

Funktionale Analyse des Pseudosignalpeptids des
Corticotropin-Releasing-Factor-Rezeptors 2a

Dissertation

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

eingereicht im Fachbereich Biologie, Chemie, Pharmazie
der Freien Universität Berlin

vorgelegt von

Katharina Schulz

aus Berlin

Berlin, 2015

Diese Arbeit wurde von September 2005 bis Dezember 2008 unter der Leitung von Prof. Dr. Ralf Schülein und Prof. Dr. Walter Rosenthal am Leibniz-Institut für Molekulare Pharmakologie (FMP) in Berlin-Buch angefertigt.

1. Gutachter: Prof. Dr. Ralf Schülein
2. Gutachter: Prof. Dr. Hartmut Oschkinat

Disputation am 02.Mai 2016

DANKSAGUNG

An dieser Stelle möchte ich allen meinen Dank aussprechen, die mich bei der Durchführung und dem Finalisieren dieser Arbeit unterstützt und begleitet haben.

Mein besonderer Dank gilt Prof. Dr. Ralf Schüle, für die Vergabe des Themas und seine Betreuung während und nach der praktischen Arbeit im Labor.

Sehr dankbar bin ich Herrn Prof. Hartmut Oschkinat für die Übernahme des Gutachtens.

Ich danke Herrn Prof. Dr. Walter Rosenthal für die Möglichkeit, diese Arbeit in der Abteilung Signaltransduktion / Protein-Trafficking am FMP durchzuführen.

Ebenso danke ich allen Kollegen der Arbeitsgruppe, vor allem Dr. Susanne Vogelbein, Dr. Antje Schmidt, Dr. Ann-Karin Haas, Dr. Murat Oueslati, Dr. Eva Schönenberger, Dr. Claudia Rutz und Dagmar Michl.

Bedanken möchte ich mich auch bei Dr. Burghard Wiesner und Frau Jenny Eichhorst für die überaus kompetente Betreuung und tatkräftige Unterstützung bei den mikroskopischen Techniken und Arbeiten im Isotopenlabor. Auch Dr. Jens Furkert danke ich für die Hilfe und Unterstützung bei Experimenten im Radioaktivitätslabor. Herrn Dr. Klauschenz, und Bärbel Mohs danke ich für die Sequenzierungen. Frau Dr. Papsdorf für die Unterstützung bei der Zellkultur.

Ein besonderer Dank gilt Dr. Ann-Karin Haas, die mich durch ihre beständige Ermutigung in der Endphase dieser Arbeit sehr bestärkt hat.

Meiner Familie, insbesondere meinen Eltern, gilt mein tiefster Dank für ihre liebevolle, fortwährende und selbstlose Unterstützung.

I. ABBILDUNGSVERZEICHNIS.....	4
II. ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS.....	6
III. ZUSAMMENFASSUNG	9
IV. SUMMARY	11
1. EINLEITUNG.....	13
1.1. Die Familie der G-Protein gekoppelten Rezeptoren.....	13
1.2. Intrazellulärer Transport von GPCR	15
1.3. Posttranslationale Modifikationen und Qualitätskontrolle im ER	18
1.4. Aktivierung von GPCR	20
1.5. Desensibilisierung, Internalisierung und Recycling von GPCR.....	21
1.5.1. Clathrin-abhängige Internalisierung.....	22
1.5.2. β -Arrestine und ihre Rolle bei der Internalisierung.....	23
1.6. Corticotropin-Releasing-Factor-Rezeptoren	25
1.6.1. Expression und physiologische Bedeutung	25
1.6.2. CRF-Rezeptor-Subtypen und Splice-Varianten.....	27
1.6.3. Liganden der CRF-Rezeptoren.....	28
1.6.4. Das Pseudosignalpeptid des CRF _{2a} R	28
1.7. Zielstellung der Arbeit.....	30
2. MATERIAL UND METHODEN	31
2.1. Material.....	31
2.1.1. Chemikalien und Reagenzien	31
2.1.2. Geräte	33
2.1.3. Software	35
2.1.4. Bakterienstämme, Zelllinien und Kulturbedingungen.....	35

2.1.5.	Desoxyribonukleotide	37
2.1.6.	Antikörper	38
2.2.	Methoden.....	39
2.2.1.	Molekularbiologische Methoden	39
2.2.2.	Zellbiologische Methoden	44
2.2.3.	Mikroskopische Methoden an lebenden Zellen	47
2.2.4.	Durchflusscytometrische Untersuchungen	48
2.2.5.	Proteinbiochemische Methoden.....	49
2.2.6.	Internalisierungsexperimente	54
2.2.7.	Pharmakologische Methoden	54
3.	ERGEBNISSE.....	57
3.1.	Untersuchung des Internalisierungsmechanismus des CRF_{2a}R und CRF₁R	57
3.1.1.	Die β -Arrestin-Rekrutierung des CRF _{2a} R und CRF ₁ R in Abhängigkeit vom Zelltyp und Liganden ..	57
3.1.2.	β -Arrestin-Rekrutierung der N13A.CRF _{2a} R-Signalpeptidmutante	61
3.1.3.	Untersuchung der Internalisierungskinetik des CRF _{2a} R, CRF ₁ R und der Signalpeptidmutante N13A.CRF _{2a} R	62
3.1.4.	Untersuchung der Interaktion zwischen CRF _{2a} R und β -Arrestinen	64
3.1.5.	β -Arrestin-Rekrutierung in Abhängigkeit der Oberflächenexpression	65
3.1.6.	Zusammenfassung und Diskussion der bisherigen Ergebnisse	67
3.2.	Untersuchung der Bedeutung des Pseudosignalpeptids des CRF_{2a}R für den intrazellulären Transport	69
3.2.1.	Bestimmung der Ligandenbindungseigenschaften	70
3.2.2.	Einfluss des Pseudosignalpeptids auf die Oberflächenexpression.....	72
3.2.3.	Untersuchung des Glykosylierungsstatus mittels Immunpräzipitation.....	76
3.2.4.	Untersuchung der ER-Retention der Konstrukte mittels Co-Immunpräzipitation von Calnexin... 79	
3.2.5.	Zusammenfassung	81
3.3.	Einfluss des Pseudosignalpeptids des CRF_{2a}R auf die Signaltransduktion	82
3.3.1.	Einfluss des Pseudosignalpeptids auf die cAMP-Bildung	82
3.3.2.	Herstellung und Quantifizierung stabiler Linien zur Untersuchung der cAMP-Bildung	84
3.3.3.	cAMP-Bildung in Abhängigkeit der Oberflächenexpression	86
3.3.4.	Agonisten-induzierte cAMP-Bildung in Abhängigkeit vom verwendeten Liganden.....	87
3.3.5.	Agonisten-induzierte cAMP-Bildung nach Sauvagine-Stimulation in AtT20-Zellen	88

4. DISKUSSION	90
4.1. Die Bedeutung des Pseudosignalpeptids für die Oberflächenexpression	91
4.1.1. Konformationsänderung durch das Pseudosignalpeptid (Exposition von Retentionssignalen oder hydrophoben Sequenzen, Maskierung von ER-Export-Sequenzen)	91
4.1.2. Direkte Wirkung des Pseudosignalpeptids als Retentionssignal	92
4.1.3. Stärkere Retention aufgrund der Glykosylierung an Position N13	93
4.1.4. Verhinderung der Oligomerisierung	93
4.2. Die Bedeutung des Pseudosignalpeptids für die Rezeptoraktivierung.....	96
4.2.1. Mögliche Bedeutung einer zweiten Ligandenbindungsstelle im N-Terminus der CRF-Rezeptoren	96
4.2.2. Möglicher Einfluss der durch das Pseudosignalpeptid verhinderten Rezeptor-Oligomerisierung auf die G-Protein-Kopplung.....	97
4.3. Ausblick	99
5. LITERATURVERZEICHNIS.....	100
6. PUBLIKATION.....	110

I. ABBILDUNGSVERZEICHNIS

ABBILDUNG 1.1 SCHEMATISCHE DARSTELLUNG DER GPCR-TOPOLOGIE.....	14
ABBILDUNG 1.2 SCHEMATISCHE DARSTELLUNG DER DREI GROßEN GPCR-FAMILIEN A, B UND C.....	14
ABBILDUNG 1.3 SCHEMATISCHE DARSTELLUNG DES INTRAZELLULÄREN TRANSPORTWEGES VON GPCR.....	16
ABBILDUNG 1.4 SCHEMATISCHE DARSTELLUNG DES ER-TARGETING UND DER ER-INSERTION EINES GPCR MIT SIGNALPEPTID	17
ABBILDUNG 1.5 SCHEMATISCHE DARSTELLUNG DER CLATHRIN-ABHÄNGIGEN INTERNALISIERUNG.....	22
ABBILDUNG 1.6 SCHEMATISCHE DARSTELLUNG DER HPA-ACHSE	26
ABBILDUNG 1.7 GRAFISCHE DARSTELLUNG DER N-TERMINALEN REZEPTORSEQUENZEN DER CRFR	28
ABBILDUNG 1.8 UNTERSUCHUNG DER SIGNALPEPTID-ABSPALTUNG BEIM CRF _{2A} R UND CRF ₁ R.....	29
ABBILDUNG 3.1 UNTERSUCHUNG DER β -ARRESTIN-2-REKRUTIERUNG NACH AGONISTEN-STIMULATION	59
ABBILDUNG 3.2 ZUSAMMENFASSUNG DER ERGEBNISSE: β -ARRESTIN-REKRUTIERUNG DURCH DEN CRF1R UND DEN CRF2AR NACH STIMULATION MIT VERSCHIEDENEN LIGANDEN IN VERSCHIEDENEN ZELLTYPEN.....	60
ABBILDUNG 3.3 UNTERSUCHUNG DER β -ARRESTIN 2-REKRUTIERUNG NACH AGONISTEN-STIMULATION.....	61
ABBILDUNG 3.4 INTERNALISIERUNGSKINETIK DES CRF ₁ R, CRF _{2A} R UND N13A.CRF _{2A} R	63
ABBILDUNG 3.5 CO-IMMUNPRÄZIPITATION MIT β -ARRESTIN 2	64
ABBILDUNG 3.6 UNTERSUCHUNG DER β -ARRESTIN-2-REKRUTIERUNG DER CRF ₁ R-KLONE A2 UND A6 NACH AGONISTEN-STIMULATION	66
ABBILDUNG 3.7 SCHEMATISCHE DARSTELLUNG DER VERWENDETEN KONSTRUKTE	70
ABBILDUNG 3.8 KOMPETITIVER BINDUNGSASSAY ZUR BESTIMMUNG DER K _D - UND B _{MAX} -WERTE	71
TABELLE 3.1 K _D - UND B _{MAX} -WERTE DER CRFR-KONSTRUKTE	71
ABBILDUNG 3.9 ANALYSE DER REZEPTOR-LOKALISATION MITTELS LSM	73
ABBILDUNG 3.10 QUANTIFIZIERUNG DER OBERFLÄCHENEXPRESSION MITTELS AUTOMATISCHER MIKROSKOPIE.....	74
ABBILDUNG 3.11 UNTERSUCHUNG DER REZEPTOREXPRESSION MITTELS EINES OBERFLÄCHENBIOTINYLIERUNGSVERSUCHES	75
ABBILDUNG 3.12 UNTERSUCHUNG DES GLYKOSYLIERUNGSSTATUS VERSCHIEDENER CRFR-KONSTRUKTE MITTELS IMMUNPRÄZIPITATION.....	77
ABBILDUNG 3.13 ANTEIL DER EINZELNEN IMMUNOREAKTIVEN PROTEINBANDEN	78
ABBILDUNG 3.14 CO-IMMUNPRÄZIPITATION VON CALNEXIN MIT CRF-REZEPTOR-KONSTRUKTEN UND LADUNGSKONTROLLEN	80
ABBILDUNG 3.15 AGONISTEN-INDUZIERTER cAMP-BILDUNG AN INTAKTEN, TRANSIENT TRANSFIZIERTEN HEK-293-ZELLEN	82
ABBILDUNG 3.16 QUANTIFIZIERUNG DER OBERFLÄCHENEXPRESSION MITTELS DURCHFLUSSCYTOMETRIE.....	85
ABBILDUNG 3.17 AGONISTEN-INDUZIERTER cAMP-BILDUNG BEI ANNÄHERND GLEICH STARK EXPRIMIERENDEN	

CRF ₁ R- UND SP2.CRF _{2A} R-KLONEN	86
ABBILDUNG 3.18 SAUVAGINE- BZW. CRF-INDUZIERTER CAMP-BILDUNG BEIM CRF ₁ R-KLON A2	87
ABBILDUNG 3.19 AGONISTEN-INDUZIERTER CAMP-BESTIMMUNG IN ATT20-ZELLEN, DIE DEN CRF ₁ R ENDOGEN EXPRIMIEREN.....	88
ABBILDUNG 4.1 SCHEMATISCHE ZUSAMMENFASSUNG DER ERGEBNISSE.....	90

II. ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

AC	Adenylylcyclase
ACTH	Adrenocorticotropes Hormon
AP	Alkalische Phosphatase
AP-2	Adapterprotein-2
APS	Ammoniumpersulfat
ATP	Adenosintriphosphat
AVP	Arginin-8-Vasopressin
B_{max}	maximale Bindung
BSA	bovines Serumalbumin
cAMP	zyklisches Adenosin-Monophosphat
CCP	<i>Clathrin-coated pit</i> , Clathrin-haltige Vertiefung in der Plasmamembran
cDNA	komplementäre Desoxyribonucleinsäure
CFP	cyanfluoreszierendes Protein
cGMP	zyklisches Guanosin-Monophosphat
CNX	Calnexin
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
CRF _{2a} R	<i>Corticotropin-Releasing Factor</i> -Rezeptor Typ 2a
CRT	Calreticulin
DAG	Diacylglycerol
ddNTP	Didesoxynukleosidtriphosphat
DMEM	<i>Dulbecco's Modified Eagle's</i> Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Deoxynukloesidtriphosphat
DPBS	<i>Dulbecco's phosphate buffered saline</i>
DSP	Dithiobissuccinimidylpropionat
E.coli	Escherichia coli

EC ₅₀	<i>half maximal effective concentration</i> , mittlere effektive Dosis
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EndoH	Endoglykosidase H
ER	Endoplasmatisches Retikulum
ERGIC	ER-Golgi-Intermediär-Kompartiment
FACS	Fluoreszenz-basierte Durchflusscytometrie
FKS	fetales Kälberserum
FRET	Fluoreszenz-Resonanzenergietransfer
GABA	Gamma-Aminobuttersäure
GDP	Guanosindiphosphat
GFP	<i>green fluorescent protein</i> , grünfluoreszierendes Protein
GPCR	G-Protein-gekoppelter Rezeptor
GRK	G-Protein-gekoppelte Rezeptorkinase
GTP	Guanosintriphosphat
GTPase	Guanosintriphosphat-Hydrolase
HEK 293	<i>human embryonic kidney cells</i> , humane embryonale Nierenzelllinie
HPA-Achse	Hypothalamic-pituitary-adrenocortical axis, Hypothalamus-Hypophysen-Nebennierenrinden-Achse
IF	Immunofluoreszenz
IgG	Immunglobulin G
IP ₃	Inositol-1,4,5-triphosphat
IPTG	Isopropyl-1-Thio- β -D-Galaktopyranosid
K _d	Dissoziationskonstante
LB-Medium	Luria-Bertani-Medium
LSM	<i>Laser Scanning</i> Mikroskopie
mRNA	<i>messenger</i> Ribonukleinsäure
n	Anzahl
NO	Stickstoffmonoxid
OD ₂₆₀	optische Dichte bei $\lambda=260\text{nm}$
PBS	<i>phosphate buffered saline</i>
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
PDE	Phosphodiesterase

PE	Phycoerythrin
P _i	Phosphat, anorganisch
PMSF	Phenylmethyloxycarbonylfluorid
PNGaseF	Peptid-Endoglykosidase F
PTX	Pertussistoxin
RIA	Radioimmunoassay
rpm	<i>revolutions per minute</i> , Umdrehungen pro Minute
RT	Raumtemperatur
SDS	Natriumdodecylsulfat
SDS-PAGE	Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese
SOC-Medium	SOB (<i>super optimal broth</i>)-Medium mit 20mM Glucose
SP	Signalpeptid
SRP	<i>signal recognition particle</i>
β -Arr	β -Arrestin
TAE-Puffer	TRIS(Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan)-Acetat-EDTA-Puffer
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethyldiamin
TM	Transmembran-Domäne
tRNA	<i>transfer</i> Ribonukleinsäure
UGGT	UDP(Uridinphosphat)-Glucose:Glykoprotein-Glycosyl-Transferase
UV	Ultraviolett
V2R	Vasopressin-Rezeptor Typ 2
YFP	<i>yellow fluorescent protein</i> , gelbfluoreszierendes Protein
ZNS	Zentralnervensystem

III. ZUSAMMENFASSUNG

Der *Corticotropin-Releasing-Factor*-Rezeptor Typ 2a (CRF_{2a}R) gehört zur Familie der G-Protein-gekoppelten Rezeptoren (GPCR). Frühere Arbeiten haben gezeigt, dass der CRF_{2a}R am N-Terminus ein Pseudosignalpeptid besitzt, das im Gegensatz zu konventionellen Signalpeptiden nicht vom Rezeptor abgespalten wird, sondern am reifen Protein verbleibt. Das Pseudosignalpeptid ist im Verlauf der frühen Stufen der Rezeptor-Biogenese weder in der Lage, die naszierende Polypeptidkette zur Membran des Endoplasmatischen Retikulums (ER) zu dirigieren, noch den proteinleitenden Kanal im Translokon zu öffnen (Rutz et al., *J. Biol. Chem.* 281, 24910-2492., 2006). Das Pseudosignalpeptid des CRF_{2a}R ist in der GPCR-Familie eine bisher einzigartige Proteindomäne.

Die vorliegende Arbeit beschäftigte sich mit der Frage, welche Bedeutung das Pseudosignalpeptid für die Rezeptorfunktion hat. Speziell wurde untersucht, ob diese Rezeptordomäne den Internalisierungsmechanismus, die Expression an der Zelloberfläche oder die Signaltransduktion des Rezeptors beeinflusst. Für alle Untersuchungen wurde als Vergleich der homologe CRF₁R herangezogen, der über ein konventionelles, abspaltbares Signalpeptid verfügt.

Experimente am Laser Scanning Mikroskop (LSM) zur Agonisten-induzierten Internalisierung ließen beim CRF_{2a}R im Gegensatz zum CRF₁R keine β -Arrestin-Rekrutierung zur Plasmamembran erkennen. Dies führte initial zu der Hypothese, dass das Pseudosignalpeptid einen Einfluss auf den Internalisierungsmechanismus haben könnte. In genaueren Untersuchungen konnte jedoch gezeigt werden, dass die Internalisierungskinetiken des CRF_{2a}R und des CRF₁R keinen signifikanten Unterschiede aufweisen, und dass das Fehlen der Rekrutierung von β -Arrestin beim CRF_{2a}R höchstwahrscheinlich auf einem Detektionsproblem beruht, das auf eine stark verminderte Oberflächenexpression des CRF_{2a}R zurückzuführen ist. In der Folge wurde daher untersucht, ob und auf welcher Stufe das Vorhandensein des Pseudosignalpeptids des CRF_{2a}R die Expression des Rezeptors an der Plasmamembran beeinflusst.

In der Tat konnte mit Signalpeptid-Austauschexperimenten zwischen dem CRF₁R und dem CRF_{2a}R belegt werden, dass das Vorhandensein des Pseudosignalpeptids zu einer sehr niedrigen Rezeptorexpression an der Zelloberfläche führt. Das Pseudosignalpeptid führt zu

einer Zunahme der Expression unreifer Formen im ER und in der Folge zu einer verstärkten Interaktion des Rezeptors mit dem Chaperonprotein Calnexin. In der Summe löst das Pseudosignalpeptid dadurch eine verstärkte Retention des Rezeptors durch das Qualitätskontrollsystem des frühen sekretorischen Wegs aus - offensichtlich erschwert das Vorhandensein des Signalpeptids die korrekte Faltung des Rezeptors. Diese Daten erklären die verminderte Expression in der Plasmamembran. Alle beschriebenen Eigenschaften des Pseudosignalpeptids konnten durch dessen Transfer auf den CRF₁R übertragen werden. Umgekehrt bewirkte der Transfer des konventionellen Signalpeptids des CRF₁R auf den CRF_{2a}R eine verbesserte Rezeptorfaltung und eine Erhöhung der Rezeptorexpression in der Plasmamembran. Ob der Pseudosignalpeptid-bedingten niedrigen CRF_{2a}R-Expression in der Plasmamembran eine physiologische Bedeutung zukommt, ist noch unklar.

Untersuchungen zur Signaltransduktion zeigten, dass die Aktivierung des CRF_{2a}R zu einer sigmoiden cAMP-Konzentrations-Wirkungskurve führt, die auf eine ausschließliche Aktivierung von G_{αs} zurückzuführen ist. Die Aktivierung des CRF₁R führte dagegen zu einer glockenförmigen Konzentrations-Wirkungskurve – dieser Rezeptor koppelt bei niedriger Besetzung an G_{αs} und bei hoher Besetzung auch an G_{αi}. Die Ergebnisse für den CRF_{2a}R und den CRF₁R waren unabhängig von der Expression in der Plasmamembran und vom verwendeten Agonisten. Die Effekte konnten wiederum mit Signalpeptid-Austauschexperimenten zwischen beiden Rezeptorsubtypen übertragen werden, d.h. das veränderte Kopplungsverhalten ist auf die Signalpeptide zurückzuführen. Mit anderen Worten, die Anwesenheit des Pseudosignalpeptids verhindert die Kopplung des Rezeptors mit G_{αi} so dass nur noch eine Interaktion mit G_{αs} möglich ist.

Zusammengefasst zeigen diese Untersuchungen, dass das Pseudosignalpeptid des CRF_{2a}R nicht nur einen Einfluss auf die frühe Rezeptor-Biogenese im ER und damit auf die Rezeptorexpression in der Plasmamembran hat, sondern auch die G-Protein-Selektivität des Rezeptors mitbestimmt. Damit konnten dieser neuen GPCR-Domäne eindeutige Funktionen zugewiesen werden.

IV. SUMMARY

The corticotropin-releasing factor receptor type 2a (CRF_{2a}R) belongs to the family of G protein-coupled receptors (GPCR). Previous work showed that the CRF_{2a}R possesses an N-terminal pseudo signal peptide that remains uncleaved in contrast to conventional signal peptides. The pseudo signal peptide is neither capable to direct the nascent polypeptide to the membrane of the endoplasmic reticulum (ER) during the course of the early steps of receptor biogenesis, nor to open the protein conducting channel in the translocon (Rutz et al., J. Biol Chem. 281, 24910-2492, 2006). Hence, the pseudo signal peptide of the CRF_{2a}R is a unique protein domain in the GPCR family.

The present study addresses the functional significance of the pseudo signal peptide. Specifically, it was investigated whether this receptor domain affects the internalization, the cell surface expression and the signal transduction. The homologous CRF₁R, that possesses a conventional cleavable signal peptide, was used as control.

Laser Scanning Microscope (LSM) experiments showed that CRF_{2a}R, in contrast to CRF₁R, did not lead to β -arrestin recruitment to the plasma membrane in agonist-induced internalization. This led to the assumption that the pseudo signal peptide might have an influence on the internalization mechanism. However, it turned out that the internalization kinetics of CRF_{2a}R and CRF₁R do not differ significantly. The lack of β -arrestin recruitment by CRF_{2a}R is most likely due to a detection problem since the CRF_{2a}R displayed a significantly reduced surface expression. Subsequently, it was investigated whether and at what stage of intracellular receptor transport the presence of the pseudo signal peptide influences the plasma membrane expression.

Signal peptide exchange experiments between CRF₁R and CRF_{2a}Rs, showed that the presence of the pseudo signal peptide indeed results in a very low receptor expression on the cell surface. The presence of the pseudo signal peptide results in an increased expression of immature receptor proteins in the ER, and consequently in an increased interaction of the receptor with the chaperone protein calnexin. Thus, the pseudo signal peptide causes an enhanced retention of the receptor by the quality control system in the early secretory pathway. The presence of the signal peptide apparently impairs the proper folding of the receptor. These data explain the decreased expression at the plasma membrane. All

specified characteristics mediated by the pseudo signal peptide were entirely transferable to the CRF₁R in signal peptide exchange experiments. Accordingly, the transfer of the conventional signal peptide of CRF₁R to CRF_{2a}R caused improved folding of the receptor and led to an increase in receptor expression in the plasma membrane. Whether the low CRF_{2a}R expression in the plasma membrane induced by the pseudo signal peptide does play a physiological role is still unclear.

Signal transduction studies showed that activation of CRF_{2a}R leads to a sigmoidal cAMP-concentration-response curve through the exclusive activation of G_{αs}. In contrast to this, the activation of CRF₁R, leads to a bell-shaped concentration-response curve. CRF₁R couples to G_{αs} at low agonist concentration and to both G_{αs} and G_{αi} at high agonist concentration. These results for CRF_{2a}R and CRF₁R were independent of plasma membrane expression and applied agonist. Again, these effects could be shifted between the two receptor subtypes by signal peptide exchange experiments, i.e. the changes in coupling characteristics are due to the signal peptides. In other words, the presence of the pseudo signal peptide prevents the coupling of the receptor to G_{αi}, meaning that only an interaction with G_{αs} is possible.

Taken together, these studies indicate that the signal peptide of the pseudo CRF_{2a}R does not only affect the early receptor biogenesis in the ER, and thus the receptor expression in the plasma membrane, but also determines the G-protein selectivity of the receptor. Thus, unique functions could be assigned to this novel GPCR domain.

1. EINLEITUNG

Die Kommunikation zwischen Zelle und Umwelt erfolgt durch die Aufnahme unterschiedlichster Reize und Signale und deren Umwandlung und Weiterverarbeitung in biochemische und physikalische Signale. Auf molekularer Ebene werden diese Signale über einen Rezeptor und Transduktionsprozesse verarbeitet.

1.1. Die Familie der G-Protein gekoppelten Rezeptoren

Die umfangreichste Rezeptorfamilie ist die der G-Protein-gekoppelten Rezeptoren (GPCR). Hauptaufgabe der GPCR ist die Weiterleitung von äußeren Signalen wie Licht, Hormone, Duft- oder Geschmacksstoffe in das Zellinnere, damit die Zelle adäquat auf diese reagieren kann (BOCKAERT, 1999).

GPCR verfügen über sieben Transmembrandomänen (TM), die durch intra- und extrazelluläre Aminosäuresequenz-Schleifen miteinander verbunden sind (Abbildung 1.1). Der extrazellulär lokalisierte N-Terminus kann potentielle N-Glykosylierungsstellen aufweisen. Der C-Terminus ist intrazellulär lokalisiert und kann zur Verankerung in der Membran zusätzlich palmitoyliert sein. Ein weiteres gemeinsames und namensgebendes Merkmal der GPCR ist, dass sie an heterotrimere G-Proteine koppeln. Durch Ligandenbindung wird die Rezeptorkonformation dabei so verändert, dass sich das G-Protein vom Rezeptor löst und in eine α - und eine $\beta\gamma$ -Untereinheit dissoziiert, die ihrerseits verschiedene andere Moleküle oder ganze Signalkaskaden in der Zelle aktivieren können (siehe Abschnitt 1.5.).

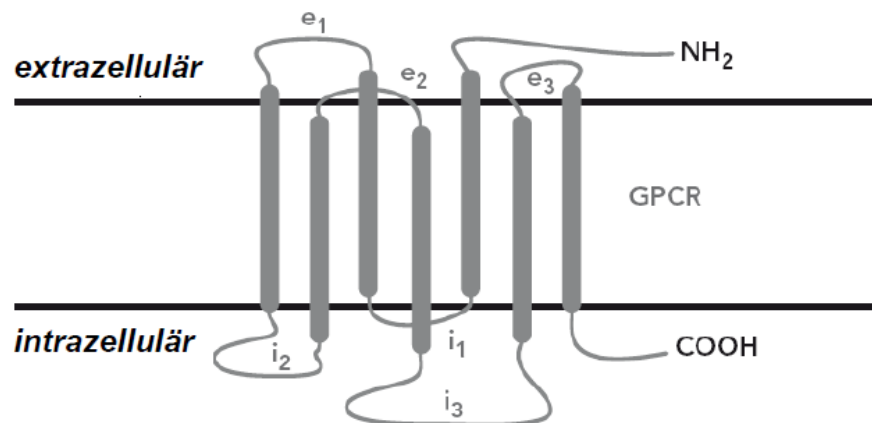


Abbildung 1.1 Schematische Darstellung der GPCR-Topologie

Sieben Transmembrandomänen sind über drei intrazelluläre (i_1 - i_3) und drei extrazelluläre (e_1 - e_3) Aminosäuresequenz-Schleifen miteinander verbunden. Der N-Terminus ist extrazellulär, der C-Terminus intrazellulär lokalisiert (nach BOCKAERT, 1999).

GPCR werden in drei Hauptfamilien eingeteilt (GETHER, 2000) (Abbildung 1.2). Zur Familie A gehören die Rezeptoren, die mit Rhodopsin und dem β_2 -adrenergen Rezeptor verwandt sind. Die Sequenzhomologie innerhalb dieser Familie ist nicht sehr groß, es gibt aber einige hochkonservierte Aminosäuren, die eine entscheidende Rolle für Rezeptorstruktur und -funktion haben (z.B. das DRY- oder das NPXXY-Motiv) (WILBANKS, 2002).

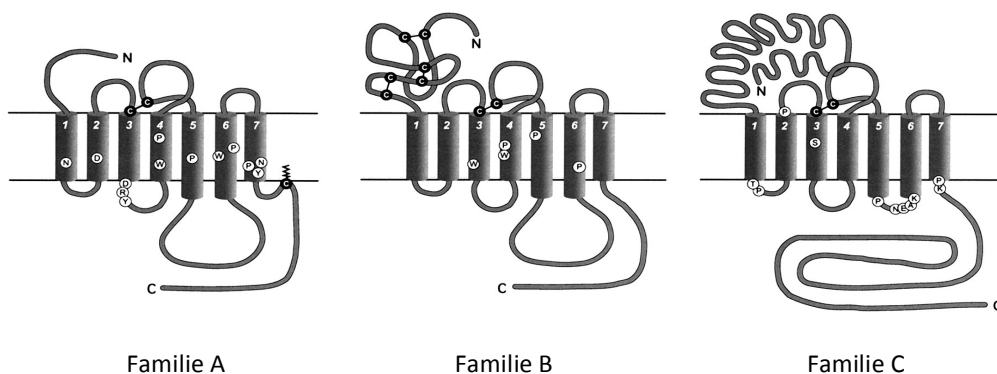


Abbildung 1.2 Schematische Darstellung der drei großen GPCR-Familien A, B und C

Die hochkonservierten Positionen (weiße Kreise), die konservierten Disulfidbrücken (schwarze Kreise) und die Palmitoylierungsstelle im C-Terminus der Familie A sind gekennzeichnet (aus GETHER, 2000).

In der Familie B, zu der auch die in dieser Arbeit untersuchten CRF-Rezeptoren gehören, sind die Rezeptoren zusammengefasst, die dem Sekretin-Rezeptor ähnlich sind. Sie zeichnen sich durch einen vergleichsweise langen N-Terminus aus (z.T. über 100 Aminosäuren), der mehrere Disulfidbrücken aufweist. Liganden dieser Rezeptorfamilie haben ein relativ hohes Molekulargewicht und werden am N-Terminus unter Beteiligung der transmembranären Bereiche gebunden.

Die Rezeptoren der Familie C (GABA-Rezeptor-ähnliche Rezeptoren) besitzen ebenfalls einen sehr langen N-Terminus von 500-600 Aminosäuren. Auch Glutamat- und Ca^{2+} -Rezeptoren gehören in diese Gruppe. Die Ligandenbindung erfolgt vermutlich im N-Terminus. Die dritte intrazelluläre Schleife ist bei diesen Rezeptoren sehr kurz und hochkonserviert.

GPCR funktionieren in einem Zyklus von Stimulation, Desensitisierung, Internalisierung und Resensitisierung. Die Regulation der Rezeptordichte an der Plasmamembran über intrazelluläre Transportprozesse spielt dabei eine maßgebliche Rolle.

1.2. Intrazellulärer Transport von GPCR

GPCR müssen zur Plasmamembran transportiert werden, um ihre Funktion ausüben zu können. Um an die Plasmamembran zu gelangen, werden sie über den so genannten sekretorischen Weg transportiert (SCHÜLEIN, 2004).

Der Transport von GPCR und anderen Membranproteinen über den sekretorischen Weg beginnt mit der Translation an cytoplasmatischen Ribosomen und verläuft dann über das Endoplasmatische Retikulum (ER), ER-Golgi-Intermediär-Kompartiment (ERGIC) und die einzelnen Elemente des Golgi-Apparates zur Plasmamembran (Abbildung 1.3).

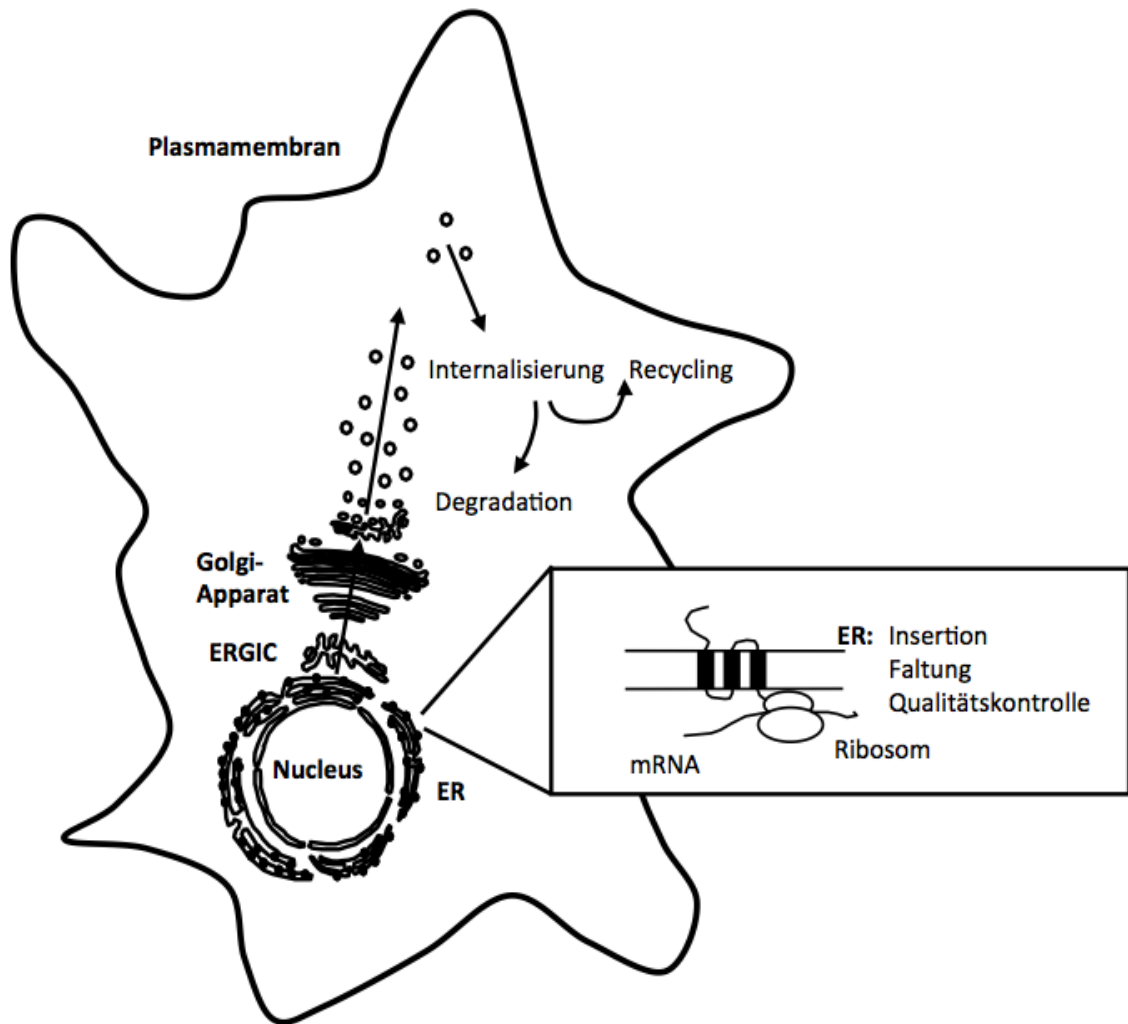


Abbildung 1.3 Schematische Darstellung des intrazellulären Transportweges von GPCR

Der sekretorische Transport beginnt mit der Insertion der wachsenden Polypeptidkette in die ER-Membran. Im ER werden die Rezeptoren auf ihre korrekte Faltung überprüft. Fehlfaltete Rezeptoren werden über das ER-assoziierte Degradationssystem abgebaut. Über das ER-Golgi-Intermediär-Kompartiment (ERGIC) und den Golgi-Apparat werden die korrekt gefalteten Membranproteine in Vesikeln zur Plasmamembran transportiert. Nach konstitutiver oder Agonisten-induzierter Internalisierung kommt es entweder zum Recycling an die Plasmamembran oder über Lysosomen zur Degradation der Rezeptoren.

Membranproteine müssen Signalsequenzen besitzen, um diesen Transportweg nutzen können (CHIN, 2002). Diese sind entweder dem Protein als so genannte, abspaltbare Signalpeptide vorgeschaltet (BLOBEL, 1975) oder verbleiben als nichtabspaltbare Signalanker-Sequenzen am Protein (WALLIN, 1995). Bei Signalanker-Sequenzen handelt es sich meistens um die erste Transmembrandomäne des reifen Proteins. Die Synthese sowohl eines

sekretorischen Proteins als auch eines Membranproteins (wie eines GPCR) (Abbildung 1.4), beginnt im Cytosol.

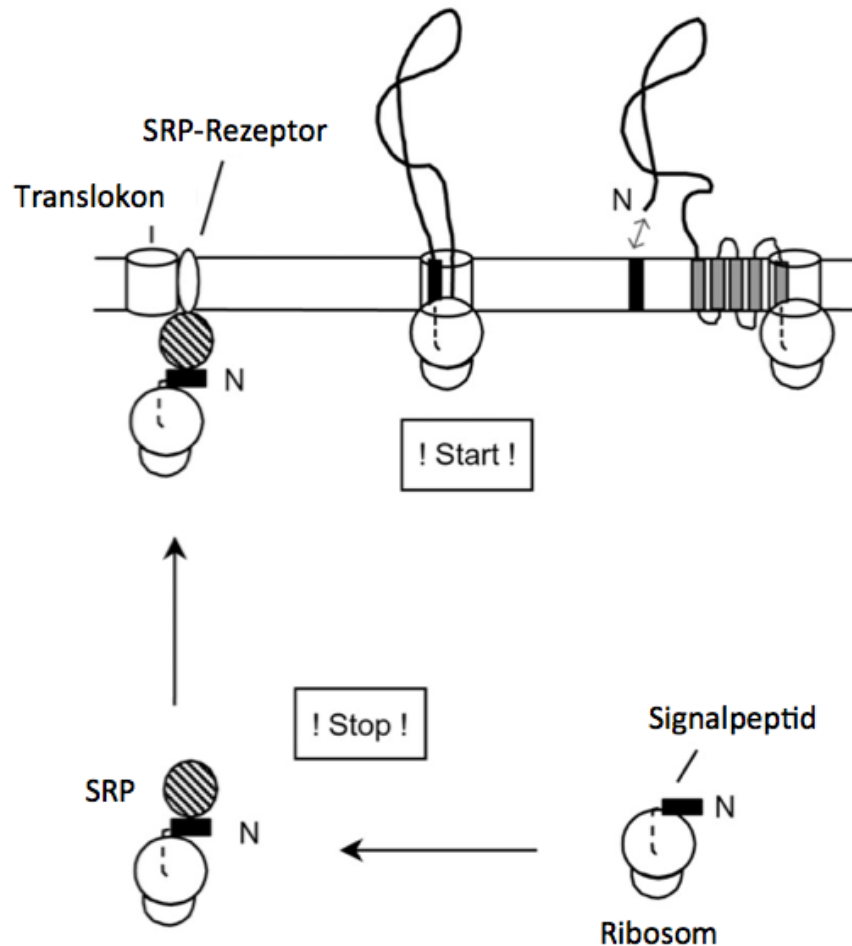


Abbildung 1.4 Schematische Darstellung des ER-Targeting und der ER-Insertion eines GPCR mit Signalpeptid

Das Signalpeptid (schwarz) wird direkt nach seiner Synthese cytoplasmatisch vom *signal recognition particle* (SRP) gebunden, wodurch die weitere Synthese der Polypeptidkette gestoppt wird. Der RNA-Ribosom-SRP-Komplex wird zur ER-Membran geleitet. Durch Bindung dieses Komplexes an den SRP-Rezeptor, der mit dem Translokon assoziiert ist, kann die Polypeptidkette in den proteinleitenden Kanal des Translokons eingeführt werden. Nach GTP-abhängiger Freisetzung des SRP beginnt die Translation erneut. Membranproteine wie GPCR werden seitlich aus dem Translokon entlassen und in die ER-Membran integriert (nach KÖCHL, 2002).

Die Signalsequenz wird kurz nachdem sie aus dem mRNA-Ribosom-Komplex herausragt, von einem *signal recognition particle* (SRP) gebunden. Der SRP besteht aus sechs Proteinen, die an einer 7S-tRNA assembliert sind (WALTER, 1982). Die Bindung des SRP bewirkt eine Verlangsamung der mRNA-Translation (WALTER, 1981). Der Mechanismus ist bei Proteinen

mit Signalpeptid und Signalanker-Sequenzen prinzipiell ähnlich, jedoch schreitet im Falle einer Signalanker-Sequenz die Translation solange voran, bis diese synthetisiert ist, d.h. der N-Terminus wird hier im Cytosol erzeugt. Der mRNA-Ribosom-SRP-Komplex wird daraufhin zur ER-Membran geleitet. Dieses so genannte ER-Targeting wird durch das Signalpeptid bzw. die Signal-Anker-Sequenz und dem SRP vermittelt. Der Komplex bindet GTP-abhängig an den SRP-Rezeptor, der mit dem Translokon assoziiert ist. Die Hauptkomponente des Translokons ist der protein-leitende Kanal des Proteins-Trimers Sec61. Nachdem der SRP durch GTP-Hydrolyse von dem entstandenen Komplex dissoziiert, wird das Signalpeptid in Form einer Haarnadel in das Translokon eingefädelt und gebunden. Durch diese Bindung wird das Translokon geöffnet und die Translation startet erneut. Die wachsende Polypeptidkette wird im Falle von Membranproteinen seitlich aus dem Sec61-Kanal entlassen und in die ER-Membran integriert (DALBEY, 1992). Ist ein Signalpeptid vorhanden, wird dieses während der Translokation von Signalpeptidasen abgespalten (MARTOGLIO, 1998).

1.3. Posttranslationale Modifikationen und Qualitätskontrolle im ER

Die Polypeptidkette kann während oder nach Translokation des Proteins über oder in die ER-Membran vielfältig modifiziert werden. Hierzu gehört die Knüpfung von Disulfidbrücken zwischen Cysteinmolekülen durch Protein-Disulfid-Isomerasen (PDI). Diese Disulfidbrücken können solange geknüpft und gelöst werden, bis das Protein die energetisch günstigste Faltung erreicht (GILBERT, 1997).

Die mannosereiche N-Glykosylierung ist eine weitere wichtige Modifikation, die Proteine im ER erfahren (SILBERSTEIN, 1996). Durch die Oligosaccharyltransferase (OST) wird ein vorgefertigter Oligosaccharylrest (14 Zuckerreste: 2x N-Acetylglucosamin, 9x Mannose, 3x Glucose) im Block auf einen Asparagin-Rest des Proteins übertragen. Im Laufe der Proteinreifung vom ER zum Golgi-Apparat wird diese Grundstruktur zu einer so genannten komplexen Glykosylierung modifiziert (mit N-Acetyl-Glucosamin, N-Acetyl-Neuraminsäure und Galactose).

Die Glykosylierung beeinflusst Proteinsortierung, -sekretion und den Proteinabbau, ist aber auch für die Ausbildung einer korrekten Proteinfaltung essentiell (HELENIUS, 2004). Glykolisierungen lassen das Qualitätskontrollsystem des ER fehlgefaltete Proteine erkennen.

Nur vollständig und richtig gefaltete Proteine sind in der Lage, über den sekretorischen Weg, das ER, ERGIC und Golgi-Apparat, zu ihrem Funktionsort zu gelangen. Fehlgefaltete Proteine werden durch die Qualitätskontrollmaschinerie retiniert. Diese Qualitätskontrolle ist hauptsächlich im ER lokalisiert, erstreckt sich aber anscheinend auch über das ERGIC bis zum Golgi-Apparat (OUESLATI, 2005). Sind Proteine fehlgefaltet, können sie nicht in den vesikulären Transport eintreten und werden über den so genannten ERAD-Weg (**ER associated degradation**) abgebaut. Dabei wird das fehlgefaltete Protein aus dem ER zurück in das Cytosol transportiert und nach Ubiquitinylierung im Proteasom degradiert (AHNER, 2004). Bei Glykoproteinen wie GPCR spielen die Lektin-Chaperone Calnexin (CNX, membrangebunden) und Calretikulin (CRT, ER-Lumen) im Rahmen der Qualitätskontrolle eine große Rolle. Nach der oben beschriebenen N-Glykosylierung durch Übertragung eines Oligosaccharylrestes mit drei endständigen Glukose-Molekülen, wird zunächst durch Deglukosylierung durch die Glukosidasen I und II eine monoglykosylierte Form gebildet. Diese werden spezifisch durch CNX und/oder CRT erkannt (SCHÜLEIN, 2004). Die Bindung von CNX und CRT wird dagegen gelöst, wenn auch der dritte Glukose-Rest durch die Glykosidase II abgespalten wird. Wenn das Protein nun in seiner nativen Form vorliegt, ist es ihm möglich, das ER zu verlassen. Wenn es jedoch seinen korrekten Faltungsstatus noch nicht erreicht hat und dadurch hydrophobe Regionen exponiert werden, überträgt die UDP-Glukose:Glykoprotein-Glucosyltransferase (UGGT) erneut ein Glukosemolekül auf das fehlgefaltete Protein. Da nun wieder ein monoglykosyliertes Protein entstanden ist, wird es erneut von CNX und CRT erkannt, wodurch der Aufenthalt im ER verlängert wird. Nach mehrmaligem Durchlaufen dieses so genannten CNX-Zyklus' kann das Protein seinen korrekten Faltungsstatus erreichen und dadurch das ER verlassen. Ist es dem Protein dagegen nicht endgültig möglich, seinen nativen Zustand auszubilden, wird es über den ERAD-Weg abgebaut.

1.4. Aktivierung von GPCR

Hat der Rezeptor die Zelloberfläche durch den intrazellulären Transport erreicht, kann er ein von außen auf die Zelle einwirkendes Signal in die Zelle weiterleiten (NEER, 1995). Die Bindung eines Liganden (*first messenger*) an einen membranständigen Rezeptor stimuliert oder inhibiert je nach assoziiertem G-Protein im Zellinneren die Bildung von *second messengern*, die nachfolgend spezifische Zellantworten auslösen. Die wichtigsten *second messenger* gehören zu folgenden Substanzgruppen: zyklische Nucleotidmonophosphate (wie cAMP und cGMP), Derivate von Inositolphospholipiden (wie Inositoltriphosphat (IP₃) und Diacylglycerol (DAG)), Stickstoffmonoxid (NO) und Ionen wie Ca²⁺.

Die Bindung des Agonisten an einen membranständigen GPCR verursacht eine Konformationsänderung vom inaktiven zum aktiven Zustand. Dadurch wird seine Affinität für G-Proteine erhöht, die GTP gebunden haben. Durch Hydrolyse von GTP zu GDP, die von den G-Proteinen selbst katalysiert wird, werden die G-Proteine wieder inaktiviert. Heterotrimere G-Proteine bestehen aus α -, und $\beta\gamma$ -Untereinheiten, von denen jeweils mehrere Isoformen bekannt sind. G α kommt in den Isoformen G α_s , G α_i , G α_q und G $_{12/13}$ vor. G α_s (als „stimulierendes“ G-Protein) erhöht die Aktivität der membranständigen Adenylylcyclase (AC). G α_i („inhibitorisches“ G-Protein) hat den gegenteiligen Effekt. G α_q aktiviert dagegen die Phospholipase C. Auch die $\beta\gamma$ -Untereinheiten werden in Klassen eingeteilt und können z.B. über Inhibierung der AC oder Aktivierung von Phospholipasen Signaltransduktionsprozesse aktivieren.

Die AC cyclisiert ATP unter Abspaltung von Diphosphat zu cAMP. Das cAMP wiederum aktiviert die Proteinkinase A, ein Tetramer aus zwei Homo-Dimeren (zwei regulatorische und zwei katalytische Untereinheiten). Durch Bindung an die regulatorischen Untereinheiten der Proteinkinase A dissoziieren diese von den katalytischen Untereinheiten. Letztere vermitteln die Phosphorylierung verschiedenster Proteine, wie Enzyme und Transkriptionsfaktoren. Die cytosolische cAMP-Konzentration hängt zum einen von der Syntheserate durch die AC ab, aber auch von der Abbaurate durch die Phosphodiesterase (PDE). Die PDE wiederum ist vom Ca²⁺-Spiegel abhängig, wird aber auch durch z.B. Methylxanthine inhibiert. So kann die Zelle ein Gleichgewicht einstellen und dementsprechend die Zellantwort regulieren.

Weitere *second messenger*, deren Bildung durch G α_q stimuliert wird, sind Inositoltriphosphat (IP₃) und Diacylglycerol (DAG). Beide werden aus dem zweifach phosphorylierten

Membranlipid Phosphatidyl-Inositol-bisphosphat mit Hilfe der Phospholipase C gebildet. Das hydrophile IP_3 wandert zum ER und bewirkt dort die Freisetzung von Ca^{2+} . Das lipophile DAG verbleibt in der Membran und aktiviert die Proteinkinase C, die wiederum durch Phosphorylierung diverser Proteine spezifische Zellantworten bewirkt.

1.5. Desensibilisierung, Internalisierung und Recycling von GPCR

Durch Ligandenbindung werden die Rezeptoren und in der Folge Signaltransduktionsprozesse aktiviert, die die Zelle adäquat auf den Stimulus reagieren lassen. Nach der Aktivierung der Rezeptoren erfolgt deren Desensibilisierung, um die zellulären Effekte zeitlich zu begrenzen und die Zellen vor Reizüberflutung zu schützen.

Die Phosphorylierung der ligandenbesetzten Rezeptoren durch GRK *G-Protein coupled receptor kinase* (GRK) bewirkt die Abkopplung der assoziierten G-Proteine und verhindert die weitere Stimulation (BÖHME, 2009). Die Signaltransduktion kann außerdem durch die Verringerung der Rezeptordichte an der Plasmamembran durch Internalisierungsprozesse beendet werden.

Es sind drei Wege der Rezeptor-vermittelten Internalisierung beschrieben: die Clathrin-abhängige Internalisierung, die Caveolin-abhängige Internalisierung und die Clathrin- und Caveolin-unabhängige Internalisierung durch *lipid rafts*. Der am besten untersuchte Internalisierungsweg der GPCR ist die Clathrin-vermittelte Internalisierung, auf die hier genauer eingegangen werden soll.

1.5.1. Clathrin-abhängige Internalisierung

Der Internalisierungsprozess ist in *Abbildung 1.5* schematisch dargestellt.

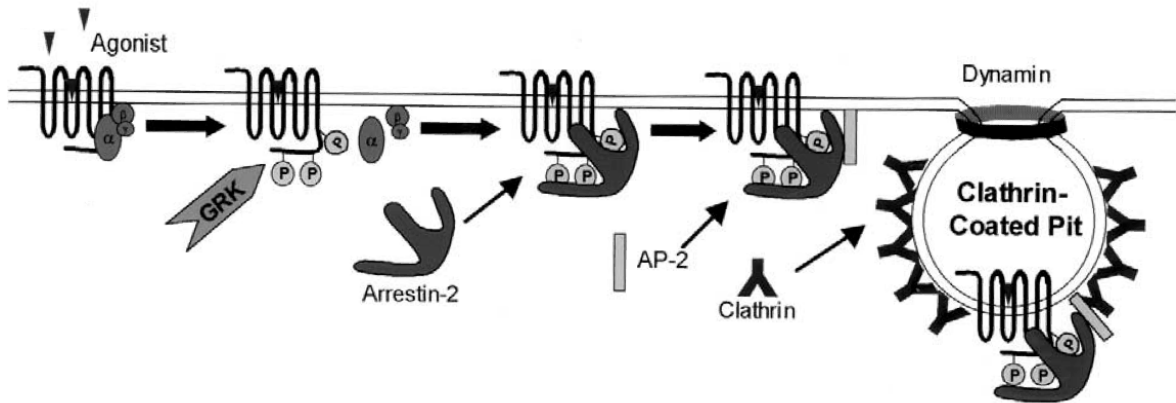


Abbildung 1.5 Schematische Darstellung der Clathrin-abhängigen Internalisierung

Nach Bindung des Agonisten wird der Rezeptor durch GRK phosphoryliert. Dadurch wird die Interaktion von β -Arrestinen möglich und es folgt die Bindung des Adapter-Protein 2 (AP-2). Dieser Komplex ermöglicht die Assemblierung von Clathrin. Die entstehenden *clathrin coated pit* werden von der GTPase Dynamin abgeschnürt (nach GRAY, 2001).

Voraussetzung für die Internalisierung ist die vorangehende aktivierungsbedingte Konformationsänderung des Rezeptors durch Bindung eines Agonisten. Dadurch kommt es zur Phosphorylierung an konservierten Serin- und Threoninresten durch die GRK und die Bindung von β -Arrestinen wird eingeleitet (OAKLEY, 2001). β -Arrestin kann nach Interaktion mit dem phosphorylierten Rezeptor das heterotetramere Adapter-Protein 2 (AP-2) binden. Dieses besteht aus zwei großen α - und β 2-Untereinheiten, einer μ 2-Untereinheit und einer kleineren σ 2-Untereinheit (KIRCHHAUSEN, 1999, ROBINSON, 2001). Die α -Untereinheit besitzt Bindungsstellen für Clathrin und Dynamin. β 2 hat eine essentielle Funktion bei der *clathrin-coat*-Bildung, kann aber auch C-terminale Internalisierungsmotive von Rezeptoren erkennen (KIRCHHAUSEN, 1999), wie Dileucin-Motive (LL) und Tyrosin-basierte Motive (NPXY oder YXX Φ ; X: beliebige Aminosäure, Φ : Aminosäure mit großem, hydrophoben Rest). Bei der β -Arrestin-unabhängigen Internalisierung spielen diese Motive eine große Rolle, da hierdurch eine direkte Bindung von AP-2 an den Rezeptor möglich wird.

AP-2 kann Clathrin-Moleküle assemblieren und stellt somit die Verbindung zu diesen her. Clathrin ist ein triskelionförmiges Protein, das aus drei leichten und drei schweren Ketten besteht. Durch die Assemblierung von Clathrin bilden sich zunächst Einschnürungen in der Plasmamembran (*clathrin coated pits*), die durch die GTPase Dynamin als *clathrin coated vesicles* in das Cytoplasma abgeschnürt werden. Dynamin wird in der GDP-gebundenen Form zur Plasmamembran dirigiert. Der Austausch von GDP zu GTP führt zur Selbstassemblierung vieler Dynamin-Moleküle am „Hals“ des entstehenden Vesikels und durch die Konformationsänderung des Dynamins durch GTP-Hydrolyse kann sich das Vesikel von der Plasmamembran lösen.

Die abgeschnürten Vesikel werden als frühe Endosomen bezeichnet (*LUZIO, 2001*). Durch den erniedrigten pH-Wert in den frühen Endosomen kann der Ligand vom Rezeptor dissoziieren. Der freie Rezeptor kann durch Abschnüren von Vesikeln aus dem Endosom zur Plasmamembran recycelt werden (*CAVALLI, 2001*). Es ist aber auch möglich, dass der Rezeptor direkt nach der ersten Ligandenbindung der Degradation zugeführt wird (*TREJO, 1999*). In diesem Fall wird durch V-ATPasen (vakuoläre H⁺-ATPasen) der pH-Wert weiter abgesenkt (pH 5-6), wodurch Proteasen aktiviert werden. Durch Verschmelzen dieser so genannten späten Endosomen mit Lysosomen, deren pH-Wert erneut niedriger ist, ist die Zelle in der Lage, einen vollständigen Abbau der Rezeptoren zu erreichen.

Zusätzlich zur agonisten-induzierten Internalisierung kommt es auch bei allen Rezeptoren zur konstitutiven Internalisierung, einem stetigem, vom Agonisten unabhängigen *Turnover* des Rezeptor-pools an der Plasmamembran.

1.5.2. β -Arrestine und ihre Rolle bei der Internalisierung

Den Arrestinen, von denen verschiedene Varianten bekannt sind, kommt bei der Internalisierung eine Schlüsselrolle zu. „Visuelles Arrestin“ und „Zapfen-Arrestin“ werden ausschließlich in der Retina, β -Arrestin 1 und 2 dagegen ubiquitär exprimiert (*FERGUSON, 2001*). β -Arrestine binden spezifisch an aktivierte und durch GRK phosphorylierte GPCR. Sie liegen gleichmäßig im Cytosol verteilt vor und werden nach Stimulierung der Rezeptoren an die Plasmamembran rekrutiert, wodurch die Internalisierung ausgelöst wird (*GROAKE, 1999*).

β -Arrestin 1 und 2 bestehen aus zwei miteinander über polare Kernregionen verbundene Hauptdomänen, der N- und C-Domäne. Diese bestehen jeweils aus sieben β -Strängen und besitzen spezifische Bindungsmotive für weitere Adapter-Proteine und Phosphorylierungsstellen (LUTTRELL, 2002). Die Bindung des phosphorylierten Rezeptors an die Kernregion führt zu einer Konformationsänderung im β -Arrestin-Molekül, wodurch Bindungsstellen für die Interaktion mit AP-2 und Clathrin frei werden.

Nach ihrer Affinität zu β -Arrestinen werden GPCR in 2 Gruppen eingeteilt (TOHGO, 2003). Gruppe 1 bindet β -Arrestin 2 mit höherer Affinität als β -Arrestin 1. Dieser β -Arrestin-Rezeptor-Komplex ist jedoch relativ instabil und dissoziiert während oder kurz nach der Internalisierung. Durch die schnelle Dissoziation des β -Arrestins enthalten die Vesikel bei der Fusion mit den frühen Endosomen kein β -Arrestin mehr, und können dadurch schnell zur Plasmamembran recycelt werden. Vertreter dieser Gruppe sind z.B. der β_2 -adrenerge Rezeptor und der Endothelin-A-Rezeptor. Der anderen Gruppe werden Rezeptoren zugerechnet, die annähernd gleiche Affinität zu β -Arrestin 1 und 2 haben und mit diesen stabilere Komplexe bilden. Diese β -Arrestin-Rezeptor-Komplexe können bis zu 4 Stunden in den fusionierten Endosomen verbleiben, wodurch ein Recyceln zur Plasmamembran erheblich verzögert wird. Zu dieser Gruppe gehören zum Beispiel der Angiotensin-1a-Rezeptor, der Neurokininrezeptor und der Vasopressin-V2-Rezeptor.

Bei einigen Rezeptoren wurde auch eine β -Arrestin-unabhängige Internalisierung beschrieben. Dazu gehören z.B. der Sekretin-Rezeptor (WALKER, 1999), der 5-HT_{2a}-Rezeptor (BHATNAGAR, 2001) und die muskarinergen M1-, M2-, M3- und M4- Rezeptoren (LEE, 1998; VAN KOPPEN, 2003). Es wird diskutiert, dass hier andere Adapter-Proteine wie AP-2 oder GRK an der Clathrin-Bindung beteiligt sind.

Neben ihrer Rolle bei der Internalisierung können β -Arrestine auch in der Aktivierung von Signalkaskaden eine Rolle spielen (TERRILLON, 2004).

Das erste Ziel dieser Arbeit war es, den Internalisierungsmechanismus von *Corticotropin-Releasing-Factor*-Rezeptoren, insbesondere die Involvierung von β -Arrestinen, zu untersuchen. Diese Rezeptoren sollen deshalb im Folgenden vorgestellt werden.

1.6. Corticotropin-Releasing-Factor-Rezeptoren

1.6.1. Expression und physiologische Bedeutung

Von den *Corticotropin-Releasing-Factor*-(CRF)-Rezeptoren (CRFR) sind drei Isoformen bekannt, der CRF₁-Rezeptor, CRF₂-Rezeptor und der CRF₃-Rezeptor (HAUGER, 2003). Der CRF₃R wurde bisher nur aus dem Wels kloniert (ARAI, 2001). Die in dieser Arbeit untersuchten CRF₁R und CRF_{2a}R, gehören zu der Familie B der GPCR (DAUTZENBERG, 2001, HAUGER, 2003).

Der CRF₁R wird im gesamten Zentralnervensystem (u.a. Cortex, Cerebellum, Hippocampus, Amygdala, Hypophyse) exprimiert (CHALMERS, 1995) und ist insbesondere in der Hypophyse an regulatorischen Prozessen beteiligt. Der CRF_{2a}R kommt ebenfalls im ZNS vor (PERRIN, 1999), dort aber nur in bestimmten Regionen (laterales Septum, Hypothalamus, Amygdala, Plexus choroideus). Er wird vorwiegend im peripheren Nervensystem, im Herz- und im Skelettmuskel exprimiert.

Die hauptsächliche physiologische Bedeutung der CRF-Rezeptoren liegt in der Stressregulation. Die so genannte Stress- oder HPA-Achse (*hypothalamic pituitary adrenal axis*, *Abbildung 1.6*) besteht aus dem Zusammenspiel von Hypophyse, Hypothalamus, der Nebennierenrinde und diversen Endorganen.

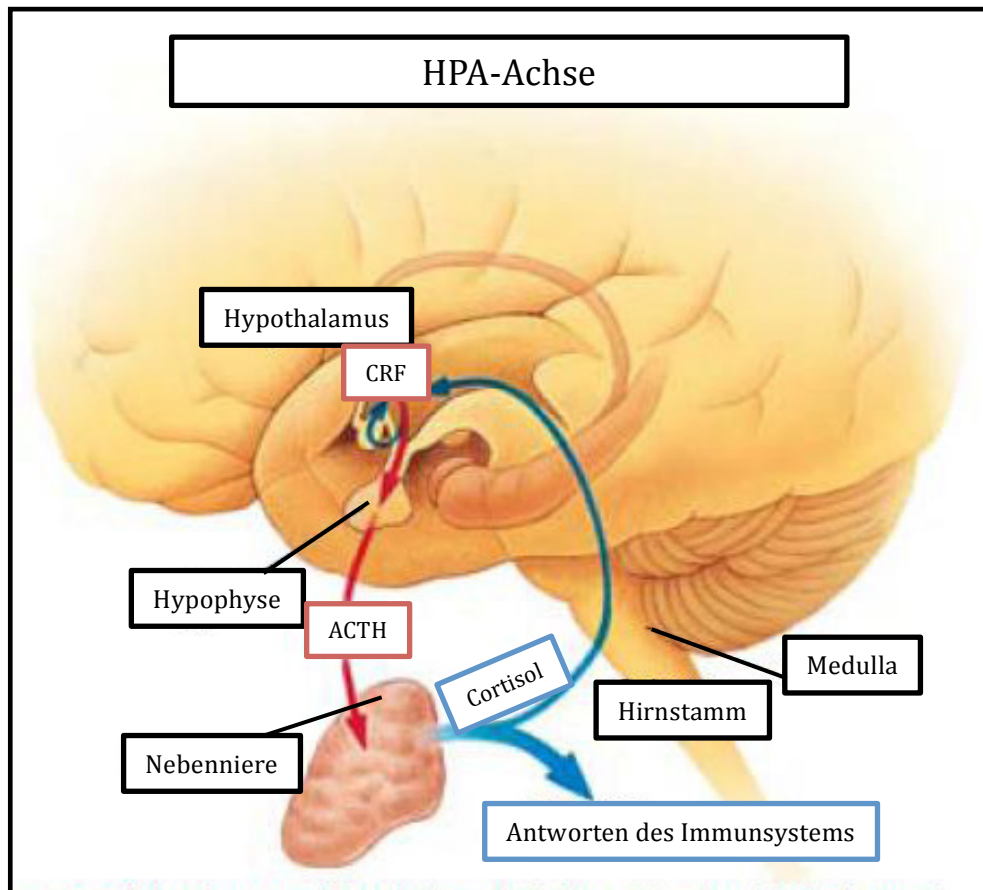


Abbildung 1.6 Schematische Darstellung der HPA-Achse

Unter Stressbedingungen wird CRF aus hypothalamären Zellen freigesetzt. CRF bindet an den CRF_1R , der in der Hypophyse exprimiert wird. Dies bewirkt die Ausschüttung von ACTH, das in der Nebenniere die Freisetzung von Cortisol induziert. Cortisol leitet die systemische Antwort des Körpers u.a. über das Immunsystem ein. Des Weiteren hemmt Cortisol über einen negativen Rückkopplungsmechanismus die Freisetzung von CRF und ACTH. (Grafik nach www.uibk.ac.at/pharmazie)

Nachdem CRF (*Corticotropin-Releasing-Factor*) von hypothalamären Zellen durch Stress-Stimuli freigesetzt wurde, bindet das Hormon an den CRF_1R , der in ACTH-freisetzenden hypophysären Zellen exprimiert wird. Das aus dem POMC-Gen prozessierte adrenocorticotropische Hormon (ACTH) wird durch die rezeptorinduzierte Signalkaskade freigesetzt und über die Blutbahn zur Nebennierenrinde transportiert, wo es eine endokrine Freisetzung von Glukocorticoiden (Cortisol, Corticosteron) bewirkt. Die weitere Freisetzung von Stressmetaboliten lässt die verschiedenen Gewebe auf den akuten Stress reagieren. Durch die gewebsspezifische Verteilung der CRF-Rezeptoren wird eine große Diversität von Antwortreaktionen erreicht. Das freigesetzte Cortisol hemmt über einen negativen Rückkopplungsmechanismus die weitere Sekretion von CRF und ACTH. Somit ist eine

Homöostase der beteiligten Faktoren gewährleistet, die von entscheidender Bedeutung für die Regulation der Stressantwort ist.

Viele Arbeiten deuten darauf hin (HOLSBOER, 1999), dass z.B. bei Depressionen dieses feine Gleichgewicht gestört sein kann. So wird CRF normalerweise nur in Gefahrensituationen ausgeschüttet, seine Freisetzung aber sofort kontrolliert und reguliert. Bei einem depressiven Syndrom kann jedoch CRF auch schubweise freigesetzt werden und der Patient somit unter „Dauerstress“ geraten. Aufgrund dieser psychopathologischen Bedeutung ist die Suche nach zentral-wirksamen CRF-Antagonisten inzwischen von erheblicher pharmakologischer Relevanz. Erste Substanzen sind bereits Gegenstand klinischer Studien zur Behandlung des depressiven Syndroms (Review HOLSBOER, 2008).

1.6.2. CRF-Rezeptor-Subtypen und Splice-Varianten

Für den CRF₁-Rezeptor sind mehrere, zusätzliche putative Splice-Varianten beschrieben (GRAMMATOPOULOS, 1999), die jedoch keine Ligandenbindungsaffinität und/oder Signaltransduktion aufweisen, daher also nicht den internationalen Richtlinien der Zuordnung von Splice-Varianten genügen (HAUGER, 2003). Nur der CRF_{1a}R ist funktionell. Im Gegensatz dazu sind von dem CRF₂-Rezeptor drei funktionelle Splice-Varianten bekannt, der CRF_{2a}R, CRF_{2b}R und CRF_{2c}R (LOVENBERG, 1995). Die C-terminalen Bereiche der CRF₂-Rezeptoren sind untereinander ausgeprägt homolog, die N-Termini weichen dagegen stark voneinander ab.

Die in dieser Arbeit untersuchten CRF₁R und CRF_{2a}R weisen eine Homologie von 70% auf (LOVENBERG, 1995). Die höchste Sequenzhomologie besteht in den Transmembranbereichen und den intrazellulären Domänen der Rezeptoren (> 85%). Die dritten intrazellulären Schleifen des CRF₁R und des CRF_{2a}R sind identisch (HILLHOUSE, 2002) und spielen bei der G-Protein-Kopplung eine entscheidende Rolle. Die Sequenzhomologie zwischen einzelnen Spezies beträgt über 80%. In den intrazellulären Schleifen der Rezeptoren sind putative Phosphorylierungsstellen vorhanden, die die Rezeptoraktivität beeinflussen können. Des Weiteren befinden sich im N-terminalen Bereich jeweils fünf N-Glykosylierungsstellen, im Falle des CRF₁R an Position N38, N45, N78, N90 und N98, beim CRF_{2a}R an Position N13, N41, N74, N86 und N94 (ASSIL, 2001; HOFMANN, 2001). Jeweils sechs Cysteinreste im N-Terminus

und im extrazellulären Bereich und die daraus gebildeten Disulfidbrücken unterstützen neben der korrekten Faltung des Rezeptors die Ausbildung und Stabilisierung der Ligandenbindungstasche.

1.6.3. Liganden der CRF-Rezeptoren

Der endogene Ligand des CRF₁R ist das aus 41 Aminosäuren bestehende Peptid CRF, jedoch binden auch Urocortin I (aus Säugern), Urotensin I (aus Fischen) und Sauvagine (aus Fröschen) mit hoher Affinität (HAUGER, 2003). Urocortin II und III wurden als endogene Liganden des CRF_{2a}R identifiziert. Zusätzlich binden Urotensin I, Sauvagine und Urocortin I mit hoher Affinität. CRF bindet dagegen mit einer ungefähr 100-fach niedrigeren Affinität als die spezifischeren Liganden an den CRF_{2a}R.

Inwieweit N-terminale Sequenzen der CRF-Rezeptoren - außer für die Ausbildung der Bindungstasche - weitere Funktionen haben, wurde in unserer Arbeitsgruppe untersucht.

1.6.4. Das Pseudosignalpeptid des CRF_{2a}R

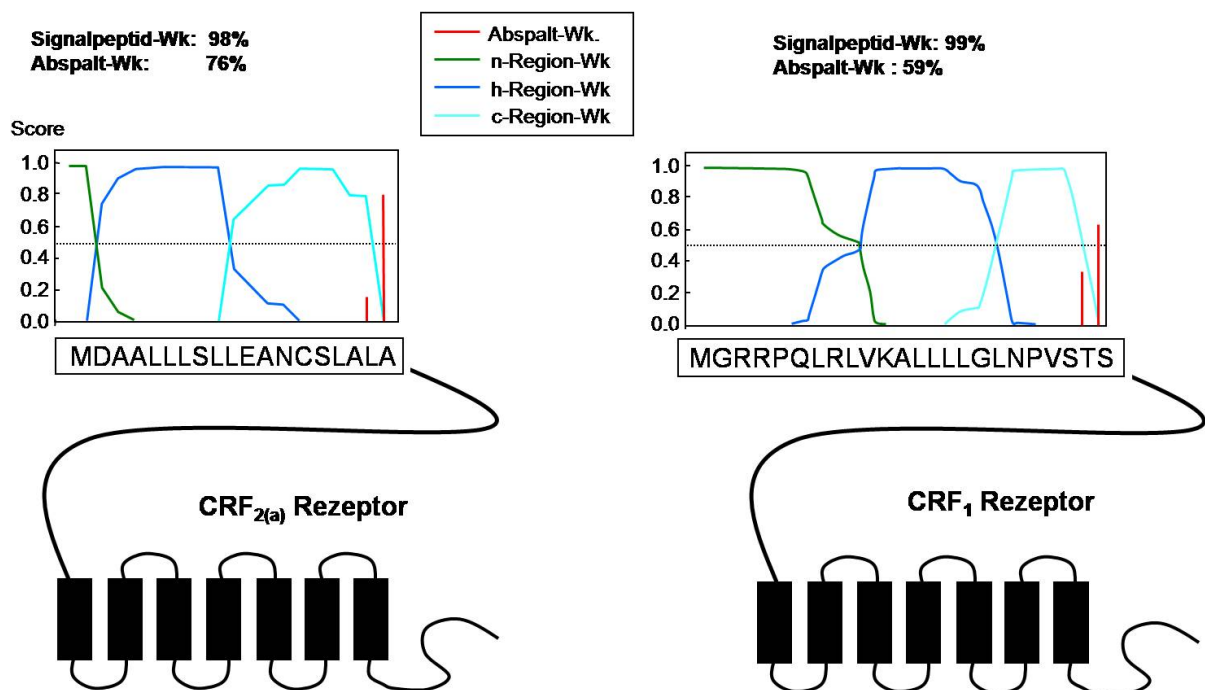


Abbildung 1.7 Grafische Darstellung der N-terminalen Rezeptorsequenzen der CRFR

Die Daten wurden mit dem Programm SignalP 3.0 (BENDTSEN, 2004) gewonnen. Die N-terminalen Aminosäuresequenzen des CRF_{2a}R und CRF₁R sind unter der Grafik im Einbuchstaben-Code angegeben. Für

jeden Rezeptor sind die Wahrscheinlichkeiten des Vorhandenseins eines Signalpeptids und dessen Abspaltung angezeigt. Das Signalpeptid besitzt folgende charakteristische Domänen: eine hydrophobe Kerndomäne (h, blau) und flankierende N-(n, grün) und C-terminale polare Domänen (c, türkis).

Sowohl der CRF_{2a}R als auch der CRF₁R besitzen typische putative Signalpeptidsequenzen (*Abbildung 1.7*), die einen spezifischen Aufbau zeigen: Eine hydrophobe Kerndomäne wird von N- und C-terminalen Bereichen flankiert, die polare Aminosäurereste enthalten. Essentiell für die Abspaltung des Signalpeptids durch Signalpeptidasen sind kleine, ungeladene Aminosäurereste an den Positionen -1 und -3 der Spaltungsstelle (*VON HEIJNE, 1990*). Alle typischen Signalpeptideigenschaften sind bei beiden Rezeptoren vorhanden. Das Signalpeptidvorhersageprogramm *SignalP 3.0* (*BENDTSEN, 2004*) zeigt eine höhere Abspaltwahrscheinlichkeit für das Signalpeptid des CRF_{2a}R als für das des CRF₁R an.

Wir konnten jedoch zeigen, dass das Signalpeptid des CRF_{2a}R nicht abgespalten wird (*RUTZ, 2006*). In folgendem Western Blot (*Abbildung 1.8*) wurden die GFP-fusionierten, deglykosylierten Konstrukte der beiden Rezeptorsubtypen und ihrer Signalpeptiddeletionsmutanten aufgetragen und über GFP-Antikörper detektiert.

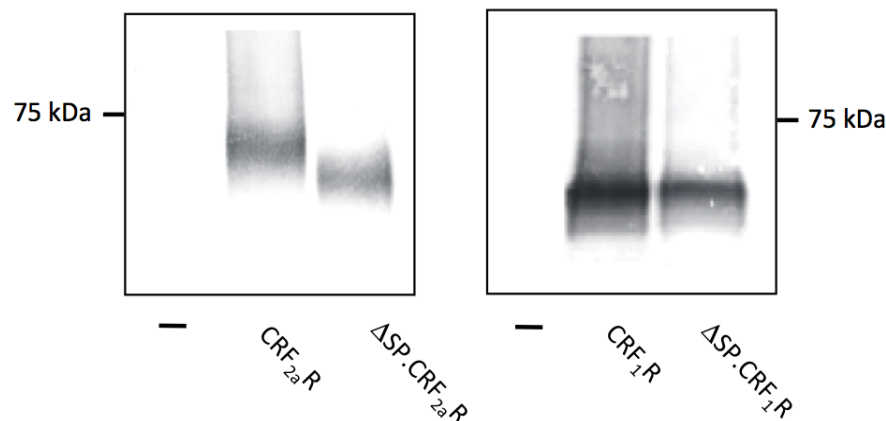


Abbildung 1.8 Untersuchung der Signalpeptid-Abspaltung beim CRF_{2a}R und CRF₁R

Nach einer Immunpräzipitation der Konstrukte CRF_{2a}R.GFP und CRF₁R.GFP wurden diese mit PNGaseF deglykosyliert und zusammen mit ihrer jeweiligen Signalpeptiddeletionsmutante Δ SP.CRF_{2a}R.GFP bzw. Δ SP.CRF₁R.GFP mit Hilfe einer hoch-auflösenden SDS-PAGE aufgetrennt und mit einem monoklonalen GFP-Antikörper detektiert (*RUTZ, 2006*).

Im Gegensatz zum CRF₁R zeigt sich beim CRF_{2a}R und seiner Signalpeptiddeletionsmutante ein Größenunterschied. Würde das Signalpeptid des CRF_{2a}R abgespalten werden, müsste dieser die gleiche Größe aufweisen wie die Deletionsmutante. Beim CRF₁R ist dies der Fall, d.h. hier wurde das Signalpeptid abgespalten. Mit diesen und weiteren Experimenten konnte gezeigt werden, dass der CRF_{2a}R über ein sogenanntes Pseudosignalpeptid verfügt, das eine zusätzliche hydrophobe Domäne im N-Terminus des Rezeptors bildet. Es konnte ferner gezeigt werden, dass diese Domäne höchstwahrscheinlich über eine N-Glykosylierung löslich gehalten wird und durch eine eingeführte Punktmutation (N13A) in ein konventionelles, abspaltbares Signalpeptid umgewandelt werden kann (RUTZ, 2006).

1.7. Zielstellung der Arbeit

Das Pseudosignalpeptid des CRF_{2a}R stellt in der GPCR-Familie eine einzigartige Domäne dar (RUTZ, 2006).

Im ersten Teil der vorliegenden Arbeit sollte der unbekannte Internalisierungsmechanismus des CRF_{2a}-Rezeptors untersucht werden. Es stellte sich die Frage, inwieweit das Pseudosignalpeptid des CRF_{2a}R einen Einfluss auf das Internalisierungsverhalten hat.

Im zweiten Teil sollte die funktionelle Bedeutung des Pseudosignalpeptids des CRF_{2a}R in Bezug auf Transport und Rezeptoraktivierung untersucht werden.

2. MATERIAL UND METHODEN

2.1. Material

2.1.1. Chemikalien und Reagenzien

[¹²⁵ I]cAMP-Tyrosylmethylester (81,4 TBq/mmol)	Biotrend Chemikalien GmbH, D
[¹²⁵ I]Tyr ⁰ -Sauvagine	PerkinElmer LAS GmbH, D
1kb DNA-Leiter	Gibco, D
2-Mercaptoethanol	Carl Roth GmbH & Co. KG, D
8-Arginin-Vasopressin (AVP)	AG Beyermann, Leibniz-Institut für Molekulare Pharmakologie (FMP), Berlin, D
ABI PRISM™ Dye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kit	Perkin Elmer, USA
Acrylamid-Bisacrylamidlösung (30% / 0,8%)	Carl Roth, D
Agar	Life Technologies, D
Agarose	Life Technologies, D
Albumin, Rind	Sigma Aldrich Chemie GmbH, D
Ammoniumperoxodisulfat (APS)	Fluka Chemie AG, CH
Ampicillin Natriumsalz	Sigma Aldrich Chemie GmbH, D
Aprotinin (aus Rinderlunge)	Merck, D
Bacitracin	Sigma Aldrich Chemie GmbH, D
Benzamidin	Sigma Aldrich Chemie GmbH, D
<i>BigDye Terminator v3.0 Kit</i>	Applied Biosystems Inc., USA
Corticotropin	AG Beyermann, Leibniz-Institut für Molekulare Pharmakologie (FMP), Berlin, D
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Sigma Aldrich Chemie GmbH, D
dNTP-Mix, 10 mM	Fermentas GmbH, D

Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM)	Sigma Aldrich Chemie GmbH, D
Endoglykosidasen	New England Biolabs GmbH, D
Ethidiumbromid	Carl Roth GmbH & Co. KG, D
Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA)	Carl Roth, D
EZ-Link™ Sulfo-NHS-Biotin	Perbio Science Deutschland GmbH, D
Fetales Kälberserum (FKS)	Invitrogen GmbH, D
G418 Sulfat (Geneticin)	Calbiochem, Merck KGaA, D
Hefeextrakt	Life Technologies, D
Hoechst 33258	Invitrogen, D
Kanamycin (Kanamycin A) Monosulfat	Sigma Aldrich Chemie GmbH, D
<i>Lipofectamine2000™ Reagent</i>	Invitrogen GmbH, D
<i>LumiLight Western Blotting Substrate</i>	Roche Diagnostics GmbH, D
Myo-[2-3H]-Inositol (37 MBq/ml)	Amersham Biosciences Europe GmbH, D
N,N,N',N'-Tetramethylethyldiamin (TEMED)	Sigma Aldrich Chemie GmbH, D
Natriumdodecylsulfat (SDS)	Carl Roth, D
Nitrozellulose (OPTITRAN BA-S 85)	Schleicher & Schuell GmbH, D
<i>NucleoBond Plasmid Kit</i>	Macherey-Nagel GmbH & Co. KG, D
<i>NucleoSpin Extract Kit</i>	Macherey-Nagel GmbH & Co. KG, D
Penicillin/Streptomycin	Sigma Aldrich Chemie GmbH, D
Peptone 140	Life Technologies, D
Phenylmethylsulfonylfluorid (PMSF)	Sigma Aldrich Chemie GmbH, D
p-Nitro-Tetrazolium-Blau-Chlorid	Carl Roth GmbH & Co. KG, D
Poly-L-Lysin	Sigma Aldrich Chemie GmbH, D
Ponceau S, reinst	Boehringer Ingelheim Bioproducts Partnership, D
Prestained Protein Marker, Broad Range (6-175 kDa)	New England BioLabs GmbH, D
Protein-A-Sepharose	Sigma Aldrich Chemie GmbH, D
<i>QuickChange™ Site-directed</i>	Stratagene Europe, NL

<i>Mutagenesis Kit</i>		
Restriktionsendonukleasen		New England Biolabs GmbH, D
RotiLoad, 4fach konzentriert		Carl Roth GmbH & Co. KG, D
Rotiphorese®-Gel 30 (37,5:1), Acrylamid- und Bisacrylamidstammlösung		Carl Roth GmbH & Co. KG, D
Sauvagine		AG Beyermann, FMP, Berlin, D
Streptomycin		Sigma Aldrich Chemie GmbH, D
Trypanblau		Seromed GmbH, A
Trypsin		Carl Roth GmbH & Co. KG, 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).

2.1.2. Geräte

Automatisches Mikroskop	Axiovert 200M, Carl Zeiss Jena, D
Autoklav	Varioklav Dampfsterilisator Typ 500 EP-Z, H+P Labortechnik, D
Blotkammern	Mini-PROTEAN® 3 Western TransBlot, Bio-Rad Laboratories GmbH, D
Brutschrank	Cellsafe, Integra Biosciences, 5% CO ₂ , 37°C Jonan, 5G 150 New Brunswick Sciences, Innova 4230
Durchlichtmikroskop	TELAVAL Carl Zeiss Jena, D
Sterilbank	BDK, Luft- und Reinraumtechnik GmbH
Elektrophoresekammern	Mini-PROTEAN® 3 Cell, Bio-Rad Laboratories GmbH, D PerfectBlue Gelsystem Mini L, PeqLab Biotechnologie

	GmbH, D
Elektroporationsgerät	GenePulser Xcell Electroporation System, Bio-Rad Laboratories GmbH, D
Fluorimeter	Odyssey® Infrared Imaging System, LI-COR® Biosciences, USA
Geldokumentationssysteme	Molecular Imager Gel Doc XR System, Bio-Rad Laboratories GmbH, D Lumilimager F1TM, Boehringer Mannheim GmbH, D
Kühltruhe	New Brunswick Scientific, -85°C Ultra Low Freezer
Labormikroskop	Zeiss Axiovert 40, Carl Zeiss MicroImaging GmbH, D
Laser Scanning-Mikroskop (LSM)	LSM 510 META, Carl Zeiss MicroImaging GmbH, D
Mikroinjektionsspritze	700 series syringe, Hamilton Co., CH
pH-Meter	HI9321 Microprocessor pH-Meter, HANNA instruments Deutschland GmbH, D
Photometer	Gene Quant II, Pharmacia
Pipetten	Gilson
Pipettierhilfe	Pipetboy, Integra Biosciences GmbH, D
Power Supply	Hoefer, EP 2A200 Bio-Rad, PowerPack 3000
Reinstwasseranlage	Typ MilliQ plus, Millipore GmbH, D
Schüttler	Heidolph, Duomax 1030
Sequenziergerät	ABI PRISM™ 3100 Avant Genetic Analyzer, Applied Biosystems Inc., USA
Thermoblock	Biometra, Trio-Thermoblock
Thermocycler	GeneAmp, PCR System 9700
Thermomix	Eppendorf, Thermomix comfort
Tisch-Zentrifuge	Heraeus, Biofuge pico
Transilluminator	Herolab, UVT-28 MP, E.A.S.Y. RH

Ultraschallgerät	Bandelin Sonoplus GM 2070
Waagen	Sartorius AG, D
Zellhomogenator	Potter S, Braun Biotech Int. GmbH, D
Zellzählgerät	Casy®1, Schärfe System, CASY®ton
Zentrifugen	Biofuge 15, Heraeus Sepatech GmbH, D Biofuge 28RS, Heraeus Sepatech GmbH, D MiniSpin Plus, Eppendorf GmbH D Rotations-Vakuum-Konzentrator α -RVC, Christ Gefriertrocknungsanlagen GmbH, D Sorval RC5C Plus, DuPont Corp., USA SVC 100 SpeedVac Savant, GMI Inc., USA
γ -Counter	Wallac 1470 Wizard, GMI Inc., USA

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

2.1.3. Software

Clone Manager 5.0 für Windows, Excel Microsoft Office 2003, FCS Express Version 3, GraphPad Prism Version 4, LSM Zeiss Image Browser 4.0, LSM ZEN 2007, LSM510 3.2 SP, Array Scan VTI, Paint.Net Version 3.4, Power Point Microsoft Office 2003, RADLIG Version 4.0, SeqMan™ 2, Word Microsoft Office 2003

2.1.4. Bakterienstämme, Zelllinien und Kulturbedingungen

2.1.4.1. Bakterienstämme

E.coli DH5 α Genotyp (Life Technologies):

F⁻ ϕ 80lacZ Δ M15 Δ (lacZYA-argF)U169 endA1 recA1 hsdR17 (rk-, mk+) supE44 thi-1 gyrA96 relA1 phoA

E.coli DH10 β Genotyp (Life Technologies)

F⁻ mcrA Δ(mrr-hsdRMS-mcrBC) φ80lacZΔM15 ΔlacX74 recA1 endA1 araΔ139 Δ(ara, leu)7697 galU galK I⁻ rpsL (Str^R) nupG

LB*-Medium	1% Trypton, 0,5% Hefeextrakt, 1% NaCl, pH 7.5
Selektionsmedien	LB + Ampicillin (100 µg/ml) oder Kanamycin (30 µg/ml)

*LB-Medium: Luria-Bertani-Medium

Für feste Medien (Platten) wurde 1,5% Agar zum Medium gegeben. Die Bakterienanzucht erfolgte bei 37°C über Nacht. Flüssigkulturen wurden bei 220 rpm geschüttelt.

2.1.4.2. Zelllinien

HEK-293, *Human embryonic kidney* Zellen (DSMZ, D), Adenovirus Typ 5 transformiert

Standardmedium	DMEM (10% v/v FKS, 100 U/ml Penicillin, 100 µg/ml Streptomycin)
Selektionsmedium	DMEM (10% v/v FKS, 400µg/ml G418)

SH 5Y-HY, humane Neuroblastom-Zelllinie

Standardmedium	DMEM (10% v/v FKS, 100 U/ml Penicillin, 100 µg/ml Streptomycin)
----------------	---

AtT-20-Zellen, Hypophysentumorzellen der Maus

Standardmedium	DMEM (10% v/v FKS, 100 U/ml Penicillin, 100µg/ml Streptomycin)
Differenzierungsmedien	DMEM (10% v/v FKS, 100 U/ml Penicillin, 100 µg/ml Streptomycin) + 1:50 Glucose-Lösung DMEM + 0,2% BSA

Weiterhin wurden für diese Arbeit stabile Linien des CRF₁R.GFP, CRF_{2a}R.GFP, SP1.CRF_{2a}R.GFP und SP2.CRF₁R.GFP in HEK 293 hergestellt (siehe 2.2.2.2) und für diverse Experimente verwendet.

2.1.5. Desoxyribonukleotide

2.1.5.1. Rekombinante Plasmide und Vektoren

Plasmid	Vektor	Herkunft
pCRFR2a.GFP	pEGFP-N1 (Clontech Inc., F)	M. Alken, FMP
pCRFR2a.ΔSP.GFP	pEGFP-N1 (Clontech Inc., F)	M. Alken, FMP
pN13A.CRFR2a.GFP	pSeqTag2a (Clontech Inc., F)	C. Rutz, FMP
pCRFR2a.YFP	pEYFP-N1 (Clontech Inc., F)	C. Rutz, FMP
pTM1.CRFR2a.GFP	pEGFP-N1 (Clontech Inc., F)	C. Rutz, FMP
pCRFR1.GFP	pEGFP-N1 (Clontech Inc., F)	M. Kuntke, FMP
pCRFR1.ΔSP.GFP	pEGFP-N1 (Clontech Inc., F)	C. Rutz, FMP
pCRFR1.YFP	pEYFP-N1 (Clontech Inc., F)	M. Alken, FMP
pSP1.CRFR2a.GFP	pEGFP-N1 (Clontech Inc., F)	C. Rutz, FMP
pSP2.CRFR1.GFP	pEGFP-N1 (Clontech Inc., F)	C. Rutz, FMP
pV2R.GFP	pEGFP-N1 (Clontech Inc., F)	R. Schüle, FMP
pβArr1.GFP	pEGFP-N1 (Clontech Inc., F)	A. Oksche, FMP
pβArr2.YFP	pEYFP-N1 (Clontech Inc., F)	A. Oksche, FMP

2.1.5.2. Primer

Sequenzierprimer	Sequenz 5' → 3'
GFP5'	CGC AAA TGG GCG GTA GGC GTG TA CGG
GFP3'	CTT GTG GCC GTT TAC GTC GCC GTC CAG
GFP3'Seq	CAA CAA CAA TTG CAT TC

Die Primer GFP5' und GFP3' wurden als Forward- und Reverse-Primer für alle Inserts in den Vektoren pEGFP-N1 und pEYFP-N1 verwendet.

Alle verwendeten Primer für die Klonierung wurden von BIOTEZ, Berlin, bezogen.

2.1.6. Antikörper

Alkalische Phosphatase-(AP)-konjugiertes Ziege- α -Kaninchen-IgG	Dianova GmbH, D
Peroxidase-konjugiertes Ziege- α -Maus-IgG	Dianova GmbH, D
AP-konjugiertes Ziege- α -Maus-IgG	Dianova GmbH, D
Kaninchen- α -cAMP-Antiserum	Abcam Inc., UK
Kaninchen- α -GFP-Serum	AG Schülein, FMP, D
Maus- α -Biotin-IgG (monoklonal)	Dianova GmbH, D
Maus- α -GFP-IgG (monoklonal)	Clontech Laboratories Inc., F
Maus- α - β -Arrestin-2-IgG (monoklonal)	Santa Cruz Biotechnology Inc., D
Kaninchen α -Calnexin-IgG (polyklonal)	StressGen, Ann Arbor, USA
Maus-IgG _{2B} -Isotypkontrolle	R&D Systems GmbH, D
Peroxidase-konjugiertes Ziege- α -Kaninchen-IgG	Dianova GmbH, D
α -Kaninchen-DyLight800	Biomol, Hamburg, D
α -Maus-DyLight680	Biomol, Hamburg, D
Maus- α -CRFR-IgG	Santa Cruz Biotechnology Inc., D
R-Phycoerythrin (R-PE)-konjugiertes Ziege- α -Maus-IgG	Dianova GmbH, D

2.2. Methoden

2.2.1. Molekularbiologische Methoden

2.2.1.1. Plasmid-DNA-Isolation: Mini- und Midi-Präparation

Während die Minipräparation dazu dient, in Bakterien transformierte DNA zu kontrollieren, wurde über eine Midipräparation DNA in größerem Maßstab für Versuche gewonnen. Die Isolationen wurden mit dem *NucleoSpin Plasmid QuickPure* und dem *NucleoBond PC100 Midiprep Kit* nach Angaben der Hersteller durchgeführt. Hierbei wurden die Bakterien für eine Minipräparation in 5 ml, für eine Midipräparation in 100 ml LB-Selektionsmedium angeimpft und über Nacht inkubiert. Die abschließende Lösung der DNA erfolgte bei beiden Präparationen in 200 µl H₂O. Konzentration und Reinheit der isolierten DNA wurden zunächst photometrisch bestimmt. Anschließend wurde die DNA über Restriktionsverdau und/oder Sequenzierung überprüft.

2.2.1.2. Photometrische Bestimmung der DNA-Konzentration

Die Konzentration gelöster DNA wurde über die Messung der OD₂₆₀ in einem Photometer bestimmt. Die Messung erfolgte in einer Quartzküvette in einem Volumen von 80 µl (2 µl DNA + 78 µl H₂O). Der Verdünnungsfaktor 40 erlaubt eine direkte Umrechnung der OD in die Konzentration in [µg/ml]. Zusätzlich wurde über den Quotient von OD₂₆₀/OD₂₈₀ die Reinheit der getesteten DNA bestimmt. Dieser sollte nicht kleiner sein als 1,8.

2.2.1.3. DNA-Fällung

Gegebenenfalls wurde die DNA zur Aufkonzentrierung und zur Reinigung gefällt. Hierzu wurden zunächst 1/10 Volumen 3M Natriumacetat und anschließend 2x Volumen 100% Ethanol zugegeben. Nach gründlichem Vortexen wurde für 10 min bei -20°C inkubiert, um die Fällung zu verbessern. Anschließend wurde das erhaltene Präzipitat abzentrifugiert (15 min/15.000 g/RT). Nach vorsichtigem Dekantieren des Überstandes wurde das Pellet mit 200 µl 70% Ethanol gewaschen und erneut abzentrifugiert (15 min/15.000 g/RT). Der Überstand

wurde sofort abgenommen und das Pellet 10 min bei 55°C getrocknet. Anschließend wurde das DNA-Pellet in einem geeigneten Volumen H₂O gelöst.

2.2.1.4. Restriktionsverdau

Isolierte Plasmid-DNA kann zur Größenüberprüfung oder zur nachfolgenden Ligation durch Restriktionsendonucleasen an spezifischen Basensequenzen gespalten werden. Eine Einheit (U) Restriktionsenzym verdaut in einer Stunde 1 µg DNA. Der Reaktionsansatz (verwendeter Puffer, Temperatur, Zugabe von BSA) richtet sich nach den Angaben und Empfehlungen des Herstellers und setzt sich wie folgt zusammen:

DNA-Template	1 µg
10x Restriktionspuffer	2 µl
ggf. 10x BSA	2µl
Enzym	je 5 U
H ₂ O	ad 20 µl

Der Verdau erfolgte 1 h bei 37°C. Nach einer Stunde Inkubation wurde der Verdau durch Zugabe von 4 µl DNA-Ladepuffer (0,25 % Bromphenolblau, 40 % w/v Saccharose) abgebrochen und auf ein Agarosegel aufgetragen.

2.2.1.5. Horizontale Gelelektrophorese

Mithilfe der horizontalen Gelelektrophorese wurden DNA-Fragmente ihrer Größe nach im elektrischen Feld aufgetrennt (0,9 V/cm²; 45 min). In der vorliegenden Arbeit wurden ausschließlich 1%ige (w/v) Agarosegele (in 100 ml TAE-Puffer, 80 mM Tris-HCl pH7, 1 mM EDTA, 0,15% v/v Essigsäure) verwendet, die mit Ethidiumbromid (0,1 mg/100 ml) versehen wurden. Ethidiumbromid interkaliert in die DNA und leuchtet nach Anregung mit UV-Licht orange. Die Auftrennung erfolgte bei 100 V in einer Gelkammer von *Peqlab* (40.0911). Als Marker wurde eine 1 kb-Ladder von *Gibco* verwendet. Das Gel wurde am Transilluminator ausgewertet.

2.2.1.6. Aufreinigung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen

Die DNA-Fragmente wurden aus dem Agarosegel ausgeschnitten und mithilfe des *NucleoSpin Extract Kits* nach Angaben des Herstellers aufgereinigt und in 20 µl H₂O eluiert.

2.2.1.7. Ligation

Die aufgereinigten DNA-Fragmente (zur Klonierung Vektor-DNA und cDNA, die mit den gleichen Restriktionsendonucleasen geschnitten wurden) wurden mit der T4-DNA-Ligase nach Angaben des Herstellers ligiert. Im Folgenden wurde die DNA in elektrokompetente *E. coli* transformiert.

2.2.1.8. Herstellung chemisch-kompetenter Bakterienzellen (CaCl₂-kompetente Zellen)

Bakterien werden als kompetent bezeichnet, wenn sie imstande sind, Plasmid-DNA aufzunehmen und zu replizieren. 100 ml LB-Medium wurden mit 1 ml einer *E. coli*-Vorkultur (Über-Nacht-Kultur von DH10β) angeimpft und unter Schütteln (220 rpm) bei 37°C bis zu einer OD₆₀₀ von 0,4 bis 0,5 inkubiert. Die Zellen befinden sich nun in der logarithmischen Wachstumsphase. Sie wurden abzentrifugiert (10 min/ 5500 g/ 4°C), in 10 ml eiskalter, steriler 100 mM CaCl₂-Lösung (100 mM CaCl₂, 15% Glycerin, 10 mM PIPES pH 7) resuspendiert und mindestens 30 min auf Eis inkubiert. Nach nochmaliger Zentrifugation (15 min/ 2000 rpm/ 4°C) wurden die Zellen in 1ml eiskalter 100 mM CaCl₂-Lösung resuspendiert. Die kompetenten Zellen können direkt zur Transformation eingesetzt werden oder nach Zugabe von 1 ml Glycerin in Aliquots (150 µl) bis zu einem Jahr bei –80°C gelagert werden.

2.2.1.9. Herstellung elektro-kompetenter Bakterienzellen

Aus einer *E. coli*-Vorkultur (eine Öse DH5a in 5 ml LB-Medium bei 37°C und 180 rpm über Nacht) wurde eine weitere Vorkultur (200 µl der ersten Vorkultur in 60 ml LB-Medium) angesetzt, um ein logarithmisches Wachstum der Kultur zu gewährleisten. Aus dieser wurden 25 ml in 475 ml LB-Medium gegeben und bis zu einer OD₆₀₀ von 0,35-0,4 inkubiert. Nach einer Inkubation von 25 min auf Eis wurde die Kultur bei 1000 g in vorgekühlten Zentrifugenbechern abzentrifugiert (4°C, 15 min) und das Pellet in 250 ml kaltem, sterilem H₂O resuspendiert. Nach weiterem zweimaligen Zentrifugieren (1000 g, 15 min, 4°C) wurde

das Pellet in zuerst 250 ml, dann in 10 ml 10%iger Glycerin-Lösung aufgenommen. Die Kultur wurde nochmals bei 1000 g und 4°C für 30 min abzentrifugiert, das Pellet wurde in 1 ml GYT-Medium (10% Glycerol, 0,125% Hefeextrakt, 0,25% Trypton) aufgenommen, und die Zellen in 40 µl-Aliquots in flüssigem Stickstoff eingefroren.

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

Hitzeschock-Methode

Die Transformation von CaCl₂-kompetenten *E. coli* Bakterien wurde nach der Hitzeschock-Methode (HIMENO, 1984) durchgeführt. Zu einem Aliquot (150 µl) kompetenter Bakterien wurden 0,1-1 µg Plasmid-DNA gegeben. Das Gemisch wurde 30 min auf Eis inkubiert, dann 2 min im Thermomixer bei 300 rpm auf 42°C erhitzt, und nochmals 5 min auf Eis inkubiert. Nach Zugabe von 1 ml LB-Medium ließ man die Zellen für 1 h bei 37°C und 300 rpm anwachsen. Anschließend wurden hieraus je 25 µl auf Selektivagar (z.B. mit Kanamycin) ausplattiert und die Platten über Nacht bei 37°C inkubiert. Als Kontrolle wurden untransformierte Bakterien auf Selektivagar und auf Agar ohne Antibiotikum ausplattiert.

Elektroporation

Elektrokompetente Zellen wurden wie folgt transformiert: 1 µl der Plasmid-DNA (0,1-1 µg) wurden zusammen mit 40 µl eiskalten kompetenten Zellen in eine Elektroporations-Küvette (gekühlt) gegeben. Nach Durchführung des Pulses bei 1250 V wurden die Zellen sofort in 1 ml 37°C-erwärmten SOC-Medium (2% Peptone 140, 0,5% Hefeextrakt, 10 mM NaCl, 2,5 mM KCl; später zusetzen: 10 mM MgCl₂, 10 mM MgSO₄, 20 mM Glucose) aufgenommen, gut resuspendiert und in ein neues Eppendorfgefäß überführt. Die Zellen wurden nun 1 h bei 37°C und 350 rpm im Thermomixer regeneriert. Nach 5-minütiger Zentrifugation bei 2500 g wurden 200 µl des Überstands abgenommen, die Zellen in dem restlichen Medium resuspendiert und auf Selektivagarplatten ausplattiert.

2.2.1.11. Gerichtete Mutagenese

Um gezielt eine Veränderung einzelner Basen in die DNA-Sequenz einzuführen, wurde die gerichtete Mutagenese mithilfe des *QuickChange Site-Directed Mutagenesis Kits* (*Stratagene*) mit mutierten *forward*- bzw. *reverse*-Oligonukleotidprimern durchgeführt.

Reaktionsansatz für eine Plasmidgröße von 5,3-6,9 kb:

10x Pfu Plus! Reaktionspuffer (Puffer B)	2 µl
DNA Template (50 ng)	1 µl
je Primer (0,5 µM)	1 µl
dNTP-Mix (0,5 mM)	1 µl
H ₂ O	ad 20 µl
Pfu Plus! (2,5 U / µl)	0,75 µl

Die DNA Amplifizierung wurde in einem Thermocycler der Firma Biometra durchgeführt mit folgendem Programm:

Schritt	Temperatur	Zeit	Zyklus
Initiale Denaturierung	94°C	2 min	
Denaturierung	94°C	15 sec	} 35x
Hybridisierung	58°C	30 sec	
Elongation	72°C	1 min/kb	
Finale Elongation	72°C	7 min	
Kühlung	4°C	∞	

Im Anschluss an die Amplifizierung erfolgte der Verdau (1,5 h bei 37°C) des methylierten Template-Plasmids durch das Enzym DpnI, welches nur methylierte DNA verdaut. Die amplifizierte DNA ist nicht methyliert, bleibt daher erhalten. Anschließend erfolgte die Elektroporation.

2.2.1.12. Sequenzierung

Die DNA-Sequenzierung erfolgte durch die Dideoxy-Methode (SANGER, 1977) nach folgendem Reaktionsansatz:

DNA-Template	0,5-1 µg
<i>BigDye Terminator v3.0 Kit</i>	0,25 µl
Sequenzierpuffer (400mM Tris-HCl pH 9,2, 10mM MgCl ₂)	1,5 µl
Primer (10 µM)	1 µl
H ₂ O	ad 10 µl

Durchführung:

Schritt	Temperatur	Zeit	Zyklus
Denaturierung	96°C	10 sec	} 25 x
Hybridisierung	50°C	5 sec	
Elongation	60°C	2 min/kb	
Kühlung	4°C	∞	

Anschließend wurde die DNA durch Zugabe von 1 µl Natriumacetat/EDTA-Puffer (1,5 M Natriumacetat pH 8, 0,25 mM EDTA) und 40 µl 95%igem (v/v) Ethanol auf Eis für 20 min gefällt. Die DNA wurde abzentrifugiert, (15 min/15.000 g/4°C oder RT), mit 250 µl 70%igem (v/v) Ethanol gewaschen und nochmals abzentrifugiert (15 min/12.000 g/4°C oder RT). Nach kurzem Zentrifugieren und vorsichtigem Dekantieren des Ethanols wurde das Pellet in der Vakuumzentrifuge für 15-20 min getrocknet. Für die abschließende Kapillarelektrophorese (*ABI Prism 310 Genetic Analyzer*) wurde das Pellet in 3,2 µl Formamid-Ladepuffer resuspendiert und 5 min bei 95°C denaturiert.

2.2.2. Zellbiologische Methoden

2.2.2.1. Aussaat der Zellen

Alle verwendeten Lösungen müssen vor Verwendung auf 37°C erwärmt werden. Konfluent gewachsene Zellen wurden mit PBS gewaschen und mit 1ml Trypsin-Lösung (0,05% w/v Trypsin und 0,02% EDTA w/v in PBS) überschichtet. Nach 60 sec wurde die Lösung abgesaugt und die Zellkultur-Flasche so lange bei 37°C inkubiert, bis ein Ablösen der Zellen optisch

erkennbar ist (2-5 min). Die Zellen wurden in 6 ml Standardmedium resuspendiert und die Zellzahl über ein Zellszählgerät (CASY1, Schärfe System) bestimmt. Anschließend erfolgte die Zellaussaat je nach Verwendungszweck:

Verwendungszweck	Zellen	Schalendurchmesser	Medium
biochemische Charakterisierung	2 Mio.	100 mm	10 ml
<i>Laser Scanning</i> Mikroskopie	150.000	35 mm	2 ml
automatische Mikroskopie/ cAMP-RIA	50.000	24-Wellplatten	1 ml

Für die Mikroskopie und cAMP-RIA wurden die Zellen in 35-mm-Schalen bzw. 24-Wellplatten auf sterilen, Poly-L-Lysin (0,1 mg/ml) beschichteten Deckgläsern bzw. in die Kavitäten ausgesät. Zur Beschichtung wurden die Deckgläser zuvor mit 500 µl, die Kavitäten mit 200 µl einer Poly-L-Lysin-Lösung (25 µg/ml) für 30 min inkubiert und nachfolgend getrocknet. Einen Tag nach Zellaussaat wurde mikroskopisch geprüft, ob die Zellen angewachsen sind, um eine Transfektion durchführen zu können.

2.2.2.2. Transfektionen

Transiente Transfektion

Die Transfektion wurde mit *Lipofectamine2000*TM-Transfektionsreagenz durchgeführt. Hierzu wurde das Reagenz 5min in serumfreiem Medium (SFM) inkubiert, dann die DNA zugegeben und der Ansatz 20 min bei RT in Polystyrolröhrchen inkubiert. Anschließend wurde das Gemisch zu den Zellen pipettiert.

Schalendurchmesser	Zellzahl	DNA	Medium	<i>Lipofectamine2000</i> TM
100 mm	4×10^6	7 µg	500 µl	10,5 µl
35 mm	1×10^5	0,8 µg	100 µl	1,5 µl
24-Wellplatte	5×10^4	0,2 µg	50 µl	0,5 µl

Nach Zugabe der Transfektionsmischung wurden die Zellen für weitere 24 h im Brutschrank inkubiert.

Stabile Transfektion

Bei der stabilen Transfektion wird die Plasmid-cDNA in das Genom der eukaryontischen Wirtszelle (hier HEK-293) integriert. Dazu wurden 2×10^5 HEK-293-Zellen auf eine 60 mm Zellkulturschale ausgesät. Nach 24 h erfolgte die Transfektion der Zellen mit dem Zielkonstrukt (500 μ l DMEM, 2 μ g DNA, 5 μ l *Lipofectamine2000*TM). Drei Tage nach der Transfektion wurden die Zellen in 100er-Schalen übertragen und daraus eine Verdünnungsreihe (1:2, 1:4, 1:8, 1:16, 1:32, 1:64) hergestellt. Nach weiteren 24 h erfolgte ein Mediumwechsel mit Selektionsmedium. Da die Zielkonstrukte mit GFP-markiert sind, konnten Klone am Fluoreszenzmikroskop selektioniert werden, die daraufhin in 24-Wellplatten vereinzelt und kultiviert wurden. Im Folgenden konnten die einzelnen Klone mittels Bindungsexperimenten und Oberflächenquantifizierungen charakterisiert werden.

2.2.2.3. Membranpräparation

Zur Präparation von Gesamtmembranen wurden 4×10^6 stabil oder transient transfizierte HEK-293-Zellen in 100-mm-Zellkulturschalen ausgesät. Nach 24 h erfolgte gegebenenfalls die transiente Transfektion (2.2.2.2). Nach zweimaligem Waschen mit DPBS (137 mM NaCl, 2,7 mM KCl, 1,5 mM KH_2PO_4 , 8,1 mM Na_2HPO_4 , 9 mM CaCl_2 und 5 mM MgCl_2) wurden die Zellen vorsichtig abgeschabt. Nach Zentrifugation (5 min/400 x g, 4°C) wurde das Zellpellet in 5 ml Tris-BAME (50 mM Tris, 2 mM EGTA, 10 mM MgCl_2 , 0,05% v/v BSA, 15 mg/ml Aprotinin, 210 mg/ml Bacitratin, 125 μ l/10ml PMSF, 0,5 mM Benzamidin, 80 μ l/10ml Trypsininhibitor) aufgenommen und mit dem Zellhomogenisator PotterS (800 rpm, 10 Stöße) homogenisiert. Nach Zentrifugation (35 min, 26.000 x g, 4°C) wurde das Pellet in 1500 μ l Tris-BAME aufgenommen und portioniert bei -80°C eingefroren. Zur Proteinbestimmung nach Bradford wurde ein 20 μ l Aliquot bereitgestellt.

2.2.3. Mikroskopische Methoden an lebenden Zellen

2.2.3.1. Lokalisationsmethode für Fluoreszenz-markierte Proteine mittels *Laser-Scanning-Mikroskopie*

HEK-293-Zellen oder stabile Linien wurden auf Poly-L-Lysin-beschichtete 35-mm-Deckgläser ausgesät. Die HEK-293-Zellen wurden nach 24 h transient transfiziert. Nach weiteren 24 h wurden die Deckgläser in eine auf 37°C beheizbare Mikroskopierkammer (Eigenbau, FMP) eingespannt und vorsichtig mit 500 µl PBS (37°C) überschichtet. Zur Färbung der Plasmamembran wurde Trypanblau (Endkonzentration 0,05%) zugegeben. Nach 15 min wurden die GFP- (λ_{ex} : 488 nm; λ_{em} : BP 500-530 nm) und Trypanblau (λ_{ex} : 543 nm; λ_{em} : LP 560 nm)-Fluoreszenzen an einem LSM510-Mikroskop (Carl Zeiss, D) detektiert. Die Überlagerung beider Fluoreszenzsignale und die GFP-Fluoreszenzsignale wurden mit der Zeiss LSM510-Software Image Browser 4.0 berechnet und quantifiziert.

2.2.3.2. Lokalisationsmethode für Fluoreszenz-markierte Proteine mittels automatischer Mikroskopie

Zur Oberflächenquantifizierung Fluoreszenz-markierter Proteine wurden HEK-293-Zellen in mit Poly-L-Lysin beschichtete 24-Well-Platten ausgesät und nach 24 h transient mit dem jeweiligen Konstrukt transfiziert. Die Zellkerne wurden 30 min vor Versuchsbeginn mit Hoechst 33258 (Stammlösung: 16 mM in H₂O; 1:400 in PBS) angefärbt und anschließend dreimal mit PBS gewaschen. Nachfolgend wurden die Zellen zur Plasmamembranfärbung mit Trypanblau (Stammlösung: 0,05% in H₂O; 1:4 in PBS) gefärbt.

Die Detektion der Lokalisation erfolgte mit Hilfe des automatischen Mikroskops Cellomics Array Scan VTI mit Fluoreszenzlampen in drei unterschiedlichen Kanälen. Im ersten Kanal erfolgte die Detektion der Hoechst 33258-Fluoreszenz (λ_{ex} : BP Filter: 325-360 nm, λ_{em} : BP Filter: 505-550 nm). Durch die Software Array Scan VTI kann dadurch eine digitale Maske für die Zellkerne definiert werden. Parallel kann dadurch die Zellzahl bestimmt werden. Im zweiten Kanal wurde die Trypanblau-Fluoreszenz um einen definierten Bereich um die Kernmaske herum detektiert (λ_{ex} : BP Filter: 540-560 nm, λ_{em} : BP Filter: 580-630 nm). Im dritten Kanal wurde die GFP-Fluoreszenz detektiert (λ_{ex} : BP Filter: 450-500 nm, λ_{em} : BP Filter: 510-570 nm). Es wurden zum einen die Fluoreszenzintensitäten in der Membranmaske (I_{Membran}) bestimmt, aber auch die intrazellulären Intensitäten ($I_{\text{„Cytosol“}}$), die sich aus der

Differenz der Zellkernmaske und der Membranmaske ergibt. Zur Quantifizierung der GFP-Intensitäten wurde die Ratio ($\text{Ratio} = I_{\text{Membran}} / I_{\text{„Cytosol“}}$) errechnet und grafisch dargestellt.

2.2.3.3. β -Arrestin-Rekrutierungsexperimente

Die Untersuchung der β -Arrestin-Rekrutierung erfolgte mit GFP- und YFP-Fusionsproteinen. 35-mm-Deckgläser mit $1,5 \times 10^5$ transient transfizierten HEK-293-Zellen oder stabilen Linien wurden in eine auf 37°C beheizbare Mikroskopierkammer (Eigenbau, FMP) eingespannt und vorsichtig mit 500 μl PBS (37°C) überschichtet. Die GFP-Fluoreszenz-Signale (λ_{ex} : 488 nm; λ_{em} : BP 495-516 nm) und YFP-Fluoreszenzsignale (λ_{ex} : 514 nm; λ_{em} : 527-612 nm) wurden an einem LSM510-Mikroskop detektiert. Zur Stimulation der Zellen wurde eine 100 nM Sauvagine-Lösung hinzugegeben und nachfolgend alle 15 sec ein Bild aufgenommen.

2.2.4. Durchflusscytometrische Untersuchungen

Für die Versuche wurden 8×10^6 HEK-293-Zellen in 60-mm-Schalen ausgesät, welche die Konstrukte CRF₁R, CRF_{2a}R, SP1.CRF_{2a}R, SP2.CRF₁R stabil exprimieren. Nach zwei Tagen Inkubation wurden die Zellen mit dem Inkubationspuffer DPBS-CM (137 mM NaCl, 2,7 mM KCl, 1,5 mM KH₂PO₄, 8,1 mM Na₂HPO₄, 9 mM CaCl₂ und 5 mM MgCl₂) abgewaschen und in entsprechende FACS-Röhrchen überführt. Anschließend wurden die Proben mit monoklonalem α -CRFR-Antikörper (100 μl , 100 $\mu\text{g/ml}$ Inkubationspuffer) oder einer Isotypkontrolle (100 μl , 100 $\mu\text{g/ml}$ IgG_{2B} in Inkubationspuffer) inkubiert, um die unspezifische Bindung des α -CRFR-Antikörper unter den gegebenen Bedingungen zu kontrollieren. Die Antikörperinkubationen erfolgten für 10 Minuten bei 4°C. Anschließend wurde zweimal mit jeweils 800 μl Inkubationspuffer gewaschen. Als Sekundärantikörper wurde ein PE-konjugierter α -Maus-Antikörper (1:50 in Inkubationspuffer) genutzt. Zwischen und nach jeder Antikörper-Behandlung wurden die Proben zweimal mit 800 μl Inkubationspuffer gewaschen und abschließend in 400 μl Inkubationspuffer aufgenommen. 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 subtrahiert.

2.2.5. Proteinbiochemische Methoden

2.2.5.1. Immunpräzipitation und Co-Immunpräzipitation

Die Immunpräzipitation (IP) dient zur spezifischen Aufkonzentrierung der gesuchten Zielproteine mittels spezifischer Antikörper, die an eine Matrix, in diesem Fall Protein-A-Sepharose, kovalent gebunden sind. Die Antigene wurden mittels SDS wieder in Lösung gebracht und mit Hilfe von SDS-PAGE und Western Blot analysiert und detektiert. Bei der Co-IP wurden mit dem Antigen interagierende Proteine detektiert.

Der Crosslinker Dithiobis(succinimidyl)propionat (DSP) ist membran-permeabel und kann so zur Detektion intrazellulärer transienter Protein-Protein-Interaktionen eingesetzt werden. Dazu wurden 4×10^6 stabil transfizierte HEK-293-Zellen in 100mm-Schalen zunächst 5 min bei 37°C mit 100 nM Sauvagine oder 100 nM AVP in PBS stimuliert. Anschließend erfolgte nach Protokoll des Herstellers für 30 min eine Inkubation mit einer 2,5 mM-Crosslinker-Lösung bei Raumtemperatur. Die Reaktion wurde durch die eine 20 mM Stop-Lösung (1 M Tris, pH 7.5) für 15 min bei Raumtemperatur beendet. Die IP wurde dann wie nachfolgend beschrieben durchgeführt.

Zur Vorbereitung wurden Protein-A-Sepharose-Beads (10 mg pro 100mm-Zellkulturschale) in Puffer A (150 mM NaCl, 1 mM EDTA, 1 % Triton X-100, 0,1 % SDS, 50 mM Tris-HCl, pH 8,0) mindestens 10 min bis über Nacht vorgequollen, abzentrifugiert (6 min, 700 x g, Sigma) und dreimal mit Puffer A gewaschen. Beim letzten Waschschrift wurden die Beads in 4 ml Puffer A aufgenommen und mit 4,5 µl GFP02-Antikörper/10 mg Sepharose/100er-Schale über Nacht bei 200 upm inkubiert. Die vorinkubierte Sepharose wurde 6 min bei 4°C und 2000 rpm abzentrifugiert, der Überstand fast komplett abgenommen.

Immunpräzipitationen werden bei 4°C im Kühlraum durchgeführt, um einen proteolytischen Abbau von Proteinen zu verhindern. 4×10^6 stabile oder transient transfizierte HEK-293-Zellen in 100mm-Schalen wurden zweimal mit PBS gewaschen. Anschließend wurden die Zellen durch Zugabe von 600 µl Lysispuffer (0,5 mM PMSF, 0,5 mM Benzamidin, 1,4 µg/ml Aprotinin, 3,2 µg/ml Trypsin-Inhibitor, 150 mM NaCl, 1 mM EDTA, 1 % Triton X-100, 0,1 % SDS, 50 mM Tris-HCl, pH 8.0) eine Stunde bei 200 rpm auf einem Schüttler lysiert. Das Lysat aus den Schalen wurde in SS-34-Zentrifugenröhrchen überführt, gegebenenfalls vereinigt

und die Zellreste abzentrifugiert (15-20 min, 37.000 x g, 4°C). Aus dem Überstand wurden die GFP-Fusionsproteine über einen anti-GFP-Antikörper (GFP02, polyklonal, 4,5 µl/ 100 mm-Schale) gebunden an Protein-A-Sepharose-Beads (10 µg/ 100 mm-Schale) präzipitiert. Die Präzipitation erfolgte über Nacht unter ständigem Invertieren. Am nächsten Tag wurden die Beads abzentrifugiert (6 min, 700 x g, 4°C), dreimal mit Waschpuffer I (500 mM NaCl, 1 mM EDTA, 0,5 % Triton X-100, 0,1 % SDS, 50 mM Tris-HCl, pH 8,0) und einmal mit Waschpuffer II (1 mM EDTA, 0,5% Triton X-100, 0,1 % SDS, 50 mM Tris-HCl, pH 7,4) gewaschen. Nach dem letzten Waschschrift wurden die Beads im Waschpuffer auf drei Ansätze in Reaktionsgefäße verteilt (unverdaut, EndoH-, und PNGase-F-Verdau) und bei 13.000 g für 2 min abzentrifugiert. Der Waschpuffer wurde komplett mittels einer 100 µl Hamilton-Spritze abgezogen, so dass die Beads absolut frei von löslichem Überstand sind. Anschließend wurden die an die Beads gebundenen Proteine entweder in 250 µl 1x Rotiload-Puffer für 5min bei 95°C eluiert (unverdaute Proben), um sie direkt über SDS-Page und Western Blot zu analysieren, oder die Elution erfolgte wie im nächsten Abschnitt beschrieben, um eine Deglykosylierung der Proteine vorzubereiten.

2.2.5.2. Verdau der N-Glykosylierung durch PNGaseF und EndoH – zur Untersuchung des Glykosylierungsstatus der Rezeptoren

Nach Immunpräzipitation wurden die präzipitierten und an die Protein-A-Sepharose-Beads gebundenen Proteine in PBS und 10x Denaturierungspuffer nach unten aufgeführtem Protokoll für 8 min bei 95°C eluiert. Die Proteine befinden sich nach der Elution im Überstand. Dieser wurde durch Zentrifugation (1 min/15.000 g/RT) von den Beads getrennt und je nach gewünschtem Verdau in mehrere Fraktionen aufgeteilt. Der EndoH- und PNGaseF-Verdau erfolgte nach folgenden Ansätzen:

EndoH-Verdau		PNGaseF-Verdau	
155 µl	PBS auf Sepharose-Pellet	140 µl	PBS auf Sepharose-Pellet
15,5 µl	10x Denaturierungspuffer	14 µl	10x Denaturierungspuffer
kurz auf Eis		kurz auf Eis	
17,5 µl	G5-Puffer	15,4 µl	NP40
4 µl	EndoHf (4000U)	15,4 µl	G7-Puffer
		4 µl	PNGaseF (500 U)
Verdau: 1 h bei 37°C		Verdau: 1 h bei 37°C	
58,45 µl	4xRotiload	61,2 µl	4 x Rotiload

Nach Verdau wurden die Proben mit entsprechender Menge 4x Rotiload-Puffer versetzt und die Proteine über SDS-Page und Western Blot analysiert.

2.2.5.3. Zelloberflächen-Biotinylierung

Für die Biotinylierungsexperimente zur Detektion von Proteinen in der Plasmamembran wurden 4×10^6 HEK-293-Zellen in 100er-Zellkulturschalen in DMEM + 10 % FKS ausgesät und bei 37 °C für 24 h kultiviert. Nach 24h erfolgte die transiente Transfektion (2.2.2.2). Weitere 24h nach der Transfektion wurde die Biotinylierungsreaktion durchgeführt (alle Schritte bei 4 °C). Das Zellkulturmedium wurde entfernt und die Zellen 3x mit PBS gewaschen. In jede Schale wurde 1 ml Biotinlösung (0,5 mg Biotin/ml PBS) gegeben und für 30 min bei 50 rpm auf einem Schüttler inkubiert. Die Biotinlösung wurde entfernt und die Zellen 3x mit PBS gewaschen. Danach wurde in jede Schale 1 ml Lysispuffer gegeben und 1 h bei 180 rpm geschüttelt. Die Lysate wurden 20 min bei 20000xg und 4 °C zentrifugiert und mit dem Überstand eine Immunpräzipitation durchgeführt. Die Detektion der biotinylierten Proteine erfolgte mit Hilfe eines Western-Blots.

2.2.5.4. SDS-Page

Die Gele für die SDS-Page wurden nach folgendem Schema gegossen:

	8%iges Trenngel	Sammelgel
AA-Bis	3 ml	835 µl
Tris-HCl	5,625 ml (0,75 M, pH 8,8)	625 µl (0,625 M, pH 6,8)
20% SDS	56,5 µl	25 µl
TEMED	5,65 µl	5 µl
H ₂ O	2,5 ml	3,5 ml
APS	79 µl	25 µl

Zunächst wurden die Komponenten des Trenngels gemischt und das Gel sofort gegossen. Das noch nicht polymerisierte Gel wurde mit Isopropanol oder Aqua tridest überschichtet, um eine glatte Oberfläche des Trenngels zu gewährleisten. Nach Polymerisation des Trenngels wurde die Flüssigkeit abgegossen. Die einzelnen Komponenten des Sammelgels wurden gemischt und über das Trenngel gegossen. Anschließend wurde der Kamm eingesetzt. Die Proteinproben wurden in Rotiload-Puffer gelöst auf das Gel aufgetragen. Die elektrophoretische Auftrennung der Proteine erfolgte bei $0,25 \text{ mA/cm}^2$ pro Gel. Die Gelelektrophorese wurde mithilfe eines vorgefärbten Marker verfolgt und das Gel so lange laufen gelassen, bis sich die untersuchten Proteine im Bereich bester Auftrennung innerhalb des Gels (untere Hälfte) befanden.

2.2.5.5. Western Blot

Um die aufgetrennten Proteine über Antikörper detektieren zu können, wurden diese auf eine Nitrozellulose-Membran (OPTITRAN BA-S85, Schleicher&Schuell, D) transferiert. Der Transfer erfolgte elektrophoretisch bei $1,6 \text{ mA/cm}^2$ Membran und 4°C für 1,5 h. Der Aufbau des Blotsandwichs ist von der Anoden- zur Kathodenseite wie folgt: Schwamm, Filter, Gel, Membran, Filter, Schwamm. Die Membran wurde kurz vor dem Zusammenbau des Sandwichs in Blotpuffer äquilibriert.

Detektion und Identifikation transferierter Proteine

Zur Kontrolle des Transfers wurde die Membran nach dem Transfer 5-10 min in einer Ponceau-Rot-Lösung (H₂O mit 0,1% Ponceau-Rot und 5% Eisessig) gefärbt. Nach Abfotografieren der Membran wurde diese in TBS-T (TBS-Puffer mit 0,1% Tween) entfärbt. Zur Detektion wurde die Membran zunächst in TBS-Puffer (+ 2% BSA) geblockt, um

unspezifische Bindungsstellen zu maskieren. Die spezifische Detektion von Proteinen erfolgte über gegen sie gerichtete Antikörper (siehe Abschnitt 2.4) nach folgendem Protokoll:

- Äquilibration der Membran in TBS-T
- Inkubationsschale mit der Membran mit 8 ml TBS-T beschicken und den Primärantikörper zugeben
- nach 1 h Inkubation 2x waschen mit TBS-T
- Inkubationsschale mit der Membran mit 8 ml TBS-T beschicken und den Sekundärantikörper zugeben
- nach 1 h Inkubation 2x Waschen mit TBS-T

Primär-Antikörper	Verdünnung in TBS-T	Sekundär-Antikörper	Verdünnung in TBS-T
α -GFP, monoklonal	1:4000	α -Maus-AP	1:1500
α - β -Arrestin, monoklonal	1:4000	α -Maus-AP	1:2000
α -Biotin, polyklonal	1:5000	α -Kaninchen-DyLight800	1:10000
α -GFP, monoklonal	1:4000	α -Maus-DyLight680	1:10000
α -Calnexin, polyklonal	1:1000	α -Kaninchen-AP	1:1000

Die Detektion der alkalischen Phosphatase erfolgte über BCIP (5-Brom-4-Chlor-3-Indolylphosphat, Endkonzentration: 0,56 mM, Sigma) und NBT (Nitroblau-Tetrazoliumsalz, Endkonzentration: 0,48 mM, Biomol) in 10 mM Tris-HCl-Lösung, pH 9,5. Durch die Dephosphorylierung der Alkalische Phosphatase wurde BCIP in das entsprechende Indoxyl überführt, das zu einem Keton tautomerisiert. Das Keton dimerisiert zu Indigo, wodurch es zu einer Freisetzung von H^+ kommt. Das NBT wurde durch die freien Protonen reduziert zu einem purpurnen Diformazan, welches detektiert werden kann.

Die Detektion der DyLight-markierten Proteinbanden wurde mittels Odyssey® LI-COR® densitometrisch bestimmt.

2.2.6. Internalisierungsexperimente

2.2.6.1. Kombiniertes Internalisierungs-/Bindungsexperiment („acid wash“)

Es wurden pro Klon (CRF₁R, CRF_{2a}R, N13A.CRF_{2a}R) 75.000 Zellen/Well in eine 24-Well-Platte ausgesät (in DMEM + 10% FKS + Streptomycin/Penicillin) und die Zellen 48 h inkubiert. Zur Induktion der Internalisierung wurde das Medium nach Zeitintervallen (60 min, 30 min, 15 min, 10 min, 5 min, 0 min (bei „0 min“ nur Inkubationsmedium ohne Ligand)) abgenommen und durch das Inkubationsmedium, das den Agonisten in einer Konzentration von 100 nM und den radioaktiven Liganden [¹²⁵I]-Tyr⁰-Savagine als Tracer in einer Konzentration von 0,1 nM enthält, ausgetauscht. Anschließend wurde der Ligandenmix durch Behandlung der Zellen mit 50mM Essigsäure (*acid wash*) entfernt und die Radioaktivität gemessen (extrazelluläre Bindung, EC). Nachfolgend wurden die Zellen lysiert und die Radioaktivität der Zellsuspension quantifiziert (intrazellulär, IC). Als „% Internalisierung“ $(IC/(IC + EC)*100)$ wurde die intrazelluläre Radioaktivität (IC) im Verhältnis zur Gesamtradioaktivität (IC + EC) definiert. Alle Werte wurden doppelt bestimmt, mit Standardabweichungen versehen und auf den Maximalwert normiert.

2.2.7. Pharmakologische Methoden

2.2.7.1. Kompetitiver Bindungsversuch - [¹²⁵I]Savagine-Bindung an Gesamtmembranen

Die Membranen wurden nach 2.2.2.3. präpariert. Zur Ermittlung der Bindungsprofile der verwendeten Konstrukte wurden aus einer 100 nM [¹²⁵I]-Tyr⁰-Savagine-Lösung (Perkin Elmer Inc., in DPBS) neun weitere Lösungen durch serielle 1:2 Verdünnungen hergestellt. Für die Bestimmung der unspezifischen Bindung wurde Savagine (1 µM Endkonzentration) zu jeder Lösung gegeben. Es wurde 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, ausgestantzt 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.

2.2.7.2. cAMP-Radiomunoassay

Es wurden HEK-293-Zellen (100.000 Zellen/Well) in mit Poly-L-Lysin beschichteten 24-Well-Platten ausgesät. Verwendet wurden sowohl stabil als auch transient transfizierte Zellen. Nach 48 h wurden die Zellen mit Stimulationsmedium (DMEM mit 10 mM HEPES, 0,5% w/v BSA, 0,25 mM 3-Isobutyl-1-methyl-xanthin) gewaschen und für 30 min bei 37 °C mit Agonist (0,1 nM bis 1 µM Sauvagine oder CRF) oder Forskolin (10 µM) stimuliert. Zur Inhibierung der $G_{\alpha i}$ -Aktivierung wurden die Zellen 16 h vor dem Versuch mit Pertussistoxin-enthaltendem DMEM (100 ng/µl; 253 ng/µl) inkubiert.

Die cAMP-Extraktion erfolgte durch Zugabe von 750 µl eiskalter 0,1%iger TFA-Lösung mit 0,005% Triton. Nach Inkubation über 30 Minuten bei 4°C wurden die Lösungen in eiskalte 1,5ml-Eppendorf-Reaktionsgefäße mit durchlöcherter Deckel überführt und 10 Minuten bei 95°C im Thermocycler inkubiert. Darauffolgend wurden die Proben entweder bei -20°C eingefroren oder direkt über Nacht im Rotation-Vakuum-Konzentrator getrocknet. Die getrockneten Pellets wurden in 750µl RIA-Puffer (100 mM Natriumacetat, 0,1% w/v BSA, 0,1 v/v TritonX-100, pH6) aufgenommen, resuspendiert und 20 min bei 4°C inkubiert. Nach nochmaligem Vortexen wurden die Proben 15 min bei 23.000 g und 4°C zentrifugiert. Nach Dekantieren in neue Reaktionsgefäße (deckellose Bio-Rad-Röhrchen) wurden Verdünnungen je nach erwarteter cAMP-Konzentration angefertigt. Ebenfalls wurden Standard-Verdünnungen hergestellt und Qualitätskontrollen aufgetaut. Zur cAMP-Acetylierung wurden je 30 µl der Probe in 2ml-Eppendorf-Röhrchen überführt und mit entsprechendem RIA-Puffer versetzt. 20µl Acetylierungsreagenz (Acetanhydrid/Triethylamin im Volumenverhältnis 1:2) wurden direkt in die Probe gegeben und sofort gevortext. Nach Zugabe von je 100 µl Tracer (10.000 cpm, spezifische Aktivität 81,4 TBq/mmol), RIA-Puffer und polyklonalem Kaninchen-anti-cAMP-Serum (Endverdünnung 1:160.000) in 100µl der Acetylierungsprobe wurden diese 20-24 h bei 4°C inkubiert. Zur Trennung von antikörpergebundenem und freiem cAMP wurden die Proben mit je 50 µl Saccel (mit Zellulose-konjugierten Schaf-anti-Kaninchen-IgG) versetzt, gevortext und 40 min bei 4°C inkubiert. Vor der abschließenden Radioaktivitätsmessung am γ -Counter wurden die Proben mit 1000 µl 1:3-verdünntem RIA-Puffer versetzt. Die Konzentration von nicht-radioaktivem

cAMP wurde durch Interpolation aus der Standardkurve ermittelt. Die Konzentrations-Wirkungskurven wurden mit Hilfe des Programms GraphPad Prism, Version 3.02 nach iterativer, nicht linearer Regression erstellt.

3. ERGEBNISSE

3.1. Untersuchung des Internalisierungsmechanismus des CRF_{2a}R und CRF₁R

Die Clathrin-abhängige Internalisierung wird über die Bindung des Agonisten eingeleitet. Die dadurch bedingte Konformationsänderung des Rezeptors führt zur Interaktion mit dem Adapterprotein AP-2, woraufhin β -Arrestin-Moleküle an den Rezeptor binden können. Dadurch wird die Assemblierung von Clathrin ermöglicht und die Endocytose der Rezeptoren eingeleitet.

Aufgrund von bisherigen Untersuchungen gab es Anhaltspunkte, dass der CRF_{2a}R im Gegensatz zum CRF₁R β -Arrestin nicht rekrutiert (SCHULZ, DIPLOMARBEIT, 2005). Es sollte daher zunächst überprüft werden, ob das Pseudosignalpeptid für einen abweichenden Internalisierungsweg des CRF_{2a}R verantwortlich ist.

3.1.1. Die β -Arrestin-Rekrutierung des CRF_{2a}R und CRF₁R in Abhängigkeit vom Zelltyp und Liganden

Zur Untersuchung des Internalisierungsmechanismus, insbesondere der β -Arrestin-Rekrutierung, wurden zum einen unterschiedliche Zelllinien verwendet, zum anderen die Agonisten variiert. Die zellulären Testsysteme können in ihrer Proteinausstattung variieren, und die Zellantworten entsprechend unterschiedlich ausfallen. Daher sollten Zelllinien verwendet werden, die auch die physiologische Umgebung der zu untersuchenden Rezeptoren berücksichtigen.

Die Ursprungsuntersuchungen wurden in HEK-293-Zellen vorgenommen (SCHULZ, DIPLOMARBEIT, 2005), da diese den Standard für mikroskopische Untersuchungen darstellen, leicht zu kultivieren und gut zu transfizieren sind. Obwohl HEK-293-Zellen ursprünglich der Niere entstammen sollen (HEK, *human embryonic kidney*), weisen sie Merkmale und Expressionsmuster einer neuronalen Zelllinie auf (SHAW, 2002), was wahrscheinlich darauf zurückzuführen ist, dass neuronale Zellen anstelle der Nierenzellen von dem verwendeten Adenovirus 5 in der ursprünglichen Nierenzellkultur transformiert und daraufhin kultiviert

worden sein könnten (SHAW, 2002). Dies könnte auch der Grund dafür sein, dass HEK-293-Zellen den CRF₁R in schwachem Umfang auch endogen exprimieren (DAUTZENBERG, 2000). Trotz der beschriebenen Ähnlichkeit zu neuronalen Zellen wurde zusätzlich eine Zelllinie verwendet, die definitiv neuronalen Ursprungs ist, um sicherzustellen, dass die für die Internalisierung essentielle, physiologische Proteinausstattung vorhanden ist. Die SH-SY-5Y-Zelllinie entstammt einem humanen Neuroblastom (JALAVA, 1990) und exprimiert die CRF-Rezeptoren in geringem Umfang endogen (SCHOEFFTER, 1999). Des Weiteren wurden für die Experimente unterschiedliche Liganden verwendet, namentlich CRF und Sauvagine. CRF besitzt als endogener Ligand zum CRF₁R eine annähernd gleiche Affinität (K_i : 1,5 nM) wie das ursprünglich aus der Froschhaut isolierte Sauvagine (K_i : 0,7 nM). Im Falle des CRF_{2a}R ist dagegen Sauvagine (K_i : 0,5 nM) wesentlich affiner als CRF (K_i : 42 nM) (HAUGER, 2006). Sauvagine besitzt damit eine annähernd gleiche Affinität zu beiden Rezeptortypen. Dadurch kann eine ähnliche Stimulierbarkeit angenommen werden.

Zur Untersuchung des Internalisierungsmechanismus wurden die oben beschriebenen Zelllinien auf für das Laser Scanning Mikroskop (LSM) angepasste Deckgläser ausgesät und transient mit GFP- bzw. YFP-Fusionsproteinen des CRF₁R und CRF_{2a}R (CRF₁R.GFP, CRF₁R.YFP, CRF_{2a}R.GFP und CRF_{2a}R.YFP) bzw. des β -Arrestin 1 und β -Arrestin 2 (β Arr1.GFP und β Arr2.YFP) kotransfiziert. Als Positivkontrolle wurde der GFP-markierte Vasopressin-V2-Rezeptor (V2R.GFP) verwendet, der ebenfalls mit β -Arrestin-Konstrukten kotransfiziert wurde. Anschließend erfolgte die Untersuchung am LSM. Dazu wurden die Zellen nach Einstellen der Fokusebene mit DPBS mit je 100 nM des Liganden stimuliert und Bildfolgen von 100 Bildern alle 15 Sekunden aufgenommen.

Zur besseren Übersicht werden zwei Bildfolgen exemplarisch (Abbildung 3.1) und die restlichen Ergebnisse anstelle einzelner Bilder in einem Diagramm dargestellt (Abbildung 3.2).

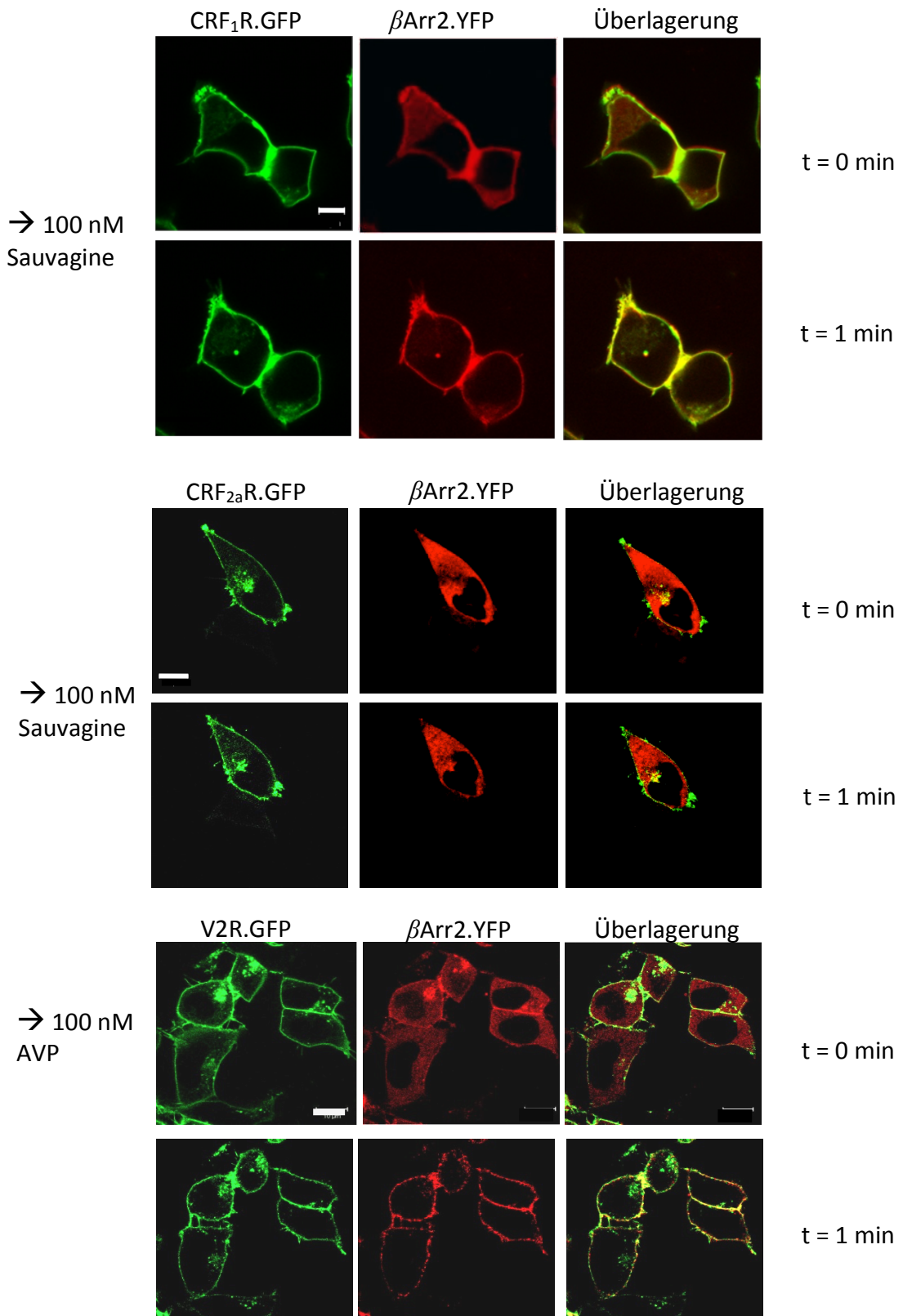


Abbildung 3.1 Untersuchung der β -Arrestin-2-Rekrutierung nach Agonisten-Stimulation

HEK-293-Zellen wurden mit CRF₁R.GFP, CRF_{2a}R.GFP, V2R.GFP (links, grüner Kanal) und β -Arrestin2.YFP (Mitte, roter Kanal) transient transfiziert. Die Zellen wurden mit 100 nM Sauvagine stimuliert und Bilder nach einer Minute mittels LSM aufgenommen. Die Aufnahmen wurden computergestützt überlagert, bei einer Kolokalisation ist eine Gelbfärbung sichtbar. Maßstab = 10 μ m.

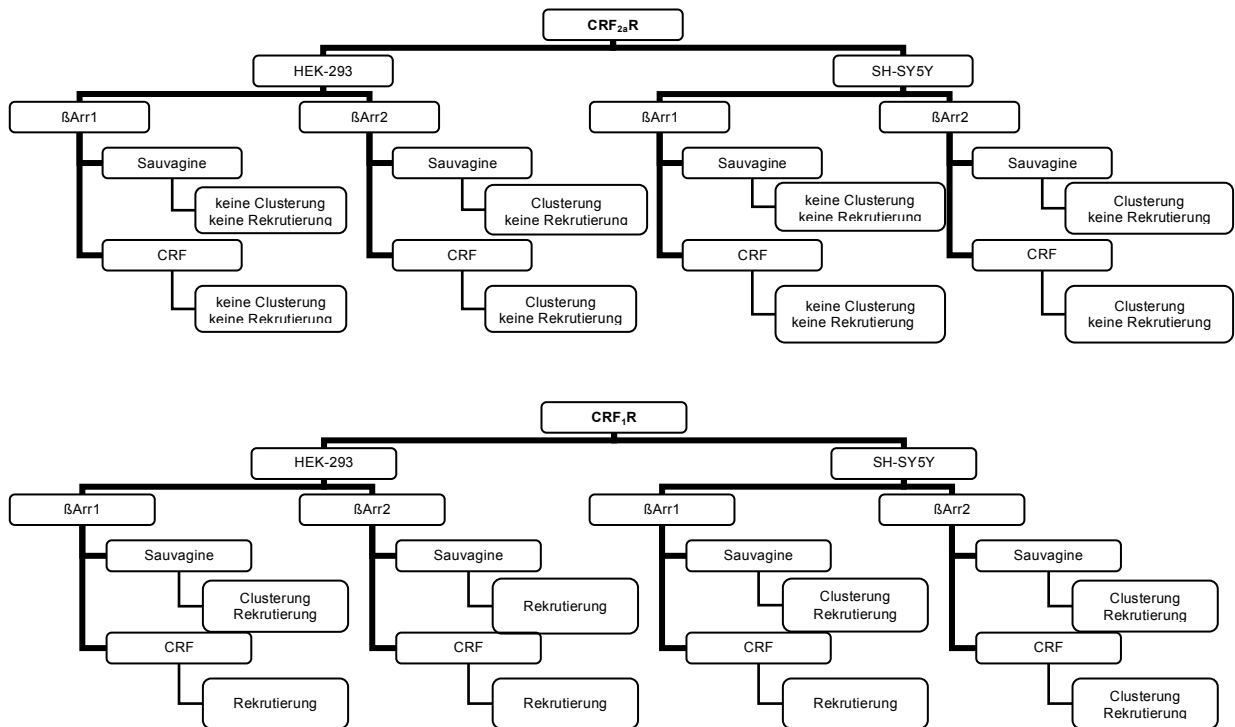


Abbildung 3.2 Zusammenfassung der Ergebnisse: β -Arrestin-Rekrutierung durch den CRF_{2a}R und den CRF₁R nach Stimulation mit verschiedenen Liganden in verschiedenen Zelltypen

HEK-293- bzw. SH-SY-5Y-Zellen wurden transient mit CRF₁R.GFP, CRF₁R.YFP, CRF_{2a}R.GFP oder CRF_{2a}R.YFP-Konstrukten und β -Arrestin1.GFP (β -Arr1) oder β -Arrestin2.YFP (β -Arr2) transient transfiziert. Die Stimulation erfolgte mit 100 nM Sauvagine. Es wurden jeweils mindestens vier unabhängige Experimente durchgeführt. Es wurden je Experiment mindestens 10 Einzelzellen stimuliert.

Als Zusammenfassung der Ergebnisse ist festzuhalten, dass unabhängig vom Agonisten (Sauvagine, CRF) und vom Zelltyp (HEK-293, SH-SY-5Y) beim CRF_{2a}R im Gegensatz zum CRF₁R keine Rekrutierung von β -Arrestin 1 und 2 beobachtet wird. Gelegentlich tritt eine Clusterung von β -Arrestin 2 auf (d.h. es bilden sich punktuelle Akkumulationen von β -Arrestin 2), deren Bedeutung unklar ist.

3.1.2. β -Arrestin-Rekrutierung der N13A.CRF_{2a}R-Signalpeptidmutante

Um zu untersuchen, ob das Pseudosignalpeptid bei der Rekrutierung eine Rolle spielen könnte, wurde das Konstrukt N13A.CRF_{2a}R.GFP verwendet. Bei dieser Mutante wird durch Austausch des Asparagins durch Alanin an der Position 13 das Pseudosignalpeptid in ein konventionelles Signalpeptid überführt und es kommt zur Abspaltung des Signalpeptids (RUTZ, 2006). Gleichzeitig wird die Expression dieser Mutante an der Plasmamembran erhöht, da die frühen Stufen des intrazellulären Transports durch die Überführung des Pseudosignalpeptids in ein konventionelles Signalpeptid effizienter sind.

Bei dieser Mutante, die abgesehen vom fehlenden (da abgespaltenem) Signalpeptid die gleiche Sequenz wie der wildtypische CRF_{2a}R hat, aber verstärkt an der Plasmamembran exprimiert wird, zeigt sich im Gegensatz zum wildtypischen CRF_{2a}R eine deutliche β -Arrestin-Rekrutierung (siehe *Abbildung 3.3*).

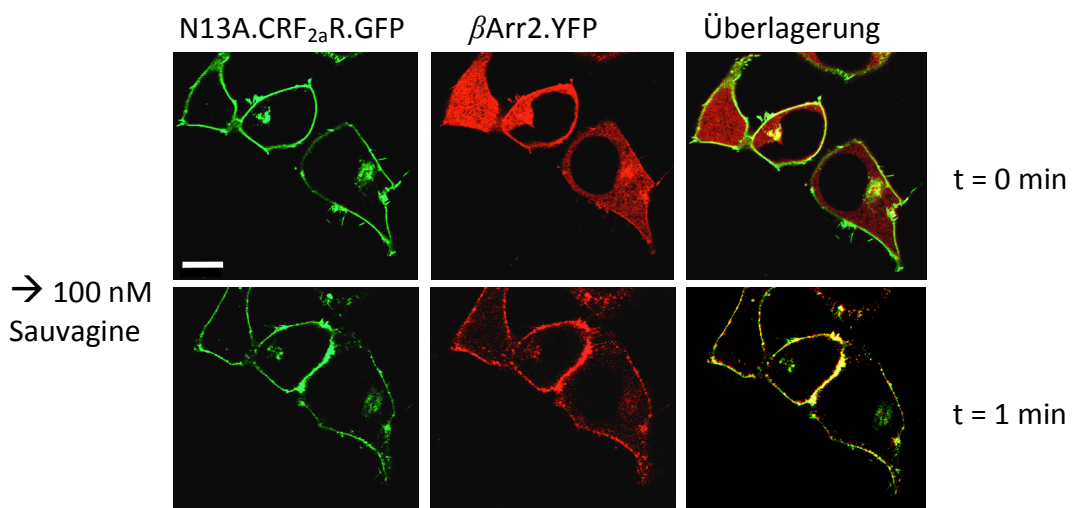


Abbildung 3.3 Untersuchung der β -Arrestin 2-Rekrutierung nach Agonisten-Stimulation

Lokalisation der N13A.CRF_{2a}R.GFP-Signalpeptidmutante bei t=0. Die Stimulation wurde wie in *Abbildung 3.1* beschrieben durchgeführt. Maßstab = 10 μ m. Das Experiment wurde fünfmal wiederholt.

Die Anwesenheit des Signalpeptids des CRF_{2a}R scheint also einen Einfluss auf die β -Arrestin-Rekrutierung und den Internalisierungsmechanismus zu haben. Entweder geschieht dies durch das Signalpeptid selbst oder indirekt durch die erniedrigte Rezeptorexpression.

Eine einfache Erklärung für die nicht zu beobachtende Rekrutierung von β -Arrestin beim CRF_{2a}R könnte sein, dass die Anwesenheit des Pseudosignalpeptids zu einer viel schnelleren Assoziation und Dissoziation des β -Arrestins führt, die sich der mikroskopischen Detektion entzieht. Andererseits könnte das Pseudosignalpeptid zu einem β -Arrestin-unabhängigen Internalisierungsmechanismus führen. Eine beschleunigte Assoziation/Dissoziation von β -Arrestin sollte mit einer schnelleren Internalisierungskinetik des CRF_{2a}R einhergehen. Daher wurde im Folgenden die Internalisierungskinetik der Konstrukte untersucht.

3.1.3. Untersuchung der Internalisierungskinetik des CRF_{2a}R, CRF₁R und der Signalpeptidmutante N13A.CRF_{2a}R

Zur Untersuchung der Internalisierungskinetik wurden stabil transfizierte HEK-293-Zellen verwendet (GFP-fusionierte Konstrukte des CRF_{2a}R, CRF₁R und N13A.CRF_{2a}R). Nach Stimulation mit dem Agonisten Sauvagine wurden nach unterschiedlichen Zeitintervallen jeweils sowohl die verbleibenden Rezeptoren an der Plasmamembran als auch die Menge der internalisierten Rezeptoren bestimmt. So konnte der Anteil der internalisierten Rezeptoren für diese drei Konstrukte in Abhängigkeit der Zeit errechnet werden (*Abbildung 3.4*).

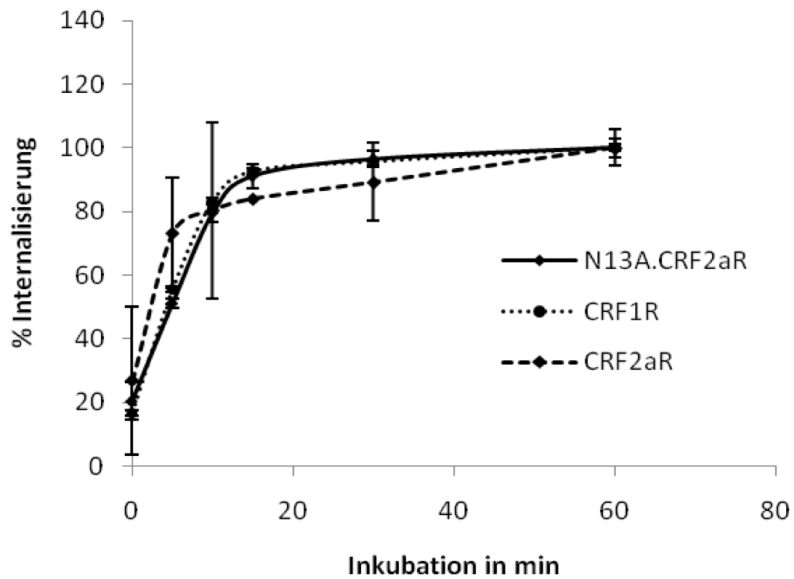


Abbildung 3.4 Internalisierungskinetik des CRF₁R, CRF_{2a}R und N13A.CRF_{2a}R

Stabil transfizierte HEK-293-Zellen (CRF₁R, CRF_{2a}R und N13A.CRF_{2a}R) wurden in 24-Well-Platten ausgesät und nach 48 h mit dem Agonisten Sauvagine (100 nM) und einer Tracerkonzentration (0,1 nM) des radioaktivmarkierten Liganden [¹²⁵I]-Tyro-Sauvagine über verschiedene Zeiträume inkubiert (0, 5, 10, 15, 30, 60min), um die Internalisierung zu induzieren. Anschließend wurde der Ligandenmix durch Behandlung der Zellen mit 50mM Essigsäure (*acid wash*) entfernt und die Radioaktivität gemessen (extrazelluläre Bindung, EC). Nachfolgend wurden die Zellen lysiert und die Radioaktivität der Zellsuspension quantifiziert (intrazellulär, IC). Als „% Internalisierung“ ($IC/(IC + EC) \cdot 100$) wird die intrazelluläre Radioaktivität (IC) im Verhältnis zur Gesamtradioaktivität (IC + EC) definiert. Alle Werte wurden doppelt bestimmt, mit Standardabweichungen versehen und auf den Maximalwert normiert. Das Experiment wurde dreimal wiederholt.

Es zeigte sich, dass der CRF₁R und die Signalpeptidmutante N13A.CRF_{2a}R eine nahezu identische Internalisierungskinetik aufweisen. Dies stimmt mit den Internalisierungsexperimenten am LSM überein. Beim CRF_{2a}R könnte es anfänglich zu einer etwas schnelleren Internalisierung kommen. Dieser Unterschied war jedoch in diesen Experimenten nicht signifikant. Es ist daher unwahrscheinlich, dass die nicht zu beobachtende β -Arrestin-Rekrutierung beim CRF_{2a}R auf eine schnellere Internalisierungskinetik, respektive schnellerer Assoziation/Dissoziation von β -Arrestinen zurückzuführen ist.

3.1.4. Untersuchung der Interaktion zwischen CRF_{2a}R und β -Arrestinen

Um zu untersuchen, ob der CRF_{2a}R grundsätzlich mit β -Arrestinen interagiert, wurden Co-Immunpräzitationsstudien (Co-IP) durchgeführt. In diesen Experimenten konnte aber auch nach vielfältiger Modifikation der Versuchsbedingungen keine Co-Immunpräzitation von β -Arrestin mit dem CRF_{2a}R nachgewiesen werden. Der als Positivkontrolle verwendete Vasopressin-V2-Rezeptor zeigte hingegen eine Interaktion mit β -Arrestin 2, die durch 8-Arginin-Vasopressin-(AVP)-Behandlung verstärkt wurde (Abbildung 3.5).

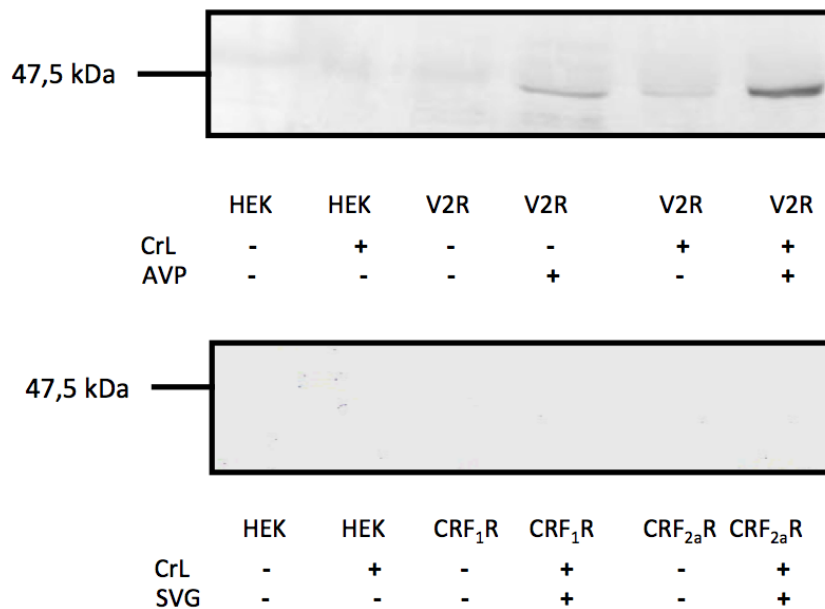


Abbildung 3.5 Co-Immunpräzitation mit β -Arrestin 2

Mit dem V2R, CRF₁R und CRF_{2a}R stabil transfizierte HEK-293-Zellen wurden mit β -Arrestin kotransfiziert. Die Rezeptoren wurden mit 100 nM AVP oder 100 nM Sauvagine (SVG) und dem Crosslinker (CrL) DSP (Dithiobis(succinimidyl)propionat) inkubiert oder blieben unbehandelt. Die Rezeptoren wurden mit α -GFP02-Antikörpern präzipitiert und mit Hilfe einer SDS-PAGE/Immunoblot-Analyse detektiert (Erstantikörper: α - β -Arrestin, Maus, monoklonal; Zweitantikörper: α -Maus-IgG-Antikörper, alkalische-Phosphatase-gekoppelt). Eine Spur entspricht dem Präzipitat aus Zellen einer viertel 100-mm-Schale. Die Ergebnisse wurden dreimal reproduziert.

Auch für den CRF₁R konnte in diesen Experimenten keine Interaktion mit β -Arrestin 2 nachgewiesen werden. Dies kann darauf zurückgeführt werden, dass dieser Rezeptor zur Gruppe 1 des Rezeptor- β -Arrestin-Interaktionstypus gehört, d.h. dass in diesem Fall die Interaktion nur transient ist.

Zusammengefasst könnten die bisherigen Ergebnisse zum einen darauf hindeuten, dass der CRF_{2a}R einen komplett anderen, β -Arrestin-unabhängigen Internalisierungsmechanismus aufweist. Es ist auch möglich, dass der CRF_{2a}R wie der CRF₁R zum transienten β -Arrestin-Interaktionstypus (Gruppe 1) gehört. Die fehlende β -Arrestin-Rekrutierung beim CRF_{2a}R könnte aber auch dadurch erklärt werden, dass durch die niedrige Rezeptorexpression nur sehr wenig β -Arrestin rekrutiert wird, das sich in den bisher durchgeführten Experimenten der Detektion entzieht.

3.1.5. β -Arrestin-Rekrutierung in Abhängigkeit der Oberflächenexpression

Um abschließend zu klären, ob eine erniedrigte Oberflächenexpression eines Rezeptors zu einer nicht detektierbaren Rekrutierung von β -Arrestin führt, wurden stabile Klone des GFP-fusionierten CRF₁R verwendet, die unterschiedliche Rezeptormengen an der Oberfläche exprimieren (unter Abschnitt 3.3 näher beschrieben). Verhindert eine erniedrigte Rezeptorexpression die Detektion der β -Arrestin-Rekrutierung, sollte dies auch beim CRF₁R zu beobachten sein. Für diese Untersuchungen wurde zum einen der CRF₁R-Klon A2 verwendet, der eine ungefähr dreimal so hohe Plasmamembran-Expression aufweist wie der ebenfalls verwendete Klon CRF₁R A6. YFP-markiertes β -Arrestin 2 wurde kotransfiziert, die Zellen anschließend mit 100 nM Sauvagine stimuliert und die β -Arrestin-Rekrutierung bestimmt (*Abbildung 3.6*).

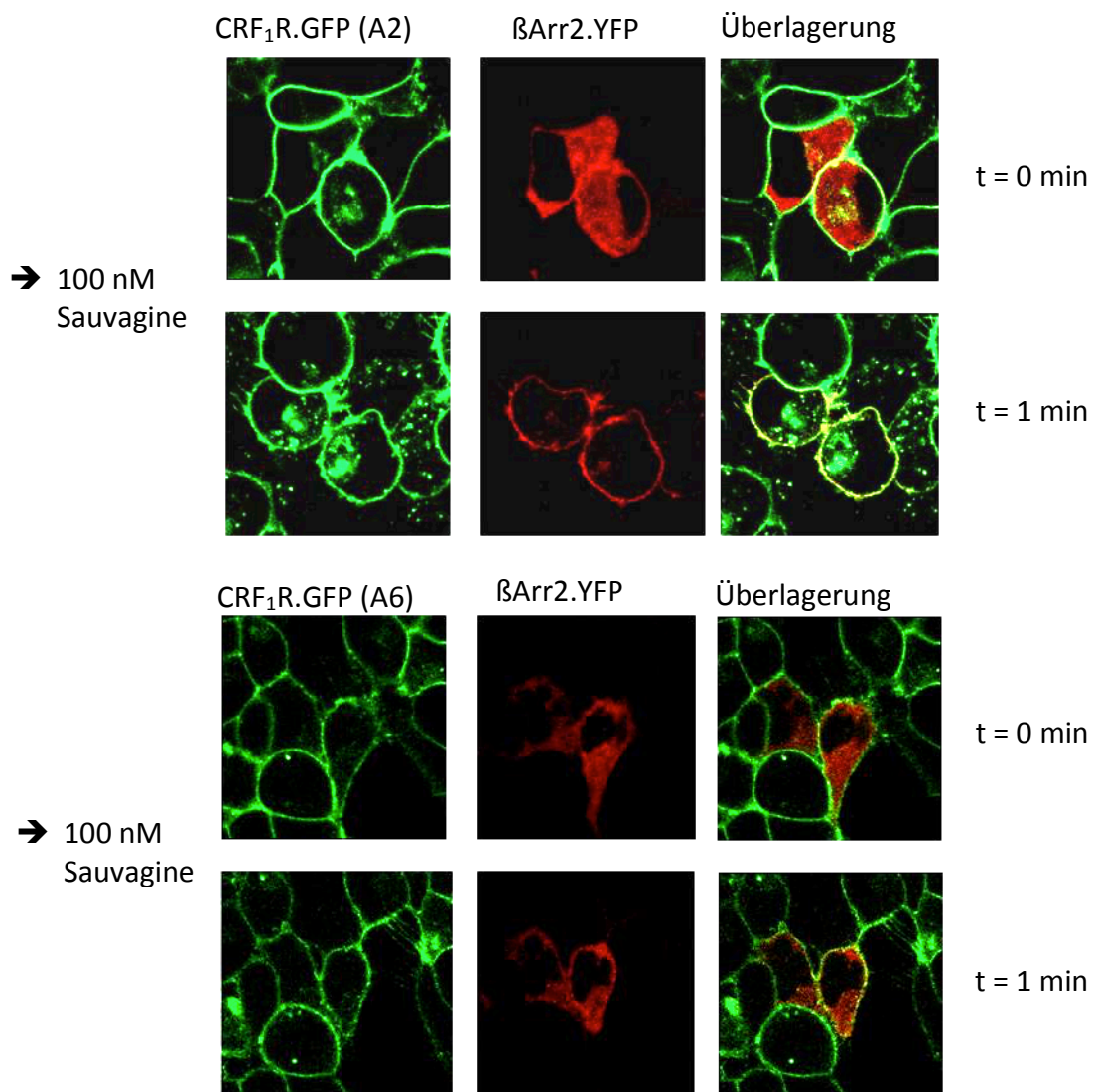


Abbildung 3.6 Untersuchung der β -Arrestin-2-Rekrutierung der CRF₁R-Klone A2 und A6 nach Agonisten-Stimulation

Die Zellklone A2 und A6 wurden auf 35 mm-Deckgläser ausgesät und anschließend mit 100 nM Sauvagine stimuliert. Die Bilder wurden nach einer Minute mittels LSM aufgenommen. Die Aufnahmen wurden computergestützt überlagert, bei einer Kolo-kalisation ist eine Gelbfärbung sichtbar.

Die Zellen, die den CRF₁R stark an der Oberfläche exprimieren (Klon A2), zeigen eine β -Arrestin-Rekrutierung wie oben beschrieben. Bei Zellen, die den CRF₁R dagegen nur schwach exprimieren (Klon A6), ist keine Rekrutierung erkennbar. Demnach zeigt sich, dass die

Oberflächenexpression einen bedeutenden Einfluss auf die Detektierbarkeit der β -Arrestin-Rekrutierung hat.

3.1.6. Zusammenfassung und Diskussion der bisherigen Ergebnisse

Der Internalisierungsvorgang beim CRF_{2a}R lässt keine β -Arrestin-Rekrutierung an die Plasmamembran erkennen. Hier wurde die Hypothese untersucht, ob dies durch einen andersartigen Internalisierungsmechanismus bedingt werden könnte, der durch das Pseudosignalpeptid hervorgerufen wird. Experimente zur Kinetik zeigten jedoch keinen signifikanten Unterschied in der Internalisierungskinetik. Zur Überprüfung der β -Arrestin-Rezeptor-Interaktion wurden Co-Immunpräzipitationsstudien durchgeführt, bei denen lediglich eine Interaktion von β -Arrestin mit dem Vasopressin-V2-Rezeptor gezeigt werden konnte, wie bereits in der Literatur beschrieben (TERRILLON, 2004).

Zusammengefasst weisen diese Untersuchungen darauf hin, dass der CRF_{2a}R trotz fehlender β -Arrestin-Rekrutierung wahrscheinlich keinen anderen Rekrutierungs- und Internalisierungsmechanismus im Vergleich zum CRF₁R aufweist. Auch wenn eine β -Arrestin-unabhängige Internalisierung des CRF_{2a}R im Augenblick nicht ausgeschlossen werden kann, legen obige Daten eher nahe, dass im Fall des CRF_{2a}R die fehlende β -Arrestin-Rekrutierung auf einem Detektionsproblem beruht, das durch eine erniedrigte Rezeptorexpression hervorgerufen wird. Die Ergebnisse zeigen auch, dass die Oberflächenexpression der Rezeptoren eine entscheidende Rolle bei der detektierbaren β -Arrestin-Rekrutierung spielt. Wahrscheinlich interagieren die Rezeptoren nur transient mit dem cytosolischen β -Arrestin-Pool und im Fall niedriger Rezeptormengen an der Oberfläche liegt diese Interaktion vermutlich unter der Nachweisgrenze. Für nachfolgende Studien ist daher die Verwendung von sensitiveren Untersuchungsmethoden, wie z.B. FRET (*Fluorescence Resonance Energy Transfer*) angebracht.

Diese Ergebnisse sind für viele bereits publizierte und noch folgende Studien wichtig: Die β -Arrestin-Rekrutierung sollte immer auf die Rezeptormenge an der Plasmamembran bezogen werden. Auch mittels Co-Immunpräzipitationsstudien konnte keine Interaktion zwischen CRF-Rezeptor und β -Arrestin nachgewiesen werden. Auch in diesem Fall greifen die oben genannten Argumente, da auch hier wenig Rezeptor nur wenig β -Arrestin kopräzipitieren

kann. Im Falle des V2R wird die Co-Immunpräzipitation zusätzlich dadurch erleichtert, dass dieser stabile Komplexe mit β -Arrestin eingeht. Dieser Rezeptor gehört der Gruppe 2 des β -Arrestin-Rezeptor-Interaktionstypus an, d.h. seine Interaktion mit β -Arrestinen ist stabil und die β -Arrestine dissoziieren erst spät von den internalisierten Vesikeln. Dies kann man im Laser Scanning Mikroskop anhand der Kollokationen erkennen. Der CRF₁-Rezeptor hingegen gehört zur Gruppe 1, d.h. seine Interaktion mit β -Arrestin ist transienter Natur. Die β -Arrestine verbleiben an der Plasmamembran und kollokalisieren nicht mit Rezeptor-tragenden Vesikeln (*Abbildung 3.1, OAKLEY, 2007 und SCHMIDT, 2009*). Dies könnte ein Grund für die Nicht-Nachweisbarkeit der β -Arrestin-Rezeptor-Komplexe sowohl per LSM als auch per Co-Immunpräzipitation sein. Es spielen also mehrere Faktoren bei der Untersuchung der β -Arrestin-Rekrutierung eine Rolle: zum einen der Interaktionstypus zwischen Rezeptor und β -Arrestinen, und zum anderen die Oberflächenexpression der Rezeptoren.

Ein weiterer Hinweis, dass auch der wildtypische CRF_{2a}R in geringem Maße mit β -Arrestinen interagieren könnte, sind partiell auftretende Clusterungen von β -Arrestin 1 oder 2, die eine Vorstufe der Rekrutierung darstellen könnten. Dies konnte auch zuvor bei *Krasel et al, 2008* beobachtet werden, wo eine C-terminale Trunkierungsmutante des β_2 -adrenergen Rezeptors keine vollständige Rekrutierung zeigt, sondern ebenfalls nur eine Clusterung.

Da die bisherigen Untersuchungen zeigten, dass das Pseudo-Signalpeptid des CRF_{2a}R wahrscheinlich keinen Einfluss auf den Internalisierungsmechanismus hat, sollte im Folgenden der Einfluss des Pseudosignalpeptids auf den intrazellulären Transport im Detail untersucht werden.

3.2. Untersuchung der Bedeutung des Pseudosignalpeptids des CRF_{2a}R für den intrazellulären Transport

Das am Rezeptor verbleibende Pseudosignalpeptid des CRF_{2a}R beeinflusst offenbar nicht den Internalisierungsmechanismus (siehe *Abschnitt 3.1*). Bei den dazu durchgeführten Untersuchungen verdichteten sich die Hinweise, dass durch das Vorhandensein des Pseudosignalpeptids die Oberflächenexpression beeinflusst wird. Der CRF_{2a}R scheint weitaus geringer an der Zelloberfläche exprimiert zu sein als der CRF₁R. Daher sollte im Folgenden der Einfluss des Pseudosignalpeptids auf den intrazellulären Transport, respektive die Oberflächenexpression, vergleichend analysiert werden.

Zur systematischen Untersuchung wurden die Rezeptoren CRF₁R und CRF_{2a}R herangezogen und *domain-swapping*-Mutanten konstruiert: dazu wurde das konventionelle Signalpeptid des CRF₁R gegen das Pseudosignalpeptid des CRF_{2a}R ausgetauscht und umgekehrt. Daraus ergaben sich folgende Konstrukte: CRF₁R, CRF_{2a}R, SP1.CRF_{2a}R, SP2.CRF₁R (*Abbildung 3.7*). Zusätzlich wurden die Signalpeptiddeletionsmutanten Δ SP.CRF₁R und Δ SP.CRF_{2a}R verwendet. Alle Konstrukte wurden C-terminal mit GFP fusioniert. Die Fusion mit GFP hat keine Auswirkung auf die Rezeptorpharmakologie und den Rezeptortransport (Daten hier nicht gezeigt).

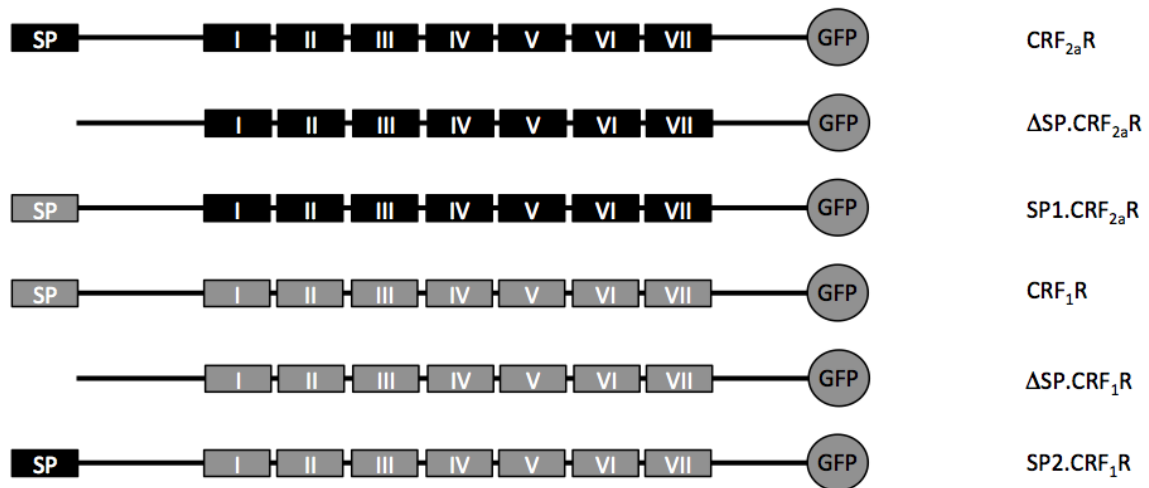


Abbildung 3.7 Schematische Darstellung der verwendeten Konstrukte

Die Kästen stellen die Signalpeptide (SP) und die Transmembrandomänen (I-VII) der verwendeten Konstrukte des CRF_{2a}R und CRF₁R dar. Alle Konstrukte sind C-terminal mit GFP fusioniert.

3.2.1. Bestimmung der Ligandenbindungseigenschaften

Zunächst sollte mittels eines kompetitiven Bindungsversuchs untersucht werden, ob das Pseudosignalpeptid Einfluss auf die Ligandenbindungseigenschaften hat. Dazu wurden die Bindungsprofile der verwendeten Konstrukte (*Abbildung 3.7*) analysiert, insbesondere die K_D - und B_{max} -Werte. Membranpräparationen, die die Konstrukte enthielten, wurden mit steigenden Konzentrationen des Liganden Sauvagine inkubiert und die verbleibende Radioaktivität des Tracers [¹²⁵I]-Tyr⁰-Sauvagine gemessen.

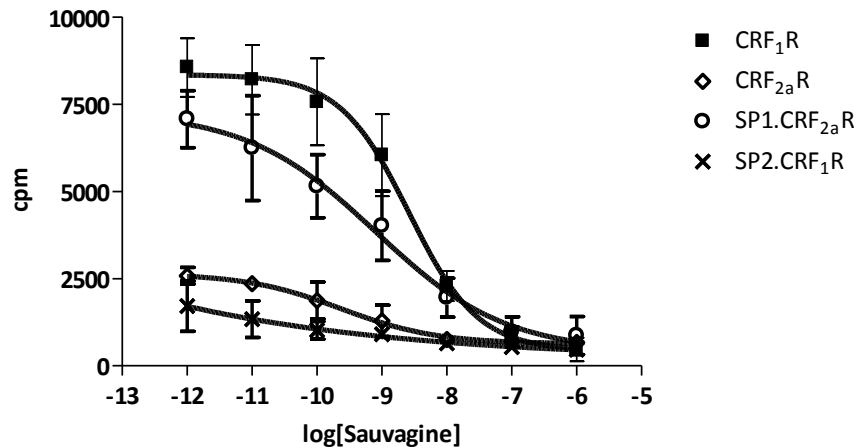


Abbildung 3.8 Kompetitiver Bindungsassay zur Bestimmung der K_D - und B_{max} -Werte

Membranextrakte von mit den oben angegebenen Konstrukten transient transfizierten HEK-293-Zellen wurden mit steigenden Konzentrationen des Liganden Sauvagine inkubiert, und anschließend die verbleibende Radioaktivität des Tracers [125 I]-Tyr^o-Sauvagine detektiert. Das Experiment wurde dreimal durchgeführt. Die Fehlerbalken zeigen die Standardabweichungen von Doppelbestimmungen eines repräsentativen Experimentes.

Aus den Bindungskurven in *Abbildung 3.8* konnten mit Hilfe des Programms KELL-RadLig (*BIOISOFT, CAMBRIDGE, UK*) die K_D - und B_{max} -Werte errechnet werden (Tabelle 3.1).

	B_{max} [fmol/mg Prot]	K_D [nM]
CRF ₁ R	490 ± 33	0,78 ± 0,1
CRF _{2a} R	122 ± 30	0,52 ± 0,3
SP2.CRF ₁ R	62 ± 18	2,32 ± 1,4
SP1.CRF _{2a} R	396 ± 34	0,74 ± 0,1
DSP.CRF ₁ R	n.b.	n.b.
DSP.CRF _{2a} R	n.b.	n.b.

Tabelle 3.1 K_D - und B_{max} -Werte der CRFR-Konstrukte

Aus Bindungswerten des kompetitiven Bindungsexperiments wurden mit Hilfe des Programms KELL-RadLig (*Biosoft, Cambridge, UK*) die K_D - und B_{max} -Werte bestimmt. Das Experiment wurde dreimal durchgeführt. (n.b. – nicht bestimmbar)

Die K_D -Werte der wildtypischen Rezeptoren und der *domain-swapping*-Mutanten bewegen sich im annähernd gleichen Bereich. Die Abweichung beim SP2.CRF₁R kann mit der stärkeren Streuung der Werte erklärt werden. Die Werte decken sich sehr gut mit Literaturdaten für die wildtypischen Konstrukte (HAUGER, 2006).

Für die jeweiligen Signalpeptiddeletionsmutanten konnten keine K_D -/ B_{max} -Werte bestimmt werden. Die Messwerte waren sehr niedrig und wiesen eine so hohe Streuung auf, dass keine verlässliche Verdrängungskurve erstellt werden konnte. Bei den B_{max} -Werten erkennt man einen grundlegenden Unterschied, ob die Konstrukte das abspaltbare Signalpeptid des CRF₁R besitzen (CRF₁R und SP1.CRF_{2a}R) oder das Pseudosignalpeptid des CRF_{2a}R (CRF_{2a}R und SP2.CRF₁R). Es zeigten sich ca. 4-fach erniedrigte B_{max} -Werte, wenn das Pseudosignalpeptid vorhanden ist. Da der B_{max} -Wert ein Maß für die Rezeptoranzahl ist, bedeutet dies, dass die Konstrukte CRF₁R und SP1.CRF_{2a}R im Vergleich zu CRF_{2a}R und SP2.CRF_{2a}R etwa vierfach stärker exprimiert werden.

Obige Versuche wurden mit Gesamtmembranen durchgeführt, spiegeln daher die Gesamtexpression der Rezeptoren wider und liefern nur einen Anhaltspunkt für eine veränderte Oberflächenexpression. Eine Messung der B_{max} -Werte an intakten Zellen, führte jedoch zu sehr großen Streuungen innerhalb der Versuchsreihen (Daten nicht gezeigt) und war daher nicht auswertbar.

Zusammengefasst kann festgehalten werden, dass sich die Ligandenaffinität durch den Signalpeptidaustausch nicht ändert. Die Rezeptorexpression ist aber bei Konstrukten, die das Pseudosignalpeptid tragen, stark verringert. Da hier die Gesamtexpression untersucht wurde, sollte nun im Folgenden der Einfluss des Pseudosignalpeptids auf die Oberflächenexpression quantifiziert werden.

3.2.2. Einfluss des Pseudosignalpeptids auf die Oberflächenexpression

Bereits die Untersuchungen an Membranextrakten deuteten darauf hin, dass der CRF_{2a}R weitaus geringer an der Oberfläche exprimiert wird als der CRF₁R. Dies gilt ebenso für alle SP2-tragenden Konstrukte. Das Pseudosignalpeptid scheint daher eine entscheidende Rolle für das Expressionsniveau zu spielen.

Zunächst wurde die Plasmamembranlokalisierung der angegebenen Konstrukte mittels LSM und einer Trypanblaufärbung untersucht (*Abbildung 3.9*).

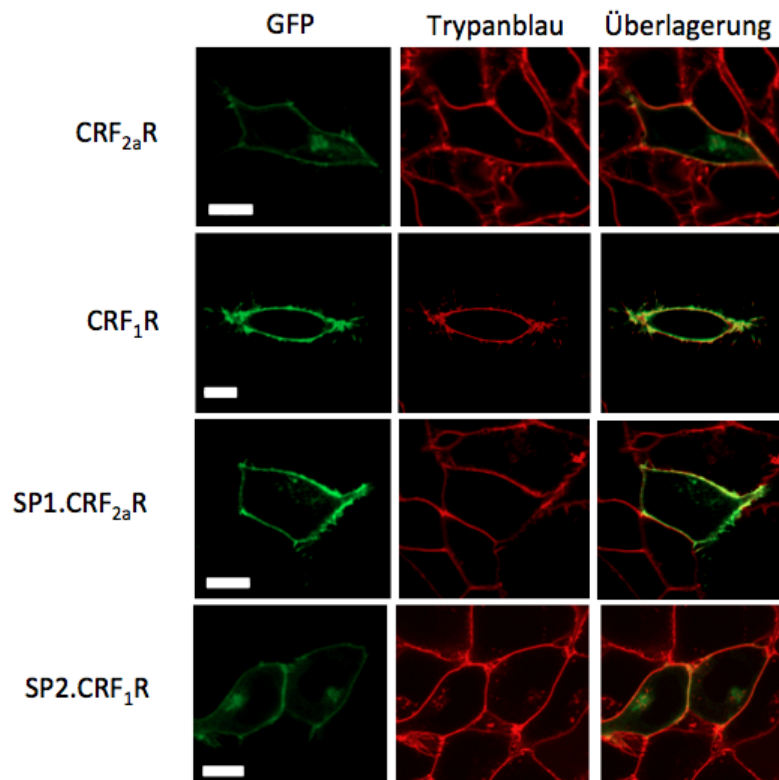


Abbildung 3.9 Analyse der Rezeptor-Lokalisation mittels LSM

Die GFP-Fluoreszenzsignale der Konstrukte CRF₁R, SP2.CRF₁R, CRF_{2a}R und SP1.CRF_{2a}R (exprimiert in transient transfizierten HEK-293-Zellen) sind grün dargestellt (links), die des Plasmamembranmarkers Trypanblau in rot (mitte). Eine Kolokalisation wird in der digitalen Überlagerung beider Kanäle in gelb gezeigt (rechts). Die dargestellten Ergebnisse sind repräsentativ für drei unabhängige Experimente. Maßstab = 10 µm.

Die Überlagerung der Rezeptor-GFP-Fluoreszenzen mit der in rot dargestellten Trypanblau-Fluoreszenz zeigt im Falle des CRF₁R und SP1.CRF_{2a}R eine deutliche Kolokalisation (in gelb). Der CRF_{2a}R und SP2.CRF₁R sind dagegen nur in geringem Maße an der Plasmamembran lokalisiert.

Als nächstes wurde die Oberflächenexpression der Konstrukte mittels automatischer Mikroskopie quantifiziert (*Abbildung 3.10*). Dazu wurden mit den angegebenen Konstrukten transient transfizierte HEK-293-Zellen in 24-Well-Platten ausgesät, eine Kernfärbung mit

Hoechst 33342 und eine Plasmamembranfärbung mit Trypanblau durchgeführt. Die Kolokalisation der GFP-Fluoreszenzen mit dem Plasmamembranmarker Trypanblau wurde bei mindestens 400 Zellen für jedes Konstrukt gemessen.

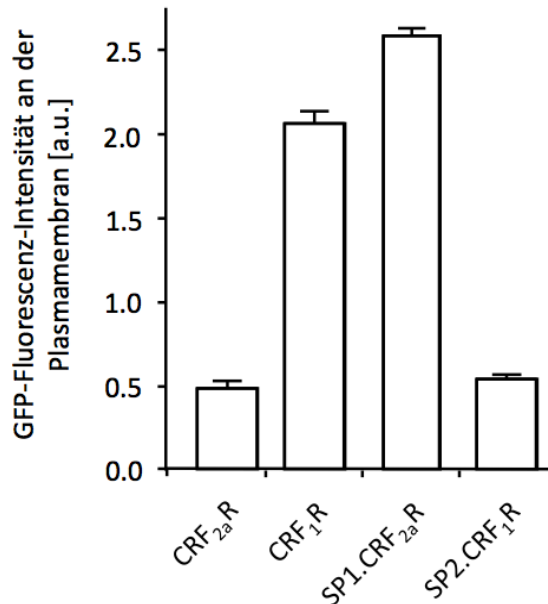


Abbildung 3.10 Quantifizierung der Oberflächenexpression mittels automatischer Mikroskopie

Mit den Konstrukten CRF₁R, SP2.CRF₁R, CRF_{2a}R und SP1.CRF_{2a}R transient transfizierte HEK-293-Zellen wurden in 24-Well-Platten ausgesät und nach 48 h mit Hoechst 33342 (Kernfärbung) und Trypanblau (Plasmamembranfärbung) behandelt. Danach wurde die Kolokalisation der GFP-Fluoreszenzen mit dem Plasmamembranmarker Trypanblau mittels automatischer Mikroskopie quantifiziert (a.u. – *arbitrary units*). Das Experiment wurde dreimal wiederholt. Die Balken stellen Mittelwerte von drei unabhängig voneinander durchgeführten Experimenten dar (+/- SD). Im Einzelexperiment wurde die GFP-Plasmamembranintensität von mindestens 400 Zellen für jedes Konstrukt analysiert.

Die Anwesenheit des Pseudosignalpeptids bewirkt eine ca. um den Faktor 4 verringerte Oberflächenexpression des CRF_{2a}R gegenüber dem CRF₁R an der Plasmamembran. Diese Eigenschaft kann auf den CRF₁R über das Pseudosignalpeptid übertragen werden. Alle SP2-tragenden Konstrukte weisen demnach eine verringerte Oberflächenexpression auf.

Um diese Ergebnisse mit biochemischen Methoden zu verifizieren, wurden Biotinylierungsexperimente durchgeführt (Abbildung 3.11). Biotin bindet kovalent an freie

Aminogruppen, ist nicht zellpermeabel und kann damit zur selektiven Markierung von Plasmamembranproteinen verwendet werden. Mit den angegebenen Konstrukten transient transfizierte HEK-293-Zellen wurden mit Biotin markiert, anschließend lysiert und aus dem Lysat über ein α -GFP-Antiserum präzipitiert. Nach Deglykosylierung mit PNGaseF erfolgte die Detektion über α -Biotin-(Oberflächenproteine) bzw. α -GFP-Erstantikörper (Gesamtprotein) und entsprechenden Sekundärantikörpern.

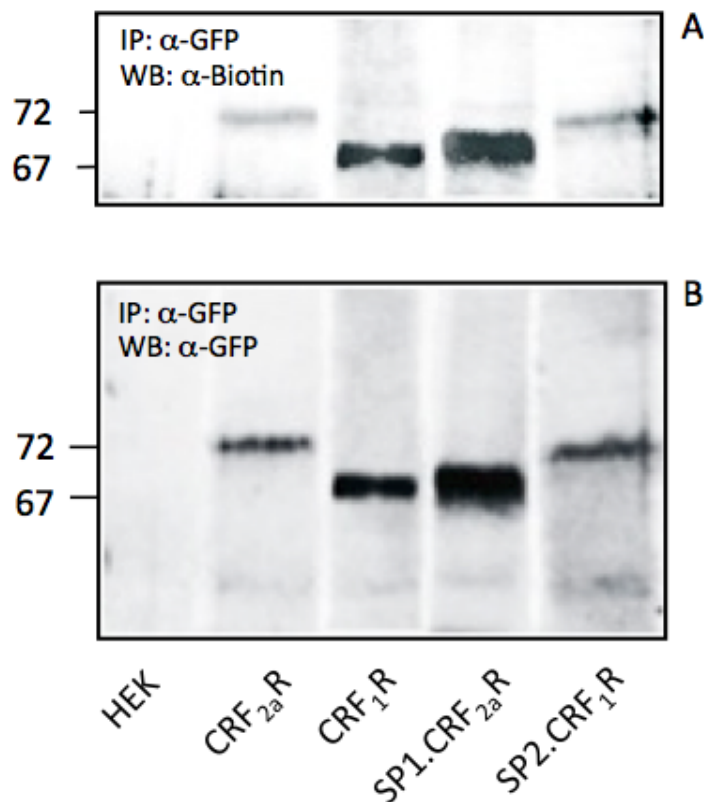


Abbildung 3.11 Untersuchung der Rezeptorexpression mittels eines Oberflächenbiotinylierungsversuches

Mit den Konstrukten CRF_{2a}R, CRF₁R, SP1.CRF_{2a}R und SP2.CRF₁R transient transfizierte HEK-293-Zellen wurden biotinyliert, lysiert und anschließend mit einem α -GFP-Antiserum aufgereinigt. Nach Deglykosylierung mit PNGaseF wurden die Rezeptoren mittels SDS-Page aufgetrennt und (A) über einen polyklonalen Kaninchen- α -Biotin- (Oberflächenproteine) bzw. (B) monoklonalen Maus- α -GFP-Erstantikörper (Gesamtprotein) und entsprechenden Sekundärantikörpern (DyLight 800-konjugierter α -Kaninchen-Antikörper bzw. DyLight 680-konjugierter α -Maus-Antikörper) detektiert. Die Blots sind repräsentativ für drei unabhängige Experimente.

Die Intensität der Rezeptorbanden derjenigen Rezeptoren, die das Pseudosignalpeptid aufweisen, ist in einem ähnlichen Maße reduziert, wie in den Experimenten zuvor beschrieben. Auch hier konnte diese Eigenschaft durch Austausch des Pseudosignalpeptides auf den CRF₁R übertragen werden.

Im Folgenden sollte der zugrunde liegende Mechanismus der erniedrigten Rezeptorexpression bei Vorhandensein des Pseudosignalpeptids untersucht werden.

3.2.3. Untersuchung des Glykosylierungsstatus mittels Immunpräzipitation

Eine mögliche Erklärung, warum bei Konstrukten mit Pseudosignalpeptid die Oberflächenexpression erniedrigt ist, kann darin zu finden sein, dass das Pseudosignalpeptid die Faltungseffizienz des Rezeptors beeinflusst. Das Pseudosignalpeptid könnte das Faltungsgeschehen hin zum nativen Rezeptor so verändern, dass zunehmend hydrophobe Strukturen der Polypeptidkette exponiert werden. Es würde vermehrt zu fehlgefalteten Rezeptoren kommen, die durch das Qualitätskontrollsystem erkannt und im ER retiniert werden. Wie in 1.1.3 beschrieben, werden Rezeptoren im ER nur mannosereich glykosyliert und erst nachfolgend ab dem ERGIC einer komplexen Glykosylierung unterzogen. Nur die komplex-glykosylierten Rezeptoren erreichen daher die Plasmamembran. Eine mögliche Fehlfaltung, die durch das Pseudosignalpeptid induziert wird, sollte daher zu einer Anreicherung von unglykosylierten und mannosereich-glykosylierten (unreifen) Rezeptorformen führen.

Um dies zu untersuchen, wurden die Konstrukte im Folgenden durch Immunpräzipitationen auf ihren Glykosylierungsstatus hin untersucht und quantifiziert (*Abbildung 3.12* und *3.13*).

Dazu wurden HEK-293-Zellen mit den oben beschriebenen Konstrukten transient transfiziert und nach 48 h lysiert. Die Präzipitation erfolgte mit Hilfe des polyklonalen α -GFP02-Antiserums, die Detektion über monoklonalen α -GFP-Antikörper und alkalische-Phosphatase-konjugiertes α -Maus-IgG. Die mit ‚+‘ gekennzeichneten Banden stellen die komplex-glykosylierten Rezeptoren, die mit ‚#‘ die nicht glykosylierten und die mit ‚*‘ die mannosereich-glykosylierten Rezeptoren dar. Die Identität der Rezeptorformen wurde mit Hilfe von Deglykosylierungsexperimenten mit den Restriktionsenzymen EndoH und PNGase F verifiziert (Daten nicht gezeigt).

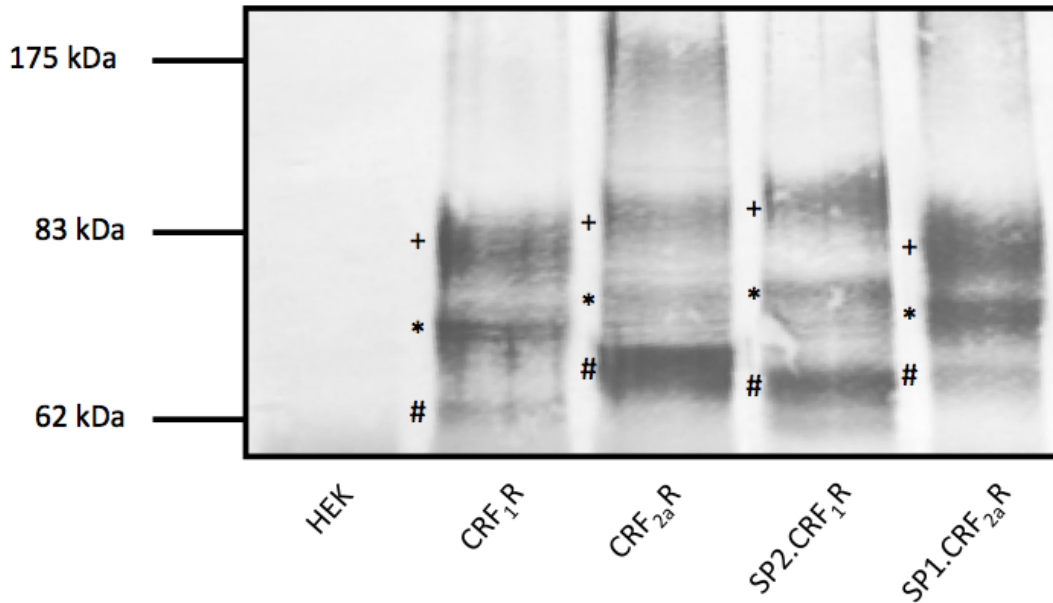
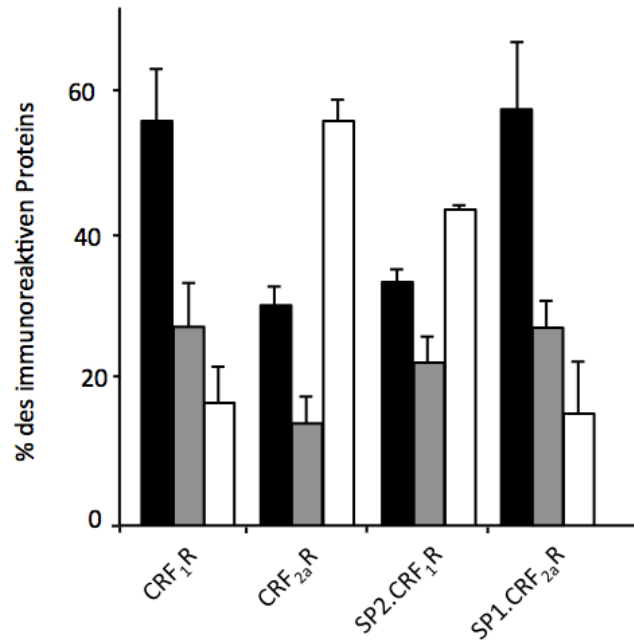


Abbildung 3.12 Untersuchung des Glykosylierungsstatus verschiedener CRFR-Konstrukte mittels Immunpräzipitation

Die Präzipitation der oben bezeichneten CRFR-Konstrukte erfolgte mit α -GFP02-Antikörpern, die an Protein-A-Sepharose-Beads gekoppelt wurden. Nach Auftrennung mittels einer SDS-PAGE und anschließendem Blotting auf eine Nitrozellulose-Membran wurden die Rezeptoren mit α -GFP-Erstantikörper (Maus, monoklonal) und mit α -Maus-Sekundärantikörper (Alkalische Phosphatase gekoppelt) über eine BCIP/NBT-Farbreaktion detektiert. Proteinbanden: + bezeichnet die komplex-glykosylierten, * die mannosereich-glykosylierten, # die unglykosylierten Rezeptoren. Eine Spur entspricht dem Präzipitat aus Zellen einer viertel 100mm-Schale. Der Versuch wurde dreimal durchgeführt.



	%	CRF ₁ R	CRF _{2a} R	SP2.CRF ₁ R	SP1.CRF _{2a} R
■	komplex	56 ± 7	30 ± 2	34 ± 2	57 ± 10
■	mannosereich	27 ± 6	14 ± 3	23 ± 2	27 ± 4
□	nicht glykosyliert	17 ± 5	55 ± 4	44 ± 0	15 ± 7

Abbildung 3.13 Anteil der einzelnen immunoreaktiven Proteinbanden

Die Proteinbandenintensität auf den Nitrozellulosemembranen wurde am Lumilmager® densitometrisch quantifiziert und die relative Menge für jedes Konstrukt berechnet. Die Säulen stellen die Mittelwerte der Bandenintensitäten von drei unabhängigen Experimenten dar (+/- SD).

Der CRF₁-Rezeptor und der SP1.CRF_{2a}-Rezeptor weisen einen hohen Anteil an komplex-glykosyliertem Rezeptor auf (56 % bzw. 57 %). Das heißt, dass diese beiden Konstrukte verstärkt an der Plasmamembran lokalisiert sind. Im Gegensatz dazu konnte beim CRF_{2a}- und SP2.CRF₁-Rezeptor nur wenig komplex-glykosylierte Formen detektiert werden (30 % bzw. 34 %). Diese Konstrukte weisen einen höheren Anteil an „unreifen“ Rezeptorformen auf (mannosereich und nicht glykosyliert) (69 % und 67 %). Sie werden offensichtlich im frühen sekretorischen Weg retiniert. Das bedeutet, dass die Anwesenheit des Pseudosignalpeptids eine verstärkte Retention in ER- und post-ER-Kompartimenten vermittelt und damit den Transport zur Plasmamembran inhibiert.

3.2.4. Untersuchung der ER-Retention der Konstrukte mittels Co-Immunpräzipitation von Calnexin

Zur weiteren Untersuchung der ER-Retention wurden Co-Immunpräzipitationsstudien mit Calnexin durchgeführt. Calnexin bindet als membranständiges Protein an Zuckerreste von naszierenden Proteinen und hilft bei deren Faltung hin zum nativen Protein. Im Fall von fehlgefalteten Glykoproteinen wird die Dauer der Calnexin-Bindung verlängert, so dass die Assoziation von Calnexin mit den Rezeptorkonstrukten nachgewiesen werden kann. Dazu wurden die Konstrukte CRF₁R, SP1.CRF_{2a}R, CRF_{2a}R und SP2.CRF₁R aus transient transfizierten HEK-293-Zellen präzipitiert und kopräzipitiertes Calnexin mittels α -Calnexin-Antikörper nach Auftrennung durch SDS-PAGE und Western-Blot detektiert (*Abbildung 3.14, A*). Es wurden jeweils gleiche Mengen an Rezeptorprotein aufgetragen, was durch Detektion mit einem monoklonalem α -GFP-Antikörper nach PNGase F-Verdau in *Abbildung 3.14 (B)* gezeigt wird. Des Weiteren wurde Calnexin in Gesamt-Zelllysaten von $1,25 \times 10^5$ Zellen detektiert (*C*).

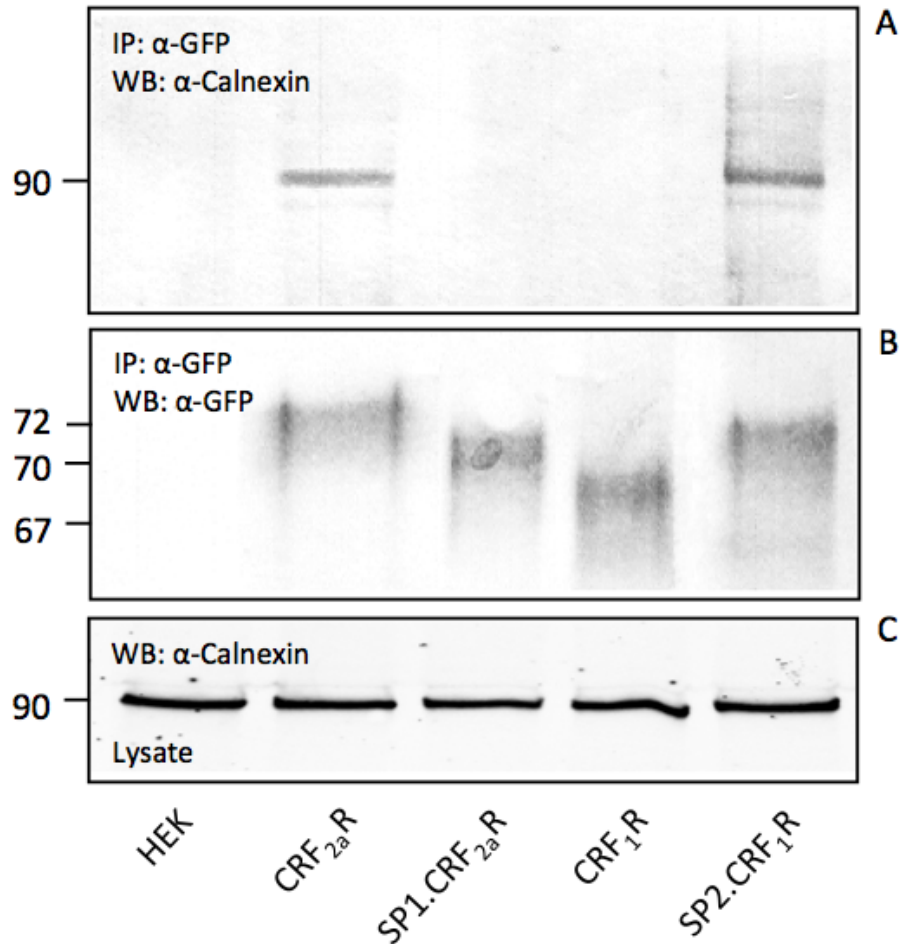


Abbildung 3.14 Co-Immünpräzipitation von Calnexin mit CRF-Rezeptor-Konstrukten und Ladungskontrollen

Die Präzipitation (IP) von mit CRF₁R, SP1.CRF_{2a}R, CRF_{2a}R und SP2.CRF₁R transient transfizierten HEK-293-Zellen erfolgte mit α-GFP02-Antikörpern. Nach Auftrennung mittels SDS-PAGE und anschließendem Blotting (WB) auf eine Nitrozellulose-Membran wurde in (A) das kopräzipitierte Calnexin mit α-Calnexin-Erstantikörpern (Kaninchen, polyklonal) und mit α-Kaninchen-Sekundärantikörpern (Alkalische Phosphatase (AP) gekoppelt) über eine BCIP/NBT-Farbreaktion detektiert. (B) zeigt die Ladungskontrolle. Gleiche Mengen an immunreaktivem Rezeptor wurden aufgetragen und mittels α-GFP-Erstantikörpern (Maus, monoklonal) und α-Maus-Sekundärantikörpern (AP-gekoppelte) detektiert. Die Rezeptorproteine wurden zuvor mit PNGase F deglykosyliert. In (C) wurde Calnexin im Gesamt-Zelllysat wie in (A) detektiert. Jede Spur entspricht dem Zelllysat von $1,25 \times 10^5$ Zellen. Der Versuch wurde dreimal durchgeführt.

Bei den Konstrukten CRF_{2a}R und SP2.CRF₁R konnte kopräzipitiertes Calnexin nachgewiesen werden. Im Gegensatz dazu gab es keine Co-Immünpräzipitation von Calnexin mit den Konstrukten des CRF₁R und SP1.CRF_{2a}R (Abbildung 3.14, A). Das Pseudosignalpeptid führt offensichtlich zu einer verstärkten Bindung von Calnexin, wahrscheinlich weil es die korrekte

Faltung des Rezeptors erschwert. Diese Ergebnisse zeigen eine verminderte Expression der Konstrukte an der Plasmamembran, die auf eine durch Calnexin verursachte Retention zurückzuführen ist.

3.2.5. Zusammenfassung

Zusammengefasst zeigen diese Daten, dass das Vorhandensein des Pseudosignalpeptids die Rezeptorexpression insgesamt und an der Plasmamembran drastisch erniedrigt. Es kommt zu einer Erhöhung des Anteils an unreifen Rezeptorformen, die durch das Qualitätskontrollsystem im ER erkannt und retiniert werden. Die Retention konnte durch Calnexin-Kopräzipitation verifiziert werden. Das Vorhandensein des Pseudosignalpeptids erschwert offensichtlich die korrekte Faltung der Rezeptoren. Diese Eigenschaften des Pseudosignalpeptids konnten durch dessen Transfer auf den CRF₁R übertragen werden. Umgekehrt bewirkt der Transfer des Signalpeptids des CRF₁R auf den CRF_{2a}R eine Erhöhung der Rezeptorexpression an der Plasmamembran.

Im nächsten Abschnitt sollte nun die Bedeutung des Pseudosignalpeptids in Bezug auf die Signaltransduktion mit Hilfe der wildtypischen Rezeptoren CRF₁R und CRF_{2a}R und der *domain-swapping*-Mutanten SP2.CRF₁R und SP1.CRF_{2a}R untersucht werden.

3.3. Einfluss des Pseudosignalpeptids des CRF_{2a}R auf die Signaltransduktion

Die bisherigen Untersuchungen zeigen, dass das Pseudosignalpeptid des CRF_{2a}R die Ligandenbindungseigenschaften des Rezeptors nicht verändert, aber im Vergleich zum CRF₁R zu einer deutlich niedrigeren Rezeptorexpression führt. Im Folgenden sollte untersucht werden, ob das Pseudosignalpeptid die Rezeptoraktivierung bzw. die Bildung des *second messengers* cAMP beeinflusst.

3.3.1. Einfluss des Pseudosignalpeptids auf die cAMP-Bildung

Um diese Fragestellung zu untersuchen, wurden HEK-293-Zellen transient mit folgenden GFP-fusionierten Konstrukten transfiziert: CRF₁R, CRF_{2a}R, SP1.CRF_{2a}R, SP2.CRF₁R. Nach Stimulation mit ansteigenden Konzentrationen des Liganden Sauvagine wurden die cAMP-Konzentrationen mittels eines *Radioimmunoassays (RIA)* bestimmt (Abbildung 3.15).

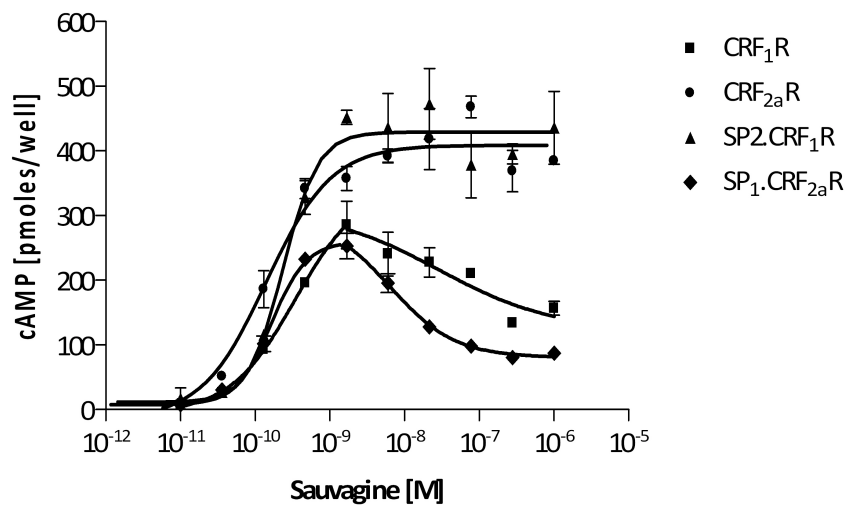


Abbildung 3.15 Agonisten-induzierte cAMP-Bildung an intakten, transient transfizierten HEK-293-Zellen

Zur Bestimmung der cAMP-Konzentrationen nach Sauvagine-Stimulierung für die Konstrukte CRF₁R, CRF_{2a}R, SP2.CRF₁R und SP1.CRF_{2a}R wurde jeweils ein cAMP-RIA durchgeführt. 24 h nach Aussaat der Zellen ($5 \cdot 10^5$ Zellen/Well) in 24-Well-Platten wurden diese transient transfiziert. Nach weiteren 24 h wurden die Zellen 30 min mit aufsteigenden Konzentrationen des Agonisten Sauvagine inkubiert, anschließend gewaschen, das cAMP extrahiert und bestimmt. Die Datenpunkte stellen die Mittelwerte als Duplikate (+/- SD) dar und zeigen ein repräsentatives Experiment. Das Experiment wurde dreimal durchgeführt.

Der CRF_{2a}R zeigt eine normale, sigmoide Konzentrations-Wirkungskurve, d.h. mit steigenden Konzentrationen des Agonisten Sauvagine werden mehr Moleküle cAMP hergestellt bis eine Sättigung erreicht ist. Der CRF₁R zeigt dagegen interessanterweise eine glockenförmige Konzentrations-Wirkungskurve. Mit steigenden Sauvagine-Konzentrationen kommt es zunächst zu einem Anstieg der cAMP-Produktion, dann, in höheren Konzentrationsbereichen, zu einem Abfall. Diese Eigenschaft lässt sich durch den Austausch der Signalpeptide übertragen, d.h. die Stimulation des SP1.CRF_{2a}R führt zu einer glockenförmigen Konzentrations-Wirkungskurve, die Stimulation von SP2.CRF₁R zu einer sigmoiden Konzentrations-Wirkungskurve.

Die Ausprägung einer glockenförmigen Konzentrations-Wirkungskurve für den CRF₁R wurde bereits von anderen Arbeitsgruppen beobachtet (WIETFELD, 2004; GUTKNECHT, 2009). Die Ursache ist, dass der CRF₁R bei Stimulation an G_{αs} koppelt und bei hohen Agonisten-Konzentrationen zusätzlich an G_{αi}. Die Kopplung von G_{αi} bei hohen Agonistenkonzentrationen wird wahrscheinlich durch eine Konformationsänderung des Rezeptors verursacht oder durch Depletion von G_{αi}. Die Kopplung mit G_{αi} inhibiert die cAMP-Produktion. Dadurch bildet sich eine glockenförmige Konzentrations-Wirkungskurve aus. Der CRF_{2a}R zeigt dagegen eine sigmoide Konzentrations-Wirkungskurve. Dies bedeutet, dass dieser Rezeptor nicht in der Lage ist, G_{αi} zu aktivieren. Die Eigenschaft, G_{αi} nicht zu aktivieren, konnte über das Pseudosignalpeptid auf den CRF₁R übertragen werden.

Aufgrund der Ergebnisse in Abschnitt 3.2 war zunächst naheliegend anzunehmen, dass dieser Effekt auf die unterschiedliche Expressionsstärke der jeweiligen Konstrukte zurückzuführen ist. Der CRF₁R und der SP1.CRF_{2a}R sind bis zu 4-fach stärker an der Plasmamembran exprimiert als die Konstrukte, die das Pseudosignalpeptid tragen. Dies könnte einen Einfluss auf die G_{αi}-Kopplung und die cAMP-Produktion bei hohen Agonisten-Konzentrationen haben. Bei hohen Rezeptor-Konzentrationen an der Plasmamembran und hohen Agonisten-Konzentrationen könnte der lokale, cytosolische G_{αs}-Pool nicht mehr ausreichen, und in der Folge könnte es zu einer G_{αi}-Kopplung kommen. Bei niedrigeren Rezeptor-Konzentrationen an der Plasmamembran, wie sie beim CRF_{2a}R und SP2.CRF₁R vorliegen, könnte dagegen ausreichend G_{αs} vorhanden sein, weshalb nur eine sigmoide Konzentrations-Wirkungskurve zu beobachten wäre.

Um den Einfluss der Oberflächenexpression zu untersuchen, wurden stabile Linien selektioniert, die zum einen eine unterschiedlich starke Expression für den CRF₁R zeigen

sollten, zum anderen eine in etwa gleich starke Expression der Konstrukte CRF₁R und SP2.CRF₁R. Das Prinzip bei der Selektion dieser Zelllinien ist, dass die Plasmid-DNA bei den einzelnen Klonen an unterschiedlichen Stellen im Genom integriert wird. Daher kann bei stabilen Linien – je nach Umgebung der integrierten Plasmid-DNA – die Rezeptorexpression stark variieren.

3.3.2. Herstellung und Quantifizierung stabiler Linien zur Untersuchung der cAMP-Bildung

Zellen, die die GFP-fusionierten Konstrukte des CRF₁R (A) und SP2.CRF₁R (B) stabil exprimierten, wurden auf ihre Oberflächenexpression hin quantifiziert.

Hierfür fanden drei verschiedene Methoden Anwendung, zunächst ein Vorscreening am LSM und eine Verifizierung der Ergebnisse am automatischen Mikroskop (Daten nicht gezeigt). Als exakteste Methode wurde die Quantifizierung via FACS-Messung herangezogen (Daten nicht gezeigt).

In der Folge konnte ein CRF₁R-Klon (A6) und ein SP2.CRF₁R-Klon (B3) isoliert werden, die die Rezeptoren in der Plasmamembran nahezu gleich stark exprimieren. Die FACS-Analyse der Oberflächenexpression ist in *Abbildung 3.16* gezeigt. Hierfür wurden die stabilen Klone in 100er-Schalen ausgesät und nach 48 h durch Scherkräfte (Schaber) vorsichtig von der Plastikoberfläche gelöst. Nachfolgend wurden die Rezeptoren mit einem gegen eine extrazelluläre Domäne gerichteten, primären Antikörper (α -CRFR) inkubiert und der Primärantikörper durch den Sekundärantikörper (PE-Fusion) detektiert (*Abbildung 3.16*).

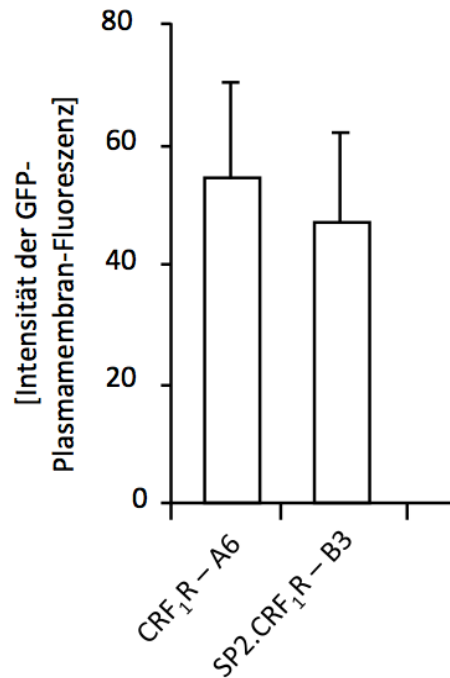


Abbildung 3.16 Quantifizierung der Oberflächenexpression mittels Durchflusszytometrie

HEK-293-Zellen, die die GFP-fusionierten Rezeptoren CRF₁R (A6) und SP2.CRF₁R (B3) stabil exprimierten, wurden mit α -CRF₁R-Antikörper (monoklonal, Maus) inkubiert. Die Detektion erfolgte über einen Phycoerythrin-konjugierten Ziege- α -Maus-Antikörper. Es wurde zu jeder Probe eine Isotypkontrolle mit α -IgG_{2b} durchgeführt und der Wert vom eigentlichen Messwert abgezogen. Dargestellt sind die Mittelwerte der Intensitäten der Oberflächenexpression von 10^4 quantifizierten Zellen (+/- SD). Das Experiment wurde dreimal unabhängig voneinander durchgeführt.

Mit diesen beiden stabilen Klonen wurden im Folgenden erneut cAMP-Messungen durchgeführt und Konzentrations-Wirkungskurven aufgenommen (*Abbildung 3.17*).

3.3.3. cAMP-Bildung in Abhängigkeit der Oberflächenexpression

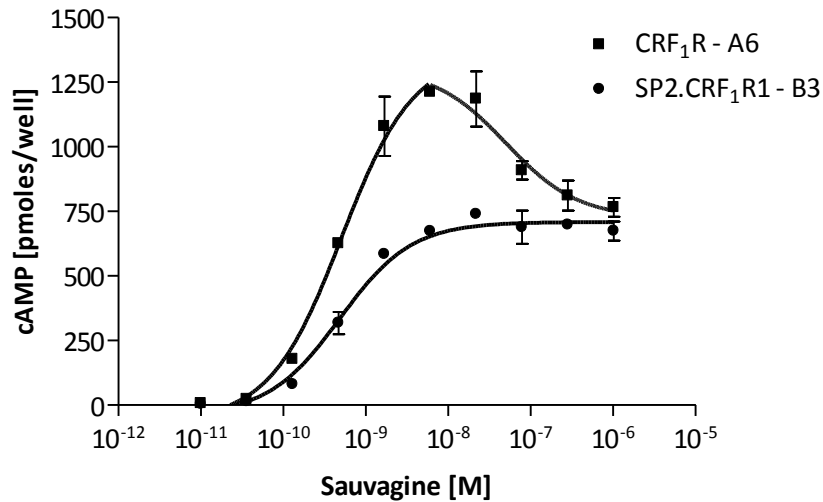


Abbildung 3.17 Agonisten-induzierte cAMP-Bildung bei annähernd gleich stark exprimierenden CRF₁R- und SP2.CRF₁R-Klonen

Die Klone A6 des CRF₁R und B3 des SP2.CRF₁R exprimieren ungefähr die gleiche Menge an Rezeptoren an der Plasmamembran (siehe *Abbildung 3.14*). Die Zellen wurden in 24-Well-Platten ausgesät, 48 h später mit aufsteigenden Konzentrationen des Agonisten Sauvagine inkubiert und nach weiteren 30 min einer cAMP-Konzentrationsbestimmung mittels eines cAMP-RIA unterzogen. Die Datenpunkte stellen die Mittelwerte aus Doppelbestimmungen (+/- SD) dar und zeigen Konzentrations-Wirkungskurven eines repräsentativen Experimentes. Das Experiment wurde dreimal wiederholt.

Der CRF₁R-Klon A6 zeigt auch bei niedriger Plasmamembranexpression eine glockenförmige Konzentrations-Wirkungskurve. Der SP2.CRF₁R-Klon B3 weist dagegen eine normale, sigmoide Konzentrations-Wirkungskurve auf. Zusammengefasst kann festgehalten werden, dass das Pseudosignalpeptid die Kopplung des Rezeptors mit G_{αi} inhibiert und zur Ausbildung einer sigmoiden Konzentrations-Wirkungskurve führt. Diese Eigenschaft ist übertragbar und beruht nicht auf Expressionsunterschieden, die durch das Pseudosignalpeptid hervorgerufen werden.

3.3.4. Agonisten-induzierte cAMP-Bildung in Abhängigkeit vom verwendeten Liganden

Abschließend sollte noch ausgeschlossen werden, dass die Ausbildung einer glockenförmigen Konzentrations-Wirkungs-Kurve auf der Verwendung des nicht endogenen Liganden Sauvagine beruht (Abschnitt 1.6.3). Daher wurden im Folgenden die Agonisten-induzierte cAMP-Bildung nach Behandlung mit Sauvagine und dem endogenen Agonisten CRF bestimmt und verglichen (Abbildung 3.18). Hierfür wurde ein weiterer CRF₁R-Klon (A2) (siehe Abschnitt 3.1.5) eingesetzt.

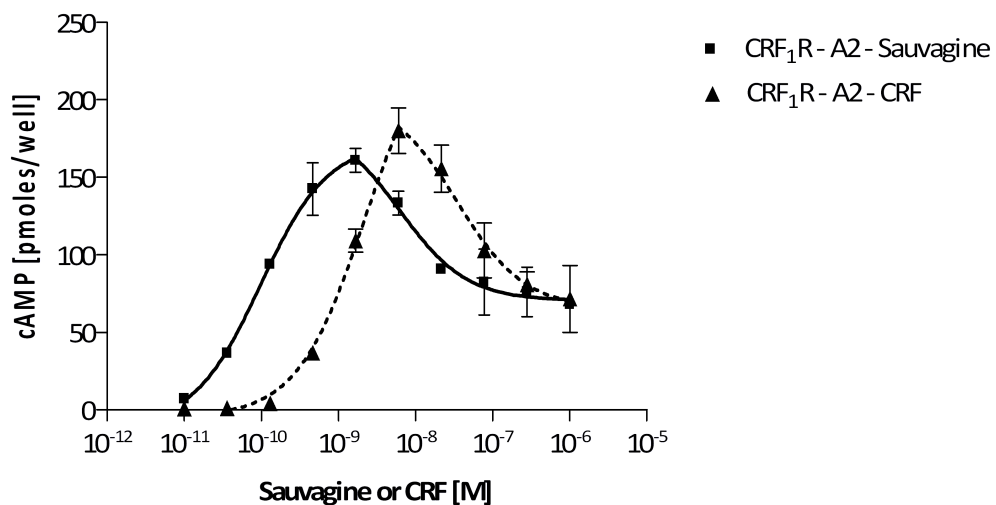


Abbildung 3.18 Sauvagine- bzw. CRF-induzierte cAMP-Bildung beim CRF₁R-Klon A2

Der CRF₁R-Klon A2 wurde in 24-Well-Platten ausgesät, nach 48 h für 30 min mit aufsteigenden Konzentrationen der Agonisten Sauvagine bzw. CRF inkubiert und 30 min später eine cAMP-Konzentrationsbestimmung mittels eines cAMP-RIA durchgeführt. Die Datenpunkte stellen Mittelwerte aus Duplikaten (+/- SD) aus einem repräsentativen Experiment dar. Das Experiment wurde dreimal wiederholt.

In diesem Experiment erkennt man für den CRF₁R-Klon A2 zwar eine deutliche Rechtsverschiebung der Kurve, die durch das im Vergleich zu Sauvagine niedrig affinere CRF hervorgerufen wird (HAUGER, 2006). Auf die Gestalt der Kurven hat der Ligand jedoch keinen Einfluss, d.h. es wurde in jedem Fall eine glockenförmige Kurve erhalten. Dies schließt aus, dass die Art des Agonisten einen Einfluss auf den Verlauf der Konzentrations-Wirkungskurve hat.

3.3.5. Agonisten-induzierte cAMP-Bildung nach Sauvagine-Stimulation in AtT20-Zellen

Eine weitere wichtige Frage war, ob sich die cAMP-Freisetzung auch im normalen zellulären Kontext der CRF₁-Rezeptoren wie oben beschrieben verhält. Zur Untersuchung dieser Fragestellung wurden die cAMP-Konzentrationen nach Agonisten-Stimulation in nicht-transfizierten AtT20-Zellen gemessen (Abbildung 3.19). AtT20-Zellen sind murine Hypophysentumorzellen (ATCC, USA; *BUANASSIS, 1962*), die den CRF₁R in geringem Maße endogen exprimieren.

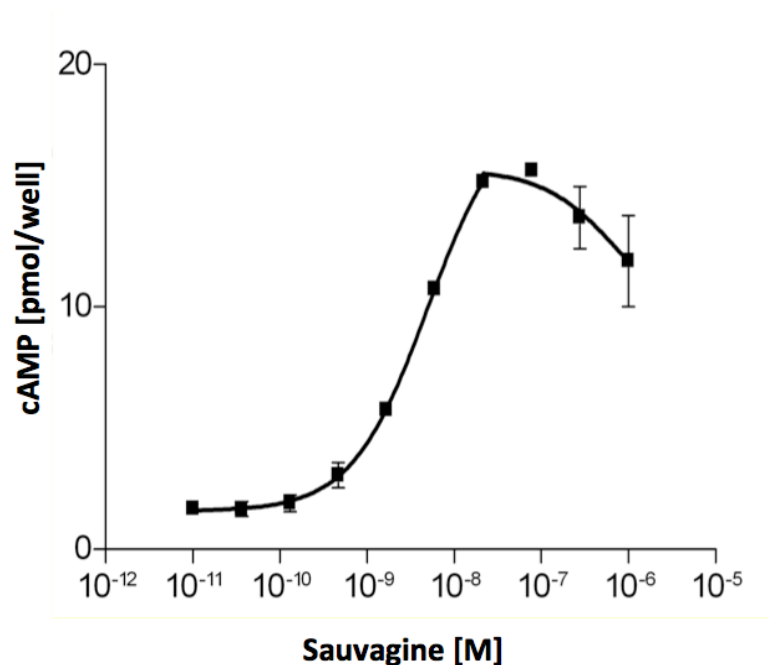


Abbildung 3.19 Agonisten-induzierte cAMP-Bestimmung in AtT20-Zellen, die den CRF₁R endogen exprimieren. AtT20-Zellen wurden in 24-Well-Platten ausgesät und nach 48 h mit aufsteigenden Konzentrationen des Agonisten Sauvagine behandelt. Nach 30 min wurde eine cAMP-Konzentrationsbestimmung mittels eines cAMP-RIA durchgeführt. Die Datenpunkte stellen Mittelwerte von Duplikaten (+/- SD) aus einem repräsentativen Experiment dar. Das Experiment wurde dreimal wiederholt.

Auch in AtT20-Zellen wurden glockenförmige Konzentrations-Wirkungskurven beobachtet. Das bedeutet, dass bei CRF₁-Rezeptoren auch in der üblichen zellulären Umgebung eine G_{αi}-Kopplung bei hohen Agonisten-Konzentrationen möglich ist. Dies untermauert, dass nicht

die Überexpression der CRF₁-Konstrukte ursächlich für die G_{αi}-Aktivierung bei hohen Agonisten-Konzentrationen ist. Es ist jedoch anzumerken, dass diese Agonisten-Konzentrationen im physiologischen Kontext wahrscheinlich nicht erreicht werden. Eine weitere Auseinandersetzung mit dieser Fragestellung findet sich in der nachfolgenden Diskussion.

Zusammengefasst zeigen diese Ergebnisse, dass die Anwesenheit des Pseudosignalpeptids in hohen Konzentrationen des Agonisten eine G_{αi}-Aktivierung verhindert. Ist dagegen das konventionelle Signalpeptid des CRF₁R vorhanden, ist eine G_{αi}-Kopplung möglich.

4. DISKUSSION

Das Pseudosignalpeptid des CRF_{2a}R wird im Gegensatz zu gewöhnlichen Signalpeptiden nicht vom Rezeptor abgespalten und verbleibt am reifen Rezeptor (RUTZ, 2006). PAL ET AL (2010) haben die Kristallstruktur der N-Termini der CRF-Rezeptoren gelöst und konnten ebenfalls zeigen, dass der N-Terminus des CRF_{2a}R das Pseudosignalpeptid enthält.

Die vorliegende Arbeit beschäftigte sich mit der Fragestellung, welchen Einfluss das Pseudosignalpeptid als zusätzliche, N-terminale Domäne auf den Internalisierungsmechanismus (Diskussion siehe 3.1.6.), die Oberflächenexpression und die Signaltransduktion des Rezeptors hat. Es konnten dabei zwei Funktionen des Pseudosignalpeptids ermittelt werden: zum einen führt das Vorhandensein des Pseudosignalpeptids zu einer sehr niedrigen Expression des Rezeptors an der Zelloberfläche. Zum anderen verhindert es die G_{αi}-vermittelte Inhibierung der Adenylcyclase-(AC)-Aktivität. In *Abbildung 4.1* sind die Ergebnisse schematisch zusammengefasst.

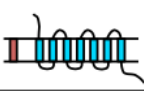

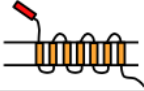

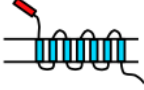

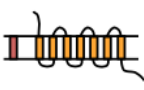

	Piktogramm	Plasmamembran-Expression	cAMP-K-W-Kurve
CRF ₁ R		+++	
CRF _{2a} R		+	
SP2.CRF ₁ R		+	
SP1.CRF _{2a} R		+++	

Abbildung 4.1 Schematische Zusammenfassung der Ergebnisse

Das Vorhandensein des Pseudosignalpeptids bewirkt eine niedrige Rezeptorexpression an der Plasmamembran. Des Weiteren verhindert es die Kopplung an G_{αi}, so dass nur noch eine sigmoide cAMP-Konzentrations-Wirkungskurve (cAMP-K-W-Kurve) erhalten wird.

4.1. Die Bedeutung des Pseudosignalpeptids für die Oberflächenexpression

In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass das nicht-abgespaltene Pseudosignalpeptid des CRF_{2a}R einen wesentlichen Einfluss auf die Rezeptorexpression hat. Ist es am Rezeptor vorhanden (CRF_{2a}R, SP2.CRF₁R) führt dies zu einer starken Erniedrigung der Expression an der Plasmamembran. Dieser Effekt korreliert mit einem Anstieg an unreifen, mannosereichen Rezeptorformen (*Abbildung 3.12*). Offensichtlich werden die Konstrukte verstärkt vom Qualitätskontrollsystem des frühen sekretorischen Weges erkannt und in der Folge intrazellulär retiniert. Dies konnte durch Analyse des Glykosylierungsstatus und über die Co-Immunpräzipitation von Calnexin bestätigt werden (*Abbildung 3.14*). Diese Ergebnisse weisen darauf hin, dass das Pseudosignalpeptid die Faltungseffizienz der Rezeptoren verschlechtert.

Im Folgenden sollen mögliche Gründe für eine Erniedrigung der Faltungseffizienz und eine dadurch verstärkte Erkennung durch das Qualitätskontrollsystem diskutiert werden.

4.1.1. Konformationsänderung durch das Pseudosignalpeptid (Exposition von Retentionssignalen oder hydrophoben Sequenzen, Maskierung von ER-Export-Sequenzen)

Eine Möglichkeit, warum es zu einer erniedrigten Faltungseffizienz kommt, wäre, dass die zusätzliche achte Helix, die das Pseudosignalpeptid am N-Terminus bildet, zu einer Konformationsänderung im gesamten Rezeptor führt. YASUDA ET AL (2009) diskutieren am Leukotrien-B₄-Rezeptor, dass eine achte, hier C-terminale, Helix eine notwendige Voraussetzung für die korrekte Faltung des Rezeptors und das nachfolgende Verlassen des Qualitätskontrollsystems sein könnte. Wenn eine solche Helix helfen kann, die Faltungseffizienz zu verbessern (Leukotrien-B₄-Rezeptor), dann könnte umgekehrt das Pseudosignalpeptid im CRF_{2a}R auch die Faltungseffizienz beeinträchtigen.

Die dadurch hervorgerufene Fehlfaltung könnte zur Exposition von normalerweise unzugänglichen ER-Retentionssignalen führen, die dann zur Retention der Rezeptoren führen. Im C-Terminus des CRF_{2a}R (R371) und CRF₁R (R375) befindet sich ein potentiell

ER-Retentionsmotiv vom RXR-Typ (ZERANGUE, 1999). Es wurde zuerst bei Ionenkanälen beschrieben, ist aber mittlerweile auch bei GPCR identifiziert. Als Beispiel sei hier der CFTR genannt (GOMES-ALVES, 2010). Bei den CRF-Rezeptoren könnte dieses Motiv im Falle einer Abwesenheit des Pseudosignalpeptids maskiert sein (CRF₁R), im Falle des Vorhandenseins (CRF_{2a}R) jedoch aufgrund einer Konformationsänderung exponiert werden und damit zur Retention führen. Um den Einfluss dieses Motivs oder möglicher weiterer ER-Retentionsmotive zu untersuchen, sollten Studien mit gerichteter Mutagenese durchgeführt werden.

Die Konformationsänderung könnte auch zu einer verstärkten Exposition hydrophober Sequenzen und damit zur Erkennung durch das ER-Qualitätskontrollsystem führen.

Ein ähnlicher Mechanismus, der zur verstärkten ER-Retention führen könnte, wäre eine durch das Pseudosignalpeptid hervorgerufene Konformationsänderung und die Maskierung möglicher ER-Exportsignale. Zum Beispiel ist die Sequenz des in GPCR hochkonservierten ER-Exportsignals F(X)₃F(X)₃F (BERMAK, 2001) zwar vorhanden, jedoch nicht wie beschrieben im C-Terminus, weshalb es fraglich ist, ob es im Falle des CRF_{2a}R funktional ist. Dass weitere, funktionale ER-Exportsequenzen vorkommen, ist jedoch nicht ausgeschlossen und sollte überprüft werden.

4.1.2. Direkte Wirkung des Pseudosignalpeptids als Retentionssignal

Bisher hat sich die Mehrzahl von Studien auf die C-Termini von GPCR als transportrelevante Domänen fokussiert, insbesondere Arbeiten zu ER-Retentionssignalen. Neuere Studien zeigen aber auch den Einfluss von N-terminalen transportrelevanten Sequenzen. ANGELOTTI (2010) haben im α_{2C} -Adrenoceptor das erste N-terminale ER-Retentionssignal (ALAAALAAAA) bei GPCR beschrieben. Es ist nicht auszuschließen, sogar wahrscheinlich, dass es weitere N-terminale Motive gibt, die den anterograden Transport inhibieren. Interessanterweise konnte JAHNSEN (2012) zeigen, dass das vorhergesagte Signalpeptid des α_{2C} -Adrenoceptors, in dem sich dieses ER-Retentionssignal befindet, ebenfalls nicht vom Rezeptor abgespalten wird. Möglicherweise befindet sich ein solches ER-Retentionsmotiv auch im Bereich des

Pseudosignalpeptids des CRF_{2a}R. Dies sollte durch Trunkierungsstudien untersucht werden.

4.1.3. Stärkere Retention aufgrund der Glykosylierung an Position N13

Es ist seit längerem bekannt, dass Membranproteine, die in den ersten 50 N-terminalen Aminosäuren eine N-Glykosylierungsstelle aufweisen, verstärkt mit Calnexin/Calreticulin interagieren und somit auch verstärkt intrazellulär retiniert werden (MOLINARI, 2000). Das nicht-abgespaltene Pseudosignalpeptid des CRF_{2a}R besitzt an Position 13 (N13) eine N-Glykosylierung (RUTZ, 2006). Dies könnte ebenfalls zu einer verstärkten Interaktion mit dem Qualitätskontrollsystem und damit zur Retention führen. Wird diese N-Glykosylierung durch Austausch des Asparagins durch Alanin verhindert (N13A-Mutante), führt dies zu einem verbesserten Transport an die Plasmamembran, wahrscheinlich aber hauptsächlich aufgrund der Tatsache, dass das Pseudosignalpeptid in ein konventionelles Signalpeptid umgewandelt und abgespalten wird. Daher ist der experimentelle Nachweis, dass die Glykosylierung zu einer verstärkten Interaktion mit dem Qualitätskontrollsystem führt, schwer zu erbringen.

4.1.4. Verhinderung der Oligomerisierung

Für sehr viele GPCR konnte die Bildung von Oligomeren nachgewiesen werden. Eine aktuelle Studie von TEICHMANN (2012) konnte bemerkenswerterweise zeigen, dass zum einen der CRF_{2a}R ausschließlich als monomeres Protein vorliegt und - wichtiger - dass das Pseudosignalpeptid des CRF_{2a}R die Rezeptor-Oligomerisierung verhindert. Trägt der CRF₁R das Pseudosignalpeptid (SP2.CRF₁R) liegt er ebenfalls als Monomer vor. Umgekehrt wird der CRF_{2a}R mit dem Signalpeptid SP1 des CRF₁R (SP1.CRF_{2a}R) als Dimer exprimiert. Das zeigt eindeutig, dass das Pseudosignalpeptid in der Lage ist, die Oligomerisierung zu verhindern. Diese Ergebnisse sind außerordentlich aufschlussreich in Bezug auf die Funktion des Pseudosignalpeptids. Gründe für das Ausbleiben der Oligomerisierung des CRF_{2a}R könnten in der sterischen Hinderung liegen, entweder hervorgerufen durch die N-

terminal gebildete Sekundärstruktur oder durch die N-Glykosylierung an Position N13 im Pseudosignalpeptid, die aufgrund der Größe ihrer Zuckerreste und der Hydrophilie keine Oligomerisierung erlaubt. Für die GABA_B-Rezeptoren Typ 1 und 2, die zur GPCR-Familie C gehören, konnte gezeigt werden, dass eine Hetero-Dimerisierung für die Reifung und den Transport der Rezeptoren zur Zelloberfläche notwendig ist (WHITE, 1998). Da nun von TEICHMANN (2012) nachgewiesen werden konnte, dass durch das Pseudosignalpeptid keine Oligomerisierung der Rezeptoren möglich ist, könnte dies für den verschlechterten intrazellulären Transport zur Plasmamembran ursächlich sein.

Abschließend noch einige Bemerkungen zum Einfluss des Pseudosignalpeptids auf die Rezeptorreifung. Wie wir zeigen konnten (RUTZ, 2006), ist das Pseudosignalpeptid des CRF_{2a}R trotz einer durch diese Domäne hervorgerufenen Verminderung der Plasmamembranexpression gleichzeitig trotzdem auch notwendig für die Reifung des Rezeptors: Die Deletionsmutante Δ SP.CRF_{2a}R ist noch stärker retiniert als der wildtypische Rezeptor und weist einen noch höheren Anteil an unreifen, unglykosylierten Rezeptorformen auf. Das Pseudosignalpeptid scheint daher die Faltungseffizienz zumindest partiell auch zu begünstigen. Einerseits ist das Pseudosignalpeptid also für die Reifung des CRF_{2a}R nötig, andererseits führt dessen Anwesenheit im Vergleich zum CRF₁R aus den oben beschriebenen und diskutierten Gründen zu einer deutlich erniedrigten Rezeptorexpression.

Zusammengefasst lässt sich sagen, dass mit dem nicht-abgespaltenen, am Rezeptor verbleibenden Pseudosignalpeptid eine neuartige transportrelevante Domäne beschrieben werden konnte.

Warum es für den CRF_{2a}R im physiologischen Kontext wichtig ist, das Pseudosignalpeptid nicht abzuspalten und damit die Rezeptorexpression niedrig zu halten, kann zum gegenwärtigen Zeitpunkt nicht endgültig geklärt werden. Möglicherweise ist die niedrige Rezeptorexpression des CRF_{2a}R im Rahmen einer Feinregulierung des Zusammenspiels mit dem CRF₁R notwendig. Eine aktuelle Studie von WOOD (2013) konnte zeigen, dass sich bei Rattensubpopulationen, die unterschiedlich auf sozialen Stress reagieren, in 5-

Hydroxytryptamin-(5-HT)-Neuronen im *Nucleus raphe dorsalis* eine unterschiedliche zelluläre Distribution von CRF₁R und CRF_{2a}R nach wiederholtem Stress zeigte. So genannte *short latency* (SL) Ratten, unterwarfen sich in solchen Stresssituationen schneller als *late latency* (LL) Ratten. Die SL Ratten zeigten keine Veränderung subzellulären Verteilung des CRF₁R und CRF₂R. LL Ratten hingegen wiesen durch eine erhöhte intrazelluläre CRF₁R-Lokalisation eine Adaptation auf, die auf Internalisierung dieser Rezeptoren hinwies. Die CRF_{2a}R-Anzahl wurde nach Stress intrazellulär geringer und war verstärkt an der Zelloberfläche nachweisbar. Die CRF_{2a}R-Erhöhung an der Plasmamembran war nicht auf eine Steigerung der Proteinexpression zurückzuführen, sondern auf Rekrutierung. Das N-terminale Pseudosignalpeptid des CRF_{2a}R hält normalerweise die Rezeptorexpression an der Zelloberfläche gering. Die Autoren postulieren, dass bei LL Ratten die wiederholte CRF-Aussetzung in Stresssituationen die Funktion dieses Peptides verändert haben könnte. Dadurch könnte es zur Umverteilung des CRF_{2a}R an die Plasmamembran kommen, was zur physiologischen Adaptation an Stress beitragen könnte (keine Inhibierung, sondern CRF_{2a}R-vermittelte Aktivierung nach CRF-Exposition).

4.2. Die Bedeutung des Pseudosignalpeptids für die Rezeptoraktivierung

In dem letzten Abschnitt dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass der CRF_{2a}R im Gegensatz zum CRF₁R nach Agonistenstimulation eine sigmoide cAMP-Konzentrations-Wirkungskurve ausbildet. Dieser Effekt lässt sich durch Austausch der Signalpeptide auf den jeweils komplementären Rezeptorgrundkörper übertragen: der SP2.CRF₁R zeigt ebenfalls eine sigmoide Konzentrations-Wirkungskurve, wohingegen der SP1.CRF_{2a}R wie der CRF₁R eine glockenförmige Konzentrations-Wirkungskurve aufweist. cAMP wird durch die Adenylylcyclase (AC) unter Zyklisierung aus ATP gebildet. Diese wird über das G-Protein G_{αs} aktiviert. Die Inhibierung erfolgt über G_{αi}. Ein Abfall der Konzentrations-Wirkungskurve in hohen Konzentrationen kann demnach auf eine Aktivierung von G_{αi} zurückzuführen sein. Dies konnte unter anderem von *WIETFELD* (2004), *BERGER* (2006), und *MILAN-LOBO* (2009) durch Pertussistoxin-(PTX)-Behandlung und damit einer spezifischen Inhibierung von G_{αi} gezeigt werden. Dies bedeutet auch, dass durch das Pseudosignalpeptid die G_{αi}-vermittelte Inhibierung der AC verhindert wird. Im Folgenden sollen mögliche Ursachen dafür diskutiert werden.

4.2.1. Mögliche Bedeutung einer zweiten Ligandenbindungsstelle im N-Terminus der CRF-Rezeptoren

Da die Signaltransduktion über die intrazelluläre Kopplung der G-Proteine vollzogen wird und die beiden untersuchten Rezeptoren CRF₁R und CRF_{2a}R auf der intrazellulären Seite hoch homolog sind (*HAUGER, 2003*), muss diskutiert werden, warum die Veränderung von einer sigmoiden zur glockenförmigen Konzentrations-Wirkungskurve über eine extrazelluläre Sequenzvariation (Pseudosignalpeptid) ausgelöst wird. Es könnte sein, dass das nicht-abgespaltene Pseudosignalpeptid des CRF_{2a}R als helikale Domäne im Rezeptor die Rezeptorkonformation so verändern kann, dass dies auch Auswirkungen auf die intrazellulären Bereiche des Rezeptors hat und so keine G_{αi}-Kopplung mehr erfolgen kann. Dies könnte auf dem Vorhandensein einer zweiten Liganden-Bindungsstelle im N-Terminus der CRF-Rezeptoren beruhen. Nach Ligandenbindung kommt es bei GPCR nach dem 2-Domänen-Modell (*HUBBEL, 2003*) zu Konformationsänderungen, die vom inaktiven

(ungebundenen) Rezeptor zum schwach aktiven Rezeptor führen, der an einer Domäne den Liganden gebunden hat. Schließlich wird der Zustand des vollständig aktiven Rezeptors erreicht, der zur G-Protein-Bindung führt. Dieses 2-Domänen-Modell scheint aber weitaus differenzierter zu sein. *WIETFELD* (2004) konnte zeigen, dass der CRF₁R zwei Bindungsstellen für Sauvagine besitzt. Eine hoch-affine, die zuerst vom Liganden besetzt wird, und eine niedrig-affine. Erst die Besetzung dieser zweiten niedrig-affineren Bindungsstelle könnte bei höheren Agonistenkonzentrationen die Konformation des CRF₁R dahingehend ändern, dass nicht nur die Bindung von G_{αs}, sondern auch von G_{αi}-Proteinen möglich wird. Das Pseudosignalpeptid wiederum könnte die zweite Bindungsstelle im CRF_{2a}R blockieren, und so die G_{αi}-Protein-Kopplung verhindern. Ob eine solche zweite Bindungsstelle im CRF_{2a}R vorhanden ist, müsste durch weitere Studien untersucht werden. Eine weitere experimentelle Möglichkeit, die Beeinflussung einer zweiten Bindungsstelle zu prüfen, wäre z.B. die Zugabe eines synthetisierten Pseudosignalpeptids. Erreichte man bei den Signalpeptiddeletionsmutanten und dem CRF₁R (dessen Signalpeptid abgespalten und abgebaut wird) dadurch eine Änderung der Konzentrations-Wirkungskurve von glockenförmig zu sigmoid, wäre dies ein Hinweis darauf, dass das Pseudosignalpeptid als zusätzliche Rezeptor-Domäne Einfluss auf die zweite Bindungsstelle hat.

4.2.2. Möglicher Einfluss der durch das Pseudosignalpeptid verhinderten Rezeptor-Oligomerisierung auf die G-Protein-Kopplung

Es hat sich in den letzten Jahren bestätigt, dass GPCR Homo- und Hetero-Dimere und möglicherweise auch Oligomere bilden (*GONZÁLEZ-MAESO, 2011*). Über diesen Mechanismus kann eine Aktivitätskontrolle und Regulation der Signaltransduktion erreicht werden (*BREITWIESER, 2004*). Durch eine Heterodimerisierung konnten für einige GPCR Änderungen in der Rezeptor-Pharmakologie, im intrazellulären Transport und auch in der G-Protein-Kopplung beschrieben werden (Übersicht in *BREITWIESER, 2004*). Gut untersucht ist der Rezeptorkomplex zwischen dem α_{2a}-adrenergen Rezeptor und dem μ-Opioid-Rezeptor. Wenn der α_{2a}-adrenerge Rezeptor Norepinephrin gebunden hat, führt eine Bindung von Morphin an den μ-Opioid-Rezeptor zu strukturellen Änderungen im α_{2a}-

adrenergen Rezeptor, die die G-Protein-Kopplung und den ERK-Signaltransduktionsweg inhibieren (VILARDAGA, 2008). Ein weiteres Beispiel ist die Interaktion zwischen dem 5-HT_{2a}- und dem mGlu2-Rezeptor. Die Heterodimerisierung führt hier zu einer Inhibierung der Aktivierung von G_{αq/11} und zu einer Verstärkung der Aktivierung von G_{αi}. (GONZÁLEZ-MAESO, 2008). Auch der μ-/δ-Opioid-Rezeptorkomplex bindet in einigen Fällen G_{αz}, die einzelnen Rezeptoren koppeln dagegen nur G_{αi} (HASBI, 2007). Eine Heterodimerisierung kann also zu einem Wechsel der Signaltransduktionswege durch Veränderung der bindenden G-Proteine führen. Interessanterweise konnte dies auch bei einer Homodimerisierung beobachtet werden: Für den TSH-Rezeptor wurde gezeigt (ALLEN, 2011), dass erst die Bindung von zwei TSH-Ligandenmolekülen im Dimer eine G_{αq/11}-Kopplung neben der G_{αs}-Kopplung möglich macht, wahrscheinlich aufgrund von intramolekularen Konformationsänderungen. Der Oligomerisierungsstatus könnte demnach durchaus eine Rolle bei der G-Protein-Selektivität spielen. So könnte man spekulieren, dass die Bindung eines Liganden im CRF₁R die Kopplung von G_{αi} erlaubt, die Bindung von zwei Liganden die Kopplung von G_{αi} verhindert. Da der CRF_{2a}R nicht dimerisiert (TEICHMANN, 2012), könnte die Bindung von mehreren Liganden verhindert sein und damit auch die G_{αi}-Kopplung. Da das Pseudosignalpeptid die Dimerisierung verhindert, wäre auch über diesen Weg eine Verhinderung der G_{αi}-Kopplung erklärbar.

Mögliche physiologische Bedeutung für den CRF_{2a}R und den CRF₁R

Die beobachtete niedrigere cAMP-Produktion bei hohen Agonistenkonzentrationen (G_{αi}-Aktivierung) könnte Teil eines Autoinhibitionsmechanismus des CRF₁-Rezeptors sein. Die physiologische Konzentration von CRF bewegt sich im Bereich von 10 nM (GRAMMATOPOULOS, HILLHOUSE, 1999). Dies befindet sich im Scheitelpunkt der cAMP-Konzentrations-Wirkungskurve. In Stresssituationen könnte diese Konzentration jedoch höher liegen. Die CRF-Hypersekretion stellt eine Ursache für Angst- und Stimmungstörungen dar (POST, 2005). Eine Autoinhibition des Rezeptors erscheint also ein sinnvoller Vorgang. Dies könnte den Körper vor einer nachfolgenden Überstimulation durch ACTH schützen. Warum es für den CRF_{2a}R sinnvoll ist, bei hohen Agonistenkonzentrationen keine G_{αi}-Inhibition zu zeigen, ist unklar. Die feine Balance der

Rezeptoren, ihrer Signaltransduktionswege und damit ihrer physiologischen Wirkungen ist aufgrund der pathophysiologischen Bedeutung in jedem Fall wichtiges Forschungsfeld.

4.3. Ausblick

Für zukünftige Arbeiten wäre es wichtig zu untersuchen, ob das Pseudosignalpeptid nicht doch in bestimmten Geweben oder unter bestimmten physiologischen oder pathophysiologischen Bedingungen abgespalten wird. Dies würde zu einer Erhöhung der Rezeptorexpression und einer Veränderung der Signaltransduktion führen. Um dies zu untersuchen, könnten beispielsweise Immunfluoreszenz-Experimente oder Immunpräzipitationen in unterschiedlichen Zelltypen mit Antikörpern gegen das Pseudosignalpeptid durchgeführt werden.

Ein weiterer, vielversprechender Ansatz hierfür wären Untersuchungen im Lebewesen Zebrafisch, einem einfach zu haltenden, sich schnell vermehrenden und vergleichsweise leicht zu transfizierenden Modellorganismus (*KAWAKAMI, 2004*). Dazu könnte man ein Pseudosignalpeptid-CRFR-N-Terminus-GFP-Fusionsprotein (*RUTZ, 2006*) im Zebrafisch exprimieren und anschließend eine mögliche Abspaltung in den verschiedenen Geweben mit mikroskopischen Methoden am Embryo oder erwachsenen Fisch durchführen (Abspaltungsassay siehe *RUTZ, 2001*). Zebrafische haben ebenfalls eine hypothalamäre-hypophysäre Stressachse (*ALSOP, 2008*). Daher könnten auch zelltypspezifische Veränderungen nach Stressinduktion untersucht werden. Ist das Pseudosignalpeptid, wie in dieser Arbeit gezeigt, nicht funktional und wird nicht abgespalten, wird sich die GFP-Fluoreszenz diffus im Cytosol verteilen, da dieses Fusionsprotein aufgrund der fehlenden ER-Targeting-/Insertions-Funktion nicht in die ER-Membran integriert werden kann. Erhält das Pseudosignalpeptid jedoch in bestimmten Zelltypen oder unter bestimmten Bedingungen seine ER-Targeting-Funktion zurück und wird in der Folge auch abgespalten, sollte dies zu einer ER-Lokalisation des Konstruktes führen.

5. LITERATURVERZEICHNIS

Accomazzo MR, Cattaneo S, Nicosia S, Rovati GE: Bell-shaped curves for prostaglandin-induced modulation of adenylate cyclase: two mutually opposing effects. *Eur J Pharmacol*, 454(2-3):107-14, 2002

Ahner A, Brodsky JL: Checkpoints in ER-associated degradation: excuse me, which way to the proteasome? *Trends Cell Biol*, 14:474-478, 2004

Alken M, Rutz C, Köchl R, Donalies U, Oueslati M, Furkert J, Wietfeld D, Hermosilla R, Scholz A, Beyermann M, Rosenthal W, Schüle R: 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(Pt 2):455-64, 2005

Allen MD, Neumann S, Gershengorn MC: Occupancy of both sites on the thyrotropin (TSH) receptor dimer is necessary for phosphoinositide signaling. *FASEB J*, 25(10):3687-94, 2011

Angelotti T, Daunt D, Shcherbakova OG, Kobilka B, Hurt CM: Regulation of G-protein coupled receptor traffic by an evolutionary conserved hydrophobic signal. *Traffic*, 11(4):560-78, 2010

Arai M, Assil IQ, Abou-Samra AB: Characterization of three corticotropin-releasing factor receptors in catfish: a novel third receptor is predominantly expressed in pituitary and urophysis. *Endocrinology*, 142:446-454, 2001

Assil IQ, Abou-Samra AB: N-glycosylation of CRF receptor type 1 is important for its ligand-specific interaction. *Am J Physiol Endocrinol Metab*, 281(5):1015-21, 2001

Assil IQ, Qi LJ, Arai M, Shomali M, Abou-Samra AB: Juxtamembrane region of the amino terminus of the corticotropin releasing factor receptor type 1 is important for ligand interaction. *Biochemistry*, 40(5):1187-95, 2001

Assil-Kishawi I, Abou-Samra AB: Sauvagine cross-links to the second extracellular loop of the corticotropin-releasing factor type 1 receptor. *J Biol Chem*, 277(36):32558-61, 2002

Assil-Kishawi I, Samra TA, Mierke DF, Abou-Samra AB: Residue 17 of sauvagine cross-links to the first transmembrane domain of corticotropin-releasing factor receptor 1 (CRFR1). *J Biol Chem*, 283(51):35644-51, 2008

Bale T, Vale W: CRF and CRF receptors: role in stress responsivity and other behaviors. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*, 44:525-57, 2004

Bendtsen JD, Nielsen H, von Heijne G, Brunak S: Improved prediction of signal peptides: SignalP 3.0. *J Mol Biol*, 340(4):783-95, 2004

Berger H, Heinrich N, Wietfeld D, Bienert M, Beyermann M: Evidence that corticotropin-releasing factor receptor type 1 couples to Gs- and Gi-proteins through different conformations of its J-domain. *Br J Pharmacol*, 149(7):942-7, 2006

Bermak JC, Li M, Bullock C, Zhou QY: Regulation of transport of the dopamine D1 receptor by a new membrane-associated ER protein. *Nat Cell Biol*, 3(5):492-8, 2001

Bhatnagar A, Willins DL, Gray JA, Woods J, Benovic JL, Roth BL: The dynamin-dependent, arrestin-independent internalization of 5-hydroxytryptamine 2A (5-HT_{2A}) serotonin receptors reveals differential sorting of arrestins and 5-HT_{2A} receptors during endocytosis. *J Biol Chem*, 276(11):8269-77, 2001

Bindslev N: A homotropic two-state model and auto-antagonism. *BMC Pharmacol*, 4:11, 2004

Blobel G, Dobberstein B: Transfer of proteins across membranes. I. Presence of proteolytically processed and unprocessed nascent immunoglobulin light chains on membrane-bound ribosomes of murine myeloma. *J Cell Biol*, 67:835-851, 1975a

Blobel G, Dobberstein B: Transfer to proteins across membranes. II. Reconstitution of functional rough microsomes from heterologous components. *J Cell Biol*, 67:852-862, 1975b

Blom N, Sicheritz-Ponten T, Gupta R, Gammeltoft S, Brunak S: Prediction of post-translational glycosylation and phosphorylation of proteins from the amino acid sequence. *Proteomics*, 4(6):1633-49, 2004

Böhme I, Beck-Sickinger AG: Illuminating the life of GPCRs. *Cell Commun Signal*, 7:16, 2009

Bockaert J, Pin JP (1999) Molecular tinkering of G protein-coupled receptors: an evolutionary success. *EMBO J*, 18(7), 1723-9

Brar B, Chen A, Perrin MH, Vale W: Specificity and regulation of extracellularly regulated kinase1/2 phosphorylation through corticotropin-releasing factor (CRF) receptors 1 and 2beta by the CRF/urocortin family of peptides. *Endocrinology*, 145(4):1718-29, 2004

Breitwieser GE: G protein-coupled receptor oligomerization: implications for G protein activation and cell signaling. *Circ Res*, 94(1):17-27, 2004

Bronnikov GE, Zhang S-J, Cannon B, Nedergaard J: A dual component analysis explains the distinctive kinetics of cAMP accumulation in brown adipocytes. *J Biol Chem*, 274(53):37770-80, 1999

Buonassisi V, Sato G, Cohen AL: Hormone-producing cultures of adrenal and pituitary tumor origin. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 48:1184-90, 1962

Cavalli V, Corti M, Gruenberg J: Endocytosis and signaling cascades: a close encounter. *FEBS*, 498:190-196, 2001

Chalmers DT, Lovenberg TW, De Souza EB: Localization of novel corticotropin-releasing factor receptor (CRF2) mRNA expression to specific subcortical nuclei in rat brain: comparison with CRF1 receptor mRNA expression. *J Neurosci*, 15(10):6340-50, 1995

Chin CN, von Heijne G, de Gier JW: Membrane proteins: shaping up. *Trends Biochem Sci*, 27:231-234, 2002

Daaka Y, Luttrell LM, Lefkowitz RJ: Switching of the coupling of the beta 2-adrenergic receptor to different G proteins by protein kinase A. *Nature*, 390:88-91, 1997

Dalbey RE, von Heijne G: Signal peptidases in prokaryotes and eukaryotes - a new protease family. *Trends Biochem Sci*, 17:474-478, 1992

Dautzenberg FM, Hauger RL: The CRF peptide family and their receptors: yet more partners discovered. *Trends Pharmacol Sci*, 23(2):71-7, 2002

Dautzenberg FM, Kilpatrick GJ, Hauger RL, Moreau J: Molecular biology of the CRH receptors-- in the mood. *Peptides*, 22(5):753-60, 2001

Dautzenberg FM, Higelin J, Teichert, U: Functional characterization of corticotropin-releasing factor type 1 receptor endogenously expressed in human embryonic kidney 293 cells. *Eur J Pharmacol*, 390, 51-59, 2000

Deupi X, Kobilka B: Activation of G protein-coupled receptors. *Adv Protein Chem*, 74:137-66, 2007

Dieterich KD, Lehnert H, De Souza EB: Corticotropin-releasing factor receptors: an overview. *Exp Clin Endocrinol Diabetes*, 105(2):65-82, 1997

Drake MT, Shenoy SK, Lefkowitz RJ: Trafficking of G protein-coupled receptors. *Circ Res*, 99(6):570-82, 2006

Drmota T, Milligan G: Kinetic analysis of the internalization and recycling of [3H]TRH and C-terminal truncations of the long isoform of the rat thyrotropin-releasing hormone receptor-1. *Biochem J*, 346:711-718, 2000

Dunham J, Meyer R, Garcia EL, Hall RA: GPR37 surface expression enhancement via N-terminal truncation or protein-protein interactions. *Biochemistry*, 48(43):10286-97, 2009

Evans R, Seasholtz A: Soluble corticotropin-releasing hormone receptor 2alpha splice variant is efficiently translated but not trafficked for secretion. *Endocrinology*, 150(9):4191-202, 2009

Ferguson SS: Evolving concepts in G Protein-coupled receptor endocytosis: the role in receptor desensitisation and signalling. *Pharmacol Rev*, 53:1-24, 2001

Gether U: Uncovering molecular mechanisms involved in activation of G Protein coupled receptors. *Endocrine Reviews*, 21:90-113, 2000

Gilbert HF: Protein Disulfide Isomerase and Assisted Protein Folding. *J Biol Chem*, 272:29399–29402, 1997

Gomes-Alves P, Couto F, Pesquita C, Coelho AV, Penque D: Rescue of F508del-CFTR by RXR motif inactivation triggers proteome modulation associated with the unfolded protein response. *Biochim Biophys Acta*, 1804(4):856-65, 2010

González-Maeso J: GPCR oligomers in pharmacology and signaling. *Mol Brain*, 4(1):20, 2011

Grammatopoulos DK, Hillhouse EW: Basal and Interleukin-1 β -Stimulated Prostaglandin Production from Cultured Human Myometrial Cells: Differential Regulation by Corticotropin- Releasing Hormone. *J Clin Endocrinol Metab*, 84(6):2204-2211, 1999

Grammatopoulos DK, Dai Y, Randeve HS, Levine MA, Karteris E, Easton AJ, Hillhouse EW: A novel spliced variant of the type 1 corticotropin-releasing hormone receptor with a deletion in the seventh transmembrane domain present in the human pregnant term myometrium and fetal membranes. *Mol Endocrinol*, 13:2189–2202, 1999

Grammatopoulos DK, Randeve HS, Levine MA, Kanellopoulou KA, Hillhouse EW: Rat cerebral cortex corticotropin-releasing hormone receptors: evidence for receptor coupling to multiple G-proteins. *J Neurochem*, 76(2):509-19, 2001

Grammatopoulos DK, Randeve HS, Levine MA, Katsanou ES, Hillhouse EW: Urocortin, but not corticotropin-releasing hormone (CRH), activates the mitogen-activated protein kinase signal transduction pathway in human pregnant myometrium: an effect mediated via R1 α and R2 β CRH receptor subtypes and stimulation of Gq-proteins. *J Neurochem*, 76(2):509-19, 2001

Gray JA, Roth BL: Paradoxical trafficking and regulation of 5-HT_{2A} receptors by agonists and antagonists. *Brain Res Bull*, 56 (5):441-51, 2001

Groake DA, Wilson S., Krasel C, Milligan G: Visualization of agonist-induced association and trafficking of green fluorescent protein-tagged forms of both beta-arrestin-1 and the thyrotropin-releasing hormone receptor-1. *J Biol Chem*, 274:23263-26269, 1999

Gutknecht E, Van der Linden I, Van Kolen K, Verhoeven KF, Vauquelin G, Dautzenberg FM: Molecular mechanisms of corticotropin-releasing factor receptor-induced calcium signaling. *Mol Pharmacol*, 75(3):648-57, 2009

Hasbi A, Nguyen T, Fan T, Cheng R, Rashid A, Alijaniam M, Rasenick MM, O'Dowd BF, George SR: Trafficking of preassembled opioid mu-delta heterooligomer-Gz signaling complexes to the plasma membrane: coregulation by agonists. *Biochemistry*, 46(45):12997-3009, 2007

Hauger RL, Grigoriadis DE, Dallman MF, Plotsky PM, Vale WW, Dautzenberg FM: International Union of Pharmacology. XXXVI. Current status of the nomenclature for receptors for corticotropin-releasing factor and their ligands. *Pharmacol Rev*, 55:21–26, 2003

Hauger RL, Risbrough V, Brauns O, Dautzenberg FM: Corticotropin releasing factor (CRF) receptor signaling in the central nervous system: new molecular targets. *CNS Neurol Disord Drug Targets*, 5(4):453-79, 2006

Helenius A, Aebi M: Roles of N-linked glycans in the endoplasmic reticulum. *Annu Rev Biochem*, 73:1019-49, 2004

Hillhouse EW, Randeve H, Ladds G, Grammatopoulos D: Corticotropin-releasing hormone receptors. *Biochem Soc Trans*, 30(4):428-32, 2002

Hoare SR, Fleck BA, Gross RS, Crowe PD, Williams JP, Grigoriadis DE: Allosteric ligands for the corticotropin releasing factor type 1 receptor modulate conformational states involved in receptor activation. *Mol Pharmacol*, 73(5):1371-80, 2008

Hoare SR, Sullivan SK, Fan J, Khongsaly K, Grigoriadis DE: Peptide ligand binding properties of the corticotropin-releasing factor (CRF) type 2 receptor: pharmacology of endogenously expressed receptors, G-protein-coupling sensitivity and determinants of CRF2 receptor selectivity. *Peptides*, 26(3):457-70, 2005

Hoare SR, Sullivan SK, Schwarz DA, Ling N, Vale WW, Crowe PD, Grigoriadis DE: Ligand affinity for amino-terminal and juxtamembrane domains of the corticotropin releasing factor type I receptor: regulation by G-protein and nonpeptide antagonists. *Biochemistry*, 43(13):3996-4011, 2004

Hofmann BA, Sydow S, Jahn O, van Werven L, Liepold T, Eckart K, Spiess J: 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

Hohenegger M, Waldhoer M, Beindl W, Böing B, Kreimeyer A, Nickel P, Nanoff C, Freissmuth M: Galpha-selective G protein antagonists. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 95(1):346-5, 1998

Holmes KD, Babwah AV, Dale LB, Poulter MO, Ferguson SS: Differential regulation of corticotropin releasing factor 1alpha receptor endocytosis and trafficking by beta-arrestins and Rab GTPases. *J Neurochem*, 96(4):934-49, 2006

Holsboer F: The rationale for corticotropin-releasing hormone receptor (CRH-R) antagonists to treat depression and anxiety. *J Psychiatr Res*, 33:181-214, 1999

Hubbell WL, Altenbach C, Hubbell CM, Khorana HG: Rhodopsin structure, dynamics, and activation: a perspective from crystallography, site-directed spin labeling, sulfhydryl reactivity, and disulfide cross-linking. *Adv Protein Chem*, 63:243-90, 2003

Jahn O, Eckart K, Brauns O, Tezval H, Spiess J: The binding protein of corticotropin-releasing factor: Ligand-binding site and subunit structure. *PNAS*, 99(19):12055-12060, 2002

Jahnsen JA, Uhlen S: The predicted N-terminal signal sequence of the human α_2 C-adrenoceptor does not act as a functional cleavable signal peptide. *Eur J Pharmacol*, 684(1-3):51-8, 2012

Jalava AM, Heikkilä J, Akerlind G, Pettit GR, Akerman KE: Effects of bryostatins 1 and 2 on morphological and functional differentiation of SH-SY5Y human neuroblastoma cells. *Cancer Res*, 50(11):3422-8, 1990

Katada T, Ui M: ADP ribosylation of the specific membrane protein of C6 cells by islet-activating protein associated with modification of adenylate cyclase activity. *J Biol Chem*, 257(12):7210-6, 1982

Kawakami K: Transgenesis and gene trap methods in zebrafish by using the Tol2 transposable element. *Methods Cell Biol*, 77:201-22, 2004

Kenakin T: The classification of seven transmembrane receptors in recombinant expression systems. *Pharmacol Rev*, 48:413-463, 1996

Kim Y, Park MK, Uhm DY, Chung S: Modulation of T-type Ca²⁺ channels by corticotropin-releasing factor through protein kinase C pathway in MN9D dopaminergic cells. *Biochem Biophys Res Commun*, 358(3):796-801, 2007

Kirchhausen T: Adaptors for clathrin-mediated traffic. *Annu Rev Cell Dev Biol*, 15:705-732, 1999

Köchl R, Alken M, Rutz C, Krause G, Oksche A, Rosenthal W, Schüle R: The signal peptide of the G protein-coupled human endothelin B receptor is necessary for translocation of the N-terminal tail across the endoplasmic reticulum membrane. *J Biol Chem*, 277:16131-16138, 2002

Krasel C, Zabel U, Lorenz K, Reiner S, Al-Sabah S, Lohse MJ: Dual role of the beta₂-adrenergic receptor C terminus for the binding of beta-arrestin and receptor internalization. *J Biol Chem*, 283(46):31840-8, 2008

Lee KB, Pals-Rylaarsdam R, Benovic JL, Hosey MM: Arrestin-independent internalization of the m₁, m₃, and m₄ subtypes of muscarinic cholinergic receptors. *J Biol Chem*, 273:12967-12972, 1998

Lovenberg TW, Chalmer DT, Liu C, De Souza EB: CRF2 alpha and CRF2 beta receptor mRNAs are differentially distributed between the rat central nervous system and peripheral tissues. *Endocrinology*, 136:4139-4142, 1995

Lovenberg TW, Liaw CW, Grigoriadis DE, Clevenger W, Chalmers DT, De Souza EB, Oltersdorf T: Cloning and characterization of a functionally distinct corticotropin-releasing factor receptor subtype from rat brain. *Proc Natl Acad Sci USA*, 92:836-840, 1995

Luttrell LM, Lefkowitz RJ: The role of beta-arrestins in the termination and transduction of G-protein-coupled receptor signals. *J Cell Sci*, 115(Pt 3):455-65, 2002

Luzio JP, Mullock BM, Pryor PR, Lindsay MR, James DE, Piper RC: Relationship between endosomes and lysosomes. *Biochem Soc Trans*, 29:476-480, 2001

Markovic D, Lehnert H, Levine MA, Grammatopoulos DK: Structural determinants critical for localization and signaling within the seventh transmembrane domain of the type 1 corticotropin releasing hormone receptor: lessons from the receptor variant R1d. *Mol Endocrinol*, 22(11):2505-19, 2008

Markovic D, Punn A, Lehnert H, Grammatopoulos DK: Intracellular mechanisms regulating corticotropin-releasing hormone receptor-2beta endocytosis and interaction with extracellularly regulated kinase 1/2 and p38 mitogen-activated protein kinase signaling cascades. *Mol Endocrinol*, 22(3):689-706, 2008

Martin NP, Whalen EJ, Zamah MA, Pierce KL, Lefkowitz RJ: PKA-mediated phosphorylation of the beta1-adrenergic receptor promotes Gs/Gi switching. *Cell Signal*, 16(12):1397-403, 2004

Martoglio B, Dobberstein B: Signal sequences: more than just greasy peptides. *Trends Cell Biol*, 8:410-415, 1998

Milan-Lobo L, Gsandtner I, Gaubitzer E, Rünzler D, Buchmayer F, Köhler G, Bonci A, Freissmuth M, Sitte HH: Subtype-specific differences in corticotropin-releasing factor receptor complexes detected by fluorescence spectroscopy. *Mol Pharmacol*, 76(6):1196-210, 2009

Molinari M, Helenius A: Chaperone selection during glycoprotein translocation into the endoplasmic reticulum. *Science*, 288(5464):331-3, 2000

Neer EJ: Heterotrimeric G proteins: organizers of transmembrane signals. *Cell*, 80(2):249-57, 1995

Nielsen SM, Nielsen LZ, Hjorth SA, Perrin MH, Vale WW: Constitutive activation of tethered-peptide/corticotropin-releasing factor receptor chimeras. *Proc Natl Acad Sci USA*, 97(18):10277-81, 2000

Nikodemova M, Diehl CR, Aguilera G: Multiple sites of control of type-1 corticotropin releasing hormone receptor levels in the pituitary. *Arch Physiol Biochem*, 110(1-2):123-8, 2002

Oakley RH, Laporte SA, Holt JA, Barak LS, Caron MG: Molecular determinants underlying the formation of stable intracellular G Protein-coupled receptor-b-Arrestin complexes after receptor endocytosis. *J Biol Chem*, 276:19452–19460, 2001

Oakley RH, Olivares-Reyes JA, Hudson CC, Flores-Vega F, Dautzenberg FM, Hauger RL: Carboxyl-terminal and intracellular loop sites for CRF1 receptor phosphorylation and beta-arrestin-2 recruitment: a mechanism regulating stress and anxiety responses. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*, 293(1):R209-22, 2007

Olsen SK, Ibrahim OA, Raucci A, Zhang F, Eliseenkova AV, Yayon A, Basilico C, Linhardt RJ, Schlessinger J, Mohammadi M: Insights into the molecular basis for fibroblast growth factor receptor autoinhibition and ligand-binding promiscuity. *Proc Natl Acad Sci USA*, 101(4):935-40, 2004

Oueslati M: Qualitätskontrolle von Membranproteinen im endoplasmatischen Retikulum und endoplasmatischen Retikulum-Golgi-Intermediärkompartiment. Dissertation, 2005

Pal K, Swaminathan K, Xu HE, Pioszak AA: Structural basis for hormone recognition by the Human CRFR2{alpha} G protein-coupled receptor. *J Biol Chem*, 285(51):40351-61, 2010

Perrin MH, Vale WW: Corticotropin releasing factor receptors and their ligand family. *Ann N Y Acad Sci*, 885:312-28, 1999

Post A, Ohl F, Almeida OF, Binder EB, Rücker M, Welt S, Binder E, Holsboer F, Sillaber I: Identification of molecules potentially involved in mediating the in vivo actions of the corticotropin-releasing hormone receptor 1 antagonist, NBI30775 (R121919). *Psychopharmacology (Berl)*, 180(1):150-8, 2005

Refojo D, Holsboer F: CRH signaling. Molecular specificity for drug targeting in the CNS. *Ann N Y Acad Sci*, 1179:106-19, 2009

Robinson MS, Bonifacino JS: Adaptor-related proteins. *Curr Opin Cell Biol*, 13:444-453, 2001

Rutz C, Renner A, Alken M, Schulz K, Beyermann M, Wiesner B, Rosenthal W, Schüle R: The corticotropin-releasing factor receptor type 2a contains an N-terminal pseudo signal peptide. *J Biol Chem*, 281(34):24910-21, 2006

Schmid SL, Smythe E: Stage-specific assays for coated pit formation and coated vesicle budding in vitro. *J Cell Biol*, 114:869-880, 2001

Schmidt A: Untersuchung des Recyclings des Corticotropin-Releasing Factor-Rezeptors Typ 1 mit Hilfe von Kaede-Fusionsproteinen, Dissertation, 2009

Schoeffter P, Feuerbach D, Bobirnac I, Gazi L, Longato R: Functional, endogenously expressed corticotropin-releasing factor receptor type 1 (CRF1) and CRF1 receptor mRNA expression in human neuroblastoma SH-SY5Y cells. *Fundam Clin Pharmacol*, 13(4):484-9, 1999

Schülein R: The early stages of the intracellular transport of membrane proteins: clinical and pharmacological implications. *Rev Physiol Biochem Pharmacol*, 151:45-91, 2004

Schulz K: Transport und Internalisierung des Corticotropin-Releasing-Factor Rezeptors Typ 2a, Diplomarbeit, 2005.

Shaw G, Morse S, Ararat M, Graham FL: Preferential transformation of human neuronal cells by human adenoviruses and the origin of HEK 293 cells. *FASEB J*, 16(8):869-71, 2002

Silberstein S, Gilmore R: Biochemistry, molecular biology, and genetics of the oligosaccharyltransferase. *Faseb J*, 10:849-858, 1996

Tang T, Gao MH, Miyanohara A, Hammond HK: Galphaq reduces cAMP production by decreasing Galphas protein abundance. *Biochem Biophys Res Commun*, 377(2):679-84, 2008

Teichmann A, Rutz C, Kreuchwig A, Krause G, Wiesner B, Schülein R: The Pseudo signal peptide of the corticotropin-releasing factor receptor type 2A prevents receptor oligomerization. *J Biol Chem*, 287(32):27265-74, 2012

Terrillon S, Bouvier M: Receptor activity-independent recruitment of arrestin2 reveals specific signalling modes. *The EMBO Journal*, 23:3950–3961, 2004

Timpl P, Spanagel R, Sillaber I, Kresse A, Reul JM, Stalla GK, Blanquet V, Steckler T, Holsboer F, Wurst W: Impaired stress response and reduced anxiety in mice lacking a functional corticotropin-releasing hormone receptor 1. *Nat Genet*, 19(2):162-6, 1998

Tohgo A, Choy EW, Gesty-Palmer D, Pierce KL, Laporte S, Oakley RH, Caron MG, Lefkowitz RJ, Luttrell LM: The stability of the G Protein-coupled Receptor-βarrestin interaction determines the mechanism and functional consequence of ERK activation. *J Biol Chem*, 278:6258-6267, 2003

Trejo J, Coughlin SR: The cytoplasmic tails of protease-activated receptor-1 and substance P receptor specify sorting to lysosomes versus recycling. *J Biol Chem*, 274:2216-2224, 1999

Tu H, Kastin AJ, Pan W: Corticotropin-releasing hormone receptor (CRHR)1 and CRHR2 are both trafficking and signaling receptors for urocortin. *Mol Endocrinol*, 21(3):700-11, 2007

Villardaga JP, Nikolaev VO, Lorenz K, Ferrandon S, Zhuang Z, Lohse MJ: Conformational cross-talk between alpha2A-adrenergic and mu-opioid receptors controls cell signaling. *Nat Chem Biol*, (2):126-31, 2008

von Heijne G: The signal peptide. *J Membr Biol*, 115:195–201, 1990

van Kolen K, Verstraeten K, Royaux I, De Hoogt R, Gutknecht E, Peeters PJ: Corticotropin releasing factor-induced ERK phosphorylation in AtT20 cells occurs via a cAMP-dependent mechanism requiring EPAC2. *Neuropharmacology*, 58(1):135-44, 2010

van Koppen CJ, Kaiser B: Regulation of muscarinic acetylcholine receptor signaling. *Pharmacol Ther*, 98:197-220, 2003

Wallin E, von Heijne G: Properties of N-terminal tails in G-protein coupled receptors: a statistical study. *Protein Eng*, 8(7):693-8, 1995

Walker JK, Premont RT, Barak LS, Caron MG, Shetzline MA: Properties of secretin receptor internalization differ from those of the beta(2)-adrenergic receptor. *J Biol Chem*, 274:31515-31523, 1999

Walter P, Blobel G: Translocation of proteins across the endoplasmic reticulum III. Signal recognition protein (SRP) causes signal sequence-dependent and site-specific arrest of chain elongation that is released by microsomal membranes. *J Cell Biol*, 91(2 Pt 1):557-61, 1981

Walter P, Blobel G: Signal recognition particle contains a 7S RNA essential for protein translocation across the endoplasmic reticulum. *Nature*, 299:691-698, 1982

Wanat MJ, Hopf FW, Stuber GD, Phillips PE, Bonci A: Corticotropin-releasing factor increases mouse ventral tegmental area dopamine neuron firing through a protein kinase C-dependent enhancement of Ih. *J Physiol*, 586(8):2157-70, 2008

Wenzel-Seifert K, Seifert R: Molecular analysis of B₂-adrenoceptor coupling to G_S-, G_I- and G_Q-proteins. *Mol Pharmacol*, 58:954–966, 2000

White JH, Wise A, Main MJ, Green A, Fraser NJ, Disney GH, Barnes AA, Emson P, Foord SM, Marshall FH: Heterodimerization is required for the formation of a functional GABA(B) receptor. *Nature*, 396(6712):679-82, 1998

Wietfeld D, Heinrich N, Furkert J, Fechner K, Beyermann M, Bienert M, Berger H: Regulation of the coupling to different G proteins of rat corticotropin-releasing factor receptor type 1 in human embryonic kidney 293 cells. *J Biol Chem*, 279(37):38386-94, 2004

Wilbanks AM, Laporte SA, Bohn LM, Barak LS, Caron MG: Apparent loss-of-function mutant GPCRs revealed as constitutively desensitized receptors. *Biochemistry*, 41(40):11981-9, 2002

Wild K, Halic M, Sinning I, Beckmann R: SRP meets the ribosom. *Nat Struct Mol Biol*, 11:1049-1053, 2004

Wood SK, Zhang XY, Reyes BA, Lee CS, Van Bockstaele EJ, Valentino RJ: Cellular adaptations of dorsal raphe serotonin neurons associated with the development of active coping in response to social stress. *Biol Psychiatry*, 73(11):1087-94, 2013

Yasuda D, Okuno T, Yokomizo T, Hori T, Hirota N, Hashidate T, Miyano M, Shimizu T, Nakamura M: Helix 8 of leukotriene B4 type-2 receptor is required for the folding to pass the quality control in the endoplasmic reticulum. *FASEB J*, 23(5):1470-81, 2009

Zamah AM, Delahunty M, Luttrell LM, Lefkowitz RJ: Protein kinase A-mediated phosphorylation of the beta 2-adrenergic receptor regulates its coupling to Gs and Gi. Demonstration in a reconstituted system. *J Biol Chem*, 277(34):31249-56, 2002

Zerangue N, Schwappach B, Jan YN, Jan LY: A new ER trafficking signal regulates the subunit stoichiometry of plasma membrane K(ATP) channels. *Neuron*, 22(3):537-48, 1999

6. PUBLIKATION

Auszüge aus der vorliegenden Arbeit wurden veröffentlicht in:

Schulz K, Rutz C, Westendorf C, Ridelis I, Vogelbein S, Furkert J, Schmidt A, Wiesner B, Schüle R: The pseudo signal peptide of the corticotropin-releasing factor receptor type 2a decreases receptor expression and prevents Gi-mediated inhibition of adenylyl cyclase activity. *J Biol Chem*, 285(43):32878-87, 2010; <http://dx.doi.org/10.1074/jbc.M110.129627>