

**Spezifische Markierungsverfahren  
von Rezeptoren  
mit kleinen Fluorophoren  
zur Analyse der Rezeptoraktivierung  
mittels FRET**

Dissertation zur Erlangung des  
naturwissenschaftlichen Doktorgrades  
der Bayerischen Julius-Maximilians-Universität Würzburg

vorgelegt von  
**Alexander Zürn**  
aus Würzburg

Würzburg 2009

Eingereicht am:.....  
bei der Fakultät für Chemie und Pharmazie

1. Gutachter:.....  
2. Gutachter:.....  
der Dissertation

1. Prüfer:.....  
2. Prüfer: .....  
3. Prüfer: .....  
des Öffentlichen Promotionskolloquiums

Tag des Öffentlichen Promotionskolloquiums:.....

Doktorurkunde ausgehändigt am:.....

Die vorliegende Arbeit wurde in der Zeit von Mai 2006 bis Februar 2009 am Institut für Pharmakologie und Toxikologie der Bayerischen Julius-Maximilians-Universität Würzburg unter der Anleitung von **Herr Prof. Dr. Martin J. Lohse** mit finanzieller Unterstützung der Deutschen Forschungsgemeinschaft angefertigt.



*"Der Wissenschaftler findet seine Belohnung in dem, was Poincaré die Freude am Verstehen nennt, nicht in den Anwendungsmöglichkeiten seiner Erfindung."*

*Albert Einstein*

Für Maximilian und Susanne

## **Inhaltsverzeichnis**

<b><u>I. Einleitung</u></b>	<b>11</b>	
I.1	Strukturelle Erkenntnisse durch Kristallisation von GPCRs	13
I.2	Biochemische Analysen zur Darstellung von Rezeptoraktivierungsmechanismen	15
I.3	FRET als optische Methode zur Analyse der Rezeptoraktivierung	18
I.3.1	Fluoreszierende Proteine in der Zellbiologie	18
I.3.2	FRET-Theorie und Anwendung	20
I.3.3	Einfluss von Donor und Akzeptor auf den Förster-Radius	22
I.3.4	FRET-Messungen	23
I.3.5	Beeinflussung des FRET	25
I.3.6	FRET zur Darstellung ligandenselektiver Rezeptorkonformationen	26
I.4	FRET-Messungen mit niedermolekularen Fluorophoren zur Aufklärung der Rezeptoraktivierung - das Tetracystein-Biarsen-System	31
I.4.1	Fluorescent Arsenic Hairpin Binder (FIAsH)	31
I.4.2	Die FIAsH-Methode zur Markierung von Proteinen in lebenden Zellen	33
I.4.3	Anwendungen des FIAsH als FRET-Partner	34
I.4.4	Weitere Biarsen-Fluorophore	35
I.4.5	Bindemotive	39
I.5	Fragestellung	41
<b><u>II. Material und Methoden</u></b>	<b>42</b>	
II.1.	Material	42
II.1.1	Bakterienstämme	42
II.1.2	Plasmide	42
II.1.3	Zelllinien	43

II.1.4	Enzyme	43
II.2.	Methoden	44
II.2.1	Molekularbiologische Methoden	44
II.2.1.1	Kultivierung von E. coli	44
II.2.1.2	Herstellung kompetenter Bakterien (Methode nach Chung und Miller, 1988)	44
II.2.1.3	Transformation von E. coli mit der „Hitzeschock“-Methode	45
II.2.1.4	Transformation von E. coli mit der KCM-Methode	45
II.2.1.5	Bestimmung der Transformationseffizienz	45
II.2.1.6	Isolierung von Plasmid-DNA (Minipräparation)	46
II.2.1.7	Isolierung von Plasmid-DNA mit Quiagen-Säulen	46
II.2.1.8	Quantifizierung von DNA	46
II.2.1.9	Agarose-Gelelektrophorese	47
II.2.1.10	Polymerasekettenreaktion (PCR)	47
II.2.1.11	Restriktionsverdau von DNA	48
II.2.1.12	Ligation von DNA-Fragmenten	48
II.2.1.13	Isolierung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen	49
II.2.1.14	Mutation von DNA mittels PCR	49
II.2.2	Zellkultur	49
II.2.2.1	Kultivierung eukaryontischer Zelllinien	49
II.2.2.2	Einfrieren und Auftauen von Zellen	49
II.2.2.3	Transfektion von Zellen mit Effectene	50
II.2.2.4	Quantifizierung von Proteinen nach Bradford	50
II.2.3	Proteinchemische Methoden	50
II.2.3.1	Membranpräparation	50
II.2.3.2	Radioligandenbindung	51
II.2.3.3	[ <sup>35</sup> S]-GTPγS-Bindungen	51
II.2.3.4	Computermodellanalysen	52
II.2.3.5	Fluorometrie	52
II.2.3.6	FRET-Messungen an lebenden Zellen	54
II.2.3.7	Konfokalmikroskopie	54
II.2.3.8	FIAsh/ReAsH	54
II.2.3.9	Markierung mit FIAsh	55



II.2.3.10	Markierung mit ReAsH	56
II.2.3.11	Markierung mit ReAsH und FIAsH	58
<b><u>III. Ergebnisse</u></b>		<b>60</b>
III.1	Untersuchung ligandenselektiver Konformationen am $\alpha_{2A}$ -adrenergen-Rezeptor	60
III.1.1	Theorie	60
III.1.2	Charakterisierung der Rezeptorsensoren	61
III.1.2.1	Membranlokalisation der FIAsH-markierten Rezeptorsensoren	61
III.1.2.2	Ligandenbindung der Rezeptorsensoren	62
III.1.2.3	[ $^{35}\text{S}$ ]GTP $\gamma$ S – Bindung	64
III.1.3	Messung der FRET-Amplituden	66
III.1.4	Messung der Aktivierungskinetik	69
III.2	Duales Markieren von Proteinen mit kleinen Fluorophoren	71
III.2.1	Charakterisierung der Tetracysteinsequenzen	73
III.2.1.1	Prinzip der Affinitätsbestimmung	73
III.2.1.2	Auswahl des Dithiols	74
III.2.1.3	Affinitätsbestimmung von FIAsH und ReAsH an unterschiedlichen Tetracysteinsequenzen	76
III.2.1.4	Einfluss der Proteinumgebung auf die Affinität der Bindesequenzen	81
III.2.2	Selektive und duale Markierung mit FIAsH und ReAsH	83
III.2.2.1	Theorie des Markierungsprotokolls	83
III.2.2.2	Markierungsprotokoll	84
III.2.2.3	Selektive und duale Markierung von zwei Proteinen in lebenden Zellen: $\beta$ -Arrestin2 und PTH-Rezeptor	85
III.2.2.3.1	Vorversuche für das duale Markieren von $\beta$ -Arrestin2 und PTH-Rezeptor	86
III.2.2.3.2	Duale und spezifische Markierung des $\beta$ -Arrestin2 mit FIAsH und des PTH-Rezeptors mit ReAsH	88
III.2.3	Intramolekulare, duale Markierung am $A_{2A}$ -Adenosin-Rezeptor	91

III.3.	Neue kleine Fluorophore zur spezifischen Markierung von Tetracysteinensequenzen	97
III.3.1	AsCy3	97
<b><u>IV. Diskussion</u></b>		<b>100</b>
IV.1	Ligandenselektive Konformationen	100
IV.2	Niedermolekulare Fluorophore zur Proteinmarkierung	106
<b><u>V. Zusammenfassung</u></b>		<b>116</b>
<b><u>VI. Summary</u></b>		<b>118</b>
<b><u>VII. Anhang</u></b>		<b>120</b>
VII.1	Abkürzungsverzeichnis	120
VII.2	Übersicht der Rezeptorkonstrukte	123
<b><u>VIII. Literatur</u></b>		<b>125</b>
<b><u>IX. Publikationen; Abstrakta und Kongressbeiträge</u></b>		<b>131</b>
<b><u>X. Danksagung</u></b>		<b>133</b>

## I. Einleitung

In der Pharmakologie sind G-Protein-gekoppelte Rezeptoren (GPCRs) die am meisten untersuchten Proteine. Die Rezeptoren besitzen eine hohe Liganden-selektivität und induzieren eine differenzierte Signalweiterleitung über eine spezifische G-Protein-Kopplung. Sie sind für zahlreiche physiologische Funktionen verantwortlich, wie zum Beispiel Geruch, Geschmack, Wachstum, Sekretion und Metabolismus (Marinissen and Gutkind, 2001). Daher wird geschätzt, dass GPCRs Zielproteine von über 30% der heute verfügbaren Pharmaka sind (Wong, 2003).

Allein das menschliche Genom kodiert für über 1000 dieser Rezeptoren, die anhand ihrer Kopplung an die vier  $G_\alpha$ -Protein-Familien ( $G_{\alpha s}$ ,  $G_{\alpha q}$ ,  $G_{\alpha i/o}$  und  $G_{12/13}$ ) eingeteilt und in 18 Subtypen eingeordnet wurden (Wong, 2003). Die  $G_{\alpha s}$ -Familie stimuliert die Adenylylcyclase ( $G_s$  und  $G_{olf}$ ), die  $G_{\alpha q}$ -Familie aktiviert die Phospholipase C ( $G_q$ ,  $G_{11}$ ,  $G_{14}$ , und  $G_{15/16}$ ), die  $G_{\alpha i/o}$ -Familie inhibiert die Adenylylcyclase und reguliert Ionenkanäle ( $G_{i1}$ ,  $G_{i2}$ ,  $G_{i3}$ ,  $G_{o1}$ ,  $G_{o2}$ ,  $G_{o3}$ ,  $G_z$ ,  $G_{t1}$ ,  $G_{t2}$ , and  $G_{gust}$ ) und die  $G_{12/13}$ -Familie aktiviert die  $Na^+/H^+$ -Austauscher-Kaskade ( $G_{12}$  und  $G_{13}$ ) (Wong, 2003).

Die Aktivierung der GPCRs wird extrazellulär durch Bindung verschiedenster Liganden ausgelöst, wie z.B. biogene Amine, Aminosäuren, Lipide, Ionen, Nukleotide, Peptide und auch Photonen, die zu hochspezifischen Konformationsänderungen der Rezeptoren führt (Gether, 2000). Nach der durch Ligandenbindung erfolgten Konformationsänderung interagiert der aktivierte Rezeptor mit den heterotrimeren G-Proteinen. Diese bestehen aus  $G_\alpha$ - und  $G_{\beta\gamma}$ -Untereinheiten, die mittels Austausch von GDP durch GTP aktiviert werden und dann mit Effektorproteinen hochspezifische Effekte ausführen. Besonders für die Entwicklung hochselektiver und wirksamer Arzneistoffe ist es essentiell, die Signaltransduktion von der Bindung des extrazellulären Liganden bis zur spezifischen G-Protein-Aktivierung zu verstehen. Dabei ist die ligandeninduzierte und zur G-Proteinaktivierung führende Konformationsänderung des Rezeptors von zentraler Bedeutung. Allen GPCRs sind sieben helikale Transmembrandomänen (TM) gemeinsam, die interessanterweise konserviert sind und die die extrazellulären Signale zur G-Proteinaktivierung ins Zellinnere weiterleiten (Schertler, 2008). Daher wird in den letzten Jahren vermehrt an der Fragestellung gearbeitet, wie die Transmembranstrukturen der GPCRs ligandenabhängige Selektivität weitervermitteln können. So wird versucht, die Frage zu klären, ob ein Rezeptor nach der Aktivierung

durch verschiedene Liganden eine oder mehrere spezifische Konformationen einnehmen kann, oder unterschiedlich lang in einer bestimmten Konformation gehalten wird. So ist auch die zeitliche Auflösung von einzelnen Konformationszuständen eine wichtige Voraussetzung für das Verständnis der mechanistischen Hintergründe der Signalvermittlung.

In den letzten Jahren wurde bereits gezeigt, dass bei solchen ligandeninduzierten Konformationsänderungen den Transmembrandomänen III und VI eine wichtige Rolle zukommt (Bissantz, 2003; Farrens et al., 1996; Gether, 2000; Hubbell et al., 2003; Sheikh et al., 1996; Wieland et al., 1996). So sollen Konformationsänderungen dieser beiden Transmembrandomänen die dritte intrazelluläre Schleife beeinflussen, der wiederum eine wichtige Rolle in der G-Protein-Kopplung zugeschrieben wird (Wess, 1998). Untersuchungen mit chimären Rezeptoren, in denen teilweise nur einige wenige Aminosäuren ausgetauscht wurden, zeigen eindrucksvoll die Bedeutung dieser dritten intrazellulären Schleife, v. a. ihrer C-terminalen Region (Wong, 2003). Weitere wertvolle Informationen, unter anderem über die Anordnung der Domänen zueinander, hat man aus den Kristallstrukturen gewonnen, auf die im Folgenden detailliert eingegangen wird.

## I.1 Strukturelle Erkenntnisse durch Kristallisation von GPCRs

In der letzten Zeit gelang es, neben der bereits länger bekannten Struktur des „Lichtrezeptors“ Rhodopsin (Palczewski et al., 2000; Schertler, 2005) die Struktur des  $\beta_1$ -adrenergen Rezeptors ( $\beta_1$ -AR), des Adenosin- $A_{2A}$ -Rezeptors ( $A_{2A}$ -R), des Opsins und des  $\beta_2$ -adrenergen Rezeptors ( $\beta_2$ -AR) aufzuklären. Der  $\beta_2$ -AR wird seit längerem als Modellrezeptor für GPCRs in vielen Studien untersucht und ist aus pharmakologischer Sicht sehr interessant. Es wurden zwei Kristallstrukturen (Kobilka and Schertler, 2008) gelöst, in denen der  $\beta_2$ -AR mit dem Antagonisten Carazolol co-kristallisiert und somit in seiner inaktiven Konformation dargestellt wurde (Abb.1).

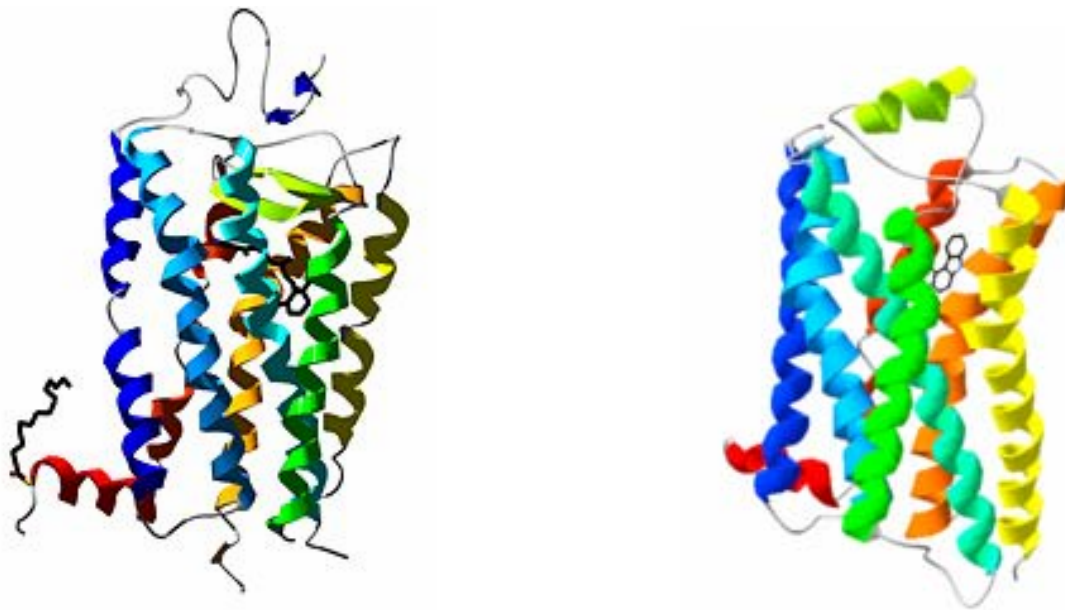


Abb.1: Schematisch die Kristallstrukturen links, des Rhodopsins nach Schertler (PDB 1GZM) und rechts des  $\beta_2$ -adrenergen-Rezeptors (PDB 2RH1) mit seinem Antagonisten Carazolol nach der Struktur von Kobilka. Die Struktur mit sieben Transmembrandomänen bildet das Grundgerüst der GPCRs (Kobilka and Schertler, 2008).

Zur Kristallisation war die Stabilisierung der dritten intrazellulären Schleife notwendig. Dazu wurde ein gegen diese Schleife gerichteter Antikörper co-kristallisiert, was jedoch die Struktur dieser Schleife beeinflussen könnte und damit eine genaue Aufklärung dieser Region verhinderte. Ebenso wie Rhodopsin, der  $\beta_1$ -AR, der  $A_{2A}$ -R und das Opsin besitzt der  $\beta_2$ -AR sieben helikale Transmembrandomänen. Zusätzlich zeigten diese Rezeptoren eine weitere helikale Struktur im C-Terminus, die nun als achte Helix bezeichnet wird und auch für viele andere GPCRs aufgrund von biochemischen Untersuchungen vermutet wird. In den vorliegenden Kristallen zeigt

der  $\beta_2$ -AR unerwarteter Weise eine weitere helikale Struktur in der zweiten extrazellulären Schleife und weist damit einen markanten strukturellen Unterschied zum Rhodopsin auf. Es wird spekuliert, dass diese zusätzliche helikale Struktur für die Ligandenbindung eine wichtige Rolle spielen, aber auch eine Angriffsfläche für beobachtete Autoimmunerkrankungen bieten könnte (Jahns et al., 2008). Es gibt also trotz der sehr ähnlichen Grundstruktur der GPCRs detaillierte Unterschiede, deren Funktion noch nicht geklärt ist.

Die Struktur des  $\beta_1$ -AR zeigt eine hohe Ähnlichkeit mit der des  $\beta_2$ -AR. Eine weitere Besonderheit bietet die kürzlich geklärte Struktur des Tintenfischrhodopsins, die grundsätzlich dem bovinen Rhodopsin sehr ähnlich ist, allerdings im C-Terminus statt einer zwei helikale Strukturen besitzt. Eine Funktion konnte dieser neunten Helix noch nicht zugeordnet werden. Alle bisher gelösten GPCR-Strukturen besitzen sehr ähnliche Konformationen hinsichtlich der Ausrichtung der Transmembrandomänen. Es bleibt zu untersuchen, ob diese strukturelle Anordnung nur in der nicht durch mehr Wasserstoffbrücken stabilisierten Kristallkonformation auftritt, oder ob G-Protein-gekoppelte Rezeptoren tatsächlich auch in ihrer physiologischen Umgebung diese Konformation annehmen. Jedoch ist die Tatsache allgemein unumstritten, dass ein GPCR seine Konformation ändern muss, um die Aktivierung des G-Proteins auszulösen.

## I.2 Biochemische Analysen zur Darstellung von Rezeptoraktivierungsmechanismen

Für lange Zeit wurde angenommen, dass GPCRs im Wesentlichen in zwei Konformationen auftreten können. Diese Konformationen sollten einem „AN-“ bzw. „AUS“-Zustand entsprechen. In diesem Modell galten Liganden als Agonisten, wenn sie den Rezeptor in der „AN“-Konformation stabilisieren, und als inverse Agonisten, wenn sie den Rezeptor in der „AUS“-Konformation stabilisieren. Ein Antagonist sollte das Gleichgewicht zwischen diesen Zuständen nicht beeinflussen, aber die Ligandenbindungsstelle des Rezeptors besetzen. Die ersten Versuche, die Bewegungen darzustellen, die ein Rezeptor bei seiner Aktivierung durchläuft, wurden am Rhodopsin vorgenommen.

So haben die Arbeitsgruppen um Hubbell und Khorana ausgehend von der postulierten Rhodopsinstruktur verschiedene Techniken angewandt, um eine Aktivierung des Rezeptors durch Liganden zu analysieren. Bei der Methode des „site directed spin labelings“ werden native Aminosäuren des Rezeptors durch Cysteine ausgetauscht, welche mit Nitroxiden reagieren können, die dann in benachbarte Seitenketten eingesetzt werden. Die Reaktion zwischen Nitroxiden und Cysteinen wird als paramagnetische Resonanz gemessen. Dadurch können Bewegungen von Seitenketten oder auch Distanzen zwischen dieser Seitenkette und dem Cystein bestimmt werden (Hubbell et al., 2003). Diese Technik wird oftmals mit der „disulfid crosslinking“ Technik kombiniert. Hierbei macht man sich den Effekt zu Nutze, dass die oxidative Entstehung von Disulfidbrücken zwischen den eingeführten Cysteinen Rückschlüsse auf die Flexibilität und Orientierung der Seitenkette zulässt (Falke and Koshland, 1987).

Indem insgesamt über 100 Mutanten des Rhodopsins erzeugt und mit Hilfe dieser Techniken analysiert wurden, konnte ein detailliertes Modell der Aktivierung dieses Rezeptors erstellt werden. So wurde gezeigt, dass Bewegungen der Transmembrandomänen für die Aktivierung des Rezeptors verantwortlich sind. Es zeigte sich, dass sich dabei die sechste Helix besonders stark bewegt (Hubbell et al., 1998). Durch diese Bewegung wird eine Bewegung auf die dritte intrazelluläre Schleife und damit auf die zytoplasmatische Seite übertragen (Abb.2).

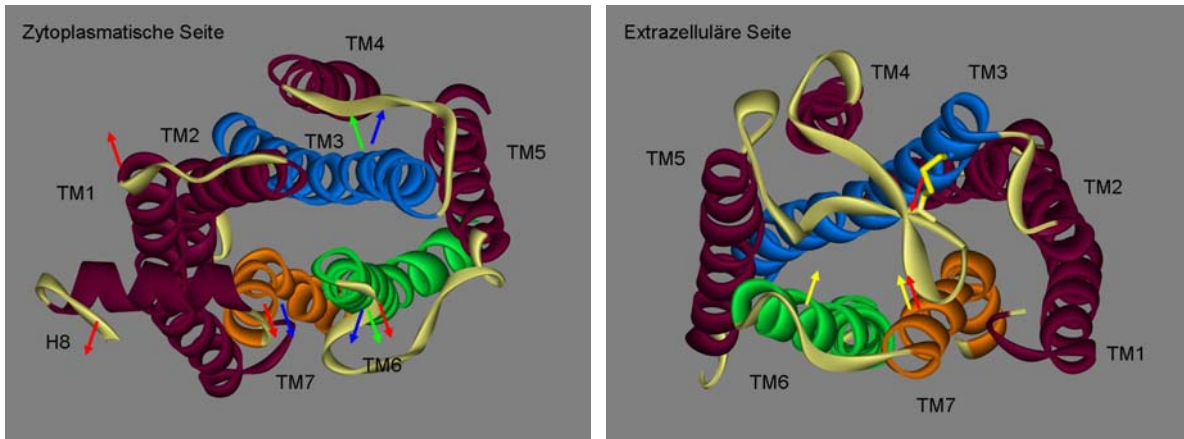


Abb.2: Bewegung der Helices, wie sie durch verschiedene Versuche beschrieben wurde, wobei hierfür die Kristallstrukturdaten des bovinen Rhodopsins (PDB access code:1U19 Okada et al., 2004) verwendet wurden. Es wird folgender Farbcode verwendet: TM III blau, TM IV grün und TM VII orange. Links wird die Sicht von der zytoplasmatischen Seite, rechts die Sicht von der extrazellulären Seite gezeigt. Die Pfeile zeigen die Bewegungen für verschiedene Rezeptoren; Modifiziert nach: (Hoffmann et al., 2008), mit Genehmigung von NPG.

Die zweite intrazelluläre Schleife wiederum folgt vermutlich der Bewegung der TM III, die nach der Aktivierung des Membranproteins eine weniger starke Bewegung als die TM VI ausführt (Hubbell et al., 2003). Die Untersuchungen zeigen, dass sich die erste intrazelluläre Schleife nur wenig bewegt. Der C-Terminus des Rhodopsins ist sehr beweglich und scheint der Bewegung der TM VII zu folgen, allerdings ist die genaue Bewegung dieses Proteinabschnitts nicht durch die Arbeiten von der Gruppe um Hubbell geklärt. In der Struktur des partiell aktiven Opsins werden Bewegungen des C-Terminus für diesen GPCR gezeigt (Park et al., 2008a; Park et al., 2008b). Zusammenfassend beschreiben Meng und Bourne 2001 die Gesamtheit dieser Bewegung als ein „Aufblühen“, welches die Interaktion des Rezeptors mit nachgeschalteten Signalproteinen, den G-Proteinen oder den  $\beta$ -Arrestinen erlaubt (Meng and Bourne, 2001).

Die Arbeiten am „Lichtrezeptor“ Rhodopsin sind allerdings für die Erstellung von Modellen für die Aktivierung ligandenbindender Rezeptoren nur bedingt geeignet. Bei diesen können verschiedene Substanzen mit unterschiedlichen Affinitäten und Effizienzen den gleichen Zielrezeptor aktivieren (Kenakin, 1997). Die Liganden werden aufgrund ihrer Affinität zum Rezeptor und der Effizienz, mit der sie die Signalweiterleitung auslösen, in verschiedene Gruppen eingeteilt: 1) volle Agonisten sind diejenigen, die durch Bindung eine maximale Rezeptoraktivierung auslösen, 2)



partielle Agonisten sind diejenigen, die an den Rezeptor binden, aber nur zu einer partiellen Sekundärantwort führen, 3) Antagonisten sind diejenigen Substanzen, die an den Rezeptor binden und keine Sekundärantwort auslösen, 4) ein inverser Agonist löst einen gegenläufigen Effekt in der Zelle in Bezug auf die Sekundärantwort aus (Urban et al., 2007).

Heute postuliert man, dass GPCRs ligandenabhängig verschiedene Konformationen eingehen können (Hoffmann et al., 2008; Perez and Karnik, 2005; Urban et al., 2007; Vauquelin and Van Liefde, 2005). Dies beruhte auf der Messung von Sekundärantworten. So konnte gezeigt werden, dass verschiedene Substanzen zur Inhibierung unterschiedlicher Signalwege am gleichen Rezeptor unter sonst gleichen Bedingungen führen konnten (Berg et al., 1998). Auch bei Untersuchungen an Subtypen des Serotoninrezeptors (5-HT<sub>2c</sub>) konnte gezeigt werden, dass die Effizienz verschiedener Agonisten nicht mit ihrer Fähigkeit korreliert, den Rezeptor zu desensibilisieren. Zwei Liganden können darüber hinaus unterschiedliche Sekundärantworten auslösen. Für den 5HT<sub>2c</sub>-Rezeptor, der G<sub>αq</sub>-vermittelt die Phospholipase C stimuliert und gleichzeitig Phospholipase A2-vermittelt zu einer Freisetzung von Arachidonsäure führt, wurde gezeigt, dass es Substanzen gibt, die in der Lage waren, am 5-HT<sub>2c</sub>-Rezeptor einerseits als Agonist für den G<sub>αq</sub>-Signalweg zu fungieren, aber andererseits für die G<sub>αi</sub>-Aktivierung ein inverser Agonist zu sein scheinen (Hoyer et al., 2002). Weitere Substanzen wiederum bewirkten entweder eine Aktivierung oder eine Inhibierung der beiden Signalwege. Es ist auch möglich, dass zwei Substanzen an einem Rezeptor für den einen Signalweg fast identische Effekte hervorrufen, für eine alternative Sekundärantwort aber sehr unterschiedliche Ergebnisse liefern. Ähnliche Effekte wurden auch für Liganden des μ-Opioidrezeptors (Whistler et al., 1999) beschrieben. Die drei vollen Agonisten DAMGO, Methadon und Morphin sind alle in der Lage, über den μ-Opioidrezeptor eine vergleichbare Aktivierung der GIRK-Kanäle auszulösen, jedoch zeigt Morphin eine deutlich weniger ausgeprägte Internalisierung dieses Rezeptors im Vergleich zu den anderen beiden Substanzen (Alvarez et al., 2002). Am β<sub>2</sub>-AR konnte durch massenspektroskopische Verfahren gezeigt werden, dass verschiedene Liganden zu unterschiedlichen Phosphorylierungsmustern des Rezeptors führen (Trester-Zedlitz et al., 2005). Alle diese Ergebnisse stützen ein Modell der ligandenselektiven Konformationen (Hoffmann et al., 2008; Urban et al., 2007).

### I.3 FRET als optische Methode zur Analyse der Rezeptoraktivierung

#### I.3.1 Fluoreszierende Proteine in der Zellbiologie

Um Proteine in lebenden Zellen zu visualisieren, werden diese in der Regel mit fluoreszierenden Antikörpern oder direkt mit fluoreszierenden Proteinen oder Farbstoffen markiert. Dafür werden fluoreszierende Farbstoffe verwendet, die selektiv durch Licht eines Wellenlängenbereichs angeregt werden können und Licht einer anderen Wellenlänge wieder emittieren. Der wohl größte Durchbruch für die Visualisierung von Proteinen war die Entdeckung des grün fluoreszierenden Proteins (GFP) aus der Qualle *Aequorea victoria* (Abb.3; Shimomura et al., 1963). Seine kaum zu überschätzende Bedeutung in der Zellbiologie liegt in der Möglichkeit, GFP mit beliebig anderen Proteinen zu fusionieren. Diese Entdeckung wurde im Jahr 2008 mit dem Nobelpreis für Chemie ausgezeichnet. Heute ist es eine Standardmethode, die cDNA des GFP mit der cDNA eines gewünschten Proteins zu fusionieren und mit Hilfe eines Expressionsvektors in Zellen nach Transfektion zur Expression zu bringen.

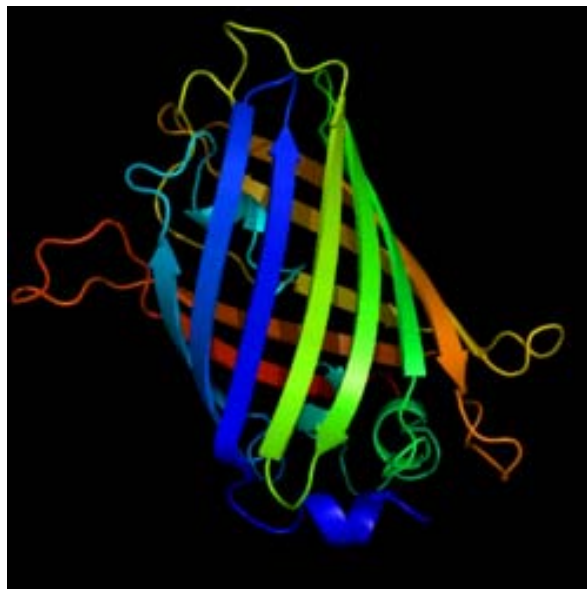


Abb.3: Schematische Struktur des GFP (PDB 1EMB). Die für die Fluoreszenz verantwortlichen Aminosäuren befinden sich in der Mitte der Struktur. Durch die Anordnung dieser Aminosäuren entsteht ein planares, aromatisches Ringsystem.

Durch Anregung der Fluoreszenz von GFP kann so die räumliche und zeitliche Verteilung des mit GFP fusionierten Proteins in lebenden Zellen, Geweben oder Organismen direkt beobachtet werden (Shimomura et al., 1963; Tsien, 1998).

GFP besteht aus 238 Aminosäuren und hat eine Molekülmasse von 27 kDa. Das eigentliche Fluorophor des GFP bildet sich autokatalytisch aus der Tripeptidsequenz Ser<sub>65</sub>-Tyr<sub>66</sub>-Gly<sub>67</sub>. In seinem Ursprungsorganismus, *Aequorea victoria*, wird GFP durch strahlungsfreien Energietransfer vom Photoprotein Aequorin angeregt. Für zell- und molekularbiologische Anwendungen wird GFP meist optisch angeregt. Das unmodifizierte, natürlich vorkommende GFP hat zwei Anregungsmaxima. Ein erstes liegt bei einer Wellenlänge von 395 nm, ein zweites bei 475 nm. Die Emissionswellenlänge liegt bei 509 nm. Mittlerweile gibt es diverse modifizierte GFP-Versionen mit unterschiedlichen Fluoreszenzspektren. Entsprechend ihrer Emissionsfarbe heißen diese zum Beispiel CFP (cyan), YFP (yellow) oder RFP (red) (Shaner et al., 2004); Abb.4). Weitere Modifikationen dieser Varianten führten zu Proteinen, die stabiler sind und intensiver leuchten, so z.B. das „enhanced YFP“. So ist es auch möglich, zwei verschiedene Proteine mit unterschiedlichen GFP-Varianten in einer Zelle zu exprimieren.

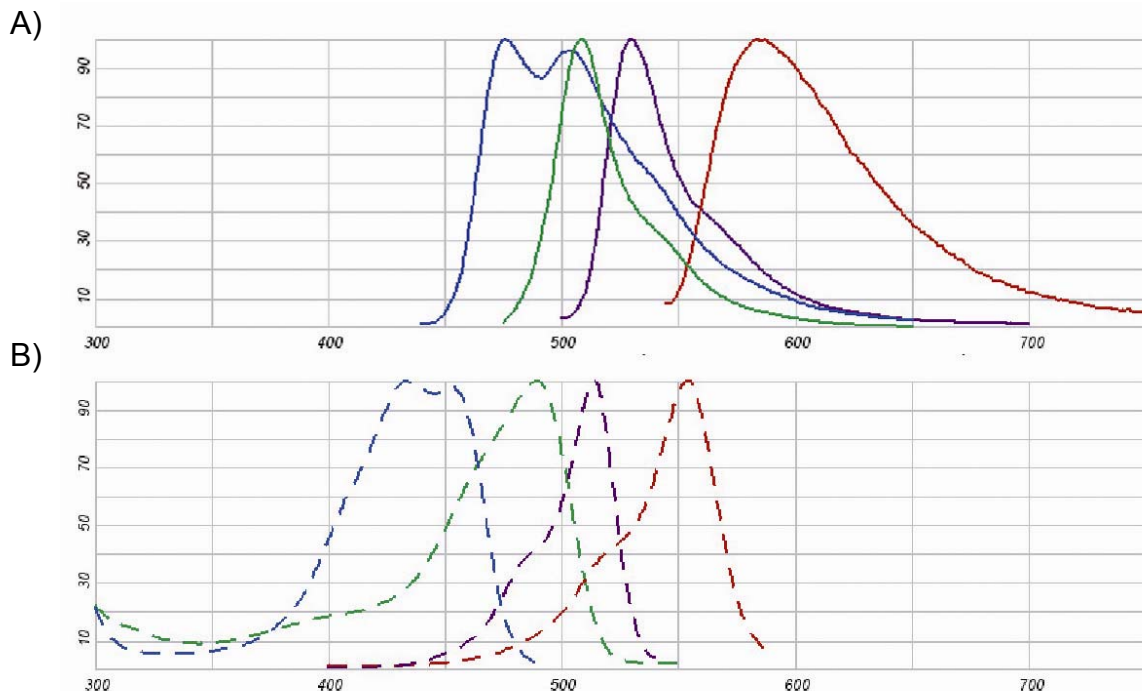


Abb.4: Emissionsspektren (A) und Absorptionsspektren (B) der heute meist verwendeten GFP-Varianten. In blau dargestellt eCFP, in grün eGFP, in violett eYFP, in rot RFP. In (A) werden die Absorptionsspektren gestrichelt, in (B) die Emissionsspektren durchgehend gezeigt (<http://www.invitrogen.com>).

### I.3.2 FRET–Theorie und Anwendung

Verschiedene GFPs sind nach Anregung unter bestimmten Bedingungen in der Lage, Energie auf ein anderes GFP zu übertragen und es damit anzuregen. Dieser Förster-Resonanz-Energie-Transfer oder auch Förster-Transfer (kurz *FRET*) ist ein 1948 von Theodor Förster entdeckter quantenphysikalischer Prozess, bei dem Energie eines angeregten Farbstoffs (Donor) strahlungsfrei auf ein Akzeptormolekül übertragen werden kann, wenn der Abstand 1 bis 10 nm beträgt. Sind sowohl Donor als auch Akzeptor Fluoreszenzfarbstoffe, spricht man von einem „Fluoreszenz Resonanz Energie Transfer“, wobei in der Literatur diese Form des Energietransfers oft synonym für „Förster resonance energy transfer“ gebraucht wird. Ist der Donor hingegen eine Biolumineszenzquelle und der Akzeptor ein Fluoreszenzfarbstoff, wird der Begriff Biolumineszenz-Resonanz-Energie-Transfer (BRET) verwendet. Da die Intensität des Förster-Resonanz-Energie-Transfers entscheidend vom Abstand zwischen Akzeptor und Donor abhängt, ist es möglich, Distanzänderungen zwischen den Fluorophoren als Änderung des FRET zwischen beiden zu messen. Daher hat sich die Nutzung dieses Prozesses als "optisches Nanometermaß" insbesondere in der Biochemie und der Zellbiologie etabliert (Ghanouni et al., 2001a; Stryer, 1978).

Um eine strahlungsfreie Energieübertragung auf ein Akzeptormolekül via FRET zu ermöglichen, müssen verschiedene Kriterien erfüllt sein: Das Emissionsspektrum des Donors muss mit dem Absorptionsspektrum des Akzeptors überlappen, und Donor und Akzeptor müssen parallele elektronische Schwingungsebenen haben. Der Abstand von Donor und Akzeptor sollte 1-10 nm betragen, so dass eine Änderung des Energieübergangs noch messbar ist. Diese Parameter fasste Förster in der nach ihm benannten Förster-Gleichung zusammen (Gl.1, Gl.2) (Förster, 1948; Fujitsuka et al., 2006; Yasuda, 2006).

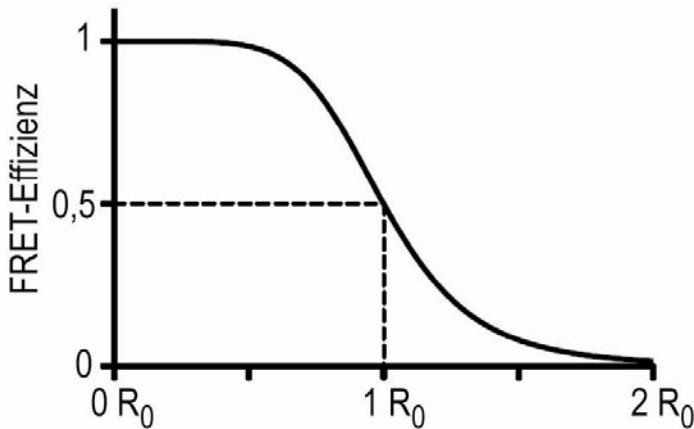


Abb. 5: FRET-Effizienz. Diese hängt von der sechsten Potenz der Distanz zwischen den beiden Fluorophoren ab (Gl.1). Die Entfernung, bei der der Energietransfer halbmaximal ist, wird  $R_0$ =Förster-Radius genannt. Er beträgt für das FRET-Paar CFP/YFP etwa 5 nm. Der Förster-Radius wird von Parametern beeinflusst, welche durch das jeweilige Messsystem vorgegeben sind (Gl.2).

$$E = r^{-6} / (r^{-6} + R_0^{-6}) \quad \text{Gl.(1)}$$

$E$  = FRET-Effizienz

$R$  = Distanz zwischen den beiden Fluorophoren

$R_0$  = Förster-Radius

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:

$$R_0 = (JK^2Q_0n^{-4})^{1/6} \times 9.7 \times 10^3 \text{ \AA} \quad \text{Gl.(2)}$$

$n$  = 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-Exzitation

### I.3.3 Einfluss von Donor und Akzeptor auf den Förster-Radius

Für FRET-Messungen benötigt man einen geeigneten Donor sowie einen dazu passenden Akzeptor.

Der ideale Donor sollte einen hohen Exzitationskoeffizienten (Quanteneffizienz) haben, das heißt eine hohe Absorption von Einzel- oder Multiphotonen. Die hohe Absorption führt zu einer hohen Quanteneffizienz, also zu einem hohen Verhältnis von aufgenommenen zu eingestrahlenen Photonen. Ebenso sollte die Quantenausbeute groß sein, also das Verhältnis von emittierten Photonen zu absorbierten Photonen möglichst gleich 1 sein. Der Abstand zwischen Exzitations- und Emissionsspektrum („Stokes shift“) muss angemessen groß sein, um eine Direktanregung des Akzeptors bei der Donor-Exzitation („Falschanregung“) zu vermeiden. Erwünscht ist eine Inertheit gegenüber Umgebungseinflüssen wie pH-Änderungen, Polaritätsänderungen und Ionisationskräften, die bei Konformationsänderungen oder Bewegungen des Proteins in andere Zellkompartimente auftreten können.

Ein idealer FRET-Akzeptor braucht annähernd die gleichen Parameter wie sein Donor. Im Zusammenhang mit diesem ist ein möglichst hoher Wert für die Überlappung der Donor-Emission mit der Akzeptor-Exzitation erforderlich. Auch hier verhindert ein großer „Stokes shift“ ein übermäßiges „Durchbluten“, d.h. die Messung von Donor-Emission in der Akzeptor-Emission. Das „Durchbluten“ kann auch durch geeignete Filter oder Strahlenteiler eingegrenzt werden (siehe II. Material und Methoden). Für den Akzeptor, dessen Emission gemessen werden soll, ist es besonders wichtig, dass die Quanteneffizienz und die Quantenausbeute hoch sind, da sie die entscheidenden Parameter für die Helligkeit des Akzeptors sind. Jedoch kann eine starke Akzeptor-Emission je nach Messapparatur und Art der Messung, ebenso gewünscht sein wie ein so genannter „dark quencher“, welcher in der Lage ist, eine große Anzahl an Photonen aufzunehmen, also hohe Quanteneffizienz besitzt, aber kein Licht emittiert, also geringe Quantenausbeute aufweist (Jares-Erijman and Jovin, 2006).

Die Quantenausbeute kann allerdings nur für das jeweilige Fluorophor angegeben werden, wenn dabei der Donor berücksichtigt wird. Denn die Quantenausbeute ist von den aufgenommenen Photonen abhängig und diese sind für jeden Donor spezifisch. Weiter muss die Orientierung der delokalisierten  $\pi$ -Elektronen des Akzeptors für das Erreichen der maximalen Quantenausbeute optimal sein.

### I.3.4 FRET-Messungen

Generell kann FRET auf drei verschiedene Arten bestimmt werden: Durch 1) intensitäts-basierte Messungen, 2) Fluoreszenzlebenszeit-Messungen (fluorescence lifetime imaging microscopy, FLIM) und 3) Messungen der Anisotropie (Fujitsuka et al., 2006).

1) Bei intensitäts-basierten Messungen wird der Donor selektiv bei seinem Exzitations-Maximum angeregt, daraufhin werden die relativen Emissionen von Donor und Akzeptor aufgenommen. Das ratiometrische Verhältnis der Akzeptorintensität zur Donorintensität wird hierbei als „FRET-Ratio“ bezeichnet. Nimmt der Abstand innerhalb bestimmter Grenzen (1-10 nm) zwischen Donor und Akzeptor zu, wird gemäß der Förstergleichung weniger Energie übertragen, so dass die Donor-Emission zu- und die Akzeptor-Emission abnimmt. Nähern sich Donor und Akzeptor an, wird mehr Energie übertragen, so dass die Donor-Emission ab- und die Akzeptor-Emission zunehmen. Bleiben alle anderen Parameter konstant, kann also eine Änderung der Distanz zwischen Donor und Akzeptor durch die Änderung des „FRET-Ratios“ dargestellt werden.

Die Amplitude der Änderungen des „FRET-Ratios“ hängt wiederum von der FRET-Effizienz ab. Um die FRET-Effizienz zu bestimmen, regt man den Akzeptor mit hoher Energie und kontinuierlich mit der Wellenlänge an, bei der er sein Exzitationsmaximum hat. Dadurch „bleicht“ das Fluorophor des Akzeptors aus, der dadurch nicht mehr in der Lage ist, die Energie des Donors aufzunehmen. Diese Energie wird nun als zusätzliche Donor-Emission sichtbar. Der Quotient aus den abgegebenen Donor-Emissionen nach bzw. vor dem Bleichen des Akzeptors ist die FRET-Effizienz. Bei intensitäts-basierten FRET-Messungen sollte gewährleistet sein, dass sich die Wellenlängenbereiche des emittierten Lichts des Donors nicht mit denen des emittierten Lichts des Akzeptors überschneiden. In der Praxis lässt sich dies jedoch meistens nicht vollständig vermeiden. Dieses Phänomen wird als „Durchbluten“ bezeichnet. Ebenso muss bestimmt werden, welcher Anteil der Akzeptor-Emission direkt durch die Anregung des Donors ausgelöst wurde. Diese Akzeptor-Emission, die bei der Anregungswellenlänge des Donors entsteht, wird Falschanregung genannt. Sowohl das Durchbluten als auch die Falschanregung sind bei der Auswertung von intensitäts-basierten FRET-Experimenten zu berücksichtigen.

2) Bei Fluoreszenzlebenszeit-Messungen bestimmt man die Zeit, in der ein Fluorophor seinen angeregten Zustand behält, die im Idealfall einer Monoexponentialfunktion folgt. Wenn der Donor in der Lage ist, seine Energie auf einen Akzeptor zu übertragen, verkürzt sich die Dauer der Donor-Emission und es ändert sich diese Exponentialfunktion. Ein Vorteil dieser Methode ist, dass nur die Donor-Emission gemessen werden muss, womit das Problem der Direktanregung des Akzeptors irrelevant wird. Somit muss spektrales Durchbluten nicht berücksichtigt werden. Nachteil ist ein höherer apparativer Aufwand, da für diese Messungen ein gepulster Laser benötigt wird.

3) FRET kann auch über die Messung der Fluoreszenzanisotropie bestimmt werden. Dazu wird die Probe mit polarisiertem Licht aus einem  $90^\circ$ -Winkel zum Fluorophor angeregt. Gemessen wird der Polarisationswinkel der Emission, der sich im Verhältnis des stattfindenden Energietransfers ändert. Hierbei ist auch der Orientierungsfaktor der Dipol-Dipol-Intensitäten der beiden Fluorophore vor und nach einem Energietransfer messbar.



I.3.5 Beeinflussung des FRET

Die in der Förstergleichung aufgezeigten Parameter können jeder für sich einen großen Einfluss auf den Energietransfer zwischen den beiden Fluorophoren bei einer FRET-Messung nehmen, weshalb die FRET-Messung einen sehr komplexen Prozess darstellt, der nicht nur von den Grundeigenschaften des Donors und des Akzeptors abhängig ist. Von Jares-Erijman und Jovin (2006) wurde dies, folgendermaßen dargestellt (Abb.6).

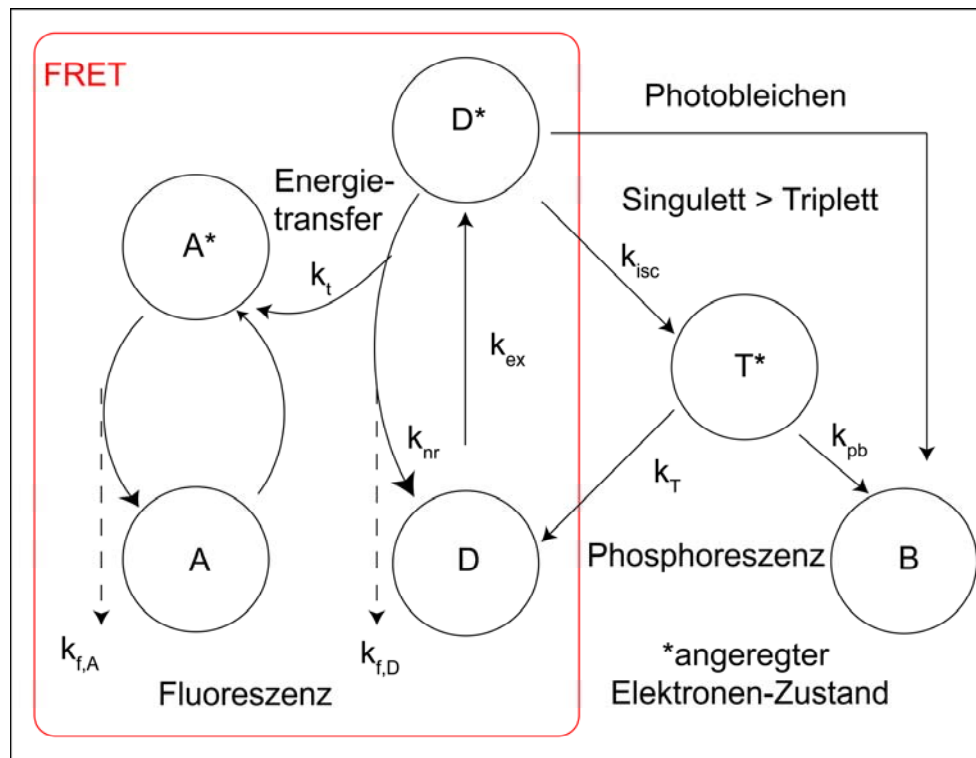


Abb.6: Zusammenhänge der Parameter, welche eine FRET-Messung beeinflussen können. Wird ein Donor D durch die Absorption von Licht ( $k_{ex}$ ) angeregt, wird er in ein energiereicheres Energieniveau gehoben ( $S1=D^*$ ). Die Deaktivierung erfolgt durch Fluoreszenzemission ( $k_{f,D}$ ), strahlungsfreien Übergang ( $k_{nr}$ ), intersystemischen Übergang in den Triplet Zustand ( $k_{isc}$ ), gefolgt von Photobleichen ( $k_{pb}$ ) oder Phosphoreszenz ( $k_T$ ) und Resonanz-Energietransfer zu einem geeigneten Akzeptor ( $k_t$ ). Der Resonanz-Energietransfer wird wiederum durch Emission deaktiviert ( $k_{fa}$ ); Modifiziert nach: (Jares-Erijman and Jovin, 2006), mit Genehmigung von Elsevier.

In der dargestellten Skizze wird die Komplexität der Einflüsse auf die Energieübertragung von Donor zu Akzeptor dargestellt. Bewegt sich das Donorfluorophor in seiner Position oder Orientierung, ändert sich nicht nur die Energieübertragung auf den Akzeptor, sondern auch alle hier aufgezeigten

Parameter, von denen FRET abhängt. Deshalb ist es äußerst selten, dass bei einer gemessenen FRET-Änderung der Akzeptor in der gleichen Intensität abnimmt oder zunimmt, wie der Donor zunimmt bzw. abnimmt. So kann z.B. die Energieübertragung auf den Akzeptor durch eine Distanzvergrößerung zwischen den beiden abnehmen, und gleichzeitig durch die Änderung der Umgebung die strahlungsfreie Energieübertragung an das umgebene Medium zunehmen. Dabei würde die Fluoreszenz des Akzeptors stark abnehmen, jedoch die Donorfluoreszenz nicht im selben Maße ansteigen (Jares-Erijman and Jovin, 2006). Aus diesen Zusammenhängen wird weiterhin deutlich, dass aus der Änderung der FRET-Effizienz nur dann auf die Distanz zwischen den beiden Fluorophoren geschlossen werden kann, wenn alle anderen Parameter völlig stabil bleiben, was in der Praxis nur schwer zu gewährleisten ist (Jares-Erijman and Jovin, 2006). So lassen sich die Zusammenhänge der einzelnen Parameter zwar theoretisch berechnen (Clayton et al., 2005); es bleibt allerdings zu bemerken, dass solche Berechnungen sowie Rückschlüsse auf Bewegungen und Umgebungen von Fluorophoren lediglich einen Modellcharakter haben.

### I.3.6 FRET zur Darstellung ligandenselektiver Rezeptorkonformationen

FRET-basierte Methoden wurden bereits angewendet, um Bewegungen von GPCRs sichtbar zu machen (Hoffmann et al., 2008; Kobilka, 2007; Kobilka und Deupi, 2007; Lohse et al., 2007, 2008)

Ursprünglich wurden gereinigte  $\beta_2$ -AR verwendet, bei denen fluoreszierende Substanzen (Alexa-Farbstoffe), deren Intensität von der Polarität der Umgebung abhängig ist, an definierte Cysteine gekoppelt wurden. Mit diesen Sensoren, die nur ein Fluorophor enthielten, war es möglich, Bewegungen des Fluorophors durch die Änderung der Emission in Abhängigkeit der Umgebung zu beobachten (Gether et al., 1997). Wird ein solches Fluorophor mit einem „Quencher“ kombiniert, welcher die Energie des Fluorophors aufnimmt, ohne selbst Licht zu emittieren, kann eine relative Distanzänderung zwischen Fluorophor und „Quencher“ als Änderung der Fluoreszenzintensität verfolgt werden. Mit dieser Methode kann so die Bewegung von Rezeptoren nach der Aktivierung durch verschiedenen Agonisten verfolgt werden. Diese Versuche waren die ersten, bei denen ein echter

Resonanzenergietransfer zur Rezeptoraktivierungsdarstellung verwendet wurde (Kobilka, 2007).

Es zeigte sich, dass ein Agonist, ähnlich wie beim Rhodopsin, auch am  $\beta_2$ -AR starke Bewegungen in der TM III und der TM VI auslöst (Gether et al., 1997; Gether et al., 1995). Ghanouni et al. zeigten 2001 mit Hilfe von Fluoreszenzlebensdauer-Messungen an einem unterhalb der TM VI markierten  $\beta_2$ -AR, dass verschiedene Liganden zu unterschiedlichen Bewegungen des Rezeptors führen (Ghanouni et al., 2001a; Ghanouni et al., 2001b). Mit Hilfe von intensitäts-basierten FRET-Messungen konnte gezeigt werden, dass der gereinigte  $\beta_2$ -AR nach der Aktivierung durch die vollen Agonisten Isoprenalin, Noradrenalin oder Adrenalin die TM VI, TM III und TM VI bewegt. Im Gegensatz dazu war der partielle Agonist Salbutamol nur in der Lage, eine messbare Konformationsänderung der TM VI auszulösen (Yao et al., 2006a). Eine vergleichbare Studie wurde hinsichtlich der Bewegung des C-Terminus durchgeführt, die auch ligandenselektive Konformationen zeigte (Granier et al., 2007).

Mit Hilfe der dynamischen FRET-Technik, bei der Donor- und Akzeptorfluorophor eine relative Bewegung zueinander ausführen, konnten Vilardaga et al. 2003 agonisteninduzierte Rezeptorbewegungen erstmals in lebenden Zellen verfolgen (Vilardaga et al., 2003). Da diese Methode als Grundlage der vorliegenden Arbeit dient, sollen an dieser Stelle die methodischen Details kurz erläutert werden (Abb.7). Hierbei wird schematisch das intramolekulare FRET dargestellt; neben diesem wurde auch das intermolekulare FRET als Technik zur Erstellung dieser Arbeit angewendet.

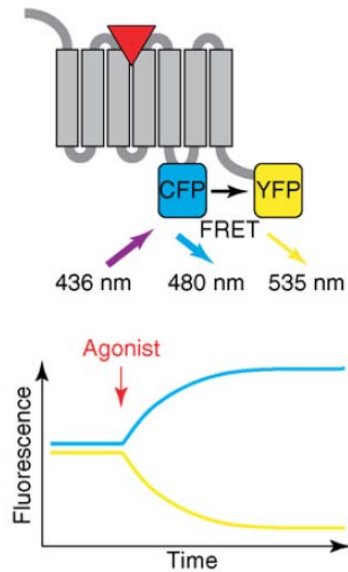


Abb.7: Prinzipien des dynamischen FRET am Beispiel des CFP/YFP FRET-Paares. Dargestellt ist Intramolekulares FRET an einem durch einen Agonisten (rotes Dreieck) aktivierten Rezeptors. Unten sind jeweils die Spuren der Einzelfluoreszenzkanäle des CFP (cyan) und des YFP (gelb) schematisch dargestellt; Modifiziert nach: (Lohse et al., 2008), mit Genehmigung von Elsevier.

Zur Aufklärung der Rezeptoraktivierung mit Hilfe von intramolekularem FRET wurden Rezeptoren konstruiert, die ein CFP in der dritten intrazellulären Schleife und ein YFP am C-Terminus tragen (Abb.7; Hoffmann et al., 2005; Rochais et al., 2007; Vilardaga et al., 2003). YFP und CFP bilden ein FRET-Paar, da die Emissionskurve des CFP mit der Exzitationskurve des YFP überlappt, und CFP damit als Donor dem YFP als Akzeptor Energie übertragen kann (Abb.8).

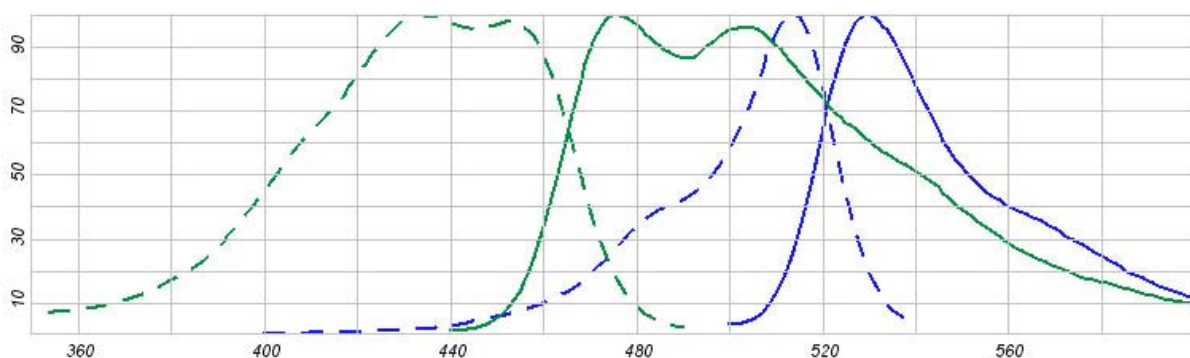


Abb.8: Exzitations- (gestrichelte Linie) und Emissionsspektren (durchgehende Linie) von CFP (grün) und YFP (blau). Es ist zu erkennen, dass sich das Emissionsspektrum von CFP mit dem Exzitationspektrum von YFP bei der Wellenlänge von 509 nm überschneidet. Dadurch ist ein strahlungsloser Energieübergang von CFP auf YFP möglich (<http://www.invitrogen.com>).

Abb.7 zeigt schematisch die durch die Konformationsänderung eines solchen Rezeptorsensors erzeugten Änderungen der Donor- und Akzeptor-Emissionen, die nach Zugabe des Agonisten erfolgen. Der Vorteil bei intramolekularen FRET-Messungen ist, dass die Fluorophore stöchiometrisch immer im Verhältnis 1:1 vorliegen. Somit wirken verschiedene Parameter, die die Messung beeinflussen können, wie z.B. Signalabschwächung durch direkte Umgebungseinflüsse auf die beiden Fluorophore gleichermaßen ein.

Interaktionen zwischen Proteinen können mit intermolekularem FRET untersucht werden. Hierzu wird eines der beiden Zielproteine mit dem Donor, das andere mit dem Akzeptor markiert. Hier können Assoziation und Dissoziation durch die Änderung des „FRET-Ratios“ verfolgt werden.

Abb.9 fasst zusammen, welche Schritte der Aktivierung von GPCRs bisher mit Hilfe von dynamischem FRET untersucht wurden (Lohse et al., 2008). Da bei diesen Messungen die Bewegungen der Fluorophore direkt die Bewegungen der betrachteten Proteine wiedergeben, ist eine kinetische Auflösung dieser Prozesse möglich. So konnten mit Rezeptorsensoren schnellere Aktivierungskinetiken von GPCRs aufgelöst werden, als es bisher möglich war (Lohse et al., 2007). Zudem konnte gezeigt werden, dass sich die Rezeptoraktivierungskinetiken verschiedener Agonisten unterscheiden: Während der volle Agonist Norepinephrin eine relativ schnelle Aktivierungskinetik am  $\alpha_{2A}$ -AR mit einer Halbwertszeit von ca. 50 ms aufwies, zeigte der partielle Agonist Octopamin einige hundert Millisekunden Halbwertszeit und inverse Agonisten sogar Kinetiken von einer Sekunde (Nikolaev et al., 2006). Während Rezeptoraktivierung und Rezeptor-G-Protein-Interaktion mit ähnlich schnellen Kinetiken ablaufen (30-50 ms Halbwertszeit), erfolgt die G-Protein-Aktivierung mit einer Halbwertszeit von 300-500ms und ist damit der geschwindigkeitslimitierende Schritt (Hein et al., 2006). Es ist allerdings nicht auszuschließen, dass die Rezeptoraktivierung in „Echtzeit“ noch schneller abläuft, als derzeit mit FRET-basierten Methoden gemessen werden kann, da Prozesse wie Ligandendiffusion und Ligandenbindung in den verwendeten Messsystemen nicht aufgelöst werden können. So wurde beim Rhodopsin, das direkt durch Licht aktiviert werden kann, eine Aktivierungskinetik mit einer Halbwertszeit von einer Millisekunde gemessen.

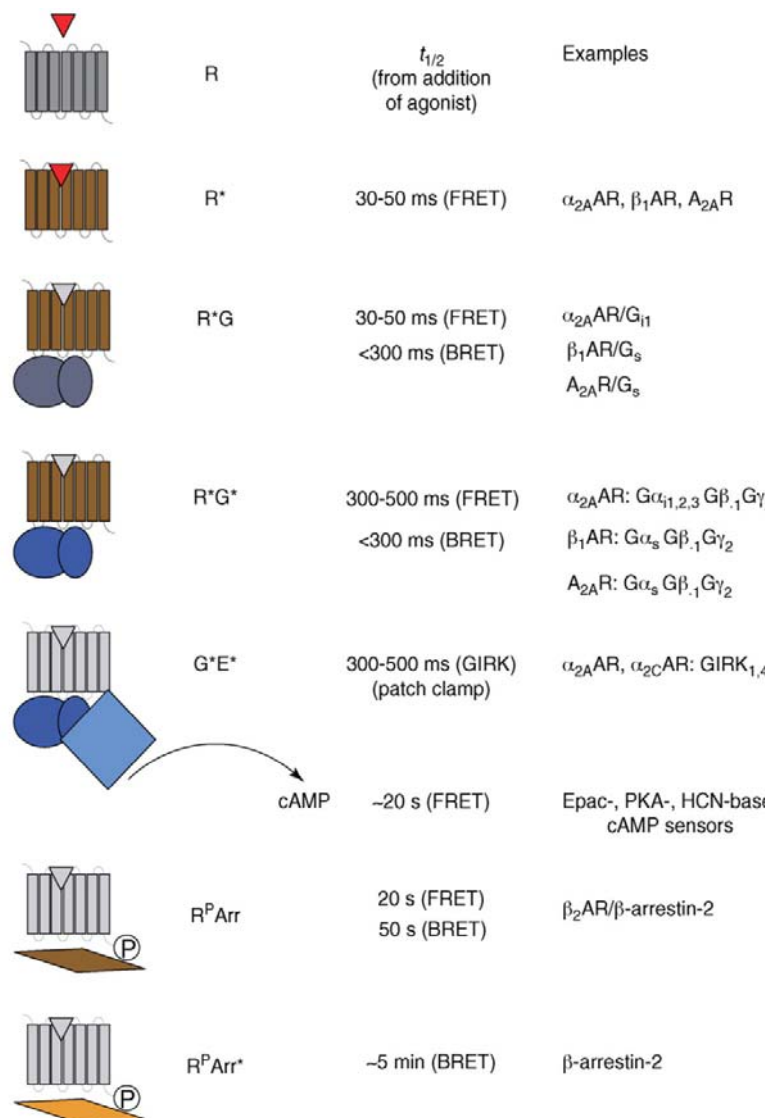


Abb.9: Verschiedene Stufen der GPCR-Aktivierung durch Agonisten (rotes Dreieck), deren Kinetiken mit dynamischem FRET ermittelt wurden. R zeigt den Rezeptor, R\* den Rezeptor in aktivem Zustand, G\* das aktive bzw. G das inaktive G-Protein, E\* den aktivierten bzw. E den inaktiven Effektor, die Bindung des  $\beta$ -Arrestins als Folge der Rezeptorphosphorylierung durch GRK (R<sup>p</sup>Arr) und die Konformationsänderung des  $\beta$ -Arrestins (R<sup>p</sup>Arr\*); Wiedergabe nach: (Lohse et al., 2008), mit Genehmigung von Elsevier.

#### I.4 FRET-Messungen mit niedermolekularen Fluorophoren zur Aufklärung der Rezeptoraktivierung - das Tetracystein-Biarsen-System

Es hat sich gezeigt, dass die Positionierung von Fluorophoren in Proteinen ein kritischer Punkt ist. GFP und seine Varianten sind mit einer Größe von 27 kDa durchaus in der Lage mit den Proteinstrukturen, an die sie fusioniert wurden zu interferieren, und deren Bewegung und Funktion massiv zu verändern (Lisenbee et al., 2003); (Andresen et al., 2004). Insbesondere können sie nicht an jeder beliebigen Stelle eines Zielproteins inseriert werden, ohne dessen strukturelle Integrität zu zerstören. Daher wurden Methoden entwickelt, bei denen die GFP-Varianten durch kleine Fluorophore ersetzt wurden. Kleine Fluorophore können entweder kovalent an die zu untersuchenden Proteine gebunden werden, oder als Komplexe spezifisch an Aminosäureseitenketten des Zielproteins binden. So können biarsenische Fluorophore spezifisch an Tetracysteinmotive gebunden werden (Griffin et al., 1998). Hoffmann et al. (2005) haben diese Methode etabliert, um bei der Untersuchung der Aktivierung von GPCRs eines der GFP-Fluorophore durch ein kleines Fluorophor zu ersetzen.

##### I.4.1 Fluorescent Arsenic Hairpin Binder (FIAsH)

Die spezifische Markierung eines Proteins mit einer fluoreszierenden Substanz über eine Tetracysteinstruktur wurde erstmals von der Arbeitsgruppe von Roger Tsien 1998 veröffentlicht (Griffin et al., 1998). Hierzu wurde eine Peptidsequenz, bestehend aus sechs Aminosäuren, wobei jeweils zwei Cysteine zwei in der Mitte liegende Aminosäuren flankieren (CCXXCC), in das zu markierende Protein eingeführt. Proteine mit dieser Peptidsequenz wurden in Zellen exprimiert und anschließend mit dem kleinen Fluorophor 4',5'-bis(1,3,2-dithioarsolan-2-yl)fluorescein (FIAsH, Fluorescein Arsenical Hairpin Binder) markiert. Einige Jahre später wurde in der gleichen Arbeitsgruppe dieses FIAsH-Bindemotiv optimiert. Die beiden Aminosäuren zwischen den beiden Cysteinpaaren wurden hierbei als Prolin und Glycin definiert (CCPGCC), da dadurch die Stabilität der Bindung zum FIAsH erhöht wurde. Das Prolin–Glycin–Motiv bildet eine haarnadelähnliche Struktur, in der die beiden Cysteinpaare einen Abstand von 6 Å haben (Abb.10). Mit diesen bildet FIAsH über zwei organisch gebundene Arsene in einem Abstand von ebenfalls 6 Å, einen

Komplex (Griffin et al., 1998; Adams et al., 2002). Der Vorteil hierbei ist insbesondere, dass die Fluoreszenz des FIASH nur entfaltet wird, wenn es an die Aminosäuresequenz gebunden ist. Interessanterweise gibt es keine chemische Erklärung, die dieses Phänomen beschreibt.

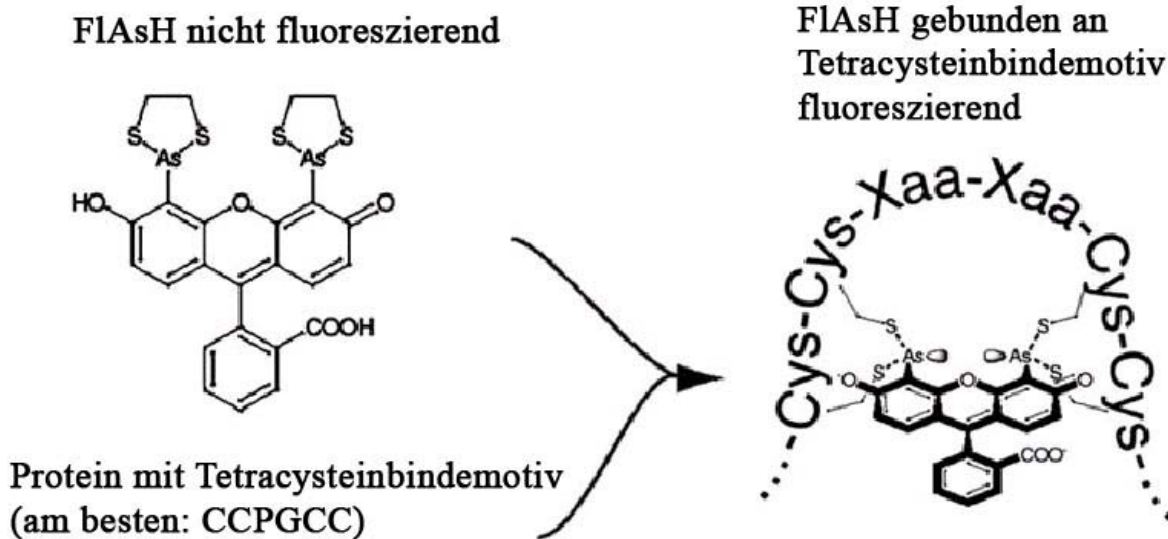


Abb.10: Strukturformel des FIASH, welches im ungebundenen Zustand nicht fluoresziert; bindet es an ein Protein mit CCPGCC-Motiv, wird es fluoreszierend. Das CCPGCC bildet hierbei eine Haarnadelstruktur aus, in welcher die Abstände der Cysteinpaare mit den Abständen der Arsene des FIASH korrelieren.

An die CCPGCC-Sequenz gebundenes FIASH hat mit seinen Anregungs- (513 nm) und Emissionsmaxima (525 nm) ähnliche spektrale Eigenschaften wie die gelbe Variante des fluoreszierenden Proteins (YFP). Somit kann der Größenvorteil der FIASH-Methode voll zum Tragen kommen, da es das YFP ersetzen kann. Mit gerade sechs Aminosäuren Länge und ca. 700 Dalton zusätzlicher Masse liegt die Größe der gesamten Markierung nur bei etwa 1/40 der Größe und Masse von GFP. Auch der Vergleich zu anderen in der Proteinmarkierung standardmäßig eingesetzten Komponenten wie Antikörper oder SNAP-Tags zeigt den deutlichen Größenvorteil des FIASH (Abb.11).



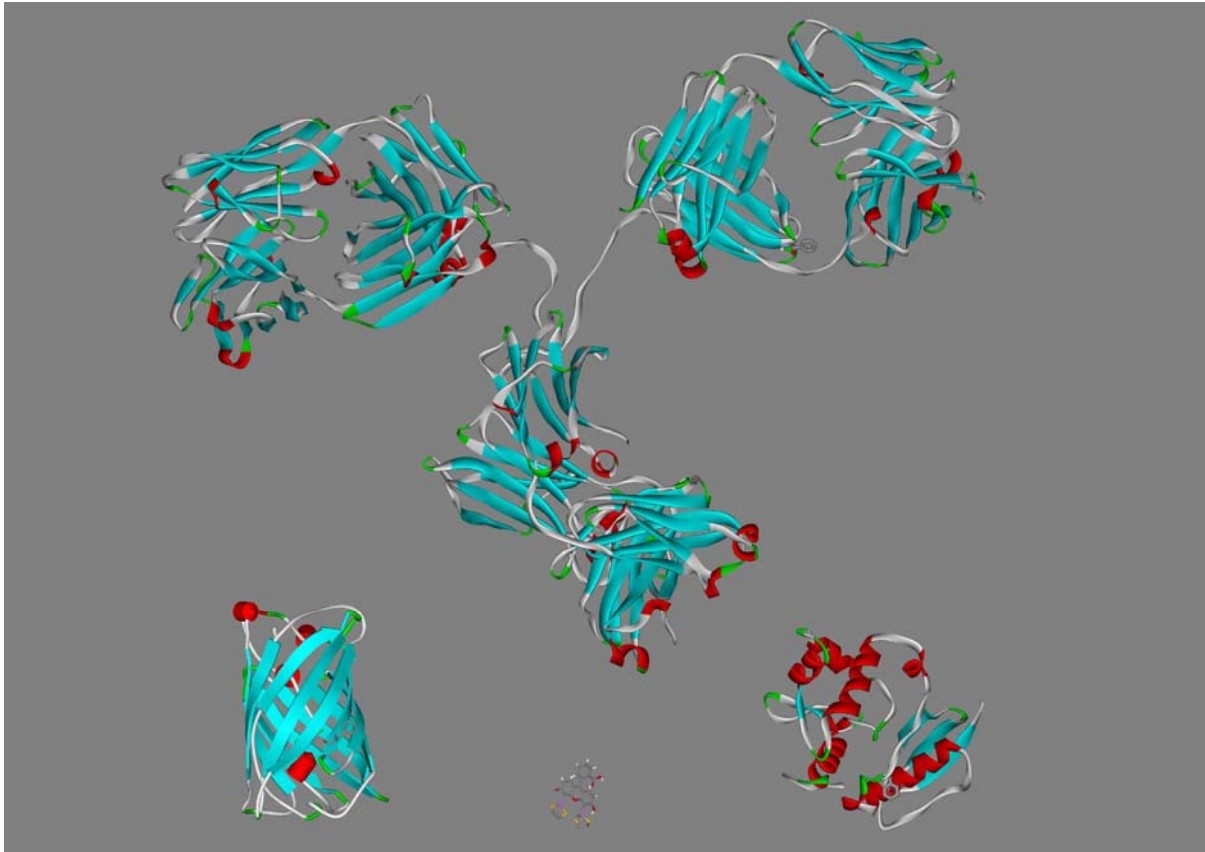


Abb.11: Größenvergleich zwischen den zur Markierung von Proteinen eingesetzten Komponenten. Ein Antikörper (rechts; PDB 1IGT), ein GFP (links oben; PDB 1EMB), ein SNAP-Tag (links unten; PDB 1EHG) und das deutlich kleinere FIASH (links in der Mitte); Mit freundlicher Genehmigung von C. Hoffmann.

#### 1.4.2 Die FIASH-Methode zur Markierung von Proteinen in lebenden Zellen

Ein wesentlicher Vorteil des lipophilen FIASH ist, dass es durch Zellmembranen diffundieren kann. So können intrazelluläre Zielproteine durch einfaches Inkubieren der Zellen mit FIASH spezifisch markiert werden, wenn sie die CCPGCC-Binde-sequenz enthalten (Abb.12). Überschüssiges Reagenz sowie unspezifisch gebundenes FIASH kann mit einem Dithiol gebunden und entfernt werden, sodass das spezifisch markierte Protein sichtbar wird. Hierfür können verschiedene Dithiole zum Einsatz kommen, die je nach eingesetzter Konzentration und Affinität das FIASH binden können. In diesem Zustand fluoresziert das FIASH nicht. Da auch unspezifische Bindung zu einer störenden Hintergrundfluoreszenz führt, ist das Waschen mit Dithiolen unumgänglich und bedarf der Optimierung für das jeweilige System. Andernfalls erhält man keine ausreichende spezifische Markierung, bzw. das unspezifisch gebundene FIASH wird nicht ausgewaschen und die Hintergrundfluoreszenz bleibt vorhanden.

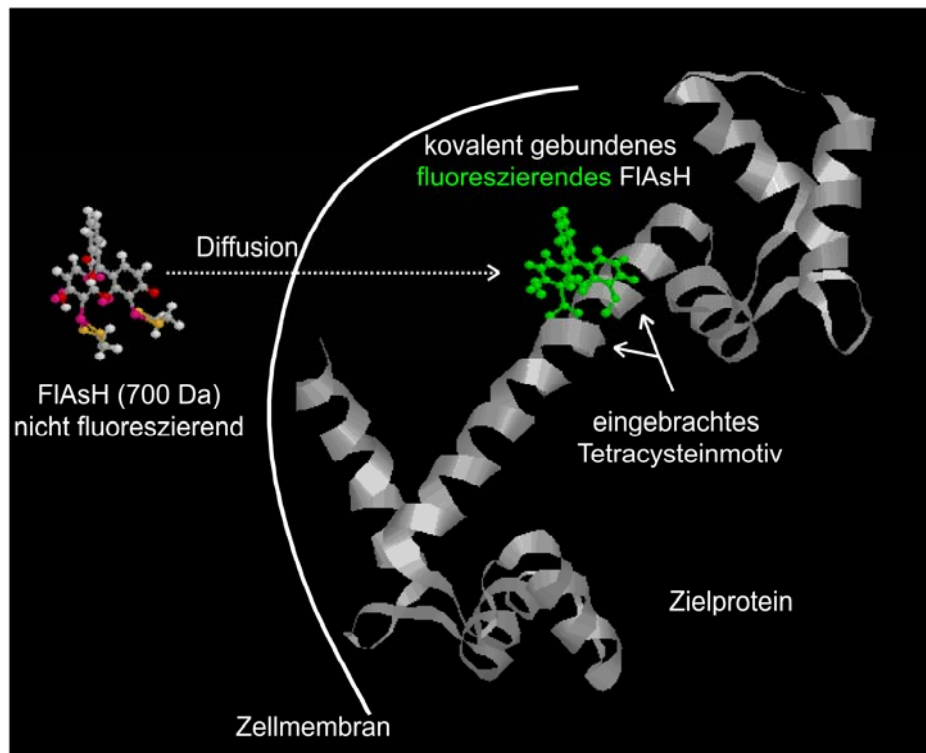


Abb.12: Markierung eines Zielproteins in einer Zelle. Das 700 Da große, nicht fluoreszierende FIASH diffundiert durch die Zellmembran und wird spezifisch an die im Protein exprimierte Tetracysteinsequenz gebunden.

#### I.4.3 Anwendungen des FIASH als FRET-Partner

Hoffmann et al. (2005) haben als erste einen FRET-Rezeptorsensor mit CFP als Donor und FIASH als Akzeptor konzipiert. Ein Adenosin- $A_{2A}$ -Rezeptor ( $A_{2A}$ -R) wurde C-terminal mit einem CFP und mit einem FIASH-Motiv in der dritten intrazellulären Schleife versehen. Ein solcher Rezeptorsensor zeigte auf Agonist-Stimulation FRET-Signale von höherer Intensität als ein vergleichbarer Rezeptorsensor, der an Stelle der FIASH-Bindesequenz ein YFP trug. Zudem aktivierte der FIASH/CFP-Sensor die Adenylylcyclase in gleicher Weise wie ein Wildtyp- $A_{2A}$ -R, während dem CFP/YFP-Sensor die Fähigkeit, Cyclase zu aktivieren, fast vollständig verloren gegangen war. So wurde zum ersten Mal gezeigt, dass mit dem Einsatz von FIASH statt YFP als Akzeptor die Funktionalität eines Rezeptors erhalten werden konnte (Hoffmann et al., 2005).

#### I.4.4 Weitere Biarsen-Fluorophore

Inzwischen wurde eine ganze Reihe von biarsenischen Fluorophoren entwickelt, die spezifisch an Tetracysteinensequenzen binden können. Als neue Farbvarianten wurden das Resofurin-Derivat ReAsH (Exzitation 593nm; Emission 608nm) und das CHoXAsH (Exzitation 380nm; Emission 430nm) ebenfalls im Tsien-Labor synthetisiert (Adams et al., 2002). Aber auch andere Gruppen entwickelten neue Mitglieder der Biarsenfamilie, so wurde von der Arbeitsgruppe Umezawa das BArNile vorgestellt, ein 9-amino-6,8-bis(1,3,2-dithioarsolan-2-yl)-5H-benzo[*a*]phenoxazin-5-one, welches ein Derivat des „nile red“ darstellt. Da allerdings BArNile sehr sensitiv auf Umgebungseinflüsse wie pH-Änderungen, oder Polaritätsänderungen reagiert, wird diese Substanz nicht mehr zur klassischen Proteinmarkierung eingesetzt. Es wurde aber zur Entwicklung eines Calciumsensors verwendet (Nakanishi et al., 2004; Nakanishi et al., 2001).

Da sowohl FIAsH, als auch ReAsH im Vergleich zu GFPs eine hohe Empfindlichkeit gegenüber Photobleichen und eine geringe Quantenausbeute haben, wurden Derivate mit höherer Bleichungsstabilität, größerem Stokes-Shift und höherer Quantenausbeute synthetisiert. Difluoriertes FIAsH (F2FIAsH,  $\lambda_{\text{abs}} = 500 \text{ nm}$ ,  $\lambda_{\text{em}} = 522 \text{ nm}$ ) sowie tetrafluoriertes FIAsH (F4FIAsH,  $\lambda_{\text{abs}} = 528 \text{ nm}$ ,  $\lambda_{\text{em}} = 544 \text{ nm}$ ) sind bleichungsstabiler und heller als FIAsH, wobei F4FIAsH sogar eine neue, bathochrom-verschobene Farbvariante darstellt (Spagnuolo et al., 2006; Abb.13). Zudem liegen das Exzitations-Maximum von F2FIAsH und das Emission-Maximum von F4FIAsH weit genug auseinander, dass diese beiden Substanzen als Donor-Akzeptor-Paar für FRET-basierte Messungen eingesetzt werden können. FRET wurde für dieses Donor-Akzeptor-Paar bisher jedoch nur an einem gereinigten Peptid gezeigt (Spagnuolo et al., 2006).

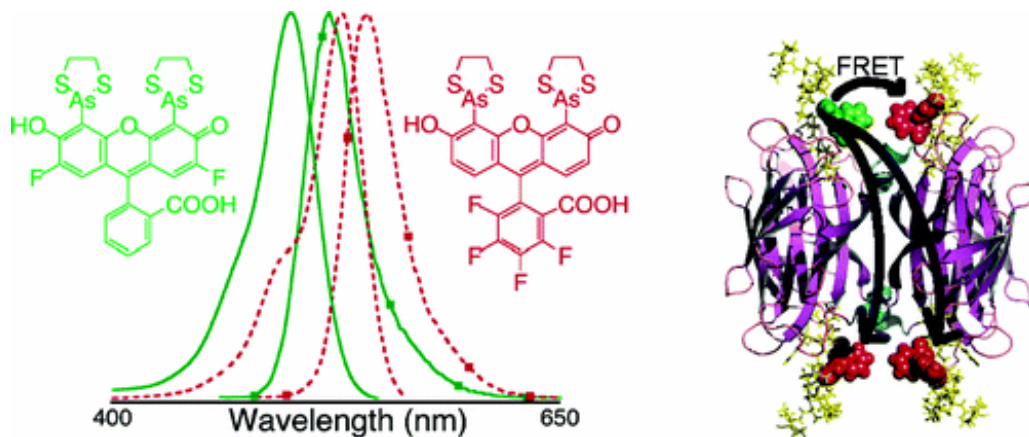


Abb.13: Links, die beiden FIAsh-Varianten F2FIAsh (grün) und F4FIAsh (rot) mit den zugehörigen Emissions- und Exzitationspektren. Der rechte Teil der Abbildung zeigt schematisch, wie diese beiden Substanzen an das Zielprotein gebunden sind und als FRET Paar agieren können; Wiedergabe nach: (Spagnuolo et al., 2006), mit Genehmigung von ACS.

In den Fluorescein- und Resofurin-Derivaten beträgt der Abstand zwischen den beiden Arsenen ca. 6 Å, die dem Abstand der Cysteinpaare in der CCPGCC-Bindesequenz entsprechen. Um Farbstoffvarianten zu erhalten, welche an alternative Bindesequenzen binden können, entwickelten Cao et al. (2007) aus dem Cyaninfarbstoff Cy3 ein Fluorophor mit ebenfalls zwei Arsenlinkern, die sich strukturell bedingt in einem Abstand von 14,5 Å befinden. Diese Substanz sollte demnach eine sehr hohe und spezifische Bindungsaffinität zu einer Aminosäuresequenz haben, in der zwei Cysteinpaare im Abstand von 14,5 Å angeordnet sind. Dies wurde an einem gereinigten Protein mit der Sequenz CCKAEAACC gezeigt. AsCy3 zeigte ein Exzitationsmaximum bei 568 nm und ein Emissionsmaximum bei 576 nm. Im Vergleich zu FIAsh und ReAsH ist diese Substanz sehr photostabil und verfügt über eine größere Quantenausbeute; allerdings ist AsCy3 in der Lage bei geeigneter Anregung permanent und nicht nur im gebundenen Zustand zu fluoreszieren. Ein Energietransfer zwischen FIAsh und AsCy3 wurde an gereinigten Proteinen als Modell gezeigt (Cao et al., 2007); Abb.14).

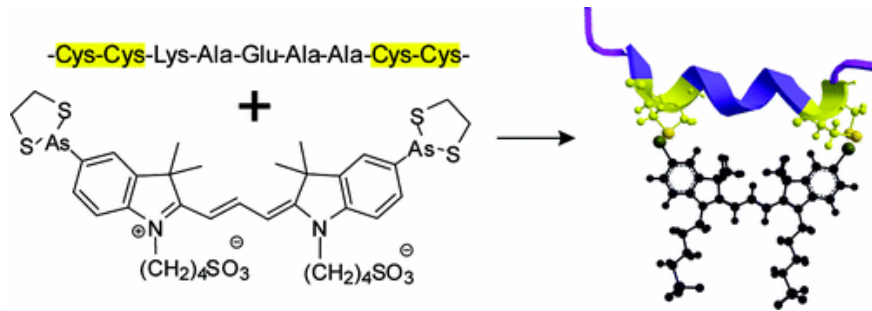


Abb.14: Struktur des AsCy3. Darüber ist das neu gestaltete Bindemotiv zu sehen, die vier Cysteine sind gelb markiert. Auf der rechten Seite wird das an das CCKAEAACC gebundene AsCy3 dargestellt. Die Aminosäuren zwischen den beiden Cysteinpaaren bilden eine  $\alpha$ -Helix; Wiedergabe nach: (Cao et al., 2007), mit Genehmigung von ACS.

Unspezifische Bindung, z.B. durch das Eindringen von Flash in hydrophobe Taschen von Proteinen, kann das spezifische Markieren von Proteinen mit FIAsH erschweren. Dieses Phänomen kann umgangen werden, wenn man an das FIAsH andere Substanzen bindet, welche dieses weniger hydrophob machen. In diesem Zusammenhang wurde das Carboxy-FIAsH (CrAsH) synthetisiert (Cao et al., 2006). Dieser Ansatz konnte sich jedoch nicht etablieren, da zwar die unspezifischen Bindungen reduziert wurden, aber gleichzeitig auch die spezifische Bindung stark an Affinität eingebüßt hatte. Um die Farbpalette der tetracysteinbindenden Substanzen zu erhöhen, wurde von Miller et al. eine Möglichkeit vorgestellt, die darauf beruht, verschiedene Fluorophore an einen „Spirolactam Fluorescent Hairpin-binder“ (SpIAsH) kovalent zu binden (Bhunja and Miller, 2007). Allerdings werden auch hier permanent fluoreszierende Verbindungen geschaffen, dadurch können unspezifische sowie Hintergrundmarkierungen nur schwer reduziert werden, wenn die Substanz in Zellen angewendet werden soll. Abb.15 gibt einen Überblick über einige der bisher verwendeten biarsenischen Substanzen.

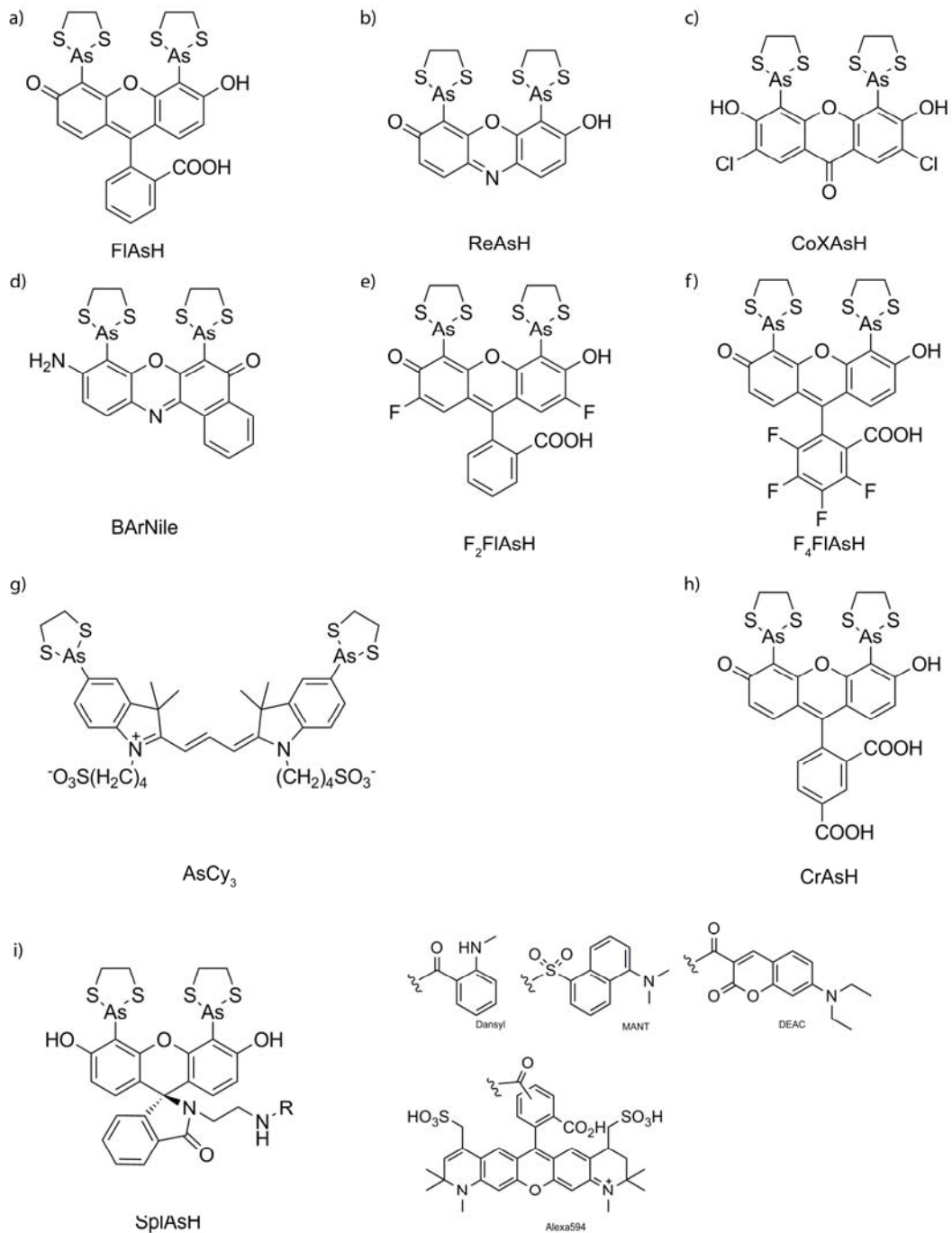


Abb. 15: Übersicht von biarsenischen, niedermolekularen Substanzen zur Markierung von Tetracysteinensequenzen: (a) FIAsH, (b) ReAsH, (c) CoXAsH, (d) BArNile, (e) F<sub>2</sub>FIAsH, (f) F<sub>4</sub>FIAsH, (g) AsCy<sub>3</sub>, (h) CrAsH, (i) SplAsHs (SplAsH-MANT, SplAsH-Dansyl, SplAsH-DEAC, SplAsH-Alexa594); die Strukturen wurden erstellt mit dem Programm ChemOffice2008.

#### I.4.5 Bindemotive

Die bisher veröffentlichten Tetracysteinmotive sollen hier zusammengefasst werden. Für das bereits beschriebene ursprüngliche Bindemotiv wurde zunächst ein  $\alpha$ -helikales Tetracysteinmotiv verwendet (Griffin et al., 1998). Bei einer *in vitro* Studie wurden die biarsenischen Fluorophore an das Modellpeptid WEAAAREACCRECCARA gebunden (Griffin et al., 1998). Einige Jahre später fand das gleiche Labor die CCPGCC-Sequenz, die aufgrund der durch Prolin und Glycin gebildeten „Haarnadel“ eine deutlich höhere Affinität gegenüber FIAsH und ReAsH aufwies, als die bisher verwendete  $\alpha$ -Helix (Adams et al., 2002).

Um eine weitere Optimierung der CCPGCC-Bindesequenz zu erreichen, wurden mit Hilfe eines Screening-Verfahrens höheraffine Motive selektiert. Dazu wurden mit zufälligen Aminosäurekombinationen erweiterte CCPGCC-Motive an GFP fusioniert, die Fusionsproteine in Säugerzellen exprimiert und mit ReAsH markiert. Bei geeigneter Anregung des GFPs kann eine durch FRET erzeugte ReAsH-Emission gemessen werden. Hierbei wurden zwei Bindesequenzen, HRWCCPGCCKTF und ein FLNCCPGCCMEP gefunden, an welchen ReAsH eine deutlich höhere Quantenausbeute als am CCPGCC-Motiv aufwies. Außerdem zeigten die Fluorophore eine höhere Affinität zu den neuen Bindemotiven (Martin et al., 2005).

Eine strukturell von den bisher genannten Motiven verschiedene Bindesequenz wurde gefunden, indem FIAsH-bindende Proteine aus einem *E. coli*-Zellextrakt gewonnen wurden (Wang et al., 2007). So wurde eine endogene Peptidsequenz (GCCGSGNDAGGCCGG) identifiziert, welche eine gute Affinität zu FIAsH hat und gleichzeitig eine höhere Quantenausbeute liefern soll. Die Autoren spekulieren, dass die beobachtete höhere Emission dadurch zustande kommen könnte, dass diese Sequenz im Gegensatz zum CCPGCC-Motiv keine intramolekularen Disulfidbrücken ausbilden kann (Abb.16).

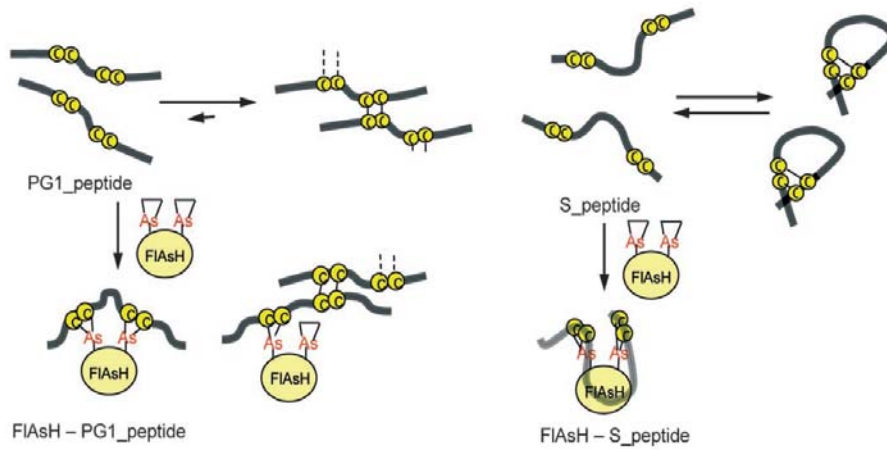


Abb.16: Bindung von FIAsh an das CCPGCC-Motiv (PG1\_peptide), wobei eine unvollständige Bindung durch die Ausbildung von intermolekularen Disulfidbrücken postuliert wird (links). Das entdeckte GCCGGSGNDAGGCCGG-Motiv (S\_peptide) bindet das FIAsh ebenso, soll aber lediglich intramolekulare Disulfidbrücken ausbilden können, welche bei Bindung des FIAsh gebrochen werden. Dadurch weist das FIAsh an diese Sequenz gebunden höhere Helligkeit auf; Wiedergabe nach: (Wang et al., 2007), mit Genehmigung von Wiley-VC.

Ein geeignetes Tetracystein-bindemotiv ist somit ein sehr wichtiger Faktor bei der Markierung von Proteinen mit kleinen Fluorophoren. Jeder Fluorophor hat an jeder Bindesequenz nicht nur eine unterschiedliche Affinität, sondern eine charakteristische Quantenausbeute für jede Bindesequenz, sowie den jeweiligen Donor. Wie groß diese Unterschiede sein können zeigt Tabelle 1. Die Quanten-ausbeuten von FIAsh an CFP als Donor gebunden und ReAsH an GFP als Donor gebunden, wird hier angegeben. Die Werte hierfür variieren je nach N- oder C-terminaler Markierung, was den Einfluss der Umgebung des Fluorophors widerspiegelt. Der größte Unterschied der Quantenausbeute hängt hier aber von der Bindesequenz ab. Die Quantenausbeute des FLNCCPGCCMEP-gebundenen biarsenischen Fluorophors ist deutlich erhöht gegenüber der an der CCPGCC-Sequenz.

Tetracystein-motiv	Quantenausbeute von FIAsh an CFP		Quantenausbeute von ReAsH an GFP	
	N-Terminus	C-Terminus	N-Terminus	C-Terminus
CCPGCC	n.A.	0,59	n.A.	0,28
FLNCCPGCCMEP	0,78	0,70	0,47	0,42
HRWCCPGCCKTF	0,65	0,61	0,40	0,34

Tab.1: Quantenausbeuten von FIAsh/CFP, sowie ReAsH/GFP. Die Quantenausbeuten wurden an den verschiedenen Bindemotiven ermittelt, wobei die fluoreszierenden Proteine als Donoren dienten; Zahlenwerte nach: (Martin et al., 2005)



## I.5 Fragestellung

In dieser Arbeit soll die Frage untersucht werden, ob es an GPCRs ligandenselektive Konformationen gibt und wie sich bei diesen insbesondere die dritte intrazelluläre Schleife in Abhängigkeit von verschiedenen Liganden verhält. Hierfür wird die dritte intrazelluläre Schleife des  $\alpha_{2A}$ -adrenergen-Rezeptors mit dem niedermolekularen Fluorophor FIAsH markiert. Dabei soll FIAsH als FRET-Akzeptor dienen, wobei ein CFP im C-Terminus des Rezeptors als FRET-Donor fungiert. Bewegt sich das C-terminale CFP relativ zum intramolekularen FIAsH, kann dies als Änderung des FRET zwischen beiden Fluorophoren sichtbar werden. So sollen durch die Änderung des FRET-Signales die durch die Aktivierung des Rezeptors ausgelösten Konformationsänderungen dargestellt werden. Dabei sind die Effekte verschiedener voller und partieller Agonisten zu vergleichen. Es werden jeweils drei Rezeptorkonstrukte betrachtet, die sich nur durch die Positionierung der FIAsH-Bindesequenz innerhalb der dritten intrazellulären Schleife unterscheiden. So soll die Frage geklärt werden, ob sich die Schleife nach der Bindung verschiedener Agonisten in allen Positionen in gleicher Weise bewegt oder ob Unterschiede in den durch FRET dargestellten Bewegungen auf ligandenselektive Konformationen schließen lassen.

Weiterhin soll eine Methode entwickelt werden, die es erlaubt, in einer lebenden Zelle zwei Proteine mit zwei verschiedenen kleinen Fluorophoren zu markieren und die Spezifität und Selektivität dieser Markierung zu beweisen. Durch diese Entwicklung könnte ein Prinzip erstellt werden, mit dem es möglich ist, diese duale Markierung auch auf andere Bindemotive und evtl. auch auf neue Fluorophore zu übertragen.

## II. Material und Methoden

### II.1 Material

#### II.1.1 Bakterienstämme

BL21 pLysS	Novagen
<i>E. coli</i> XL-1-Blue	Stratagene
<i>E. coli</i> JM109	Stratagene
DH5 $\alpha$	Stratagene

#### II.1.2 Plasmide (siehe Anhang VII.2 Übersicht der Rezeptorkonstrukte)

pcDNA3	Invitrogen
A <sub>2A</sub> -FLN-CFP in pcDNA3	diese Arbeit
A <sub>2A</sub> -FLN-YFP in pcDNA3	diese Arbeit
A <sub>2A</sub> -HRW-CFP in pcDNA3	diese Arbeit
A <sub>2A</sub> -HRW-YFP in pcDNA3	diese Arbeit
A <sub>2A</sub> -FI3-CFP in pcDNA3	C. Hoffmann
A <sub>2A</sub> -FI3-YFP in pcDNA3	C. Hoffmann
A <sub>2A</sub> -FI3-FLN11 in pcDNA3	diese Arbeit
A <sub>2A</sub> -FI3-FLN33 in pcDNA3	diese Arbeit
PTHR-CCKAEAACC in pcDNA3	J.C. Klenk
PTHR-CFP in pcDNA3	J.P. Villadarga
PTHR-FLN in pcDNA3	J.C. Klenk
PTH-KAE in pcDNA3	diese Arbeit
$\alpha$ <sub>2A</sub> -FIIC1-CFP in pcDNA3	diese Arbeit
$\alpha$ <sub>2A</sub> -I3-C-CFP in pcDNA3	diese Arbeit
$\alpha$ <sub>2A</sub> -I3-M -CFP in pcDNA3	diese Arbeit
$\alpha$ <sub>2A</sub> -I3-N-CFP in pcDNA3	diese Arbeit
$\beta$ -arrestin2-12 in pcDNA3	diese Arbeit
$\beta$ -arrestin2-6 in pcDNA3	diese Arbeit

### II.1.3 Zelllinien

HEK293 humane embryonale Nierenzellen	Graham et al.,
HEK293-TsA humane embryonale Nierenzellen	M. Bünemann,
HEK293-A <sub>2A</sub> -FIPG-CFP49	C. Hoffmann
HEK293-A <sub>2A</sub> -FIPG-CFP33	C. Hoffmann
HEK293-A <sub>2A</sub> -FIPG-YFP	C. Hoffmann
HEK293-A <sub>2A</sub> -model-FLN-CFP	diese Arbeit
HEK293-A <sub>2A</sub> -model-FLN-YFP	diese Arbeit
HEK293-A <sub>2A</sub> -model-HRW-CFP	diese Arbeit
HEK293-A <sub>2A</sub> -model-FLN-YFP	diese Arbeit
HEK293- $\alpha_{2A}$ -I3-N-CFP	diese Arbeit
HEK293- $\alpha_{2A}$ -I3-M-CFP	diese Arbeit
HEK293- $\alpha_{2A}$ -I3-C -CFP	diese Arbeit

### II.1.4 Enzyme

Pwo DNA-Polymerase	Roche, NEB
T4 DNA-Ligase	New England Biolabs
Taq DNA-Polymerase	Eppendorf
Trypsin (sequencing grade)	Promega
Vent <sup>®</sup> DNA-Polymerase	New England Biolabs

## II.2 Methoden

### II.2.1 Molekularbiologische Methoden

#### II.2.1.1 Kultivierung von *E. coli*

Für die Kultivierung von *E. coli* wurde eine Einzelkolonie in LB-Medium, das mit einem entsprechendem Selektionsantibiotikum versetzt war, für 6-15 h bei 37 °C im Rotationsschüttler inkubiert. Für eine Vorkultur wurden 5 ml LB-Medium verwendet. Die Vorkulturen wurden in einer 1:100 Verdünnung zum Animpfen größerer Kulturen (200-500 ml) zu Präparationszwecken verwendet.

LB-Medium:            10 g/l Trypton  
                              5 g/l Hefe-Extrakt  
                              10 g/l NaCl

#### II.2.1.2 Herstellung kompetenter Bakterien (Methode nach Chung und Miller, 1988)

250 ml LB-Medium (ohne Antibiotikum) wurden mit 2,5 ml einer *E. coli*-Vorkultur angeimpft und bei 37 °C im Rotationsschüttler bis zu einer optischen Dichte von ca. 0,5 (595 nm) kultiviert. Die Bakterien wurden abzentrifugiert (10 min; 3400 x g) und anschließend in 25 ml TSB aufgenommen (4 °C), aliquotiert und in flüssigem Stickstoff eingefroren. Die Lagerung erfolgte bei -80 °C (Chung and Miller, 1988).

TSB („Transformation and storage buffer“):    10% (M/V) PEG 3000  
    5% (V/V) DMSO  
    20 mM MgCl<sub>2</sub>  
    in LB-Medium pH 6,1 sterilfiltriert

### II.2.1.3 Transformation von *E. coli* mit der „Hitzeschock“-Methode

100 µl „kompetente“ Bakterien wurden mit 0,01-1 µg Plasmid-DNA versetzt und nach 15-minütiger Inkubation auf Eis für 50 s bei 42 °C („Hitzeschock“) inkubiert. Anschließend wurden 900 µl LB-Medium (ohne Selektionsantibiotikum) zugegeben und 50 min bei 37 °C inkubiert. Ein Aliquot der Bakteriensuspension wurde auf einer LB-Agarplatte mit Selektionsantibiotikum ausplattiert und über Nacht bei 37 °C inkubiert.

LB-Agar:            15 g/l Agar  
                         10 g/l Trypton  
                         5 g/l Hefe-Extrakt  
                         10 g/l NaCl

### II.2.1.4 Transformation von *E. coli* mit der KCM-Methode

5-10 µl Ligationsansatz oder 0,1-0,5 µg Plasmid-DNA wurden mit 100 µl 1 x KCM Puffer und 100 µl kompetenten Bakterien gemischt, für 20 min auf Eis gekühlt und danach 10 min bei RT inkubiert. Die nächsten Schritte erfolgten analog der „Hitzeschock“-Methode.

5 x KCM-Puffer:    150 mM CaCl<sub>2</sub>  
                         250 mM MgCl<sub>2</sub>  
                         500 mM KCl

### II.2.1.5 Bestimmung der Transformationseffizienz

Zur Bestimmung der Kompetenz von Bakterien wurde mit einer definierten Menge an Plasmid-DNA transformiert. Die erhaltenen Kolonien wurden gezählt und die Transformationseffizienz wurde folgendermaßen ermittelt:

Transfektionseffizienz = Anzahl von Kolonien/µg transformierter DNA

### II.2.1.6 Isolierung von Plasmid-DNA (Minipräparation)

Zur Aufreinigung kleiner Mengen Plasmid-DNA wurden 2 ml einer *E. coli* -Vorkultur abzentrifugiert (1 min, 6800 x g). Das Bakterienpellet wurde dann in 250 µl P1-Puffer resuspendiert. Der Aufschluss der Bakterien und die Denaturierung der DNA erfolgten durch die Zugabe von 250 µl alkalischem Puffer (P2) und 5-minütiger Inkubation bei RT (Birnboim and Doly, 1979). Durch die Zugabe von 350 µl P3-Puffer wurde die Suspension neutralisiert und die Plasmid-DNA renaturiert. Die präzipitierte chromosomale DNA und die präzipitierten bakteriellen Proteine wurden durch Zentrifugation (10 min, 20800 x g, 4 °C) von der gelösten Plasmid-DNA abgetrennt. Anschließend wurde die Plasmid-DNA mit 500 µl Isopropanol (70% V/V) gefällt und abzentrifugiert (10 min, 20800 x g, 4 °C). Das Plasmid-DNA-Pellet wurde mit 1 ml Ethanol (70%) gewaschen und in 20 µl H<sub>2</sub>O gelöst.

Puffer P1: 100 µg/ml RNase A  
50 mM Tris-HCl  
10 mM EDTA, pH 8,0

Puffer P2: 200 mM NaOH  
1% SDS (M/V)

Puffer P3: 3 M Kaliumacetat, pH 5

### II.2.1.7 Isolierung von Plasmid-DNA mit Quiagen-Säulen

Größere Plasmid-DNA-Mengen wurden mithilfe von Anionenaustauschersäulen der Firma Qiagen (Qiagen-tip 500) nach Anweisungen des Herstellers aufgereinigt.

### II.2.1.8 Quantifizierung von DNA

Die Konzentration der DNA wurde durch photometrische Messung der Extinktion bei 260 nm bestimmt. Die DNA-Konzentration wurde folgendermaßen berechnet:

$c = 50 \times E_{260} \text{ nm} \times \text{Verdünnungsfaktor} [\text{ng}/\mu\text{l}]$ . Die Verunreinigung mit Proteinen wurde über den Quotienten der Extinktionen  $E_{260\text{nm}}/E_{280\text{nm}}$  bestimmt. Dieser Quotient sollte > 1,8 sein.

### II.2.1.9 Agarose-Gelelektrophorese

Die Auftrennung von DNA-Fragmenten erfolgte mittels Agarose-Gelelektrophorese in 1-2%igen Agarosegelen (M/V in TAE-Puffer), denen 0,5 µg/ml Ethidiumbromid zugesetzt waren. Den DNA-Proben wurden vor dem Auftragen auf die Gele 10 x DNA-Ladepuffer zugesetzt. Die Elektrophorese erfolgte in TAE-Laufpuffer und bei einer angelegten Spannung von 8 bis 12 V/cm Trennstrecke. Die aufgetrennten DNA-Fragmente wurden mithilfe von UV-Licht über die Fluoreszenz des interkalierten Ethidiumbromids sichtbar gemacht.

50 x TAE-Puffer:	0,1 M EDTA
	1 M Eisessig
	2 M Tris-Base pH 8
10 x DNA-Ladepuffer:	0,25% (M/V) Bromphenolblau
	50% (V/V) Glycerin
	100 mM EDTA

### II.2.1.10 Polymerasekettenreaktion (PCR)

Zur Amplifikation eines bestimmten DNA-Abschnitts wurde die PCR nach (Saiki et al., 1988) angewandt. Dazu wurde mit strangspezifischen Oligonukleotiden (Primern) gearbeitet, deren Sequenzen komplementär zu den flankierenden Bereichen des gewünschten DNA-Abschnittes waren. Die Primer hatten in der Regel eine Länge von 15-45 Basen. Die in einer Reaktion verwendeten Primer wurden so gewählt, dass sie ähnliche Schmelztemperaturen aufwiesen. Die DNA-Amplifikation erfolgte in einem dreiphasigen Reaktionszyklus - Denaturierung der Matrize, Hybridisierung der Oligonukleotide und DNA-Polymerisation - in einem programmierbaren Thermocycler (Perkin Elmer GeneAMP 2400). Der PCR-Reaktionsansatz und die PCR-Bedingungen waren folgende:

PCR-Ansatz: 0,1-1 µg Ausgangs-DNA  
0,5-2 µM Vorwärtsprimer  
0,5-2 µM Rückwärtsprimer  
200 µM dNTPs 1 x DNA-Polymerase-Puffer  
1 U DNA-Polymerase

PCR-Zyklus: Denaturierung 1 min 94 °C  
Hybridisierung 2 min 45 - 60 °C  
Amplifikation 2 min 72 °C; 25-35 Zyklen

#### II.2.1.11 Restriktionsverdau von DNA

Der Verdau von DNA erfolgte mit Restriktionsenzymen in den vom jeweiligen Hersteller empfohlenen Puffern. Für 1 µg DNA wurden 2-10 Einheiten Enzym eingesetzt. Der Reaktionsansatz wurde zusätzlich mit 100 µg/ml BSA versetzt. Die DNA wurde für 2 h bei 37°C verdaut. Der Verdau wurde anschließend gelelektrophoretisch auf einem Agarosegel aufgetrennt.

#### II.2.1.12 Ligation von DNA-Fragmenten

Bei der Ligation von DNA-Fragmenten wurden der geschnittene Vektor und das gewünschte Insert in einem molaren Verhältnis von 1:2-10 eingesetzt. Dazu wurden fünf Einheiten T4-DNA-Ligase und die vom Hersteller mitgelieferten Puffer verwendet. Die Ligation wurde 10 min bei RT durchgeführt. Die Ligationsansätze wurden dann nach der KCM-Methode in *E. coli* transformiert. Von den erhaltenen Kolonien wurden *E.coli*-Vorkulturen angesetzt und daraus die Plasmid-DNA isoliert. Mittels PCR und/oder Restriktionsverdau wurde anschließend kontrolliert, ob das Insert erfolgreich in den Vektor ligiert worden war. Das Insert wurde dann anschließend über DNA-Sequenzanalyse verifiziert (Fa. MWG).



#### II.2.1.13 Isolierung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen

Zur Isolierung von DNA-Banden aus einem Agarosegel wurden diese unter UV-Licht ausgeschnitten und die Gelstücke mit Hilfe des QIAquick®-Gelextraktionskits der Firma Qiagen aufgereinigt.

#### II.2.1.14 Mutation von DNA mittels PCR

Der Austausch einzelner Basen in einer DNA-Sequenz wurde mittels überlappender PCR in die Plasmid-DNA eingeführt (Ho et al., 1989).

### II.2.2 Zellkultur

#### II.2.2.1 Kultivierung eukaryontischer Zelllinien

HEK293- und HEK TSA-Zellen wurden auf Petrischalen in DMEM (4,5 g/l Glucose) kultiviert, dem 10% FCS, Penicillin (100 U/ml) und Streptomycin (100 µg/ml) zugesetzt waren. Für stabile Zelllinien wurde zusätzlich 0,2g/l G418 (steril) dem Medium zugesetzt. Die Inkubation der Zellen erfolgte bei 37 °C und 7% CO<sub>2</sub>.

#### II.2.2.2 Einfrieren und Auftauen von Zellen

Das Einfrieren eukaryontischer Zellen erfolgte in möglichst frühen Passagen. Dazu wurden die Zellen am Vortag so ausgesät, dass sie sich zum Zeitpunkt des Einfrierens in der logarithmischen Wachstumsphase befanden. Die Zellen wurden abtrypsiniert und abzentrifugiert (130 x g). Anschließend wurden die Zellen in geeignetem Kulturmedium, das mit 10% DMSO und weiteren 20% FCS versetzt war, resuspendiert und in Kryoröhrchen (Fa. Nunc) aliquotiert (0,5-1 x 10<sup>6</sup> Zellen/ml). Die Aliquots wurden dann bei -80 °C eingefroren und zur dauerhaften Lagerung in flüssigen Stickstoff überführt.

Zum Auftauen wurden die Zellen bei 37 °C im Wasserbad erwärmt und dann in eine Kulturschale mit Kulturmedium überführt. Nach der Anheftung der Zellen wurden die Zellen mit frischem Kulturmedium versetzt.

### II.2.2.3 Transfektion von Zellen mit Effectene

Die Transfektion von HEK 293- bzw. HEK TSA-Zellen erfolgte unter der Sterilbank mit dem Quiagen Effectene-Kit nach Angaben des Herstellers.

### II.2.2.4 Quantifizierung von Proteinen nach Bradford

Die Quantifizierung von Proteinen erfolgte mit dem Protein Assay-Reagenz von Biorad nach Bradford (Bradford, 1976). Die Proteinkonzentration wurde bei 595 nm anhand einer mit BSA erstellten Kalibrierkurve photometrisch ermittelt.

## II.2.3 Proteinchemische Methoden

### II.2.3.1 Membranpräparation

Transfizierte HEK Zellen wurden auf Zellkulturschalen bis zu einer Konfluenz von 80% angezogen. Das Medium wurde entfernt und die Zellen 2x mit PBS-Puffer gewaschen. Anschließend wurden die Zellen, je nach Größe der Zellkulturschale mit 3-5 ml 5/2 Puffer bedeckt und mit einem Ionenbesen abgeschabt und in ein 50 ml Röhrchen überführt. Anschließend wurde mit 1 ml 5/2 Puffer nachgewaschen und die Suspension auch in das Röhrchen überführt. Die Zelllösung wurde mit einem Ultraturax auf höchster Stufe 2x 15s homogenisiert. Anschließend wurde die Suspension 10 min zentrifugiert (170 x g; Hettich EBA12R). Der Überstand wurde in Zentrifugenröhrchen überführt und in der Ultrazentrifuge (Beckmann LE-70) bei 120000 x g, 4°C für 40 min zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen, das Pellet in 500µM 50mM Tris-Puffer, pH=7,4 aufgenommen und mit einem Glaspotter homogenisiert.

PBS-Puffer: 137 mM NaCl,  
2,7 mM KCl  
12 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> / KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, pH 7,4

5/2 Puffer: 5 mM Tris-HCl,  
2 mM EDTA, pH 7,4

### II.2.3.2 Radioligandenbindung

Membranpräparation und Radioligandenbindung erfolgten nach Standardprotokollen für den  $\alpha_{2A}$ -AR (Bunemann et al., 2001). Für die Sättigungsbindungen wurden die Zellmembranen für 90 Minuten mit 1 bis 110 nM [ $^3$ H]-RX821002 ( $^3$ [H]-2-(2-methoxy-1,4-benzodioxan-2-yl)-2-imidazoline; Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg) in Bindungspuffer inkubiert. Verdrängungsbindungen wurden mit 4 nM [ $^3$ H]-RX821002 und steigenden Konzentrationen der Agonisten durchgeführt. Unspezifische Bindungen wurden durch die Anwesenheit von 1  $\mu$ M Atipamezole (Orion Corp. Turku) bestimmt. Sättigungs- und Verdrängungsbindungen wurden mit dem Programm Origin (OriginLab 6.1) für die Kalkulation der  $K_D$ - und  $K_i$ -Werte analysiert.

Bindungspuffer: 5 mM Tris-HCl,  
2 mM EDTA,  
100 $\mu$ M GTP; pH 7.4

### II.2.3.3 [ $^{35}$ S]-GTP $\gamma$ S-Bindungen

[ $^{35}$ S]-GTP $\gamma$ S-Bindungen wurden wie beschrieben durchgeführt (Sternweis and Robishaw, 1984). Hierfür wurden 10  $\mu$ g Membranprotein in 200  $\mu$ l Bindungspuffer welcher 3 mM Guanosindiphosphat sowie 100 pM [ $^{35}$ S]-GTP $\gamma$ S (PerkinElmer Life Sciences) enthielt, mit oder ohne Agonist auf Eis vorinkubiert. Nach verschiedenen Inkubationszeiten von 15 s bis 10 min bei 20°C wurde die Inkubation durch Filtration durch GF/F-Membranfilter (Whatman) und dreimaligem Waschen mit eiskaltem Bindungspuffer gestoppt. Die gebundene Radioaktivität wurde durch Zintillationszählung quantifiziert.

Bindungspuffer: 20 mM HEPES,  
10 mM MgCl<sub>2</sub>,  
100 mM NaCl,  
100 $\mu$ M GTP; pH 7.4

#### II.2.3.4 Computermodellanalysen

Die Strukturen von Rhodopsin (Schertler 2005; PDB-entry 1GZM) und Opsin (Park et al. 2008; PDB-entry 3CAP) wurden überlagert. Hierfür wurde das Programm LSQKAB CCP4 "Program for protein crystallography" (Acta cryst. D50 760-763) verwendet. Die Strukturüberlagerung wurde optimiert, indem der Wert für die Summe der kleinsten Abstandsquadrate (root mean square, rms) minimiert wurde. Individuelle Betrachtungen der einzelnen Abweichungen wurden in einem iterativen Verfahren durchgeführt. Bereiche mit starken Abweichungen wurden aus der Wertung der Minimierung ausgenommen. Die Bereiche der Aminosäuren 1-68, 73-221, 262-305 und 309-322 wurden überlagert und ergaben ein rms von 1,421 Å.

#### II.2.3.5 Fluorometrie

Für fluorometrische Messungen wurde die zu vermessende Lösung in 600 µl Quarzküvetten im Fluorometer (Perkin Elmer) bei der entsprechenden Wellenlänge vermessen. Zur Optimierung der Messungen wurden zunächst für die einzelnen Fluorophore Exzitationsspektren aufgenommen und aus diesen anschließend die Exzitations-Maxima (Wellenlänge, bei der die höchste Absorption auftritt) bestimmt und für die Emissionsmessungen eingesetzt. Die für jedes Fluorophor ermittelten Emissionsspektren bei einer Exzitation im Exzitationsmaximum wurden verwendet, um die Emissions-Maxima (Wellenlänge, bei der die höchste Emission auftritt) zu definieren. Zur Affinitätsbestimmung der biarsenischen Fluorophore zu den Tetracysteinbindemotiven durch FRET (s. III.2.1.1) wurde der Wert der relativen Fluoreszenz im so ermittelten Emissions-Maximum des Akzeptors durch den des Donors in ein ratiometrisches Verhältnis gesetzt.

### II.2.3.6 FRET-Messungen an lebenden Zellen

Die in dieser Arbeit durchgeführten FRET-Messungen wurden mit einem Zeiss Axiovert200 Mikroskop, das mit einem Objektiv von Zeiss (Plan-Neofluar 100x/1,3 Oil) ausgestattet ist, und einem dualen Emissionssystem (Till Photonics) vorgenommen. Die Exzitation der Zellen erfolgte mit einem Polychrom IV (Till Photonics), der Lichtstrahl wurde dazu durch ein Filterrad über einen Strahlenteiler in einen Exzitationsfilter (Chroma) geleitet und gelangte von diesem auf die Probe. Um das Photobleichen möglichst gering zu halten, wurde die Belichtungszeit auf 10-60 ms festgelegt bei einer Frequenz von 10 - 50 Hz je nach Agonistenkonzentration und Messung. Zellen wurden kultiviert auf 24 mm sterilen Deckgläschen, die mit Polylysin (Sigma) beschichtet worden waren. Diese vorbereiteten Proben (Zellen) wurden in Attofluor-Messkammern (Molecular Probes) montiert, mit Messpuffer bedeckt und so auf dem Mikroskop vermessen. Das Signal wurde von der gesamten Zelle aufgenommen. Das von der Probe emittierte Licht wurde in einen Viewfinder (Till Photonics) geleitet, der mit einer LCL-902 Kamera (Wattec Corp. USA) ausgestattet ist. Von dort wurde das Licht durch einen 600 nm LP Filter (Chroma) (dieser ist für die Messungen über 600 nm, z.B. für ReAsH auszubauen) über ein Shutterssystem in den Filterwürfel geleitet. Dieser Filterwürfel (Till Photonics) besteht aus einem Strahlenteiler (DLCP CFP/FIAsH 505 nm; FIAsH/ReAsH 560nm) mit nachgeschalteten Emissionsfiltern (Chroma) je nach zu messenden Fluorophoren (CFP  $480 \pm 20$  nm; FIAsH  $535 \pm 15$  nm; ReAsH  $605 \pm 70$  nm), somit wurde das Signal in zwei Wellenlängen aufgeteilt. Das Licht jedes Kanals wurde in Photodioden (Till Photonics) eingebracht und anschließend mit einem AD-Converter (Digidata1322A, Axon Instruments) digitalisiert. Dargestellt wurden hierbei die einzelnen Kanäle, sowie eine ratiometrische Darstellung aus dem Quotienten von Akzeptor- zu Donor-Emission.

Zur Exzitation wurde die TillVison Software verwendet, zur Aufnahme der Messsignale wurde die Clampex9.0 Software verwendet. Zur Auswertung der FRET-Messungen wurde die Origin 6.1 Software verwendet. Das Durchbluten des Donors in den Akzeptorkanal wurde bestimmt und vom Akzeptorsignal abgezogen. Um die Falschanregung des Akzeptors durch die Donor-Exzitation zu bestimmen, wurde am Ende jedes Experimentes die direkte Anregung des Akzeptors gemessen und von dieser der prozentuale Anteil der Anregung des Akzeptor allein bei der Donor-

Exzitation subtrahiert. Zur Berechnung der „FRET-Ratios“ wurde die korrigierte Akzeptorfluoreszenz durch die Donorfluoreszenz geteilt. Für die Berechnung der Kinetik, mit der sich die „FRET Ratio“ ändert, wurde folgende Gleichung verwendet:

$A(t) = A \times e^{-t/\tau}$ , wobei  $\tau$  die Zeitkonstante ist (s) und A die Signaländerung. Es wurden bei allen Messungen agonistenunabhängige FRET-Änderungen durch Photobleichen subtrahiert.

Messpuffer :            140 mM NaCl,  
                              5 mM KCl,  
                              2 mM CaCl<sub>2</sub>,  
                              1 mM MgCl<sub>2</sub>,  
                              10 mM HEPES, pH 7.3

#### II.2.3.7 Konfokalmikroskopie

Transfizierte HEK-Zellen werden auf mit Polylysin beschichteten Deckgläschen kultiviert und mit FIAsh bzw. ReAsH markiert und wie beschrieben in einer Attofluor-Messkammer montiert. Die Aufnahmen wurden an einem Leica SP5 Konfokalmikroskop gemacht, hierbei wurde ein 63x1,4 Öbektiv verwendet. FIAsh wurde mit einer 514 nm Laserlinie angeregt. Die Fluoreszenzintensität wurde in einem Bereich von 520-560 nm aufgenommen. ReAsH wurde mit einer 594 nm Laserlinie angeregt. Fluoreszenzintensität wurde in einem Bereich von 600 - 700 nm aufgenommen. Die Einstellungen für die Aufnahmen wurden konstant gehalten: 1024\*1024 Pixelformat, 400 Hz. Alle Aufnahmen wurden mit den Einstellungen der Leica LASAF Software vorgenommen. Mit dieser Software wurden die Bilder anschließend bearbeitet. Überlagerungen wurden ebenfalls mit Leica LASAF erstellt. Fluoreszenzberechnungen von Bildern wurden mit dem Programm ImageJ vorgenommen.

#### II.2.3.8 FIAsh/ReAsH

Syntheseprotokolle aus Fluorescein und Resofurin werden beschrieben (Adams 2002). Die Synthese wurde verbessert und ist jetzt als Zweischnittsynthese durchführbar (Adams and Tsien, 2008). FIAsh und ReAsH sind von Invitrogen kommerziell erhältlich.

Diese Substanzen wurden in DMSO gelöst.

Die Konzentrationen der einzelnen Substanzen wurden fluorometrisch bestimmt. Dazu wurden Verdünnungsreihen vermessen und über die Mittelwerte der Extinktionen mit Hilfe des Lambert-Beersch'sen Gesetzes die Konzentrationen ermittelt.

Lambert-Beersch'es Gesetz:

$$E_{\lambda} = -\lg\left(\frac{I_1}{I_0}\right) = \epsilon_{\lambda} \cdot c \cdot d \quad (\text{Gl.3})$$

*I<sub>1</sub>*: Intensität des transmittierten Licht

*I<sub>0</sub>*: Intensität des einfallenden (eingestrahnten) Lichts

*c*: Konzentration der absorbierenden Substanz [*mol*·*l*<sup>-1</sup>]

*ε<sub>λ</sub>*: dekadischer molarer Extinktionskoeffizient bei der Wellenlänge λ [*l*·*mol*<sup>-1</sup>·*cm*<sup>-1</sup>]

*d*: Weglänge des Lichts im Material [*cm*]

Als dekadischer, molarer Extinktionskoeffizient wurde für FIAsH der des Fluorescein bei 499 nm ( $\epsilon_{499}=75000 \mu^{-1}\text{cm}^{-1}$ ) verwendet, für das ReAsH der des Resuforin bei 590 nm ( $\epsilon_{590}=56000 \mu^{-1}\text{cm}^{-1}$ ). Die Lösungen wurden in 15  $\mu\text{l}$  Aliquots lichtgeschützt bei -20°C gelagert

### II.2.3.9 Markierung mit FIAsH

Die Angaben für die Markierung beziehen sich auf je ein „well“ einer „6-well-plate“ Zellkulturplatte. Dieses Markierungsprotokoll ist sowohl für die CCPGCC-Motive als auch für FLNCCPGCCMEP und HRWCCPGCKTF verwendet worden. Alle Arbeiten mit BAL oder EDT fanden unter einem Abzug statt.

- für jedes well wurde 0,25  $\mu\text{l}$  einer 1mM Lösung von FIAsH in DMSO mit 0,5  $\mu\text{l}$  einer 25 mM EDT in DMSO Lösung(2,1  $\mu\text{l}$  10 M EDT in 1000  $\mu\text{l}$  DMSO) gemischt und für 5 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert;
- diese Lösung wurde in 1ml Markierungspuffer pro Schale aufgenommen (FIAsH-EDT-Lösung);
- transfizierte HEK Zellen wurden auf mit Polylysin beschichteten Deckgläschen kultiviert. Von den Zellen wurde das Zellkulturmedium entfernt, und die Zellen einmal mit Markierungspuffer gewaschen. Diese Zellen wurden mit je 1 ml pro well FIAsH-EDT-Lösung bedeckt und für 40 Minuten bei 37°C und 7% CO<sub>2</sub> im

- Brutschrank inkubiert (längere Inkubationszeiten verbesserten das Ergebnis nicht, kürzere Inkubationszeiten führten zu einer schlechteren Markierung);
- in dieser Zeit wurden 25 µl einer 500 mM Lösung von EDT in DMSO (42 µl 10 M EDT in 1000 µl DMSO) in 50 ml Markierungspuffer gelöst (Wasch-FIAsH-Lösung). Es ist darauf zu achten, dass sich die EDT-Lösung vollständig in dem Markierungspuffer löst. Bei der Verwendung von FLNCCPGCCMEP kann eine Lösung von BAL in Markierungspuffer (0,5-1 mM) als Wasch-FIAsH-Lösung verwendet werden;
  - die inkubierten Zellen werden aus dem Brutschrank entnommen, die FIAsH-EDT-Lösung entfernt und einmal mit Markierungspuffer gewaschen. Anschließend wurden je 2 ml pro Schale Wasch-FIAsH-Lösung auf die Zellen gegeben und für 10 Minuten bei 37°C und 7% CO<sub>2</sub> im Brutschrank inkubiert;
  - die Zellen wurden aus dem Brutschrank entnommen, die Wasch-FIAsH-Lösung entfernt und einmal mit FIAsH-Puffer gewaschen. Die Zellen wurden mit Zellkulturmedium bedeckt und im Brutschrank bis zur Messung gelagert. Die Messung nach der Markierung in lebenden Zellen sollte innerhalb von 12–16 Stunden erfolgen. Bei längeren Zeitabständen nach der Markierung beginnt diese schwächer zu werden.

Markierungspuffer:            150 mM NaCl,  
                                      10 mM HEPES,  
                                      10 mM Glucose wasserfrei,  
                                      2,5 mM KCl,  
                                      4 mM CaCl<sub>2</sub>,  
                                      2 mM MgCl<sub>2</sub>

#### II.2.3.10 Markierung mit ReAsH

Die Angaben für die Markierung beziehen sich auf je ein „well“ einer „6-well-plate“ Zellkulturplatte. Dieses Markierungsprotokoll ist sowohl für die CCPGCC als auch für die FLNCCPGCCMEP und die HRWCCPGCCKTF Bindemotive verwendet worden. Alle Arbeiten mit BAL oder EDT fanden unter einem Abzug statt.



- für jedes well wurden 2 µl einer 2,5 mM Lösung von ReAsH in DMSO mit 0,5 µl einer 25 mM EDT in DMSO Lösung(2,1 µl 10 M EDT in 1000 µl DMSO) gemischt und für 5 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert;
- diese Lösung wurde in 1 ml Markierungspuffer pro Schale aufgenommen (ReAsH-EDT-Lösung);
- transfizierte HEK-Zellen wurden auf mit Polylysin beschichteten Deckgläschen kultiviert. Von den Zellen wurde das Zellkulturmedium entfernt, und einmal mit Markierungspuffer gewaschen. Diese Zellen werden mit je 1 ml pro well ReAsH-EDT-Lösung bedeckt und für 40 Minuten bei 37°C und 7% CO<sub>2</sub> im Brutschrank inkubiert (längere Inkubationszeiten verbesserten das Ergebnis nicht, kürzere Inkubationszeiten führten zu einer schlechteren Markierung);
- in dieser Zeit wurden 10 µl einer 500 mM Lösung von EDT in DMSO (42 µl 10 M EDT in 1000 µl DMSO) in 50 ml Markierungspuffer gelöst (Wasch-ReAsH-Lösung; es ist darauf zu achten, dass sich die EDT-Lösung vollständig in dem Markierungspuffer löst), bei der Verwendung von FLNCCPGCCMEP kann eine Lösung von BAL in Markierungspuffer (100-250 µM) als Wasch-ReAsH - Lösung verwendet werden;
- die inkubierten Zellen wurden aus dem Brutschrank entnommen, die ReAsH - EDT-Lösung entfernt und einmal mit Markierungspuffer gewaschen. Anschließend wurden je 2 ml pro Schale Wasch-ReAsH-Lösung auf die Zellen gegeben und für 10 Minuten bei 37°C und 7% CO<sub>2</sub> im Brutschrank inkubiert;
- die Zellen wurden aus dem Brutschrank entnommen, die Wasch-ReAsH-Lösung entfernt und einmal mit FIAsh-Puffer gewaschen. Die Zellen wurden mit Zellkulturmedium bedeckt und im Brutschrank bis zur Messung gelagert. Die Messung nach der Markierung in lebenden Zellen sollte innerhalb von 12–16 Stunden erfolgen. Bei längeren Zeitabständen nach der Markierung beginnt diese schwächer zu werden.

Markierungspuffer:            150 mM NaCl,  
   10 mM HEPES,  
   10 mM Glucose wasserfrei,  
   2,5 mM KCl,  
   4 mM CaCl<sub>2</sub>,  
   2 mM MgCl<sub>2</sub>

### II.2.3.11 Markierung mit ReAsH und FIAsh

Für alle Versuche wurden FIAsh- und ReAsH-Stammlösungen von 1 mM bzw. 2,5 mM eingesetzt. Die Angaben für die Markierung beziehen sich auf je ein „well“ einer „6-well-plate“ Zellkulturplatte. Bei diesem Markierungsprotokoll wurden die FLNCCPGCCMEP-Bindesequenz mit ReAsH und die CCPGCC-Bindesequenz mit FIAsh markiert. Zur Inkubation der Zellen mit dem jeweiligen Fluorophor sollte zur Verringerung von unspezifischen Bindungen EDT 12,5  $\mu$ M zugegeben werden. Versuche, diese Lösung durch eine 4  $\mu$ M BAL-Lösung zu ersetzen führten zu einer Verschlechterung der Markierung.

- Für jedes well wurden 2  $\mu$ l einer 2,5 mM Lösung von ReAsH in DMSO mit 0,5  $\mu$ l einer 25 mM EDT in DMSO (2,1  $\mu$ l 10 M EDT in 1000  $\mu$ l DMSO) Lösung gemischt und für 5 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert;
- diese Lösung wurde in 1 ml Markierungspuffer pro Schale aufgenommen (ReAsH-EDT-Lösung);
- transfizierte HEK-Zellen wurden auf mit Polylysin beschichteten Deckgläschen kultiviert. Von den Zellen wurde das Zellkulturmedium entfernt und einmal mit Markierungspuffer gewaschen. Diese Zellen wurden mit je 1 ml pro well ReAsH-EDT-Lösung bedeckt und für 40 Minuten bei 37°C und 7% CO<sub>2</sub> im Brutschrank inkubiert (längere Inkubationszeiten verbesserten das Ergebnis nicht, kürzere Inkubationszeiten führten zu einer schlechteren Markierung);
- in dieser Zeit wurden 0,25  $\mu$ l einer 10 M BAL-Lösung in 10 ml Markierungspuffer gelöst (250  $\mu$ M BAL; es ist darauf zu achten, dass sich die BAL-Lösung vollständig in dem Markierungspuffer löst);
- die inkubierten Zellen wurden aus dem Brutschrank entnommen, die ReAsH - EDT-Lösung entfernt und einmal mit Markierungspuffer gewaschen. Anschließend wurden je 2 ml pro Schale BAL-Wasch-Lösung auf die Zellen gegeben und für 10 Minuten bei 37°C und 7% CO<sub>2</sub> im Brutschrank inkubiert;
- die inkubierten Zellen wurden aus dem Brutschrank entnommen die BAL-Wasch-Lösung entfernt und einmal mit Markierungspuffer gewaschen;
- für jedes well wurden 0,25  $\mu$ l einer 1 mM Lösung von FIAsh in DMSO mit 0,5  $\mu$ l einer 25  $\mu$ M EDT in DMSO (2,1  $\mu$ l 10 M EDT in 100  $\mu$ l DMSO) Lösung gemischt und für 5 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert;

- diese Lösung wurde in 1 ml Markierungspuffer pro Schale aufgenommen (FIAsH-EDT-Lösung), die Zellen wurden mit je 1ml pro well FIAsH-EDT-Lösung bedeckt und für 40 Minuten bei 37°C und 7% CO<sub>2</sub> im Brutschrank inkubiert (längere Inkubationszeiten verbesserten das Ergebnis nicht, kürzere Inkubationszeiten führten zu einer schlechteren Markierung);
- die inkubierten Zellen wurden aus dem Brutschrank entnommen, die FIAsH-EDT-Lösung entfernt und einmal mit Markierungspuffer gewaschen. Anschließend wurden je 2 ml pro Schale Wasch-FIAsH-Lösung (25 µl einer 500 mM Lösung von EDT in DMSO (42 µl 10 M EDT in 1000 µl DMSO) in 50 ml Markierungspuffer gelöst; es kann alternativ eine Lösung von 0,2 µl 10 M BAL in 10 ml Markierungspuffer verwendet werden) auf die Zellen gegeben und für 10 Minuten bei 37°C und 7% CO<sub>2</sub> im Brutschrank inkubiert;
- die Zellen wurden aus dem Brutschrank entnommen, die Wasch-FIAsH-Lösung entfernt und einmal mit FIAsH-Puffer gewaschen. Die Zellen werden mit Zellkulturmedium bedeckt und im Brutschrank bis zur Messung gelagert. Die Messung nach der Markierung in lebenden Zellen sollte innerhalb von 12–16 Stunden erfolgen. Bei längeren Zeitabständen nach der Markierung beginnt diese schwächer zu werden.

Markierungspuffer:            150 mM NaCl,  
                                      10 mM HEPES,  
                                      10 mM Glucose wasserfrei,  
                                      2,5 mM KCl,  
                                      4 mM CaCl<sub>2</sub>,  
                                      2 mM MgCl<sub>2</sub>

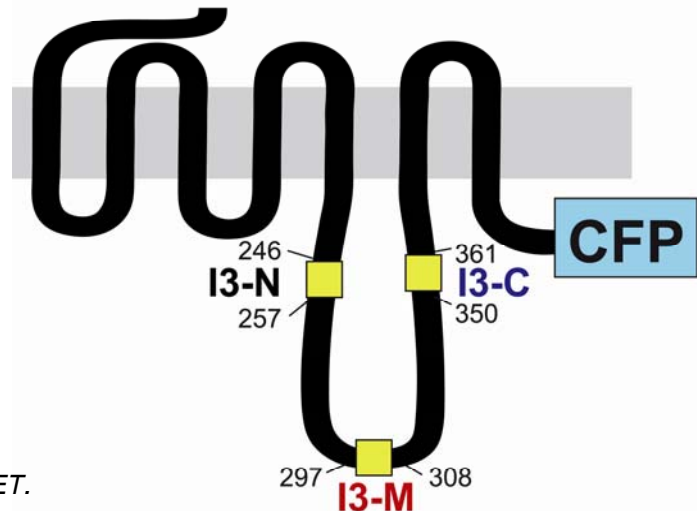
### **III. Ergebnisse**

#### **III.1 Untersuchung ligandenselektiver Konformationen am $\alpha_{2A}$ -adrenergen-Rezeptor**

##### **III.1.1 Theorie**

In vorherigen Untersuchungen (Hoffmann et al., 2005; Nikolaev et al., 2006) konnte bereits gezeigt werden, dass eine Aktivierung des  $\alpha_{2A}$ -AR mittels FRET zwischen zwei Fluorophoren, die in der dritten intrazellulären Schleife und dem C-Terminus eingebracht wurden, messbar ist. Bei diesen Messungen wurde die FIAsh-Bindesequenz in der dritten intrazellulären Schleife positioniert, wobei eine Trunkation von 120 Aminosäuren vorgenommen worden war. Hier soll nun der Fokus auf die Bewegungen der intakten dritten intrazellulären Schleife des  $\alpha_{2A}$ -AR gelegt werden, die aus 158 Aminosäuren besteht. Die Struktur dieses Rezeptorbereichs ist nicht erschlossen und der entsprechende Bereich konnte auch in der Kristallstruktur des  $\beta_2$ -adrenergen Rezeptors nicht ohne den gegen diesen Bereich gerichteten Antikörper aufgeklärt werden (Rasmussen et al., 2007). Zudem liegt keine Kristallstruktur eines GPCR vor, dessen dritte intrazelluläre Schleife eine ähnliche Größe wie die des  $\alpha_{2A}$ -AR besitzt. Um mögliche Konformationsänderungen des Rezeptors insbesondere in der dritten intrazellulären Schleife zu untersuchen, wurden drei verschiedene Positionen innerhalb dieser Schleife ausgewählt. Zunächst wurde ein gemeinsames Vorläuferkonstrukt kloniert, bei dem der C-Terminus mit einem CFP fusioniert wurde. In dieses Vorläuferkonstrukt wurde dann anschließend mit Hilfe der PCR-Technik an drei verschiedenen Positionen die Tetracysteinsequenz FLNCCPGCCMEP (Martin et al., 2005) eingefügt. Diese Sequenz wurde unterhalb der TM V (als Ersatz für G246-A257; I3-N) unterhalb der TM VI (als Ersatz für E350-W361; I3-C) und in der Mitte der intrazellulären Schleife (als Ersatz für S297-R308; I3-M) eingebracht. Dabei wurden die zwölf nativen Aminosäuren, die sich an den entsprechenden Stellen befanden, durch das Bindemotiv ersetzt (Abb.17).

Abb.17: Schematische Darstellung der drei verschiedenen Konstrukte:  
I3-N mit dem FLNCCPGCCMEP Motiv (gelb) zwischen Aminosäure 246 und 257 (schwarz);  
I3-M zwischen 297 und 308 (rot);  
I3-C zwischen 350 und 361 (blau).  
Bei allen drei Konstrukten befindet sich das CFP (cyan) am Ende des C-Terminus; Modifiziert nach:  
(Zürn et al.,2009), mit Genehmigung von ASPET.



### III.1.2 Charakterisierung der Rezeptorsensoren

Bevor die Rezeptorsensoren hinsichtlich ligandeninduzierter Konformationsänderungen untersucht wurden, wurde eine Reihe von Vorversuchen zur genauen Charakterisierung der Rezeptoren unternommen. Zunächst wurde die korrekte Lokalisation der Rezeptoren an der Zellmembran überprüft. Anschließend wurde untersucht, ob die Affinität der zu untersuchenden Liganden zu den Rezeptorkonstrukten von der des Wildtyprezeptors abweicht. Darüber hinaus wurde die Funktionalität der Signaltransduktion aller Rezeptorkonstrukte anhand ihrer Fähigkeit, G-Proteine zu aktivieren, überprüft.

#### III.1.2.1 Membranlokalisierung der FIAsH-markierten Rezeptorsensoren

HEK-Zellen, welche die Rezeptorsensoren stabil exprimierten, wurden mit FIAsH wie unter II. Methoden beschrieben markiert. Konfokalmikroskopische Aufnahmen zeigten für alle drei Rezeptorsensoren CFP-Fluoreszenz an der Plasmamembran (Abb.18 links). Die FIAsH-Fluoreszenz korrelierte mit der CFP-Fluoreszenz (Abb.18 rechts); die Rezeptorsensoren sind somit korrekt lokalisiert und spezifisch mit FIAsH markiert.

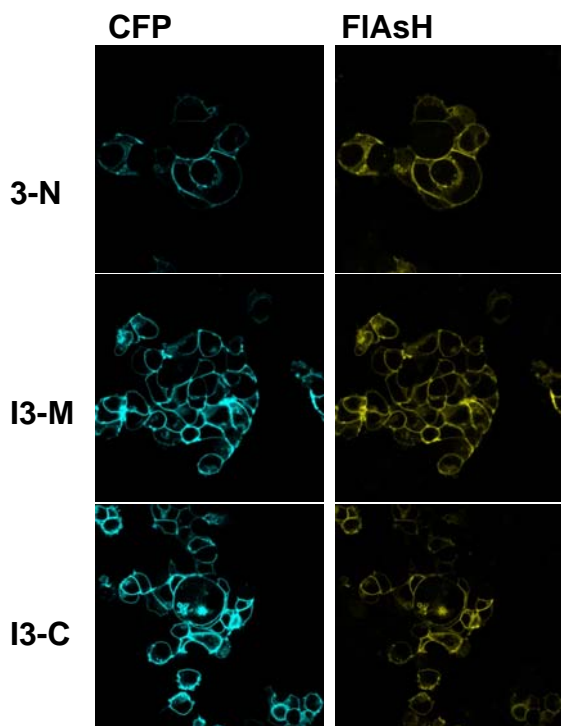


Abb.18: Sequenzielle Aufnahmen mit dem Konfokalmikroskop (Leica SP5). HEK293-Zellen, die I3-N, I3-M oder I3-C stabil exprimieren, wurden mit FIAsh markiert. Links: CFP-Fluoreszenz angeregt mit dem 405 nm Diodenlaser (Emissionsbereich 460-500 nm), rechts: FIAsh-Fluoreszenz angeregt mit dem 514 nm Argonlaser (Emissionsbereich 525-600 nm).

### III.1.2.2 Ligandenbindung der Rezeptorsensoren

In dieser Studie wurden folgende Agonisten untersucht: Der volle Agonist Noradrenalin (NE), der starke, partielle Agonist Dopamin (DA), sowie die schwachen, partiellen Agonisten Norphenylephrin (NF) und Octopamin (OC); diese sind sich strukturell sehr ähnlich und stellen alle Katecholamine dar, die sich lediglich durch die Positionierung oder Anwesenheit von Hydroxylgruppen unterscheiden. Der starke ,partielle Agonist Clonidin (CL) wurde ebenfalls untersucht, ist aber strukturell unterschiedlich und sollte als Imidazolderivat mit den Katecholaminen verglichen werden. Um zu überprüfen, ob die eingeführten Mutationen die Ligandenbindung der Rezeptorsensoren beeinflussen, wurden Membranen aus HEK-Zellen, die die Rezeptoren I3-N, I3-M oder I3-C bzw. Wildtyp  $\alpha_{2A}$ -AR stabil exprimierten, gewonnen und die  $K_D$ - und  $K_i$ -Werte der Liganden in Radioligandenbindungsversuchen bestimmt. Dazu wurde zunächst in Sättigungsexperimenten für alle Rezeptoren die Affinität zum Radioliganden [ $^3$ H]-RX821002 ermittelt ( $K_D$ , Tabelle 2 unten). Die Affinitäten der vollen und partiellen Agonisten wurden durch Verdrängung des [ $^3$ H]-RX821002 bestimmt ( $K_i$ , Tabelle 2). Keiner der Rezeptorsensoren zeigte signifikante Unterschiede zum Wildtyprezeptor für die untersuchten Liganden. Somit beeinflussen die vorgenommenen Mutationen die Affinität der verwendeten Liganden nicht.

## Ergebnisse

Compound	Wild type		I3-N		I3-M		I3-C	
	K <sub>i</sub> [μM]	95% confidence limit	K <sub>i</sub> [μM]	95% confidence limit	K <sub>i</sub> [μM]	95% confidence limit	K <sub>i</sub> [μM]	95% confidence limit
Norepinephrine (NE)	15.6	10.5 – 23.1	18.9	14.5 – 24.7	15.5	12.4 – 19.2	31.2	29.9 – 32.6
Dopamine (DA)	47.5	45.1 – 50.1	52.4	36.8 – 74.7	35.7	28.8 – 44.3	55.9	42.1 – 74.4
Clonidine (CL)	0.10	0.08 – 0.13	0.15	0.14 – 0.17	0.12	0.10 – 0.14	0.24	0.18 – 0.32
Octopamine (OC)	41.1	34.5 – 48.8	65.8	43.5 – 96.1	93.6	69.0 – 126.9	70.4	65.7 – 75.4
Norphenylephrine (NF)	30.4	17.0 – 54.2	40.3	33.7 – 48.3	50.3	20.0 – 126.5	52.3	29.1 – 94.1
[ <sup>3</sup> H]-RX821002	K <sub>D</sub> [μM]							
	3.59	n.d.	2.58	n.d.	4.38	n.d.	3.80	n.d.

*Tab.2: Bindungsaffinitäten der untersuchten Liganden zu den Rezeptorsensoren. Für die Sättigungsbindung (unten) wurden je drei unabhängige Versuche durchgeführt. Zur K<sub>i</sub>-Bestimmung wurden Verdrängungsbindungen in Gegenwart von 4 nM [<sup>3</sup>H]-RX821002 mit verschiedenen Konzentrationen der aufgeführten Agonisten durchgeführt. Drei unabhängige Versuche wurden für jeden Liganden an jedem Konstrukt durchgeführt. Sowohl für die Sättigungs- als auch für die Verdrängungsbindung wurden die K<sub>D</sub>- und K<sub>i</sub>-Werte nach Cheng-Prussow berechnet. Das Konfidenzintervall für alle Werte beträgt 95%; Modifiziert nach: (Zürn et al., 2009), mit Genehmigung von ASPET.*

### III.1.2.3 [<sup>35</sup>S]-GTPγS-Bindung

Um die Funktionalität der Rezeptoren zu analysieren, wurde untersucht, ob sie nach Ligandenbindung ihr nachgeschaltetes G-Protein aktivieren können. Da nur aktive G-Proteine in der Lage sind, GTP zu binden, kann die Aktivierung von G-Proteinen anhand der Bindung von radioaktiv markiertem [<sup>35</sup>S]-GTPγS an das aktivierte G-Protein gemessen werden (Sternweis and Robishaw, 1984). Dies gibt wiederum Aufschluss über die Funktionalität des in der Membran befindlichen Rezeptors. Dazu wurden aus Zellen, die Wildtyp, I3-N, I3-M und I3-C stabil exprimierten, Zellmembranen präpariert. Die Rezeptorkonzentrationen wurden mit Radio-ligandenbindungen ermittelt und vergleichbare Rezeptormengen für die Bestimmung der [<sup>35</sup>S]-GTPγS Bindung eingesetzt. Die Rezeptoren wurden mit NE in sättigenden Konzentrationen stimuliert und als Kontrolle außerdem Zellmembranen aus untransfizierten HEK293-Zellen untersucht. Abb.19A zeigt, dass alle Rezeptoren auch in Abwesenheit des Agonisten eine basale Bindung von [<sup>35</sup>S]-GTPγS auslösen (verglichen mit untransfizierten HEK293-Zellen), die jedoch nach Inkubation mit 1 mM NE signifikant zunimmt und deutlich schneller verläuft. Ein Unterschied für die Bindung von [<sup>35</sup>S]-GTPγS zwischen den jeweiligen Rezeptoren konnte jedoch nicht festgestellt werden.

Entsprechende Versuche wurden für alle vollen und partiellen Agonisten durchgeführt, die in dieser Studie untersucht wurden. Alle Rezeptorkonstrukte zeigten hierbei für den jeweils verwendeten Agonisten eine Aktivierung der G-Proteine, die der des Wildtyprezeptors äquivalent ist (Abb.19 B). Dies verdeutlicht, dass die drei Rezeptorsensoren bezüglich ihrer Sekundärantwort untereinander identisch sind und sich wie der Wildtyprezeptor verhalten. Die Daten zeigen ebenfalls, dass keiner der Agonisten eine veränderte Effizienz („efficacy“) gegenüber dem Wildtyprezeptor aufweist.



## Ergebnisse

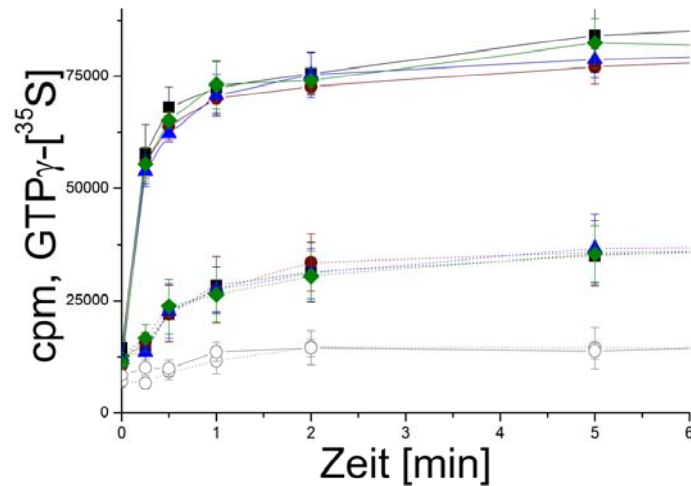


Abb.19A: G-Protein-Aktivierung durch NE, gemessen als [ $^{35}$ S]-GTP $\gamma$ S-Bindung. Die Rezeptoren wurden in HEK293-Zellen stabil transfiziert und es wurden von diesen Zellmembranen präpariert. Untersucht wurden untransfizierte HEK293-Zellen (grau, Kreis), der Wildtyprezeptor (olive, Raute), I3-N (blau, Dreieck), I3-M (rot, Kreis) und I3-C (schwarz, Quadrat). Die Daten stellen die Mittelwerte aus 3 unabhängigen Messungen dar. Zum Vergleich der Bindungskinetik mit und ohne Agonist wurde ein Zeitverlauf gemessen, nach 0 s, 15 s, 30 s, 1 min, 2 min, 5 min. Gestrichelte Linien zeigen die Darstellung ohne Zugabe eines Agonisten, die durchgezogenen Linien zeigen die Messungen mit 1 mM NE. Die vier transfizierten Konstrukte sind in keinem Messpunkt signifikant voneinander unterschiedlich (ANOVA  $p > 0,01$ ).

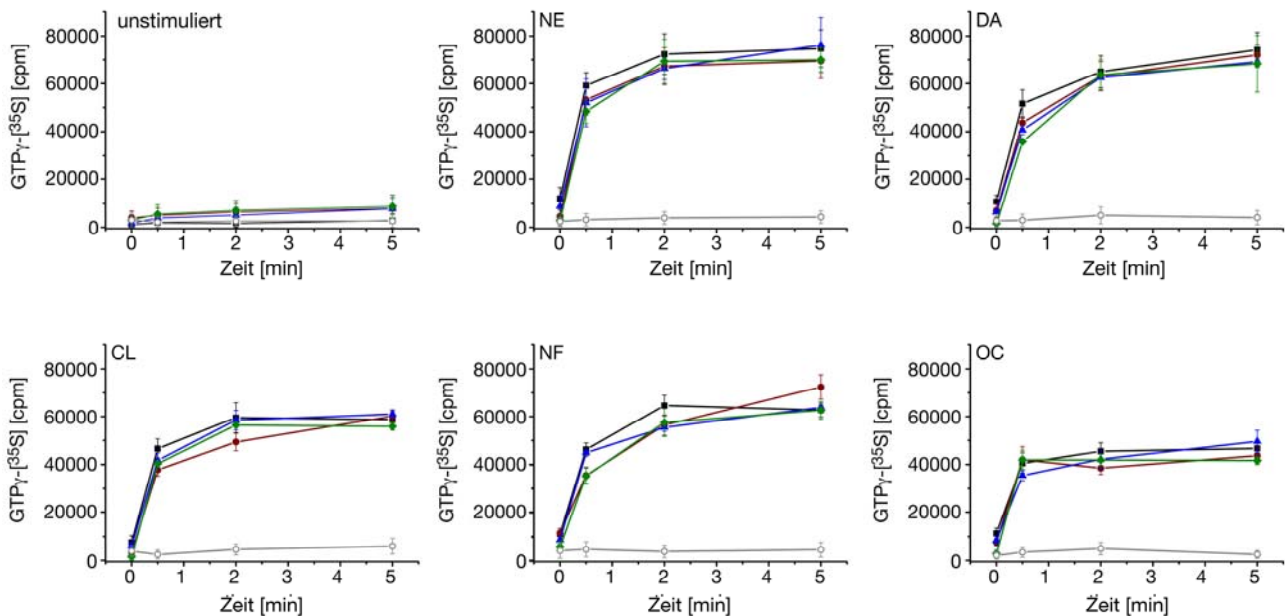


Abb.19B: G-Protein-Aktivierung durch verschiedene Agonisten. Vergleich der einzelnen Konstrukte (Farbcode s. Abb.19A) auf die Bindung von [ $^{35}$ S]-GTP $\gamma$ S mit den eingesetzten Agonisten. Es wurde ein Zeitverlauf nach 0 s, 30 s, 1 min, 2 min und 5 min aufgenommen. Die Daten stellen die Mittelwerte aus drei unabhängigen Messungen dar. Die vier transfizierten Konstrukte sind in keinem Messpunkt signifikant voneinander unterschiedlich (ANOVA  $p > 0,01$ ); Modifiziert nach: (Zürn et al., 2009), mit Genehmigung von ASPET.

### III.1.3 Messung der FRET-Amplituden

Im vorangegangenen Kapitel (III.1.2) wurde gezeigt, dass die drei  $\alpha_{2A}$ -Rezeptorsensoren, die C-terminal mit CFP (Donor) und in der dritten intrazellulären Schleife mit einer FIAsh-Bindedomäne (Akzeptor) versehen wurden, sich nicht hinsichtlich ihrer subzellulären Lokalisation, Ligandenbindung sowie G-Protein-Aktivierung von Wildtyprezeptoren unterscheiden. Diese Vorversuche zeigen darüber hinaus, dass die Rezeptorkonstrukte (I3-N, I3-M und I3-C) auch untereinander hinsichtlich agonistinduzierter G-Protein-Aktivierung vergleichbar sind und sich daher nur hinsichtlich der Position der FIAsh-Bindesequenz in der dritten intrazellulären Schleife unterscheiden. Damit sind die Voraussetzungen gegeben, agonistinduzierte Konformationsänderungen mit diesen Konstrukten vergleichend untersuchen zu können. Würde sich durch die Konformationsänderung des hier betrachteten  $\alpha_{2A}$ -adrenergen-Rezeptors die Distanz bzw. Orientierung der Fluorophore (in der dritten Schleife und im C-Terminus) zueinander verändern, sollte sich das als Änderung des ratiometrischen Verhältnisses der Akzeptorfluoreszenz zur Donorfluoreszenz zeigen. Dabei sollte zunächst mit Hilfe der drei Rezeptorsensoren untersucht werden, ob sich für einen gegebenen Agonisten solche Änderungen des FRET-Verhältnisses für jede der drei möglichen Positionen des FIAsh in der dritten intrazellulären Schleife detektieren lassen. Dabei wurde insbesondere das Augenmerk darauf gelegt, ob alle Agonisten ähnliche Änderungen der ratiometrischen Verhältnisse für die verschiedenen Positionen der FIAsh-Markierung hervorrufen, oder ob sich die Antworten unterscheiden.

HEK-Zellen, die die Rezeptorsensoren I3-N, I3-M oder I3-C stabil exprimierten, wurden mit FIAsh markiert und am FRET-Mikroskop untersucht. Alle drei Rezeptorsensoren zeigten nach NE-Stimulation vergleichbar deutliche, absolute FRET-Änderungen von 11% für I3-N, 13% für I3-M und 15% für I3-C. Für alle folgenden Versuche wurde der volle Agonist Norepinephrin (NE) als Referenzsubstanz verwendet: Um die Effekte eines partiellen Agonisten zu messen, wurden die Zellen zunächst mit diesem stimuliert und dann, nach einer kurzen Auswaschphase des untersuchten, partiellen Agonisten, die entsprechende Zelle nochmals mit NE stimuliert. Alternativ wurde direkt mit NE superfundiert. Die gemessenen Signale der partiellen Agonisten wurden dann immer auf das entsprechende NE-Signal des jeweiligen Versuchs bezogen, so dass die FRET-

Änderung immer als prozentuales Verhältnis der maximalen FRET-Änderung durch NE (100%) angegeben wird.

Abb.20 zeigt eine repräsentative FRET-Messung nach sequenzieller Stimulation der Rezeptorsensoren mit zwei verschiedenen, partiellen Agonisten und NE. Die Stimulation mit dem schwachen, partiellen Agonisten Octopamin (OC) erzeugte hier nur am Rezeptorsensor I3-C eine messbare FRET-Änderung, nicht aber an den Rezeptorsensoren I3-N und I3-M. Im Gegensatz dazu erzeugte der stärkere partielle Agonist Dopamin (DA) Antworten an allen drei Rezeptorsensoren, wobei die stärkste FRET-Änderung wiederum am I3-C, also zwischen dem C-terminalen CFP und dem in der dritten intrazellulären Schleife C-terminal gebundenen FIAsh auftrat. Die FRET-Änderungen zwischen dem mittig (I3-M) und N-terminal (I3-N) in der dritten Schleife lokalisierten FIAsh und dem C-terminalen CFP waren dagegen signifikant schwächer. Die quantitative Auswertung von 6-15 Experimenten ergab, dass die beobachteten Unterschiede zwischen den verschiedenen Rezeptorsensoren signifikant sind (Abb.21). So erzeugte DA an I3-N lediglich 22,3% und am I3-M 29,5% des maximalen NE-Signals; die stärkste FRET-Änderung am I3-C betrug 36,1%, bezogen auf das NE Signal.

Im Gegensatz dazu erzielte der stärkere, partielle Agonist Clonidin (CL) vergleichbare FRET-Signale an allen drei Rezeptorsensoren, die bei 43,7%-51,8% der mit NE erzielten FRET-Änderung lagen. Der schwache, partielle Agonist Norphenephrin (NF) wiederum zeigte, wie auch schon Octopamin, an den Sensoren I3-N und I3-M keine Veränderung des FRET-Signals. An I3-C war jedoch eine deutliche FRET-Änderung messbar (OC: 16,8 %, NF: 17,4 %). Dieses Ergebnis deutet darauf hin, dass sich bei diesen partiellen Agonisten vor allem das C-terminale Ende der dritten intrazellulären Schleife relativ zum C-Terminus bewegt, der Rest der dritten Schleife hingegen (relativ zum C-Terminus) kaum die Position wechselt. Generell sind die FRET-Antworten für CL, DA, NF und OC im Bezug auf das NE-Signal für alle drei betrachteten Positionen des FIAsh unterschiedlich stark, das heißt jede Substanz erzeugte ein individuelles Muster von FRET-Änderungen. Dies könnte darauf hin deuten, dass jede Substanz eine spezifische Rezeptorkonformation induziert.

## Ergebnisse

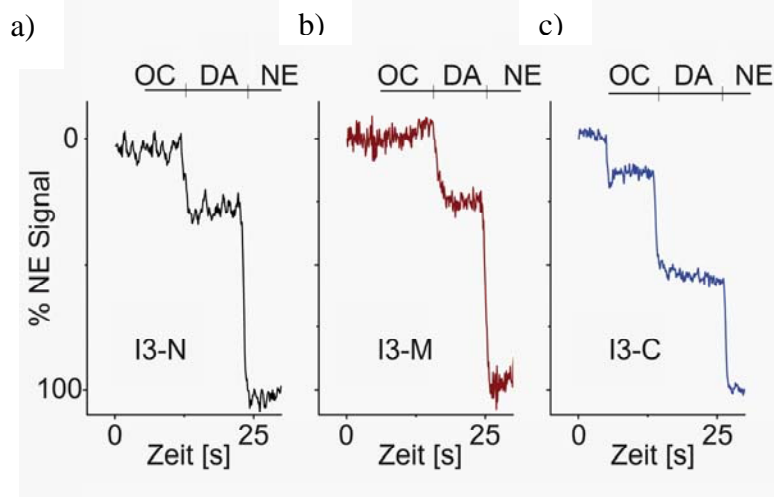


Abb.20: Normalisierte repräsentative FRET-Ratios der Rezeptorsensoren, (a) I3-N (schwarz), (b) I3-M (rot) und (c) I3-C (blau). Die Messungen erfolgten an der Zeiss/Till Photonics FRET-Messeinheit, mit einer Exzitation von 436 nm. Die Zellen, die den jeweiligen Rezeptorsensor exprimieren, wurden mit den angegebenen Agonisten (1 mM) mit der Superfusion nacheinander stimuliert, zuerst Octopamin (OC) gefolgt von Dopamin (DA) und schließlich Norepinephrin (NE); Modifiziert nach: (Zürn et al., 2009), mit Genehmigung von ASPET.

A)

	CL	DA	OC	NF
I3-N	51.8	22.3	0.4	0.4
I3-M	43.7	29.5	0.03	0.5
I3-C	47.2	36.1	17.4	16.8

B)

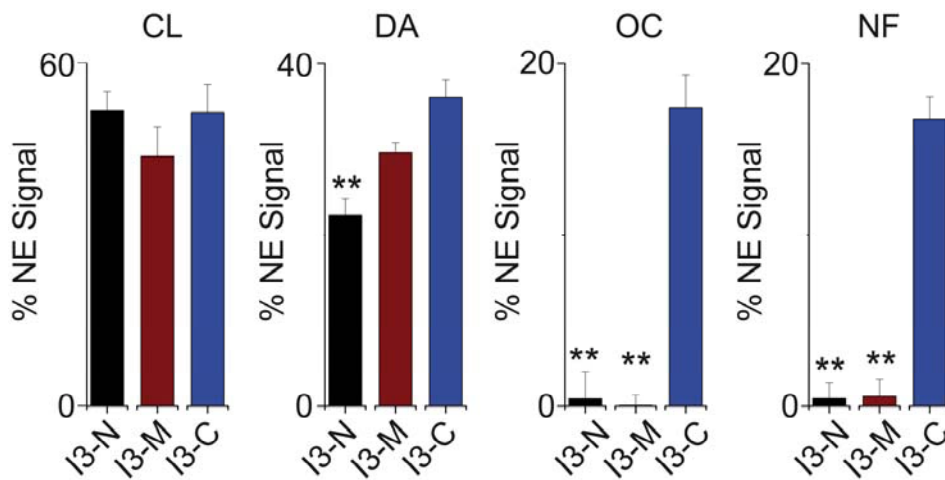


Abb. 21: Quantitative FRET-Änderungen durch Stimulation der Rezeptorsensoren I3-N (schwarz), I3-M (rot) und I3-C (blau) für die verschiedenen Agonisten (CL, DA, OC, NF), bezogen auf die entsprechenden FRET-Änderungen durch NE (% NE-Signal). Es wurden 6-15 Zellen je Agonist und Konstrukt analog zu den Bedingungen in Abb.20 vermessen. Die Messungen erfolgten an der Zeiss/ Till Photonics FRET-Messeinheit, mit einer Exzitation von 436 nm. Die Zellen, die den jeweiligen Rezeptorsensor exprimierten, wurden mit den angegebenen Agonisten (1 mM; Clonidin 10µM) mit der Superfusion stimuliert. Angegeben sind die Mittelwerte in tabellarischer Form A) und als Balkendiagramm B); Modifiziert nach: (Zürn et al., 2009), mit Genehmigung von ASPET. \*\* = signifikant unterschiedlich von I3-C ( $p < 0,01$  ANOVA)

### III.1.4 Messung der Aktivierungskinetik

Als nächstes wurde überprüft, ob verschiedene Agonisten an den drei Rezeptorsensoren unterschiedlich schnelle Konformationsänderungen hervorrufen, oder ob die Änderung der Konformation an den drei betrachteten Stellen in der dritten intrazellulären Schleife des  $\alpha_{2A}$ -AR der gleichen Kinetik folgt. Hierzu wurde die Geschwindigkeit, mit der sich das FRET-Signal ändert, bestimmt.

Die FRET-Änderungen, die durch NE ausgelöst wurden, folgten an allen drei Sensoren I3-N, I3-M und I3-C einer Kinetik mit einer Halbwertszeit von 60 - 80 ms, was mit publizierten Daten übereinstimmt (Hoffmann et al., 2005; Nikolaev et al., 2006; Vilardaga et al., 2003). Für Dopamin wurde beschrieben, dass es im Vergleich zu NE die doppelte Zeit benötigt, um den Rezeptor zu aktivieren. Eine vergleichbare Kinetik wurde auch mit den Konstrukten I3-M und I3-C gemessen. Interessanterweise benötigte das Konstrukt I3-N bei Stimulation mit Dopamin relativ zu NE die dreifache Zeit, um das Aktivierungssignal zu erzeugen (Abb.21/22). Dies zeigt, dass die scheinbare Kinetik der Rezeptoraktivierung von der Positionierung der Fluorophore abhängen kann und deutet darauf hin, dass sich verschiedene Regionen eines Rezeptors mit unterschiedlicher Geschwindigkeit bewegen können. Es wird auch deutlich, dass für die beiden Agonisten NE und DA nicht die gleiche Konformationsänderung von statten gehen kann, weil NE an allen drei Positionen gleich schnelle Bewegungen auslöst, DA hingegen die Region unterhalb der TM V langsamer bewegt als die beiden anderen Positionen. Sollte es sich um die gleichen Konformationen handeln, welche an den verschiedenen Positionen unterschiedlich schnell eingestellt werden, so wird jedoch klar, dass die verschiedenen Agonisten diese Konformation durch unterschiedliche Mechanismen stabilisieren.

Dies zeigt zusammenfassend, dass ligandenspezifische Konformationen durch unterschiedlichen Signalamplituden sowie unterschiedliche Kinetiken nachgewiesen werden können.

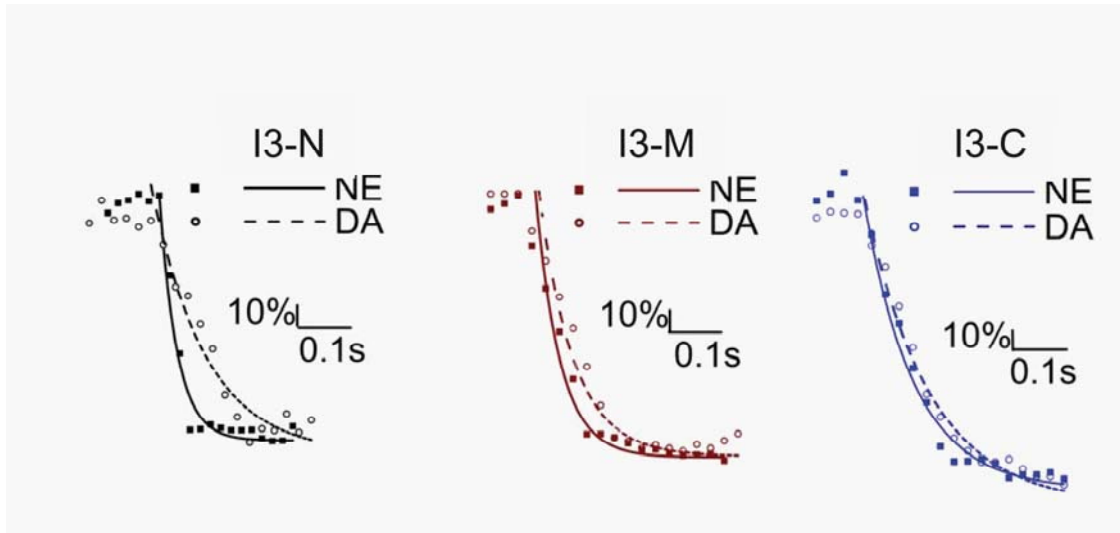


Abb.22: Kinetik der FRET-Änderung der Rezeptorsensoren I3-N (schwarz), I3-M (rot) und I3-C (blau) für NE und DA (1 mM, Superfusion). FRET wurde gemessen in stabil transfizierten HEK293-Zellen bei einer Exzitation von 436 nm. Gezeigt sind repräsentative Spuren, normalisiert auf den größten Effekt für NE; Modifiziert nach: (Zürn et al., 2009), mit Genehmigung von ASPET.

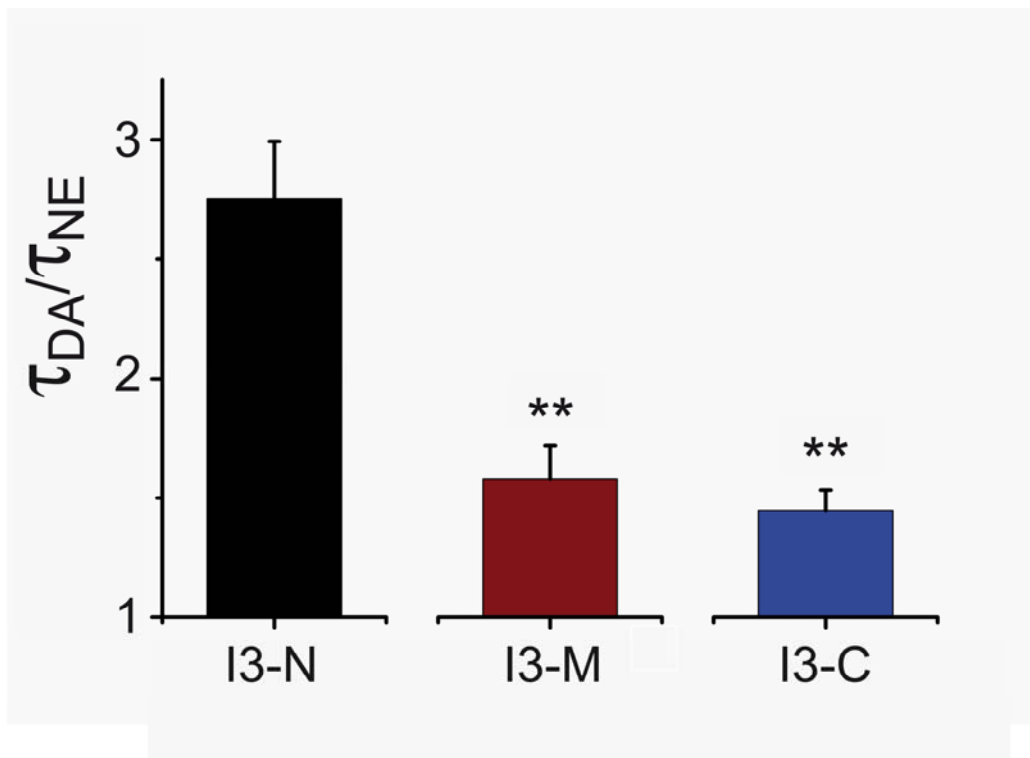


Abb.23: Vergleich der Aktivierungskinetiken von DA und NE an den Rezeptorsensoren I3-N (schwarz), I3-M (rot) und I3-C (blau). Relative  $\tau$ -Werte von DA bezogen auf NE ( $\tau_{DA}/\tau_{NE}$ ) sind dargestellt als Mittelwerte ( $\pm$  SEM). Für jedes Konstrukt wurden 5 bis 7 Zellen je Agonist (NE und DA) vermessen. \*\* = signifikant unterschiedlich von I3-C ( $p < 0,01$  ANOVA); Modifiziert nach: (Zürn et al., 2009), mit Genehmigung von ASPET.

### III.2 Duales Markieren von Proteinen mit kleinen Fluorophoren

Die Ergebnisse dieser Arbeit mit CFP-FIAsH-markierten Proteinen haben gezeigt, dass verschiedene Agonisten individuelle Konformationsänderungen an Rezeptoren auslösen können (vgl. Abschnitt III.1). Ein Nachteil dieser Methode ist jedoch, dass sich große Fluorophore, wie z.B. CFP, nicht beliebig im Rezeptor positionieren lassen. Ein hilfreiches Werkzeug für genauere Konformationsanalysen wären Sensoren, bei denen die Positionen beider Fluorophore variabel gestaltbar wären. Bisher haben wir nur die kleinen Fluorophore innerhalb der dritten intrazellulären Schleife platziert und deren Bewegung im Verhältnis zu einem, am C-Terminus befindlichen, sehr großen Fluorophor betrachtet. Jedoch ist für genaue Distanzberechnungen dabei unklar, welche Ausrichtung der fluoreszierende Kern des Donors (CFP) zum Akzeptor einnimmt. Außerdem verhindert die Größe des CFP die Detektierung kleiner Rezeptorbewegungen.

Ein weiterer Aspekt muss für die Weiterentwicklung des Systems beachtet werden: Versuche, FIAsH (das CCPGCC-Motiv) in andere intrazelluläre Schleifen einzubringen, um dann FRET mit dem CFP im C-Terminus zu messen, schlugen fehl. So konnte zwar eine schwache FRET-Änderung von 1,6% für NE beobachtet werden, wenn die FIAsH-Sequenz in der ersten intrazellulären Schleife des  $\alpha_{2A}$ -AR positioniert wurde (Abb.24), jedoch ließen sich diese schwachen FRET-Änderungen nur schlecht reproduzieren und eine Optimierung dieser Messung war von Nöten. Bei Versuchen, die CCPGCC-Sequenz in der zweiten intrazellulären Schleife einzubringen und FRET mit einem CFP im C-Terminus zu messen, konnte überhaupt kein dynamisches FRET-Signal detektiert werden. Ob bei der Rezeptoraktivierung wirklich wenig relative Bewegung zwischen dem C-Terminus und der ersten oder zweiten intrazellulären Schleife stattfindet, oder ob die Ausrichtung der Fluoreszenz-Zentren des CFP und des FIAsH ungünstig ist, beziehungsweise beide zu weit voneinander entfernt sind, lässt sich aus diesem Ergebnis nicht schließen. Es wäre notwendig, die beiden Fluorophore variabel positionieren zu können, also z.B. FIAsH in der ersten oder zweiten und CFP in der dritten intrazellulären Schleife. Aufgrund seiner Größe kann CFP jedoch innerhalb der dritten intrazellulären Schleife nicht variabel platziert werden, was nach den vorher gezeigten Ergebnissen am  $\alpha_{2A}$ -AR nötig wäre um die Bewegung des Rezeptors für mehrere Agonisten zu vergleichen. Des Weiteren ist es auf diese Weise möglich, eine Optimierung der Positionierung der Fluorophore zu erreichen.

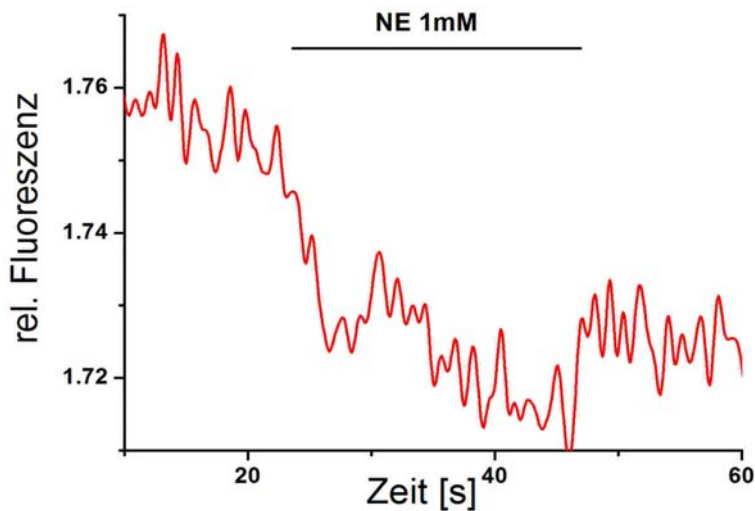


Abb.24: FRET-Änderung zwischen FIAsh in der ersten intrazellulären Schleife des  $\alpha_{2A}$ -AR und einem C-terminalen CFP. HEK-Zellen wurden mit diesem  $\alpha_{2A}$ -AR transfiziert und mit FIAsh markiert. FRET wurde gemessen bei einer Exzitation von 436 nm und die Akzeptorfluoreszenz durch die Donorfluoreszenz geteilt. NE (1mM) wurde über die Superfusion auf die Zelle gebracht (Adjacent Averaging: 5).

Es wurde daher versucht, eine Methode zu etablieren, bei der im FRET-Paar CFP/FIAsh der Donor CFP durch ein ebenfalls kleines Fluorophor ersetzt wird. Wegen seiner spektralen Eigenschaften könnte das Resofurin-Derivat ReAsH als FRET-Partner für FIAsh geeignet sein. In dieser Konstellation würde das FIAsh als Donor fungieren und ReAsH als Akzeptor (Abb.25). Ein Problem bei dieser Konstellation ist, dass beide Fluorophore an die CCPGCC-Sequenz binden. Allerdings binden die Fluorophore mit unterschiedlichen Affinitäten, sowohl an das CCPGCC-Motiv als auch an alternative Tetracysteinsequenzen (Martin, 2003). Diese unterschiedlichen Affinitäten sind die Voraussetzung für die Entwicklung einer Methode, die eine duale Markierung mit zwei Fluorophoren innerhalb einer Zelle erlaubt.

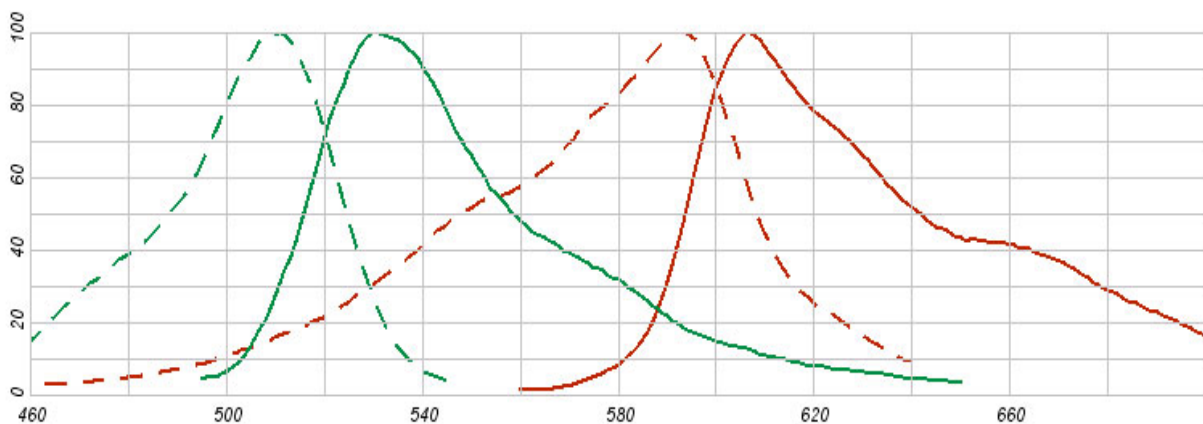


Abb.25: Emissions- (durchgezogenen Linie) und Exzitationsspektren (gestrichelte Linie) von FIAsh (grün) und ReAsH (rot) (<http://www.invitrogen.com>).



### III.2.1 Charakterisierung der Tetracysteinsequenzen

#### III.2.1.1 Prinzip der Affinitätsbestimmung

Martin et al. beschreiben für die Bindemotive FLNCCPGCCMEP und HRWCCPGCCKTF eine höhere Affinität zu den Fluorophoren FIAsH und ReAsH als für die publizierte CCPGCC-Sequenz (Martin et al., 2005). In dieser Arbeit von Martin et al. waren die Bindesequenzen direkt C-terminal an ein GFP fusioniert worden, wobei gezeigt werden konnte, dass die umliegenden Aminosäuren die Affinität des Bindemotivs beeinflussen. Es sollte daher zunächst überprüft werden, ob die beschriebenen Affinitätsunterschiede auch dann reproduzierbar sind, wenn die Bindesequenzen in einen GPCR eingeführt werden.

Die relativen Affinitäten verschiedener Fluorophore zu ihren Bindesequenzen können mit Hilfe der Auswaschung der Fluorophore vom Bindemotiv durch Dithiole gemessen werden, die eine höhere Affinität zu den biarsenischen Fluorophoren haben als die Tetracystein-Bindesequenzen. Die Konzentration an benötigtem Dithiol, um ein Fluorophor aus der Bindung mit einer Tetracysteinsequenz zu lösen, ist somit ein Maß für dessen Affinität zur Bindesequenz. Um die Affinität von FIAsH zu den Bindesequenzen FLNCCPGCCMEP und HRWCCPGCCKTF innerhalb eines GPCRs zu bestimmen, wurde ein FRET-basierter Ansatz gewählt, um die Menge an gebundenem FIAsH messen zu können. Dazu wurden die Bindemotive in  $A_{2A}$ -R, die ein C-terminales CFP tragen, unmittelbar N-terminal vor dem CFP eingefügt ( $A_{2A}$ -FLN-CFP bzw.  $A_{2A}$ -HRW-CFP). Gebundenes FIAsH und CFP bilden somit ein direkt benachbartes FRET-Paar. Wird nach Anregung vom Donor CFP eine Emission vom Akzeptor FIAsH detektiert, handelt es sich um FRET, wobei das FRET-Signal direkt mit der Menge an gebundenem FIAsH korrelieren sollte, da dieses nur in gebundenem Zustand fluoresziert. In analoger Weise wurden Konstrukte hergestellt, mit denen die relative Affinität von ReAsH zu den Bindemotiven FLNCCPGCCMEP und HRWCCPGCCKTF bestimmt werden kann. ReAsH bildet aufgrund seiner spektralen Eigenschaften mit YFP ein effizientes FRET-Paar. Es wurden daher identische  $A_{2A}$ -R konstruiert, die jedoch anstelle des C-terminalen CFP ein YFP tragen, vor dem die zu untersuchenden Bindemotive eingefügt wurden, so dass gebundenes ReAsH und YFP hier ein FRET-Paar bilden ( $A_{2A}$ -FLN-YFP bzw.  $A_{2A}$ -HRW-YFP).

Zum Vergleich wurden zunächst die Affinitäten von FIAsh und ReAsH zur ursprünglichen CCPGCC-Sequenz ermittelt. Die Affinität von FIAsh kann an einem  $A_{2A}$ -R bestimmt werden, der ein C-terminales CFP und CCPGCC in der dritten intrazellulären Schleife trägt, und für den FRET bereits beschrieben wurde ( $A_{2A}$ -FI3-CFP, Hoffmann 2005). Für ReAsH wurde ein analoger  $A_{2A}$ -R mit CCPGCC und endständigem YFP hergestellt ( $A_{2A}$ -FI3-YFP).

### III.2.1.2 Auswahl des Dithiols

Ein mögliches Dithiol zur Auswaschung der Fluorophore ist Ethandithiol (EDT), das – in niedrigen Konzentrationen – standardmäßig im Markierungsprotokoll für FIAsh eingesetzt wird, um unspezifische Bindungen gering zu halten (Hoffmann et al., 2005). In der angesprochenen Arbeit von Martin et al. hingegen wurde „British Anti-Lewisite“ (BAL), 2,3-Dimercaptopropanol, zur Auswaschung der kleinen Fluorophore und damit zur relativen Affinitätsbestimmung verwendet. BAL ist weniger geruchsbelästigend und zudem wird für BAL eine höhere Verdrängungspotenz für FIAsh als für EDT beschrieben (Martin et al., 2005). Daher ist es sinnvoll, die Versuche zur Bestimmung der Affinitäten, bei denen mit hohen Dithiolkonzentrationen gearbeitet werden muss, mit BAL anstatt mit EDT durchzuführen. So wurde zunächst mit FIAsh und dem Konstrukt  $A_{2A}$ -FLN-CFP, das mit FLNCCPGCCMEP die Sequenz mit der höchsten beschriebenen Affinität enthält, die Eignung von BAL überprüft, ein kleines Fluorophor aus seiner Bindung auszuwaschen.

Hierzu wurden aus HEK-Zellen, die mit dem Konstrukt  $A_{2A}$ -FLN-CFP transient transfiziert und mit FIAsh (250 nM) markiert wurden, Membranfraktionen präpariert und im Fluorometer vermessen. Bei einer Exzitation von 436 nm wurden die Emissionen von CFP (480 nm) und FIAsh (525 nm) vermessen. Die unter diesen Exzitationsbedingungen beobachtete Fluoreszenz von FIAsh beruhte auf einem Energieübergang von CFP auf FIAsh, also FRET, da bei 436 nm das FIAsh kaum direkt angeregt werden kann (nicht gezeigt). Dann wurden BAL bzw. EDT additiv zur Membransuspension in der Küvette zugegeben, wobei nach jeder Zugabe 10 Minuten bis zur Messung gewartet wurde, um so eine Gleichgewichtseinstellung zu gewährleisten. Die Zeit, welche bis zur Gleichgewichtseinstellung nötig ist, wurde durch Versuche optimiert. Für jede Dithiolkonzentration wurde das Verhältnis von

Akzeptorfluoreszenz zu Donorfluoreszenz bestimmt. Dieses Verhältnis vor der Zugabe eines Thiols, also bei maximal gebundenem FIAsh, wurde als 100 % -Wert definiert. Die Zugabe steigender Mengen führte bei beiden Thiolen konzentrationsabhängig zu einer Abnahme des Verhältnisses von Akzeptor- zu Donorfluoreszenz, da FIAsh ausgewaschen wurde und so keine Energie mehr auf dieses übertragen werden konnte (Abb. 26). Die  $IC_{50}$  von BAL (3,4 mM) war um einen Faktor 3 kleiner als die von EDT (1,2 mM), man benötigte also geringere Konzentrationen von BAL im Vergleich zu EDT, um den gleichen Effekt zu erzielen. Deswegen konnte in den folgenden Versuchen zur Affinitätsbestimmung BAL eingesetzt werden.

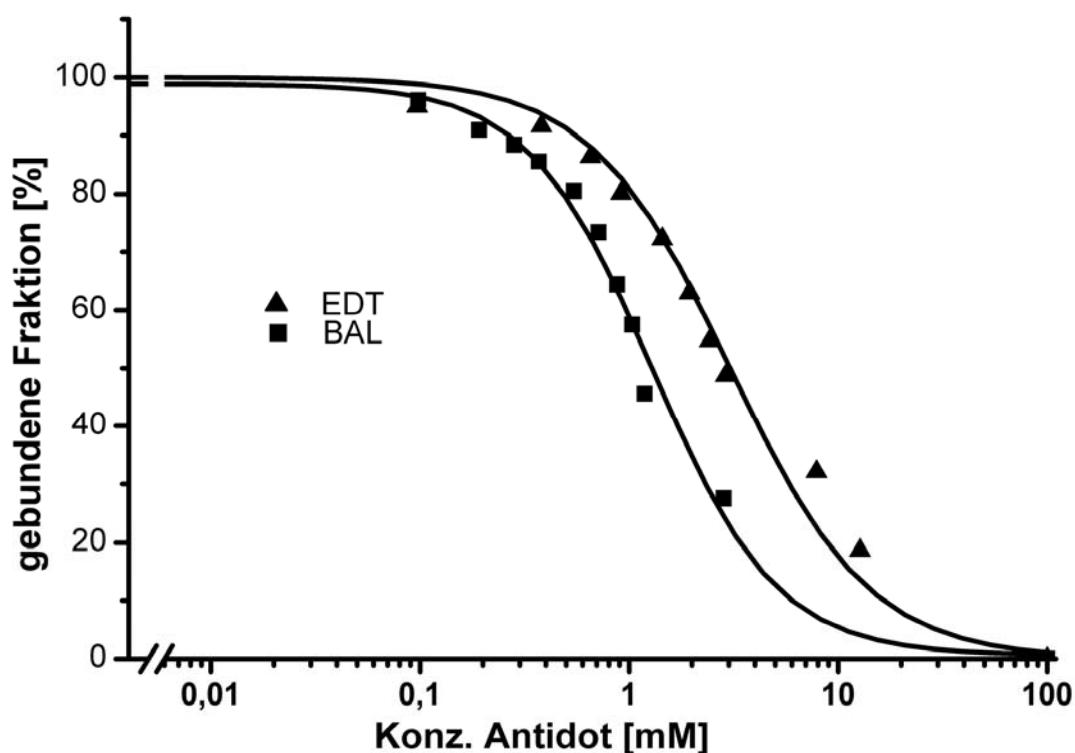


Abb.26 Vermessung der am  $A_{2A}$ -FLN-CFP-Konstrukt FIAsh-markierten HEK293-Membranen im Fluorometer. Gezeigt ist die Kalkulation der maximalen Akzeptorfluoreszenz (FIAsh) im Verhältnis zur maximalen Donorfluoreszenz (CFP). Jeder Punkt stellt ein ratiometrisches Verhältnis nach additiver Zugabe des entsprechenden Dithiols dar.

III.2.1.3 Affinitätsbestimmung von FIAsH und ReAsH an unterschiedlichen Tetracysteinensequenzen

Zunächst wurden HEK-Zellen mit dem  $A_{2A}$ -FI-CFP, der die ursprüngliche CCPGCC-Sequenz sowie ein C-terminales CFP enthielt (Hoffmann 2005), transfiziert und nach 48 h mit FIAsH markiert. Anschließend wurden aus den Zellen Zellmembranen präpariert und diese im Fluorometer vermessen. Als Exzitationswellenlänge wurde das Exzitationsmaximum des Donorfluorophores CFP gewählt (436 nm) und Emissionsspektren von 460 bis 600 nm vermessen (Abb.27). Es traten zwei Emissionsmaxima auf, wobei das Maximum bei 475 nm der CFP-Fluoreszenz entspricht. Das Maximum bei 530 nm entspricht der FIAsH-Fluoreszenz, die bei der gewählten Exzitationswellenlänge durch einen Energietransfer (FRET) vom CFP ausgelöst wurde. Die Zugabe steigender Konzentrationen von BAL (wie schon in Abb.26 beschrieben) führte zu einer Abnahme der Akzeptorfluoreszenz und zu einer Zunahme der Donorfluoreszenz, da FIAsH ausgewaschen wurde und so kein Energietransfer mehr vom CFP auf dieses stattfinden konnte. Die vorher übertragene Energie wird nun als Emissionsenergie des Donors frei. Bei einer Konzentration von ca. 4 mM BAL war FIAsH komplett ausgewaschen, so dass keine FIAsH-Fluoreszenz mehr detektiert werden konnte.

Um nun die relativen Affinitäten von FIAsH und ReAsH zu den verschiedenen Bindesequenzen quantifizieren und vergleichen zu können, wurden in gleicher Weise HEK-Zellen mit den Konstrukten  $A_{2A}$ -FLN-CFP und  $A_{2A}$ -HRW-CFP transfiziert und nach 48 h mit FIAsH markiert. Für ReAsH wurden dementsprechend HEK-Zellen mit den Konstrukten  $A_{2A}$ -FI3-YFP,  $A_{2A}$ -FLN-YFP und  $A_{2A}$ -HRW-YFP transfiziert und nach 48 h mit ReAsH markiert. Wiederum wurden aus den Zellen Zellmembranen präpariert und diese im Fluorometer vermessen. Als Exzitationswellenlänge wurde das Exzitationsmaximum des jeweiligen Donorfluorophores gewählt und Emissionsspektren vermessen. Alle beschriebenen Konstrukte zeigten nach Donoranregung mit der entsprechenden Wellenlänge Fluoreszenz des Akzeptorfluorophors, also FRET (nicht gezeigt). Jedoch war beim FRET-Paar YFP/ReAsH die Fluoreszenzintensität des Akzeptors ReAsH (Emissionsmaximum 608 nm) im Vergleich zu der des Donors YFP (Emissionmaximum 530) sehr gering. Abb.28 (links) zeigt dies beispielhaft am Konstrukt  $A_{2A}$ -FLN-CFP. Aber auch hier führten steigende Konzentrationen von BAL zu einer Abnahme der ReAsH-Fluoreszenz (Akzeptor) und einer Zunahme der YFP-Fluoreszenz (Donor; Abb. 28 rechts).

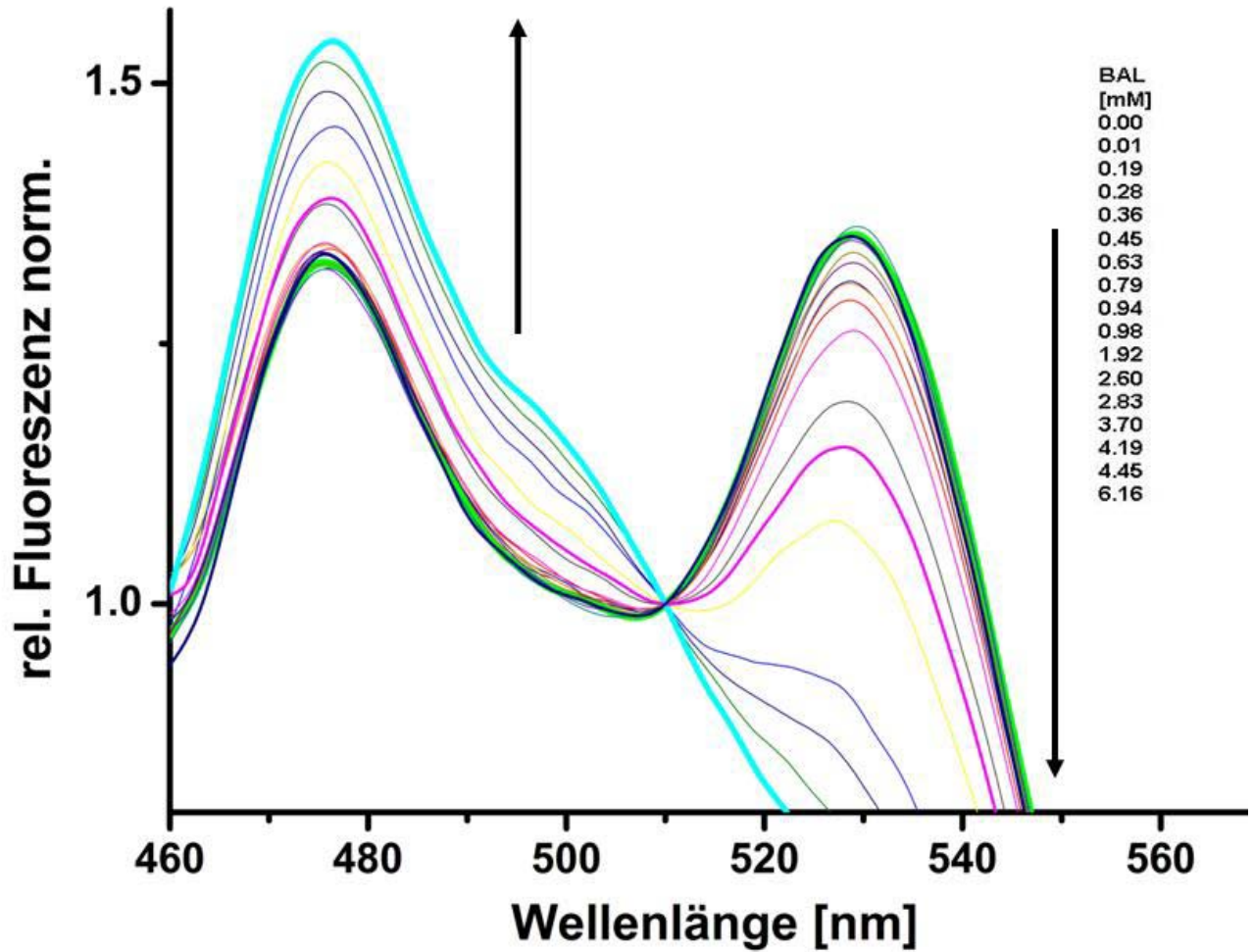


Abb.27: Emissionsspektren des A<sub>2A</sub>-FLN-CFP (460-570 nm). HEK293-Zellen wurden transfiziert, markiert und von diesen Membranen präpariert. Emissionsspektren von 460-570 nm wurden bei einer Exzitation von 436 nm aufgenommen. Der linke Peak zeigt die Emission des Donors CFP, der rechte die Emission des Akzeptors FIAsh. Die Konzentration von BAL wurde zwischen 0 und 6 mM gemessen. Die Kurve wurde bei 510 nm auf 1 normiert, bei dieser Wellenlänge endet der Peak der CFP Emission und der der FIAsh-Emission beginnt. Das Emissionsmaximum von CFP liegt bei 475 nm das von FIAsh bei 525 nm.

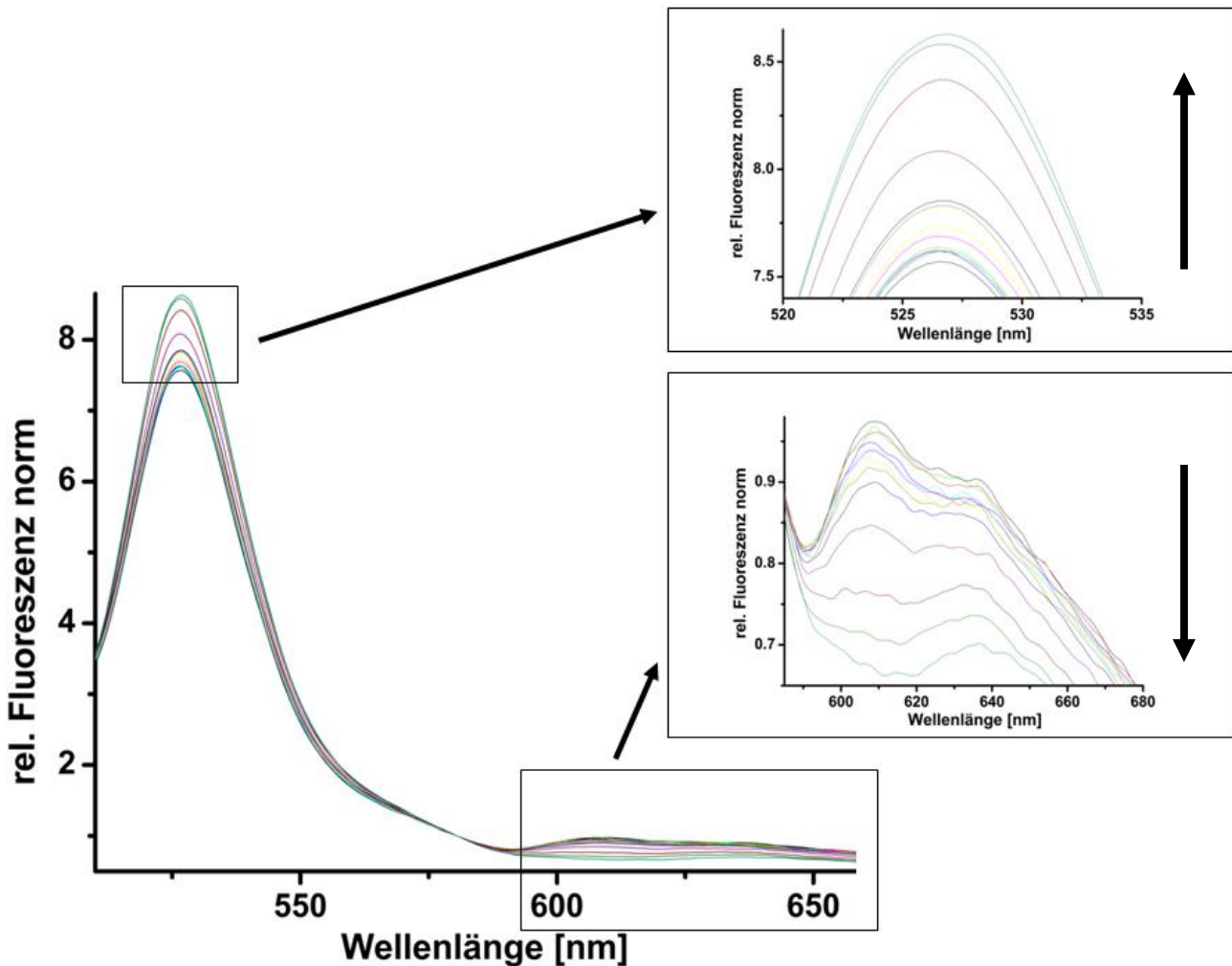


Abb.28: Fluorometrische Emissionsmessung, gemessen von 500-700 nm bei einer Exzitation von 490 nm. Gemessen wurden Membranpräparationen von HEK-Zellen, die mit dem A<sub>2A</sub>-FLN-YFP-Konstrukt transfiziert wurden. Die Zellen wurden vor der Membranpräparation mit ReAsH markiert. Der linke Peak zeigt die YFP-Emission, der rechte Peak die ReAsH-Emission (Ausschnittsvergrößerung ist rechts gezeigt) und damit FRET. Rechts oben ist die Zunahme des YFP verdeutlicht, rechts unten die Abnahme des ReAsH. Jede Kurve wurde 8 Minuten nach BAL-Zugabe gemessen. Die Kurven wurden bei 580 nm auf 1 normiert, bei dieser Wellenlänge endet der Peak der YFP-Emission und der der ReAsH-Emission beginnt. Das Emissionsmaximum des YFP liegt bei 475 nm, das des ReAsH bei 608 nm.

Um nun die relativen Affinitäten der verschiedenen Fluorophore an den unterschiedlichen Bindemotiven zu vergleichen, wurde aus den gemessenen Spektren für jede Dithiolkonzentration wieder das Verhältnis von Akzeptorfluoreszenz zu Donorfluoreszenz bestimmt (vgl. auch Abb.26) und gegen die Dithiolkonzentration aufgetragen, wobei das Verhältnis vor der Zugabe eines Thiols, also bei maximal gebundenem, kleinem Fluorophor, 100 % gesetzt wurde (Abb.26, links). Aus den jeweiligen Kurven konnten so IC<sub>50</sub>-Werte erhalten werden, die die relativen Affinitäten zwischen Bindesequenz und Fluorophor widerspiegeln (Abb.29, rechts).

Es ist erkennbar, dass beide Fluorophore eine deutlich höhere Affinität zur FLNCCPGCCMEP-Sequenz als zur CCPGCC-Sequenz haben. Die Affinitäten unterscheiden sich dabei mindestens um den Faktor 10. Die Affinität der HRWCCPGCCCKTF-Sequenz liegt etwa zwischen den beiden anderen. Vergleicht man die beiden Fluorophore untereinander an jeweils einer der Sequenzen, ist FIAsH in allen Fällen um einen Faktor von 2-3 affiner als ReAsH.

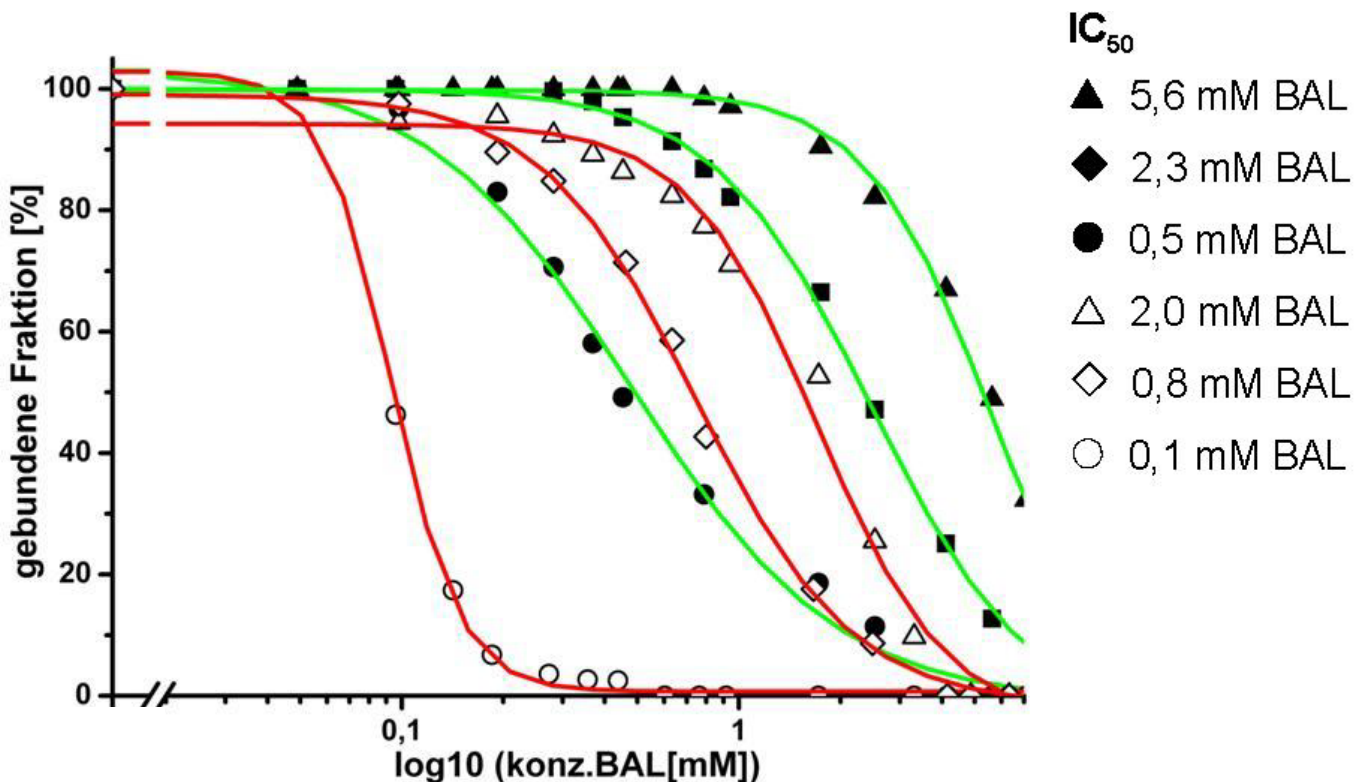
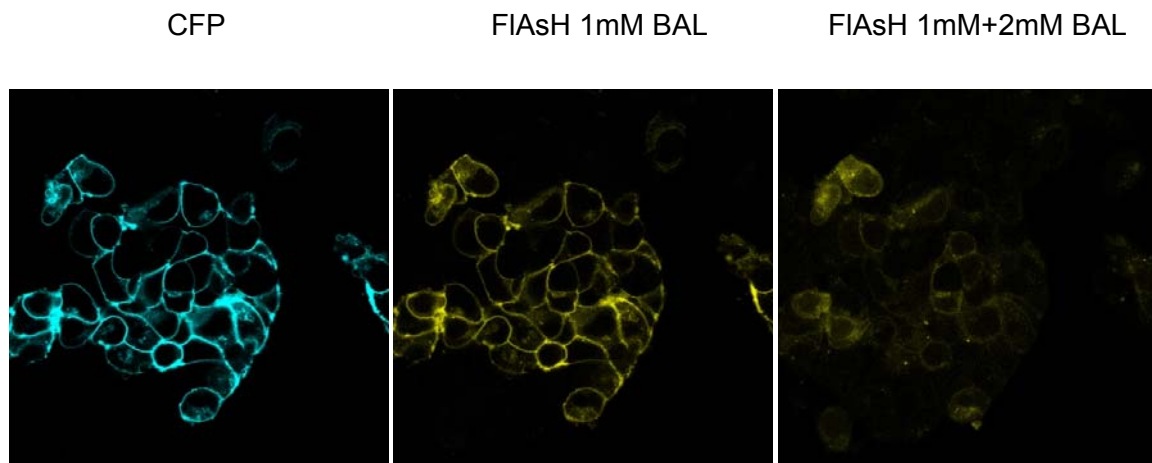


Abb.29: Auswertung der fluorometrischen Emissionsmessungen der HEK293-Zellmembranen, die mit dem A<sub>2A</sub>-FLN-CFP- bzw. A<sub>2A</sub>-FLN-YFP-Konstrukt oder dem A<sub>2A</sub>-HRW-CFP- bzw. A<sub>2A</sub>-HRW-YFP-Konstrukt nach Markierung mit FIAsH (grün und gefüllte Symbole) bzw. ReAsH (rot und ungefüllte Symbole). Die Messungen ohne BAL-Zugabe wurden als 100% gesetzt. Dreiecke zeigen A<sub>2A</sub>-FLN-CFP bzw. das entsprechende A<sub>2A</sub>-FLN-YFP-Konstrukt; die Rauten zeigen A<sub>2A</sub>-HRW-CFP bzw. das korrespondierende A<sub>2A</sub>-HRW-YFP-Konstrukt und die Kreise zeigen das A<sub>2A</sub>-FI3-CFP -Konstrukt bzw. das entsprechende A<sub>2A</sub>-FI3-YFP-Konstrukt. Rechts sind die einzelnen IC<sub>50</sub>-Werte der Konstrukte für die gezeigte Messung mit dem jeweiligen Symbol aufgelistet. Die Abbildung zeigt eine Messung, bei der alle Konstrukte gemeinsam präpariert und anschließend direkt vermessen wurden. Die Messungen wurden zwei Mal wiederholt, wobei die Ergebnisse keine signifikanten Unterschiede ergaben.

In einem Kontrollversuch an lebenden Zellen wurde beispielhaft gezeigt, dass die mit der fluorometrischen Affinitätsbestimmung ermittelten BAL-Konzentrationen tatsächlich die Bindung von FIAsH an die FLNCCPGCCMEP-Bindesequenz in der vorhergesagten Weise beeinflussen. HEK293-Zellen, die stabil mit dem  $\alpha_{2A}$ -I3-C-Konstrukt (siehe III.1.1) transfiziert waren, wurden zunächst mit 250 nM FIAsH markiert. Abb.30 (links) zeigt die Expression des Rezeptors anhand seiner CFP-Fluoreszenz. Ein Waschschrift mit 1 mM BAL, der die Bindung von FIAsH kaum beeinflussen sollte (s. Abb.29), beeinträchtigte die Bindung von FIAsH an das I3-C-Konstrukt nicht (Abb.30 Mitte). Dagegen reduzierte ein Waschschrift mit 3 mM BAL die Bindung von FIAsH deutlich (Abb.30, rechts).



*Abb.30: Sequentielle Aufnahme der FIAsH-Verdrängung durch BAL mit dem Leica SP5 Mikroskop. CFP wurde mit 405 nm angeregt (Emissionsbereich 460-500 nm) und zeigt den membranständigen  $\alpha_{2A}$ -Rezeptor (I3-C-Konstrukt) stabil transfiziert in HEK-Zellen (links). FIAsH wurde mit dem 514 nm Argonlaser (Emissionsbereich 525-560 nm) angeregt und zeigt ebenfalls den membranständigen Rezeptor mit wenig Hintergrundfluoreszenz nach einem Waschschrift mit 1 mM BAL (vgl. II.2.1.3; Mitte). Ein weiterer Waschschrift mit 2 mM BAL für 15 Minuten verdrängt einen signifikanten Anteil an FIAsH aus der Bindung am FLNCCPGCCMEP-Motiv (rechts).*



#### III.2.1.4 Einfluss der Proteinumgebung auf die Affinität der Bindesequenzen

Die Versuche von Martin et al. (2005) haben gezeigt, dass die umliegenden Aminosäuren die Affinitäten der Bindesequenzen zu den kleinen Fluorophoren beeinflussen können. Denkbar ist daher, dass umliegende Aminosäuren im jeweiligen Zielprotein einen Einfluss auf die Stärke der eingegangenen Bindung haben. Aus diesem Grund müssten für jede in ein Protein eingebrachte Tetracysteinsequenz zunächst die Affinitäten zu den Fluorophoren bestimmt werden. Um zu überprüfen, wie groß dieser Einfluss ist, wurden die Affinitäten zwischen FIAsH und der CCPGCC-Sequenz bestimmt, wenn diese an verschiedenen Stellen eines Proteins eingebracht ist.

Dazu wurden sechs Konstrukte eines S1P1-Rezeptors verwendet, welche sich lediglich in der Positionierung der CCPGCC Sequenz in der dritten intrazellulären Schleife unterscheiden (zur Verfügung gestellt von Astrid Alewijnse, Amsterdam). Diese Konstrukte sind mit einem C-terminal angebrachten CFP versehen. Die Konstrukte wurden in HEK-Zellen exprimiert und mit FIAsH markiert. Damit war auch hier eine Bestimmung der relativen Affinitäten durch den Verlust der Energieübertragung von Donor auf den Akzeptor möglich, wie in Kapitel III.2.1.3 beschrieben.

Abb.31 zeigt, dass die Kurven, die die konzentrationsabhängige Auswaschung von FIAsH durch BAL zeigen, für die verschiedenen Konstrukte leicht variieren, jedoch wurden nur geringe Unterschiede in der Affinität der Konstrukte festgestellt. Die  $IC_{50}$ -Werte variierten nicht mehr als um einen Faktor 2 und die Unterschiede waren nicht signifikant. So konnte – zumindest in diesem Modellprotein – kein massiver Einfluss der unmittelbaren Proteinumgebung auf die Bindungsaffinitäten festgestellt werden.

A)

	IC <sub>50</sub> [BAL]
◆ LVRTRSRR <u>CCPGCC</u> LTFRKNISKASRSSENVALLKT	0,35mM
▼ LVRTRSRLTFR <u>CCPGCC</u> KNISKASRSSENVALLKT	0,7mM
▶ LVRTRSRLTFRKN <u>CCPGCC</u> ISKASRSSENVALLKT	0,65mM
■ LVRTRSRLTFRKNIS <u>CCPGCC</u> KASRSSENVALLKT	0,50mM
● LVRTRSRLTFRKNISKA <u>CCPGCC</u> SRSENVALLKT	0,60mM
★ LVRTRSRLTFRKNISKASR <u>CCPGCC</u> SENVALLKT	0,55 mM

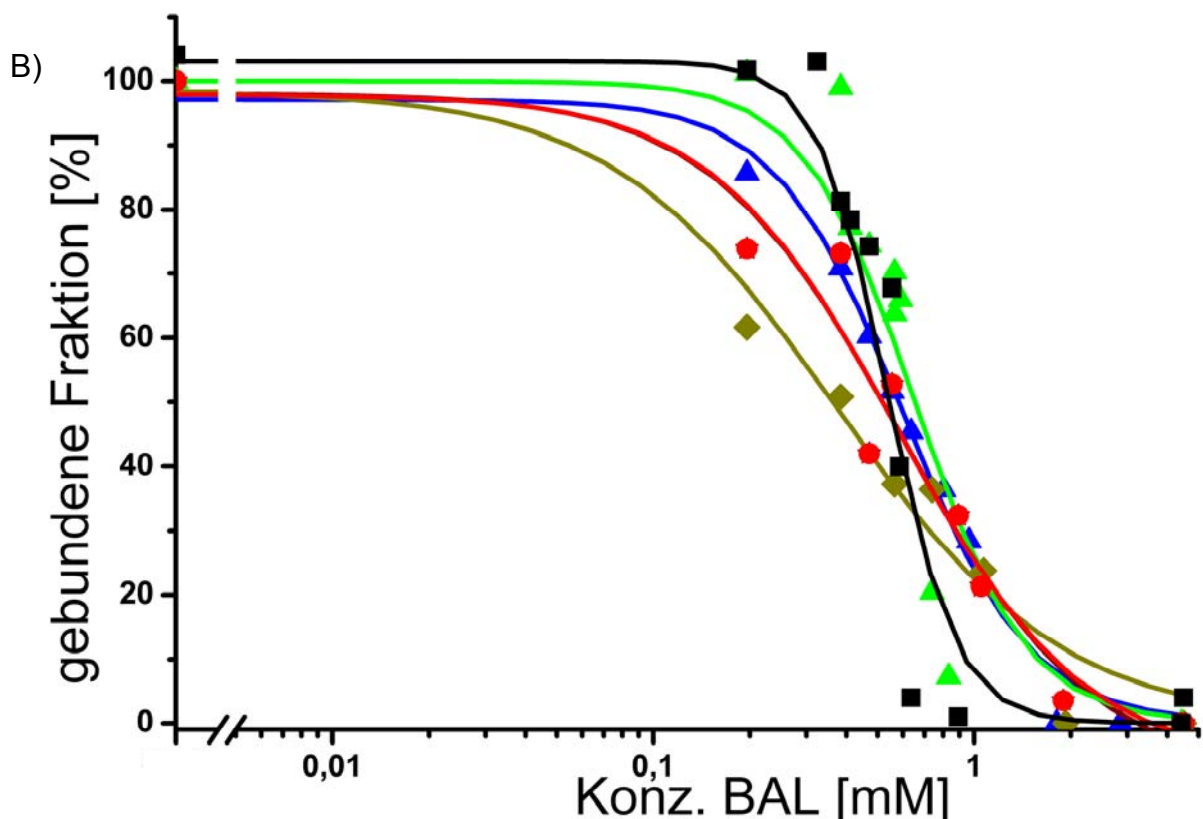


Abb.31:

A) Rezeptorsequenzen mit der entsprechend inserierten CCPGCC-Sequenz. Das Bindemotiv ist hervorgehoben. Für jedes Konstrukt ist der IC<sub>50</sub>-Wert für die Verdrängung von FIAsh durch BAL [mM] angegeben, der sich aus der unten gezeigten Grafik (B) ergibt.

B) Affinitätsbestimmungen für FIAsh durch Verdrängung mit BAL. Dargestellt ist die ratiometrische Berechnung der Akzeptorfluoreszenz (FIAsh) im Emissionsmaximum (525 nm) dividiert durch die Donorfluoreszenz (CFP) im Emissionsmaximum (480 nm). Der 100 %-Wert stellt die gebundene Fraktion ohne BAL-Zugabe dar. Es liegen keine signifikanten Affinitätsunterschiede für die IC<sub>50</sub>-Werte vor ( $p < 0,05$ ).

## III.2.2 Selektive und duale Markierung mit FIAsh und ReAsH

### III.2.2.1 Theorie des Markierungsprotokolls

Im vorherigen Abschnitt wurden die Affinitätsunterschiede der einzelnen Tetracysteinbindemotive zu FIAsh und ReAsH untersucht. Im nächsten Schritt sollten diese Ergebnisse zur selektiven Markierung von verschiedenen Proteinen innerhalb einer Zelle genutzt werden.

Das Ziel war es, zwei verschiedene Proteine an definierten Positionen mit FIAsh und ReAsH innerhalb einer Zelle zu markieren. Dazu wählten wir das Tetracysteinmotiv mit der höchsten und das mit der niedrigsten Affinität zu FIAsh und ReAsH, also FLNCCPGCCMEP und CCPGCC (vgl. III.2.1.3). Da aus der Charakterisierung hervorging, dass FLNCCPGCCMEP eine höhere Affinität als HRWCCPGCCKTF besitzt, wurde dieses HRWCCPGCCKTF-Motiv nicht weiter berücksichtigt. Es sollte eine sequenzielle Markierung erreicht werden. Zunächst sollten Zellen mit ReAsH inkubiert werden. Mit Hilfe einer genau gewählten Konzentration von BAL sollte ReAsH anschließend von der niederaffineren Sequenz, dem CCPGCC-Motiv, entfernt werden, wobei es an FLNCCPGCCMEP gebunden bleibt. Die nun freie, niederaffine CCPGCC-Sequenz sollte dann mit FIAsh markiert werden.

Es wurde daher folgende Markierungsstrategie entworfen: Die Zellen, die sowohl CCPGCC als auch FLNCCPGCCMEP enthalten, werden zuerst mit ReAsH inkubiert, das zunächst an beide Tetracysteinmotive bindet. Aus den in III.2.1.3 durchgeführten Affinitätsbestimmungen ist ersichtlich, dass ReAsH durch Gegenwart von 250  $\mu\text{M}$  BAL praktisch vollständig von CCPGCC verdrängt wird. Unter den gleichen Bedingungen wird jedoch die Bindung von ReAsH an FLNCCPGCCMEP nicht reduziert. Daher kann ReAsH mit 250  $\mu\text{M}$  BAL effektiv aus der Bindung an die CCPGCC-Sequenz ausgewaschen werden, allerdings kaum aus der FLNCCPGCCMEP-Sequenz. Anschließend sollen die wieder frei gewordenen CCPGCC-Bindesequenzen mit FIAsh markiert werden. Unspezifisch gebundenes FIAsh kann dann anschließend mit 100  $\mu\text{M}$  BAL ausgewaschen werden, da BAL in dieser Konzentration weder ReAsH von FLNCCPGCCMEP, noch FIAsh von CCPGCC entfernen kann (vgl. III.2.1.3). In diesem Schritt könnte alternativ mit 250  $\mu\text{M}$  EDT gewaschen werden, da diese Konzentration ähnlich effizient ist, wie 100  $\mu\text{M}$  BAL (vgl. III.2.1.2). EDT wurde bisher als Standard für den Waschschrift bei FIAsh-Markierungen verwendet (Hoffmann et al., 2005).

### III.2.2.2 Markierungsprotokoll

Für die sequenzielle Markierung wurden folgende Bedingungen gewählt:

Die mit den entsprechenden Konstrukten transfizierten HEK-Zellen wurden mit 5  $\mu\text{M}$  ReAsH in Anwesenheit von 12,5  $\mu\text{M}$  EDT (zur Minimierung der unspezifischen Bindung) für 40 Minuten markiert. Danach wurde ReAsH mit 250  $\mu\text{M}$  BAL von der CCPGCC-Sequenz ausgewaschen. Anschließend wurden die Zellen mit 250 nM FIAsH für 40 Minuten markiert, wiederum in Anwesenheit von 12,5 $\mu\text{M}$  EDT. Eine 40-minütige Inkubation mit den jeweiligen Fluorophoren, ergab die besten Ergebnisse; längere Inkubationen führten zu keiner Verbesserung der Markierung der Zellen, während viel kürzere ein Defizit in der Markierungseffektivität zeigten (nicht gezeigt).

III.2.2.3 Selektive und duale Markierung von zwei Proteinen in lebenden Zellen:

$\beta$ -Arrestin2 und PTHR

Es wurden zunächst zwei Proteine gewählt, die in zwei verschiedenen Kompartimenten innerhalb einer Zelle lokalisiert sind (Lohse et al., 1990). So sollte sich zeigen lassen, dass die Markierung mit FIAsh bzw. ReAsH spezifisch am jeweiligen Zielprotein stattfindet. Dazu wurde das unter basalen Bedingungen zytosolisch lokalisierte  $\beta$ -Arrestin2 und der membranständige PTHR gewählt. Ein weiterer Vorteil dieser beiden Proteine ist, dass  $\beta$ -Arrestin2 nach Aktivierung des PTHR an die Membran transloziert und den Rezeptor bindet, und der Rezeptor daraufhin internalisiert (Lohse et al., 1990; Vilardaga et al., 2001). Diese Proteinbewegungen sollten durch spezifische Markierung mit FIAsh und ReAsH visualisiert werden können. Der PTH-Rezeptor wurde dazu im C-Terminus mit der FLNCCPGCCMEP-Sequenz zum Markieren mit ReAsH versehen und  $\beta$ -Arrestin2 mit einer CCPGCC-Sequenz ebenfalls im C-Terminus zum Markieren mit FIAsh kloniert. Abb. 32 zeigt schematisch den Ablauf der sequenziellen Markierung von PTHR und  $\beta$ -Arrestin2.

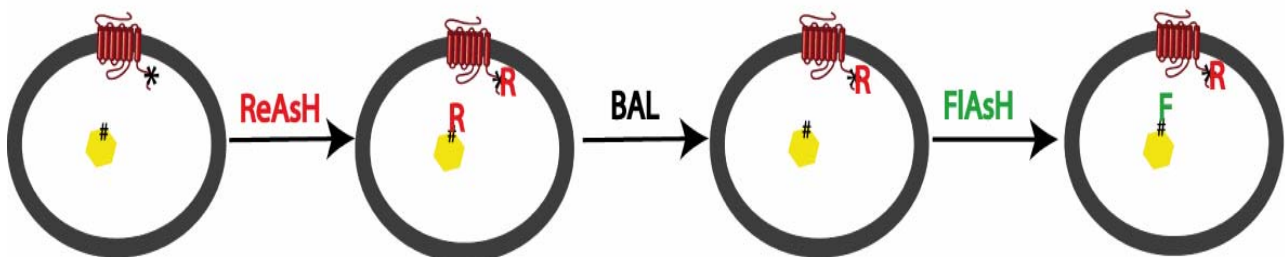


Abb.32: Schematische Darstellung der Markierung von PTHR und  $\beta$ -Arrestin2 mit ReAsH und FIAsh. PTHR (rot) mit C-terminaler FLNCCPGCCMEP-Sequenz (Stern),  $\beta$ -Arrestin2 (gelb) mit C-terminaler CCPGCC-Sequenz (Kreuz). Rotes R: ReAsH, grünes F: FIAsh.

III.2.2.3.1 Vorversuche für das duale Markieren von  $\beta$ -Arrestin2 und PTH-Rezeptor

Um zu überprüfen, ob sich die gewählten Konstrukte grundsätzlich mit den kleinen Fluorophoren markieren lassen und ihre Funktionalität beibehalten, wurde  $\beta$ -Arrestin2-CCPGCC zunächst mit einem PTH-Rezeptor, der C-terminal mit CFP markiert war, in HEK-Zellen co-transfiziert und mit FIAsh markiert. Beide Proteine zeigten die typische subzelluläre Lokalisation. Abb.33 zeigt die Membranlokalisierung des CFP-markierten PTHR sowie die zytosolische Lokalisation des FIAsh-markierten  $\beta$ -Arrestin2. Die Aktivierung des PTH-Rezeptors mit humanem PTH1-34 (1  $\mu$ M, 10 min) führte zu einer Translokation des FIAsh-markierten  $\beta$ -Arrestin2 vom Zytosol an die Zellmembran, wie es auch für Wildtyp- $\beta$ -Arrestin2 beschrieben ist (Vilardaga et al., 2001).

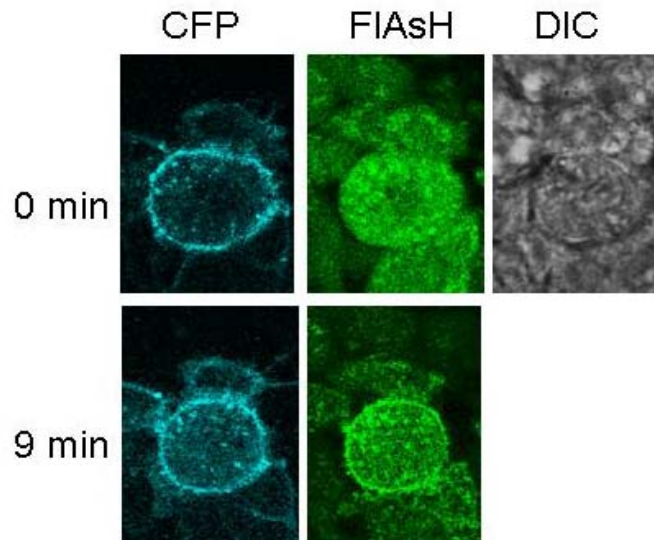
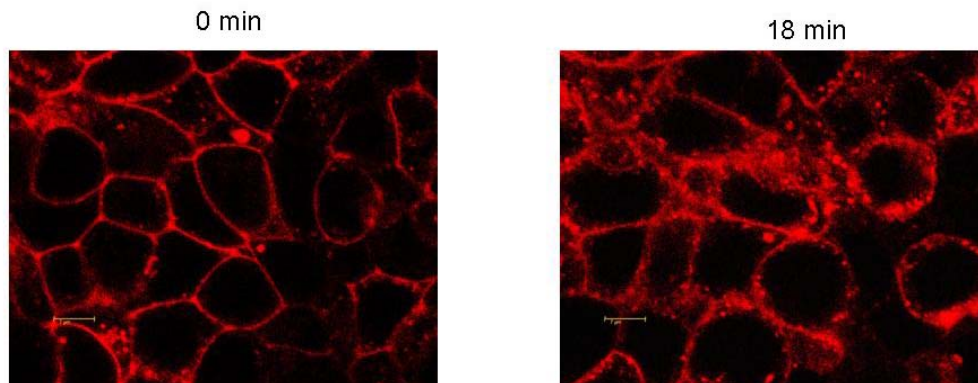


Abb.33: Sequentielle Aufnahme der  $\beta$ -Arrestin2-Translokation nach PTH-Stimulation mit dem Leica SP5 Mikroskop. HEK-Zellen, transfiziert mit PTH-CFP und  $\beta$ -Arrestin2 markiert mit FIAsh (Markierung nach Standardprotokoll mit 250 nM FIAsh und gewaschen mit 250  $\mu$ M EDT). PTHR-CFP wurde mit 405 nm angeregt (Emissionsbereich 460-500 nm; links) und  $\beta$ -Arrestin2-FIAsh mit dem 514 nm Argonlaser (Emissionsbereich 525-560 nm, links), rechts ist das entsprechende Durchlichtbild (Differential Interferenz Kontrast, DIC) gezeigt; obere Reihe vor Zugabe von PTH1-34, untere Reihe zeigt die Zellen nach Stimulation mit PTH1-34 (1 $\mu$ M, 9 min).

Im nächsten Schritt wurde der PTHR-FLN mit  $\beta$ -Arrestin2-CCPGCC in HEK-Zellen co-transfiziert und nur mit ReAsH markiert. Entsprechend den optimierten Bedingungen wurde mit 5  $\mu$ M ReAsH inkubiert und anschließend mit 250  $\mu$ M BAL gewaschen, so dass das an die CCPGCC-Sequenz gebundene ReAsH abgewaschen werden sollte. Abb.34 zeigt, dass der membranständige PTHR-FLN

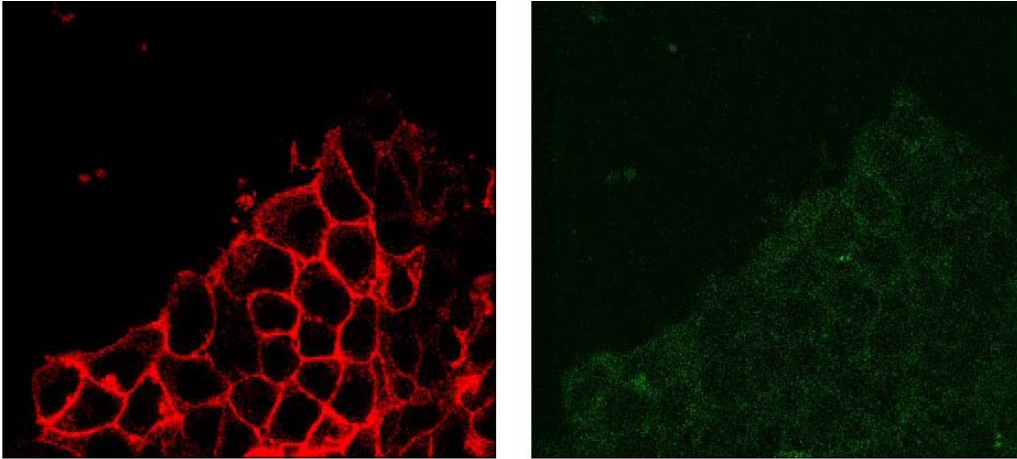
effizient mit ReAsH markiert wurde, während im Zytosol kaum eine gleichmäßige Fluoreszenz, welche als spezifische Markierung des  $\beta$ -Arrestin2-CCPGCC zu deuten gewesen wäre, sichtbar war. Lediglich einige unspezifisch markierte Punkte sowie der Golgi-Apparat der Zelle, in der der PTHR gebildet wird, sind sichtbar. Stimulation des PTH-Rezeptors mit humanem PTH1-34 (1  $\mu$ M) führte zur Internalisierung des Rezeptors, was darauf hindeutet, dass der ReAsH-markierte Rezeptor funktional ist.



*Abb.34 zeigt die Internalisierung des ReAsH-markierten PTH-Rezeptors. HEK-Zellen wurden transient transfiziert mit PTHR-FLN und  $\beta$ -Arrestin2-CCPGCC. Aufnahme des ReAsH-markierten PTHR-FLN mit einem 594 nm Laser am Leica SP5 Konfokalmikroskop (Emissionsbereich 600-700 nm) vor der Zugabe von PTH 1-34 (links) und nach 18-minütiger Stimulation von PTH 1-34 (1  $\mu$ M; rechts).*

Um zu zeigen, dass das duale Markierungsprotokoll auch dann zu einer spezifischen Markierung des PTHR-FLN mit ReAsH führt, wenn auch der Markierungsschritt mit FIAsH durchgeführt wird, wurde PTHR-FLN in HEK-Zellen transfiziert und das duale Markierungsprotokoll mit FIAsH und ReAsH wie beschrieben durchgeführt. Abb.35 zeigt, dass der PTHR mit ReAsH markiert war, aber eine Anregung von FIAsH kein spezifisches Signal an der Zellmembran und lediglich wenig unspezifische Bindung der Zellen zeigte. Somit war der PTHR-FLN unter diesen Bedingungen ausschließlich mit ReAsH markiert. Damit konnten wir zeigen, dass FIAsH nicht in der Lage ist, das im ersten Schritt des dualen Markierungsprotokolls an den PTHR gebundene ReAsH zu verdrängen. Die Inkubation des ReAsH-markierten Proteins mit FIAsH beeinflusst die Markierung mit ReAsH nicht. Weiterhin zeigte dieser Versuch, dass der Waschschrift mit 250  $\mu$ M BAL ReAsH auch nicht in geringem Maße aus der Bindung zum FLNCCPGCCMEP-Motiv verdrängen konnte, was zur

Folge gehabt hätte, dass FIAsH anschließend an dieses in einem solchen Ausmaß hätte binden können, dass es zu einem spezifischen membranständigen FIAsH-Signal gekommen wäre.



*Abb.35: Selektive ReAsH-Markierung des PTHR-FLN nach Durchführung des dualen Markierungsprotokolls mit FIAsH und ReAsH. HEK-Zellen wurden mit dem PTHR-FLN-Konstrukt transfiziert und das duale Markierungsprotokoll mit ReAsH und FIAsH durchgeführt. Die Aufnahme des ReAsH erfolgte mit einem 594 nm Laser am Leica SP5 Konfokalmikroskop (Emissionsbereich 600-700 nm; links, rot). Parallel, sequentiell aufgenommene Bilder mit dem 514 nm Laser (rechts, grün) zeigen nur unspezifische FIAsH-Hintergrundsignale in den Zellen (Emissionsbereich 525-560 nm).*

### III.2.2.3.2 Duale und spezifische Markierung des $\beta$ -Arrestin2 mit FIAsH und des PTH-Rezeptors mit ReAsH

Im vorherigen Kapitel konnte gezeigt werden, dass sich zum Einen sowohl  $\beta$ -Arrestin2 als auch der PTHR entsprechend dem dualen Markierungsprotokoll spezifisch und effizient markieren lassen. Zum Anderen zeigen die Versuche, dass die subzelluläre Lokalisation und Bewegung der markierten Proteine der der entsprechenden Wildtyp-Proteine entsprachen. Die beschriebenen Konstrukte sollten nun co-exprimiert und mit ReAsH und FIAsH erstmals dual markiert werden.

Um die Fluoreszenzen von FIAsH und ReAsH in einem solchen Experiment am Konfokalmikroskop simultan verfolgen zu können, musste darauf geachtet werden, dass nur das gewünschte Fluorophor spezifisch angeregt wurde. Gäbe es eine Falschanregung des anderen Fluorophors, würde dessen Fluoreszenz das Ergebnis verfälschen. Außerdem muss ausgeschlossen werden, dass die Emission des einen



Fluorophors in den betrachteten Emissionsbereich des anderen fällt. Daher wurde für diese Aufnahmen am Leica SP5 Konfokalmikroskop der Modus für sequentielle Aufnahmen gewählt, bei dem zwischen den beiden Lasern (514 nm für FIAsh- und 594 nm für ReAsH-Anregung) dauernd umgeschaltet wird. Somit ist eine Falschanregung der Fluorophore ausgeschlossen. Eine weitere Voraussetzung ist auch, dass ReAsH bei 514 nm nur sehr schwach angeregt wird und unter 560 nm kaum emittiert. Die gemessenen Emissionsbereiche wurden deshalb mit 525-560 nm für FIAsh und 600-700 nm für ReAsH so gewählt, dass kein Durchbluten auftritt (vgl. Spektren Abb. 25).

Bereits aus den Versuchen zur Affinitätsbestimmung der Fluorophore war zu vermuten, dass die Intensität von ReAsH im Vergleich zu FIAsh wesentlich geringer ist. Zudem ist der 514 nm Laser mit 3,2 mW Leistung deutlich stärker als der 594 nm Laser (0,5 mW). Um dies auszugleichen, wurden für die Anregung von FIAsh nur 8 % der Leistung des 514 nm Lasers genutzt, während das ReAsH bei voller Leistung des 594 nm Lasers visualisiert wurde.

HEK-Zellen wurden mit PTHR-FLN und  $\beta$ -Arrestin2-CCPGCC co-transfiziert, entsprechend dem dualen Markierungsprotokoll (III.2.2.2) markiert und am Leica SP5 Konfokalmikroskop betrachtet. Die markierten Zellen zeigten eine ReAsH-Färbung (rot) der Membran, was auf eine spezifische ReAsH-Bindung an der hochaffinen FLNCCPGCCMEP-Sequenz im PTHR schließen lässt. Diese Verteilung der Fluoreszenz wurde auch mit einer quantitativen Fluoreszenzmessung bestätigt (Abb. 37). Das Zytosol zeigte dagegen eine FIAsh-Färbung (grün), entsprechend einer spezifischen FIAsh-Markierung an der CCPGCC-Sequenz des  $\beta$ -Arrestin2 (Abb.36). Auch die intrazellulären Bewegungen beider Proteine nach Stimulation des Rezeptors ließen sich mit den beiden Fluorophoren individuell verfolgen. Stimulation der Zellen mit humanem PTH 1-34 (1  $\mu$ M) führte zunächst zu einer Translokation des  $\beta$ -Arrestin2 (grün) an die Zellmembran, wobei die Fluoreszenz im Zytosol abnahm (Abb.36, 9 min). Diese Umverteilung der Fluoreszenz zeigte sich ebenfalls bei der quantitativen Fluoreszenzmessung (Abb.37). Auch auf Überlagerungsbildern, bei denen Bereiche von co-Lokalisation der FIAsh- (grün) bzw. ReAsH-Fluoreszenzen (rot) in gelb dargestellt wurden (Abb.36) zeigte sich, dass PTHR und  $\beta$ -Arrestin2 vor Stimulation der Zellen nicht co-lokalisiert waren. 9 Minuten nach der Stimulation mit PTH 1-34 co-lokalisierten beide Proteine an der Zellmembran (starke Gelbfärbung der Membran). Zu diesem Zeitpunkt war der PTHR noch vollständig an der

Zellmembran lokalisiert (Abb.36, 9 min, durchgehende FIAsh-Färbung (rot) der Membran). Nach 15 Minuten ist eine beginnende Internalisierung des Rezeptors zu erkennen, welche aber in diesem Experiment nicht weiter durch längere Inkubation verfolgt wurde.

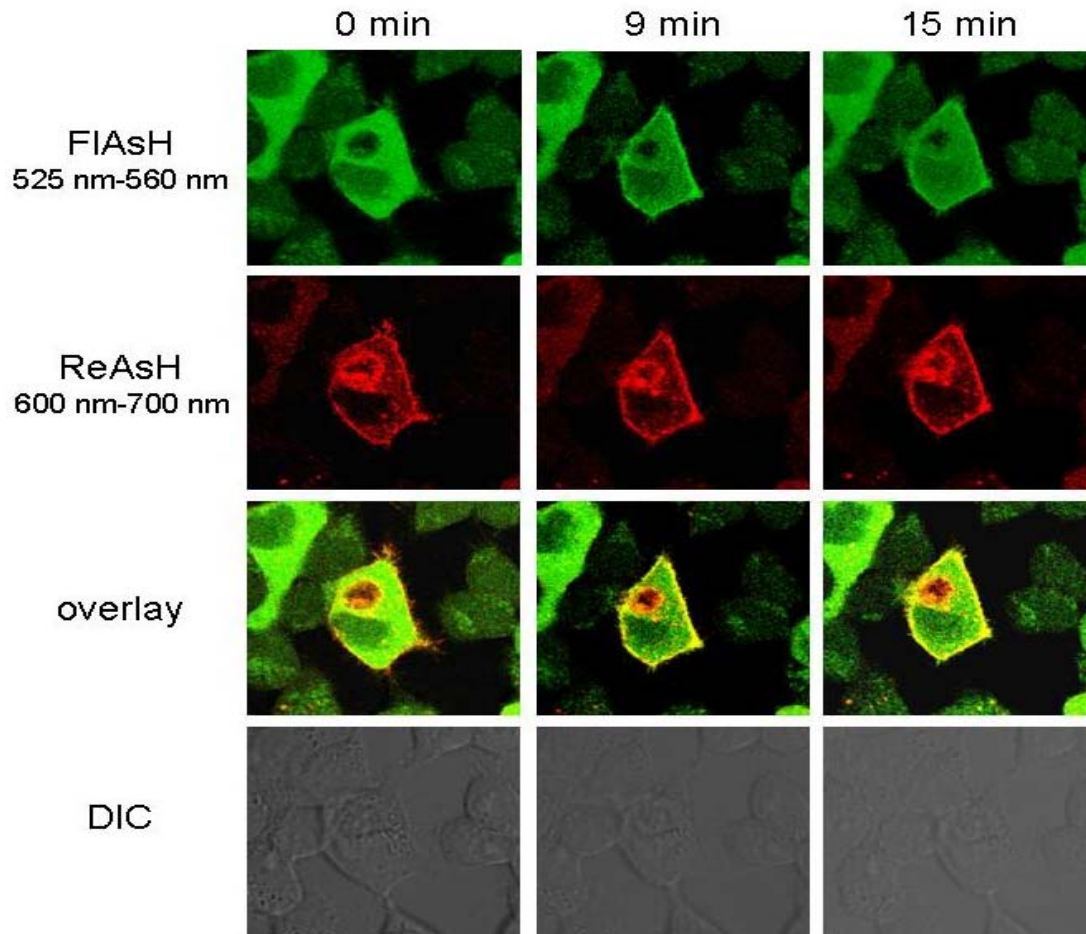


Abb.36: Darstellung der PTHR-vermittelten  $\beta$ -Arrestin2-Rekrutierung mittels dualer Markierung mit den kleinen Fluorophoren, FIAsh und ReAsH. HEK-Zellen transfiziert mit PTHR-FLN und  $\beta$ -Arrestin2-CCPGCC sowie GRK2. Es sind sequentielle Aufnahmen am Leica SP5 Mikroskop gezeigt, bei denen FIAsh, angeregt mit dem 514 nm Argonlaser (Emissionsbereich 525-560 nm) grün (obere Reihe) und ReAsH, angeregt mit 594 nm (Emissionsbereich 600-700 nm), rot dargestellt ist (mittlere Reihe). Die Reihe darunter zeigt die übereinandergelegten Aufnahmen des FIAsh und ReAsH-Kanals, Gelbfärbung zeigt eine Überlagerung von Rot- und Grünfärbung. Die übereinander gelegten Aufnahmen wurden mit dem Programm LASAF erstellt.

In der linken Spalte sind die Zellen vor der Zugabe von PTH 1-34 gezeigt: Membranlokalisierung von PTHR (rot) und Zytosollokalisierung von  $\beta$ -Arrestin2 (grün). Die mittlere und rechte Spalte zeigen die beiden Proteine nach 9 bzw. 15-minütiger Stimulation mit PTH 1-34 [1  $\mu$ M]. Nach 9-minütiger Stimulation ist eine deutliche Translokation von  $\beta$ -Arrestin2 an die Zellmembran und co-Lokalisierung zu sehen, nach 15-minütiger schwach beginnende gemeinsame Internalisierung. Dieses Ergebnis wurde in drei unabhängigen Versuchen an anderen Zellen wiederholt.

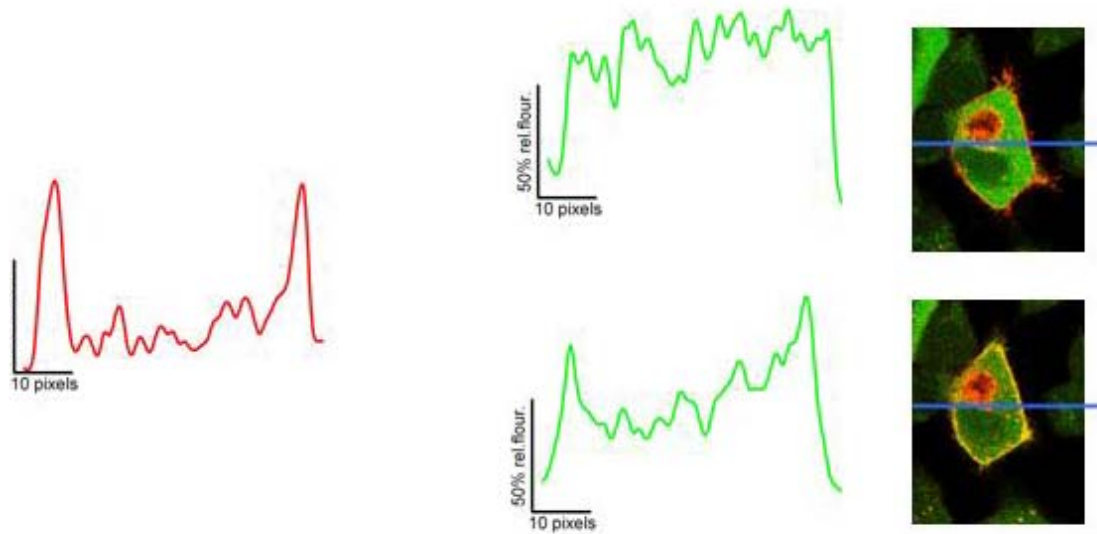


Abb.37: Quantitative Fluoreszenzverteilung von FIAsh und ReAsH. Die grüne Kurve zeigt die Fluoreszenzverteilung von FIAsh (grün) gebunden an  $\beta$ -Arrestin2, vor (oben) und nach Zugabe (unten) von PTH 1-34 (1  $\mu$ M, 9 min). Die rote Kurve zeigt ReAsH (rot) gebunden an den PTHR vor der Zugabe von PTH. Die Berechnung der Fluoreszenz erfolgte mit dem Programm Image J über die Bestimmung der Pixelverteilung an den in Abb.36 gezeigten Zellen. Die blaue Linie stellt die Schnittebene für diese Fluoreszenzanalyse dar. Der maximale Wert der absoluten Fluoreszenz wurde als 100% definiert. Die Abbildung zeigt das Ergebnis einer repräsentativen Messung aus drei unabhängigen Versuchen.

### III.2.3 Intramolekulare, duale Markierung am $A_{2A}$ -Adenosin-Rezeptor

Im vorangegangenen Kapitel konnte anhand der dualen Markierung von zwei verschiedenen Proteinen mit unterschiedlicher subzellulärer Lokalisation demonstriert werden, dass das unter III.2.2.2 beschriebenen Protokoll geeignet ist, die jeweiligen Fluorophore spezifisch an das eine oder andere Motiv zu binden. Es ist also möglich, innerhalb eines Systems, hier einer Zelle, zwei verschiedene Tetracysteinmotive selektiv mit FIAsh und ReAsH zu markieren und zu visualisieren. Diese Strategie sollte nun dazu genutzt werden, variabelere FRET-Messungen zur Visualisierung von Proteinen zu ermöglichen. So könnten zum Einen die Donor- und Akzeptorfluorophore an Stellen positioniert werden, an denen es bisher mit den hochmolekularen GFP-Varianten nicht möglich war (z.B. innerhalb verschiedener Positionen einer intrazellulären Schleife eines GPCRs), zum Anderen könnten durch die kleineren Fluorophore die Distanzänderungen der Bewegungen genauer analysiert werden.

Hierzu wurde der bereits von Hoffmann et al. (2005) beschriebene und charakterisierte  $A_{2A}$ -Adenosin-Rezeptor mit der CCPGCC-Sequenz in der dritten intrazellulären Schleife und CFP im C-Terminus als Ausgangskonstrukt verwendet. Das CFP im C-Terminus des Rezeptors wurde nun jedoch durch eine FLNCCPGCCMEP-Sequenz ersetzt und der Rest des nativen C-Terminus des Rezeptors wiederhergestellt. Es wurden zwei Rezeptorsensoren mit leicht variierenden Positionen des FLNCCPGCCMEP konstruiert, 11 (FLN11) bzw. 33 Aminosäuren (FLN33) hinter TM VII.

Beide Konstrukte wurden in HEK-Zellen transient exprimiert und nach dem dualen Markierungsprotokoll mit FIAsH und ReAsH markiert. Zunächst wurde die Markierung am Leica SP5 Konfokalmikroskop durch sequentielle Aufnahmen überprüft (Abb.38).

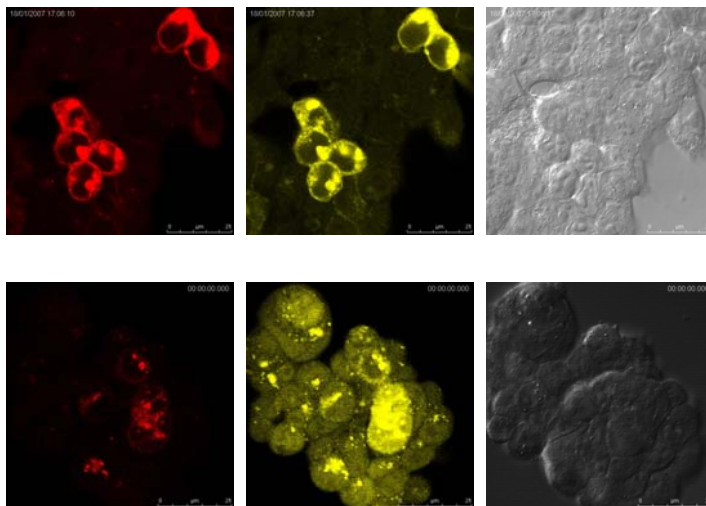


Abb.38: Konfokalmikroskopische Aufnahmen am Leica SP5 von HEK-Zellen transfiziert mit FLN33 (oben) und FLN11 (unten). Gezeigt sind Bilder der Zellen nach Exzitation von ReAsH mit 594 nm (Emissionsbereich 600-700 nm; links, nach Anregung von FIAsH mit 514 nm (Emissionsbereich 525-560 nm; Mitte) und Durchlichtbilder im DIC-Modus (rechts). Die spezifische Lokalisation von FIAsH und ReAsH innerhalb der Zelle ist identisch.

Für das Rezeptorkonstrukt FLN33 zeigten die Zellen eine deutliche membranständige Markierung sowohl mit FIAsH als auch mit ReAsH. Allerdings war auch eine Färbung innerhalb der Zellen, die möglicherweise auf Rezeptoren beruht, die noch nicht an die Zellmembran transportiert wurden, erkennbar. Für das Konstrukt FLN11 konnte dagegen keine Membranlokalisation festgestellt werden. Dass die Membranlokalisation des  $A_{2A}$ -Rezeptors durch Mutationen in direkter Nähe zur TM VII negativ beeinflusst werden kann, wurde bereits beschrieben (Burgueno et al., 2003), jedoch wurde das für das FLNCCPGCCMEP-Motiv noch nicht beschrieben und sollte nun überprüft werden.

Nachdem gezeigt wurde, dass das A<sub>2A</sub>-Konstrukt mit den kleinen Fluorophoren, FIAsH und ReAsH, doppelt markiert werden konnte und korrekt lokalisiert war, wollten wir nun dynamisches FRET zwischen FIAsH als Donor und ReAsH als Akzeptor messen. Für die Messungen sind folgende Filter bzw. Messvorrichtungen von uns ausgewählt worden: Für die direkte Anregung von ReAsH wird eine Anregung von 550 nm eingesetzt, wofür ein Strahlenteiler mit 560 nm verwendet wurde und ein Emissionsfilter mit 605/70 nm. Es musste weiterhin darauf geachtet werden, für die Messungen des "roten" ReAsH, den Rot-Filter nach dem Shutterystem des Mikroskops zu entfernen, der für die Standardmessungen mit CFP/YFP verbaut ist.

Um zu überprüfen, ob ein Energieübergang zwischen FIAsH und ReAsH in diesem Modell prinzipiell möglich ist, wurde zunächst ein Akzeptorbleichen durchgeführt. Hierzu wurden Zellen gewählt, die sowohl eine deutliche FIAsH-Markierung als auch eine ReAsH-Markierung aufwiesen. Bei einer Anregung von 490 nm wurde der Donor FIAsH angeregt und zeigte eine Emission im 525 nm Kanal. Unter diesen Bedingungen zeigte ReAsH eine Fluoreszenz im 605 nm Kanal (Abb.39). Die Zellen wurden dann mit 550 nm belichtet, wodurch der FRET-Akzeptor ReAsH gebleicht wurde, d.h. das Fluorophor des ReAsH wurde zerstört. Bei einer erneuten Exzitation bei 490 nm führte dies zu einer durch das Bleichen verursachten Abnahme der ReAsH-Emission, aber gleichzeitig zu einer Zunahme der FIAsH-Emission. Dies bedeutet, dass die vorher auf den Akzeptor übertragende Energie nun als Donor-Emission frei wird. Das heißt, dass ein Energieübergang, also FRET, zwischen den beiden Fluorophoren stattfindet. Würde man davon ausgehen, dass der Förster-Radius zwischen den beiden Fluorophoren konstant bleibt, ließe sich eine FRET-Effizienz von ca. 20 % aus dieser Messung berechnen.

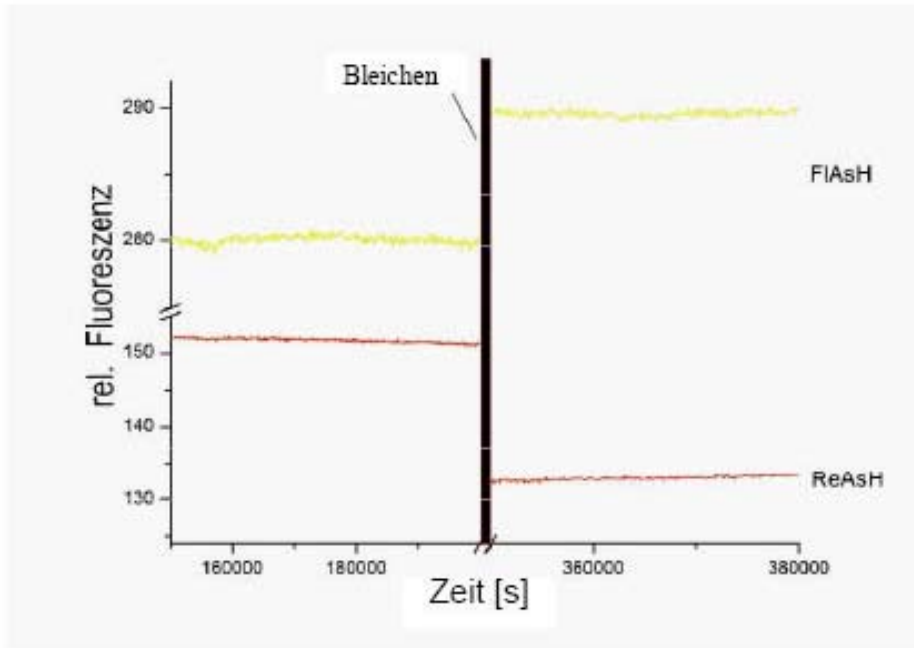


Abb.39: Akzeptorbleichen mit dem FIAsh/ReAsH- $A_{2A}$ -Rezeptorsensor FLN33. HEK-Zellen transient transfiziert mit FLN33, wurden mit FIAsh und ReAsH markiert. Die Messung wurde bei einer Anregung von 490 nm durchgeführt, das Emissionslicht mit einem Strahlenteiler von 565 nm LP geteilt und die Emissionen von FIAsh (gelbe Kurve) mit einem 525/50 nm und ReAsH (rote Kurve) mit einem 605/70 nm Emissionsfilter aufgenommen. Nach drei Minuten mit einem stabilen Signal in beiden Kanälen wurden die Zellen zum Bleichen des Akzeptors (ReAsH) für 150 Sekunden mit einem 530/60 nm Exzitationsfilter bei 550 nm Exzitation belichtet (schwarzer Balken). Anschließend wurde wieder die vorherige Exzitation (490nm) eingestellt und die beiden Kanäle für FIAsh und ReAsH analysiert. Der Anstieg der Donor-Emission nach der Akzeptorbleichung zeigt indirekt eine Energieübertragung vom Donor auf den Akzeptor, d.h. ein FRET-Signal, an.

Um dynamisches FRET am Rezeptorsensor FLN33 zu messen, wurden wiederum Zellen mit FIAsh- und ReAsH-Markierung gewählt und mit 100  $\mu$ M Adenosin stimuliert. Die Ergebnisse sind in Abb.40 dargestellt. Nach Agonistengabe war keine Änderungen der Donor- und Akzeptorfluoreszenzen erkennbar, weshalb sich das FRET-Verhältnis nicht ändert. Dynamisches FRET konnte unter diesen Bedingungen also nicht gemessen werden. Auf mögliche Gründe wird in der Diskussion eingegangen.

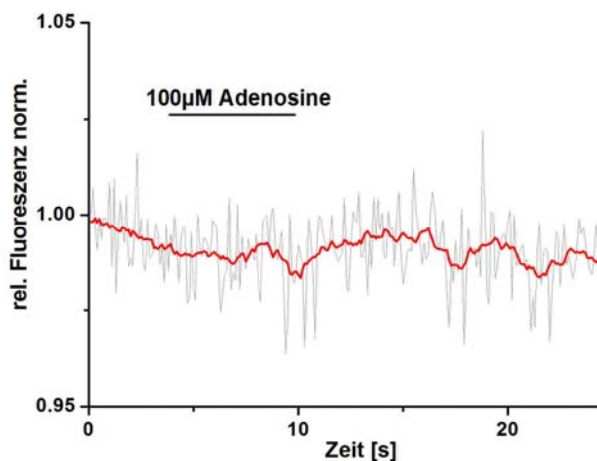


Abb.40: Ratiometrische Darstellung der dynamischen FRET-Messung des FLN33 Rezeptorsensors in HEK293-Zellen. Für die Messung wurde FIAsH als Donor mit 490 nm angeregt, das emittierte Licht wurde mit einem Strahlenteiler von 565 nm LP geteilt und FIAsH mit einem 525/50 nm und ReAsH mit einem 605/70 nm Emissionsfilter analysiert. Gezeigt ist das normalisierte FRET-Verhältnis. Die graue Linie zeigt die durch wenig Akzeptorfluoreszenz stark rauschende Originalspur, die rote eine geglättete Ausgleichsline (Adjacent Averaging: 5). Die Adenosinzugabe (100  $\mu$ M) erfolgte mithilfe einer Perfusionsanlage, die schnelle störungsfreie Lösungszugaben ermöglicht.

Um zu überprüfen, ob ReAsH grundsätzlich als Akzeptorfluorophor in einem Rezeptorsensor für dynamisches FRET geeignet ist, wurde ein weiterer  $A_{2A}$ -R, mit der Bezeichnung  $A_{2A}$ -FI3-YFP (vgl. Kapitel II.2.1.3), verwendet; dieser wurde bereits für die Affinitätsbestimmung beschrieben. In diesem Rezeptorsensor befinden sich eine Tetracystein-Bindungsstelle (CCPGCC) in der dritten intrazellulären Schleife und ein YFP im C-Terminus. YFP fungiert als FRET-Donor für das in der dritten intrazellulären Schleife gebundene ReAsH. Der Rezeptorsensor ist damit ähnlich dem publizierten  $A_{2A}$ -FI3-CFP, an dem mit Hilfe von FIAsH und CFP bereits dynamisches FRET gezeigt wurde (Hoffmann et al., 2005). Das Konstrukt wurde in HEK-Zellen exprimiert und mit ReAsH markiert. Bei einer Exzitation von 490 nm wurde der Donor YFP angeregt und zeigte eine Emission im 525 nm Kanal. Unter diesen Bedingungen zeigte ReAsH eine Fluoreszenz im 605 nm Kanal, es wird daher FRET beobachtet. Die Fluoreszenzen vor Agonistengabe wurden normiert (Abb.41). Stimulation der Zellen mit 100  $\mu$ M Adenosin führte zu einer Zunahme der Donorfluoreszenz und einer Abnahme der Akzeptorfluoreszenz, und somit zu einer Abnahme des FRET.

Bei diesen Versuchen zeigte sich jedoch, dass die Intensität des emittierten Lichts von ReAsH sehr gering ist. Es ist allerdings zu erwähnen, dass sich das ReAsH hier an der CCPGCC-Sequenz befand, was die Quantenausbeute in Vergleich zu einer Bindung an die FLNCCPGCCMEP Sequenz herabsetzt (Martin et al., 2005). Dies

erschwerte es, Zellen zu finden, bei denen die ReAsH-Markierung gut sichtbar war. Daher war eine dynamische FRET-Messung mit diesem Konstrukt nur bei starker Überexpression des Sensors möglich, da nur in solchen Zellen, die eine starke YFP-Fluoreszenz zeigten, überhaupt eine Markierung durch ReAsH festgestellt werden konnte. Außerdem ist eine Änderung der schwachen ReAsH-Fluoreszenz schwer zu verfolgen. Dennoch konnte nach einigen Versuchen gezeigt werden, dass mit diesem Konstrukt dynamisches FRET prinzipiell messbar ist (Abb.41).

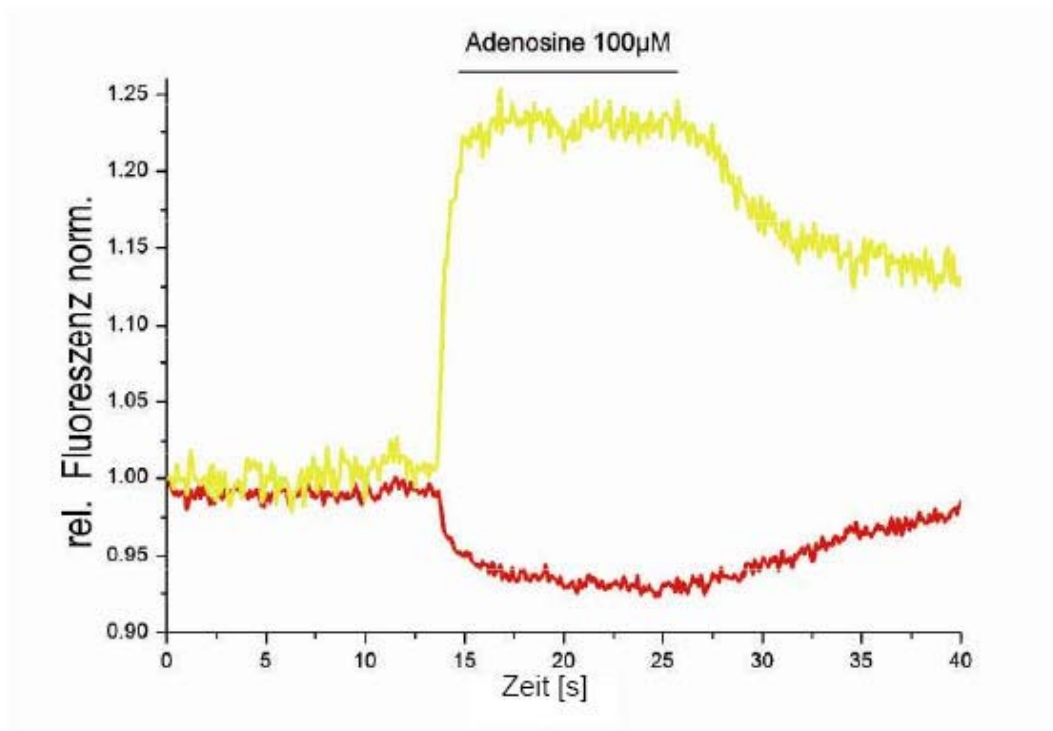


Abb.41: Dynamische FRET-Messung mit ReAsH-markiertem  $A_{2A}$ -FI3-YFP in HEK293-Zellen. Für die Messung wurde YFP als Donor mit 490 nm angeregt, das emittierte Licht wurde mit einem Strahlenteiler von 565 nm LP geteilt und YFP mit einem 525/50 nm und ReAsH mit einem 605/70 nm Emissionsfilter analysiert. Gezeigt sind normalisierte Werte für den YFP-Kanal und den ReAsH-Kanal. Die Adenosinzugabe (100 µM) erfolgte mithilfe einer Perfusionsanlage, die schnelle störungsfreie Lösungszugaben ermöglicht.



### III.3. Neue kleine Fluorophore zur spezifischen Markierung von Tetracystein-sequenzen

#### III.3.1 AsCy3

Haishii Cao et al. (2007) beschreiben AsCy3 als ein kleines Fluorophor, welches an ein Tetracystein-Motiv binden soll. AsCy3 wurde aus dem Fluoreszenzfarbstoff Cy3 entwickelt, dem durch die Einführung von Arsenen die Eigenschaft verliehen wird, an Tetracysteine-Motive zu binden. Das Bindemotiv von AsCy3, CCKAEAACC, bildet jedoch keine Haarnadelstruktur aus, sondern nach Strukturvorhersagen eine helikale Bindesequenz (Cao et al., 2007). Da sich die Bindemotive von AsCy3 und FlAsH unterscheiden, sollte eine selektive Markierung möglich sein. AsCy3 wurde für uns von Herrn Dr. Eberhardt Heller synthetisiert. Zunächst wurde die Markierung mit AsCy3 allein getestet. Dazu wurde die FLNCCPGCCMEP-Sequenz des PTHR-FLN der dualen Markierung (vgl.III.2.2) gegen die CCKAEAACC-Sequenz (PTHR-CCKAEAACC) ausgetauscht. HEK293-Zellen wurden mit diesem Konstrukt transfiziert und mit AsCy3 markiert. Zur Markierung wurde das Standardprotokoll für FlAsH-Markierung verwendet, jedoch wurde statt mit 250 nM FlAsH mit 250 nM AsCy3 inkubiert. Als Kontrolle der spezifischen Bindung wurden auch untransfizierte Zellen diesem Markierungsprotokoll unterzogen. Parallel wurden die Zellen auch einer Standard-FlAsH-Markierung unterzogen, um die Kreuzreaktivität des AsCy3-Motivs mit FlAsH zu prüfen. Die so behandelten Zellen wurden an einem Leica SP5 Konfokalmikroskop analysiert (Abb.42).

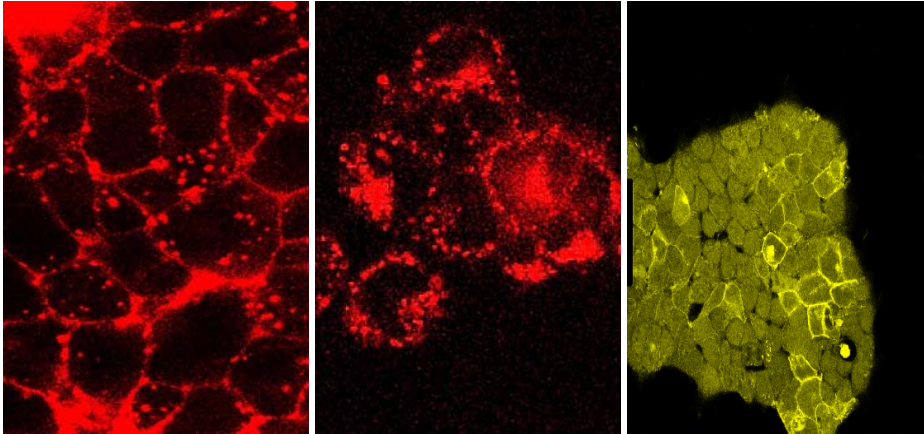


Abb.42: Mit AsCy3 (250 nM) behandelte untransfizierte (links) bzw. mit PTHR-CCKAEEAACC transfizierte HEK-Zellen (Mitte). Gezeigt sind konfokale Aufnahmen (Leica SP5). Als Kontrolle für die Spezifität der Bindesequenz sind FIAsh (250 nM)-behandelte Zellen (rechts) gezeigt, die ebenfalls mit dem PTHR-CCKAEEAACC transfiziert worden waren. Für die Aufnahmen wurde mit dem 514 nm Argonlaser gearbeitet, wobei die Emissionsbereiche für AsCy3 von 590-653 nm und für FIAsh von 525-550 nm eingestellt waren.

Die konfokalen Aufnahmen zeigen AsCy3 in der Zellmembran aller Zellen, unabhängig davon, ob sie transfiziert oder untransfiziert waren (Abb.42). Zudem war auffällig, dass sich kaum AsCy3 in den Zellen befand, im Vergleich zu einer FIAsh-Markierung, was darauf hindeutet, dass dieser Farbstoff die Zellmembran nicht gut passieren kann, oder sich dies zumindest nicht visualisieren lässt. Zudem konnte die Spezifität des CCKAEEAACC-Motivs für AsCy3 versus FIAsh nicht bestätigt werden, da auch FIAsh an die Bindesequenz gebunden hat (Abb. 42, rechtes Bild).

Um die Bindung von AsCy3 an das CCKAEEAACC-Bindemotiv genauer zu analysieren, wurden erneut Zellen mit PTHR-CCKAEEAACC transfiziert und mit AsCy3 markiert. Analog dazu wurden untransfizierte Zellen mit AsCy3 markiert. Von diesen AsCy3-behandelten Zellen und von unmarkierten Zellen, die aber mit PTHR-CCKAEEAACC transfiziert waren, wurden Membranen präpariert. Anschließend wurden deren Emissionsspektren im Fluorometer bei 540 nm Exzitation vermessen (Abb.43).

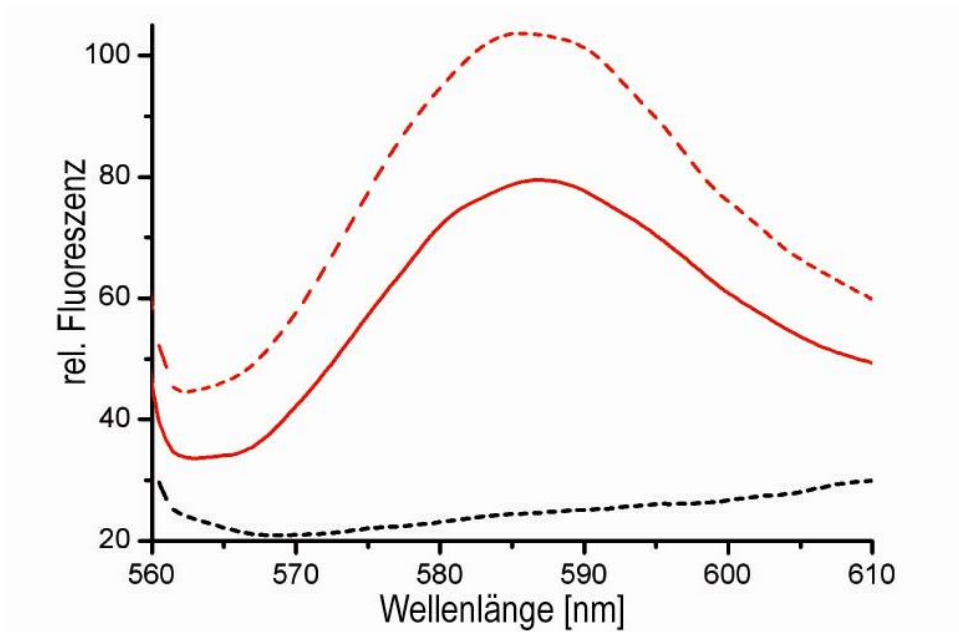


Abb.43: Fluorometrische Vermessung von Membranpräparationen gewonnen aus HEK-Zellen transfiziert mit PTHR-CCKAEEAACC, die entweder mit (rote, gestrichelte Linie) oder ohne (schwarze, gestrichelte Linie) AsCy3 behandelt worden waren. Ebenfalls wurden untransfizierte HEK-Zellen nach AsCy3-Behandlung vermessen (rote Linie). Gemessen wurde die Emission von 560 nm-610 nm nach Anregung mit 540 nm.

Es ist deutlich zu erkennen, dass das AsCy3 sowohl an die Membranen der transfizierten, als auch an die Membranen der untransfizierten Zellen bindet. Die Markierung der Membranen der transfizierten Zellen ist etwas höher, als die unspezifische Markierung der untransfizierten Membranen unter diesen Bedingungen.

Eine genaue Analyse der Affinität des AsCy3 zu dem beschriebenen Tetracystein-Bindemotiv bzw. zu untransfizierten Zellmembranen lässt sich nicht mit der gleichen Methode ermitteln wie dies für FIAsH und ReAsH gezeigt wurde. Die Substanz fluoresziert permanent, und daher ist ein Auswaschen aus der Bindung nicht so deutlich sichtbar wie bei FIAsH und ReAsH. Zudem ist die Fluoreszenzintensität der Substanz hoch und ein fluoreszierendes Protein als Donor oder Akzeptor würde mit schwächeren Fluoreszenzintensitäten nur schwach neben dem AsCy3 zu detektieren sein.

## **IV. Diskussion**

### **IV.1 Ligandenselektive Konformationen**

Ziel dieser Arbeit war es, die Existenz ligandenselektiver Konformationen von GPCRs in lebenden Zellen durch Messungen der Bewegung einzelner Regionen dieser Proteine zu prüfen. Dazu wurden FRET-Messungen in Zellen durchgeführt, welche einen  $\alpha_{2A}$ -AR mit einer FIAsh Bindungssequenz (FLNCCPGCCMEP) in der dritten intrazellulären Schleife und einem CFP im C-Terminus exprimierten. Um unterschiedliche Bewegungsmuster nach Agonistengabe nachweisen zu können, wurden drei verschiedene Rezeptoren verwendet, welche sich in der Position der FLNCCPGCCMEP-Sequenz innerhalb der dritten intrazellulären Schleife unterscheiden. Alle diese Konstrukte erzeugen nach Bindung von Norepinephrin eine Änderung des FRET-Signals zwischen FIAsh und CFP mit vergleichbarer Intensität. Clonidin erzeugte schwächere Signalintensitäten, welche aber untereinander nicht signifikant unterschiedlich waren. Im Gegensatz dazu konnten die partiellen Agonisten Dopamin, Norphenephrin und Octopamin nur schwächere, oder gar keine Änderungen der FRET-Signale für das I3-N-(FIAsh unterhalb der TM V) und I3-M-(FIAsh in der Mitte der Schleife) Konstrukt zeigen. Alle Agonisten waren jedoch in der Lage, stärkere Signale beim I3-C Konstrukt (FIAsh unterhalb der TM VI) zu erzeugen. Auch die Kinetiken für Dopamin sind, im Vergleich zu Norepinephrin, für das I3-N Konstrukt deutlich langsamer, als für die beiden anderen Konstrukte. In der zur Charakterisierung von I3-N, I3-M und I3-C gezeigten Agonistenbindung sowie G-Protein-Aktivierung konnten keine Unterschiede zum Wildtyprezeptor festgestellt werden. Hiermit konnte nun in lebenden Zellen gezeigt werden, dass tatsächlich ligandenselektive Konformationen innerhalb der dritten intrazellulären Schleife des  $\alpha_{2A}$ -adrenergen-Rezeptors vorliegen.

Wie bereits beschrieben, sind die genauen Mechanismen dieser ligandenselektiven Konformationen noch nicht geklärt. Daten, welche zeigen, dass eine Substanz an dem gleichen Rezeptor sowohl Agonist als auch Antagonist für unterschiedliche Sekundärantworten sein kann, wurden für Serotonin, Opioid, Dopamin, Vasopressin und adrenerge Rezeptorsysteme gezeigt (Urban et al., 2007). Die genaue Aufklärung dieser Phänomene ist bisher noch nicht gelungen. Um zu verstehen, welche Bereiche innerhalb der aktiven Konformation eines bestimmten Agonisten für die

jeweiligen aktivierenden oder hemmenden Prozesse in einer Zelle verantwortlich sind, ist es wichtig, in lebenden Zellen zunächst diese ligandenselektiven Konformationen darzustellen. Nur so ist es möglich, neue Agonisten zu entwerfen, welche dann als spezifische Therapeutika genutzt werden können (Urban et al., 2007). Denn nur so kann letztendlich die Frage geklärt werden, wie die Bindung einer Substanz an den Rezeptor mit den anschließenden Effekten in der Zelle verknüpft ist (Gether, 2000). Ein weiterer Aspekt, der hierbei zu berücksichtigen ist, wird durch die Tatsache beschrieben, dass einige GPCRs mehrere Bindestellen und Allosterie aufweisen. Es ist also möglich, dass durch zusätzliche allosterische Liganden ein Agonist verschiedene Konformationen erzeugen kann (Baker and Hill, 2007; Kobilka and Deupi, 2007). Diese möglichen Zusammenhänge wurden bereits in der Einleitung diskutiert.

Es ist bekannt, dass bei der Aktivierung eines GPCR eine Bewegung zwischen TM III und TM VI stattfindet. Vergleiche von Daten aus biochemischen Verfahren und den Modellen, welche an Hand der Kristallstrukturen der GPCRs entworfen wurden, bestätigen diese Bewegung (Hubbell et al., 2003). Auch eine Bewegung der TM V wurde für den  $\alpha_{2A}$ -adrenergen-Rezeptor beschrieben (Marjamaki et al., 1999; Nyronen et al., 2001). Für die TM V wird eine wichtige Rolle in der Bindung von Katecholaminen postuliert. Hierbei soll eine Reihe von Serinen, welche in der TM V lokalisiert sind, mit den OH-Gruppen der Katecholamine interagieren. Die gezeigten Daten bestätigen die kritische Rolle der Anwesenheit und Positionierung der Hydroxylgruppen der Katecholamine. Die drei partiellen Agonisten Dopamin, Octopamin und Norphenephrin erzeugten alle ein stärkeres FRET-Signal an I3-C als an I3-N. Das heißt, diese Substanzen bewegen die TM VI des Rezeptors stärker als die TM V. Diese Substanzen haben alle eine unterschiedliche Anordnung der OH-Gruppen (Abb.44). So besitzt Dopamin eine  $\beta$ -OH-Gruppe, Octopamin hat die Hydroxylgruppe am aromatischen Ring in der para-Position lokalisiert und Norphenephrin eine meta-OH-Gruppe. Das strukturell unterschiedliche Clonidin zeigt durch die Anordnung der Wasserstoffbrückenakzeptoren und Donatoren ähnliche Eigenschaften wie das Norepinephrin. Es würde sich nun anbieten, ein Modell der gemessenen Daten mit den Agonisten in der Bindungstasche des Rezeptors zu erstellen um daraus eine Simulation des aktiven Rezeptors zu erhalten. Eine Interaktion der Serine der TM V mit den Hydroxylgruppen der Agonisten könnte von deren Position beeinflusst werden. Die Bereiche des Rezeptors, welche an der Bindung der Agonisten beteiligt sind, bestimmen wohl auch die Konformationsänderung des Rezeptors. Dies korreliert mit den hier vorgestellten Daten.

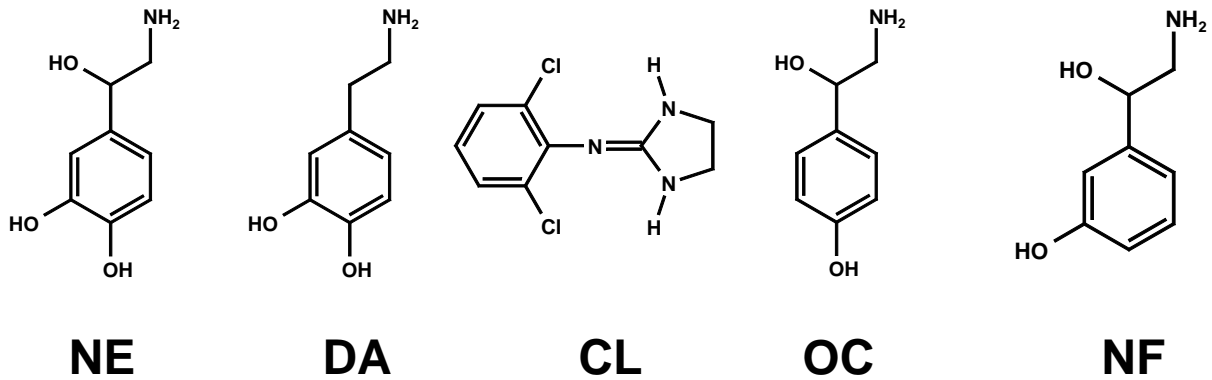


Abb.44: Strukturformeln, der in dieser Studie verwendeten Agonisten für  $\alpha_{2A}$ -Rezeptoren. Die Strukturen wurden erstellt mit dem Programm ChemOffice2008.

Bisher ist ungeklärt, welcher Mechanismus für die unterschiedlichen Potenzen dieser Substanzen zur Aktivierung adrenerger Rezeptoren verantwortlich ist. Für den  $\beta_2$ -Rezeptor wurde gezeigt, dass eine ionische Bindung zwischen TM III und TM VI sowohl durch Norepinephrin als auch durch Dopamin gebrochen wird (Yao et al., 2006b). So wurde aus diesen Untersuchungen gefolgert, dass der Unterschied in der Potenz dieser beiden Substanzen durch andere Regionen des Proteins definiert wird. Die in dieser Arbeit gezeigten Daten am  $\alpha_{2A}$ -adrenergen-Rezeptor unterstützen die Hypothese, dass die dritte intrazelluläre Schleife und dabei insbesondere auch die Region unterhalb der TM V maßgeblich an der vollen und auch partiellen Aktivierung des Rezeptors beteiligt ist. Durch biochemische Verfahren konnte gezeigt werden, dass einige Agonisten am  $\alpha_{2A}$ -AR in der Lage sind, neben  $G_i$  auch  $G_s$  zu aktivieren (Eason and Liggett, 1995). Interessanterweise ist es NE, welches zusätzlich zu  $G_i$  auch eine  $G_s$ -Aktivierung zeigt, das die TM V bewegen kann. Für NF wurde gezeigt, dass es nicht in der Lage, eine  $G_i$  Aktivierung über den  $\alpha_{2A}$ -AR auszulösen. NF ist ebenso nicht in der Lage die TM V des Rezeptors zu bewegen. Ein möglicher Mechanismus für diesen Effekt ergibt sich aus den übereinander gelegten Strukturen von Rhodopsin und Opsin (Palczewski et al., 2000; Park et al., 2008b; Schertler, 2005). Die TM V bewegt sich bei der Aktivierung vertikal in das Zytosol hinein. Die Aktivierung des GPCR führt an TM VI zu einer horizontalen Bewegung. Die Bewegung an TM VI führt außerdem zu einer größeren betragsmäßigen Distanzänderung (7 Å) als die Bewegung an TM V (3 Å) (Abb.45). Diese Daten korrelieren mit den von uns in lebenden Zellen gemessenen Bewegungen.

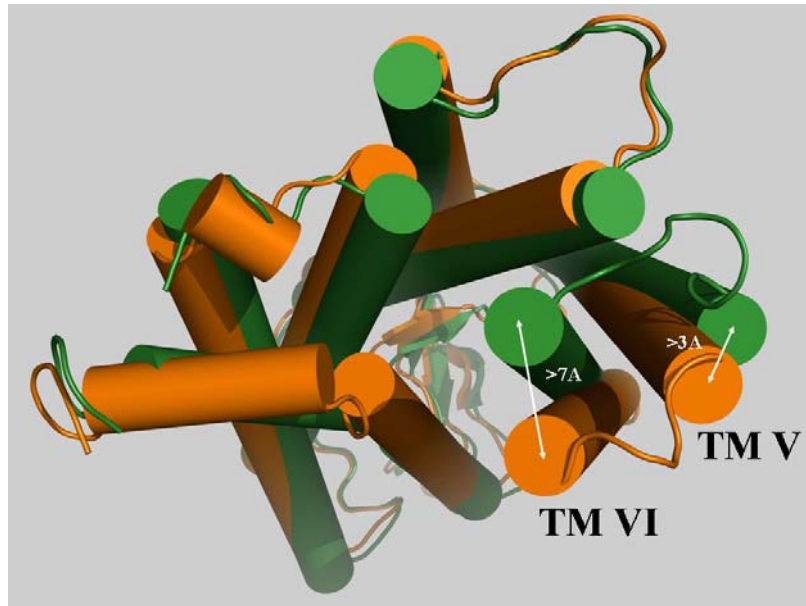


Abb.45: Struktur von Opsin (partial aktiv) (PDB 3CAP) und Rhodopsin (inaktiv) (PDB 1GZM), gezeigt von der zytosolischen Seite der Rezeptoren. Die größten Unterschiede sind an der TM VI zu erkennen (Verschiebung um 7 Å), kleinere Unterschiede sind an der TM V zu sehen (Verschiebung um 3 Å); Modifiziert nach: (Zürn et al., 2009), mit Genehmigung von ASPET.

Wir betrachten in unseren Messungen die Bewegung zwischen zwei Fluorophoren. Deshalb besteht auch die Möglichkeit, dass die Bewegungen, die wir hier zeigen, nicht von der dritten intrazellulären Schleife ausgehen, sondern dass für verschiedene Agonisten der C-Terminus des Rezeptors unterschiedliche Bewegungen zeigt. Der C-Terminus spielt eine entscheidende Rolle bei der agonisteninduzierten Phosphorylierung durch spezifische Kinasen sowie bei der Bindung von Arrestinen (Lohse et al., 1990). Studien, die die Bewegungen zweier verschiedener Positionen innerhalb des C-Terminus zu einem Referenzpunkt in der dritten intrazellulären Schleife, vergleichbar mit dem I3-C Konstrukt, betrachteten, wurden an gereinigten  $\beta_2$ -adrenergen-Rezeptoren durchgeführt (Granier et al., 2007). Dabei wurde die Hypothese aufgestellt, dass sich durch einen Agonisten die Distanz zwischen diesen beiden Positionen um 1-2 Å ändert. Allerdings können auch hier nur relative Distanzen angegeben werden. Ob sich der C-Terminus nicht, allein, oder mit der dritten intrazellulären Schleife gemeinsam bewegt, bleibt ungeklärt.

Unsere Daten können diese Diskussion allerdings aktiv beleben, denn die Tatsache, dass eine Bewegung stattfindet, wird hier in lebenden Zellen bewiesen. Durch die neu gezeigten Kristallstrukturen werden auch Fragen über die Rolle des C-Terminus aufgeworfen, besonders durch die Struktur des Tintenfisch-Rhodopsins, hier besitzt

der C-Terminus des Rezeptors zwei Helices (Murakami and Kouyama, 2008). Eine Interpretation der Tatsache, dass bei dem Tintenfisch-Rhodopsin im C-Terminus neben der achten noch eine neunte Helix vorliegt, ist noch nicht gefunden. Die in dieser Arbeit gezeigten Daten könnten einen Hinweis auf die Bewegung des C-Terminus des  $\alpha_2$ -adrenergen Rezeptors geben. Die kinetischen Daten, die mit I3-N, I3-M und I3-C gezeigt wurden, könnten darauf hindeuten, dass sich der Rezeptor in seinem C-Terminus unterschiedlich für die einzelnen Agonisten bewegen könnte, was zu einer unterschiedlichen Messung der Aktivierungsgeschwindigkeit führen kann. In dem gezeigten Fall ist dies eine unterschiedliche Geschwindigkeit zwischen der Region unterhalb der TM V (I3-N) und der Region unterhalb der TM VI (I3-C) für den Agonisten Dopamin. Die Daten die für die verschiedenen Agonisten bezüglich der Signalintensitäten gezeigt wurden, lassen allerdings vermuten, dass die unterschiedliche Bewegung des Rezeptors in der dritten intrazellulären Schleife stattfindet.

Bei der Interpretation der diskutierten Daten bleibt allerdings zu erwähnen, dass auch bei der Verwendung eines kleinen Fluorophors wie FIAsh der Rezeptor durch Mutationen verändert wird, welche diesen beeinflussen können. Es ist auch nicht auszuschließen, dass die niedermolekularen Substanzen selbst die Bewegungen beeinflussen könnten. Jedoch wurde zwischen den verwendeten Rezeptorsensoren und dem Wildtyprezeptor kein Unterschied in der Agonistenbindung sowie in der Aktivierung des G-Proteins festgestellt. Ob die Interaktion mit anderen Proteinen in der Signalkaskade der GPCRs durch die eingebrachten Mutationen beeinflusst wird, kann hierdurch jedoch nicht geklärt werden. Da in keiner der bisher erzeugten Kristallstrukturen die dritte intrazelluläre Schleife aufgelöst wurde, bleibt der genaue Einfluss der erzeugten Mutationen schwer abzuschätzen. Somit sind diese Messungen die einzigen, welche in der lebenden Zelle solche Interpretationen zulassen.

Eine Beeinflussung des Rezeptors im Vergleich zu den nativen Rezeptoren wird eventuell durch das 27 kDa CFP im C-Terminus erzeugt. Die Bewegung des C-Terminus ließe sich nur prüfen, wenn verschiedene Stellen nach der TM VII markiert würden. Denn die hier gezeigten Messungen für die dritte Schleife zeigen, dass für eine genaue Betrachtung verschiedene Positionen eines Proteinabschnitts markiert werden müssen und hierfür sind die fluoreszierenden Proteine nur bedingt geeignet (s. Einleitung).



Abschließend zeigen diese Daten, dass ein partieller Agonist nicht nur eine existierende, aktive Konformation schwächer oder langsamer ausbildet, sondern, dass jeder Agonist in der Lage ist eine eigene Konformation des Rezeptors zu erzeugen. Zieht man aus diesen gesamten Messungen am murinen  $\alpha_{2A}$ -adrenergen Rezeptor ein Fazit, wird deutlich, dass das Model der ligandenselektiven Konformationen der GPCRs jenes zu sein scheint, welches am ehesten die physiologischen Verhältnisse widerspiegelt (Abb.46). Jede Substanz ist in der Lage eine eigene Konformation des Rezeptors zu stabilisieren. Die Bedeutung dieser Erkenntnisse ist bisher noch nicht aufgeklärt, doch ein therapeutischer Nutzen der letztendlich daraus gezogen werden könnte, wäre nach der Aufklärung der physiologischen Effekte dieser Konformationen möglich (Mailman, 2007).

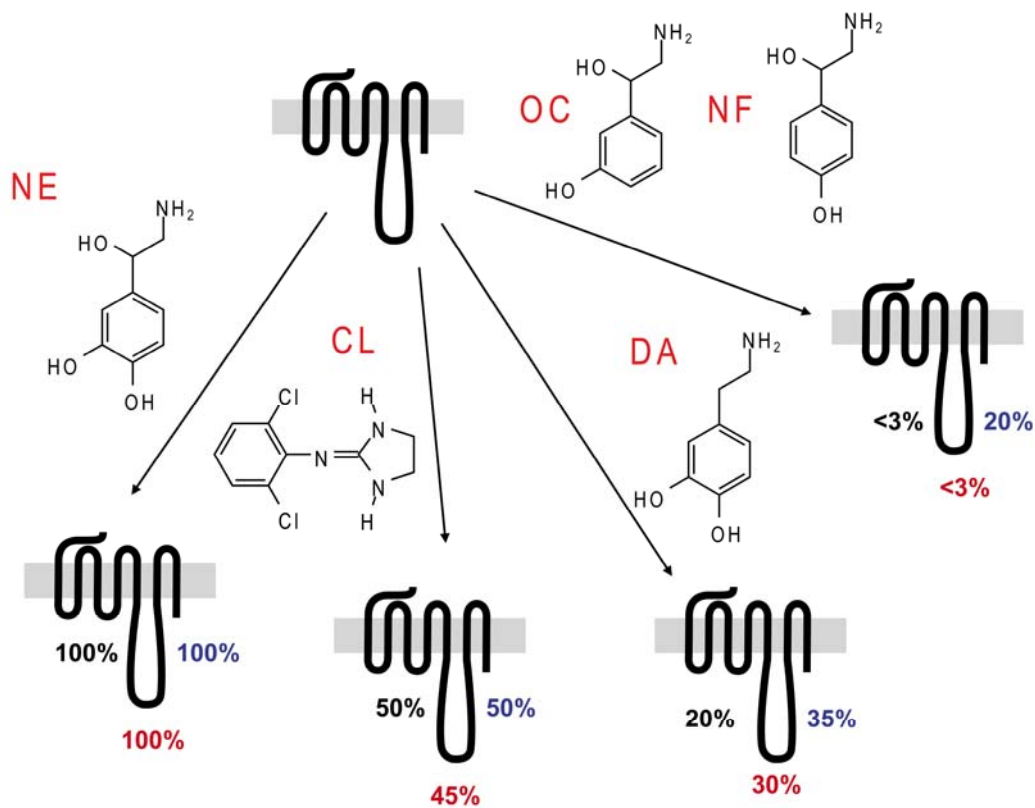


Abb.46: Schematische Darstellung der ligandenselektiven Konformationen. Der Grundzustand des Rezeptors wird durch die einzelnen Agonisten in eigene Konformationen gebracht. Diese werden durch die prozentuale Änderung des Norepinephrinsignals in der dritten Schleife charakterisiert; Modifiziert nach: (Zürn et al., 2009), mit Genehmigung von ASPET.

#### IV.2 Niedermolekulare Fluorophore zur Proteinmarkierung

In dieser Arbeit wurde bereits diskutiert, dass mit FRET gemessenen Daten kritisch betrachtet werden müssen (Jares-Erijman and Jovin, 2006). In einigen Publikationen tauchen Interpretationen von FRET-Messungen auf, bei denen allein über Messung eines FRET-Signals FRET-Effizienzen bestimmt werden und daraus Schlüsse über die Distanzen der Fluorophore gezogen werden (Granier et al., 2007). Dabei ist aber immer zu bedenken, dass die Fluorophore bei den meisten Messungen nicht direkt am Protein angebracht sind. So ist bei den fluoreszierenden Proteinen gezeigt (Tsien, 1998), dass das tatsächliche Fluorophor in der Mitte dieses 27kDa-Proteins sitzt und damit immer eine Distanz zwischen dem Fluorophor und dem fusionierten Zielprotein bleibt. Aber selbst bei richtiger Interpretation bleibt die Größe der verwendeten Fluorophore ein Kritikpunkt dieser Technik.

In Abb. 47 wird gezeigt, wie ein GPCR mit einem CFP in der dritten intrazellulären Schleife und einem YFP im C-Terminus aussehen könnte. Es wird deutlich, dass die beiden Fluorophore zusammen die gleiche Größe wie der gesamte Rezeptor aufweisen. Zudem scheint die intrazelluläre Seite des GPCRs sterisch behindert zu werden (Lisenbee et al., 2003). In einer 2007 erschienenen Publikation werden die Lokalisation und die Interaktion des Proteins Phospholamban mit dem Protein SERCA beschrieben. Das Phospholamban, welches selbst aus 52 Aminosäuren besteht, wurde hierbei mit einem 27 kDa großen YFP markiert (Robia et al., 2007). Auch hier ist wohl die Frage erlaubt, welchen Einfluss das YFP auf die Bewegung dieses kleinen Proteins hat.



Abb.47: Darstellung eines Modells eines GPCR mit einem CFP in der dritten intrazellulären Schleife und einem YFP im C-Terminus; Mit freundlicher Genehmigung von C. Hoffmann.

Es wurden einige Ansätze entwickelt, um eine Proteinmarkierung mit kleineren Komponenten, als die GFP-Varianten umzusetzen. So wurden in der Gruppe um Kai Johnsson der „SNAP-tag“ (s.Abb.11) und der „CLIP-tag“ entwickelt. Bei der SNAP-tag-Technik wird an das Zielprotein die O<sup>6</sup>-Alkylguanin-DNA-Alkyltransferase (AGT) Protein fusioniert. Dieses Protein koppelt kovalent an O<sup>6</sup>-Benzylguanin. Dieses O<sup>6</sup>-Benzylguanin kann vor der Kopplung mit einer fluoreszierenden Substanz markiert werden. Ist das fluoreszierende O<sup>6</sup>-Benzylguanin-Derivat in der Lage über die Membran zu diffundieren, kann diese Technik in lebenden Zellen auf der zytosolischen Seite verwendet werden. Der CLIP-tag ist eine Variante des AGT und kann mit markierten O<sup>2</sup>-Benzylzytosin-Derivaten spezifisch gekoppelt werden. Somit besteht die Möglichkeit, die beiden verschiedenen Varianten des AGT an die gewünschten Stellen der Zielproteine zu fusionieren und diese dann spezifisch zu markieren (Gautier et al., 2008; Gronemeyer et al., 2006; Keppler et al., 2004). AGT ist zwar mit ca. 20 kDa kleiner als die GFP-Varianten, jedoch ist sie ebenfalls viel zu groß, um eine Markierung an beliebigen Stellen innerhalb eines Proteins zu verwirklichen. Da viele dafür verwendbare Fluorophore keine ausreichende Membranpermeabilität aufweisen, wird die Technik überwiegend zur extrazellulären Markierung oder an gereinigten Proteinen angewendet.

Eine weitere Markierungstechnik für Proteine bietet die „His-tag“-Technik. Hierbei wird eine Oligohistidinsequenz in das Protein eingebracht. Diese geht einen Komplex mit einem Nitrilotriessigsäure (NTA)-Ni<sup>2+</sup>-Chelatkomplex ein. Durch Kopplung von Fluorophoren an NTA können so Proteine markiert werden. Durch die Kombination verschieden markierter NTA konnten FRET-Messungen an gereinigten Proteinen gezeigt werden (Kapanidis et al., 2001). Auch eine Anwendung in lebenden Zellen konnte gezeigt werden, wobei ein N-terminal mit sechs Histidinen modifizierter 5HT<sub>3</sub>-Rezeptor markierte NTA binden konnte (Guignet et al., 2004). Membranpermeabilität ist bei diesen Kombinationen nicht gegeben. Zudem werden die fluoreszierenden Eigenschaften der meisten Fluorophore durch das Ni<sup>2+</sup> negativ beeinflusst, was zu einer Limitierung dieser Technik führt (Goldsmith et al., 2006). Der größte Nachteil dieser Technik ist allerdings die geringe Affinität (K<sub>d</sub> 1-20 µM) und damit Stabilität des Komplexes (Soh, 2008). Mit einer Größe von 2-5 kDa sind die eingebrachten gekoppelten Fluorophore deutlich kleiner als GFP oder der SNAP-tag, jedoch immer noch ein Vielfaches größer als FIAsH oder ReAsH, welche zudem auch membranpermeabel sind und eine stabile Markierung von Proteinen zulassen.

Allerdings bleibt bei der Verwendung von FIAsH als Akzeptor in unseren FRET-Messungen das 27 kDa Protein CFP als Donor ein Problem, denn die fluoreszierenden Proteine können die Zielproteine direkt beeinflussen. Durch die bereits diskutierten Beispiele (s. Einleitung) wurde aufgeführt, dass einige Rezeptoren durch das Ersetzen des YFP durch FIAsH ihre Funktionalität zurückerhalten können (Hoffmann et al., 2005). Es wird deutlich, dass in einigen Fällen die Notwendigkeit gegeben ist, fluoreszierende Proteine in unseren FRET-Messungen durch ein anderes niedermolekulares Fluorophor zu ersetzen.

In dieser Arbeit sollte unter diesen Gesichtspunkten eine Methode entwickelt werden, mit der es möglich ist, zwei verschiedene Stellen in Proteinen durch zwei unterschiedliche Bindesequenzen in einer lebenden Zelle spezifisch mit unterschiedlichen niedermolekularen Fluorophoren zu versehen. Durch die Charakterisierung der Affinitäten der beiden Fluorophore FIAsH und ReAsH zu den beschriebenen Bindesequenzen CCPGCC und FLNCCPGCCMEP in lebenden Zellen konnte hier zum ersten Mal eine Möglichkeit entwickelt werden, mit der es auch in lebenden Zellen möglich ist, eine selektive Markierung von Proteinen mit FIAsH und ReAsH zu erreichen. Es wurden früher bereits Versuche unternommen, Zellen mit FIAsH und ReAsH zu markieren, jedoch waren dies nur unspezifische

Markierungen. Es ist bekannt, dass am CCPGCC-Motiv FIAsh eine dreifach höhere Affinität als ReAsH hat (Martin et al., 2005). Dies wurde in zwei Publikationen genutzt, um eine duale Markierung von FIAsh und ReAsH in einer lebenden Zelle zu ermöglichen. Einmal wurden Phospholambanpentamere mit zwei CCPGCC Sequenzen versehen und mit FIAsh und ReAsH im Verhältnis 1:3 inkubiert und anschließend FRET gemessen (Robia et al., 2005). Bei der zweiten Publikation wurde an  $\alpha$ -Synuclein eine CCPGCC-Sequenz kloniert, das Protein in Zellen exprimiert ebenfalls mit FIAsh und ReAsH im Verhältnis 1:3 markiert. Über das gemessene FRET kann so eine Aggregation des Proteins nachgewiesen werden (Roberti et al., 2007). In beiden Publikationen fehlt allerdings die Information über das Verhältnis der tatsächlich gebundenen Fluorophore, denn hierbei handelt es sich weder um ein spezifisches oder selektives, noch um ein stöchiometrisch definiertes Markieren von Proteinen. Auch eine Abgrenzung gegenüber unspezifischen Bindungen ist nicht möglich. Es ist zu vermuten, dass aus diesen Gründen weitere solche Versuche bisher nicht veröffentlicht wurden.

Die Tatsache, dass die beiden Fluorophore FIAsh und ReAsH an Bindesequenzen mit unterschiedlichen Affinitäten binden, kann als Vorteil genutzt werden. So wurde versucht, Bindemotive zu charakterisieren, welche selektiv nur FIAsh oder ReAsH binden können. Ein hierfür beschriebenes Motiv ist das CCKACC-Motiv, welches FIAsh aber kein ReAsH binden soll (Chen et al., 2007). Die Affinität gegenüber dem CCPGCC-Motiv ist dabei stark herabgesetzt, was erklären könnte, warum nur noch das höheraffine FIAsh an das Motiv bindet. Allerdings bleibt zu vermuten, dass eine Markierung in lebenden Zellen mit anschließender Dithiolbehandlung, um die unspezifische Bindung gering zu halten, mit so niederaffinen Motiven nicht möglich ist. Eine Markierung mit diesen Motiven wurde bisher nur an gereinigten Proteinen gezeigt.

Um in lebenden Zellen eine spezifische Markierung einzelner Proteine zu verwirklichen, wurde in dieser Arbeit ein spezifisches Markierungsprotokoll entwickelt. Durch das beschriebene Markierungsprotokoll wird so ReAsH an FLNCCPGCCMEP gebunden und FIAsh an CCPGCC. Dies kann auch umgedreht verwirklicht werden.

So kann das Markierungsprotokoll so modifiziert werden, dass zunächst mit FIAsh inkubiert wird und der Waschschrift mit 1 mM BAL durchgeführt wird. Nach unseren Affinitätsbestimmungen ist dann der Großteil des FIAsh von der

Sechsamino-säuresequenz CCPGCC verdrängt, aber über 90% der Substanz noch an die FLNCCPGCCMEP-Sequenz gebunden. Anschließend wird mit ReAsH inkubiert und mit EDT oder BAL in geeigneter Konzentration gewaschen. Damit hat man das gleiche System wie vorher, nur, dass der Donor und der Akzeptor vertauscht wurden, ohne dafür neu klonieren zu müssen. Die Proteinkonstrukte können so auch mit anderen CFP- oder YFP-Konstrukten kombiniert werden, da beide Bindesequenzen sich auch einzeln mit einem der beiden Farbstoffe, FIAsh und ReAsH, kombinieren lassen. Somit wären variable FRET-Messungen zwischen unterschiedlichen Proteinen möglich. Allerdings ist die Affinität des FIAsh zu der CCPGCC-Sequenz deutlich höher, als die Affinität des ReAsH, dies erschwert diese Art der Markierung im Vergleich zu dem vorgestellten Protokoll und bedarf einer Optimierung.

Die Möglichkeit, FRET zwischen FIAsh und ReAsH zu messen, wurde durch das Akzeptorbleichen des ReAsH bewiesen. Der Resonanz-Energie-Transfer konnte auch in den beiden bereits erwähnten Publikationen, in denen FIAsh und ReAsH als FRET-Paar kombiniert wurden, gezeigt werden (Roberti et al., 2007; Robia et al., 2005). Bei der Durchführung von dynamischen FRET-Messungen sind allerdings noch einige Optimierungen von Nöten.

In dem von uns verwendeten Zeiss/Till-System wurde ein 560 nm Exzitationsfilter verwendet. Das Exzitationsmaximum des ReAsH liegt bei 593 nm (siehe Abb.25). Bei 560 nm wird nur ein sehr geringer Teil des ReAsH angeregt, dies gestaltet die Suche nach gut und gleichmäßig dual markierten Zellen sehr schwer. So ist es möglich, dass lediglich die Auswahl der Zellen eine dynamische FRET-Messung verhinderte. Die Verwendung eines besseren Exzitationsfilters für die Direktanregung von ReAsH, welcher eine Anregung des ReAsH im Exzitationsmaximum bei 595 nm zulässt, wird unumgänglich sein. Dies war auch bei Messungen mit dem A<sub>2A</sub>-Adenosin-Rezeptor mit YFP im C-Terminus und der CCPGCC-Sequenz mit ReAsH in der dritten intrazellulären Schleife zu erkennen. Doch wie in Abb.38 gezeigt, war hier eine dynamische FRET-Messung möglich, die Auswahl der Zellen gestaltete sich aber auch hier als sehr schwierig.

Die Änderung des Signals im ReAsH-Kanal war hierbei gering. Eine Interpretation dieser Tatsache ist an Hand der gezeigten Quantenausbeuten (ReAsH an GFP: 0,28) spekulativ möglich, da hier ein Bindung des ReAsH an die CCPGCC-Sequenz

stattfind, allerdings ist die tatsächliche Quantenausbeute des ReAsH in dieser Position an diesem Rezeptor unbekannt.

ReAsH besitzt, C-terminal gebunden an GFP über eine CCPGCC-Sequenz, nur eine Quantenausbeute von 0.18 (Martin et al., 2005), d.h. nur 18% der aufgenommenen Photonen werden wieder abgegeben. In unserem Fall wurde YFP verwendet, welches sich zu dem GFP ähnlich verhalten dürfte. FIAsH besitzt, C-terminal gebunden an CFP eine Quantenausbeute von 0.50, wenn es an die CCPGCC-Sequenz gebunden ist. In der Kombination von FIAsH an der CCPGCC- und ReAsH an der FLNCCPGCCMEP-Sequenz lässt sich über die Quantenausbeuten nur spekulieren. Allerdings könnte eine zu geringe Quantenausbeute eine Begründung dafür sein, dass in dem von uns betrachteten  $A_{2A}$ -Konstrukt FLN33 keine dynamische FRET-Messung zu verfolgen war. So wäre lediglich eine Änderung der Donorfluoreszenz messbar und die Änderung der Akzeptorfluoreszenz nicht verfolgbar. Wenn bei dem Konstrukt FLN33, nach der Doppelmarkierung mit FIAsH und ReAsH der Akzeptor geblichen wurde, konnte ein Energieübergang zwischen den beiden Fluorophoren gemessen werden. Hierbei wird die Abnahme der Akzeptorfluoreszenz durch direktes Bleichen verursacht, die Zunahme der Donorfluoreszenz wird sichtbar. Bei den dynamischen Messungen kann durch die schlechte Quantenausbeute des ReAsH dieser Effekt nur schwer visualisiert werden, da die Änderungen des Energieüberganges geringer sind und das gesamte Signal praktisch nur durch die verfolgbare Änderung der Donorfluoreszenz verursacht wird. Die dynamische Messung kann nicht nur durch die oben genannten Gründe beeinflusst werden, sondern auch durch den Abstand der Fluorophore zueinander. Bei einer Messung mit CFP/YFP kann über den Abstand der beiden Regionen, an die diese Proteine gekoppelt sind, keine Aussage getroffen werden. Denn bei fluoreszierenden Proteinen, bei denen sich der Fluorophor direkt in der Mitte des Proteins befindet, ist durch deren Größe das Fluorophor je nach Orientierung des fluoreszierenden Proteins weiter oder näher von der eigentlichen Bindestelle des Proteins entfernt. Diese Orientierung des fluoreszierenden Proteins ist durch die direkte Umgebung beeinflusst und lässt sich nicht vorhersagen. Auch der Abstand der Chromophore der fluoreszierenden Proteine kann nur bestimmt werden, wenn genaue Anisotropiemessungen und die FRET-Effizienz bestimmt werden (Borst et al., 2008). Bei den niedermolekularen biarsenischen Fluorophoren ist die Möglichkeit der freien Drehbarkeit eingeschränkt. Sie sind dicht an der Tetracystein-

Bindesequenz am Zielprotein lokalisiert. So könnten im Fall des FLN 33 die beiden Fluorophore so dicht aneinander sein, dass ein Energieübergang stattfindet, aber die Distanzänderung zwischen beiden Fluorophoren nicht ausreicht, um die FRET-Effizienz zu ändern. Nach theoretischen Berechnungen des Rhodopsin-Modells ist es durchaus vorstellbar, dass der Abstand der Fluorophore von der Mitte der dritten intrazellulären Schleife (Position des FIAsH) zum C-Terminus des Rezeptors in 33 Aminosäuren Abstand zur TM VII (Position des ReAsH) unter 2 nm beträgt. Bei dieser Distanz ist eine Änderung der FRET-Effizienz nicht möglich. Neben der Auswahl der geeigneten Positionen der Tetracystein- Bindestellen sollte auch die Auswahl der Fluorophore optimiert werden, um Messungen mit ausschließlich kleinen Fluorophoren möglich zu machen.

Bei den Translokationsstudien zwischen dem FIAsH-markierten  $\beta$ -Arrestin2 und dem ReAsH-markierten PTHR war auffällig, dass die Leistung des 594 nm Lasers am Leica SP5 Konfokalmikroskop voll ausgeschöpft werden musste, um die gezeigten Bilder zu erzielen. Dieser Laser besitzt eine gemessene Leistung am Objektiv von 0,5 mW. Verwendet man den 561 nm, welcher 0,9 mW Leistung besitzt, so wurde das ReAsH deutlich heller dargestellt, obwohl die Exzitation hier nicht im Maximum ist. Dies spricht dafür, dass das ReAsH eine ungünstige Quanteneffizienz in dieser Bindung besitzt, über die Quantenausbeute kann nur spekuliert werden. Da aber eine exakte Trennung zwischen FIAsH und ReAsH zum Beweis der dualen und spezifischen Markierung nötig war, konnte für die Experimente der 561 nm Laser nicht verwendet werden. ReAsH scheint für den Einsatz als Akzeptor für dynamische FRET-Messungen mit FIAsH als Donor nicht das optimale niedermolekulare Fluorophor zu sein. Neue Farbstoffe mit hohen Quanteneffizienzen und Quanten ausbeuten könnten eine Alternative für ReAsH bieten.

Hierfür wurde auch das bereits veröffentlichte AsCy3 verwendet. Allerdings zeigte auch diese Substanz Nachteile. Solche neuen Fluorophore benötigen neue Bindesequenzen, deren Affinität genau zu bestimmen ist. So ließen sich neue Kombinationen für FRET-Paare finden. Hierbei sind die Bindesequenzen verschieden von den bisher verwendeten. Denn allen bisher gezeigten Motiven war die CCPGCC-Sequenz gemein, welche die Cysteine in einem Abstand von ca. 6Å beinhaltet. Bei der beschriebenen Bindesequenz für das AsCy3 CCKAEAACC wird eine helikale Bindesequenzen postuliert. Der Abstand der Cysteinpaare sollte bei etwa 14.5 Å liegen, um die Arsene des AsCy3 binden zu können. Sollte diese



Bindung affin genug sein, um Bestand zu haben, wenn mit ausreichenden Konzentrationen an Dithiol gewaschen wird, um den Hintergrund gering zu halten, wäre eine Bestimmung der Substanz an den verschiedenen Varianten der CCPGCC-Motive durchzuführen. Ebenso müssten die Substanzen FIAsH und ReAsH auf ihre Affinität zu dem CCKAEAACC Motiv getestet werden. So könnte anschließend das entwickelte Protokoll für die spezifische duale Markierung mit FIAsH und ReAsH, auch auf eine Kombination FIAsH/AsCy3 oder AsCy3/ReAsH übertragen werden. Betrachtet man die Spektren der Substanzen, so wären diese Kombinationen als FRET-Paare denkbar (Abb.48).

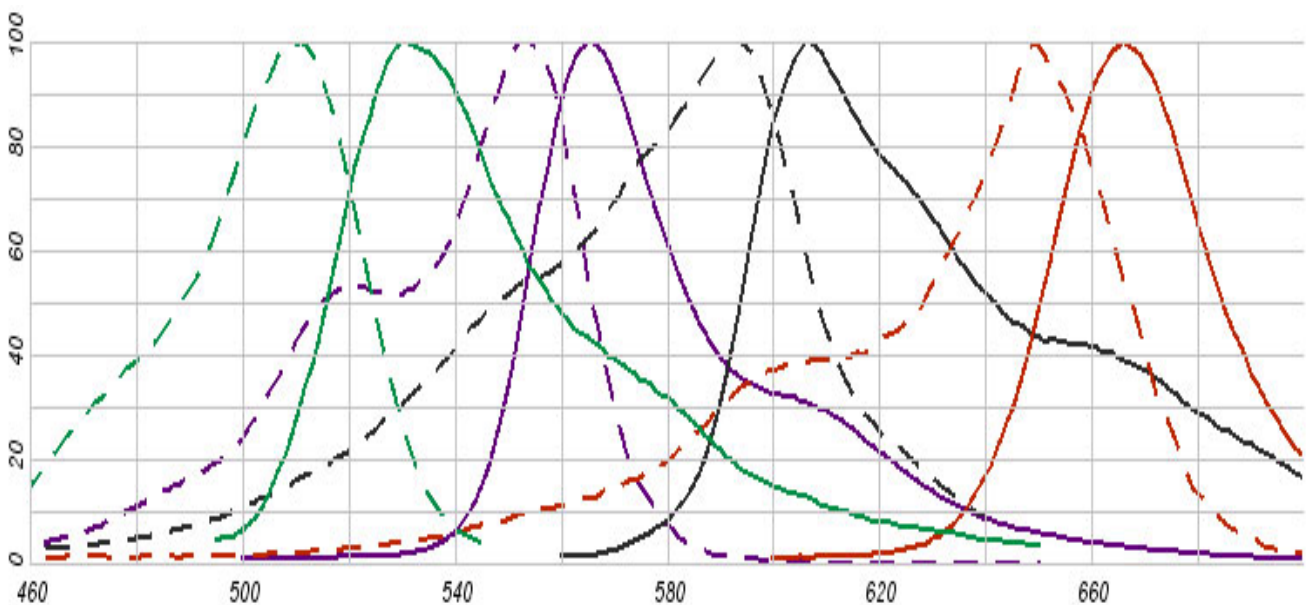


Abb.48: Die Exzitationsspektren (gestrichelt) und Emissionsspektren (durchgezogen) von FIAsH (grün), Cy3 (violett), ReAsH (schwarz) und Cy5 (rot) (<http://www.invitrogen.com>).

Die ersten Versuche zeigten jedoch keine Spezifität des AsCy3 für die postulierte Bindesequenz. Ebenso zeigte das FIAsH eine spezifische Bindung zu dem CCKAEAACC -Motiv, nach einem Waschschrift mit 250  $\mu$ M EDT.

Die Membranpermeabilität des AsCy3 ist nicht gegeben, es wäre aber durchaus eine N-terminale, also extrazelluläre Markierung von Rezeptoren denkbar. In einem solchen Fall wäre auch eine Spezifität der Markierung gegeben. Durch die Membranpermeabilität des FIAsH und des ReAsH sowie deren gezeigte Kombinierbarkeit wäre durch die zusätzliche Verwendung von AsCy3 als extrazelluläres Fluorophor eine Dreifachmarkierung von Proteinen möglich.

Diese Tatsachen zeigen, dass das AsCy3 ein interessanter Ansatz für neue niedermolekulare Fluorophore sein kann, aber noch nicht die optimalen Eigenschaften besitzt. Eine Substanz, die durch einen größeren Abstand der Cysteinpaare eine spezifische Bindung neben FIAsH oder ReAsH zulassen würde, könnte eine duale Markierung vereinfachen.

Somit wäre es wünschenswert, weitere verbesserte niedermolekulare Fluorophore zu entwickeln. Es wäre denkbar, ein Cy5 mit Arsenlinkern zu versehen, analog wie dies bei dem AsCy3 vorgenommen wurde, da Cy5 in Kombination mit FIAsH oder ReAsH als FRET-Partner dienen könnte. Cy5 besitzt eine Ethylengruppe mehr als Cy3 und ist somit lipophiler als Cy3. Dies ist eine Voraussetzung für eine gute Passage über die Zellmembran. Für eine Messung in lebenden Zellen wäre also eine Kombination von ReAsH mit AsCy5 denkbar, sofern das AsCy5 die Zellmembran passieren kann und die Bindemotive für die jeweiligen Substanzen spezifisch sind. Die spektralen Eigenschaften der beiden Substanzen lassen diese Überlegung durchaus zu (Abb. 47). Die Schwierigkeit hierbei ist das Auffinden neuer und vor allem sehr spezifischer Bindemotive, an denen der potentielle FRET-Partner nur mit geringer Affinität bindet. Das AsCy5 sollte also eine herabgesetzte Affinität zu der CCKAEAACC-Sequenz, sowie zum CCPGCC-Motiv haben.

Für AsCy3 wird die Distanz zwischen den beiden Arsenen mit 14.5 Å angegeben (Cao et al., 2007). Sieht man sich nun die Struktur des von uns vorgeschlagenen AsCy5 im Vergleich zu AsCy3 an (Abb.49), ist die gleiche Grundstruktur zu erkennen, die lediglich um eine Ethylengruppe zwischen den beiden Ringsystemen verlängert ist. Durch Berechnungen mit Hilfe von Prof. Schindelin (Strukturbiologe des Rudolf-Virchow-Zentrums) konnten die angegebenen Daten für das AsCy3 auf die Struktur des AsCy5 übertragen werden.

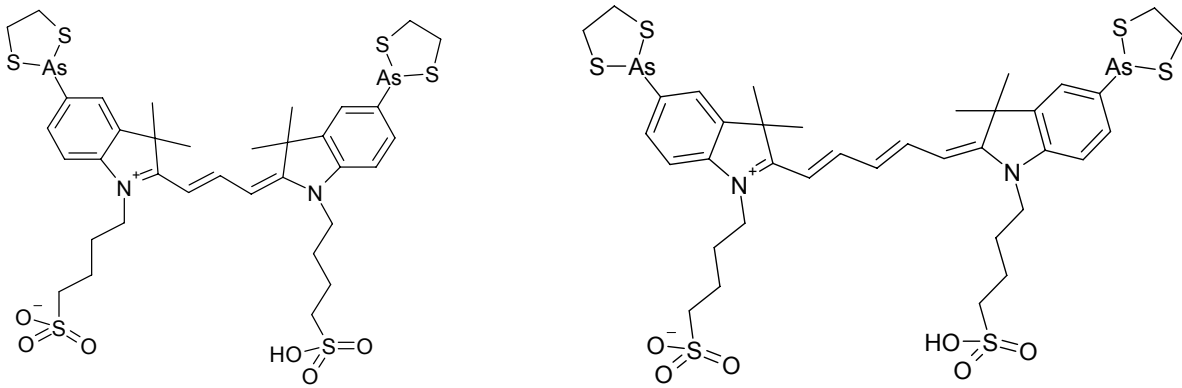


Abb.49: Struktur von AsCy3 (Cao et al.,2007) und die postulierte Struktur von AsCy5. Das AsCy5 unterscheidet sich vom AsCy3 durch eine zusätzliche Ethylengruppe und sollte daher lipophiler sein als das AsCy3. Die Strukturen wurden mit dem Programm ISIS DRAW erstellt.

So müsste unter Berücksichtigung der Bindungslängen und der Struktur einer solchen Substanz (AsCy5) die Distanz zwischen den beiden Arsenen 16,9 Å im Vergleich zu 14,5 Å bei Cy3 betragen. Das Bindemotiv CCKAEAACC stellt theoretisch eine  $\alpha$ -helikale Struktur (ca. 2,5 Windungen) dar. Daher müssten sich mit AsCy5 für eine Distanz von 16,9 Å mindestens 3 Windungen ausbilden. Durch Berechnungen wurden zwei mögliche Bindemotive entworfen: CCKAEAAKAEECC und ein um ein Alanin erweitertes Motiv, CCKAEAAKAEEACC. Dieses so modulierte AsCy5 wird derzeit von Dr. Eberhardt Heller, Institut für Pharmazie Würzburg, synthetisiert. Wir erhoffen uns, durch diese Substanz, die Möglichkeit zu erhalten, die entwickelten Protokolle darauf anzuwenden und ein verbessertes (neues) anwendbares FRET-Paar mit kleinen Fluorophoren zu etablieren.

ReAsH kann in der Kombination mit solch einer Substanz trotz der gezeigten schlechten Eigenschaften als Akzeptor als geeigneter Donor fungieren. Bei dieser Konstellation wären die Einflüsse der Quantenausbeute nicht so tragend, da ReAsH direkt angeregt würde. Allerdings bedarf es zuerst einer ausführlichen Charakterisierung des AsCy5, sollte die Synthese gelingen, und nach dem bisher gezeigten Vorbild des AsCy3 ist die Affinität und Membranpermeabilität zu überprüfen.

## **V. Zusammenfassung**

Es gibt viele Hinweise, dass G-Protein-gekoppelte Rezeptoren bei ihrer Aktivierung durch einen Agonisten ligandenselektive Konformationen eingehen. Ein tatsächlichen Beleg hierfür konnte bisher in lebenden Zellen noch nicht erbracht werden. Zu diesem Zweck wurde in dieser Arbeit ein Fluoreszenz-Resonanz-Energie-Transfer (FRET)-basierter Ansatz gewählt, um ligandenselektive Konformationen in der dritten intrazellulären Schleife des  $\alpha_{2a}$ -adrenergen Rezeptors ( $\alpha_{2a}$ -AR) in lebenden Zellen darzustellen. Dazu wurden Rezeptorsensoren erstellt, welche jeweils ein CFP am Ende des C-Terminus trugen und in der dritten intrazellulären Schleife an verschiedenen Stellen mit einem Tetracysteinmotiv versehen wurden. Drei Konstrukte wurden verglichen, die das Tetracysteinmotiv N-terminal in der Nähe der Transmembrandomäne V (I3-N), in der Mitte der dritten intrazellulären Schleife (I3-M) beziehungsweise C-terminal in der Nähe der Transmembrandomäne VI (I3-C) trugen. Die drei Rezeptorsensoren unterschieden sich hinsichtlich ihrer Ligandenbindung sowie ihrer G-Proteinaktivierung nicht vom Wildtyp  $\alpha_{2a}$ -AR.

Durch das Tetracysteinmotiv ist es möglich, den Rezeptor spezifisch mit dem niedermolekularen Fluorophor FIAsh (fluorescein arsenical hairpin binder) zu markieren, welcher als Akzeptor für den Donor CFP in FRET-Experimenten dient. Die Änderung des FRET-Signals zwischen den beiden Fluorophoren, das durch den vollen Agonist Norepinephrin ausgelöst wurde, war bei allen drei Rezeptorsensoren vergleichbar. Der starke partielle Agonist Clonidin war ebenfalls in der Lage, in allen drei Konstrukten ein ähnliches FRET-Signal hervorzurufen. Dagegen zeigte der partielle Agonist Dopamin an dem Konstrukt I3-N ein signifikant schwächeres Signal, als an I3-C. Die schwachen partiellen Agonisten Octopamin und Norphenephrin konnten an den Konstrukten I3-N und I3-M keine Änderung des FRET-Signals bewirken, wobei an I3-C eine deutliche Signaländerung detektiert wurde. Dies legt nahe, dass die Transmembrandomäne V bei der Aktivierung des Rezeptors eine kleinere Bewegung eingeht als die Transmembrandomäne VI, und bestätigt damit ein auf Röntgenstrukturanalysen basierendes Modell der Rezeptorbewegung.

Außerdem wurden die Aktivierungskinetiken für die Agonisten Norepinephrin und Dopamin verglichen. Hierbei konnte gezeigt werden, dass die durch Norepinephrin ausgelöste Bewegung an allen beobachteten Punkten gleich schnell war. Im Gegensatz dazu aktivierte Dopamin I3-C und I3-M ca. 1,5-mal langsamer, als Norepinephrin. Für das I3-N Konstrukt wurde sogar eine 3-mal langsamere

Aktivierung gemessen. Diese Daten zeigen, dass unterschiedliche Agonisten in der dritten intrazellulären Schleife spezifische Konformationen auslösen können.

Die Untersuchungen zur Rezeptorbewegung im ersten Teil dieser Arbeit wurde mit dem kleinen Fluorophor FIAsH in Kombination mit einer großen GFP-Variante durchgeführt. Im zweiten Teil dieser Arbeit wurde eine Methode entwickelt, bei der es möglich ist Proteine spezifisch mit beiden kleinen Fluorophoren FIAsH und ReAsH in einer lebenden Zelle zu markieren. Hierfür wurden zwei Tetracysteinmotive, CCPGCC und FLNCCPGCCMEP, gewählt, an die beide kleine Fluorophore kovalent binden. Durch Verdrängungsexperimente mit BAL konnte gezeigt werden, dass FIAsH für beide Motive eine dreifach höhere Affinität besitzt, als ReAsH. Dabei besitzt das FLNCCPGCCMEP-Motiv jedoch eine dreifach höhere Affinität zu dem jeweiligen Fluorophor besitzt als CCPGCC. Durch Ausnutzung dieser Affinitätsunterschiede konnte ein Protokoll entwickelt werden, mit dem es möglich ist, beide Motive in einer Zelle zu markieren. Dabei werden zunächst beide Motive mit ReAsH markiert. Durch anschließendes Waschen mit einer geeigneten Konzentration von BAL wird das ReAsH ausschließlich von der CCPGCC-Sequenz verdrängt, wohingegen die FLNCCPGCCMEP-Sequenz mit ReAsH markiert bleibt. Die nun unbesetzte CCPGCC-Sequenz kann dann anschließend mit FIAsH markiert werden, ohne dabei die Bindung des ReAsH an die FLNCCPGCCMEP-Sequenz zu beeinflussen.

Um die Funktionalität dieses Protokolls zu überprüfen, sollten zwei verschiedene Proteine mit unterschiedlicher subzellulärer Lokalisation in einer lebenden Zelle spezifisch mit jeweils einem kleinen Fluorophor markiert werden. Hierzu wurden ein PTH-Rezeptor, in dem im C-Terminus die FLNCCPGCCMEP-Sequenz eingebracht wurde, mit ReAsH und ein  $\beta$ -Arrestin-2, dem die CCPGCC-Sequenz eingebracht wurde, in Zellen co-exprimiert und gemäß dem Protokoll mit FIAsH und ReAsH markiert. Beide Proteine konnten spezifisch markiert werden, wobei der mit ReAsH markierte PTH-Rezeptor eine deutliche Lokalisation in der Zellmembran zeigte. Durch sequentielle Exzitation konnte in der gleichen Zelle das zytosolisch lokalisierte, mit FIAsH markierte  $\beta$ -Arrestin-2 detektiert werden. Wurden die so markierten Zellen mit 1  $\mu$ M PTH stimuliert, wurde das FIAsH-markierte  $\beta$ -Arrestin-2 an die Zellmembran rekrutiert. Somit konnte durch die Entwicklung dieses Protokolls eine duale spezifische Markierung von Proteinen mit zwei kleinen Fluorophoren zu innerhalb einer Zelle erreicht werden.

## **VI. Summary**

Several lines of evidence suggest that G-protein-coupled receptors can adopt different active conformations, but their direct demonstration in intact cells is still missing. Using a fluorescence resonance energy transfer (FRET)-based approach we studied conformational changes in  $\alpha_{2A}$ -adrenergic receptors ( $\alpha_{2A}$ -AR) in intact cells. The receptors were C-terminally labeled with cyan fluorescent protein (CFP) and with fluorescein arsenical hairpin binder (FIAsH) bound at a tetracysteine-motif at different sites in the third intracellular loop: N-terminally close to transmembrane domain V (I3-N), in the middle of the loop (I3-M), or C-terminally close to transmembrane domain VI (I3-C). All constructs retained normal ligand binding and signaling properties compared to the wildtype- $\alpha_{2A}$ -AR. Changes in FRET between the labels were determined in intact cells in response to different agonists. The full agonist norepinephrine evoked similar FRET-changes for all three constructs. The strong partial agonist clonidine induced partial FRET-changes for all constructs.

The partial agonist dopamine evoked a significantly weaker FRET-signal in I3-N than in I3-C. However, the weak partial agonists octopamine and norphenephrine only induced detectable changes in the construct I3-C, but no change in I3-M and I3-N. This agrees with X-ray receptor structures indicating larger agonist-induced movements at the cytoplasmic ends of transmembrane domain VI than V and suggests that partial agonism is linked to distinct conformational changes within a G-protein-coupled receptor. The kinetics of the receptor activation was compared between dopamine and norepinephrine. The kinetics for norepinephrine were similar for all three constructs. Dopamine-induced FRET-signals were  $\approx 1.5$ -fold slower than those for norepinephrine in I3-C and I3-M, but  $>3$ -fold slower in I3-N. Our data indicate that the different ligands induced conformational changes in the receptor that were sensed differently in different positions of the third intracellular loop.

Specific labeling of proteins in living cells with two different molecular probes would be an important further development for multiparameter imaging of cellular functions. Here we report a strategy to selectively label two different proteins in living cells with two different fluorophores, FIAsH and ReAsH.

Recently improved tetracysteine binding motifs have been described to selectively bind FIAsH or ReAsH. We compared the six amino acid motif CCPGCC and the

twelve amino acid motif FLNCCPGCCMEP with respect to their affinity for FIAsH and ReAsH. For both fluorophores, we observed a 3-fold higher affinity for the FLNCCPGCCMEP motif compared to CCPGCC, when washed off with BAL (British anti-Lewisite; 2,3-Dimercaptopropanol). For both target sequences, FIAsH showed more stable interactions than ReAsH. Based on these observations, we developed a protocol to demonstrate selective labeling of different proteins in the same cell. We used two target proteins that are localized in different cellular compartments. As model proteins we chose a plasmamembrane localized G protein-coupled receptor for PTH (PTH-receptor) which was C-terminally modified with the FLNCCPGCCMEP motif for labeling with ReAsH, and the cytosolic  $\beta$ -arrestin-2 protein which was C-terminally modified with the CCPGCC motif for labeling with FIAsH. Both proteins were specifically labelled with the respective fluorophores and  $\beta$ -arrestin-2 will translocate to the plasmamembrane upon agonist stimulation of the PTH receptor. Taken together our data demonstrate that FIAsH and ReAsH can be used for orthogonal labeling to different binding motifs fused to different target proteins in living cells.

## VII. Anhang

### VII.1. Abkürzungsverzeichnis

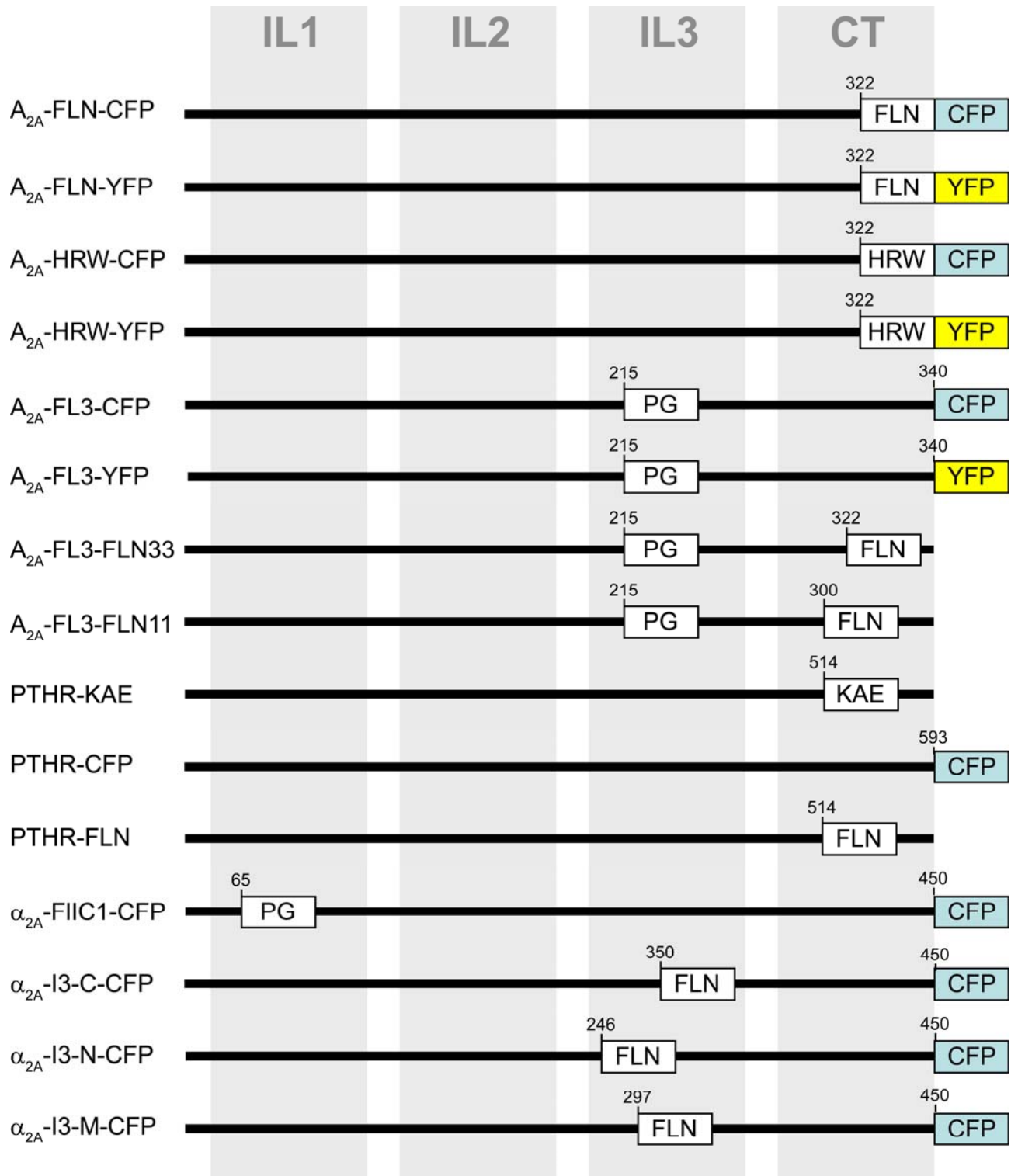
- 5-HTR Serotoninrezeptor
- Abb. Abbildung
- A<sub>2A</sub>-R Adenosin-A<sub>2A</sub>-Rezeptor
- BAL British Anti Lewisite, 2,3-Dimercaptopropanol
- BRET Biolumineszenz-Resonance-Energie-Transfer
- CFP Cyan fluoreszierendes Protein
- CL Clonidin
- CrAsH Carboxy-FIAsH
- CT C-Terminus
- DA Dopamin
- EDT Ethandithiol
- FIAsH Fluorescent Arsenical Hairpin Binder
- FLIM Fluoreszenz-Lebensdauer-Mikroskopie  
(Fluorescence lifetime imaging microscopy)
- FLN FLNCCPGCCMEP
- FRET Förster-Resonance-Energie-Transfer
- GFP Grün fluoreszierendes Protein
- GPCRs G-Protein-gekoppelte Rezeptoren
- HEK Humane endothele Nierenzelllinie  
(human endothel kidney)
- HRW HRWCCPGCCKTF
- I3 dritte Intrazelluläre Schleife
- IL intrazelluläre Schleife
- KAE CCKAEAACC
- NE Norepinephrin
- NF Norphenylephrin
- OC Octopamin
- PG CCPGCC
- PTH Parathormon



- ReAsH Red Arsenical Hairpin Binder
- RFP Rot fluoreszierendes Protein
- SplAsH Spirolactam Fluorescent Hairpinbinder
- TM Transmembrandomäne
- YFP Gelb fluoreszierendes Protein
- $\alpha_{2A}$ -AR  $\alpha_{2A}$ -adrenerger Rezeptor
- $\beta_1$ -AR  $\beta_1$ -adrenerger Rezeptor
- $\beta_2$ -AR  $\beta_2$ -adrenerger Rezeptor



**VII. 2 Übersicht der Rezeptorkonstrukte**





**VIII. Literatur**

- Adams SR, Campbell RE, Gross LA, Martin BR, Walkup GK, Yao Y, Llopis J and Tsien RY (2002) New biarsenical ligands and tetracysteine motifs for protein labeling in vitro and in vivo: synthesis and biological applications. *J Am Chem Soc* **124**(21):6063-6076.
- Adams SR and Tsien RY (2008) Preparation of the membrane-permeant biarsenicals FAsH-EDT2 and ReAsH-EDT2 for fluorescent labeling of tetracysteine-tagged proteins. *Nat Protoc* **3**(9):1527-1534.
- Alvarez VA, Arttamangkul S, Dang V, Salem A, Whistler JL, Von Zastrow M, Grandy DK and Williams JT (2002)  $\mu$ -Opioid receptors: Ligand-dependent activation of potassium conductance, desensitization, and internalization. *J Neurosci* **22**(13):5769-5776.
- Andresen M, Schmitz-Salue R and Jakobs S (2004) Short tetracysteine tags to beta-tubulin demonstrate the Significance of small labels for live cell imaging. *Mol Biol Cell* **15**(12):5616-5622.
- Baker JG and Hill SJ (2007) Multiple GPCR conformations and signalling pathways: implications for antagonist affinity estimates. *Trends Pharmacol Sci* **28**(8):374-381.
- Berg KA, Maayani S, Goldfarb J, Scaramellini C, Leff P and Clarke WP (1998) Effector pathway-dependent relative efficacy at serotonin type 2A and 2C receptors: evidence for agonist-directed trafficking of receptor stimulus. *Mol Pharmacol* **54**(1):94-104.
- Bhunja AK and Miller SC (2007) Labeling Tetracysteine-Tagged Proteins with a SplAsH of Color: A Modular Approach to Bis-Arsenical Fluorophores. *Chembiochem* **8**(14):1642-1645.
- Birnboim HC and Doly J (1979) A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucleic Acids Res* **7**(6):1513-1523.
- Bissantz C (2003) Conformational changes of G protein-coupled receptors during their activation by agonist binding. *J Recept Signal Transduct Res* **23**(2-3):123-153.
- Borst JW, Laptinok SP, Westphal AH, Kuhnemuth R, Hornen H, Visser NV, Kalinin S, Aker J, van Hoek A, Seidel CA and Visser AJ (2008) Structural changes of yellow Cameleon domains observed by quantitative FRET analysis and polarized fluorescence correlation spectroscopy. *Biophys J* **95**(11):5399-5411.
- Bradford MM (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* **72**:248-254.
- Bunemann M, Bucheler MM, Philipp M, Lohse MJ and Hein L (2001) Activation and deactivation kinetics of alpha 2A- and alpha 2C-adrenergic receptor-activated G protein-activated inwardly rectifying K<sup>+</sup> channel currents. *J Biol Chem* **276**(50):47512-47517.
- Burgueno J, Blake DJ, Benson MA, Tinsley CL, Esapa CT, Canela EI, Penela P, Mallol J, Mayor F, Jr., Lluís C, Franco R and Ciruela F (2003) The adenosine A2A receptor interacts with the actin-binding protein alpha-actinin. *J Biol Chem* **278**(39):37545-37552.
- Cao H, Chen B, Squier TC and Mayer MU (2006) CrAsH: a biarsenical multi-use affinity probe with low non-specific fluorescence. *Chem Commun (Camb)*(24):2601-2603.
- Cao H, Xiong Y, Wang T, Chen B, Squier TC and Mayer MU (2007) A red cy3-based biarsenical fluorescent probe targeted to a complementary binding peptide. *J Am Chem Soc* **129**(28):8672-8673.

- Chen B, Cao H, Yan P, Mayer MU and Squier TC (2007) Identification of an orthogonal peptide binding motif for biarsenical multiuse affinity probes. *Bioconjug Chem* **18**(4):1259-1265.
- Chung CT and Miller RH (1988) A rapid and convenient method for the preparation and storage of competent bacterial cells. *Nucleic Acids Res* **16**(8):3580.
- Clayton AH, Klonis N, Cody SH and Nice EC (2005) Dual-channel photobleaching FRET microscopy for improved resolution of protein association states in living cells. *Eur Biophys J* **34**(1):82-90.
- Eason MG and Liggett SB (1995) Identification of a Gs coupling domain in the amino terminus of the third intracellular loop of the alpha 2A-adrenergic receptor. Evidence for distinct structural determinants that confer Gs versus Gi coupling. *J Biol Chem* **270**(42):24753-24760.
- Falke JJ and Koshland DE, Jr. (1987) Global flexibility in a sensory receptor: a site-directed cross-linking approach. *Science* **237**(4822):1596-1600.
- Farrens DL, Altenbach C, Yang K, Hubbell WL and Khorana HG (1996) Requirement of rigid-body motion of transmembrane helices for light activation of rhodopsin. *Science* **274**(5288):768-770.
- Förster T (1948) Zwischenmolekulare Energiewanderung und Fluoreszenz. *Annalen der Physik* **2**:pg. 55-75. 57
- Fujitsuka M, Cho DW, Shiragami T, Yasuda M and Majima T (2006) Intramolecular electron transfer from axial ligand to S<sub>2</sub>-excited Sb-tetraphenylporphyrin. *J Phys Chem B* **110**(19):9368-9370.
- Gautier A, Juillerat A, Heinis C, Correa IR, Jr., Kindermann M, Beaufils F and Johnsson K (2008) An engineered protein tag for multiprotein labeling in living cells. *Chem Biol* **15**(2):128-136.
- Gether U (2000) Uncovering molecular mechanisms involved in activation of G protein-coupled receptors. *Endocr Rev* **21**(1):90-113.
- Gether U, Lin S, Ghanouni P, Ballesteros JA, Weinstein H and Kobilka BK (1997) Agonists induce conformational changes in transmembrane domains III and VI of the beta2 adrenoceptor. *Embo J* **16**(22):6737-6747.
- Gether U, Lin S and Kobilka BK (1995) Fluorescent labeling of purified beta 2 adrenergic receptor. Evidence for ligand-specific conformational changes. *J Biol Chem* **270**(47):28268-28275.
- Ghanouni P, Gryczynski Z, Steenhuis JJ, Lee TW, Farrens DL, Lakowicz JR and Kobilka BK (2001a) Functionally different agonists induce distinct conformations in the G protein coupling domain of the beta 2 adrenergic receptor. *J Biol Chem* **276**(27):24433-24436.
- Ghanouni P, Steenhuis JJ, Farrens DL and Kobilka BK (2001b) Agonist-induced conformational changes in the G-protein-coupling domain of the beta 2 adrenergic receptor. *Proc Natl Acad Sci U S A* **98**(11):5997-6002.
- Goldsmith CR, Jaworski J, Sheng M and Lippard SJ (2006) Selective labeling of extracellular proteins containing polyhistidine sequences by a fluorescein-nitrilotriacetic acid conjugate. *J Am Chem Soc* **128**(2):418-419.
- Granier S, Kim S, Shafer AM, Ratnala VR, Fung JJ, Zare RN and 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**(18):13895-13905.
- Griffin BA, Adams SR and Tsien RY (1998) Specific covalent labeling of recombinant protein molecules inside live cells. *Science* **281**(5374):269-272.

- Gronemeyer T, Chidley C, Juillerat A, Heinis C and Johnsson K (2006) Directed evolution of O6-alkylguanine-DNA alkyltransferase for applications in protein labeling. *Protein Eng Des Sel* **19**(7):309-316.
- Guignet EG, Hovius R and Vogel H (2004) Reversible site-selective labeling of membrane proteins in live cells. *Nat Biotechnol* **22**(4):440-444.
- Hein P, Rochais F, Hoffmann C, Dorsch S, Nikolaev VO, Engelhardt S, Berlot CH, Lohse MJ and Bunemann M (2006) GS Activation Is Time-limiting in Initiating Receptor-mediated Signaling. *J Biol Chem* **281**(44):33345-33351.
- Ho SN, Hunt HD, Horton RM, Pullen JK and Pease LR (1989) Site-directed mutagenesis by overlap extension using the polymerase chain reaction. *Gene* **77**(1):51-59.
- Hoffmann C, Gaietta G, Bunemann M, Adams SR, Oberdorff-Maass S, Behr B, Vilaradaga JP, Tsien RY, Ellisman MH and Lohse MJ (2005) A FRET-based FRET approach to determine G protein-coupled receptor activation in living cells. *Nat Methods* **2**(3):171-176.
- Hoffmann C, Zurn A, Bunemann M and Lohse MJ (2008) Conformational changes in G-protein-coupled receptors-the quest for functionally selective conformations is open. *Br J Pharmacol* **153 Suppl 1**:S358-366.
- Hoyer D, Hannon JP and Martin GR (2002) Molecular, pharmacological and functional diversity of 5-HT receptors. *Pharmacol Biochem Behav* **71**(4):533-554.
- Hubbell WL, Altenbach C, Hubbell CM and Khorana HG (2003) Rhodopsin structure, dynamics, and activation: a perspective from crystallography, site-directed spin labeling, sulfhydryl reactivity, and disulfide cross-linking. *Adv Protein Chem* **63**:243-290.
- Hubbell WL, Gross A, Langen R and Lietzow MA (1998) Recent advances in site-directed spin labeling of proteins. *Curr Opin Struct Biol* **8**(5):649-656.
- Jahns R, Boivin V, Schwarzbach V, Ertl G and Lohse MJ (2008) Pathological autoantibodies in cardiomyopathy. *Autoimmunity* **41**(6):454-461.
- Jares-Erijman EA and Jovin TM (2006) Imaging molecular interactions in living cells by FRET microscopy. *Curr Opin Chem Biol* **10**(5):409-416.
- Kapanidis AN, Ebright YW and Ebright RH (2001) Site-specific incorporation of fluorescent probes into protein: hexahistidine-tag-mediated fluorescent labeling with (Ni(2+):nitrilotriacetic Acid (n)-fluorochrome conjugates. *J Am Chem Soc* **123**(48):12123-12125.
- Kenakin T (1997) Agonist-specific receptor conformations. *Trends Pharmacol Sci* **18**(11):416-417.
- Keppler A, Pick H, Arrivoli C, Vogel H and Johnsson K (2004) Labeling of fusion proteins with synthetic fluorophores in live cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* **101**(27):9955-9959.
- Kobilka B and Schertler GF (2008) New G-protein-coupled receptor crystal structures: insights and limitations. *Trends Pharmacol Sci* **29**(2):79-83.
- Kobilka BK (2007) G protein coupled receptor structure and activation. *Biochim Biophys Acta* **1768**(4):794-807.
- Kobilka BK and Deupi X (2007) Conformational complexity of G-protein-coupled receptors. *Trends Pharmacol Sci* **28**(8):397-406.
- Lisenbee CS, Karnik SK and Trelease RN (2003) Overexpression and mislocalization of a tail-anchored GFP redefines the identity of peroxisomal ER. *Traffic* **4**(7):491-501.
- Lohse MJ, Benovic JL, Codina J, Caron MG and Lefkowitz RJ (1990) beta-Arrestin: a protein that regulates beta-adrenergic receptor function. *Science* **248**(4962):1547-1550.
- Lohse MJ, Hoffmann C, Nikolaev VO, Vilaradaga JP and Bunemann M (2007) Kinetic analysis of G protein-coupled receptor signaling using fluorescence resonance energy transfer in living cells. *Adv Protein Chem* **74**:167-188.

- Lohse MJ, Nikolaev VO, Hein P, Hoffmann C, Vilardaga JP and Bunemann M (2008) Optical techniques to analyze real-time activation and signaling of G-protein-coupled receptors. *Trends Pharmacol Sci* **29**(3):159-165.
- Mailman RB (2007) GPCR functional selectivity has therapeutic impact. *Trends Pharmacol Sci* **28**(8):390-396.
- Marinissen MJ and Gutkind JS (2001) G-protein-coupled receptors and signaling networks: emerging paradigms. *Trends Pharmacol Sci* **22**(7):368-376.
- Marjamaki A, Frang H, Pihlavisto M, Hoffren AM, Salminen T, Johnson MS, Kallio J, Javitch JA and Scheinin M (1999) Chloroethylclonidine and 2-aminoethyl methanethiosulfonate recognize two different conformations of the human alpha(2A)-adrenergic receptor. *J Biol Chem* **274**(31):21867-21872.
- Martin BR, Giepmans BN, Adams SR and Tsien RY (2005) Mammalian cell-based optimization of the biarsenical-binding tetracysteine motif for improved fluorescence and affinity. *Nat Biotechnol* **23**(10):1308-1314.
- Meng EC and Bourne HR (2001) Receptor activation: what does the rhodopsin structure tell us? *Trends Pharmacol Sci* **22**(11):587-593.
- Murakami M and Kouyama T (2008) Crystal structure of squid rhodopsin. *Nature* **453**(7193):363-367.
- Nakanishi J, Maeda M and Umezawa Y (2004) A new protein conformation indicator based on biarsenical fluorescein with an extended benzoic acid moiety. *Anal Sci* **20**(2):273-278.
- Nakanishi J, Nakajima T, Sato M, Ozawa T, Tohda K and Umezawa Y (2001) Imaging of conformational changes of proteins with a new environment-sensitive fluorescent probe designed for site-specific labeling of recombinant proteins in live cells. *Anal Chem* **73**(13):2920-2928.
- Nikolaev VO, Hoffmann C, Bunemann M, Lohse MJ and Vilardaga JP (2006) Molecular Basis of Partial Agonism at the Neurotransmitter {alpha}2A-Adrenergic Receptor and Gi-protein Heterotrimer. *J Biol Chem* **281**(34):24506-24511.
- Nyronen T, Pihlavisto M, Peltonen JM, Hoffren AM, Varis M, Salminen T, Wurster S, Marjamaki A, Kanerva L, Katainen E, Laaksonen L, Savola JM, Scheinin M and Johnson MS (2001) Molecular mechanism for agonist-promoted alpha(2A)-adrenoceptor activation by norepinephrine and epinephrine. *Mol Pharmacol* **59**(5):1343-1354.
- Palczewski K, Kumasaka T, Hori T, Behnke CA, Motoshima H, Fox BA, Le Trong I, Teller DC, Okada T, Stenkamp RE, Yamamoto M and Miyano M (2000) Crystal structure of rhodopsin: A G protein-coupled receptor. *Science* **289**(5480):739-745.
- Park JH, Scheerer P, Hofmann KP, Choe HW and Ernst OP (2008a) Crystal structure of the ligand-free G-protein-coupled receptor opsin. *Nature* **454**(7201):183-187.
- Park PS, Lodowski DT and Palczewski K (2008b) Activation of G protein-coupled receptors: beyond two-state models and tertiary conformational changes. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* **48**:107-141.
- Perez DM and Karnik SS (2005) Multiple signaling states of G-protein-coupled receptors. *Pharmacol Rev* **57**(2):147-161.
- Rasmussen SG, Choi HJ, Rosenbaum DM, Kobilka TS, Thian FS, Edwards PC, Burghammer M, Ratnala VR, Sanishvili R, Fischetti RF, Schertler GF, Weis WI and Kobilka BK (2007) Crystal structure of the human beta2 adrenergic G-protein-coupled receptor. *Nature* **450**(7168):383-387.
- Roberti MJ, Bertoncini CW, Klement R, Jares-Erijman EA and Jovin TM (2007) Fluorescence imaging of amyloid formation in living cells by a functional, tetracysteine-tagged alpha-synuclein. *Nat Methods* **4**(4):345-351.



- Robia SL, Campbell KS, Kelly EM, Hou Z, Winters DL and Thomas DD (2007) Forster transfer recovery reveals that phospholamban exchanges slowly from pentamers but rapidly from the SERCA regulatory complex. *Circ Res* **101**(11):1123-1129.
- Robia SL, Flohr NC and Thomas DD (2005) Phospholamban pentamer quaternary conformation determined by in-gel fluorescence anisotropy. *Biochemistry* **44**(11):4302-4311.
- Rochais F, Vilardaga JP, Nikolaev VO, Bunemann M, Lohse MJ and Engelhardt S (2007) Real-time optical recording of beta1-adrenergic receptor activation reveals supersensitivity of the Arg389 variant to carvedilol. *J Clin Invest* **117**(1):229-235.
- Saiki RK, Gelfand DH, Stoffel S, Scharf SJ, Higuchi R, Horn GT, Mullis KB and Erlich HA (1988) Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science* **239**(4839):487-491.
- Schertler GF (2005) Structure of rhodopsin and the metarhodopsin I photointermediate. *Curr Opin Struct Biol* **15**(4):408-415.
- Schertler GF (2008) Signal transduction: the rhodopsin story continued. *Nature* **453**(7193):292-293.
- Shaner NC, Campbell RE, Steinbach PA, Giepmans BN, Palmer AE and Tsien RY (2004) Improved monomeric red, orange and yellow fluorescent proteins derived from *Discosoma* sp. red fluorescent protein. *Nat Biotechnol* **22**(12):1567-1572.
- Sheikh SP, Zvyaga TA, Lichtarge O, Sakmar TP and Bourne HR (1996) Rhodopsin activation blocked by metal-ion-binding sites linking transmembrane helices C and F. *Nature* **383**(6598):347-350.
- Shimomura O, Johnson FH and Saiga Y (1963) Further Data on the Bioluminescent Protein, Aequorin. *J Cell Physiol* **62**:1-8.
- Soh N (2008) Selective Chemical Labeling of Proteins with Small Fluorescent Molecules Based on Metal-Chelation Methodology *Sensors* **8**(2):1004-1102.
- Spagnuolo CC, Vermeij RJ and Jares-Erijman EA (2006) Improved photostable FRET-competent biarsenical-tetracysteine probes based on fluorinated fluoresceins. *J Am Chem Soc* **128**(37):12040-12041.
- Sternweis PC and Robishaw JD (1984) Isolation of two proteins with high affinity for guanine nucleotides from membranes of bovine brain. *J Biol Chem* **259**(22):13806-13813.
- Stryer L (1978) Fluorescence energy transfer as a spectroscopic ruler. *Annu Rev Biochem* **47**:819-846.
- Trester-Zedlitz M, Burlingame A, Kobilka B and von Zastrow M (2005) Mass spectrometric analysis of agonist effects on posttranslational modifications of the beta-2 adrenoceptor in mammalian cells. *Biochemistry* **44**(16):6133-6143.
- Tsien RY (1998) The green fluorescent protein. *Annu Rev Biochem* **67**:509-544.
- 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 and Mailman RB (2007) Functional selectivity and classical concepts of quantitative pharmacology. *J Pharmacol Exp Ther* **320**(1):1-13.
- Vauquelin G and Van Liefde I (2005) G protein-coupled receptors: a count of 1001 conformations. *Fundam Clin Pharmacol* **19**(1):45-56.
- Vilardaga JP, Bunemann M, Krasel C, Castro M and Lohse MJ (2003) Measurement of the millisecond activation switch of G protein-coupled receptors in living cells. *Nat Biotechnol* **21**(7):807-812.
- Vilardaga JP, Frank M, Krasel C, Dees C, Nissenson RA and Lohse MJ (2001) Differential conformational requirements for activation of G proteins and the regulatory proteins arrestin and G protein-coupled receptor kinase in the G protein-coupled receptor for parathyroid hormone (PTH)/PTH-related protein. *J Biol Chem* **276**(36):33435-33443.

- Wang T, Yan P, Squier TC and Mayer MU (2007) Prospecting the proteome: identification of naturally occurring binding motifs for biarsenical probes. *ChemBiochem* **8**(16):1937-1940.
- Wess J (1998) Molecular basis of receptor/G-protein-coupling selectivity. *Pharmacol Ther* **80**(3):231-264.
- Whistler JL, Chuang HH, Chu P, Jan LY and von Zastrow M (1999) Functional dissociation of mu opioid receptor signaling and endocytosis: implications for the biology of opiate tolerance and addiction. *Neuron* **23**(4):737-746.
- Wieland K, Zuurmond HM, Krasel C, Ijzerman AP and 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**(17):9276-9281.
- Wong SK (2003) G protein selectivity is regulated by multiple intracellular regions of GPCRs. *Neurosignals* **12**(1):1-12.
- Yao X, Parnot C, Deupi X, Ratnala VR, Swaminath G, Farrens D and Kobilka B (2006a) Coupling ligand structure to specific conformational switches in the beta2-adrenoceptor. *Nat Chem Biol* **2**(8):417-422.
- Yao X, Parnot C, Deupi X, Ratnala VR, Swaminath G, Farrens D and Kobilka B (2006b) Coupling ligand structure to specific conformational switches in the beta(2)-adrenoceptor. *Nat Chem Biol* **2**(8):417-422.
- Yasuda R (2006) Imaging spatiotemporal dynamics of neuronal signaling using fluorescence resonance energy transfer and fluorescence lifetime imaging microscopy. *Curr Opin Neurobiol* **16**(5):551-561.
- Zurn A, Zabel U, Vilardaga JP, Schindelin H, Lohse MJ and Hoffmann C (2008) FRET-Analysis of {alpha}2a-Adrenergic Receptor Activation Reveals Distinct Agonist-specific Conformational Changes. *Mol Pharmacol*.

### **IX. Publikationen**

**Zürn A**, Zabel U, Vilardaga JP, Schindelin H, Lohse MJ and Hoffmann C (2009)

FRET-Analysis of  $\alpha_{2a}$ -adrenergic receptor activation reveals distinct agonist specific conformational changes.

*Mol Pharmacol.*, doi:10.1124/mol.108.052399

Hoffmann C, **Zürn A**, Bunemann M and Lohse MJ (2008)

conformational changes in G-protein-coupled receptors - the quest for functionally selective conformations is open.

*Br J Pharmacol* **153 Suppl 1**:S358-366.

### **Kongressbeiträge**

**A.Zürn**, U. Zabel, J.-P. Vilardaga, M.J. Lohse, C. Hoffmann: (2007)

*Optical recording of differential conformational changes within the 3<sup>rd</sup> intracellular loop of the  $\alpha_{2A}$ -adrenergic receptor for full and partial agonists in living cells.*

DPTG Jahrestagung 2007, Mainz

*Naunyn-Schmiedebergs Archives of Pharmacology*, , **375**, 24 Suppl. 1

**Zürn A**, Zabel U, Vilardaga JP, Lohse MJ and Hoffmann C

*Visualisation of differential conformational changes within the 3<sup>rd</sup> intracellular loop of the  $\alpha_{2A}$ -adrenergic receptor for full and partial agonists by optical recording in living cells*

Biochemical Society focused meeting, Stevenage, UK, April 2007

**Zürn A**, Zabel U, Vilardaga JP, Lohse MJ and Hoffmann C

*Induction of ligand selective conformations by full and partial agonists at the  $\alpha_{2a}$ -adrenergic receptor – optical recording in living cells*

XXXII. European Conference on Hormones and Cell Regulation

13.-16. September 2007 in Mont St. Odile, Frankreich

**Zürn A**, Zabel U, Vilardaga JP, Lohse MJ and Hoffmann C

*FRET in living cells – derivatives of Norepinephrine induce individual conformations of the  $\alpha_{2a}$ -Adrenergic Receptor*

Jahrestagung der Deutschen Pharmazeutischen Gesellschaft

10.-13. Oktober 2007 in Erlangen

**Zürn A**, Klenk JC, Zabel U, Lohse MJ, Hoffmann C

*Site – specific labelling of proteins with FIAsh and ReAsH in living cells*

EMBL Conference on Chemical Biology 2008

8.-11- Oktober 2008 in Heidelberg

## **X. Danksagung**

Ich danke Frau Professor Dr. Schirmeister, dass sie sich bereit erklärt hat meine Doktorarbeit im Institut für Pharmazie und Lebensmittelchemie zu betreuen.

Ich bedanke mich herzlich bei Herrn Professor Dr. Lohse für die Möglichkeit in der Pharmakologie meine Doktorarbeit anzufertigen. Ich bedanke mich auch für die vielen Diskussionen über die Möglichkeiten und Limitationen von FRET sowie für den Gedankenaustausch über die Bewegung des C-Terminus von GPCRs. Die Möglichkeiten an Konferenzen teilzunehmen wird mir immer positiv in Erinnerung bleiben. Vielen Dank für das in mich gesetzte Vertrauen.

Ich danke besonders Dr. Carsten Hoffmann, der die Ideen zu meiner Arbeit hatte und mir immer mit gutem Rat zur Seite stand. Vor allem danke ich ihm dafür, dass in der Zeit, in der keiner geglaubt hat, dass man mit ReAsH arbeiten kann, ich von ihm volle Unterstützung und Hilfe bekam. Danke insbesondere für die Geduld und das offene Ohr, alle meine „fancy ideas“ ernst zu nehmen. Ein großer Erfolg unserer Zusammenarbeit der letzten drei Jahre ist, neben dieser Arbeit, nicht zu letzt, dass ich mich über einen Sieg von Werder Bremen freue und Du mit mir um den Glubb bangst!

Für die große Geduld mit mir danke ich dem ersten Stock, vor allem aber dem Labor 113. Nicole, ich weiß gar nicht wie ich Dir danken kann, ich weiß nur, ohne Dich gäbe es diese Arbeit nicht. Insbesondere danke ich Susi für ihre Geduld, wenn ich mal wieder keine hatte! Ulrike, ohne das viele Lachen mit Dir und Deine unglaubliche Hilfe hätte das alles nichts werden können! DANKE!

Nina, vielen Dank für die Zeit, in der Du mich wieder runter gebracht und mit mir vor dem PC ausgeharrt hast, sowohl im Labor, als auch abends mit Rotwein.

Ich danke der gesamten Pharmakologie, Toxikologie und dem RVZ, von Professoren über TAs bis hin zur Haustechnik, Werkstatt und den Reinigungskräften. Es würde zu lange dauern alle zu erwähnen, aber ich weiß wie viel Hilfe ich erhalten habe. Ich habe viele tolle Menschen kennen gelernt, die ich nie wieder missen möchte! DANKE!

## *Danksagung*

---

Ich danke meinen Freunden. Ich weiß ich war nicht immer anwesend, aber Ihr seid immer für mich da gewesen! Meinen Eltern, vor allem meiner Oma und meinen Großeltern in Frankreich, Patricia und Marco, danke ich für die Unterstützung. Ute, danke für die Korrektur und die Deutsch-Nachhilfe.

Ich danke meinem Sohn Maximilian, der sooooo große Geduld mit mir hatte und immer verständnisvoll war, wenn ich mal wenig Zeit hatte. Es hat mich immer aufgebaut, zu wissen, dass Du stolz darauf bist, dass Dein Papa im Labor die Zellen zum Leuchten bringt. DANKE!

Susanne, ich danke Dir, dass Du die Zeit mit mir durch gestanden hast, auch wenn es oft hart war! Ich Danke dafür, dass ich Dich habe! Ein großer Teil dieser Arbeit ist Dein Verdienst!