

Untersuchung des Recyclings des
Corticotropin-Releasing Factor-Rezeptors Typ 1
mit Hilfe von Kaede-Fusionsproteinen

Dissertation

Zur Erlangung des akademischen Grades
des Doktors der Naturwissenschaften (Dr. rer. nat.)

Eingereicht an der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät
am Institut für Ernährungswissenschaft
der Universität Potsdam

vorgelegt von

Antje Schmidt

Berlin, März 2009

Dieses Werk ist unter einem Creative Commons Lizenzvertrag lizenziert:
Namensnennung - Keine kommerzielle Nutzung - Weitergabe unter gleichen Bedingungen
3.0 Deutschland
Um die Bedingungen der Lizenz einzusehen, folgen Sie bitte dem Hyperlink:
<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/3.0/de/>

Online veröffentlicht auf dem
Publikationsserver der Universität Potsdam:
URL <http://opus.kobv.de/ubp/volltexte/2009/3490/>
URN urn:nbn:de:kobv:517-opus-34902
[<http://nbn-resolving.org/urn:nbn:de:kobv:517-opus-34902>]

Untersuchung des Recyclings des
Corticotropin-Releasing Factor-Rezeptors Typ 1
mit Hilfe von Kaede-Fusionsproteinen

Antje Schmidt
Berlin, März 2009

Diese Arbeit wurde von November 2005 bis März 2009 am Leibniz-Institut für Molekulare Pharmakologie in Berlin unter Leitung von PD Dr. Ralf Schüle und Prof. Dr. Walter Rosenthal angefertigt.

Eidesstattliche Erklärung

Hiermit erkläre ich, die vorliegende Arbeit selbstständig und ohne unerlaubte Hilfe angefertigt und alle Hilfsmittel und Inhalte aus anderen Quellen als solche kenntlich gemacht zu haben. Des Weiteren versichere ich, dass die vorliegende Arbeit nie Gegenstand eines früheren Promotionsverfahrens war. Die dem Verfahren zugrunde liegende Promotionsordnung ist mir bekannt.

Berlin, den

Inhaltsverzeichnis

I	Abbildungsverzeichnis	4
II	Abkürzungsverzeichnis	6
III	Zusammenfassung	9
IV	Summary	11
1	Einleitung	13
1.1	G-Protein-gekoppelte Rezeptoren (GPCR)	13
1.1.1	Der intrazelluläre Transport von GPCR (sekretorischer Weg)	14
1.1.2	Aktivierungsmechanismen von GPCR	16
1.1.3	Beendigung der Signaltransduktion und Desensibilisierung von GPCR	16
1.1.4	Internalisierungsmechanismen von GPCR	17
1.1.4.1	Die Clathrin-vermittelte Internalisierung	17
1.1.4.2	Internalisierungssignale von GPCR	18
1.1.5	Die intrazelluläre Sortierung internalisierter GPCR	19
1.1.5.1	Recyclingmechanismen von GPCR	20
1.1.5.2	Degradationsmechanismen von GPCR	21
1.1.5.3	Der Einfluss von β -Arrestin auf die Sortierung der GPCR	22
1.1.5.4	Der Einfluss von Rab-Proteinen auf die intrazelluläre Sortierung von Proteinen	22
1.2	Die CRF-Rezeptoren	23
1.3	Die Vasopressin-Rezeptoren	24
1.4	Fluoreszierende Proteine als Marker zur Proteinlokalisierung	26
1.4.1	Die Familien der Fluoreszenzproteine	26
1.4.2	Das grünfluoreszierende Protein (GFP) und seine Anwendungen	27
1.4.3	Eigenschaften des Kaede-Proteins	28
2	Fragestellung	30
3	Material und Methoden	31
3.1	Material	31
3.1.1	Chemikalien und Reagenzien	31
3.1.2	Geräte	33
3.1.3	Software	34
3.1.4	Bakterienstämme und eukaryotische Zelllinien	35
3.1.5	Desoxyribonukleinsäuren	35
3.1.5.1	Vektoren	35
3.1.5.2	Rekombinante Plasmide	35
3.1.5.3	Oligonukleotide	36
3.1.6	Flüssigmedien, Agarplatten und Antibiotika für <i>E. coli</i>	37

3.1.7	Flüssigmedien und Zusätze für eukaryotische Zelllinien	37
3.2	Methoden	38
3.2.1	Molekularbiologische Methoden	38
3.2.1.1	Plasmid-DNA-Isolierung	38
3.2.1.2	Restriktionsverdau und Agarosegelelektrophorese	38
3.2.1.3	Aufreinigung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen	38
3.2.1.4	Ligation	39
3.2.1.5	Gerichtete Mutagenese	39
3.2.1.6	LIC-Klonierung	40
3.2.1.7	Transformation von Plasmid-DNA in <i>E. coli</i>	41
3.2.1.8	Sequenzierung	42
3.2.2	Zellkulturtechniken	42
3.2.2.1	Beschichtung von Deckgläsern und Zellkulturschalen	42
3.2.2.2	Transfektion von HEK-293-Zellen	43
3.2.3	Mikroskopische Methoden an lebenden HEK-293-Zellen	44
3.2.3.1	Kolokalisationsstudien	44
3.2.3.2	Kaede-basierte Untersuchungen des Rezeptorrecyclings	46
3.2.3.3	Kaede-basierte Untersuchungen von Rezeptorbiosynthese und -transport	47
3.2.3.4	Untersuchungen zur Stabilität des Kaede-Proteins	47
3.2.4	Durchflusscytometrische Messungen zur Untersuchung des Rezeptorrecyclings	48
3.2.5	Fluoreszenz-Korrelations-Spektroskopie (FCS) zur Untersuchung des Oligomerisierungsstatus des Kaede-Proteins	49
3.2.6	Proteinbiochemische Methoden	52
3.2.6.1	Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE), Immunoblot und Coomassie-Brillantblau-Färbung	52
3.2.6.2	Immunpräzipitation	54
3.2.6.3	Untersuchung des Glykosylierungsstatus der Rezeptoren	54
3.2.6.4	Biotinylierung von Oberflächenproteinen	55
3.2.6.5	Immunisolierung intrazellulärer Vesikel	56
3.2.6.6	Aufreinigung des Kaede-Proteins	56
3.2.6.7	Proteinbestimmung nach Bradford	57
3.2.6.8	Limitierte Proteolyse des rekombinanten Kaede-Proteins	57
3.2.7	Pharmakologische Methoden	58
3.2.7.1	Bindungsexperimente	58
3.2.7.2	Bestimmung der <i>second messenger</i> -Konzentrationen	59
3.2.8	Analyse der Interaktionsflächen innerhalb des Kaede-Tetramers	60

4	Ergebnisse und Auswertung	62
4.1	Gewinnung eines Kaede-Antikörpers zur Detektion von Kaede-Fusionsproteinen	62
4.2	Herstellung eines monomeren Kaede-Proteins	64
4.3	Untersuchung des Oligomerisierungsstatus des Kaede-Proteins	67
4.4	Analyse der Stabilität des Kaede-Proteins nach UV-Bestrahlung	70
4.5	Untersuchung des Einflusses des Kaede-Proteins auf die Rezeptorfunktion von GPCR	72
4.5.1	In dieser Arbeit verwendete Konstrukte	72
4.5.2	Untersuchung der subzellulären Lokalisation Kaede- und CFP-fusionierter GPCR	73
4.5.3	Untersuchung des Glykosylierungsstatus der CFP-fusionierten Rezeptoren	75
4.5.4	Analyse der pharmakologischen Eigenschaften Kaede-fusionierter Rezeptoren	76
4.6	Untersuchung des Rezeptorrecyclings mit Hilfe von Kaede-Fusionsproteinen	78
4.6.1	Kaede-basierte Untersuchung des Rezeptorrecyclings	79
4.6.2	Durchflusscytometrische Analyse des Rezeptorrecyclings	84
4.6.3	Biochemische Untersuchung des Rezeptorrecyclings	85
4.7	Charakterisierung der am CRF ₁ R-Recycling beteiligten Proteine	86
4.7.1	Charakterisierung der β -Arrestin-2-Bindung der Rezeptoren	87
4.7.2	Kolokalisationsstudien mit Recycling- und Degradationsmarkern	89
4.7.3	Kaede-Fusionen zur Messung der Transportgeschwindigkeit von GPCR	90
5	Diskussion	93
5.1	Mögliche Bedeutung des CRF ₁ R-Recyclings	93
5.1.1	Putative Recyclingsignale in den cytoplasmatischen Domänen des CRF ₁ R	94
5.1.2	Weitere Eigenschaften des CRF ₁ R-Rezeptors, die ein Recycling begünstigen könnten	94
5.1.3	Mögliche Wege des CRF ₁ R-Recyclings	95
5.1.4	Vollständigkeit des CRF ₁ R-Recyclings	96
5.1.5	Der Einfluss der konstitutiven Internalisierung auf das Recycling des CRF ₁ R	96
5.2	Anwendung des Kaede-Proteins als Fusionspartner für Transportstudien	98
5.2.1	Experimentelle Monomerisierung des Kaede-Proteins	99
5.2.2	Vorteile des Kaede-Proteins für Proteintransportstudien	99
5.2.2.1	Die Stabilität von gKaede und rKaede	99
5.2.2.2	Vorteile des Kaede-basierten Recyclingversuchs	100
5.3	Zukünftige Anwendungen des Kaede-Systems	101
6	Literaturverzeichnis	102

I Abbildungsverzeichnis

1	Schematischer Aufbau eines GPCR	13
	Abb. entnommen und verändert aus J. Bockaert, J. P. Pin: Molecular tinkering of G protein-coupled receptors: an evolutionary success. <i>EMBO J</i> 18:1723-1729, 1999	
2	Die Familien der GPCR	14
	Abb. entnommen und verändert aus J. Bockaert, J. P. Pin: Molecular tinkering of G protein-coupled receptors: an evolutionary success. <i>EMBO J</i> 18:1723-1729, 1999	
3	Intrazellulärer Transport von GPCR	15
	Abb. entnommen und verändert aus H. Stenmark and V. M. Olkkonen: The Rab GTPase family. <i>Genome Biology</i> 2(5), 2001	
4	Schematische Darstellung der Clathrin-vermittelten Internalisierung	17
	Abb. entnommen und verändert aus: S. A. Laporte, R. H. Oakley, J. A. Holt, L. S. Barak, M. G. Caron: The interaction of beta-arrestin with the AP-2 adaptor is required for the clustering of beta 2-adrenergic receptor into clathrin-coated pits. <i>J Biol Chem</i> 275(30):23120-6, 2000	
5	Photokonvertierung des Kaede-Proteins	29
	Abb. entnommen und verändert aus: K. A. Lukyanov, D. M. Chudakov, S. Lukyanov, V. V. Verkhusha: Innovation: Photoactivatable fluorescent proteins. <i>Nat Rev Mol Cell Biol</i> 6(11):885-91, 2005	
6	Strahlengang am <i>Laser Scanning</i> -Mikroskop (LSM 510 META)	44
7	Erweiterung des LSM-Schemas unter Einbeziehung des FCS-Moduls	51
8	SDS-PAGE mit affinitätschromatographisch aufgereinigtem rekombinantem Kaede-Protein	63
9	Testung der Kaede-Antiseren 8719 und 8720	63
10	Strukturbasierte Modellierung der interagierenden Flächen im Kaede-Dimer und -Tetramer	65
11	Analyse der bakteriellen Expression von wildtypischem Kaede (WT) und seiner mono- und dimerisierten Varianten	66
12	Analyse des Oligomerisierungsstatus von wildtypischem Kaede, V ₂ R.Δ.Kaede und V ₂ R.Kaede	69
13	<i>In vitro</i> -Analyse der Stabilität von gKaede und rKaede durch limitierende Proteolyse	71
14	Untersuchung der Stabilität von gKaede und rKaede in lebenden Zellen	72
15	Schematische Darstellung der verwendeten Konstrukte	73
16	Mikroskopische Untersuchung der subzellulären Lokalisation der Kaede- und CFP-fusionierten Rezeptoren CRF ₁ R, V _{1a} R und V ₂ R	74
17	Untersuchung des Glykosylierungsstatus der CFP-markierten Rezeptoren CRF ₁ R, V _{1a} R und V ₂ R	76

18	Ligandenbindung und Rezeptoraktivierung der Kaede-fusionierten Rezeptoren CRF ₁ R, V _{1a} R und V ₂ R im Vergleich zu ihren unfusionierten Formen	78
19	Prinzip des Kaede-basierten Recyclingversuchs am konfokalen LSM	80
20	Kolokalisation der Kaede-fusionierten Rezeptoren CRF ₁ R, V _{1a} R und V ₂ R mit dem endosomalen Markerprotein EYFP-Endo	81
21	Kaede-basierter Recyclingversuch für den CRF ₁ R, V _{1a} R und V ₂ R	83
22	Durchflusscytometrische Analyse des Rezeptorreyclings	85
23	Untersuchung des Rezeptorreyclings mit Hilfe eines Oberflächenbiotinylierungsversuchs	86
24	Kolokalisation der CFP-fusionierten Rezeptoren CRF ₁ R, V _{1a} R und V ₂ R mit GFP-fusioniertem β -Arrestin-2	88
25	Detektion der CFP-fusionierten Rezeptoren V _{1a} R, CFR ₁ R und V ₂ R in β -Arrestin-2-tragenden Vesikeln	89
26	Kolokalisation der Rezeptoren CRF ₁ R.Kaede, V _{1a} R.Kaede und V ₂ R.Kaede mit einem lysosomalen Marker und Rab11	90
27	Mikroskopische Untersuchungen der Biosynthese- und Transportgeschwindigkeit neusynthetisierter Rezeptoren	92

II Abkürzungsverzeichnis

λ_{em}	Emissionswellenlänge
λ_{exc}	Anregungswellenlänge
ACTH	adrenocorticotropes Hormon
AP	Alkalische Phosphatase
AP2	Adapterprotein 2
APS	Ammoniumperoxodisulfat
AQP	Aquaporin
ARRB2	β -Arrestin-2
ATP	Adenosintriphosphat
AVP	8-Arginin-Vasopressin
B_{max}	maximale Bindung
BP	Bandpass
BSA	bovines Serumalbumin
cAMP	cyclisches Adenosinmonophosphat
CART	<i>Cytoskeleton-associated recycling or transport</i>
CCP	<i>Clathrin-coated pit</i> , Clathrin-haltige Vertiefung in der Plasmamembran
cDNA	Komplementäre Desoxyribonukleinsäure
CFP	<i>cyan fluorescent protein</i> , cyanfluoreszierendes Protein
Ch	Detektor am konfokalen Mikroskop
Chx	Cycloheximid
cpm	<i>Counts per minute</i> , Impulse pro Minute
CRF	<i>Corticotropin-Releasing Factor</i>
CRF ₁ R	<i>Corticotropin-Releasing Factor</i> -Rezeptor Typ 1
dATP	Desoxyadenosintriphosphat
ddNTP	Didesoxynukleosidtriphosphat
DMEM	<i>Dulbecco's Modified Eagle's-Medium</i>
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTPs	Desoxynukleosidtriphosphat
DPBS	<i>Dulbecco's phosphate buffered saline</i> , Phosphatpuffer
DPBS-CM	<i>Dulbecco's phosphate buffered saline</i> (Phosphatpuffer) mit Kalziumchlorid und Magnesiumchlorid
dpm	<i>Desintegration per minute</i> , Zerfälle pro Minute
DsRed	rotfluoreszierendes Protein aus <i>Discosoma sp.</i>
DSSP	<i>Diode-pumped solid state</i> (gepumpter Festkörperdiodenlaser)
DTT	Dithiothreitol

EC ₅₀	<i>Half maximal effective concentration</i> , mittlere effektive Dosis
ECFP	<i>Enhanced cyan fluorescent protein</i> , stärker fluoreszierende Form des cyanfluoreszierenden Proteins
<i>E. coli</i>	Escherichia coli
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EGFP	<i>Enhanced green fluorescent protein</i> , stärker fluoreszierende Form des grünfluoreszierenden Proteins
EndoH	Endoglykosidase H
<i>EosFP</i>	Photokonvertierbares Fluoreszenzprotein aus <i>Lobophyllia hemprichii</i>
ER	endoplasmatisches Retikulum
ERK	<i>Extracellular regulated kinase</i>
ESCRT	<i>Endosomal sorting complex required for transport</i>
EYFP	<i>Enhanced yellow fluorescent protein</i> , stärker fluoreszierende Form des gelbfluoreszierenden Proteins
FACS	<i>Fluorescence activated cell sorting</i> , Fluoreszenz-basierte Durchflusszytometrie
FCS	<i>Fluorescence correlation spectroscopy</i> , Fluoreszenz-Korrelations-Spektroskopie
FKS	fetales Kälberserum
FMP	Leibniz-Institut für Molekulare Pharmakologie, Berlin
Fw	<i>Forward</i> , 5'-Oligonukleotid
GASP	<i>GPCR-associated protein</i>
GDP	Guanosindiphosphat
GFP	<i>Green fluorescent protein</i> , grünfluoreszierendes Protein
gKaede	grünfluoreszierendes Kaede
GPCR	G-Protein-gekoppelter Rezeptor
G-Protein	Guaninnukleotid-bindendes Protein
GRK	G-Protein-gekoppelte Rezeptorkinase
GTP	Guanosintriphosphat
GTPase	Guanosintriphosphat-Hydrolase
HEK-293	<i>human embryonic kidney cells</i> , humane embryonale Nierenzelllinie
HEPES	N-2-Hydroxyethylpiperazin-N'-2-Ethansulfonsäure
HFT	Hauptfarbteiler
IgG	Immunglobulin G
IP ₃	Inositol-1,4,5-triphosphat
IP _x	Summe aus Inositolmono-, -di- und -triphosphat
IPTG	Isopropyl-1-Thio-β-D-Galaktopyranosid
K _D	Dissoziationskonstante
KRH-Puffer	Krebs-Ringer-HEPES-Puffer

LB-Medium	Luria-Bertani-Medium (Typ: Lennox)
LIC	<i>Ligation Independent Cloning</i>
LP	Langpass
LSM	<i>Laser Scanning</i> -Mikroskop
MAP	<i>Mitogen activated protein</i>
<i>mEosFP</i>	Monomerisiertes photokonvertierbares Fluoreszenzprotein aus <i>Lobophyllia hemprichii</i>
MVB	<i>Mutivesicular bodies</i> , multivesikuläre Körper
N	Anzahl
NFT	Nebenfarbteiler
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
P _i	Phosphat
<i>PNGaseF</i>	Peptid-Endoglykosidase F
PDZ	Proteininteraktionsdomäne (Akronym aus den drei Proteinen <i>post synaptic density protein</i> , <i>Drosophila disc large tumor suppressor</i> , und <i>zonula occludens-1 protein</i>)
Rev	<i>Reversed</i> , 3' Oligonukleotid
RIA	<i>Radioimmunoassay</i>
rKaede	rotfluoreszierendes Kaede
R-PE	R-Phycoerythrin
ROI	<i>Region of interest</i> , ausgewählter Bereich in der konfokalen Mikroskopie
SDS	Natriumdodecylsulfat
SDS-PAGE	Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethyldiamin
UV	Ultraviolett
V _{1a} R	Vasopressin-Rezeptor Typ 1a
V _{1b} R	Vasopressin-Rezeptor Typ 1b
V ₂ R	Vasopressin-Rezeptor Typ 2
YFP	<i>Yellow fluorescent protein</i> , gelbfluoreszierendes Protein

III Zusammenfassung

Aktiviert G-Protein-gekoppelte Rezeptoren (GPCR) werden schnell desensibilisiert, internalisiert und anschließend entweder lysosomal degradiert oder zur Plasmamembran recycelt. Zur Resensibilisierung der Zellen tragen nicht nur recycelte sondern auch neusynthetisierte Rezeptoren bei. Die Überlagerung beider Prozesse erschwert die Untersuchung des Rezeptorrecyclings. In dieser Arbeit sollte mit Hilfe des photokonvertierbaren Fluoreszenzproteins Kaede eine neue Technik entwickelt werden, mit der es möglich ist Recycling- von Neusyntheseprozessen zu trennen und das Recycling von GPCR mikroskopisch in Echtzeit zu beobachten. Als Modellproteine wurden der Vasopressin-1a-Rezeptor $V_{1a}R$ (recycelnder Rezeptor), der Vasopressin-2-Rezeptor V_2R (degradiertes Rezeptor) und der *Corticotropin-Releasing Factor*-Rezeptor Typ 1 (CRF_1R) verwendet. Bei Letzterem war nicht klar, ob er nach Agonistenstimulation zur Plasmamembran zurücktransportiert wird. Die Untersuchung dieser Frage war eine weitere Zielsetzung dieser Arbeit.

Da Kaede als fluoreszierendes Protein mit den GPCR fusioniert wird, wurde im ersten Teil der Arbeit überprüft, ob Kaede die Eigenschaften der Rezeptoren verändert und generell für Transportstudien geeignet ist. Beispielsweise könnte die bereits publizierte Tetramerisierung des Kaede-Proteins seine Anwendung verhindern oder erschweren. Mittels Fluoreszenz-Korrelationsspektroskopie konnte gezeigt werden, dass das Kaede-Protein nicht in der Lage ist zu tetramerisieren, wenn es an ein Membranprotein fusioniert ist. Außerdem konnte in *in vitro*-Experimenten und bei Untersuchungen in Zellkulturen belegt werden, dass die native und die photokonvertierte Form von Kaede gleichermaßen stabil sind. Darüber hinaus zeigten Kaede-fusionierte GPCR sowohl in subzellulären Lokalisationsstudien als auch in Agonistbindungs- und Rezeptoraktivierungsexperimenten die gleichen Eigenschaften wie die CFP-fusionierten bzw. die unfusionierten Rezeptoren. Lediglich die Expression der Kaede-fusionierten Rezeptoren war geringer, was sich aber nicht negativ auf die mikroskopischen Experimente auswirkte.

Parallel wurde anhand der bereits publizierten Kaede-Struktur versucht, die Tetramerisierung des Proteins durch den Austausch der interagierenden Aminosäuren zu unterbinden. Die eingeführten Mutationen bewirkten allerdings eine Fehlfaltung des Proteins und damit den Verlust der Fluoreszenz. Da aber zuvor gezeigt werden konnte, dass mit Membranproteinen fusionierte Kaede-Proteine nicht tetramerisieren und nicht die Eigenschaften der fusionierten Proteine verändern, war monomerisiertes Kaede für die anschließende Untersuchung des Rezeptorrecyclings nicht notwendig.

Im zweiten Teil der Arbeit wurde unter Anwendung von Kaede-Fusionsproteinen und mikroskopischer Testsysteme das noch unbekannte Recyclingverhalten des CRF_1R untersucht. Hierfür wurden die Kaede-fusionierten Rezeptoren in eukaryotischen Zellen exprimiert und mit Agonisten internalisiert. Die internalisierten Rezeptoren wurden in endosomalen Kompartimenten selektiv mit

UV-Strahlung photokonvertiert. Anschließend wurde der Transport der photokonvertierten Form verfolgt. Sowohl beim CRF₁R als auch beim V_{1a}R wurden Signale in der Plasmamembran detektiert, beim V₂R hingegen nicht. Dies zeigt, dass es sich beim CRF₁R um einen recycelnden Rezeptor handelt. Die als Kontrolle eingesetzten Rezeptoren verhielten sich in diesem Experiment wie erwartet: Der V_{1a}R wurde zur Plasmamembran zurücktransportiert, der V₂R recycelte nicht. Diese Ergebnisse konnten mit Hilfe biochemischer und durchflusscytometrischer Experimente bestätigt werden.

Die Internalisierung des CRF₁R verläuft, wie bei den meisten GPCR, Clathrin-vermittelt in Anwesenheit des Adapterproteins AP2, Dynamin und β -Arrestin. Je nach Stabilität der β -Arrestin-Interaktion unterscheidet man zwei Klassen von Rezeptoren: Klasse-A-Rezeptoren zeichnen sich durch eine transiente Interaktion mit β -Arrestin aus und sind in der Lage zu recyceln. Im Gegensatz dazu gehen Klasse-B-Rezeptoren eine stabile Interaktion mit β -Arrestin ein. Sie werden nach ihrer Internalisierung degradiert. In mikroskopischen Untersuchungen konnte für die aktivierten CRF₁R und V_{1a}R eine Rekrutierung von β -Arrestin zur Plasmamembran und eine transiente Interaktion mit β -Arrestin gezeigt werden (Klasse-A-Rezeptoren). Für den V₂R wurde dagegen eine stabile Interaktion mit β -Arrestin beobachtet (Klasse-B-Rezeptor). Diese Daten stützen die Ergebnisse des Kaede-basierten Recyclingversuchs und zeigen, dass der CRF₁R ein recycelnder Rezeptor ist.

Ferner wurde untersucht, ob der CRF₁R zu den schnell oder langsam recycelnden Rezeptoren zählt. Schnell recycelnde Rezeptoren werden direkt aus den peripheren frühen Endosomen, langsam recycelnde hingegen über das Trans-Golgi-Netzwerk bzw. über perinukleäre *Recycling*-Endosomen zur Plasmamembran transportiert. Als Marker für das Trans-Golgi-Netzwerk oder die *Recycling*-Endosomen wurde die GTPase Rab11 verwendet. In Kollokalisationsstudien konnte gezeigt werden, dass der CRF₁R den langsam recycelnden Rezeptoren zugeordnet werden kann.

Zusammenfassend konnte in dieser Arbeit belegt werden, dass das photokonvertierbare Kaede-Protein als Fusionspartner für Membranproteine genutzt werden kann um deren Transport in Echtzeit zu studieren. Damit wurde erstmals eine mikroskopische Methode etabliert, die es erlaubt recycelnde von neusynthetisierten Rezeptoren zu unterscheiden. Mit Hilfe dieser Methode und weiterer Experimente war es ferner möglich zu zeigen, dass der CRF₁R ein recycelnder Rezeptor ist.

IV Summary

Upon ligand binding and receptor activation, G protein-coupled receptors (GPCR) are rapidly desensitized, internalized and subsequently degraded in lysosomes or recycled back to the plasma membrane. Resensitization of the cell is enabled by both recycling receptors and newly synthesized receptors. The overlap of recycling and synthesis processes largely complicates the study of GPCR recycling mechanisms. One aim of this thesis was to develop a new microscopic technique for real-time visualization of GPCR recycling using the photoconvertible Kaede protein allowing us to differentiate newly synthesized from recycling receptors. As model proteins the $V_{1a}R$ (recycling receptor), the V_2R (degraded receptor) and the CRF_1R were used. In the case of the CRF_1R , it was unknown whether this receptor recycles to the plasma membrane following agonist-promoted internalization. The study of the CRF_1R recycling behaviour was another objective of this work.

As the Kaede protein is fused C-terminally to the GPCRs, an influence on the pharmacological and trafficking properties of the receptors must be excluded. The previously published tetramerization of Kaede, for example, might hinder or even prevent its usability. To assess the applicability of Kaede fluorescence correlation spectroscopy experiments were performed and it was demonstrated that Kaede fused to membrane proteins cannot form tetramers in contrast to the soluble form. *In vitro* studies and experiments in cell culture revealed that both the native and the photoconverted Kaede are equally stable. Moreover, Kaede-fused GPCR displayed the same pharmacological and trafficking properties as the untagged or CFP-tagged receptors. Only the expression levels of the Kaede fusion proteins were reduced, yet this did not affect the microscopic experiments.

In parallel to these experiments, the interacting amino acids of the tetrameric Kaede were substituted according to the previously published crystal structure of the protein. Unfortunately, these mutations induced protein misfolding thereby causing the loss of fluorescence functions. However, since it could be shown that membrane protein-fused Kaede cannot tetramerize, the monomerized Kaede was no more essential for the microscopic study of receptor recycling.

In the second part of this work, Kaede-fusions were used to study the recycling behaviour of the CRF_1R and the $V_{1a}R$ and V_2R control proteins by utilizing the novel real-time recycling assay at the laser scanning microscope. For this purpose, HEK 293 cells expressing the Kaede-fused receptors were treated with agonist to induce receptor internalization. Internalized receptors were selectively photoconverted in endosomes using UV-irradiation and the subcellular fate of the new fluorescence signals was studied. In the case of the CRF_1R , signals of the photoconverted receptors could be detected in the plasma membrane indicating that the CRF_1R belongs to the family of recycling receptors. The control receptors showed the expected results: The $V_{1a}R$ recycled back to the plasma

membrane whereas the V₂R did not. These results were confirmed with biochemical and flow cytometry measurements.

The CRF₁R internalizes in a clathrin-dependent way via the adaptor protein AP2, dynamin and β -arrestin. Depending on the stability of the resulting receptor- β -arrestin-complex, two classes of receptors can be differentiated. Class A receptors are recycling receptors undergoing a transient β -arrestin interaction. In contrast, class B receptors stably interact with β -arrestin and are degraded after internalization. In the case of the CRF₁R and V_{1a}R microscopic analyzes demonstrated that β -arrestin transiently interacts with the stimulated CRF₁R and V_{1a}R indicating again that these receptors are recycling GPCRs (class A receptors). The V₂R, in contrast, revealed a stable interaction (class B receptor).

Moreover, it was studied whether the CRF₁R recycles rapidly or rather slowly to the plasma membrane. Rapidly recycling receptors are recruited out of early endosomes whereas slowly recycling receptors pass the trans-golgi-network or recycling endosomes before reaching the cell surface. Rab11 colocalization studies demonstrated that the CRF₁R belongs to the family of slowly recycling receptors.

In conclusion, a novel microscopic technique was established allowing us to study GPCR recycling in real-time and to differentiate recycling and synthesis processes. Moreover, it was shown that the CRF₁R belongs to the family of slowly recycling receptors. The Kaede technique seems to be very well suited to study membrane protein trafficking in general.

1 Einleitung

1.1 G-Protein-gekoppelte Rezeptoren (GPCR)

GPCR bilden die größte Gruppe von Zelloberflächenrezeptoren in eukaryotischen Zellen. Die Sequenzanalyse des humanen Genoms zeigte, dass ungefähr 900 verschiedene Gene für GPCR enthalten sind. GPCR vermitteln Antworten auf eine Vielzahl von Signalen, wie z.B. Licht, Kalziumionen, Pheromone und Protein hormone. Auch kleine Moleküle, wie Aminosäuren und Nukleotide, können GPCR aktivieren [1]. Aus diesem Grund dienen sie als Angriffspunkt für eine Fülle von Pharmaka zur Behandlung immunologischer, kardiovaskulärer und psychischer Krankheiten. Gegenwärtig greift ca. die Hälfte aller zugelassenen Medikamente an GPCR an.

Alle GPCR haben einen ähnlichen strukturellen Aufbau. Sie besitzen sieben Transmembrandomänen, die über intra- (i_1 , i_2 , i_3) und extrazelluläre (e_1 , e_2 , e_3) Schleifen miteinander verbunden sind. Der N-Terminus ist extra- und der C-Terminus intrazellulär lokalisiert [1] (Abb. 1).

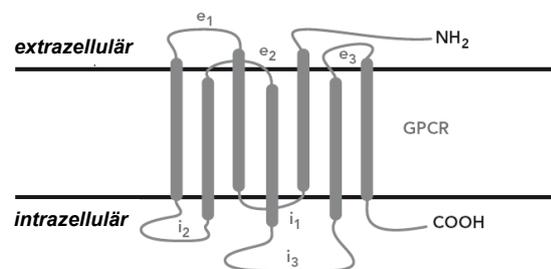


Abb. (1) Schematischer Aufbau eines GPCR. Die charakteristischen Merkmale sind sieben Transmembrandomänen, die über drei intra- (i_1 - i_3) und extrazelluläre (e_1 - e_3) Schleifen miteinander verbunden sind.

Bezüglich ihrer Aminosäuresequenz lassen sich GPCR in drei große Familien einteilen (Abb. 2). Die meisten GPCR gehören zur Familie 1, den Rhodopsin-ähnlichen Rezeptoren. Dieser Gruppe werden die olfaktorischen Rezeptoren, die Geschmacksrezeptoren und die opsinartigen Rezeptoren zugeordnet. Zur Unterfamilie 1a gehören GPCR, deren Ligandenbindungsstelle sich zwischen den Transmembrandomänen befindet. Rezeptoren der Unterfamilien 1b und 1c binden kleine Peptide bzw. Glykoproteinhormone mit den Transmembrandomänen unter Beteiligung des N-Terminus und der extrazellulären Schleifen. GPCR der Familie 2 besitzen eine sehr große extrazelluläre Domäne, mit der sie vor allem hochmolekulare Proteine wie Glukagon oder Sekretin binden. Zusätzlich werden dieser Familie die *Frizzled*- und *Smoothened*-Rezeptoren zugeordnet [1, 2, 3]. Rezeptoren der Familie 3, die metabotropen Glutamaterezeptoren, besitzen ebenfalls eine große extrazelluläre Domäne. Zu ihr zählen unter anderem kalziumsensitive und Pheromon-Rezeptoren [1, 3].

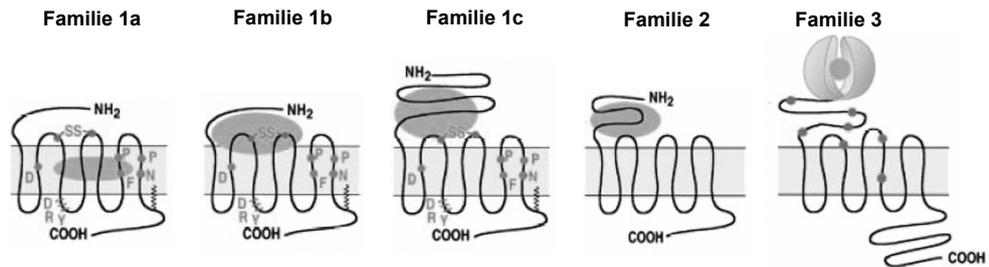


Abb. (2) Die Familien der GPCR. GPCR können in drei Familien eingeteilt werden. Zusätzlich werden bei Familie 1 drei Untergruppen (1a - 1c) unterschieden. Die Familie 1 umfasst die Rhodopsin-ähnlichen GPCR, die Familie 2 die Sekretin-ähnlichen sowie die *Frizzled*- und die *Smoothed*-Rezeptoren und die Familie 3 die metabotropen Glutamatrezeptoren.

Um eine optimale Reaktion der Zelle auf extrazelluläre Stimuli zu gewährleisten, funktionieren GPCR in einem Zyklus aus Stimulation, Desensibilisierung, Internalisierung und Resensibilisierung. Zur regulierten Funktion der Rezeptoren tragen maßgeblich intrazelluläre Transportprozesse und damit einhergehende Veränderungen der Rezeptordichte in der Plasmamembran bei.

1.1.1 Der intrazelluläre Transport von GPCR (sekretorischer Weg)

Um ihre Funktion erfüllen zu können, müssen neusynthetisierte GPCR über den so genannten sekretorischen Weg zur Plasmamembran transportiert werden. Initial werden diese Proteine am rauen endoplasmatischen Retikulum (ER) synthetisiert. Neuentstehende integrale Membranproteine werden von der Transportmaschinerie an N-terminalen hydrophoben Signalsequenzen (Signalpeptide oder Signalankersequenzen) erkannt und dem Translokationskomplex der ER-Membran zugeführt. Dieser Komplex ermöglicht das Einfädeln der Proteine in die ER-Membran [4]. Anschließend werden die Proteine in der Membran von Vesikeln über das ER-Golgi-Intermediärkompartiment und den Golgi-Apparat zur Zelloberfläche transportiert, wo sie mit der Plasmamembran fusionieren (Abb. 3).

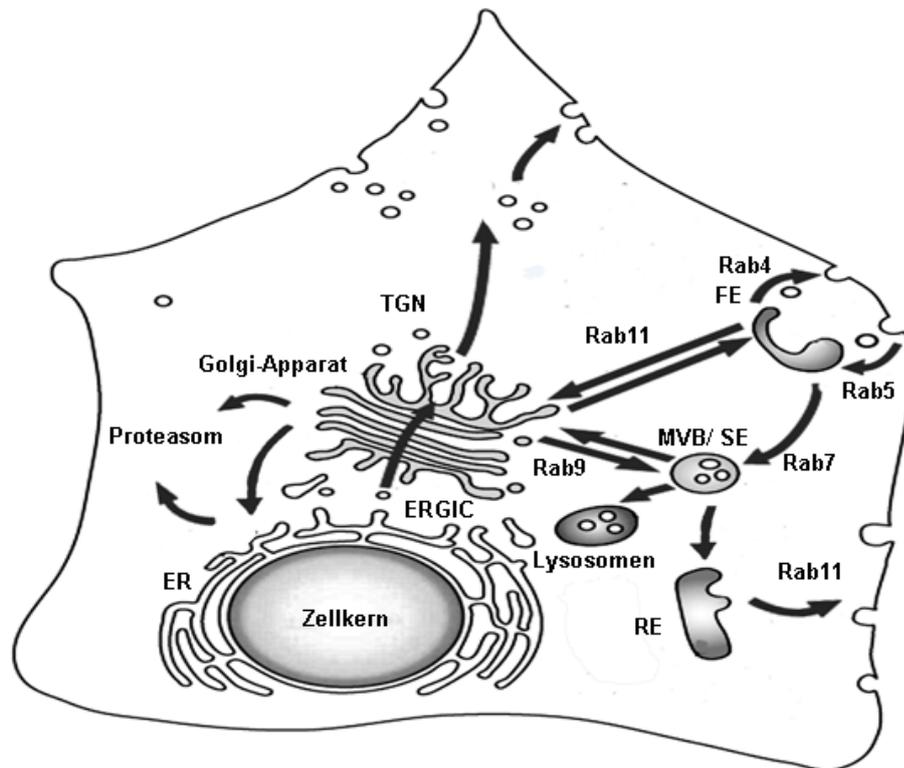


Abb. (3) Intrazellulärer Transport von GPCR. Der sekretorische Transport beginnt mit der Insertion in die ER-Membran. Anschließend werden die GPCR in der Membran von Vesikeln über das ER-Golgi-Intermediärkompartiment (ERGIC) und den Golgi-Apparat zur Plasmamembran transportiert. Von dort internalisieren Rezeptoren in frühe Endosomen (FE). Die Rezeptoren können über multivesikuläre Körper (MVB) in späte Endosomen (SE) und schließlich zu Lysosomen transportiert werden, in denen sie degradiert werden. Alternativ können internalisierte Rezeptoren auch zur Plasmamembran recyceln; entweder direkt aus frühen Endosomen (FE) oder aus MVB über Recyclingendosomen (RE) bzw. das Trans-Golgi-Netzwerk (TGN). Fehlgefaltete Rezeptoren werden schon im frühen sekretorischen Weg erkannt und über das ER-assoziierte Degradationssystem proteasomal abgebaut.

Während des sekretorischen Proteintransports werden GPCR im ER und im Golgi-Apparat glykosyliert. Dies unterstützt die Faltung und Stabilität der Proteine und hilft bei der korrekten Orientierung in der Membran [4]. Die N-Glykosylierung erfolgt an freien Aminogruppen von Asparaginen im N-Terminus oder der extrazellulären Schleifen (Konsensussequenz: N-X-S/T, X = beliebige Aminosäure). Im ER werden mannosereiche N-Glykosylierungen angeheftet, die im medialen Golgi-Apparat durch komplexe Glykane ersetzt werden. Zusätzlich zu N-Glykosylierungen werden bei einigen Rezeptoren im Golgi-Apparat O-Glykosylierungen mit den Hydroxygruppen von Serinen, Threoninen, Hydroxyprolinen oder Hydroxylysinen verknüpft [5].

GPCR werden im ER mit Hilfe von Chaperonen gefaltet. Um sicherzustellen, dass die neusynthetisierten Rezeptoren korrekt gefaltet sind, durchlaufen sie im frühen sekretorischen Weg eine Qualitätskontrolle, an der ebenfalls Chaperone beteiligt sind. So erkennen die Lektin-Chaperone Calnexin und Calreticulin fehlgefaltete Rezeptoren durch einzelne Glukosemoleküle, die von Hilfsenzymen an die mannosereichen Glykane der Rezeptoren angehängt werden. Können die Chaperone die Fehlfaltung der Rezeptoren nicht korrigieren, werden diese dem proteasomalen Abbau

zugeführt [6, 7]. So wird gewährleistet, dass nur korrekt gefaltete Rezeptoren die Plasmamembran erreichen.

1.1.2 Aktivierungsmechanismen von GPCR

Die Rezeptoraktivierung erfolgt durch die Bindung des Agonisten. Sie führt zur Änderung der Rezeptorkonformation und zur Interaktion mit einem heterotrimeren Guaninnukleotid-bindenden Protein (G-Protein). In der α -Untereinheit des G-Proteins wird GDP gegen GTP getauscht. Dadurch kann die heterodimere β/γ -Untereinheit dissoziieren [8]. In Abhängigkeit von den spezifischen G-Protein-Untereinheiten werden unterschiedliche intrazelluläre Signalkaskaden aktiviert.

Aufgrund ihrer Sequenzhomologie werden vier Familien von $G\alpha$ -Untereinheiten (G_s , G_i , G_q und G_{12}) unterschieden, wobei die einzelnen Familien jeweils in mehrere Unterfamilien gegliedert werden [9, 10]. Die α -Untereinheiten der stimulatorischen G-Proteine (G_s) aktivieren eine membranständige Adenylylcyclase, ATP wird zu cAMP umgesetzt und die cAMP-abhängige Proteinkinase-A wird aktiviert. Im Gegensatz dazu inhibieren G_i -Untereinheiten die Adenylylcyclase und führen so zur Erniedrigung des intrazellulären cAMP-Spiegels. Bindet ein Rezeptor G-Proteine der Familie G_q wird die Phospholipase-C- β aktiviert, die wiederum Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat zu Diacylglycerol und Inositol-1,4,5-triphosphat (IP_3) hydrolysiert. Unter dem Einfluss von IP_3 werden Kalziumionen aus intrazellulären Speichern freigesetzt. Diese binden an die Proteinkinase-C und induzieren so ihre Translokation zur Plasmamembran. Dort wird sie letztlich von Diacylglycerol aktiviert [11]. G-Proteine der Familie G_{12} sind in der Lage Rho-GTPasen zu aktivieren und dadurch die Aktivierung der Phospholipasen-C- ϵ und -D zu ermöglichen. Dies führt unter anderem zu Veränderungen im Cytoskelett, der Aktivierung von *mitogen activated protein*-(MAP)-Kinasen und der Stimulation des Na^+/H^+ -Austauschs [12]. Auch die β/γ -Untereinheiten der G-Proteine werden in unterschiedliche Klassen eingeteilt. Sie tragen zur Signaltransduktion bei, indem sie beispielsweise die Adenylylcyclase inhibieren, Phospholipasen aktivieren und G-Protein-gekoppelte Rezeptorkinasen (GRK) rekrutieren [13, 14, 15]. Nach der Aktivierung der Rezeptoren erfolgt deren Desensibilisierung, um die zellulären Effekte zeitlich zu begrenzen und die Zellen vor einer Reizüberflutung zu schützen.

1.1.3 Beendigung der Signaltransduktion und Desensibilisierung von GPCR

Nach der Agonist-Rezeptor-Interaktion hydrolysiert die α -Untereinheit des G-Proteins GTP zu GDP und P_i . Dies ermöglicht die erneute Bindung der α -Untereinheit an die β/γ -Untereinheiten. Das neu formierte G-Protein ist in der Lage vom phosphorylierten Rezeptor abzukoppeln [16]. Ferner werden die aktivierten Rezeptoren desensibilisiert. Man unterscheidet zwischen schneller und langsamer Desensibilisierung, wobei die schnelle Desensibilisierung zusätzlich in homologe und heterologe Desensibilisierung eingeteilt werden kann. Bei der homologen Desensibilisierung phosphorylieren GRK ausschließlich aktivierte Rezeptoren. Heterologe Desensibilisierung findet statt, wenn die durch die

Signaltransduktion aktivierten Proteinkinasen neben stimulierten GPCR auch unstimulierte und andere intrazelluläre Proteine phosphorylieren. Die Signaltransduktion kann außerdem durch die Verringerung der Rezeptorzahl auf der Zelloberfläche unterbrochen werden. Eine schnelle und effektive Möglichkeit hierfür stellt die Internalisierung der Rezeptoren dar. Eine langsame Reduktion kann zusätzlich durch eine Verringerung der mRNA-Synthese im Rahmen der so genannten *down regulation* erreicht werden [15].

1.1.4 Internalisierungsmechanismen von GPCR

Neben der agonisteninduzierten Internalisierung werden Rezeptoren auch konstitutiv internalisiert. Die konstitutive Internalisierung hält die Rezeptordichte in der Plasmamembran in Abwesenheit der Liganden im Gleichgewicht, welche sonst aufgrund der Neusynthese kontinuierlich ansteigen würde [17]. Die Mechanismen der Internalisierung sind vielfältig und hängen maßgeblich von dem zu transportierenden Rezeptor, dem Liganden, dem zellulären Hintergrund, der Vesikelgröße und der Art der Vesikelbildung ab. Man unterscheidet bei der Internalisierung von GPCR zwischen Caveolin- oder Clathrin-abhängigen bzw. -unabhängigen Internalisierungsmechanismen [18]. Die Internalisierung der meisten GPCR erfolgt Clathrin-vermittelt.

1.1.4.1 Die Clathrin-vermittelte Internalisierung

Die Clathrin-vermittelte Internalisierung findet in allen Säugerzellen statt und spielt eine übergeordnete Rolle bei der Regulation der Rezeptordichte in der Plasmamembran [18].

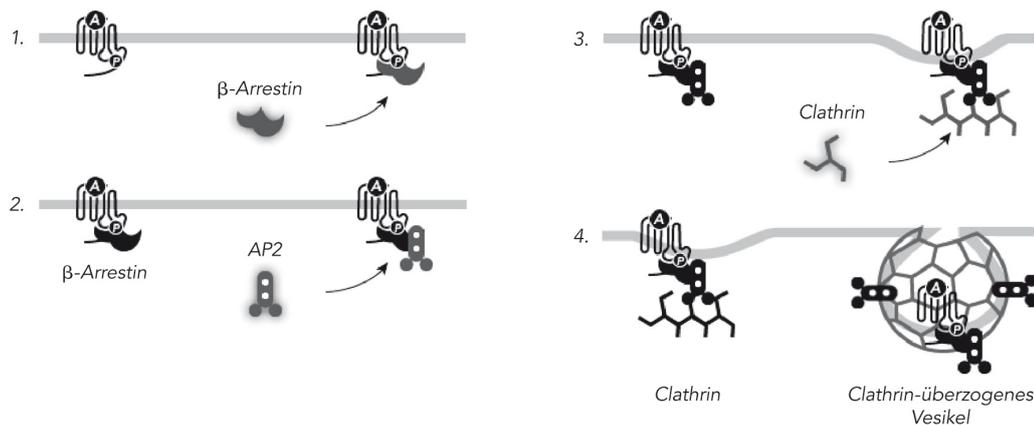


Abb. (4) Schematische Darstellung der Clathrin-vermittelten Internalisierung. Auf die Bindung von β -Arrestin an den GPCR (1) folgt die Interaktion von β -Arrestin mit dem Adapterprotein AP2 (2). Der entstehende Komplex ist in der Lage Clathrin zu binden (3). Es bilden sich Vesikel, die von der GTPase Dynamin abgeschnürt werden (4).

GPCR werden im Rahmen der Signaltransduktion an konservierten Serin- und Threoninresten im C-Terminus und/oder der dritten intrazellulären Schleife von GRK phosphoryliert. Daraufhin werden β -Arrestine (β -Arrestine-1 und -2), die im unstimulierten Zustand des Rezeptors cytosolisch vorliegen, an die Plasmamembran rekrutiert. Dort sind sie in der Lage mit erhöhter Affinität an den GPCR zu binden (Abb. 4.1) [19]. Dabei ist die Phosphorylierung nicht in jedem Fall für die β -Arrestin-Bindung

notwendig, kann diese aber maßgeblich verstärken [20]. β -Arrestine bestehen aus einer N- und einer C-Domäne, die über eine polare Kerndomäne miteinander verbunden sind. Die Bindung des phosphorylierten Rezeptors an die polare Kerndomäne bewirkt eine Konformationsänderung im β -Arrestin-Molekül. Dadurch wird dessen C-Terminus frei, der Bindungsstellen für Clathrin und das Adapterprotein 2 (AP2) besitzt [21]. Es bildet sich ein Komplex aus GPCR, β -Arrestin, AP2 und Clathrin (Abb. 4.2, 4.3) [22]. Clathrine sind triskelionförmige Proteine, die aus drei miteinander verbundenen schweren Ketten bestehen, welche jeweils mit einer leichten Kette assoziiert sind. Aufgrund ihrer Molekülstruktur sind sie in der Lage so genannte Clathrin-haltige Vertiefungen (*Clathrin-coated pits*, CCP) in der Plasmamembran zu bilden [23]. AP2 bewirkt die Rekrutierung der Rezeptoren in die CCP, die neben Clathrin auch große Mengen an Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat enthalten [18, 24, 25]. Die CCP werden von der GTPase Dynamin zu Vesikeln (120 nm) abgeschnürt (Abb. 4.4). Anschließend dissoziiert die Clathrinhülle der Vesikel und die Clathrin-Monomere können zur erneuten Bildung von Vesikeln bereitgestellt werden [18].

Einer der Hauptinternalisierungswege von GPCR hängt also von der Anwesenheit von CCP in der Plasmamembran ab. Die eigentliche Internalisierung wird aber durch Clathrin-Adapterproteine vorbereitet. Sie erkennen kurze Sequenzen der GPCR, deren Phosphorylierungen, Palmitoylierungen und/oder Ubiquitinierungen und rekrutieren die GPCR in CCP [26].

1.1.4.2 Internalisierungssignale von GPCR

Internalisierungssignale sind kurze Sequenzen innerhalb von GPCR, die Protein-Interaktionen ermöglichen und so die Endocytose von Rezeptoren vermitteln. Prinzipiell können Adapterproteine direkt oder indirekt über β -Arrestin an Internalisierungssignale binden (siehe 1.1.4.1) [22, 27]. Einige GPCR besitzen Tyrosin- und Dileucinmotive in den intrazellulären Schleifen oder dem C-Terminus, die als Bindungsstellen für Adapterproteine dienen. So kann AP2 beispielsweise an die Tyrosin-Motive Y-X-X-Ø, Y-X-X-X-Ø und Y-X-X-G-Ø binden (Ø = hydrophobe Aminosäure) [28, 29, 30]. Entscheidend ist, dass das Tyrosin unphosphoryliert bleibt. Die direkte Interaktion der Adapterproteine mit Tyrosin-haltigen Sequenzen ist von großer Bedeutung und scheint bei der konstitutiven Internalisierung einiger Rezeptoren sogar wichtiger zu sein als die indirekte Interaktion über β -Arrestine [31, 32]. Andere Adapterproteine können an Dileucinmotive mit den Konsensussequenzen [D/E]-X-X-X-L-[L/I] oder [D/E]-X-X-L-[L/I] binden [28, 33]. Diese Motive können neben der Regulation der Internalisierung auch an der Regulation des Rezeptorrecyclings beteiligt sein.

Die hochaffine Konformation von β -Arrestin kann durch Bindung an GPCR-assoziierte Phosphate stabilisiert werden und auf diese Weise die Bildung eines stabileren GPCR- β -Arrestin-Komplexes ermöglichen [34]. Neben der Phosphorylierung des Rezeptors selbst spielt beim Transport der GPCR

auch die Phosphorylierung anderer Komponenten der Endocytosemaschinerie eine wichtige Rolle. Beispielsweise werden Proteine, die für die Bildung, Abschnürung und Fusion von frühen Endosomen (Rabenosyn5, *early endosomal antigen* EEA-1) wichtig sind, phosphoryliert und aktiviert. Diese wiederum aktivieren Rab-GTPasen, die für den weiteren Transport der GPCR zu ihren Zielkompartimenten verantwortlich sind [35, 36].

Neben den eigentlichen Internalisierungssignalen von GPCR sind auch posttranslationale Modifikationen wie die Palmitoylierung für den Internalisierungsprozess relevant. Palmitoylierungen entstehen durch die Verknüpfung einer C16-Fettsäure mit einem Cystein im C-Terminus des Rezeptors. Dies führt zur Ausbildung einer vierten intrazellulären, helikalen Schleife [37, 38]. Meist werden Palmitoylierungen im frühen Golgi-Apparat angefügt. Sie sind molekulare Schalter, welche die Zugänglichkeit der Phosphorylierungsstellen regulieren. Fehlen diese posttranslationalen Modifikationen, interagiert der phosphorylierte Rezeptor verstärkt mit β -Arrestin und wird internalisiert. Somit können Palmitoylierungen die Internalisierung von GPCR verhindern [39]. Zu welchem Zielkompartiment (Plasmamembran oder Lysosomen) internalisierte Rezeptoren sortiert werden, ist abhängig von den Proteinen, mit denen sie interagieren.

1.1.5 Die intrazelluläre Sortierung internalisierter GPCR

Zunächst gelangen internalisierte GPCR in frühe Endosomen (Abb. 3). Diese befinden sich vorwiegend in der Zellperipherie und bestehen aus einem Netzwerk von Vakuolen und Tubuli. Aufgrund des niedrigen pH-Wertes (5,5 - 6,5) können reversibel gebundene Liganden von den Rezeptoren dissoziieren [40]. Aus den frühen Endosomen können Proteine wieder zur Plasmamembran gelangen (schnelles Recycling, Abb. 3). Hierfür akkumulieren sie zunächst in tubulären Domänen der frühen Endosomen, die sich zu Vesikeln abschnüren und zur Plasmamembran transportiert werden. Sind alle schnell recycelnden Proteine entfernt, beginnt die Reifung der frühen Endosomen zu multivesikulären Körpern (MVB) [41, 42].

Der nächste Schritt der intrazellulären Sortierung vollzieht sich in den MVB. Diese entstehen, wenn sich Teile der früh-endosomalen Vesikelmembranen einstülpen und in ihr eigenes Lumen abschnüren. Proteine, die in der äußeren Membran der MVB verbleiben, akkumulieren erneut in tubulären Domänen und können von dort recyceln [43]. Die entstehenden Vesikel werden zum Trans-Golgi-Netzwerk oder den *Recycling*-Endosomen transportiert. Aus dem Trans-Golgi-Netzwerk gelangen sie entweder direkt zurück in die MVB, oder sie werden mit neusynthetisierten Proteinen zur Plasmamembran befördert (Abb. 3) [44, 45]. In *Recycling*-Endosomen befindliche GPCR werden ebenfalls zur Plasmamembran transportiert (Abb. 3) [46]. Sobald die „Reifung“ der MVB abgeschlossen ist und alle recycelnden Proteine entfernt sind, spricht man nicht mehr von MVB, sondern von späten Endosomen. Späte Endosomen besitzen einen pH-Wert von 5,0 bis 6,0. Durch

Fusion mit Lysosomen werden alle Proteine (beispielsweise Rezeptoren mit irreversibel gebundenen Liganden) abgebaut, die sich in den intraluminalen Vesikeln der späten Endosomen befinden (Abb. 3) [43, 47].

Die Resensitisierung erfolgt bei Rezeptoren, die nach der Internalisierung degradiert werden, ausschließlich durch das langsame Auffüllen der Plasmamembran mit neusynthetisierten Rezeptoren sowie Rezeptoren, die bereits im sekretorischen Weg vorhanden sind.

1.1.5.1 Recyclingmechanismen von GPCR

Neben unstimulierten Rezeptoren können auch aktivierte GPCR nach Dissoziation ihres Liganden recyceln. Voraussetzung für ein Recycling ist die Dephosphorylierung der aktivierten Rezeptoren durch Phosphatasen.

Es wurden drei Wege des Rezeptorrecyclings beschrieben. Der erste Weg, das schnelle Recycling, dauert nur wenige Minuten ($t_{1/2} = 2$ min) und führt, wie oben beschrieben, direkt aus den peripheren frühen Endosomen zur Plasmamembran (Abb. 3) [44]. Voraussetzung hierfür ist die Anwesenheit des CART-Komplexes (*cytoskeleton-associated recycling or transport*) [48]. Recycling aus frühen Endosomen ist ein unspezifischer Prozess, der aufgrund fehlender Degradationssignale im Rahmen des allgemeinen Austauschs von Membranen (*bulk flow*) stattfindet [26, 49]. Der zweite Weg ist deutlich langsamer und führt, wie oben beschrieben, über frühe Endosomen und MVB zum Trans-Golgi-Netzwerk (Abb. 3). Von dort aus werden die Rezeptoren zusammen mit den neusynthetisierten Proteinen zur Plasmamembran transportiert [44]. Beim dritten Weg handelt es sich ebenfalls um langsames Recycling. Hierbei werden die Rezeptoren nach der Internalisierung in perinukleäre *Recycling*-Endosomen sortiert, bevor sie zurück zur Plasmamembran transportiert werden (Abb. 3) [46]. Dieser Prozess besitzt für viele Proteine eine Halbwertszeit von ungefähr 20 Minuten [44]. Für langsame Recyclingprozesse müssen spezifische Signale vorhanden sein, welche die Aufnahme in die intraluminalen Vesikel der MVB verhindern. Als Recyclingsignale für GPCR wurden bisher nur PDZ-Bindemotive beschrieben.

PDZ-Bindemotive und PDZ-Domänen binden sequenzspezifisch aneinander und vermitteln direkte Interaktionen zwischen Proteinen. Bei PDZ-Bindemotiven handelt es sich um kurze konservierte Sequenzen, die sich häufig am äußersten Ende des C-Terminus von GPCR befinden. Man unterscheidet Typ1- (X-[S/T]-X-Ø), Typ2- (X-Ø-X-Ø) und Typ3-PDZ-Motive (X-[D/E]-X-Ø). Die Motive müssen nicht zwingend am C-terminalen Ende liegen, sondern können auch innerhalb der Proteine lokalisiert sein. In diesem Fall bestehen sie aus zwei antiparallelen β -Faltblättern, die eine β -Haarnadelstruktur bilden (Konsensussequenz: S/T-X-I/V/L/M/F-(X)₃₋₆-S/T-X-X-X-X-R/K/H) [50, 51]. PDZ-Domänen sind modularartig aufgebaute Proteindomänen, die vor allem in Gerüstproteinen

enthalten sind. So kann die Bindung weiterer Proteine vermittelt und das Recycling zurück zur Plasmamembran ermöglicht werden [26]. Zudem können PDZ-Interaktionen die Endocytose von Proteinen beeinflussen. Einige GPCR internalisieren aufgrund der Anwesenheit eines PDZ-Bindemotivs langsamer und verbleiben länger in der Plasmamembran [52, 53].

1.1.5.2 Degradationsmechanismen von GPCR

Am Abbau von GPCR ist vorwiegend die Ubiquitin-abhängige *endosomal sorting complex required for transport*-(ESCRT)-Maschinerie beteiligt. Voraussetzung für die Funktion des ESCRT-Komplexes ist die Ubiquitinierung der Proteine [54]. Diese beeinflusst den proteasomalen Abbau von Proteinen sowie die Internalisierung und die Regulation der Signaltransduktion und Transkription. Ferner wirkt sie sich auf die Sortierung von der Plasmamembran und den Transport aus den MVB bzw. aus dem Golgi-Apparat zu Lysosomen aus [55]. Daneben können internalisierte Rezeptoren auch Ubiquitin- und ESCRT-unabhängig in den lysosomalen Abbauweg gelangen. Dies geschieht unter anderem durch die direkte Interaktion mit dem *GPCR-associated protein* GASP oder dem Protein *Sorting Nexin-1* SNX-1. Welche genaue Rolle die beiden Proteine bei der Sortierung der GPCR spielen, ist nicht bekannt [56, 57].

Ubiquitin ist ein 76 Aminosäuren großes Protein, welches kovalent an Lysine von Proteinen geknüpft wird. Auch Ubiquitin selbst besitzt verschiedene Lysine, die ubiquitiniert werden können. Auf diese Weise entstehen polyubiquitinierte Proteine, die dem proteasomalen Abbau im 26S Proteasom zugeführt werden. Monoubiquitinierungen wirken hingegen als Endocytosesignal und führen nicht zur Degradation der Proteine [58]. Sie können die konstitutive Internalisierung von GPCR verlangsamen, indem sie die Bindung der Adapterproteine der Internalisierungsmaschinerie erschweren [59]. Grundsätzlich sind Ubiquitinierungen dynamische, reversible Prozesse und Ubiquitin steht nach der Deubiquitinierung zur erneuten Bindung an andere Proteine bereit. Durch die niedrige Bindungsaffinität von ubiquitinierten Proteinen zueinander wird die Ubiquitin-abhängige Assoziation und Dissoziation von Proteinkomplexen ermöglicht [26].

ESCRT-Komplexe vermitteln die Sortierung ubiquitiniertes Proteine aus der äußeren Membran der MVB in intraluminale Vesikel. Bevor sich die Vesikel in das Lumen abschnüren, werden die Proteine deubiquitiniert [60]. Ein Modell für die Funktion der ESCRT-Maschinerie sieht vor, dass die beteiligten Proteinkomplexe ESCRT-0 bis -3 sequenziell an das ubiquitinierte Protein binden. Dabei ist die Bindung eines Komplexes immer Voraussetzung für die Bindung des nächsten. Erst die Bindung des Komplexes ESCRT-3 bewirkt die Abschnürung intraluminale Vesikel [61, 62]. Alternativ wurde postuliert, dass die verschiedenen ESCRT-Komplexe in einem konzentrischen Ring aneinander binden. Hierbei leitet vor allem der ESCRT-1-Komplex die Vesikelbildung ein [63].

1.1.5.3 Der Einfluss von β -Arrestin auf die Sortierung der GPCR

Ob Rezeptoren nach der Clathrin-vermittelten Internalisierung abgebaut werden oder recyceln, wird maßgeblich von den β -Arrestinen-1 und/oder -2 bestimmt. Das weitere Schicksal der Rezeptoren hängt aber nicht nur von der Stärke des Rezeptor- β -Arrestin-Komplexes und dem Ubiquitinierungsstatus beider Proteine, sondern auch vom Vorhandensein konservierter C-terminaler Serin-Threonin-Motive, ab [64, 65]. β -Arrestine gelten mittlerweile nicht mehr nur als reine Gerüstproteine. Sie besitzen zusätzlich zu ihrer Funktion im Rahmen der Rezeptordesensibilisierung regulatorische Aufgaben in der Signalweiterleitung [66]. So können β -Arrestine Proteine rekrutieren, welche die Transaktivierung von Rezeptortyrosinkinasen ermöglichen [67]. Außerdem sind sie in der Lage die Bindung der *extracellular regulated kinase* (ERK) 1/2 an die assoziierten GPCR zu vermitteln. Aktivierte MAP-Kinasen können in den Zellkern translozieren und Transkriptionsfaktoren aktivieren. Damit tragen β -Arrestine zum Beispiel zur Zellproliferation und -differenzierung bei. Sie sind aber auch an der Regulation anderer zellulärer Prozesse beteiligt [68].

Bezüglich der β -Arrestin-Bindung unterscheidet man zwei Klassen von GPCR. Wird der aktive und phosphorylierte Rezeptor nach Internalisierung schnell dephosphoryliert, kann β -Arrestin vom Rezeptor dissoziieren. Die anschließende Deubiquitinierung beider Proteine erlaubt dem Rezeptor das Recycling zur Plasmamembran. Dieser Weg ist charakteristisch für Klasse-A-Rezeptoren. Klasse-B-Rezeptoren werden weder dephosphoryliert noch deubiquitiniert. Hier kann β -Arrestin-2 nicht sofort vom Rezeptor dissoziieren. Das hat zur Folge, dass der Komplex aus beiden Proteinen lysosomal abgebaut wird und dadurch nur eine verspätete Resensibilisierung der Zellen möglich ist [19, 65, 69]. Grundsätzlich binden Klasse-A-Rezeptoren β -Arrestin-2 mit höherer Affinität als β -Arrestin-1. Klasse-B-Rezeptoren binden beide β -Arrestine mit ähnlicher Affinität [70].

1.1.5.4 Der Einfluss von Rab-Proteinen auf die intrazelluläre Sortierung von Proteinen

Die Spezifität des Vesikeltransports wird mit Hilfe von Rab-Proteinen gewährleistet. Rab-Proteine sind kleine monomere GTPasen, die zur Ras-Familie gehören. Durch den Austausch von GDP gegen GTP werden die cytosolisch vorliegenden Proteine aktiviert und in der Membran der sich bildenden Vesikel verankert. Fusionieren die Rab-gebundenen Vesikel mit der Membran des Zielkompartiments, kommt es zur Hydrolyse von GTP, zur Inaktivierung der Rab-Proteine und zu deren Ablösen von der Vesikelmembran [11].

GPCR, die degradiert werden, sind zunächst in Rab5-positiven frühen Endosomen und anschließend in Rab7-positiven späten Endosomen zu finden. Schnell recycelnde Rezeptoren internalisieren ebenfalls in frühe Rab5-positive Endosomen, gelangen aber über Rab4-vermittelte Transportprozesse zurück zur Plasmamembran. Beim langsamen Recycling werden GPCR zunächst in perinukleäre Rab11-positive *Recycling*-Endosomen sortiert, bevor sie zurück zur Plasmamembran transportiert werden. Wenn

Rezeptoren über das Trans-Golgi-Netzwerk recyceln, sind sie zunächst in Rab9- und anschließend ebenfalls in Rab11-positiven Vesikeln zu finden (Abb. 3) [71, 72, 73].

Es existieren viele verschiedene Transportwege in Zellen, die sich häufig überlappen und dadurch schwierig zu untersuchen sind. Bei Recyclingversuchen wurde beispielsweise häufig nur die zeitabhängige Zu- oder Abnahme der GPCR-Dichte an der Zelloberfläche bestimmt. Diese kann aber durch neusynthetisierte Rezeptoren oder Rezeptoren, die sich bereits im sekretorischen Weg befinden, verfälscht werden. Darüber hinaus kann es im Trans-Golgi-Netzwerk sogar zur Vermischung von recycelnden und neusynthetisierten Rezeptoren kommen. Ziel dieser Arbeit war es eine neue Methode zu entwickeln, um das Rezeptorrecycling zu untersuchen. Hierfür wurden der *Corticotropin-Releasing Factor*-(CRF)-Rezeptor Typ 1 (CRF₁R) und Vasopressin-Rezeptoren als Modelle verwendet. Diese werden im Folgenden kurz vorgestellt.

1.2 Die CRF-Rezeptoren

CRF-Rezeptoren zählen zur Familie 2 der GPCR, deren Ligandenbindungsstelle sich vorwiegend im N-Terminus des Rezeptors befindet. Der natürliche Ligand ist das aus 41 Aminosäuren bestehende Peptid CRF, welches im Hypothalamus sezerniert wird und über die Blutbahn zu den Rezeptoren gelangt. Grundsätzlich werden drei CRF-Rezeptoren (CRF₁R, CRF₂R, CRF₃R) unterschieden, wobei für den CRF₂R noch drei Subtypen (a, b und c) beschrieben wurden. Neben CRF haben auch Urocortin (bei Säugern), Urotensin (bei Fischen) und Sauvagine (bei Fröschen) agonistische Wirkungen an CRF-Rezeptoren [74]. CRF-Rezeptor-Antagonisten sind beispielsweise Astressin und das CRF₁R-selektive Peptid Antalarmin [75, 76].

Physiologische Bedeutung und Signaltransduktion des CRF₁R

Der CRF₁R wird im zentralen Nervensystem vorwiegend im Cortex, im Hippocampus sowie in der Amygdala und der Hypophyse exprimiert. Im peripheren Gewebe ist die Expression dagegen gering. Die Stimulation des CRF₁R in der Hypophyse führt zur Ausschüttung des adrenocorticotropen Hormons (ACTH), das die Cortisolfreisetzung aus den Nebennieren vermittelt und damit eine Stressantwort des Körpers einleitet. Eine Fehlregulation dieses Systems (*hypothalamic pituitary adrenal axis, HPA axis*) kann zur Ausbildung von Angststörungen, Depressionen und anderen stressassoziierten Störungen führen [77, 78].

Die Bindung des Agonisten an den CRF₁R führt zur Kopplung des G_s-Proteins, zur Stimulation der Adenylylcyclase und dadurch zu einer cAMP-assoziierten Signaltransduktion. Zusätzlich ist der CRF₁R auch in der Lage an ein G_q-Protein zu koppeln und so einen Anstieg des intrazellulären Kalziumspiegels zu bewirken [79, 80]. Der CRF₁R besitzt fünf N-Glykosylierungsstellen (N38, N45, N78, N90 und N98) im N-Terminus, von denen zumindest drei glykosyliert sein müssen, um eine

vollständige Rezeptorfunktion zu gewährleisten [81, 82]. Zur korrekten Ausbildung und Stabilisierung der Bindungstasche im N-Terminus sind außerdem drei Disulfidbrücken nötig (C44/C102, C68/C87 und C188/C258) [83].

Desensibilisierung und Internalisierung des CRF₁R

Nach Aktivierung wird der Rezeptor, abhängig vom zellulären Hintergrund, am C-Terminus und in der dritten intrazellulären Schleife von GRK2, GRK3 oder GRK6 phosphoryliert [84, 85]. Diese Phosphorylierungen scheinen wenig Einfluss auf die Internalisierung des CRF₁R zu haben, da sie zwar die Affinität für β -Arrestin erhöhen, für dessen Bindung aber nicht zwingend notwendig sind. Der Rezeptor rekrutiert sowohl β -Arrestin-1 als auch β -Arrestin-2 zur Plasmamembran. Eine funktionelle Bedeutung für die Internalisierung scheint aber nur β -Arrestin-2 zu haben [86]. Die eigentliche Internalisierung des CRF₁R erfordert neben β -Arrestin noch Clathrin und Dynamin [87]. Ob der Rezeptor nach seiner Internalisierung zur Plasmamembran recycelt oder degradiert wird, war bisher unklar.

1.3 Die Vasopressin-Rezeptoren

Bei den Vasopressin-Rezeptoren handelt es sich um GPCR der Familie 1b. Die Ligandenbindungsstelle für das Hormon 8-Arginin-Vasopressin (AVP) umfasst den N-Terminus sowie Teile der Transmembrandomänen und der extrazellulären Schleifen. Es werden drei Vasopressin-Rezeptoren unterschieden: Die Subtypen 1a (V_{1a}R) und 1b (V_{1b}R) und der Typ 2 (V₂R). Der V_{1a}R wird vorwiegend in glatten Gefäßmuskelzellen und der V_{1b}R in der Hypophyse exprimiert. Der V₂R befindet sich hingegen hauptsächlich in Epithelzellen des Sammelrohrs der Niere. Für die Vasopressin-Rezeptoren wurden mehrere spezifische Antagonisten beschrieben: SR49059 (V_{1a}R), SSR149415 (V_{1b}R) und SR121463 (V₂R) [88, 89].

Physiologische Bedeutung und Signaltransduktion von Vasopressin-Rezeptoren

Die Stimulation der Vasopressin-Rezeptoren dient, neben anderen Effekten, hauptsächlich der Steigerung des Blutdrucks und der Wasserrückresorption aus dem Harn. Bei erniedrigtem Blutdruck oder erhöhter Plasmaosmolalität wird AVP aus der Neurohypophyse ausgeschüttet und gelangt über die Blutbahn zu den Vasopressin-Rezeptoren.

Der V_{1a}R wird vorwiegend auf glatten Gefäßmuskelzellen exprimiert. Die Aktivierung der Rezeptoren durch das Hormon AVP führt zur Kopplung von G-Proteinen der G_{q/11}-Familie. In der Folge kommt es zur Stimulierung der Phospholipase-C- β , welche die beiden *second messenger* Diacylglycerol und IP₃ bildet [11]. IP₃ bindet an IP₃-Rezeptoren in der ER-Membran und bewirkt durch die Öffnung von Kalziumkanälen den Ausstrom von Kalziumionen aus intrazellulären Speichern. Die Kalziumionen binden an Calmodulin und es wird eine Kinase aktiviert, die die leichte Kette des Myosins

phosphoryliert. Dadurch wird die Kontraktion der Myosinfilamente und in der Folge die Kontraktion der gesamten Gefäßmuskelzelle eingeleitet [90]. Die im Rahmen der Signaltransduktion aktivierte Proteinkinase-C beeinflusst außerdem die Zellproliferation, Zelldifferenzierung und Apoptose [91]. Daneben ist der $V_{1a}R$ auch an der Thrombozytenaggregation beteiligt [92].

Der V_2R wird auf der basolateralen Seite der Epithelzellen im Sammelrohr der Niere exprimiert und vermittelt die regulierte Wasserrückresorption aus dem Urin. Durch Stimulation der Rezeptoren wird G_S -vermittelt eine membranständige Adenylcyclase aktiviert. Der resultierende cAMP-Anstieg führt zur Phosphorylierung des Wasserkanals Aquaporin (AQP) 2, der in der Membran intrazellulärer Vesikel vorliegt. Die Vesikel fusionieren daraufhin mit der apikalen Membran der Epithelzellen. Dadurch kann freies Wasser aus dem Lumen des Sammelrohrs in die Epithelzellen gelangen. Von dort wird es durch die auf basolateraler Seite konstitutiv vorhandenen Wasserkanäle AQP3 und AQP4 in das hypertone Blut rückresorbiert. Die erhöhte Wasserpermeabilität der Epithelzellen und die damit gesteigerte Wasserreabsorption führen zur Erhöhung des Blutplasmavolumens und zur Aufkonzentrierung des Harns [93, 94]. Auch die GTPase RhoA spielt eine wichtige Rolle in diesem Prozess. Sie reguliert die Depolymerisierung von F-Aktin und ermöglicht so die Translokation der Wasserkanäle in die Plasmamembran [95]. Eine Besonderheit des V_2R besteht darin, dass er nach Agonistenstimulation von einer plasmamembranständigen Metalloprotease gespalten wird [96]. Dies führt zur Zerstörung der Ligandenbindungsstelle und zum irreversiblen Verlust der Rezeptorfunktion.

Die Vasopressin-Rezeptoren werden N-glykosyliert. Die Glykosylierung des $V_{1a}R$ erfolgt an den Aminosäureresten N14, N27 und N198, die des V_2R an N22 [97, 98]. Im Gegensatz zum $V_{1a}R$ wurde für den V_2R auch eine zusätzliche O-Glykosylierung beschrieben, die im Golgi-Apparat erfolgt [82, 99]. Als weitere posttranslationale Modifikation wurden für beide Rezeptoren C-terminale Palmitoylierungen beschrieben. Der V_2R wird an den Aminosäureresten C341/C342 und der $V_{1a}R$ an C371/C372 palmitoyliert [100, 101]. Der V_2R besitzt ferner eine Disulfidbrücke zwischen den Aminosäuren C112 und C192 [102].

Desensibilisierung, Internalisierung und Recycling des $V_{1a}R$ und des V_2R

Der $V_{1a}R$ wird nach Agonistenstimulation phosphoryliert. Zur heterologen Desensibilisierung und für seine proliferative Wirkung besitzt er drei Proteinkinase-C-Phosphorylierungsstellen im C-Terminus [103]. Die homologe Desensibilisierung erfolgt über GRK2-Phosphorylierungen [104]. Der $V_{1a}R$ internalisiert nach Interaktion mit dem Agonisten Clathrin-abhängig unter Anwesenheit von β -Arrestin-2 oder β -Arrestin-1, Dynamin und Clathrin. Wahrscheinlich erfolgt die Rekrutierung in die CCP durch die AP2-Bindung an ein C-terminal vorhandenes Dileucin-Motiv L361-L362 [25, 105]. Aufgrund der schnellen Dephosphorylierung des Rezeptors kann β -Arrestin dissoziieren und der Rezeptor ist in der Lage zur Plasmamembran zu recyceln. Somit gehört der $V_{1a}R$ zu den Klasse-A-

Rezeptoren [70, 106]. Als Recyclingsignal wurde ein putatives internes PDZ-Bindemotiv (S393-T-M-S-K409) postuliert [51].

Auch die Internalisierung des V₂R verläuft nach Agonistenstimulation Clathrin-vermittelt in Anwesenheit von β -Arrestin-2 und Dynamin [106, 107]. Für den V₂R wurden unterschiedliche Internalisierungssignale beschrieben. Er besitzt ein C-terminales Tyrosin-haltiges N-P-X-X-Y-Motiv zur Bindung von Adapterproteinen und das Serinmotiv S362-S-S364, welches eine GRK-Phosphorylierungsstelle darstellt [108, 109]. Das Serinmotiv ermöglicht die Bildung eines sehr stabilen V₂R- β -Arrestin-2-Komplexes. Somit gehört der V₂R hinsichtlich der Internalisierung zu den Klasse-B-Rezeptoren [69, 109]. Zusätzlich wird der V₂R an Lysinen der dritten intrazellulären Schleife ubiquitiniert. Da keine Deubiquitinierung stattfindet, wird er nach der Internalisierung degradiert [110]. Gegen ein mögliches Rezeptorrecycling spricht auch die Tatsache, dass der Rezeptor nach Agonisteninteraktion gespalten und somit irreversibel inaktiviert wird [96].

1.4 Fluoreszierende Proteine als Marker zur Proteinlokalisierung

Ein Schwerpunkt dieser Arbeit war die Entwicklung neuer Methoden, um das Rezeptorrecycling mit Hilfe umschaltbarer Fluoreszenzproteine zu studieren. Fluoreszenz ist die spontane Emission von Licht, die entsteht, wenn ein Atom oder Molekül ein Photon aufnimmt und kurze Zeit später ein Photon geringerer Energie abgibt. Fluoreszenz wird häufig bei Molekülen beobachtet, die konjugierte Doppelbindungen enthalten. In der Natur wurden die meisten Fluoreszenzproteine in marinen Nesseltieren, vorwiegend in *Hydrozoa* und *Anthozoa*, gefunden. Die natürlichen Funktionen der Proteine sind nicht vollständig geklärt. Sie können zur Tarnung vor Fressfeinden, zur Anlockung von Beute, aber auch der Kommunikation dienen [111, 112]. Für Fluoreszenzproteine aus *Anthozoa* wird darüber hinaus eine Schutzfunktion diskutiert. Diese ergibt sich aus der Absorption von DNA-schädigendem, energiereichem Licht und der Emission energieärmeren Lichts (Photoprotektion) [113]. Dies könnte nicht nur dem Organismus selbst, sondern auch symbiotisch lebenden Algen, helfen, die das emittierte Licht zur Photosynthese nutzen [112].

Der Aufbau der Fluoreszenzproteine ist hochkonserviert. Sie besitzen eine tonnenförmige Struktur aus 11 β -Faltblättern, in deren Zentrum sich eine kurze α -Helix mit dem Chromophor befindet [114, 115]. Das Chromophor ist der Teil des Moleküls, der die fluoreszierenden Eigenschaften vermittelt. Es bildet sich posttranslational durch autokatalytische Prozesse an drei Aminosäureresten [116].

1.4.1 Die Familien der Fluoreszenzproteine

Abhängig vom Ursprung des Anregungslichts werden biolumineszierende und nicht-biolumineszierende Fluoreszenzproteine eingeteilt. Von biolumineszierenden Fluoreszenzproteinen spricht man, wenn Organismen in der Lage sind das benötigte Anregungslicht für die Fluoreszenz

selbst bereitzustellen. Biolumineszierende Fluoreszenzproteine werden in *Hydrozoa* exprimiert. Der bekannteste Vertreter dieser Gruppe ist das grünfluoreszierende Protein (GFP) [117]. Mit Hilfe künstlich eingeführter Mutationen war es möglich die Anregungs- und Emissionsspektren von GFP zu verändern und so seinen biotechnologischen Einsatz zu erweitern. Außerdem wurde auf diese Weise die Quantenausbeute und Helligkeit der Fluoreszenzmoleküle verstärkt [114].

Nicht-biolumineszierende Fluoreszenzproteine werden hingegen in *Anthozoa* exprimiert und benötigen eine externe Lichtquelle (Sonnenlicht) zur Erzeugung der Fluoreszenz [117]. Als Grundtyp der Fluoreszenz gilt sowohl bei *Anthozoa* als auch bei *Hydrozoa* die grüne Fluoreszenz. Im Laufe der Evolution sind in der Familie der nicht-biolumineszierenden Fluoreszenzproteine rot-, gelb- und cyanfluoreszierende Proteine entstanden [111]. Diese Vielfalt macht die nicht-biolumineszierenden Proteine für biotechnologische Fragestellungen besonders interessant. Bis heute gibt es über 100 Genbank-Einträge für Fluoreszenzproteine, die aus *Anthozoa* isoliert wurden, für Fluoreszenzproteine aus *Hydrozoa* hingegen weniger als zehn [111]. Verglichen mit biolumineszierenden Fluoreszenzproteinen besitzen nicht-biolumineszierende Fluoreszenzproteine eine höhere Quantenausbeute und Helligkeit. Ferner sind sie unempfindlich gegenüber pH-Änderungen, denaturierenden Substanzen und dem Ausbleichen bei hoher Lichtintensität (*Photobleaching*) [117]. Für ihre Anwendung in der Biotechnologie sind zwei ihrer Eigenschaften von entscheidendem Nachteil. Der erste besteht darin, dass viele der bisher klonierten nicht-biolumineszierenden Fluoreszenzproteine aufgrund elektrostatischer oder hydrophober Wechselwirkungen tetramerisieren [115]. Es ist schwierig diese tetramerisierenden Fluoreszenzproteine durch gerichtete Mutagenese zu monomerisieren. Häufig geht die Störung der Interaktionsflächen mit dem Verlust der Fluoreszenz einher. So waren für die Monomerisierung des aus *Discosoma sp.* isolierten DsRed allein 50 Aminosäureaustausche notwendig, um einerseits die interagierenden Aminosäuren zu substituieren und andererseits die Fluoreszenz des Proteins zu erhalten [118]. Der zweite Nachteil ist, dass die Ausbildung des Chromophors häufig stark temperaturabhängig ist und unter suboptimalen Bedingungen langsam und unvollständig verläuft. So wird die künstlich monomerisierte Form des aus *Lobophyllia hemprichii* stammenden Proteins EosFP (mEosFP) nur bei Temperaturen unter 30 °C korrekt gefaltet und ist damit nur bedingt für Anwendungen in Säugerzellkulturen geeignet [119].

1.4.2 Das grünfluoreszierende Protein (GFP) und seine Anwendungen

Hydrozoa stellen die Anregungsenergie für ihre biolumineszierenden Fluoreszenzproteine selbst bereit. Im Fall der Qualle *Aequorea victoria* bindet das globuläre Protein Aequorin Kalziumionen. Dadurch wird das kovalent gebundene Coelenterazin unter Bildung von CO₂ und kurzweiligem Licht freigesetzt. Das emittierte Licht wird von GFP absorbiert und regt dessen Fluoreszenz über das

Chromophor des Proteins (S65-Y-G67) an. Aequorin kann nach Dissoziation der Kalziumionen durch die erneute Bindung von Coelenterazin regenerieren [117].

GFP ist das erste Fluoreszenzprotein, dessen DNA isoliert und kloniert wurde [120]. Die cDNA von GFP kann mit der anderer Proteine fusioniert und die Fusionsproteine können exprimiert und anhand der Fluoreszenz lokalisiert werden. Da GFP die Eigenschaften der zu untersuchenden Proteine in der Regel nicht beeinflusst, ist es für mikroskopische Lokalisationsstudien gut geeignet. Die Klonierungen der gelb- und cyanfluoreszierenden Varianten sowie der stärker fluoreszierenden Formen (YFP, EYFP, CFP, ECFP, EGFP) schufen die Möglichkeit der zeitgleichen Beobachtung mehrerer Proteine [121]. Mikroskopische Untersuchungen konnten dadurch nicht nur einen Überblick über die intrazelluläre Lokalisation, sondern auch Aufschluss über Affinität und Nähe von interagierenden Proteinen liefern. Zur Ermittlung von Transportkinetiken werden Methoden wie *fluorescence recovery after photobleaching* (FRAP) oder die inverse Variante iFRAP eingesetzt. Hierbei werden bestimmte Zellareale so lange mit hoher Laserintensität bestrahlt, bis das Fluoreszenzprotein ausgebleicht ist (*Photobleaching*). Anschließend wird die Kinetik des Transports über die Zunahme der Fluoreszenzintensitäten in diesen Bereichen ermittelt [122]. Zur Untersuchung des Transports von Proteinen zwischen Organellen sind biolumineszierende Proteine wie GFP nicht optimal geeignet, da nur mit einer Fluoreszenz gearbeitet werden kann. Eine Verbesserung war hier die Klonierung des photoaktivierbaren GFP sowie die Nutzung anderer photoaktivierbarer Fluoreszenzproteine, die teilweise aus *Anthozoa* stammen [123, 124]. Aber auch mit diesen Proteinen ist es nicht möglich Proteine in überlappenden Transportwegen voneinander zu differenzieren. Um dies zu erreichen, wären photokonvertierbare Fluoreszenzproteine besser geeignet. Eine Photokonvertierung von GFP gelingt aber lediglich *in vitro* unter nicht-oxidativen Bedingungen durch Bestrahlung mit hohen Intensitäten bei 488 nm [125]. *In vivo* führt die Bestrahlung von GFP mit hoher Laserintensität bei gleicher Wellenlänge zum Verlust der Fluoreszenz (*Photobleaching*) [122]. Um den Transport von Proteinen besser untersuchen zu können, wären photokonvertierbare Fluoreszenzproteine wünschenswert, die auch *in vivo* anwendbar sind. Eine Reihe von Proteinen, die diese Eigenschaft besitzen, konnten bislang aus *Anthozoa* kloniert werden. Zu diesen Proteinen gehört das photokonvertierbare Protein Kaede.

1.4.3 Eigenschaften des Kaede-Proteins

Das Kaede-Protein zählt zu den nicht-biolumineszierenden Fluoreszenzproteinen und wurde 2002 aus der Steinkoralle *Trachyphyllia geoffroy* kloniert [126]. Durch UV-Bestrahlung verschiebt sich die Fluoreszenz von grün ($\lambda_{\text{ex/em}} = 508 \text{ nm}/518 \text{ nm}$, gKaede) nach rot ($\lambda_{\text{ex/em}} = 572 \text{ nm}/580 \text{ nm}$, rKaede) [126]. Der Veränderung der Fluoreszenz liegen Umsortierungen im Chromophor H62-Y-G64 zugrunde. Ein entscheidender Unterschied des Kaede-Chromophors gegenüber dem GFP-Chromophor ist die Anwesenheit eines Histidin- anstelle eines Serinrests. Darüberhinaus konnte gezeigt werden,

dass sich auch die Wasserstoffbrückenbindungen, in die die Kaede- und GFP-Chromophore eingebettet sind, deutlich voneinander unterscheiden [127].

Durch UV-Bestrahlung des Kaede-Proteins kommt es zu einer β -Eliminierung im Chromophor. Unter Einbindung von Wasser ändern sich die Bindungsverhältnisse und der Imidazolring des Histidins wird in das Chromophor inkorporiert (Abb. 5). Die darin enthaltenen konjugierten Doppelbindungen nehmen Einfluss auf die fluoreszierenden Eigenschaften, so dass sich die Anregungs- und Emissionswellenlängen verschieben. Darüber hinaus hat die β -Eliminierung einen Bruch des Proteinrückgrates zur Folge (Abb. 5) [128]. Die Struktur des Kaede-Proteins wurde 2007 mit einer Auflösung von 1,4 Å und 1,6 Å entschlüsselt [129]. Dabei wurde festgestellt, dass die Strukturen der rot- und grünfluoreszierenden Formen fast deckungsgleich sind. Die Veränderungen im Chromophor und der daraus resultierende Bruch des Proteinrückgrates haben also kaum Auswirkungen auf die Proteinstruktur [129].

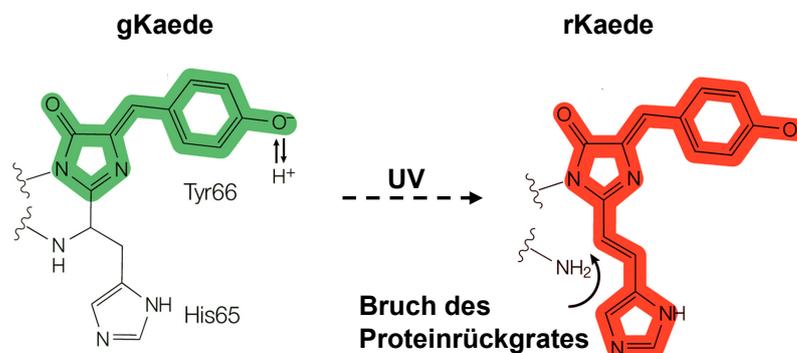


Abb. (5) Photokonvertierung des Kaede-Proteins. Dargestellt ist die Struktur der Kaede-Chromophore vor (gKaede) und nach (rKaede) UV-Bestrahlung.

Nach UV-Bestrahlung bleibt die rote Fluoreszenz des Kaede-Proteins, auch unter oxidierenden Bedingungen, erhalten. Sowohl die Helligkeit als auch die Stabilität des rotfluoreszierenden rKaede-Proteins sind mit denen der gKaede-Form vergleichbar. Beide zeichnen sich durch eine hohe Quantenausbeute aus. Weitere Vorteile sind, dass beide Formen messtechnisch vollständig getrennt werden können und dass die Photokonvertierung ausschließlich durch UV-Bestrahlung und nicht durch eine der beiden Anregungswellenlängen herbeigeführt wird [126]. Von Nachteil ist, dass das Kaede-Protein, wie viele Fluoreszenzproteine aus *Anthozoa*, tetramerisiert [129]. Die Tetramerisierung von Kaede scheint für die freie Bewegung der Moleküle im Cytosol von Zellen keine Rolle zu spielen [126]. Trotzdem könnte sie seine Anwendbarkeit als Fusionspartner einschränken. Bisherige Versuche, ein monomeres Kaede-Protein herzustellen, scheiterten. Es wurde lediglich eine dimere Tandemform (td-Kaede) beschrieben [130]. Die Tetramerisierung ist wahrscheinlich der Grund, weshalb Kaede bisher vorwiegend als Indikator für die Neusynthese eines Proteins eingesetzt wurde und nicht für Transportstudien [131, 132].

2 Fragestellung

Die Untersuchung des Rezeptorrecyclings ist aufgrund der überlappenden Transportwege neusynthetisierter und recycelnder Rezeptoren schwierig. Die Verwendung des photokonvertierbaren Fluoreszenzproteins Kaede als Fusionspartner könnte bei Recyclingversuchen die Differenzierung dieser beiden Rezeptorpopulationen erlauben. Es sollte daher in dieser Arbeit untersucht werden, ob das Rezeptorrecycling mit Hilfe von Kaede-Fusionsproteinen in Echtzeit mikroskopisch darstellbar und messbar ist.

Im ersten Teil der Arbeit sollte überprüft werden, ob das Kaede-Protein die Eigenschaften der Fusionspartner beeinflusst und somit für Transportstudien von Membranproteinen geeignet ist. Ein entscheidender Nachteil des Proteins könnte hier dessen Tetramerisierung sein [129]. Parallel sollte anhand der bereits publizierten Struktur versucht werden die zur Di- bzw. Tetramerisierung führenden Aminosäurreste auszutauschen, um so ein monomeres Kaede-Protein herzustellen. Ist Kaede als Fusionspartner geeignet, sollte im zweiten Teil der Arbeit das noch unbekanntes Recyclingverhalten des CRF₁R mit Hilfe dieser neuen Technologie untersucht werden. Ziel war die Etablierung eines mikroskopischen Testsystems, in dem neusynthetisierte von recycelnden Rezeptoren unterschieden werden können. Als Kontrollen für das Recyclingverhalten des CRF₁R wurden der V_{1a}R (recycelnder Rezeptor) und der V₂R (degradierter Rezeptor) verwendet [106, 133, 134].

3 Material und Methoden

3.1 Material

3.1.1 Chemikalien und Reagenzien

[¹²⁵ I]cAMP-Tyrosylmethylester (81,4 TBq/mmol)	Biotrend Chemikalien GmbH, Köln, D
[¹²⁵ I]Tyr ⁰ -Sauvagine	PerkinElmer LAS GmbH, Rodgau-Jügesheim, D
[³ H]8-Arginin-Vasopressin	GE Healthcare, München, D
3-Isobutyl-1-Methylxanthin	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München, D
8-Arginin-Vasopressin (AVP)	AG Beyermann, Leibniz-Institut für Molekulare Pharmakologie (FMP), Berlin, D
Alkalische Phosphatase-(AP)-konjugiertes Ziege-anti-Kaninchen-IgG	Dianova GmbH, Hamburg, D
AP-konjugiertes Ziege-anti-Maus-IgG	Dianova GmbH, Hamburg, D
Ammoniumperoxodisulfat (APS)	Fluka Chemie AG, Buchs, CH
Antalarmin	AG Beyermann, FMP, Berlin, D
Aquasafe 300 Plus, Szintillator	Zinsser Analytic GmbH, Frankfurt, D
<i>BigDye Terminator v3.0 Kit</i>	Applied Biosystems Inc., Foster City, USA
Collagen R	Serva Electrophoresis GmbH, Heidelberg, D
Coomassie-Brillantblau G250	Serva Electrophoresis GmbH, Heidelberg, D
dNTP-Mix, 10 mM	Fermentas GmbH, St. Leon-Rot, D
<i>Dynabeads Protein A</i>	Invitrogen GmbH, Karlsruhe, D
Endoglykosidasen	New England Biolabs GmbH, Frankfurt am Main, D
EZ-Link™ Sulfo-NHS-Biotin	Perbio Science Deutschland GmbH, Bonn, D
Fetales Kälberserum (FKS)	Invitrogen GmbH, Karlsruhe, D
G.418 Sulfat (Geneticin)	Calbiochem, Merck KGaA, Darmstadt, D
Hi-Di™ Formamide	Applied Biosystems Inc., Foster City, USA
Isopropyl-1-Thio-β-D-Galaktopyranosid (IPTG)	Sigma Aldrich Chemie GmbH, München, D
Kaninchen-anti-cAMP-Antiserum	Abcam Inc., Cambridge, UK
Kaninchen-anti-GFP-Serum	AG Schüle, FMP, Berlin, D
<i>Lipofectamine2000™ Reagent</i>	Invitrogen GmbH, Karlsruhe, D
<i>LumiLight Western Blotting Substrate</i>	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, D
<i>LysoTrackerRed-DND99</i>	Invitrogen GmbH, Karlsruhe, D
Maus-anti-β-Arrestin-2-IgG (monoklonal)	Santa Cruz Biotechnology Inc., Heidelberg, D
Maus-anti-Biotin-IgG (monoklonal)	Dianova GmbH, Hamburg, D
Maus-anti-FLAG-M1-IgG (monoklonal)	Sigma Aldrich Chemie GmbH, München, D

Maus-anti-GFP-IgG (monoklonal)	Clontech Laboratories Inc., Saint-Germain-en-Laye, F
Maus-anti-Kaede-IgG (monoklonal)	MBL International Corp., Woburn, USA
Maus-anti-Rab11-IgG (monoklonal)	Dianova GmbH, Hamburg, D
Maus-IgG _{2B} -Isotypkontrolle	R&D Systems GmbH, Wiesbaden, D
Monensin	Calbiochem, Merck KGaA, Darmstadt, D
Myo-[2- ³ H]-Inositol (37 MBq/ml)	Amersham Biosciences Europe GmbH, Freiburg, D
Nitrozellulose (OPTITRAN BA-S 85)	Schleicher & Schuell GmbH, Dassel, D
N,N,N',N'-Tetramethylethyldiamin (TEMED)	Sigma Aldrich Chemie GmbH, München, D
<i>NucleoBond Plasmid Kit</i>	Macherey-Nagel GmbH & Co. KG, Düren, D
<i>NucleoSpin Extract Kit</i>	Macherey-Nagel GmbH & Co. KG, Düren, D
Peroxidase-konjugiertes Ziege-anti-Kaninchen-IgG	Dianova GmbH, Hamburg, D
<i>pET30 Ek/LIC Cloning Kit</i>	Novagen, Merck KGaA, Darmstadt, D
p-Nitro-Tetrazolium-Blau-Chlorid	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, D
Poly-L-Lysin	Sigma Aldrich Chemie GmbH, München, D
Prestained Protein Marker, Broad Range (6-175 kDa)	New England BioLabs GmbH, Frankfurt am Main, D
<i>QuickChange™ Site-directed Mutagenesis Kit</i>	Stratagene Europe, Amsterdam, NL
Restriktionsendonukleasen	New England Biolabs GmbH, Frankfurt am Main, D
RotiLoad, 4fach konzentriert	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, D
Rotiphorese®-Gel 30 (37,5:1), Acrylamid- und Bisacrylamidstammlösung	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, D
R-Phycoerythrin (R-PE)-konjugiertes Ziege-anti-Maus-IgG	Dianova GmbH, Hamburg, D
Sauvagine	AG Beyermann, FMP, Berlin, D
SR121463B	Sanofi Synthelabo GmbH, Frankfurt am Main, D
SR49049	Sanofi Synthelabo GmbH, Frankfurt am Main, D
<i>Talon Metal Affinity Resin</i>	Becton Dickinson GmbH, Heidelberg, D
Trypanblau	Seromed GmbH, Wien, A
Trypsin	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, D Biochrom AG, Berlin, D

Venimmun	Centeon Pharma GmbH, Marburg, D
Zellulose-konjugiertes Schaf-anti-Kaninchen-IgG	Immunodiagnostic Systems GmbH, Frankfurt am Main, D

Hier nicht aufgeführte Chemikalien wurden von folgenden Firmen bezogen: Merck KGaA (Darmstadt, D), Carl Roth GmbH & Co. KG (Karlsruhe, D), Life Technologies (Invitrogen GmbH, Karlsruhe, D), Sigma Aldrich Chemie GmbH (München, D), J.T. Baker (Mallinckrodt Baker Inc., Griesheim, D) und Perkin Elmer Inc. (Waltham, USA).

3.1.2 Geräte

Blotkammern	Mini-PROTEAN® 3 Western TransBlot, Bio-Rad Laboratories GmbH, München, D
Durchfluscytometer	FACSCanto II, Becton Dickinson GmbH, Heidelberg, D
Elektrophoresekammern	Mini-PROTEAN® 3 Cell, Bio-Rad Laboratories GmbH, München, D PerfectBlue Gelsystem Mini L, PeqLab Biotechnologie GmbH, Erlangen, D
Elektroporationsgerät	GenePulser Xcell Electroporation System, Bio-Rad Laboratories GmbH, München, D
<i>γ-Counter</i>	Wallac 1470 Wizard, GMI Inc., Ramsey, USA
Geldokumentationssysteme	Molecular Imager Gel Doc XR System, Bio-Rad Laboratories GmbH, München, D LumiImager F1™, Boehringer Mannheim GmbH, Mannheim, D
Harvester	Inotech AG, Dottikon, CH
Labormikroskop	Zeiss Axiovert 40, Carl Zeiss MicroImaging GmbH, Jena, D
<i>Laser Scanning</i> -Mikroskop (LSM) und additive Komponenten	ConfoCor3, Carl Zeiss MicroImaging GmbH, Jena, D LSM 510 META, Carl Zeiss MicroImaging GmbH, Jena, D
Mikroinjektionsspritze	700 series syringe, Hamilton Co., Bonaduz, CH
Pipettierhilfe	Pipetboy, Integra Biosciences GmbH, Fernwald, D
Pipetten	research® 0,5 – 10 µl, Eppendorf GmbH, Hamburg, D research® 2 – 20 µl, Eppendorf GmbH, Hamburg, D research® 20 - 200 µl, Eppendorf GmbH, Hamburg, D research® 100 – 1000 µl, Eppendorf GmbH, Hamburg, D research® 500 – 5000 µl, Eppendorf GmbH, Hamburg, D
pH-Meter	HI9321 Microprocessor pH-Meter, HANNA instruments Deutschland GmbH, Kehl am Rhein, D
Photometer	Ultraspec2000, Amersham Pharmacia Biotech Europe GmbH, Wien, A

Reinstwasseranlage	Typ MilliQ plus, Millipore GmbH, Schwalbach, D
Rotator	Multishaker Rotator RS-24, Biosan Ltd., Warren, USA
Rotoren	11133 Festwinkelrotor, Sartorius AG, Göttingen, D 3042 Festwinkelrotor, Heraeus Sepatech GmbH, Osterode am Harz, D 3757 Festwinkelrotor, Heraeus Sepatech GmbH, Osterode am Harz, D F-45-12-1 Festwinkelrotor, Eppendorf GmbH, Hamburg, D SLA3000 Festwinkelrotor, DuPont Corp., Delaware, USA SS34 Festwinkelrotor, DuPont Corp., Delaware, USA
Sequenziergerät	ABI PRISM™ 3100 Avant Genetic Analyzer, Applied Biosystems Inc., Foster City, USA
Szintillationszähler	β-Counter, Beckmann Coulter GmbH, Krefeld, D
Waagen	Sartorius AG, Göttingen, D
Zellhomogenator	Potter S, Braun Biotech Int. GmbH, Melsungen, D
Zentrifugen	Biofuge 15, Heraeus Sepatech GmbH, Osterode am Harz, D Biofuge 28RS, Heraeus Sepatech GmbH, Osterode am Harz, D Capsulefuge PMC-060, Tomy Seiko Co. Ltd., Fremont, USA MiniSpin Plus, Eppendorf GmbH, Hamburg, D 3K12 Sigma, Sartorius AG, Göttingen, D Rotations-Vakuum-Konzentrator α-RVC, Christ Gefriertrocknungsanlagen GmbH, Osterode, D Sorval RC5C Plus, DuPont Corp., Delaware, USA SVC 100 SpeedVac Savant, GMI Inc., Ramsey, USA

Für die Experimente dieser Arbeit wurde Wasser verwendet, das mit dem Milli-Q Plus Wasseraufbereitungssystem® (Millipore GmbH) von organischen und ionischen Bestandteilen befreit wurde und eine Leitfähigkeit von höchstens 10 µS/cm bei Raumtemperatur besaß.

3.1.3 Software

Clone Manager 5.0 für Windows, Excel Microsoft Office 2003, FACSDiva Version 6.1.1, GraphPad Prism Version 3.02, LSM-Software Release Version 3.2, LSM ZEN 2007, Photoshop 6.0, RADLIG Version 4.0, SeqMan™ 2, Sybyl Version 7.3.5

3.1.4 Bakterienstämme und eukaryotische Zelllinien

Bakterienstamm	Genotyp	Herkunft
<i>E. coli</i> DH5 α	fhuA2 Δ (argF-lacZ)U169 phoA glnV44 Φ 80 Δ (lacZ)M15 gyrA96 recA1 relA1 endA1 thi-1 hsdR17	Stratagene Europe, NL
<i>E. coli</i> Rosetta DE3	F ⁻ ompT hsdS _B (r _B ⁻ m _B ⁻) gal dcm (DE3) pRARE (Cam ^R)	Novagen, Merck KGaA, Darmstadt, D

Eukaryotische Zelllinien	Merkmale	Herkunft
HEK-293	<i>Human embryonic kidney cells</i> ; mit Adenovirus Typ 5 transformiert (DSMZ-Nr. ACC 305)	DSMZ GmbH, Braunschweig, D

Stabile Zelllinien

Für diese Arbeit wurden für folgende Konstrukte stabil exprimierende HEK-293-Zelllinien angelegt bzw. genutzt: CRF₁R.CFP (C. Rutz, FMP), CRF₁R.Kaede, *FLAG*.CRF₁R.Kaede, V_{1a}R.CFP, V_{1a}R.Kaede, *FLAG*.V_{1a}R.Kaede, V₂R.CFP, V₂R.Kaede und *FLAG*.V₂R.Kaede.

3.1.5 Desoxyribonukleinsäuren

3.1.5.1 Vektoren

pEYFP.N1, pECFP.N1, pEGFP.N1 (alle Takara Bio Europe/Clontech Inc., Saint-Germain-en-Laye, F), CoralHue™ pKaede-MN1 (MBL International Corp., Woburn, USA), pET30 Ek/LIC (Novagen, Merck KGaA, Darmstadt, D).

3.1.5.2 Rekombinante Plasmide

Plasmidname	Funktionelle Bereiche	Herkunft
ARRB2.YFP	β -Arrestin-2, YFP	G. P. Püschel, Universität Potsdam, D
ARRB2.CFP	β -Arrestin-2, CFP	Krasel et al, 2005 [135]
CRF ₁ R.CFP	CRF ₁ R, CFP	C. Rutz, FMP Berlin, D
CRF ₁ R.GFP	CRF ₁ R, GFP	U. B. Kaupp, IBI Forschungszentrum Jülich, D
CRF ₁ R.Kaede	CRF ₁ R, Kaede	für diese Arbeit kloniert
CRF ₁ R.U	CRF ₁ R	für diese Arbeit kloniert
DiKaede	DiKaede	für diese Arbeit kloniert
DiKaede.ET30	DiKaede, 6 \times His	für diese Arbeit kloniert

EYFP-Endo	N-terminale 81 Aminosäuren der humanen β -1,4-Galactosyltransferase, YFP	Takara Bio Europe/ Clontech Inc., Saint- Germain-en-Laye, F
<i>FLAG.CRF₁R.Kaede</i>	<i>FLAG</i> , CRF ₁ R, Kaede	für diese Arbeit kloniert
<i>FLAG.V_{1a}R.Kaede</i>	<i>FLAG</i> , V _{1a} R, Kaede	für diese Arbeit kloniert
<i>FLAG.V₂R.Kaede</i>	<i>FLAG</i> , V ₂ R, Kaede	für diese Arbeit kloniert
Kaede.ET30	Kaede, 6×His	für diese Arbeit kloniert
Rab11.CFP	Rab11, CFP	P. I. Nedvetsky, FMP, Berlin, D
SoloKaede	SoloKaede	für diese Arbeit kloniert
SoloKaede.ET30	SoloKaede, 6×His	für diese Arbeit kloniert
V _{1a} R.CFP	V _{1a} R, CFP	für diese Arbeit kloniert
V _{1a} R.Kaede	V _{1a} R, Kaede	für diese Arbeit kloniert
V _{1a} R.U	V _{1a} R	für diese Arbeit kloniert
V ₂ R.CFP	V ₂ R, CFP	Wüller <i>et al.</i> , 2004 [136]
V ₂ R.Δ.Kaede	V ₂ R: N-terminale 71 Aminosäuren fusioniert mit dem C-Terminus, Kaede	für diese Arbeit kloniert
V ₂ R.GFP	V ₂ R, GFP	Schülein <i>et al.</i> , 1998 [137]
V ₂ R.Kaede	V ₂ R, Kaede	für diese Arbeit kloniert
V ₂ R.U	V ₂ R	für diese Arbeit kloniert

3.1.5.3 Oligonukleotide

Oligonukleotide zur Mutagenese

Angegeben sind nur die *Forward*-(Fw)-Oligonukleotide.

Plasmidname	Oligonukleotide	Sequenz (5'-3')
CRF ₁ R.U	CRF ₁ R.X	GCAGTCCACAGCGTAAGCGGGGACCATGG
DiKaede	E140A	CTCTGAAATGGGCGGCATCCACTG
	Y147A.R149A	CTGAGAAAATGGCTTTGGCTGATGGAGTGTTG
	D156A.T158A	GTTGACGGGCGCTATTGCAATGGCTCTGC
	R170A	GATGTCCATTACGCATGTGACTTCAG
	R189A	GTTGCCAGGAGCTCACTTTGTGCGATC
<i>FLAG.CRF₁R.Kaede</i>	<i>FLAG.CRF₁R</i>	GGGATCAACCATGGACTATAAGGACGATGACGAT AAGGGACGGCGCCCGC
<i>FLAG.V_{1a}R.Kaede</i>	<i>FLAG.V_{1a}R</i>	GTACGGACAGCATGGACTATAAGGACGATGACGA TAAGAGTTTCCCGC
<i>FLAG.V₂R.NotI</i>	V ₂ R.NotI	CCCTGGCCAAGGCGGCCGCTCTAGAGGGCCCG

SoloKaede	E90A.S92D	GGGTTTTCTTGGGCGCGAGACCTGATGTTTCGAG
	V100A.I102A	GGACGGGGGCGCTTGCGCCGCTACAAATG
	V123A.N124A.	GATTTGATGGCGCAGCCTTTCCCCCAGCTGGTCCT
	N128A	GTTATG
	D150A.V152A	GGCTTTGGCTGCTGGAGCGTTGACGGGGCGC
V _{1a} R.U	V _{1a} R.X	GTACGGACAGCATGGACTATAAGGACGATGACGA TAAGAGTTTCCCGC
V ₂ R.U	V ₂ R.X	CCCTGGCCAAGTAACCAGCGGCCGCGC

Oligonukleotide zur LIC-Klonierung

Angegeben sind sowohl die Fw- als auch die *Reversed*-(Rev)-Oligonukleotide.

Plasmidname	Oligonukleotide	Sequenz (5'-3')
Kaede.ET30	LIC.Kaede.Fw	GAGGAGAAGCCCGGTTTACTTGACGTTGTCCGGC AATCC
	LIC.Kaede.Rev	GACGACGACAAGATGGTGAGTCTGATTAAACCAG

3.1.6 Flüssigmedien, Agarplatten und Antibiotika für *E. coli*

Luria Bertani (LB)-Medium,	10 g/l	Pepton
Typ Lennox	5 g/l	Hefeextrakt
	5 g/l	NaCl
LB-Agarplatten	12 g/l LB-Medium	Agar

Antibiotika

Ampicillin	100 µg/ml
Kanamycin	30 µg/ml
Chloramphenicol	27 µg/ml

3.1.7 Flüssigmedien und Zusätze für eukaryotische Zelllinien

Dulbecco's Modified Eagle's-Medium (DMEM)

Antibiotika und andere Zusätze zur Herstellung von Zellkulturmedium

10 % v/v	FKS
2 mM	L-Glutamin
0,25 mg/ml	G-418 zur Selektion stabiler Klone mit Neomycin-Resistenzgen (Selektionsmedium)
10 % v/v	DMSO (Einfriermedium)

3.2 Methoden

Sofern keine Literaturreferenz angegeben ist, wurden die Methoden dem Handbuch von Sambrook und Russell (2001) entnommen oder sind an dieses angelehnt.

3.2.1 Molekularbiologische Methoden

3.2.1.1 Plasmid-DNA-Isolierung

Zur Isolierung von Plasmid-DNA wurden kommerziell erwerbliche Kits verwendet (*NucleoSpin Plasmid QuickPure* und *NucleoBond PCI100*, beide von Macherey-Nagel GmbH & Co. KG). Die Durchführung erfolgte laut Herstellerprotokoll.

3.2.1.2 Restriktionsverdau und Agarosegelelektrophorese

Beim Restriktionsverdau wird die isolierte DNA von Restriktionsendonukleasen zwischen spezifischen Basenabfolgen gespalten. Die entstehenden DNA-Fragmente können durch den Vergleich mit einem Größenstandard zugeordnet werden. Für den Restriktionsverdau wurden Restriktionsendonukleasen, ihre entsprechenden Puffer und falls notwendig BSA der New England Biolabs GmbH genutzt. Der Verdau mit zwei Restriktionsendonukleasen erfolgte unter Verwendung des vom Hersteller empfohlenen Puffersystems.

In einem 20- μ l-Restriktionsansatz wurde 1 μ g DNA mit jeweils 5 U Restriktionsendonuklease für 30 Minuten bei 37 °C verdaut und anschließend über eine Agarosegelelektrophorese der Größe nach aufgetrennt. Die horizontale Gelelektrophorese erfolgte unter Verwendung von Elektrophorese-Puffer (80 mM Tris-HCl pH 7, 1 mM EDTA, 0,15 % v/v Essigsäure), eines Agarosegels (0,8 % w/v Agarose in Elektrophorese-Puffer) und Gelelektrophoresekammern (PerfectBlue Gelsystem Mini L, PeqLab Biotechnologie GmbH). Um die DNA anzufärben, wurde außerdem 0,1 mg Ethidiumbromid pro 100 ml Gel zugegeben. Die Auftrennung der DNA erfolgte bei 0,9 V/cm² für 45 Minuten. Die Ethidiumbromid-gefärbten DNA-Fragmente wurden durch UV-Bestrahlung im Geldokumentationssystem (Molecular Imager Gel Doc XR System, Bio-Rad Laboratories GmbH) sichtbar gemacht, dokumentiert und ausgewertet.

3.2.1.3 Aufreinigung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen

Zur Klonierung der cDNA von zu untersuchenden Proteinen in Vektoren wurden sowohl die Vektor-DNA als auch die cDNA mit den gleichen Restriktionsendonukleasen verdaut und über eine Gelelektrophorese aufgetrennt. Die Fragmente wurden aus dem Gel ausgeschnitten, mit Hilfe des kommerziell erhältlichen *NucleoSpin Extract Kits* (Macherey-Nagel GmbH & Co. KG) nach Anleitung des Herstellers aufgereinigt und in 25 μ l H₂O eluiert.

3.2.1.4 Ligation

Die *T4*-Ligase (New England Biolabs GmbH) ist in der Lage verdaut und aufgereinigte DNA-Fragmente (cDNA und Vektor-DNA) zu einem vollständigen Plasmid zu ligieren. Die Ligationsreaktion wurde laut Herstellerprotokoll in einem 20- μ l-Ansatz durchgeführt und für 30 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend erfolgte die Transformation in *E. coli* (siehe 3.2.1.7).

3.2.1.5 Gerichtete Mutagenese

Mit Hilfe der gerichteten Mutagenese lassen sich gezielt einzelne Basen in Genen austauschen, deletieren oder einführen. Zur Mutagenese wurden das *QuickChange® Site-Directed Mutagenesis Kit* (Stratagene Europe) und Fw- bzw. Rev-Oligonukleotide genutzt, welche die gewünschten Mutationen tragen. Die folgenden Tabellen zeigen einen Standardreaktionsansatz und fassen die Durchführung der gerichteten Mutagenese zusammen:

Reaktionsansatz:	2 μ l	10 \times Reaktionspuffer
	50 ng	Plasmid-DNA
	0,5 μ M	Fw-Oligonukleotid
	0,5 μ M	Rev-Oligonukleotid
	0,5 mM	dNTP-Mix
	ad 20 μ l	H ₂ O
	2 U	<i>PfuTurbo</i> DNA Polymerase

Durchführung:

Schritt	Zyklen	Temperatur	Zeit
Initiale Denaturierung	1	95 °C	30 s
Denaturierung	16	95 °C	30 s
Hybridisierung		58 °C	1 min
Elongation		68 °C	1 min/kb
Finale Elongation	1	68 °C	7 min
Kühlung	1	4 °C	∞

Die methylierte, wildtypische DNA wurde für eine Stunde bei 37 °C mit 20 U der Restriktionsendonuklease DpnI verdaut. Anschließend wurde der Mutageneseansatz in *E. coli* transformiert (siehe 3.2.1.7).

3.2.1.6 LIC-Klonierung

Ligation Independent Cloning (LIC) ist ein kommerzielles System zur Klonierung von DNA-Fragmenten in prokaryotische Expressionsvektoren ohne Restriktionsverdau und Ligationsreaktion. Der Klonierung liegt die Bindung einzelsträngiger komplementärer Enden eines linearisierten Vektors und der cDNA des zu untersuchenden Proteins zugrunde. Hierfür wird die 3'-5'-Exonukleaseaktivität der *T4*-DNA-Polymerase genutzt. Nach der Zusammenlagerung von Vektor und cDNA wird das Konstrukt in *E. coli* transformiert. Dort bilden sich kovalente Bindungen aus und die zirkuläre Plasmid-DNA entsteht. Die LIC-Klonierungen wurden mit Hilfe des *pET30 Ek/LIC Cloning Kit* (Novagen, Merck KGaA) laut Herstellerprotokoll durchgeführt. Die folgenden Tabellen zeigen den Standardreaktionsansatz zur Durchführung der initialen Polymerase-Kettenreaktion (PCR):

Reaktionsansatz:	2 µl	10× Reaktionspuffer
	50 ng	Plasmid-DNA
	0,5 µM	Fw-Oligonukleotid
	0,5 µM	Rev-Oligonukleotid
	0,5 mM	dNTP-Mix
	ad 20 µl	H ₂ O
	2 U	<i>PfuTurbo</i> DNA Polymerase

Durchführung:

Schritt	Zyklen	Temperatur	Zeit
Initiale Denaturierung	1	95 °C	30 s
Denaturierung	16	95 °C	30 s
Hybridisierung		58 °C	1 min
Elongation		68 °C	1 min/kb
Finale Elongation	1	68 °C	7 min
Kühlung	1	4 °C	∞

Nach der Auftrennung des PCR-Produkts mittels horizontaler Agarosegelelektrophorese erfolgte die Aufreinigung der amplifizierten DNA (siehe 3.2.1.2 und 3.2.1.3). Anschließend wurden die überhängenden einzelsträngigen Enden der cDNA mit Hilfe der *T4*-Polymerase und dATP generiert. Die Probenreaktion hierfür beinhaltete folgende Komponenten:

Reaktionsansatz:	2 µl	aufgereinigtes PCR-Produkt
	2 µl	10× Puffer
	1,25 mM	dATP
	5 mM	DTT
	ad 20 µl	H ₂ O
	1 U	<i>T4</i> DNA-Polymerase

Nach 30-minütiger Inkubation des Reaktionsansatzes bei Raumtemperatur erfolgte die Inaktivierung der *T4*-DNA-Polymerase bei 75 °C für fünf Minuten. Anschließend wurden 2 µl des *T4*-Polymerase-behandelten PCR-Produkts zu 1 µl pET30 Ek/LIC-Vektor gegeben und für fünf Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Die Reaktion wurde durch Zugabe von EDTA (1 µl, 25 mM, fünf Minuten) gestoppt und die Plasmid-DNA wurde in *E. coli* transformiert (siehe 3.2.1.7).

3.2.1.7 Transformation von Plasmid-DNA in *E. coli*

Unter Transformation versteht man das Einbringen von Plasmid-DNA in kompetente Bakterienzellen. Der *E. coli*-Stamm DH5α wurde zur Klonierung, Mutagenese und zur Vermehrung von Plasmid-DNA elektroporiert. Der *E. coli*-Stamm Rosetta DE3 wurde durch einen Hitzeschock transformiert und anschließend zur Proteinexpression genutzt. Die Selektion der transformierten Bakterien erfolgte auf selektiven Agarplatten. Nach Inkubation der Platten bei 37 °C über Nacht wurden einzelne Kolonien gepickt und aus diesen Plasmide (*E. coli* DH5α) bzw. Proteine (*E. coli* Rosetta DE3) isoliert (siehe 3.2.1.1 und 3.2.6.6).

Transformation durch Elektroporation

Nach dem Auftauen der elektrokompetenten Zellen (40 µl) auf Eis und anschließender Zugabe der DNA (1 µl zur Retransformation bzw. 4 µl bei Mutagenesen oder Ligationen) wurden die Ansätze für fünf Minuten auf Eis inkubiert und in eine Küvette (1 mm Dicke) überführt. Die Elektroporation erfolgte bei einer Spannung von 1250 V und einer elektrischen Kapazität von 25 µF im GenePulser Xcell Electroporation System (Bio-Rad Laboratories GmbH). Die Zellen wurden anschließend in 1 ml LB-Medium aufgenommen, zur Expression des Resistenzgens für eine Stunde bei 37 °C geschüttelt und auf selektiven Agarplatten ausplattiert.

Transformation durch Hitzeschock

Die chemisch kompetenten Bakterienzellen (10 µl) wurden auf Eis aufgetaut, mit 1 µl Plasmid-DNA gemischt und fünf Minuten auf Eis inkubiert. Die Transformation erfolgte durch Erhitzen des Ansatzes für 45 Sekunden auf 42 °C und anschließende Inkubation für zwei Minuten auf Eis. Die Zellen wurden eine Stunde bei 37 °C in LB-Medium geschüttelt und auf selektiven Agarplatten ausplattiert.

3.2.1.8 Sequenzierung

Zur Sequenzierung wurde die Didesoxymethode mit fluoreszierenden ddNTP unter Verwendung des *BigDye Terminator v3.0 Kit* (Applied Biosystems Inc.) durchgeführt. Die fluoreszenzmarkierten DNA-Fragmente unterschiedlicher Größe wurden über Kapillarelektrophorese aufgetrennt und die gemessenen Signale computergestützt ausgewertet. Die folgenden Tabellen zeigen den Standardreaktionsansatz und fassen die Durchführung der PCR zusammen:

Reaktionsansatz:	0,25 µl	<i>BigDye Terminator v3.0 Kit</i>
	1,9 µl	400 mM Tris-HCl pH 9,2, 10 mM MgCl ₂
	500 ng	Plasmid-DNA
	1 µM	Oligonukleotid
	ad 10 µl	H ₂ O

Durchführung:

Schritt	Zyklen	Temperatur	Zeit
Denaturierung	25	96 °C	10 s
Hybridisierung		50 °C	5 s
Elongation		60 °C	4 min
Kühlung	1	4 °C	∞

Zur Fällung der DNA wurde die Sequenzierreaktion mit 1 µl Natriumacetat-EDTA-Puffer (1,5 M Natriumacetat pH 8,0, 0,25 mM EDTA) und 40 µl 95 % v/v Ethanol gemischt und für 20 Minuten auf Eis gestellt. Die gefällte DNA wurde abzentrifugiert (20 Minuten, 20000 ×g), mit 200 µl 70 % v/v Ethanol gewaschen, getrocknet und in das institutseigene Sequenzierlabor gegeben. Die Analyse und Auswertung der Proben erfolgte nach Resuspendierung in 20 µl Hi-Di™ Formamide im automatischen Sequenzierer ABI PRISM™ 3100 Avant Genetic Analyzer (Applied Biosystems Inc., Software SeqMan™ 2).

3.2.2 Zellkulturtechniken

3.2.2.1 Beschichtung von Deckgläsern und Zellkulturschalen

Beschichtung mit Poly-L-Lysin

Die Beschichtung der Deckgläser und 24-Wellplatten verbessert bei HEK-293-Zellen die Haftung am Untergrund, da die negativ geladene Zellmembran mit dem positiv geladenen Poly-L-Lysin über elektrostatische Kräfte interagieren kann. Zur Beschichtung wurden 500 µl Poly-L-Lysin-Lösung (0,1 mg/ml) auf 30-mm-Deckgläser bzw. 200 µl in die Vertiefungen einer 24-Wellplatte pipettiert und

nach 30 Minuten wieder abgesaugt. Die Trocknung der Oberfläche erfolgte für eine Stunde bei Raumtemperatur. Da Biotin an Poly-L-Lysin bindet, wurden die Zellkulturschalen für den Biotinylierungsversuch mit Rattenschwanzkollagen beschichtet.

Beschichtung mit Rattenschwanzkollagen

Hier wurden 400 µl einer Lösung aus 1 % w/v Rattenschwanzkollagen (Collagen R, Serva Electrophoresis GmbH) und 10 % v/v Ethanol in 35-mm-Schalen gegeben und über Nacht luftgetrocknet.

3.2.2.2 Transfektion von HEK-293-Zellen

Zur transienten Transfektion der Zellen wurde *Lipofectamine2000™ Reagent* (Invitrogen GmbH) verwendet. Die Transfektionsmethode beruht auf der Bildung kationischer, zellpermeabler Komplexe des Transfektionsreagens mit der DNA.

Transiente Transfektion

Zur transienten Transfektion wurden die entsprechenden Mengen DNA, *Lipofectamine2000™ Reagent* und DMEM gemischt, für 30 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert und anschließend zu den Zellen gegeben. Die Transfektionsprotokolle für verschiedene Schalengrößen und Zellzahlen sind in der folgenden Tabelle zusammengefasst:

Schalen	Zellzahl	<i>Lipofectamine2000™ Reagent</i>	Plasmid-DNA	DMEM
24-Wellplatte	$7,5 \times 10^4$	0,5 µl	0,2 µg	50 µl
35 mm	1×10^5	2 µl	0,8 µg	100 µl
100 mm	4×10^6	12 µl	6 µg	700 µl

Die Zellen wurden 24 Stunden nach Zellaussaat transfiziert und weitere 24 Stunden später für die Versuche verwendet.

Stabile Transfektion

Zur stabilen Transfektion wurden 2×10^5 HEK-293-Zellen in eine 60-mm-Zellkulturschale ausgesät und transfiziert (500 µl DMEM, 2 µg DNA und 5 µl *Lipofectamine2000™ Reagent*). Vier Tage nach der Zellaussaat wurden die Zellen im Selektionsmedium (siehe 3.1.6) aufgenommen und in eine 100-mm-Schale überführt. Aus dieser wurden bis zu sechs weitere 100-mm-Zellkulturschalen (1:2, 1:4, 1:8, 1:16, 1:32, 1:64) seriell verdünnt. Unter dem Mikroskop gut identifizierbare Klone wurden passagiert und anschließend durch mikroskopische Analysen und Bindungsversuche charakterisiert. Die Lagerung der Zelllinien erfolgte in Einfriermedium (siehe 3.1.7) in flüssigem Stickstoff.

3.2.3 Mikroskopische Methoden an lebenden HEK-293-Zellen

Die mikroskopische Analyse lebender Zellen wurde am LSM 510 META (Carl Zeiss MicroImaging GmbH) durchgeführt. Um für die Untersuchungen des Proteintransports optimale Bedingungen zu schaffen, wurde eine Heizkammer genutzt (37 °C). Die am Mikroskop aufgenommenen Bilder wurden im lsm-Dateiformat in einer Datenbank gespeichert und nach entsprechender Bearbeitung für die Ergebnisdarstellung in das jpg-Format überführt.

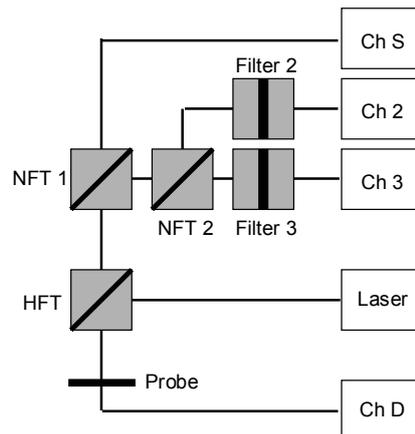


Abb. (6) Strahlengang am Laser Scanning-Mikroskop (LSM 510 META). Der Hauptfarbteiler (HFT) reflektiert die Anregungsstrahlung (Laser) und ist für die Probenfluoreszenzen durchlässig. Dadurch wird garantiert, dass von der Probe und dem Deckglas reflektiertes Anregungslicht nicht zu den Detektoren gelangt. Die Nebenfarbteiler (NFT 1 und NFT 2) übernehmen die Funktion der spektralen Trennung verschiedener Fluoreszenzen, und somit deren Zuordnung zu den verschiedenen Detektoren (Ch 2, Ch 3, Ch S). Farbglasfilter (Filter 2 und 3) sind für die gewünschte Fluoreszenzstrahlung durchlässig. Beim META-Detektor wird diese Funktion durch die gezielte Auswahl einzelner Detektoren innerhalb einer Detektorzeile erreicht. Der Durchlichtdetektor (Ch D) liefert, durch einen ausgewählten Anregungslaser, ein Hellfeld-Durchlichtbild (nicht konfokal).

Für die mikroskopischen Untersuchungen waren Bildaufnahmen mit bis zu drei Kanälen (Messung von drei unterschiedlichen Fluoreszenzen) erforderlich (Abb. 6). Als Anregungslichtquellen sowie für die Photokonvertierung des Kaede-Proteins standen am Mikroskop folgende Laser zur Verfügung: Argonionen-Laser (364 nm), Argon-Laser (458 nm, 488 nm, 514 nm) und Helium-Neon-Laser (543 nm).

3.2.3.1 Kolokalisationsstudien

Um die intrazelluläre Lokalisation von Proteinen zu untersuchen, wurden Kolokalisationsstudien mit koexprimierten, fluoreszenzmarkierten Proteinen durchgeführt. Für die Anfärbung der Plasmamembran sowie intrazellulärer Kompartimente wurden verschiedene spezifische Fluoreszenzfarbstoffe genutzt.

Koexpression fluoreszenzmarkierter Proteine

Zur Koexpression fluoreszenzmarkierter Proteine wurden 1×10^5 HEK-293-Zellen auf Poly-L-Lysin-beschichtete Deckgläser (siehe 3.2.2.1) ausgesät. Für Kolokalisationsstudien wurden Zellen, die die Kaede- oder CFP-fusionierten Rezeptoren stabil exprimieren, zusätzlich mit fluoreszenzmarkierten Markerproteinen (ARRB2.GFP, ARRB2.YFP, EYFP-Endo, Rab11.CFP) kotransfiziert (siehe 3.2.2.2). Zwei Tage nach der Aussaat wurden die Deckgläser in eine Küvette übertragen, mit Krebs-Ringer-HEPES-(KRH)-Puffer (10 mM NaCl, 5 mM KCl, 1,2 mM KH_2PO_4 , 1,2 mM MgSO_4 , 1,2 mM CaCl_2 , 6 mM Glukose, 25 mM HEPES) überschichtet und mikroskopiert.

Färbung mit fluoreszierenden Molekülen

1×10^5 HEK-293-Zellen, die die Kaede- oder CFP-fusionierten Rezeptoren stabil exprimieren, wurden auf Poly-L-Lysin-beschichtete Deckgläser ausgesät (siehe 3.2.2.1). Zwei Tage später erfolgte die Übertragung der Deckgläser in eine Küvette und nachfolgend deren mikroskopische Analyse. Die Anfärbung der Plasmamembran erfolgte mit einer Trypanblaulösung (0,025 % w/v in KRH-Puffer) direkt am Mikroskop. Zur Anfärbung von Lysosomen wurden die HEK-293-Zellen eine Stunde vor der Mikroskopie mit $1 \mu\text{M}$ *LysoTrackerRed-DND99* (Invitrogen GmbH) in DMEM inkubiert. Die in dieser Arbeit verwendeten Einstellungen am Mikroskop (siehe Abb. 6) sind in der folgenden Tabelle zusammengefasst:

	CFP (A) und TB (B)	gKaede (A) und YFP (B)	GFP (A) und CFP (B)	gKaede (A) und CFP (B) und TB (C)	gKaede (A) und LysoTracker (B) und TB (C)
Objektiv	Plan-Neofluar 100× / 1.3 Öl	Plan-Neofluar 100× / 1.3 Öl	Plan-Neofluar 100× / 1.3 Öl	Plan-Neofluar 100× / 1.3 Öl	Plan-Neofluar 100× / 1.3 Öl
Optische Schichtdicke	≤ 0,9 μm	≤ 0,9 μm	≤ 0,9 μm	≤ 0,9 μm	≤ 0,9 μm
Scan-Modus	<i>Frame</i>	<i>Frame</i>	<i>Frame</i>	<i>Frame</i>	<i>Line</i>
Anregung	A: 488 nm B: 543 nm	A: 488 nm B: 514 nm	A: 488 nm B: 458 nm	A: 488 nm B: 458 nm C: 543 nm	A: 488 nm B: 543 nm C: 543 nm
HFT	A: 458 B: 488/543	A: 488 B: UV/514	A: 488 B: 458	A: 488 B: 458 C: 488 / 543	488 / 543
NFT 1	A: Spiegel B: Spiegel	A: 490 B: 515	A: 490 B: ---	A: Spiegel B: --- C: Spiegel	Spiegel
NFT 2	A: 545 B: Spiegel	---	---	A: 490 C: 545	545
Filter 2	BP 475-525	---	---	---	A: BP 505-530
Filter 3	LP 560	---	---	A: BP 505-530 C: LP 560	B: LP 560 C: LP 560
„Filter Ch S“	---	A: BP 495-516 B: BP 527-612	A: BP 516-602 B: BP 463-495	B: BP 463-495	---
Detektor	A: Ch 2 B: Ch 3	A: Ch S B: Ch S	A: Ch S B: Ch S	A: Ch 3 B: Ch S C: Ch 3	A: Ch 2 B: Ch 3 C: Ch 3

LP = Langpass, BP = Bandpass, „Filter Ch S” – Ansteuerung definierter Detektoren in der Empfängerzeile des META-Detektors.

3.2.3.2 Kaede-basierte Untersuchungen des Rezeptorrecyclings

Mit Hilfe des Kaede-Proteins wurde das Recycling von GPCR untersucht. Im ersten Schritt wurden die Zellen mit einem Agonisten behandelt, um die Rezeptorinternalisierung zu induzieren. Anschließend erfolgte die Photokonvertierung von gKaede zu rKaede durch selektive Bestrahlung der internalisierten Rezeptoren mit UV-Licht. In den nächsten 45 Minuten wurden die Zellen in Anwesenheit des Rezeptorantagonisten bei 37 °C inkubiert, um das Rezeptorrecycling zu ermöglichen und eine erneute Internalisierung der Rezeptoren zu verhindern.

Zur Untersuchung des Rezeptorrecyclings wurden 1×10^5 HEK-293-Zellen, die die Kaede-fusionierten Rezeptoren stabil exprimierten, in μ -Slides (Ibidi GmbH) ausgesät. Zwei Tage nach der Zellaussaat erfolgte eine 30-minütige Behandlung der Zellen mit dem Agonisten (CRF₁R: 100 nM Sauvagine, V_{1a}R und V₂R: 100 nM AVP in DMEM mit 10 % v/v FKS). Danach wurden die Schalen in eine Heizkammer (37 °C) überführt und mit dem entsprechenden Antagonisten (CRF₁R: 1 μ M Antalarmin, V_{1a}R: 1 μ M SR49059, V₂R: 1 μ M SR121463B in KRH-Puffer) inkubiert. Zu Beginn der Untersuchungen wurde ein Zwei-Kanal-Bild (gKaede und rKaede) aufgenommen. Im gKaede-Kanal konnte das perinukleäre Kompartiment der internalisierten Rezeptoren lokalisiert und eine entsprechende ROI (*region of interest*) definiert werden. Dieses wurde für 20 Sekunden mit einem UV-Laser (364 nm, 25 % Laserintensität) bestrahlt. Anschließend wurden gKaede und rKaede in einer Zeitserie detektiert (zehn Bilder im Intervall von fünf Minuten). Aufgrund der schwachen Fluoreszenzintensität von rKaede musste die optische Schichtdicke etwas größer gewählt werden. Die gesamten Einstellungen des Mikroskops (siehe Abb. 6) sind in der folgenden Tabelle zusammengefasst:

gKaede und **rKaede**

Objektiv	Plan-Neofluar 100× / 1.3 Öl
Optische Schichtdicke	≤ 2,0 μm
Scan-Modus	Line
Anregung	gKaede: 488 nm rKaede: 543 nm Photokonversion: 364 nm
HFT	UV / 488 / 543 / 633
NFT 1	Spiegel
NFT 2	545
Filter 2	BP 505-530
Filter 3	LP 560
„Filter Ch S“	- - -
Detektor	gKaede: Ch 2 rKaede: Ch 3

3.2.3.3 Kaede-basierte Untersuchungen von Rezeptorbiosynthese und -transport

Bei der Untersuchung der Transportkinetik mit Hilfe des Kaede-Proteins wird ausgenutzt, dass die Photokonvertierung der Fluoreszenz durch UV-Licht irreversibel ist. Das bedeutet, dass in einer vollständig umgeschalteten Zelle (nur rKaede) ausschließlich neusynthetisierte Proteine grün fluoreszieren (gKaede). Um die Kinetik der Biosynthese und des sekretorischen Transports von GPCR zu bestimmen, wurde die Intensität der neusynthetisierten Rezeptoren in der Plasmamembran quantifiziert.

Zur Untersuchung der Rezeptorbiosynthese und des Rezeptortransports wurden 1×10^5 HEK-293-Zellen, die die Kaede-fusionierten Rezeptoren stabil exprimieren, in μ -Slides ausgesät. Nach 48 Stunden Inkubation wurden die Schalen in die Wärmekammer (37 °C) überführt und mit KRH-Puffer überschichtet. Zu Beginn wurde ein Zwei-Kanal-Bild von gKaede und rKaede aufgenommen. Anschließend wurden die Zellen so lang mit UV-Laser (364 nm, 25 % Laserintensität) bestrahlt, bis gKaede vollständig in rKaede umgewandelt war. Danach erfolgte der Start der Zeitserie (16 Bilder im Intervall von zehn Minuten) und die Detektion von gKaede und rKaede. Die Fluoreszenzintensität von gKaede in der Plasmamembran wurde mit Hilfe der LSM-Software bestimmt. Die Einstellungen am Mikroskop entsprachen denen des Kaede-basierten Recyclingversuchs (siehe 3.2.3.2 und Abb. 6).

3.2.3.4 Untersuchungen zur Stabilität des Kaede-Proteins

Die UV-Bestrahlung von gKaede führt zur Änderung der Fluoreszenzeigenschaften und zum Bruch des Proteinrückgrates. Um die Stabilität von gKaede und rKaede zu vergleichen, wurden Zellen, die ein verkürztes Rezeptorkonstrukt (V₂R.Δ.Kaede) exprimieren, solange mit UV-Licht bestrahlt bis ca. 50 % gKaede in rKaede umgewandelt war. Dieser Prozess wurde über die Messung der gKaede-

Fluoreszenzintensität kontrolliert. Anschließend wurden die Zellen bei 37 °C inkubiert, um die zellulären Biosynthese- und Abbauprozesse zu ermöglichen. Die zeitliche Änderung der Expression der gKaede- und rKaede-Fusionsproteine in der Plasmamembran wurde mit Hilfe der LSM-Software quantifiziert. Um einen Einfluss der Neusynthese auf das gKaede/rKaede-Verhältnis auszuschließen, erfolgte die Durchführung bei einem Teil der Experimente unter Cycloheximid-Behandlung.

Zur Bestimmung der Stabilität der gKaede- und rKaede-Fusionsproteine wurden 1×10^5 HEK-293-Zellen in μ -Slides ausgesät. 24 Stunden nach der Transfektion mit V₂R.Δ.Kaede wurden die Schalen in eine Heizkammer (37 °C) überführt und mit KRH-Puffer (mit und ohne 40 µg/ml Cycloheximid) überschichtet (siehe 3.2.2.2). Mit einem Zwei-Kanal-Bild (gKaede und rKaede) wurde zu Beginn sichergestellt, dass keine rKaede-Fluoreszenz detektierbar war. Mit der konventionellen Fluoreszenzeinrichtung des Mikroskops (Quecksilber-Hochdrucklampe, Filtersatz 01, Carl Zeiss MicroImaging GmbH) wurden die Zellen nun so lange bestrahlt, bis die Intensität von gKaede um ca. 50 % gesunken war. Anschließend erfolgte die Aufnahme einer Zeitserie mit sieben Bildern und einem Intervall von 30 Minuten, bei der sowohl gKaede als auch rKaede detektiert wurden. Die Fluoreszenzintensität von gKaede und rKaede in der Plasmamembran wurde mit Hilfe der LSM-Software bestimmt. Die Einstellungen des Mikroskops (siehe Abb. 6) sind unter 3.2.3.2 aufgeführt.

3.2.4 Durchflusszytometrische Messungen zur Untersuchung des Rezeptorrecyclings

Um das Rezeptorrecycling durchflusszytometrisch zu untersuchen, wurde eine bereits publizierte Methode modifiziert [138]. Grundlage für den Versuch ist die kalziumabhängige Bindung des *FLAG-M1*-Antikörpers an N-terminal *FLAG*-fusionierte Rezeptoren. Primärer Antikörper und Rezeptor werden nach Agonistenstimulation zusammen internalisiert. Nicht-internalisierte Rezeptoren, die den primären Antikörper gebunden haben, können von diesem durch Kalziumdepletion befreit werden. Am Ende werden recycelte, *FLAG-M1*-markierte Rezeptoren mit Hilfe eines Fluoreszenzfarbstoff-konjugierten Sekundärantikörpers in der Plasmamembran detektiert.

Für die Versuche wurden 8×10^6 HEK-293-Zellen ausgesät, welche die Proteine *FLAG.CRF₁R.Kaede*, *FLAG.V_{1a}R.Kaede* oder *FLAG.V₂R.Kaede* stabil exprimierten. Nach zwei Tagen Inkubation wurden die Zellen mit DPBS-CM (137 mM NaCl, 2,7 mM KCl, 1,5 mM KH₂PO₄, 8,1 mM Na₂HPO₄, 9 mM CaCl₂ und 5 mM MgCl₂) abgespült, auf acht Reaktionsgefäße verteilt und in Inkubationspuffer (DPBS-CM, 1 % v/v Venimmun) gewaschen (Zentrifugationen bei 700 ×g für fünf Minuten). Anschließend wurden jeweils vier Reaktionsgefäße mit *FLAG-M1*-Antikörper (100 µl, 100 µg/ml Inkubationspuffer) oder einer Isotypkontrolle (100 µl, 100 µg/ml IgG_{2B} in Inkubationspuffer) inkubiert, um die unspezifische Bindung des *FLAG-M1*-Antikörpers unter den gegebenen Bedingungen zu kontrollieren. Alle Antikörperinkubationen erfolgten für zehn Minuten bei 4 °C. Anschließend wurde zweimal mit jeweils 800 µl Inkubationspuffer gewaschen. Jeweils ein

Reaktionsgefäß mit *FLAG-M1*-markierten Zellen bzw. mit Isotypkontrolle-behandelten Zellen wurde folgenden Behandlungen unterzogen:

Probe	Behandlung
-	Sekundärantikörper
A	Internalisierung Sekundärantikörper
D	Internalisierung Entfernung der Antikörper von der Zelloberfläche Sekundärantikörper
R	Internalisierung Entfernung der Antikörper von der Zelloberfläche Recycling Sekundärantikörper

Als Sekundärantikörper wurde ein R-PE-konjugierter anti-Maus-Antikörper (1:50 in Inkubationspuffer) genutzt. Zur Internalisierung der Rezeptoren wurden die Zellen für 30 Minuten in DMEM mit 10 % v/v FKS und Agonist ($V_{1a}R$ und V_2R : 100 nM AVP, oder CRF_1R : 100 nM Sauvagine) bei 37 °C inkubiert. Um nicht-internalisierte Antikörper zu entfernen, wurden die Zellen viermal mit Dissoziationspuffer (137 mM NaCl, 2,7 mM KCl, 1,5 mM KH_2PO_4 , 8,1 mM Na_2HPO_4 , 0,4 % w/v EDTA) gewaschen. Das Recycling erfolgte für drei Stunden in DMEM mit 10 % v/v FKS bei 37 °C. Zwischen und nach jeder Behandlung wurden die Proben zweimal mit 800 µl Inkubationspuffer gewaschen.

Die Fluoreszenz der Proben (2×10^4 Zellen) wurde am FACSCanto II (Becton Dickinson GmbH) gemessen. Die Auswertung erfolgte mit Hilfe der Software FACS Diva (Version 6.1.1). Um das spezifische Rezeptorsignal zu ermitteln, wurde die unspezifische Bindung (Isotypkontrolle) von den gemessenen Werten (*FLAG-M1*) subtrahiert. Anschließend wurde die Menge der Rezeptoren in der Plasmamembran auf die Menge unter Kontrollbedingungen (-) normiert.

3.2.5 Fluoreszenz-Korrelations-Spektroskopie (FCS) zur Untersuchung des Oligomerisierungsstatus des Kaede-Proteins

Die FCS ist eine hochempfindliche optische Messmethode auf Einzelmolekülniveau, die aus Fluktuationen der Fluoreszenzintensität innerhalb des konfokalen Volumens Informationen gewinnt. Auf diese Weise lassen sich Diffusionskonstanten, Konzentrationen und Bindungen zwischen verschiedenen diffundierenden Spezies messen bzw. nachweisen. Besitzt eine biologische Probe zwei

spektral verschiedene Fluorophore, so erhält man mittels FCS zunächst für jedes dieser Moleküle eine eigene Messspur (Fluoreszenzintensität als Funktion der Zeit $F(t)$). In einer Messspur steht jede Spitze für ein fluoreszierendes Teilchen, das gerade durch das Anregungsvolumen diffundiert. Da jedes dieser Teilchen eine bestimmte Zeit braucht, um den Fokus zu durchqueren, können bei zeitlich aufeinander folgenden Abtastzeiten Photonen von ein und demselben Teilchen detektiert werden. Das heißt, die Intensitäten sind zeitlich korreliert. Zur Auswertung wird eine solche Messspur mit sich selbst korreliert (autokorreliert). Die Autokorrelationsfunktion $G(\tau)$ liefert Aussagen über die Diffusionskonstante oder die Konzentration des untersuchten Fluorophors. Eine weitere Möglichkeit ist die Messspuren zweier spektral unterschiedlich fluoreszierender Moleküle miteinander zu korrelieren, man spricht in diesem Fall von einer Kreuzkorrelation. Lässt sich eine Kreuzkorrelation zwischen den Fluorophoren nachweisen, kann man annehmen, dass sich die beiden Fluorophore zusammen durch das konfokale Volumen bewegt haben. Die Kreuzkorrelation kann daher genutzt werden, um Interaktionen zwischen verschiedenen Molekülen nachzuweisen.

Für die FCS-Messungen wurden 1×10^5 HEK-293-Zellen auf Poly-L-Lysin beschichtete Deckgläser ausgesät und transient mit Kaede, V_2R .Kaede und V_2R . Δ .Kaede transfiziert (siehe 3.2.2.1 und 3.2.2.2). Mit Hilfe einer Laserdiode (405 nm, 2 % Intensität) wurde gKaede zu 50 % photokonvertiert. Anhand eines Intensitätsprofils der Zellen wurde die Z-Position für die Messung festgelegt. Zur Messung von V_2R .Kaede und V_2R . Δ .Kaede wurde der Laser auf die Plasmamembran und zur Messung von wildtypischem Kaede auf das Cytoplasma fokussiert. Die Zwei-Kanal-Messung erfolgte 20-mal für jeweils fünf Sekunden mit 0,4 % Laser-Intensität ($\lambda_{exc} = 488 \text{ nm}$, $\lambda_{exc} = 561 \text{ nm}$).

Die FCS-Messungen wurden im Rahmen eines Gastaufenthaltes bei Dr. Klaus Weißhart (Carl Zeiss MicroImaging GmbH) an einem LSM510-ConfoCor3 (Carl Zeiss MicroImaging) durchgeführt. Dieses System unterscheidet sich von dem im Kapitel 3.2.3 beschriebenen LSM-System durch ein zusätzliches FCS-Modul (siehe Abb. 7).

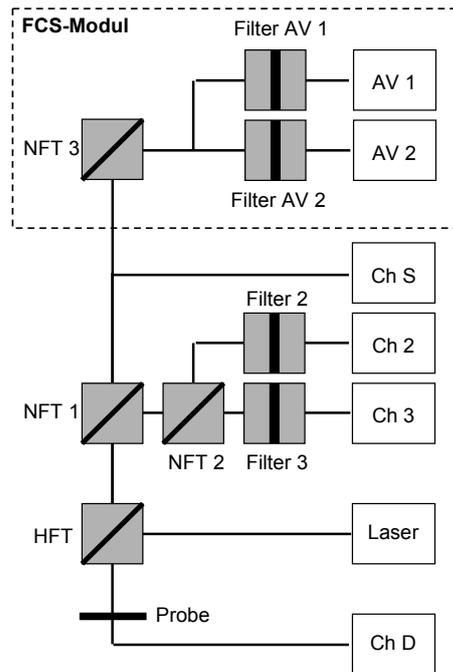


Abb. (7) Erweiterung des LSM-Schemas unter Einbeziehung des FCS-Moduls. Die Anregung wird, wie in Abb. (6) beschrieben über das LSM-System vorgenommen. Die Detektion der FCS-Signale erfolgt über ein zusätzliches Modul am konfokalen System (FCS-Modul). Mit Hilfe des NFT 3 werden Fluoreszenzen den unterschiedlichen Kanälen (AV 1 und AV 2) zugewiesen. Zusätzliche Filter vor den Empfängern (Filter AV 1 und Filter AV 2) sichern die erwünschte spektrale Auswahl ab.

Als Anregungslichtquellen sowie für die Photokonvertierung des Fusionsproteins Kaede standen folgende Laser zur Verfügung: Argon-Laser (488 nm), Diodenlaser (405 nm) und *diode-pumped solid state*-(DSSP)-Laser (561 nm). Bei den in der Abb. dargestellten Detektoren (AV 1 und AV 2) handelt es sich nicht wie bei den LSM-Detektoren (Ch S, Ch 2 und Ch 3) um *Photomultiplier* sondern um *Avalanche* Dioden. Diese erreichen beim Zählen einzelner Photonen Zählfrequenzen bis zu 100 MHz, was eine wichtige Voraussetzung für die anschließenden Korrelationsanalysen der Messsignale ist. Die Belegung der Filter am Mikroskop (siehe Abb. 7) und die notwendigen Einstellungen lauteten wie folgt:

gKaede und rKaede	
Objektiv	Apochrom C 40× / 1.2 W (Korr)
Anregung	rKaede: 488 nm gKaede: 561 nm Photokonversion: 405 nm
HFT	405 / 488 / 561
NFT	565
Filter 1	BP 505-540 IR
Filter 2	LP 580
Detektor	gKaede: Ch 1 rKaede: Ch 2

Die gemessenen Daten für das wildtypische lösliche Kaede wurden mit Hilfe des Auswerteprogramms LSM Zen 2007 nach folgender Gleichung für eine dreidimensionale Bewegung mit einer Komponente (ohne Offset, mit Triplettfraktion) angepasst:

$$G(\tau) = 1 + G_{\infty} + \frac{1}{N} \cdot \left(1 + \frac{T \cdot e^{-\tau/\tau_F}}{1-T}\right) \cdot \left(\frac{1}{\left(1 + \frac{\tau}{\tau_D}\right) \cdot \left(1 + \frac{\tau}{\tau_D} \cdot S^2\right)^{1/2}}\right)$$

Für die membranständigen Fusionsproteine V₂R.Kaede und V₂R.Δ.Kaede, die lediglich einer zweidimensionalen Bewegung unterliegen, erfolgte eine Anpassung mit zwei Komponenten (ohne Offset, mit Triplettfraktion):

$$G(\tau) = 1 + G_{\infty} + \frac{1}{N} \cdot \left(1 + \frac{T \cdot e^{-\tau/\tau_F}}{1-T}\right) \cdot \left(\frac{1}{\left(1 + \frac{\tau}{\tau_{D,1}}\right)} + \frac{1-f}{\left(1 + \frac{\tau}{\tau_{D,2}}\right)}\right)$$

G_{∞} = Offset; N und T = Anzahl der Partikel und der Triplettfraktion; τ_D , τ_{D1} und τ_{D2} = Diffusionszeiten der unterschiedlichen Molekülspezies; τ_F = Triplettzeit; f und 1-f = Fraktionen der Spezies 1 und 2; τ = Korrelationszeit; $S = \omega_z/\omega_{xy}$ = Strukturparameter mit ω_z und ω_{xy} , die die halbe Höhe und den Radius des konfokalen Volumens beschreiben.

3.2.6 Proteinbiochemische Methoden

3.2.6.1 Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE), Immunoblot und Coomassie-Brillantblau-Färbung

Mit Hilfe der SDS-PAGE können Proteine unabhängig von ihrer Ladung nach ihrer Größe aufgetrennt werden. Anschließend lassen sich alle vorhandenen Proteine mit einer Coomassie-Brillantblau-Färbung bzw. bestimmte Proteine über spezifische Antikörper im Immunoblot sichtbar machen. Beim Immunoblot werden die Proteine aus dem Gel auf Nitrozellulosemembranen überführt und anschließend mit einem spezifischen Primär- und einem Enzym-konjugierten Sekundäntikörper detektiert. Zur Entwicklung des Immunoblots mit einem AP-konjugierten Sekundäntikörper werden die Salze Brom-Chloro-Indolyl-Phosphat und p-Nitro-Tetrazolium-Blau-Chlorid verwendet und enzymatisch zu einem blauen Farbstoff umgesetzt. Bei Verwendung eines Peroxidase-konjugierten Antikörpers wird der Immunoblot unter Zugabe eines chemilumineszierenden Substrats entwickelt.

Für die SDS-PAGE wurden Mini-PROTEAN® 3 Apparaturen (Bio-Rad Laboratories GmbH) verwendet (Gelgröße: 8 × 10 × 0,1 cm). Bei der Herstellung der SDS-Gele wurde zunächst das Trenngel gegossen und bis zur vollständigen Polymerisierung mit Isopropanol überschichtet. Anschließend wurde das Sammelgel mit den Probenaschen auf das Trenngel gegossen. Die folgende Tabelle gibt die Zusammensetzung der verschiedenen Trenn- und Sammelgele an:

	Trenngel			Sammelgel
	8 %	13 %	15 %	
H ₂ O	2,5 ml	0,8 ml	---	3,5 ml
Rotiphorese®-Gel 30	3 ml	4,875 ml	5,625 ml	835 µl
0,75 M Tris-HCl, pH 8,8	5,625 ml	5,625 ml	5,625 ml	---
0,625 M Tris-HCl, pH 6,8	---	---	---	625 µl
20 % SDS	56,5 µl	56,5 µl	56,5 µl	25 µl
TEMED	5,65 µl	5,65 µl	5,65 µl	5 µl
APS	79 µl	79 µl	79 µl	25 µl

Die SDS-PAGE erfolgte bei 0,25 mA/cm² pro Gel für 1 bis 1,5 Stunden in Laufpuffer (3 g/l Tris, 14,4 g/l Glycin, 1 g/l SDS, pH 7,3). Zur Färbung der Proteine mit Coomassie-Brillantblau wurde das Gel für mindestens 30 Minuten in Färbelösung (25 % v/v Isopropanol, 10 % v/v Essigsäure, 0,05 % w/v Coomassie R250) inkubiert und danach in Entfärber (10 % v/v Essigsäure) geschüttelt, bis nur noch die Proteinbanden gefärbt blieben.

Für den spezifischen Nachweis der Proteine mit Antikörpern im Immunoblot wurden die Proteine zunächst im Tankblotverfahren (Mini-PROTEAN® 3 Apparaturen, Bio-Rad Laboratories GmbH) auf Nitrozellulose überführt (1,5 Stunden bei 1,7 mA/cm² Gel in 2,4 g/l Tris, 11,26 g/l Glycin, 20 % v/v Methanol, 0,04 % w/v SDS). Zur Absättigung der unspezifischen Bindungsstellen wurde die Nitrozellulose-Membran in TBS-T (6,1 g/l Tris-HCl, 8,8 g/l NaCl, 0,05 % v/v Tween20, pH 7,5) mit 2 % w/v BSA für eine Stunde geschüttelt. Anschließend wurde die Membran mit dem verdünnten Primärantikörper (in TBS-T mit 2 % v/v BSA, Antikörperverdünnungen siehe Tabelle) für eine Stunde bei Raumtemperatur inkubiert und dreimal für zehn Minuten mit TBS-T gewaschen. Die Inkubation mit dem verdünnten, AP-gekoppelten, polyklonalen Sekundärantikörper (in TBS-T mit 2 % w/v BSA, Antikörperverdünnungen siehe Tabelle) erfolgte ebenfalls für eine Stunde. Danach wurde die Membran erneut dreimal für zehn Minuten mit TBS-T gewaschen. Die folgende Tabelle gibt die Verdünnungen der verwendeten Antikörper an:

Primärantikörper	Verdünnung
Kaninchen-anti-Kaede-Serum (polyklonal)	1:100
Maus-anti-Biotin-IgG (monoklonal)	1:1000
Maus-anti-GFP-IgG (monoklonal)	1:1000
Maus-anti-Rab11-IgG (monoklonal)	1:500

Sekundärantikörper	Verdünnung
AP-konjugiertes Ziege-anti-Kaninchen-IgG (polyklonal)	1:2500
AP-konjugiertes Ziege-anti-Maus-IgG (polyklonal)	1:5000
Peroxidase-konjugiertes Ziege-anti-Kaninchen-IgG (polyklonal)	1:2000

Zur Entwicklung des Blots wurde Brom-Chloro-Indolyl-Phosphat (0,2 mg/ml in 10 mM Tris-HCl pH 9,5) und p-Nitro-Tetrazolium-Blau-Chlorid (0,5 mg/ml in 10 mM Tris-HCl pH 9,5) zugesetzt. Die Reaktion wurde durch Spülen der Membran mit H₂O gestoppt. Alternativ wurden Peroxidase-konjugierte Antikörper zur Detektion genutzt. Der Immunoblot wurde in einer Lösung aus chemilumineszierendem Substrat (*LumiLight Western Blotting Substrate*, Roche Diagnostics GmbH) entwickelt und die Lumineszenz wurde mit dem LumiImager-F1TM (Boehringer Mannheim GmbH) detektiert.

3.2.6.2 Immunpräzipitation

Zwei Tage nach Aussaat der stabil transfizierten HEK-293-Zellen wurden die Zellen mit DPBS gewaschen und mit Lysispuffer (50 mM Tris-HCl, 150 mM NaCl, 1 mM Na₂EDTA, 1 % v/v TritonX-100, 0,1 % w/v SDS, pH 8) für eine Stunde bei 4 °C aufgeschlossen. Die im Lysat befindlichen Zelltrümmer wurden abzentrifugiert (20000 ×g, 20 Minuten) und der Überstand wurde für drei Stunden auf die mit Antikörper beladene Protein-A-Sepharose gegeben. Nach der Präzipitation (Zentrifugationen bei 900 ×g, zwei Minuten) wurden die Proteine zweimal mit Waschpuffer 1 (50 mM Tris-HCl, 500 mM NaCl, 1 mM Na₂EDTA, 0,5 % v/v TritonX-100, 0,1 % w/v SDS, pH 8) und einmal mit Waschpuffer 2 (50 mM Tris-HCl, 1 mM Na₂EDTA, 0,5 % v/v TritonX-100, 0,1 % w/v SDS, pH 8) gewaschen. Die Elution der Proteine von der Protein-A-Sepharose erfolgte durch Erhitzen der Proben (95 °C, fünf Minuten) in RotiLoad Probenpuffer. Anschließend wurden die Proteine in der SDS-PAGE aufgetrennt und im Immunoblot nachgewiesen (siehe 3.2.4.1). Für den Biotinylierungsversuch und zur Untersuchung des Glykosylierungsstatus wurden folgende Mengen Protein-A-Sepharose und präzipitierender Antikörper verwendet:

	Schalen	Zellzahl	Sepharose	Präzipitierender Antikörper
Biotinylierung	35 mm	6×10 ⁵	3 mg	0,3 µl Kaninchen-anti-GFP-Serum
Glykosylierungsstatus	100 mm	4×10 ⁶	10 mg	2 µl Kaninchen-anti-GFP-Serum

3.2.6.3 Untersuchung des Glykosylierungsstatus der Rezeptoren

Im ER-Lumen und im Golgi-Apparat von eukaryotischen Zellen werden Proteine glykosyliert. Mannosereiche Glykosylierungen sind bei Proteinen zu finden, die im ER oder im frühen Golgi-Apparat lokalisiert sind. Komplexe Glykosylierungen werden erst im medialen Golgi-Apparat

angeheftet. Um den Glykosylierungsstatus der Proteine zu bestimmen, können mannosereiche Glykosylierungen durch Endoglykosidase H (*EndoH*) und sowohl mannosereiche als auch komplexe Glykosylierungen durch die Peptid-Endoglykosidase F (*PNGaseF*) abgespalten werden.

Mittels Immunpräzipitation wurden die zu untersuchenden Rezeptoren an Protein-A-Sepharose immobilisiert (siehe 3.2.6.2) und anschließend auf drei Reaktionsgefäße verteilt, wobei jeweils ein Gefäß für die unbehandelte Kontrolle (-), den *EndoH*-Verdau (EH) und den *PNGaseF*-Verdau (PF) verwendet wurde. Im nächsten Schritt erfolgte die Denaturierung der immobilisierten Rezeptoren in Denaturierungspuffer für acht Minuten bei 95 °C. Der Glykosidaseverdau wurde für 30 Minuten bei 37 °C mit Enzymen und Puffern der New England Biolabs GmbH laut Herstellerprotokoll durchgeführt. Anschließend wurden die Proben in RotiLoad Probenpuffer aufgenommen, für drei Minuten bei 95 °C inkubiert und mittels SDS-PAGE und Immunoblot detektiert (siehe 3.2.6.1).

3.2.6.4 Biotinylierung von Oberflächenproteinen

Biotin bindet kovalent an freie Aminogruppen. Da es nicht membranpermeabel ist, kann es zur Markierung von Zelloberflächenproteinen genutzt werden. Mit Biotinylierungsversuchen ist es möglich plasmamembranständige Rezeptoren vor und nach Agonistenstimulation und einer darauf folgenden Recyclingzeit zu quantifizieren. Um zwischen neusynthetisierten und recycelnden Rezeptoren zu unterscheiden, wurde das Recycling in einem parallelen Ansatz mit dem Ionophor Monensin inhibiert. Monensin verstärkt den Natriumionen-Einstrom in die Vesikel und führt so zu einem Zusammenbruch des natürlichen transmembranären Ionengradienten. Durch die pH-Verschiebung wird der Vesikeltransport und damit das Rezeptorrecycling inhibiert [139, 140].

Für das Biotinylierungsexperiment wurden $0,5 \times 10^5$ HEK-293-Zellen, die die CFP-fusionierten Rezeptoren stabil exprimieren, in vier Kollagen-beschichtete 35-mm-Zellkulturschalen ausgesät (siehe 3.2.2.1). Zwei Tage nach der Aussaat wurden die Zellen wie folgt behandelt:

Ansatz	unbehandelt	30 Minuten Agonist		60 Minuten Recycling	
		CRF ₁ R: 100 nM Sauvagine in DMEM	V _{1a} R und V ₂ R: 100 nM AVP in DMEM	DMEM	1 µM Monensin in DMEM
-	+	-	-	-	-
A	-	+	-	-	-
R	-	+	+	+	-
M	-	+	+	-	+

Nach jeder Behandlung wurden die Zellen zweimal mit DPBS gewaschen und auf die letzte Behandlung folgte die Biotinylierung der Zellen für 30 Minuten bei 4 °C in Biotinlösung (0,5 mg/ml

DPBS-CM). Anschließend wurden die Zellen zweimal mit DPBS gewaschen und lysiert. Die CFP-fusionierten Rezeptoren wurden über ein Kaninchen-anti-GFP-Serum aus dem Lysat präzipitiert und durch SDS-PAGE/Immunoblot detektiert (siehe 3.2.6.2 und 3.2.6.1). Die Gesamtmenge an CFP-fusionierten Rezeptoren wurde durch Detektion mit einem anti-GFP-Antikörper bestimmt, der Anteil der plasmamembranständigen Rezeptoren durch Detektion mit einem anti-Biotin-Antikörper.

3.2.6.5 Immunisolierung intrazellulärer Vesikel

Zur Vesikelisolierung wurden 4×10^6 HEK-293-Zellen in Zellkulturschalen (Durchmesser: 100 mm) ausgesät, zwei Tage später zweimal mit DPBS gewaschen, in 1 ml Homogenisierungspuffer (250 mM Saccharose, 3 mM Imidazol, pH 7,4) aufgenommen, mit dem Zellhomogenisator mechanisch homogenisiert (800 rpm, zehn Stöße, Potter S) und zentrifugiert ($3000 \times g$, 15 Minuten, 4 °C). Der Überstand wurde auf vorbereitete magnetische *Dynabeads Protein A* (Invitrogen GmbH) gegeben und für eine Stunde bei 4 °C rotiert. Zur Vorbereitung wurden 5 µl des präzipitierenden Maus-anti-β-Arrestin-2-IgG mit 100 µl *Dynabeads Protein A* in 10 mg/ml BSA in DPBS für drei Stunden bei 4 °C rotiert. Nach Inkubation des Zelllysats mit den *Dynabeads Protein A* folgte ein Waschschrift mit 1 mg/ml BSA in DPBS. Anschließend wurden die gebundenen Proteine durch Erhitzen (95 °C, fünf Minuten in RotiLoad) eluiert und mit Hilfe der SDS-PAGE und eines Immunoblots detektiert (siehe 3.2.6.1).

3.2.6.6 Aufreinigung des Kaede-Proteins

Das Kaede-Protein wurde mit Hilfe einer Metallaffinitätschromatografie isoliert. Bei dieser Methode werden die Proteine mit His-Markierungen versehen und darüber reversibel an Metallionen gebunden.

Zur Aufreinigung des Kaede-Proteins wurde zunächst das Plasmid pKaede.ET30 in *E. coli* Rosetta E3 transformiert (siehe 3.2.1.7). Die Bakterien wurden bei 37 °C in 100 ml LB-Medium geschüttelt, bis eine OD_{600} von 0,6 erreicht war. Nach Induktion mit 1 mM IPTG erfolgte die Proteinexpression bei 22 °C über Nacht. Am nächsten Morgen wurden die Bakterien abzentrifugiert ($4000 \times g$, zehn Minuten), zweimal mit DPBS gewaschen, in 20 ml Lysispuffer (50 mM Natriumphosphatpuffer, 300 mM NaCl, 0,75 mg/ml Lysozym) resuspendiert und lysiert. Nach Ultraschallbehandlung wurden die unlöslichen Zellbestandteile pelletiert ($20000 \times g$, 20 Minuten) und der Überstand wurde auf das zuvor mit Waschpuffer (50 mM Natriumphosphatpuffer, 300 mM NaCl, 6 M Guanidin-HCl, pH 7) äquilibrierte *Talon Metal Affinity Resin* (Becton Dickinson GmbH) gegeben und für drei Stunden bei 4 °C rotiert. Der Ansatz wurde dreimal mit Waschpuffer gewaschen (Zentrifugationen bei $900 \times g$ für fünf Minuten). Anschließend wurde das immobilisierte Kaede-Protein in zehn Fraktionen (je 1 ml) mit denaturierendem Elutionspuffer (150 mM Imidazol, 45 mM Natriumphosphatpuffer, 270 mM NaCl, 5,4 M Guanidin-HCl, pH 7) eluiert. Nach Kontrolle der Reinheit und Ausbeute des Proteins durch ein Coomassie-Brillantblau-gefärbtes SDS-Gel (siehe 3.2.6.1) wurden einige Fraktionen vereint und für

24 Stunden gegen DPBS dialysiert (Größenausschluss 15 kDa). Anschließend wurden mit 2 mg des Proteins (Proteinbestimmung nach Bradford, siehe 3.2.6.7) zwei Kaninchen immunisiert (Firma Biogenes GmbH). Diese lieferten die Antiseren 8719 und 8720.

3.2.6.7 Proteinbestimmung nach Bradford

Der Bradford-Test eignet sich zur kolorimetrischen Bestimmung von Proteinkonzentrationen. Unter sauren Bedingungen bewirkt die Bindung von Proteinen an den Farbstoff Coomassie-Brillantblau G250 eine Verschiebung des Absorptionsmaximums von 465 nm zu 595 nm, die photometrisch ermittelt werden kann.

Die Messungen erfolgten als Doppelbestimmung und wurden mit einer Standardkurve verglichen. Zur Erstellung der Standardkurve dienten Lösungen bekannter Mengen BSA (1, 2, 5, 10, 20, 40 µg), die mit H₂O und 50 µl 2 N NaOH auf ein Endvolumen von 100 µl verdünnt wurden. Die Proben unbekannter Proteinkonzentration wurden ebenfalls mit H₂O und NaOH auf 100 µl verdünnt. Nach Erhitzen (60 °C, zehn Minuten) und anschließender Abkühlung aller Proben auf Raumtemperatur wurden 1 ml Bradford-Reagenz (0,1 g/l Coomassie-Brillantblau G250, 4,25 % v/v Ethanol, 8,5 % v/v Phosphorsäure) zugegeben und die Absorption bei 595 nm am Photometer (Ultraspec2000, Amersham Pharmacia Biotech) bestimmt. Die Proteinkonzentrationen wurden mit Hilfe einer quadratischen Gleichung aus der Standardkurve interpoliert.

3.2.6.8 Limitierte Proteolyse des rekombinanten Kaede-Proteins

Zur Untersuchung der Stabilität des Kaede-Proteins wurde rekombinantes gKaede- und rKaede-Protein mit unterschiedlichen Proteasekonzentrationen verdaut. Zur Photokonvertierung wurde gKaede für 30 Minuten mit einer Quecksilberhochdrucklampe (BP 365/12) bestrahlt. Anschließend wurden jeweils 2,5 µg gKaede- und rKaede-Protein mit unterschiedlichen Mengen Trypsin (1, 5, 10, 20, 100 µg/ml, Biochrom AG) für 30 Minuten bei 4 °C verdaut. Alternativ wurde der Verdau von gKaede und rKaede mit zellulären Proteasen aus HEK-293-Zelllysats durchgeführt. Zur Herstellung des HEK-293-Lysats wurden 4×10^6 HEK-293-Zellen zwei Tage nach der Aussaat mit DPBS gewaschen, abgeschabt, mit dem Zellhomogenisator mechanisch aufgeschlossen (800 rpm, zehn Stöße, Potter S) und zentrifugiert (20000 ×g, 15 Minuten). Der Überstand wurde auf ein Endvolumen von 600 µl mit DPBS verdünnt, bevor er in unterschiedlichen Mengen (5, 15, 25, 35, 55, 100 % v/v) zu jeweils 2,5 µg gKaede- und rKaede-Protein gegeben wurde. Die Proben wurden bei 37 °C für 30 Minuten inkubiert, anschließend mit RotiLoad Probenpuffer versetzt und für fünf Minuten auf 95 °C erhitzt. Die Detektion der Proteine erfolgte mit Hilfe einer SDS-PAGE (15%ige Gele) und eines Immunoblots mit einem Kaede-Antiserum (siehe 3.2.6.1).

3.2.7 Pharmakologische Methoden

3.2.7.1 Bindungsexperimente

Mit Hilfe eines spezifischen Rezeptorliganden und seinem radioaktiv markierten Analogon ist es möglich die Anzahl der Rezeptoren in der Plasmamembran (maximale Bindung = B_{\max}) sowie ihre Affinität (Dissoziationskonstante = K_D) zu bestimmen. Die spezifische Bindung des Liganden wird aus der Differenz von gesamter und unspezifischer Bindung berechnet. Dies ist notwendig, weil Liganden auch unspezifisch an die Plasmamembran binden können. Um die unspezifische Bindung zu messen, wird gebundener, radioaktiv markierter Ligand mit Hilfe des unmarkierten verdrängt, bis nur noch die unspezifischen Bindungsstellen besetzt sind.

[³H]AVP-Bindung an intakten Zellen

In Poly-L-Lysin-beschichtete 24-Wellplatten wurden jeweils $7,5 \times 10^4$ HEK-293-Zellen ausgesät und einen Tag später mit der Rezeptor-DNA transfiziert (siehe 3.2.2.1 und 3.2.2.2). Am nächsten Tag wurden die Zellen dreimal mit eiskaltem DPBS gewaschen und mit den Lösungen zur Bestimmung der totalen und der nichtspezifischen Bindung versetzt (je eine 24-Wellplatte, 300 μ l/Well). Für die Ermittlung der Gesamtbindung wurden durch serielle 1:2 Verdünnungen aus einer 100 nM [³H]AVP-Lösung (Amersham Biosciences Europe GmbH, in DPBS) neun weitere Lösungen (0,4 nM – 100 nM) hergestellt. Zur Bestimmung der unspezifischen Bindung wurde jede dieser Verdünnungen mit unmarkiertem AVP (Endkonzentration 1 μ M) versetzt. Die Platten wurden bei 4 °C für zwei Stunden inkubiert, die Zellen nach Absaugen der Bindungslösungen dreimal mit eiskaltem DPBS gewaschen und in 500 μ l 0,5 M NaOH lysiert. Das Lysat wurde in ein 5-ml-Szintillationsgefäß überführt und mit 4 ml Aquasafe 300 Plus Szintillator vermischt. Die Proben wurden mit Hilfe eines Szintillationszählers (β -Counter, Beckman Coulter GmbH) gemessen. Die gemessenen Zerfälle pro Minute (dpm) wurden mit Hilfe des Programms RADLIG Version 4.0 ausgewertet und es wurde eine Sättigungskurve erstellt. Die Berechnung der K_D - und B_{\max} -Werte erfolgte durch iterative, nicht lineare Regression.

[¹²⁵I]Sauvagine-Bindung an Gesamtmembranen

Zur Präparation der Gesamtmembranen wurden 4×10^6 HEK-293-Zellen ausgesät und transient transfiziert (siehe 3.2.2.1 und 3.2.2.2). Am nächsten Tag wurden die Zellen mit DPBS gewaschen, abgeschabt und pelletiert (400 \times g, fünf Minuten, 4 °C). Anschließend wurden die Zellen in 5 ml Tris-BAME (50 mM Tris, 2 mM EGTA, 10 mM CaCl₂, 0,05 % v/v BSA, 15 mg/ml Aprotinin, 210 mg/ml Bacitracin, 0,5 mM Phenylmethylsulfonylfluorid, 0,5 mM Benzamidin, 3,2 μ g/ml Trypsininhibitor) resuspendiert, mit dem Zellhomogenisator (800 rpm, zehn Stöße, Potter S) homogenisiert und für 35 Minuten bei 26000 \times g zentrifugiert. Das Pellet wurde in 400 μ l Tris-BAME aufgenommen, portioniert und bei -80 °C gelagert. Die Proteinkonzentration wurde mit Hilfe des Bradford-Tests bestimmt (siehe 3.2.6.7).

Zur Ermittlung der Gesamtbindung wurden aus einer 100 nM [¹²⁵I]Tyr⁰-Sauvagine-Lösung (Perkin Elmer Inc., in DPBS) neun weitere Lösungen durch serielle 1:2 Verdünnungen hergestellt. Für die Bestimmung der unspezifischen Bindung wurde Sauvagine (1 µM Endkonzentration) zu jeder Lösung gegeben. Es wurden je 100 µl Lösung mit Liganden vorgelegt. Die Reaktion wurde durch die Zugabe von 100 µl verdünnter Membransuspension (0,5 mg/ml) gestartet und für zwei Stunden bei 25 °C im Schüttelwasserbad inkubiert. Danach wurde die Membransuspension mit Hilfe eines Harvesters (Inotech AG) auf einen Filter (Whatman GF/C, Brandel Inc.) überführt, der mehrmals mit DPBS gewaschen, ausgestant und in ein Zählröhrchen überführt wurde. Die Impulse pro Minute (cpm) wurden mit einem γ -Counter (Wallac 1470 Wizard, GMI Inc.) gemessen. Aus den gemessenen Werten wurde mit dem Programm RADLIG Version 4.0 eine Sättigungskurve erstellt und die K_D - und B_{max} -Werte durch iterative, nicht lineare Regression berechnet.

3.2.7.2 Bestimmung der *second messenger*-Konzentrationen

Um Herauszufinden, ob die Fusion des Kaede-Proteins einen Einfluss auf die biologische Aktivität der untersuchten Rezeptoren hat, wurde die *second messenger*-Konzentration nach Agonistenstimulation bestimmt. Die Stimulation von CRF₁R und V₂R führt zur Aktivierung einer membranständigen Adenylylcyclase, die ATP zu cAMP umsetzt. Die cAMP-Konzentration wurde mit Hilfe eines *cAMP-Radioimmunoassay* (cAMP-RIA) bestimmt. Die Stimulation des V_{1a}R führt zur Aktivierung der Phospholipase-C und zur Bildung des *second messenger* IP₃. Aus experimentellen Gründen kann IP₃ nicht einzeln, sondern nur die Summe aus IP₃, Inositolmonophosphat und Inositoldiphosphat (gemeinsam IP_x) gemessen werden.

cAMP-RIA

Für den cAMP-RIA wurden $7,5 \times 10^4$ HEK-293-Zellen in Poly-L-Lysin-beschichtete 24-Wellplatten ausgesät und am folgenden Tag transfiziert (siehe 3.2.2.1 und 3.2.2.2). Nach einem Tag Inkubation wurden die Zellen mit Stimulationsmedium (10 mM HEPES, 0,5 % w/v BSA, 0,25 mM 3-Isobutyl-1-methyl-xanthin in DMEM) gewaschen und für 30 Minuten bei 37 °C mit Agonist (0,1 nM – 1 µM AVP bzw. Sauvagine) oder Forskolin (10 µM) stimuliert. Anschließend wurden die Zellen für 30 Minuten bei 4 °C lysiert (750 µl, 0,1 % v/v Trifluoressigsäure, 0,005 % v/v TritonX-100). Das Lysat wurde für zehn Minuten auf 95 °C erhitzt und mit Hilfe eines Rotations-Vakuum-Konzentrators (α -RVC, Christ Gefriertrocknungsanlagen GmbH, Osterode, D) getrocknet. Die getrockneten Pellets wurden in 750 µl RIA-Puffer (100 mM Natriumacetat, 0,1 % w/v BSA, 0,1 % v/v TritonX-100, pH 6) resuspendiert, 20 Minuten bei 4 °C inkubiert und anschließend zentrifugiert (23000 \times g, 15 Minuten, 4 °C). Die Überstände der Proben wurden verdünnt und die cAMP-Konzentrationen mittels RIA bestimmt. Zur Erhöhung der Sensitivität der Messung wurden Proben und cAMP-Standard-Lösungen (0,1 – 146 fmol pro Inkubat) bei Raumtemperatur acetyliert (500 µl Probe/Standard, 20 µl einer

Mischung von Acetanhydrid/Triethylamin im Volumenverhältnis 1:2). Acetylierte Proben und Standards wurden mit [¹²⁵I]-cAMP-Tyrosylmethylester (10000 cpm, spezifische Aktivität 81,4 TBq/mmol) und polyklonalem Kaninchen-anti-cAMP-Antiserum (Endverdünnung 1:160000; Endinkubationsvolumen 400 µl) über Nacht bei 4 °C inkubiert. Die Trennung von antikörpergebundenem und freiem cAMP erfolgte anschließend durch Inkubation mit Zellulose-konjugierten Schaf-anti-Kaninchen-IgG (50 µl, 40 Minuten, 4 °C). Nach dem Waschen mit 1 ml BSA-freiem RIA-Puffer und Zentrifugation (4200 ×g, 40 Minuten) wurde die Radioaktivität des Präzipitats mit einem γ -Counter (Wallac 1470 Wizard, GMI Inc., Ramsey, USA) gemessen. Die Konzentration von nicht-radioaktivem cAMP wurde durch Interpolation aus der Standardkurve ermittelt. Die Dosis-Wirkungskurven wurden mit Hilfe des Programms GraphPad Prism Version 3.02 nach iterativer, nicht linearer Regression erstellt und die EC₅₀-Werte ermittelt.

IP_x-Bestimmung

Zur IP_x-Bestimmung wurden 7,5×10⁴ HEK-293-Zellen in Poly-L-Lysin-beschichtete 24-Wellplatten ausgesät und am folgenden Tag transfiziert (siehe 3.2.2.1 und 3.2.2.2). Zwei Tage nach der Aussaat wurden die Zellen mit 0,5 ml/Well myo-[2-³H]-Inositol (74 kBq/ml in Zellkulturmedium, spezifische Aktivität = 630 GBq/mmol) versetzt und für weitere 20 Stunden bei 37 °C inkubiert. Anschließend wurden die Zellen mit Inkubationspuffer (10 mM LiCl, 10 mM HEPES, 0,5 % w/v BSA in DMEM) gewaschen und für eine Stunde bei 37 °C in Inkubationspuffer mit steigenden AVP-Konzentrationen (100 pM - 1 µM) inkubiert. Nach Absaugen der Stimulationslösung wurden die Zellen mit 150 µl 0,1 N NaOH pro Well lysiert. Zur Einstellung der geeigneten Ausgangsbedingungen für die Ionenaustauschchromatographie wurden die Lysate mit 50 µl 0,2 M Ameisensäure und 1 ml Puffer (5 mM Natriumtetraborat, 0,5 mM EDTA) pro Well versetzt und nach Überführung in Reaktionsgefäße zentrifugiert (20 Minuten, 23000 ×g). Aus den Überständen wurde durch Anionenaustauschchromatographie (Sep-Pak Vac 3cc Accell™ Plus QMA Kartuschen, Waters GmbH, Eschborn, D) IP_x vom überschüssigem Inositol getrennt. Zur Äquilibration wurden die Säulen nacheinander mit 0,5 N NaOH, Regenerationspuffer (0,1 M Ameisensäure und 3 M Ammoniumformiat), und *Aqua deion.* behandelt. Nach Probenauftrag wurden die Säulen mit *Aqua deion.* und Waschpuffer (5 mM Natriumtetraborat und 60 mM Natriumformiat) gewaschen und das gebundene IP_x mit 3,5 ml Elutionspuffer (0,1 M Ameisensäure und 0,4 M Ammoniumformiat) eluiert. Das Eluat wurde mit 16 ml Aquasafe 300 Plus Szintillator gemischt und die Zerfälle pro Minute (dpm) wurden mit Hilfe eines Szintillationszählers (β -Counter, Beckman Coulter GmbH) gemessen. Die Dosis-Wirkungskurven wurden mit dem Programm Prism nach iterativer, nicht linearer Regression erstellt und die EC₅₀-Werte ermittelt.

3.2.8 Analyse der Interaktionsflächen innerhalb des Kaede-Tetramers

Die Strukturdaten für gKaede und rKaede wurden der RCSB Protein Data Bank entnommen (Codes: 2GW3 und 2GW4 für gKaede bzw. rKaede) [129]. Die Interaktionsflächen der grün- oder

rotfluoreszierenden Kaede-Dimere wurden in hochaufgelösten Kristallstrukturen (1,6 Å bzw. 1,4 Å) identifiziert. Die Struktur des Kaede-Tetramers wurde am Computer aus zwei Dimeren zusammengesetzt. Da Kaede und EosFP eine sehr hohe Sequenzhomologie (83 %) besitzen, konnten hierfür Daten aus den Röntgenstrukturenanalysen dieses tetramerisierenden Fluoreszenzproteins (Auflösung: 1,8 Å, Code: 1ZUX) herangezogen werden [141]. Mit Hilfe des Programms Sybyl (Version 7.3.5) wurde die Kaede-Struktur aufgebaut und die interagierenden Aminosäuren dargestellt. Die Identifizierung der interagierenden Aminosäuren im Kaede-Tetramer fand in Kooperation mit der AG Strukturelle Bioinformatik des FMP statt.

4 Ergebnisse und Auswertung

4.1 Gewinnung eines Kaede-Antiserums zur Detektion von Kaede-Fusionsproteinen

Ziel dieser Arbeit war es zu überprüfen, ob das Kaede-Protein zukünftig als umschaltbarer Fluoreszenzmarker für Membranproteine eingesetzt werden kann. Neben der Detektion der Fluoreszenzsignale wäre es für viele Studien günstig, wenn das Protein auch biochemisch mit Hilfe von Antikörpern nachgewiesen werden könnte. Da mit dem kommerziell erhältlichen Kaede-Antikörper (MBL International Corp.) kein Protein aus Zelllysaten präzipitiert werden konnte (Daten nicht gezeigt), wurden zu Beginn dieser Arbeit Kaninchen mit rekombinantem Kaede-Protein immunisiert, um eigene Kaede-Antiseren zu gewinnen.

Hierfür wurde die Kaede-cDNA in den prokaryotischen Expressionsvektor pET30 Ek/LIC (Novagen Merck KGaA) kloniert und N-terminal mit einer His-Markierung fusioniert. Nach Transformation in *E. coli* RosettaDE3 und Induktion mit 1 mM IPTG erfolgte die Proteinexpression bei 22 °C über Nacht. Das Kaede-Protein wurde affinitätschromatographisch gereinigt und unter denaturierenden Bedingungen in mehreren Fraktionen vom Säulenmaterial eluiert. Die Reinheit der einzelnen Fraktionen wurde kontrolliert, indem Proben jeder Fraktion über SDS-PAGE aufgetrennt und mit Coomassie-Brillantblau gefärbt wurden (Abb. 8). In den aufgereinigten Fraktionen konnte eine deutliche Proteinbande bei 26 kDa detektiert werden. Die apparente Molmasse dieses Proteins (26 kDa) deckte sich mit der berechneten Größe des Kaede-Proteins (25,7 kDa). Auf einem Immunoblot wurde mit Hilfe des kommerziell erhältlichen Kaede-Antikörpers (MBL International Corp.) sicher gestellt, dass es sich bei dem 26 kDa-Protein tatsächlich um Kaede handelt (Daten nicht gezeigt). Neben dem Signal für das Kaede-Protein waren in Fraktion 3 (Abb. 8, F3) noch Signale von unspezifisch an das Säulenmaterial gebundenen Proteinen erkennbar. Diese konnten aber schon ab Fraktion 4 (Abb. 8, F4) nicht mehr nachgewiesen werden. Die Fraktionen 4 bis 9 (Abb. 8, F4 - F9) wurden vereint und gegen PBS dialysiert. 2 mg gereinigtes Protein wurden an die Firma BioGenes GmbH (Berlin, D) gesendet. Es wurden zwei Kaninchen immunisiert und die erhaltenen Antiseren (8719 und 8720) auf ihre Spezifität getestet.

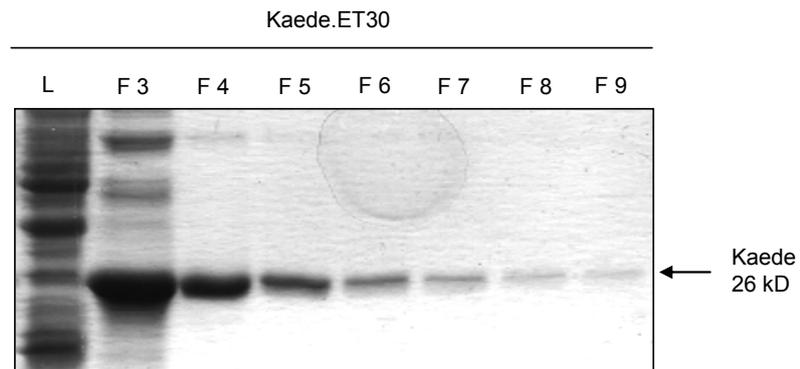


Abb. (8) SDS-PAGE mit affinitätschromatographisch aufgereinigtem rekombinantem Kaede-Protein. Proben des Gesamtzelllysats (L) und der aufgereinigten, eluierten Fraktionen 3 bis 9 (F3 - F9) wurden der Größe nach aufgetrennt und mit Coomassie-Brillantblau gefärbt.

Hierfür wurden konstante Mengen Kaede-Protein (0,5 µg) mit unterschiedlichen Konzentrationen der Antiseren (1:100 - 1:10000) im Immunoblot detektiert (Abb. 9). Das Kaede-Protein konnte mit beiden Antiseren bei 26 kDa detektiert werden. Mit Hilfe des kommerziell erhältlichen Antikörpers (MBL International) wurde das gleiche Ergebnis erhalten (Daten nicht gezeigt). Darüber hinaus wurden mit den Antiseren weitere Banden bei ca. 50, 75 und 80 kDa detektiert (Abb. 9). Da das Kaede-Protein in der Lage ist zu oligomerisieren [126], ist es möglich, dass die 50- und 75-kDa-Banden den dimeren bzw. trimeren Formen des Proteins entsprechen. Obwohl die theoretische Molmasse des Tetramers bei ca. 100 kDa liegt, könnte es sich bei der 80-kDa-Bande um das Kaede-Tetramer handeln. Auch für andere oligomerisierende Fluoreszenzproteine, wie EosFP, ist beschrieben, dass sie SDS-resistente Oligomere bilden, die in der SDS-PAGE bei einer anderen als der errechneten Größe laufen [119].

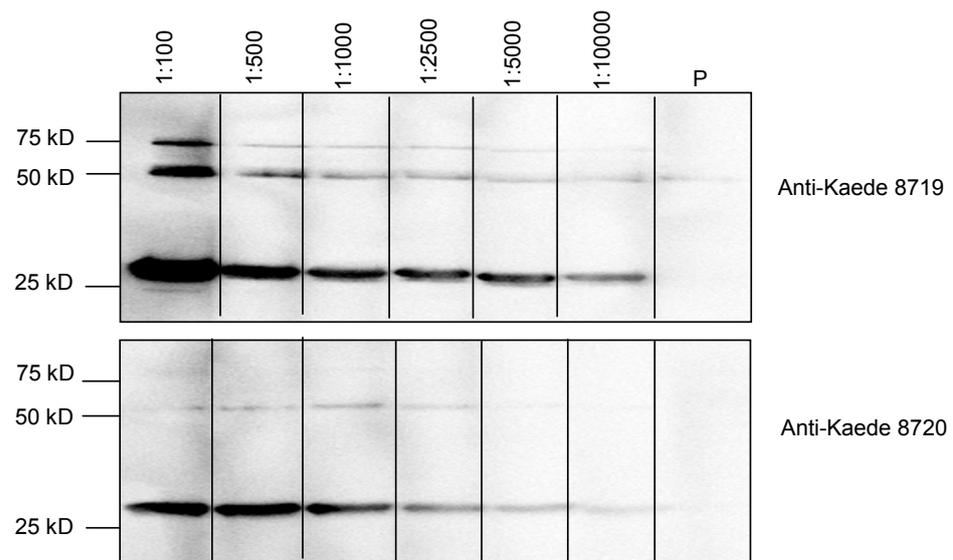


Abb. (9) Testung der Kaede-Antiseren 8719 und 8720. Gereinigtes Kaede-Protein wurde mittels SDS-PAGE und Immunoblot analysiert. 0,5 µg Protein wurden mit unterschiedlichen Konzentrationen des Kaede-Serums (Verdünnungen: 1:100, 1:500, 1:1000, 1:2500, 1:5000, 1:10000) und dem 1:100 verdünnten Präimmunserum (P) sowie einem POD-gekoppelten Sekundärantikörper detektiert.

In weiteren Untersuchungen wurde festgestellt, dass sich die hergestellten Antiseren nicht zur Detektion niedrig exprimierter Kaede-Fusionsproteine aus Zelllysaten eignen (Daten nicht gezeigt). Damit wurde keine Verbesserung zum käuflichen monoklonalen Kaede-Antikörper erzielt. Das Antiserum 8719 wurde daher in dieser Arbeit in einer Verdünnung von 1:100 benutzt, um natives, unfusioniertes gKaede und rKaede zu detektieren (Abb. 13).

4.2. Herstellung eines monomeren Kaede-Proteins

Da das Kaede-Protein und andere Fluoreszenzproteine aus der Familie der *Anthozoa* tetramerisieren, wurden sie in der Vergangenheit nur selten mit Proteinen fusioniert, um deren Lokalisation und Transport zu untersuchen. Um eine Tetramerisierung des Kaede-Proteins zu unterbinden, wurde im Folgenden versucht monomeres Kaede durch gerichtete Mutagenesen herzustellen.

Modellierung der Proteinstruktur und Identifikation der interagierenden Aminosäuren

Die Kristallstrukturen des grün- und rotfluoreszierenden Kaede-Proteins wurden vor kurzem mit einer Auflösung von 1,4 Å und 1,6 Å ermittelt [129]. Hierbei stellte sich heraus, dass UV-Bestrahlung zwar zu molekularen Verschiebungen innerhalb des Chromophors führt, diese aber nur geringe Auswirkungen auf die Gesamtstruktur der Moleküle haben. Die interagierenden Aminosäurereste beider Formen sind demzufolge identisch. In Kooperation mit der AG Strukturelle Bioinformatik des FMP wurden mögliche interagierende Aminosäuren identifiziert (Abb. 10.A). Diese wurden anschließend durch gerichtete Mutagenesen sukzessiv ausgetauscht. Zunächst wurden die Aminosäuren ersetzt, welche die Bildung des Kaede-Tetramers aus zwei Dimeren vermitteln (E90A, S92D, V100A, I102A, V123A, N124A, N128A, D150A, V152A, Abb. 10.B). Anschließend wurden die Aminosäurereste getauscht, die die Interaktion zweier Kaede-Monomere zu einem -Dimer ermöglichen (E140A, Y147A, R149A, D156A, T158A, R170A, R189A, Abb. 10.C). Diese Mutagenesestrategie führte am Ende zu einem putativen Kaede-Monomer, bei dem alle interagierenden Aminosäurereste ersetzt waren. Eine ähnliche Strategie wurde bereits angewendet, um aus dem tetramerbildenden DsRed das monomere mRFP1 abzuleiten [118].

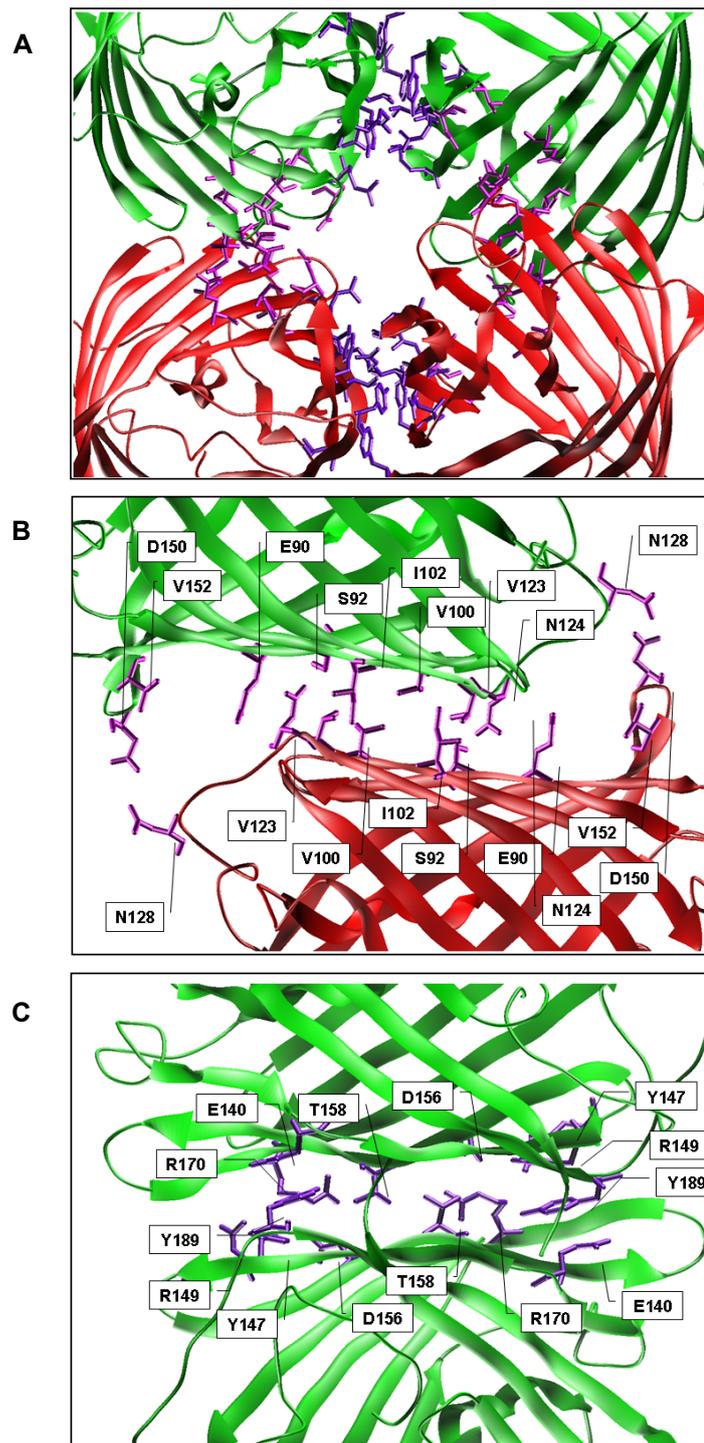


Abb. (10) Strukturbasierte Modellierung der interagierenden Flächen im Kaede-Dimer und -Tetramer. (A) Interagierende Aminosäurereste sind in lila dargestellt. Die Kaede-Struktur wurde von Hayashi et al (2008) übernommen. **(B)** Aminosäurereste, die wahrscheinlich die Interaktion zweier Dimere zu einem Tetramer vermitteln. **(C)** Aminosäurereste, die an der Dimerbildung zweier Monomere beteiligt sind.

Expression und Detektion der putativen mono- und dimeren Kaede-Proteine

Die cDNA der mit den mutierten Kaede-Derivaten (Monomer und Dimer) wurden sowohl in eukaryotische Vektoren als auch in prokaryotische Ek/LIC-Vektoren kloniert und exprimiert. Die Expression in *E. coli* RosettaDE3 wurde durch Induktion mit 1 mM IPTG über Nacht bei 22 °C

eingeleitet. Nach Lyse der Bakterien wurde ein Teil des Zellysats direkt in einer SDS-PAGE aufgetrennt (Abb. 11, Gesamtzellextrakt, E). Der Rest des Lysats wurde zentrifugiert, um lösliche Bestandteile zu entfernen. Der Überstand dieser Zentrifugationen wurde als lösliche Fraktion mittels SDS-PAGE aufgetrennt (Abb. 11, Überstand, S). Die Analyse der Löslichkeit ist hilfreich, um Rückschlüsse auf die Faltung des exprimierten Proteins zu ziehen. Bei der Überexpression von Proteinen in *E. coli* werden vorwiegend fehlerhaft oder unvollständig gefaltete Proteine in multivesikulären Strukturen gespeichert, die durch die Zentrifugationen entfernt werden. Die Gele wurden mit einer Coomassie-Färbung (Abb. 11.A) und auch mit Immunoblots analysiert (Abb. 11.B und 11.C). In den Immunoblots wurden zur Detektion sowohl der kommerziell erhältliche Kaede-Antikörper (MBL International Corp.) und das selbst hergestellte Kaede-Antiserum (8719) eingesetzt. In allen Versuchen konnte nur für das wildtypische Kaede-Protein eine 26 kDa große Bande im Gesamtzellextrakt und in der löslichen Fraktion nachgewiesen werden (Abb. 11). Die monomerisierten und dimerisierten Kaede-Proteine waren dagegen nur sehr schwach oder gar nicht im Zellextrakt nachweisbar (Abb. 11). Dies lässt auf eine Fehlfaltung und eine daraus resultierende proteolytische Degradation dieser Proteine schließen.

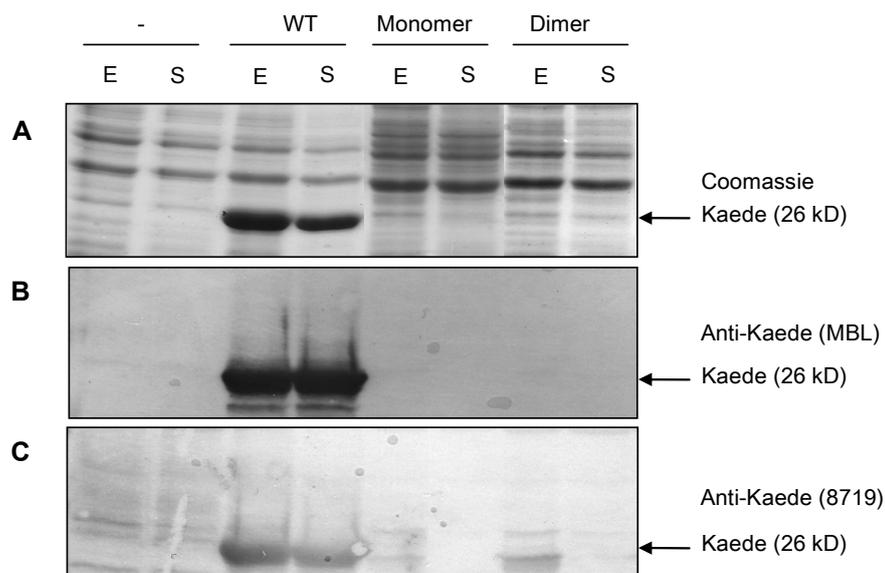


Abb. (11) Analyse der bakteriellen Expression von wildtypischem Kaede (WT) und seiner mono- und dimerisierten Varianten. Die cDNAs wurden in RosettaDE3 transformiert. Anschließend wurde die Proteinexpression mit 1 mM IPTG über Nacht bei 22 °C induziert. Gesamtzellextrakt (E) und dessen lösliche Fraktion (S) wurden per SDS-PAGE aufgetrennt. Die Detektion erfolgte mit Coomassie-Brillantblau (**A**) oder mit Hilfe von Immunoblots, bei denen entweder der kommerziell erhältliche Kaede-Antikörper (**B**) oder das Kaede-Antiserum 8719 (**C**) eingesetzt wurden. Als Sekundärantikörper wurde in (B) und (C) ein AP-konjugierter anti-Kaninchen-Antikörper verwendet.

Durch Mutagenese veränderte Fluoreszenzproteine sind häufig fehlgefaltet und können nicht mehr fluoreszieren [118, 142]. Um zu untersuchen, ob das auch für die hier hergestellten putativen Mono- und Dimere des Kaede-Proteins zutrifft, wurden eukaryotische HEK-293-Zellen transient transfiziert. Anschließend wurden die Kaede-Fluoreszenzen nach 24 Stunden mit Hilfe des LSM analysiert.

Im Falle des wildtypischen Kaede-Proteins konnte ein Fluoreszenzsignal detektiert werden (Daten nicht gezeigt). Sowohl für das putative Kaede-Dimer als auch für das -Monomer konnten keine Fluoreszenzsignale nachgewiesen werden (Daten nicht gezeigt). Zusammengefasst zeigen diese Daten, dass der Austausch der interagierenden Aminosäuren höchstwahrscheinlich zur Fehlfaltung des Kaede-Proteins führt. Die weitere Analyse ergab, dass selbst einzelne Punktmutationen zum Funktionsverlust des Kaede-Proteins führen (Daten nicht gezeigt). Lediglich für die vier Mutationen E140A, R189A, E140A.R189A und Y147A.R149A wurde ein Fluoreszenzsignal erhalten, das aber durch weitere Kombination der Mutationen erneut verloren ging (Daten nicht gezeigt). Da die Versuche zur Herstellung eines mono- bzw. dimeren Kaede-Proteins nicht erfolgreich waren, wurde nachfolgend untersucht, ob das Kaede-Protein tatsächlich oligomerisiert, wenn es mit einem Membranprotein fusioniert wird.

4.3 Untersuchung des Oligomerisierungsstatus des Kaede-Proteins

Für die Analyse des Oligomerisierungsstatus des Kaede-Proteins wurde die FCS eingesetzt. Diese Methode bietet die Möglichkeit sehr oft und schnell hintereinander die Fluoreszenz einzelner Moleküle im Fokus des Lasers zu messen [143, 144]. Mit Hilfe einer Autokorrelationsanalyse lassen sich daraus Diffusionsgeschwindigkeiten und -konstanten berechnen, die wiederum Rückschlüsse auf die Molmasse einzelner Moleküle erlauben. In einer gemischten Probe zweier unterschiedlich fluoreszierender Moleküle können die gemessenen Signale auch miteinander korreliert werden (Kreuzkorrelation). Lässt sich eine Kreuzkorrelation detektieren, zeigt dies die Assoziation der betreffenden Moleküle. Die Kreuzkorrelationsanalyse ist damit für die Untersuchung von Protein-Interaktionen geeignet [145].

Mit Hilfe der FCS und der Kreuzkorrelationsanalyse sollte ermittelt werden, ob das Kaede-Protein nach Fusion an ein membranständiges Protein noch in der Lage ist zu oligomerisieren. Kaede-Oligomere könnten die Aggregation des Fusionspartners nach sich ziehen und dessen Funktion stören. Nur wenn das Kaede-Protein keinen Einfluss auf den Fusionspartner hat, ist es als Marker für Proteinlokalisationsstudien nutzbar. Die FCS-Messungen wurden im Rahmen eines Gastaufenthaltes bei Dr. Klaus Weißhart (Carl Zeiss MicroImaging GmbH, Jena) durchgeführt.

Zur Untersuchung des Oligomerisierungsstatus von Kaede-Fusionen mit Membranproteinen wurden zunächst Vorversuche mit dem wildtypischen, nicht fusionierten Kaede-Protein durchgeführt. Ziel war es hier die bereits publizierte Oligomerisierung auch mit Hilfe der FCS zu zeigen. Zunächst wurde für das unfusionierte Kaede eine Kolokalisation mit dem Plasmamembranmarker Trypanblau mittels LSM in transient transfizierten HEK-293-Zellen analysiert (Abb. 12.A, oben, Kaede-Protein in grün, Trypanblau in rot) [137]. Eine Kolokalisation des Plasmamembranmarkers mit dem cytosolischen Kaede-Protein wurde erwartungsgemäß nicht detektiert. Zur Vorbereitung der FCS-Messungen

wurden die Zellen für wenige Sekunden mit einem 405-nm-Laser bestrahlt, bis die Fluoreszenzintensität von gKaede um ca. 50 % reduziert war. Im Idealfall wurde also jedes zweite gKaede-Molekül zu rKaede photokonvertiert. Aufgrund der Tetramerisierung des wildtypischen Kaedes ist somit zu erwarten, dass statistisch jedes Tetramer zwei gKaede- und zwei rKaede-Moleküle enthält. Die Wahrscheinlichkeit, dass nur monochrom rot- und grünfluoreszierende Tetramere entstehen, die sich einer Kreuzkorrelationsanalyse entziehen würden, liegt bei nur 12,5 %. Dies sollte die Messung nicht stören.

Die monochromen Messdaten für das wildtypische Kaede-Protein ließen sich mit der Autokorrelation auswerten (Abb. 12.B). Dies bedeutet, dass grün- und rotfluoreszierende Moleküle vorliegen. Darüber hinaus konnte auch eine Kreuzkorrelation beider Signale gezeigt werden (Abb. 12.B). Dies bestätigt bereits publizierte Daten für die Oligomerisierung des wildtypischen Kaede-Proteins [126].

Im Folgenden wurde die FCS auch mit einem Kaede-fusionierten Membranprotein durchgeführt. Als Modellprotein wurde eine Deletionsmutante des V_2R ($V_2R.\Delta$.Kaede) verwendet, die nur noch aus dem N-Terminus, der ersten transmembranären Domäne und dem C-Terminus besteht (Konstrukt siehe Abb. 15) [146]. Da viele GPCR dimerisieren, sollte ein Protein verwendet werden, von dem bekannt ist, dass es als Monomer in der Plasmamembran vorliegt. Nur dann ist gewährleistet, dass eine mögliche Kreuzkorrelation (Beleg für Molekül- Wechselwirkungen) ausschließlich durch den Kaede-Teil vermittelt wird.

Zunächst wurde die Plasmamembranlokalisation von $V_2R.\Delta$.Kaede mittels LSM und einer Trypanblaufärbung untersucht (Abb. 12.A, Mitte). Die Überlagerung der in grün dargestellten $V_2R.\Delta$.Kaede-Fluoreszenz mit der in rot dargestellten Trypanblau-Fluoreszenz zeigt eine deutliche Kolo-kalisation (Abb. 12.A, rechts). Damit konnte bestätigt werden, dass sich $V_2R.\Delta$.Kaede in der Plasmamembran befindet [137]. Zur Untersuchung des Oligomerisierungsstatus wurde wieder ca. die Hälfte der gKaede-Moleküle in rKaede-Spezies umgeschaltet. Die FCS-Messungen zeigten sowohl bei gKaede als auch bei rKaede eine Autokorrelation (Abb. 12.B). Im Gegensatz zum unfusionierten Kaede wurde aber keine Kreuzkorrelationskurve erhalten. Dieses Ergebnis belegt, dass Kaede nicht in der Lage ist zu oligomerisieren, wenn es an die V_2R -Deletionsmutante $V_2R.\Delta$.Kaede fusioniert vorliegt. Da alle Membranproteine den gleichen ER-Insertionsmechanismus benutzen, ist es unwahrscheinlich, dass das Kaede-Protein nach Fusion mit anderen Membranproteinen, wie zum Beispiel mit intakten GPCR, oligomerisieren kann. FCS-Messungen mit den vollständigen Kaede-fusionierten V_2R (Konstrukt siehe Abb. 15) zeigten in der Tat zwar für gKaede und rKaede eine Autokorrelation, aber keine Kreuzkorrelation der Signale (Abb. 12.B). Zusammengefasst belegten die FCS-Analysen dieser Arbeit, dass das Kaede-Protein nicht oligomerisiert, wenn es mit Membranproteinen fusioniert wird. Somit ist unwahrscheinlich, dass Kaede in der Lage ist, den

Oligomerisierungsstatus der fusionierten Proteine zu beeinflussen. Das Kaede-Protein scheint damit prinzipiell als Fluoreszenzmarker für Lokalisationstudien von Membranproteinen geeignet zu sein.

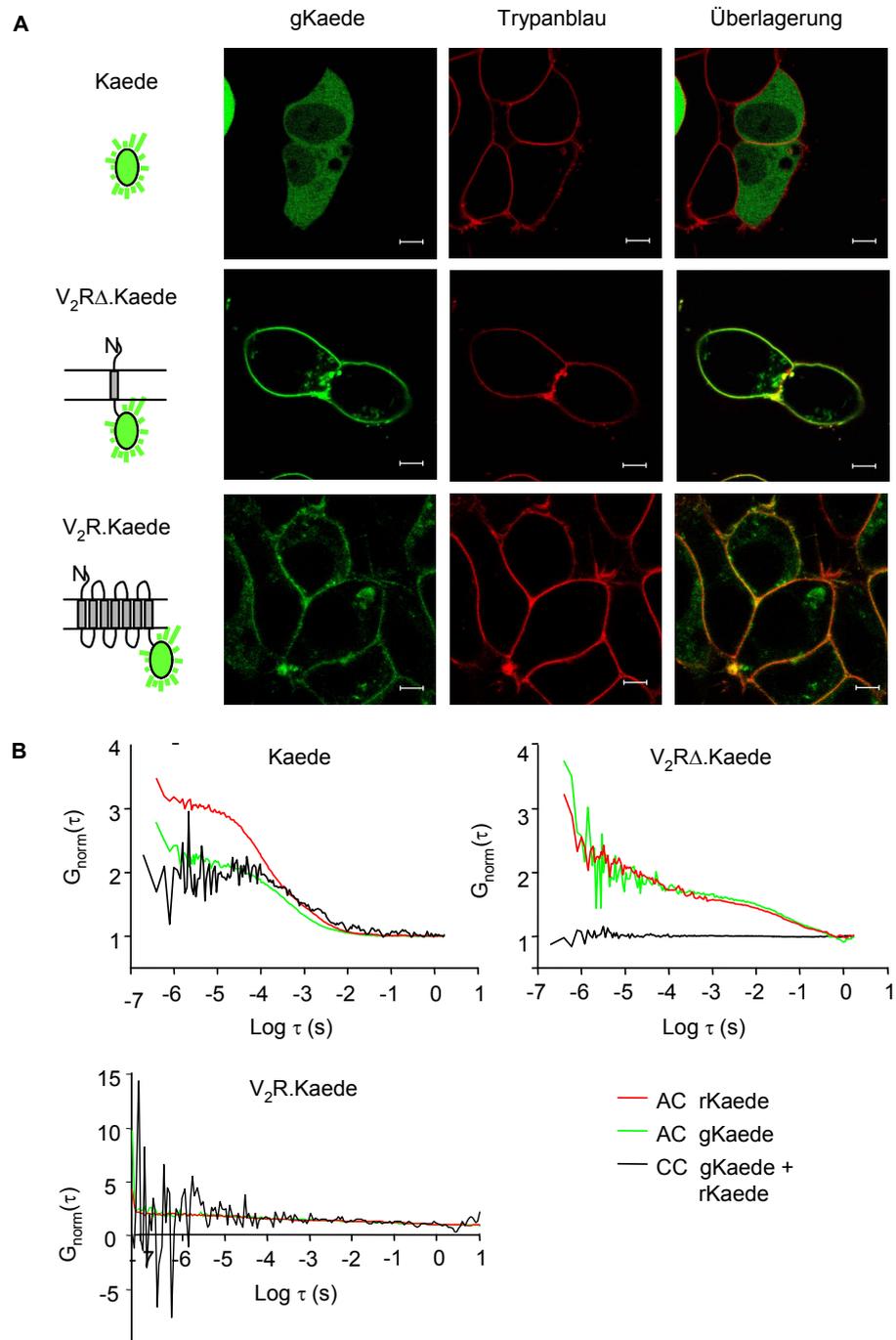


Abb. (12) Analyse des Oligomerisierungsstatus von wildtypischem Kaede, V₂RΔ.Kaede und V₂R.Kaede in transient transfizierten HEK-293-Zellen. (A) Analyse der intrazellulären Lokalisation der Proteine mittels LSM. Die Fluoreszenzsignale von Kaede, V₂RΔ.Kaede und V₂R.Kaede (schematische Darstellung links) wurden in grün, die des Plasmamembranmarkers Trypanblau in rot dargestellt. Eine gelbe Färbung in der Überlagerung beider Kanäle zeigt eine Kolo-kalisation der Fluoreszenzsignale an. Die dargestellten Ergebnisse sind repräsentativ für mindestens 30 Zellen aus drei unabhängigen Experimenten (Größenmaßstab = 5 μm). (B) FCS-Messungen der Konstrukte an lebenden Zellen nach partieller Photokonvertierung. Die gezeigten Kurven sind für fünf unabhängige Messungen repräsentativ. Die Kurven zeigen die normierten Autokorrelations- (AC) und Kreuzkorrelations- (CC) Analysen ($G(\tau)$, τ = Korrelationszeit).

4.4 Analyse der Stabilität des Kaede-Proteins nach UV-Bestrahlung

Die Umschaltung von gKaede zu rKaede erfolgt mittels kurzwelliger Strahlung (in dieser Arbeit bei 364 nm oder 405 nm). Diese führt neben einer Umsortierung im Chromophor und den damit verbundenen Änderungen der Absorptions- und Emissionswellenspektren zu einem Bruch des Proteinrückgrates. Das könnte einen erleichterten proteolytischen Angriff auf rKaede ermöglichen und damit Transportstudien erschweren. Aus diesem Grund sollte gezeigt werden, dass Kaede vor und nach der Photokonvertierung die gleiche Stabilität besitzt.

***In vitro* Stabilität von gKaede und rKaede**

Zur Untersuchung der *in vitro*-Stabilität wurde rekombinant aufgereinigtes gKaede und photokonvertiertes rKaede mit unterschiedlichen Trypsin-Konzentrationen (0, 1, 5, 10, 20, 50, 100 µg/ml) für 30 Minuten bei 4 °C verdaut. Die Proteine wurden mittels SDS-PAGE aufgetrennt und auf einem Immunoblot mit Hilfe des selbst hergestellten Kaede-Antiserums 8719 detektiert. Mit steigenden Proteasekonzentrationen nahm die Anzahl und Intensität von kleineren Fragmenten erwartungsgemäß zu (Abb. 13, oben). Es ließ sich kein Unterschied im Abbaumuster von rKaede (r) und gKaede (g) detektieren. Darüber hinaus wurden gKaede und rKaede für 30 Minuten bei 37 °C mit unterschiedlichen Mengen HEK-293-Zellysate inkubiert, um einen Verdau mit Proteasen im zellulären Milieu zu simulieren. Im Immunoblot ist deutlich erkennbar, dass sowohl gKaede als auch rKaede innerhalb einer Stunde nur sehr schwach von zellulären Proteasen angegriffen wurden (Abb. 13, unten). Das identische Bandenmuster beider Formen unter verschiedenen Bedingungen zeigt, dass diese gleichermaßen stabil sind.

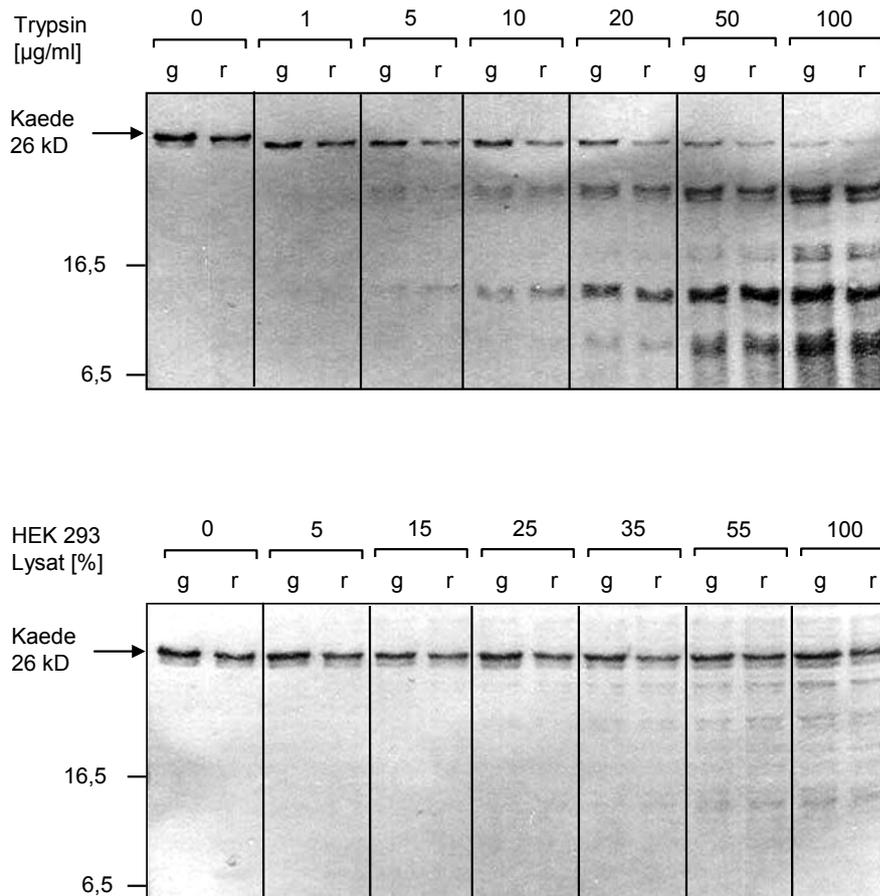


Abb. (13) *In vitro* Analyse der Stabilität von gKaede und rKaede durch limitierende Proteolyse. 0,5 µg gereinigtes gKaede (g) und photokonvertiertes rKaede (r) wurden mit unterschiedlichen Konzentrationen Trypsin (oben, 0, 1, 5, 10, 20, 50, 100 µg/ml, 4 °C) oder HEK-293-Zelllysate (unten, 0, 5, 15, 25, 35, 55, 100 %, 37 °C) für jeweils 30 Minuten verdaut. Die Größenauftrennung der Proben erfolgte mittels SDS-PAGE. Die Detektion erfolgte auf einem Immunoblot mit dem Kaede-Antiserum 8719. Als Sekundärantikörper wurden AP-konjugierte anti-Kaninchen-IgG verwendet.

Stabilität von gKaede und rKaede in lebenden Zellen

Um die Stabilität der Proteine auch im zellulären System zu untersuchen, wurde das Konstrukt V₂R.Δ.Kaede transient in HEK-293-Zellen exprimiert. Die Zellen wurden so lange mit UV-Laser (364 nm) am LSM bestrahlt, bis ca. die Hälfte des grünfluoreszierenden Proteins umgeschaltet war. Anschließend wurde eine Zeitserie (Zwei-Kanal-Messung über drei Stunden mit einem Intervall von 30 Minuten) aufgenommen. Die Fluoreszenzintensitäten beider Kanäle in der Plasmamembran wurden gemessen und daraus das Verhältnis von gKaede/rKaede berechnet. Unter Kontrollbedingungen zeigte sich schon nach 60 Minuten ein deutlicher Anstieg dieses Verhältnisses (Abb. 14). Diese Veränderung beruht auf der Proteinbiosynthese und der damit verbundenen Erhöhung des gKaede-Anteils in der Plasmamembran. Wurde die Proteinbiosynthese mit 40 µg/ml Cycloheximid inhibiert, änderte sich das Verhältnis von gKaede zu rKaede nicht (Abb. 14). Somit konnte auch in lebenden Zellen eine vergleichbare Stabilität beider spektraler Formen gezeigt werden.

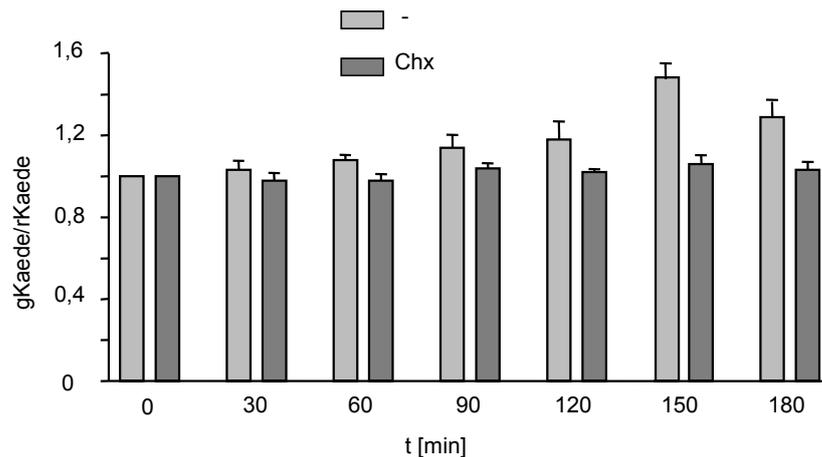


Abb. (14) Untersuchung der Stabilität von gKaede und rKaede in lebenden Zellen. HEK-293-Zellen wurden mit dem Konstrukt $V_2R.\Delta.Kaede$ transient transfiziert. Die Zellen wurden mit Cycloheximid behandelt (Chx, dunkelgraue Balken) oder blieben unbehandelt (-, hellgraue Balken). Durch Bestrahlung mit UV-Licht wurde ca. die Hälfte der gKaede-Moleküle in rKaede photokonvertiert. Mit Hilfe des LSM wurde die Signalintensität von gKaede und rKaede in der Plasmamembran über die Zeit quantifiziert (alle 30 Minuten ein Bild), ins Verhältnis gesetzt und auf den Ausgangswert (0) normiert. Dargestellt sind die Mittelwerte (\pm SD) von 12 Zellen unter Kontrollbedingungen und von 21 cycloheximidbehandelten Zellen aus drei unabhängigen Experimenten.

Zusammengefasst zeigen die bisherigen Untersuchungen, dass Kaede nicht oligomerisiert, wenn es mit Membranproteinen fusioniert wird. Ferner konnte nachgewiesen werden, dass sich die Stabilität des Kaede-Proteins nach Photokonvertierung nicht ändert. Diese Ergebnisse sprechen für die Verwendung von Kaede-Fusionen zur Charakterisierung von Transportprozessen. Im Folgenden wurden daher Kaede-Fusionen mit verschiedenen GPCR hergestellt und deren Eigenschaften untersucht.

4.5 Untersuchung des Einflusses des Kaede-Proteins auf die Rezeptorfunktion von GPCR

4.5.1 In dieser Arbeit verwendete Konstrukte

Um den Einfluss des Kaede-Proteins auf die pharmakologischen Eigenschaften der Rezeptoren zu untersuchen, wurde Kaede C-terminal mit den Rezeptoren CRF₁R, V_{1a}R und V₂R fusioniert (CRF₁R: Fusion an T415, V_{1a}R: Fusion an L448 und V₂R: Fusion an K472; resultierende Konstrukte: CRF₁R.Kaede, V_{1a}R.Kaede und V₂R.Kaede). In mikroskopischen Untersuchungen wurde der Einfluss des Kaede-Proteins auf die intrazelluläre Lokalisation der Rezeptoren überprüft. Als Kontrolle dienten in diesen Experimenten CFP-fusionierte Rezeptoren (CRF₁R.CFP, V_{1a}R.CFP und V₂R.CFP). In pharmakologischen Experimenten sollten die Kaede-fusionierten Rezeptoren mit nicht-markierten Rezeptoren verglichen werden. Für die Klonierung der unfusionierten Rezeptoren wurde ein Stopcodon zwischen Rezeptor- und Kaede-Sequenz eingeführt (resultierende Konstrukte: CRF₁R.U, V_{1a}R.U und V₂R.U). Außerdem wurden die Kaede-fusionierten Rezeptoren für alternative Recyclingversuche N-terminal mit einer *FLAG*-Markierung fusioniert (resultierende Konstrukte: *FLAG*.CRF₁R.Kaede, *FLAG*.V_{1a}R.Kaede und *FLAG*.V₂R.Kaede).

Zur Untersuchung des Oligomerisierungsstatus des Kaede-Proteins (siehe oben) wurde eine Kaede-fusionierte Deletionsmutante des V₂R genutzt. Sie besteht aus dem N-Terminus, der ersten Transmembrandomäne (71 N-terminale Aminosäuren), dem C-Terminus (43 Aminosäuren) und dem C-terminal fusionierten Kaede-Protein (Fusion an K472; resultierendes Konstrukt V₂R.Δ.Kaede). Alle Klonierungen und Mutagenesen wurden mittels Sequenzierung überprüft. Die Konstrukte sind in Abb. 15 schematisch dargestellt.

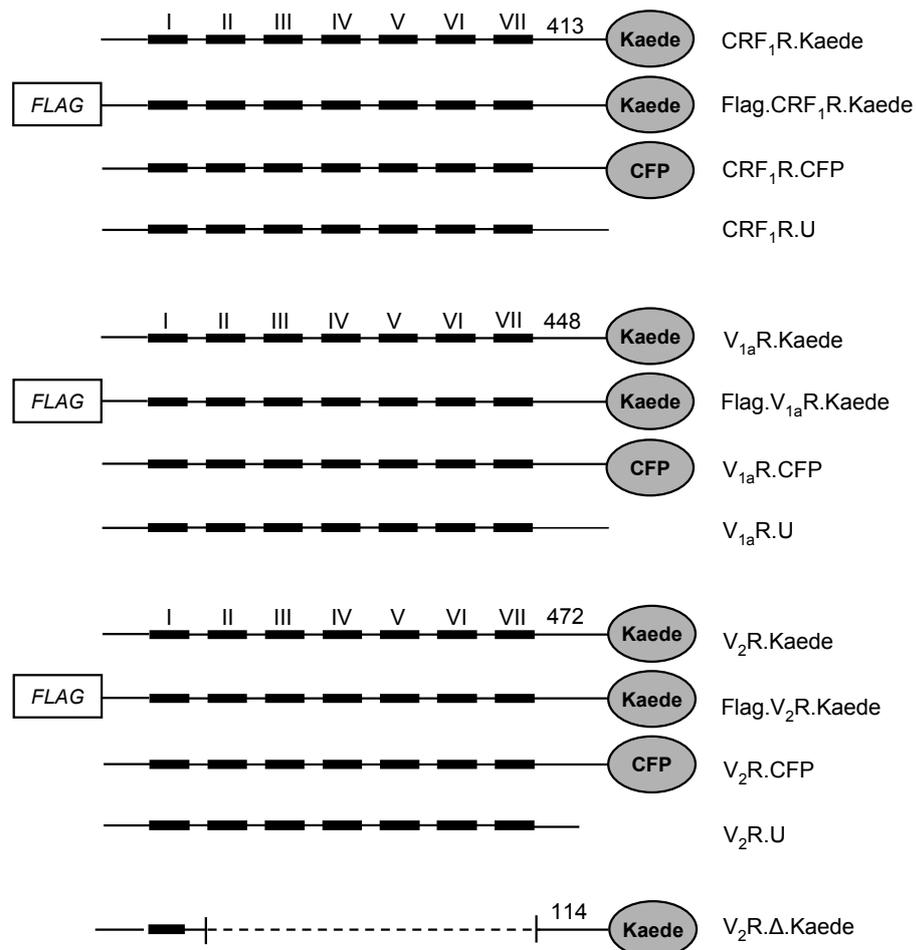


Abb. (15) Schematische Darstellung der verwendeten Konstrukte. Die römischen Zahlen symbolisieren die Transmembrandomänen der Rezeptoren. CRF₁R, V_{1a}R und V₂R liegen unfusioniert vor oder wurden C-Terminus mit Kaede oder CFP markiert. Zusätzlich wurden auch N-terminal mit einer FLAG-Domäne markierte Rezeptoren hergestellt. V₂R.Δ.Kaede, eine Kaede-fusionierte Deletionsmutante des V₂R, besteht aus dem N-Terminus, der ersten Transmembrandomäne und dem C-Terminus des Rezeptors. Die Zahl gibt die Aminosäure an, an die CFP oder Kaede kloniert wurde.

4.5.2 Untersuchung der subzellulären Lokalisation Kaede- und CFP-fusionierter GPCR

Zur mikroskopischen Untersuchung der Lokalisation von Proteinen in lebenden Zellen werden Proteine häufig mit GFP und seinen Derivaten (z.B. EGFP, ECFP und EYFP) markiert. Für GPCR wurde vielfach beschrieben, dass diese Fluoreszenzproteine die Lokalisation der GPCR nicht beeinflussen [150]. Um sicherzustellen, dass sich das Kaede-Protein ebenso verhält, wurde die zelluläre Lokalisation CFP- und Kaede-fusionierter Rezeptoren miteinander verglichen. Hierzu

wurden die Kaede- bzw. CFP-Signale der Rezeptoren in lebenden, stabil transfizierten HEK-293-Zellen am LSM aufgenommen (Abb. 16, grün). Als Marker für die Plasmamembran diente Trypanblau (Abb. 16, rot) [137]. In der Überlagerung zeigt eine gelbe Färbung Kolokalisationen an. Es konnte sowohl für die Kaede- als auch für die CFP-fusionierten Rezeptoren eine deutliche Kolokalisation mit Trypanblau detektiert werden (Abb. 16). Das heißt, die Rezeptoren befinden sich unabhängig vom Fusionspartner in der Plasmamembran. Des Weiteren waren bei allen Rezeptoren gleichermaßen intrazelluläre, vesikuläre Signale detektierbar.

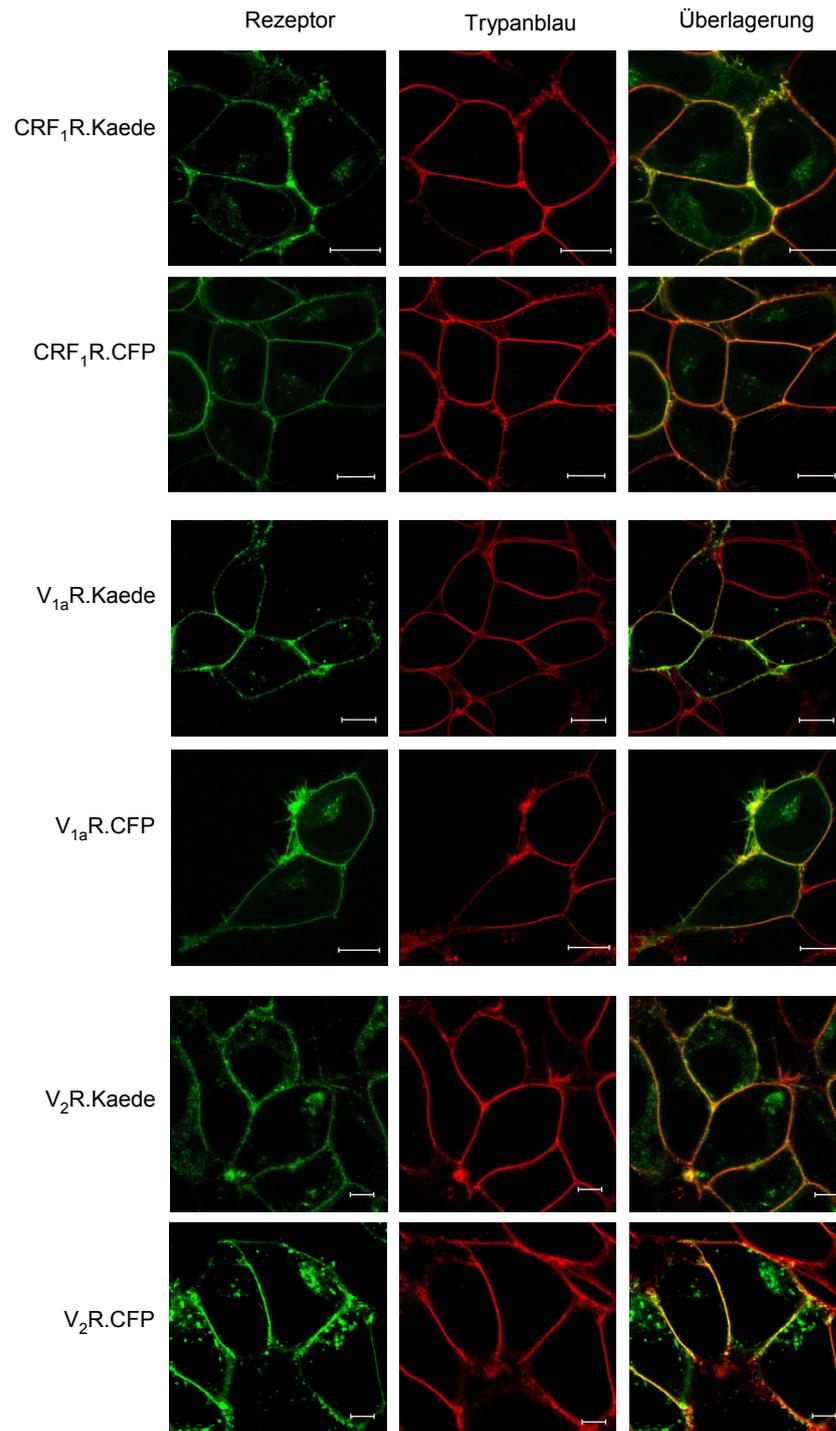


Abb. (16) Mikroskopische Untersuchung der subzellulären Lokalisation der Kaede- und CFP-fusionierten Rezeptoren CRF₁R, V_{1a}R und V₂R in lebenden, stabil transfizierten HEK-293-Zellen. Die GFP-Fluoreszenzsignale der Rezeptoren (links,

grün) wurden mit den Trypanblau-Signalen der Plasmamembran (Mitte, rot) überlagert (rechts). Ein gelber Farbton zeigte eine Kollokalisierung an. Die Bilder zeigen repräsentative Ergebnisse aus drei unabhängigen Experimenten, bei denen jeweils 30 Zellen ausgewertet wurden (Größenmaßstab = 5 µm).

4.5.3 Untersuchung des Glykosylierungsstatus der CFP-fusionierten Rezeptoren

Um sicherzustellen, dass die Kaede-fusionierten Rezeptoren korrekt gefaltet und transportiert werden, sollte im nächsten Schritt der Glykosylierungsstatus der Rezeptoren bestimmt werden. Aufgrund der niedrigen Expression der Rezeptoren und mangels eines hochaffinen Antikörpers blieben die Kaede-fusionierten Rezeptoren in diesen Experimenten unterhalb der Detektionsschwelle. Die Analyse wurde daher nur mit den entsprechenden CFP-Fusionen durchgeführt.

Im Laufe des intrazellulären Transports wird die Glykosylierung von Rezeptoren fortlaufend modifiziert. Zunächst erfolgt die Anknüpfung einer mannosereichen N-Glykosylierung, die charakteristisch für unreife Rezeptoren im ER und frühem Golgi-Apparat ist. Die mannosereiche Glykosylierung wird im medialen Golgi-Apparat durch komplexe Glykane (komplexe Glykosylierung) ersetzt. Komplex-glykosylierte Rezeptoren findet man im Verlauf des sekretorischen Proteintransports ab dem medialen Golgi-Apparat.

Da alle untersuchten CFP-fusionierten Rezeptoren die Plasmamembran erreichen (Vergleich Abb. 16), war zu erwarten, dass bei diesen Rezeptoren sowohl eine mannosereiche Kernglykosylierung als auch eine komplexe Glykosylierung nachweisbar ist. Die Untersuchung des Glykosylierungsstatus erfolgte mit stabil transfizierten HEK-293-Zellen. Die Rezeptoren wurden über ein GFP-Antiserum an Protein-A-Sepharose immobilisiert, mit den N-Glykosidasen *EndoH* (EH) und *PNGaseF* (PF) verdaut und auf einem Immunoblot mit einem monoklonalen anti-GFP-Antikörper detektiert (Abb. 17). In den Kontrollen mit den unbehandelten Rezeptoren wurden jeweils zwei Banden detektiert (CRF₁R: 90 kDa und 70 kDa, V_{1a}R: 72 kDa und 60 kDa, V₂R: 72 kDa und 60 kDa). Nach dem Verdau mit *EndoH* wurde die Größe der jeweils unteren Banden reduziert (CRF₁R: 70 kDa zu 60 kDa, V_{1a}R: 60 kDa zu 55 kDa, V₂R: 60 kDa zu 55 kDa), die oberen Banden waren *EndoH*-resistent. Das bedeutet, dass es sich bei der oberen Bande um die komplex-glykosylierte Form der Rezeptoren (*) und bei der unteren um die mannosereiche Form (#) handelt. Zusätzlich wurden durch Behandlung mit der N-Glykosidase *PNGaseF* alle N-Glykosylierungen vom Rezeptor entfernt. Im Falle des CRF₁R blieb entsprechend nur noch die unglykosylierte Form des Rezeptors erhalten (CRF₁R: 58 kDa, §). Der V₂R wird im Golgi-Apparat O-glykosyliert [100]. Daher wurde die Bande nicht auf die Größe der unmodifizierten Bande reduziert. Vielmehr entstand, in Übereinstimmung mit bereits publizierten Daten, eine 65 kDa große Bande [100]. Ein ähnliches Ergebnis wurde für den V_{1a}R detektiert. Auch hier entstand nach *PNGaseF*-Verdau eine 65 kDa große Bande. Wahrscheinlich entspricht diese Bande auch hier dem O-glykosylierten Rezeptor.

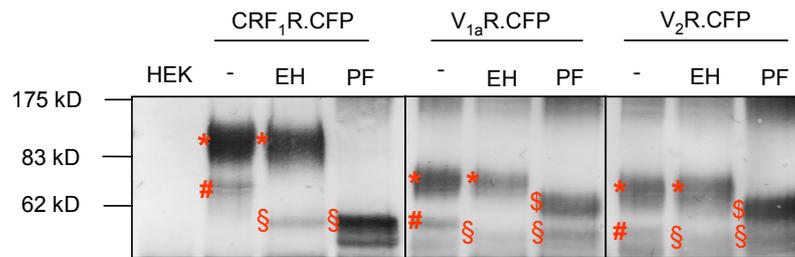


Abb. (17) Untersuchung des Glykosylierungsstatus der CFP-markierten Rezeptoren CRF₁R, V_{1a}R und V₂R. Die Rezeptoren wurden mit Hilfe eines polyklonalen GFP-Antiserums aus dem Zelllysate stabil exprimierender HEK-293-Zellen präzipitiert. Der Verdau der mannoseichen N-Glykosylierungen erfolgte mit *EndoH* (EH). Als Kontrolle diente der unbehandelte Rezeptor (-). Mit *PNGase F* (PF) wurden komplexe und mannoseiche Glykosylierungen entfernt. Die mittels SDS-PAGE aufgetrennten Rezeptoren wurden auf einen Immunoblot mittels monoklonaler GFP-Antikörper und AP-konjugierten anti-Maus-IgG nachgewiesen. Als Kontrolle für die Spezifität des Antikörpers dienten untransfizierte HEK-293-Zellen (HEK). Die komplex-glykosylierten Rezeptoren (*), die mannoseichen Intermediate (#) und die unmodifizierten (§) bzw. O-glykosylierten Rezeptoren (\$) sind gekennzeichnet. Der Immunoblot ist für mindestens drei unabhängige Experimente repräsentativ.

Das Glykosylierungsmuster der untersuchten CFP-fusionierten Rezeptoren zeigt, dass die Rezeptoren korrekt gefaltet werden. Sie liegen vorwiegend in der komplex-glykosylierten Form vor. Auch wenn analoge Versuche mit den Kaede-fusionierten Rezeptoren scheiterten, kann aufgrund der gleichen intrazellulären Lokalisation der CFP- und Kaede-fusionierten Rezeptoren (Vergleich Abb. 16) davon ausgegangen werden, dass die Glykosylierungsmuster der CFP- und Kaede-fusionierten Rezeptoren identisch sind. Im nächsten Schritt wurden nun die pharmakologischen Eigenschaften der CFP- und Kaede-fusionierten Rezeptoren überprüft.

4.5.4 Analyse der pharmakologischen Eigenschaften Kaede-fusionierter Rezeptoren

Die funktionelle Charakterisierung der Kaede-fusionierten Rezeptoren erfolgte mit Hilfe von Ligandenbindungsstudien und *second messenger*-Analysen.

Agonistenbindungsstudien

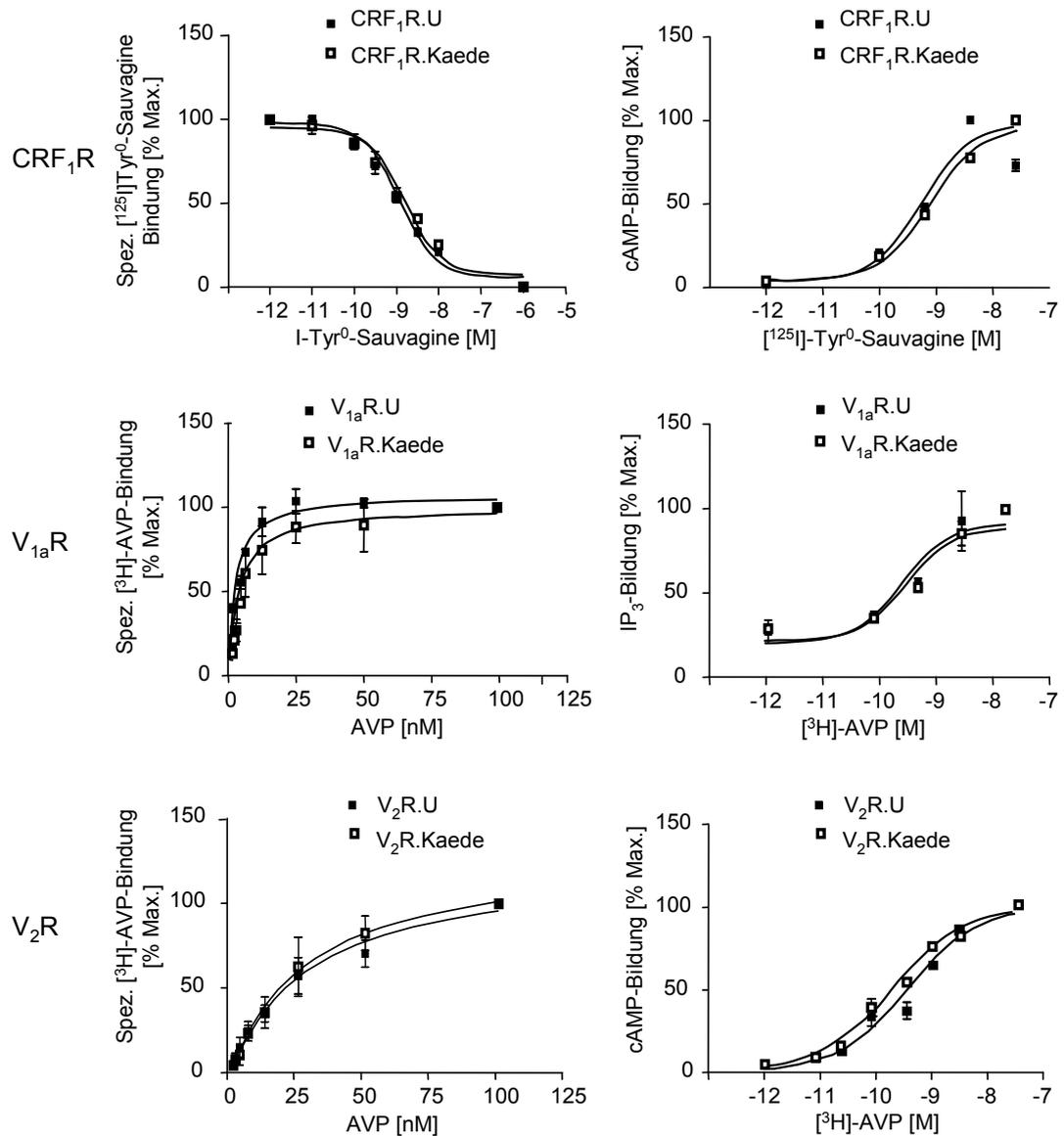
Um die Affinität des Liganden zum Rezeptor und die Anzahl der Bindungsstellen zu bestimmen, wurden Bindungskurven mit Hilfe von radioaktiv-markierten Rezeptorliganden aufgenommen (CRF₁R: [¹²⁵I]Tyr⁰-Sauvagine, V_{1a}R und V₂R: [³H]8-AVP). Für den CRF₁R wurde ein Verdrängungsversuch mit unmarkiertem Liganden durchgeführt (Abb. 18). Für den V_{1a}R und V₂R wurde die Bindung des Radioliganden direkt bestimmt (Abb. 18, Sättigungsversuch). Die Bindungsstudien wurden an präparierten Membranen transient transfizierter HEK-293-Zellen durchgeführt. In den Bindungsexperimenten wurden die Kaede-fusionierten Rezeptoren mit den unfusionierten Rezeptoren verglichen. Bei allen drei untersuchten Rezeptoren unterschied sich die Dissoziationskonstante (K_D) der Kaede-markierten Rezeptoren nicht von denen der unfusionierten Rezeptoren (Abb. 18, Tabelle). Alle ermittelten Bindungskonstanten stimmten auch mit publizierten Daten überein [101, 102, 147]. Lediglich die Anzahl der Bindungsstellen (B_{max}) war bei den Kaede-fusionierten Rezeptoren auf jeweils etwa ein Drittel reduziert (B_{max}: CRF₁R.Kaede =

$0,9 \pm 0,1$ pmol/mg Protein, $CRF_1R.U = 3,5 \pm 1,2$ pmol/mg Protein, $V_{1a}R.Kaede = 0,2 \pm 0,0$ pmol/mg Protein, $V_{1a}R.U = 0,6 \pm 0,2$ pmol/mg Protein, $V_2R.Kaede = 0,4 \pm 0,1$ pmol/mg Protein, $V_2R.U = 0,7 \pm 0,2$ pmol/mg Protein). Dies deutet auf eine niedrigere Expression der Kaede-fusionierten Rezeptoren hin.

Second messenger-Analysen

Die Bestimmung der *second messenger*-Konzentrationen erfolgte an präparierten Gesamtmembranen. Für die G_S -koppelnden Rezeptoren CRF_1R und V_2R wurden die cAMP-Konzentrationen nach Sauvagine- bzw. AVP-Stimulation gemessen. Für den G_q -koppelnden $V_{1a}R$ wurde die IP_3 -Bildung nach AVP-Stimulation bestimmt. Als Kontrolle für die Kaede-fusionierten Rezeptoren dienten auch hier die unfusionierten GPCR. Es konnte nur ein geringfügiger Unterschied der EC_{50} -Werte zwischen den Kaede-fusionierten und den unfusionierten Rezeptoren festgestellt werden (Abb. 18, Tabelle). Die Werte für die unfusionierten Rezeptoren stimmen mit bereits publizierten Daten für diese Rezeptoren überein [101, 102, 148].

Insgesamt zeigte die pharmakologische Charakterisierung der Kaede-markierten Rezeptoren, dass weder Ligandenbindung noch Rezeptoraktivierung durch die Kaede-Fusion beeinträchtigt werden. Lediglich die Rezeptorexpression ist, verglichen mit den unfusionierten Rezeptoren, auf etwa ein Drittel reduziert. Da in allen bisherigen Experimenten keine Hinweise darauf erhalten wurden, dass Kaede-Fusionen die Rezeptoreigenschaften verändern, soll das Protein im Folgenden genutzt werden, um das Recycling der Rezeptoren zu studieren.



	CRF ₁ R.Kaede	CRF ₁ R.U	V _{1a} R.Kaede	V _{1a} R.U	V ₂ R.Kaede	V ₂ R.U
K _D [nM]	3,0 ± 0,3	2,0 ± 0,5	2,4 ± 0,7	1,6 ± 0,1	10,7 ± 4,9	8,0 ± 4,6
EC ₅₀ [M]	5,76 * 10 ⁻¹⁰	8,02 * 10 ⁻¹⁰	4,65 * 10 ⁻¹⁰	1,24 * 10 ⁻⁹	3,96 * 10 ⁻¹⁰	6,90 * 10 ⁻¹⁰

Abb. (18) Ligandenbindung und Rezeptoraktivierung der Kaede-fusionierten Rezeptoren CRF₁R, V_{1a}R und V₂R im Vergleich zu ihren unfusionierten Formen in transient transfizierten HEK-293-Zellen. Die Durchführung der Agonistenbindungsstudien (links) erfolgte mit radioaktiv-markierten Liganden (CRF₁R: [¹²⁵I]Tyr⁰-Sauvagine, V_{1a}R und V₂R [³H]-AVP). Für den CRF₁R wurde anstelle einer Sättigungskurve eine Verdrängungskurve aufgenommen. Zur Bestimmung der cAMP-Bildung (rechts) von CRF₁R und V₂R dienten cAMP-RIA. Für den V_{1a}R wurde die Menge an gebildetem IP_x bestimmt (rechts). Für jede Kurve wurden die Werte aus drei unabhängigen Messungen jeweils auf ihren Maximalwert normiert, dann gemittelt (± SD) und über die Konzentration des verwendeten Agonisten aufgetragen. In der Tabelle (unten) sind die K_D- und die EC₅₀-Werte aus mindestens drei unabhängigen Messungen angegeben.

4.6 Untersuchung des Rezeptorrecyclings mit Hilfe von Kaede-Fusionsproteinen

In der Vergangenheit wurde Rezeptorrecycling häufig als die erneute Zunahme der Rezeptorzahl an der Plasmamembran nach agonisteninduzierter Internalisierung definiert [65, 134]. Zur Untersuchung dienten Rezeptoren, die zunächst in der Plasmamembran markiert, internalisiert und nach einer

bestimmten Recyclingperiode wieder an der Oberfläche detektiert wurden. Dieser Ansatz ist problematisch, denn bei nicht vollständiger Internalisierung können an der Oberfläche verbleibende Rezeptoren Recycling vortäuschen. Man versuchte dieses Problem durch reversible Markierungsverfahren zu umgehen [138]. Unter anderen experimentellen Voraussetzungen können auch neusynthetisierte Rezeptoren oder Rezeptoren, die sich noch im sekretorischen Weg befinden, Recyclingexperimente stören. Während man die Neusynthese der Rezeptoren mit Cycloheximid verhindern kann, sind Rezeptoren im sekretorischen Weg Cycloheximid-unempfindlich [32, 106]. Um all diese Probleme zu vermeiden, sollen in dieser Arbeit in einem neuen methodischen Ansatz recycelnde Rezeptoren mit Hilfe des umschaltbaren Fluoreszenzproteins Kaede mikroskopisch detektiert werden.

4.6.1 Kaede-basierte Untersuchung des Rezeptorrecyclings

Das Prinzip der Kaede-basierten Untersuchungen des Rezeptorrecyclings beruht auf der Umschaltbarkeit des Kaede-Proteins durch kurzwellige Strahlung (Abb. 19). Zunächst werden stabil transfizierte Zellen mit einem Agonisten behandelt, um die Internalisierung der Rezeptoren zu induzieren. Danach wird um das entstehende endosomale Kompartiment am konfokalen Mikroskop eine *region of interest* (ROI) definiert. Die Rezeptoren in der ROI werden mit kurzwelliger Strahlung photokonvertiert. Unmittelbar vor der Photokonvertierung wird das Zellkulturmedium durch einen Puffer ersetzt, der einen Rezeptorantagonisten enthält. Dadurch wird verhindert, dass bereits recycelte Rezeptoren erneut internalisieren. Nach der UV-Bestrahlung werden die photokonvertierten Rezeptoren am LSM bei 37 °C beobachtet. Eine rKaede-Fluoreszenz in der Plasmamembran ist dann ein direkter Beleg für das Rezeptorrecycling. Erscheinen die Rezeptoren nicht wieder an der Zelloberfläche, werden sie höchstwahrscheinlich degradiert. In dem Fall sollte die rKaede-Fluoreszenz mit einem lysosomalen Marker kolokalisierbar sein. Mit Hilfe dieses Versuchsaufbaus wurde das Recycling des CRF₁R studiert. Als Kontrollen dienten wieder der V_{1a}R (recycelnder Rezeptor) und der V₂R (degradierter Rezeptor) [106, 133, 134].

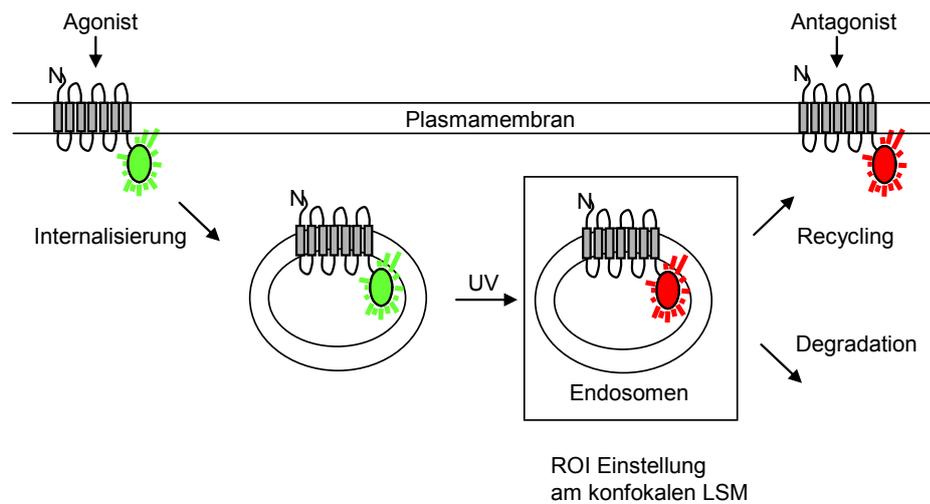


Abb. (19) Prinzip des Kaede-basierten Recyclingversuchs am konfokalen LSM. Kaede-fusionierte GPCR werden in der Plasmamembran lebender Zellen exprimiert. Durch Inkubation der Rezeptoren mit Agonisten kommt es zur Internalisierung in ein endosomales Kompartiment, welches mit Hilfe der LSM-Software markiert werden kann (*region of interest*, ROI). Diese ROI wird selektiv mit einem UV-Laser bestrahlt, um gKaede in rKaede umzuwandeln. Anschließend werden die Zellen für eine definierte Zeit bei 37 °C inkubiert und der Transport der rotfluoreszierenden Rezeptoren wird am Mikroskop beobachtet. Können diese an der Plasmamembran detektiert werden, handelt es sich um einen recycelnden Rezeptor. Das Recycling findet in Anwesenheit eines Rezeptorantagonisten statt, der verhindert, dass die Rezeptoren erneut internalisieren.

Kolokalisation der internalisierten Rezeptoren mit endosomalen Markerproteinen

Um sicherzustellen, dass es sich bei dem intrazellulären vesikulären Kompartiment, das für die UV-Bestrahlung ausgesucht und als ROI markiert wurde, tatsächlich um Endosomen und nicht um den Golgi-Apparat handelt, wurden zu Beginn Kolokalisationsstudien der Kaede-fusionierten Rezeptoren mit einem EYFP-fusionierten Endosomenmarker (EYFP-Endo, Takara Bio Europe/Clontech Inc.) durchgeführt. Hierzu wurden mit den Rezeptorkonstrukten stabil transfizierte HEK-293-Zellen zusätzlich transient mit der Marker-Plasmid-DNA transfiziert. Es wurde ein Zwei-Kanal-Bild der Rezeptorfluoreszenz (Abb. 20, links, grün) und der EYFP-Endo-Fluoreszenz (Abb. 20, Mitte, rot) mittels LSM detektiert. Schon im unbehandelten Zustand ließ sich eine deutliche Kolokalisation (gelbe Färbung, Abb. 20, rechts) der intrazellulären vesikulären Rezeptoren mit dem endosomalen Marker detektieren (Abb. 20, -). Es handelt sich hierbei wahrscheinlich um konstitutiv internalisierte Rezeptoren [151]. Die Inkubation der Rezeptoren mit dem Rezeptoragonisten (CRF₁R: 100 nM Sauvagine, V_{1a}R und V₂R: 100 nM AVP, +) führte zur Internalisierung der Rezeptoren. Die Rezeptoren konnten in intrazellulären, vesikulären Strukturen detektiert werden, die eine fast vollständige Kolokalisation mit dem endosomalen Marker zeigten.

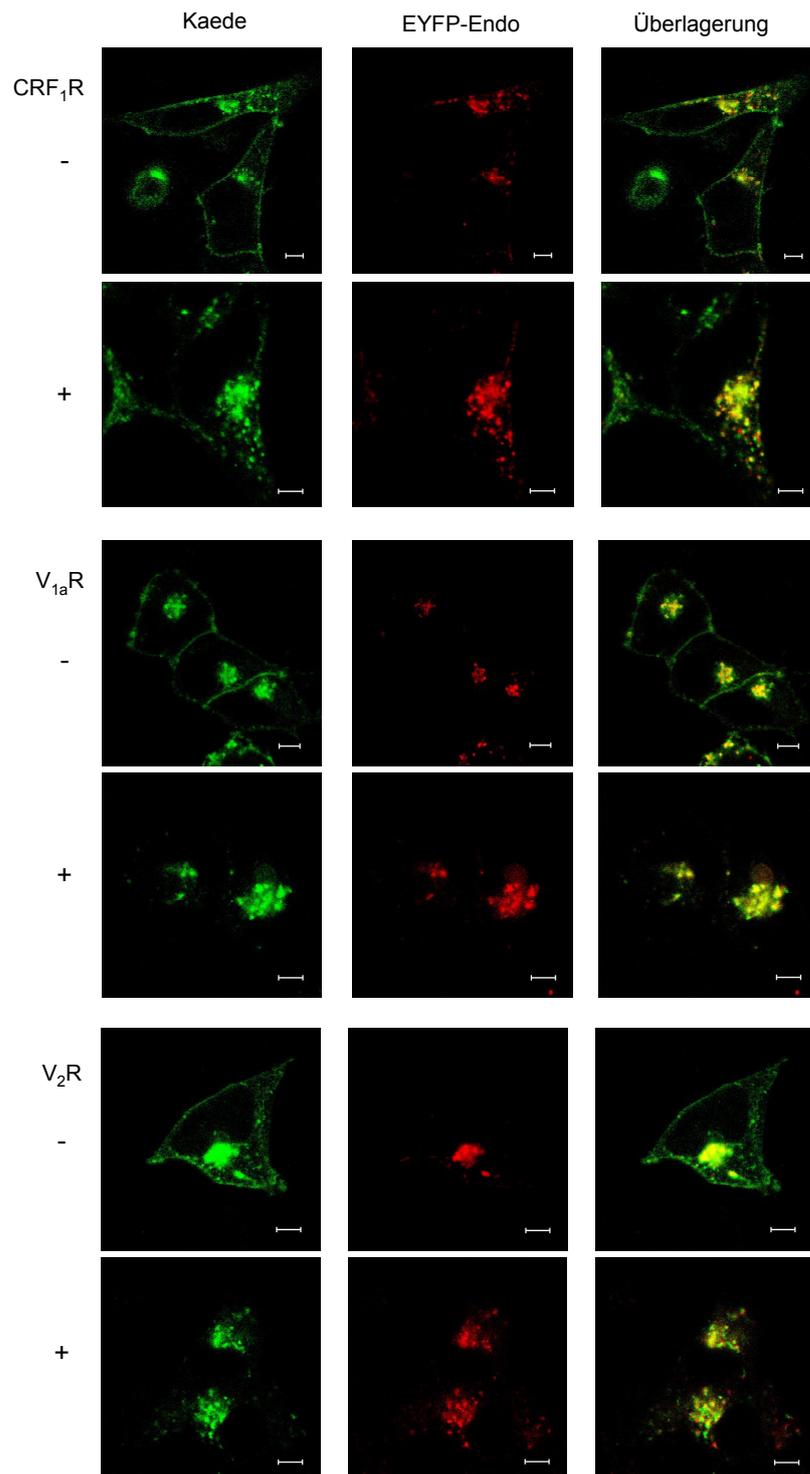


Abb. (20) Kolokalisation der Kaede-fusionierten Rezeptoren CRF₁R, V_{1a}R und V₂R mit dem endosomalen Markerprotein EYFP-Endo. Lebende HEK-293-Zellen wurden vor (-) und nach (+) 30-minütiger Agonistenbehandlung untersucht. Die Rezeptor-Fluoreszenzen sind in grün (links), die Signale des Endosomenmarkers in rot (Mitte) dargestellt. Eine gelbe Färbung zeigt Kolokalisationen an (rechts). Die Bilder zeigen repräsentative Ergebnisse aus drei unabhängigen Experimenten (jeweils 20 ausgewertete Zellen, Größenmaßstab = 5 µm).

Kaede-basierter Recyclingversuch

Für den Kaede-basierten Recyclingversuch wurden HEK-293-Zellen genutzt, die die Kaede-fusionierten Rezeptoren CRF₁R, V_{1a}R und V₂R stabil exprimierten. Im unbehandelten Zustand waren

die Rezeptoren in der Plasmamembran lokalisiert (Abb. 21, Reihe 1). Die Inkubation der Zellen für 30 Minuten mit einem Agonisten (CRF₁R: 100 nM Sauvagine, V_{1a}R und V₂R: 100 nM AVP) führte zur Rezeptorinternalisierung in intrazelluläre, vesikuläre Strukturen, die als Endosomen identifiziert werden konnten (siehe oben). Um das endosomale Kompartiment wurde eine ROI definiert (Abb. 21, Reihe 2), in der gKaede zu rKaede photokonvertiert wurde (Abb. 21, Reihe 3). Für das Recycling wurden die Zellen für weitere 45 Minuten bei 37 °C inkubiert. Anschließend war der rKaede-fusionierte V_{1a}R teilweise wieder an der Plasmamembran zu finden (Abb. 21, Reihe 4). Demnach konnten bereits publizierte Daten, in denen gezeigt wurde, dass dieser Rezeptor recycelt, bestätigt werden [106]. Der rKaede-fusionierte V₂R konnte hingegen nur in intrazellulären, vesikulären Strukturen detektiert werden (Abb. 21, Reihe 4). Dies bestätigt ebenfalls die publizierten Daten, entsprechend derer der V₂R zu den nicht recycelnden Rezeptoren zählt [133, 134]. Im Falle des CRF₁R war das rKaede-Signal nach Ablauf der Recyclingzeit wie beim V_{1a}R an der Plasmamembran detektierbar. Dieses Ergebnis zeigt, dass dieser Rezeptor ebenfalls ein recycelnder Rezeptor ist (Abb. 21, Reihe 4). Für alle drei Rezeptoren wurden nach Ablauf der Recyclingzeit auch gKaede-Signale in der Plasmamembran gefunden. Hierbei handelt es sich vermutlich um neusynthetisierte Rezeptoren oder um Rezeptoren, die sich zu Beginn der Recyclingperiode bereits im sekretorischen Weg befanden. Im Gegensatz zu früheren Internalisierungsversuchen stellen diese Rezeptoren aber kein methodisches Problem dar, da sie eine andere Fluoreszenz als die recycelnden Rezeptoren besitzen. Um die Daten des Kaede-basierten Recyclingversuchs abzusichern, sollte das Rezeptorrecycling im Folgenden zusätzlich mit konventionellen Recycling-Experimenten untersucht werden.

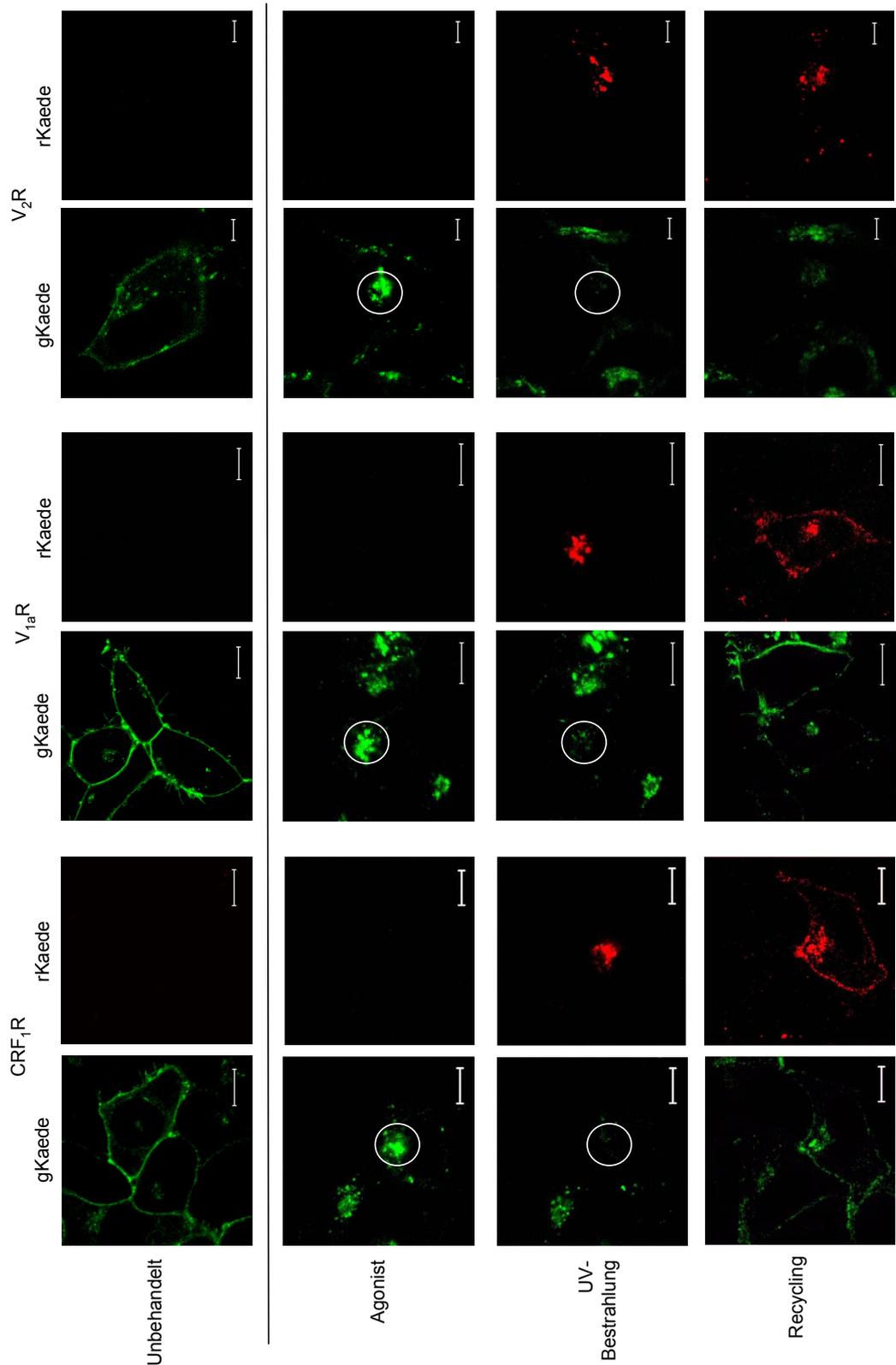


Abb. (21) Kaede-basierter Recyclingversuch für den CRF₁R, V_{1a}R und V₂R. Die Kaede-fusionierten Rezeptoren wurden stabil in lebenden HEK-293-Zellen exprimiert und am LSM mikroskopiert. Reihe 1 zeigt die unbehandelten Rezeptoren. Nach 30-minütiger Inkubation der Rezeptoren mit ihrem Agonisten wurde um die internalisierten Rezeptoren eine ROI (Reihe 2, weiße Kreise) definiert und diese für 20 Sekunden mit UV-Laser bestrahlt (UV-Bestrahlung), um gKaede in rKaede umzuschalten (Reihe 3). Anschließend erfolgte die Inkubation der Zellen für weitere 45 Minuten in Anwesenheit der Rezeptorantagonisten bei 37 °C. Während der Recyclingperiode wurde eine Zeitserie am LSM aufgenommen (Zwei-Kanal-Bild, alle fünf Minuten). Die Abbildung zeigt nur die letzte Aufnahme dieser Serie (Reihe 4). Die gKaede-Fluoreszenz ist in grün, die

rKaede-Fluoreszenz in rot dargestellt. Die Bilder sind für acht unabhängig voneinander durchgeführte Messungen repräsentativ (Größenmaßstab = 5 μm).

4.6.2 Durchflusscytometrische Analyse des Rezeptorrecyclings

Das Recycling von N-terminal *FLAG*-fusionierten Rezeptoren wurde durchflusscytometrisch mit einem reversibel bindenden anti-*FLAG*-Antikörper untersucht [138]. Hierfür wurden die Kaede-fusionierten Rezeptoren zusätzlich N-terminal mit einer *FLAG*-Markierung versehen (resultierende Konstrukte: *FLAG*.CRF₁R.Kaede, *FLAG*.V_{1a}R.Kaede, *FLAG*.V₂R.Kaede, Vergleich Abb. 15) und transient in HEK-293-Zellen exprimiert. Die Zellen wurden mit einem anti-*FLAG*-M1-Antikörper beladen und anschließend mit dem entsprechenden Rezeptoragonisten (CRF₁R: 100 nM Sauvagine, V_{1a}R und V₂R: 100 nM AVP) für 30 Minuten inkubiert, um die Rezeptoren zu internalisieren. Unspezifisch oder an nicht internalisierte Rezeptoren gebundener Antikörper wurde durch Kalziumdepletion (0,4 % EDTA in PBS) entfernt. Nach Inkubation der Zellen für drei Stunden bei 37 °C in Zellkulturmedium wurden die Zellen mit einem fluoreszierenden Sekundäntikörper beladen, um Rezeptoren zu identifizieren, die zur Zelloberfläche zurücktransportiert wurden. Der Vorteil dieser Methode ist, dass nur recycelnde Rezeptoren in der Durchflusscytometrie ein Fluoreszenzsignal liefern.

Die Fluoreszenzsignale der Zellen wurden gemessen und auf den Ausgangswert (Abb. 22, -) normiert. Bei allen Rezeptoren verringerte sich die Zahl der Rezeptoren an der Oberfläche nach Inkubation mit dem Rezeptoragonisten und der dadurch induzierten Rezeptorinternalisierung (Abb. 22, +). Die Internalisierung der Rezeptoren war nicht vollständig. Es verblieben einige Rezeptoren auf der Zelloberfläche, die nach Kalziumdepletion vom Antikörper befreit werden konnten (Abb. 22, D). Die nachfolgende Inkubation für drei Stunden führte zu einer deutlichen Erhöhung des Plasmamembransignals für den CRF₁R und den V_{1a}R (Abb. 22, R). Das Plasmamembransignal für den V₂R nahm hingegen noch weiter ab. Die Abnahme des Signals bedeutet, dass im Laufe der Recyclingzeit von drei Stunden plasmamembrangebundener anti-*FLAG*-M1-Antikörper verloren ging. Dies hängt vermutlich mit der konstitutiven Internalisierung der Rezeptoren bzw. dem ständigen Austausch der Membranen (*bulk flow*) zusammen [151].

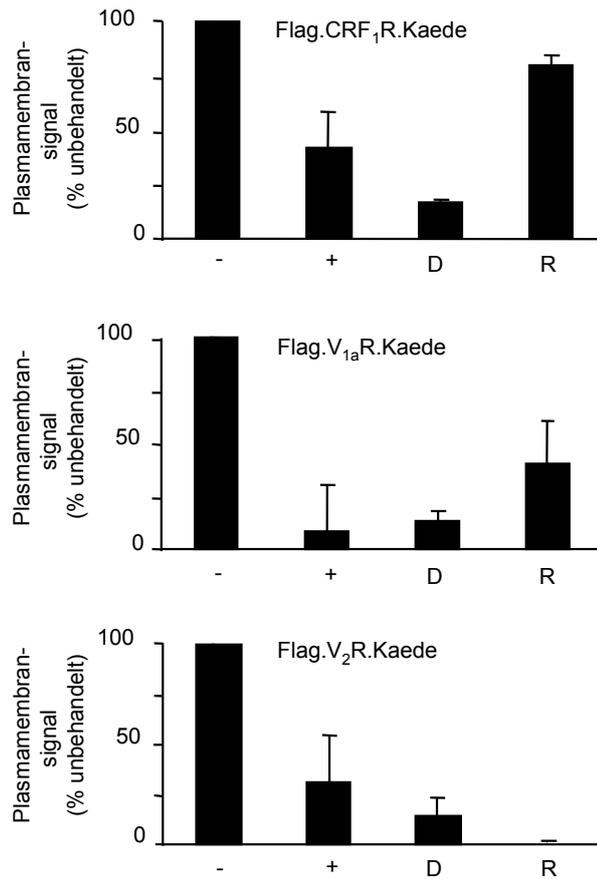


Abb. (22) Durchflusszytometrische Analyse des Rezeptorrecyclings. HEK-293-Zellen (20×10^3), welche die N-terminal FLAG- und C-terminal Kaede-fusionierten Rezeptoren *FLAG.CRF₁R.Kaede*, *FLAG.V_{1a}R.Kaede* und *FLAG.V₂R.Kaede* transient exprimierten, wurden mit *FLAG-M1*-Antikörper beladen und anschließend 30 Minuten mit einem Agonist inkubiert (+), um die Rezeptorinternalisierung zu induzieren. An der Plasmamembran verbleibende Antikörper wurden durch Kalziumdepletion entfernt (D). Nach Ablauf einer Recyclingzeit von drei Stunden wurde die Zunahme der recycelnden anti-*FLAG-M1*-IgG-beladenen Rezeptoren bestimmt (R). Als Sekundärantikörper diente ein PE-konjugierter anti-Maus-Antikörper. Es wurde zu jeder Probe eine Isotypkontrolle mit anti-IgG_{2b} durchgeführt und der Wert vom eigentlichen Messwert abgezogen. Anschließend erfolgte die Normierung des Wertes auf den Ausgangswert der mit *FLAG-M1*-beladenen Zellen (-). Es wurden drei voneinander unabhängige Messungen gemittelt (\pm SD).

Insgesamt konnten die Ergebnisse des Kaede-basierten Recyclingassays bestätigt werden. Beim CRF₁R handelt es sich, wie auch beim V_{1a}R, um einen recycelnden Rezeptor, der V₂R hingegen recycelt nicht. In einem dritten Recyclingexperiment sollte dieser Sachverhalt noch mit biochemischen Methoden bestätigt werden.

4.6.3 Biochemische Untersuchung des Rezeptorrecyclings

Um das Rezeptorrecycling biochemisch zu untersuchen, wurden Biotinylierungsexperimente durchgeführt. Biotin bindet kovalent an freie Aminogruppen der Proteine, ist nicht zellpermeabel und markiert somit selektiv Plasmamembranproteine. Für den Versuch wurden HEK-293-Zellen verwendet, die die CFP-fusionierten Rezeptoren CRF₁R, V_{1a}R und V₂R stabil exprimierten. Die Zellen wurden vor (Abb. 23.A, -) und nach (Abb. 23.A, +) Agonistenstimulation sowie nach einer Recyclingperiode (Abb. 23.A, R) mit Biotin behandelt. Nach der Biotinylierung wurden die Zellen

lysiert und die CFP-fusionierten Rezeptoren über einen GFP-Antikörper aus dem Lysat aufgereinigt. Anschließend erfolgte die Detektion der Plasmamembranfraktion der Rezeptoren über einen Biotin-Antikörper. Auf den Immunoblots war erwartungsgemäß nur die komplex-glykosylierte Form der Rezeptoren zu sehen, denn nur diese erreichte die Plasmamembran. Die Intensität der unbehandelten Rezeptorbande (Abb. 23.A, -) nahm nach Agonistenbehandlung (CRF₁R: 100 nM Sauvagine, V_{1a}R und V₂R: 100 nM AVP) durch die Rezeptorinternalisierung ab (Abb. 23.A, +). Nach einstündiger Inkubation in DMEM war bei allen drei Rezeptoren wieder mehr Protein auf der Oberfläche detektierbar (Abb. 23.A, R). Dies kann zum einen daran liegen, dass die internalisierten Rezeptoren zurück zur Plasmamembran recyceln. Zum anderen kann das stärkere Signal aber auch auf neusynthetisierte Rezeptoren zurückgeführt werden oder auf Rezeptoren, die sich zu Beginn des Experiments bereits im sekretorischen Weg befanden. Um dies zu untersuchen, wurden Zellen zusätzlich mit dem Ionophor Monensin (Abb. 23.A, M), einem Inhibitor des Rezeptorrecyclings, behandelt [139, 140].

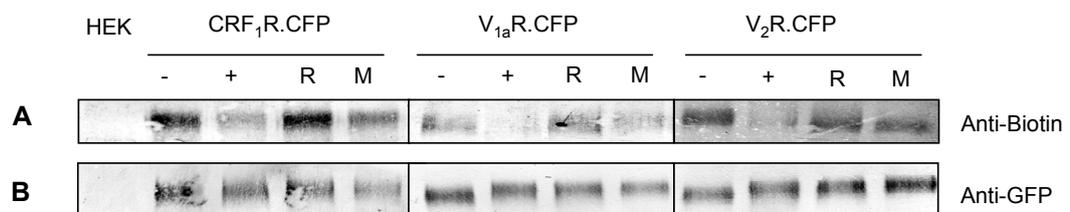


Abb. (23) Untersuchung des Rezeptorrecyclings mit Hilfe eines Oberflächenbiotinylierungsversuchs. (A) HEK-293-Zellen, die die CFP-fusionierten Rezeptoren CRF₁R, V_{1a}R und V₂R stabil exprimierten, wurden vor (-) und nach (+) Agonistenbehandlung sowie nach einer Recyclingperiode (R) biotinyliert. Zusätzlich wurde jeweils ein Ansatz während der Recyclingperiode mit Monensin (M) behandelt. Nach Biotinylierung und Zellyse wurden die CFP-fusionierten Rezeptoren mit einem polyklonalen anti-GFP-Antiserum aufgereinigt und mittels SDS-PAGE aufgetrennt. Der Nachweis der Rezeptoren im Immunoblot erfolgte mit einem monoklonalen anti-Biotin- und AP-konjugierten anti-Maus-IgG. **(B)** Als Ladekontrolle wurde die komplex-glykosylierte Bande der Rezeptoren im Präzipitat detektiert (Anti-GFP-IgG, AP-konjugiertes anti-Maus-IgG). Das Ergebnis ist repräsentativ für drei unabhängig voneinander durchgeführte Experimente.

Im Falle des V_{1a}R zeigte sich ein deutlicher Unterschied in der Intensität der Banden mit und ohne Monensinbehandlung nach der Recyclingperiode. Dies zeigt, dass dieser Rezeptor recycelt [106]. Das gleiche Ergebnis wurde für den CRF₁R erhalten, der ebenfalls recycelt. Beim V₂R dagegen war dieser Unterschied nicht detektierbar. Dadurch konnte erneut belegt werden, dass dieser Rezeptor nach Internalisierung die Plasmamembran nicht wieder erreicht.

4.7 Charakterisierung der am CRF₁R-Recycling beteiligten Proteine

Rab-Proteine definieren die Zugehörigkeit von Vesikeln zu bestimmten Zellkompartimenten und vermitteln ihren gezielten Transport. Aus diesem Grund eignen sie sich als Marker zur Untersuchung des Vesikeltransports. Recycelnde Rezeptoren befinden sich zum Beispiel in Rab11-positiven *Recycling*-Endosomen oder im Trans-Golgi-Netzwerk [72]. Darüber hinaus unterscheiden sich recycelnde und degradierte Rezeptoren durch die Stabilität ihrer β -Arrestin-2-Bindung. Recycelnde

Rezeptoren gehen lediglich eine transiente Interaktion mit β -Arrestin-2 ein. Die Interaktion von Rezeptoren, die lysosomal abgebaut werden, ist stabiler [64].

4.7.1 Charakterisierung der β -Arrestin-2 Bindung der Rezeptoren

β -Arrestin-2 bindet an den aktivierten und phosphorylierten Rezeptor. Je nach Stabilität des Komplexes sind die Rezeptoren in der Lage zu recyceln oder nicht. Bei Klasse-A-Rezeptoren dissoziiert β -Arrestin-2 und der Rezeptor kann zurück zur Plasmamembran transportiert werden. Für Klasse-B-Rezeptoren ist charakteristisch, dass der Komplex aus β -Arrestin-2 und dem Rezeptor abgebaut wird [19, 64]. Der $V_{1a}R$ gehört zu den Klasse-A- und der V_2R zu den Klasse-B-Rezeptoren [69, 106].

Kolokalisation der internalisierten Rezeptoren mit β -Arrestin-2

Gehört der CRF_1R , wie oben gezeigt, tatsächlich zu den recycelnden Rezeptoren, muss er die Charakteristika eines Klasse-A-Rezeptors aufweisen. Um dies zu untersuchen, wurde mit Hilfe des LSM die Kolokalisation der CFP-markierten Rezeptoren CRF_1R , $V_{1a}R$ und V_2R (Abb. 24, grün) mit GFP-fusioniertem β -Arrestin-2 (Abb. 24, rot) analysiert. Im unstimulierten Zustand befanden sich die Rezeptoren in der Plasmamembran (Abb. 24 und 16) und in intrazellulären, vesikulären Strukturen, die bereits als Endosomen identifiziert werden konnten (siehe oben). β -Arrestin-2 war im unstimulierten Zustand vorwiegend cytosolisch verteilt.

Eine Minute nach Zugabe des Agonisten war bei allen untersuchten Rezeptoren eine deutliche Rekrutierung von β -Arrestin-2 an die Plasmamembran zu beobachten. Nach 30 Minuten waren die Rezeptoren ausschließlich in intrazellulären, endosomalen Vesikeln detektierbar. Im Fall des $V_{1a}R$ konnte keine Überlagerung der Rezeptorsignale mit den β -Arrestin-2-Signalen nachgewiesen werden. Dies ist ein charakteristisches Merkmal von Klasse-A-Rezeptoren und bereits für den $V_{1a}R$ beschrieben [106]. Der CRF_1R lieferte ein vergleichbares Ergebnis. Das bedeutet, dass es sich auch bei diesem Rezeptor um einen Klasse-A-Rezeptor handelt. Klasse-A-Rezeptoren rekrutieren β -Arrestin-2 und internalisieren β -Arrestin-2-abhängig. Eine Kolokalisation ist aber nicht nachweisbar, da der Komplex aus Rezeptor und β -Arrestin-2 nur transient besteht und der Rezeptor relativ schnell recycelt. Im Falle des V_2R waren dagegen nach 30 Minuten nicht nur der Rezeptor sondern auch β -Arrestin-2 in intrazellulären, vesikulären Strukturen zu finden. Die β -Arrestin-2-Signale kolokalisierten nahezu vollständig mit den Signalen der internalisierten Rezeptoren. Dieses Resultat zeigt die stabile Interaktion des V_2R mit β -Arrestin-2 (Klasse-B-Rezeptor).

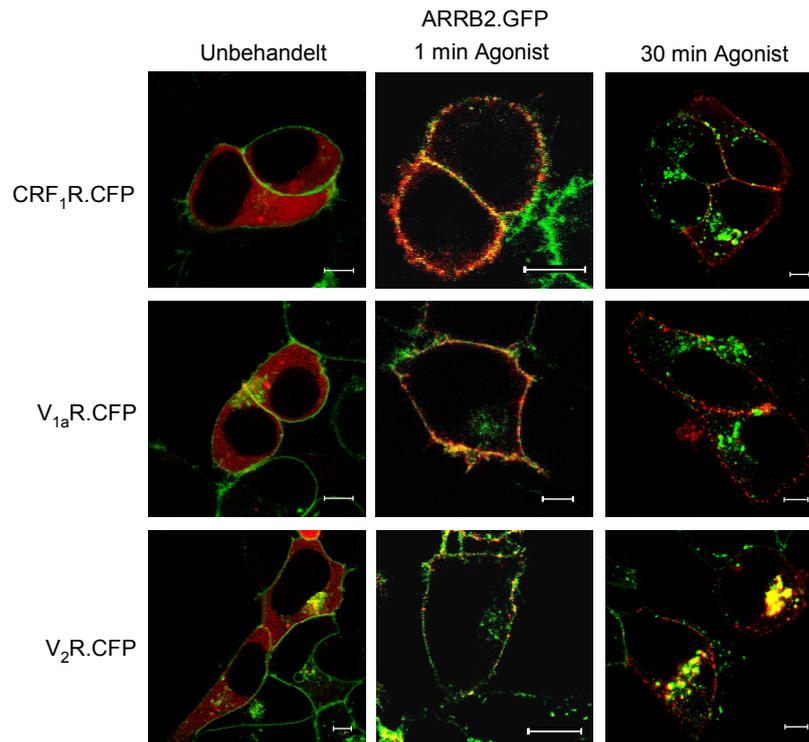


Abb. (24) Kolokalisation der CFP-fusionierten Rezeptoren CRF₁R, V_{1a}R und V₂R mit GFP-fusioniertem β -Arrestin-2. HEK-293-Zellen, die die Rezeptoren stabil exprimierten, wurden zusätzlich mit β -Arrestin-2-GFP-Plasmid-DNA transient transfiziert. Die Aufnahmen wurden im unbehandelten Zustand (links) und nach ein- (Mitte) bzw. 30-minütiger Agonistenbehandlung (rechts) gemacht. Die Fluoreszenz der Rezeptoren ist in grün, die von β -Arrestin-2 in rot dargestellt. In den Zwei-Kanal-Bildern zeigt eine Gelbfärbung die Kolokalisation der Fluoreszenzsignale an. Die Bilder sind für drei unabhängige Messungen repräsentativ (Größenstandard = 5 μ m).

Detektion der Rezeptoren in β -Arrestin-2-haltigen Vesikeln

Zur Bestätigung, dass es sich bei CRF₁R und V_{1a}R um Klasse-A-Rezeptoren und beim V₂R um einen Klasse-B-Rezeptor handelt, wurden Vesikelisolierungen durchgeführt und die Lokalisation von β -Arrestin-2 und den Rezeptoren in diesen Vesikeln untersucht. Die Zellen mit den CFP-fusionierten Rezeptoren CRF₁R, V_{1a}R und V₂R wurden mit und ohne Agonist (CRF₁R: 100 nM Sauvagine, V_{1a}R und V₂R: 100 nM AVP) inkubiert. Danach wurden die β -Arrestin-tragenden Vesikel mit Hilfe eines β -Arrestin-2-Antikörpers präzipitiert, isoliert und die darauf befindlichen Rezeptoren mit Hilfe eines GFP-Antikörpers im Immunoblot detektiert. Die Banden im Immunoblot zeigten erwartungsgemäß jeweils nur die komplex-glykosylierte Form der Rezeptoren (Abb. 25, *). Die Tatsache, dass auch in der unbehandelten Kontrolle Rezeptorprotein detektierbar war (Abb. 25, -), deutet darauf hin, dass auch die konstitutive Internalisierung aller untersuchten Rezeptoren β -Arrestin-2-abhängig verläuft. Nimmt die Bandenintensität nach Agonistenbehandlung zu, spricht dies für eine stabilere Interaktion von β -Arrestin-2 mit dem Rezeptor und damit für einen Klasse-B-Rezeptor. Tritt keine Verstärkung der Bandenintensität auf, konnte β -Arrestin-2 offensichtlich wieder schnell vom Rezeptor und damit vom Vesikel dissoziieren. Dies entspräche den Merkmalen eines Klasse-A-Rezeptors. Beim V_{1a}R und CRF₁R waren kaum Unterschiede zwischen unbehandelten und agonistenbehandelten Vesikeln zu detektieren (Abb. 25). Dies spricht für eine transiente Interaktion von β -Arrestin-2 und zeigt erneut,

dass es sich bei diesen Rezeptoren um Klasse-A-Rezeptoren handelt. Für den V₂R wurde dagegen nach Agonistenbehandlung eine deutlich stärkere Rezeptorbande (Abb. 25) und damit mehr Rezeptor auf den β-Arrestin-2-tragenden Vesikeln detektiert. Dies spricht für eine stabile Interaktion des Rezeptors mit β-Arrestin-2. Zusammengefasst stützen die Ergebnisse dieses Versuchs die Daten der mikroskopischen Kollokalisationsstudien.

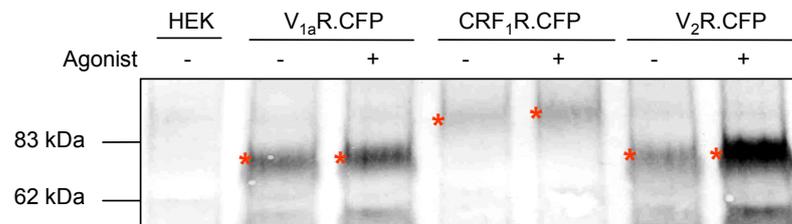


Abb. (25) Detektion der CFP-fusionierten Rezeptoren V_{1a}R, CRF₁R und V₂R in β-Arrestin-2-tragenden Vesikeln. Die Zellen wurden vor (-) und nach 30-minütiger Agonisteninkubation (+) aufgeschossen. Die β-Arrestin-2-tragenden Vesikel wurden mittels eines anti-β-Arrestin-2-Antikörpers präzipitiert. Die Proteine wurden durch SDS-PAGE getrennt und die Menge der in den Vesikeln befindlichen Rezeptoren mit einem monoklonalen anti-GFP-Antikörper und einen AP-konjugierten Sekundärantikörper auf einem Immunoblot detektiert. Als Kontrolle für die Spezifität der Antikörper dienten untransfizierte HEK-293-Zellen (HEK). Das Ergebnis ist für drei unabhängige Experimente repräsentativ.

4.7.2 Kollokalisationsstudien mit Recycling- und Degradationsmarkern

Nach Ablauf der Recyclingzeit von einer Stunde im Kaede-basierten Recyclingversuch konnten sowohl der V_{1a}R als auch der CRF₁R in intrazellulären Vesikeln detektiert werden. Ob es sich dabei um Rezeptoren handelt die noch recyceln, oder um solche, die dem Abbau zugeführt werden, sollte durch eine Kollokalisation der Rezeptoren mit einem Lysosomenmarker und einem gleichzeitig koexprimierten CFP-fusionierten Rab11 gezeigt werden. Die GTPase Rab11 ist ein spezifischer Marker für *Recycling*-Endosomen und das Trans-Golgi-Netzwerk [73].

Für die Kollokalisationsstudien wurden lebende HEK-293-Zellen, die die Kaede-fusionierten Rezeptoren und CFP-markiertes Rab11 exprimierten, nach Anfärbung der Lysosomen (Vitalfarbstoff *LysoTrackerRed-DND99*, Invitrogen GmbH) mikroskopisch untersucht. Um die intrazellulären Vesikel zu charakterisieren, wurde die Methodik des Kaede-basierten Recyclingversuchs verwendet, ohne jedoch die Kaede-fusionierten Rezeptoren V_{1a}R, CRF₁R und V₂R zu photokonvertieren. Sowohl der lysosomale Marker als auch der Trans-Golgi-Netzwerk- bzw. *Recycling*-Endosomen-Marker Rab11 waren in intrazellulären vesikulären Strukturen lokalisiert (Abb. 26, *LysoTrackerRed-DND99* in blau und Rab11 in rot dargestellt), die in der Überlagerung nicht miteinander kollokalisieren. Für den CRF₁R und den V_{1a}R wurde nur eine sehr geringe Kollokalisation der intrazellulären Rezeptoren mit dem lysosomalen Marker detektiert. Dagegen war die Kollokalisation mit Rab11 deutlich stärker. Dieses Ergebnis steht im Einklang mit dem Befund, dass beide Rezeptoren zur Plasmamembran recyceln. Die Tatsache, dass nach 45 Minuten noch immer Rezeptoren in Rab11-positiven

endosomalen Strukturen zu finden sind, zeigt auch, dass man die Recyclingzeit im Kaede-basierten Recyclingassay (45 Minuten, siehe auch Abb. 21) noch verlängern könnte.

Die Verteilung des V₂R unterscheidet sich nach Ablauf der Recyclingzeit deutlich von der der beiden anderen Rezeptoren. Das gKaede-Signal konnte wesentlich stärker mit dem lysosomalen Marker kolokalisiert werden. Eine Kolokalisation mit Rab11 wurde dagegen kaum detektiert. Dies zeigt erneut, dass der V₂R nach agonisteninduzierter Internalisierung nicht recycelt, sondern lysosomal abgebaut wird [133, 152].

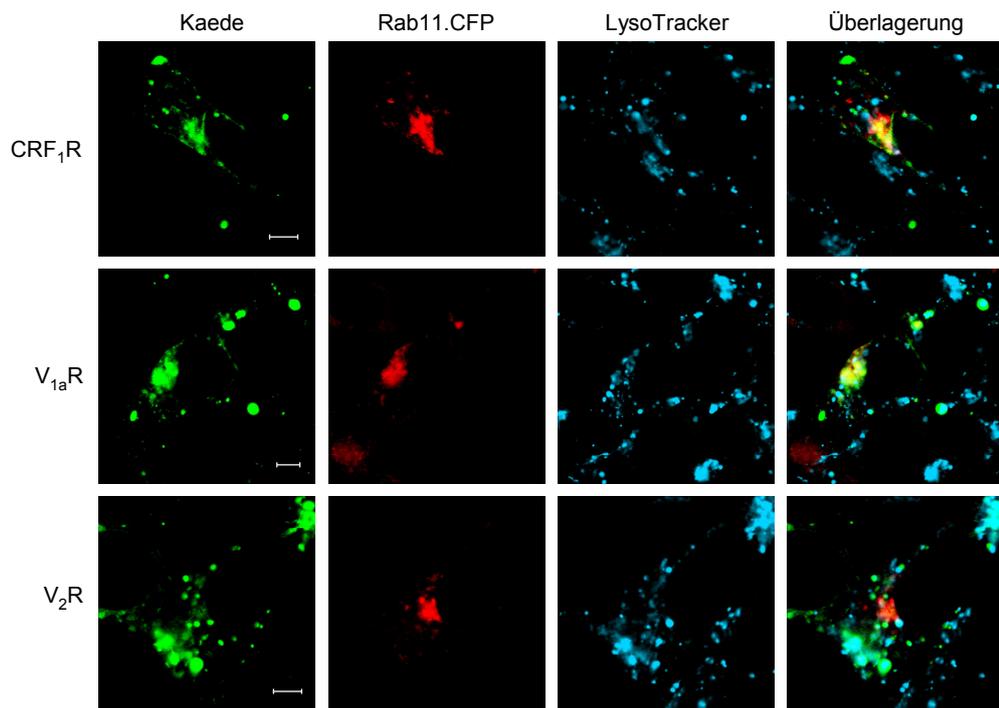


Abb. (26) Kolokalisation der Rezeptoren CRF₁R.Kaede, V_{1a}R.Kaede und V₂R.Kaede mit einem lysosomalen Marker und Rab11. Für die Versuche wurden lebende stabil transfizierte HEK-293-Zellen verwendet. Die Zellen wurden zusätzlich mit CFP-fusioniertem Rab11 transfiziert und die Lysosomen mit dem Vitalfarbstoff *LysoTrackerRed-DND99* gefärbt. Die Aufnahmen entstanden nach 30-minütiger Agonistenbehandlung und anschließender 45-minütiger Recyclingperiode. Die gKaede-Fluoreszenz der Rezeptoren ist in grün, der lysosomale Marker in blau und die CFP-Fluoreszenz von Rab11 in rot dargestellt. Die Bilder sind für drei unabhängige Experimente repräsentativ (Größenstandard = 5 µm).

4.7.3 Kaede-Fusionen zur Messung der Transportgeschwindigkeit von GPCR

Bei genauer Betrachtung der gKaede-Signale des Recyclingversuchs (siehe Abb. 21) fällt auf, dass die Signale des V_{1a}R und des CRF₁R in der Plasmamembran stärker sind als die des V₂R. Da die gKaede-fusionierten Rezeptoren im Verlauf des Versuchs zunächst vollständig internalisiert werden, stammen die Signale in der Plasmamembran höchstwahrscheinlich von neusynthetisierten Rezeptoren. Möglicherweise sind für den V₂R keine Signale detektierbar, weil dieser z.B. langsamer transportiert oder synthetisiert wird als der V_{1a}R und der CRF₁R. Die Kaede-Methodik sollte sich auch zur Bestimmung der Biosynthese- und Transportgeschwindigkeiten von Rezeptoren eignen, da die Rezeptoren komplett umgeschaltet werden können. Um zu untersuchen, ob diese zusätzliche

Anwendung der Kaede-Methodik möglich ist, wurde bei Zellen, die die Kaede-fusionierten Rezeptoren $V_{1a}R$, CRF_1R und V_2R exprimieren, die gKaede-Fluoreszenz vollständig mit einem UV-Laser (364 nm) umgeschaltet. Anschließend wurde das erneute Auftreten der gKaede-Fluoreszenz in der Plasmamembran (Abb. 27.A) in einer Zeitserie über 90 Minuten detektiert (alle zehn Minuten ein LSM-Bild). Die Intensität des gKaede-Signals in der Plasmamembran wurde mit Hilfe der LSM-Software quantifiziert (Abb. 27.B). Mit dieser Methode konnte bestimmt werden, wie schnell sich die Plasmamembran wieder mit neusynthetisierten grünfluoreszierenden Rezeptoren füllt. Vor der Bestrahlung der gKaede-fusionierten Rezeptoren mit dem UV-Laser waren die Rezeptoren in der Plasmamembran (Abb. 27.A, -) und zu einem geringen Teil in Endosomen lokalisiert (siehe auch Abb. 20). Zu diesem Zeitpunkt waren nur die gKaede-Fluoreszenzen detektierbar. Nach UV-Bestrahlung der kompletten Zelle (Abb. 27, 0 min) waren ausschließlich rKaede-Fluoreszenzen messbar. Die gKaede-Fluoreszenzen nahmen zeitabhängig wieder zu. Die gKaede-Fluoreszenzintensitäten wurden auf den Ausgangswert (gKaede vor UV-Bestrahlung) normiert, als Funktion der Zeit aufgetragen und einer linearen Regression unterzogen (Abb. 27.B). Der Anstieg dieser Geraden spiegelt die Geschwindigkeit der Rezeptorbiosynthese und des Rezeptortransports wider. Der Anstieg der Regressionsgeraden war für den $V_{1a}R$ (0,0081) und den CRF_1R (0,0055) vergleichbar und deutlich steiler als für den V_2R (0,0015). Die Ergebnisse lassen den Schluss zu, dass der $V_{1a}R$ und der CRF_1R schneller biosynthetisiert und zur Plasmamembran transportiert werden als der V_2R . Dies könnte auch erklären, warum am Ende des Recyclingversuchs die gKaede-Signale dieser Rezeptoren in der Plasmamembran stärker waren.

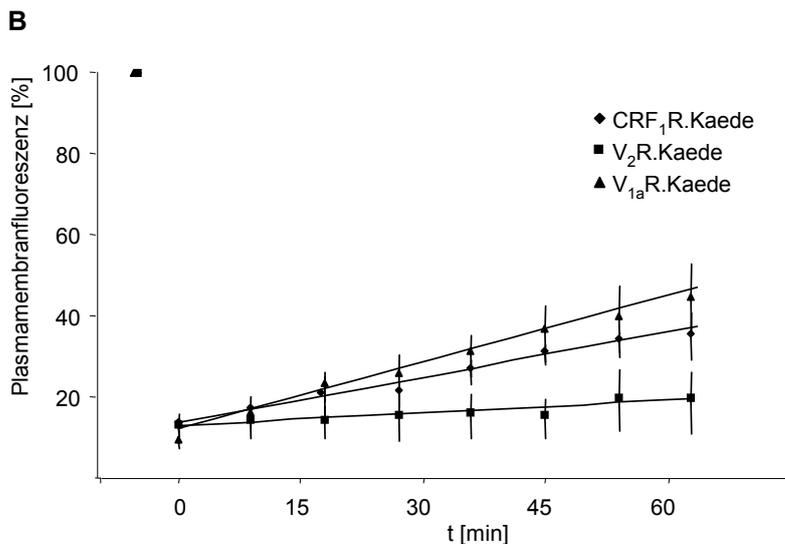
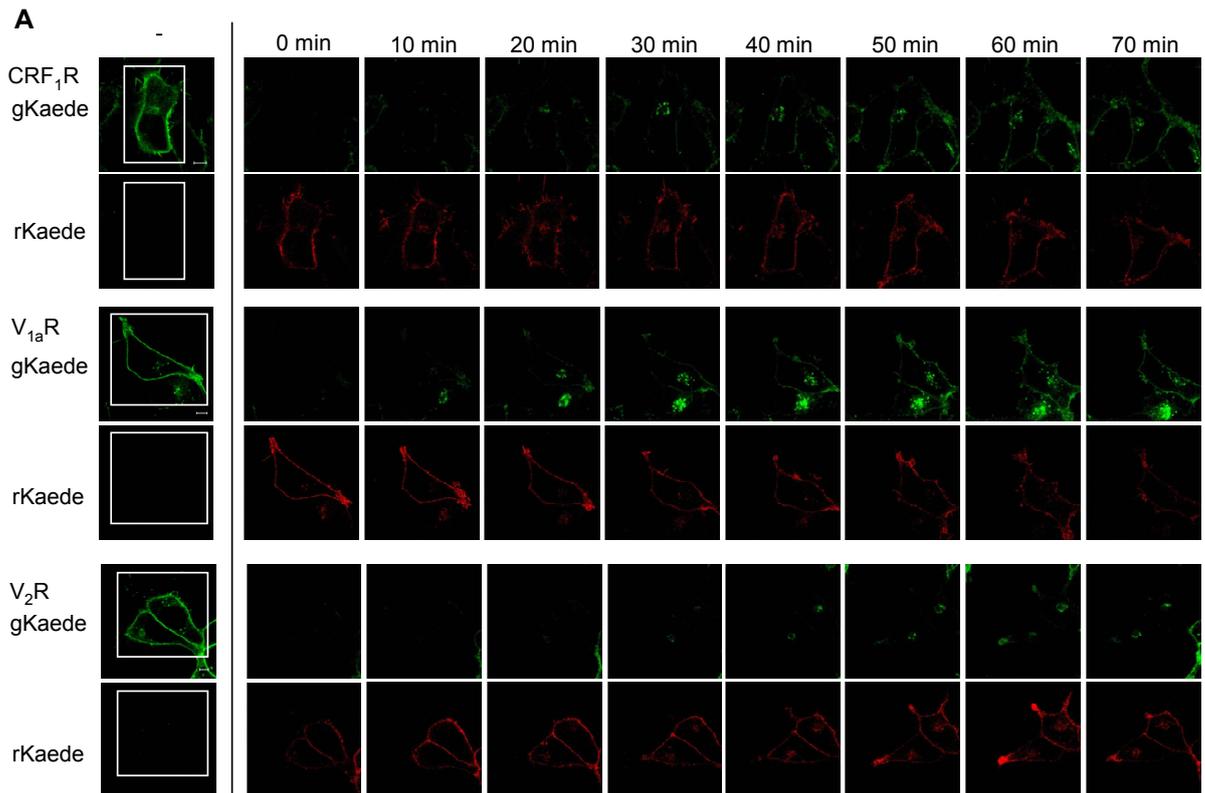


Abb. (27) Mikroskopische Untersuchungen der Biosynthese- und Transportgeschwindigkeit neusynthetisierter Rezeptoren. (A) Lebende HEK-293-Zellen, die die Kaede-fusionierten Rezeptoren CRF₁R, V_{1a}R und V₂R stabil exprimierten, wurden mit einem UV-Laser (364 nm) bestrahlt und die gKaede-Fluoreszenz der Rezeptoren vollständig in rKaede umgewandelt. Anschließend wurde eine Zeitserie über 70 Minuten aufgenommen (alle zehn Minuten ein Bild) und das erneute Auftreten der gKaede-Fluoreszenz mit Hilfe des LSM-Programms detektiert (Größenstandard = 5 µm). **(B)** Quantifizierung der Zunahme der gKaede-Fluoreszenzen aus (A). Die Intensitätswerte wurden auf den Wert der gKaede-Fluoreszenz vor UV-Bestrahlung normiert und gemittelt (± SD, CRF₁R N = 4, V_{1a}R N = 5 und V₂R N = 4). Die normierten Messpunkte wurden einer linearen Regression unterzogen und die Anstiege der Geraden ermittelt.

Die erhaltenen Resultate belegen, dass die Kaede-Technik geeignet ist, Biosynthese- und Transportgeschwindigkeiten von GPCR zu bestimmen. Zukünftig sollte es mit dieser Technik auch möglich sein Halbwertszeiten von Rezeptoren zu bestimmen.

5 Diskussion

5.1 Mögliche Bedeutung des CRF₁R-Recyclings

In dieser Arbeit wurden zur Untersuchung des Rezeptorrecyclings erstmals Kaede-Fusionsproteine genutzt. Mit dem photokonvertierbaren Fluoreszenzprotein Kaede war es möglich teilweise überlappende Transportmechanismen, wie den sekretorischen Transport und den Recyclingweg, zu differenzieren. Im Recyclingversuch wurden die Kaede-fusionierten Rezeptoren CRF₁R, V_{1a}R und V₂R zunächst internalisiert und photokonvertiert. Anschließend wurde der Transport der photokonvertierten Rezeptoren beobachtet. Der V_{1a}R und der V₂R dienen als Kontrollen für recycelnde bzw. degradierte Rezeptoren [104, 133, 134]. Für den CRF₁R konnte mit Hilfe des Kaede-basierten Versuchs erstmals gezeigt werden, dass dieser Rezeptor zur Plasmamembran recycelt (Abb. 21). Das Ergebnis wurde mit durchflusscytometrischen und biochemischen Versuchen bestätigt (Abb. 22 und 23). Das Recycling des CRF₁R wirft die Frage nach der physiologischen Bedeutung dieses Prozesses auf.

Der CRF₁R ist an der Regulation der neuroendokrinen Stressachse beteiligt. Durch Stimulation des CRF₁R mit seinem natürlichen Liganden CRF wird das Stresshormon ACTH ausgeschüttet, das zur Cortisol-Freisetzung in der Nebennierenrinde beiträgt. Die Empfindlichkeit der Zellen für CRF wird unter anderem durch die Änderung der Anzahl plasmamembranständiger CRF₁R reguliert [153]. Im Anschluss an die Aktivierung des CRF₁R werden die Rezeptoren desensitisiert und internalisiert. Um eine Adaption an Stresssituationen zu ermöglichen, wird die Empfindlichkeit der Zellen gegenüber CRF wieder hergestellt, indem die CRF₁R-Zahl in der Plasmamembran erhöht wird. Zum einen kann dies durch Neusynthese erreicht werden, zum anderen könnte aber auch das Recycling der Rezeptoren zur Resensitisierung beitragen. Hervorzuheben ist, dass das Recycling eine deutlich schnellere Resensitisierung ermöglichen würde. Die Intensität der ACTH-Ausschüttung ist weitgehend unabhängig von der Rezeptorzahl [153]. Das bedeutet, dass schon wenige Rezeptoren ausreichen, um ein maximales ACTH-Signal zu erzielen. Entscheidend für die schnelle Adaption könnte also nicht die Menge der Rezeptoren, sondern die Geschwindigkeit der Resensitisierung sein. Hier wäre der schnellere Recyclingprozess von Vorteil. Ob das CRF₁R-Recycling tatsächlich eine physiologische Bedeutung im Rahmen der schnellen Resensitisierung besitzt, müsste in zukünftigen Studien geklärt werden.

Bei Störungen der Stressachse kommt es zur Ausbildung von Angststörungen, Depressionen und anderen stressassoziierten Krankheiten [78]. Zu therapeutischen Zwecken werden Substanzen gesucht, die entweder antagonistisch am CRF₁R wirken oder die die Menge der Rezeptoren in der Plasmamembran modifizieren. Somit könnte sich aus der Tatsache, dass der CRF₁R recycelt, ein neuer

Angriffspunkt zur Modifikation der Rezeptormenge in der Plasmamembran ergeben. Problematisch an potentiellen Recyclinginhibitoren wäre aber, dass diese auch den Transport anderer Rezeptoren beeinflussen würden.

5.1.1 Putative Recyclingsignale in den cytoplasmatischen Domänen des CRF₁R

Als Voraussetzung für das Recycling von Rezeptoren gelten PDZ-Bindemotive. Diese Motive liegen entweder am extremen C-Terminus oder innerhalb von Proteinen [50, 51]. Für den V_{1a}R wurde anhand einer Datenbank-basierten Sequenzanalyse ein putatives internes PDZ-Bindemotiv (T398-G-M-W-K-D-S-P-K-S-S-K409) identifiziert [51]. Auch am extremen C-Terminus des Rezeptors befindet sich ein putatives Typ-2-PDZ-Bindemotiv (P-V-S-T). Die Funktionalität der Motive wurde bisher nicht geklärt. Da der CRF₁R ebenfalls recycelt, stellte sich die Frage, ob der Rezeptor über ähnliche Motive verfügt. Eine Sequenzanalyse zeigt, dass sich im C-Terminus des Rezeptors ein putatives Typ2-PDZ-Bindemotiv (S414-T-A-V417) und in der zweiten intrazellulären Schleife ein putatives internes PDZ-Bindemotiv (T244-A-I-V-L-T-Y-S-T-D-R-L-R256) befinden. Ob diese Motive eine Rolle beim Recycling des nativen Rezeptors spielen, ist nicht klar und könnte in weiteren Studien durch gerichtete Mutagenesen der betreffenden Sequenzen untersucht werden. Mit Hilfe des Kaede-basierten Recyclingversuchs könnte festgestellt werden, ob die mutierten Rezeptoren noch in der Lage sind die Plasmamembran zu erreichen. Durch Immunpräzipitationsexperimente könnte ferner die mögliche Interaktion der mutierten Rezeptoren mit PDZ-Domänen-tragenden Proteinen untersucht werden (zum Beispiel dem *Na⁺/H⁺ exchanger regulatory factor* NHERF oder GASP) [56, 154].

5.1.2 Weitere Eigenschaften des CRF₁R-Rezeptors, die ein Recycling begünstigen könnten

Agonistenstimulierung von GPCR führt zur GRK-vermittelten Phosphorylierung der Rezeptoren. Anschließend kommt es zur Rekrutierung von β -Arrestin, zur Bindung von Clathrin, zur Sortierung der Rezeptoren in die CCP und schließlich zur Internalisierung [155, 156, 157]. Die Stabilität des entstandenen Rezeptor- β -Arrestin-Komplexes erlaubt die Klassifizierung der Rezeptoren in Klasse-A- und Klasse-B-Rezeptoren [71]. Nach Stimulation des CRF₁R konnte in mikroskopischen Experimenten eine Rekrutierung von β -Arrestin-2 zur Plasmamembran beobachtet werden (Abb. 24). Allerdings konnte anschließend keine Kolokalisation des internalisierten CRF₁R mit β -Arrestin-2 festgestellt werden, so dass man von einer transienten Rezeptor- β -Arrestin-2-Interaktion ausgehen muss (Klasse-A-Rezeptor). Es stellt sich die Frage, welche Eigenschaften des CRF₁R eine stabile Interaktion mit β -Arrestin-2 verhindern.

Es gibt für andere GPCR Hinweise, dass ein Ausbleiben der Liganden-induzierten Phosphorylierung mit einer niedrigen Affinität zu β -Arrestin-2 einhergeht. So konnte für verschiedene GPCR gezeigt werden, dass sie nicht zwingend phosphoryliert sein müssen um zu internalisieren (Chemokin-Rezeptor CXCR4, Sekretin-Rezeptor, Parathyroidhormon-Rezeptor, Lutropin-Rezeptor, δ -Opioid-

Rezeptor und μ -Opioid-Rezeptor) [158, 159, 160, 161, 162]. Alle diese Rezeptoren gehören zu den Klasse-A-Rezeptoren und sind in der Lage zu recyceln [163, 164, 165, 166, 167, 168]. Für den CRF₁R konnte gezeigt werden, dass sich die Internalisierung von Phosphorylierungsmutanten nicht von der des wildtypischen Rezeptors unterscheidet [86]. Die fehlende Phosphorylierung des Rezeptors könnte hier also auch zu einem weniger stabilen Rezeptor- β -Arrestin-Komplex führen und das Recycling ermöglichen. Es sind aber auch andere bzw. modifizierte Mechanismen denkbar. So konnte für den δ -Opioid-Rezeptor gezeigt werden, dass die fehlende Phosphorylierung nicht die Affinität von β -Arrestin zu den Rezeptoren erniedrigt und dadurch das Rezeptorrecycling ermöglicht. In diesem Fall werden die unphosphorylierten δ -Opioid-Rezeptoren degradiert und nur die phosphorylierten sind in der Lage nach erfolgter Dephosphorylierung zur Plasmamembran zu recyceln [168].

5.1.3 Mögliche Wege des CRF₁R-Recyclings

Bisher wurden drei Recyclingwege für GPCR und andere Membranproteine beschrieben. Das schnelle Recycling erfolgt direkt aus frühen Endosomen über Rab4-haltige Vesikel zur Plasmamembran [72]. Langsam recycelnde Rezeptoren erreichen hingegen MVB und werden anschließend entweder über das Trans-Golgi-Netzwerk oder *Recycling*-Endosomen zur Plasmamembran transportiert [44]. Sowohl MVB als auch das Trans-Golgi-Netzwerk sind Rab11-positive Kompartimente [73]. Es ist wahrscheinlich, dass ein Rezeptor zwar einen Hauptweg wählt, in geringem Maß aber auch in anderen Wegen gefunden werden kann [44]. Es stellt sich die Frage, welchen Recyclingweg der CRF₁R nutzt.

Mit Hilfe von Kolokalisationsstudien konnte gezeigt werden, dass der CRF₁R und der V_{1a}R nach Agonistenstimulation vorwiegend in einem Rab11-positiven Kompartiment zu finden sind (Abb. 26). Es scheint sich also bei beiden hauptsächlich um langsam recycelnde Rezeptoren zu handeln. Unklar ist, ob es sich bei dem Rab11-positiven Kompartiment um das Trans-Golgi-Netzwerk oder um *Recycling*-Endosomen handelt. Diese Frage könnte mit weiteren Kolokalisationsstudien beantwortet werden. Als Marker für das Trans-Golgi-Netzwerk würde sich das Protein Golgin-97 eignen [169]. Für die *Recycling*-Endosomen kämen der Transferrin-Rezeptor oder der *low density lipoprotein*-LDL-Rezeptor als Marker in Frage, da beide Proteine zwar recyceln, dabei aber nicht das Trans-Golgi-Netzwerk durchlaufen [44].

Es ist nicht klar, ob der CRF₁R ausschließlich aus Rab11-positiven Kompartimenten recycelt, oder ob dies auch zumindest teilweise aus frühen Endosomen geschieht. Es kann nicht ausgeschlossen werden, dass auch ein schnelles Recycling stattfindet, da es sich dabei um einen unspezifischen Prozess im Rahmen des Membranaustauschs handelt [26, 49]. Für den V_{1a}R wurde zum Beispiel beschrieben, dass er nach agonisteninduzierter Internalisierung über Rab4-haltige Vesikel schnell zur Plasmamembran recycelt [134]. Im Gegensatz zu den Ergebnissen dieser Arbeit wurde der V_{1a}R aber in der betreffenden Studie nur vereinzelt in Rab11-positiven Endosomen gefunden (Abb. 26). Daher

erscheint es auch für den V_{1a}R noch nicht vollständig klar, ob er hauptsächlich den schnellen oder den langsamen Recyclingweg nutzt. Neben der Lokalisation des CRF₁R in einem Rab11-positiven Kompartiment spricht auch die Kinetik des Rücktransports dafür, dass ein Großteil des CRF₁R langsam recycelt. Die Halbwertszeiten des CRF₁R-Recyclings wurden nicht bestimmt, jedoch wurden im Kaede-basierten Versuch erst nach ca. 20 Minuten recycelnde Rezeptoren in der Plasmamembran detektiert (nicht gezeigt). Wenn es sich also beim CRF₁R um einen vorwiegend schnell recycelnden Rezeptor ($t_{1/2} = 2$ min) handeln würde, wäre schon früher ein deutliches Plasmamembransignal zu erwarten [44]. Recyceln allerdings nur wenige Rezeptoren über diesen schnellen Mechanismus, könnten die Rezeptorsignale unterhalb der Detektionsgrenze liegen. In einer zukünftigen Studie wäre es daher wichtig, Rab4-tragende Vesikel zu isolieren und den CRF₁R und gegebenenfalls auch den V_{1a}R dort nachzuweisen.

In dieser Arbeit wurde der internalisierte V₂R kaum in Rab11-positiven Endosomen sondern hauptsächlich in Lysosomen gefunden (Abb. 26). Die lysosomale Lokalisation ist ein Indiz für die Degradation der internalisierten V₂R. In einer früheren Publikation von Innamorati *et al.* wurde dagegen postuliert, dass der V₂R vorwiegend in einem perinukleären Rab11-positiven Kompartiment zu finden ist und langsam recycelt [134]. Die Ergebnisse dieser Arbeit werden in drei weiteren Publikationen durch Abbaukinetiken, Koloalisationsstudien mit lysosomalen Markern und auch durch die proteolytische Spaltung des aktivierten Rezeptors unterstützt [96, 133, 152]. Da in der Studie von Innamorati *et al.* nicht zwischen Neusynthese und Recycling unterschieden wurde, ist in der Gesamtsicht der Daten heute davon auszugehen, dass der neusynthetisierte Rezeptor detektiert wurde, und dass hier der V₂R nicht recycelt.

5.1.4 Vollständigkeit des CRF₁R-Recyclings

Mit Hilfe der Rab11- und Lysosomen-Koloalisationsstudien konnte gezeigt werden, dass sich der internalisierte CRF₁R nicht vollständig in Rab11-positiven Kompartimenten befindet. Ein kleiner Teil der Rezeptoren ist in Lysosomen lokalisiert und scheint demzufolge auch degradiert zu werden (Abb. 26). Es ist durchaus zu erwarten, dass ein Teil der internalisierten Rezeptoren degradiert wird, um die Neusynthese auszugleichen und die Rezeptorzahl in der Plasmamembran konstant zu halten. Möglicherweise handelt es sich bei den lysosomal lokalisierten Rezeptoren um konstitutiv internalisierte Rezeptoren [170].

5.1.5 Der Einfluss der konstitutiven Internalisierung auf das Recycling des CRF₁R

Mit den in dieser Arbeit durchgeführten Methoden konnte nicht zwischen Recycling nach konstitutiver oder agonisteninduzierter Internalisierung unterschieden werden. Zu den recycelnden Rezeptoren könnten daher auch Rezeptoren beitragen, die zuvor konstitutiv internalisiert wurden. Die Mechanismen der konstitutiven und agonisteninduzierten Internalisierung können sich unterscheiden.

Beispielsweise nutzt der M3-muskarinerge Acetylcholin-Rezeptor in Abhängigkeit von seiner Aktivierung verschiedene Endocytosemechanismen: die konstitutive Internalisierung verläuft Clathrin-unabhängig und die agonisteninduzierte Clathrin-abhängig [171]. Aber nicht nur die Mechanismen der Internalisierung können sich unterscheiden, sondern auch die darauffolgende intrazelluläre Sortierung. Zum Beispiel sind beim *protease-activated*-Rezeptor Typ 1 (PAR-1) nur konstitutiv internalisierte Rezeptoren in der Lage zur Plasmamembran zu recyceln, die aktivierten Rezeptoren werden durch Thrombin gespalten und anschließend degradiert [172].

Dass im Kaede-basierten Recyclingversuch eine größere Anzahl konstitutiv internalisierter CRF₁R detektiert wurde, ist unwahrscheinlich, da sich das endosomale Kompartiment durch die agonisteninduzierte Internalisierung um ein Vielfaches vergrößerte (Abb. 20 und 21). Es ist daher davon auszugehen, dass hier vorwiegend Rezeptoren detektiert wurden, die zuvor durch den Agonisten internalisiert wurden.

Um einen Beitrag der konstitutiven Internalisierung beim Recycling des CRF₁R zu zeigen, könnten verschiedene methodische Ansätze genutzt werden. Sollten, wie im Fall des M3-muskarinergen Acetylcholin-Rezeptors, unterschiedliche Internalisierungsmechanismen vorliegen (Clathrin-abhängig und -unabhängig) könnten diese durch die Verwendung spezifischer Internalisierungsinhibitoren differenziert und die Recyclingversuche wiederholt werden [171]. Die Clathrin-vermittelte Internalisierung wäre durch Kaliumionen-Depletion oder Chlorpromazin inhibierbar. Der Clathrin-unabhängige Internalisierungsweg über Caveolae könnte durch Zugabe von Filipin, Nystatin oder Genistein unterbrochen werden [173, 174]. Bei gleichen Internalisierungsmechanismen könnte man versuchen die möglicherweise unterschiedlichen Kinetiken der konstitutiven und agonisteninduzierten Internalisierung zu nutzen, um ihren Einfluss auf das Recycling zu bestimmen. Eine geeignete Methode wäre zum Beispiel der durchflusscytometrische Recyclingversuch mit Hilfe der *FLAG*-fusionierten Rezeptoren und *FLAG*-Antikörpern aus unterschiedlichen Spezies: Zur Bestimmung des Recyclings nach konstitutiver Internalisierung müssten die Rezeptoren mit einem primären *FLAG*-Antikörper einer Spezies beladen und über mehrere Stunden inkubiert werden. Anschließend erfolgt die Entfernung der nicht-internalisierten Antikörper von der Zelloberfläche. Die nächsten Schritte entsprächen dem Standardprotokoll: Die Rezeptoren würden mit dem *FLAG*-Antikörper der anderen Spezies beladen und mit dem Agonisten inkubiert. Anschließend erfolgten erneut die Entfernung der nicht-internalisierten Antikörper und die Recyclingperiode. Nun könnten die recycelten Rezeptoren mit zwei speziesspezifischen Sekundärantikörpern mit unterschiedlichen Fluorophoren inkubiert und detektiert werden. Die erhaltenen Ergebnisse könnten Aufschluss über die Herkunft der recycelten Rezeptoren geben (konstitutiv oder agonisteninduziert internalisiert).

5.2 Anwendung des Kaede-Proteins als Fusionspartner für Transportstudien

Da das native, nicht-fusionierte Kaede-Protein tetramerisiert, ist eine Nutzung als Fusionspartner nur möglich, wenn es keine Auswirkungen auf die Eigenschaften bzw. den Transport des zu untersuchenden Proteins hat. Mit Hilfe von FCS-Messungen wurde der Frage nachgegangen, ob Kaede auch tetramerisiert, wenn es an Membranproteine fusioniert vorliegt. Hierfür wurden Kaede-Fusionen mit dem vollständigen V₂R und einer Deletionsmutante des V₂R (V₂R.Δ.Kaede) genutzt. In den Versuchen wurde keine Kreuzkorrelation für das Konstrukt V₂R.Δ.Kaede beobachtet (Abb. 25). Man konnte folgern, dass diese Deletionsmutante nicht oligomerisieren kann und Kaede demnach als Fusionsprotein für Membranproteine sehr gut geeignet ist. Es konnte auch mit anderen Methoden gezeigt werden, dass Kaede die Fusionspartner nicht beeinflusst (Agonistbindungsstudien, *Second messenger*-Bestimmungen, intrazelluläre Lokalisationsstudien). Wenn Kaede als Fusionspartner nicht oligomerisiert, stellt sich die Frage, ob FCS-Messungen und Kreuzkorrelationsanalysen dazu verwendet werden könnten, die Assoziation der eigentlichen Zielproteine zu untersuchen. Beispielsweise sollte bei dimerisierenden GPCR eine Kreuzkorrelation detektierbar sein. Beim vollständigen V₂R konnte in dieser Arbeit aber keine Kreuzkorrelation gezeigt werden, obwohl beschrieben wurde, dass er zu einem geringen Teil homodimerisiert [149]. Es stellt sich die Frage warum diese Homodimerisierung nicht gemessen werden konnte. Mit *fluorescence resonance energy transfer*- und *fluorescence lifetime imaging*-Messungen wurde ermittelt, dass nur ca. 10 % der V₂R in der Plasmamembran dimerisieren (Anke Teichmann und Burkhard Wiesner, AG Zell-Imaging, FMP, Berlin, persönliche Mitteilung). Die FCS-Messungen wurden an partiell photokonvertierten Rezeptoren durchgeführt. Statistisch betrachtet fluoresziert nur die eine Hälfte der Rezeptordimere heterochrom (gKaede und rKaede) und nur bei dieser (also bei 5 % der gesamten Rezeptoren) kann theoretisch eine Kreuzkorrelation gemessen werden. Wahrscheinlich ist im Fall des V₂R die Menge an Rezeptoren zu gering, um einen Einfluss auf die Ergebnisse der Korrelationsanalyse zu haben. Kaede-Fusionen sollten zwar prinzipiell geeignet sein, um zum Beispiel die Dimerisierung der Fusionspartner mit Hilfe einer Kreuzkorrelationsanalyse zu belegen. Im speziellen Fall des V₂R könnte die Zahl der dimerisierenden Moleküle aber nicht ausgereicht haben.

Durch die Ergebnisse der FCS-Messungen konnte ausgeschlossen werden, dass an ein Membranprotein fusioniertes Kaede in der Plasmamembran zur Aggregatbildung führt. Es ist jedoch nicht klar, ob dies auch für alle Transportintermediate des Fusionsproteins gilt, die sich noch im sekretorischen Weg befinden. In den mikroskopischen Studien wurde eine vergleichsweise niedrige Expression der Kaede-fusionierten Rezeptoren beobachtet, die sich auch in einem erniedrigten B_{max}-Wert niederschlägt (Abb. 18). Dies könnte durchaus mit einer zumindest partiellen Aggregatbildung innerhalb des sekretorischen Wegs erklärt werden. So könnten sich im ER Aggregate bilden, die aber vom Qualitätskontrollsystem erkannt und über das ER-assoziierte Degradationssystem abgebaut werden (Abb. 12). Eine sehr hohe Expression könnte zu einer hohen Dichte der Kaede-

Fusionsproteine führen und so eine Aggregation begünstigen. So konnte eine gewisse Konzentrationsabhängigkeit der Tetramerisierung bereits bei mEosFP, einem künstlich monomerisierten Fluoreszenzprotein aus der Steinkoralle *Discosoma sp.*, gezeigt werden. Bei geringen Konzentrationen im nM-Bereich liegt das gereinigte Protein als Monomer vor, im μM -Bereich beginnt dagegen die Dimerisierung der Proteine [119]. Demnach könnte die geringe Expression der integralen Membranproteine bereits in der ER-Membran eine Assoziation der Kaede-Monomere erschweren.

5.2.1 Experimentelle Monomerisierung des Kaede-Proteins

Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen zwar, dass Kaede als Fusionspartner für Membranproteine geeignet ist. Aufgrund der Tetramerisierung des cytosolischen Kaede ist es aber unwahrscheinlich, dass sich das Protein gleichermaßen für die Fusion mit löslichen Proteinen eignet. Es wäre daher wünschenswert monomeres Kaede herzustellen. Die in dieser Arbeit durchgeführte Monomerisierung des Kaede-Proteins führte leider nicht zum Erfolg. Zwar konnten die Interaktionsflächen verändert und damit die Tetramerbildung verhindert werden, dies führte jedoch zur Fehlfaltung des Proteins und zum Verlust der Fluoreszenz.

Ein ähnlicher Effekt wurde bereits bei der Monomerisierung des tetrameren Fluoreszenzproteins DsRed beobachtet, bei dem der Austausch der 11 interagierenden Aminosäuren zur Fehlfaltung führte. Erst durch 39 zusätzliche Mutationen konnte die Struktur stabilisiert und die Fluoreszenz wieder hergestellt werden [118]. Das erste photokonvertierbare Fluoreszenzprotein, bei dem die Monomerisierung gelang, war EosFP [120]. Allerdings ist hier die Faltung des monomeren Proteins stark temperaturabhängig und verläuft nur bei 30 °C fehlerfrei. Diese Temperatur ist zur Untersuchung des Proteintransports in lebenden Zellen ungeeignet. In zukünftigen Studien sollte daher noch einmal versucht werden, Kaede durch erweiterte Mutagenesestrategien zu monomerisieren.

5.2.2 Vorteile des Kaede-Proteins für Proteintransportstudien

5.2.2.1 Die Stabilität von gKaede und rKaede

Ein entscheidender Nachteil photokonvertierbarer Proteine könnte sein, dass sich die Eigenschaften des Markerproteins nach dem Umschalten ändern. Eine veränderte Halbwertszeit der Proteine oder eine veränderte Photostabilität könnten zu falschen Schlussfolgerungen über das Verhalten des jeweiligen Fusionspartners führen.

Die Photokonvertierung des Kaede-Proteins führt zum Bruch des Proteinrückgrates. Das hat offenbar keinen Einfluss auf die Gesamtstruktur des Proteins, könnte sich aber auf die Stabilität des photokonvertierten Kaedes auswirken. Mit *in vitro*- und *in vivo*-Vergleichen der Stabilität von gKaede und rKaede konnte belegt werden, dass beide Proteine gleichermaßen stabil sind (Abb. 13 und 14). Somit können mit Kaede über mehrere Stunden Transportstudien durchgeführt werden.

5.2.2.2 Vorteile des Kaede-basierten Recyclingversuchs

Im Kaede-basierten Recyclingversuch werden die membranständigen Kaede-fusionierten GPCR internalisiert, photokonvertiert und recycelt (Abb. 19). Aufgrund der Photokonvertierung ist es möglich, recycelnde Rezeptoren von neusynthetisierten zu unterscheiden. Verglichen mit anderen Recyclingversuchen ist dies ein entscheidender Vorteil.

Die Rezeptorzahl in der Plasmamembran setzt sich aus der Summe von recycelnden und neusynthetisierten Rezeptoren zusammen. In der Vergangenheit wurde Recycling allerdings häufig nur als erneute Zunahme der plasmamembranständigen Rezeptoren bestimmt [65, 134]. Welchen Einfluss die Neusynthese auf die Zunahme der Rezeptoren in der Plasmamembran haben kann, konnte in Abb. 27 gezeigt werden. Hier wurde die Transportgeschwindigkeit von Rezeptoren im sekretorischen Weg bestimmt, indem der Anstieg der gKaede-Fluoreszenz in der Plasmamembran nach vollständiger Photokonvertierung gemessen wurde. Es zeigte sich, dass sich das Plasmamembransignal schon innerhalb kurzer Zeit wieder durch Neusynthese erhöht.

Um in Recyclingversuchen recycelnde von neusynthetisierten Rezeptoren zu trennen, wurde in einigen früheren Fällen der Biosyntheseinhibitor Cycloheximid genutzt. Cycloheximid inhibiert die Neusynthese, nicht aber den Transport der Rezeptoren, die sich bereits im sekretorischen Weg befinden [32, 106]. Letztere können aber auch als recycelnde Rezeptoren fehlinterpretiert werden. Ferner kann die Cycloheximidbehandlung nicht beliebig ausgedehnt werden, zum Beispiel bis sich aufgrund des sekretorischen Transports keine Rezeptoren mehr in ER und Golgi-Apparat befinden. Cycloheximid inhibiert die Neusynthese aller Proteine und lange Inkubationzeiten führen immer zum Verlust von Proteinen, die für Transportvorgänge bzw. das Überleben der Zelle notwendig sind.

Ein weiterer methodischer Ansatz zur Untersuchung des Rezeptorrecyclings ist die Nutzung reversibel bindender Antikörper gegen eine extrazelluläre Domäne. Die Messung kann mit Durchfluscytometrie oder über andere immunologische Nachweisverfahren (zum Beispiel *Enzyme-linked Immunosorbent Assay*, ELISA) erfolgen (siehe durchfluscytometrische Untersuchung des Rezeptorrecyclings in dieser Arbeit). Auch wenn diese Technik einen methodischen Fortschritt gegenüber früheren Recyclingversuchen darstellt, bleibt der Nachteil, dass das Recycling nicht unmittelbar in Echtzeit beobachtet werden kann.

Mit Hilfe der Kaede-Technologie kann man also nicht nur die Kinetik des Recyclings, sondern auch das Zielkompartiment differenziert analysieren. Die Ergebnisse des Kaede-basierten Recyclingversuchs zeigen beispielsweise, dass das Recycling gleichmäßig über die gesamte Plasmamembran verläuft und nicht etwa auf einen engen Bereich der Plasmamembran begrenzt ist

(Abb. 21). Ein Nachteil der Methode ist, dass es sich um eine Einzelzellmethode handelt. Um Recycling an vielen Zellen zu untersuchen sind die biochemischen oder durchflusscytometrischen Versuche besser geeignet. Ein weiterer Nachteil der Kaede-basierten Untersuchungen ist, dass der apparative Aufwand im Vergleich zu dem konventioneller Recycling-Analysen sehr hoch ist.

5.3 Zukünftige Anwendungen des Kaede-Systems

Mit Hilfe photokonvertierbarer Fluoreszenzproteine wie Kaede können neue Fragestellungen gelöst bzw. Ergebnisse ergänzt oder alte Methoden ersetzt werden. Gerade zur Untersuchung überlappender Transportwege bieten sich photokonvertierbare Fluoreszenzproteine an. Anwendungsbeispiele wären zum Beispiel auch die Untersuchung der Halbwertszeiten von Proteinen und die Analyse der Proteinsortierung in polarisierten Zellen.

So stellte sich zum Beispiel in Epithelzellen häufig die Frage, ob der apikale Transport über die basolaterale Membran verläuft. Mit Hilfe der Kaede-Technik können Proteine, die sich in der basolateralen Membran befinden, photokonvertiert und anschließend zeitabhängig lokalisiert werden. Außerdem ist es möglich zu untersuchen, ob zum Beispiel apikale und basolaterale Membranproteine in die gleichen Kompartimente internalisieren bzw. über die gleichen Kompartimente recyceln. Ein weiteres Anwendungsbeispiel ist die Untersuchung von Kinetiken, wie die in dieser Arbeit durchgeführte Analyse der Transportgeschwindigkeiten von GPCR (Abb. 27). Bisher werden zu diesem Zweck häufig *pulse-chase*-Experimente durchgeführt [175]. Sie besitzen den entscheidenden Nachteil gegenüber den Kaede-basierten Experimenten, dass die intrazelluläre Lokalisation der Proteine nicht beachtet wird.

Zusammengefasst könnten die in dieser Arbeit erhaltenen Ergebnisse dazu beitragen, dass die Kaede-Technologie in Zukunft eine breitere Anwendung erfährt.

6 Literaturverzeichnis

- [1] J. Bockaert, J. P. Pin: Molecular tinkering of G-protein coupled receptors: an evolutionary success. *EMBO J* 18:1723-1729, 1999
- [2] S. M. Ford, S. Jupe and J. Holbrook: Bioinformatics and type II G-protein-coupled receptors. *Biochemical Society Transactions* 30:473–479, 2002
- [3] S. M. Ford, T. I. Bonner, R. R. Neubig, E. M. Rosser, J.-P. Pin, A. P. Davenport, M. Spedding and A. J. Harmar: International Union of Pharmacology. XLVI. G Protein-Coupled Receptor List. *Pharmacol Rev* 57:279–288, 2005
- [4] W. Wu and J. Suttie: N-glycosylation contributes to the intracellular stability of prothrombin precursors in the endoplasmic reticulum. *Thromb Res* 96:91–98, 1999
- [5] R. G. Spiro: Protein glycosylation: nature, distribution, enzymatic formation, and disease implications of glycopeptide bonds. *Glycobiology* 12(4):43R-56R, 2002
- [6] B. Tsai *et al.*: Retro-translocation of proteins from the endoplasmic reticulum into the cytosol. *Nat Rev Mol Cell Biol* 3:246–255, 2002
- [7] L. Ellgaard and A. Helenius: Quality control in the endoplasmic reticulum. *Nat Rev Mol Cell Biol* 4:181–191, 2003
- [8] H. E. Hamm: The Many Faces of G Protein Signaling. *J Biol Chem* 273:669-672, 1998
- [9] E. H. Hurowitz, J. M. Melnyk, Y. J. Chen, H. Kouros-Mehr, M. I. Simon, H. Shizuya: Genomic characterization of the human heterotrimeric G protein alpha, beta, and gamma subunit genes. *DNA Res* 7(2):111-20, 2000
- [10] M. P. Strathmann, M. I. Simon: G alpha 12 and G alpha 13 subunits define a fourth class of G protein alpha subunits. *Proc Natl Acad Sci USA* 88(13):5582-6, 1991
- [11] T. D. Pollard, W. C. Earnshaw: Cell Biology. *Saunders USA*, 2002
- [12] H. Kurose: Galpha12 and Galpha13 as key regulatory mediator in signal transduction. *Life Sci* 74(2-3):155-61, 2003
- [13] G. M. Bokoch: The presence of free G protein beta/gamma subunits in human neutrophils results in suppression of adenylate cyclase activity. *J Biol Chem* 262(2):589-94, 1987
- [14] L. M. Blayney, P. W. Gapper, A. C. Newby: Phospholipase C isoforms in vascular smooth muscle and their regulation by G-proteins. *Br J Pharmacol* 118(4):1003-11, 1996
- [15] S. S. G. Ferguson: Evolving concepts in G protein-coupled receptor endocytosis: The role in receptor-desensitisation and signaling. *Pharmacological Reviews* 53:1-24, 2001
- [16] N. J. Freedman, S. B. Liggett, D. E. Drachman, G. Pei, M. G. Caron, R. J. Lefkowitz: Phosphorylation and desensitization of the human β -1-adrenergic receptor: Involvement of G protein-coupled receptor kinases and cAMP-dependent protein kinase. *J Biol Chem* 270:17953-17961, 1995
- [17] M. J. Shapiro, S. R. Coughlin: Separate signals for agonist-independent and agonist-triggered trafficking of protease-activated receptor 1. *J Biol Chem* 273:29009-29014, 1998

- [18] S. D. Connor, S. L. Schmid: Regulated portals of entry into the cell. *Nature* 422:37-44, 2003
- [19] R. Oakley, S. Laporte, J. Holt, L. Barak, M. Caron: Molecular determinants underlying the formation of stable intracellular G protein-coupled receptor-beta-arrestin complexes after receptor endocytosis. *J Biol Chem* 276:19452-19460, 2001
- [20] D.A. Groarke, S. Wilson, C. Krasel, G. Milligan: Visualization of agonist induced association and trafficking of green fluorescent protein-tagged forms of both b-arrestin-1 and the thyrotropin releasing hormone receptor-1. *J Biol Chem* 274:23263-23269, 1999
- [21] X. Kunhong, S. K. Shenoy, K. Nobles, and R. J. Lefkowitz: Activation-dependent Conformational Changes in beta-Arrestin 2. *J Biol Chem* 279:55744-55753, 2004
- [22] S. Laporte, R. Oakley, J. Zhang, J. Holt, S. Ferguson, M. Caron, L. Barak: The beta2-adrenergic receptor/beta-arrestin complex recruits the clathrin adaptor AP-2 during endocytosis. *PNAS* 6:3712-3717, 1999
- [23] M. Hanspal, E. Luna, D. Branton: The association of clathrin fragments with coated vesicle membranes. *J Biol Chem* 259:11075-11082, 1984
- [24] S. A. Laporte, R. H. Oakley, J. A. Holt, L. S. Barak, M. G. Caron: The interaction of beta-arrestin with the AP-2 adaptor is required for the clustering of beta 2-adrenergic receptor into clathrin-coated pits. *J Biol Chem* 275(30):23120-6 2000
- [25] A. M. Gabilondo, J. Hegler, C. Krasel, V. Boivin-Jahns, L. Hein, M. J. Lohse: A dileucine motif in the C terminus of the beta2-adrenergic receptor is involved in receptor internalization. *Proc Natl Acad Sci USA* 94(23):12285-90, 1997
- [26] A. Marchese, M. M. Paing, B. R. S. Temple, and J. Trejo: G Protein-Coupled Receptor Sorting to Endosomes and Lysosomes. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 48:601-29, 2008
- [27] D. Diviani, A. L. Lattion, L. Abuin, O. Staub, S. Cotecchia: The adaptor complex 2 directly interacts with the $\alpha 1b$ -adrenergic receptor and plays a role in receptor endocytosis. *J Biol Chem* 278:19331-19340, 2003
- [28] J. S. Bonifacino, L. M. Traub: Signals for sorting of transmembrane proteins to endosomes and lysosomes. *Annu Rev Biochem* 72:395-447, 2003
- [29] J. L. Parent, P. Lebreque, M. D. Rochdi, J. L. Benovic: Role of the differentially spliced carboxyl terminus in thromboxane A2 receptor trafficking. *J. Biol. Chem.* 276:7079-85, 2001
- [30] S. J. Royle, O. S. Qureshi, L. K. Bobanovic, P. R. Evans, D. Owen, R. D. Murrell-Lagnado: Non-canonical YXXG endocytic motifs: recognition by AP2 and preferential utilization in P2 \times 4 receptors. *J Cell Sci* 118:3073-80, 2005
- [31] M. M. Paing, A. B. Stutts, T. A. Kohout, R. J. Lefkowitz, J. Trejo: β -arrestins regulate protease-activated receptor-1 desensitization but not internalization or down-regulation. *J Biol Chem* 277:1292-300, 2002
- [32] L. Hein, K. Ishii, S. R. Coughlin, B. K. Kobilka: Intracellular targeting and trafficking of thrombin receptors: a novel mechanism for resensitization of a G protein-coupled receptor. *J Biol Chem* 269:27719-26, 1994

- [33] A. C. Hanyaloglu, M. von Zastrow: A novel sorting sequence in the β 2-adrenergic receptor switches recycling from default to the Hrs-dependent mechanism. *J Biol Chem* 282:3095–104, 2007
- [34] V. V. Gurevich, E. V. Gurevich: The structural basis of arrestin-mediated regulation of G protein-coupled receptors. *Pharmacol Ther* 110:465–502, 2006
- [35] G. Mace, M. Miaczynska, M. Zerial, A. R. Nebreda: Phosphorylation of EEA1 by p38 MAP kinase regulates μ opioid receptor endocytosis. *EMBO J* 24:3235–46, 2005
- [36] S. Christoforidis, H. McBride, R. Burgoyne, M. Zerial: The Rab5 effector EEA1 is a core component of endosome docking. *Nature* 397:621–25, 1999
- [37] P. J. O'Brien, M. Zatz: Acylation of bovine rhodopsin by [3H]palmitic acid. *J Biol Chem* 259:5054–57, 1984
- [38] K. Palczewski, T. Kumasaka, T. Hori, C. A. Behnke, H. Motoshima: Crystal structure of rhodopsin: A G protein-coupled receptor. *Science* 289:739–45, 2000
- [39] R. Qanbar and M. Bouvier: Role of palmitoylation/depalmitoylation reactions in G protein-coupled receptor function. *Pharmacol Ther* 97:1–33, 2003
- [40] A. Sorkin, L. Teslenko, & N. Nikolsky: The endocytosis of epidermal growth factor in A431 cells: a pH of microenvironment and the dynamics of receptor complexes dissociation. *Exp Cell Res* 175:192–205, 1988
- [41] M. Mari, M.V. Bujny, D. Zeuschner, W.J.C. Geerts, J. Griffith, C.M. Petersen, P.J. Cullen, J. Klumperman, H.J. Geuze: SNX1 defines an early endosomal recycling exit for sortilin and mannose 6-phosphate receptors. *Traffic* 9:380–393, 2008
- [42] H. de Wit, Y. Lichtenstein, H. J. Geuze, R. B. Kelly, P. van der Sluijs, J. Klumperman: Synaptic vesicles form by budding from tubular extensions of sorting endosomes in PC12 cells. *Mol Biol Cell* 10(12):4163-76, 1999
- [43] R. C. Piper and D. J. Katzmann: Biogenesis and Function of Multivesicular Bodies. *Annu Rev Cell Dev Biol* 23:519–47, 2007
- [44] F. R. Maxfield and T. E. McGraw: Endocytic recycling. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 5:121-132, 2004
- [45] P. Uchil and W. Mothes: Viral entry: a detour through multivesicular bodies. *Nature Cell Biology* 7:641–642, 2005
- [46] D. R. Sheff, E. A. Daro, M. Hull, I. Mellman: The receptor recycling pathway contains two distinct populations of early endosomes with different sorting functions. *J Biol Chem* 274:123-139, 1999
- [47] P. G. Woodman, C. E. Futter: Multivesicular bodies: co-ordinated progression to maturity. *Curr Opin Cell Biol* 20(4):408-14, 2008
- [48] Q. Yan, W. Sun, P. Kujala, Y. Lotfi, T. A. Vida and A. J. Bean: CART: an Hrs/actinin-4/BERP/myosin V protein complex required for efficient receptor recycling. *Mol Biol Cell* 16:2470– 2482, 2005

- [49] B. T. Pan, R. M. Johnstone: Fate of the transferrin receptor during maturation of sheep reticulocytes in vitro: selective externalization of the receptor. *Cell* 33:967–78, 1983
- [50] B. J. Hillier, K. S. Christopherson, K. E. Prehoda, D. S. Brecht, W. A. Lim: Unexpected modes of PDZ domain scaffolding revealed by structure of n-NOS-syntrophin complex. *Science* 284:812–15, 1999
- [51] J. D. Paasche, T. Attramadal, K. Kristiansen, M. P. Oksvold, H. K. Johansen: Subtype-specific sorting of the ETA endothelin receptor by a novel endocytic recycling signal for G protein-coupled receptors. *Mol Pharm* 67:1581–90, 2005
- [52] M. A. Puthenveedu, M. von Zastrow: Cargo regulates clathrin-coated pit dynamics. *Cell* 127:113–24, 2006
- [53] Z. Xia, J. A. Gray, B. A. Compton-Toth, B. L. Roth: A direct interaction of PSD-95 with 5-HT_{2A} serotonin receptors regulates receptor trafficking and signal transduction. *J Biol Chem* 278:21901–8, 2003
- [54] M. Babst: A protein's final ESCRT. *Traffic* 6:2–9, 2005
- [55] A. Hershko, A. Ciechanover: The ubiquitin system. *Annu Rev Biochem* 67:425–79, 1998
- [56] J. L. Whistler, J. Enquist, A. Marley, J. Fong, F. Gladher: Modulation of postendocytic sorting of G protein-coupled receptors. *Science* 297:615–20, 2002
- [57] J. Carlton, M. Bujny, B. J. Peter, V. M. J. Oorschot, A. Rutherford: Sorting nexin-1 mediates tubular endosome-to-TGN transport through coincidence sensing of high curvature membranes and 3-phosphoinositides. *Curr Biol* 14:1791–800, 2004
- [58] D. Höller, I. Dikic: Receptor endocytosis via ubiquitin-dependent and -independent pathways. *Biochem Pharmacol* 67:1013-1017, 2004
- [59] B. L. Wolfe, A. Marchese, J. Trejo: Ubiquitination differentially regulates clathrin-dependent internalization of protease-activated receptor-1. *J Cell Biol* 177:905–16, 2007
- [60] C. Raiborg, K. G. Bache, D. J. Gillooly, I. H. Madshus, E. Stang, H. Stenmark: Hrs sorts ubiquitinated proteins into clathrin-coated microdomains of early endosomes. *Nat Cell Biol* 4:394–398, 2002
- [61] J. H. Hurley, S. D. Emr: The Escrt complexes: Structure and mechanism of a membrane trafficking network. *Annu Rev Biophys Biomol Struct* 35:277–298, 2006
- [62] R. L. Williams, S. Urbe: The emerging shape of the ESCRT machinery. *Nat Rev Mol Cell Biol* 8:355–368, 2007
- [63] D. P. Nickerson, M. R. Russell and G. Odorizzi: A concentric circle model of multivesicular body cargo sorting. *EMBO Rep* 8:644–650, 2007
- [64] S. K. Shenoy, R. Lefkowitz: Multifaced roles of beta-arrestins in the regulation of seven-membrane-spanning receptor trafficking and signalling. *Biochem J* 375, 503-515, 2003
- [65] R. H. Oakley, S. A. Laporte, J. A. Holt, L. S. Barak, M. G. Caron: Association of beta-arrestin with G protein-coupled receptors during clathrin-mediated endocytosis dictates the profile of receptor resensitization. *J Biol Chem* 274:32248–32257, 1999

- [66] S. Terrillon, M. Bouvier: Receptor activity-independent recruitment of beta-arrestin2 reveals specific signalling modes. *EMBO J* 23:3950-3961, 2004
- [67] N. J. Pyne, C. Waters, N. A. Moughal, B. S. Sambhi, S. Pyne: Receptor tyrosine kinase-GPCR signal complexes. *Biochem Soc Trans* 31(6):1220-5, 2003
- [68] A. Tohgo, E. W. Choy, D. Getsy-Palmer, K. L. Pierce, S. A. Laporte: The stability of the G protein-coupled receptor- β -arrestin interaction determines the mechanism and functional consequence of ERK activation. *J Biol Chem* 278:6258-67, 2003
- [69] S. K. Shenoy, R. J. Lefkowitz: Trafficking patterns of beta-arrestin and G protein-coupled receptors determined by the kinetics of beta-arrestin deubiquitination. *J Biol Chem* 278:14498-14506, 2003
- [70] S. Terrillon, C. Barberis, M. Bouvier: Heterodimerization of V1a and V2 vasopressin receptors determines the interaction with beta-arrestin and their trafficking patterns. *Proc Natl Acad Sci USA* 101(6):1548-53, 2004
- [71] T. Soldati, C. Rancaño, H. Geissler, S. R. Pfeffer: Rab7 and Rab9 are recruited onto late endosomes by biochemically distinguishable processes. *J Biol Chem* 270(43):25541-8, 1995
- [72] B. Sonnichsen, S. De Renzis, E. Nielsen, J. Rietdorf, M. Zerial: Distinct membrane domains on endosomes in the recycling pathway visualized by multicolor imaging of Rab4, Rab5, and Rab11. *J Cell Biol* 149:901-914, 2000
- [73] H. Stenmark, V. M. Olkkonen: The Rab GTPase family. *Genome Biol* 2(5), 2001
- [74] R. L. Hauger, D. E. Grigoriadis, M. F. Dallman, P. M. Plotsky, W. W. Vale, F. M. Dautzenberg: International Union of Pharmacology. XXXVI. Current status of the nomenclature for receptors for corticotropin-releasing factor and their ligands. *Pharmacol Rev* 55(1):21-6, 2003
- [75] J. H. Broadbear, G. Winger, J. E. Rivier, K. C. Rice, J. H. Woods: Corticotropin-releasing hormone antagonists, astressin B and antalarmin: differing profiles of activity in rhesus monkeys. *Neuropsychopharmacology* 29(6):1112-21, 2004
- [76] J. R. McCarthy, S. C. Heinrichs, D. E. Grigoriadis: Recent advances with the CRF1 receptor: design of small molecule inhibitors, receptor subtypes and clinical indications. *Curr Pharm Des* 5(5):289-315, 1999
- [77] T. Teli, D. Markovic, M. A. Levine, E. W. Hillhouse, D. K. Grammatopoulos: Regulation of corticotrophin releasing hormone (CRH) receptor type 1 $\{\alpha\}$ signalling: structural determinants for G protein-coupled receptor kinase-mediated phosphorylation and agonist-mediated desensitization. *Mol Endocrinol* (2):474-90, 2005
- [78] R. L. Hauger, V. Risbrough, O. Brauns, F. M. Dautzenberg: Corticotropin releasing factor (CRF) receptor signaling in the central nervous system: new molecular targets. *CNS Neurol Disord Drug Targets* 5(4):453-79, 2006
- [79] S. Ulisse, A. Fabbri, J. C. Tinajero, M. L. Dufau: A novel mechanism of action of corticotropin releasing factor in rat Leydig cells. *J Biol Chem* 265(4):1964-71, 1990
- [80] F. M. Dautzenberg, E. Gutknecht, I. Van der Linden, J. A. Olivares-Reyes, F. Dürrenberger, R. L. Hauger: Cell-type specific calcium signaling by corticotropin-releasing factor type 1 (CRF1) and 2a (CRF2(a)) receptors: phospholipase C-mediated responses in human embryonic kidney 293 but not SK-N-MC neuroblastoma cells. *Biochem Pharmacol* 68(9):1833-44, 2004

- [81] I. Q. Assil, A. B. Abou-Samra: N-glycosylation of CRF receptor type 1 is important for its ligand-specific interaction. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 281(5):1015-21, 2001
- [82] B. A. Hofmann, S. Sydow, O. Jahn, L. van Werven, T. Liepold, K. Eckart, J. Spiess: Functional and protein chemical characterization of the N-terminal domain of the rat corticotropin-releasing factor receptor 1. *Protein Sci* 10(10):2050-62, 2001
- [83] L. J. Qi, A. T. Leung, Y. T. Xiong, K. A. Marx and A. B. Abou-Samra: Extracellular cysteines of the corticotropin-releasing factor-receptor are critical for ligand interaction. *Biochemistry* 36:12442–12448, 1997
- [84] K. D. Holmes, A. V. Babwah, L. B. Dale, M. O. Poulter, S. S. Ferguson: Differential regulation of corticotropin releasing factor 1alpha receptor endocytosis and trafficking by beta-arrestins and Rab GTPases. *J Neurochem* 96:934–949, 2006.
- [85] K. Kageyama, K. Hanada, T. Moriyama, T. Nigawara, S. Sakihara, T. Suda: G protein-coupled receptor kinase 2 involvement in desensitization of corticotropin-releasing factor (CRF) receptor type 1 by CRF in murine corticotrophs. *Endocrinology* 147(1):441-50, 2006
- [86] T. N. Rasmussen, I. Novak, S. M. Nielsen: Internalization of the human CRF receptor 1 is independent of classical phosphorylation sites and of β -arrestin 1 recruitment. *Eur J Biochem* 271:4366–4374, 2004
- [87] S. J. Perry, S. Junger, T. A. Kohout, S. R. J. Hoare, R. S. Struthers, D. E. Grigoriadis, R. A. Maki: Distinct conformations of the corticotropin releasing factor type 1 receptor adopted following agonist and antagonist binding are differentially regulated. *J Biol Chem* 280:11560–11568, 2005
- [88] C. Serradeil-Le Gal, J. Wagnon, C. Garcia, C. Lacour, P. Guiraudou, B. Christophe, G. Villanova, D. Nisato, J. P. Maffrand, G. Le Fur : Biochemical and pharmacological properties of SR 49059, a new, potent, nonpeptide antagonist of rat and human vasopressin V1a receptors. *J Clin Invest* 92(1):224-31, 1993
- [89] C. Serradeil-Le Gal, J. Wagnon, G. Valette, G. Garcia, M. Pascal, J. P. Maffrand, G. Le Fur: Nonpeptide vasopressin receptor antagonists: development of selective and orally active V1a, V2 and V1b receptor ligands. *Prog Brain Res* 139:197-210, 2002
- [90] G. Löffler, P. E. Petrides : Biochemie & Pathobiochemie, 7. Auflage; *Springer-Verlag*, 2003
- [91] M. Musashi, S. Ota, N. Shiroshita: The role of protein kinase C isoforms in cell proliferation and apoptosis. *Int J Hematol* 72(1):12-9, 2000
- [92] K. Agarwal: Modulation of vasopressin actions on human platelets by plasma adenosine and theophylline: gender differences. *J Cardiovasc Pharmacol* 21(6):1012-8, 1993
- [93] A. Oksche, W. Rosenthal: Molekulare Grundlagen des Diabetes insipidus renalis und centralis. Endokrinopathien, *Springer Verlag*, 2001
- [94] E. Klussmann, K. Maric, W. Rosenthal: The mechanisms of aquaporin control in the renal collecting duct. *Physiol Biochem Pharmacol* 141:33-95, 2000
- [95] E. Klussmann, G. Tamma, D. Lorenz, B. Wiesner, K. Maric, F. Hofmann, K. Aktories, G. Valenti, W. Rosenthal: inhibitory role of Rho in the vasopressin-mediated translocation of aquaporin-2 into cell membranes of renal principal cells. *J Biol Chem* 276(23):20451-7, 2001

- [96] E. Kojro, F. Fahrenholz: Ligand-induced cleavage of the V2 vasopressin receptor by a plasma membrane metalloproteinase. *J Biol Chem* 270(12):6476-81, 1995
- [97] S. R. Hawtin, A. R. Davies, G. Matthews, M. Wheatley: Identification of the glycosylation sites utilized on the V1a vasopressin receptor and assessment of their role in receptor signalling and expression. *Biochem J* 357(1):73-81, 2001
- [98] G. Innamorati, H. Sadeghi, M. Birnbaumer: A fully active nonglycosylated V2 vasopressin receptor. *Mol Pharmacol* 50(3):467-73, 1996
- [99] H. M. Sadeghi, M. Birnbaumer: O-glycosylation of the V2 vasopressin receptor. *Glycobiology* 9:731-737, 1999
- [100] R. Schülein, U. Liebenhoff, H. Müller, M. Birnbaumer, W. Rosenthal: Properties of the human arginine vasopressin V2 receptor after site-directed mutagenesis of its putative palmitoylation site. *Biochem J* 313(2):611-6, 1996
- [101] S. R. Hawtin, A. B. Tobin, S. Patel, M. Wheatley: Palmitoylation of the vasopressin V1a receptor reveals different conformational requirements for signaling, agonist-induced receptor phosphorylation, and sequestration. *J Biol Chem* 276(41):38139-46, 2001
- [102] M. Birnbaumer, S. Gilbert, W. Rosenthal: An extracellular congenital nephrogenic diabetes insipidus mutation of the vasopressin receptor reduces cell surface expression, affinity for ligand, and coupling to the Gs/adenylyl cyclase system. *Mol Endocrinol* 8(7):886-94, 1994
- [103] M. Thibonnier, C. L. Plesnicher, K. Berrada and L. Berti-Mattera: Role of the human V1 vasopressin receptor COOH terminus in internalization and mitogenic signal transduction. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 281:81-92, 2001
- [104] G. Innamorati, H. Sadeghi, M. Birnbaumer: Transient phosphorylation of the V1a vasopressin receptor. *J Biol Chem* 273(12):7155-61, 1998
- [105] L. Preisser, N. Ancellin, L. Michaelis, C. Creminon, A. Morel, B. Corman: Role of the carboxyl-terminal region, di-leucine motif and cysteine residues in signalling and internalization of vasopressin V1a receptor. *FEBS Lett* 460(2):303-8, 1999
- [106] D. Bowen-Pidgeon, G. Innamorati, H. M. Sadeghi, M. Birnbaumer: Arrestin effects on internalization of vasopressin receptors. *Mol Pharmacol* 59(6):1395-401, 2001
- [107] R. Pfeiffer, J. Kirsch, F. Fahrenholz: Agonist and antagonist-dependent internalization of the human vasopressin V2 receptor. *Exp Cell Res* 244(1):327-39, 1998
- [108] R. Bouley, T. X. Sun, M. Chenard, M. McLaughlin, M. McKee, H. Y. Lin, D. Brown, D. A. Ausiello: Functional role of the NPxxY motif in internalization of the type 2 vasopressin receptor in LLC-PK1 cells. *Am J Physiol Cell Physiol* 285(4):750-62, 2003
- [109] G. Innamorati, H. M. Sadeghi, N. T. Tran, M. Birnbaumer: A serine cluster prevents recycling of the V2 vasopressin receptor. *Proc Natl Acad Sci USA*. 95(5):2222-6, 1998
- [110] N. P. Martin, R. J. Lefkowitz, S. K. Shenoy: Regulation of V2 vasopressin receptor degradation by agonist-promoted ubiquitination. *J Biol Chem* 278(46):45954-9, 2003

- [111] D. A. Shagin, E. V. Barsova, Y. G. Yanushevich, A. F. Fradkov, K. A. Lukyanov, Y. A. Labas, T. N. Semenova, J. A. Ugalde, A. Meyers, J. M. Nunez, E. A. Widder, S. A. Lukyanov, M. V. Matz: GFP-like proteins as ubiquitous metazoan superfamily: evolution of functional features and structural complexity. *Mol Biol Evol* 21(5):841-50, 2004
- [112] A. Salih, A. Larkum, G. Cox, M. Kühl, O. Hoegh-Guldberg: Fluorescent pigments in corals are photoprotective. *Nature* 408:850–853, 2000
- [113] M. Y. Gorbunov, Z. S. Kolber, M. P. Lesser and P. G. Falkowski: Photosynthesis and photoprotection in symbiotic corals. *Limnol Oceanogr* 46:75–85, 2001
- [114] N. C. Shaner, P. A. Steinbach, R. Y. Tsien: A guide to choosing fluorescent proteins. *Nat Methods* 2(12):905-9, 2005
- [115] A. Miyawaki: Green Fluorescent Protein-like Proteins in Reef Anthozoa Animals. *Cell Structure and Function* 27:343-347, 2002
- [116] R. Heim, D. C. Prasher, R. Y. Tsien: Wavelength mutations and posttranslational autoxidation of green fluorescent protein. *Proc Natl Acad Sci USA* 91(26):12501-4, 1994
- [117] D. Veith, M. Veith: Biologie fluoreszierender Proteine: Ein Regenbogen aus dem Ozean. *Biologie in unserer Zeit* 6:394-404, 2005
- [118] R. E. Campbell, O. Tour, A. E. Palmer, P. A. Steinbach, G. S. Baird, D. A. Zacharias, R. Y. Tsien: A monomeric red fluorescent protein. *Proc Natl Acad Sci USA* 99(12):7877-82, 2002
- [119] J. Wiedenmann, S. Ivanchenko, F. Oswald, F. Schmitt, C. Röcker, A. Salih, K. D. Spindler, G. U. Nienhaus: EosFP, a fluorescent marker protein with UV-inducible green-to-red fluorescence conversion. *Proc Natl Acad Sci USA* 101(45):15905-10, 2004
- [120] R.Y. Tsien: The green fluorescent protein. *Annu Rev Biochem* 67, 509-44, 1998
- [121] O. V. Stepanenko, V. V. Verkhusha, I. M. Kuznetsova, V. N. Uversky, K. K. Turoverov: Fluorescent proteins as biomarkers and biosensors: throwing color lights on molecular and cellular processes. *Curr Protein Pept Sci* 9(4):338-69, 2008
- [122] M. Dunder, T. Misteli: Measuring dynamics of nuclear proteins by photobleaching. *Curr Protoc Cell Biol* 13:13.5, 2003
- [123] G. H. Patterson, J. Lippincott-Schwartz: A photoactivatable GFP for selective photolabeling of proteins and cells. *Science* 297(5588):1873-7, 2002
- [124] D. M. Chudakov, V. V. Verkhusha, D. B. Staroverov, E. A. Souslova, S. Lukyanov, K. A. Lukyanov: Photoswitchable cyan fluorescent protein for protein tracking. *Nat Biotechnol* 22(11):1435-9, 2004
- [125] S. Brunet, T. Zimmermann, E. G. Reynaud, I. Vernos, E. Karsenti, R. Pepperkok: Detection and quantification of protein-microtubules interactions using green fluorescent protein photoconversion. *Traffic* 7(9):1283-9, 2006
- [126] R. Ando, H. Hama, M. Yamamoto-Hino, H. Mizuno, A. Miyawaki: An optical marker based on the UV-induced green-to-red photoconversion of a fluorescent protein. *Proc Natl Acad Sci USA* 99(20):12651-6, 2002

- [127] H. Hosoi, H. Mizuno, A. Miyawaki, T. Tahara: Competition between energy and proton transfer in ultrafast excited-state dynamics of an oligomeric fluorescent protein red Kaede. *J Phys Chem B* 110(45):22853-60, 2006
- [128] H. Mizuno, T. K. Mal, K. I. Tong, R. Ando, T. Furuta, M. Ikura, A. Miyawaki: Photo-induced peptide cleavage in the green-to-red conversion of a fluorescent protein. *Mol Cell* 12(4):1051-8, 2003
- [129] I Hayashi, H Mizuno, KI Tong, T Furuta, F Tanaka, M Yoshimura, A Miyawaki, M. Ikura: Crystallographic evidence for water-assisted photo-induced peptide cleavage in the stony coral fluorescent protein Kaede. *J Mol Biol* 372(4):918-926, 2007
- [130] Y. Shigematsu, N. Yoshida, Y. Miwa, A. Mizobuti, Y. Suzuki, Y. Tanimoto, S. Takahashi, S. Kunita, F. Sugiyama, K. Yagami: Novel embryonic stem cells expressing tdKaede protein photoconvertible from green to red fluorescence. *Int J Mol Med* 20(4):439-44, 2007
- [131] M. Tomura, N. Yoshida, J. Tanaka, S. Karasawa, Y. Miwa, A. Miyawaki, O. Kanagawa: Monitoring cellular movement in vivo with photoconvertible fluorescence protein "Kaede" transgenic mice. *Proc Natl Acad Sci USA* 105(31):10871-6, 2008
- [132] K. M. Leung, C. E. Holt: Live visualization of protein synthesis in axonal growth cones by microinjection of photoconvertible Kaede into *Xenopus* embryos. *Nat Protoc* 3(8):1318-27, 2008
- [133] J. H. Robben, N. V. Knoers, P. M. Deen: Regulation of the vasopressin V2 receptor by vasopressin in polarized renal collecting duct cells. *Mol Biol Cell* 15:5693-5699, 2004
- [134] G. Innamorati, C. Le Gouill, M. Balamotis, M. Birnbaumer: The long and the short cycle. Alternative intracellular routes for trafficking of G-protein-coupled receptors. *J Biol Chem* 276(16):13096-103, 2001
- [135] C. Krasel, M. Bünemann, K. Lorenz, M. J. Lohse: Beta-arrestin binding to the beta2-adrenergic receptor requires both receptor phosphorylation and receptor activation. *J Biol Chem* 280(10):9528-35, 2005
- [136] S. Wuller, B. Wiesner, A. Löffler, J. Furkert, G. Krause, R. Hermosilla, M. Schaefer, R. Schulein, W. Rosenthal, A. Oksche: Pharmacochaperones post-translationally enhance cell surface expression by increasing conformational stability of wild-type and mutant vasopressin V2 receptors. *J Biol Chem* 279:47254-47263, 2004
- [137] R. Schülein, R. Hermosilla, A. Oksche, M. Dehe, B. Wiesner, G. Krause, W. Rosenthal: A dileucine sequence and an upstream glutamate residue in the intracellular carboxyl terminus of the vasopressin V2 receptor are essential for cell surface transport in COS.M6 cells. *Mol Pharmacol* 54(3):525-35, 1998
- [138] P. I. Tsao, M. J. von Zastrow: Type-specific sorting of G protein-coupled receptors after endocytosis. *Biol Chem* 275(15):11130-40, 2000
- [139] B. S. Stein, K. G. Bensch, H. H. Sussman: Complete inhibition of transferrin recycling by monensin in K562 cells. *J Biol Chem* 259:14762-14772, 1984

- [140] Y. Kapp-Barnea, L. Ninio-Many, K. Hirschberg, M. Fukuda, A. Jeromin, R. Sagi-Eisenberg: Neuronal calcium sensor-1 and phosphatidylinositol 4-kinase beta stimulate extracellular signal-regulated kinase 1/2 signaling by accelerating recycling through the endocytic recycling compartment. *Mol Biol Cell* 17:4130-4141, 2006
- [141] K. Nienhaus, G. U. Nienhaus, J. Wiedenmann, H. Nar: Structural basis for photo-induced protein cleavage and green-to-red conversion of fluorescent protein EosFP. *Proc Natl Acad Sci USA* 102(26):9156-9, 2005
- [142] S. Cabantous, Y. Rogers, T. C. Terwilliger, G. S. Waldo: New molecular reporters for rapid protein folding assays. *PLoS ONE* 3(6):e2387, 2008
- [143] D. Magde, E. Elson and W. W. Webb: Thermodynamic fluctuations in a reacting system: measurement by fluorescence correlation spectroscopy. *Phys Rev Lett* 29:705-708, 1972
- [144] M. Ehrenberg and R. Rigler: Rotational Brownian-motion and fluorescence intensity fluctuations. *Chem Phys* 4:390-401, 1974
- [145] P. Liu, T. Sudhakaran, R. M. Koh, L. C. Hwang, S. Ahmed, I. N. Maruyama, T. Wohland: Investigation of the dimerization of proteins from the epidermal growth factor receptor family by single wavelength fluorescence cross-correlation spectroscopy. *Biophys J* 93(2):684-98, 2007
- [146] G. Krause, R. Hermosilla, A. Oksche, C. Rutz, W. Rosenthal, R. Schülein: Molecular and conformational features of a transport-relevant domain in the C-terminal tail of the vasopressin V(2) receptor. *Mol Pharmacol* 57(2):232-42, 2000
- [147] R. Schülein, D. Lorenz, A. Oksche, B. Wiesner, R. Hermosilla, J. Ebert, W. Rosenthal: Polarized cell surface expression of the green fluorescent protein-tagged vasopressin V2 receptor in Madin Darby canine kidney cells. *FEBS Lett* 441(2):170-6, 1998
- [148] M. Alken, C. Rutz, R. Köchl, U. Donalies, M. Oueslati, J. Furkert, D. Wietfeld, R. Hermosilla, A. Scholz, M. Beyermann, W. Rosenthal and R. Schülein: The signal peptide of the rat corticotropin-releasing factor receptor 1 promotes receptor expression but is not essential for establishing a functional receptor. *Biochem J* 390:455-464, 2005
- [149] S. Terrillon, T. Durroux, B. Mouillac, A. Breit, M. A. Ayoub, M. Taulan, R. Jockers, C. Barberis, M. Bouvier: Oxytocin and vasopressin V1a and V2 receptors form constitutive homo- and heterodimers during biosynthesis. *Mol Endocrinol* 17(4):677-91, 2003
- [150] V. V. Gurevich, E. V. Gurevich: GPCR monomers and oligomers: it takes all kinds. *Trends Neurosci* 31(2):74-81, 2008
- [151] S. Mohammad, G. Baldini, S. Granell, P. Narducci, A. M. Martelli, G. Baldini: Constitutive traffic of melanocortin-4 receptor in Neuro2A cells and immortalized hypothalamic neurons. *J Biol Chem* 282(7):4963-74, 2007
- [152] R. Bouley, H. Y. Lin, M. K. Raychowdhury, V. Marshansky, D. Brown, D. A. Ausiello: Downregulation of the vasopressin type 2 receptor after vasopressin-induced internalization: involvement of a lysosomal degradation pathway. *Am J Physiol Cell Physiol* 288:1390-1401, 2005
- [153] G. Aguilera, M. Nikodemova, P. C. Wynn, K. J. Catt: Corticotropin releasing hormone receptors: two decades later. *Peptides* 25(3):319-29, 2004

- [154] R. A. Hall, R. T. Premont, C. W. Chow, J. T. Blitzer, J. A. Pitcher, A. Claing, R. H. Stoffel, L. S. Barak, S. Shenolikar, E. J. Weinman, S. Grinstein, R. J. Lefkowitz: The beta2-adrenergic receptor interacts with the Na⁺/H⁺-exchanger regulatory factor to control Na⁺/H⁺ exchange. *Nature* 392(6676):626-30, 1998
- [155] R. J. Lefkowitz: G protein-coupled receptors. III. New roles for receptor kinases and β-arrestins in receptor signaling and desensitization. *J Biol Chem* 273:18 677–18 680, 1998
- [156] M. J. Lohse, J. L. Benovic, J. Codina, M. G. Caron and R. J. Lefkowitz: Beta-arrestin: a protein that regulates β-adrenergic receptor function. *Science* 248:547–1550, 1990
- [157] O. B. Jr. Goodman, J. G. Krupnick, F. Santini, V. V. Gurevich, R. B. Penn, A. W. Gagnon, J. H. Keen and J. L. Benovic: Beta-arrestin acts as a clathrin adaptor in endocytosis of the β2-adrenergic receptor. *Nature* 383:447–450, 1996
- [158] M. H. Holtmann, B. F. Roettger, D. I. Pinon and L. J. Miller: Role of receptor phosphorylation in desensitization and internalization of the secretin receptor. *J Biol Chem* 271:23 566–23 571, 1996
- [159] N. Malecz, T. Bambino, M. Bencsik and R. A. Nissenson: Identification of phosphorylation sites in the G protein-coupled receptor for parathyroid hormone. Receptor phosphorylation is not required for agonist-induced internalization. *Mol Endocrinol* 12:1846–1856, 1998
- [160] S. R. Murray, C. J. Evans and M. von Zastrow: Phosphorylation is not required for dynamin-dependent endocytosis of a truncated mutant opioid receptor. *J Biol Chem* 273:24 987–24 991, 1998
- [161] L. Min and M. Ascoli: Effect of activating and inactivating mutations on the phosphorylation and trafficking of the human lutropin/choriogonadotropin receptor. *Mol Endocrinol* 14:1797–1810, 2000
- [162] Y. Qiu, P. Y. Law and H. H. Loh: Mu-opioid receptor desensitization: role of receptor phosphorylation, internalization, and representation. *J Biol Chem* 278:36 733–36 739, 2003
- [163] R. Förster, E. Kremmer, A. Schubel, D. Breitfeld, A. Kleinschmidt, C. Nerl, G. Bernhardt, M. Lipp: Intracellular and surface expression of the HIV-1 coreceptor CXCR4/fusin on various leukocyte subsets: rapid internalization and recycling upon activation. *J Immunol* 160(3):1522-31, 1998
- [164] R. S. Izzo, A. I. Chen, C. Pellecchia, M. Praissman: Secretin internalization and adenosine 3',5'-monophosphate levels in pancreatic acinar cells. *Endocrinology* 124(5):2252-60, 1989
- [165] G. Hilal, F. Massicotte, J. Martel-Pelletier, J. C. Fernandes, J. P. Pelletier, D. Lajeunesse : Endogenous prostaglandin E2 and insulin-like growth factor 1 can modulate the levels of parathyroid hormone receptor in human osteoarthritic osteoblasts. *J Bone Miner Res* 16(4):713-21, 2001
- [166] N. Genty, R. Salesse, J. Garnier: Internalization and recycling of lutropin receptors upon stimulation by porcine lutropin and human choriogonadotropin in porcine Leydig cells. *Biol Cell* 59(2):129-35, 1987
- [167] L. E. Chen, C. Gao, J. Chen, X. J. Xu, D. H. Zhou, Z. Q. Chi: Internalization and recycling of human mu opioid receptors expressed in Sf9 insect cells. *Life Sci* 73(1):115-28, 2003

- [168] X. Zhang, F. Wang, X. Chen, Y. Chen, L. Ma: Post-endocytic fates of delta-opioid receptor are regulated by GRK2-mediated receptor phosphorylation and distinct beta-arrestin isoforms. *J Neurochem* 106(2):781-92, 2008
- [169] D. Alzhanova, D. E. Hruby: A trans-Golgi network resident protein, golgin-97, accumulates in viral factories and incorporates into virions during poxvirus infection. *J Virol* 80(23):11520-7, 2006
- [170] P. Schu: Vesicular protein transport. *Pharmacogenomics J* 1(4):262-71, 2001
- [171] M. Scarselli, J. G. Donaldson: Constitutive Internalization of G Protein-coupled Receptors and G Proteins via Clathrin-independent Endocytosis. *J Biol Chem* 284(6):3577-85, 2009
- [172] M. M. Paing, B. R. Temple, J. Trejo: A tyrosine-based sorting signal regulates intracellular trafficking of protease-activated receptor-1: multiple regulatory mechanisms for agonist-induced G protein-coupled receptor internalization. *J Biol Chem* 279(21):21938-47; 2004
- [173] V. Puri, R. Watanabe, R. D. Singh, M. Dominguez, J. C. Brown, C. L. Wheatley, D. L. Marks and R. E. Pagano: Clathrin-dependent and -independent internalization of plasma membrane sphingolipids initiates two Golgi targeting pathways. *J Cell Biol* 154(3):535-548, 2001
- [174] P. A. Orlandi, P. H. Fishman: Filipin-dependent inhibition of cholera toxin: evidence for toxin internalization and activation through caveolae-like domains. *J Cell Biol* 141(4):905-15, 1998
- [175] I. Schwieger, K. Lautz, E. Krause, W. Rosenthal, B. Wiesner, R. Hermosilla: Derlin-1 and p97/valosin-containing protein mediate the endoplasmic reticulum-associated degradation of human V2 vasopressin receptors. *Mol Pharmacol* 73(3):697-708, 2008

DANKSAGUNG

Hiermit möchte ich mich bei Prof. Dr. G. P. Püschel von der Universität Potsdam für die Betreuung und Begutachtung meiner Dissertation bedanken. Ebenso danke ich Prof. Michael Schäfer von der Universität Leipzig und Prof. Ricardo Hermosilla für die Begutachtung meiner Dissertation.

Außerdem danke ich Prof. Dr. Rosenthal für die Bereitstellung meines Dissertationsthemas.

Besonderer Dank gilt Ralf Schüle für die intensive Betreuung und die ständig neuen Herausforderungen während und wegen meiner Doktorarbeit. Es hat mir gut getan, auch wenn ich das nicht immer sofort erkannt habe. Nicht zuletzt danke ich Dir für das angenehme und entspannte Klima in der Arbeitsgruppe.

Burkhard Wiesner möchte ich für seine Hilfe bei den mikroskopischen Techniken, für seine Geduld und für seine vielen klugen Ideen danken. Ohne Deine Hilfe wäre diese Arbeit nicht zustande gekommen.

Für Deine Anleitung und Hilfe in jeglicher Hinsicht, liebe Jenny Eichhorst, vielen Dank!

Jens Furkert und Ehrhard Klausenz danke ich für ihre Hilfe bei Experimenten und der Sequenzierung meiner zahlreichen Plasmidkonstrukte. Gisela Papsdorf möchte ich für die äußerst bereitwillige und kompetente Hilfe mit der Zellkultur danken.

Klaus Weißhart von der Carl Zeiss MicroImaging GmbH aus Jena danke ich für die Hilfe bei der Durchführung der FCS-Messungen. Außerdem danke ich Gerd Krause und Gunnar Kleinau für die Modellierung des Kaede-Proteins und die Identifizierung der interagierenden Aminosäuren. Auf gleichem Wege möchte ich Björn Lamprecht von der AG Dörken am MDC für seine Hilfe bei der Durchführung der FACS-Messungen danken.

Danken möchte ich allen Mitarbeitern, Mitkämpfern und Mitstreitern der AGs Schüle, Klusmann und Hermosilla, insbesondere Susanne Vogelbein, Isabel Schwieger, Philipp Skroblin, Sven Beulshausen, Christian Hundsruker, Frank Christian, Anke Teichmann, Pavel Nedvetsky, Solveig Grossmann, Vedrana Tabor, Sabine Friedl, Claudia Rutz und Jessica Tröger für Hilfe, Geduld, Freundschaft und manchmal einfach fürs Aushalten.

Besonders bedanken möchte ich mich bei Philipp Skroblin, Theresa Unger und Sven Beulshausen für die Mühe, die sich mit meiner Arbeit und all ihren Eigenarten gegeben haben - es hat offenbar geholfen!

Insbesondere danke ich Theresa Unger und Claudia Hagedorn – einfach nur fürs Dasein!

Danke Philipp! Es ist nicht immer einfach, aber es ist immer schön!

Ganz besonderer Dank gilt meiner Familie für ihre Unterstützung und Liebe - DANKE.