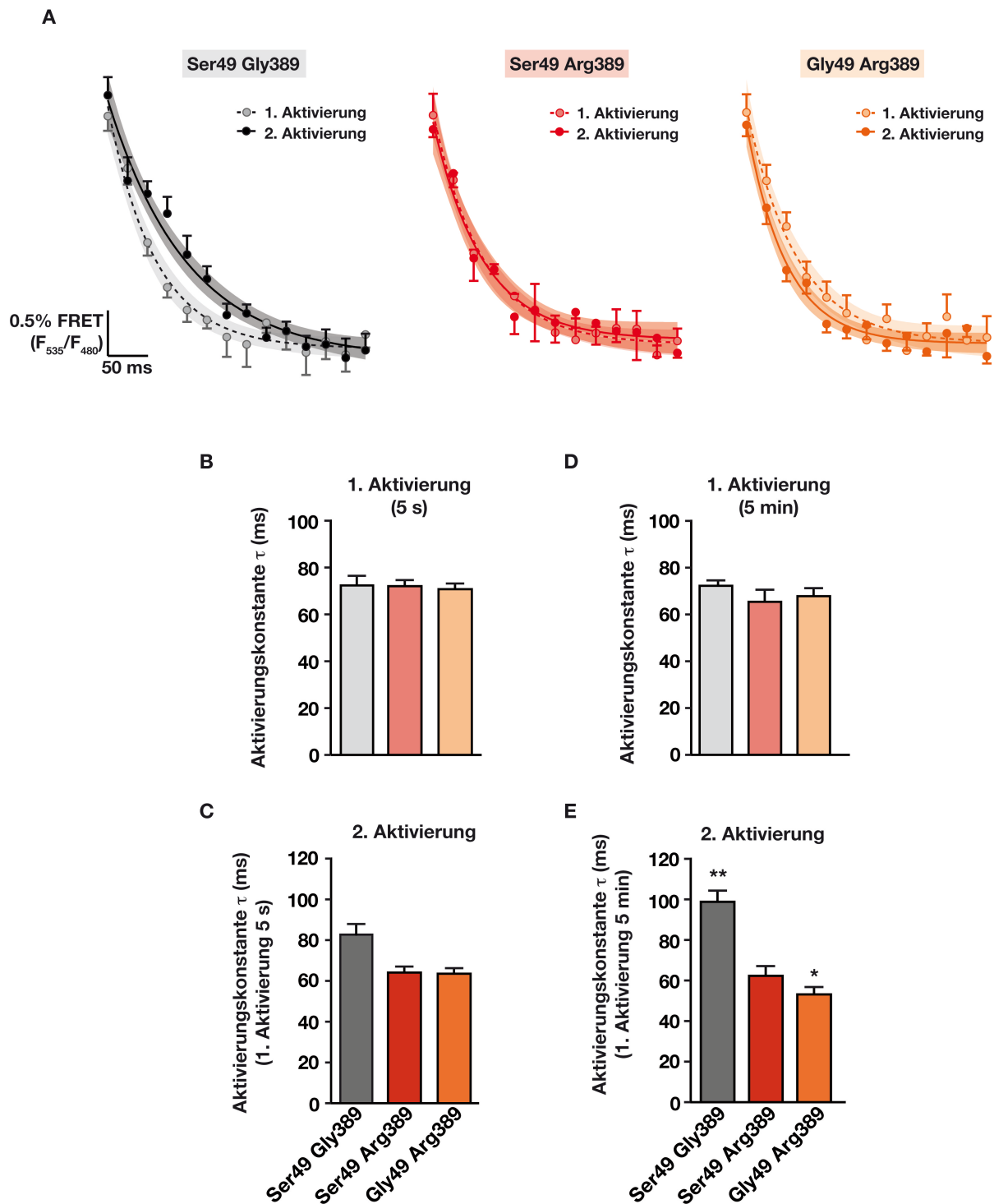


Abbildung 39. β_1 AR-Polymorphismen determinieren die Aktivierungskinetik des Rezeptors. Repetitive Stimulation der β_1 AR-Sensor-Varianten mit 100 μ M Noradrenalin. (A) Mittelwert + Standardabweichung aus $n=4-5$ monoexponentiell gemittelten Kurven der ersten (5 s) und zweiten Aktivierung für die natürlich vorkommenden Varianten Ser49 Gly389 (identisch mit Abbildung 37D), Ser49 Arg389 und Gly49 Arg389 (mit 95%-Konfidenzintervall). Zeitkonstanten für (B) die erste Aktivierung für 5 s und (C) die folgende zweite Aktivierung nach Auswaschen des Agonisten ($n=14-21$), (D) die erste Aktivierung für 5 min und (E) die entsprechend folgende zweite Aktivierung nach Auswaschen des Agonisten ($n=14-20$). Die Werte für den Ser49Gly389- β_1 AR sind zu Abbildung 37 identisch und zum Zweck der besseren Vergleichbarkeit der polymorphen Varianten erneut gezeigt.

Tabelle 10. Vergleich der Affinität und der Aktivierungscharakteristika der polymorphen Varianten der β_1 AR-Sensoren.

	Ser49 Gly389	Ser49 Arg389	Gly49 Arg389
Radioligandenbindung			
K_i (μ M) für Noradrenalin	4,3 \pm 0,3 (n=5)	4,2 \pm 0,3 (n=6)	3,4 \pm 0,5 (n=3)
Aktivierungskonstante τ (ms)			
3. Aktivierung	97 \pm 5 (n=7)	55 \pm 8 (n=2)	53 \pm 3 (n=5)
FRET-Amplitude -ΔFRET (%)			
1. Aktivierung	3,30 \pm 0,24	3,14 \pm 0,07	3,15 \pm 0,12
2. Aktivierung	2,93 \pm 0,23	2,76 \pm 0,06	2,73 \pm 0,10
Deaktivierungskonstante τ (s)			
1. Aktivierung	1,09 \pm 0,10	1,46 \pm 0,16	1,06 \pm 0,11
2. Aktivierung	1,15 \pm 0,10	1,32 \pm 0,09	1,20 \pm 0,08

In der Literatur wird der schnellere Gly49Arg389- β_1 AR als hyperfunktioneller Rezeptor benannt, da er *in vitro* eine erhöhte Aktivität der Adenylatzyklase bewirkt (177, 181). Dies wäre im Einklang mit der effizienteren Signalweiterleitung der Gly16- β_2 AR-Varianten, wurde von uns jedoch bislang noch nicht weiter untersucht.

3.3.3 Abhängigkeit des β_1 AR-Gedächtnisses von löslichen intrazellulären Faktoren

Ob die polymorphismusspezifische Änderung der Aktivierungskinetiken auch im Falle des β_1 AR von der Interaktion mit intrazellulären löslichen Faktoren abhängt, die mit dem Rezeptor bei seiner initialen Stimulation interagieren, wurde durch Permeabilisierung der Zellen mit Saponin untersucht. Genauso wie der β_2 AR-Sensor verblieb auch der β_1 AR-Sensor nach Saponinbehandlung an der Zellmembran, während das zur Visualisierung der Permeabilisierungseffizienz kotransfizierte β -Arrestin2-RFP aus dem Zytosol ins Medium freigesetzt wurde und somit intrazellulär keine rote Fluoreszenz mehr detektiert werden konnte (Abbildung 40C).

3.3.3.1 Permeabilisierung vor der initialen Stimulation

Zunächst wurde die Aktivierung des β_1 AR selbst ohne die auf eine Stimulation folgende Interaktion mit intrazellulären Proteinen aufgenommen. Dies wurde durch Permeabilisierung vor den FRET-Messungen und damit vor Agonistzugabe realisiert (schematische Darstellung in Abbildung 40, A und B). Die Analyse der zweiten Aktivierung brachte sowohl für eine

kurze Vorstimulation für 5 s wie auch für eine fünfminütige Vorstimulation keine signifikanten Änderungen zwischen der ersten und zweiten Stimulation sowie zwischen den polymorphen Varianten des β_1 AR, und damit kein Rezeptorgedächtnis (Abbildung 40, D und E). Diese Feststellung konnten wir auch schon für den β_2 AR machen.

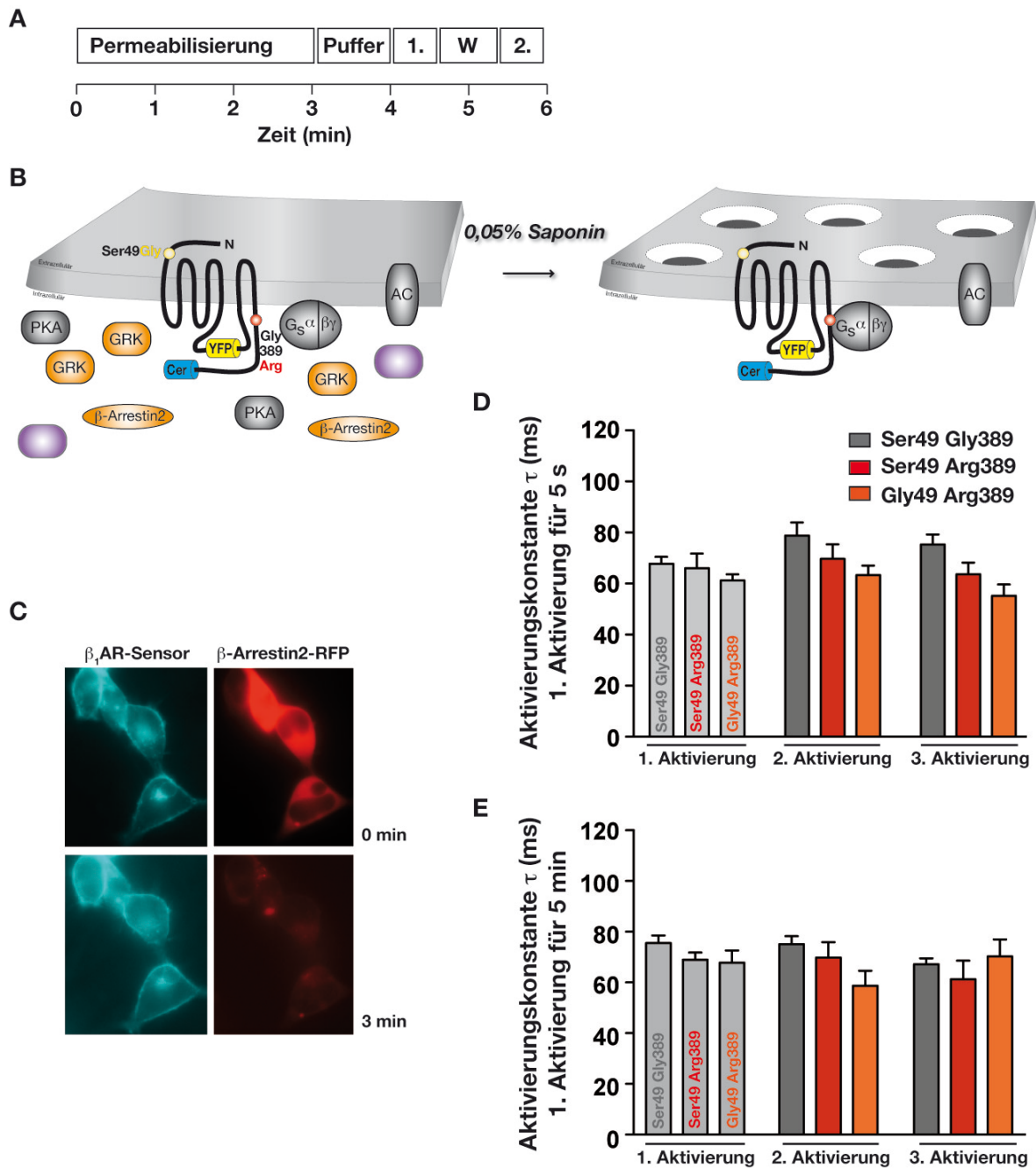


Abbildung 40. Die Unterschiede in der Aktivierungskinetik der β_1 AR nach einer initialen Stimulation von 5 s oder 5 min sind von löslichen zytosolischen Faktoren abhängig. (A) Zeitverlauf des Experiments (1. = 1. Stimulation mit 100 μ M Noradrenalin, W = Auswaschen des Agonisten, 2. = 2. Stimulation mit 100 μ M Noradrenalin). (B) Schematische Darstellung des Experiments „Permeabilisierung vor der ersten Stimulation“. (C) HEK293-Zellen, die den β_1 AR-Sensor an der Zellmembran und β -Arrestin2-RFP im Zytosol exprimieren, vor und nach 3 min Permeabilisierung mit 0,05% Saponinlösung. (D) und (E) Aktivierungskinetiken der polymorphen β_1 AR-Sensoren bei repetitiver Stimulation mit 100 μ M Noradrenalin nach Permeabilisierung mit 0,05% Saponin für 3 min. Erste Aktivierung für (D) 5 s (n=6-8) bzw. (E) 5 min (n=5-6).

3.3.3.2 Permeabilisierung nach der initialen Stimulation

Eine deutlich Diskrepanz zum β_2 AR konnte jedoch bei Saponinbehandlung von Zellen mit bereits aktivierten β_1 AR festgestellt werden. Hier wiesen die Literaturdaten für den β_2 AR klar auf eine stabile, über eine Agoniststimulation hinausreichende GRK-Phosphorylierung des Rezeptors hin (136). Die Interaktion des β_1 AR mit GRKs und weiteren zytosolischen Proteinen sowie die Phosphorylierung des Rezeptors ist dagegen kaum untersucht. Da die Aktivierungskinetiken der polymorphen β_1 AR Varianten sich erst nach einer Vorstimulation von 5 min änderten und wir darin eine langsamere intrazelluläre Modifikation und Interaktion des Rezeptors vermuteten, wurde das Permeabilisierungsprotokoll im Vergleich zum β_2 AR abgeändert: Einer Vorstimulation mit Noradrenalin für 5 min folgte eine dreiminütige Saponinbehandlung in Gegenwart des Agonisten, sodass die erste Stimulation insgesamt 8 min betrug, und nach einer daran anschließenden etwa einminütigen Auswaschphase des Agonisten die zweite Stimulation erfolgte (Abbildung 41, A und B). Parallele Kontrollexperimente ohne Permeabilisierung (entsprechend Inkubation mit Intrazellulärlösung für 8 min) sowie mit Vorstimulation für 8 min ohne Permeabilisierung der Zellen zeigten, dass das Aktivierungsgedächtnis auch unter diesen experimentellen Bedingungen polymorphismusabhängig ausgebildet war (Abbildung 41C, Säulen 1-5).

Wurden nun Zellen mit vorstimulierten, und damit mit intrazellulären Molekülen interagierenden Rezeptoren permeabilisiert, so konnten, betrachtet man die Ergebnisse für den β_2 AR, überraschenderweise keine signifikanten Unterschiede in der Aktivierung festgestellt werden (Abbildung 41C, Säulen 6-8). Dies lässt vermuten, dass die Interaktion des β_1 AR mit zytosolischen Faktoren transient ist bzw. dass eine mögliche Phosphorylierung des Rezeptors als Basis für das Gedächtnis des β_1 AR nicht für die Auswaschphase von einer Minute anhält.

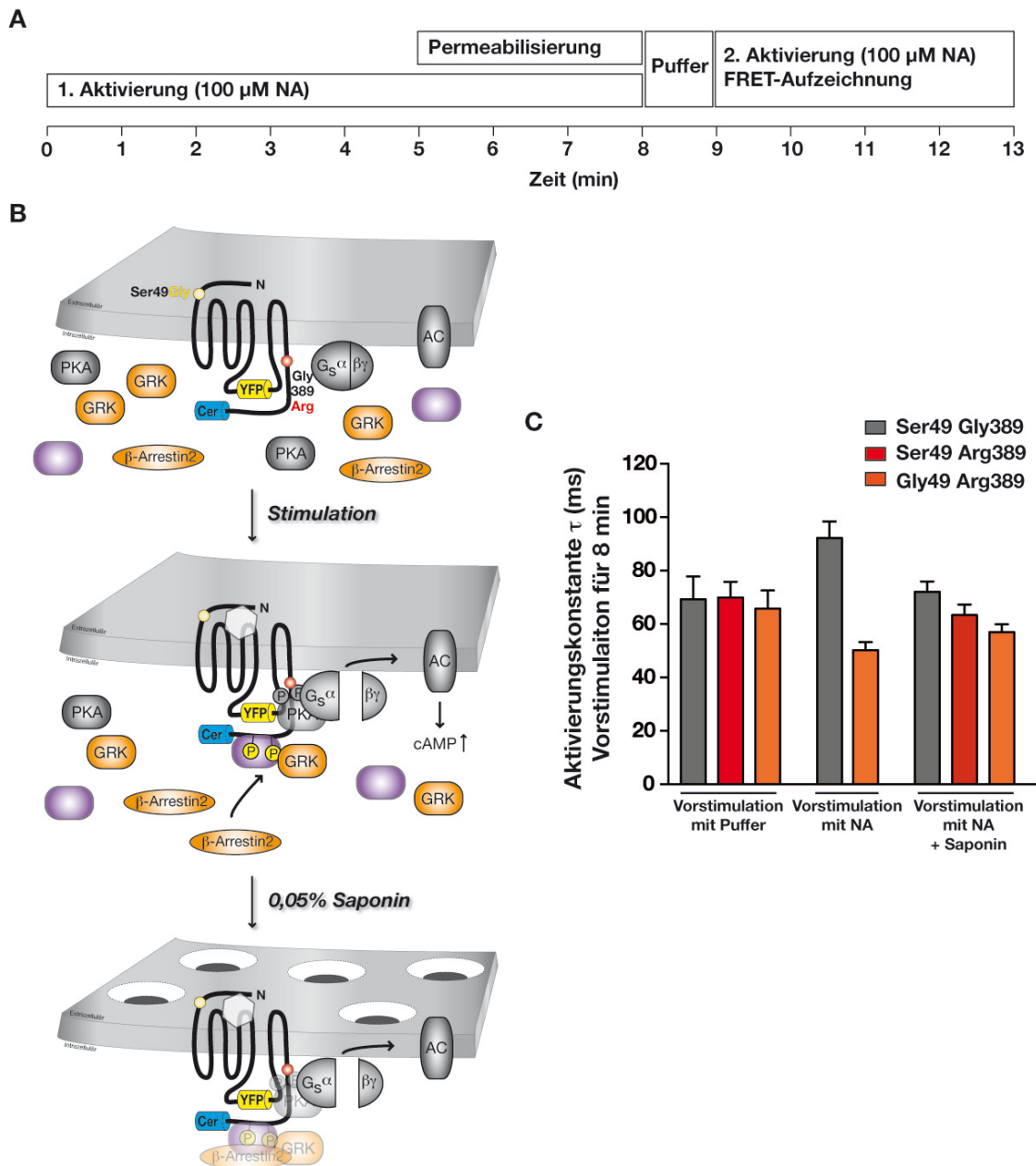


Abbildung 41. Permeabilisierung vor der initialen Stimulation. (A) Zeitverlauf des Experiments. Da sich das Aktivierungsgedächtnis des β_1 AR erst nach 5 min ausgebildet hat, erfolgte die Permeabilisierung hier erst nach 5 min, so dass die Zellen insgesamt 8 min mit Noradrenalin (NA) stimuliert wurden. **(B)** Schematische Darstellung des Experiments. **(C)** Aktivierungskinetik der polymorphen β_1 AR-Sensoren ($n=3-4$ für CTRL, $n=6-10$ für Vorstimulation, $n=8-12$ für Vorstimulation + Saponin).

3.3.4 Phosphorylierungsabhängigkeit der Aktivierungskinetiken des β_1 AR

Letztere Ergebnisse schließen Phosphorylierung des Rezeptors als möglichen Basis für sein Aktivierungsgedächtnis nicht aus, sondern postulieren eine potentiell vom β_2 AR verschiedene Ausprägung hinsichtlich Zeit und Stabilität. Die Phosphorylierung des humanen β_1 AR ist bisher nicht untersucht worden. Ein Serin in der dritten intrazellulären

Schleife und ein Serin im C-Terminus gelten als putative PKA-Phosphorylierungsstellen. Zusätzlich enthält der C-Terminus noch weitere Serine und Threonine, die durch GRKs phosphoryliert werden könnten, was aber nicht belegt ist. Daten für den Maus- β_1 AR legen nahe, dass GRK-Phosphorylierung auch am β_1 AR auftritt (206).

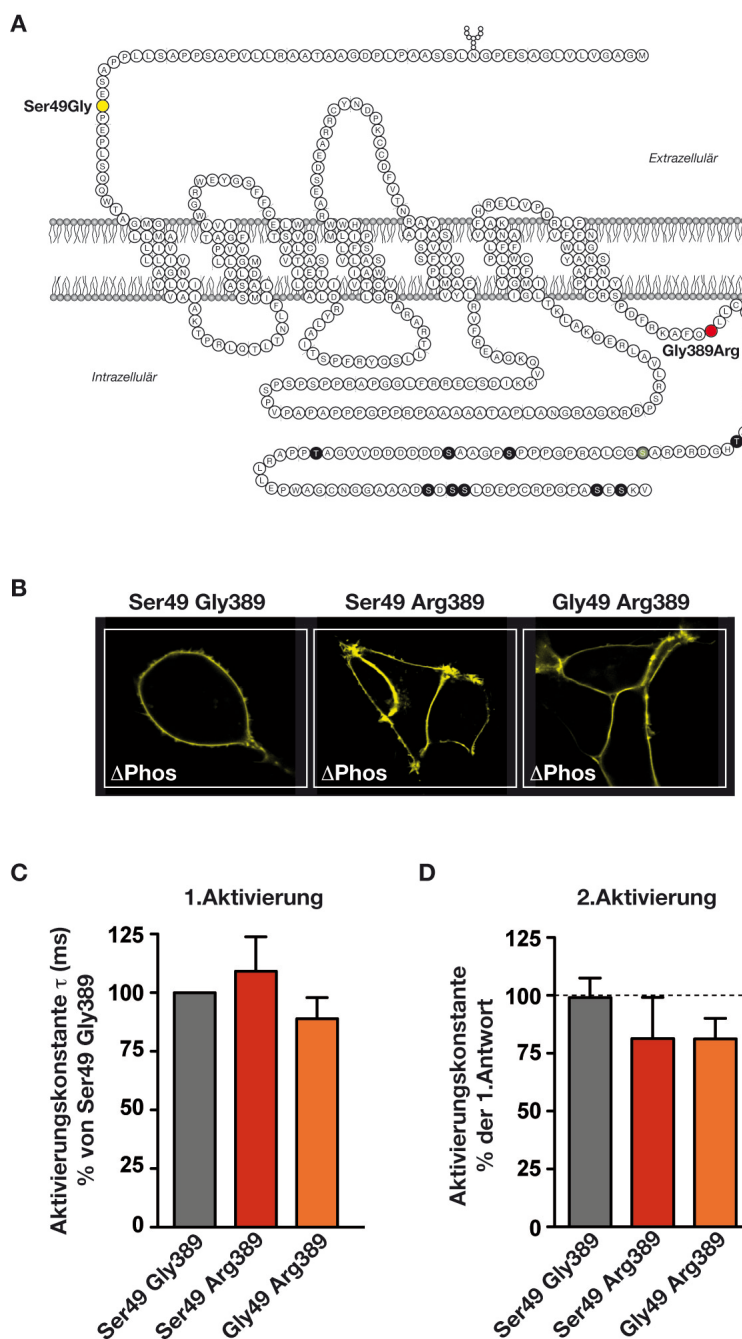


Abbildung 42. Das Aktivierungsgedächtnis des β_1 AR ist phosphorylierungsabhängig. (A) Schema des β_1 AR mit den polymorphen Stellen sowie der C-terminalen Serine und Threonine, die in der Δ Phos- β_1 AR-Mutante zu Alanin mutiert wurden. (B) Subzelluläre Lokalisation der β_1 AR Δ Phos-FRET-Sensoren nach transienter Expression in HEK293-Zellen (konfokalmikroskopische Aufnahmen). (C) Aktivierung für die erste Stimulation mit 100 μ M Noradrenalin (5 min) sowie (D) die entsprechende zweite Aktivierung (n=4-6).

Um den Einfluss C-terminaler Phosphorylierung des β_1 AR zu testen, wurden Mutanten der polymorphen Varianten der FRET-Sensoren generiert, deren Serine und Threonine durch Alanin ersetzt wurden (Abbildung 42A). Dabei wurde auch die PKA-Stelle im C-Terminus mutiert. Die Expression der Δ Phos-Mutanten der β_1 AR-Sensoren in HEK293-Zellen war nicht beeinträchtigt (Abbildung 42B). Die Analyse der Rezeptoraktivierung brachte ein Verschwinden der Polymorphismus-bedingten Unterschiede der vorstimulierten Rezeptoren (Abbildung 42, C und D), und deutet somit auf einen entscheidenden Einfluss der Rezeptorphosphorylierung für das Aktivierungsgedächtnis des β_1 AR hin.

3.3.5 Analyse der Ligandenbindungsaffinität polymorpher β_1 AR

Die SNP-spezifische Ausbildung des Aktivierungsgedächtnisses des β_1 AR hängt somit, analog zum β_2 AR, von der Interaktion des Rezeptors mit löslichen zytosolischen Faktoren ab, wobei auch die Phosphorylierung des β_1 AR durch PKA und/oder GRKs eine entscheidende Rolle zu spielen scheint. Um einen Einfluss der Rezeptorphosphorylierung sowie der Interaktion mit zytosolischen Faktoren auf die Affinität der an den Rezeptor bindenden Liganden zu analysieren, wurde die Affinität von Noradrenalin an den polymorphen Varianten in intakten Zellen bestimmt. Inkubation mit verschiedenen Noradrenalin-Konzentrationen bei gleichbleibender Menge von [3 H]-CGP-12177 ergab keine Unterschiede in der K_i der verschiedenen Varianten sowohl für die nativen Rezeptoren als auch für die FRET-Sensoren bei stabiler Expression in HEK293-Zellen (Tabelle 11).

Tabelle 11. Einfluss der SNPs Ser49Gly und Gly389Arg auf die Affinität der β_1 AR. Ergebnisse der Radioligandenbindung mit 3 H-CGP-12177 an intakten HEK293-Zellen.

	Ser49 Gly389	Ser49 Arg389	Gly49 Arg389
Native β_1AR			
K_i (NA) (μ M)	5,1 \pm 1,2 (n=3)	4,8 \pm 1,4 (n=3)	6,0 \pm 1,8 (n=3)
β_1AR-Sensoren			
K_i (NA) (μ M)	2,3 \pm 0,1 (n=2)	2,1 \pm 0,3 (n=2)	2,2 \pm 0,2 (n=2)

3.3.6 Internalisierung der β_1 AR-Varianten

Wir vermuteten für den β_2 AR, dass eine differentielle Internalisierung der Arg16- und Gly16-Varianten während der Inkubationsphase von 1,5 h mit Agonist und Radioligand eine mögliche Affinitätsänderung verdecken könnte. Um das Ausmaß der Internalisierung des β_1 AR zu visualisieren, wurde die Lokalisation der polymorphen Varianten der β_1 AR-Sensoren nach Stimulation mit Noradrenalin zeitabhängig mit Konfokalmikroskopie untersucht. Im Gegensatz zum β_2 AR (Abbildung 34) kann qualitativ keine signifikante Internalisierung der β_1 AR-FRET-Sensoren festgestellt werden (Abbildung 43). Dies bedeutet nicht, dass der β_1 AR nicht desensibilisiert und gibt keinen Aufschluss über die über die Zeit noch funktionell aktiven Rezeptoren, weißt jedoch klar auf einen zum β_2 AR alternierenden Verlauf der Rezeptordesensibilisierung hin.

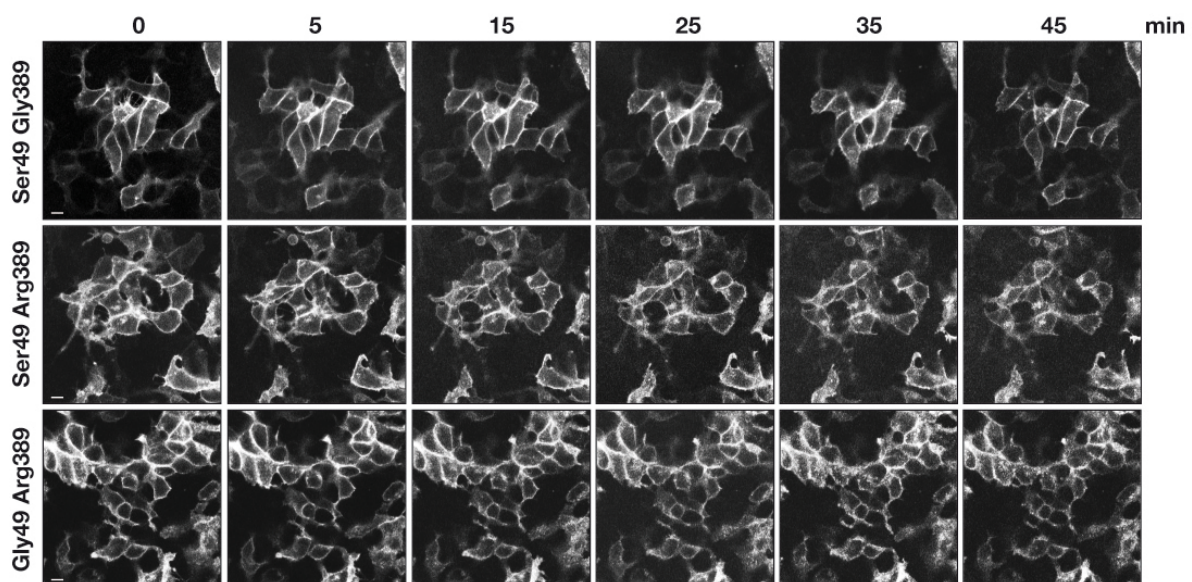


Abbildung 43. Internalisierung der polymorphen Varianten des β_1 AR-Sensors nach Stimulation mit 100 μ M Noradrenalin für die angegebene Zeit. Konfokale Aufnahmen, Maßeinheit: 10 μ m.

4 Diskussion

Die Untersuchungen der funktionellen und strukturellen Aspekte von GPCRs konzentrieren sich meist auf die Analyse agonistnaiver Rezeptoren, also auf die Aktivierung von GPCRs bei ihrem ersten „Kontakt“ mit einem Liganden. Im Organismus sind β AR allerdings ständig zirkulierenden Katecholaminen ausgesetzt, deren Konzentration vom aktuellen Stresszustand abhängt. Die Verwendung der FRET-Methode erlaubt die Aufzeichnung der Aktivierung wiederholter Stimulationspulse, und damit die Nachstellung der physiologischen Situation eines vorstimulierten β AR. Bei Betrachtung der Aktivierungsprofile der initialen Stimulation mit dem Liganden Noradrenalin oder Adrenalin und der darauf folgenden Aktivierungen der β AR wurde eine Änderung in der Kinetik festgestellt. Der Charakter dieses „Aktivierungsgedächtnisses“ hing vom β AR-Subtyp sowie von der SNP-Variante (Ser49Gly389, Ser49Arg389 und Gly49Arg389 für den β_1 AR sowie Arg16Gln27, Gly16Gln27 und Gly16Glu27 für den β_2 AR) ab. Dabei wurden funktionell effizientere Varianten schneller aktiviert, während funktionell weniger effizientere Varianten verglichen zur initialen Aktivierung eine langsamere Kinetik aufwiesen.

Dem polymorphismusspezifischen Aktivierungsgedächtnis liegt die Interaktion des stimulierten Rezeptors mit löslichen intrazellulären Faktoren zugrunde und die Phosphorylierung des aktivierten Rezeptors im C-Terminus spielt eine entscheidende Rolle. Dabei konnten subtypspezifische Unterschiede zwischen β_1 AR und β_2 AR nachgewiesen werden.

4.1 β AR-FRET-Sensoren

4.1.1 FRET-Sensoren als Messinstrumente für Konformationsänderungen in GPCRs

Die entscheidenden Werkzeuge dieser Arbeit sind FRET-Sensoren für den β_1 AR und den β_2 AR. Die FRET-Effizienz hängt entscheidend vom Abstand zwischen Akzeptor und Donor ab und ermöglicht somit Distanzänderungen zwischen den Fluorophoren als Änderung des FRET zwischen beiden zu messen. Die Methode ist somit ein "optisches Nanometermaß" (207). Diese für GPCRs etablierte Technik ermöglicht die Aufzeichnung der Rezeptoraktivierung im Millisekundenbereich in intakten Zellen (68). Die β AR-FRET-Sensoren stellen modifizierte Rezeptorproteine dar, in die zwei Varianten des GFP integriert sind, YFP in der dritten intrazellulären Schleife und Cerulean (β_1 AR) oder CFP (β_2 AR) am C-Terminus. Mit jedem Fluorophor erhöht sich das Molekulargewicht der β AR um 27 kDa, was etwa 50% der Nettomasse der Rezeptormoleküle entspricht. Agoniststimulation der β AR-

Sensoren resultiert in einer FRET-Abnahme, was eine Bewegung der dritten intrazellulären Schleife weg vom C-Terminus reflektiert, die fluoreszenzspektroskopische Studien sowie die Kristallstrukturen implizieren (siehe Abbildung 5) (32, 55, 56).

Ein quantitative Analyse der Entfernungen ist jedoch kaum realisierbar, da die FRET-Änderung nicht nur von den Grundeigenschaften der Fluorophore abhängt, sondern auch von deren Orientierung zueinander, die schwer vorhergesagt werden kann, sowie vom umgebenden Milieu. Letzteres schließt den pH-Wert, Änderungen von Polarität und Ionisationskräften, die bei der Bewegung des Proteins und damit verbundenen Bewegungen anderer Proteine aus anderen Zellkompartimenten auftreten, ein. Daraus folgt, dass aus der Änderung der FRET-Effizienz nicht einfach auf die Distanz zwischen den beiden Fluorophoren geschlossen werden kann (208) und dass umgekehrt eine gleiche FRET-Ratio-Änderung kein „Einrasten“ in der gleichen Konformation darstellen muss.

4.1.2 Auflösung der Kinetik der Rezeptoraktivierung

Neben der Visualisierung der Konformationsänderungen des Rezeptors als Folge seiner Aktivierung kann auch der kinetische Verlauf der Aktivierung nachvollzogen und analysiert werden. Die Zeitkonstante für Rezeptoraktivierung folgt einer hyperbolischen Abhängigkeit von der Ligandenkonzentration und erreicht ein Maximum bei sättigenden Konzentrationen (69, 209, 210).

Die gemessene Aktivierungsgeschwindigkeit der β AR von 50 bis 100 Millisekunden ist ähnlich der Kinetik anderer Klasse A GPCRs (69, 211) und bewegt sich im erwarteten Rahmen physiologischer Prozesse. Vergleichende FRET-Analysen der anschließenden Signaltransduktionsprozesse identifizierten die G-Protein-Aktivierung als geschwindigkeitsbestimmenden Schritt in der Signalweiterleitung. Während Rezeptoraktivierung und Rezeptor-G-Protein-Interaktion jeweils unter 100 ms ablaufen, beträgt die Zeitkonstante der FRET-Änderung zwischen $G\alpha$ -YFP und $G\gamma$ -CFP etwa 450 ms (85).

Im Vergleich wird der Peptidhormon- und der Klasse B angehörende PTH-Rezeptor in einem zweistufigen Prozess mit einer Aktivierungskonstante von 1 s aktiviert (69). Jedoch zeigt die Aktivierung des Rhodopsins, dass GPCRs der Klasse A sehr viel schneller aktiviert werden können: Die aktive, G-Protein-koppelnde Form Metarhodopsin II liegt etwa 1 ms nach Lichtaktivierung vor. Die nachgeschalteten Prozesse von Transducinaktivierung über cGMP-Hydrolyse durch Transducin-aktivierte Phosphodiesterasen und cGMP-gesteuerte Kationenkanal-Schließung laufen innerhalb von 200 ms ab (212-214). Ob diese Geschwindigkeit nur dem Rhodopsin obliegt, oder ob die FRET-Messungen an β AR und anderen Klasse A GPCRs durch technische Limitationen die tatsächliche

Aktivierungsgeschwindigkeit unterschätzen, ist nicht klar. Solche Limitationen könnten die Geschwindigkeit der Agonistgabe durch ein Perfusionssystem darstellen, sowie die Tatsache, dass nicht die Aktivierung eines einzelnen Rezeptors betrachtet wird. Vielmehr wird die gesammelte Aktivierung der Rezeptoren auf einer Zelle oder eines größeren Zellausschnitts, die nicht unbedingt synchronisiert ablaufen muss und die der Agonist nicht genau gleichzeitig erreicht, aufgenommen.

Die zeitliche Auflösung der Kinetikmessungen ist durch Parameter sowohl der hier verwendeten β AR-FRET-Sensoren als auch der technischen Ausstattung limitiert. Die verwendete Frequenz von 50 Hz zur Aufnahme der Aktivierungskinetik der β AR nach Katecholaminstimulation stellt einen guten Kompromiss aus den entscheidenden Aufnahmeparametern wie der Sensorexpression an der Zellmembran, der Intensität der Lichtquelle im Verhältnis zum Bleichen der Fluorophore sowie dem Signal-zu-Rausch-Verhältnis dar. Dies ist in etwa vergleichbar mit der Determinierung der Aktivierungskinetiken anderer GPCRs (215, 216) bzw. eines ähnlich konstruierten β_2 AR-Sensors mit CFP im dritten intrazellulären Loop an gleicher Stelle, aber ohne Linkersequenz und mit der YFP-Sequenz an einen um 44 Aminosäuren verkürzten C-Terminus (72).

Partielle Agonisten zeigen eine langsamere Aktivierung im Vergleich zu vollen Agonisten (vgl. Adrenalin versus Fenoterol am β_2 AR, Abbildungen 24 und 35), und gleichzeitig auch eine verminderte Amplitude im FRET-Signal (72, 209).

Die „Wildtyp“-Varianten der β AR – Ser49Gly389- β_1 AR und Arg16Gln27- β_2 AR – zeigen jeweils eine Verlangsamung in der Aktivierungsgeschwindigkeit ab der zweiten Stimulation bei Subtyp-spezifischer Dauer der ersten Aktivierung. Die gegenläufige Beobachtung für polymorphe Varianten der Rezeptoren spricht für die Spezifität der gemessenen Kinetiken und schließt potentielle Artefakte durch Bleichen aus. Zusätzlich untermauern die Daten für das β_2 AR-Aktivierungsgedächtnis unter Fenoterol die Spezifität der Kinetiken.

Ein zusätzlich komplementärer interessanter Ansatz ist die Analyse der Ligandenbindung mittels FRET. So konnte für den PTH-Rezeptor durch dynamische Aufzeichnung der FRET-Effizienz zwischen N-terminal mit GFP markiertem Rezeptor und TMR-markiertem PTH eine biphasische Bindung des Liganden nachgewiesen werden mit einer schnellen, ligandenkonzentrationsabhängigen Komponente von 140 ms und einer langsamen Komponente von etwa 1 s, die mit der Kinetik der Rezeptoraktivierung des PTH-Sensors vergleichbar war (217).

4.1.3 Potentielle Optimierungsmöglichkeiten für die β AR-Sensoren

Eine Optimierung der β AR-FRET-Sensoren in der Hinsicht, die Fluorophore besser zu platzieren, um eine höhere FRET-Ratio-Änderung nach Stimulation und gleichzeitig ein niedrigeres Signal-zu-Rausch-Verhältnis zu erwirken, bleibt erstrebenswert. Damit könnten Lichtintensität und Aufnahmesampling optimiert werden, so dass am Ende eine Erhöhung der Aufnahmefrequenz ohne Einschränkungen in der Qualität der Kurve resultiert, die eine höhere Messgenauigkeit erlaubt. Unter solchen Bedingungen könnte womöglich auch in den ersten Millisekunden der ersten Aktivierung des β_2 AR ein biphasischer Verlauf der Aktivierungskinetik beobachtet werden, deren Basis eine gemischte Population von phosphorylierten und (noch) nicht phosphorylierten Rezeptoren wäre. Aufgrund der beobachteten Differenzen in der Phosphorylierung des β_2 AR durch GRKs (Abbildung 28) müssten hier zwischen den polymorphen Varianten Unterschiede detektiert werden können.

Eine mögliche Modifikation der β AR-Sensoren könnte im Austausch der Fluorophore durch optimierte Varianten bestehen. Im Gegensatz zum β_2 AR-Sensor besitzt der verwendete β_1 AR-Sensor bereits Cerulean statt ECFP. Cerulean unterscheidet sich von ECFP durch den Austausch von vier Aminosäuren (ECFP/S72A/Y145A/H148D) (75) und zeichnet sich durch eine verbesserte Helligkeit (2,5fach höhere Fluoreszenzintensität, thermale Deaktivierung des photoangeregten Zustands) sowie ein höheres Signal-zu-Rausch-Verhältnis aus. Gleichzeitig ist aber die maximale Amplitude des FRET-Signals für den β_1 AR-Sensor im Vergleich zum β_2 AR-Sensor geringer. Letzteres könnte von einem Subtyp-spezifischen Ausmaß der Konformationsänderungen des Rezeptors nach Agoniststimulation herrühren. Darüber hinaus sind die Dipolorientierungen der Fluorophore kaum vorhersagbar und durch die Mobilität der Fluorophore teilweise randomisiert. Dies wird besonders am Beispiel des β_2 AR-Sensors deutlich: Der Austausch von ECFP durch Cerulean führt zu einer verringerten FRET-Effizienz und zu keinem stabilen Signal (200).

Alternative, dem CFP/YFP-FRET ähnliche Methoden sowie leicht abgewandelte Sensoren sind bereits für die β AR-Subtypen beschrieben. Für BRET (Biolumineszenz-Resonanz-Energie-Transfer) wird keine externe Lichtquelle benötigt, doch der beschriebene BRET-Sensor (mit YFP in der dritten intrazellulären Schleife und Rluc, Renilla luciferase, am C-Terminus) zeigte keine erkennbaren Vorteile (218). Eine Alternative zu YFP und seinen Varianten stellt das kleine zellpermeable Fluoresceinderivat FIAsh (Fluoresceine Arsenical Hairpin binder) dar, eine Substanz, die spezifisch die Sequenz CCPGCC aus sechs Aminosäuren erkennt und bindet (210, 219). FIAsh ist mit einer Molekularmasse von 700 Dalton etwa 1/40 von YFP und fluoresziert nur, wenn es an die Sequenz gebunden hat. Ein

Vergleich von β_1 AR-Sensoren mit den FRET-Paaren Cer/YFP und Cer/Flash brachte keine Unterschiede in der Aktivierungskinetik hervor, sodass die Größe der GFPs keine Limitation für die β AR-Sensoren darzustellen scheint ((70) und nicht veröffentlichte Daten von F. Rochais, RVZ, Universität Würzburg). Weitergehende Modifikationen von FIAsh brachten verschiedenfarbige synthetische Varianten hervor, die mit diesem zusammen potentielle FRET-Paare bilden können (220). Auch die Verwendung von neuartigen Tags wie dem SNAP- und CLIP-Tag (221) stellt eine weitere Option zur Generierung verbesserter Sensorkonstrukte dar.

4.1.4 Charakterisierung der β AR-FRET-Sensoren

Eine wichtige Komponente der hier verwendeten Sensoren ist ihre Funktionalität, die für weitergehende Aussagen unabdingbar ist. Diese wurde erfolgreich für den β_1 AR-Sensor gezeigt (70) und im Rahmen dieser Arbeit durch Radioligandenbindungsexperimente bestätigt (Tabelle 9). Der generierte β_2 AR-FRET-Sensor wurde hinsichtlich seiner pharmakologischen und funktionellen Charakteristika intensiv untersucht, mit dem Ergebnis, dass er trotz der eingebauten Fluorophore seine volle Funktionsfähigkeit bewahrt und kein Unterschied zum nativen β_2 AR festzustellen ist. So ist die Ligandenbindungsaffinität unverändert und die Anschaltung intrazellulärer Signalwege (cAMP-Akkumulation, Arrestin-Translokation an die Membran, Internalisierung, Abbildungen 19 und 20) war ungestört. Auch die Phosphorylierung durch GRKs konnte trotz der Fluorophore ungehindert stattfinden (Abbildung 28). Daraus lässt sich schließen, dass die verwendeten Sensorkonstrukte für den β_1 AR und den β_2 AR die nativen Rezeptoren widerspiegeln und somit als „Messinstrument“ zur Analyse deren Aktivierung eingesetzt werden können.

Es ist jedoch nicht vollständig geklärt, ob die β AR-Sensoren bei Aktivierung nur die Konformationsänderungen der Rezeptoren selbst reflektieren, oder ob darin auch die Bindung und Aktivierung des G-Proteins involviert ist. Für ersteres sprechen Untersuchungen der Aktivierung des PTH-Rezeptors, die von einer Urea-Behandlung, die nachweislich GPCRs intakt lässt, jedoch zur Degradation so gut wie aller anderen Proteine inklusive der G-Proteine führt (222), unbeeinflusst blieb (69). Letzteres ist in der Beobachtung begründet, dass der aktive Zustand des β_2 AR relativ instabil ist und ein hohes Energieniveau besitzt, das nicht adäquat vom gebundenen Agonisten allein stabilisiert werden kann. G-Protein-Rekrutierung ist für die volle Stabilisierung des aktiven Rezeptorzustandes nötig (54, 56, 223). Somit wäre die G-Protein-Rekrutierung essentiell

und ein untrennbarer Teil der Rezeptoraktivierung, und die Antwort des Sensors würde notwendigerweise von der Verfügbarkeit der G-Proteine abhängen. Betrachtet man die Kinetiken der β_1 AR-Aktivierung und der Interaktion des β_1 AR mit G_s , so liegen beide Zeitkonstanten in vergleichbaren Regionen um 60 ms (85). Ein entscheidender Einfluss der G-Protein-Bindung auf das Signal der β AR-Sensoren ist zeitlich gesehen also möglich. Auch in den Experimenten mit permeabilisierten Zellen sind G-Proteine noch vorhanden, und in diesen Zellen können Rezeptoren agonistabhängig noch GTP γ S-gebundene G-Proteine rekrutieren. Um aufzuklären, in welchem Ausmaß die Änderungen im FRET durch Rezeptoraktivierung und G-Protein-Bindung verursacht werden, müsste entweder eine Urea-Behandlung der Membranen vorgenommen oder es müssten Experimente in G-Protein freiem Milieu mit aufgereinigten und gleichzeitig voll funktionellen Sensoren durchgeführt werden.

4.2 Das „Aktivierungsgedächtnis“ des β_2 AR *

4.2.1 Agonist-„Efficacy“ des β_2 AR

Eine entscheidende Frage, deren Antwort nicht auf experimentellen Fakten basiert, ist: Wie kann eine Änderung der Aktivierungskinetik die Funktionalität des Rezeptors beeinflussen? Es gibt mittlerweile zahlreiche Hinweise aus Fluoreszenzspektroskopie-, NMR- und FRET-Studien dafür, dass Rezeptoren nicht nur in zwei Zuständen (inaktiv und aktiv) vorliegen, sondern mehrere verschiedene Konformationen einnehmen können, in die sie mit bestimmten Kinetiken verschoben werden (36, 209, 224). So unterscheiden sich volle und partielle Agonisten nicht nur in der FRET-Amplitude sondern auch in ihrer Aktivierungskinetik, das heißt größere Effekte werden schneller induziert. Agonisten unterschiedlicher Wirksamkeit verursachen ein verschiedenes Ausmaß der G-Protein-Aktivierung durch die Induktion bestimmter Rezeptorkonformationen. Dies impliziert einen direkten Zusammenhang von Zeitkonstante der Rezeptoraktivierung, G-Protein Aktivierung und physiologischer Wirksamkeit und wurde mittels FRET als erstes für den α_{2A} -adrenergen Rezeptor gezeigt (73).

Der Vergleich der für die Aktivierung des β_2 AR verwendeten Liganden Adrenalin (voller Agonist) und Fenoterol (Partialagonist) am β_2 AR bestätigt diese Korrelation (Abbildungen 24

* Auszüge aus diesem Diskussionsteil wurden von Ahles *et al.* in *Science Signaling* veröffentlicht (199).

und 35, Daten der FRET-Amplitude für Fenoterol sind nicht gezeigt). Hier korreliert die Aktivierungsgeschwindigkeit mit der Wirksamkeit (Efficacy) des Agonisten.

Nun liegen in dieser Arbeit primär nicht Liganden mit unterschiedlicher Effektivität vor, sondern „unterschiedliche“ Rezeptoren, die unterschiedliche Aktivierungskinetiken bei gleichbleibender FRET-Amplitude hervorrufen. Dies ist nicht generell der Fall, sondern setzt eine Vorstimulation des Rezeptors und eine während dieser ablaufender Interaktion des Rezeptormoleküls mit zytosolischen Faktoren voraus. Unsere Daten lassen daher einen Zusammenhang zwischen der Geschwindigkeit der Rezeptoraktivierung vorstimulierter Rezeptoren (und damit verbundener intrazellulärer Modifikation der Rezeptorproteine) und der „Efficacy“ des Rezeptors unabhängig von einer Amplitudenveränderung vermuten.

Dabei kehrt der Rezeptor möglicherweise abhängig von der SNP-Kombination nach der initialen Aktivierung und Dissoziation des Liganden in einen vom Ausgangszustand abweichenden „basalen“ Zustand zurück oder er nimmt in der zweiten Stimulation eine polymorphismusspezifische aktive Konformation ein. Es ist nicht ausgeschlossen, dass der FRET-Sensor solche verschiedenen Konformationen nicht direkt visualisieren kann, wenn sie vergleichbare Änderungen in der FRET-Ratio und damit vergleichbare Änderungen im Energietransfer nach Agoniststimulation hervorbringen. Die resultierenden Aktivierungskinetiken könnten ein Ausdruck der verschiedenen Konformationsänderungen und damit möglicherweise einer veränderten „Efficacy“ sein, die in unterschiedlichen Signalstärken resultiert. Eine Aufklärung könnte möglicherweise die Generierung von β AR-FRET-Sensoren liefern, deren Fluorophore an anderen Stellen integriert sind. Nehmen β AR wirklich abhängig von ihrem polymorphen Status unterschiedliche basale und/oder agonistinduzierte Konformationen ein, so ist die Wahrscheinlichkeit hoch, dass dies auch in unterschiedlichen FRET-Effizienzen bei alternierendem Einbau resultiert. Dies konnte bereits abhängig vom Agonisten für den α_{2A} -Rezeptor gezeigt werden (215).

Alternativ könnten aber auch die Kinetikunterschiede selbst die mechanistische Basis für die unterschiedliche Wirksamkeit darstellen. So vermag die Aufsummierung vieler kurzer und wiederholter Ligand-Rezeptor-Interaktionen unter nativen Bedingungen (nicht-sättigenden Ligandenkonzentrationen) direkt die Stärke des weitergeleiteten Signals (also der cAMP-Produktion) festlegen. Unter der Annahme, dass solche Aktivierungs-Deaktivierungs-Zyklen kurz aufeinanderfolgen, und dass die schnelleren Gly16-Varianten somit jeweils immer schneller und damit länger im aktiven Zustand sind, kann es zu polymorphismusbedingten Unterschieden im funktionellen Output kommen (Abbildung 44).

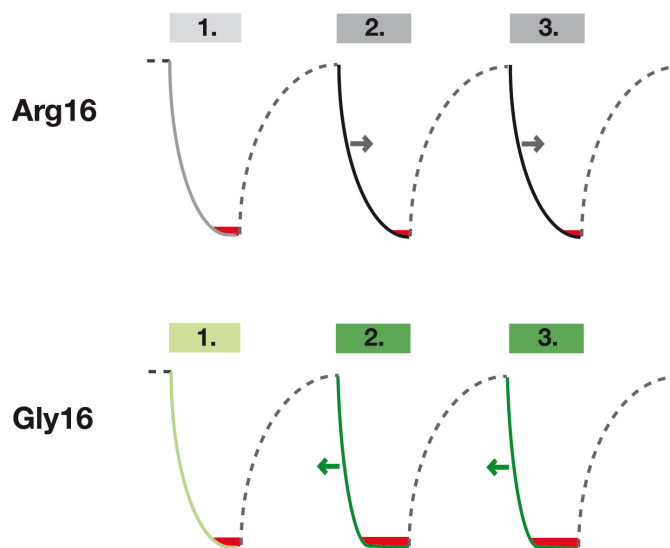


Abbildung 44. Hypothese zur direkten Übersetzung der Aktivierungsgeschwindigkeit der polymorphen β_2 AR nach wiederholter Stimulation in funktionelle Wirksamkeit. Unter der Annahme von schnellen, wiederkehrenden Aktivierungszyklen befänden sich schneller aktivierte Rezeptoren (Gly16- β_2 AR) länger im aktiven Zustand (in rot dargestellt) als langsamer aktivierte Rezeptoren (Arg16- β_2 AR) und könnten damit länger und effizienter nachfolgende Signalwege anschalten.

4.2.2 Erklärungen auf struktureller Ebene – der „unsichtbare“ N-Terminus

GPCRs sind dynamische Proteine mit komplexer Konformation (225). Die Ligandenbindungstasche ist hochkonserviert und unterscheidet sich zwischen den beiden untersuchten β AR-Subtypen nur in einer einzigen Aminosäure, wohingegen die extrazelluläre Fläche strukturell heterogen ist und der N-Terminus flexibel. Dieser Flexibilität zufolge bleibt die Struktur des N-Terminus, der funktionell variante SNPs beinhaltet, bis heute ungeklärt. Im Kristallstrukturvergleich der aktiven und inaktiven Konformationen des β_2 AR ist eine Bewegung der TM1 erkenntlich, woraus auch zwangsweise eine Bewegung des extrazellulären N-Terminus bei Agonistbindung resultieren muss (55, 56).

Die zweite extrazelluläre Schleife des β_2 AR formt eine α -Helix gefolgt von einem β -Faltblatt. Zwei Disulfidbrücken festigen die Struktur, sodass die Ligandenbindungstasche vom extrazellulären Milieu aus leicht erreichbar ist und lösliche Liganden schnell an- und abdiffundieren können (53, 226). NMR-Daten zeigen distinkte Konformationen der extrazellulären Oberfläche abhängig ob ein Agonist, inverser Agonist oder neutraler Antagonist bzw. kein Ligand gebunden ist und belegen gleichzeitig, dass Variationen im extrazellulären Bereich auf die Effektivität der Signaltransduktion des Rezeptors Einfluss nehmen können (227). Wenn auch nicht auf die Ligandenbindungsaffinität, die sowohl an

Membranpräparationen (Tabellen 4 und 9) als auch an intakten Zellen (Tabellen 5 und 11) gemessen, zwischen den polymorphen β AR nicht unterschiedlich ist, so kann der N-terminale Bereich einen Einfluss auf die Rearrangements nehmen, die bei Rezeptoraktivierung auftreten und damit intrazelluläre Phosphorylierung und Signaltransduktion determinieren. Die Abspaltung der ersten 20 N-terminalen Aminosäuren von einem in HEK293-Zellen exprimierten, modifizierten β_2 AR-FRET-Sensor durch TEV-Protease-Behandlung weist gar darauf hin, dass der N-Terminus für die erfolgreiche Aktivierung des β_2 AR unverzichtbar ist (Abbildung 23).

Darüber hinaus könnten auch weitere Parameter die Wirkstärke des β_2 AR beeinflussen. Vielleicht sind SNPs in Vorgänge wie Rezeptor-Oligomerisierung, der zelltypabhängigen Lokalisation des Rezeptors in Mikrodomänen in der Plasmamembran, oder der Interaktion mit anderen Proteinen wie Arrestinen involviert. Die Homodimerisierung des β_2 AR und auch des β_1 AR wurde in zahlreichen Überexpressionsystemen nachgewiesen (202, 203). Die Messung von intermolekularem FRET nach Co-Transfektion von einzelmarkierten β_2 AR (β_2 AR-YFP und β_2 AR-CFP) in HEK293-Zellen resultierte in einer nur geringen basalen Rezeptor-Rezeptor-Interaktion. Dies war für die Arg16- und Gly16-Varianten gleich (Daten nur für Arg16 Gln27 in Abbildung 17 gezeigt), in unserem Setup unterschieden sich die β_2 AR-Varianten nicht hinsichtlich der Einnahme der Konformation zueinander.

4.2.3 GRK-Phosphorylierung und die Auswirkungen

Wie der N-terminale Abschnitt ist auch der größte Teil der Struktur des C-Terminus sowohl des β_1 AR als auch des β_2 AR aufgrund seiner langgestreckten Konformation und damit verbundenen Flexibilität nicht gelöst. Unsere Ergebnisse weisen klar auf eine polymorphismusspezifische Phosphorylierung der β AR durch GRKs nach Agoniststimulation hin. Dies konnte für beide Subtypen mittels phosphorylierungsdefizienter Mutanten der FRET-Sensoren nachgewiesen werden (Abbildungen 29 und 42). Die Konzentration auf GRK und die Vernachlässigung der PKA-Phosphorylierung rührte von der kinetischen Analyse der Phosphorylierung des β_2 AR her. Während die Modifikation durch PKA erst nach Minuten der Agoniststimulation erfolgt, geschieht die Phosphorylierung durch GRKs sehr schnell (204, 228). Die Kinasen binden binnen Sekunden, was wir auch im Western Blot zeigen konnten und was mit den schnellen Änderungen der Aktivierungskinetik vereinbar ist.

Während die Mutation von Serin und Threonin zu Alanin im β_1 AR auf Verdacht erfolgte, sind die im β_2 AR veränderten Stellen durch zahlreiche Mutagenesestudien und massenspektro-

skopische Analysen klar als Phosphorylierungsstellen für die den Serin-Threonin-Kinasen angehörenden GRKs definiert.

Jedoch gibt es kontroverse Aussagen über die Spezifität der GRK-Subtypen für bestimmte Serine und Threonine. Fünf potentielle Phosphorylierungsstellen der GRK2 wurden im C-Terminus des β_2 AR beschrieben: zwischen den Aminosäuren 384 und 411 (111-114) und zwischen 355 und 364 (229). Eine Kombination aus siRNA-Knockdown und massenspektroskopischer Analyse erbrachte eine potentiell präferentielle Phosphorylierung der distalen Reste Thr360, Ser364, Ser396, Ser401, Ser407 und Ser 411 durch GRK2, während GRK6 putativ Ser355/Ser356 phosphoryliert (115).

Unsere Untersuchungen spezifischer Stellen der Rezeptorphosphorylierung beschränkten sich auf die Analyse der im proximalen C-Terminus des β_2 AR gelegenen Serine 355 und 356, die als Schlüsselbereiche der GRK-Phosphorylierung gelten (230). Deren Phosphorylierung erfolgt nach Agoniststimulation, sowohl durch den endogenen Liganden Adrenalin als auch durch den Partialagonisten Fenoterol (Abbildungen 24 und 35E). Dabei war die Effizienz für den Partialagonisten, gemessen an der Stärke der Phosphorylierung, auch hier reduziert (Daten nicht gezeigt).

Welche und wie viele Phosphosites im C-Terminus unabdinglich und entscheidend für die Ausbildung eines Aktivierungsgedächtnisses sind, könnte durch gezielte Mutagenese der einzelnen Serine und Threonine analysiert werden. Es ist auch vorstellbar, dass es ein polymorphismusspezifisches Phosphorylierungsmuster, sozusagen einen „polymorphismus-spezifischen Phosphorylierungsbarcode“, gibt, nach dem abhängig von der polymorphen Natur bestimmte Stellen phosphoryliert werden und das womöglich mit unterschiedlicher Kinetik (115).

Eine komplementäre Frage ist die nach der Spezifität der GRKs – Die GRK-Subtypen 2, 3, 5 und 6 sind alle in HEK293-Zellen exprimiert und könnten den Rezeptor dort phosphorylieren. Ob nun ein Subtyp davon genau den Unterschied zwischen Arg16 und Gly16 ausmacht, bleibt zu klären. Dies mit subtypspezifischen siRNA-Knockdown herauszufinden, erscheint schwierig, da eine komplette Eliminierung der Proteine nicht möglich ist und zudem ein anderer Subtyp kompensierend den Rezeptor phosphorylieren könnte. Aus diesen Gründen brachte eine solche Herangehensweise wohl keine klaren Ergebnisse für den β_1 AR (Daten nicht gezeigt). Permeabilisierung der Zellen und anschließende Zugabe aufgereinigter GRK könnte einen Hinweis darauf geben, ob eine und wenn ja, welche GRK-Isoform das Aktivierungsgedächtnis der Rezeptoren determiniert.

Die intakte GRK-Phosphorylierung ist ein Spezifikum des hier verwendeten Sensorbaustein für den β_2 AR: Wir konnten nachweisen, dass der Sensor, trotz der eingebauten Fluorophore, die bei Betrachtung ihrer Anordnung den Zugang für GRKs erschweren könnten, phosphoryliert werden kann. Im Folgenden kann auch Arrestin rekrutiert werden. Dies wurde noch für keinen GPCR-FRET-Sensor gezeigt und wird bei anderen Sensoren allein schon durch die Kürzung des C-Terminus unwahrscheinlich (72).

Eine weitere interessante Frage ist, wie lange das Aktivierungsgedächtnis der β AR anhält. Nimmt man an, dass es mit der Dephosphorylierung der GRK-Phosphorylierungsstellen der Rezeptoren „die neue Kinetik in Vergessenheit gerät“, würde man eine Elimination der Unterschiede in der Aktivierungskinetik nach etwa 20 Minuten erwarten, denn die Halbwertszeit für die Dephosphorylierung GRK-phosphorylierter Rezeptoren beträgt etwa 18 min (231). Die Kinetiken von GRK- und PKA-Phosphorylierung und Dephosphorylierung hängen von verschiedenen Bedingungen ab, letztere kann auch erst nach Endozytose des Rezeptors erfolgen (230, 232). Computersimulationen zeigen, dass die Dauer der Agonistpulse die Stabilität und damit die Dauer der Phosphorylierung beeinflussen kann (233).

4.2.4 SNP-spezifische Rezeptordesensibilisierung

Die Phosphorylierung des β_2 AR durch GRKs führt zur Translokation von β -Arrestin aus dem Zytosol an die Plasmamembran, um an den phosphorylierten Rezeptor am C-Terminus zu binden. Die Mutation aller distal zu 354 lokalisierten elf Serin- und Threoninreste inhibiert die agonistvermittelte Phosphorylierung des β_2 AR sowie die (detektierbare) β -Arrestin-Rekrutierung und führt zum Verlust der Bindung von β -Arrestin an den aktivierten Rezeptor (100). Weitergehende Studien postulieren jedoch, dass nicht alle C-terminalen Phosphorylierungsstellen notwendig für Rekrutierung von β -Arrestin sind, sondern dass vielmehr ein Cluster aus vier Aminosäuren zwischen Ser355 und Ser364 essentiell für Interaktion ist (112, 113, 229, 234, 235). Auch in der zweiten intrazellulären Schleife wurden zusätzliche Bindestellen von β -Arrestin am β_2 AR identifiziert (236).

Wir konnten Unterschiede in der Arrestin-Rekrutierung an den agonistgebundenen und durch GRK phosphorylierten Rezeptor abhängig von der SNP-Kombination detektieren. Die Geschwindigkeit der Interaktion variierte dabei verglichen mit publizierten Daten, vermutlich bedingt durch die verwendete Zelllinie und damit der endogenen Konzentration an GRKs, die die Geschwindigkeit der Arrestin-Translokation determinieren (136), und Proteinen wie NHERF, die als Scaffoldprotein eine Rolle bei der Arrestinbindung an den Rezeptor spielen

(237). In diesem Zusammenhang wird auch diskutiert, dass unterschiedliche GRK-Phosphorylierungsmuster zu unterschiedlichen β -Arrestin-Translokationskinetiken führen können (238).

Aus der schnelleren Interaktion der Gly16-Varianten mit β -Arrestin2 (Abbildung 32) lässt sich eine verstärkte Desensibilisierung ableiten, die auch bei Langzeitapplikation eines Agonisten *in vitro* gezeigt wurde (189). Die weitergehenden Prozesse der Internalisierung und Herabregulation der Rezeptorzahl an der Zellmembran wurden hier nicht quantitativ untersucht. Auch fehlen uns noch jegliche Informationen darüber, ob die Recyclinggeschwindigkeit oder der Prozentsatz an Rezeptoren, die nicht endozytiert und degradiert werden, sondern an die Zelloberfläche zurückkehren und wieder voll funktionsfähig sind, polymorphismusabhängig ist.

4.3 Das „Aktivierungsgedächtnis“ des β_1 AR im Vergleich zum β_2 AR

Analog zum β_2 AR wurde auch das Aktivierungsprofil polymorpher β_1 AR bei wiederholter Stimulation untersucht. Daraus ergaben sich unterschiedliche Charakteristika für das Aktivierungsgedächtnis der β AR-Subtypen.

4.3.1 Zeitliche Ausprägung des Rezeptorgedächtnisses

Diese bestehen zunächst einmal in der unterschiedlichen Zeitspanne der Agoniststimulation, die nötig ist, um polymorphismusspezifische Änderungen der Aktivierungsgeschwindigkeit zu detektieren: Während sich die Änderung in der Aktivierungskinetik der β_2 AR schon nach einem nur fünfsekündigen ersten Agonistpuls manifestierte, konnten wir nur bei einer kontinuierlichen Vorstimulation über fünf Minuten eine Verlangsamung der Aktivierungsgeschwindigkeit des Ser49Gly389- β_1 AR und eine schnellere Kinetik der Gly49Arg389- β_1 AR-Variante beobachten.

4.3.2 Subtyp-spezifische Interaktion mit zytosolischen Proteinen

Das „Aktivierungsgedächtnis“ beider Subtypen ist abhängig von der Interaktion des Rezeptors mit löslichen intrazellulären Faktoren. Dies konnte durch Permeabilisierung der Zellen mit Saponin nachgewiesen werden, in deren Folge lösliche Proteine durch die entstandenen Poren in der Zellmembran ins umgebende Medium diffundieren konnten und allein der Rezeptor (mit membranständigem G-Protein) betrachtet wurde. Wurde die Aktivierungskinetik der agonistnaiven Rezeptoren unter diesen Bedingungen aufgezeichnet,

so konnte sowohl im Falle der β_1 AR-Varianten als auch für die polymorphen β_2 AR keine Ausbildung eines Aktivierungsgedächtnisses beobachtet werden (Abbildungen 26 und 40). Wurde jedoch erst nach der initialen Stimulation und damit nach der Phosphorylierung und Interaktion des Rezeptors mit intrazellulären Faktoren als Folge dieser Aktivierung permeabilisiert, so blieb das Aktivierungsgedächtnis unabhängig von der Aktivierung von G-Proteinen für den β_2 AR bestehen. Die ist mit der bekannten anhaltenden Phosphorylierung des Rezeptors auch Minuten nach Wegnahme des Agonisten im Einklang (136). Im Gegensatz dazu resultierte dieser Ansatz nicht in der signifikanten Ausbildung des Aktivierungsgedächtnisses für die Varianten des β_1 AR.

Eine mögliche Ursache für diese Differenzen zwischen den β AR-Subtypen ist eine im Vergleich zum β_2 AR niedrigaffinere, weniger stabile Bindung von zytosolischen Proteinen an den Rezeptor. Diese könnten aufgrund der herabgesetzten Konzentration in der Zelle durch Permeabilisierung dann leichter wieder abdiffundieren. Außerdem wäre eine nur transient anhaltende Phosphorylierung denkbar. Diese könnte wiederum durch die Abdiffusion löslicher Faktoren eliminiert werden, oder die Phosphorylierung könnte durch die im Vergleich zu den Experimenten mit intakten Zellen längere Auswaschphase (20 s versus 1-2 min) nicht mehr vorhanden sein. Die längere Phase ohne Agonist wurde in den Permeabilisierungsexperimenten nötig, um die Saponinlösung von den Zellen zu entfernen und die Zellen am Mikroskop zu positionieren. Eine Optimierung des Protokolls hinsichtlich des Auswaschens könnte einen Aufschluss über die Charakteristika der Interaktion des β_1 AR mit intrazellulären Proteinen geben.

Die unterschiedliche Ausprägung des Aktivierungsgedächtnisses der beiden β AR-Subtypen lässt außerdem die Vermutung zu, dass die Interaktion mit jeweils anderen intrazellulären Faktoren eine Rolle spielt. So besitzt sowohl der β_1 AR als auch der β_2 AR eine PDZ (post-synaptic density protein [PSD95]/ Drosophila disc large tumor suppressor [DlgA]/zonula occludens-1 protein [zo-1])-Domäne im C-Terminus, an die jeweils abhängig vom Subtyp spezifische Proteine binden (Abbildung 45). Dies erhöht die Spezifität der intrazellulären Signaltransduktion von β_1 AR und β_2 AR, die genauen molekularen Mechanismen, die die Spezifität der Interaktion bestimmen, sind allerdings bis heute unklar. So bindet der Na^+/H^+ -regulatorische Austauschfaktor an das C-terminale Ende des β_2 AR (237, 239) und vermittelt die adrenerge Regulation des Na^+/H^+ -Austausches und kontrolliert außerdem die Endozytose des β_2 AR (240). Über das PDZ-Motiv des β_2 AR wird auch das Recycling des Rezeptors und die Kopplung an G_i determiniert (241). Im Gegensatz dazu interagiert die PDZ-Domäne des β_1 AR (242) mit PSD-95, was die Rezeptorinternalisierung blockt und zur Verhinderung der Interaktion des Rezeptors mit G_i führt (140, 243, 244).

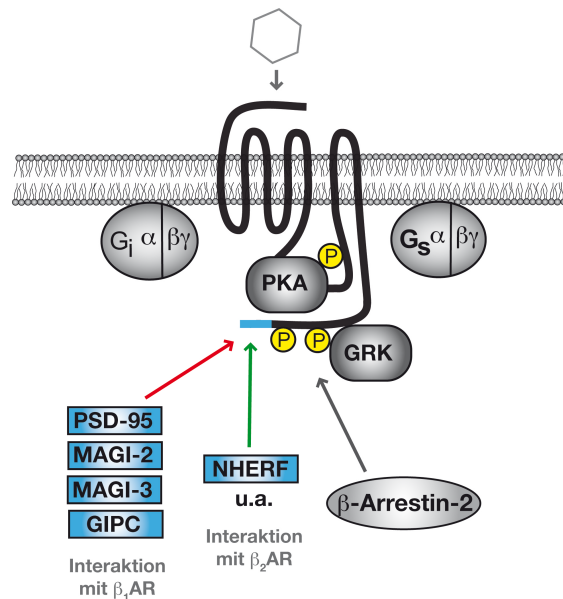


Abbildung 45. Interaktion der β AR mit intrazellulären Proteinen (nach (166)). Die PDZ-Domäne des Rezeptors ist in blau dargestellt. Proteine, die Subtyp-spezifisch (β_1 AR - roter Pfeil, β_2 AR – grüner Pfeil) über die PDZ-Domäne mit den β AR interagieren, sind blau unterlegt. PSD95 – postsynaptic density protein 95, MAGI – membrane associated guanylate kinase inverted, GIPC – GAIP interacting protein at the C-terminus.

4.3.3 Kinetik der Phosphorylierung und die entscheidende Kinase

Dass das Aktivierungsgedächtnis des β_1 AR analog zum β_2 AR auch von der Phosphorylierung des Rezeptors abhängt, konnte mit Hilfe phosphorylierungsdefizienter Sensormutanten gezeigt werden. Hier wurden alle Serine und Threonine im C-Terminus durch Alanin ersetzt, darunter auch eine putative PKA-Phosphorylierungsstelle (Ser412). Somit kann ein PKA-vermittelter Effekt nicht ausgeschlossen werden. Da PKA auch durch Aktivierung anderer GPCRs β AR phosphorylieren kann, was mit dem Prozess der heterologen Desensibilisierung einhergeht, kann das Szenario für den β_1 AR noch komplexer gestalten. Allerdings weisen Beobachtungen in transgenen Mäusen, die die humanen β_1 AR-Varianten Gly389 und Arg389 ventrikulär überexprimieren, auf einen Zusammenhang zwischen der Funktionalität des Rezeptors und der GRK2-Expression hin. Diese ist spezifisch bei Überexpression der Arg389-Variante signifikant erhöht (186).

Erkenntnisse über die GRK-Phosphorylierung des β_1 AR, ihre Stabilität und die wichtigen Stellen müssen folgen, um endgültige Aussagen über das Aktivierungsgedächtnis des β_1 AR im Hinblick auf die Phosphorylierung des Rezeptors machen zu können. Das Ausmaß der Phosphorylierung kann dabei mittels Labeling der Zellen mit radioaktiv markiertem Phosphor, Stimulation und anschließender Immunpräzipitation des Rezeptors bestimmt werden.

4.3.4 Subtyp-spezifische Kinetik der Rezeptorinternalisierung

Bei der konfokalmikroskopischen Visualisierung der Rezeptorlokalisierung wurden erhebliche Unterschiede in der Internalisierung zwischen β_1 AR und β_2 AR deutlich. Während alle Varianten des β_2 AR nach zehn bis 15 Minuten Stimulation mit Adrenalin eine sichtbare Internalisierung zeigten (Abbildung 34), war das für die Varianten des β_1 AR (stimuliert mit Noradrenalin) nicht der Fall (Abbildung 43). Letzteres steht im Einklang mit einer geringeren Affinität von β -Arrestin zum β_1 AR (245). Zusätzlich ist der β_1 -Subtyp resistenter gegen lysosomale Degradation (246) und Ubiquitinierung (247). Jedoch kann keine Aussage darüber gemacht werden, inwieweit die Rezeptoren an der Zelloberfläche noch funktionsfähig sind.

Davon abgesehen könnte für die hier beobachteten Differenzen auch ausschlaggebend sein, dass die Experimente mit zwei verschiedenen Liganden durchgeführt wurden. Adrenalin und Noradrenalin sind zwar beides Katecholamine, jedoch konnte zumindest für den β_2 AR für die beiden endogenen Liganden ein „ligand bias“ beobachtet werden (72): Der β_2 AR internalisierte nach Noradrenalin-Stimulation weniger stark im Vergleich zu Adrenalin. Dies legt nahe, die zeitliche Ausprägung des Aktivierungsgedächtnisses des β_1 AR mit anderen Agonisten, insbesondere auch mit Adrenalin, zu testen.

4.3.5 Weitere β AR-Subtyp-spezifische Phänomene

Eine weiterer Unterschied, der das differentielle Aktivierungsgedächtnis von β_1 AR und β_2 AR bedingen könnte, besteht im intrinsischen Verhalten der Rezeptoren. So ist die Basalaktivität des β_2 AR signifikant höher als die des β_1 AR (21). Eine hohe Basalaktivität geht mit einer geringeren Energiebarriere zwischen aktiven und inaktiven Zuständen einher. Dies führt zu einer größeren strukturellen Flexibilität des β_2 AR verglichen zum β_1 AR (40). Zudem gibt es auch umgekehrt Hinweise, dass Flexibilität hinsichtlich der Einnahme bestimmter Konformationen und strukturelle Instabilität erhöhte Basalaktivität ausmachen (248).

Zusätzliche regulatorische Mechanismen spezifisch im β_1 AR rühren von seiner N-terminalen Modifizierung durch sialierte O-Glykosylierung neben einer N-Glykosylierung an Asn15 und der Existenz zweier Schnittstellen für Matrixmetalloproteasen der ADAM (A Disintegrin And Metalloproteinase)-Familie im N-Terminus zwischen Arg31 und Leu32 bzw. Pro52 und Leu53. Die Spaltung wurde durch Isoprenalin-Behandlung verstärkt und resultierte bei Expression in HEK293-Zellen in zwei membrangebundenen fragmentierten Rezeptorvarianten, deren Funktionalität nicht weiter charakterisiert wurde (249).

Auch das Ausmaß der Rezeptor-Rezeptor-Interaktion differiert zwischen den Subtypen: Während β_2 AR stabile Oligomere formen, ist die Bildung von Homodimeren bei β_1 AR eher transienter Natur (202). Finale Erklärungen und Beweise für die subtyp-bedingten Differenzen im Aktivierungsgedächtnis wird wohl die Detektion der Aktivierung nativer Rezeptoren bringen. Dabei könnten durch eine Knock-in-Strategie die polymorphen Varianten untersucht werden. Ein experimenteller Ansatz bestünde auch in der Verwendung fluoreszierender Liganden, mit Hilfe derer es bereits gelungen ist, Oxytozinrezeptordimere in der Brustdrüse nachzuweisen (250).

4.4 Der Einfluss der β AR-Polymorphismen auf die Rezeptorfunktion

4.4.1 SNPs und cAMP-Bildung

Wir konnten zeigen, dass eine schnellere Aktivierungskinetik eines vorstimulierten β_2 AR in einer effizienteren Signalweiterleitung, gemessen als cAMP-Akkumulation, resultiert (Abbildung 31). Diese Daten stimmen auf den ersten Blick nicht mit Green et al. überein, die keinen Unterschied in der basalen und agonistinduzierten Adenylatzyklaseaktivierung in Abhängigkeit der N-terminalen β_2 AR Polymorphismen feststellten (189). Letztere Messungen wurden allerdings an isolierten Membranen durchgeführt. Dem experimentellen Ansatz fehlt also die Interaktion mit löslichen intrazellulären Proteinen und die Phosphorylierung, und damit die funktionelle Basis des Rezeptorgedächtnisses. Unsere cAMP-Messungen wurden an intakten Zellen durchgeführt, somit intrazellulär und im physiologischen Umfeld.

Darüber hinaus wurde die cAMP-Bildung in weiteren Studien nach Langzeitstimulation (>24 h) der endogenen Rezeptoren bestimmt, einer Zeitspanne, in der das Rezeptorgedächtnis schon längst durch Desensibilisierungsvorgänge überlagert wird. Dies resultierte zumeist in keinem signifikanten Unterschied zwischen den Varianten (251-253).

Der funktionelle Effekt der SNPs im β_1 AR wurde in dieser Arbeit nicht untersucht, doch finden sich hier in der Literatur bereits deutliche Hinweise für eine Hyperfunktionalität der Arg389-Variante sowie des Gly49Arg389-Haplotyps, was der Lage von Position 389 in der G-Protein-Bindungsdomäne (Helix 8 des β_1 AR in G-Protein-Bindung involviert (254)) und der daraus resultierenden verstärkten Kopplung an G_s zugeschrieben wird (177, 181). Dies wäre analog zum β_2 AR, auch hier ist die schneller werdende Variante funktionell effizienter.

4.4.2 Relevanz der SNPs für die Klinik

Zahlreiche Studien analysierten die physiologische, pharmakologische und klinische Relevanz der SNPs Arg16Gly, Gln27Glu und Thr164Ile im β_2 AR. Methodische Probleme, besonders in Bezug auf Kohortengröße, ihre Heterogenität, ethnische Unterschiede und die häufig fehlende Reproduzierbarkeit der Ergebnisse machen es schwer, ihre klinische Relevanz einzuordnen.

Wir haben hier den therapeutischen Effekt des β_2 -Agonisten Fenoterol appliziert bei Tokolyse untersucht. Neben Fenoterol werden auch Ritodrin, Salbutamol und Terbutalin in verschiedenen Ländern häufig zur Hemmung von vorzeitigen Wehen und damit zur Verhinderung einer Frühgeburt vor der 37. Schwangerschaftswoche eingesetzt. Dieses Feld ist vergleichsweise wenig im Hinblick auf die Auswirkung von Polymorphismen erforscht. Unsere Daten zeigen eine signifikante Korrelation des tokolytischen Effekts von Fenoterol mit dem β_2 AR-SNP Arg16Gly. Bei Arg16-Trägern konnte die Geburt nicht wie gewünscht hinausgezögert werden, während das Vorhandensein von zwei Gly16-Allelen mit effizienter Verhinderung der vorzeitigen Kontraktionen einherging. Dies kann mit einer effizienteren Anschaltung intrazellulärer Signalwege, der cAMP-PKA-MLCK-Kaskade (172) interpretiert werden. Beide Gruppen, mit und ohne erfolgreiche Tokolyse, waren vergleichbar hinsichtlich des Gestationsalters und im Vorkommen von Zwillingsgeburten (Tabelle 8).

Dieses Ergebnis steht nicht im Einklang mit einer ähnlichen Studie (255), in der eine Geburtsverzögerung von mindestens 48 Stunden durch Gabe des β_2 -Agonisten Hexoprenalin als erfolgreiche Tokolysetherapie definiert wurde. Diese Studie zeigt eine Tendenz zur besseren Wirksamkeit für homozygote Arg16-Träger, die Daten sind jedoch nicht statistisch signifikant. Mögliche Erklärungen für die Diskrepanz, die getestet werden müssten, sind 1. potentiell unterschiedliche Anschaltung intrazellulärer Signalwege von Fenoterol und Hexoprenalin, 2. der ethnischer Hintergrund sowie 3. der Studienaufbau.

Darüber hinaus muss mit einbezogen werden, dass die Wirksamkeit der β_2 -Agonisten bei längerer Gabe (> 48 h) aufgrund der Desensibilisierung des β -adrenergen Systems im Myometrium abnimmt. Dabei kommt es zu einer Entkopplung der Rezeptoren von G_s (256) sowie zu einer Herabregulation der Rezeptoren an der Zelloberfläche (257). Ein wichtiger Schluss aus den hier gezeigten Ergebnissen und der Literatur ist die Notwendigkeit größerer Probandenzahlen mit definiertem ethnischen Hintergrund. Der Vergleich verschiedener β_2 -Agonisten vor dem Hintergrund des „ligand biased agonism“ erscheint genauso nötig wie die Analyse einer unabhängige Patientengruppe. Sollte sich Arg16-Träger erneut als Therapieversager herausstellen, so sind Überlegungen zur Anwendung „personalisierter Medizin“ nötig. Eine Lösung könnte in der Tokolysebehandlung von Arg16-Patientinnen mit

Atosiban, einem Oxytozinrezeptorantagonisten, sein. Diesem wird eine vergleichbare Wirksamkeit wie den β_2 -Agonisten zugeschrieben (258, 259).

Unsere Daten sind mit Beobachtungen in der glatten Muskulatur von Gefäßen (260, 261) und Bronchien (262-265) vereinbar, die zeigen, dass der Haplotyp Arg16Gln27 anfälliger für agonistinduzierte Desensibilisierung ist und einen Verlust der bronchienerweiternden und damit protektiven Effekte und eine erhöhte Frequenz der Asthmaanfälle zeigt.

Die Analyse der Tokolyseeffizienz im Hinblick auf den Genotyp der Schwangeren für den SNP Arg16Gly ist vom Rezeptorgedächtnis getrennt zu betrachten, denn es wäre zu weit gegriffen, einen kausalen Zusammenhang mit den Daten der molekularen Rezeptorpharmakologie zu sehen. Dafür müsste das Rezeptorgedächtnis bei Langzeitstimulation (das heißt über Stunden bis Tage) analysiert werden, und gleichzeitig müsste eine detaillierte quantitative Analyse der parallel ablaufenden Desensibilisierungsprozesse erfolgen.

Ein langfristiges Ziel der *in vitro* und *in vivo* Analysen sollte eine Verminderung der Variabilität der individuellen Ansprechbarkeit auf ein Pharmakon sein. Dies könnte durch die Wahl des Medikaments, das abhängig vom Genotyp den größten Therapieerfolg verspricht, erreicht werden.

5 Zusammenfassung / Summary

Die Funktionalität β_1 - und β_2 -adrenerger Rezeptoren wird durch Polymorphismen in ihrer kodierenden Region moduliert. Wir haben uns die Technik des Fluoreszenz-Resonanz-Energie-Transfers (FRET) zu Nutze gemacht, um den Einfluss der am häufigsten vorkommenden Polymorphismen (Ser49Gly und Gly389Arg im β_1 AR, Arg16Gly und Gln27Glu im β_2 AR) auf die Rezeptorkonformation nach Aktivierung zu untersuchen. Dafür wurden FRET-Sensoren für die beiden β AR-Subtypen mit einem gelb-fluoreszierenden Protein (YFP) sowie einem cyan-fluoreszierenden Protein (CFP oder Cerulean) in der dritten intrazellulären Schleife bzw. am C-Terminus verwendet. Nach Stimulierung der β AR-Sensoren konnte die Aktivierung der polymorphen Rezeptorvarianten in lebenden Zellen in Echtzeit untersucht werden. Dabei behielten die FRET-Sensoren sowohl die Bindungsaffinitäten der nativen Rezeptoren als auch eine intakte Funktionalität hinsichtlich der Bildung von sekundären Botenstoffen.

Der Vergleich der Aktivierungskinetiken der verschiedenen polymorphen Varianten des β_1 AR und β_2 AR ergab keine signifikanten Unterschiede nach einer einmaligen Stimulation. Es zeigte sich jedoch, dass Rezeptorpolymorphismen die Aktivierungskinetik vorstimulierter β AR erheblich beeinflussen. So konnten wir im Vergleich zur ersten Aktivierung eine schnellere Aktivierung der Gly16-Varianten des β_2 AR sowie des Gly49Arg389- β_1 AR feststellen, während die Arg16- β_2 AR-Variante und der Ser49Gly389- β_1 AR dagegen bei einer wiederholten Stimulation langsamer aktiviert wurden. Diese Ergebnisse lassen auf ein "Rezeptorgedächtnis" schließen, das spezifisch für bestimmte polymorphe Rezeptorvarianten ist und eine β AR-Subtyp-spezifische Ausprägung zeigt. Die Ausbildung der unterschiedlichen Aktivierungskinetiken hing von der Interaktion des Rezeptors mit löslichen intrazellulären Faktoren ab und bedurfte einer Phosphorylierung intrazellulärer Serin- und Threonin-Reste durch G-Protein-gekoppelte Rezeptorkinasen. Die Interaktion mit löslichen intrazellulären Faktoren scheint für den β_1 AR weniger stark ausgeprägt zu sein als für den β_2 AR.

Die cAMP-Produktion war für die schneller werdenden, "hyperfunktionellen" Gly16- β_2 AR-Varianten signifikant um mehr als 50% höher im Vergleich zur "hypofunktionellen" Arg16-Variante. Die unterschiedliche Funktionalität spiegelte sich im Therapieausgang bei Tokoysepatientinnen wider, dessen Erfolg mit dem Arg16Gly Polymorphismus verknüpft war. Die Daten implizieren eine intrinsische, polymorphismusabhängige Eigenschaft der β AR, die die Aktivierungskinetik der Rezeptoren bei wiederholten Stimulationen determiniert. Diese könnte auch für die zwischen Individuen variierende Ansprechbarkeit auf β -Agonisten und β -Blocker mitverantwortlich sein.

Signaling through G protein-coupled receptors is known to be influenced by receptor polymorphisms, yet the molecular basis for the functional differences is unclear.

To investigate the impact of the most frequent polymorphic sites of the β_1 - and the β_2 -adrenergic receptor (Ser49Gly and Gly389Arg for β_1 AR, Arg16Gly and Gln27Glu for β_2 AR) on receptor conformation we used a fluorescence resonance energy transfer (FRET) based approach. We made use of β AR-FRET sensors with a yellow fluorescent protein (YFP) inserted into the third intracellular loop and a cyan fluorescent protein (CFP or Cerulean) fused to the C-terminal tail of the β AR. These sensors retained key pharmacological and functional characteristics of the native receptors.

Upon stimulation of the sensors we determined the activation characteristics of the polymorphic receptors in real time and in living cells and found that β AR respond to repeated activation with a change of their activation kinetics during subsequent stimulations. This phenomenon differed between polymorphic variants of the β AR. The “hyperfunctional” Gly16- β_2 AR variants as well as the Gly49Arg389- β_1 AR became faster in their activation kinetics, while the “hypofunctional” Arg16- β_2 AR and the Ser49Gly389- β_1 AR became slower compared to their initial activation. These differences depended on the interaction with soluble cytosolic factors that occurred after the initial activation, and on the phosphorylation of agonist-bound receptors through G protein-coupled receptor kinases. The “memory“ of previous activation is formed already after a first stimulation of only five seconds, whereas the β_1 AR memory necessitates prestimulation for five minutes and seems to be based on a less stable interaction with intracellular proteins compared to the β_2 AR.

Assuming short-lived and repetitive receptor-ligand interaction under native conditions, we hypothesized that faster activation during single ligand-receptor interaction represents the basis for more effective signaling to downstream effectors. Indeed, the extent of cAMP formation was enhanced by 50% upon stimulation of the Gly16- β_2 AR compared to the Arg16 variant. The different functionality reflected the outcome of tocolysis treatment with the β_2 -agonist fenoterol whose success correlated with the Arg16Gly genotype of the patients.

Our findings suggest an intrinsic, polymorphism-specific property of the β AR that alters activation kinetics upon continued stimulation and that might account for individual drug responses.

6 Literaturverzeichnis

1. Dorn GW 2nd. 2010. Adrenergic signaling polymorphisms and their impact on cardiovascular disease. *Physiol Rev* 90:1013-62
2. Pierce KL, Premont RT, Lefkowitz RJ. 2002. Seven-transmembrane receptors. *Nat Rev Mol Cell Biol* 3:639-50
3. Takeda S, Kadowaki S, Haga T, Takaesu H, Mitaku S. 2002. Identification of G protein-coupled receptor genes from the human genome sequence. *FEBS Lett* 520:97-101
4. Fredriksson R, Lagerstrom MC, Lundin LG, Schioth HB. 2003. The G-protein-coupled receptors in the human genome form five main families. Phylogenetic analysis, paralogon groups, and fingerprints. *Mol Pharmacol* 63:1256-72
5. Foord SM, Bonner TI, Neubig RR, Rosser EM, Pin JP, Davenport AP, Spedding M, Harmar AJ. 2005. International Union of Pharmacology. XLVI. G protein-coupled receptor list. *Pharmacol Rev* 57:279-88
6. Kolakowski LJ. 1994. GCRDb: a G-protein-coupled receptor database. *Receptors Channels* 2:1-7
7. Dixon RA, Kobilka BK, Strader DJ, Benovic JL, Dohlman HG, Frielle T, Bolanowski MA, Bennett CD, Rands E, Diehl RE, Mumford RA, Slater EE, Sigal IS, Caron MG, Lefkowitz RJ, Strader CD. 1986. Cloning of the gene and cDNA for mammalian beta-adrenergic receptor and homology with rhodopsin. *Nature* 321:75-9
8. Lefkowitz RJ. 2000. The superfamily of heptahelical receptors. *Nat Cell Biol* 2:E133-6
9. Palczewski K, Kumasaka T, Hori T, Behnke CA, Motoshima H, Fox BA, Le Trong I, Teller DC, Okada T, Stenkamp RE, Yamamoto M, Miyano M. 2000. Crystal structure of rhodopsin: A G protein-coupled receptor. *Science* 289:739-45
10. Strader CD, Fong TM, Graziano MP, Tota MR. 1995. The family of G-protein-coupled receptors. *FASEB J* 9:745-54
11. Lefkowitz RJ. 2007. Seven transmembrane receptors: something old, something new. *Acta Physiol (Oxf)* 190:9-19
12. Cramer H, Schmenger K, Heinrich K, Horstmeyer A, Boning H, Breit A, Piiper A, Lundstrom K, Muller-Esterl W, Schroeder C. 2001. Coupling of endothelin receptors to the ERK/MAP kinase pathway. Roles of palmitoylation and G(alpha)q. *Eur J Biochem* 268:5449-59
13. Warne T, Serrano-Vega MJ, Baker JG, Moukhametzianov R, Edwards PC, Henderson R, Leslie AG, Tate CG, Schertler GF. 2008. Structure of a beta1-adrenergic G-protein-coupled receptor. *Nature* 454:486-91
14. Ji TH, Grossmann M, Ji I. 1998. G protein-coupled receptors. I. Diversity of receptor-ligand interactions. *J Biol Chem* 273:17299-302
15. Overington JP, Al-Lazikani B, Hopkins AL. 2006. How many drug targets are there? *Nat Rev Drug Discov* 5:993-6
16. Frielle T, Collins S, Daniel KW, Caron MG, Lefkowitz RJ, Kobilka BK. 1987. Cloning of the cDNA for the human beta 1-adrenergic receptor. *Proc Natl Acad Sci U S A* 84:7920-4
17. Kobilka BK, Dixon RA, Frielle T, Dohlman HG, Bolanowski MA, Sigal IS, Yan-Feng TL, Francke U, Caron MG, Lefkowitz RJ. 1987. cDNA for the human beta 2-

- adrenergic receptor: a protein with multiple membrane-spanning domains and encoded by a gene whose chromosomal location is shared with that of the receptor for platelet-derived growth factor. *Proc Natl Acad Sci U S A* 84:46-50
18. Cheng Y, Prusoff WH. 1973. Relationship between the inhibition constant (K₁) and the concentration of inhibitor which causes 50 per cent inhibition (I₅₀) of an enzymatic reaction. *Biochem Pharmacol* 22:3099-108
 19. Hoffmann C, Leitz MR, Oberdorf-Maass S, Lohse MJ, Klotz KN. 2004. Comparative pharmacology of human beta-adrenergic receptor subtypes--characterization of stably transfected receptors in CHO cells. *Naunyn Schmiedeberg's Arch Pharmacol* 369:151-9
 20. De Lean A, Stadel JM, Lefkowitz RJ. 1980. A ternary complex model explains the agonist-specific binding properties of the adenylate cyclase-coupled beta-adrenergic receptor. *J Biol Chem* 255:7108-17
 21. Engelhardt S, Grimmer Y, Fan GH, Lohse MJ. 2001. Constitutive activity of the human beta(1)-adrenergic receptor in beta(1)-receptor transgenic mice. *Mol Pharmacol* 60:712-7
 22. Stephenson RP. 1956. A modification of receptor theory. *Br J Pharmacol Chemother* 11:379-93
 23. Chidiac P, Hebert TE, Valiquette M, Dennis M, Bouvier M. 1994. Inverse agonist activity of beta-adrenergic antagonists. *Mol Pharmacol* 45:490-9
 24. Bond RA, Leff P, Johnson TD, Milano CA, Rockman HA, McMinn TR, Apparsundaram S, Hyek MF, Kenakin TP, Allen LF, Lefkowitz RJ. 1995. Physiological effects of inverse agonists in transgenic mice with myocardial overexpression of the beta 2-adrenoceptor. *Nature* 374:272-6
 25. Altenbach C, Yang K, Farrens DL, Farahbakhsh ZT, Khorana HG, Hubbell WL. 1996. Structural features and light-dependent changes in the cytoplasmic interhelical E-F loop region of rhodopsin: a site-directed spin-labeling study. *Biochemistry* 35:12470-8
 26. Dunham TD, Farrens DL. 1999. Conformational changes in rhodopsin. Movement of helix f detected by site-specific chemical labeling and fluorescence spectroscopy. *J Biol Chem* 274:1683-90
 27. Farrens DL, Altenbach C, Yang K, Hubbell WL, Khorana HG. 1996. Requirement of rigid-body motion of transmembrane helices for light activation of rhodopsin. *Science* 274:768-70
 28. Sheikh SP, Zvyaga TA, Lichtarge O, Sakmar TP, Bourne HR. 1996. Rhodopsin activation blocked by metal-ion-binding sites linking transmembrane helices C and F. *Nature* 383:347-50
 29. Wieland K, Zuurmond HM, Krasel C, Ijzerman AP, Lohse MJ. 1996. Involvement of Asn-293 in stereospecific agonist recognition and in activation of the beta 2-adrenergic receptor. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93:9276-81
 30. Zuurmond HM, Hessling J, Bluml K, Lohse M, Ijzerman AP. 1999. Study of interaction between agonists and asn293 in helix VI of human beta(2)-adrenergic receptor. *Mol Pharmacol* 56:909-16
 31. Gether U, Lin S, Kobilka BK. 1995. Fluorescent labeling of purified beta 2 adrenergic receptor. Evidence for ligand-specific conformational changes. *J Biol Chem* 270:28268-75

32. Gether U, Lin S, Ghanouni P, Ballesteros JA, Weinstein H, Kobilka BK. 1997. Agonists induce conformational changes in transmembrane domains III and VI of the beta2 adrenoceptor. *EMBO J* 16:6737-47
33. Jensen AD, Guarnieri F, Rasmussen SG, Asmar F, Ballesteros JA, Gether U. 2001. Agonist-induced conformational changes at the cytoplasmic side of transmembrane segment 6 in the beta 2 adrenergic receptor mapped by site-selective fluorescent labeling. *J Biol Chem* 276:9279-90
34. Ghanouni P, Steenhuis JJ, Farrens DL, Kobilka BK. 2001. Agonist-induced conformational changes in the G-protein-coupling domain of the beta 2 adrenergic receptor. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98:5997-6002
35. Elling CE, Frimurer TM, Gerlach LO, Jorgensen R, Holst B, Schwartz TW. 2006. Metal ion site engineering indicates a global toggle switch model for seven-transmembrane receptor activation. *J Biol Chem* 281:17337-46
36. Ghanouni P, Gryczynski Z, Steenhuis JJ, Lee TW, Farrens DL, Lakowicz JR, Kobilka BK. 2001. Functionally different agonists induce distinct conformations in the G protein coupling domain of the beta 2 adrenergic receptor. *J Biol Chem* 276:24433-6
37. Shi L, Liapakis G, Xu R, Guarnieri F, Ballesteros JA, Javitch JA. 2002. Beta2 adrenergic receptor activation. Modulation of the proline kink in transmembrane 6 by a rotamer toggle switch. *J Biol Chem* 277:40989-96
38. Vogel R, Mahalingam M, Ludeke S, Huber T, Siebert F, Sakmar TP. 2008. Functional role of the "ionic lock"--an interhelical hydrogen-bond network in family A heptahelical receptors. *J Mol Biol* 380:648-55
39. Ballesteros JA, Weinstein H. 1995. Integrated methods for the construction of three-dimensional models and computational probing of structure-function relations in G protein-coupled receptors. *Methods in Neurosciences* 25:366-428
40. Deupi X, Kobilka B. 2007. Activation of G protein-coupled receptors. *Adv Protein Chem* 74:137-66
41. Swaminath G, Xiang Y, Lee TW, Steenhuis J, Parnot C, Kobilka BK. 2004. Sequential binding of agonists to the beta2 adrenoceptor. Kinetic evidence for intermediate conformational states. *J Biol Chem* 279:686-91
42. Swaminath G, Deupi X, Lee TW, Zhu W, Thian FS, Kobilka TS, Kobilka B. 2005. Probing the beta2 adrenoceptor binding site with catechol reveals differences in binding and activation by agonists and partial agonists. *J Biol Chem* 280:22165-71
43. Yao X, Parnot C, Deupi X, Ratnala VR, Swaminath G, Farrens D, Kobilka B. 2006. Coupling ligand structure to specific conformational switches in the beta2-adrenoceptor. *Nat Chem Biol* 2:417-22
44. Luttrell LM, Ferguson SS, Daaka Y, Miller WE, Maudsley S, Della Rocca GJ, Lin F, Kawakatsu H, Owada K, Luttrell DK, Caron MG, Lefkowitz RJ. 1999. Beta-arrestin-dependent formation of beta2 adrenergic receptor-Src protein kinase complexes. *Science* 283:655-61
45. Kenakin T. 2002. Efficacy at G-protein-coupled receptors. *Nat Rev Drug Discov* 1:103-10
46. Kenakin T. 2003. Ligand-selective receptor conformations revisited: the promise and the problem. *Trends Pharmacol Sci* 24:346-54
47. Rajagopal S, Rajagopal K, Lefkowitz RJ. 2010. Teaching old receptors new tricks: biasing seven-transmembrane receptors. *Nat Rev Drug Discov* 9:373-86

48. Park JH, Scheerer P, Hofmann KP, Choe HW, Ernst OP. 2008. Crystal structure of the ligand-free G-protein-coupled receptor opsin. *Nature* 454:183-7
49. Scheerer P, Park JH, Hildebrand PW, Kim YJ, Krauss N, Choe HW, Hofmann KP, Ernst OP. 2008. Crystal structure of opsin in its G-protein-interacting conformation. *Nature* 455:497-502
50. Choe HW, Kim YJ, Park JH, Morizumi T, Pai EF, Krauss N, Hofmann KP, Scheerer P, Ernst OP. 2011. Crystal structure of metarhodopsin II. *Nature* 471:651-5
51. Cherezov V, Rosenbaum DM, Hanson MA, Rasmussen SG, Thian FS, Kobilka TS, Choi HJ, Kuhn P, Weis WI, Kobilka BK, Stevens RC. 2007. High-resolution crystal structure of an engineered human beta2-adrenergic G protein-coupled receptor. *Science* 318:1258-65
52. Rasmussen SG, Choi HJ, Rosenbaum DM, Kobilka TS, Thian FS, Edwards PC, Burghammer M, Ratnala VR, Sanishvili R, Fischetti RF, Schertler GF, Weis WI, Kobilka BK. 2007. Crystal structure of the human beta2 adrenergic G-protein-coupled receptor. *Nature* 450:383-7
53. Rosenbaum DM, Cherezov V, Hanson MA, Rasmussen SG, Thian FS, Kobilka TS, Choi HJ, Yao XJ, Weis WI, Stevens RC, Kobilka BK. 2007. GPCR engineering yields high-resolution structural insights into beta2-adrenergic receptor function. *Science* 318:1266-73
54. Rosenbaum DM, Zhang C, Lyons JA, Holl R, Aragao D, Arlow DH, Rasmussen SG, Choi HJ, Devree BT, Sunahara RK, Chae PS, Gellman SH, Dror RO, Shaw DE, Weis WI, Caffrey M, Gmeiner P, Kobilka BK. 2011. Structure and function of an irreversible agonist-beta(2) adrenoceptor complex. *Nature* 469:236-40
55. Rasmussen SG, Choi HJ, Fung JJ, Pardon E, Casarosa P, Chae PS, Devree BT, Rosenbaum DM, Thian FS, Kobilka TS, Schnapp A, Konetzki I, Sunahara RK, Gellman SH, Pautsch A, Steyaert J, Weis WI, Kobilka BK. 2011. Structure of a nanobody-stabilized active state of the beta(2) adrenoceptor. *Nature* 469:175-80
56. Rasmussen SG, Devree BT, Zou Y, Kruse AC, Chung KY, Kobilka TS, Thian FS, Chae PS, Pardon E, Calinski D, Mathiesen JM, Shah ST, Lyons JA, Caffrey M, Gellman SH, Steyaert J, Skiniotis G, Weis WI, Sunahara RK, Kobilka BK. 2011. Crystal structure of the beta(2) adrenergic receptor-Gs protein complex. *Nature*
57. Warne T, Moukhametzianov R, Baker JG, Nehme R, Edwards PC, Leslie AG, Schertler GF, Tate CG. 2011. The structural basis for agonist and partial agonist action on a beta(1)-adrenergic receptor. *Nature* 469:241-4
58. Jaakola VP, Griffith MT, Hanson MA, Cherezov V, Chien EY, Lane JR, Ijzerman AP, Stevens RC. 2008. The 2.6 angstrom crystal structure of a human A2A adenosine receptor bound to an antagonist. *Science* 322:1211-7
59. Xu F, Wu H, Katritch V, Han GW, Jacobson KA, Gao ZG, Cherezov V, Stevens RC. 2011. Structure of an agonist-bound human A2A adenosine receptor. *Science* 332:322-7
60. Granier S, Kim S, Shafer AM, Ratnala VR, Fung JJ, Zare RN, Kobilka B. 2007. Structure and conformational changes in the C-terminal domain of the beta2-adrenoceptor: insights from fluorescence resonance energy transfer studies. *J Biol Chem* 282:13895-905
61. Yao XJ, Velez Ruiz G, Whorton MR, Rasmussen SG, DeVree BT, Deupi X, Sunahara RK, Kobilka B. 2009. The effect of ligand efficacy on the formation and stability of a GPCR-G protein complex. *Proc Natl Acad Sci U S A* 106:9501-6

62. Serrano-Vega MJ, Magnani F, Shibata Y, Tate CG. 2008. Conformational thermostabilization of the beta1-adrenergic receptor in a detergent-resistant form. *Proc Natl Acad Sci U S A* 105:877-82
63. Kobilka BK. 2011. Structural insights into adrenergic receptor function and pharmacology. *Trends Pharmacol Sci* 32:213-8
64. Shimomura O, Johnson FH, Saiga Y. 1963. Microdetermination of Calcium by Aequorin Luminescence. *Science* 140:1339-40
65. Tsien RY. 1998. The green fluorescent protein. *Annu Rev Biochem* 67:509-44
66. Chudakov DM, Matz MV, Lukyanov S, Lukyanov KA. 2010. Fluorescent proteins and their applications in imaging living cells and tissues. *Physiol Rev* 90:1103-63
67. Förster T. 1948. *Zwischenmolekulare Energiewanderung und Fluoreszenz*. *Ann. Physik.* 437:55-75
68. Lohse MJ, Nikolaev VO, Hein P, Hoffmann C, Vildardaga JP, Bunemann M. 2008. Optical techniques to analyze real-time activation and signaling of G-protein-coupled receptors. *Trends Pharmacol Sci* 29:159-65
69. Vildardaga JP, Bunemann M, Krasel C, Castro M, Lohse MJ. 2003. Measurement of the millisecond activation switch of G protein-coupled receptors in living cells. *Nat Biotechnol* 21:807-12
70. Rochais F, Vildardaga JP, Nikolaev VO, Bunemann M, Lohse MJ, Engelhardt S. 2007. Real-time optical recording of beta1-adrenergic receptor activation reveals supersensitivity of the Arg389 variant to carvedilol. *J Clin Invest* 117:229-35
71. Nakanishi J, Takarada T, Yunoki S, Kikuchi Y, Maeda M. 2006. FRET-based monitoring of conformational change of the beta2 adrenergic receptor in living cells. *Biochem Biophys Res Commun* 343:1191-6
72. Reiner S, Ambrosio M, Hoffmann C, Lohse MJ. 2010. Differential signaling of the endogenous agonists at the beta2-adrenergic receptor. *J Biol Chem* 285:36188-98
73. Nikolaev VO, Hoffmann C, Bunemann M, Lohse MJ, Vildardaga JP. 2006. Molecular basis of partial agonism at the neurotransmitter alpha2A-adrenergic receptor and Gi-protein heterotrimer. *J Biol Chem* 281:24506-11
74. Lohse MJ, Hein P, Hoffmann C, Nikolaev VO, Vildardaga JP, Bunemann M. 2008. Kinetics of G-protein-coupled receptor signals in intact cells. *Br J Pharmacol* 153 Suppl 1:S125-32
75. Rizzo MA, Springer GH, Granada B, Piston DW. 2004. An improved cyan fluorescent protein variant useful for FRET. *Nat Biotechnol* 22:445-9
76. Orly J, Schramm M. 1976. Coupling of catecholamine receptor from one cell with adenylate cyclase from another cell by cell fusion. *Proc Natl Acad Sci U S A* 73:4410-4
77. Tolkovsky AM, Levitzki A. 1978. Mode of coupling between the beta-adrenergic receptor and adenylate cyclase in turkey erythrocytes. *Biochemistry* 17:3795
78. Tolkovsky AM, Levitzki A. 1978. Coupling of a single adenylate cyclase to two receptors: adenosine and catecholamine. *Biochemistry* 17:3811-7
79. Wreggett KA, De Lean A. 1984. The ternary complex model. Its properties and application to ligand interactions with the D2-dopamine receptor of the anterior pituitary gland. *Mol Pharmacol* 26:214-27

80. Neubig RR, Gantz RD, Thomsen WJ. 1988. Mechanism of agonist and antagonist binding to alpha 2 adrenergic receptors: evidence for a precoupled receptor-guanine nucleotide protein complex. *Biochemistry* 27:2374-84
81. Morris AJ, Malbon CC. 1999. Physiological regulation of G protein-linked signaling. *Physiol Rev* 79:1373-430
82. De Vries L, Zheng B, Fischer T, Elenko E, Farquhar MG. 2000. The regulator of G protein signaling family. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 40:235-71
83. Lambert NA, Johnston CA, Cappell SD, Kuravi S, Kimple AJ, Willard FS, Siderovski DP. 2010. Regulators of G-protein signaling accelerate GPCR signaling kinetics and govern sensitivity solely by accelerating GTPase activity. *Proc Natl Acad Sci U S A* 107:7066-71
84. Hein P, Frank M, Hoffmann C, Lohse MJ, Bunemann M. 2005. Dynamics of receptor/G protein coupling in living cells. *EMBO J* 24:4106-14
85. Hein P, Rochais F, Hoffmann C, Dorsch S, Nikolaev VO, Engelhardt S, Berlot CH, Lohse MJ, Bunemann M. 2006. Gs activation is time-limiting in initiating receptor-mediated signaling. *J Biol Chem* 281:33345-51
86. Nobles M, Benians A, Tinker A. 2005. Heterotrimeric G proteins precouple with G protein-coupled receptors in living cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102:18706-11
87. Janetopoulos C, Jin T, Devreotes P. 2001. Receptor-mediated activation of heterotrimeric G-proteins in living cells. *Science* 291:2408-11
88. Bunemann M, Frank M, Lohse MJ. 2003. Gi protein activation in intact cells involves subunit rearrangement rather than dissociation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100:16077-82
89. Yi TM, Kitano H, Simon MI. 2003. A quantitative characterization of the yeast heterotrimeric G protein cycle. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100:10764-9
90. Azpiazu I, Gautam N. 2004. A fluorescence resonance energy transfer-based sensor indicates that receptor access to a G protein is unrestricted in a living mammalian cell. *J Biol Chem* 279:27709-18
91. Hamm HE. 1998. The many faces of G protein signaling. *J Biol Chem* 273:669-72
92. Cabrera-Vera TM, Vanhauwe J, Thomas TO, Medkova M, Preinerger A, Mazzoni MR, Hamm HE. 2003. Insights into G protein structure, function, and regulation. *Endocr Rev* 24:765-81
93. Simon MI, Strathmann MP, Gautam N. 1991. Diversity of G proteins in signal transduction. *Science* 252:802-8
94. Offermanns S. 2003. G-proteins as transducers in transmembrane signalling. *Prog Biophys Mol Biol* 83:101-30
95. Hakak Y, Shrestha D, Goegel MC, Behan DP, Chalmers DT. 2003. Global analysis of G-protein-coupled receptor signaling in human tissues. *FEBS Lett* 550:11-7
96. Daaka Y, Luttrell LM, Lefkowitz RJ. 1997. Switching of the coupling of the beta2-adrenergic receptor to different G proteins by protein kinase A. *Nature* 390:88-91
97. Zaccolo M, De Giorgi F, Cho CY, Feng L, Knapp T, Negulescu PA, Taylor SS, Tsien RY, Pozzan T. 2000. A genetically encoded, fluorescent indicator for cyclic AMP in living cells. *Nat Cell Biol* 2:25-9

98. Nikolaev VO, Bunemann M, Hein L, Hannawacker A, Lohse MJ. 2004. Novel single chain cAMP sensors for receptor-induced signal propagation. *J Biol Chem* 279:37215-8
99. Brodde OE, Michel MC. 1999. Adrenergic and muscarinic receptors in the human heart. *Pharmacol Rev* 51:651-90
100. Bouvier M, Hausdorff WP, De Blasi A, O'Dowd BF, Kobilka BK, Caron MG, Lefkowitz RJ. 1988. Removal of phosphorylation sites from the beta 2-adrenergic receptor delays onset of agonist-promoted desensitization. *Nature* 333:370-3
101. Hausdorff WP, Bouvier M, O'Dowd BF, Irons GP, Caron MG, Lefkowitz RJ. 1989. Phosphorylation sites on two domains of the beta 2-adrenergic receptor are involved in distinct pathways of receptor desensitization. *J Biol Chem* 264:12657-65
102. Lohse MJ, Benovic JL, Caron MG, Lefkowitz RJ. 1990. Multiple pathways of rapid beta 2-adrenergic receptor desensitization. Delineation with specific inhibitors. *J Biol Chem* 265:3202-11
103. Lohse MJ, Benovic JL, Codina J, Caron MG, Lefkowitz RJ. 1990. beta-Arrestin: a protein that regulates beta-adrenergic receptor function. *Science* 248:1547-50
104. Oakley RH, Laporte SA, Holt JA, Barak LS, Caron MG. 1999. Association of beta-arrestin with G protein-coupled receptors during clathrin-mediated endocytosis dictates the profile of receptor resensitization. *J Biol Chem* 274:32248-57
105. Anborgh PH, Seachrist JL, Dale LB, Ferguson SS. 2000. Receptor/beta-arrestin complex formation and the differential trafficking and resensitization of beta2-adrenergic and angiotensin II type 1A receptors. *Mol Endocrinol* 14:2040-53
106. Doss RC, Perkins JP, Harden TK. 1981. Recovery of beta-adrenergic receptors following long term exposure of astrocytoma cells to catecholamine. Role of protein synthesis. *J Biol Chem* 256:12281-6
107. Hadcock JR, Malbon CC. 1988. Down-regulation of beta-adrenergic receptors: agonist-induced reduction in receptor mRNA levels. *Proc Natl Acad Sci U S A* 85:5021-5
108. Valiquette M, Bonin H, Hnatowich M, Caron MG, Lefkowitz RJ, Bouvier M. 1990. Involvement of tyrosine residues located in the carboxyl tail of the human beta 2-adrenergic receptor in agonist-induced down-regulation of the receptor. *Proc Natl Acad Sci U S A* 87:5089-93
109. Valiquette M, Parent S, Loisel TP, Bouvier M. 1995. Mutation of tyrosine-141 inhibits insulin-promoted tyrosine phosphorylation and increased responsiveness of the human beta 2-adrenergic receptor. *EMBO J* 14:5542-9
110. Jockers R, Angers S, Da Silva A, Benaroch P, Strosberg AD, Bouvier M, Marullo S. 1999. Beta(2)-adrenergic receptor down-regulation. Evidence for a pathway that does not require endocytosis. *J Biol Chem* 274:28900-8
111. Fredericks ZL, Pitcher JA, Lefkowitz RJ. 1996. Identification of the G protein-coupled receptor kinase phosphorylation sites in the human beta2-adrenergic receptor. *J Biol Chem* 271:13796-803
112. Hausdorff WP, Campbell PT, Ostrowski J, Yu SS, Caron MG, Lefkowitz RJ. 1991. A small region of the beta-adrenergic receptor is selectively involved in its rapid regulation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 88:2979-83

113. Seibold A, January BG, Friedman J, Hipkin RW, Clark RB. 1998. Desensitization of beta2-adrenergic receptors with mutations of the proposed G protein-coupled receptor kinase phosphorylation sites. *J Biol Chem* 273:7637-42
114. Trester-Zedlitz M, Burlingame A, Kobilka B, von Zastrow M. 2005. Mass spectrometric analysis of agonist effects on posttranslational modifications of the beta-2 adrenoceptor in mammalian cells. *Biochemistry* 44:6133-43
115. Nobles KN, Xiao K, Ahn S, Shukla AK, Lam CM, Rajagopal S, Strachan RT, Huang TY, Bressler EA, Hara MR, Shenoy SK, Gygi SP, Lefkowitz RJ. 2011. Distinct Phosphorylation Sites on the {beta}2-Adrenergic Receptor Establish a Barcode That Encodes Differential Functions of {beta}-Arrestin. *Sci Signal* 4:ra51
116. Krupnick JG, Benovic JL. 1998. The role of receptor kinases and arrestins in G protein-coupled receptor regulation. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 38:289-319
117. Benovic JL, Onorato JJ, Arriza JL, Stone WC, Lohse M, Jenkins NA, Gilbert DJ, Copeland NG, Caron MG, Lefkowitz RJ. 1991. Cloning, expression, and chromosomal localization of beta-adrenergic receptor kinase 2. A new member of the receptor kinase family. *J Biol Chem* 266:14939-46
118. Benovic JL, Strasser RH, Caron MG, Lefkowitz RJ. 1986. Beta-adrenergic receptor kinase: identification of a novel protein kinase that phosphorylates the agonist-occupied form of the receptor. *Proc Natl Acad Sci U S A* 83:2797-801
119. Pitcher JA, Freedman NJ, Lefkowitz RJ. 1998. G protein-coupled receptor kinases. *Annu Rev Biochem* 67:653-92
120. Lorenz W, Inglese J, Palczewski K, Onorato JJ, Caron MG, Lefkowitz RJ. 1991. The receptor kinase family: primary structure of rhodopsin kinase reveals similarities to the beta-adrenergic receptor kinase. *Proc Natl Acad Sci U S A* 88:8715-9
121. Benovic JL, DeBlasi A, Stone WC, Caron MG, Lefkowitz RJ. 1989. Beta-adrenergic receptor kinase: primary structure delineates a multigene family. *Science* 246:235-40
122. Ambrose C, James M, Barnes G, Lin C, Bates G, Altherr M, Duyao M, Groot N, Church D, Wasmuth JJ, Lehrach H, Housman D, Buckler A, Gusella JF, MacDonald ME. 1992. A novel G protein-coupled receptor kinase gene cloned from 4p16.3. *Hum Mol Genet* 1:697-703
123. Kunapuli P, Benovic JL. 1993. Cloning and expression of GRK5: a member of the G protein-coupled receptor kinase family. *Proc Natl Acad Sci U S A* 90:5588-92
124. Premont RT, Koch WJ, Inglese J, Lefkowitz RJ. 1994. Identification, purification, and characterization of GRK5, a member of the family of G protein-coupled receptor kinases. *J Biol Chem* 269:6832-41
125. Benovic JL, Gomez J. 1993. Molecular cloning and expression of GRK6. A new member of the G protein-coupled receptor kinase family. *J Biol Chem* 268:19521-7
126. Weiss ER, Raman D, Shirakawa S, Ducceschi MH, Bertram PT, Wong F, Kraft TW, Osawa S. 1998. The cloning of GRK7, a candidate cone opsin kinase, from cone- and rod-dominant mammalian retinas. *Mol Vis* 4:27
127. Shinohara T, Dietzschold B, Craft CM, Wistow G, Early JJ, Donoso LA, Horwitz J, Tao R. 1987. Primary and secondary structure of bovine retinal S antigen (48-kDa protein). *Proc Natl Acad Sci U S A* 84:6975-9
128. Yamaki K, Takahashi Y, Sakuragi S, Matsubara K. 1987. Molecular cloning of the S-antigen cDNA from bovine retina. *Biochem Biophys Res Commun* 142:904-10

129. Attramadal H, Arriza JL, Aoki C, Dawson TM, Codina J, Kwatra MM, Snyder SH, Caron MG, Lefkowitz RJ. 1992. Beta-arrestin2, a novel member of the arrestin/beta-arrestin gene family. *J Biol Chem* 267:17882-90
130. Murakami A, Yajima T, Sakuma H, McLaren MJ, Inana G. 1993. X-arrestin: a new retinal arrestin mapping to the X chromosome. *FEBS Lett* 334:203-9
131. Craft CM, Whitmore DH, Wiechmann AF. 1994. Cone arrestin identified by targeting expression of a functional family. *J Biol Chem* 269:4613-9
132. Benovic JL, Kuhn H, Weyand I, Codina J, Caron MG, Lefkowitz RJ. 1987. Functional desensitization of the isolated beta-adrenergic receptor by the beta-adrenergic receptor kinase: potential role of an analog of the retinal protein arrestin (48-kDa protein). *Proc Natl Acad Sci U S A* 84:8879-82
133. Sterne-Marr R, Gurevich VV, Goldsmith P, Bodine RC, Sanders C, Donoso LA, Benovic JL. 1993. Polypeptide variants of beta-arrestin and arrestin3. *J Biol Chem* 268:15640-8
134. Dawson TM, Arriza JL, Jaworsky DE, Borisy FF, Attramadal H, Lefkowitz RJ, Ronnett GV. 1993. Beta-adrenergic receptor kinase-2 and beta-arrestin-2 as mediators of odorant-induced desensitization. *Science* 259:825-9
135. Oakley RH, Laporte SA, Holt JA, Caron MG, Barak LS. 2000. Differential affinities of visual arrestin, beta arrestin1, and beta arrestin2 for G protein-coupled receptors delineate two major classes of receptors. *J Biol Chem* 275:17201-10
136. Krasel C, Bunemann M, Lorenz K, Lohse MJ. 2005. Beta-arrestin binding to the beta2-adrenergic receptor requires both receptor phosphorylation and receptor activation. *J Biol Chem* 280:9528-35
137. Goodman OJ, Krupnick J, Santini F, Gurevich V, Penn R, Gagnon AW, Keen JH, Benovic JL. 1996. Beta-arrestin acts as a clathrin adaptor in endocytosis of the beta2-adrenergic receptor. *Nature* 383:447-50
138. Laporte SA, Oakley RH, Zhang J, Holt JA, Ferguson SS, Caron MG, Barak LS. 1999. The beta2-adrenergic receptor/betaarrestin complex recruits the clathrin adaptor AP-2 during endocytosis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96:3712-7
139. Hanyaloglu AC, von Zastrow M. 2008. Regulation of GPCRs by endocytic membrane trafficking and its potential implications. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 48:537-68
140. Xiang Y, Devic E, Kobilka B. 2002. The PDZ binding motif of the beta 1 adrenergic receptor modulates receptor trafficking and signaling in cardiac myocytes. *J Biol Chem* 277:33783-90
141. Rapacciuolo A, Suvarna S, Barki-Harrington L, Luttrell LM, Cong M, Lefkowitz RJ, Rockman HA. 2003. Protein kinase A and G protein-coupled receptor kinase phosphorylation mediates beta-1 adrenergic receptor endocytosis through different pathways. *J Biol Chem* 278:35403-11
142. Penela P, Ribas C, Mayor F Jr. 2003. Mechanisms of regulation of the expression and function of G protein-coupled receptor kinases. *Cell Signal* 15:973-81
143. Lefkowitz RJ, Shenoy SK. 2005. Transduction of receptor signals by beta-arrestins. *Science* 308:512-7
144. DeWire SM, Ahn S, Lefkowitz RJ, Shenoy SK. 2007. Beta-arrestins and cell signaling. *Annu Rev Physiol* 69:483-510
145. Drake MT, Shenoy SK, Lefkowitz RJ. 2006. Trafficking of G protein-coupled receptors. *Circ Res* 99:570-82

146. Butcher AJ, Prihandoko R, Kong KC, McWilliams P, Edwards JM, Bottrill A, Mistry S, Tobin AB. 2011. Differential G-protein-coupled receptor phosphorylation provides evidence for a signaling bar code. *J Biol Chem* 286:11506-18
147. Urban JD, Clarke WP, von Zastrow M, Nichols DE, Kobilka B, Weinstein H, Javitch JA, Roth BL, Christopoulos A, Sexton PM, Miller KJ, Spedding M, Mailman RB. 2007. Functional selectivity and classical concepts of quantitative pharmacology. *J Pharmacol Exp Ther* 320:1-13
148. Kenakin T. 2007. Functional selectivity through protean and biased agonism: who steers the ship? *Mol Pharmacol* 72:1393-401
149. Barnes PJ. 1993. Beta-adrenoceptors on smooth muscle, nerves and inflammatory cells. *Life Sci* 52:2101-9
150. Ferrer-Lorente R, Cabot C, Fernandez-Lopez JA, Alemany M. 2005. Combined effects of oleoyl-estrone and a beta3-adrenergic agonist (CL316,243) on lipid stores of diet-induced overweight male Wistar rats. *Life Sci* 77:2051-8
151. Ahles A, Engelhardt S. 2009. Polymorphisms determine beta-adrenoceptor conformation: implications for cardiovascular disease and therapy. *Trends Pharmacol Sci* 30:188-93
152. Zhao XL, Gutierrez LM, Chang CF, Hosey MM. 1994. The alpha 1-subunit of skeletal muscle L-type Ca channels is the key target for regulation by A-kinase and protein phosphatase-1C. *Biochem Biophys Res Commun* 198:166-73
153. Gerhardstein BL, Puri TS, Chien AJ, Hosey MM. 1999. Identification of the sites phosphorylated by cyclic AMP-dependent protein kinase on the beta 2 subunit of L-type voltage-dependent calcium channels. *Biochemistry* 38:10361-70
154. Simmerman HK, Jones LR. 1998. Phospholamban: protein structure, mechanism of action, and role in cardiac function. *Physiol Rev* 78:921-47
155. Sulakhe PV, Vo XT. 1995. Regulation of phospholamban and troponin-I phosphorylation in the intact rat cardiomyocytes by adrenergic and cholinergic stimuli: roles of cyclic nucleotides, calcium, protein kinases and phosphatases and depolarization. *Mol Cell Biochem* 149-150:103-26
156. Marx SO, Reiken S, Hisamatsu Y, Jayaraman T, Burkhoff D, Rosembli N, Marks AR. 2000. PKA phosphorylation dissociates FKBP12.6 from the calcium release channel (ryanodine receptor): defective regulation in failing hearts. *Cell* 101:365-76
157. Kunst G, Kress KR, Gruen M, Uttenweiler D, Gautel M, Fink RH. 2000. Myosin binding protein C, a phosphorylation-dependent force regulator in muscle that controls the attachment of myosin heads by its interaction with myosin S2. *Circ Res* 86:51-8
158. Zhang ZY, Zhou B, Xie L. 2002. Modulation of protein kinase signaling by protein phosphatases and inhibitors. *Pharmacol Ther* 93:307-17
159. Biel M, Schneider A, Wahl C. 2002. Cardiac HCN channels: structure, function, and modulation. *Trends Cardiovasc Med* 12:206-12
160. Brodde OE. 1993. Beta-adrenoceptors in cardiac disease. *Pharmacol Ther* 60:405-30
161. Nikolaev VO, Bunemann M, Schmitteckert E, Lohse MJ, Engelhardt S. 2006. 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

162. Nikolaev VO, Moshkov A, Lyon AR, Miragoli M, Novak P, Paur H, Lohse MJ, Korchev YE, Harding SE, Gorilek J. 2010. Beta2-adrenergic receptor redistribution in heart failure changes cAMP compartmentation. *Science* 327:1653-7
163. Fischmeister R, Castro LR, Abi-Gerges A, Rochais F, Jurevicius J, Leroy J, Vandecasteele G. 2006. Compartmentation of cyclic nucleotide signaling in the heart: the role of cyclic nucleotide phosphodiesterases. *Circ Res* 99:816-28
164. Kuschel M, Zhou YY, Spurgeon HA, Bartel S, Karczewski P, Zhang SJ, Krause EG, Lakatta EG, Xiao RP. 1999. beta2-adrenergic cAMP signaling is uncoupled from phosphorylation of cytoplasmic proteins in canine heart. *Circulation* 99:2458-65
165. Xiao RP, Ji X, Lakatta EG. 1995. Functional coupling of the beta 2-adrenoceptor to a pertussis toxin-sensitive G protein in cardiac myocytes. *Mol Pharmacol* 47:322-9
166. Evans BA, Sato M, Sarwar M, Hutchinson DS, Summers RJ. 2010. Ligand-directed signalling at beta-adrenoceptors. *Br J Pharmacol* 159:1022-38
167. Schafer M, Frischkopf K, Taimor G, Piper HM, Schluter KD. 2000. Hypertrophic effect of selective beta(1)-adrenoceptor stimulation on ventricular cardiomyocytes from adult rat. *Am J Physiol Cell Physiol* 279:C495-503
168. Engelhardt S, Hein L, Wiesmann F, Lohse MJ. 1999. Progressive hypertrophy and heart failure in beta1-adrenergic receptor transgenic mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96:7059-64
169. Milano CA, Allen LF, Rockman HA, Dolber PC, McMinn TR, Chien KR, Johnson TD, Bond RA, Lefkowitz RJ. 1994. Enhanced myocardial function in transgenic mice overexpressing the beta 2-adrenergic receptor. *Science* 264:582-6
170. Communal C, Colucci WS. 2005. The control of cardiomyocyte apoptosis via the beta-adrenergic signaling pathways. *Arch Mal Coeur Vaiss* 98:236-41
171. Bristow MR. 2000. beta-adrenergic receptor blockade in chronic heart failure. *Circulation* 101:558-69
172. Simhan H, N Caritis SN. 2007. Prevention of preterm delivery. *N Engl J Med* 357:477-87
173. Mathews TJ, Curtin SC, MacDorman MF. 2000. Infant mortality statistics from the 1998 period linked birth/infant death data set. *Natl Vital Stat Rep* 48:1-25
174. Maqbool A, Hall AS, Ball SG, Balmforth AJ. 1999. Common polymorphisms of beta1-adrenoceptor: identification and rapid screening assay. *Lancet* 353:897
175. Borjesson M, Magnusson Y, Hjalmarson A, Andersson B. 2000. A novel polymorphism in the gene coding for the beta(1)-adrenergic receptor associated with survival in patients with heart failure. *Eur Heart J* 21:1853-8
176. Tesson F, Charron P, Peuchmaurd M, Nicaud V, Cambien F, Tiret L, Poirier O, Desnos M, Jullieres Y, Amouyel P, Roizes G, Dorent R, Schwartz K, Komajda M. 1999. Characterization of a unique genetic variant in the beta1-adrenoceptor gene and evaluation of its role in idiopathic dilated cardiomyopathy. CARDIGENE Group. *J Mol Cell Cardiol* 31:1025-32
177. Mason DA, Moore JD, Green SA, Liggett SB. 1999. A gain-of-function polymorphism in a G-protein coupling domain of the human beta1-adrenergic receptor. *J Biol Chem* 274:12670-4
178. Moore JD, Mason DA, Green SA, Hsu J, Liggett SB. 1999. Racial differences in the frequencies of cardiac beta(1)-adrenergic receptor polymorphisms: analysis of c145A>G and c1165G>C. *Hum Mutat* 14:271

179. Johnson JA, Terra SG. 2002. Beta-adrenergic receptor polymorphisms: cardiovascular disease associations and pharmacogenetics. *Pharm Res* 19:1779-87
180. Johnson JA, Zineh I, Puckett BJ, McGorray SP, Yarandi HN, Pauly DF. 2003. Beta 1-adrenergic receptor polymorphisms and antihypertensive response to metoprolol. *Clin Pharmacol Ther* 74:44-52
181. Rathz DA, Brown KM, Kramer LA, Liggett SB. 2002. Amino acid 49 polymorphisms of the human beta1-adrenergic receptor affect agonist-promoted trafficking. *J Cardiovasc Pharmacol* 39:155-60
182. Joseph SS, Lynham JA, Grace AA, Colledge WH, Kaumann AJ. 2004. Markedly reduced effects of (-)-isoprenaline but not of (-)-CGP12177 and unchanged affinity of beta-blockers at Gly389-beta1-adrenoceptors compared to Arg389-beta1-adrenoceptors. *Br J Pharmacol* 142:51-6
183. Levin MC, Marullo S, Muntaner O, Andersson B, Magnusson Y. 2002. The myocardium-protective Gly-49 variant of the beta 1-adrenergic receptor exhibits constitutive activity and increased desensitization and down-regulation. *J Biol Chem* 277:30429-35
184. Rathz DA, Gregory KN, Fang Y, Brown KM, Liggett SB. 2003. Hierarchy of polymorphic variation and desensitization permutations relative to beta 1- and beta 2-adrenergic receptor signaling. *J Biol Chem* 278:10784-9
185. Sandilands A, Yeo G, Brown MJ, O'Shaughnessy KM. 2004. Functional responses of human beta1 adrenoceptors with defined haplotypes for the common 389R>G and 49S>G polymorphisms. *Pharmacogenetics* 14:343-9
186. Mialet Perez J, Rathz DA, Petrashevskaya NN, Hahn HS, Wagoner LE, Schwartz A, Dorn GW, Liggett SB. 2003. Beta 1-adrenergic receptor polymorphisms confer differential function and predisposition to heart failure. *Nat Med* 9:1300-5
187. Parola AL, Kobilka BK. 1994. The peptide product of a 5' leader cistron in the beta 2 adrenergic receptor mRNA inhibits receptor synthesis. *J Biol Chem* 269:4497-505
188. Dewar JC, Wheatley AP, Venn A, Morrison JF, Britton J, Hall IP. 1998. Beta2-adrenoceptor polymorphisms are in linkage disequilibrium, but are not associated with asthma in an adult population. *Clin Exp Allergy* 28:442-8
189. Green SA, Turki J, Innis M, Liggett SB. 1994. Amino-terminal polymorphisms of the human beta 2-adrenergic receptor impart distinct agonist-promoted regulatory properties. *Biochemistry* 33:9414-9
190. Green SA, Cole G, Jacinto M, Innis M, Liggett SB. 1993. A polymorphism of the human beta 2-adrenergic receptor within the fourth transmembrane domain alters ligand binding and functional properties of the receptor. *J Biol Chem* 268:23116-21
191. Turki J, Lorenz JN, Green SA, Donnelly ET, Jacinto M, Liggett SB. 1996. Myocardial signaling defects and impaired cardiac function of a human beta 2-adrenergic receptor polymorphism expressed in transgenic mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93:10483-8
192. La Rosee K, Huntgeburth M, Rosenkranz S, Bohm M, Schnabel P. 2004. The Arg389Gly beta1-adrenoceptor gene polymorphism determines contractile response 6
193. Bruck H, Leineweber K, Temme T, Weber M, Heusch G, Philipp T, Brodde OE. 2005. The Arg389Gly beta1-adrenoceptor polymorphism and catecholamine effects on plasma-renin activity. *J Am Coll Cardiol* 46:2111-5

194. Leineweber K, Bogedain P, Wolf C, Wagner S, Weber M, Jakob HG, Heusch G, Philipp T, Brodde OE. 2007. In patients chronically treated with metoprolol, the demand of inotropic catecholamine support after coronary artery bypass grafting is determined by the Arg389Gly-beta 1-adrenoceptor polymorphism. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* 375:303-9
195. Small KM, McGraw DW, Liggett SB. 2003. Pharmacology and physiology of human adrenergic receptor polymorphisms. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 43:381-411
196. Brodde OE. 2008. Beta-1 and beta-2 adrenoceptor polymorphisms: functional importance, impact on cardiovascular diseases and drug responses. *Pharmacol Ther* 117:1-29
197. Nagai T, Iyata K, Park ES, Kubota M, Mikoshiba K, Miyawaki A. 2002. A variant of yellow fluorescent protein with fast and efficient maturation for cell-biological applications. *Nat Biotechnol* 20:87-90
198. Miyawaki A, Griesbeck O, Heim R, Tsien RY. 1999. Dynamic and quantitative Ca²⁺ measurements using improved cameleons. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96:2135-40
199. Ahles A, Rochais F, Frambach T, Bunemann M, Engelhardt S. 2011. A polymorphism-specific "memory" mechanism in the beta(2)-adrenergic receptor. *Sci Signal* 4:ra53
200. Ahles A. 2007. Direct optical recording of β 2-adrenergic receptor activation. *Thesis zur Erlangung des Master of Science (M.Sc.) Biomedizin der Medizinischen Fakultät und der Fakultät für Biologie der Bayerischen Julius-Maximilians-Universität Würzburg*
201. Wang Y, Botvinick EL, Zhao Y, Berns MW, Usami S, Tsien RY, Chien S. 2005. Visualizing the mechanical activation of Src. *Nature* 434:1040-5
202. Dorsch S, Klotz KN, Engelhardt S, Lohse MJ, Bunemann M. 2009. Analysis of receptor oligomerization by FRAP microscopy. *Nat Methods* 6:225-30
203. Salahpour A, Angers S, Mercier JF, Lagace M, Marullo S, Bouvier M. 2004. Homodimerization of the beta2-adrenergic receptor as a prerequisite for cell surface targeting. *J Biol Chem* 279:33390-7
204. Roth NS, Campbell PT, Caron MG, Lefkowitz RJ, Lohse MJ. 1991. Comparative rates of desensitization of beta-adrenergic receptors by the beta-adrenergic receptor kinase and the cyclic AMP-dependent protein kinase. *Proc Natl Acad Sci U S A* 88:6201-4
205. Brodde OE, Leineweber K. 2005. Beta2-adrenoceptor gene polymorphisms. *Pharmacogenet Genomics* 15:267-75
206. Tilley DG, Kim IM, Patel PA, Violin JD, Rockman HA. 2009. beta-Arrestin mediates beta1-adrenergic receptor-epidermal growth factor receptor interaction and downstream signaling. *J Biol Chem* 284:20375-86
207. Stryer L. 1987. The molecules of visual excitation. *Sci Am* 257:42-50
208. Jares-Erijman EA, Jovin TM. 2003. FRET imaging. *Nat Biotechnol* 21:1387-95
209. Vilardaga JP, Steinmeyer R, Harms GS, Lohse MJ. 2005. Molecular basis of inverse agonism in a G protein-coupled receptor. *Nat Chem Biol* 1:25-8
210. Hoffmann C, Gaietta G, Bunemann M, Adams SR, Oberdorff-Maass S, Behr B, Vilardaga JP, Tsien RY, Ellisman MH, Lohse RJ. 2005. A FIAsh-based FRET approach to determine G protein-coupled receptor activation in living cells. *Nat Methods* 2:171-6

211. Ziegler N, Batz J, Zabel U, Lohse MJ, Hoffmann C. 2011. FRET-based sensors for the human M1-, M3-, and M5-acetylcholine receptors. *Bioorg Med Chem* 19:1048-54
212. Kahlert M, Hofmann KP. 1991. Reaction rate and collisional efficiency of the rhodopsin-transducin system in intact retinal rods. *Biophys J* 59:375-86
213. Pugh EN Jr, Lamb TD. 1993. Amplification and kinetics of the activation steps in phototransduction. *Biochim Biophys Acta* 1141:111-49
214. Makino CL, Wen XH, Lem J. 2003. Piecing together the timetable for visual transduction with transgenic animals. *Curr Opin Neurobiol* 13:404-12
215. Zurn A, Zabel U, Vilardaga JP, Schindelin H, Lohse MJ, Hoffmann C. 2009. Fluorescence resonance energy transfer analysis of alpha 2a-adrenergic receptor activation reveals distinct agonist-specific conformational changes. *Mol Pharmacol* 75:534-41
216. Maier-Peuschel M, Frolich N, Dees C, Hommers LG, Hoffmann C, Nikolaev VO, Lohse MJ. 2010. A fluorescence resonance energy transfer-based M2 muscarinic receptor sensor reveals rapid kinetics of allosteric modulation. *J Biol Chem* 285:8793-800
217. Castro M, Nikolaev VO, Palm D, Lohse MJ, Vilardaga JP. 2005. Turn-on switch in parathyroid hormone receptor by a two-step parathyroid hormone binding mechanism. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102:16084-9
218. Swift SM, Schwarb MR, Mhlbachler KA, Liggett SB. 2007. Pleiotropic beta-agonist-promoted receptor conformations and signals independent of intrinsic activity. *Am J Respir Cell Mol Biol* 36:236-43
219. Griffin BA, Adams SR, Tsien RY. 1998. Specific covalent labeling of recombinant protein molecules inside live cells. *Science* 281:269-72
220. Zurn A, Klenk C, Zabel U, Reiner S, Lohse MJ, Hoffmann C. 2010. Site-specific, orthogonal labeling of proteins in intact cells with two small biarsenical fluorophores. *Bioconjug Chem* 21:853-9
221. Gautier A, Juillerat A, Heinis C, Correa IR Jr, Kindermann M, Beaufls F, Johnsson K. 2008. An engineered protein tag for multiprotein labeling in living cells. *Chem Biol* 15:128-36
222. Lim WK, Neubig RR. 2001. Selective inactivation of guanine-nucleotide-binding regulatory protein (G-protein) alpha and betagamma subunits by urea. *Biochem J* 354:337-44
223. Whorton MR, Bokoch MP, Rasmussen SG, Huang B, Zare RN, Kobilka B, Sunahara RK. 2007. 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* 104:7682-7
224. Kahsai AW, Xiao K, Rajagopal S, Ahn S, Shukla AK, Sun J, Oas TG, Lefkowitz RJ. 2011. Multiple ligand-specific conformations of the beta(2)-adrenergic receptor. *Nat Chem Biol*
225. Kobilka BK, Deupi X. 2007. Conformational complexity of G-protein-coupled receptors. *Trends Pharmacol Sci* 28:397-406
226. Audet M, Bouvier M. 2008. Insights into signaling from the beta2-adrenergic receptor structure. *Nat Chem Biol* 4:397-403

227. Bokoch MP, Zou Y, Rasmussen SG, Liu CW, Nygaard R, Rosenbaum DM, Fung JJ, Choi HJ, Thian FS, Kobilka TS, Puglisi JD, Weis WI, Pardo L, Prosser RS, Mueller L, Kobilka BK. 2010. Ligand-specific regulation of the extracellular surface of a G-protein-coupled receptor. *Nature* 463:108-12
228. Violin JD, DiPilato LM, Yildirim N, Elston TC, Zhang J, Lefkowitz RJ. 2008. beta2-adrenergic receptor signaling and desensitization elucidated by quantitative modeling of real time cAMP dynamics. *J Biol Chem* 283:2949-61
229. Vaughan DJ, Millman EE, Godines V, Friedman J, Tran TM, Dai W, Knoll BJ, Clark RB, Moore RH. 2006. Role of the G protein-coupled receptor kinase site serine cluster in beta2-adrenergic receptor internalization, desensitization, and beta-arrestin translocation. *J Biol Chem* 281:7684-92
230. Iyer V, Tran TM, Foster E, Dai W, Clark RB, Knoll BJ. 2006. Differential phosphorylation and dephosphorylation of beta2-adrenoceptor sites Ser262 and Ser355,356. *Br J Pharmacol* 147:249-59
231. Tran TM, Friedman J, Baameur F, Knoll BJ, Moore RH, Clark RB. 2007. Characterization of beta2-adrenergic receptor dephosphorylation: Comparison with the rate of resensitization. *Mol Pharmacol* 71:47-60
232. Tran TM, Friedman J, Qunaibi E, Baameur F, Moore RH, Clark RB. 2004. Characterization of agonist stimulation of cAMP-dependent protein kinase and G protein-coupled receptor kinase phosphorylation of the beta2-adrenergic receptor using phosphoserine-specific antibodies. *Mol Pharmacol* 65:196-206
233. Vayttaden SJ, Friedman J, Tran TM, Rich TC, Dessauer CW, Clark RB. 2010. Quantitative modeling of GRK-mediated beta2AR regulation. *PLoS Comput Biol* 6:e1000647
234. Seibold A, Williams B, Huang ZF, Friedman J, Moore RH, Knoll BJ, Clark RB. 2000. Localization of the sites mediating desensitization of the beta(2)-adrenergic receptor by the GRK pathway. *Mol Pharmacol* 58:1162-73
235. Krasel C, Zabel U, Lorenz K, Reiner S, Al-Sabah S, Lohse MJ. 2008. Dual role of the beta2-adrenergic receptor C terminus for the binding of beta-arrestin and receptor internalization. *J Biol Chem* 283:31840-8
236. Marion S, Oakley RH, Kim KM, Caron MG, Barak LS. 2006. A beta-arrestin binding determinant common to the second intracellular loops of rhodopsin family G protein-coupled receptors. *J Biol Chem* 281:2932-8
237. Hall RA, Premont RT, Chow CW, Blitzer JT, Pitcher JA, Claing A, Stoffel RH, Barak LS, Shenolikar S, Weinman EJ, Grinstein S, Lefkowitz RJ. 1998. The beta2-adrenergic receptor interacts with the Na⁺/H⁺-exchanger regulatory factor to control Na⁺/H⁺ exchange. *Nature* 392:626-30
238. Violin JD, Ren XR, Lefkowitz RJ. 2006. G-protein-coupled receptor kinase specificity for beta-arrestin recruitment to the beta2-adrenergic receptor revealed by fluorescence resonance energy transfer. *J Biol Chem* 281:20577-88
239. Hall RA, Ostedgaard LS, Premont RT, Blitzer JT, Rahman N, Welsh MJ, Lefkowitz RJ. 1998. A C-terminal motif found in the beta2-adrenergic receptor, P2Y1 receptor and cystic fibrosis transmembrane conductance regulator determines binding to the Na⁺/H⁺ exchanger regulatory factor family of PDZ proteins. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95:8496-501

240. Cao TT, Deacon HW, Reczek D, Bretscher A, von Zastrow M. 1999. A kinase-regulated PDZ-domain interaction controls endocytic sorting of the beta2-adrenergic receptor. *Nature* 401:286-90
241. Xiang Y, Kobilka B. 2003. The PDZ-binding motif of the beta2-adrenoceptor is essential for physiologic signaling and trafficking in cardiac myocytes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100:10776-81
242. He J, Bellini M, Inuzuka H, Xu J, Xiong Y, Yang X, Castleberry AM, Hall RA. 2006. Proteomic analysis of beta1-adrenergic receptor interactions with PDZ scaffold proteins. *J Biol Chem* 281:2820-7
243. Hu LA, Tang Y, Miller WE, Cong M, Lau AG, Lefkowitz RJ, Hall RA. 2000. beta 1-adrenergic receptor association with PSD-95. Inhibition of receptor internalization and facilitation of beta 1-adrenergic receptor interaction with N-methyl-D-aspartate receptors. *J Biol Chem* 275:38659-66
244. Xu J, Paquet M, Lau AG, Wood JD, Ross CA, Hall RA. 2001. beta 1-adrenergic receptor association with the synaptic scaffolding protein membrane-associated guanylate kinase inverted-2 (MAGI-2). Differential regulation of receptor internalization by MAGI-2 and PSD-95. *J Biol Chem* 276:41310-7
245. Shiina T, Nagao T, Kurose H. 2001. Low affinity of beta1-adrenergic receptor for beta-arrestins explains the resistance to agonist-induced internalization. *Life Sci* 68:2251-7
246. Liang W, Austin S, Hoang Q, Fishman PH. 2003. Resistance of the human beta 1-adrenergic receptor to agonist-mediated down-regulation. Role of the C terminus in determining beta-subtype degradation. *J Biol Chem* 278:39773-81
247. Liang W, Fishman PH. 2004. Resistance of the human beta1-adrenergic receptor to agonist-induced ubiquitination: a mechanism for impaired receptor degradation. *J Biol Chem* 279:46882-9
248. Gether U, Ballesteros JA, Seifert R, Sanders-Bush E, Weinstein H, Kobilka BK. 1997. Structural instability of a constitutively active G protein-coupled receptor. Agonist-independent activation due to conformational flexibility. *J Biol Chem* 272:2587-90
249. Hakalahti AE, Vierimaa MM, Lilja MK, Kumpula EP, Tuusa JT, Petaja-Repo UE. 2010. Human beta1-adrenergic receptor is subject to constitutive and regulated N-terminal cleavage. *J Biol Chem* 285:28850-61
250. Albizu L, Cottet M, Kralikova M, Stoev S, Seyer R, Brabet I, Roux T, Bazin H, Bourrier E, Lamarque L, Breton C, Rives ML, Newman A, Javitch J, Trinquet E, Manning M, Pin JP, Mouillac B, Durroux T. 2010. Time-resolved FRET between GPCR ligands reveals oligomers in native tissues. *Nat Chem Biol* 6:587-94
251. Aziz I, Hall IP, McFarlane LC, Lipworth BJ. 1998. Beta2-adrenoceptor regulation and bronchodilator sensitivity after regular treatment with formoterol in subjects with stable asthma. *J Allergy Clin Immunol* 101:337-41
252. Lipworth BJ, Hall IP, Tan S, Aziz I, Coutie W. 1999. Effects of genetic polymorphism on ex vivo and in vivo function of beta2-adrenoceptors in asthmatic patients. *Chest* 115:324-8
253. Bruck H, Leineweber K, Beilfuss A, Weber M, Heusch G, Philipp T, Brodde OE. 2003. Genotype-dependent time course of lymphocyte beta 2-adrenergic receptor down-regulation. *Clin Pharmacol Ther* 74:255-63

254. Delos Santos NM, Gardner LA, White SW, Bahouth SW. 2006. Characterization of the residues in helix 8 of the human beta1-adrenergic receptor that are involved in coupling the receptor to G proteins. *J Biol Chem* 281:12896-907
255. Landau R, Morales MA, Antonarakis SE, Blouin JL, Smiley RM. 2005. Arg16 homozygosity of the beta2-adrenergic receptor improves the outcome after beta2-agonist tocolysis for preterm labor. *Clin Pharmacol Ther* 78:656-63
256. Frambach T, Muller T, Freund S, Engelhardt S, Sutterlin M, Lohse MJ, Dietl J. 2005. Self-limitation of intravenous tocolysis with beta2-adrenergic agonists is mediated through receptor G protein uncoupling. *J Clin Endocrinol Metab* 90:2882-7
257. Engelhardt S, Zieger W, Kassubek J, Michel MC, Lohse MJ, Brodde OE. 1997. Tocolytic therapy with fenoterol induces selective down-regulation of beta-adrenergic receptors in human myometrium. *J Clin Endocrinol Metab* 82:1235-42
258. Tsatsaris V, Carbonne B, Cabrol D. 2004. Atosiban for preterm labour. *Drugs* 64:375-82
259. Wex J, Connolly M, Rath W. 2009. Atosiban versus betamimetics in the treatment of preterm labour in Germany: an economic evaluation. *BMC Pregnancy Childbirth* 9:23
260. Dishy V, Sofowora GG, Xie HG, Kim RB, Byrne DW, Stein CM, Wood AJ. 2001. The effect of common polymorphisms of the beta2-adrenergic receptor on agonist-mediated vascular desensitization. *N Engl J Med* 345:1030-5
261. Bruck H, Leineweber K, Park J, Weber M, Heusch G, Philipp T, Brodde OE. 2005. Human beta2-adrenergic receptor gene haplotypes and venodilation in vivo. *Clin Pharmacol Ther* 78:232-8
262. Taylor DR, Drazen JM, Herbison GP, Yandava CN, Hancox RJ, Town GI. 2000. Asthma exacerbations during long term beta agonist use: influence of beta(2) adrenoceptor polymorphism. *Thorax* 55:762-7
263. Israel E, Drazen JM, Liggett SB, Boushey HA, Cherniack RM, Chinchilli VM, Cooper DM, Fahy JV, Fish JE, Ford JG, Kraft M, Kunselman S, Lazarus SC, Lemanske RF, Martin RJ, McLean DE, Peters SP, Silverman EK, Sorkness CA, Szeffler SJ, Weiss ST, Yandava CN. 2000. The effect of polymorphisms of the beta(2)-adrenergic receptor on the response to regular use of albuterol in asthma. *Am J Respir Crit Care Med* 162:75-80
264. Israel E, Chinchilli VM, Ford JG, Boushey HA, Cherniack R, Craig TJ, Deykin A, Fagan JK, Fahy JV, Fish J, Kraft M, Kunselman SJ, Lazarus SC, Lemanske RF Jr, Liggett SB, Martin RJ, Mitra N, Peters SP, Silverman E, Sorkness CA, Szeffler, SJ, Wechsler ME, Weiss ST, Drazen JM. 2004. Use of regularly scheduled albuterol treatment in asthma: genotype-stratified, randomised, placebo-controlled cross-over trial. *Lancet* 364:1505-12
265. Wechsler ME, Lehman E, Lazarus SC, Lemanske RJ Jr, Boushey HA, Deykin A, Fahy JV, Sorkness CA, Chinchilli VM, Craig TJ, DiMango E, Kraft M, Leone F, Martin RJ, Peters SP, Szeffler SJ, Liu W, Israel E. 2006. beta-Adrenergic receptor polymorphisms and response to salmeterol. *Am J Respir Crit Care Med* 173:519-26

7 Publikationen und Konferenzbeiträge

7.1 Publikationen

Ahles A, Engelhardt S. Polymorphisms determine beta-adrenoceptor conformation: implications for cardiovascular disease and therapy. *Trends Pharmacol Sci.* 2009 Apr;30(4): 188-93.

Ahles A, Rochais F, Frambach T, Bünemann M, Engelhardt S. A Polymorphism-Specific “Memory“ Mechanism in the β_2 -Adrenergic Receptor. *Science Signal.* 4(185):ra53 (2011).

7.2 Konferenzbeiträge

Ahles A, Rochais F, Lohse MJ, Engelhardt S. Receptor polymorphisms determine the kinetics of β -adrenergic receptor conformational changes. 49. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Experimentelle und Klinische Pharmakologie und Toxikologie, 11.-13.03.2008, Mainz - **Vortrag**

Ahles A, Rochais F, Lohse MJ, Engelhardt S. Impact of polymorphisms on β -adrenergic receptor activation. 50. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Experimentelle und Klinische Pharmakologie und Toxikologie, 10.-12.03.2009, Mainz - **Vortrag**

Ahles A, Rochais F, Bünemann M, Engelhardt S. Impact of Polymorphisms on β -Adrenergic Receptor Activation. Basic Cardiovascular Sciences Conference 2009, 20.-23.07.2009, Lake Las Vegas, USA - **Poster**

Ahles A, Rochais F, Frambach T, Bünemann M, Engelhardt S. Phosphorylation-dependent memory of the β_2 -adrenergic receptor. The GPCR Dimer Symposium, 9.-10.10.2009, Würzburg - **Poster**

Ahles A, Rochais F, Frambach T, Bünemann M, Engelhardt S. A phosphorylation-dependent memory mechanism determining β -adrenergic receptor activation. 51. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Experimentelle und Klinische Pharmakologie und Toxikologie, 23.-25.03.2010, Mainz – **Poster**

Ahles A, Rochais F, Bünemann M, Engelhardt S. β -adrenerge Rezeptoren besitzen ein phosphorylierungsabhängiges Aktivierungsgedächtnis. 76. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Kardiologie, 8.-10.04.2010, Mannheim - **Poster**

Ahles A, Rochais F, Frambach T, Bünemann M, Engelhardt S. A phosphorylation-dependent memory mechanism determining β -adrenergic receptor activation. 5th International Symposium – CHIASMA, 13.-14.10.2010, Würzburg - **Poster**

Ahles A, Rochais F, Frambach T, Bünemann M, Engelhardt S. A memory mechanism in the β_2 -adrenergic receptor critical for downstream signaling and individual drug responses. 77. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Experimentelle und Klinische Pharmakologie und Toxikologie, 30.03.-1.04.2011, Frankfurt am Main - **Poster**

Ahles A, Rochais F, Bünemann M, Engelhardt S. A polymorphism-specific memory mechanism in the β_2 -adrenergic receptor. 9th Dutch-German Joint Meeting of the Molecular Cardiology Working Groups, 14.-16.04.2011, Ulm/Günzburg – **Poster**

8 Anhang

8.1 Sequenzen der synthetisierten Genabschnitte

8.1.1 „ β_1 AR-C-Terminus- Δ Phos“

C-terminale Nukleotidsequenz des β_1 AR (Nukleotide 1186-1431, Aminosäuren 396-477) mit 5xGly-Linker – phosphorylierungsdefiziente Mutante: Serin (Ser) und Threonin (Thr) wurde zu Alanin (Ala) mutiert (in grün in der Aminosäuresequenz markiert).

Die Sequenz wurde aufgrund des hohen GC-Gehalts der C-terminalen ADRB1-Nukleotidsequenz optimiert, ohne dass dabei die resultierende Aminosäuresequenz verändert wurde, und von Genescript (Piscataway, USA) synthetisiert. Die Sequenz wurde im Vektor pUC57 bereitgestellt und mittels Restriktionsverdau mit SgrAI und BamHI (gelb markiert) und anschließender Ligation in die ADRB1-Sequenz eingebracht.

- 1 - optimierte (= synthetisierte) Nukleotidsequenz (255 bp)
- 2 - C-terminale Nukleotidsequenz des ADRB1 (1188-1431) mit 5xGly-Linker
- 3 - resultierende Aminosäuresequenz (396-477)
- 4 - Aminosäureposition

```

1 - CGC CGG CGT CAT GCG GCA CAT GGC GAT CGC CCA CGC GCT GCG GGT TGT CTG GCC
2 - CGC CGG CGC CAC GCG GCC CAC GGA GAC CGG CCG CGC GCC GCG GGC TGT CTG GCC
3 - Arg Arg Arg His Ala Ala His Gly Asp Arg Pro Arg Ala Ala Gly Cys Leu Ala
4 - 396 400 401 402 403 404 405 406 407 408 409 410 411 412 413 414 415 416

```

```

1 - CGT CCA GGA CCG CCT CCG GCA CCA GGT GCT GCG GCC GAT GAT GAT GAT GAT GAT
2 - CGG CCC GGA CCC CCG CCA GCG CCC GGG GCC GCC GCG GAC GAC GAC GAC GAC GAT
3 - Arg Pro Gly Pro Pro Pro Ala Pro Gly Ala Ala Ala Asp Asp Asp Asp Asp Asp
4 - 417 418 419 420 421 422 423 424 425 426 427 428 429 430 431 432 433 434

```

```

1 - GTA GTG GGT GCC GCT CCG CCG GCC CGT CTG CTG GAA CCG TGG GCC GGT TGT AAC
2 - GTC GTC GGG GCC GCG CCG CCC GCG CGC CTG CTG GAG CCC TGG GCC GGC TGC AAC
3 - Val Val Gly Ala Ala Pro Pro Ala Arg Leu Leu Glu Pro Trp Ala Gly Cys Asn
4 - 435 436 437 438 439 440 441 442 443 444 445 446 447 448 449 450 451 452

```

```

1 - GGT GGC GCC GCC GCC GAT GCA GAT GCC GCG CTG GAC GAA CCG TGC CGC CCG GGC
2 - GGC GGG GCG GCG GCG GAC GCC GAC GCG GCC CTG GAC GAG CCG TGC CGC CCC GGC
3 - Gly Gly Ala Ala Ala Asp Ala Asp Ala Ala Leu Asp Glu Pro Cys Arg Pro Gly
4 - 453 454 455 456 457 458 459 460 461 462 463 464 465 466 467 468 469 470

```

```

1 - TTT GCC GCG GAA GCC AAA GTG GGT GGT GGC GGC GGA TCC
2 - TTC GCC GCG GAA GCC AAG GTG GGC GGC GGT GGT GGA TCC
3 - Phe Ala Ala Glu Ala Lys Val Gly Gly Gly Gly Gly Ser
4 - 471 472 473 474 475 476 477

```

8.1.2 „β₂ARnterm_20-TEV-21“

N-terminale Nukleotidsequenz des β₂AR (Nukleotide 1-522, Aminosäuren 1-174) mit inserierter TEV-Protease-Erkennungssequenz (rot) zwischen Aminosäure 20 und 21. Angehängt sind Erkennungssequenzen für die Restriktionsenzyme DraI und BamHI (gelb) zum Einbau der Sequenz in das β₂AR-Sensor-Konstrukt. Die Gensynthese der 559 Basenpaare wurde von Geneart (Regensburg) durchgeführt.

```
GAG CTC TTT AAA ACC ATG GGG CAA CCC GGG AAC GGC AGC GCC TTC TTG CTG GCA CCC
      Met Gly Gln Pro Gly Asn Gly Ser Ala Phe Leu Leu Ala Pro
      1  2  3  4  5  6  7  8  9 10 11 12 13 14

AAT AGA AGC CAT GCG CCG GAA AAT CTA TAC TTC CAA GGA GAC CAC GAC GTC ACG CAG
Asn Arg Ser His Ala Pro Glu Asn Leu Tyr Phe Gln Gly Asp His Asp Val Thr Gln
15 16 17 18 19 20      21 22 23 24 25 26

CAA AGG GAC GAG GTG TGG GTG GTG GGC ATG GGC ATC GTC ATG TCT CTC ATC GTC CTG
Gln Arg Asp Glu Val Trp Val Val Gly Met Gly Ile Val Met Ser Leu Ile Val Leu
27 28 29 30 31 32 33 34 35 36 37 38 39 40 41 42 43 44 45

GCC ATC GTG TTT GGC AAT GTG CTG GTC ATC ACA GCC ATT GCC AAG TTC GAG CGT CTG
Ala Ile Val Phe Gly Asn Val Leu Val Ile Thr Ala Ile Ala Lys Phe Glu Arg Leu
46 47 48 49 50 51 52 53 54 55 56 57 58 59 60 61 62 63 64

CAG ACG GTC ACC AAC TAC TTC ATC ACT TCA CTG GCC TGT GCT GAT CTG GTC ATG GGC
Gln Thr Val Thr Asn Tyr Phe Ile Thr Ser Leu Ala Cys Ala Asp Leu Val Met Gly
65 66 67 68 69 70 71 72 73 74 75 76 77 78 79 80 81 82 83

CTG GCA GTG GTG CCC TTT GGG GCC GCC CAT ATT CTT ATG AAA ATG TGG ACT TTT GGC
Leu Ala Val Val Pro Phe Gly Ala Ala His Ile Leu Met Lys Met Trp Thr Phe Gly
84 85 86 87 88 89 90 91 92 93 94 95 96 97 98 99 100 101 102

AAC TTC TGG TGC GAG TTT TGG ACT TCC ATT GAT GTG CTG TGC GTC ACG GCC AGC ATT
Asn Phe Trp Cys Glu Phe Trp Thr Ser Ile Asp Val Leu Cys Val Thr Ala Ser Ile
103 104 105 106 107 108 109 110 111 112 113 114 115 116 117 118 119 120 121

GAG ACC CTG TGC GTG ATC GCA GTG GAT CGC TAC TTT GCC ATT ACT TCA CCT TTC AAG
Glu Thr Leu Cys Val Ile Ala Val Asp Arg Tyr Phe Ala Ile Thr Ser Pro Phe Lys
122 123 124 125 126 127 128 129 130 131 132 133 134 135 136 137 138 139 140

TAC CAG AGC CTG CTG ACC AAG AAT AAG GCC CGG GTG ATC ATT CTG ATG GTG TGG ATT
Tyr Gln Ser Leu Leu Thr Lys Asn Lys Ala Arg Val Ile Ile Leu Met Val Trp Ile
141 142 143 144 145 146 147 148 149 150 151 152 153 154 155 156 157 158 159

GTG TCA GGC CTT ACC TCC TTC TTG CCC ATT CAG ATG CAC TGG TAC C
Val Ser Gly Leu Thr Ser Phe Leu Pro Ile Gln Met His Trp Tyr
160 161 162 163 164 165 166 167 168 169 170 171 172 173 174
```

8.2 Abkürzungsverzeichnis

A	Adrenalin	F _{YFP}	Fluoreszenzintensität im YFP-Kanal
Å	Ångström	Fab	engl. <i>Fragment antigen binding</i>
AC	Adenylatzyklase	FAM	6-Carboxyfluorescein
ADAM	engl. <i>A Disintegrin-And-Metalloprotease</i>	FBS	fötales Kälberserum
ADRB	Adrenerger Rezeptor	FRET	Fluoreszenz/Förster-Resonanz-Energie-Transfer
Ala	Alanin	GDP	Guanosindiphosphat
ANOVA	engl. <i>Analysis of variance</i>	G _i	inhibierendes G-Protein
AP-2	Adapterprotein 2, β -Adaptin	GIRK-Kanal	G-Protein-gekoppelter einwärtsgerichteter Kaliumkanal
APS	Ammoniumperoxodisulfat	Gly	Glycin
α AR	α -adrenerger Rezeptor	Gln	Glutamin
β AR	β -adrenerger Rezeptor	Glu	Glutamat
β_1 AR	β_1 -adrenerger Rezeptor	GNB	engl. <i>G protein β subunits 1-4</i>
β_2 AR	β_2 -adrenerger Rezeptor	GPCR	G protein-coupled receptor = G-Protein-gekoppelter Rezeptor
β ARK	β -adrenerge-Rezeptor-Kinase	G-Protein	Guanosintriphosphat (GTP)-bindendes Protein
Arg	Arginin	GRK	G-Protein-gekoppelte Rezeptorkinase
ARRB2	β -Arrestin2	G _s	stimulierendes G-Protein
AS	Aminosäure	GTP	Guanosintriphosphat
Asn	Asparagin	GTP γ S	Guanosin-5'-O-(gamma-thio)triphosphat
ATP	Adenosintriphosphat	h	Stunde
AU	engl. <i>Arbitrary units</i>	[³ H]	Tritium
BCA	engl. <i>Bicinchoninic acid</i>	[³ H]-GP12177	(-)-[³ H]4-(3-tertiärbutylamino-2-hydroxy-propoxy)-benzimidazol-2-on hydrochlorid)
bp	Basenpaare	HCN-Kanal	hyperpolarisationsaktivierter, durch zyklische Nukleotide modulierter Kationenkanal
BSA	Bovines Serumalbumin	HEK	engl. <i>Human embryonic kidney</i>
Ca ²⁺	Calcium	HEPES	2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure
c	Konzentration	HRP	engl. <i>Horseradish peroxidase</i> = Meerrettichperoxidase
cAMP	zyklisches Adenosinmonophosphat	Ile	Isoleucin
cDNA	engl. <i>Complementary DNA</i> = komplementäre Desoxyribonukleinsäure	Iso	Isoprenalin
Cer	Cerulean	kb	1000 Basenpaare
CFP	engl. <i>Cyan fluorescent protein</i> = blau fluoreszierendes Protein	kDa	1000 Dalton
CHO	engl. <i>Chinese hamster ovary</i>	K _i	Gleichgewichtsdissoziationskonstante des Inhibitors
CM	Calmodulin	K220R	Lysin-220-Arginin
C-Terminus	Carboxy-Terminus	LB	engl. <i>Lysogeny broth</i>
ddH ₂ O	bidestilliertes Wasser	Leu	Leucin
DHPR	Dihydropyridinrezeptor	Lys	Lysin
DMEM	engl. <i>Dulbecco's modified eagle medium</i>	M	Molar
DMSO	Dimethylsulfoxid	mA	Milliampere
dn	dominant-negativ	MAPK	engl. <i>Mitogen-activated protein kinase</i>
DNA	engl. <i>Desoxyribonucleic acid</i> = Desoxyribonukleinsäure	MGB	engl. <i>Minor groove binder</i>
dNTPs	Desoxyribonukleotidtriphosphat	min	Minute
DPBS	engl. <i>Dulbecco's Phosphate Buffered Saline</i>	MLCK	engl. <i>Myosin light-chain kinase</i> = Myosin-leichte-Ketten-Kinase
dsDNA	engl. <i>Double-strand DNA</i> = Doppelstrang-DNA	MOI	engl. <i>Multiplicity of infection</i>
DTT	Dithiothreitol	ms	Millisekunde
EC ₅₀	Mittlere effektive Wirkkonzentration	NA	Noradrenalin
eCFP	engl. <i>Enhanced cyan fluorescent protein</i>	NHERF	engl. <i>Na⁺/H⁺ exchanger regulatory factor</i>
ECL	engl. <i>Enhanced Chemoluminescence</i>	NMR	engl. <i>Nuclear magnetic resonance</i> = Kernspinresonanzspektroskopie
E. coli	Escherichia coli		
EDTA	Ethylendiamintetraacetat		
Epac	engl. <i>Exchange protein activated by cAMP</i>		
EtOH	Ethanol		
eYFP	engl. <i>Enhanced yellow fluorescent protein</i>		
F _{CFP}	Fluoreszenzintensität im CFP-Kanal		

N-Terminus	Aminoterminus	SDS	Natriumdodecylsulphat
OD	Optische Dichte	SDS-PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese mit SDS
p.a.	lat. <i>pro analysi</i>	Ser	Serin
Δ Phos	Phosphorylierungsdefizient	SERCA	Sarkoplasmatische Ca^{2+} -ATPase
PBS	engl. <i>Phosphate buffered saline</i>	siRNA	engl. <i>Short interfering RNA</i>
PCR	engl. <i>polymerase chain reaction</i> = Polymerasekettenreaktion	SNP	engl. <i>Single nucleotide polymorphism</i> = Einzelnukleotid-Polymorphismus
Phe	Phenylalanin		Halbwertszeit
PIP2	Phosphatidylinositol-4,5-Bisphosphat	$t_{1/2}$	Tris-Acetat-EDTA
PI3K	Phosphoinositid-3-Kinase	TAE	N,N,N',N'-Tetramethylethan-1,2-diamin
β_2 AR	Phosphorylierter β_2 -adrenerger Rezeptor	Temed	Tobacco Etch Virus
PKA	Proteinkinase A (cAMP abhängige Proteinkinase)	TEV	Threonin
PKC	Proteinkinase C	Thr	Transmembrandomäne
PLB	Phospholamban	TM	2-Amino-2-(hydroxymethyl)-propan-1,3-diol
PLC	Phospholipase C	Tris	Tryptophan
PMCA	Plasmamembran- Ca^{2+} -ATPase	Trp	Tyrosin
Primer	DNA-Oligonukleotid	U	Unit
Prop	Propranolol	UV	Ultraviolett
PTH	Parathormon	V	Volt
RFP	Engl. <i>Red fluorescent protein</i> = rot fluoreszierendes Protein	Vol	Volumen
RNA	engl. <i>Ribonucleic acid</i> = Ribonukleinsäure	WB	Western Blot
RNase	Ribonuklease	w/v	Gewicht/Volumen
RT	Raumtemperatur	v/v	Volumen/Volumen
RVZ	Rudolf-Virchow-Zentrum, DFG-Forschungszentrum für Experimentelle Biomedizin, Universität Würzburg	YFP	engl. <i>Yellow fluorescent protein</i> = gelb fluoreszierendes Protein
RyR	Ryanodinrezeptor	λ	Wellenlänge
s	Sekunde	τ	Geschwindigkeitskonstante ($t_{1/2} \cdot \ln 2$)
		$^{\circ}C$	Grad Celsius

8.3 Danksagung

Mein besonderer Dank gilt Prof. Stefan Engelhardt für die Möglichkeit, meine Doktorarbeit in seiner Arbeitsgruppe anzufertigen. Ich bedanke mich herzlich für seine stets engagierte Unterstützung und fortwährende Motivation sowie seinen grenzenlosen und ansteckenden Optimismus und Enthusiasmus für wissenschaftliche Fragen.

Prof. Martin Lohse danke ich herzlich für die hilfreichen Diskussionen und die Betreuung als zweiter Gutachter, Prof. Bernhard Nieswandt für die Betreuung der Arbeit als dritter Gutachter, und Prof. Thomas Müller für die Übernahme des Promotionskomiteevorsitzes.

Ein ganz herzliches Dankeschön geht an Francesca Rochais für die hervorragende fachliche und praktische Einarbeitung, die persönlichen Ratschläge und ihr Interesse an der Arbeit auch aus dem fernen Marseille.

Zudem möchte ich mich bei Prof. Moritz Bünemann und Bernhard Laggerbauer für ihre stetige Hilfsbereitschaft und die ideenreichen Diskussionen bedanken. Torsten Frambach danke ich für die Bereitstellung der Patientenproben, sein Engagement und die unkomplizierte, gute Zusammenarbeit.

Darüber hinaus gilt mein besonderer Dank den ehemaligen bzw. noch aktiven Mitarbeiterinnen der Arbeitsgruppe Sabine Merkle, Claudia Jentzsch und Petra Göbel für ihre stetige Hilfsbereitschaft, Aufmunterung und die ereignisreichen gemeinsamen Jahre, im Labor wie auch abseits der Arbeit.

In dieser Hinsicht danke ich auch den ehemaligen Würzburger Kollegen Julia Schittl, Nadine Yurdagül-Hemmrich, Carina Gross, Lydia Vlaskin und Morgan Dupuis, den mit mir nach München umgezogenen Kollegen Isabell Floherschütz, Xavier Loyer, Simon Leierseder, Deepak Ramanujam und Jaya Ganesan sowie den in München neuen Mitgliedern der Arbeitsgruppe Fabian Rodewald, Yassine Sassi, Astrid Vens und Megha Saraiya.

Ich bedanke mich zudem bei allen jetzigen und ehemaligen Mitgliedern des Rudolf-Virchow-Zentrums, des Instituts für Pharmakologie und Toxikologie der Universität Würzburg und des IPTs der TU München, darunter insbesondere Christian Dees, Peter Hein, Marianne Babl und Angelika Keller für die gute Zusammenarbeit und die stetige Hilfsbereitschaft.

Abschließend gilt mein herzlicher Dank meiner Familie und meinen Freunden für ihre Unterstützung und manchmal nötige Ablenkung vom Laboralltag.