

**Regulation des humanen anaphylatoxischen
C3a-Rezeptors:
Struktur-/ Funktionsanalyse des C-Terminus
mit dem Schwerpunkt Internalisierung**

**Von dem Fachbereich Chemie der Universität Hannover
zur Erlangung des Grades einer
Doktorin der Naturwissenschaften
Dr. rer. nat.**

genehmigte Dissertation

von

**Dipl. Biochem. Britta Settmacher
geb. am 30. März 1968
in Düsseldorf**

2001

1. Referent: Prof. Dr. rer. nat. R. Gerardy-Schahn
2. Referent: PD Dr. med. A. Klos
Tag der Promotion: 19. Dezember 2000

How many and marvellous are the discoveries prepared for us
by the spirit of enlightenment,
by experiment, the child of error and effort,
by genius, the friend of paradox,
and by that divine inventor, Chance.

Alexander S. Puschkin

Zusammenfassung

Stichworte: C3aR, Internalisierung, cytosolischer C-Terminus

Das Komplementsystem, ein komplexes kaskadenartig aufgebautes System aus verschiedenen plasma- und membranständigen Proteinen, spielt eine bedeutende Rolle bei der Immunabwehr und in der frühen Phase von Entzündungsprozessen. Bei einer Aktivierung werden die proinflammatorischen Anaphylatoxine C3a und C5a freigesetzt. Diese wirken über spezifische Anaphylatoxinrezeptoren, dem C3aR und dem C5aR, die zur Familie der G-Protein gekoppelten Rezeptoren zählen. Die Aktivierungs- und Inaktivierungswege unterliegen einer Regulation, die für die Feinsteuerung der Signalübertragung verantwortlich ist. Teil der negativen Regulationsvorgänge sind Desensitierungsmechanismen, die eine Signaltransduktion durch den Rezeptor limitieren. Dazu zählen u.a. die Rezeptorphosphorylierung und -Internalisierung. Die Internalisierung ist ein innerhalb von Minuten nach Ligandenbindung ablaufender Transport des Rezeptors von der Zelloberfläche in Zellinnere.

Aufgrund der pathophysiologischen Bedeutung der Anaphylatoxine ist ein Verständnis ihrer molekularen Wirkungsweise und ihrer Rezeptoren von großer Wichtigkeit. Im Rahmen dieser Dissertation wurden Regulationsmechanismen des anaphylatoxischen C3a-Rezeptors untersucht. Dabei lag der Schwerpunkt auf der Charakterisierung der C3aR-Internalisierung, die mit Hilfe eines durchflusszytometrisch-antigenetischen Assays untersucht wurde. Es lassen sich folgende Ergebnisse zusammenfassen:

Eine dosisabhängige, C3a-spezifische, schnelle Internalisierung des C3aR konnte für Monozyten und insbesondere für HMC-1-Zellen gezeigt werden.

Bei einer pharmakologischen Untersuchung inhibitorischer Substanzen der Firma Smith Kline Beecham an Granulozyten konnte gezeigt werden, dass die chemisch modifizierte Substanz SB290157, die mit C3a um die Bindung an dem C3aR konkurriert, ein potenter Inhibitor der C3aR-Internalisierung ist und selbst nur in sehr hohen "unphysiologischen" Konzentrationen eine Internalisierung auslöst.

Bezüglich der Struktur-/Funktionsanalyse des C3aR-C-Terminus wurde der Einfluss der zehn im zytosolischen C-Terminus lokalisierten putativen Phosphorylierungsstellen auf die Internalisierung untersucht. Dabei zeigten die Serine an Pos. 465 u. 470 und Threonine an Pos. 463 u. 466 einen entscheidenden Einfluss auf die Rezeptorinternalisierung, wobei das Threonin an Position 463 den größten Effekt hat. Die Aminosäuren Ser⁴⁷⁵, Ser⁴⁷⁹, Thr⁴⁸⁰ und Thr⁴⁸¹ spielen keine Rolle für die Internalisierung des C3aR. Das Serin an Position 449 hat möglicherweise einen inhibitorischen Effekt auf die C3aR-Internalisierung. Da trotz des Austausches aller zehn putativen Phosphorylierungsstellen noch Internalisierung stattfindet, müssen noch weitere Teile des C3a-Rezeptors an dessen Internalisierung beteiligt sein.

Neben diesen Untersuchungen zur Internalisierung des C3aR wurden Vorstudien zur Charakterisierung der dem C3a-Rezeptor nach Ligandenbindung nachgeschalteten Regulationsvorgänge durchgeführt. Hierbei wurde zum einen ein C3aR-GFP-Fusionsprotein hergestellt, das später einmal zur Visualisierung der Rezeptorinternalisierung bzw. zur Verfolgung des Rezeptors im Inneren der Zelle genutzt werden kann, das allerdings in seiner jetzigen Form nur relativ schwach exprimiert wird. Daneben erfolgte eine erste, orientierende Untersuchung der C3aR- und auch C5aR-vermittelten Regulation auf mRNA-Ebene mit Hilfe des Atlas cDNA Array. Mit den gewählten Stimulationsbedingungen ließen sich jedoch noch keine größeren Unterschiede in der Genregulation zwischen stimulierten und nicht stimulierten HMC-1-Zellen 4 h nach AT-Gabe feststellen.

Abstract

Keywords: C3aR, internalization, cytosolic C-terminus

The complement system, a complex cascade of interacting plasma and membrane proteins, is one of the major mechanisms by which antigen recognition is converted into an effective defense against infection and is particularly important in defense against extracellular bacteria. During complement activation the human anaphylatoxic peptides C5a and C3a are generated which are potent pro-inflammatory mediators. These anaphylatoxins act on their specific receptors C5aR and C3aR which belong to the family of heptahelical G protein-coupled receptors. To avoid deleterious over-action, the signal transduction of heptahelical receptors is often, as in case of the related C5a receptor, negatively regulated by receptor desensitization either caused by fast ligand-induced receptor phosphorylation – in many but not all cases at serine or threonine residues located within the cytosolic C-terminus – or by receptor internalization.

Because of the pathophysiological importance of the anaphylatoxins it is necessary to understand their molecular way of action and their receptors. In this thesis mechanisms of negative feed-back regulations were examined. The focus was laid on the C3aR-internalization which was characterized by flow-cytometric antigenetic internalization assays. The results can be summarized as follows:

For monocytes and the human mast cell-line HMC-1, on which the C3aR is naturally expressed, a dose-dependent, C3a-specific, and fast internalization was demonstrated.

A pharmacological study on granulocytes with inhibitory substances designed by the company Smith Kline Beecham showed that the chemically modified substance SB290157, which competes with C3a for C3aR-binding, potently inhibited C3aR-internalization. On itself, SB290157 only caused internalization when used in very high "unphysiological" concentrations.

The role of the cytosolic C-terminus of the C3aR-for receptor-internalization was studied. The influence of ten putative serine and threonine phosphorylation sites was analyzed using C3aR-mutants stably expressed in RBL.2H3-cells. In this cells the wild-type C3aR was almost completely internalized within minutes after addition of C3a. It was shown that the serine residues at positions 465 and 470 and the threonine residues at positions 463 and 466 participated in the process of C3aR-internalization among which the threonine at position 463 had the strongest influence. The amino acids Ser⁴⁷⁵, Ser⁴⁷⁹, Thr⁴⁸⁰, and Thr⁴⁸¹ did not affect C3aR-internalization, while the serine at position 449 seemed to have an inhibitory effect. The fact that internalization occurred even when all ten putative phosphorylation sites in the cytosolic C-terminus of the C3aR were abolished points to the fact that other parts of the receptor are involved in this mechanism of C3aR regulation.

Preliminary studies were carried out to characterize the events following ligand binding at the C3aR. In this context, a recombinant fusion protein of the C3aR with Green Fluorescent Protein was generated in order to visualize receptor-internalization or to follow the receptor inside the cell after its internalization, but the expression of the fusion protein was only weak. Also, a first orientating investigation of C3aR- and C5aR-mediated regulation concerning the mRNA levels was performed using the Atlas cDNA array technology. Four hours after addition of anaphylatoxins or buffer to the cell culture medium of HMC1-cells, no significant differences between ligand-stimulated and non-stimulated cells were detected.

Inhaltsverzeichnis

Verzeichnis der Abbildungen und Tabellen	VI
Abkürzungsverzeichnis	VIII
1 Einleitung	1
1.1 Das Komplementsystem	1
1.2 Struktur und Funktion der Anaphylatoxine	4
1.3 Die Anaphylatoxinrezeptoren	7
1.3.1 Der C5a-Rezeptor (CD88)	7
1.3.2 Der C3a-Rezeptor	10
1.4 Signaltransduktion und negative Rückkopplungsmechanismen G-Protein gekoppelter Rezeptoren	13
1.5 Einführung in die Methode der Fluoreszenzdurchflusszytometrie	17
1.6 Zielsetzung und Aufgabenstellung	23
2 Material und Methoden	24
2.1 Material	24
2.1.1 Geräte	24
2.1.2 Verbrauchsmaterial	24
2.1.3 Chemikalien	25
2.1.4 Puffer und Lösungen	26
2.1.5 Enzyme, Enzymkits und Enzymzubehör	28
2.1.6 Vektoren	28
2.1.7 Oligonukleotide	28
2.1.8 Bakterienstämme	30
2.1.9 Eukaryontische Zelllinien	30
2.1.10 Nährmedien	30
2.1.11 Liganden	31
2.1.12 Antikörper	31
2.1.13 Spezielle EDV	32
2.2 Methoden	32
2.2.1 Methoden zum Arbeiten mit DNA und RNA	32
2.2.1.1 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)	32
2.2.1.2 Hybridisierung komplementärer Oligonukleotide	34
2.2.1.3 Agarosegelelektrophorese	34
2.2.1.4 Extraktion von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen	35
2.2.1.5 Phenol-Chloroform-Extraktion	36
2.2.1.6 Ethanol-fällung zur Präzipitation von Nukleinsäuren	36
2.2.1.7 Spaltung von DNA durch Restriktionsendonukleasen	37
2.2.1.8 Dephosphorylierung linearisierter Vektor-DNA	37
2.2.1.9 Ligation	37
2.2.1.10 Herstellung elektrokompenter Bakterien	38
2.2.1.11 Transformation von Bakterien durch Elektroporation	38
2.2.1.12 Plasmid-DNA-Präparationen	39

2.2.1.13	Präparation von genomischer DNA	40
2.2.1.14	Photometrische Bestimmung der Konzentration von Nukleinsäuren	40
2.2.1.15	DNA-Sequenzierung	40
2.2.1.16	Präparation von Gesamt-RNA	41
2.2.1.17	Herstellung Digoxigenin (DIG)-markierter RNA-Sonden	41
2.2.1.18	Northern-Transfer	42
2.2.1.19	Hybridisierung mit DIG-markierten Sonden	42
2.2.1.20	Immunologischer Nachweis von DIG mit CSPD	42
2.2.1.21	Atlas cDNA Expression Array	43
2.2.2	Zell- und Immunbiologische Methoden	44
2.2.2.1	Ammoniumchloridlyse zur Aufarbeitung von Vollblut für durchflusszytometrische Analysen	44
2.2.2.2	Präparation von mononukleären Zellen	44
2.2.2.3	Zellkultur	44
2.2.2.4	Transiente Transfektion	45
2.2.2.5	Stabile Transfektion	46
2.2.2.6	¹²⁵ Iod-Ligandenbindung	48
2.2.2.7	Kompetitive Bindungsstudien	48
2.2.2.8	Glukosaminidase-Release-Assay (GARA)	48
2.2.2.9	Messung der intrazellulären Calciumionenkonzentration	49
2.2.3	Durchflusszytometrisch-antigenetische Methoden	49
2.2.3.1	Durchflusszytometrische Expressionsüberprüfung	49
2.2.3.2	Internalisierungs-Gesamtkinetiken	50
2.2.3.3	Untersuchungen der schnellen Rezeptorinternalisierung (Teilkinetik)	52
2.2.3.4	Ermittlung einer Dosis-Wirkungs-Beziehung	52
3	Ergebnisse	53
3.1	Untersuchungen zur Charakterisierung der C3aR-Internalisierung	53
3.1.1	Durchflusszytometrische Untersuchung der C3aR-Internalisierung an Zellen der humanen Mastzelllinie HMC-1 und aufgereinigten humanen Monozyten	54
3.1.1.1	Dosis-Wirkungsabhängigkeit der C3aR-Internalisierung an HMC-1-Zellen und Monozyten	55
3.1.1.2	Zeitabhängigkeit der C3a-Rezeptor-Internalisierung an HMC-1-Zellen	56
3.1.2	Pharmakologische Untersuchungen mit inhibierenden Substanzen der Firma Smith Kline Beecham	58
3.2	Struktur-/Funktionsanalyse des C3a-Rezeptor C-Terminus mit dem Schwerpunkt Internalisierung	60
3.2.1	Vorüberlegungen und Voruntersuchungen zur Auswahl der eingesetzten Vektoren und Zelllinien	60
3.2.2	Klonierungsstrategie zum Austausch der zehn putativen Phosphorylierungsstellen im C-Terminus des Rezeptors gegen Alanin	62
3.2.3	Weiterentwicklung eines durchflusszytometrischen Internalisierungsassays zur Charakterisierung der neu generierten stabilen Zelllinien	68
3.2.4	Ergebnisse der durchflusszytometrischen Expressionsüberprüfung der stabilen Zelllinien	70
3.2.5	Struktur-Funktionszuordnung durch durchflusszytometrische Ermittlung des zeit- und dosis-abhängigen Internalisierungsverhaltens anhand ausgewählter Klone der stabilen Zelllinien	72
3.2.5.1	Dosis-Wirkungsabhängigkeit der Rezeptorinternalisierung	72
3.2.5.2	Vergleich des zeitabhängigen Internalisierungsverhaltens verschiedener Mutanten mit Hilfe von Gesamtkinetiken	73
3.2.5.3	Untersuchungen zur schnellen Rezeptorinternalisierung	75
3.2.6	Überprüfung der Mutanten M0, M1 und M5 anhand genomischer DNA	78

3.2.7	Untersuchungen zur Auswirkung der C-terminalen C3aR-Mutationen in Funktionstests	79
3.2.8	Zusammenfassung der Teilergebnisse zur Struktur-/Funktionsanalyse des C3a-Rezeptor C-Terminus mit dem Schwerpunkt Internalisierung	81
3.3	Untersuchungen zur Regulation des humanen anaphylatoxischen C3a-Rezeptors	81
3.3.1	Entwicklung eines C3aR-GFP-Fusionsproteins für die spätere Visualisierung der Rezeptor-Ligand-Interaktion mit Hilfe der konvokalen Laserspektroskopie	81
3.3.1.1	Herstellung des C3aR-GFP-Fusionsproteins	81
3.3.1.2	Durchflusszytometrische Überprüfung der Funktionsfähigkeit des C3aR-GFP-Fusionsproteins nach transienter Transfektion in HEK-293-Zellen mit Hilfe einer Zweifarbanalyse	82
3.3.1.3	Überprüfung des GFP-Fusionsproteins in der Zweipunktbindung und anhand von ¹²⁵ I-C3a-Bindungsstudien	85
3.3.2	Voruntersuchungen zur C3aR- und C5aR-vermittelten Regulation auf mRNA-Ebene an der humanen Mastzelllinie HMC-1 mit Hilfe des Atlas cDNA Arrays	87
3.3.2.1	Voruntersuchungen zur C3aR-vermittelten Regulation mit Hilfe des Northern-Transfers	88
3.3.2.2	Ergebnisse der Voruntersuchungen zur C3aR-vermittelten Regulation mit Hilfe des Atlas cDNA Arrays	89
4	Diskussion	91
4.1	Charakterisierung der C3aR-Internalisierung an Zellen der humanen Mastzelllinie HMC-1 und humanen Monozyten	91
4.2	Pharmakologische Untersuchungen der C3aR-inhibierenden Substanzen der Firma Smith Kline Beecham	94
4.3	Struktur-/ Funktionsanalyse des C3aR-C-Terminus mit dem Schwerpunkt Internalisierung	95
4.4	Untersuchungen zur Charakterisierung der dem humanen anaphylatoxischen C3a-Rezeptor nachgeschalteten Regulationsvorgänge	101
5	Ausblick	104
6	Literatur	105
7	Anhang	120
	Lebenslauf	125
	Eigene Publikationen	126
	Danksagung	

Verzeichnis der Abbildungen und Tabellen

Abb. 1.1:	Aktivierungswege des Komplementsystems und die Generierung anaphylatoxischer Peptide.	2
Abb. 1.2:	Der heptahelikale humane C5a-Rezeptor mit der Darstellung der putativen Phosphorylierungsstellen.	9
Abb. 1.3:	Der humane C3a-Rezeptor.	12
Abb. 1.4:	Signaltransduktion durch G-Proteine.	14
Abb. 1.5:	Aufbau eines Durchflusszytometers.	20
Abb. 1.6:	Prinzip der hydrodynamischen Fokussierung.	21
Abb. 1.7:	Graphische Darstellung durchflusszytometrischer Untersuchungen.	22
Abb. 3.1:	Typische Histogramme der C3aR-Fluoreszenz an HMC-1-Zellen (links) und Monozyten (rechts).	54
Abb. 3.2:	Dosis-Wirkungskurven der C3aR-Internalisierung an HMC-1-Zellen (links) und Monozyten (rechts).	55
Abb. 3.3:	Zeitabhängiges C3aR-Internalisierungsverhalten bei HMC-1-Zellen.	57
Abb. 3.4:	Einfluss verschiedener Inhibitoren der Firma Smith Kline Beecham auf die C3aR-Internalisierung humaner Granulozyten.	58
Abb. 3.5:	Übersicht über die generierten C3aR-Mutanten.	63
Abb. 3.6:	Skizze zur Subklonierung des C3aR-wt (TC) aus dem Vektor pTC13M.	64
Abb. 3.7:	Überprüfung des Ligationsansatzes zur Herstellung der stabilen Mutanten pEF1/HisA-M0, -M1 und -M2.	65
Abb. 3.8:	Klonierungsstrategie zur Generierung der Mutanten M0 bis M3.	66
Abb. 3.9:	Vorstudien zur Ermittlung optimaler Bedingungen für die durchflusszytometrische Analyse der stabilen RBL-Zelllinien.	68
Abb. 3.10:	Vergleich des Internalisierungsverhaltens verschiedener Klone eines Konstruktes mit unterschiedlicher Rezeptorexpression anhand zweier Beispiele.	72
Abb. 3.11:	Dosis-Wirkungskurven der ersten Mutantengeneration im Vergleich zum Wildtyp nach 3minütiger Stimulation bei 37°C mit ansteigenden Konzentrationen an C3a.	73
Abb. 3.12:	Auswirkungen der C-terminalen Rezeptormutationen auf das mit 100 nM ausgelöste C3aR-Internalisierungsverhalten.	74
Abb. 3.13:	Überblick über das schnelle Rezeptorinternalisierungsverhalten der ersten und zweiten Generation an Mutanten.	75
Abb. 3.14:	Internalisierungsverhalten von C3aR-Mutanten nach 4minütiger Stimulation mit 100 nM C3a.	76
Abb. 3.15:	Übersicht über die Mutationen der Konstrukte der dritten Generation im Vergleich zum C3aR-Wildtyp und zu Mutante M1.	77
Abb. 3.16:	Überblick über das schnelle Rezeptorinternalisierungsverhalten der 3. Mutantengeneration (M7a-d) im Vergleich zum Wildtyp und M1.	78
Abb. 3.17:	Ergebnisse der Liganden-induzierten Calciumfreisetzung bei den Mutanten der ersten und zweiten Generation im Vergleich zum Wildtyp nach Kotransfektion mit $G\alpha_{16}$.	80
Abb. 3.18:	Ergebnisse der Liganden-induzierten Calciumfreisetzung bei den Mutanten der dritten Generation im Vergleich mit dem Wildtyp und Mutante M1 nach Kotransfektion mit $G\alpha_{16}$.	80
Abb. 3.19:	Darstellung der detektierten C3aR-Fluoreszenzen (FL-2) des C3aR-wt (1), des C5aR-wt (2), des zur Fusion eingesetzten GFP-Vektors (3) und der drei C3aR-GFP-Konstrukte (4-6) nach Expression in HEK-293-Zellen.	83
Abb. 3.20:	GFP-Eigenfluoreszenz des pcDNA3.1/CT-GFP-TOPO-Fusionsvektors.	83

Abb. 3.21: Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen transient transfizierter HEK-293-Zellen mit a) dem C3aR-wt in pcDNA3, b) und c) dem GFP-Fusionsvektor und d) dem C3aR-GFP-Konstrukt mit Stop.	84
Abb. 3.22: C3a-Bindungskurve des C3aR-GFP-Fusionsproteins (ohne Stop) im Vergleich zu dem C3aR-wt in pEF1/HisA (pEF7/11) an transient transfizierten HEK-293-Zellen.	85
Abb. 3.23: Gelelektrophoretische Überprüfung der aus stimulierten und nicht stimulierten HMC-1-Zellen gewonnenen RNA.	88
Abb. 3.24: C3aR-Nachweis mittels Northern-Blot.	89
Abb. 3.25: Digitalisiertes Ergebnis der Hybridisierung von Atlas Array Membranen mit RNA unstimulierter (a) und mit C3a/C5a stimulierter HMC-1-Zellen.	90
Tab. 3.1: Übersicht über die in RBL _A -Zellen nach stabiler Transfektion mit verschiedenen Expressionsvektoren erzielte Rezeptorexpression anhand von jeweils drei verschiedenen Klonen.	61
Tab. 3.2: Übersicht über die C3aR-Expressionslevel der Klone des Wildtyps und der Mutanten M0-M3 in RBL _A - und RBL _O -Zellen.	70
Tab. 3.3: ¹²⁵ I-C3a-Zweipunktbindung der GFP-Fusionsproteine an transient transfizierten HEK-293-Zellen.	86
Tab. 3.4: Anhand des Atlas Array Verfahrens detektierte, nach 4stündiger Stimulation von HMC-1-Zellen mit C3a/C5a regulierte Gene.	90

4 Abkürzungsverzeichnis

¹²⁵ I-C3a	mit ¹²³ Iod-markiertes Anaphylatoxin C3a
Abb.	Abbildung
AC3aRser	Anti-C3a-Rezeptor-Serum
ACD	Acid-Citrat-Dextrose, Gerinnungshemmer für Blut
A/D	Analog/Digital
ADP	Adenosindiphosphat
Amp	Ampicillin
AMP	Adenosinmonophosphat
Arg	Arginin
AS	Aminosäure
AT	Anaphylatoxin
ATP	Adenosin-5'triphosphat
Bp, bp	Basenpaare
BSA	Bovines Serumalbumin
Bt ₂ cAMP	dibutyryl-cAMP, N ⁶ ,2'-O-dibutyryl-adenosine-3',5'-cyclic monophosphate
C	Carboxyl
C3aR	C3a-Rezeptor
C5aR	C5a-Rezeptor
cAMP	cyclisches Adenosin-3',5'-monophosphat
CD4, CD8, CD14, CD16	Oberflächenantigene
cDNA	komplementäre DNA
CDS	Cell Dissociation Solution
CIP	Calf intestinal phosphatase
cpm	counts per minute
CSPD	3-(4-Methoxyspiro{1,2-dioxethan-3,2'-(5'chloro)tricyclodecan}-4-yl)phenylphosphat Dinatriumsalz
DAG	Diacylglycerin
DEPC	Diethylpyrocarbonat
desArg	desarginiert
dest.	destilliert
DIG	Digoxigenin
DMSO	Dimethylsulfoxid
<i>E. Coli</i>	<i>Escherischia coli</i>
ED	Effektive Dosis
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
Endkonz.	Endkonzentration
EtBr	Ethidiumbromid
FACS	Durchflusszytometer
FITC	Fluoresceinisothiocyanat
FL	Fluoreszenz
FMLP, FMLPR	N-Formyl-methionyl-leucyl-phenylalanin, FMLP-Rezeptor
FSC	Vorwärtsstreulicht
g	Gravitation
G-418	Geneticin
G-Protein	regulatorisches Guanin-Nukleotid-bindendes Protein
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase
GARA	Glucosaminidase-release-assay
GDP	Guanosindiphosphat
GFP	green fluorescent protein
Glu	Glutamin
GM-CSF	Granulozyten/Makrophagen-Kolonie-stimulierender-Faktor
gp	guinea-pig, Meerschwein
GPCR	G-Protein gekoppelter Rezeptor

GRK	G-Protein-Rezeptor-Kinase
GTP	Guanosintriphosphat
h	human
IFN	Interferon
IgG	Immunglobulin G
IL	Interleukin
<i>in vivo</i>	im lebenden Organismus
<i>in vitro</i>	im Reagenzglas, im Versuch
IP ₃	Inositoltriphosphat
IPTG	Isopropylthiogalaktosid
Kb, kb	Kilobasenpaare
K _D	Gleichgewichtskonstante
kDa	Kilo-Dalton
Ktrser	Kontrollserum
LB	Luria-Bertani-Medium
Leu	Leucin
LPS	Lipopolysaccharid
Lys	Lysin
m	murin, Maus
M	Mutante
MAC	membrane attack complex
mRNA	messenger Ribonukleinsäure
n	Anzahl
N-	Ammino-
NMR	nuklear magnetic resonance
OD	optische Dichte
OSM	Onkostatin M
p	Wahrscheinlichkeit
p. a.	zur Analyse
P/S	Penicillin/Streptomycin
PBS	Phosphat gepufferte Saline, Puffer
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
PE	Phycoerythrin
pH	negativer dekadischer Logarithmus der Hydronium-Ionen-Konzentration
pI	Propidiumiodid
PKA	Proteinkinase A
PKC	Proteinkinase C
PMA	Phorbol-12-myristate-13 acetate
PMNL	Polymorphkernige neutrophile Leukocyten
Pos.	Position
RBL _A	leukämische RBL-Zelllinie zur Verfügung gestellt von R. Ames
RBL _O	leukämische RBL-Zelllinie zur Verfügung gestellt von M. Oppermann
RT	Raumtemperatur
Ser	Serin
SSAR	second step anti rabbit-Antikörper
SSC	Seitwärtsstreulicht
STD	Standardabweichung
TC	Thorsten Crass
Thr	Threonin
TNF	Tumor-Nekrose-Faktor
U	Unit [$\mu\text{mol}/\text{min}$]
UTR	nicht übersetzte Region
UV	Ultraviolett
vs	versus
wt	Wildtyp
β -ARK	β -adrenerge Rezeptorkinase

1 Einleitung

1.1 Das Komplementsystem

Das Komplementsystem ist ein komplexes System aus verschiedenen Plasma- und membranständigen Proteinen, das insgesamt mehr als 30 Faktoren umfasst. Es ähnelt in seinem kaskadenartigen, proteolytischen Aufbau [1] dem Blutgerinnungs- und dem Kininsystem und der Fibrinolyse. Das Komplementsystem spielt eine wichtige Rolle bei der Immunabwehr und in der frühen Phase von Entzündungsprozessen. Die löslichen Komponenten befinden sich vorwiegend im Plasma, wo sie mehr als 15% der Globulinfraction ausmachen [2]. Die zellgebundenen Anteile sind Rezeptoren oder Regulatoren. Die Komplementkomponenten reagieren untereinander und mit Faktoren des angeborenen und erworbenen Immunsystems und komplementieren damit die Immunantwort [3]. Nach Auslösung der Komplementkaskade kommt es zu einer sich verstärkenden Kettenreaktion, in deren Verlauf die Komplementkomponenten durch limitierte Proteolyse oder katalysierte Konformationsumwandlung in ihre enzymatisch aktive Form überführt werden.

Die Aktivierung und damit die Auslösung der Komplementkaskade kann über drei unterschiedliche, aber miteinander in Beziehung stehende Wege, den klassischen, den Lektin- und den alternativen Weg starten. Eine Übersicht über die Aktivierungswege des Komplementsystems bietet Abb. 1.1.

Als klassischen Weg bezeichnet man die hauptsächlich über Immunkomplexe vermittelte Art der Komplementaktivierung. Dieser Weg umfasst aber auch die Aktivierung über Zellwandproteine wie Protein A, das bei vielen *Staphylococcus aureus* Stämmen vorkommt, über Lipid A der Lipopolysaccharide (LPS) gramnegativer Bakterien, über das C-reaktive Protein (CRP), dessen Serumkonzentration im Verlauf entzündlicher Reaktionen rapide ansteigt und durch Retroviren. Sie verläuft über die Initiierung der Komplementfaktoren C1q, C1r, C1s, C4 und C2 und der Bildung der C4b,2a-Konvertase.

Bei dem erst kürzlich beschriebenen Antikörper- und C1-unabhängigen Lektin- oder MBL-Weg reagiert ein Mannan-bindendes Lektin, ein während der Akuten-Phase-Reaktion im Serum hochreguliertes Protein, mit terminaler Mannose oder terminalem N-Acetylglucosamin an der bakteriellen Zelloberfläche. Es folgt die enzymatische Spaltung von C4 [4][5][6] über die Aktivierung zweier MBL-assoziiierter Serinproteasen (MASP-1 und -2). An dieser Stelle mündet der Lektin-Weg in den klassischen Weg und führt ebenso zur Bildung der klassischen C3-Konvertase (C4b,2a).

Die Auslösung des alternativen Wegs [7] erfolgt durch Reaktion des immer in geringen Konzentrationen vorhandenen metastabilen C3b [8] mit Oberflächenstrukturen von Komplementaktivierenden Mikroorganismen, z.B. mit Teichoidsäuren von gram-positiven Bakterien, mit

LPS von gram-negativen Bakterien oder Zymosan aus Hefezellwänden [9], oder mit Viren, aber auch durch den Kontakt mit einigen Kunststoffoberflächen. C3b bindet auf der Oberfläche in Gegenwart von Mg^{2+} den Faktor B, und nach dessen proteolytischer Spaltung durch den Faktor D bildet sich die alternative C3-Konvertase aus den Komponenten C3b und Bb. Ein weiterer im Serum vorhandener Komplementfaktor, Properdin oder auch Faktor P genannt, stabilisiert die alternative Konvertase. Da die Bindung eines einzelnen C3b genügt, um die Reaktionskaskade anzustoßen, ist der alternative Weg gleichzeitig auch eine Art Verstärkerschleife des klassischen Wegs [10].

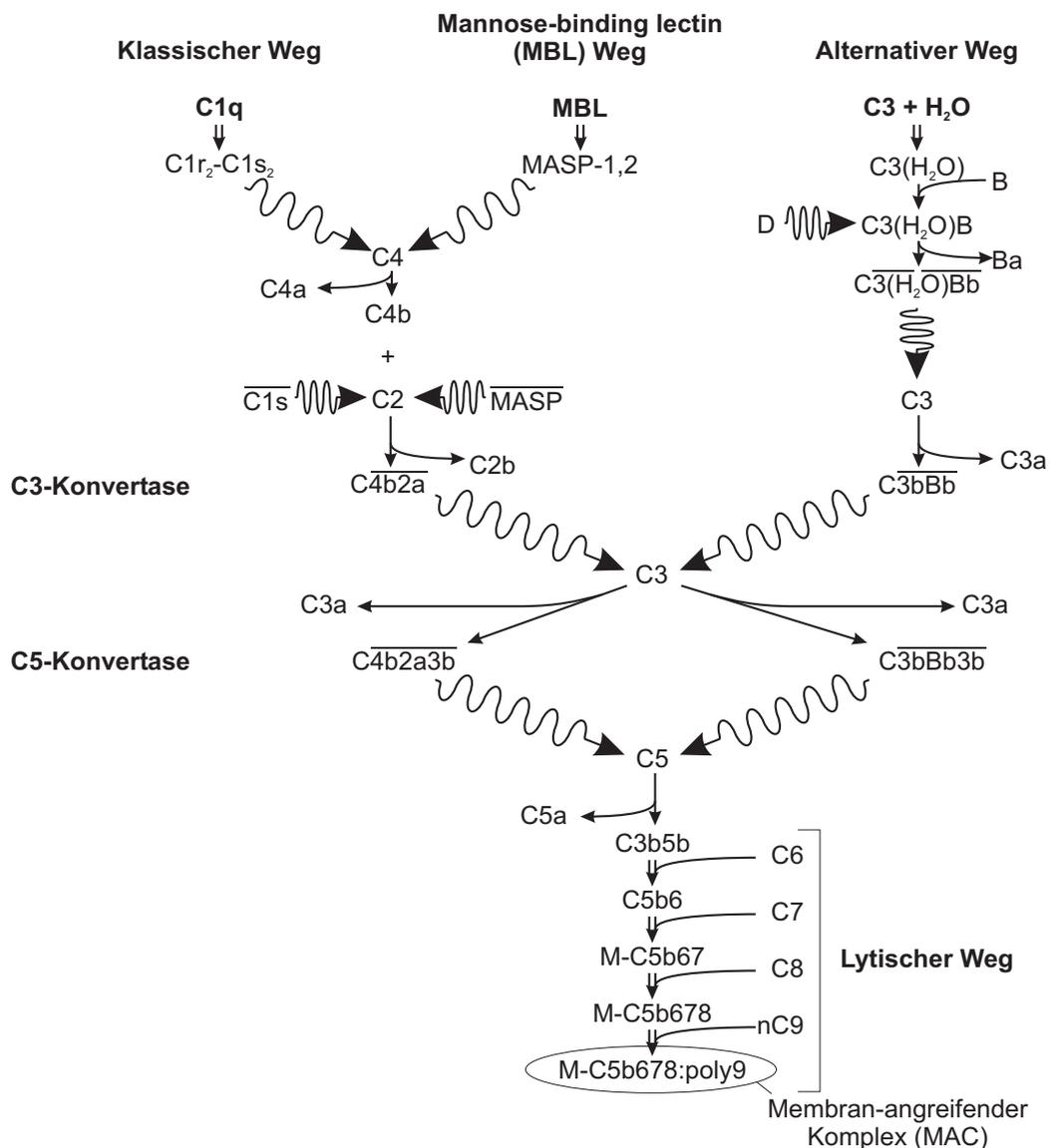


Abb. 1.1: Aktivierungswege des Komplementsystems und die Generierung anaphylatoxischer Peptide. Entnommen aus [11].

Alle drei Wege laufen mit der Bildung von C3-Konvertasen (C4b₂a oder C3bBb), die C3 in die aktive Komplementkomponente C3b und das lösliche anaphylatoxische Peptid C3a spalten, in einer gemeinsamen Endstrecke, dem lytischen Weg, zusammen. Zunächst wird C5 über die Aktivierung der jeweiligen C3-Konvertase durch C3b und damit der Bildung einer

trimolekularen C5-Konvertase (C4b,2a,3b oder C3b,Bb,C3b) in C5b und das anaphylatoxische Peptid C5a gespalten. Dann lagern sich an das C5b-Fragment nacheinander die Komponenten C6, C7, C8 und sechs bis zwölf ringförmig angeordnete Moleküle C9 an [12]. Dieses Konglomerat bildet den Membran-angreifenden Komplex (MAC), der eine Pore in der zytoplasmatischen Membran einer als fremd erkannten Zielzelle bildet [13] und damit letztendlich deren Lyse einleitet.

Das Komplementsystem erfüllt im wesentlichen drei Effektorfunktionen:

- **Zytotoxische Funktion**
Durch die Ausbildung des Membranangriffskomplexes (MAC) und dessen Insertion in die Membran kommt es zur osmotischen Lyse und damit zur Abtötung eines Komplement-aktivierten Mikroorganismus.
- **Opsonisierende Funktion**
Die Opsonisierung von Immunkomplexen und Mikroorganismen durch die Spaltprodukte C3b bzw. dessen Abbauprodukt iC3b und C4b, die aufgrund ihrer hochreaktiven Thioestergruppen kovalent an Amino- und Hydroxylgruppen von Fremddantigenen, entweder direkt oder als Immunkomplex binden können, erleichtert die rezeptorvermittelte Phagozytose. Die "C-markierten" Immunkomplexe oder Mikroorganismen binden dann an spezifische Komplementrezeptoren, die auf fast allen Immunzellen vorhanden sind (z.B. auf Makrophagen und Erythrozyten: CR1, auf B-Zellen: CR2) und werden aus dem Blutkreislauf entfernt.
- **Entzündungsstimulierende Funktion**
Die während der Komplementkaskade freigesetzten Anaphylatoxine C3a und C5a haben eine proinflammatorische Wirkung: Sie verstärken die Degranulation von Basophilen und Mastzellen, erhöhen die Gefäßpermeabilität, induzieren die Kontraktion der glatten Muskulatur und stimulieren den Arachidonsäuremetabolismus. C5a bewirkt die chemotaktische Rekrutierung von Granulozyten und Monozyten, fördert deren Aggregation, stimuliert den sog. oxidativen Burst (Freisetzung von O[•]-Radikalen und proteolytischen Enzymen) und fördert die Freisetzung des plättchenaktivierenden Faktors.

Ein Regulationssystem gewährleistet die permanente Funktionsfähigkeit des Komplementsystems, steuert die Aktivität und dient der Verhinderung von Gewebeschäden infolge unspezifischer Bindung aktivierter Komplementkomponenten im Plasma. Diese Kontrolle beginnt schon im ersten Schritt. Der im Blutplasma zirkulierende C1-Inhibitor reguliert die klassische Komplementaktivierung durch die Hemmung des aktivierten C1r und C1s. Die gemeinsame Funktion von DAF, CR1, Faktor I, C4-bp, Faktor H und MCP ist die Hemmung der Bildung von Enzymen der C3-Konvertase (C4b2a und C3bBb). Ihre Funktionen sind überlappend, jedoch nicht identisch. Der DAF (decay accelerating factor) beschleunigt den Abbau der klassischen und alternativen C3 und C5 Konvertasen und verhindert auch schon ihre Bildung. Daneben übt er in der Zellmembran körpereigener Zellen eine Schutzfunktion gegenüber dem autolytischen Komplementangriff aus. Der Komplementrezeptor CR1 hat eine ähnliche Wirkung wie DAF, die er aber sowohl in- wie extrinsisch ausüben kann. Daneben ist er ein Kofaktor für die von Faktor I ausgeübten Funktionen. Faktor I spaltet C3b in iC3b und C3f, iC3b

in C3c und C3d,g und C4b in C4c und C4d in der Gegenwart der Kofaktoren CR1, MCP, Faktor H und C4BP [14]. Das MCP (membrane cofactor protein) verstärkt die Aktivität des Faktors I, wobei die Regulation rein intrinsisch ist, also auf die Zelle beschränkt bleibt, wo das MCP verankert ist. Daneben findet eine weitere Regulation durch CD59 statt. CD59 ist ein MAC-inhibierender Faktor, der die Anlagerung von C9 an den C5b-8-Komplex und damit die Zelllyse verhindert.

Eine weitergehende, detaillierte Beschreibung der Feinstruktur des Komplementsystems und der beteiligten Komponenten finden sich in Übersichtsartikeln [11][15][16][18][17][19].

1.2 Struktur und Funktion der Anaphylatoxine

Die Anaphylatoxine (AT) C3a und C5a entstehen durch die proteolytische Abspaltung des N-terminalen Bereichs der α -Ketten im Verlauf der Komplementkaskade aus ihren nativen Vorläuferpeptiden C3 und C5. Sie entfalten ihre Wirkung über spezifische Anaphylatoxinrezeptoren, dem C3a-Rezeptor (C3aR) und dem C5a-Rezeptor (C5aR). Bei der relativ rasch einsetzenden Inaktivierung der Anaphylatoxine durch ein Regulatorprotein, die Serumcarboxypeptidase N, wird das endständige Arginin abgespalten [20][21][22][23]. Das dabei entstehende C5adesArg hat noch eine um den Faktor 10 (-100) verminderte Potenz im Vergleich zum C5a [24] und zählt deshalb auch mit zu den Anaphylatoxinen [25]. C3adesArg gilt als funktionell inaktiv, wie z.B. in [26] gezeigt, und ist deshalb kein Anaphylatoxin. Kürzlich wurden zwar einige durch C3adesArg vermittelte Effektorfunktionen beschrieben [27][28] [29][30], die jedoch als umstritten gelten, da z. T. eine Kontamination mit C3a bzw. C5a nicht ausgeschlossen werden kann [28] und z.T. die Reaktion unabhängig vom C3aR-C-Terminus, der beim C3a für die Bindung des Rezeptors wichtig ist, erfolgt [31][32]. Bis vor kurzem wurde C4a, das über den klassischen Weg gebildete lösliche Spaltprodukt von C4, als relativ schwach wirkendes anaphylatoxisches Peptid aufgefasst. Dies war hauptsächlich begründet durch seine hohe Sequenz- und Strukturhomologie und durch seine proinflammatorischen Effektorfunktionen im Meerschwein-System [33][34][35][36]. Neuere Untersuchungen haben gezeigt, dass humanes C4a (hC4a) seine Effektorfunktionen nicht über den humanen C3aR sondern nur über den Meerschwein-C3a-Rezeptor vermittelt, an den es artifiziell binden und eine funktionelle Calciumantwort in transient transfizierten HEK-293-Zellen auslösen kann [37][37]. Da hC4a also nachweislich nicht über den hC3aR wirkt und es keinen Hinweis auf einen eigenen Rezeptor für hC4a gibt, gilt es im Menschen nicht mehr als AT-Peptid.

Bei den Anaphylatoxine handelt es sich um kurze, basische ($pI=8,6-9,6$) Polypeptide, wobei C3a eine Länge von 77 und C5a eine Länge von 74 Aminosäuren aufweist. Wegen des hohen Anteils an basischen Lysinen und Argininen liegen die Anaphylatoxine bei neutralem pH-Wert als Kationen vor. Das Molekulargewicht von C3a beträgt 9 kDa, das von C5a liegt aufgrund des posttranslatorisch an Asp⁶⁴ angefügten Oligosaccharids bei 11 kDa [38][39][40]. Aus dem direkten Vergleich der Primärstrukturen von C3a mit C5a ergibt sich eine Sequenzhomologie von ca. 35-40% und bezüglich homologer Anaphylatoxine verschiedener Spezies

eine Homologie von ca. 65-70% [41]. Dabei zeigt sich ebenfalls, dass die C-terminale Penta-peptidsequenz der einzelnen Anaphylatoxine hoch konserviert ist. Bei C3a handelt es sich um die Sequenz LGLAR, bei C5a um die Sequenz MQLGR. Studien mit synthetischen Peptiden [42][43][44][45][46] haben gezeigt, dass diese fünf terminalen Reste für die Bindung und die Interaktion mit dem Rezeptor von entscheidender Bedeutung sind.

Mit Hilfe von 2D-NMR-Spektroskopie und röntgenkristallographischen Analysen konnte die Tertiärstruktur der Anaphylatoxine aufgeklärt werden [47][48][49][50][51]. Demnach gliedert sich ein Anaphylatoxinmolekül in einen α -helikalen N-Terminus mit 4-8 hydrophoben, spe-zieskonservierten Aminosäuren, einen globulären Kernbereich (Core) und einen C-Terminus mit random-coil-Struktur [38][47][52][53][54]. Der Core-Bereich wird durch drei bzw. vier antiparallele α -Helices, die über Schleifen (Loops) miteinander verbunden sind, gebildet und durch drei intramolekulare Disulfidbrücken stabilisiert. Der semi-flexible C-Terminus (Amino-säuren 64-74), der auch als flexibler Finger bezeichnet wird, hat Kontakt zur umgebenden Lösung und zeigt vom Core weg. In neueren 2D-NMR-Untersuchungen hat sich allerdings gezeigt, dass der C-Terminus des C5a durch Wechselwirkungen zwischen den Argininen an Position 74 und 62 dazu tendiert, sich in Richtung des Kernbereiches zurückzufalten [55].

Trotz dieser strukturellen Ähnlichkeit und eines wahrscheinlich gemeinsamen phylogenetischen Ursprungs unterscheiden sich die Anaphylatoxine zum Teil erheblich in ihrer proinflammatorischen Potenz, die beim C5a 100mal stärker ist als beim C3a [39][53]. Allerdings steht der im Vergleich zum C5a verminderten C3a-Aktivität eine 15fach höhere Serumkonzentration entgegen. Die physiologisch wirksamen Konzentrationen liegen im nano- und picomolaren Bereich, im Falle von C5a/C5adesArg bei 10^{-10} M bis 10^{-11} M [53] und im Falle von C3a zwischen 10^{-8} M und 10^{-10} M, abhängig von den jeweils untersuchten Zellen und der jeweils untersuchten Funktion. Bereits eine Aktivierung von 0,1-1% des im Plasma vorhandenen C3 oder C5 ist für eine zelluläre Anaphylatoxin-Aktivität ausreichend. Bei maximaler Aktivierung liegen die theoretisch erreichbaren Plasmakonzentrationen bzw. die maximal erreichbaren lokalen Konzentrationen der Anaphylatoxine im Bereich von $7,7 \times 10^{-6}$ M bei C3a und $4,4 \times 10^{-7}$ M bei C5a [41].

Die Funktion der Anaphylatoxine im Entzündungsgeschehen besteht in der physiologischen Antwort auf die Invasion von Fremdkörpern und Mikroorganismen, wobei sie in erster Linie für die Initiierung und die Aufrechterhaltung von Entzündungsprozessen und die Abwehr bakterieller Infektionen von Bedeutung sind. Die Anaphylatoxine C3a und C5a bewirken einen Anstieg des Blutflusses im infizierten Gebiet, eine Steigerung der Gefäßpermeabilität und die Kontraktion der glatten Muskulatur [21][56][57][58]. C5a führt zur Freisetzung von präfor-mierten Mediatoren wie Histamin aus Ratten-Mastzellen [59], Serotonin und ATP aus Meerschwein-Thrombozyten [60] und hydrolytischen Enzymen aus humanen Granulozyten [61]. Bei C3a kommt es neben der Freisetzung von β -Glucosaminidase aus Bt₂cAMP-differenzierten U937-Zellen [62] ebenfalls zur Freisetzung von Serotonin [60] und ATP [63] aus Meerschwein-Thrombozyten. Durch die chemotaktische Aktivität der Anaphylatoxine C5a und C5adesArg werden Granulozyten [64][65], Monozyten [66][67] und Mastzellen [68] an den Ort des Entzündungsgeschehens gelockt. Beim C3a, einem potenten Chemotaxin für

Mastzellen [68], beschränkt sich die weitere chemotaktische Aktivität auf Eosinophilen [69], während Neutrophile nicht angelockt werden [70][71]. Im Zuge der Stimulation von Granulozyten kommt es sowohl bei C5a als auch bei C3a zur Produktion und Freisetzung toxischer Sauerstoffmetabolite, dem sog. oxidative Burst, wobei jedoch zum Teil andere Zytokine beteiligt sind [62][72][73][74][75]. Weiterhin führen C5a, und schwächer auch C5adesArg, zur dosisabhängigen Produktion von entzündungsfördernden Zytokinen (z. B. IL-1 u. IL-6) und dem Tumornekrosefaktor TNF- α in humanen und murinen Monozyten [76][77][78]. Hinzu kommt bei C5a eine positive immunmodulatorische Wirksamkeit, da es die antigenspezifische und polyklonale Antikörperantwort, sowie die alloantigeninduzierte T-Zell-Proliferation verstärkt [79]. Im Gegensatz dazu besitzt C3a, das an der Regulation der Synthese von Zytokinen, wie TNF- α , IL-6 und IL-1 [27][80][81] beteiligt ist, eine immun-suppressive Aktivität. Daneben übt C3a eine modulierende Rolle im Fettsäurestoffwechsel aus [82]. Infolge eines C5a-Stimulus kommt es bei Neutrophilen, Eosinophilen [69][83] und Monozyten [84] zu morphologischen Zellreaktionen wie Aktinpolymerisation oder Zellpolarisierung. Diese Phänomene lassen sich im Falle des C3a auch an Eosinophilen beobachten [69]. Für C5a ist die Hochregulation von Adhärenzfaktoren (Integrine, z. B. Mac-1) bzw. eine Beeinflussung des Adhärenzverhaltens von Neutrophilen und Monozyten beobachtet worden. Ein weiterer Unterschied besteht bei der Ca²⁺-Freisetzung, die beim C3a aus dem die Zelle umgebenden Medium erfolgt, wohingegen durch C5a eine Ca²⁺-Mobilisierung aus intrazellulären Speichern ausgelöst wird [85].

Charakteristisch für die physiologisch ablaufenden Entzündungsreaktionen der Anaphylatoxine ist eine zeitliche Begrenzung der Wirkdauer und eine räumliche Begrenzung auf den Ort der Entzündung [86]. In *vivo* ist deshalb mit relativ hohen lokalen Konzentrationen dieser Entzündungsmediatoren zu rechnen. Das Komplementsystem unterliegt zwar strengen Kontrollmechanismen, diese können jedoch durch Fehlregulation oder überschießende Reaktionen überfordert werden. Dadurch kann es zu einem unkontrollierten Entzündungsverlauf mit schwerwiegenden, im Extremfall sogar letalen Schäden für den Organismus kommen. Man vermutet bei einer Reihe von Krankheitsbildern einen Zusammenhang zwischen der Ausprägung des Krankheitsbildes und der systemischen bzw. lokalen Überschwemmung des Körpers mit Anaphylatoxinen [41]. Beispiele in diesem Zusammenhang sind das "adult respiratory distress syndrom (ARDS)", bei dem es zu einem progressiven Lungenversagen durch massive Invasion von anaphylatoxisch aktivierten Neutrophilen kommt [87] und das "multiple system organ failure"-Syndrom (MOF) [88]. Daneben scheinen die Anaphylatoxine auch bei einigen Autoimmunerkrankungen, wie der rheumatoiden Arthritis [89][90], dem systemischen Lupus Erythematoses (SLE) oder der Psoriasis [91][92] eine Rolle zu spielen. Bei Erkrankungen des Nervensystems wie der multiplen Sklerose (MS) und dem Morbus Alzheimer wird ebenfalls eine Komplementsystemaktivierung beobachtet [93]. Deutlich erhöhte C3adesArg-Spiegel sind bei Sepsis und dem "severe immune response syndrom" (SIRS) nachweisbar [94]. Es gibt auch Evidenzen, dass Anaphylatoxine zur Entstehung von Perfusionschäden bei Organischämie beitragen [95][96]. Daneben kann es zu unerwünschten systemischen Entzündungsreaktionen, wie sie bei der Hämodialyse und Operationen mit extrakorporaler Zirkulation beobachtet wurden, infolge einer Aktivierung der Anaphylatoxine durch die Membranoberflächen der Dialyseschläuche oder der Oxygeneratoren kommen [97]. Erst kürzlich wurde im

murinen Modell für Allergen-induzierte Atemwegs-Hyperreaktivität (allergen-induced airway hyperresponsiveness = AHR) gezeigt, dass eine Deletion des C3aR zu einer Verminderung der Erkrankung, die auch beim Menschen vorkommt, führt [98]. Daneben konnten erhöhte C3a-Konzentrationen in der Bronchial-Lavage von akut allergischen Asthma-Patienten nachgewiesen werden. Anhand dieser Hinweise wird für C3a eine Beteiligung an der Pathogenese des Asthma postuliert. C5a und C5adesArg wurden bereits in der Bronchial-Lavage von allergischen Asthmatikern nachgewiesen [99]. Eine Studie mit C5-defizienten Tieren im murinen Modell für AHR gibt Hinweise auf eine Beteiligung von C5a bei der Regulation des Asthma, deutet allerdings auf einen gegenteiligen Effekt im Vergleich zu C3a hin [100]. In einer C5aR-knock-out-Maus konnte kürzlich die entscheidende Bedeutung des C5a bei der Abwehr von durch *Pseudomonas aeruginosa* hervorgerufenen Lungeninfektionen gezeigt werden [101]. Auf die hohe immunologische Bedeutung der Anaphylatoxine weist zudem hin, dass sie Angriffspunkte von Pathogenitätsfaktoren sind. So produzieren z.B. Streptokokken der Gruppe A und B C5a-abbauende Enzyme [102][103] und die Amöbe *Entamoeba histolytica* Anaphylatoxin-spezifische Proteasen [104]. Aufgrund der pathophysiologischen Bedeutung sind weitere Untersuchungen der Anaphylatoxine und ihrer Rezeptoren von großer Wichtigkeit.

1.3 Die Anaphylatoxinrezeptoren

Die beiden Rezeptoren für die Anaphylatoxine C3a und C5a sind Mitglieder der Rhodopsin-Superfamilie der G-Protein gekoppelten Rezeptoren (GPCR) [105][106], zu der beispielsweise auch der Formylmethionin-Leuclin-Phenylalanin (FMLP)-Rezeptor [107], der β -adrenerge Rezeptor und der IL-8-Rezeptor zählen. Sequenzanalysen zeigen eine hohe Homologie zwischen dem humanen C3a-Rezeptor (C3aR), dem humanen C5a-Rezeptor (C5aR) und dem FMLP-Rezeptor [107][108]. Gemeinsame Kennzeichen dieser Rezeptorfamilie sind der strukturelle Aufbau aus sieben hydrophoben transmembranösen Helices, die durch hydrophile extra- und intrazelluläre Loops miteinander verbunden sind und die Realisierung der Signaltransduktion über eine G-Protein-Kopplung. Der C-Terminus liegt intrazellulär, während sich der glykosylierte N-Terminus [109] extrazellulär befindet und einen sauren Bereich mit sieben negativen Ladungen darstellt [110].

1.3.1 Der C5a-Rezeptor (CD88)

1978 gelang der Nachweis des ca. 43 kDa großen humanen C5a-Rezeptors auf polymorphkernigen Leukozyten (PMNL's) über Bindungsstudien mit 125 I-markiertem C5a [111]. Kloniert wurde er aber erst 1991 parallel aus mit Bt_2cAMP differenzierten U937-Zellen über Hybridisierung mit degenerierten Oligonukleotiden [112] und über Expressionsklonierung aus HL-60-Zellen [108][110].

Der C5a-Rezeptor wird typischerweise auf Blutzellen der myeloischen Reihe exprimiert, also auf neutrophilen, eosinophilen, basophilen Granulozyten, Mastzellen und Monozyten [111]

[113][114][115][116][117][118], während er auf Lymphozyten und Erythrozyten fehlt. Auf PMNL's hat man dabei 70-210.000 Bindungsstellen pro Zelle mit einer Dissoziationskonstanten von 0,48 nM [115] bestimmen können. Daneben wird er auch auf Meerschwein-Thrombozyten [119] und den differenzierten myeloischen Zelllinien U937, HL-60 [3][120] und THP-1-Zellen exprimiert. Erst kürzlich wurde die Expression dieses Rezeptors auch auf nicht myeloischen Gewebszellen, wie auf Leberparenchym, auf vaskulärem Lungenendothel und vaskulärer glatter Muskulatur in der Lunge, auf Lungenepithelzellen, sowie auf Astrozyten und Mikroglia [121][122][123][124][125][126] gezeigt. Allerdings stellen neuere immunhistochemische Befunde die Expression des C5aR auf bronchialen und alveolaren Epithelzellen der Lunge, auf vaskulärer glatter Muskulatur und Endothelzellen der Lunge und auf Hepatozyten in der Leber in Frage, wobei sie die Expression des C5aR auf proximal tubulären Zellen der Niere zeigen [127]. Neuere Untersuchungen weisen seine Expression auf humanen Neuroblastomazellen nach und diskutieren seine Rolle als Apoptosevermittler [128]. Kürzlich wurden Evidenzen für die Expression des C5aR auf humanen T- und B-Lymphozyten beschrieben [129][130], die bisher als C5aR-negativ angesehen wurden [113]. Befunde, nach denen der C5aR besonders stark auf synovialen Mastzellen von Patienten mit rheumatoider Arthritis exprimiert wird, weisen auf seine pathologische Bedeutung hin [131]. Auf mRNA-Level wurde die Expression auch für andere Gewebe wie Milz, Herz, Niere und Intestinum [122] gezeigt. Daneben gelang der Nachweis auf der humanen Leberkarzinom-Zelllinie HepG2 [121][122] und auf der humanen leukämischen Mastzelllinie HMC-1 [132]. In *vivo* beobachtet man eine Hochregulierung des C5aR im entzündlich veränderten Hirn [123]. In *vitro* kann man ihn durch Bt_2cAMP , Dimethylsulfoxid (DMSO), Phorbol ester (PMA), Interferon γ und 1,25-dihydroxy-Vitamin D in Kombination mit Prostaglandin E2 hochregulieren. Die Entwicklung einer C5aR-knock-out-Maus sollte die Bedeutung des Rezeptors in einem Gesamtorganismus erhellen. Die phänotypisch unauffälligen Mäuse waren nach gezielter Infektion der Lunge mit *Pseudomonas aeruginosa* trotz erheblichen Neutrophileninflux nicht in der Lage, den Keim abzutöten [101]. In einem weiteren Experiment mit diesen C5aR-defizienten Tieren konnte die Bedeutung des C5aR während der reversen Arthus-Reaktion gezeigt werden [134]. Mit Hilfe eines spezifischen C5aR Antagonisten konnte für C5a eine bedeutende Rolle als Mediator in Immunkomplexerkrankungen und bei Ischämie/Reperfusionsschädigungen nachgewiesen werden [133].

Die Bindung zwischen C5a und seinem Rezeptor ist weitaus komplexer als bei anderen Mitgliedern der Rhodopsin-Superfamilie, die ihren Liganden an einer einzigen Domäne im hydrophoben Core-Bereich des Rezeptors binden. Für des Anaphylatoxin C5a werden mindestens zwei verschiedene Domänen als Bindungsstellen postuliert [111], die in einer sequentiellen Abfolge an der Bindung und Aktivierung des Rezeptors beteiligt sind. Zum einen scheinen Aminosäuren des C-Terminus mit dem Rezeptor zu interagieren und die Effektorfunktion des C5a auszulösen, zum anderen scheint es durch die Bindung von Aminosäuren des Kernbereiches zu einer Affinitätssteigerung zu kommen [43][44][135][136][137][138][139]. Aufgrund dieser Ergebnisse wurden auch beim C5aR zwei Bindungsstellen erwartet. Möglich sind eine Beteiligung von mehreren Aspartat-Resten am N-Terminus des Rezeptors, wo der Kernbereich des C5a gebunden wird [140][141], und eventuell des externen Loops zwischen der zweiten und dritten Helix, während die intrazellulären Domänen in Wechselwirkungen mit

den G-Proteinen einbezogen sind. Dort interagieren möglicherweise das Glu¹⁹⁹ und Arg²⁰⁶ [142] mit den C-terminalen Resten Lys⁶⁸, Leu⁷² und Arg⁷⁴ des C5a [143][144]. Durch die freie Carboxylgruppe des Arginins angezogen und gleichzeitig durch die positive Ladung der Guanidino-Gruppe abgestoßen, ändert sich möglicherweise die Lage der Seitenkette des Arg²⁰⁶ und induziert so wahrscheinlich eine leichte Änderung in den Orientierungen der transmembranösen Helices des Rezeptors. Diese Ligand-Seitenketten-Interaktion benötigt nur sehr wenig Energie, wird aber erst möglich durch eine hydrophobe Wechselwirkung einer Aspartat-reichen Region am N-Terminus des Rezeptors und den Aminosäuren Lys¹⁹ und Lys²⁰.

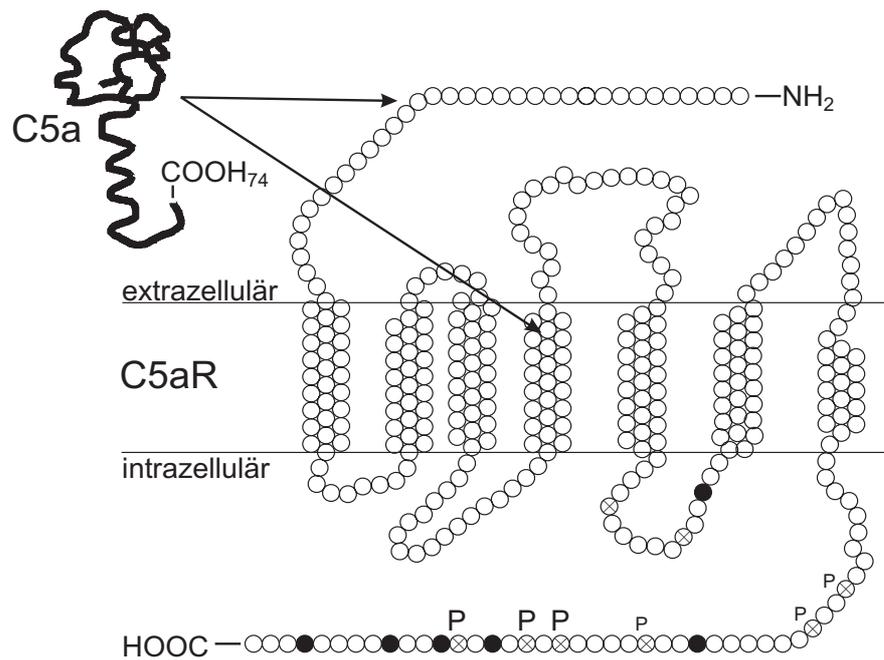


Abb. 1.2: Der heptahelikale humane C5a-Rezeptor mit der Darstellung der putativen Phosphorylierungsstellen. Die Hauptphosphorylierungsmotive (major sites) sind mit einem großen P, die Nebenphosphorylierungsstellen (minor sites) mit einem kleinen p gekennzeichnet. Der Pfeil zeigt auf Bereiche, die möglicherweise für die C5a-Bindung in Frage kommen.

Die Signalweiterleitung nach C5a-Bindung wird in Neutrophilen und in C5aR-transfizierten rattenbasophilen Leukämiezellen (RBL-2H3) über die pertussistoxin-sensitiven heterotrimeren G_i-Proteine (G α_{i2} , G α_{i3}) vermittelt [145][146][147][148]. In der humanen Nierenzelllinie HEK-293 kommt es erst nach Kotransfektion des C5aR mit dem pertussistoxin-insensitiven G α_{16} zu einer Signaltransduktion [149]. Interaktionsstellen werden in der ca. 16 Aminosäuren langen dritten zytosolischen Schleife gesehen [150]. Anhand der beim β -adrenergen Rezeptor entwickelten Modellvorstellung nimmt man an, dass der C5a-Rezeptor bzw. seine Signalweiterleitung direkt einer negativen Regulation der Anaphylatoxin-vermittelten Entzündungsreaktionen unterliegt. Durch eine rezeptorvermittelte Desensibilisierung wird bei hohem AT-Spiegel im Serum eine Daueraktivierung der Effektorzellen verhindert. Dabei wird der Rezeptor nach Phosphorylierung durch Rezeptorkinasen in einen als homologe Desensibilisierung bezeichneten Refraktärzustand versetzt, vom assoziierten G-Protein abgekoppelt und internalisiert. Nach Internalisierung wird der Rezeptor nach einer lag-Phase wieder auf der

Oberfläche reexprimiert und ist resensibilisierbar [151]. Vermutlich wird der Rezeptor in einem bestimmten intrazellulären Internalisierungskompartiment durch eine Phosphatase dephosphoryliert, um den ursprünglichen agonistischen Zustand wiederherzustellen [152]. Die genauen Mechanismen dieses "Rezeptor-Recyclings" sind jedoch noch unklar. Der ca. 50 Aminosäuren lange C-Terminus des C5a-Rezeptors enthält zwei Phosphorylungsmotive, deren sechs Serine agonistenabhängig und -unabhängig (PMA) phosphoryliert werden [153]. Daneben konnte kürzlich auch ein Zusammenhang der Phosphorylierung mit der Internalisierung des C5aR gezeigt werden [154].

1.3.2 Der C3a-Rezeptor

Wie im Falle des C5a-Rezeptors gelang 1989 auch beim C3a-Rezeptor der Nachweis und die genauere Charakterisierung auf polymorphkernigen Leukozyten durch Bindungsstudien mit Hilfe von ^{125}I -markierten Liganden [155]. Die Ergebnisse dieser Bindungsstudien an C3a-sensitiven Meerschwein-Thrombozyten wiesen auf die Existenz zweier C3a-Rezeptorpopulationen hin. Zum einen zeigten sie einen hochaffinen Rezeptortyp mit einer K_D von $1,7 \times 10^{-9}$ M und 200 Rezeptoren pro Zelle, und zum anderen einen niedrigaffinen Typ mit einer K_D von 10^{-8} M und 500 Rezeptoren pro Zelle. Auf humanen PMNL's konnte nur die Existenz einer hochaffinen Rezeptorklasse mit etwa 40.000 Bindungsstellen pro Zelle und einer K_D von etwa 3×10^{-8} M nachgewiesen werden. Weitere Untersuchungen bestätigen die Expression eines humanen C3a-Rezeptors auf PMNL's, weisen allerdings auf Rezeptorzahlen von 26.500 pro Zelle und eine K_D von 2×10^{-9} M hin [62]. Daneben konnte 1992 nachgewiesen werden, dass neben humanen Neutrophilen auch mit Bt_2cAMP differenzierte U937-Zellen auf einen C3a-Stimulus mit einem Anstieg des zytosolischen Ca^{2+} -Spiegels und der Freisetzung von N-Acetyl-Glucosaminidase reagieren [62]. Allerdings scheint im Falle des C3a-Rezeptors der durch die Bindung des Agonisten induzierte Ca^{2+} -Einstrom nicht aus intrazellulären Speichern zu stammen, wie beim C5a, sondern aus dem die Zelle umgebenden Medium [85]. Vergleichende Bindungsstudien mit ^{125}I -C3a ergaben für die differenzierten U937-Zellen eine K_D von $4,5 \times 10^{-9}$ M mit 67.000 Rezeptoren pro Zelle. Daneben konnte die Bildung von 1,4,5-Inositol-Triphosphat (IP_3) bei U937-Zellen nachgewiesen werden [62]. Eine 1995 veröffentlichte Arbeit stellte die Expression des C3aR auf Neutrophilen, die den größten Anteil der PMNL's ausmachen, in Frage. Sie führten die beobachteten Effekte auf die Aktivierung des nachweislich [75] auf den (zu 3-5% in der Granulozyten-Präparation enthaltenen) Eosinophilen exprimierten C3aR zurück [69]. Dies konnte jedoch 1997 durch den Nachweis der C3aR-Expression auf hochaufgereinigten Neutrophilen (Anteil der Eosinophilen $<0,2\%$) mittels kompetitiver Bindungsstudien, einem Funktionstest und auf Einzelzellebene mittels durchflusszytometrisch-antigenetischer Untersuchungen widerlegt werden [156]. Gleichzeitig wurde auch ein Nachweis erbracht, dass der C3aR wohl auf Monozyten, nicht aber auf B- und T-Zellen exprimiert ist [156]. Neuere Untersuchungen deuten jedoch auf eine Hochregulation des C3aR auf Lymphozyten im Entzündungsprozess. Es konnte eine lymphozytäre C3aR-Expression nach Vorstimulation gezeigt werden. Nach IL-2-Stimulation konnte C3aR-mRNA in humanen T-Lymphozyten nachgewiesen werden [157] und nach *Staphylococcus aureus* Cowan strain/IL-2-Stimulation antworteten humane B-Lymphozyten auf C3a-Gabe mit einer Unterdrückung der polyklonalen Immunantwort und einer Reduktion der Freisetzung von

TNF- α und IL-6 [158]. Allerdings sind auch diese Daten umstritten [159]. Außerdem konnte der C3aR auf CD4⁺ oder CD8⁺ T-Zellklonen aus Patienten mit atopischer Dermatitis und allergischer Kontaktdermatitis auf mRNA- und Proteinebene detektiert werden [157]. Frühere schwache Hinweise auf die Existenz eines C3a-Rezeptors auf humanen basophilen Leukozyten [160][161] wurden unterstützt durch die Beobachtung, dass nach Stimulation mit IL-3 und GM-CSF (Granulozyten/Makrophagen-stimulierender Faktor) eine schnelle Degranulation der Basophilen schon bei sehr niedrigen C3a-Konzentrationen erfolgt [72]. Des Weiteren wurden auf basophilen Zellen von Patienten mit chronisch myelogener Leukämie über Bindungsstudien Rezeptordichten von 240.000 +/- 100.000 Rezeptoren pro Zelle mit einer K_D von 5,6 nM +/- 0,9 nM festgestellt. Diese Zellen zeigen auch eine funktionelle Calciumantwort, die durch Pertussis-Toxin partiell gehemmt werden kann [73]. Erste Untersuchungen zur Expression des humanen C3a-Rezeptors auf Mastzellen wurden von Mousli [28] publiziert. Nach mehreren aktuellen Veröffentlichungen [68][162][163] kann die Expression des C3a-Rezeptors auf diesen Zellen als gesichert betrachtet werden.

1996 konnte der humane C3a-Rezeptor parallel in zwei Arbeitsgruppen [164][165] kloniert werden. Er war bereits kurz zuvor als Rezeptor mit unbekanntem Liganden (Orphanrezeptor) beschrieben worden [148]. Er besteht aus 482 Aminosäuren und zeichnet sich im Vergleich zu allen anderen bisher bekannte G-Protein gekoppelten Rezeptoren durch einen außergewöhnlich großen zweiten, extrazellulären Loop aus, der mit ca. 172 Aminosäuren gut ein Drittel des gesamten Rezeptormoleküls ausmacht. Bei Sequenzanalysen konnte unter Vernachlässigung des zweiten extrazellulären Loops von Aminosäureposition 162 bis 344 bei 309 verglichenen Aminosäuren eine Identität von 37,5% zwischen dem humanen C3aR und dem humanen C5aR und eine Identität von 34,3% zwischen dem humanen C3aR und dem FMLPR ermittelt werden [165]. Mittlerweile hat man für den C3aR ein immer breiter werdendes Expressionsspektrum ermittelt. So konnte er unter anderem in verschiedenen Hirnregionen, Herz, Lunge, Lymphknoten, Knochenmark, Milz und Plazenta nachgewiesen werden, wobei die C3aR-tragenden Zelltypen in den jeweiligen Geweben kaum identifiziert sind [164][165][166]. Bei Untersuchungen am gesunden Gehirn und an entzündeten Bereichen des Gehirns bei Multipler Sklerose und bakterieller Meningitis erwiesen sich fetale und adulte Astrocyten, Gliazellen und auch Neuronen als C3aR-positiv [167][168][169]. Auch auf einer Reihe von neuronalen Zelllinien, insbesondere Astrocytoma-Zelllinien, konnte eine C3aR-Expression durch FACS-Analysen und Analysen auf mRNA-Ebene durch RT-PCR nachgewiesen werden [167][170][171]. Neben der Sequenz des humanen C3aR wurden vor kurzem auch die Sequenzen des murinen C3aR [172][173][174], des Ratten-C3aR [175] und des Meerschweinchen-C3aR [37][176] publiziert. Nimmt man den zweiten extrazellulären Loop aus dem Vergleich heraus, so liegen hohe Homologien zwischen den Rezeptoren der verschiedenen Spezies vor (65% zw. m- u. hC3aR, 58,5% zw. Ratten- u. hC3aR, 90,7% zw. Ratten- u. mC3aR, 59,5% zw. gp- u. hC3aR und 57% zw. gp- u. mC3aR).

In *vivo* findet man den C3aR in entzündlichem Hirngewebe hochreguliert [168]. In *vitro* sind neben IL-2 bislang nur wenige Regulatoren der C3aR-Expression bekannt. In myelomonoblastischen Zelllinien wie HL-60, THP-1 und U937 wurden PMA und Bt₂cAMP als nicht-physiologische Regulatoren und IFN- γ als erster physiologischer Regulator beschrieben [177].

Einige Daten sprechen auch für die Hochregulation der C3aR-Expression nach Oncostatin M (OSM)-Stimulation: In den Zellkulturüberstand sezerniertes OSM bewirkt eine schwache autologe Hochregulation der hC3aR-Expression in mit einer OSM-cDNA transient transfizierten HEK-293-Zellen [bisher unveröffentlicht; Dissertation: [178].

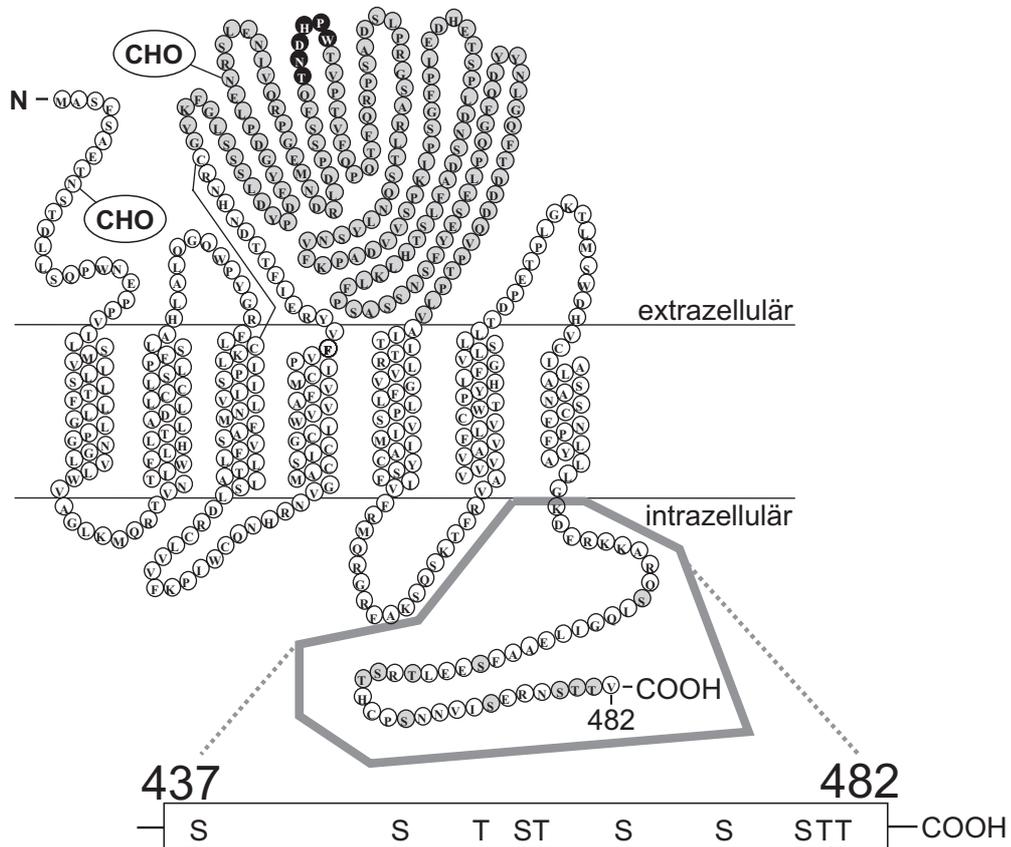


Abb. 1.3: Der humane C3a-Rezeptor. Die heptahelikale Struktur ist schematisch unter Verwendung des Einbuchstaben-codes für die Aminosäuren (siehe Anhang) dargestellt. Im cytosolischen C-Terminus sind die hervorgehobenen putativen Phosphorylierungsstellen grau unterlegt. Die mit CHO-bezeichneten Stellen markieren mögliche Glykosylierungsstellen.

Aufgrund der Identifizierung von Bindungsstellen im zweiten extrazellulären Loop beim C5aR, dem nächsten Verwandten des C3aR, wurden Untersuchungen durchgeführt, die klären sollten, ob auch beim C3aR Bindungsstellen im zweiten extrazellulären Loop vorhanden sind. Für den C3aR wird aufgrund von Mutageneseexperimenten eine Beteiligung von Aminosäureresten am Anfang des zweiten extrazellulären Loops (Aminosäure 174-197) postuliert [179]. Diese Daten stehen im Widerspruch dazu, dass ein die Aminosäuren 185-193 erkennder scFv die Bindung des Liganden und eine funktionelle Calciumantwort nicht inhibieren kann [180]. Dagegen konnte in Untersuchungen mit C3aR/C5aR-Chimären gezeigt werden, dass durch Austausch des zweiten extrazellulären Loops des C3aR gegen den zweiten extrazellulären Loop des C5aR ein Verlust der C3a-Bindung und der funktionellen Calciumantwort erfolgt [179][181]. Bei einem um etwa ein Drittel verkürzten zweiten extrazellulären Loop wurde jedoch noch eine C3a-Bindung und Calciumantwort beschrieben [179], was wiederum eher gegen eine Funktion in der Ligandenbindung spricht. Durch Untersuchungen mit

N-terminalen Deletionsmutanten konnte gezeigt werden, dass der hC3aR den originalen N-Terminus nicht für eine hochaffine Bindung von C3a und anschließender Aktivierung durch C3a benötigt [181]. Durch Austausch des C3aR-N-Terminus gegen den C5aR-N-Terminus wurde ein C3a/C5a-Rezeptor-Hybrid generiert, das C3a und C5a binden kann, und bei dem es nach Bindung beider Liganden zur Auslösung einer funktionellen Calciumantwort kommt [179][181]. Weiterhin wird nach Durchführung von Mutageneseexperimenten, bei denen einzelne Aminosäuren in den transmembranen Helices ausgetauscht wurden, eine Beteiligung der geladenen Argininreste an den Positionen 161, 340 und 417 postuliert [182].

Beim C3a-Rezeptor deuten Untersuchungen an PMNL's, der humanen Mastzelllinie HMC-1 und humanen Basophilen ebenfalls wie beim C5aR auf eine über pertussistoxin-sensitive heterotrimere G_i -Proteine vermittelte Signaltransduktion hin [62][73][75][162]. In C3aR-transfizierten "Chinese Hamster Ovary"-Zellen (CHO) konnte nur nach einer Kotransfektion mit $G\alpha_{16}$ eine Signaltransduktion beobachtet werden [165]. Auch beim C3aR konnte wie schon beim C5aR nach Gabe einer substimulierenden Dosis des Liganden eine Rezeptordeaktivierung (Tachyphylaxie) beobachtet werden [183].

1.4 Signaltransduktion und negative Rückkopplungsmechanismen G-Protein gekoppelter Rezeptoren

Mit der Entstehung vielzelliger Organismen und der fortschreitenden Spezialisierung von Zellgruppen zu Organen und Geweben mit spezifischen Funktionen ging die Notwendigkeit der Signalübertragung einher. Das Hauptproblem stellt sich dabei in der Überwindung der Zellmembranbarriere, was umso schwieriger wird, je größer, je polarer und je hydrophiler die Signalvermittler sind. Ungebundene lipophile Hormone sind in der Lage, die Zellmembran zu durchdringen und ins Zytosol zu gelangen, wo sie an ihren jeweiligen Rezeptor binden können. Hydrophile Signalstoffe können die lipophile Zellmembran dagegen nicht durchdringen. Ihr Signal wird deshalb von membranständigen Rezeptoren ins Zellinnere weitergeleitet. Es handelt sich hierbei um integrale Membranproteine, die den Signalstoff außen binden und durch Änderung ihrer Raumstruktur auf der Innenseite der Membran ein neues, zweites Signal auslösen. Diese Rezeptoren werden in drei Kategorien eingeteilt, die katalytisch wirkenden 1-Helix-Rezeptoren, die Ionenkanäle und die relativ große Gruppe der heptahelikalen Rezeptoren, zu denen auch die Anaphylatoxine zählen. Zu den Strukturmerkmalen dieser zuletzt genannten Rezeptorgruppe gehören neben dem Aufbau aus sieben transmembranösen Domänen auch die G-Protein vermittelte Signalübertragung auf Effektorproteine, die ihrerseits die Konzentration von Ionen oder Sekundärbotenstoffen, sog. Second messenger, verändern [184]. Für die 1987 erfolgte Entdeckung von G-Proteinen und die Aufklärung ihrer Bedeutung bei der zellulären Signalübertragung [185] erhielten Rodbell und Gilman 1994 den Nobelpreis für Medizin. Zu den heute am besten charakterisierten G-Protein gekoppelten Rezeptoren gehören das Photorezeptorpigment Rhodopsin und der β_2 -adrenerge Rezeptor [186][187][188].

Heterotrimere G-Proteine bestehen aus den drei Komponenten α , β und γ . Diese unterscheiden sich in Aufbau, Funktion und Molmasse (kDa: $\alpha=39-46$, $\beta=37$, $\gamma=8$). Die Unterteilung der G-Proteine in verschiedene Subfamilien erfolgte historisch bedingt anhand der Wirkung der α -Untereinheit auf einen Effektor. Diese willkürliche oder entdeckerspezifische Einteilung wurde durch die moderne Nomenklatur der $G\alpha$ -Proteine auf der DNA-Sequenzhomologie bzw. einer Nummerierung analog zur zeitlichen Abfolge ihrer Klonierung, abgelöst [189]. Es werden vier Subfamilien unterschieden, die mit G_s , G_i , G_q und G_{12} bezeichnet werden. Beispielsweise zählen zu der G_s -Gruppe die stimulierenden G-Proteine, die gruppenspezifisch die Aktivität der Adenylatcyclase erhöhen und Calciumkanäle regulieren. Die inhibitorischen G_i -Proteine enthalten neben den α_i -Untereinheiten die α_o -, α_t -, α_g - und α_z -Untereinheiten mit ebenfalls inhibitorischer, aber über andere Mechanismen ausgelöster Funktion [190]. Spezifisch für die α_i -Untereinheit ist eine Hemmung der Adenylatcyclase [185][191], eine Senkung der cAMP-Konzentration, und eine Erhöhung der Konzentrationen der Sekundärbotenstoffe IP_3 , Diacylglycerol (DAG) [192], Ca^{2+} und der Proteinkinase C (PKC). Die meisten bekannten G-Proteine werden von Cholera- oder Pertussis-Toxin ADP-ribosyliert. Neben den heute bekannten, derzeit etwa 22 verschiedenen α -Untereinheiten (einschließlich der Splicingvarianten) existieren fünf β - und mindestens sieben unterschiedliche γ -Untereinheiten [193].

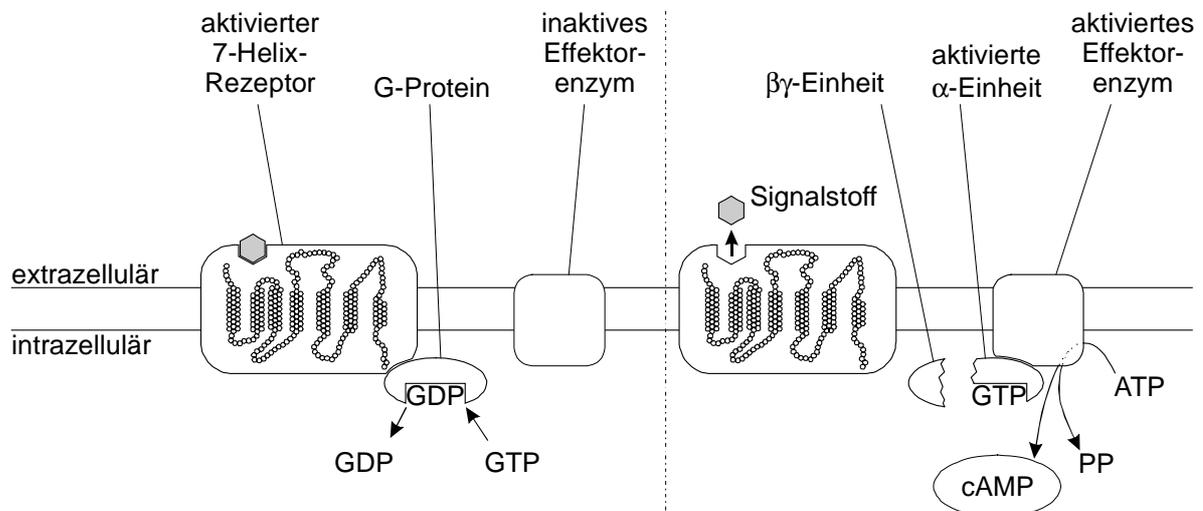


Abb. 1.4: Signaltransduktion durch G-Proteine. Entnommen aus [194].

Das Reaktionsprinzip ist bei allen G-Protein-Subfamilien gleich. Die α -Untereinheit mit dem im Ruhezustand gebundenen GDP bildet zusammen mit der $\beta\gamma$ -Untereinheit das inaktive membran-assoziierte G-Protein. Nach Ligandenbindung ändert sich die Rezeptorkonformation so, dass sich ein G-Protein anlagern kann. Durch die Wechselwirkung mit dem Rezeptor wird das G-Protein veranlasst, GDP gegen GTP auszutauschen, wodurch es aktiviert wird (Abb. 1.4, li). Es dissoziiert vom Rezeptor ab und zerfällt in eine α - und eine $\beta\gamma$ -Einheit. Beide Einheiten reagieren getrennt oder gemeinsam mit einem primären Effektor (Abb. 1.4, re) [185]. Bei den hauptsächlich durch die α -Einheit vermittelten Reaktionen handelt es sich je nach G-Protein-Typ entweder um die Öffnung oder Schließung von Ionenkanälen, die Akti-

vierung oder Inaktivierung von Enzymen wie der Adenylatcyclase, der Phospholipasen A und C oder Phosphodiesterasen, oder die Synthese von Sekundärbotenstoffen. Die Botenstoffe cAMP, cGMP, Diacylglycerol (DAG), Inositoltriphosphat (IP₃) oder auch Ca²⁺ beeinflussen sekundäre Effektorenzyme, z. B. verschiedene Proteinkinasen. Dadurch werden zusätzliche Aktivierungs- und Inaktivierungsvorgänge in der Zelle, vermittelt über den leistungsfähigen Regulationsmechanismus der Phosphorylierung, angestoßen [191][195][196][197]. Beispiele für eine Funktion der $\beta\gamma$ -Untereinheit sind durch einen direkten Effekt auf eine Adenylatcyclase-Subklasse, Phospholipase C- β , Calmodulin und Phosphoducin [198] gegeben.

Verfolgt man die gesamte Reaktion, angefangen bei dem Liganden-induzierten Reiz bis hin zum biologischen Effekt, so offenbart sich ein komplexes, partiell ineinandergreifendes Netzwerk aus Aktivierungs- und Inaktivierungswegen, das für die Feinsteuerung der Signalübertragung verantwortlich ist. Auf dieses Netzwerk üben die Zellen über positive und negative Rückkopplungsmechanismen regulatorische und kontrollierende Wirkung aus. Sie verfügen neben Methoden, die den Liganden desarginieren oder am Rezeptor abfangen ("Scarven-ging"), über Rezeptor-Desensitisierungsmechanismen, die eine Signaltransduktion durch den Rezeptor limitieren. Dies ist besonders dann notwendig, wenn bei permanenter oder kurzfristig periodischer Stimulus-Exposition bzw. bei einer geringen Abdissoziation des Liganden vom Rezeptor der extrazelluläre Reiz bestehen bleibt und aufgrund des stark amplifizierenden Systems die Gefahr einer überschüssenden Reaktion gegeben ist. Bei G-Protein gekoppelten Rezeptoren sind verschiedene, sowohl schnell als auch langsam ablaufende Desensitisierungsmechanismen bekannt. Dazu zählen die Rezeptorphosphorylierung, die Rezeptorinternalisierung sowie die längerfristige Minimierung der membranständigen Rezeptorzahl, die zu einer Verschlechterung oder sogar Unterbrechung der Signaltransduktion führen oder ein Verschwinden des Rezeptors von der Oberfläche bewirken. Diese Reaktionen sind für verschiedene G-Protein gekoppelte Rezeptoren beschrieben worden. Bei dem G_s-gekoppelten β_2 -adrenergen Rezeptor wird ein Model diskutiert, das mögliche Vorgänge der Desensitisierung und Resensitisierung skizziert. Ergebnisse von Untersuchungen an G_i-Protein gekoppelten Rezeptoren wie dem α_2 -adrenergen- und m₂-muscarinergen Rezeptor lassen auf eine allgemeinere Gültigkeit des Modells schließen [199][200].

Es existiert eine schnelle Form der Desensitisierung, bei der die dazu beitragenden Reaktionen innerhalb von Sekunden bis Minuten ablaufen. An der schnellen Desensitisierung des G α_s -gekoppelten β_2 -adrenergen Rezeptors sind zwei Domänen mit unterschiedlichen Auswirkungen beteiligt [187]. Bei der einen Domäne in der dritten zytosolischen Schleife, die zusammen mit einer gleichen Sequenz des membranahen C-terminalen Bereiches als Phosphorylierungs-Site für die cAMP-abhängige Proteinkinase A (PKA) fungiert, wird eine Phosphorylierung innerhalb von drei Minuten [201] durch geringe Agonisten-Dosen im nanomolaren Bereich ausgelöst. Da es bei dieser Form zusätzlich zu einer Phosphorylierung und Deaktivierung anderer, an das gleiche Effektor-System gekoppelter Rezeptoren kommt, wird sie als heterologe Desensitisierung bezeichnet. Daneben kann auch eine Affinitätsänderung am Rezeptor zum Liganden auftreten, je nach G-Protein/Rezeptorkopplung. Bei der anderen Domäne handelt es sich um eine Serin- und Threonin-reiche Sequenz am distalen Carboxylterminus. Diese sehr schnelle Phosphorylierung (15 s, [201]) durch die rezeptorspezifische

β -adrenergen Rezeptorkinase (β -ARK bzw. GRK2) an den Threoninen 384, 396 und den Serinen 401 und 407 setzt erst bei höheren Stimuluskonzentrationen ein [187][202][203][204][205]. Die Phosphorylierung des Rezeptors durch die GRK2 unterbindet die Kopplung des G-Proteins an den Rezeptor nur marginal [199], führt aber zu einer deutlichen Affinitäts-erhöhung für die β -Arrestin-Bindung [206], wodurch der Rezeptor vom G-Protein entkoppelt wird [207]. Im Gegensatz zur Phosphorylierung durch die PKA wird diese Form der Desensitisierung als homolog bezeichnet, da nur vom spezifischen Agonisten besetzte Rezeptoren betroffen sind. Beide Enzyme übertragen bei der Phosphorylierung maximal zwei Phosphate pro Rezeptor [188]. Hohe Stimuluskonzentrationen im mikromolaren Bereich induzieren die Aktivität beider Enzyme, wodurch die Aktivität der Adenylatcyclase und auch die maximal erreichbare Antwort reduziert werden [187].

Bei der langsamen Desensitisierung laufen die dazu beitragenden Reaktionen innerhalb von Minuten ab. Eine noch relativ schnelle Form dieses negativen Regulationsmechanismus ist dabei die Internalisierung bzw. Sequestrierung, bei der die Zahl der Rezeptoren an der Zelloberfläche abnimmt. In vielen Fällen, wie auch beim β_2 -adrenergen Rezeptor, kommt es infolge der Bindung von β -Arrestin an Clathrin als Adapter zu den Clathrin-coated pits des Endozytoseapparates zur Rezeptorinternalisierung in frühe Endosomen [208][209]. Dort sind, nach Ergebnissen aus der Immunfluoreszenzmikroskopie und der präparativen subzellulären Dichtegradientenzentrifugation, Rezeptor, GRK2 und β -Arrestin kolokalisiert [208][209][210][211]. Im erniedrigten pH-Wert der Endosomen wird der Rezeptor durch Phosphatasen dephosphoryliert [212] und an der Oberfläche recycled. Hier ist er nach einer lag-Phase von wenigen Minuten wieder zur Signaltransduktion fähig. Auch beim Neuromedin-B-Rezeptor auf Fibroblasten und Ratten-glioblastoma-Zellen kommt es binnen 90 Minuten zu einer Internalisierung mit anschließender Reexpression, die von der Proteinsynthese unabhängig ist [213]. Bei Studien an der Mauslymphom-Zelllinie S49 und der humanen epidermoiden Karzinomzelle A431 wurde beobachtet, dass die Hälfte des internalisierten Rezeptors bereits nach 17 Minuten wieder an der Oberfläche zu finden war [214][215]. Einige der Rezeptoren, die während ihres intrazellulären Transports in Lysosomen gelangen, werden abgebaut [208], wodurch sich die Rezeptorzahl verringert. Andere negative Regulationsmechanismen, die über die Senkung der biologischen Halbwertszeit des Rezeptorproteins ("down regulation"), der Verminderung der Rezeptortranslation durch cAMP- und agonisteninduzierbarer Destabilisierung der Rezeptor-mRNA [216], oder die Senkung der Transkriptionsrate zur Desensitisierung führen, laufen innerhalb von Stunden bis Tagen ab.

Bei dem anhand des G_s -gekoppelten β_2 -adrenergen Rezeptors entwickelten Model sind die Desensitisierung und die Internalisierung unterschiedliche, aber synergistische Abläufe. Die Internalisierung trägt kurzfristig zur Desensitisierung bei, initiiert aber dann das Rezeptor-Recycling. Dies ist jedoch nicht bei allen zu dieser Gruppe gehörenden Rezeptoren der Fall. Beim β_3 -adrenergen Rezeptor tritt keine Internalisierung auf [217], internalisierte hCG/LH-Rezeptoren werden nur zu einem geringen Teil wieder an die Oberfläche befördert [218] und beim aktivierten Thrombinrezeptor erfolgt eine Lyse aller internalisierten Rezeptoren [219][220].

Zur Internalisierung der Anaphylatoxinrezeptoren, insbesondere des C3aR, war zu Beginn dieser Dissertation nur wenig bekannt. Allerdings sind die für die Internalisierung notwendigen molekularen Strukturen bereits für andere G-Protein gekoppelte Rezeptoren untersucht worden sind. Beim FMLP-Rezeptor, dem C5aR und C3aR am nächsten verwandten Rezeptor, fand man eine Beteiligung des C-Terminus an der Signaltransduktion heraus [221][222]. Bei anderen G-Protein gekoppelten Rezeptoren konnte man die Beteiligung des C-Terminus an der Internalisierung nachweisen [223][224][225] [226][227][228][229][230]. Dabei war es lange Zeit ebenfalls unklar, ob ein Zusammenhang zwischen Internalisierung und Phosphorylierung besteht. Bei einigen Rezeptoren ist eine Beteiligung von Phosphorylierungsstellen im zytosolischen C-Terminus an der Internalisierung beschrieben [223]. Auch beim FMLP-Rezeptor sind die identifizierten Phosphorylierungsstellen im C-Terminus *in vivo* essentiell für Phosphorylierung, Desensibilisierung [231] und nach neueren Untersuchungen auch für die Internalisierung [232]. Für den C5a-Rezeptor konnte die Beteiligung von G-Proteinen unter anderem durch die Hemmbarkeit der Signaltransduktion mit Pertussis-Toxin [233], durch den Nachweis von GTPase-Aktivität in neutrophilen Granulozyten [234] und die Aufreinigung eines Rezeptor-G_i-Komplexes [146] gezeigt werden. Durch Experimente mit Fluorescinkmarkiertem C5a konnte auf humanen Neutrophilen und Monozyten eine Internalisierung des Rezeptors, die zwischen 3-10 Minuten ihr Maximum erreicht hat, und die anschließende Reexpression nach ca. 40 Minuten nachgewiesen werden [151][235]. Ein weiterer Hinweis auf die Beteiligung von G-Proteinen an der Signaltransduktion des C5a-Rezeptors lässt sich aus dem Anstieg der Phospholipase-C-Aktivität nach C5a-Stimulus bei G_{α16}-kotransfizierten HEK-293-Zellen ableiten [149]. Neuere Studien haben gezeigt, dass der Phorbol-ester PMA zu einer Phosphorylierung des C5aR in differenzierten HL-60-Zellen und transient transfizierten COS.M7-Zellen führt [153]. Es konnte gezeigt werden, dass der C-Terminus des C5a-Rezeptors wesentlich an der Liganden-induzierten Internalisierung beteiligt ist [236]. Dass dabei die Signaltransduktion keine notwendige Voraussetzung für die Internalisierung ist, konnte auch durch Ergebnisse einer weiteren Arbeit [154] bestätigt werden. Erst kürzlich konnte gezeigt werden, dass die Phosphorylierung und die Internalisierung beim C5aR durch verschiedene Mechanismen unabhängig voneinander ablaufen [237]. Für den C3a-Rezeptor findet man zu diesen Themen bisher nur wenige Veröffentlichungen. Es gibt erste Hinweise darauf, dass die Art der Signaltransduktion derjenigen beim C5a-Rezeptor ähnlich ist. So wurde kürzlich gezeigt, dass die Liganden-induzierte Phosphorylierung der Anaphylatoxinrezeptoren C3aR und C5aR über G-Protein gekoppelte Rezeptorkinasen vermittelt wird [238]. Zusätzlich konnte bereits die agonistenabhängige und -unabhängige Internalisierung des C3a-Rezeptors bei Untersuchungen an humanen Neutrophilen, an der humanen Mastzelllinie HMC-1 und in stabil transfizierten rattenbasophilen Leukämiezellen (RBL-2H3) beschrieben werden [239].

1.5 Einführung in die Methode der Fluoreszenzdurchflusszytometrie

Ein großer Teil der in dieser Dissertation beschriebenen Analysen wurde mit Hilfe des Fluoreszenzdurchflusszytometers durchgeführt. Hierfür hat sich der Name FACS, eigentlich ein

Akronym für den von der Firma Becton-Dickinson vertriebenen "Fluorescence-Activated Cell Sorter", eingebürgert. Aufgrund seiner Bedeutung für diese Arbeit wird im Folgenden eine detaillierte Beschreibung dieses Gerätes und der Methode der Durchflusszytometrie gegeben. Die Fluoreszenzanalyse gliedert sich ganz allgemein in die Schritte Probenvorbereitung, Messung und Datenauswertung. Von diesen Schritten sind die Messung und die Auswertung am wenigsten problematisch. Hierfür ist lediglich die Kenntnis der Messtechnik und der Bedienung des Gerätes bzw. die Erfahrung im Umgang mit der Auswertesoftware notwendig. Die Technik der Probenvorbereitung und die Auswahl und Kombination der Fluorochrome ist jedoch relativ komplex. Auf sie wird, bezogen auf die durchgeführten Analysen, im Methodenteil eingegangen werden. Für weitere Informationen und zur Vertiefung sei auf das Buch "Practical Flow Cytometry" von H. M. Shapiro verwiesen [240].

Bei einem Fluoreszenzdurchflusszytometer handelt es sich um ein optisches Meßsystem, das Streulicht- und Fluoreszenzsignale einzelner lebender oder fixierter Partikel, die in einem Flüssigkeitsstrom fokussiert sind, bis zu einer Größe von 100 µm erfassen kann. In gewisser Weise kann man es als spezialisiertes und automatisiertes Fluoreszenz-Mikroskop betrachten. Klar erkennbare Vorteile liegen in der hohen zeitlichen Auflösung (über tausend Ereignisse pro Sekunde) und in der simultanen Akquisition vieler verschiedener physikalischer und biochemischer Parameter einer Einzelzelle. Durchflusszytometer arbeiten überwiegend mit nur einer Messstelle zur multiparametrischen Analyse.

Zur durchflusszytometrischen Untersuchung sind Zellen verschiedenster Herkunft prinzipiell geeignet. So können fast alle Blutzellen, also Lymphozyten, Monozyten, Neutrophile, Eosinophile, Thrombozyten, Erythrozyten und Retikulozyten gemessen werden. Ebenso Zellen aus Körperflüssigkeiten wie z.B. Knochenmark, Bronchial-Lavage oder Gelenksflüssigkeit. Aber auch viele weitere Zellen wie z.B. Tumorzellen, Kulturzellen, Virus-infizierte Zellen, Bakterien, Hefen und Protoplasten können analysiert werden. Voraussetzung für die Durchflusszytometrie ist dabei das Vorliegen einer monodispersen Einzelzellsuspension. Zellen aus zusammenhängenden Zellverbänden müssen vorher mechanisch oder enzymatisch vereinzelt werden. Oft empfiehlt sich auch eine Anreicherung oder Aufreinigung der Zellen.

Von seinem Aufbau her ist das Durchflusszytometer für eine Vielzahl von Fragestellungen flexibel einsetzbar. So können zum einen physikalisch-morphologische Eigenschaften wie die Zellgröße, die Form, die Membranfaltung und die Granularität ermittelt werden. Zum anderen können aber mit Hilfe von spezifischen Fluoreszenzfarbstoffen indirekt oder direkt markierbare Zellkompartimente, Zelloberflächenantigene, Rezeptoren, intrazelluläre Moleküle wie DNA, RNA, Antigene oder auch der Lipid- und Proteingehalt untersucht werden. Mit dieser Methode können aber auch Membranpotentiale, intrazelluläre Ionenkonzentrationen und Enzymaktivitäten analysiert werden, die Pino- und Phagozytose untersucht werden oder wie im Fall der vorliegenden Dissertation die Internalisierung eines Rezeptors.

Grundvoraussetzung für diese Analysen ist die Anfärbung mit geeigneten Fluorochromen, von denen die drei folgenden Eigenschaften gefordert werden. Sie müssen spezifisch für die jeweiligen Untersuchungen bzw. Zellen sein, sich mit der Lichtquelle des Messgerätes zur Fluoreszenz anregen lassen und ihre Emission muss mit dem Gerät detektierbar sein. Das

Durchflusszytometer misst dabei im Wesentlichen optischen Signale unterschiedlicher Qualität, wie die Fluoreszenz und das Streulicht, die beim Kontakt eines Partikels mit einem Lichtstrahl entstehen. Dazu werden die Zellen mit Hilfe einer isotonischen Trägerflüssigkeit sozusagen im Gänsemarsch zu einem Analysepunkt geleitet, an dem sie von einem fokussierten Lichtstrahl einer Lichtquelle erfasst werden. An die dafür eingesetzte Lichtquelle werden besondere Anforderungen gestellt. So müssen sie ihr Licht mit einer hohen Intensität ausstrahlen, damit ausreichende Fluoreszenz- und Streulichtsignale erzeugt werden können, und sie müssen eine konstante Strahlungsleistung haben. Bei den heute gängigen Durchflusszytometern hat sich der Einsatz eines Lasers (Light Amplification by Stimulated Emission of Radiation) bewährt. Er emittiert gerichtetes, kohärentes monochromatisches Licht von hoher Energiedichte. In Abhängigkeit von der Gasfüllung emittiert der Laser nur einzelne Wellenlängen des Lichtspektrums. Dadurch ergeben sich gleich zwei Vorteile. Zum einen lässt sich der Laser leicht im optischen System justieren, zum anderen kann man geeignete Farbstoffe gezielt zur Fluoreszenz anregen. Üblicherweise wird ein Argon-Laser eingesetzt mit einer Emissionslinie bei 488 nm.

Als Fluorochrome finden für Einfarbmessungen (ein analysierter Parameter) hauptsächlich das Fluoresceinisothiocyanat (FITC) und für Zweifarbmessungen (zwei Parameter) zusätzlich das Phycoerythrin (PE) Verwendung. Bei beiden liegt die Exzitationswellenlänge bei 488 nm, wobei FITC bei 525 nm und PE bei 578 nm emittiert. Bei der Zweifarbmessung ist aufgrund der starken Überlappung der Emissionsspektren der beiden Farbstoffe, die nicht mehr durch Lichtfilter trennbar sind, eine Korrektur erforderlich. Unter nichtkorrigierten Bedingungen erscheinen FITC gefärbte Zellen auch im roten Messkanal, während PE gefärbte Zellen nur zu einem geringen Maß im grünen Kanal erscheinen. FITC gefärbte Zellen haben somit einen scheinbaren PE-Anteil. Zur Korrektur der spektralen Überlappung ist eine Kompensationselektronik integriert, die von jedem Signalimpuls den durch die spektrale Überlappung verursachten Fluoreszenzanteil subtrahiert. Die Kompensation wird dabei vor jeder Messung neu mit Hilfe von jeweils einfach gefärbten ansonsten aber gleichen Zellen eingestellt. Sie wird solange verändert, bis das Signal der jeweils FITC oder PE gefärbten Zelle nur noch von dem dazugehörigen Kanal detektiert wird.

Das beim Auftreffen des Laserstrahls auf die Zelle erzeugte Streulicht hat aufgrund verschiedener physikalischer Zelleigenschaften unterschiedliche Quantität und Qualität. Das Licht wird nicht in alle Richtungen gleichmäßig gestreut. Die Lichtstreuung ist am größten im Winkel von 0-10° des einfallenden Lichtstrahls. Man bezeichnet es als das Vorwärtsstreulicht bzw. FSC. Es ist sensitiv für die Querschnittsfläche der Zelle und gibt so Informationen über die Zellgröße. Die Korrelation des Signals mit der Zellgröße ist allerdings nur über relativ kleine Bereiche linear. Ein geringer Teil des Lichtes wird im Winkel von 90° seitwärts gestreut. Man bezeichnet dies als Seitwärtsstreulicht oder SSC. Es ist sensitiv für den Brechungsindex und gibt Auskunft über die Granularität, die Membranfaltung und die äußere Form der Zelle. Mittels FCS und SSC lassen sich die wichtigsten Leukozytengruppen wie Lymphozyten, Monozyten und neutrophile Granulozyten unterscheiden. Die Basophilen sind größtenteils im Streulichtbereich der Lymphozyten enthalten. Eosinophile Granulozyten lassen sich am besten im depolarisierten SSC abtrennen. Tote Zellen besitzen ein geringes FSC und können so von lebenden Zellen unterschieden werden.

Das gestreute Laserlicht und das von jeder einzelnen Zelle emittierte Fluoreszenzlicht wird gesammelt, durch optische Filter und Spiegel in bestimmte Wellenlängenbereiche eingeteilt und in elektronische Signale umgewandelt. Diese Signale werden digitalisiert und als Listen-dateiformate, sog. list-mode-files gespeichert. Die Auswertung erfolgt mit Hilfe der Software-Programme WinMDI, CELLQuest oder einem anderen geeigneten Programm, wobei die Daten als sog. Dot-Plots oder Histogramme graphisch ausgegeben werden können. Zum besseren Verständnis wird zunächst der Aufbau eines typischen Durchflusszytometers skizziert und im Anschluss daran das Messprinzip und die Darstellung erläutert.

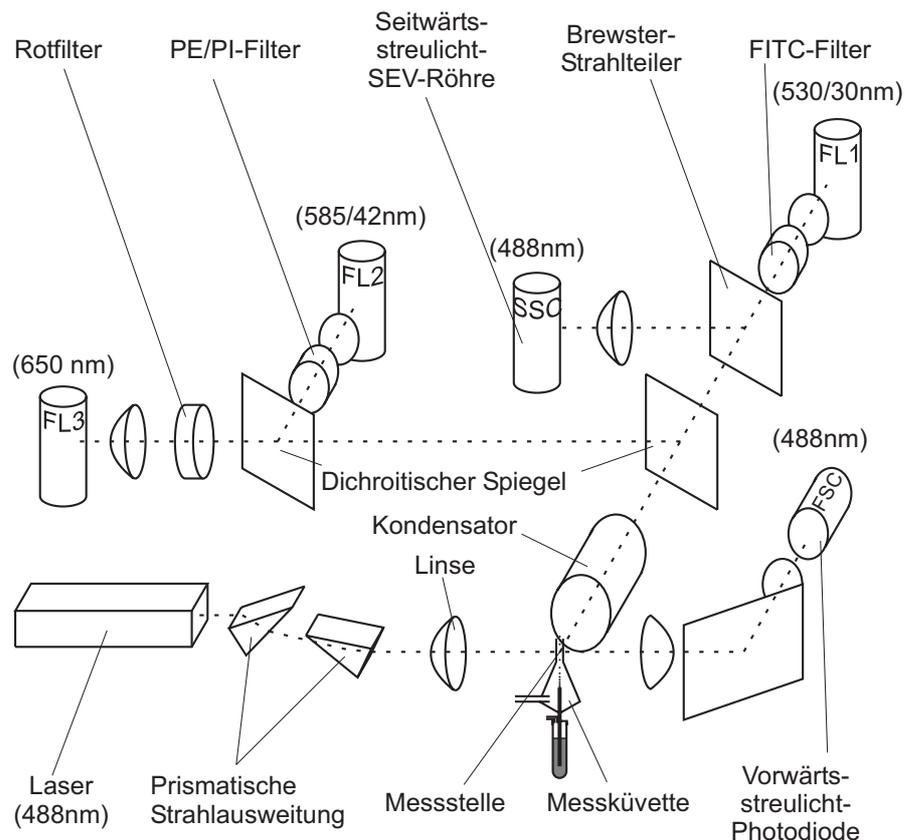


Abb. 1.5: Aufbau eines Durchflusszytometers. Dargestellt ist das optische System.

Für die Funktion eines Durchflusszytometers sind die vollständige Erfassung der Zelle durch die Lichtquelle und die Signalaufnahme durch die Detektoren, die Sicherstellung der Analyse einzelner Zellen, also Vermeidung der gleichzeitigen Messung mehrerer Zellen oder Zellaggregate, und die Zuordnung der von verschiedenen Detektoren gemessenen Signale zu einer gegebenen Zelle wichtig. Dementsprechend ist ein Fluoreszenzdurchflusszytometer aus drei Systemen, dem Flüssigkeitssystem, dem optischen System und der Signalverarbeitung aufgebaut.

Das Flüssigkeitssystem besteht (vereinfacht gesehen) aus zwei Leitungen (siehe Abb. 1.6). Über eine Zuleitung wird kontinuierlich isotonische Trägerflüssigkeit durch die Messkammer und dann weiter in den Abfallbehälter gepumpt. Eine zweite Leitung dient dem Zelltransport vom Probenröhrchen zur Messkammer. Eine Stahlkapillare bildet das Ende dieser Leitung,

das auf das Zentrum der Küvette gerichtet ist. Die Zellsuspension wird mittels Überdruck in die Messkammer, üblicherweise eine Quarzküvette, transportiert. Unmittelbar nach dem Verlassen der Kapillare wird die Zellsuspension von der laminar durch die Küvette strömenden Trägerflüssigkeit erfasst. Durch eine Verengung der Küvette erfahren die konzentrisch strömenden Träger- und Probenflüssigkeiten eine Beschleunigung von wenigen Zentimetern auf etwa sieben Meter pro Sekunde. Dieser Vorgang wird als hydrodynamische Fokussierung bezeichnet. Durch ihn wird gewährleistet, dass die Zellen als Einzelzellen (wie Perlen an einer Kette) den Messpunkt an einer definierten Stelle passieren. An diesem Punkt trifft der fokussierte Laserstrahl die Zelle.

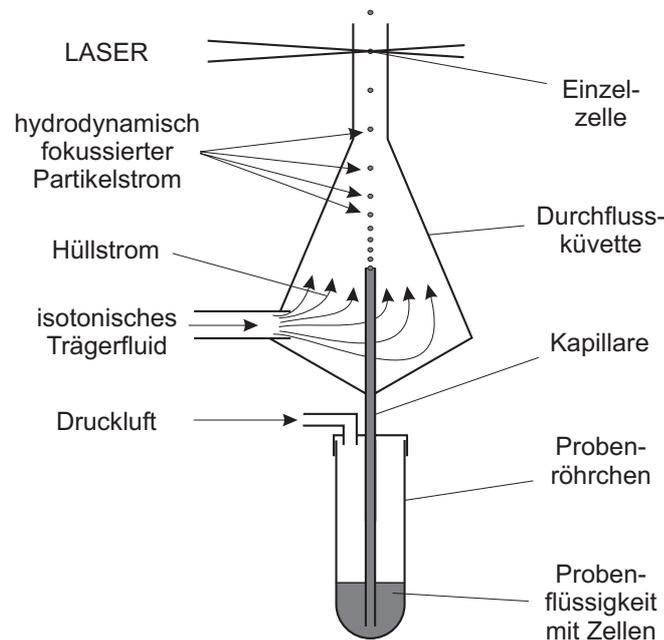


Abb. 1.6: Prinzip der hydrodynamischen Fokussierung. Dargestellt ist das Flüssigkeitssystem in der Messküvette.

Das optische System gliedert sich in einen Anregungs- und einen Detektionsteil. Durch eine Kombination von Prismen und Linsen wird der Laserstrahl so geformt, dass er im Messpunkt einen horizontal-elliptischen Durchmesser von etwa $20 \times 60 \mu\text{m}$ besitzt. So wird eine möglichst hohe Auflösung zur Unterscheidung nah aufeinanderfolgender Zellen und eine ausreichende Signalintensität gewährleistet. Der Detektionsteil umfasst zwei Baugruppen mit optischen Geräten, die der Messung von FSC, SSC und der Fluoreszenz dienen. Die beiden Baugruppen sind orthogonal zueinander aufgebaut, wobei eine axial zum anregenden Laserstrahl positioniert ist. Sie erfasst das FSC. Mit der zweiten Baugruppe werden die Fluoreszenzsignale und das Seitwärtsstreulicht detektiert. Dabei wird das SSC-Signal über geeigneter Filter von der gleichzeitig in verschiedene Farbbereiche unterteilten Fluoreszenz getrennt.

Das optische Signal wird mit Hilfe von Photodetektoren in korrelierende elektrische Impulse umgewandelt. Dabei wird zur Erfassung des intensiven Vorwärtsstreulichtes eine Photodiode eingesetzt. Zur Verstärkung der relativ schwachen Fluoreszenz- und Seitwärtsstreulichtsignale werden Photomultiplier eingesetzt. Durch die Wahl der Verstärkung werden die Photomul-

tiplier der Messaufgabe angepasst. Bei Immunfluoreszenzmessungen wird eine logarithmische Verstärkung benötigt, um einen Bereich von vier Dekaden abzudecken. Bei DNA-Untersuchungen wird eine lineare Verstärkung gewählt.

Die Aufgabe der Elektronik besteht in der Erfassung und Korrelation aller von einer Zelle generierten Messsignale. Die Detektoren registrieren ununterbrochen Signale, wobei sie nicht zwischen Zellsignalen und Rausch- oder Störsignalen unterscheiden können. Als Anhaltspunkt für eine Unterscheidung wird zu Beginn der Messung ein elektronischer Schwellenwert (Threshold) gesetzt, der sich auf einen bestimmten Auslöseparameter oder auch Trigger bezieht. Üblicherweise wird hierfür der FSC gewählt. Beim Betrieb mehrerer Detektoren erfolgen die einzelnen Schwellenwertüberschreitungen nicht zum selben Zeitpunkt. Die Elektronik muss deshalb mit Hilfe von Impulskorrelaten in der Lage sein, das jeweilige Signal auch der richtigen Zelle zuzuordnen. Dies wird dadurch bewerkstelligt, dass ein Detektor für eine bestimmte Zelleigenschaft mit dem höchsten Signal-Rausch-Abstand priorisiert wird, und Pulse anderer Detektoren nur innerhalb einer fest eingestellten Koinzidenzzeit als zu einer Zelle dazugehörig gewertet und weiterverarbeitet werden. Mit Hilfe eines A/D-Wandlers werden die registrierten Signalintensitäten für jede gemessene Eigenschaft in eine Kanalzahl mit einer Auflösung von 0-1023 (8 bit) gewandelt. Der Computer speichert die Messwerte der Zellen als Listendatei in der gleichen Reihenfolge, in der die Zellen den Analysepunkt passieren.

In der einfachsten Form können die Messdaten als Histogramm bzw. Häufigkeitsverteilung dargestellt werden, siehe Abb. 1.7 b). Sie eignet sich am besten, um die Intensität einer Färbung zu illustrieren. Daneben gibt es die korrelierte Zweiparameterdarstellung, den sog. Dot Plot. Diese findet man oft als Auftragung von FSC gegen SSC z.B. bei Vollblutanalysen, da sie das Abgrenzen einzelner Populationen durch das sog. Gating erlaubt, wie in Abb. 1.7 a) dargestellt. Eine statistische Auswertung der Messwerte erfolgt mittels spezieller Programme, wobei der sog. mean-Wert ermittelt wird. Der mean-Wert entspricht der Verteilungsklasse, bei der 50% der Werte darüber und 50% darunter liegen. Er wird von Ausreißern (Debris oder Zellaggregate) am wenigsten beeinflusst und gibt eine gute Abschätzung des Signalwertes.

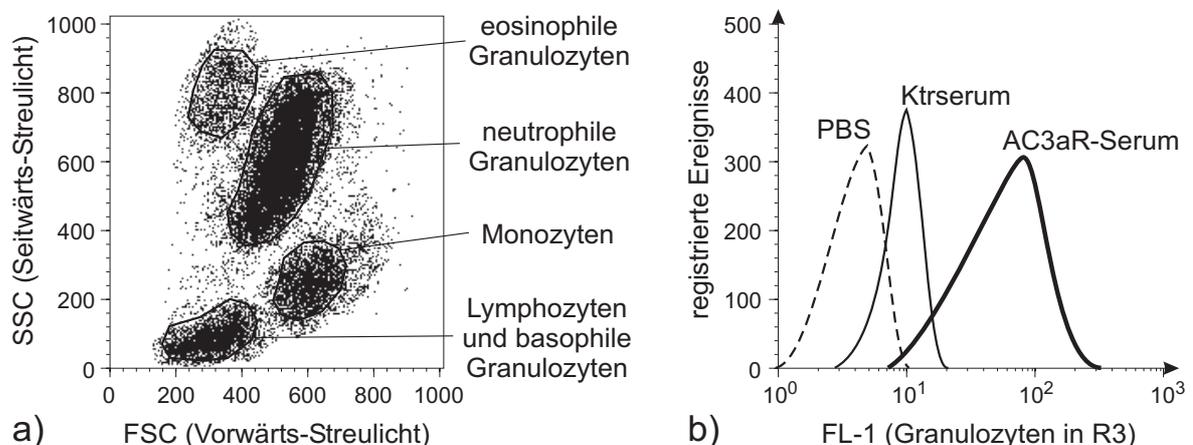


Abb. 1.7: Graphische Darstellungen durchflusszytometrischer Untersuchungen. a) zeigt die morphologische Einordnung von Blutzellen im Dotplot und b) die Fluoreszenz von Granulozyten nach Inkubation mit PBS und C3aR-spezifischem bzw. -unspezifischem Serum in Form eines Histogramms.

1.6 Zielsetzung und Aufgabenstellungen

Die während der Komplementkaskade freigesetzten Anaphylatoxine C3a und C5a sind potente Entzündungsmediatoren. Aufgrund der pathophysiologischen Bedeutung der Anaphylatoxine ist ein Verständnis ihrer molekularen Wirkungsweise und ihrer Rezeptoren von großer Wichtigkeit. Im Rahmen dieser Dissertation sollen Regulationsmechanismen des anaphylatoxischen C3a-Rezeptors untersucht werden. Der Schwerpunkt liegt dabei auf der Charakterisierung der C3aR-Internalisierung, einem innerhalb von Minuten ablaufenden Regulationsmechanismus, bei dem der Rezeptor von der Zelloberfläche ins Zellinnere transportiert wird.

- Teilziele zur allgemeinen Charakterisierung der Internalisierung sind dabei:
 - Untersuchung des Liganden-induzierten Internalisierungsverhaltens von humanen Monozyten und Zellen der humanen Mastzelllinie HMC-1.
 - Pharmakologische Untersuchung von C3aR-Inhibitoren der Firma Smith Kline Beecham. An humanen Granulozyten sollte untersucht werden, ob sie bereits auf Ebene der Rezeptorinternalisierung einen Einfluss zeigen.
- Das Hauptziel der Arbeit ist die Struktur-/ Funktionsanalyse des zytosolischen Carboxyterminus des C3a-Rezeptors, wobei vor allem der Einfluss der putativen Phosphorylierungsstellen auf die Internalisierung Gegenstand der Untersuchung ist. Dies soll durch die folgenden Strategien verwirklicht werden:
 - Generierung von Austausch-Mutanten, bei denen die zehn putativen Phosphorylierungsstellen innerhalb des C-Terminus gruppenweise gegen Alanin ausgetauscht werden.
 - Herstellung von Zelllinien durch stabile Transfektion dieser Mutanten in rattenbasophilen RBL-2H3-Zellen.
 - Durchflusszytometrische Analysen an RBL-Zelllinien zur Untersuchung der Auswirkung der gezielten Mutagenese auf das Internalisierungsverhalten.
 - Untersuchungen zur Ermittlung des Einflusses der Mutationen auf das Phosphorylierungsverhalten, die Ausschüttung von intrazellulärem Ca^{2+} sowie die Glukosaminidase-Freisetzung nach Ligandenstimulus.
- Ein weiteres Teilziel der Dissertation sind Untersuchungen zur Charakterisierung der dem C3a-Rezeptor nach Ligandenbindung nachgeschalteten Regulationsvorgänge mit den folgenden Aufgabenstellungen:
 - Entwicklung eines C3aR-GFP-Fusionsproteins für die spätere Visualisierung der Rezeptorinternalisierung bzw. der Verfolgung des Rezeptors im Inneren von lebenden Zellen mit Hilfe der konvokalen Laser-Spektroskopie.
 - Untersuchung zur C3aR- und C5aR-vermittelten Regulation auf mRNA-Ebene an der humanen Mastzelllinie HMC-1 mit Hilfe des Atlas cDNA Arrays.

2 Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Geräte

- Bilddokumentationssystem: E:A:S:Y: RH-3, (Herolab, Wiesloch, D)
- Brutschränke: Modell B5090 E, (Heraeus, Osterode a. H., D)
- Schüttelinkubator: Modell G25 (New Brunswick, Edison, USA)
- Durchflusszytometer: FACScan™ (Becton Dickinson, Heidelberg, D)
- Elektrophoresekammern: Gelkammern für horizontale Agarose-Gele (52 x 76 mm und 76 x 100 mm) (Pharmacia Biotech Inc., Uppsala, S)
- Elektroporationsgerät: GenePulser 1 und 2 (Biorad, München, D)
- Film-Kassetten: X-OMAT mit Verstärkerfolie (Kodak, Rochester, USA)
- Heizblock: Modell BT3, Techne-Dryblock, Typ DB-3 (Gesellschaft für Laborgeräte, Wertheim, D)
- Hybridisierungsöfen: Modell 400 HY, (Bachhofer Laboratoriumsgeräte, Reutlingen, D)
- Mikroskope: unterschiedliche Modelle (Zeiss, Jena, D)
- Neubauer-Zählkammer (Brand GmbH & Co KG, Wertheim, D)
- PCR-Thermocycler: Modell TCV 5*9, (Landgraf, Langenhagen, D)
- Photometer: Ultrospec III (Pharmacia Biotech Inc., Uppsala, S)
- Spannungsgeräte: Electrophoresis Constant Power Supply ECPS 3000/150 (Pharmacia Biotech Inc., Uppsala, S), Electrophoresis Power Supply Phero Stab 200 (Biotech Fischer, D), Gene Power Supply GPS 200/20 (Pharmacia Biotech Inc., Uppsala, S)
- Speedvac: Speedvac Concentrator SVC 100 (Savant, Farmingdale, USA)
- UV-Crosslinker, Stratalinker 1800 (Stratagene, La Jolla, USA)
- Vakuumofen: Typ VTR 5022 (Heraeus, Osterode a. H., D)
- Wasserbad (Gesellschaft für Labortechnik, Burgwedel, D)
- Zentrifugen: Biofuge 17 RS, Biofuge A und Minifuge GL (Heraeus Sepatech, Osterode, a. H., D); Kühlzentrifuge: Modell J2-21 (Beckmann, Glenrothes, UK)

2.1.2 Verbrauchsmaterial

- Combitips plus 1,25 ml und 2,5 ml (Eppendorf, Hamburg, D)
- Filme: Hyperfilm™ (Amersham, Braunschweig, D)
- Küvetten: 3 ml Acryl-Küvetten (Sarstedt, Nümbrecht, D), Quarzküvetten (Hellma, LAT, Garbsen, D)
- Mikrotiterplatten, Polystyrol, Rund- und Flachboden, mit und ohne Deckel, steril, (Greiner, Frickenhausen, D)
- Mikrotiterplattenverschußfolie: Plate Sealers (Acetat) (Dynatech, Denkendorf, D)
- Nitrozellulosemembran Protran (Schleicher & Schüll, Dassel, D)

- Nylonmembran Hyperbond-N 0,45 Micron™ (Amersham, Braunschweig, D)
- Reaktionsgefäße: 0,5 ml, 1,5 ml, 1,5 ml mit Schraubdeckel (Sarstedt, Nümbrecht, D), 12 ml Plastikröhrchen (17,0/100 mm), Rundboden, steril (Greiner, Frickenhausen, D), 15 ml und 50 ml Falcontubes, steril, (Greiner, Frickenhausen, D)
- Säulen und Aufreinigungskits: Jetsorb (Genomed, Bad Oeynhausen, D), Quiagen Plasmid Präparationskit Midi und Maxi (Quiagen, Hilden, D), GFX PCR, DNA and Gel Band Purifikation Kit (Pharmacia Biotech, Uppsala, S)
- Spritzen und Kanülen: EDTA-Monovetten (Sarstedt, Nümbrecht, D), Spritzen: 5 ml, 10 ml, 20 ml (Braun, Melsungen, D), Kanülen mit unterschiedlichem Durchmesser und Länge, Sterican®Luer-Lock (Braun, Melsungen, D), Venofix® S, Luer-Lock, 30 cm, 0,8 mm-21G, (Braun, Melsungen, D), Multi-Adapter für S- Monovetten®, (Sarstedt, Nümbrecht, D)
- Sterilfilter, Minisart NML (Satorius, Göttingen, D)
- Zellkulturflaschen für adhärenente Zellen und Suspensionszellen, verschiedene Größen, (Greiner, Frickenhausen, D)

2.1.3 Chemikalien

- Agarose, ultraPure®, (Life Technologies, Eggenstein, D)
- Albumin, Fraktion V aus Rinderserum (BSA), (Boehringer, Mannheim, D)
- Bacto-Agar (Difco Laboratories GmbH, Augsburg, D)
- Bacto-Trypton (Difco Laboratories GmbH, Augsburg, D)
- Blockingreagenz (Boehringer, Mannheim, D)
- Bromphenolblau (Serva, Heidelberg, D)
- Bt₂cAMP, (Boehringer, Mannheim, D)
- CSPD (Boehringer, Mannheim, D)
- Diethylpyrocarbonat (DEPC) (AppliChem GmbH, Heidelberg, D)
- DNA-Marker "1 KB DNA-Ladder" (Life Technologies, Eggenstein, D)
- DNA-Marker Hind-III-Fragments (Life Technologies, Eggenstein, D)
- Effectene (Qiagen, Hilden, D)
- Ethidiumbromid (Boehringer, Mannheim, D)
- Ficoll-Paque™ (Pharmacia Biotech, Uppsala, S)
- Formalin, p. a., (Merck, Darmstadt, D)
- Glukose, ultraPure®, (Life Technologies, Eggenstein, D)
- Glycerin (Merck, Darmstadt, D)
- Glykogenlösung (20 mg/ml) (Boehringer, Mannheim, D)
- Hefeextrakt (Merck, Darmstadt, D)
- Hepes Free Acid, (Serva, Heidelberg, D)
- Hepes Natriumsalz, pK_a 7,55 (Serva, Heidelberg, D)
- γ-Interferon (Polyferon™) (Rentschler, Laupheim, D)
- Lipofectamine™ (Life Technologies, Eggenstein, D)
- Natriumazid, (Merck, Darmstadt, D)
- Natriumchlorid, (Merck, Darmstadt, D)
- Polymorphprep™, (Nycomed, Oslo, N)

- Propidiumiodid, (Calbiochem, Bad Soden, D)
- RNA-Marker "0,24-0,95 KB RNA-Ladder" (Life Technologies, Eggenstein, D)
- Saccharose, (Aldrich, Steinheim, D)
- SDS (Serva, Heidelberg, D)
- Trizol (Life Technologies, Eggenstein, D)

Alle weiteren während dieser Arbeit verwendeten Chemikalien wurden in p. a. Qualität von Sigma Chemicals, Deisenhofen bezogen.

2.1.4 Puffer und Lösungen

Die nachfolgenden Puffer und Lösungen werden in ihrer Zusammensetzung an den entsprechenden Stellen des Methodenteils nicht mehr beschrieben.

ACD	0,74 g Zitronensäure, 2,2 g Na ₃ -Citrat, 2,4 g Glukose, mit aqua bidest. ad 100 ml, sterilfiltriert
10% Blockingreagenz	10% [w/v] Blockingreagenz in Maleinsäurepuffer
Blotpuffer	25 mM TRIS·HCl pH 8,5, 150 mM Glycin, 10% Methanol
Bradford-Stammlösung	0,67 g/l Coomassie Brilliant Blue G 250 in 57% [v/v] Phosphorsäure und 32% [v/v] Ethanol
Chloronaphthol-Stammlösung	3 g/l 4-Chloro-1-naphthol in Methanol
CSPD-Detektionspuffer	100 mM TRIS·HCl, 100 mM NaCl, 50 mM MgCl ₂ , pH 9,7
CSPD-Substratlösung	1% [v/v] CSPD in CSPD-Detektionspuffer
DEPC-H ₂ O	0,2% [v/v] Diethylpyrocarbonat (DEPC) in Aqua dest.
GEBS	50 mM EDTA pH 8,0 mit 1% [w/v] SDS, 30% [v/v] Glycerin, 2,5 g/l Bromphenolblau
HAG-CM	20 mM HEPES pH 7,4 mit 125 mM NaCl, 5 mM KCl, 1 mM CaCl ₂ , 1 mM MgCl ₂ , 0,25% [w/v] BSA und 0,5 mM Glucose
HBSS-Puffer	120 mM NaCl, 5 mM KCl, 1 mM MgCl ₂ , 20 mM HEPES, 1 mM CaCl ₂ , 10 mM Glucose, pH 7,4
Hybridisierungspuffer	5 x SSC, 50% [v/v] Formamid, 0,1% Na-Lauroylsarcosin, 0,02% SDS, 2% Blockingreagenz
Kimura-Färbelösung	11,0 ml Toluidinblau-Lösung, 5,0 ml Kalium-Natrium-Phosphatpuffer pH 6,4, 0,8 ml 0,03% Lichtgrün in aqua bidest., 0,5 ml Saponin, gesättigt in 50% Ethanol
Maleinsäurepuffer	0,1 M Maleinsäure, 0,15 M NaCl, pH 7,5

PBS	10 mM Na-Phosphat pH 7,4 mit 2,7 mM KCl; mit NaCl auf eine Leitfähigkeit von 15mS/cm eingestellt
PI-Färbung:	Stammlösung: 20 µg/mL Propidiumiodid in PBS, auf 150 µL Probe in PBS 10 µl einsetzen
Plasmid-Midi- bzw. Maxipräparationspuffer (Qiagen)	
P1	50 mM TRIS·HCl, 10 mM EDTA, 100 µg/ml RNase, pH 8,0
P2	200 mM NaOH, 1% [w/v] SDS
P3	3 M K-Acetat pH 5,2
QBT	750 mM NaCl, 50 mM MOPS, 15% [v/v] Ethanol, 0,15% [v/v] Triton-X-100, pH 7,0
QC	1 M NaCl, 50 mM MOPS, 15% [v/v] Ethanol, pH 7,0
QF	1,25 M NaCl, 50 mM TRIS·HCl, 15% [v/v] Ethanol, pH 8,2
Plasmid-Minipräparationspuffer	
P1	50 mM TRIS·HCl, 10 mM EDTA, pH 8,0
P2	200 mM NaOH, 1% [w/v] SDS
P3	3 M K-Acetat pH 4,8
RNA-Auftragspuffer	50% [v/v] Formamid, 2,2 M Formaldehyd, 10 mM EDTA, 20% [v/v] Glycerin, 0,2% [w/v] Bromphenolblau, 50 µg/ml Ethidiumbromid
5 x RNA- Laufpuffer	0,1 M MOPS pH 7,0, 40 mM Na-Acetat, 5 mM EDTA pH 8,0 in DEPC-H ₂ O
20 x SSC	3 M NaCl, 0,3 Na-Citrat, pH 7,0
Substrat-Lösung (GARA)	8 mM p-Nitrophenyl-N-acetyl-β-D-Glucosaminid in 42,5 mM Na-Acetat pH 4,5
50 x TAE	2 M Tris-Acetat pH 8,0, 150 mM EDTA pH 8,0
10 x TBE (Agarose-Gele)	0,9 M TRIS, 0,9 M Borsäure, 0,2 mM EDTA
10 x TBE (Sequenzgele)	1 M TRIS, 1 M Borsäure, 20 mM EDTA
1 x TE	10 mM TRIS·HCl pH 7,4, 0,1 mM EDTA
Toluidinblau-Lösung	50 mg Toluidinblau, 50 ml 1,8% NaCl-Lösung, 22 ml 96% Ethanol, mit aquo bidest. ad 100 ml
10 x Transkriptionspuffer	400 mM Tris-HCl, pH 8, 60 mM MgCl ₂ , 100 mM DTT, 20 mM Spermidin und 100 mM NaCl

Alle Puffer und Lösungen wurden, sofern nicht anders angegeben, mit Aqua dest. angesetzt. In der Regel erfolgte eine Sterilisation durch Autoklavieren oder Sterilfiltration.

2.1.5 Enzyme, Enzymkits und Enzymzubehör

- Calf Intestinal Phosphatase (CIP) aus Kälbermägen (Boehringer, Mannheim, D)
- diverse Restriktionsendonukleasen (New England Biolabs, Schwalbach, D) (Pharmacia, Uppsala, S) (BioWhittaker Europa, Taufkirchen, D)
- DIG RNA Labeling Kits SP6/T7 (Boehringer, Mannheim, D)
- dNTP-Set (Pharmacia Biotech, Uppsala, S)
- Lithiumchlorid-Lösung (T7 MessageMachine Kit, Ambion,)
- QIAamp-Tissue-Kit (Quiagen, Hilden, D)
- OnePhorAll Buffer (Pharmaca Biotech, Uppsala, S)
- Pfu-DNA-Polymerase (Stratagene, La Jolla, USA)
- RQ₁-DNase I, RNase-frei (Promega, Madison, USA)
- SuperscriptTM-Kit (Life Technologies, Eggenstein, D)
- T4 DNA-Ligase, T4 DNA-Polymerase, *Taq*-DNA-Polymerase, *Taq*-DNA-Polymerase-Puffer, Magnesiumchlorid für *Taq*-DNA-Polymerase (Life Technologies, Eggenstein, D)

2.1.6 Vektoren

- pcDNA3 (Invitrogen, NV Leek, NL), Vektorkarte im Anhang
- pcDNA3.1/CT-GFP-TOPO (Invitrogen, NV Leek, NL), Vektorkarte im Anhang
- pcDNA3.1/HisA (Invitrogen, NV Leek, NL), Vektorkarte im Anhang
- pEF-BOS [241] (zur Verfügung gestellt von Dr. M. Oppermann, Universität Göttingen, D)
- pEF1/HisA (Invitrogen, NV Leek, NL), Vektorkarte im Anhang
- pGEX-4T1 (Pharmacia Biotech, Uppsala, S), Vektorkarte im Anhang
- pTC13M (pcDNA1/Amp + hC3aR-wt + 2 zusätzliche Schnittstellen, zur Verfügung gestellt von Dr. T. Crass, Medizinische Hochschule Hannover, D), Vektorkarte im Anhang
- pTCC0 (Insert von pTC13M umkloniert in pcDNA3 über HindIII/XbaI, zur Verfügung gestellt von Dr. T. Crass, s. o.), Vektorkarte im Anhang)

2.1.7 Oligonukleotide

Primer für die Umklonierung des C3aR-wt aus pTC13M in pcDNA3.1HisA:

Sett001

5'-AGC CAC TTG GAT CCA GGC GTC TTT CTC TGC TG-3'

Sett002

5'-AGC CAT CTC GAG GTA CCT CAC ACA GTT GTA CTA TTT C-3'

Primer für die Herstellung von Mutante 5:

Sett001

5'-AGC CAC TTG GAT CCA GGC GTC TTT CTC TGC TG-3'

Sett003 (RAS-Primer mit Ser⁴⁴⁹->Ala und stiller Mutation T->g (BssHII) an N1337)

5'-CCT CCA GAA TTC CCT GAA TGG CCT GGC GCG CTT TC-3'

Primer für die Herstellung von Mutante 7a:

Sett004/NEW(M1AS)

5'-CGC ACG TGC CAC CCA CTG TCC CTC AAA CAA TGT CAT TTC AGA AAG AAA
TAG TAC AAC TGT GTG ACG ATC GGC-3'

Sett005/NEW(M1ARAS)

5'-GGC CGC CGA TCG TCA CAC AGT TGT ACT ATT TCT TTC TGA AAT GAC ATT
GTT TGA GGG ACA GTG GGT GGC ACG TGC GAG CT-3'

Primer für die Herstellung von Mutante 7b:

Sett006/NEW(M1BS)

5'-CAC ACG TTC CGC CCA CTG TCC CGC AAA CAA TGT CAT TTC AGA AAG AAA
TAG TAC AAC TGT GTG ACG ATC GGC-3'

Sett007/NEW(M1BRAS)

5'-GGC CGC CGA TCG TCA CAC AGT TGT ACT ATT TCT TTC TGA AAT GAC ATT
GTT TGC GGG ACA GTG GGC GGA ACG TGT GAG CT-3'

Primer für die Herstellung von Mutante 7c:

Sett008/NEW(M1CS)

5'-CGC ACG TTC CAC CCA CTG TCC CGC AAA CAA TGT CAT TTC AGA AAG AAA
TAG TAC AAC TGT GTG ACG ATC GGC-3'

Sett009/NEW(M1CRAS)

5'-GGC CGC CGA TCG TCA CAC AGT TGT ACT ATT TCT TTC TGA AAT GAC ATT
GTT TGC GGG ACA GTG GGT GGA ACG TGC GAG CT-3'

Primer für die Herstellung von Mutante 7d:

Sett010/NEW(M1DS)

5'-CAC ACG TGC CGC CCA CTG TCC CTC AAA CAA TGT CAT TTC AGA AAG AAA
TAG TAC AAC TGT GTG ACG ATC GGC-3'

Sett011/NEW(M1DRAS)

5'-GGC CGC CGA TCG TCA CAC AGT TGT ACT ATT TCT TTC TGA AAT GAC ATT
GTT TGA GGG ACA GTG GGC GGC ACG TGT GAG CT-3'

Primer zur Amplifizierung der genomischen DNA der stabilen RBL/O Zelllinien über PCR:

Sett009 (T7-Promotor/priming site, Sense-Primer)

5'-TAA TAC GAC TCA CTA TAG GG-3'

Sett010 (pcDNA3.1/BGH reverse priming site, Antisense-Primer)

5'-TAG AAG GCA CAG TCG AGG-3'

Primer zur Herstellung eines GFP-/ C3aR-Fusionsproteins:

SH03 (Sense-Primer)

5'-AAG CTT ACC ATG GCG TCT TTC TCT G-3'

SH04B (Reverse-Antisense-Primer, ohne Doppelstop)

5'-G GGT ACC CAC AGT TGT ACT ATT TCT-3'

Die Herstellung und Aufreinigung der Oligonukleotide wurde bei der Firma MWG (MWG Biotech, Ebersberg, D) in Auftrag gegeben.

2.1.8 Bakterienstämme

- *E.coli* TOP 10 F'
- *E.coli* GM 2163

2.1.9 Eukaryontische Zelllinien

Die eukaryontischen Zelllinien wurden bei 37°C und 5% CO₂ im Brutschrank gehalten.

- HeLaT:
Humane Zelllinie epithelartiger Morphologie, die aus einem Cervix-Karzinom isoliert wurde. Sie weist eine hohe Transformationseffizienz auf.
- HEK-293:
Permanente Zelllinie aus der humanen, frühembryonalen Niere (ATCC CRL 1573). Die Zelllinie ist mit gescherter DNA vom humanen Adenovirus Typ 5 (Ad 5) transformiert [242][243].
- HMC-1:
Humane Mastzelllinie, die aus leukämischen Mastzellen generiert wurde [244].
- RBL-2H3:
Basophile leukämische Rattenzelllinie ATTC CRL 1593 (ATTC, Rockville, USA).
- U937:
Humane histiocytäre Lymphoma-Zelllinie, die aus malignen Zellen eines 37jährigen Kaukasiens gewonnen und charakterisiert wurden. Sie exprimiert viele monozytäre Zellmarker und differenziert in ein Monozyten-ähnliches Stadium.

2.1.10 Nährmedien

Bakterien:

- LB-Medium 1% [w/v] Bacto-Trypton, 0,5% [w/v] Hefeextrakt, 1% [w/v] NaCl, pH 7,5
- LB-Agar LB-Medium mit 1,5% Bacto-Agar
- LB-Topagarose LB-Medium mit 0,7% Agarose
- SOB-Medium 2% [w/v] Trypton, 0,5% [w/v] Hefeextrakt, 10 mM NaCl, 2,5 mM KCl

- SOC-Medium SOB-Medium mit 10 mM MgCl₂, 10 mM MgSO₄, 20 mM Glucose

Bei Zusatz von Antibiotika wurden folgende Endkonzentrationen verwendet:

Ampicillin 80 µg/ml (Stammlösung 100 g/l in Aqua dest.) und Tetracyclin 10 µg/ml (Stammlösung 2,5 g/l in Ethanol). Alle Stammlösungen wurden sterilfiltriert (Porengröße 0,2 µm) und bei -20°C gelagert.

Zellkultur:

- Cell Dissociation Solution (1x), nicht enzymatisch, (Sigma Chemicals, Deisenhofen, D)
- DMEM: Dulbecco's MEM (Gibco BRL, Eggenstein, D), suppl. mit 10% FCS, 2 mM L-Alanyl-L-Glutamin, 2,5 ml Penicillin/ Streptomycin-Lösung
- DMEM Nut Mix F12 (Gibco BRL, Eggenstein, D), suppl. mit 10% FCS, 2 mM L-Alanyl-L-Glutamin, 1 mM Natriumpyruvat, 2,5 ml Penicillin/ Streptomycin-Lösung
- Fetales Kälberserum (FCS), (Gibco BRL, Eggenstein)
- Geneticin G-418, (Gibco BRL, Eggenstein)
- L-Alanyl-L-Glutamin (Sigma Chemicals, Deisenhofen, D)
- Natriumpyruvat (Gibco BRL, Eggenstein)
- Opti-MEM (Gibco BRL, Eggenstein, D)
- Penicillin 10000 U/Streptomycin 10 mg in 0,9% NaCl-Lösung, (Sigma Chemicals, Deisenhofen, D)
- RPMI 1640 (Gibco BRL, Eggenstein), suppl. mit 10% FCS, 2 nM L-Alanyl-L-Glutamin, 2,5 ml Penicillin/ Streptomycin-Lösung
- Stopplösung: Dulbecco's MEM Nut-Mix F-12 mit 20% FCS, 2 nM L-Alanyl-L-Glutamin, 1 mM Natriumpyruvat, 2,5 ml Penicillin/ Streptomycin-Lösung
- Trypanblau, 0,5%, (Sigma Chemicals, Deisenhofen, D)
- Trypsin-EDTA-Lösung (Gibco BRL, Eggenstein)

Das eingesetzte FCS wurde zur Inaktivierung des Komplementsystems 30 Minuten bei 56°C im Wasserbad erhitzt. Penicillin wurde in einer Endkonzentration von 50 U/ml und Streptomycin in einer Endkonzentration von 50 µg/ml eingesetzt.

2.1.11 Liganden

- humanes aufgereinigtes C3a (Advanced Research Technologies, San Diego, USA)
- rekombinantes hC5a (Sigma Chemikals, Deisenhofen, D)
- synthetisches C3a-analoges Peptid P117 (Multiple Peptid System, San Diego, USA), Sequenz: LRRQAWRASALGLAR, Aminosäuren 63-77 des hC3a
- synthetisches irrelevantes Peptid P252 (Multiple Peptid System, San Diego, USA), Sequenz: YTTDDYGHYDD

2.1.12 Antikörper

Monoklonale Antikörper bzw. Kontrollen:

- Maus-Anti-CD4-FITC

- Maus-Anti-CD8-PE
- Maus-Anti-CD14-PE
- Maus-Anti-CD14-FITC
- Maus-Anti-CD16-PE
- Maus-IgG1-FITC
- Maus-IgG1-PE

Polyklonale Antikörper bzw. Kontrollen:

- Ziege-Anti-Kaninchen-IgG, FITC-markiert (Dianova, Hamburg, D)
- Anti-C3a-Rezeptor-Serum (aC3aRser): Kaninchenserum, hergestellt durch Immunisierung von Kaninchen mit einem rekombinanten Fusionsprotein aus Gluthationtransferase und dem zweiten extrazellulären Loop des C3a-Rezeptors [164], Verdünnung 1:4000, zur Verfügung gestellt von Dr. Ames, Smith Kline Beecham, King of Prussia, USA
- Kontrollserum (Ktrser) vom gleichen Kaninchen vor Immunisierung (Präimmunserum), siehe Anti-C3a-Rezeptor-Serum

2.1.13 Spezielle EDV

- CELLQuestTM-Software (Becton Dickinson, Heidelberg, D)
- WinMDI (Copyright© by Joseph Trotter, Scripps Research Institute, La Jolla, USA)
- SigmaPlotTM, Version 1.02, (Jandel Scientific Software)
- MegAlign (DNASTAR Inc.)
- EditSeq (DNASTAR Inc.)
- Vec View (zur Verfügung gestellt von Dr. T. Crass)
- Clone (Scientific & Education Software)
- EASY image plusTM (Haerolab GmbH, Wiesloch, D)
- Array Vision (Imaging Research Inc., St. Catherines, Ontario, Kanada)

2.2 Methoden

2.2.1 Methoden zum Arbeiten mit DNA und RNA

2.2.1.1 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

(Saiki et al., 1988 [245])

Die PCR ist ein *in vitro* Verfahren, bei dem eine selektive Anreicherung oder selektive Veränderung von Nukleinsäure-Sequenzen einer beliebigen Ausgangs-DNA (Template) mit Hilfe von thermostabilen DNA-Polymerasen erfolgt. Die Reaktion wird durch zwei synthetisch hergestellte, spezifische Oligonukleotid-Primer, die komplementär zu den terminalen Bereichen der zu amplifizierenden DNA-Sequenz sind, realisiert. Das nach der Hybridisierung der beiden Primer jeweils erzeugte kurze DNA-Doppelstrangstück dient der DNA-Polymerase als Transkriptionsstart. Die Polymerase-Kettenreaktion besteht aus drei sich wiederholenden Re-

aktionsteilen: aus einer Hitze-Denaturierung der doppelsträngigen DNA bei 94°C, der Anlagerung der Primer an die nun als Einzelstrang vorliegende DNA bei einer optimalen Temperatur (Annealing) und einem sog. Elongationsschritt, bei dem die Primer bei 72°C, dem Temperaturoptimum der DNA-Polymerase, verlängert werden, bis wieder eine komplette, doppelsträngige DNA vorliegt. Je nach Einsatzzweck wurden unterschiedliche Ansätze pipettiert und andere Reaktionsbedingungen gewählt, die zuvor ausgetestet wurden. Für die unterschiedlichen Anwendungen wurden die folgenden Ansätze und Bedingungen gewählt:

- **Subklonierung des C3aR-wt (TC) aus pTC13M**

Taq-PCR:

0,5 µl Taq-Polymerase	10 s 94°C	
10,0 µl Taq-Puffer	180 s 94°C	1x
6,0 µl MgCl ₂	10 s 94°C	
1,0 µl Primer Sett 001 (20 pmol)	60 s 94°C	
1,0 µl Primer Sett 002 (20 pmol)	10 s 54°C	
1,0 µl dNTPs (20 mM)	180 s 54°C	
0,9 µl pTC13M (200ng/µl)	10 s 72°C	
<u>79,6 µl aqua dest.</u>	<u>180 s 72°C</u>	<u>6x</u>
100,0 µl Ansatz	10 s 72°C	
	600 s 72°C	1x

Pfu-PCR:

2 µl Pfu-Polymerase	10 s 94°C	
10 µl Pfu-Puffer	180 s 94°C	1x
1 µl Primer Sett 001 (20 pmol)	10 s 94°C	
1 µl Primer Sett 002 (20 pmol)	60 s 94°C	
1 µl dNTPs (20 mM)	10 s 54°C	
10 µl PCR-Produkt (2 ng)	180 s 54°C	
<u>75 µl aqua dest.</u>	<u>10 s 72°C</u>	
100 µl Ansatz	<u>180 s 72°C</u>	<u>35x</u>
	10 s 72°C	
	600 s 72°C	1x

- **Herstellung eines GFP-Fusionsproteins**

2 µl Pfu-Polymerase	10 s 94°C	
10 µl Pfu-Reaktionspuffer	180 s 94°C	1x
2 µl Primer SH03 (20 pmol)	10 s 94°C	
2 µl Primer SH04B (20 pmol)	60 s 94°C	
1 µl dNTPs (20 mM)	10 s 50°C	
10 µl Template-DNA (13,5 ng)	60 s 50°C	
<u>73 µl aqua dest.</u>	<u>10 s 72°C</u>	
100 µl Ansatz	<u>60 s 72°C</u>	<u>30x</u>
	10 s 72°C	
	600 s 72°C	1x

2.2.1.2 Hybridisierung komplementärer Oligonukleotide

Für die Generierung der C3a-Rezeptormutanten wurden teilweise synthetisch hergestellte Oligonukleotide eingesetzt, die nach ihrer Hybridisierung bereits das fertige Insert mit den passenden Enden für die Ligation darstellten. Pro Mutante wurden jeweils zwei Oligonukleotide mit komplementärer Sequenz konstruiert und bei MWG bestellt. Für den Einsatz bei der Klonierung musste das jeweilige Oligonukleotid-Paar zunächst hybridisiert werden. Dazu wurde folgender 10 µl-Ansatz verwendet:

- 1 µl Oligo 1 (Sense)
- 1 µl Oligo 2 (Anti-Sense)
- 7 µl Aqua bidest.
- 1 µl OPA (One Phor All Buffer, Pharmacia)

Der Reaktionsansatz wurde für zwei Minuten bei 100°C aufgeköcht. Anschließend wurde die Probe über 2-2½ Stunden sukzessive auf Raumtemperatur abgekühlt. Durch das Aufkochen werden eventuelle intramolekulare Interaktionen aufgehoben, die einer Hybridisierung über die gesamte Oligonukleotidlänge hinderlich wären. Bei der anschließenden langsamen Abkühlung hybridisieren die Oligonukleotide aufgrund ihrer komplementären Sequenzen zum Doppelstrang. Von diesem Inkubationsansatz wurde ein Teil direkt in die Ligation eingesetzt, ein Teil des Ansatzes wurde bei -20°C aufbewahrt. Diese Arbeiten wurden von unserer MTA Frau Claudia Rheinheimer durchgeführt.

2.2.1.3 Agarosegelelektrophorese

Durch die Agarosegelelektrophorese können DNA-Gemische zu analytischen oder präparativen Zwecken aufgetrennt werden. Dabei nutzt man die durch Phosphatgruppen verursachte negative Gesamtladung der Desoxyribonukleinsäuren und die Tatsache, dass die Molekülgröße und die Gesamtladung in einem direkt proportionalen Verhältnis zueinander stehen. Die Agarosegelmatrix besteht aus vernetzten linearen Polymeren, der D-Galactose und der 3,6-anhydro-L-Galactose. In dieser Matrix wandert DNA im elektrischen Feld von der Anode zur Kathode. Das Wanderungsverhalten ist abhängig von der Konformation der Nukleinsäure, der Temperatur, dem pH-Wert und der Ionenstärke des Laufpuffers, der Feldstärke und der Geldichte, wobei kleinere Fragmente in der Regel schneller wandern als große. Die Agarosekonzentration der Gele wurde jeweils in Abhängigkeit von den zu erwartenden Fragmentgrößen zwischen 0,6 und 1,5% [w/v] gewählt.

Die entsprechende Agarosemenge wurde in 1 x TBE (oder 1 x TAE) aufgeköcht, auf ca. 60°C abgekühlt und in den vorbereiteten, horizontal nivellierten Gelträger gegossen. Nach Erstarren wurde das Gel in die Gelkammer eingesetzt und mit dem Laufpuffer 1 x TBE (oder 1 x TAE) überschichtet. Die aufzutragenden Proben wurden mit Gelladepuffer (5 x GEBS) gemischt und zusammen mit geeigneten Längenstandard- und Quantifizierungs-Markern aufgetragen. Durch das darin enthaltene Glycerin wird die Dichte der Probe erhöht und so ein herausdiffundieren aus der Geltasche verhindert. Ein Bromphenolblau-Zusatz erleichtert das Auftragen und markiert die Lauffront. Die Auftrennung erfolgte bei 100 V (gr. Gelkammer) bzw. 70 V (kl. Gelkammer). Das Gel wurde für 10 bis 30 Minuten in einem Ethidiumbromidbad (400 µg

EtBr / 300 ml Aqua dest.) gefärbt, das interkalierte Ethidiumbromid durch UV-Bestrahlung zur Fluoreszenz angeregt und die visualisierten Banden unter Verwendung des Herolab-Geldokumentationssystems EASY™ dokumentiert. Zur Abschätzung der Nukleinsäurefragmentlänge sowie zur semiquantitativen Konzentrationsbestimmung wurden DNA-Molekulargewichtsstandards verwendet (Fragmentgrößen jeweils in bp):

1 KB-DNA-Ladder: 12216 / 11198 / 10189 / 9162 / 8144 / 7126 / 6108 / 5090 / 4072 / 3054 / 2036 / 1636 / 1018 / 506 / 344 / 298 / 201 / 154 / 134 / 75

Das Fragment 1636 bp entspricht 10% der gesamt aufgetragenen Marker-DNA-Menge

λ-Hind III-Marker:

KB	DNA-Menge in x g Marker:		
	1 µg	500 ng	100 ng
23,1	480	240	48
9,4	195	97,5	19,5
6,5	135	67,5	13,5
(4,3)	(89)	(44,5)	(8,9)
2,3	48	24	4,8
2,0	41,6	20,8	4,16
0,5	10,4	5,2	1,04

Die Agarose-Gelelektrophorese von RNA erfolgte unter denaturierenden Bedingungen in einem Formaldehyd-haltigen Gel, um die Ausbildung von intramolekularen Sekundärstrukturen zu verhindern. Die Proben wurden 1:2 mit dem RNA-Auftragspuffer verdünnt, bei 65°C für 10 min denaturiert und zusammen mit dem RNA-Molekulargewichtsstandard (0,24-9,5 Kb RNA-Ladder) auf das 1%ige Agarosegel (1% [w/v] Agarose, 1 x RNA-Laufpuffer, 1,5% [v/v] Formaldehyd in DEPC-H₂O) aufgetragen. Die Auftrennung erfolgte bei 80 V. Anschließend wurde unter UV-Bestrahlung und Verwendung des Herolab-Geldokumentationssystems EASY™ der Gellauf dokumentiert und gegebenenfalls der Transfer der RNA mittels Northern-Blot (vgl. Kap. 2.2.1.19) durchgeführt.

2.2.1.4 Extraktion von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen

(Vogelstein and Gillesie, 1979 [246])

Die Isolierung und Aufreinigung elektrophoretisch aufgetrennter DNA-Fragmente aus Agarosegelen erfolgte unter Verwendung des Jetsorb-Gel Extraction Kits (Genomed) oder des GFX PCR, DNA and Gel Band Purification Kits (Pharmacia). Bei beiden Methoden wurden die DNA-Banden im Agarosegel unter UV-Licht mit einem Skalpell ausgeschnitten. Die so erhaltenen Gelstücke wurden aufgelöst, die DNA an eine Silicamatrix gebunden, gewaschen und anschließend eluiert. Die Durchführung erfolgte Angabe des jeweiligen Herstellers.

2.2.1.5 Phenol-Chloroform-Extraktion

(Wallace, 1987 [247])

Durch die Phenol-Chloroform-Extraktion werden störende Proteine und Lipide aus wässrigen Nukleinsäurelösungen entfernt. Phenol wirkt dabei denaturierend auf die Proteine, die sich in der Phenolfraktion bzw. an der Grenze der organischen zur wässrigen Phase (Interphase) anreichern. Chloroform unterstützt die Dissoziation von Proteinen und Nukleinsäuren, wirkt ebenfalls denaturierend und stabilisiert aufgrund seiner hohen Dichte die Phasentrennung. Daneben dient es der Extraktion der Lipide. Der nur zu einem geringen Anteil beigefügte Isoamylalkohol hat die Funktion, eine Schaumbildung bei der Durchmischung der beiden Phasen zu verhindern.

Der wässrige, nukleinsäurehaltige Reaktionsansatz wird mit einem einfachen Volumen Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol (25:24:1) versetzt, das Ganze gemischt und zur besseren Phasentrennung 1 min bei 15000 x g zentrifugiert. Die obere, wässrige Phase, die die Nukleinsäuren enthält, wurde in ein neues Gefäß transferiert, zur Entfernung von Phenolresten mit dem gleichen Volumen an Chloroform/Isoamylalkohol (24:1) versetzt und erneut zentrifugiert. Der nukleinsäurehaltige Überstand wurde dann vorsichtig abgenommen und einer Ethanol-fällung unterzogen.

2.2.1.6 Ethanol-fällung zur Präzipitation von Nukleinsäuren

(Wallace, 1987 [247])

Die Ethanol-fällung dient der Aufreinigung von Nukleinsäuren aus ethanolischen wässrigen Lösung durch sog. Aussalzen. Hierbei werden die Nukleinsäuren durch Salzzugabe in eine schwer lösliche Form überführt und aus der Lösung ausgefällt. Unterstützt wird der Prozess durch die geringe Polarität des Ethanols und durch einen Inkubationsschritt bei -70°C. Ein finaler Zentrifugationsschritt gewährleistet die Abtrennung der Nukleinsäuren von der überstehenden Lösung. Die Ethanolpräzipitation wird überwiegend zur Aufreinigung, Ankonzentrierung oder Umpufferung von DNA und RNA genutzt.

Die Fällung der Nukleinsäuren erfolgte durch Zugabe von 1/10 des Ausgangsvolumens einer 2,5 M Na-Acetatlösung und dem 2,5fachen Ausgangsvolumen an 96%igem eiskalten Ethanol bei -70°C innerhalb von 30 Minuten. Bei Ligationsansätzen, die nur eine geringe Menge DNA enthielten (unter 100 ng), wurde zusätzlich 1 µl Glycogenlösung (20 mg/ml) als Fällungsmittel zugegeben. Nach 20-30minütiger Zentrifugation bei 4°C und 15000 x g (Sepatech Biofuge 15R, Heraeus) wurde der Überstand vorsichtig dekantiert und verworfen. Das Pellet wurde mit gleichem Volumen 70%igem eiskalten Ethanol gewaschen, erneut für 15 min zentrifugiert und der Überstand ebenfalls verworfen. Anschließend wurde das Sediment zur Entfernung eventuell vorhandene Salze bis zu dreimal mit 70%igem Ethanol gewaschen und im Vakuum oder im Heizblock bei 37°C getrocknet. Die gefällte DNA wurde in Aqua dest., RNA in DEPC-H₂O unter mehrfachem vorsichtigem Resuspendieren gelöst. Bei RNA wurde zur besseren Löslichkeit eine Inkubation bei 55-65°C im Wasserbad für eine Dauer von 10-15 min angeschlossen.

2.2.1.7 Spaltung von DNA durch Restriktionsendonukleasen

Mit Restriktionsspaltung wird das sequenzspezifische Auftrennen von doppelsträngigen DNA-Molekülen mit Hilfe spezifischer Endonukleasen bezeichnet. Die Endonukleasen öffnen nach Erkennung einer bestimmten palindromen Sequenz, die meist aus 4 bis 6 Nukleotiden besteht, die dort bestehenden Phosphodiesterbindungen. Je nach Restriktionsenzym entstehen dabei entweder 3'- bzw. 5'-überhängende (kohäsive, "sticky") oder glatte ("blunt") Enden. Dieses Verfahren wird zur Vorbereitung von PCR-Produkten und Vektoren für die Klonierung genutzt, dient aber auch analytischen Zwecken z. B. der Überprüfung einer Schnittstelle oder eines Inserts.

Die Spaltungen wurden unter den Puffer- und Temperaturbedingungen durchgeführt, die der Hersteller für die Enzyme vorgab. Es wurden 10 U Restriktionsendonuklease pro μg DNA eingesetzt. In der Regel wurde ein Reaktionsvolumen von 10 bis 20 μl (Glycerinanteil max. 5%) gewählt und 1-2 h bei 37°C inkubiert. Die Inaktivierung der Enzyme erfolgte anschließend durch 20minütiges Erhitzen auf 65°C, GEBS-Zugabe oder Phenol-Chloroform-Extraktion.

2.2.1.8 Dephosphorylierung linearisierter Vektor-DNA

Simsek et al., 1973 [248]

Durch Restriktionsendonukleasen linearisierte Vektormoleküle neigen zur Rezirkularisierung, was eine Ligation mit dem Ziel der Einfügung zusätzlicher DNA-Abschnitte behindert. Deshalb wurde der linearisierte Vektor einer Behandlung mit einer alkalischen Phosphatase aus Kälberdarm (calf intestinal phosphatase = CIP) unterzogen, die am 5'-Ende dephosphoryliert. Da für die Religation mindestens eines der beiden Doppelstrangenden am 5'-Ende phosphoryliert sein muss, bleiben die CIP-behandelten Vektormoleküle im linearen Zustand.

Nach der Linearisierung des Vektors durch Restriktionsendonukleasen wird der Ansatz (Gesamtvolumen 100 μl) inaktiviert und anschließend mit 1 μl Phosphatase (10 U/ μl in Verdünnungspuffer) versetzt. Nach einer 30minütigen Inkubationszeit bei 37°C wurde das Enzym in einem einstündigen Reaktionsschritt bei 65°C unter Zugabe von 1 μl 0,5 M EDTA pH 8,0 inaktiviert und durch Zugabe von 25 μl 5 x GEBS abgestoppt. Anschließend wurde der Ansatz in eine Agarosegelelektrophorese eingesetzt.

2.2.1.9 Ligation

Brady & Timmis, 1983 [249]

Das Einbringen von DNA (Insert) in einen vorbereiteten Vektor bzw. die Verknüpfung der komplementären DNA-Stränge wird durch die T4-DNA-Ligase in Gegenwart von ATP katalysiert und als Ligation bezeichnet. Dabei werden Phosphodiesterbindungen zwischen freien 3'-OH-Gruppen und 5'-Phosphatgruppen gebildet. Um eine effektive Ligationsrate zu erzielen, wird einzufügende DNA bei einer "sticky-end"-Ligation in einem Verhältnis von 1:1, 1:3, 1:10 und 1:20 gegenüber der Vektor-DNA eingesetzt. Für die Ligation von glatten Enden

setzt man, da diese Reaktion mit geringerer Effizienz verläuft, das Insert in einem 10-20fachen Überschuss ein.

Für die Ligation wurde ein Reaktionsansatz von 10 bis 20 μl unter Verwendung von 40 U T4-DNA-Ligase in 1 x Ligasepuffer pipettiert und bei 16°C über Nacht inkubiert. Vor der Transformation in Bakterien wurde die DNA durch Ethanol-fällung aufgereinigt.

2.2.1.10 Herstellung elektrokompetenter Bakterien

500 ml LB-Medium wurden mit 25 ml einer Übernachtskultur des jeweiligen *E.coli*-Stammes angeimpft und bis zu einer OD_{550} von 0,5 bis 0,6 (mittlere exponentielle Wachstumsphase) bei 37°C unter Schütteln inkubiert. Nach Abkühlung der Zellen für 30 min auf Eis wurden sie bei 4°C und 2500 x g für 15 min abzentrifugiert. Auf Eis wurde das Zellsediment nach und nach in 500 ml eiskaltem autoklavierten Aqua dest. resuspendiert, erneut wie oben zentrifugiert, auf Eis in 250 ml autoklaviertem Aqua dest. resuspendiert und ein drittes Mal zentrifugiert. Diese Waschschriffe sind erforderlich, um die Bakterien zu entsalzen, da zur Vermeidung von Kurzschlüssen während der Elektroporation die Leitfähigkeit der Bakteriensuspension möglichst niedrig sein muß. Nach dem letzten Waschschriff wurde das Zellsediment in 20 ml eiskaltem 10% [v/v] Glycerin aufgeschwemmt, erneut bei 4°C und 2500 x g für 15 min zentrifugiert und schnell dekantiert. Die Zellen wurden dann in dem verbleibenden Volumen an Glycerinlösung resuspendiert, zu je 100 μl in vorgekühlten 0,5 ml Reaktionsgefäßen aliquotiert und bei -70°C eingefroren.

2.2.1.11 Transformation von Bakterien durch Elektroporation

Calvin and Hanawalt, 1988 [250]

Die Transformation von *E.coli* mit Vektoren zu deren Amplifizierung erfolgte ausschließlich mit Hilfe der Elektroporation, bei der die Membran durch kurze elektrische Pulse hoher Feldstärke für DNA-Moleküle durchlässig gemacht werden. 45 μl elektrokompetente Bakterien wurden auf Eis kurz aufgetaut, mit der vorbereiteten DNA (Ligationsansatz oder 5-10 ng Plasmid) vorsichtig vermischt und für 2 Minuten auf Eis inkubiert. Anschließend wurde der Reaktionsansatz in eine vorgekühlte Elektroporationsküvette überführt und elektroporiert. Dazu wurde der Widerstand auf 400 Ω , die Kondensatorkapazität auf 25 μF und die Ausgangsspannung auf 2,5 kV/cm eingestellt. Die elektroporierten Zellen wurden möglichst zügig in 1 ml SOC-Medium überführt und bei 37°C zur Stabilisierung und zur Ausbildung der Plasmidkodierten Antibiotikaresistenz 30-45 min im Schüttelinkubator inkubiert. Anschließend wurde der Ansatz mit LB-Medium unterschiedlich verdünnt, jeweils 50 μl der einzelnen Verdünnungen auf vorgewärmten Selektionsagarplatten ausplattiert und über Nacht bei 37°C inkubiert. Zur Ermittlung der Transformationseffizienz wurden die Platten am nächsten Tag ausgezählt.

2.2.1.12 Plasmid-DNA-Präparationen

(Birnboim and Doly, 1979 [251])

Es wurden verschiedene Plasmid-DNA-Präparationsmethoden durchgeführt, wobei sich die Wahl der Methode nach der gewünschten Reinheit und Menge der Plasmid-DNA richtete. Für die DNA-Gewinnung zur Transformationsüberprüfung von Bakterienklonen wurde die Plasmid-Minipräparation angewandt, für größere DNA-Mengen wurden die Midi- oder Maxipräparation durchgeführt. Beide Verfahren basieren auf einer alkalischen Lyse der plasmidhaltigen Bakterien und anschließender Isolierung der Plasmide.

Plasmid-Minipräparationen

Für eine Minipräparation wurden jeweils 5 ml LB-Amp-Medium mit dem entsprechenden Plasmid-tragenden Bakterienklon angeimpft und über Nacht bei 37°C im Schüttelinkubator inkubiert. 1,5 ml Übernachtskultur wurden in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt und für 2 min bei 13000 x g zentrifugiert (Sepatech Biofuge 15, Heraeus). Der Überstand wurde verworfen und weitere 1,5 ml der Kultur auf das Pellet sedimentiert. Anschließend wurde das Zellsediment auf Eis in 100 µl Lösung P1 bei 4°C resuspendiert und durch Zugabe von 200 µl Lösung P2 für 5 min bei RT lysiert. Die Neutralisation erfolgt durch Zugabe von 150 µl Lösung P3 bei 4°C, wobei hauptsächlich die Plasmid-DNA renaturiert. Zur Abtrennung von Protein-SDS-Komplexen, aggregierter chromosomaler DNA und hochmolekularer RNA wurde 10 min bei 4°C und 13000 x g zentrifugiert. Der Überstand wurde in ein neues Reaktionsgefäß überführt und erneut zentrifugiert. Zur weiteren Aufreinigung wurde er nach Verwerfen des Überstandes mit 400 µl Phenol-Chloroform-Isoamylalkohol extrahiert (vgl. Kap. 2.2.1.6). Die Fällung der Plasmid-DNA erfolgte für 30 min bei -70°C in 800 µl Isopropanol. Nach 30 minütiger Zentrifugation bei 4°C und 13000 x g wurde das Sediment mit 1 ml 70%igem Ethanol gewaschen. Das DNA-Sediment wurde vakuumgetrocknet, in 20 µl Ampullenwasser resuspendiert und für mindestens 30 Minuten bei RT gelöst.

Die Mini-Präparation wurde zum Teil auch mit Hilfe des NucleoSpin-Systems (Macherey-Nagel, Düren, D) nach Herstellerangaben durchgeführt. Bei diesem schnelleren Verfahren erfolgt die Auftrennung über eine Säule. Zusätzlich beinhaltet sie einen RNase-Schritt. Aus Kostengründen wurde jedoch in den meisten Fällen die normale Minipräparation bevorzugt.

Plasmid-Midi- und Maxipräparationen

Zur Gewinnung größerer Mengen Plasmid-DNA mit einem hohen Reinheitsgrad für präparative Zwecke (Klonierung, Sequenzierung, Transformation, Transfektion) wurden Plasmid-Midi- bzw. Maxipräparationen mit kommerziellen Kits (Qiagen) laut Herstellerprotokoll durchgeführt. Für die Midipräparation wurden 100 ml *E. coli*-Übernachtskultur alkalisch lysiert, das Lysat wurde über spezielle Silicagel-Anionenaustauschersäulen aufgereinigt, mit Isopropanol gefällt, mit 70%igem Ethanol gewaschen und das Sediment in 250 µl Aqua dest. aufgenommen. Für die Maxipräparation wurden stattdessen 300 ml Übernachtskultur eingesetzt.

2.2.1.13 Präparation von genomischer DNA

Für die Gewinnung genomischer DNA wurden Zellen der entsprechenden Linie in einer 75 cm²-Zellkulturflasche herangezüchtet, trypsinisiert, zweimal mit PBS gewaschen und anschließend in einem Eppendorff-Reaktionsgefäß 10 min bei 1000 x g pelletiert. Das Zellsediment (etwa 1 x 10⁷ Zellen) wurde in 200 µl 100 mM NaCl-Lösung aufgenommen. Anschließend werden 20 µl Proteinase K und 180 µl Lysis Puffer zugegeben und der Ansatz für 2½ Stunden bei 55°C im Thermoschüttler inkubiert. Die weitere Aufarbeitung erfolgte nach den Herstellerangaben des verwendeten QIAamp-Tissue-Kits. Die genomische DNA wurde mit 100 µl Ampullenwasser eluiert.

Die Konzentrationsbestimmung der genomischen DNA erfolgte photometrisch und ergab Konzentrationen von 599 ng/µl für M0 (Ratio 1,990), 490 ng/µl für M1 (Ratio 1,944) und 671 ng/µl für M5 (Ratio 2,015), wobei die DNA in jeweils 50 µl Volumen aufgenommen war.

Dabei wurden die nachfolgenden Bedingungen für die PCR verwendet:

0,5 µl Taq-Polymerase	10 s 94°C	
10,0 µl Taq-Puffer	180 s 94°C	1x
1,0 µl Primer Sett 009 (20 pmol)	10 s 94°C	
1,0 µl Primer Sett 010 (20 pmol)	60 s 94°C	
1,0 µl dNTPs (20 mM)	10 s 56°C	
10,0 µl genomische DNA (2ng)	60 s 56°C	
76,5 µl aqua dest.	10 s 72°C	
100,0 µl Ansatz	60 s 72°C	35x
	10 s 72°C	
	600 s 72°C	1x

2.2.1.14 Photometrische Bestimmung der Konzentration von Nukleinsäuren

(Berger, 1987 [252])

Die Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren erfolgt photometrisch über die Messung der optischen Dichte (OD) bei einer Wellenlänge von 260 nm. Unter Einbeziehung des entsprechenden Extinktionskoeffizienten ϵ , der Schichtdicke der verwendeten Quarzküvette und der Verdünnung konnte die Konzentration aus der OD bei 260 nm berechnet werden. Über die Bestimmung der Extinktion bei 280 nm erhält man eine Aussage über die Proteinkontaminationen in der Lösung und damit über die Reinheit der Nukleinsäure. Der Quotient OD_{260nm}/OD_{280nm} sollte bei DNA im Bereich zwischen 1,8-1,9 und bei RNA zwischen 1,9-2,0 liegen. Da aus messtechnischen Gründen nur OD-Werte zwischen 0,1 bis 1 aussagekräftig sind, wurde die Extinktion gegebenenfalls in einer anderen Verdünnung erneut bestimmt.

2.2.1.15 DNA-Sequenzierung

Während der PCR kann es zum Auftreten von unerwünschten Mutationen in den amplifizierten DNA-Sequenzen kommen. Deshalb wurden alle Bereiche der generierten Plasmide, die durch Amplifikation entstanden sind, durch Sequenzierung überprüft. In Einzelfällen erfolgte

die Sequenzierung aus genomischer DNA. Alle Sequenzierungen wurden von kommerziellen Sequenzierunternehmen (SeqLab, Göttingen, D; GATC, Konstanz, D) durchgeführt.

2.2.1.16 Präparation von Gesamt-RNA

(Chomczynski and Sacchi, 1987 [253])

Um eine Kontamination der RNA durch RNAsen zu verhindern, wurden grundsätzlich alle RNA-Arbeiten an einem gesonderten Platz mit extra für diesen Zweck reservierten Materialien und Substanzen durchgeführt. Die Präparation von Gesamt-RNA aus humanen Zelllinien erfolgte unter Verwendung von Trizol-Reagenz nach den Angaben des Herstellers. Trizol ist ein Gemisch aus Phenol und Guanidiniumthiocyanat, welches die Zellen lysiert, dabei RNAsen hemmt und die Integrität der RNA nicht beeinträchtigt. Die RNA wird aus dieser Lösung durch Phenol-Chloroform-Extraktion und anschließende Isopropanolpräzipitation isoliert.

Für die Voruntersuchungen zur C3aR-vermittelten Regulation auf RNA-Ebene wurden HMC-1-Zellen zu einer Dichte von jeweils $0,75 \times 10^7$ Zellen/ml in je 20 ml Medium in zwei mittleren Zellkulturflaschen (75 cm^2 Wachstumsfläche, 250 ml) ausgesät. Zwei Tage später wurden die Zellen einer Flasche mit einem Gemisch aus C3a (100 nM Endkonzentration im Ansatz) und C5a (20 nM Endkonzentration im Ansatz) stimuliert. Dabei erfolgte die Zugabe des entsprechenden Volumens (39,8 μl) an Liganden-Gemisch direkt ins Zellkulturmedium. Anschließend wurden die Zellen 2 mal vorsichtig resuspendiert und wieder zurück in den Brutschrank gestellt. Mit den Zellen der zweiten Zellkulturflasche wurde genauso verfahren, wobei anstelle des Liganden-Gemischs mit Medium stimuliert wurde. Nach drei Stunden wurde diese Prozedur wiederholt und nach einer weiteren Stunde, also nach insgesamt 4 h Stimulationszeit bei 37°C wurden die Zellen geerntet.

Zur RNA-Gewinnung wurden von beiden Ansätzen jeweils 1×10^7 Zellen mit 3 ml Trizol-Reagenz versetzt, vermischt und zur vollständigen Dissoziation der Nukleoproteinkomplexe 5 min bei RT inkubiert. Nach Zugabe von 1,2 ml Chloroform und 2minütiger Inkubation bei RT erfolgte zur Phasentrennung eine Zentrifugation bei $12000 \times g$ und 4°C für 15 min. Die RNA-haltige, nahezu farblose obere Phase wurde in ein neues Reaktionsgefäß überführt, mit 3 ml Isopropanol unter Zusatz von 2-5 μg Glykogen für 10 min bei RT gefällt und für 10 min bei $12000 \times g$ und 4°C zentrifugiert. Anschließend wurde das RNA-Sediment mit 6 ml 70%igem Ethanol gewaschen, bei 37°C im Heizblock getrocknet, in etwa 30 μl DEPC- H_2O aufgenommen und zum Lösen der sedimentierten RNA 10 min bei $55\text{-}65^\circ\text{C}$ im Wasserbad inkubiert. Die Bestimmung der Konzentration erfolgte photometrisch.

2.2.1.17 Herstellung Digoxigenin (DIG)-markierter RNA-Sonden

Zur Herstellung DIG-markierter RNA-Sonden wurde die Matrizen-DNA über *in vitro* Transkription in RNA umgeschrieben und dabei durch den Einbau DIG-markierter UTP-Nukleotide markiert. Es wurden ausschließlich Antisense-Sonden hergestellt unter Verwendung des DIG RNA Labeling Kits SP6/T7. Die als Matrizen dienende Plasmid-DNA wurde durch Restriktionsspaltung linearisiert. Dabei wurden Enzyme verwendet, die 5'-Überhänge erzeugen, um die Transkription unerwünschter Sequenzen zu vermeiden. Anschließend wurde

die linearisierte DNA-Matrize durch Phenol-Chloroform-Extraktion und Ethanol-fällung aufgereinigt. Der *in vitro* Transkriptionsansatz mit ca. 1,5 µg linearisierter DNA und 20 µl Gesamtvolumen wurde gemäß den Anweisungen des Herstellers angesetzt und 2 h bei 37°C inkubiert. Die DNA wurde im Anschluß durch Verdau mit 2 U RQ₁-DNase für 15 min bei 37°C entfernt. Es folgte zur Aufreinigung der Sonde eine Präzipitation durch Zugabe von 25 µl Lithiumchlorid-Lösung, 200 µl 96%igem eiskaltem Ethanol und 30 µl DEPC-H₂O. Nach 30-60minütiger Inkubation bei -70°C wurde für 20 min bei 15000 x g und 4°C zentrifugiert und das RNA-Sediment einmal mit 70%igem eiskaltem Ethanol gewaschen. Die RNA-Sonde wurde bei 37°C im Heizblock getrocknet und in 100 µl DEPC-H₂O gelöst. Die Überprüfung der RNA-Sonde erfolgte gelelektrophoretisch.

2.2.1.18 Northern-Transfer

Thomas, 1980 [254]

Beim Northern-Transfer wird RNA nach elektrophoretischer Auftrennung aus der Gelmatrix auf eine Nylonmembran übertragen und immobilisiert, wobei das ursprüngliche Trennmuster der RNA-Moleküle erhalten bleibt. Dazu wurden 10–15 µg Gesamt-RNA aufgetrennt und das Gel fotografisch dokumentiert. Anschließend wurde das Gel für 20 min in 20 x SSC äquilibriert. Der Transfer der RNA erfolgte durch Diffusionsblotting unter Ausnutzung der Kapillarkräfte. Auf eine ca. 10 cm hohe Schicht aus Saugpapier wurden vier Blätter trockenes Whatman 3MM Filterpapier und ein Blatt in 20 x SSC getränktes Whatman 3MM Filterpapier gelegt. Anschließend folgte die ebenfalls in 20 x SSC getränkte Nylonmembran, das Gel, vier in 20 x SSC getränkte Blätter Whatman 3MM Filterpapier und ein Blatt 5MM Whatman Filterpapier als Verbindung zu dem auf ca. 10 cm erhöhten Pufferreservoir mit 20 x SSC. Der Transfer erfolgte für 16–24 h bei RT. Zur Immobilisierung wurde die RNA bei 1200 mJ für 1 min UV-kreuzvernetzt und anschließend für 20 min bei 80°C getrocknet. Nach dem Blotten wurde das RNA-Gel erneut zur Kontrolle fotografiert.

2.2.1.19 Hybridisierung mit DIG-markierten Sonden

Nach dem Northern-Transfer wurde die Nylonmembran, möglichst ohne Luftblasen zu erzeugen, in eine Hybridisierungsröhre überführt und bei 65–68°C in Hybridisierungspuffer für 1 h prähybridisiert. Anschließend wurde die DIG-markierte RNA-Sonde (1:1000 Verdünnung) zugegeben und für 18–24 Stunden bei 65–68°C hybridisiert. Die Nylonmembran wurde dann für zweimal 5 min in 2 x SSC, 0,1% SDS bei RT und zweimal 15 min in 0,1 x SSC, 0,1% SDS bei 70°C gewaschen.

2.2.1.20 Immunologischer Nachweis von DIG mit CSPD

Der immunologische Nachweis von DIG erfolgte über einen mit alkalischer Phosphatase konjugierten anti-DIG-Antikörper und CSPD als Chemilumineszenz-Substrat. Dabei führt die enzymatische Dephosphorylierung von CSPD durch die alkalische Phosphatase zu einer Lichtemission, durch die ein Röntgenfilm belichtet wird.

Die nach der Hybridisierung gewaschene Nylonmembran wurde für 2 min bei RT in Maleinsäurepuffer äquilibriert, für 30 min in 1% Blockierungsreagenz bei RT abgesättigt und für

30-60 min mit einem anti-DIG-Alkaline Phosphatase-Antikörper (1:10000 in 1% Blockingreagenz) inkubiert. Nach zweimaligen Waschen für 15 min mit Maleinsäurepuffer bei RT wurde die Membran für 2 min im CSPD-Detektionspuffer äquilibriert und dann für 2 min in einer Plastiktüte mit 1:100 in CSPD-Detektionspuffer verdünntem CSPD vorsichtig geknetet. Die Membran wurde anschließend für 30 min bei 37°C inkubiert, für verschiedene Zeiten auf einen Röntgenfilm gelegt und dieser dann entwickelt.

2.2.1.21 Atlas cDNA Expression Array

Dieses Testsystem bietet die Möglichkeit, verschiedene Gewebe oder Zelllinien in ihrer mRNA-Zusammensetzung zu vergleichen. Sie eignet sich auch zur Erfassung transkriptioneller Regulationsvorgänge. So können z. B. Zellen, die mit unterschiedlichen Liganden stimuliert wurden auf mRNA-Ebene verglichen werden. Das Testverfahren basiert auf der Methode des Southern-Blot, wobei jedoch keine Gelelektrophorese erfolgt. Als markierte Probe wird cDNA eingesetzt, die durch reverse Transkription aus Gesamt- bzw. poly(A)⁺-RNA der gewünschten Zellen gewonnen wird. Die für die Hybridisierung eingesetzte Nylon-Membran ist mit einer großen Anzahl an unterschiedlichen DNA-Fragmenten versehen. Zusätzlich zu 1176 DNA-Fragmenten von transkriptionell regulierten Genen sind DNA von neun sog. Haushaltsgenen zur Positivkontrolle, Fragmente aus Plasmid- und Phagen-DNA zur Negativkontrolle und genomische DNA zur Überprüfung der Probe auf Verunreinigungen mit genomischer DNA auf die Membran aufgebracht. Die Synthese der cDNA findet über eine reverse Transkription mit spezifischen Primern statt, wobei sie radioaktiv oder nicht-radioaktiv markiert werden kann. Abhängig von der in den Zellen vorhandenen Menge an mRNA entstehen bei der anschließenden Hybridisierung der Membran mit dieser Sonde mehr oder weniger starke Signale, die radioaktiver Markierung durch eine Auswertung mit einem Phospho-Imager digitalisiert und im Anschluß daran mit Hilfe der Signale der Haushaltsgene quantifiziert werden. Es wurde das Atlas cDNA Expression Array Atlas human 1.2 der Fa. Clontech (Clontech, Heidelberg, D) unter Einsatz ³²P-markierte cDNA-Sonden verwendet.

Der Einsatz im Atlas Array fordert eine hohe Reinheit der eingesetzten, präparierten RNA. Zur Beseitigung von DNA-Verunreinigungen wurde deshalb zunächst eine einstündige DNase-Behandlung durchgeführt. Dazu wurden ca. 500 ng RNA mit 100 µl 5 x first strand Puffer des SuperscriptTM-Kits und 50 U RQ1 DNase I in einem 1 ml Ansatz versetzt und für 1 h bei 37°C inkubiert. Durch Zugabe von 20 µl 0,5 M EDTA-Lösung pH 8,0 wurde die Reaktion abgestoppt. Anschließend wurden dem Ansatz Trizol zugegeben und wie bei der Herstellung von Gesamt-RNA (vgl. Kap. 2.2.1.17) verfahren.

Die weiteren Schritte wie die reverse Transkription der RNA, die anschließende Aufreinigung der generierten cDNA, die Hybridisierung der Atlas Array Membran und die Waschschritte erfolgten in Zusammenarbeit mit einem weiteren Mitglied unserer Arbeitsgruppe, Frau Dipl. Biochem. Simone Hess, an der GBF in Braunschweig. Aufgrund der Komplexität der Array-Auswertung und da dieser Versuch nur einmalig durchgeführt wurde, wurde sie von Frau Dipl. Biochem. Simone Hess durchgeführt.

2.2.2 Zell- und Immunbiologische Methoden

2.2.2.1 Ammoniumchloridlyse zur Aufarbeitung von Vollblut für durchflusszytometrische Analysen

Für den Einsatz in die Durchflusszytometrie wurde von gesunden Spendern gewonnenes Vollblut (in EDTA-Monovetten) in einem Verhältnis von 1:10 mit Ammoniumchloridlösung (0,83% in PBS) verdünnt und für 30 Minuten bei 37°C inkubiert. Anschließend wurden die so lysierten Erythrozyten durch 10minütige Zentrifugation bei 500 x g und 4°C entfernt. Nach zwei Waschschrritten mit 4°C kaltem BPS wurden die nicht lysierten Blutzellen auf eine Zellzahl von 1×10^7 /ml in DMEM eingestellt. Die Auswahl einzelner Zellpopulationen erfolgte über die spezifische Anfärbung mit CD-Markern und die anschließende Eingrenzung mit Hilfe von Gates.

2.2.2.2 Präparation von mononukleären Zellen

Für die Präparation von Monozyten wurden 30 ml ACD-Blut oder alternativ 30 ml 1:5 in PBS verdünnter "buffy coat" von gesunden Blutspendern (Blutbank, Medizinische Hochschule Hannover, D) in einem 50 ml Polypropylenröhrchen über 20 ml Ficoll-Paque™ geschichtet. Nach 25 min Zentrifugationszeit bei 600 x g und RT wurde die Bande der mononukleären Zellen vorsichtig abgenommen und 2 mal in eiskaltem PBS gewaschen. Anschließend wurden sie in einer Dichte von 1×10^7 Zellen/ml in RPMI 1640-Medium resuspendiert.

2.2.2.3 Zellkultur

Von jeder Zelllinie wurden direkt nach Erwerb (z. B. von ATCC) bzw. direkt nach ihrer Generierung (stabilen Zelllinien) Aliquots in einer Mischung aus 70% des entsprechenden Zellkulturmediums, 20% FCS und 10% DMSO im Stickstofftank bei 196°C konserviert. Um für alle Versuche einen möglichst identischen Phänotyp zu garantieren, wurde eine aufgetaute Zellcharge nicht länger als zwei Monate in Kultur gehalten. Zur Sicherung des Bestands wurde spätestens nach der zweiten Passage dieser aufgetauten Zellen ein neues Aliquot eingefroren.

Die Kultivierung der Zelllinien erfolgte unter sterilen Bedingungen in Standardzellkulturflaschen in einem Brutschrank bei 37°C in einer feuchten Atmosphäre mit 5% CO₂. Zum Schutz vor Kontaminationen wurden die Arbeiten grundsätzlich an einer sterilen Werkbank, einem sog. Flow, durchgeführt. Zusätzlich wurden den Kulturmedien Antibiotika (Penicillin und Streptomycin) zugesetzt. Alle verwendeten Lösungen und Arbeitsgeräte wurden vor Gebrauch sterilisiert.

Die Zellkulturflaschen für adhärenente und Suspensionszellen unterscheiden sich in der Beschaffenheit ihrer Wachstumsfläche und sind durch verschiedenfarbige Deckel gekennzeichnet. Für Erhaltungskulturen der einzelnen Zelllinien wurden grundsätzlich 250 ml Zellkulturflaschen (75 cm² Oberfläche) verwendet. Adhärenente Zellen bilden einen Monolayer am Gefäßboden aus, der für optimale Wachstums- und Versuchsbedingungen maximal 75% der Wachstumsfläche bedecken sollte. Die Zelldichte von Suspensionszellen sollte höchstens bei

1×10^6 Zellen pro ml Medium liegen. Nach drei bis vier Passagen wurden die Zellkulturen zur Vermeidung von Kontaminationen in eine neue Zellkulturflasche überführt.

Die Erhaltungskulturen von adhärennten Zelllinien (RBL-2H3-, HeLaT- und HEK-293-Zellen) wurden alle zwei bis drei Tage subkultiviert. Dazu wurde zunächst das Medium entnommen, der Zellrasen mit 10 ml PBS gewaschen und mit einer Trypsin-EDTA-Lösung überspült, die bis auf einen Film auf dem Zellrasen sofort wieder abgenommen wurde. Die so vorbehandelten Zellen wurden für ca. 10 min bei 37°C im Brutschrank inkubiert und anschließend durch manuelles, kräftiges Klopfen an der Zellkulturflasche von der Oberfläche abgelöst. Durch Zugabe von 10 ml PBS in die Zellkulturflasche wurden die restlichen Zellen abgespült und alle Zellen resuspendiert. Von dieser Zellsuspension verblieb 1 ml in der Flasche, die anschließend mit 19 ml Medium aufgefüllt und wieder in den Brutschrank gestellt wurde. Die restliche Zellsuspension wurde entweder verworfen oder für die Anzucht der Zellen in weiteren Zellkulturflaschen (je nach Versuch) genutzt. Das Trypsin aus der Trypsin-EDTA-Lösung fördert dabei aber nicht nur das Ablösen der Zellen, sondern greift auch die Rezeptoren auf der Zelloberfläche an. Für die Ernte der Zellen zu Versuchszwecken wurde deshalb eine nicht enzymatische Lösung, die sog. Cell-Dissociation-Solution (CDS) benutzt, wobei allerdings eine verlängerte Inkubationszeit von 15-20 Minuten erforderlich war. Die resuspendierten Zellen wurden bei 200 x g innerhalb von zehn Minuten sedimentiert, zweimal mit PBS gewaschen und anschließend in einem bestimmten Volumen an einem geeigneten Puffer (je nach Versuch) aufgenommen.

Für die Passage von Suspensionszellen (HMC-1) wurden die Zellen in dem vorhandenen Medium resuspendiert, 19 ml Suspension entnommen und durch 19 ml neuen Mediums ersetzt. Zur Ernte für Versuche wurden die Zellen vorsichtig resuspendiert und abzentrifugiert. Auch hier erfolgten zwei Waschschrte, ehe die Zellen in einem bestimmten Volumen in einem geeigneten Puffer (je nach Versuch) aufgenommen wurden.

Für die Bestimmung der Zellzahl wurden die Zellen nach dem ersten Waschschrte in einem definierten Volumen PBS resuspendiert und ein Aliquot entnommen. Mit Zellen aus diesem Aliquot erfolgte nach einer Vitalfärbung mit Trypanblau die Zählung in einer Neubauer-Zählkammer unter dem Lichtmikroskop.

2.2.2.4 Transiente Transfektion

Die Transiente Transfektion ist eine Methode zum Einbringen von Plasmid-DNA in eukaryonte Zellen, bei der die Plasmid-DNA nicht in das Genom integriert wird. In Abhängigkeit der verwendeten Zelllinien und der durchzuführenden Versuche wurden die transienten Transfektionen entweder nach der Calciumphosphat-Technik oder nach der Liposomen-Technik unter Verwendung von Lipofectamin bzw. von Effecten unter Berücksichtigung des Herstellerprotokolls durchgeführt. Die aufgenommene DNA ist in der Zelle nur wenige Tage vorhanden, da sie Abbauvorgängen unterliegt.

Calciumphosphat-Technik:

Einen Tag vor der Transfektion wurden 1×10^6 Zellen pro Vertiefung einer 6-Loch-Kulturplatte ausgesät. Am folgenden Tag wurden $10 \mu\text{g}$ Plasmid-DNA mit $1 \times \text{TE}$ auf $105 \mu\text{l}$ aufgefüllt. Unter Belüftung mit einer Pasteurpipette erfolgte eine Zugabe von $15 \mu\text{l}$ 2 M CaCl_2 . Anschließend erfolgte eine Zugabe von $120 \mu\text{l}$ (gleiches Volumen) an $2 \times \text{HBS}$ -Puffer. Nach 45minütiger Inkubation bei RT wurde der Transfektionsansatz auf die zuvor mit $2,5 \text{ ml}$ Opti-MEM überschichteten Zellen gegeben. Zum Abstoppen der Reaktion erfolgte 5 h später ein Mediumwechsel mit 3 ml Opti-MEM. Ungefähr 72 Stunden nach der transienten Transfektion wurden die Zellen in die Versuche eingesetzt. Für umfangreichere Versuche erfolgte die transiente Transfektion in Zellkulturflaschen. Dazu wurden die Volumina entsprechend der Wachstumsflächen der jeweils verwendeten Zellkulturgefäße berechnet. Für eine durchflusszytometrische Untersuchung war diese Methode weniger geeignet, da die einzelnen Zellen erfahrungsgemäß nur wenig Rezeptoren an der Oberfläche exprimierten.

Transiente Transfektion mit Lipofectamine:

5×10^6 Zellen wurden einen Tag vor der Transfektion in einer 75 cm^2 -Kulturflaschen ausgesät. Am folgenden Tag wurden $6 \mu\text{g}$ Plasmid-DNA mit $600 \mu\text{l}$ Opti-MEM vermischt und in ein Reaktionsgefäß mit $36 \mu\text{l}$ Lipofectamine und $600 \mu\text{l}$ Opti-MEM überführt. Nach Inkubation für 30 min bei RT wurde der Ansatz mit 5 ml Opti-MEM aufgefüllt und den zuvor zweimal mit 10 mM PBS gewaschenen Zellen zugesetzt. Nach 5stündiger Inkubation bei 37°C wurde die Transfektion durch Zugabe von 5 ml Stopplösung beendet. Zwei bis drei Tage nach der transienten Transfektion wurden die Zellen in die Immunfluoreszenz oder in durchflusszytometrische Analysen eingesetzt. Für kleiner oder größere Ansätze wurden die Mengen wieder an die Zellwachstumsfläche der verwendeten Kulturgefäße angepasst. Diese Methode wurde für die transiente Transfektion von HEK-293-Zellen hauptsächlich angewendet.

Transiente Transfektion mit Effectene:

Am Vortag der Transfektion wurden pro Vertiefung einer 6-Loch-Kulturplatte 2×10^6 Zellen in $1,6 \text{ ml}$ Kulturmedium vorgelegt. Für die Transfektion wurden 200 ng Plasmid-DNA mit Puffer EC (Qiagen) auf $100 \mu\text{l}$ aufgefüllt, mit $8,2 \mu\text{l}$ Enhancer (Qiagen) versetzt und für 5 min bei RT inkubiert. Dann wurden $10 \mu\text{l}$ Effectene zugegeben. Nach 10–15minütiger Inkubation wurden $600 \mu\text{l}$ Kulturmedium zugeführt, und der Ansatz wurde auf die Zellen gegeben. 18 h nach der transienten Transfektion erfolgte ein Mediumwechsel. Ungefähr 72 Stunden nach der Transfektion wurden die Zellen in die jeweiligen Versuche eingesetzt. Für umfangreichere Versuche erfolgte die transiente Transfektion in Zellkulturflaschen, wobei die verwendeten Mengen entsprechend der Wachstumsflächen berechnet wurden. Diese Methode wurde zu meist für die transiente Transfektion von HeLaT-Zellen gewählt.

2.2.2.5 Stabile Transfektion

Als stabile Transfektion bezeichnet man das dauerhafte Einbringen einer DNA in das Genom einer Zelle. Die Wahrscheinlichkeit für die Integration der DNA ins Genom liegt bei etwa 10^{-4} , d. h. nur eine Zelle von zehntausend wird stabil transfiziert. Im Gegensatz zur transienten Transfektion wird linearisierte DNA eingesetzt, die sich besser integrieren lässt. Die effizien-

teste Technik zum Einschleusen von DNA ist die Elektroporation, bei der durch ein starkes elektrisches Feld die Membran der eukaryonten Zelle kurzfristig perforiert wird, so dass die DNA durch die Poren in die Zelle diffundieren kann. Es ist allerdings eine größere DNA-Menge als bei der transienten Transfektion erforderlich. Die ausschließliche Proliferation der stabil transfizierten Zellen wird über ein Selektionsgen erreicht, das auf der transfizierten DNA kodiert ist, z. B. das Gen für die Aminoglykosid-Phosphotransferase, welches den transfizierten Zellen eine Resistenz gegen Geneticin (G-418) verleiht. Nach der Transfektion werden die Zellen für zwei Teilungen in nichtselektivem Medium kultiviert. Anschließend stellt man auf ein selektives Medium mit G-418 um, in dem nur die Zellen überleben, die DNA aufgenommen haben. Von diesen Zellen überleben nur diejenigen die nächsten Wochen, die die transfizierte DNA ins Genom integriert haben. Nach etwa zehn Tagen beginnt man mit der klonalen Selektion. Die ausplattierten Zellen werden alle ein bis zwei Tage optisch auf Klone überprüft. Entdeckte Klone wurden am Mikroskop überprüft, Einzelklone gepickt und unter ständigem Selektionsdruck kultiviert. Die einzelnen Klone wurden durchflusszytometrisch bezüglich ihre Rezeptorexpression überprüft. Die Etablierung einer stabilen Zelllinie nach diesem Verfahren dauert ca. zwei bis drei Monate.

Für die stabile Transfektion von RBL-2H3-Zellen mit den verschiedenen C-terminalen Austauschmutanten wurde unter sterilen Bedingungen jeweils eine große Zellkulturflasche (175 cm²) mit RBL-2H3-Zellen zum Ablösen trypsinisiert, einmal mit PBS, ein weiteres mal mit Serum-freien Medium gewaschen und anschließend in Serum-freien DMEM (mit P/S) aufgenommen. Die Zellzahl wurde auf $1,25 \times 10^6$ Zellen pro ml eingestellt. Eine verschließbare Elektroporations-Küvette wurde mit 0,8 ml dieser Zellsuspension steril befüllt. Nach Zugabe von 20 µg des entsprechenden, unter sterilen Bedingungen vorbereiteten Vektors wurde das Ganze vorsichtig mit Hilfe einer Pasteurpipette gemischt, ebenfalls unter sterilen Bedingungen. Nach einer 30minütigen Inkubationszeit auf Eis erfolgte die Elektroporation bei 0,25 kV und 975 µF nach dem Protokoll von P. N. Monk (Krebs Institut for Biomolecular Research, Dep. of Molec. Bio. & Biotec., Sheffield, UK). Der Elektroporation schloss sich eine zweite Inkubation für 30 Minuten auf Eis an. Anschließend wurde die elektroporierte Zellsuspension (0,8 ml) unter der Sterilwerkbank in 100 ml DMEM mit 10% FCS und P/S verdünnt. Jeweils 10 ml dieser verdünnten Suspension (100 ml Gesamtvolumen) wurde für die Ausplattierung eine 96-Loch-Platte verwendet, so dass insgesamt zehn Platten ausplattiert wurden. Am nächsten Tag erfolgte ein Mediumwechsel, indem das vorhandene mit Hilfe einer Saugvorrichtung abgesaugt und mit einer 10 ml Pipette neues Medium mit 20% FCS, P/S und 1000 µg/ml G-418 zugetropft wurde. Nach einer Woche erfolgte ein weiterer Mediumwechsel, diesmal mit DMEM mit 10% FCS, P/S und 1000 µg/ml G-418. Nach etwa 10-14 Tagen wurden die ersten Klone gepickt und in 24-Loch-Platten überführt. Die weitere Kultivierung erfolgte danach in kleinen Zellkulturflaschen (25 cm²). Diese Einzelklone der verschiedenen Rezeptormutanten wurden in einem Screeningverfahren getestet, bei dem mit Hilfe der Fluoreszenzdurchflusszytometrie der jeweilige Expressionslevel des mutierten C3a-Rezeptors ermittelt wurde. Für die genauere Charakterisierung wurden von jeder Rezeptormutante jeweils drei Klone mit unterschiedlichem Expressionslevel ausgewählt. Die ausgewählten Klone wurden bei -196°C im Stickstofftank eingefroren und so für die weiteren Arbeiten gesichert.

2.2.2.6 ¹²⁵Iod-Ligandenbindung

Die ¹²⁵Iod-Ligandenbindung ist ein radioaktives Verfahren zur Überprüfung der spezifischen Ligandenbindungsfähigkeit von Rezeptoren, die auf der Zelloberfläche exprimiert sind. Sie wurde zur Überprüfung der Rezeptorexpression bei stabil transfizierten RBL-2H3-Zellen und transient transfizierten HEK-293-Zellen eingesetzt und von unserer MTA Frau Claudia Rheinheimer bzw. Herrn cand. med. Henning Hamacher zumeist als ¹²⁵I-C3a-Zweipunktbindung durchgeführt.

2.2.2.7 Kompetitive Bindungsstudien

Zur Bestimmung der Rezeptoraffinität und der Rezeptorzahl pro Zelle wurden kompetitive Bindungsstudien mit konstanter Konzentration an ¹²⁵Iod-markiertem Liganden und unterschiedlichen Konzentrationen an nichtmarkiertem Liganden an einer definierten Zellmenge durchgeführt. Die Bindungsstudien wurden bei 4°C durchgeführt zur Vermeidung Ergebnisverfälschender Regulationsprozesse wie Internalisierung, Reexpression oder Ligandenprozessierung. Durch steigende Konzentrationen an unmarkiertem Liganden wird schon gebundener ¹²⁵Iod-markierter Ligand von den Bindungsplätzen der an der Oberfläche der Membran exprimierten Rezeptoren verdrängt. Es kommt zu einer Abnahme der messbaren zellassoziierten Radioaktivität. Die Radioaktivität wurde sowohl mit Hilfe eines β - wie auch eines γ -Counters gemessen und die erhaltenen Bindungsdaten unter Verwendung der Software Ligand™ ausgewertet. Die Rezeptorzahlen pro Zelle wurden aus B_{\max} errechnet. Die kompetitiven Bindungsstudien wurden ebenfalls von Henning Hamacher durchgeführt.

2.2.2.8 Glukosaminidase-Release-Assay (GARA)

Die Liganden-Stimulus-abhängige Glucosaminidase-Freisetzung aus stabil mit C3aR-Mutanten transfizierten RBL-2H3-Zellen wurde mit Hilfe einer nachgeschalteten, Substratgekoppelten Farbreaktion photometrisch bestimmt. Der Test wurde nach einem modifizierten Protokoll von Gerard et al. [255] in Mikrotiterplatten durchgeführt.

Die geernteten Zellen wurden auf eine Konzentration von 1×10^7 Zellen/ml mit HAG-CM-Puffer eingestellt und genau 20 min bei 37°C äquilibriert. In der Zwischenzeit wurden in einer Mikrotiterplatte je 30 μ l einer geeigneten Stimulus-Verdünnungsreihe in Mehrfachwerten vorgelegt, mit je 10 μ l Cytochalasin B (20 μ g/ml HAG-CM) versetzt und ebenfalls auf 37°C vorgewärmt. Die Enzymfreisetzung wird durch Zugabe von 75 μ l Zellen pro Loch gestartet und nach exakt dreiminütiger Inkubation bei 37°C durch Sedimentieren der Zellen bei 4°C beendet (3 min, 100 x g). Von dem Überstand wurden jeweils 75 μ l abgenommen und mit 100 μ l Substratlösung vereinigt. Nach 1 h Inkubation bei 37°C wurde die Substratreaktion gestoppt und durch Zugabe von je 75 μ l 0,4 M Glycin-NaOH pH 10,4 sichtbar gemacht. Der gelbe Farbumschlag wird durch Messung der OD₄₀₅ bestimmt, wobei der Leerwert (nur HAG-CM-Puffer ohne C3a-Stimulus) von allen Messungen substrahiert wird. Die maximale Enzymfreisetzung wird separat nach Totallyse der Zellen mit 1% Triton X-100 in HAG-CM bestimmt.

2.2.2.9 Messung der intrazellulären Calciumionenkonzentration

Ca^{2+} -Ionen dienen als intrazelluläre Signalvermittler in eukaryonten Zelle. Die zytosolischen Calciumionenkonzentration ist normalerweise sehr gering (10-100 nM) und wird durch ATP-getriebene Ca^{2+} -Pumpen und $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ -Austauscher ständig niedrig gehalten. Ein plötzlicher Anstieg des Ca^{2+} -Spiegels auf 500-1000 nM durch Öffnung von Ca^{2+} -Kanälen, die sich in der Plasma-Membran oder in der Membran von Calciumspeichern (ER, SR) befinden, kann durch Membran-Depolarisation oder Signalstoffe ausgelöst werden. Intrazellulär wird dies durch Sekundärbotenstoffe wie cAMP oder Inositol-1,4,5-triphosphat (IP_3) ausgelöst. IP_3 wird hydrolytisch aus Phosphatidyl-Inositol-bisphosphat (PIP_2) durch das Enzym Phospholipase C erzeugt. Die Aktivierung der Phospholipase C ist eine Folge der G-Proteinaktivierung, die durch eine ligandeninduzierte Rezeptorkonformationsänderung bei heptahelikalen Rezeptoren erzielt wurde. Der Calciuminflux, der ja letztendlich durch einen Liganden-Stimulus ausgelöst wurde, ist messbar. Im Mittelpunkt des Messverfahrens steht der Farbstoff Fura-2, ein Calciumchelator, der bei 340 nm bzw. 380 nm zur Fluoreszenz angeregt wird und in Abhängigkeit von der Calciumbindung sein Fluoreszenzverhalten bei 500 nm verändert.

Nach Resuspendierung geernteter RBL-2H3-Zellen in HBSS-Puffer (1×10^7 Zellen/ml) erfolgte eine 30minütige Beladung der Zellen bei RT mit dem zellpermeablen Fura-2/AM in einer Endkonzentration von 5 μM . Fura-2/AM diffundiert dabei durch die Membran und wird durch zytosolische Esterasen in die nicht-membrangängige, aktive Form (Fura-2) überführt. Nicht umgewandeltes Fura-2/AM kann in der 30minütiger Folgeinkubation mit der in HBSS 1:10 verdünnten Suspension wieder aus der Zelle herausdiffundieren. Nach einmaliger Wäsche in HBSS und anschließender Zentrifugation bei 300 x g wurden die Zellen auf 1×10^7 Zellen/ml HBSS eingestellt. Zur eigentlichen Messung wurden 450 μL HBSS mit 50 μl Zellsuspension in einer Quarzküvette auf 37°C temperiert. Die Zellen wurden durch Zugabe von C3a, C5a oder FMLP stimuliert. Die nach Ligandenstimulus gemessene Fura-2-Fluoreszenz wurde unter Berücksichtigung zweier Eichwerte (Triton X-100 und EDTA) von der Geräte-Software direkt in die freie Calciumionenkonzentrationen [nM] umgerechnet. Dabei verwendet das Programm eine Formel nach Grynkiewicz [256]. Als Positiv-Kontrolle für die Messung wurden mit γ -Interferon induzierte U937-Zellen verwendet. Die Messung der intrazellulären Calciumionenkonzentrationen an stabil mit verschiedenen C3aR-Mutanten transfizierten RBL-2H3-Zellen wurden von unserer MTA Frau Claudia Rheinheimer durchgeführt.

Die intrazellulären Calciumionenkonzentrationen an transient transfizierten HEK-293-Zellen nach Ligandenstimulus wurde mit Hilfe einer anderen Technik, dem sog. FLIPR, in der Arbeitsgruppe um Robert Ames bei Smith Cline Beecham gemessen.

2.2.3 Durchflusszytometrisch-antigenetische Methoden

2.2.3.1 Durchflusszytometrische Expressionsüberprüfung

Für die durchflusszytometrische Detektion der C3a-Rezeptoren auf der Zelloberfläche der neu generierten, stabil mit C3aR-Mutanten transfizierten RBL-2H3-Zelllinien wurde spezifisches polyklonales Anti-C3aR-Kaninchenserum (AC3aR) verwendet. Als Kontrolle diente ein vor

der Immunisierung des Kaninchens gewonnenes Präimmenserum (Ktrser). Beide Seren wurden im Versuchsansatz 1:2667 mit PBS verdünnt eingesetzt (Endkonzentration 1:4000), wobei diese Verdünnung zuvor experimentell in Verdünnungsversuchen ermittelt wurde. Zur Detektion des gebundenen Serums wurde je nach Versuch entweder ein FITC- oder PE-gefärbter anti-Kaninchen IgG-Antikörper in einer PBS-Verdünnung von 1:200 eingesetzt.

Für dieses Screening wurden die unter Verwendung von CDS geernteten Zellen in DMEM-Medium resuspendiert und auf eine Zellzahl von 1×10^7 pro ml eingestellt. In auf Eis gelagerten 96-Loch-Mikrotiterplatten wurden für jeden zu überprüfenden Zellklon je einmal 100 μ l Anti-C3aR-Serum und einmal 100 μ l Präimmenserum vorgelegt. Dabei wurde um jedes einzelne befüllte Loch herum ein Sicherheitsabstand von jeweils einem ungefüllten Loch eingehalten, so das maximal 24 Einzelwerte auf einer Mikrotiterplatte Platz hatten. In die so vorbereiteten Mikrotiterplatten wurden je 50 μ l der jeweiligen Zellsuspension zu dem vorgelegten Serum pipettiert, wodurch sich eine Konzentration der Zellen von 5×10^5 in 150 μ l Reaktionsvolumen ergab. Alle Inkubations- und Waschschrte erfolgten bei 4°C in diesen Mikrotiterplatten, die mit Hilfe von Polyacetatklebefolie, sog. "plate-sealers", dicht verschlossen wurden. Die Seruminkubation wurde nach 30 Minuten durch zweimaliges Waschen mit eiskaltem PBS (600 x g, 2 min) beendet. Im Anschluß daran wurden die Zellen mit 50 μ l FITC- oder PE-gelabeltem Ziege-Anti-Kaninchen-IgG für 30 min inkubiert. Nach zwei weiteren Waschschrten wurden die Zellen in 100 μ l kaltem PBS resuspendiert und im Durchflusssystemer FACScan™ analysiert. Konnte die Messung nicht sofort erfolgen, so wurden die Zellen stattdessen in PBS mit 1% Formaldehyd aufgenommen und bis zur Analyse kühl und dunkel (max. 8 Stunden) gelagert.

Die ermittelten Meßdaten wurden im "list-mode" für die spätere Auswertung mit Hilfe der Software-Programme CELLQuest™ oder WinMDI gespeichert. Die erfaßten Ereignisse wurden in Abhängigkeit von der jeweils gemessenen Fluoreszenz, FL-1 für FITC bzw. FL-2 für PE, als Histogramm aufgetragen. Durch statistische Auswertung wurden die mean-Werte der Fluoreszenzen mit Hilfe des Programms WinMDI bestimmt. Der Unterschied (Shift) zwischen Präimmenserum und Anti-C3aR-Serum wurde als Differenz (Δ -mean) der einzelnen mean-Werte bestimmt und als relatives Maß für die Rezeptorzahl verwendet.

2.2.3.2 Internalisierungs-Gesamtkinetiken

Für diesen durchflusssystemerischen Assay wurde Vollblut einer Ammoniumchloridlyse (vgl. Kap. 2.2.2.1) unterzogen. Die nicht lysierten Zellen wurden auf eine Zellzahl von 1×10^7 pro ml in DMEM eingestellt. RBL- und HMC-1-Zellen wurden ebenfalls nach zweimaliger Wäsche in eiskaltem PBS auf eine Zellzahl von 1×10^7 Zellen/ml in entsprechendem Zellkulturmedium gebracht. Die unterschiedlich lange Inkubation mit definierten Konzentrationen an humanem C3a erfolgte in Eppendorf-Gefäßen bei 37°C im Heizblock. Für diese Bestimmung wurden parallel in vier Reaktionsgefäßen jeweils 22,5 μ l DMEM für den Kontrollwert (neg. Kontrolle für unspez. Bindung) bzw. 22,5 μ l C3a-Stimulus (5-fach konzentriert) für die einzelnen Internalisierungswerte bei 37°C im Heizblock für 5 min vorinkubiert. Der exakte Reaktionsstart erfolgte durch Zugabe von 90 μ l Zellsuspension, die parallel ebenfalls 5 min bei 37°C vorgewärmt wurde.

Die exakte Abstimmung der Internalisierung erfolgte durch die Zugabe dieser inkubierten Zellen zu eiskaltem, in vorgekühlten Mikrotiterplatten vorgelegtem polyklonalem Kaninchenserum (1:4000 verdünnt in PBS). Dabei wurde der Ansatz aus einem Reaktionsgefäß gesplittet und jeweils ein 50 µl-Aliquot zu dem mit jeweils 100 µl vorgelegten Präimmun- (Kontrolle) bzw. Anti-C3aR-Serum pipettiert. Für die Inkubation wurden Zeiträume zwischen 15 s und maximal 60 min gewählt, wobei die einzelnen Werte ineinander verschachtelt wurden. Für einen Bezugswert (Null-Minuten-Wert) erfolgte die Zugabe des Stimulus zu den Zellen auf Eis. Nach einer 30minütigen Seruminkubation erfolgten zwei Waschschrte und anschließend die Inkubation mit 50 µl FITC-gelabeltem Ziege-Anti-Kaninchen-IgG (1:200 verdünnt in PBS) für ebenfalls 30 min. Nach zwei weiteren Waschschrten wurden die Zellen in 100 µl kaltem PBS resuspendiert und im Durchflusszytometer FACScan™ analysiert. Konnte die Messung nicht sofort erfolgen, so wurden die Zellen in PBS mit 1% Formaldehyd fixiert, sowie kühl und dunkel bis zur Analyse (max. 8 h) gelagert. Die ermittelten Meßdaten wurden im "list-mode" für die spätere Auswertung mit Hilfe der Software-Programme CELLQuest™ oder WinMDI gespeichert.

Monozyten und Granulozyten wurden für diese Auswertung mit Hilfe eines Gates eingegrenzt ("gating") und betrachtet. Dieses Eingrenzen basiert bei Monozyten auf einer zusätzlichen Anfärbung mit PE-gefärbtem CD14, einem spezifischen Monozytenmarker, und bei Granulozyten auf einer zusätzlichen Anfärbung mit CD16-PE. Für diese Messungen ist ein Kompensationsschritt erforderlich, da die Fluoreszenzen von PE bzw. FITC zu einem geringen Prozentsatz auch in den für die jeweils andere Fluoreszenz verwendeten Messkanal strahlen und damit auch von dem entsprechenden Detektor erfasst werden, was zu einer Verfälschung der Messergebnisse führt. Man nutzt für die Kompensation die im Vollblut ebenfalls vorhandenen Lymphozyten, die sich durch ihre identifizierenden Oberflächenantigene unterschiedlich mit CD4 bzw. CD8 anfärben lassen. Mit CD4 lassen sich Th-Lymphozyten (u. a. T-Helfer-Zellen) anfärben, da sie das CD4-Antigen tragen, aber nicht mit CD8 (CD8-negativ). Dagegen lassen sich Tc-Lymphozyten (u. a. zytotoxische thymusabhängige Lymphozyten) mit CD8 anfärben, aber nicht mit CD4 (CD4-negativ). Für diese Anfärbung wurde ein Zellaliquot der eingesetzten, aber unbehandelten Zellen (30 µL) mit 20 µL CD4 (FITC) bzw. 20 µL CD8 (PE) für 30 Minuten während des zweiten Inkubationsschritt der behandelten Zellen inkubiert. Da man weiß, dass die CD4-FITC-markierten Th-Lymphozyten CD8-PE negativ sein müssen, reguliert man die Kompensation am Gerät so lange, bis die anfangs aufgrund der Überstrahlung doppelt positiven Zellen nur noch in dem FITC-Kanal strahlen. De Facto werden dabei die negativen Populationen mit Hilfe der über vier "Log-Stufen" gehenden Fluoreszenzskala in einer Auftragung von FL-1 gegen FL-2 jeweils auf den Bereich von 10^0 bis 10^{-1} für die entsprechend negative Fluoreszenz eingestellt. Dabei ergibt sich meist eine Einstellung von FL-1 (-) 0,8% FL-2. Die PE-Fluoreszenz wird sozusagen von der FITC-Fluoreszenz abgezogen. Mit den CD8-PE-positiven Tc-Lymphozyten, die ja CD4-FITC-negativ sind, verfährt man genauso, allerdings wird jetzt durch die entsprechende Kompensation der FITC-Anteil von der PE-Fluoreszenz abgezogen. Es ergibt sich meist eine Einstellung von FL-2 (-) 22% FL-1. Bei Untersuchungen mit aufgereinigten Monozyten wird stattdessen mit Hilfe unterschiedlich gefärbter Monozytenmarker (CD14-PE und CD14-FITC) nach dem gleichen Prinzip kompensiert.

Die erfassten Ereignisse werden in Abhängigkeit von der jeweils gemessenen Fluoreszenz für FITC (FL-1) bzw. für PE (FL-2) als Histogramm aufgetragen. Durch eine statistische Auswertung wurden die mean-Werte der entsprechenden Fluoreszenzen mit Hilfe des Programms WinMDI bestimmt. Der sich zwischen Präimmunserum und Serum nach Immunisierung ergebende Unterschied der beiden Fluoreszenzkurven wurde über die Differenz der jeweiligen mean-Werte berechnet (Δ -mean). Für die Berechnung der Internalisierungsrate wurde der sich bei den einzelnen Proben durch die jeweilige Inkubation ergebende Δ -mean_x-Wert in Relation zu einem Startwert gesetzt. Dieser Startwert ergab sich bei Kinetiken aus dem Δ -mean-Wert einer Probe zum Zeitpunkt Null und wurde für die Berechnung als Δ -mean_{0-Minuten}-Wert mit 100% Rezeptoren an der Oberfläche definiert, woraus folgende Berechnungsformel resultierte:

$$\text{Internalisierung [\%]} = \frac{(\Delta - \text{mean}_{0\text{-Minuten}} - \Delta - \text{mean}_x)}{\Delta - \text{mean}_{0\text{-Minuten}}}$$

2.2.3.3 Untersuchung der schnellen Rezeptorinternalisierung (Teilkinetik)

Das Prinzip dieser Messung entspricht dem der Ermittlung der Internalisierungs-Gesamtkinetiken, das Protokoll wurde allerdings extra für die Untersuchung der schnellen Rezeptorinternalisierung an den stabilen Zelllinien modifiziert (vgl. Kap. 3.2.3). Es wurde hierbei jeweils ein Zeitpunkt, entweder der 1- oder 4-Minutenwert nach Ligandenstimulus, parallel an vier verschiedenen stabilen Zelllinien näher untersucht. Pro Wert wurde von den einzelnen Zelllinien jeweils 90 μ l der jeweiligen Zellsuspension (ein Reaktionsgefäß) vorgelegt und für exakt 5 min bei 37°C vorinkubiert. Durch Zugabe von 22,5 μ l des ebenfalls vorgewärmten 500 nM C3a-Stimulus wurde die Reaktion gestartet und nach genau einer Minute abgestoppt. Dafür wurde der Reaktionsansatz gesplittet und die beiden Aliquots mit vorgelegtem eiskaltem Präimmun- bzw. Anti-C3aR-Serum in der auf Eis gelagerten Mikrotiterplatte gemischt. Zur Kontrolle erfolgte parallel eine Stimulation mit vorgewärmten DMEM. Der weitere Reaktionsverlauf ist unter Kap. 2.2.3.2 beschrieben.

2.2.3.4 Ermittlung einer Dosis-Wirkungs-Beziehung

Diese Bestimmung erfolgte als Vierfach-Bestimmung an Monozytenpräparationen aus Blut von verschiedenen gesunden Spendern, HMC-1-Zellen und RBL-Zelllinien. Das Prinzip der Messung entspricht dem der Ermittlung der Internalisierungs-Gesamtkinetiken. Für die Untersuchung der stabilen RBL-Zellen wurde das Protokoll wie unter Kap. 3.2.3 beschrieben, angepasst. Für die übrigen Zellen erfolgte statt verschieden langer Inkubationszeiten mit konstanter C3a-Menge die Stimulation bei einer festgelegten Inkubationszeit von drei Minuten mit verschiedenen C3a-Konzentrationen. Das Abstoppen der Reaktion und die weiteren Schritte wurden durchgeführt, wie unter Kap. 2.2.3.2 beschrieben. Als Bezugswert für die Berechnung wurde der Pufferwert (0 nM) verwendet.

3 Ergebnisse

Zellen sind bezüglich ihres Informationsaustausches über die Zellmembranbarriere hinaus zu anderen Zellen auf eine Rezeptor-vermittelte Signaltransduktion angewiesen, die einer Vielzahl an Regulationsmechanismen ineinandergreifender Regelkreise unterliegt. Negative Rückkopplungsmechanismen, auch als Desensibilisierung bezeichnet, limitieren die Signaltransduktion durch den Rezeptor und verhindern dadurch das schädliche Überschießen einer an sich, z. B. im Rahmen des Entzündungsgeschehens, erwünschten Reaktion. Bei G-Protein gekoppelten Rezeptoren sind verschiedene, sowohl schnell als auch langsam ablaufende Desensibilisierungsmechanismen bekannt. Zu diesen Mechanismen zählen die Rezeptor-phosphorylierung, die Rezeptorinternalisierung sowie die längerfristige Minimierung der membranständigen Rezeptorzahl. Im Rahmen der vorliegenden Dissertation wurden Untersuchungen durchgeführt, die zu einem besseren Verständnis dieser Regulationsmechanismen bei dem anaphylatoxischen C3a-Rezeptor dienen sollen. Dabei wurde der Schwerpunkt auf die Charakterisierung der Internalisierung dieses Rezeptors gelegt.

Nachfolgend (Kap. 3.1) werden die Ergebnisse des auf die allgemeine Charakterisierung der C3a-Rezeptorinternalisierung abzielenden Aufgabenteils vorgestellt. In Kap. 3.2 werden die Resultate zur Struktur-/ Funktionsanalyse des C3aR-C-Terminus mit dem Schwerpunkt Internalisierung, dem Hauptthema dieser Dissertation, präsentiert. Im dritten Kapitel (Kap. 3.3) werden die Ergebnisse der Untersuchungen zur Charakterisierung der dem C3aR nachgeschalteten, Liganden-induzierten Regulationsvorgänge vorgestellt.

3.1 Untersuchungen zur Charakterisierung der C3aR-Internalisierung

Die Rezeptorinternalisierung, ein innerhalb von Minuten nach Ligandenbindung ablaufender Transport des Rezeptors von der Zelloberfläche ins Zellinnere, wurde bereits für den C5aR an Granulozyten und Monozyten beschrieben [151, 235]. Ein Ziel der Arbeitsgruppe war es, das Internalisierungsverhalten des C3a-Rezeptors an verschiedenen Zellen und Zelllinien zu charakterisieren. In einer vorangehenden Arbeit wurde bereits das Internalisierungsverhalten des C3aR an humanen Granulozyten, HEK293- und U937-Zellen untersucht [239]. Im Rahmen der vorliegenden Dissertation wurde das zeit- und dosisabhängige Internalisierungsverhalten von humanen Monozyten und Zellen der humanen Mastzelllinie HMC-1 untersucht, deren Ergebnisse in Kap. 3.1.1 vorgestellt werden. Zusätzlich erfolgte eine pharmakologische Untersuchung von C3aR-Inhibitoren der Firma Smith Kline Beecham mit Hilfe eines durchflusszytometrisch-antigenetischen Internalisierungsassays an humanen Monozyten, deren Resultate in Kap. 3.1.2 beschrieben sind.

3.1.1 Durchflusszytometrische Untersuchung der C3aR-Internalisierung an Zellen der humanen Mastzelllinie HMC-1 und aufgereinigten humanen Monozyten

Für die durchflusszytometrische Untersuchung der C3aR-Internalisierung wurden Zellen der humanen Mastzelllinie HMC-1 und humane Monozyten zunächst auf ihre C3a-Rezeptorexpression und auf ihre Fähigkeit zur Internalisierung dieses Rezeptors hin überprüft. Dazu wurden die Zellen entweder mit Puffer oder mit 100 nM C3a für drei Minuten bei 37°C inkubiert und anschließend zur Visualisierung der C3aR-spezifischen bzw. unspezifischen Fluoreszenz mit entsprechendem C3a-Immun- bzw. Präimmenserum in Verbindung mit einem FITC-markierten Sekundärantikörper angefärbt. In Abb. 3.1 sind die detektierten Fluoreszenzen in Form von Histogrammen dargestellt.

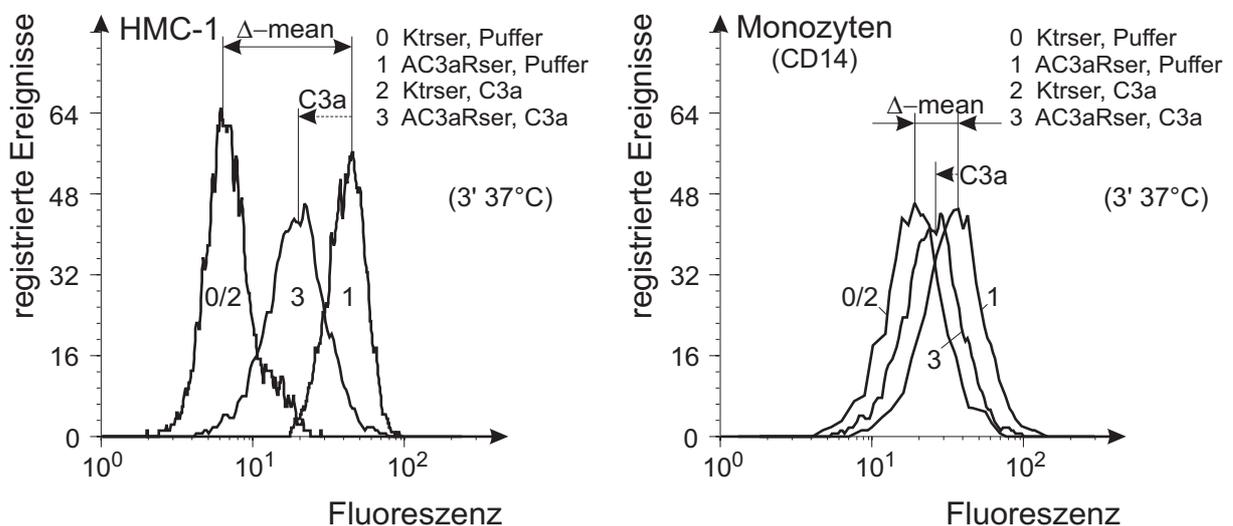


Abb. 3.1: Typische Histogramme der C3aR-Fluoreszenz an HMC-1-Zellen (links) und Monozyten (rechts). Die Zellen wurden für 3 min bei 37°C mit Puffer bzw. C3a stimuliert und anschließend parallel entweder mit Präimmenserum (0/2) oder spezifischem Anti-C3aR-Serum (1/3) in Verbindung mit einem FITC-markierten Sekundärantikörper inkubiert.

Bei den HMC-1-Zellen lässt sich nach Stimulation mit Puffer ein im Vergleich zum unspezifischen Signal (0) deutlich erhöhtes C3aR-spezifisches Fluoreszenzsignal (1) detektieren, dass nach Stimulation mit C3a reduziert ist (3) bei gleichbleibender unspezifischer Fluoreszenz (2). Aus dieser Reduktion der C3aR-spezifischen Fluoreszenz lässt sich in Relation zu dem als 100% Rezeptorbesatz definiertem Δ -mean-Wert, der Differenz der statistischen Mittelwerte der Fluoreszenzkurven (0 und 1) der mit Puffer stimulierten Zellen, die prozentuale Internalisierung berechnen (vgl. Kap. 2.2.3.2). Native Monozyten zeigen im Vergleich zu HMC-1-Zellen einen geringen Unterschied zwischen der C3aR-spezifischen und unspezifischen Fluoreszenz (vgl. Abb. 3.1, rechts). Dies lässt auf eine geringere Rezeptorexpression schließen. Auch hier zeigt die C3aR-spezifische Fluoreszenzkurve eine Intensitätsabnahme nach Liganden-Stimulus aufgrund der Rezeptorinternalisierung. Allerdings ist diese Abnahme aufgrund der niedrigeren Rezeptorzahl bzw. des schlechten Signal-Hintergrundverhältnisses weniger

deutlich als bei den HMC-1-Zellen zu sehen. Bei der Berechnung der prozentualen Internalisierung ergab sich dementsprechend in den nachfolgend vorgestellten durchflusszytometrischen Untersuchungen ein relativ hoher statistischer Fehler bei Monozyten im Vergleich zu den HMC-1-Zellen.

3.1.1.1 Dosis-Wirkungsabhängigkeit der C3aR-Internalisierung an HMC-1-Zellen und Monozyten

Die durchflusszytometrische Ermittlung einer Dosis-Wirkungsbeziehung erfolgte wie unter Kap. 2.2.3.4 beschrieben. Die Zellen wurden jeweils mit Puffer, 1 nM, 3,16 nM, 10 nM, 21,5 nM, 46,6 nM, 100 nM und 464 nM C3a für 3 Minuten bei 37°C inkubiert. Parallel dazu wurden die HMC-1-Zellen mit 100 nM und 1000 nM, und die Monozyten mit 100 nM, 464 nM und 1000 nM eines C3a-analogen (P117) bzw. eines irrelevanten (P252) Peptids (vgl. Kap. 2.1.11) inkubiert, um die Spezifität eines möglicherweise beobachteten Effektes für C3a zu überprüfen. Die Ergebnisse dieser Untersuchung sind in Abb. 3.2 dargestellt.

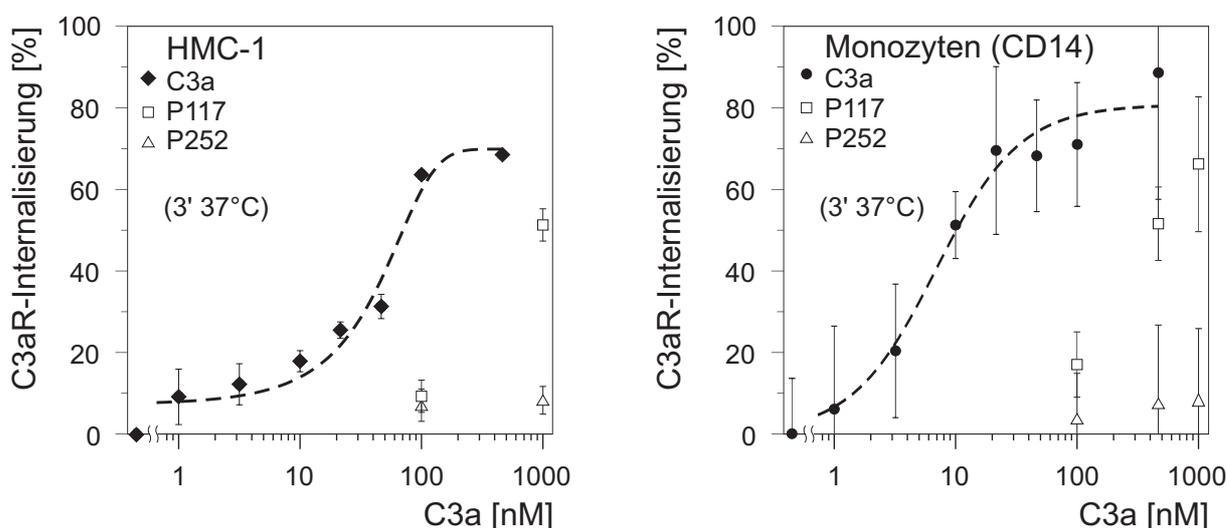


Abb. 3.2: Dosis-Wirkungskurven der C3aR-Internalisierung an HMC-1-Zellen (links) und Monozyten (rechts). Die Zellen wurden mit steigenden Konzentrationen an C3a, C3a-analogenem Peptid P117 (Viereck-Symbol) bzw. irrelevantem Kontrollpeptid P252 (Dreieck-Symbol) für 3 min bei 37°C inkubiert. Die prozentuale Rezeptorinternalisierung wurde anhand der antigenetisch-durchflusszytometrisch detektierten Fluoreszenz berechnet. Dargestellt ist jeweils Mittelwert und Standardabweichung aus drei Einzelwerten eines repräsentativen Experimentes von $n = 3$. Die eingezeichnete Kurve wurde mit Hilfe des Programms Sigmaplot (Jandel) iteriert.

Sowohl bei HMC-1-Zellen als auch bei Monozyten wurde eine dosisabhängige C3aR-Internalisierung beobachtet. Bei den HMC-1-Zellen wurden mit 100 nM C3a eine Rezeptorinternalisierung von 63,6% \pm 1,15% erzielt. Der halbmaximale Effekt nach 3minütiger Ligandeninkubation wurde in drei unabhängigen Experimenten mit 41 nM \pm 18 nM C3a erreicht. Die Stimulation mit 100 nM C3a-analogenem Peptid P117 erzeugte eine Rezeptorinternalisierung von 9,1% \pm 4,8% und mit 1000 nM dieses Peptids wurden 51,3% \pm 4,8% Internalisierung erzielt. Die Inkubation mit den gleichen Konzentrationen an irrelevantem Peptid P252

fürte wie erwartet nur zu einer geringen Rezeptorinternalisierung von 6,6% +/- 4,7% bzw. 8,0% +/- 3,4%.

Bei den Monozyten wurde eine ähnliche Dosisabhängigkeit der Rezeptorinternalisierung beobachtet. Hier wurde durch einen Stimulus von 100 nM eine Internalisierung von 71% +/- 15,2% erreicht. Die C3a-Konzentration zum Erreichen des halbmaximalen Effektes schwankte in drei unabhängigen Versuchen zwischen 15-50 nM. Die Stimulation mit C3a-analogenem Peptid P117 erzeugte bei einer Konzentration von 100 nM 17,9% +/- 8% Rezeptorinternalisierung und bei 1000 nM 66,7% +/- 16,5%. Die Inkubation mit gleichen Konzentrationen an irrelevantem Peptid P252 führte zu einer vernachlässigbaren Rezeptorinternalisierung von 3% +/- 11,5% bzw. 9% +/- 15,7%.

3.1.1.2 Zeitabhängigkeit der C3a-Rezeptor-Internalisierung an HMC-1-Zellen

Monozyten adhären an Plastikoberflächen von Reaktionsgefäßen, was z.B. zur Aufreinigung dieser Zellen aus Vollblut genutzt wird [156]. Dabei kann es möglicherweise auch zu einer Stimulation der Monozyten kommen. Bei den Untersuchungen zur Zeitabhängigkeit der C3aR-Internalisierung führte die Adhärenz der Monozyten bei einer längeren Inkubation bei 37°C zu einem drastischen Verlust an suspendierten Zellen. Je größer die Inkubationszeiträume waren, um so weniger Zellen waren noch in Suspension vorhanden. Deshalb wurden die durchflusszytometrische Untersuchung der Zeitabhängigkeit der Rezeptorinternalisierung ausschließlich an HMC-1-Zellen durchgeführt. Für kurze Zeitpunkte (etwa 3-5 Minuten) war eine Messung an Monozyten, wie z.B. zur Untersuchung der Dosis-Wirkungsabhängigkeit (vgl. Kap. 3.1.1.1), jedoch unproblematisch.

Die Ermittlung einer Zeitkinetik erfolgte nach der unter Kap. 2.2.3.2 beschriebenen Methode. Untersucht wurde die Internalisierung nach 1, 2, 5, 15 und 30 min Stimulation mit 100 nM C3a bei 37°C. Bei dieser C3a-Konzentration ist anhand der Dosis-Wirkungskurve (vgl. Abb. 3.2, links) mit einer nahezu vollständigen Besetzung aller C3a-Rezeptoren durch den Liganden zu rechnen. Parallel dazu wurden die Zellen zu allen Zeitpunkten als Negativkontrolle mit Puffer inkubiert. Das Resultat dieser Untersuchung ist in Abb. 3.3 graphisch dargestellt.

Innerhalb der ersten Minute nach Stimulation mit 100 nM C3a zeigen die HMC-1-Zellen einen drastischen Anstieg der Rezeptorinternalisierung. Nach etwa 5 Minuten liegen die erzielten Werte in einem Plateaubereich von etwa 60-70% maximaler Rezeptorinternalisierung, der jedoch einen leichten Anstieg zeigt. Insgesamt liegt die maximal erzielte Internalisierungsrate im Vergleich zu Granulozyten, bei denen der C3aR zu 90-100% internalisiert wird [239] und zu RBL-2H3-Zellen mit einer 80-90%igen Rezeptorinternalisierung niedriger (siehe Abb. 3.10). Dabei scheinen die HMC-1-Zellen gegenüber den gegebenen Versuchsbedingungen empfindlich zu sein, erkennbar daran, dass die nur mit Puffer inkubierten Zellen ebenfalls einen Verlust an Rezeptoren auf der Oberfläche von bis zu 40% nach 30 Minuten zeigen. Bei Granulozyten zeigte sich nur ein langsam bis zu 20% bei 30 min ansteigender Rezeptorverlust nach Pufferstimulation [239].

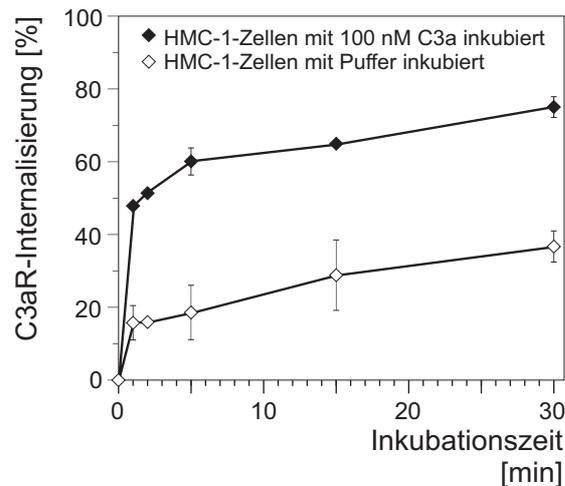


Abb. 3.3: **Zeitabhängiges C3aR-Internalisierungsverhalten bei HMC-1-Zellen.** Die HMC-1-Zellen wurden bei 37°C für unterschiedlich lange Zeiten mit 100 nM C3a inkubiert. Parallel wurden die Zellen als Kontrolle für unspezifische Internalisierung bzw. Rezeptorverlust zu allen Zeitpunkten mit Puffer inkubiert. Dargestellt ist ein repräsentatives Experiment von n = 4.

Um einen versuchsbedingten erhöhten Stressfaktor der Zellen als Ursache für die geringere Rezeptorinternalisierung auszuschließen, wurde das Experiment unter physiologischeren Bedingungen erneut durchgeführt. Dabei erfolgte die Stimulation der Zellen, die zuvor für 48 h ungestört wachsen konnten, noch in den Zellkulturflaschen unter Zellkulturbedingungen. Das Abstoppen der Reaktion erfolgte durch Zentrifugation der Zellen bei 4°C. Die sich sofort anschließende Inkubation der Zellen mit eiskaltem Präimmun- und Anti-C3aR-Serum wurde, wie zuvor in Kap. 2.2.3.2 beschrieben, durchgeführt. Auch unter "stressfreieren" Inkubationsbedingungen lag die maximal erreichte Rezeptorinternalisierung nur bei 70% und durch Inkubation mit Puffer wurde auch in diesem Fall ein unspezifisches Verschwinden von etwa 35% der Rezeptoren von der Oberfläche ausgelöst (Daten nicht gezeigt).

Zusammenfassend lässt sich aus den Untersuchungen zur Charakterisierung der C3aR-Internalisierung an Monozyten und Zellen der humanen Mastzelllinie HMC-1 sagen, dass beide Zellarten den Rezeptor vergleichbar dosisabhängig internalisieren, wobei die maximal durch 100 nM C3a erreichte prozentuale Internalisierung bei HMC-1-Zellen bei etwa 80% und bei Monozyten nur bei etwa 70% im Vergleich zu Granulozyten mit etwa 90-100% Rezeptorinternalisierung [239] liegt. Die C3a-Spezifität der Internalisierung konnte in beiden Fällen durch synthetische Peptide bewiesen werden. Bei HMC-1-Zellen ist die Internalisierung ebenfalls, wie auch schon bei den Granulozyten beschrieben [239], ein rasch ablaufender Prozess, bei dem innerhalb von 5 Minuten die maximale Internalisierungsrate erreicht wird. Eine Ermittlung des zeitabhängigen Internalisierungsverhaltens von Monozyten war aufgrund des schlechten Signal-Hintergrundverhältnisses und der Adhärenz dieser Zellen an der Oberfläche der Reaktionsgefäße während der Untersuchung nicht möglich. Diese Teilergebnisse wurden bereits veröffentlicht [239].

3.1.2 Pharmakologische Untersuchungen mit inhibierenden Substanzen der Firma Smith Kline Beecham

Pharmakologische Substanzen der Firma Smith Kline Beecham (King of Prussia, USA) wurden in einen durchflusszytometrisch-antigenetischen Internalisierungsassay an humanen Granulozyten, die den C3aR nativ an ihrer Oberfläche tragen, eingesetzt. Von diesen Substanzen war zum Zeitpunkt der Untersuchung aus Gründen der Geheimhaltung und des laufenden Patentverfahrens nur ein inhibierender Einfluss der Substanzen mit den Bezeichnungen SB290175 und SKF63649J auf den C3a-Rezeptor bekannt war und auch, dass es sich bei der Substanz mit der Bezeichnung SB280936 um eine Negativkontrolle handelt. Für diesen Versuch wurde EDTA-Vollblut verwendet, bei dem die Erythrozyten mit Hilfe einer Ammoniumchloridlyse entfernt worden waren (vgl. Kap. 2.2.2.1). Aus den Blutzellen wurden die Granulozyten bei der Auswertung der FACS-Analysen eingegrenzt (vgl. Kap. 2.2.3.2) und gesondert betrachtet. Um den Effekt der Inhibitoren besser sichtbar machen zu können, wurde eine möglichst geringe C3a-Konzentration gewählt, die gerade noch eine deutliche Internalisierung bewirkte. Anhand der Ergebnisse von Dosis-Wirkungs-Untersuchungen an humanen Granulozyten wurde eine Endkonzentration von 10 nM C3a im Ansatz gewählt, mit der bereits 90% der maximal bei Granulozyten erreichbaren Internalisierung erzielt werden konnte (siehe Abb. 3.4, rechts).

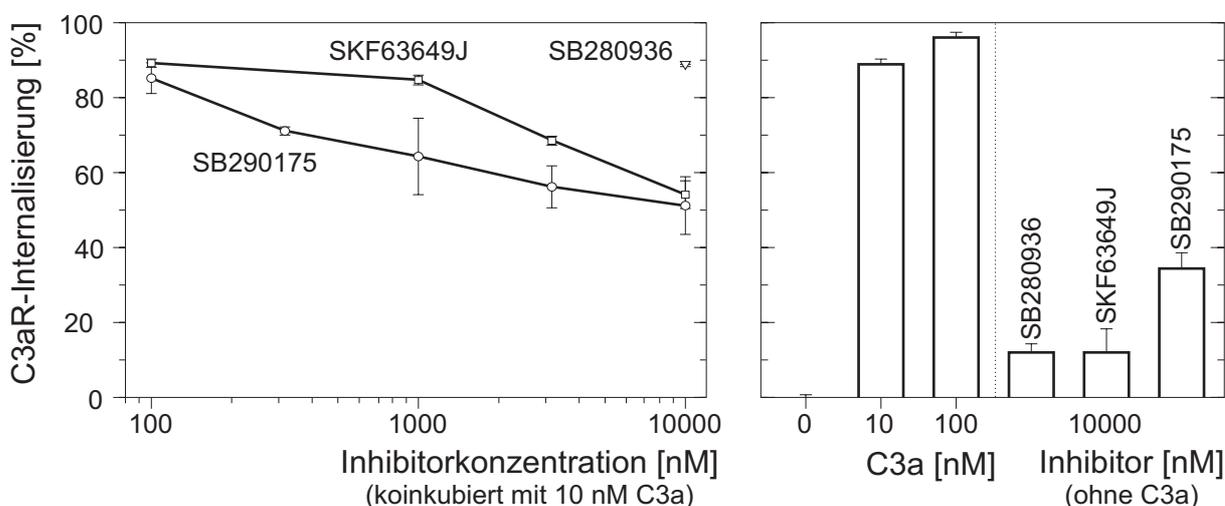


Abb. 3.4: Einfluss verschiedener Inhibitoren der Firma Smith Kline Beecham auf die C3aR-Internalisierung humaner Granulozyten. Dargestellt sind links der Einfluss der Inhibitoren auf die durch 10 nM C3a ausgelöste Internalisierung und rechts die Auswirkung einer Stimulation mit entweder Puffer (0 nM), 10 nM C3a, 100 nM C3a oder jeweils 10000 nM der einzelnen Inhibitoren auf humane Granulozyten. Die dargestellten Δ -mean-Werte sind jeweils Mittelwert und Standardabweichung aus drei unabhängigen Versuchen mit $n = 3$ Einzelwerten.

Das Prinzip der Studie entspricht der unter Kap. 2.2.3.4 beschriebenen Methode zur Ermittlung einer Dosis-Wirkungsbeziehung. Für diese Untersuchung erfolgte eine Koinkubation mit einer konstanten Endkonzentration von 10 nM C3a und ansteigenden Konzentrationen von 100 nM, 316 nM, 1000 nM, 3160 nM bis 10000 nM des jeweiligen Inhibitors und der Kontrollsubstanz für 3 min bei 37°C. Es wurden drei Werte pro Konzentration und Inhibitor pro-

zessiert. Um den Einfluss der Inhibitoren in Abwesenheit von C3a zu testen, wurden die Zellen mit je 10000 nM der einzelnen Substanzen im Vergleich zum Einfluss von Puffer (DMEM-Medium) bzw. 10 nM und 100 nM C3a-Stimulus untersucht. Die Ergebnisse der pharmakologischen Untersuchung der C3aR-Inhibitoren sind in Abb. 3.4 (rechts) dargestellt. Die Berechnung des Δ -mean-Wertes erfolgte wie unter Kap. 2.2.3.3 beschrieben.

Da die Kontrollsubstanz, wie erwartet, in den durchgeführten Versuchen keinen Einfluss auf die C3aR-Internalisierung bei humanen Granulozyten zeigte, wurde im linken Teil dieser Abbildung exemplarisch nur der Einfluss von 10000 nM SB280936 auf die durch 10 nM C3a ausgelöste Internalisierung dargestellt. Zu sehen ist ein dosisabhängiger Effekt der Inhibitoren SKF63649J und SB290157 auf die durch 10 nM C3a induzierte Internalisierung des C3aR bei humanen Granulozyten. Dabei ist der SB290157 bei geringeren Konzentrationen der stärkere Inhibitor. Durch Zugabe von 316 nM können bereits 20% der Rezeptorinternalisierung geblockt werden, wohingegen die gleiche Konzentration an SKF6364J noch keine Effekte zeigt. Bei einer Inhibitor-Konzentration von 1000 nM ist der Unterschied zwischen den beiden Inhibitoren am größten. Mit SB290157 werden bereits 30% der Rezeptorinternalisierung inhibiert, wohingegen mit SKF63649J nur 5% inhibiert werden können. Die maximal erreichte Inhibition liegt bei beiden Inhibitoren bei etwa 45% der mit 10 nM C3a nach 3minütiger Stimulation bei 37°C erreichten Gesamtinternalisierung und wird durch eine Konzentration von 10000 nM erzielt.

Anhand der Ergebnisse der alleinigen Inkubation der Zellen (siehe Abb. 3.4, rechts) mit den beiden Inhibitoren und der Kontrollsubstanz kann man einen unspezifischen Einfluss der Kontrollsubstanz SB280936 und des Inhibitors SKF63649J in einer vergleichbaren Höhe von 10-15% erkennen. Dieser Einfluss lässt sich eventuell auf das Lösemittel der Inhibitoren, Dimethylsulfoxid (DMSO) zurückführen, das sich schädlich auf die Zellen auswirkt bzw. deren Tod herbeiführen kann. Der unspezifische Einfluss des Inhibitors SB290175 ist mit 35% im Vergleich dazu signifikant ($p < 0,01$) erhöht, was auf eine Funktion als partieller Agonist deuten kann. Hinsichtlich dieser Tatsache ist auch erklärlich, dass mit diesem Inhibitor trotz weiter ansteigender Konzentrationen nicht mehr als 45% der durch 10 nM C3a ausgelösten Internalisierung geblockt werden konnte.

Zusammenfassend kann man sagen, dass die beiden Substanzen (SKF63649 und SB290157) eine dosisabhängige Inhibierung der C3a-Rezeptor-Internalisierung bewirken. In der Gegenwart von $> 3,6 \mu\text{M}$ Inhibitor wird nur noch eine 50%ige Internalisierung des C3a-Rezeptors, ausgelöst durch 10 nM C3a, erreicht. Der Inhibitor SB290157 ist im Vergleich zu SKF63649J potenter, da er auch schon bei geringeren Konzentrationen einen Einfluss auf die C3aR-Internalisierung zeigt. Die als Kontrolle dienende Substanz SB280936 zeigt keine Auswirkungen auf die Rezeptorinternalisierung. Bei allen drei Substanzen wurde intrinsische Aktivität auf die Rezeptorinternalisierung in der Abwesenheit von C3a bei Konzentrationen von $10 \mu\text{M}$ festgestellt. Die Substanz SB290157 scheint bei dieser extrem hohen Konzentration als partieller Agonist zu fungieren.

3.2 Struktur-/ Funktionsanalyse des C3a-Rezeptor C-Terminus mit dem Schwerpunkt Internalisierung

Die Rezeptorinternalisierung ist ein bedeutender Bestandteil der zellulären Desensibilisierung (vgl. Kap. 1.5). Für eine funktionierende Rezeptorinternalisierung ist bei einer Vielzahl der G-Protein gekoppelten Rezeptoren der Rezeptor-C-Terminus notwendig [223-230]. Auch für den dem untersuchten C3a-Rezeptor am nächsten verwandten C5aR konnte gezeigt werden, dass der C-Terminus wesentlich an der Liganden-induzierten Internalisierung beteiligt ist [236]. Bei einigen Rezeptoren ist eine Beteiligung von Phosphorylierungsstellen im zytosolischen C-Terminus an der Internalisierung beschrieben [223]. Auch beim nahe verwandten FMLP-Rezeptor sind die identifizierten Phosphorylierungsstellen im C-Terminus *in vivo* essentiell für Phosphorylierung, Desensibilisierung [231] und nach neueren Untersuchungen auch für die Internalisierung [232]. Die Abhängigkeit der C5a-Rezeptorinternalisierung von einer vorhergehenden Phosphorylierung konnte anhand von C-terminalen Austauschmutanten gezeigt werden [154]. Dabei zeigte eine Mutante, bei der die im C-Terminus lokalisierten Serine des Hauptphosphorylierungsmotivs (Serine 332, 334 und 338) gegen Alanine ausgetauscht wurden, eine deutlich reduzierte Internalisierung. Für den C3aR wurde gezeigt, dass nach Liganden-Stimulus eine über G-Protein gekoppelte Rezeptorkinasen vermittelte Phosphorylierung stattfindet [238]. Dabei wurden als Phosphorylierungsstellen Serine und Threonine erkannt, jedoch nicht lokalisiert. Ausgehend von diesen Befunden sollte der Einfluss C-terminaler putativer Phosphorylierungsstellen (Serine und Threonine) des C3aR-C-Rezeptors auf die Internalisierung untersucht werden.

3.2.1 Vorüberlegungen und Voruntersuchungen zur Auswahl der eingesetzten Vektoren und Zelllinien

Für Studien des C5a-Rezeptors war in unserer Arbeitsgruppe ein pcDNA3-Expressionsvektor verwendet worden. Ein anderer Mitarbeiter der Arbeitsgruppe hatte bereits erfolglos versucht mit diesem pcDNA3-Vektor den C3a-Rezeptor stabil in RBL-Zellen zu exprimieren, obwohl er nach transienter Transfektion in HEK-293-Zellen eine gute C3aR-Expression erzielt hatte (Daten nicht publiziert). Wir vermuten die Ursache für diesen Misserfolg entweder in der dem C3aR in diesem Konstrukt vorgeschalteten 5'UTR ("untranslated region") des C5aRs, im Promotor oder in einer speziellen Inkompatibilität dieses Vektors mit der C3aR-Sequenz. Für die stabile Transfektion der herzustellenden C3a-Rezeptormutanten wurden deshalb zuerst mehrere unterschiedliche Plasmide auf ihre Eignung hin getestet. Der auf Basis des pcDNA3-Vektors weiterentwickelte pcDNA3.1/HisA-Vektor beinhaltet einen N-terminalen His-Tag mit einer eigenen, bereits optimierten UTR. Durch die Fusion des subklonierten C3a-Rezeptors (ohne die 5'UTR des C5aR) mit dem His-Tag in diesem Vektor kann diese optimierte UTR genutzt werden. Zudem ermöglicht der His-Tag die Erkennung oder Aufreinigung durch Antikörper. Ein pEF-BOS-Vektor, der bereits für die erfolgreiche stabile Expression des hC3a-Rezeptors in RBL-Zellen beschrieben war [241], sollte ebenfalls ausgetestet werden (vgl. Tab. 3.1). Allerdings wurde dieser Vektor nur als Positivkontrolle mitgeführt, da

von ihm keine verwertbare Vektorkarte existiert und dadurch die Entwicklung einer Klonierungsstrategie für Rezeptormutanten aufgrund unbekannter Restriktionsenzymstimmstellen sehr schwierig bis unmöglich gewesen wäre. Für die Expression der Rezeptormutanten in RBL-Zellen wurde ein weiterer Vektor, der pEF1/HisA-Vektor der Firma Invitrogen (Vektorkarte siehe Anhang), getestet. Dieser besitzt wie der pEF-BOS-Vektor die humane Elongationsfaktor-1 α -Untereinheit, die als Promotor für hochgradige Expression bei einer Vielzahl von Zelltypen beschrieben wurde [241, 258]. Der Vektor trägt ein zur Selektion nutzbares Neomycin-Resistenzgen und ermöglicht durch einen N-terminalen Polyhistidin-Tag eine Erkennung mit Hilfe von Antikörpern oder eine Aufreinigung.

Die durch die drei verschiedenen, den C3aR beinhaltenen Vektoren pcDNA3.1/HisA (pCR7), pEF-BOS und pEF1/HisA (pEF7/11) erzielte Rezeptorexpression wurde in FACS-Analysen und 125 I-C3a-Zweipunktbindungen nach transients Transfektion in HEK-293- und stabiler Transfektion in RBL-Zellen analysiert. Die Tab. 3.1 zeigt die Ergebnisse der FACS-Analyse an stabil transfizierten RBL_A-Zellen, wobei der ermittelte Δ -mean-Wert als relatives Maß für die Rezeptorexpression dient.

Tab. 3.1: Übersicht über die in RBL_A-Zellen nach stabiler Transfektion mit verschiedenen Expressionsvektoren erzielte Rezeptorexpression anhand von jeweils drei verschiedenen Klonen. Dargestellt sind die Differenzen (Δ -mean) der statistischen, aus den Fluoreszenzen berechneten Mittelwerte.

Expressionsvektor	pCR7 (C3aR-wt (TC) in pcDNA3.1/HisA)			pEF-BOS			pEF7/11 (C3aR-wt (TC) in pEF1/HisA)		
	CA7	CE3	CF11	K1	K2	CC6	AC9	BF3	ED10
[Δ -mean]	8,11	4,95	2,24	206,21	137,94	80,54	63,40	67,86	33,05

Die mit dem pcDNA3.1/HisA-Vektor stabil transfizierten RBL_A-Zellen exprimieren nur wenig Rezeptor an ihrer Oberfläche, erkennbar an den geringen Differenzwerten [Δ -mean] der nach Inkubation mit spezifischem C3a-Immunsereum bzw. unspezifischem Präimmunsereum und einem FITC-markierten Sekundärantikörper detektierten Fluoreszenz. Der Erfolg der stabilen Transfektion von RBL-Zellen mit dem C3aR-wt in dem pEF-BOS-Vektor war auf drei Klone beschränkt, wobei zwei von ihnen hochexprimierend (K1 + K2) und einer im Vergleich dazu mittelexprimierend (CC6) war. Mit dem pEF1/HisA-Vektor wurden Klone erzeugt, die eine mit dem Klon CC6 (C3aR-wt in pEF-BOS) vergleichbare, noch gute Expression des C3aR-wt zeigten. Eine Überprüfung der drei Vektoren auf ihre Rezeptor-Expression mit Hilfe einer 125 I-C3a-Zweipunktbindung an stabil transfizierten RBL-Zellen lieferte vergleichbare Ergebnisse (Daten von Herrn cand. med. Henning Hamacher, siehe Anhang). Als Expressionsvektor für die zu generierenden C-terminal mutierten Rezeptorkonstrukte wurde der pEF1/HisA-Vektor gewählt.

Als Expressionszelllinie für die zu generierenden Rezeptormutanten soll die basophile Leukämie RBL-2H3 aus der Ratte verwendet werden. Diese Zellen sind zusammen mit dem,

dem gewählten Expressionsvektor sehr ähnlichen pEF-BOS-Vektor, bereits beschrieben [241] und in unserer Arbeitsgruppe für die stabile Expression/Internalisierung des C5a-Rezeptors und verschiedenen C-terminal verkürzte C5a-Rezeptormutanten genutzt worden [236]. Wichtig für die Auswahl der Zellen war aber auch die Voraussetzung der Rezeptorinternalisierung. So wird der Rezeptor in anderen Zellen wie z. B. in HEK-293- und HeLaT-Zellen zwar gut nach transienter Transfektion exprimiert, aber nur rudimentär bzw. gar nicht internalisiert. Dem gegenüber wird der Wildtyprezeptor nach Ergebnissen aus Vorversuchen in stabil transfizierten RBL-Zellen zu 80-90% nach Stimulus mit 100 nM C3a internalisiert (vgl. Kap. 3.2.3, Abb. 3.10).

Von diesen RBL-Zellen existieren unterschiedliche Subpopulationen. Zur Verfügung standen RBL-2H3-Zellen aus der Arbeitsgruppe von Robert Ames (Smith Kline Beecham, King of Prussia, USA) und aus der Arbeitsgruppe von Martin Oppermann (Universität Göttingen, D).

Die stabile Transfektion des Wildtyps (wt) und auch der ersten Generation an Mutanten (M0, M1, M2 und M3) erfolgte zunächst in den RBL-Zellen von Robert Ames (RBL_A). Allerdings war die Ausbeute an Klonen relativ gering, die Expressionslevel der einzelnen Klone waren sehr unterschiedlich, es gab nur wenige Hochexprimierer und die Klone der Mutante M3 waren generell sehr schlecht exprimiert. Vor allem aber zeigten die stabilen Zelllinien keine Antwort im GARA oder anderen Funktionstests wie z. B. der Ca²⁺-Freisetzung (Daten nicht gezeigt). Von stabil mit dem C3aR transfizierten RBL-Zellen von Martin Oppermann (RBL_O) wurde von Wilken et al. [26] eine Enzymfreisetzung im GARA beschrieben. Deswegen wurde der Wildtyp und die ersten Mutantengeneration in diesen Zellen ebenfalls stabil zur Expression gebracht. Bei den so generierten stabilen Zelllinien waren die Expressionslevel der einzelnen Klone konstanter, es konnten mehr Hochexprimierer gewonnen werden und auch die Mutante M3 wurde geringfügig besser exprimiert. Zudem zeigte der Wildtyp im GARA eine Enzymfreisetzung (Daten nicht gezeigt). Für die stabile Transfektion aller weiteren Mutantengenerationen wurden daher RBL_O-Zellen eingesetzt. Für einen Vergleich der erzielten C3a-Rezeptorexpression in RBL_A- und RBL_O-Zellen wird auf Tab. 3.2 in Kap. 3.2.4 verwiesen.

3.2.2 Klonierungsstrategie zum Austausch der zehn putativen Phosphorylierungsstellen im C-Terminus des Rezeptors gegen Alanin

Im C-Terminus des Wildtyp-Rezeptors sind zehn putative Phosphorylierungsstellen lokalisiert: vier Threonine an den Positionen 463, 466, 480 und 481 und sechs Serine an den Positionen 449, 459, 465, 470, 475 und 479, siehe Abb. 3.5 (wt, oben). Diese Serine und Threonine wurden gruppenweise gegen Alanine ausgetauscht. Insgesamt wurden so drei Generationen an stabilen Zelllinien hergestellt. Die einzelnen, fett markierten Austausche, die jeweilige Bezeichnung und Generationszuordnung sind in Abb. 3.5 dargestellt.

Die Bezeichnung M4 fehlt in diesem Schema, da sie einer von Herrn Oppermann generierten und uns in Form von zwei Klonen, M4-15 und M4-17, zur Verfügung gestellten C3aR-

Mutante zugeordnet wurde. In M4 wurde das Serin an Position 449 gegen ein Alanin ausgetauscht. Es sind allerdings noch zwei weitere Mutationen an den Positionen 453 (Leucin gegen Alanin) und 454 (Isoleucin gegen Alanin) vorhanden. Für den β_2 -adrenergen Rezeptor konnte gezeigt werden, dass ein di-Leucin-Motiv im C-Terminus in die Internalisierung des Rezeptors involviert ist [258].

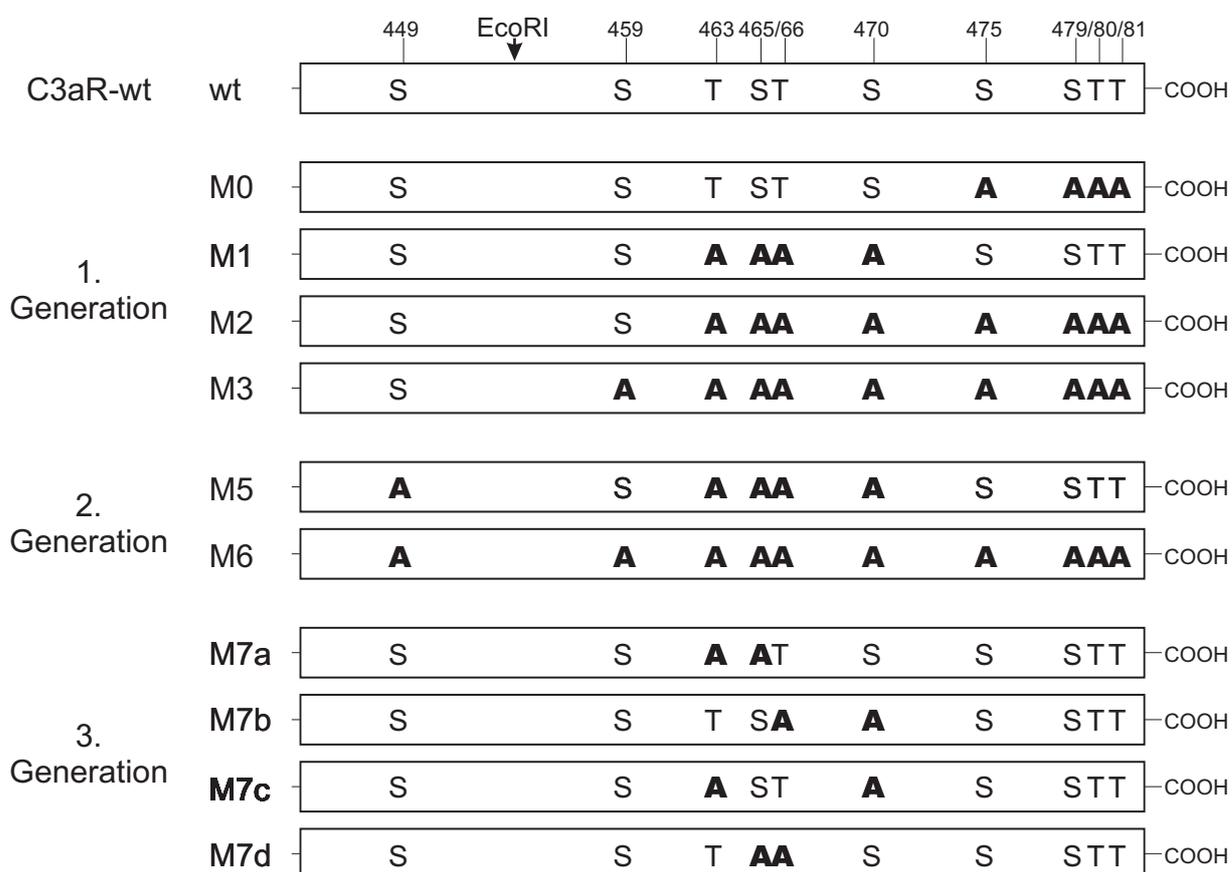


Abb. 3.5: Übersicht über die generierten C3aR-Mutanten. Die im Vergleich zum C3aR-Wildtyp ausgetauschten putativen Phosphorylierungsstellen bei den einzelnen Mutanten der ersten bis dritten Generation sind jeweils fett markiert.

Zur Generierung der C-terminalen Austauschmutanten des C3aR waren verschiedene Klonierungsstrategien notwendig, die im einzelnen nachfolgend beschrieben werden.

• Klonierung des C3aR-wt (TC) in den pef1/HisA-Vektor

Als Wildtyp wurde der in pTC13M (pcDNA1/Amp-Vektor, Vektorkarte im Anhang) enthaltene C3a-Rezeptor gewählt, in den zwei zusätzlichen Schnittstellen NruI und BsrGI von Dr. T. Crass, einem Mitglied der Arbeitsgruppe, eingefügt wurden (hC3aR-wt (TC), Sequenz im Anhang). Da zusätzlich noch die 5'-UTR des C5aR als Flag in diesem Vektor enthalten war, die möglicherweise einen störenden Einfluss auf die Expression des Konstruktes haben konnte, wurde der C3aR mit Hilfe der Primer Sett001 und Sett002 (siehe Kap. 2.1.7) subkloniert. Dabei wurden drei neue Schnittstellen eingebracht, zwei zur Klonierung des Inserts in den Vektor pcDNA3.1HisA (Sett001: BamHI, Sett002: XhoI) und eine zur Überprüfung und

Unterscheidung des neu generierten Konstruktes (Sett002: KpnI). Zur Verdeutlichung der Subklonierung siehe Abb. 3.6.

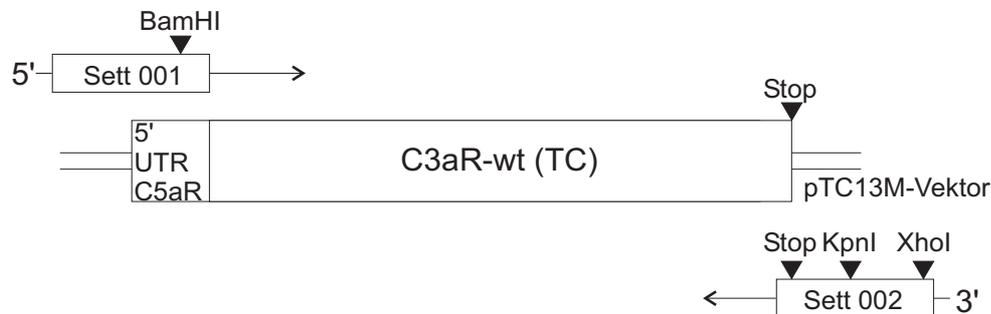


Abb. 3.6: Skizze zur Subklonierung des C3aR-wt (TC) aus dem Vektor pTC13M

Zur Reduzierung von Amplifikationsfehlern bei diesem 1,5 kb langen Insert sollte ursprünglich ein Pfu-Ansatz gewählt werden, da die Fehlerrate bei diesem Enzym deutlich kleiner ist als bei der Taq. Trotz Optimierungsversuchen bezüglich der $MgCl_2$ -Konzentration, der eingesetzten Primer- und Template-Mengen und der Reaktionsbedingungen konnte das Insert jedoch nicht in einer Pfu-PCR amplifiziert werden. Aus diesem Grunde wurde ein anderer Weg gewählt, bei dem das Insert zunächst direkt mit Hilfe der Taq aus einer 100fach erhöhten Menge an Template-DNA in einer auf sechs Zyklen verkürzten PCR amplifiziert wurde. Das PCR-Produkt wurde nach Aufreinigung in eine Pfu-PCR eingesetzt und konnte erfolgreich amplifiziert werden.

Mit dem aufgereinigten Pfu-PCR-Produkt erfolgte eine Restriktionsspaltung mit BamHI und XhoI und entsprechende Aufreinigungsschritte zur Vorbereitung des Inserts für die Ligation. Der Vektor pcDNA3.1/HisA (vgl. Kap. 3.2.1; Vektorkarte siehe Anhang) wurde ebenfalls mit BamHI und XhoI geschnitten, anschließend dephosphoryliert und über Agarosegelelektrophorese aufgereinigt. Vektor und Insert wurden in verschiedenen Ansätzen neben entsprechenden Kontrollen ligiert, anschließend gefällt und in elektrokompetente *E.coli* GM 2163 transformiert. Einige Klone wurden durch Restriktionsspaltung überprüft, wobei 12 von 17 positiv waren (ca. 70%). Drei ausgewählte Klone (pCR1, pCR7 und pCR10) wurden zur DNA-Maxipräparation eingesetzt und die DNA durch Restriktionsverdau erneut erfolgreich überprüft. Nach transienter Transfektion der Klone in HEK-293-Zellen erfolgte eine ^{125}I -C3a-Zweipunktbindung zur Überprüfung der Rezeptorexpression. Alle drei Klone zeigten Bindung, hatten also den Rezeptor exprimiert.

Zur Umklonierung des C3aR-wt (TC) in den Expressionsvektor pEF1/HisA wurde das Konstrukt PCR7 (siehe oben) ausgewählt und mit Hilfe von XbaI und BamHI geschnitten. Der pEF1/HisA-Vektor wurde ebenso geschnitten, dephosphoryliert und mit dem Insert ligiert. Nach der Ligation folgte die gleiche Prozedur wie für das Konstrukt PCR7 beschrieben. Auch hier wurden drei Klone (Plasmidminipräparation 5, 8 und 11) zur DNA-Maxipräparation eingesetzt. Zwei diese Klone, pEF7/5 und pEF7/11, wurden mit Hilfe der ^{125}I -C3a-Zweipunktbindung auf ihre Rezeptorexpression getestet und waren positiv. Parallel erfolgte eine durchflusszytometrische Kontrolle der Rezeptorexpression, ebenfalls mit positivem Ergebnis.

• Klonierung der ersten Mutantengeneration (M0, M1, M2 und M3)

In der Arbeitsgruppe existierten bereits Austauschmutanten der C-terminalen putativen Phosphorylierungsstellen des C3a-Rezeptors, die zur Untersuchung der Phosphorylierung von Dr. D. Bock generiert wurden, die sich aber in einem für die Expression in RBL-Zellen ungeeigneten pGEX-4T1-Vektor befanden (Übersicht siehe Anhang). Teile dieser Konstrukte wurden in die Klonierungsstrategie mit einbezogen. Ein direktes Umklonieren der mutierten C-Termini war nicht möglich, da das Herausschneiden der Inserts nur mit den Restriktionsenzymkombinationen EcoRI/XhoI, EcoRI/PstI oder EcoRI/NotI erfolgen konnte. Der pEF1/HisA-Vektor mit dem Wildtyp (pEF7/11) besitzt jedoch keine NotI-Schnittstelle, dafür aber zwei XhoI- und vier PstI-Schnittstellen. Zur Umklonierung wurde deshalb eine sog. Tripelligation gewählt. Für einen Überblick über die Klonierungsstrategie siehe S. 65.

Dazu wurde der C3aR mit den Enzymen BamHI und EcoRI aus dem Konstrukt pEF7/11 (C3aR-wt in pEF1/HisA, s. o.) herausgeschnitten. Der pEF1/HisA Vektor wurde mit BamHI und NotI geschnitten und die einzelnen Rezeptormutanten mit EcoRI und NotI aus ihrem pGEX-4T1-Vektor herausgeschnitten. Alle Teilstücke wurden gelelektrophoretisch aufgetrennt, aufgereinigt und anschließend in die Ligation eingesetzt. Jeweils acht Klone des Ligationsansatzes pro Konstrukt wurden durch Restriktionsspaltungen auf das Vorhandensein des Inserts geprüft. Die Abb. 3.7 zeigt das Restriktionsmuster nach Verdau mit BamHI/EcoRI (1) bzw. BamHI/NotI (2) für die Klone der Mutanten M0, M1 und M2.

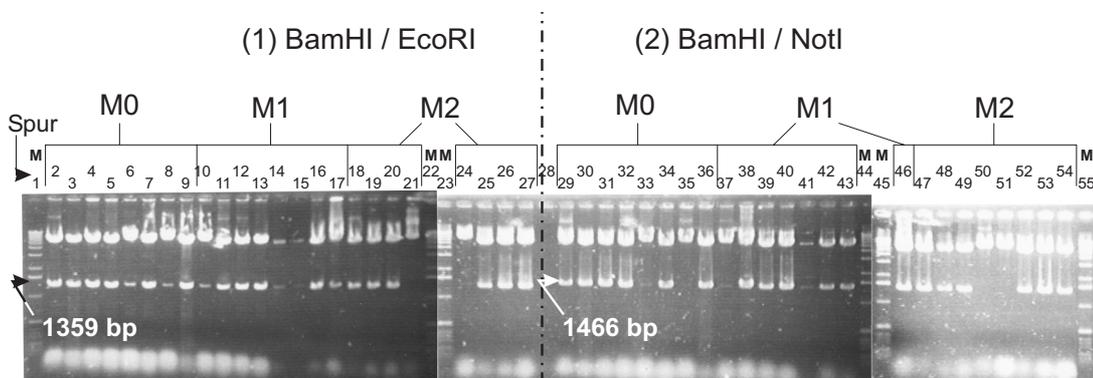


Abb. 3.7: Überprüfung des Ligationsansatzes zur Herstellung der stabilen Mutanten pEF1/HisA-M0, -M1 und -M2 (bei den Spuren 14,15 und 41 waren die Geltaschen defekt).

Nach dem Muster der ersten Spaltung (1) zeigten alle Klone mit zwei Ausnahmen bei Mutante M2 (Spuren 21 + 24) ein Insert. Anhand des zweiten Restriktionsspaltungsmusters zeigte sich jedoch, dass auch bei den Mutanten M0 (Spur 33 + 35) und M1 (Spur 37) Klone defekt waren. Die Klone M0/3 (Spur 4), M1/3 (Spur 12) und M2/6 (Spur 25) wurden jeweils zur Plasmidmaxipräparation eingesetzt. Anhand der Ergebnisse der Sequenzierung des hinteren Rezeptordrittels bei M0, M2 und M3 bzw. des gesamten C3aR-Inserts bei Mutante M1 ließen sich Fehler in den Konstrukten weitgehend ausschließen. Von den jeweiligen Plasmidpräparationen wurden 40 µg mit Hilfe des Enzyms MluI (40 U) als Vorbereitung für die stabile Transfektion unter sterilen Bedingungen linearisiert. Die stabile Transfektion mit diesen Konstrukten wurde wie unter Kap. 2.2.2.5 beschrieben durchgeführt.

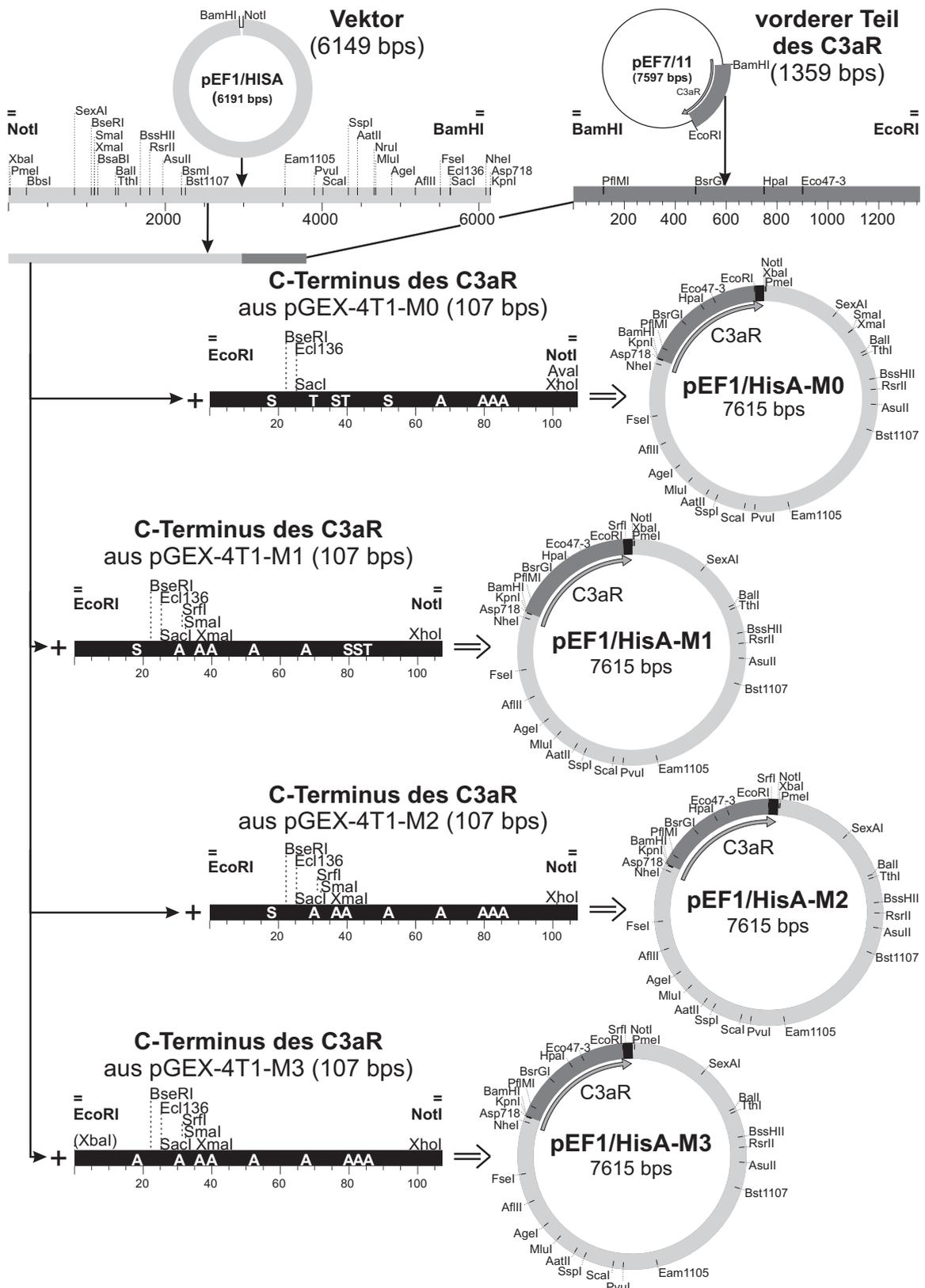


Abb. 3.8: Klonierungsstrategie zur Generierung der Mutanten M0 bis M3. Die Klonierung der Mutanten erfolgte als Tripelligation. Die für die Vorbereitung der einzelnen Teilstücke verwendeten Restriktionsschnittstellen sind hervorgehoben und fett markiert. Die eingeklammerte XbaI-Site beim C-Terminus aus pGEX-4T1-M3 wird erst durch die Ligation wieder komplementiert.

- **Klonierung der zweiten Generation an C3aR-Mutanten (M5, M6)**

Die Klonierung dieser Mutantengeneration und auch die stabile Transfektion von RBL-2H3-Zellen mit diesen Konstrukten wurde von unserem Medizindoktoranden Herrn Henning Hamacher durchgeführt und wird in seiner Dissertation beschrieben. Die Generierung konnte nicht wie bei den Mutanten M0 bis M3 durch Umklonierung bereits existierender Konstrukte realisiert werden, da die letzte der zehn putativen Phosphorylierungsstellen in 5'-Richtung unmittelbar vor der verwendeten EcoRI-Schnittstelle liegt und nicht über eine andere Schnittstelle herausgeschnitten werden kann. Aus diesem Grund wurde der vordere Teil des C3aR aus dem Konstrukt pEF7/11 mit Hilfe der Primer Sett001 und Sett003 (siehe Kap. 2.1.5) subkloniert, wobei über den Primer Sett003 neben dem Austausch Ser⁴⁴⁹Ala noch eine zusätzliche BssHIII-Schnittstelle zur Kontrolle eingefügt wurde. Das PCR-Produkt wurde mit BsrGI und EcoRI geschnitten. Der hintere Teil des C3aR wurde zum für Mutante M5 aus pEF1/HisA-M1 und für Mutante M6 aus pEF1/HisA-M3 über Restriktionsspaltung mit EcoRI und NotI erhalten. Als Vektor wurde die Mutante M1 ausgewählt, da sich die damit stabil transfizierten RBL-Zellen als besonders gute Exprimierer erwiesen hatten. Der Vektor wurde mit BsrGI und NotI geschnitten. Es erfolgte wiederum eine Tripelligation. Bei beiden Mutanten wurde durch Sequenzierung das gesamte C3aR-Insert überprüft, das sich in beiden Fällen als fehlerfrei herausstellte.

- **Klonierung der dritten Mutantengeneration (M7a-d)**

Die Klonierung dieser Mutantengeneration und auch die stabile Transfektion von RBL-2H3-Zellen mit diesen Konstrukten wurde von Frau Claudia Rheinheimer durchgeführt. Die dritte Generation wurde erst als Folge der Untersuchungsergebnisse an den übrigen Mutanten generiert. Bei diesen Untersuchungen hat sich herausgestellt, dass die in Mutante M1 ausgetauschten putativen Phosphorylierungsstellen einen deutlichen Einfluss auf die Internalisierung haben (siehe Kap. 3.2.4). Um den Bereich weiter eingrenzen zu können, wurden die vier putativen Phosphorylierungsstellen paarweise gegen Alanin ausgetauscht, und zwar im Vergleich mit Mutante M1 bei Mutante M7a die beiden mehr N-terminalen, bei M7b die beiden mehr C-terminalen, bei M7c die äußeren und bei Mutante M7d die beiden inneren Sites. Die Klonierung dieser Konstrukte erfolgte mit Hilfe von Inserts, die aus miteinander hybridisierten synthetischen Oligonukleotiden gebildet wurden (siehe Kap. 2.1.5). Die Inserts, die bereits die notwendigen Schnittstellen aufwiesen, wurden nach einer Fällung mit dem pGEX-4T1-M1-Vektor ligiert, der mit SacI und NotI geschnitten war. Von vier der aus dem Ligationsansatz erhaltenen Klone erfolgten DNA-Maxipräparationen, die durch eine Restriktionsspaltung mit EcoRI und NotI für die Ligation vorbereitet wurden. Als Vektor für die Mutanten wurde wiederum pEF1/HisA-M1, geschnitten mit EcoRI und NotI verwendet. Von jeweils einem der gewachsenen Klone wurde nach Restriktionsüberprüfung DNA im großen Maßstab für die stabile Transfektion amplifiziert. Jeweils das hintere (C-terminale) Drittel des C3a-Rezeptors in den einzelnen Konstrukten wurde durch Sequenzierung überprüft. Es zeigten sich keine Abweichung von der erwarteten Sequenz.

3.2.3 Weiterentwicklung eines durchflusszytometrischen Internalisierungsassays zur Charakterisierung der neu generierten stabilen Zelllinien

Der bereits im Rahmen der Diplomarbeit entwickelte durchflusszytometrische Internalisierungsassay (vgl. Kap. 2.2.3.2) wurde für die Charakterisierung der stabilen Zelllinien weiterentwickelt. In dem früher angewandten Assay wurde jeweils nur eine Zellart entweder auf ihr zeit- oder dosisabhängiges Internalisierungsverhalten hin untersucht. Im Rahmen der vorliegenden Studie sollten mehrere Zelllinien parallel vermessen werden, um sie unabhängig von versuchsbedingten Schwankungen der mean-Werte vergleichen zu können. Dabei wurden pro Versuchstag maximal 144 Einzelwerte, verteilt auf 6 Mikrotiterplatten (jeweils 24 Werte pro Platte), generiert und im FACS vermessen. Die Gesamtinkubationsdauer von Probe 1 bis 144 mit Stimulus wurde durch Staffelung der Einzelwerte so kurz wie möglich gehalten, damit die Messung nicht durch Fehler infolge von Zellalterung beeinträchtigt wurde. Nach einer Stunde, der maximalen Gesamtinkubationsdauer, haben sich nachweislich keine größeren Veränderungen des Internalisierungsverhaltens der bis zum Zeitpunkt der Messung bei RT gelagerten Zellen ergeben (Daten nicht gezeigt).

Die Bedingungen zur Durchführung der durchflusszytometrischen Analysen wurden zunächst anhand der Klone AC9 (pEF1/HisA-wt in RBL_A-Zellen) und GD8 (pEF1/HisA-M3 in RBL_A-Zellen) ausgetestet, siehe Abb. 3.9.

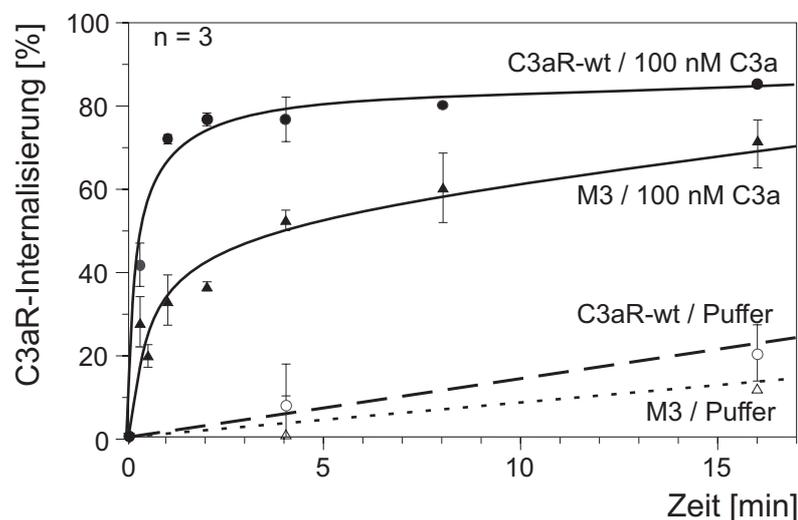


Abb. 3.9: Vorstudien zur Ermittlung optimaler Bedingungen für die durchflusszytometrische Analyse der stabilen RBL-Zelllinien

Das Internalisierungsverhalten konnte gut bis zu einer Inkubationszeit von 10-15 Minuten beobachtet werden. Bei längeren Inkubationszeiten wurde schon durch Zugabe von Puffer (DMEM) ein Rückgang der Rezeptorzahlen, vermutlich aufgrund von Zellalterung, beobachtet (Daten nicht gezeigt). Im Bereich von 1 bis 4 Inkubationsminuten mit 100 nM C3a bei 37°C lassen sich die größten Unterschiede im Internalisierungsverhalten beobachten. Für ver-

gleichende Internalisierungsstudien an den mit den verschiedenen C3aR-Mutanten stabil transfizierten RBL-Zelllinien wurde dies berücksichtigt. Die Untersuchung der Dosisabhängigkeit der C3a-Rezeptorinternalisierung erfolgte nach einer 3minütigen Inkubationszeit der Zellen mit steigenden Konzentrationen an C3a. Die Charakterisierung der schnellen Rezeptorinternalisierung erfolgte nach 1 bzw. 4 Minuten Inkubation der Zellen mit 100 nM C3a. Diese relativ hohe Konzentration an C3a wurde gewählt, weil durch sie auch bei Hochexprimierern eine vollständige Absättigung aller Rezeptoren sichergestellt werden konnte.

Zur Realisierung eines Assays, bei dem die Gesamtkinetiken von vier Zelllinien parallel innerhalb eines Experiments ermittelt werden, wurden pro Zelllinie je sechs verschiedene Zeitpunkte in dreifacher Wiederholung prozessiert, wovon ein Zeitpunkt, der 0-Minutenwert, als Berechnungsgrundlage diente und immer mitgeführt werden musste. Dabei wurde pro Zeitpunkt ein Reaktionsgefäß mit Stimulus für insgesamt vier Inkubationsproben gleichzeitig mit einem die Zellen einer ersten Zelllinie beinhaltenden Reaktionsgefäß in einem Heizblock fünf Minuten bei 37°C vorinkubiert. Die übrigen Reaktionsgefäße mit den Zellen der anderen Zelllinien wurden jeweils um 15 Sekunden versetzt ebenfalls in den Heizblock gestellt. Gestartet wurde nach Ablauf der Vorinkubation durch Zugabe eines Stimulus-Aliquots zu den vorgelegten Zellen, und nicht wie in dem früheren Assay, durch Zugabe der Zellen zu den vorgelegten Stimuli. Nur so konnte die exakte Einhaltung der Reaktionszeiten gewährleistet werden. Das Abstoppen und weitere Prozessieren der Proben erfolgte nach der unter Kap. 2.2.3.2 beschriebenen Methode.

Zur genaueren Charakterisierung der schnellen Rezeptorinternalisierung wurden zwei Zeitpunkte, der 1- und der 4-Minutenwert ausgewählt. Zum Erreichen einer möglichst hohen Signifikanz wurden diese Versuche als 7fach-Werte ausgelegt und mehrfach an verschiedenen Tagen wiederholt (vgl. Kap. 3.2.5.3). Zur Realisierung dieser Untersuchung parallel an vier verschiedenen Zelllinien wurden zunächst die als Berechnungsgrundlage dienenden 0-Minutenwerte aller Mutanten in vierfacher Wiederholung prozessiert. Im Anschluss daran wurden die übrigen Messwerte, wie für die Gesamtkinetik beschrieben, gestaffelt generiert, wobei immer abwechselnd mit DMEM und C3a (100 nM Endkonz.) in insgesamt 7facher Wiederholung für exakt 1- bzw. 4-Minuten inkubiert wurde. Auch bei dieser Untersuchung wurden die Stimuli und die Zellen jeweils fünf Minuten vorinkubiert. Das Abstoppen und weitere Prozessieren der Proben erfolgte nach der unter Kap. 2.2.3.2 beschriebenen Methode.

Die Untersuchung der Dosis-Wirkungsbeziehung des Internalisierungsverhaltens wurde mit sechs verschiedenen Konzentrationen parallel an vier Mutanten untersucht, wobei eine der Konzentrationen dem Pufferwert (0 nM) entsprach. Bei diesen Untersuchungen waren die Abweichungen der einzelnen Werte für die Kontrollseren von ihrem Mittelwert so gering, dass nur ein Wert mit dem Kontrollserum, dafür aber drei Werte mit dem Anti-C3aR-Serum inkubiert wurden. Deshalb wurden diesmal pro Konzentration und Mutante vier Reaktionsgefäße mit jeweils der Hälfte (45 µl) an Zellsuspension parallel mit einem Stimulus-enthaltenden Reaktionsgefäß 5 min bei 37°C vorinkubiert und die Reaktion in den einzelnen Gefäßen im Abstand von 10 s durch Zugabe von 12,5 µl Stimulus gestartet. Im Gegensatz zu den beiden bisher beschriebenen Verfahren erfolgte das Prozessieren aller zu einer Konzentration und Mutante gehörenden Werte direkt nacheinander. Im Anschluss wurden die zur gleichen Kon-

zentration gehörenden Werte der anderen Mutanten nacheinander generiert. Das Abstoppen der einzelnen Proben erfolgte nach jeweils 3 Minuten wie bereits in Kap. 2.2.3.2 beschrieben, jedoch mit dem Unterschied, dass jeweils nur ein Wert (50 μ l) dem Reaktionsgefäß entnommen und in das jeweilige vorgelegte Serum (siehe oben) überführt wurde. In einer Abwandlung dieses Versuches wurden parallel sechs Mutanten mit allerdings nur vier Konzentrationen an Stimulus untersucht, da die Ergebnisse starken tagesabhängigen Schwankungen unterlagen und so eine bessere Vergleichsmöglichkeit gegeben war.

3.2.4 Ergebnisse der durchflusszytometrischen Expressionsüberprüfung der stabilen Zelllinien

Die Methode zur Herstellung von stabilen Zelllinien wurde bereits im Methodenteil beschrieben (siehe Kap. 2.2.2.4). Die gewachsenen Klone wurden entsprechend ihrer Position in der Mikrotiterplatte und der Plattenbezeichnung (10 Platten, A-J) benannt, wobei auch immer die Zuordnung zur jeweiligen Mutation angegeben wurde. In der Regel wurden 24, in Einzelfällen maximal 36 Klone parallel durchflusszytometrisch auf ihre Rezeptorexpression hin überprüft, wobei immer eine entsprechende Positiv- und Negativkontrolle zum Vergleich mitgeführt wurde. Nicht exprimierende Klone wurden verworfen, positive in einem Wiederholungsexperiment bestätigt. Bei unterschiedlicher Rezeptorexpression wurden die Klone noch ein drittes Mal überprüft. Von den getesteten Klonen wurden jeweils drei mit unterschiedlichem, aber konstant gleichem Expressionslevel, möglichst jeweils ein hoch-, mittel- und niedrig-exprimierender Klon, für die weitere Charakterisierung ausgewählt und Aliquots dieser Zellen bei -196°C konserviert. Exemplarisch wird nachfolgend die Rezeptorexpression der vier höchstexprimierenden Klone des Wildtyps und der Mutanten M0-3, sowohl in RBL_A - wie auch in RBL_O -Zellen, als Tabelle (Tab. 3.2) angegeben.

Tab. 3.2: Übersicht über die C3aR-Expressionslevel der Klone des Wildtyps und der Mutanten M0-M3 in RBL_A - und RBL_O -Zellen

Konstrukt	Klonbezeichnung: Rezeptorexpression in RBL_A -Zellen [Δ -mean]				Klonbezeichnung: Rezeptorexpression in RBL_O -Zellen [Δ -mean]			
	Leervektor	CB7: 2,26				AC3: 1,49		
wt	AC9: 63,46	BF3: 47,43	ED10: 23,15	AB5: 12,02	FC2: 49,07	ID2: 24,56	JF8: 16,36	GG11: 12,38
M0	AF1: 22,40	IG4: 14,41	BG12: 8,11	IH4: 2,53	AD12: 22,43	CG7: 21,57	AB4: 17,34	BH10: 17,24
M1	JE2: 50,36	BH6: 45,97	IG4: 32,75	AE9: 25,19	BA6: 61,78	CG1: 59,59	CF5: 55,20	CE8: 48,79
M2	CE4: 31,25	CF12: 29,30	DH9: 10,99	JC9: 4,97	DG7: 40,69	BG6: 23,21	AG4: 16,98	ED5: 14,90
M3	EE9: 16,13	GD8: 11,96	FH5: 11,15	HG9: 11,02	BE12: 18,32	AE3: 16,53	AE8: 15,58	AC9: 10,24

Anhand der Tabelle wird deutlich, dass die Rezeptorexpression verschiedener Klone eines gleichen Konstruktes sehr unterschiedlich war. Aber auch die Höhe der maximal für die verschiedenen Konstrukte erreichten Δ -mean-Werte differierte stark. Das Expressionsverhalten verschiedener Klone einzelner Konstrukte wurde ebenfalls mit Hilfe von Bindungsstudien untersucht, wobei sich ein den durchflusszytometrischen Untersuchungsergebnissen vergleichbarer Trend zeigte (Daten von Herrn H. Hamacher, siehe Anhang). Bezüglich des Expressionsverhaltens der einzelnen Konstrukte in den verschiedenen RBL-Zellen ließ sich kein signifikanter Unterschied feststellen. Auffällig sowohl bei RBL_A- als auch bei RBL_O-Zellen war die insgesamt schlechte C3aR-Expression bei Mutante M3, genauso wie die besonders hohe Expression des C3aR in den Klonen der Mutante M1.

Die Ursache für diese schlechte Expression ist möglicherweise in der zunehmenden Anzahl an Mutationen oder einer ungünstigen Kombination von diesem Insert mit dem Vektor in RBL-2H3-Zellen zu suchen. Ein ähnliches Phänomen zeigte sich bei der Herstellung von C-terminalen Verkürzungsmutanten des C5a-Rezeptors [236] in unserer Arbeitsgruppe, wobei einige Konstrukte zwar nach transienter Transfektion in HEK-293-Zellen ¹²⁵I-C3a-Bindung zeigten, der C5aR aber nicht mit diesen Konstrukten stabil in RBL-2H3-Zellen zur Transfektion gebracht werden konnten. Da jedoch zur Überprüfung der im Rahmen dieser Dissertation generierten Austauschmutanten entweder Teile des Inserts oder der gesamte C3a-Rezeptor, aber nie der gesamte Vektor sequenziert worden waren, konnte auch nicht ausgeschlossen werden, dass das schlechte Expressionsverhalten der Mutante M3 auf einen Fehler im Vektor zurückzuführen war. Deshalb wurde als Vektor für die Generierung der zweiten (M5 und M6) und dritten (M7a-d) Generation (vgl. Kap. 3.2.1), der Vektor der Mutante M1 gewählt. Der C3aR wurde in den Mutanten M5 und M6 jedoch ebenfalls nur gering exprimiert (Daten nicht gezeigt).

Aufgrund des unterschiedlichen Expressionsverhaltens der Mutanten war es wichtig zu überprüfen, ob die Höhe der Rezeptorexpression einen Einfluss auf die Internalisierung hat. Dies wurde anhand verschiedener Klone des C3aR-Wildtyps und der hier nicht aufgeführten Mutante M7a überprüft. Das Resultat dieser Untersuchung ist in Abb. 3.10 (S. 71) dargestellt. Es zeigte sich, dass der Grad der Internalisierung von der Höhe der Rezeptorexpression unabhängig war. Bei allen Klonen des Wildtyps wurden vergleichbare Internalisierungsraten um die 70% nach einer Minute Inkubationszeit mit C3a erzielt. Auch die beiden Klone der Mutante M7a zeigten beide eine ca. 45%ige Rezeptorinternalisierung nach 1minütiger Inkubation mit dem Stimulus.

Die zur Stimulation eingesetzte Ligandenkonzentration muss allerdings im Sättigungsbereich liegen, damit sichergestellt ist, dass nicht wegen eines relativen Ligandenmangels bei Hochexprimierern nur ein Teil der C3a-Rezeptoren besetzt ist und nur dieser Teil internalisiert wird. Für die Untersuchung der Zeitabhängigkeit der Internalisierung und die Charakterisierung der schnellen Rezeptorinternalisierung wurde der C3a-Stimulus deshalb in einer Endkonzentration von 100 nM eingesetzt.

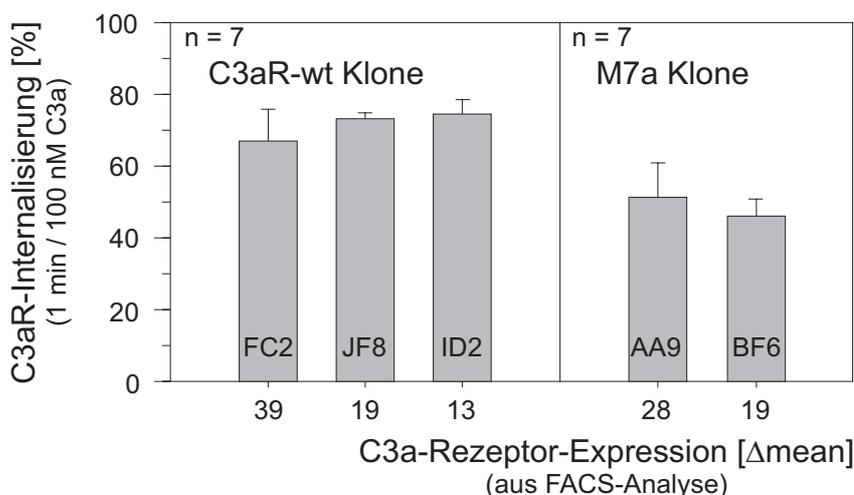


Abb. 3.10: Vergleich des Internalisierungsverhaltens verschiedener Klone eines Konstruktes mit unterschiedlicher Rezeptorexpression anhand zweier Beispiele.

3.2.5 Struktur-Funktionszuordnung durch durchflusszytometrische Ermittlung des zeit- und dosisabhängigen Internalisierungsverhaltens anhand ausgewählter Klone der stabilen Zelllinien

3.2.5.1 Dosis-Wirkungsabhängigkeit der Rezeptorinternalisierung

An den Mutanten der ersten Generation (M0, M1, M2 und M3) wurden Untersuchungen zur Ermittlung des dosisabhängigen Internalisierungsverhaltens durchgeführt. Die Differenz der mittleren Fluoreszenz, detektiert nach Anfärbung der Zellen mit einem spezifischen Anti-C3aR-Immunsersums bzw. einem unspezifischen Präimmunsersums desselben Kaninchens und einem gegen Kaninchen gerichteten, FITC-markierten Sekundärantikörper, dient bei diesem Verfahren als Maß des C3aR-Besatzes auf der Zelloberfläche. Die relative Abnahme dieses Rezeptorbesatzes gegenüber einer Pufferkontrolle fungiert als Maß für die Rezeptorinternalisierung. Aus früheren Ergebnissen unserer Arbeitsgruppe war bereits bekannt, dass der C3a-Rezeptor in Granulozyten dosisabhängig internalisiert wird [239]. Dort führte ein Stimulus von 100 nM C3a nach 3minütiger Inkubation bei 37°C zu einem fast kompletten Verschwinden der C3aR-spezifischen Fluoreszenz, also einer beinahe vollständigen C3aR-Internalisierung. Die halbmaximale Internalisierung wurde bei etwa 12 nM C3a erreicht. Diese Daten dienten als Anhaltspunkt für die Untersuchung der Dosis-Wirkungsabhängigkeit der Internalisierung der verschiedenen Mutanten. Dazu wurden die Zellen jeweils drei Minuten mit Puffer (0 nM) und ansteigenden C3a-Konzentrationen von 0,46 nM, 1 nM, 2,15 nM, 10 nM und 100 nM inkubiert, siehe Abb. 3.11. Für alle Konstrukte und den Wildtyp lässt sich eine Konzentrationsabhängigkeit der Internalisierung feststellen. Zwischen der Mutante M0, bei der die letzten vier C-terminalen putativen Phosphorylierungsstellen ausgetauscht sind, und dem Wildtyp lässt sich kein Unterschied im Internalisierungsverhalten detektieren. Nach einem dreiminütigen Stimulus mit 100 nM C3a sind 85% aller Rezeptoren auf der Oberfläche internalisiert. Die Konstrukte M1 bis M3 zeigen einen ähnlichen, von dem des Wildtyps und M0 unterschiedlichen Kurvenverlauf. Im Vergleich zum Wildtyp und M0 werden bei der Mutante M1, in der die vier nächsten mehr N-terminal gelegenen putativen Phosphorylie-

rungsstellen ausgetauscht sind, nach einem Stimulus mit 100 nM C3a nur 2/3 der Rezeptoren, also 66%, internalisiert. Die Werte der beiden anderen Mutanten für diese Konzentration liegen bei etwa 50% für Mutante M2, bei der die Austausch von M0 und M1 kombiniert sind und bei etwa 40% für Mutante M3, bei der zusätzlich zu den Austauschen von M2 noch eine neunte, sich N-terminal anschließende putative Phosphorylierungsstelle ausgetauscht ist.

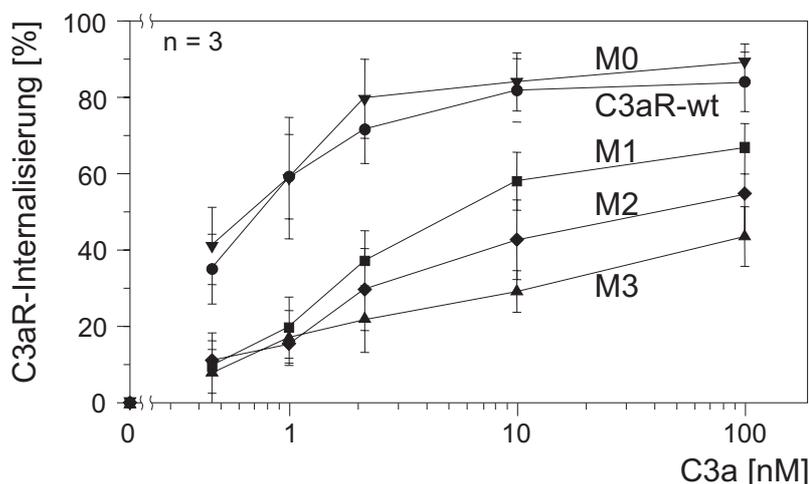


Abb. 3.11: Dosis-Wirkungskurven der ersten Mutantengeneration im Vergleich zum Wildtyp nach 3minütiger Stimulation bei 37°C mit ansteigenden Konzentrationen an C3a. Dargestellt sind Mittelwerte von jeweils Dreifachwerten eines repräsentativen Experiments, das dreimal unabhängig wiederholt wurde.

3.2.5.2 Vergleich des zeitabhängigen Internalisierungsverhaltens verschiedener Mutanten mit Hilfe von Gesamtkinetiken

An den stabil transfizierten Rezeptormutanten der ersten Generation (M0 bis M3) wurden durchflusszytometrische Untersuchungen bezüglich der Zeitabhängigkeit der Internalisierung durchgeführt. Ausgehend von früheren Ergebnissen unserer Arbeitsgruppe und den Erkenntnissen, die während der Methodenoptimierung entstanden, war das Internalisierungsverhalten des Wildtyps in RBL-Zellen bekannt. Es kam innerhalb der ersten Minuten nach Inkubationsstart zu einer Internalisierung mit exponentiell ansteigender Internalisierungsrate. Nach ca. 3-5 Minuten wurde bereits eine Plateauphase erreicht. Für den Vergleich des Internalisierungsverhaltens der einzelnen Mutanten mit dem Wildtyp wurden die Parameter Internalisierungsrate und die Höhe des erreichten Internalisierungsmaximums herangezogen. Dazu wurden innerhalb der aufsteigenden Phase nach 0,5 min, 1 min, 2 min, 4 min und 10 min Inkubation mit dem Stimulus die prozentuale Internalisierung ermittelt. Mit Hilfe des modifizierten Verfahrens zur Durchführung von Gesamtkinetiken (vgl. Kap. 3.2.3) war es möglich, vier Mutanten im direkten Vergleich unter exakt gleichen Versuchsbedingungen zu vermessen. Dadurch wurde die Erkennung von kleineren Unterschieden im Internalisierungsverhalten erleichtert. Die Abb. 3.12 zeigt die Gesamtkinetiken für die Mutanten der ersten Generation im Vergleich zum Wildtyp. Die angegebenen prozentualen Internalisierungswerte sind Mittelwerte von jeweils Dreifachwerten eines repräsentativen Experiments, das insgesamt dreimal wiederholt wurde. Der Kurvenverlauf wurde mit der Sigma-Plot Software (Jandel) iteriert und ist aus diesem Grunde nur gestrichelt dargestellt.

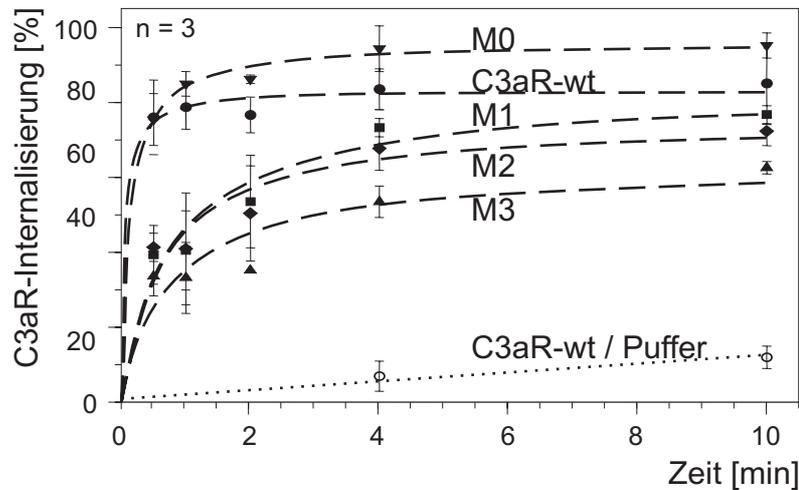


Abb. 3.12: Auswirkungen der C-terminalen Rezeptormutationen auf das mit 100 nM ausgelöste C3aR-Internalisierungsverhalten. Dargestellt sind Mittelwerte und Standardabweichungen von $n=3$ Einzelwerten eines repräsentativen Experimentes, das dreimal unabhängig wiederholt wurde.

Das Internalisierungsverhalten des Wildtyps und der Mutante M0 ist innerhalb der ersten Minute gleich. Beide zeigen einen drastischen Anstieg der Internalisierung. Nach drei Minuten hat der Wildtyp bereits sein Internalisierungsmaximum von etwa 80% erreicht. Bei den späteren Zeitpunkten bleiben die Werte in dem Plateaubereich. Die Mutante M0 erreicht erst nach etwa 4-5 Minuten ein Maximum von 90%, das konstant beibehalten wird. Sie wird insgesamt besser internalisiert als der Wildtyp. Die Mutanten M1 bis M3 zeigen im Gegensatz dazu ein deutlich verlangsamtes und auch in der Höhe des erreichten Maximums reduziertes Internalisierungsverhalten. Es zeigt sich eine Abstufung anhand der zunehmenden Anzahl an Alanin-Austauschen von Mutante M1 mit etwa 72% Internalisierung, über Mutante M2 mit etwa 65% bis hin zu Mutante M3, die mit etwa 55% am schlechtesten internalisiert. Auch diese Mutanten erreichen nach etwa 4-5 Minuten ein Plateau, das allerdings eine leichte Aufwärtstendenz zeigt. Deshalb wurde das zeitabhängige Internalisierungsverhalten nach einer verlängerten Inkubationszeit von 20 und 30 Minuten untersucht. Die Ergebnisse waren allerdings nur bedingt aussagefähig, da auch die nur mit Puffer inkubierten Zellen an Rezeptor verloren, wie auch schon bei der Anpassung des Internalisierungsassays für den C3aR-wt gezeigt (vgl. Abb. 3.10). Trotzdem lässt sich davon ableiten, dass das Internalisierungsmaximum der Mutanten M1 bis M3 sich zwar dem des Wildtyps annähert, jedoch niedriger bleibt (Daten nicht gezeigt). Auffällig ist auch, dass die Mutante M3 mit neun von zehn Austauschen immer noch Rezeptorinternalisierung zeigt.

Um die Unterschiede im Internalisierungsverhalten der einzelnen Mutanten besser beurteilen zu können und Signifikanzen herauszuarbeiten, wurden einzelne Zeitpunkte, der 1- bzw. 4-Minutenwert, genauer betrachtet. Dazu wurden die unter Kap. 3.2.3 beschriebene Methode zur Untersuchung der schnellen Rezeptorinternalisierung angewandt. Die Ergebnisse dieses Tests sind im nächsten Kapitel beschrieben.

3.2.5.3 Untersuchungen zur schnellen Rezeptorinternalisierung

• Internalisierungsverhalten nach 1minütiger Stimulusinkubation mit 100 nM C3a

Die Beeinflussung der schnellen Rezeptorinternalisierung durch die C-terminalen Mutationen wurde an den Klonen der ersten (M0-M3) und der zweiten Generation (M5 und M6) näher untersucht. Dazu wurde der für die Ermittlung der Gesamtkinetiken verwendete durchflusszytometrisch-antigenetische Internalisierungsassay, wie bereits unter Kap. 3.2.3 beschrieben, angepasst. Pro Mutante und Versuch wurden sieben Einzelwerte generiert und das Experiment unterschiedlich oft wiederholt, wie in Abb. 3.13 angezeigt.

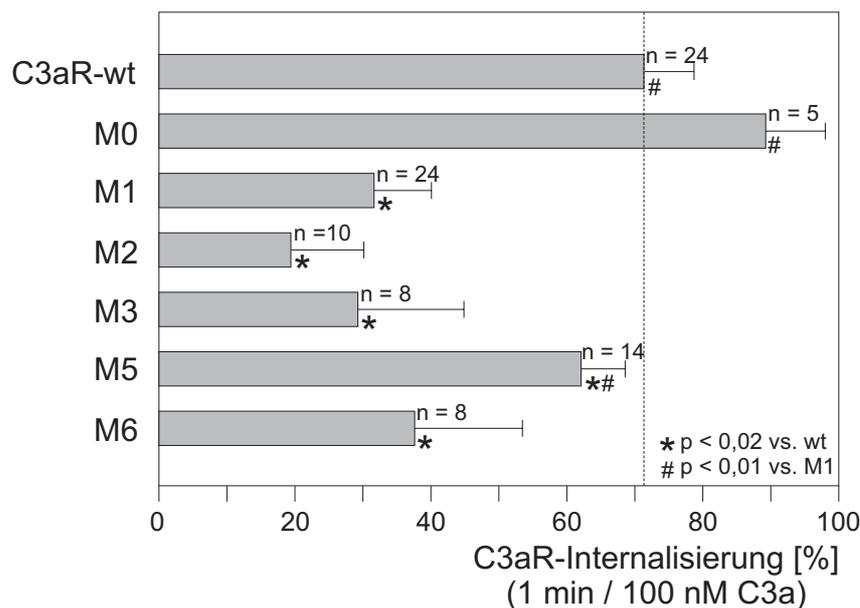


Abb. 3.13: Überblick über das schnelle Rezeptorinternalisierungsverhalten der ersten und zweiten Generation an Mutanten. Dargestellt ist jeweils die errechnete prozentuale Internalisierung nach 1minütiger Stimulation mit 100 nM C3a als Mittelwert aus allen Messungen mit jeweils n = 7 Einzelwerten.

Wie auch schon in den Gesamtkinetiken zeigt die Mutante M0 ein gegenüber dem Wildtyp (72%) verbessertes Internalisierungsverhalten (88%), was allerdings nach dem Dunnett-T3-Test nicht signifikant ist. Die prozentuale Internalisierung der Mutanten M1 bis M6 ist im Vergleich zum Wildtyp und zu Mutante M0 signifikant reduziert. Die Mutanten M2, M3 und M1 unterscheiden sich kaum und zeigen dabei die geringste Internalisierungsrate mit 20-30%. Die Mutante M5 wird doppelt so gut (60%) internalisiert wie die Mutante M1, von der sie sich nur durch eine zusätzliche Mutation eines Serins an Position 449 unterscheidet. Auch dieser Effekt ist signifikant. Der gleiche Mutations-Unterschied besteht zwischen den Konstrukten M6 und M3, wobei auch hier der Vergleich ein durch die zusätzliche Mutation in M6 verbessertes Internalisierungsverhalten (38%) gegenüber Mutante M3 (30%) ergibt. Allerdings wurde für diesen Unterschied keine Signifikanz festgestellt. Auffällig ist auch hier wieder, dass die "Komplett"-Mutante M6, bei der alle zehn putativen Phosphorylierungsstellen gegen Alanine ausgetauscht sind, noch ca. 40% Restinternalisierung zeigt, etwa die Hälfte der prozentualen Rezeptorinternalisierung des Wildtyps.

- **Internalisierungsverhalten nach 4minütiger Stimulusinkubation mit 100 nM C3a**

Um herauszufinden, ob die beobachteten Unterschiede im Internalisierungsverhalten der Mutanten nur Folge einer zeitlichen Verzögerung sind oder ob ein echter prozentualer Unterschied vorliegt, wurde ein späterer Zeitpunkt, 4 Minuten nach Liganden-Stimulus, betrachtet. Ab diesem Zeitpunkt lagen die in der Gesamtkinetik gemessenen prozentualen Internalisierungsraten in einem Plateaubereich. Das Ergebnis dieser Untersuchung ist in Abb. 3.14 dargestellt.

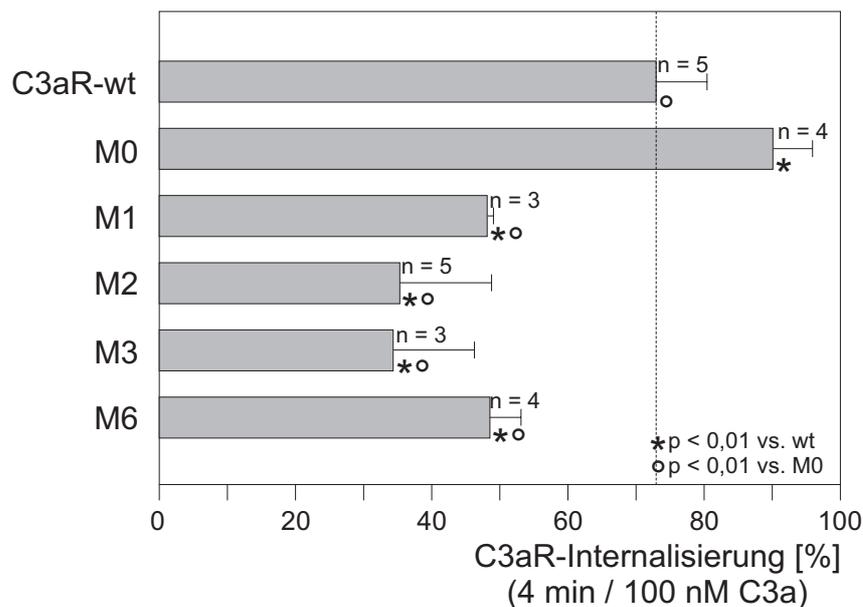


Abb. 3.14: Internalisierungsverhalten von C3aR-Mutanten nach 4minütiger Stimulation mit 100 nM C3a. Dargestellt sind für jedes Konstrukt die Mittelwerte und Standardabweichungen der prozentual errechneten Internalisierung aus n = 7 Einzelwerten eines mehrfach wiederholten (siehe Abb.) Experiments.

Auch nach einer 4minütigen Inkubation mit 100 nM C3a zeigten die C3aR-Mutanten M1, M2, M3 und M6 ein signifikant reduziertes Internalisierungsverhalten gegenüber dem Wildtyp und M0. Die nicht signifikanten, aber in Abb. 3.13 optisch erkennbaren Unterschiede (vgl. auch Abb. 3.12) der prozentualen Internalisierung zwischen den Mutanten M1, M2, M3 und M6 haben sich ausgeglichen. Im Vergleich zum 1-Minutenwert zeigen alle eine erhöhte, jetzt 50%ige Internalisierung des C3a-Rezeptors nach 4 min C3a-Stimulus. Die Mutante M6 zeigt trotz des Austausches aller putativen Phosphorylierungsstellen im C-Terminus des Rezeptors noch Internalisierung. Die Mutante M0 zeigt wieder ein um etwa 15-20% besseres Internalisierungsverhalten im Vergleich zum Wildtyp, wobei die maximal erreichte Internalisierungsrate in beiden Fällen nicht angestiegen ist.

- **Untersuchung des schnellen Rezeptorinternalisierungsverhaltens in Derivaten der Mutante M1**

Sowohl nach 1- wie auch nach 4minütiger Inkubationszeit mit 100 nM C3a zeigen die Mutanten M1, M2, M3 und M6 ein signifikant reduziertes Internalisierungsverhalten im Vergleich

zum Wildtyp. Dabei konnten zwischen den einzelnen Mutanten keine signifikanten Unterschiede ermittelt werden. Das im Vergleich zum Wildtyp signifikant reduzierte Internalisierungsverhalten der Konstrukte M1, M2, M3 und M6 kann deshalb auf die ihnen gemeinsamen Mutationen der Serine an den Positionen 465 und 470 und der Threonine an den Positionen 464 und 466 zurückgeführt werden.

Zur Überprüfung dieser Feststellung und zur näheren Eingrenzung der für die reduzierte Internalisierung verantwortlichen Stellen wurde eine dritte Generation an stabilen Mutanten erzeugt, alles Derivate von M1. In M7a waren die beiden "N-terminalen" Stellen (Thr⁴⁶³ u. Ser⁴⁶⁵), in M7b die beiden "C-terminalen" Stellen (Thr⁴⁶⁶ u. Ser⁴⁷⁰), in M7c die beiden inneren (Ser⁴⁶⁵ u. Thr⁴⁶⁶) und in M7d die beiden äußeren (Ser⁴⁶⁵ u. Ser⁴⁷⁰) Positionen gegen Alanin ausgetauscht, siehe Abb. 3.15.

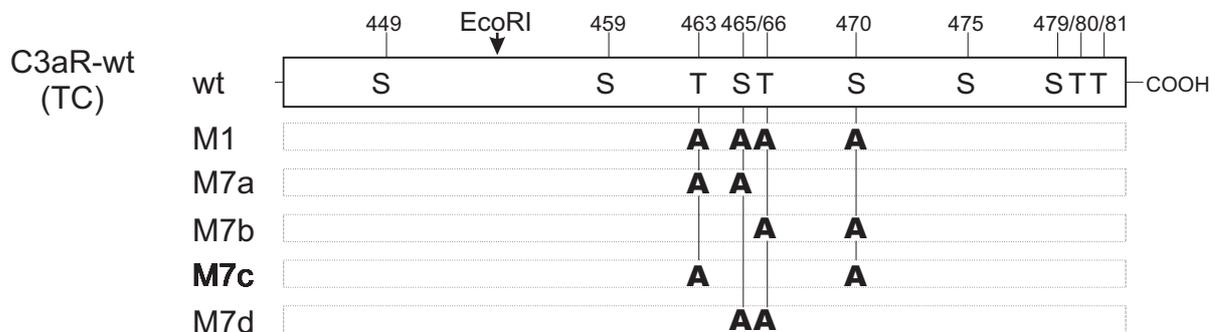


Abb. 3.15: Übersicht über die Mutationen der Konstrukte der dritten Generation im Vergleich zum C3aR-Wildtyp und zu Mutante M1. Die gegen Alanin ausgetauschten putativen Phosphorylierungsstellen sind durch ein A gekennzeichnet.

Mit diesen Mutanten wurden Studien zur Ermittlung des schnellen Internalisierungsverhaltens nach 1minütiger Stimulation mit 100 nM C3a im Vergleich zum Wildtyp und zu Mutante M1 durchgeführt. Die Ergebnisse dieser Analysen sind in Abb. 3.16 zusammengefasst.

Alle Mutanten der 3. Generation zeigen eine signifikant reduzierte Rezeptorinternalisierung im Vergleich zum Wildtyp, berechnet mit Hilfe des Tukey-HSD-Tests. Im Vergleich zur Mutante M1 ist die Internalisierungsrate aller M7-Konstrukte signifikant erhöht. Die in Mutante M1 ausgetauschten putativen Phosphorylierungsstellen haben also einen entscheidenden Einfluss auf die C3aR-Internalisierung. Die Mutanten M7c und M7a zeigen eine vergleichbare niedrige prozentuale Internalisierung. Beiden gemeinsam ist der Austausch des Threonins an Position 463. Die Internalisierungsraten der Mutanten M7d und M7b liegen ebenfalls auf einem vergleichbaren, etwas erhöhten Niveau. Der Unterschied in der Rezeptorinternalisierung zwischen den Mutanten M7c im Vergleich zu M7b und M7d ist signifikant. Auch die Mutante M7a zeigt eine im Vergleich zur Mutante M7b signifikante, im Vergleich zur Mutante M7d jedoch nicht signifikante Verminderung der Rezeptorinternalisierung.

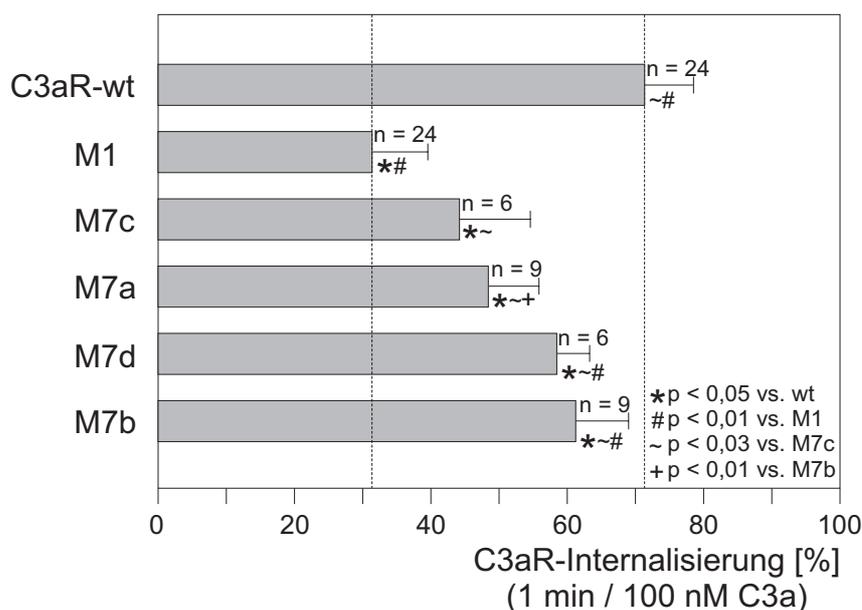


Abb. 3.16: Überblick über das schnelle Rezeptorinternalisierungsverhalten der 3. Mutantengeneration (M7a-d) im Vergleich zum Wildtyp und M1. Dargestellt ist jeweils die errechnete prozentuale Internalisierung nach 1minütiger Stimulation mit 100 nM C3a als Mittelwert aus allen Messungen.

3.2.6 Überprüfung der Mutanten M0, M1 und M5 anhand genomischer DNA

Sowohl die Mutante M1 wie auch die aus ihr generierten Mutanten M5 und M6 zeigen ein im Vergleich zu allen anderen Mutanten auffällig erscheinendes Verhalten. Um Fehler in den nicht sequenzierten Bereichen der Mutanten auszuschließen, wurde aus je einem Klon der Mutanten M1 und M5, und um eine eventuelle Verwechslung der Mutanten M0 und M1 auszuschließen zu können, auch von Mutante M0 genomische DNA aus je 1×10^7 Zellen gewonnen. Aus dieser genomischen DNA wurde der C3aR mit Hilfe der Primer Sett009 und Sett010 (vgl. Kap. 2.1.7) amplifiziert. Diese wurden so gewählt, dass der amplifizierte C3a-Rezeptor mit Hilfe eines T7-Sense und eines pcDNA3.1/BGH-Reverse-Primers des ins Genom integrierten Vektors problemlos sequenziert werden konnte.

Die erhaltenen PCR-Produkte wurden aus dem Gel mit Hilfe des QIAamp-DNA-Präparations-Kits aufgereinigt und die Ausbeute anhand von DNA-Markern in einem quantitativen Gel bestimmt. Die anschließende Sequenzanalyse, durchgeführt von GATC, ergab für alle Konstrukte die richtige Zuordnung und zeigte über den gesamten Leserahmen keine Abweichungen zu den erwarteten Sequenzen.

3.2.7 Untersuchungen zur Auswirkung der C-terminalen C3aR-Mutationen in Funktionstests

Die stabil transfizierten C3a-Rezeptormutanten sollten mit Hilfe von Funktionstests näher charakterisiert werden. Es sollte die Enzymfreisetzung im GARA (vgl. Kap. 2.2.2.8), die Freisetzung von intrazellulärem Calcium (vgl. Kap. 2.2.2.7) und das Phosphorylierungsverhalten nach Liganden-Stimulus untersucht werden.

An den stabil transfizierten RBL-Zellen konnte jedoch nur eine schlechte Calciumfreisetzung beobachtet werden und im GARA zeigte nur der Wildtyp in RBL₀-Zellen mit der höchsten Rezeptorexpression (FC2) eine konzentrationsabhängige Enzymfreisetzung (Daten nicht gezeigt). Für die Untersuchung der Phosphorylierung dieser stabil in RBL-Zellen exprimierten C3aR-Mutanten in der kooperierenden Arbeitsgruppe von Martin Oppermann (Universität Göttingen) war die Rezeptorexpression generell zu gering (Daten nicht gezeigt). Für eine transiente Transfektion in HEK-293-Zellen waren die Konstrukte jedoch aufgrund des dort nur schlecht wirksamen EF-1-Promotors nicht geeignet. Die Rezeptormutanten wurden daher im Rahmen der medizinischen Doktorarbeit von Herrn cand. med. Henning Hamacher in einen für die transiente Expression der Konstrukte in HEK-293-Zellen geeigneten pcDNA3-Vektor mit CMV-Promotor umklontiert. An diesen Konstrukten wurde erneut das Phosphorylierungsverhalten und die Calciumfreisetzung ausgetestet.

Zum Zeitpunkt der Erstellung dieser Dissertation lagen die Ergebnisse der Rezeptorphosphorylierung noch nicht vor. Die Calciumfreisetzung wurde in der Arbeitsgruppe von Robert Ames (Smith Kline Beecham) mit Fura3-AM als Indikator in einem auf parallele Inkubation vieler Proben in Mikrotiterplatten basierenden Assay untersucht. Die durch die Ca²⁺-Bindung veränderte Fluoreszenz des Farbstoffes wurde mit Hilfe eines speziellen Messgerätes, dem FLIPR (fluorescent imaging plate reader), gemessen. Für diese Untersuchungen wurden HEK-293-Zellen mit den C3aR-Mutanten und G α_{16} kotransfiziert. Die Auswertung der Daten erfolgte mit Hilfe des Programms Excel (Microsoft). In Abb. 3.17 sind die Ergebnisse für die erste und zweite Mutantengeneration und in Abb. 3.18 die Ergebnisse für die Mutanten M7a bis M7d graphisch dargestellt. Aufgetragen ist jeweils die Konzentration an eingesetztem C3a-Stimulus gegen die gemessenen optischen Einheiten.

Mit Ausnahme der Mutanten M5 und M6 zeigt sich bei allen Konstrukten und dem Wildtyp eine vergleichbare Calciumfreisetzung. Diese beiden Mutanten zeigen ein um mindestens die Hälfte reduziertes Calciumsignal.

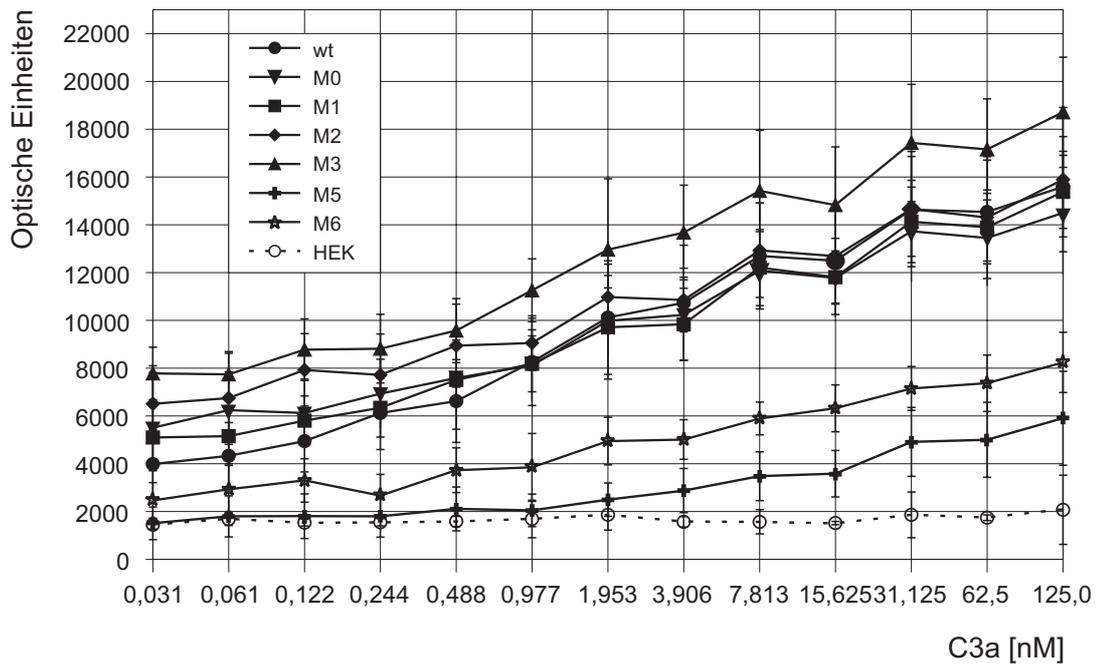


Abb. 3.17: Ergebnisse der Liganden-induzierten Calciumfreisetzung bei den Mutanten der ersten und zweiten Generation im Vergleich zum Wildtyp nach Kotransfektion mit $G\alpha_{16}$. Dargestellt sind die Mittelwerte aus $n = 2$ Wiederholungen mit je 6 Einzelwerten.

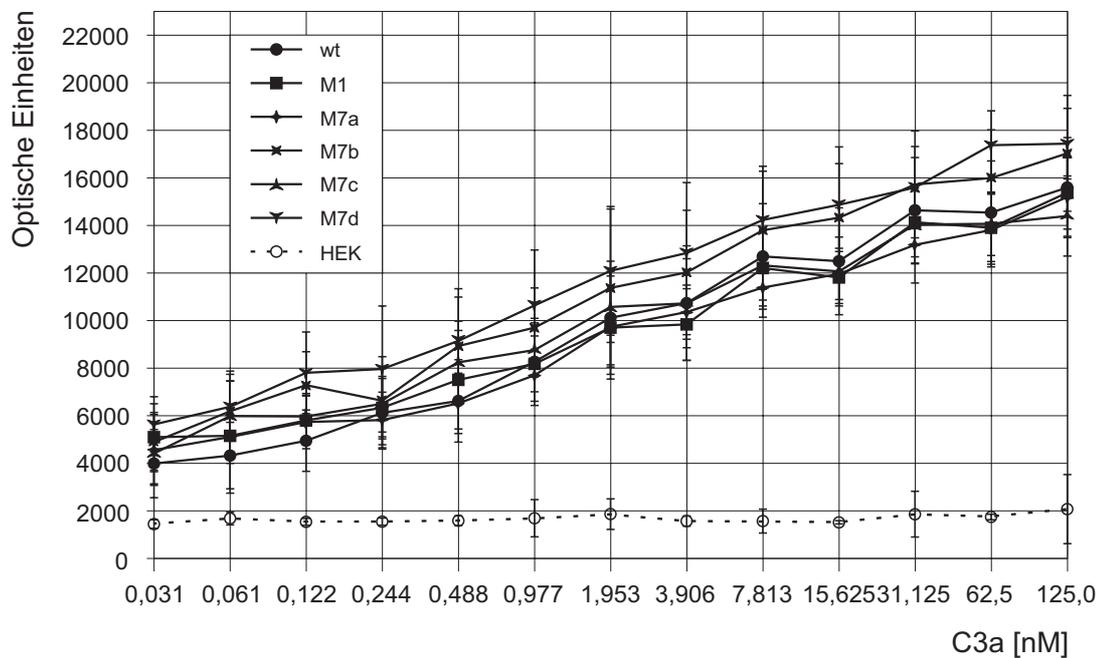


Abb. 3.18: Ergebnisse der Liganden-induzierten Calciumfreisetzung bei den Mutanten der dritten Generation im Vergleich mit dem Wildtyp und Mutante M1 nach Kotransfektion mit $G\alpha_{16}$. Dargestellt sind die Mittelwerte und die Standardabweichungen aus $n = 2$ Wiederholungen mit je 6 Einzelwerten.

3.2.8 Zusammenfassung der Teilergebnisse zur Struktur-/ Funktionsanalyse des C3a-Rezeptor C-Terminus mit dem Schwerpunkt Internalisierung

Mit Hilfe des pEF1/HisA-Vektors ist es gelungen, den C3a-Rezeptor stabil in RBL-2H3-Zellen zu exprimieren. Zur Struktur-/ Funktionsanalyse wurden die zehn im C-Terminus des Rezeptors enthaltenen putativen Phosphorylierungsstellen gruppenweise gegen Alanin ausgetauscht und die Auswirkung dieser Mutationen auf das Internalisierungsverhalten und andere Funktionen wie z. B. die Calciumfreisetzung nach Liganden-Stimulus im Anschluss daran an stabil mit diesen Konstrukten transfizierten RBL-2H3-Zellen untersucht. Dabei zeigte sich, dass diese putativen Phosphorylierungsstellen einen Einfluss auf die zeit- und dosisabhängige Internalisierung haben, insbesondere die Serine und Threonine an den Positionen 463, 465, 466 und 470.

3.3 Untersuchungen zur Regulation des humanen anaphylatoxischen C3a-Rezeptors

3.3.1 Entwicklung eines C3aR-GFP-Fusionsproteins für die spätere Visualisierung der Rezeptor-Ligand-Interaktion mit Hilfe der konvokalen Laserspektroskopie

Es sollte ein C3aR-GFP-Fusions-Protein hergestellt werden zur Untersuchung des Rezeptors nach Ligandenbindung. Dieses sollte eine Verfolgung des internalisierten Rezeptors in die verschiedenen Zellkompartimente mit Hilfe der konvokalen Laserspektroskopie ermöglichen und so einen Beitrag zur Aufklärung des dem Rezeptor nachgeschalteten Regulationsmechanismus leisten.

3.3.1.1 Herstellung des C3aR-GFP-Fusionsproteins

Für die Herstellung eines GFP-Fusionsproteins zur Untersuchung des Rezeptor-"Schicksals" nach Ligandenbindung wurde ein TOPO-Kloning-Vektor, der pcDNA3.1/CT-GFP-TOPO, verwendet. Mit Hilfe dieses Vektors ist es möglich, C-terminale Fusionsproteine zu generieren. Der Vektor ist für die Ligation mit einem Taq-PCR-Produkt konzipiert. Um die Fehlerrate bei der C3aR-Amplifikation möglichst gering zu halten, wurde der C3aR in einem Pfu-PCR-Ansatz mit dem bereits in Kap. 3.2.2 beschriebenen pEF7/11-Vektor (C3aR-wt (TC) als Template in pEF1/HisA) für die nachfolgende Subklonierung amplifiziert mit Hilfe der Primer SH03 und SH04B (vgl. Kap. 2.1.7) subkloniert. Die Primer wurden so gewählt, dass sich zwischen dem GFP und dem C3aR kein Stopcodon befand. Dem Reaktionsansatz wurde nach Ablauf des in Kap. 2.2.1.1 beschriebenen PCR-Programms noch 0,25 µl Taq zugesetzt und es erfolgte eine Amplifikation mit der Taq-Polymerase für 8 min bei 72°C. Dadurch wurden dem PCR-Produkt die nötigen Enden für das TOPO-Kloning angefügt. Das aufgereinigte PCR-Produkt wurde entsprechend den Herstellerangaben in das TOPO-Kloning eingesetzt. Die

entstandenen Klone wurden mit Hilfe eines Restriktionsverdau über KpnI überprüft. Der Klon K1 wurde am Übergang zwischen dem C3aR und dem GFP sequenziert. Der Sequenzvergleich mit dem theoretisch erzeugten Konstrukt zeigte keine Abweichungen und bestätigte das Vorliegen eines echten Fusionsproteins. Die Überprüfung der Funktionsfähigkeit des generierten C3aR-Fusionsproteins erfolgte sowohl durchflusszytometrisch wie auch mit Hilfe von ^{125}I -C3a-Bindungsstudien.

3.3.1.2 Durchflusszytometrische Überprüfung der Funktionsfähigkeit des C3aR-GFP-Fusionsproteins nach transienter Transfektion in HEK-293-Zellen mit Hilfe einer Zweifarbanalyse

In der Arbeitsgruppe war zu einem früheren Zeitpunkt bereits ein C3aR-GFP-Fusionsprotein hergestellt worden. Hierbei stellte sich jedoch heraus, dass unbeabsichtigt ein Stop zwischen dem C3aR und dem GFP durch das TA-Kloning entstanden war, so dass es sich nicht um ein Fusionsprotein handelt. Für die Untersuchung des Rezeptorschicksals nach Ligandenbindung war jedoch das Vorliegen eines echten Fusionsproteins Bedingung, weshalb dieses Stop mit Hilfe spezifischer Primer, wie unter Kap. 3.3.1.1 beschrieben, mutiert wurde. Ergebnisse dieser gezielten Mutagenese sind die Klone K1 und K3. Die generierten GFP-Fusionsproteine wurden im Vergleich zu einem C3aR-wt in pcDNA3 als Positivkontrolle, einem C5aR in pcDNA3 als Negativkontrolle, dem pcDNA3.1/CT-GFP-TOPO-Fusionsvektor und dem Konstrukt mit Stop durchflusszytometrisch untersucht.

Für diese Überprüfung war eine Zweifarbanalyse nötig (vgl. Kap 1.5). Das GFP wurde aufgrund seiner Eigenfluoreszenz dabei im Kanal FL-1 erfasst. Die C3aR-spezifische Fluoreszenz wurde im Kanal FL-2 erfasst. Dazu wurden die transfizierten HEK-293-Zellen zunächst mit polyklonalem Präimmun- bzw. C3a-spezifischem Immunsereum aus dem Kaninchen inkubiert, das durch einen gegen Kaninchen gerichteten Sekundärantikörper mit dem Fluorochrom PE markiert wurde. Die bei Zweifarbanalysen notwendige Kompensation der beiden Fluoreszenzen (siehe Kap. 1.5) erfolgte für die Fluoreszenz FL-1 über die mit dem pcDNA3.1/CT-GFP-TOPO-Vektor transfizierten Zellen und für die Fluoreszenz FL-2 über die mit dem C3aR-wt in pcDNA3 transfizierten Zellen. Diese Kompensation ist problematisch, da das GFP als komplettes Molekül intrazellulär fluoresziert, die PE-Fluoreszenz aber an der Oberfläche detektiert wird. Die Abb. 3.19 zeigt die für die einzelnen Klone nach transienter Transfektion in HEK-293-Zellen detektierte C3aR-Fluoreszenz in Form von Histogrammen.

Bei dem C3aR-wt in pcDNA3 (1) kann man eine deutliche Verschiebung der für den C3aR spezifischen Fluoreszenzkurve nach links im Vergleich zur unspezifischen Fluoreszenzkurve erkennen. Der C3a-Rezeptor wird also exprimiert. Allerdings ist die aus der Differenz der beiden Kurven ermittelte C3a-Rezeptor-Expressionsrate im Vergleich zu Granulozyten, bei denen die Differenz ungefähr eine log-Stufe ausmacht (vgl. Kap. 1, Abb. 7b), etwa um die Hälfte niedriger. Beim C5aR (2) ist entgegen den Erwartungen eine kleine Differenz zwischen spezifischer und unspezifischer C3aR-Fluoreszenz zu sehen, die, da sie unspezifisch ist, als Hintergrund von der C3aR-Expression der übrigen Konstrukte abgezogen werden muss. Eine rein optische Auswertung ist aufgrund der geringen Differenzen und dieses Hintergrundes unmöglich. Aus diesem Grund wurden die statistisch ermittelten Δ -mean-Werte zur Bewer-

tung mit herangezogen. Bei den Konstrukten mit Stop (4) und den beiden Konstrukten ohne Stop (K1 (5) + K3 (6)) wird der C3a-Rezeptor vergleichbar niedrig exprimiert, erkennbar an der geringen Differenz der beiden Fluoreszenzkurven. Rechnerisch ergibt sich im Vergleich zum C3aR-Wildtyp und unter Berücksichtigung des unspezifischen C5aR-Signals eine sehr geringe Rezeptorexpression von nur 8-12%.

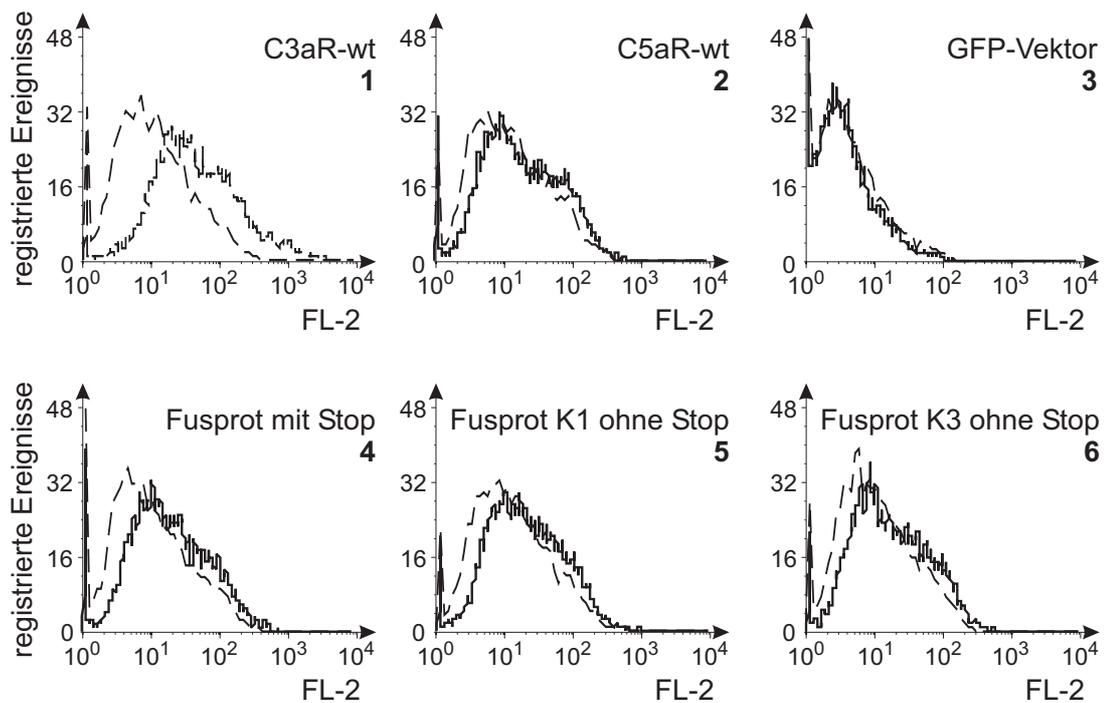


Abb. 3.19: Darstellung der detektierten C3aR-Fluoreszenzen (FL-2) des C3aR-wt (1), des C5aR-wt (2), des zur Fusion eingesetzten GFP-Vektors (3) und der drei C3aR-GFP- Konstrukte (4-6) nach Expression in HEK-293-Zellen. Zur Detektion wurden die Zellen mit Präimmun- (gestrichelt) und C3aR-spezifischem Kaninchen-Immuserum (durchgezogen) und zur Anfärbung mit einem gegen Kaninchen gerichteten, PE-markierten Sekundärantikörper inkubiert.

Eine Überprüfung der in Kanal 1 detektierten GFP-Fluoreszenz ergab für den pcDNA3.1/CT-GFP-TOPO-Vektor, ein im Vergleich zu HEK-293-Zellen, die mit dem C3aR-wt transfiziert wurden, um eine halbe log-Stufe erhöhtes spezifisches Fluoreszenzsignal, siehe Abb. 3.20. Auch dieses Signal war deutlich niedriger als erwartet.

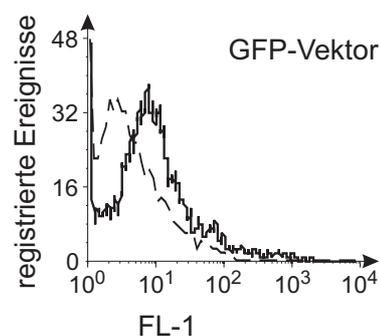


Abb. 3.20: GFP-Eigenfluoreszenz des pcDNA3.1/CT-GFP-TOPO-Fusionsvektors

Alle Konstrukte wurden parallel auch optisch unter dem Fluoreszenzmikroskop untersucht. Dazu wurden Zellen auf Objektträger aufzentrifugiert und möglichst innerhalb eines Zeitraumes von einer halben bis zu einer Stunde überprüft, da sich die Fluoreszenz zeitabhängig verringert, was eine Betrachtung und Bewertung unter dem Mikroskop zu späteren Zeitpunkten sehr schwierig macht.

Unter dem Fluoreszenzmikroskop konnte optisch eine Fluoreszenz des GFP-Vektors festgestellt werden. Allerdings konnte diese Fluoreszenz zusätzlich nur noch bei dem Konstrukt mit Stop beobachtet werden. Die beiden C3aR-GFP-Fusionsproteine K1 und K3 zeigten ein untypisches, braun verfärbtes Fluoreszenzbild, weswegen für sie keine Aussage getroffen werden konnte. Abb. 3.21 zeigt die fluoreszenzmikroskopischen Aufnahmen der transient mit den einzelnen Konstrukten transfizierten HEK-293-Zellen.

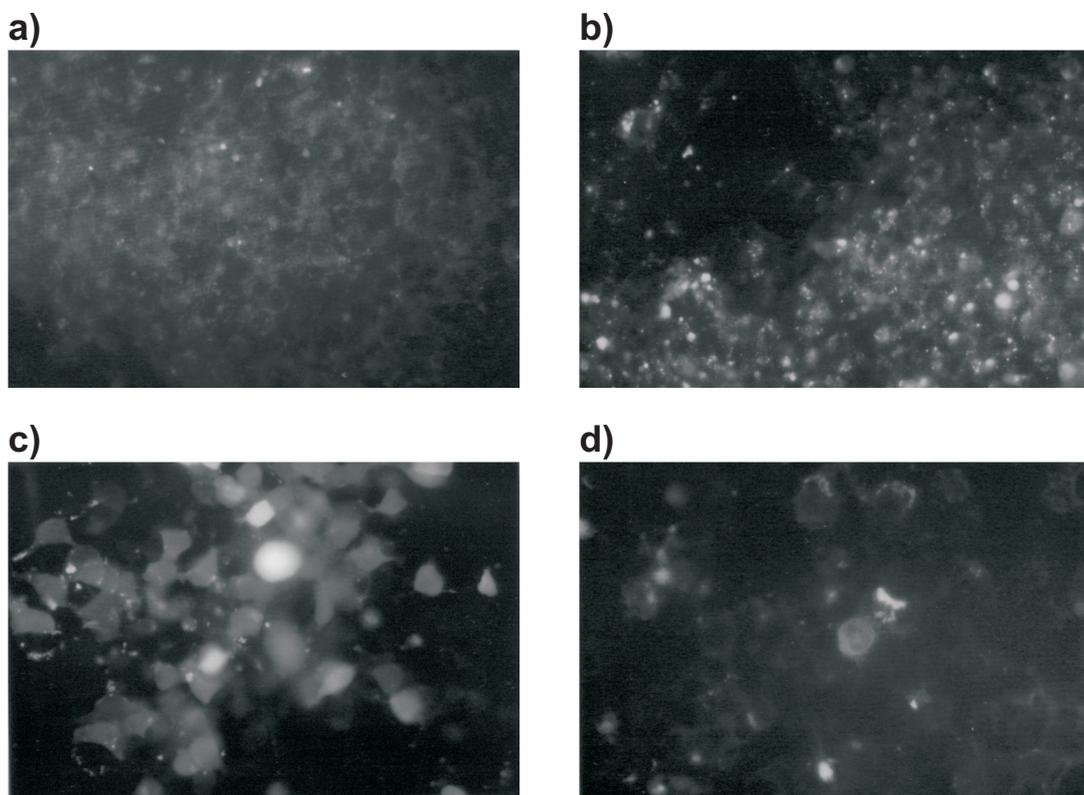


Abb. 3.21: Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen transient transfizierter HEK-293-Zellen mit a) dem C3aR-wt in pcDNA3, b) und c) dem GFP-Fusionsvektor und d) dem C3aR-GFP-Konstrukt mit Stop.

Dargestellt sind die fluoreszenzmikroskopischen Aufnahmen von transient mit dem C3aR transfizierten, also nicht fluoreszierenden HEK-293-Zellen im Bild oben links (a) im Vergleich zu Zellen, die mit dem GFP-Fusionsvektor transient transfiziert wurden im Bild oben rechts (b). In (b) sieht man deutliche Fluoreszenzsignale in der Mehrzahl der erkennbaren Zellen, die in (c) noch einmal vergrößert dargestellt sind. Dabei ist zu erkennen, dass die gesamte Zelle einheitlich fluoresziert. Die Abbildung unten rechts zeigt im Vergleich dazu Zellen, die mit dem C3a-GFP-Konstrukt mit Stop transfiziert wurden. Hier zeigt sich eine am

Rand der Zelle verstärkte Fluoreszenz aufgrund der Kolo-kalisation mit dem C3aR. Das Innere der Zellen fluoresziert nur schwach. Auffällig ist jedoch, dass in der Aufnahme, die einen typischen Ausschnitt zeigt, nur eine einzige positive Zelle zu sehen ist. Zusammen mit den Ergebnissen der FACS-Analyse könnte dies auf eine geringe Transfektionseffizienz der Konstrukte in den HEK-293-Zellen hinweisen.

3.3.1.3 Überprüfung des GFP-Fusionsproteins in der Zweipunktbindung und anhand von ^{125}I -C3a-Bindungsstudien

Zusätzlich zur durchflusszytometrischen Analyse wurde das Konstrukt K1 (C3aR-GFP-Fusionsprotein ohne Stop) in ^{125}I -C3a-Bindungsstudien untersucht, vgl. Kap. 2.2.2.7. Das Resultat der Bindungsstudien ist in Abb. 3.22 zu sehen.

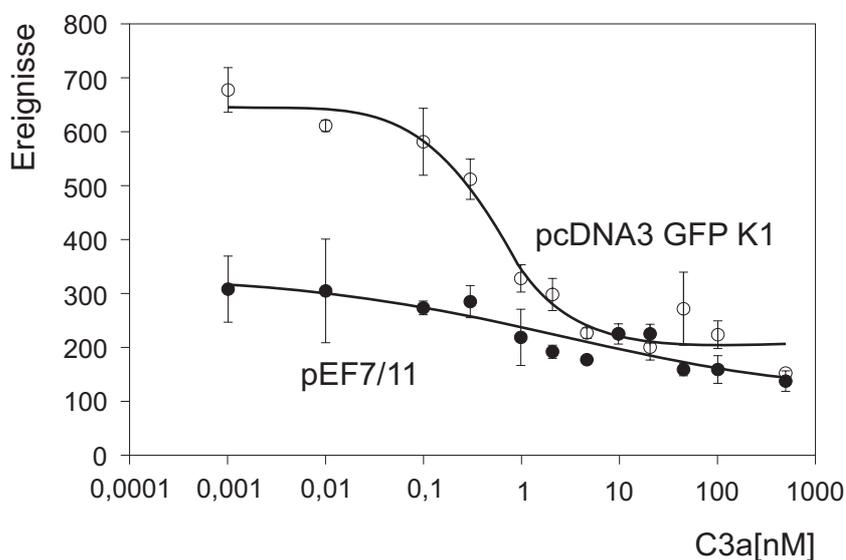


Abb. 3.22: C3a-Bindungskurve des C3aR-GFP-Fusionsproteins (ohne Stop) im Vergleich zu dem C3aR-wt in pEF1/HisA (pEF7/11) an transient transfizierten HEK-293-Zellen. Dargestellt sind die Mittelwerte aus $n = 4$ Einzelwerten einer typischen Bindungskurve, die dreimal wiederholt wurden.

Nach transienter Transfektion des C3aR-GFP-Fusionsprotein K1 (ohne Stop) zeigen HEK-293-Zellen eine Bindung von radioaktiv markiertem C3a, das sich durch steigende Mengen an nicht-radioaktiv markiertem (kalten) Liganden verdrängen lässt. Aufgrund dieser Ergebnisse wurden die bereits durchflusszytometrisch überprüften GFP-Fusionsproteine in einer ^{125}I -C3a-Zweipunktbindung vermessen. Die Ergebnisse dieser Untersuchung sind in Tab. 3.3 zusammengestellt.

Tab. 3.3: ^{125}I -C3a-Zweipunktbindung der GFP-Fusionsproteine an transient transfizierten HEK-293-Zellen

Konstrukt	0 nM C3a	400 nM C3a
C3aR in pcDNA3	2064,50 +/- 85,85	561,50 +/- 23,27
C3aR in pcDNA3.1/HisA (pCR7)	1076,00 +/- 30,31	602,75 +/- 30,96
C5aR in pcDNA3	654,25 +/- 35,72	642,50 +/- 30,97
pcDNA3.1/CT-GFP-TOPO-Fusionsvektor	856,25 +/- 69,98	844,25 +/- 24,82
C3aR-GFP-Fusionsprotein ohne Stop (K1)	1067,25 +/- 30,31	602,96 +/- 30,96

Der C3aR-wt in pcDNA3 zeigt eine deutliche spezifische C3a-Bindung, wobei sich zwischen der ^{125}I -C3a-Gesamtbindung und der nach Verdrängung mit 400 nM "kaltem" C3a ermittelten Restbindung etwa ein Faktor von vier ergibt. In einem anderen Vektor, dem pcDNA3.1/HisA zeigt der C3aR-Wildtyp eine etwa halb so hohe Bindung, die auch durch die Verdrängung nur um etwa 50% erniedrigt wurde. Bei dem C5aR in pcDNA3 und dem pcDNA3.1/CT-GFP-TOPO-Fusionsvektor zeigt sich kein Unterschied in der Höhe des Signals mit und ohne Verdränger. Beide Konstrukte zeigen wie erwartet nur eine Hintergrundbindung. Das C3aR-GFP-Fusionsprotein (K1) zeigt eine deutliche ^{125}I -C3a-Bindung, die sich um etwa die Hälfte durch Verdrängung mit nicht radioaktivem C3a reduzieren lässt. Es exprimiert den C3aR damit deutlich schlechter als das Konstrukt C3aR-wt in pcDNA3 und vergleichbar mit dem C3aR-wt in pcDNA3.1/HisA. Dieses Ergebnis lässt sich mit den durchflusszytometrisch ermittelten Resultaten vereinbaren. Allerdings scheint die geringe Rezeptorexpression für die fluoreszenzmikroskopischen Untersuchungen nicht auszureichen.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass sich die Funktionsfähigkeit der GFP-Konstrukte anhand der durchgeführten Untersuchungen nur schwer beurteilen lässt. Das C3aR-GFP-Fusionsprotein K1 zeigte sowohl durchflusszytometrisch, in der ^{125}I -C3a-Zweipunktbindung und auch in Bindungsstudien eine deutliche sichtbare C3a-Rezeptor-Expression, die jedoch insgesamt im Vergleich zum Wildtyp etwa um die Hälfte niedriger ist. Über die Verwertbarkeit des Konstruktes im Zuge der konvokalen Laserspektroskopie zur Aufklärung des Rezeptorschicksals nach Ligandenbindung kann keine eindeutige Aussage getroffen werden, da sich das Konstrukt unter dem Fluoreszenzmikroskop untypisch verhielt. Aus Zeitgründen konnte jedoch keine erneute Überprüfung des Konstruktes erfolgen. Die Herstellung eines verbesserten C3aR-GFP-Fusionsproteins und die nachfolgende Überprüfung wurde als Teilthema einer Diplomarbeit in der Arbeitsgruppe vergeben.

3.3.2 Voruntersuchung zur C3aR- und C5aR-vermittelten Regulation auf mRNA-Ebene an der humanen Mastzelllinie HMC-1 mit Hilfe des Atlas cDNA Arrays

Die bei der Aktivierung des Komplementsystems entstehenden proinflammatorischen Anaphylatoxine C3a und C5a stimulieren Monozyten, Granulozyten und Mastzellen. Dabei ist ihre Wirkungsweise im Zusammenhang mit den verschiedenen Aktivierungswegen des Komplementsystems bisher weitestgehend unbekannt. In der Arbeitsgruppe sollen die den beiden Anaphylatoxin-Rezeptoren nachgeschalteten intrazellulären Regulationsmechanismen auf mRNA-Ebene untersucht werden. Voruntersuchungen zielten darauf ab zu klären, ob durch eine Stimulation mit C3a und C5a eine Veränderung in Zellen ausgelöst wird. Dazu wurden HMC-1-Zellen verwendet, die den C3aR und C5aR nativ an ihrer Oberfläche in großer Anzahl exprimieren (vgl. Kap. 3.1.1) und eine RNA-Gewinnung in ausreichender Menge und guter Qualität erlauben.

Diesen Zellen wurden insgesamt für 4 Stunden mit einem kombinierten Stimulus von C3a mit einer Endkonzentration 100 nM und C5a mit einer Endkonzentration von 20 nM im Ansatz unter Zellkulturbedingungen im Brutschrank bei 37°C inkubiert. Die Zugabe des Stimulus erfolgte zu Beginn und erneut nach einer Stunde Inkubationszeit um einen eventuellen "Verlust" an Stimulus infolge von Internalisierungsvorgängen oder einem eventuellen Verlust seiner biologischen Aktivität während der Inkubation auszugleichen. Nach weiteren drei Inkubations-Stunden wurden die Zellen geerntet. Die Gesamtinkubationszeit mit dem Stimulus betrug also 4 Stunden. Parallel dazu wurden Zellen zur Kontrolle anstelle von C3a mit Puffer behandelt. Die Präparation der Gesamt-RNA erfolgte nach der unter Kap. 2.2.1.16 beschriebenen Methode. Die Konzentration wurde anschließend photometrisch bestimmt.

Da der Einsatz in das Atlas Array eine besondere Reinheit der eingesetzten RNA verlangt, wurde sie zunächst mit DNase behandelt und erneut aufgereinigt, wie zu Beginn von Kap. 2.2.1.21 beschrieben. Die RNA wurde anschließend gelelektrophoretisch überprüft. Das Ergebnis dieser Überprüfung der jeweiligen RNA-Aliquots vor und nach DNase-Verdau ist in Abb. 3.23 gezeigt.

Es sind sowohl vor wie auch nach DNase-Spaltung und erneuter Aufreinigung eindeutige, nicht degenerierte RNA-Banden zu erkennen. Bei einer 1:10-Verdünnung (Spur 2 und 4) der RNA sind die Banden jedoch nur schlecht zu erkennen.

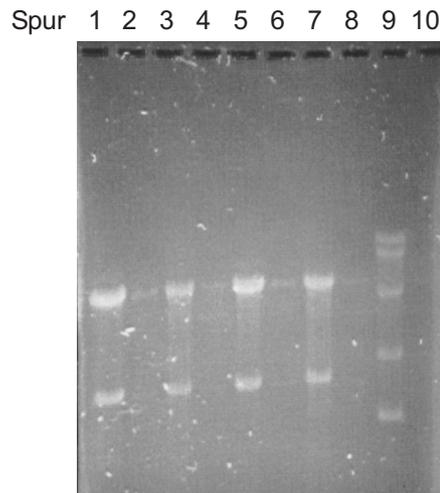


Abb. 3.23: Gelelektrophoretische Überprüfung der aus stimulierten und nicht stimulierten HMC-1-Zellen gewonnenen RNA. Aufgetragen ist in den Spuren 1 bis 4 die RNA der unstimulierten Zellen, wobei in Spur 1 und 2 (1:10) der Ansatz vor DNase-Verdau und in Spur 3 und 4 (1:10) der Ansatz nach DNase-Verdau zu sehen ist. In den Spuren 5 bis 8 ist die RNA der stimulierten Zellen entsprechend aufgetragen. Spur 9 zeigt einen RNA-Marker im Vergleich.

Die RNA wurde zunächst mit Hilfe des Northern-Transfers qualitativ überprüft, ehe sie in das teure Atlas Array eingesetzt wurde, wobei auch hier schon ein Potential zur Erkennung möglicher Regulationsmechanismen bestand.

3.3.2.1 Voruntersuchungen zur C3aR-vermittelten Regulation mit Hilfe des Northern-Transfers

Die Untersuchungen der Zellen auf mRNA-Ebene erfolgten zur Qualitätsüberprüfung der hergestellten RNA zunächst durch Northern-Transfer und anschließender Detektion mit einer DIG-markierten Antisense-RNA-Sonde gegen die hC3aR-mRNA. Zur Generierung der ca. 1000 bp-Sonde wurden die Vektoren pTC13M und pTCC0 mit dem Restriktionsenzym BsrGI linearisiert und durch die SP6-RNA-Polymerase *in vitro* transkribiert. Als interner Standard wurde zusätzlich eine DIG-markierte GAPDH-Antisense-RNA-Sonde aus dem linearisierten pTRI-GAPDH-Human-Plasmid (Human Internal Standards Kit, Ambion) unter Verwendung der SP6-RNA-Polymerase hergestellt. Zur Auftrennung wurden 15 µg Gesamt-RNA von mit Puffer bzw. mit C3a/C5a stimulierten HMC-1-Zellen (vgl. Kap. 3.3.2.1) eingesetzt. Nach Northern-Transfer erfolgte die Hybridisierung der Membran über Nacht zuerst mit der hC3aR-Sonde, wobei letztendlich die aus pTCC0 generierte Sonde zum Einsatz kam, und anschließend wieder über Nacht mit der GAPDH-Sonde. Die im Northern-Blot zu detektierende mRNA-Größe lag bei der hC3aR-Sonde bei 2,4 kb und bei der GAPDH-Sonde bei 1,4 kb, siehe Abb. 3.24.

In der Northern-Analyse konnte mit der hC3aR-RNA-Sonde die 2,4 kb Bande sowohl bei stimulierten als auch unstimulierten HMC-1-Zellen nachgewiesen werden. Die RNA war also in Ordnung. Zwischen den beiden detektierten RNA-Banden konnte jedoch kein durch die Vorstimulation mit C3a und C5a induzierter Unterschied festgestellt werden.

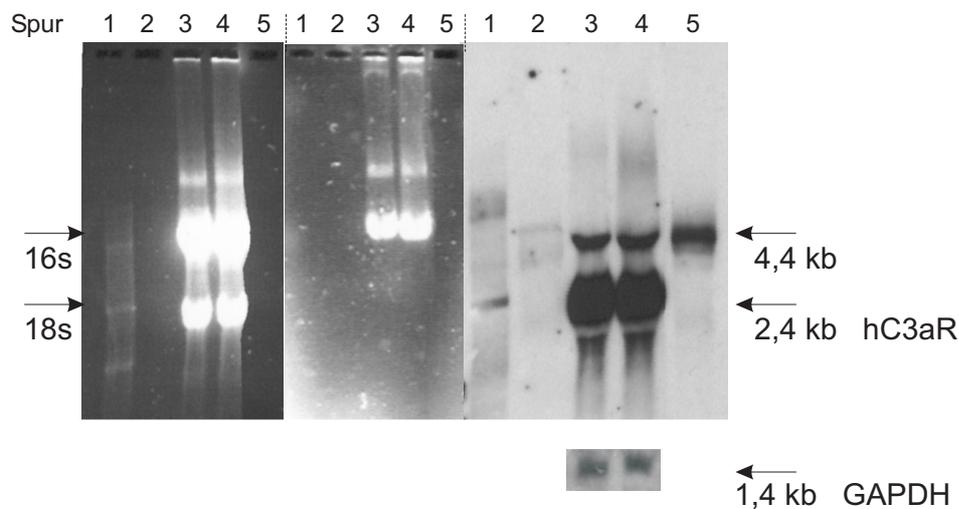


Abb. 3.24: C3aR-Nachweis mittels Northern-Blot. Von links nach rechts sind das RNA-Gel vor und nach dem Blotten und das Resultat der Hybridisierung dargestellt. In Spur 1 ist ein RNA-Marker, in den Spuren 2 und 5 DIG-Marker (II und III), in Spur 3 etwa 10 μg RNA der mit Puffer inkubierten Zellen und in Spur 4 etwa 10 μg RNA der mit C3a/C5a stimulierten Zellen aufgetragen.

3.3.2.2 Ergebnisse der Voruntersuchungen zur C3aR-vermittelten Regulation mit Hilfe des Atlas cDNA Arrays

Unsere Arbeitsgruppe benutzt für andere Fragestellungen die Methode des Atlas cDNA Arrays (Clontech) in Kooperation mit der Arbeitsgruppe von Dr. Jan Buer an der GBF (Braunschweig). Mit Hilfe dieser Methode (vgl. Kap. 2.2.1.21) können auf RNA-Ebene Unterschiede in der Genregulation von stimulierten und unstimulierten Zellen detektiert werden. Die RNA der HMC-1-Zellen wurde in einem einmaligen Versuch unter der Anleitung von Frau Simone Hess mit Hilfe des cDNA Arrays auf durch Stimulation mit C3a und C5a ausgelösten Regulationsunterschiede hin untersucht.

Nach dieser Überprüfung wurden jeweils 5 μg der RNA nach Angaben des Herstellers in ^{32}P -markierte cDNA umgeschrieben und diese dann nach einem Aufreinigungsschritt zur Hybridisierung der Atlas Array Membranen eingesetzt. Auf dieser Membran befinden sich 1176 DNA-Fragmente von transkriptionell regulierten Genen, neun sog. Haushaltsgene, Fragmente aus Plasmid- und Phagen-DNA und genomische DNA. Nach der Hybridisierung über Nacht und einigen Waschschrritten wurden die Membranen auf einen Röntgenfilm aufgelegt. Abhängig von der in den Zellen vorhandenen Menge an mRNA entstehen so bei der anschließenden Exposition und Auswertung im Phospho-Imager mehr oder weniger starke Hybridisierungssignale. Das Ergebnis der Hybridisierung der Atlas Array Membranen ist in Abb. 3.25 gezeigt, wobei die Hybridisierung mit der RNA der mit Puffer behandelten Zellen links (a) und der mit C3a/C5a stimulierten Zellen rechts (b) dargestellt ist.

Diese digitalisierten Hybridisierungssignale werden mit Hilfe eines Programms quantifiziert und qualitätskontrolliert. Mit Hilfe der Signale sog. Haushaltsgene, die ebenfalls mit auf die Membran aufgedotet sind, und der Gesamtsignalstärke werden die einzelnen Messwerte normalisiert. Anschließend werden die Hybridisierungssignale beider Membranen computer-

gestützt verglichen. Dabei wird ein Faktor ermittelt, durch den sich korrespondierende Signale auf den beiden Membranen unterscheiden. Für diesen Faktor wird ein Schwellenwert festgelegt. Erst bei Signalen oberhalb dieses Faktors spricht man von einer möglichen Regulation des betroffenen Gens.

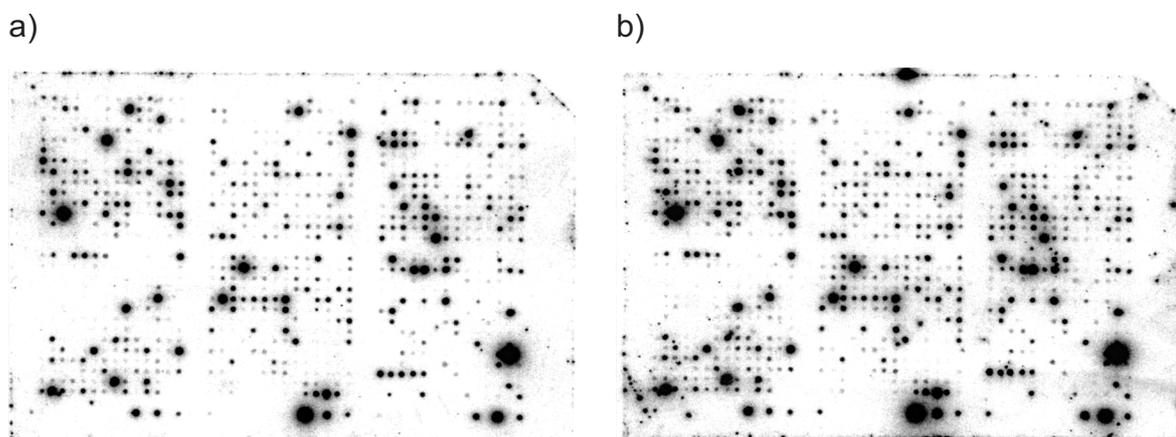


Abb. 3.25: Digitalisiertes Ergebnis der Hybridisierung von Atlas Array Membranen mit RNA unstimulierter (a) und mit C3a/C5a stimulierter HMC-1-Zellen.

Die beschriebene Auswertung wurde von Frau Dipl. Biochem. Simone Hess durchgeführt. Fünf der am höchsten regulierten Gene ($>1,7$ und $<-1,8$) sind in Tab. 3.4 dargestellt.

Tab. 3.4: Anhand des Atlas Array Verfahrens detektierte, nach 4stündiger Stimulation von HMC-1-Zellen mit C3a/C5a regulierte Gene.

Gen-Bank-Bezeichnung	Name des Gens	Koordinate	Regulationsfaktor
M54968	transforming protein p21/K-ras 2B	A02G	-2,5
L27211	cyclin-dependent kinase 4 inhibitor (CDK4I; CDKN2); p16-INK4; multiple tumor suppressor 1 (MTS1)	A04k	2,0
D10924	stromal cell derived factor 1 receptor (SDF1 receptor); fusin; CXCR4; leukocyte-derived seven transmembrane domain receptor (LESTR); LCR1	B13d	-1,9
M97935	signal transducer and activator of transcription 1 alpha/beta (STAT1); transcription factor ISGF-3 components p91/p84	C13c	1,8
X52541; M62829	early growth response protein 1 (hEGR1); transcription factor ETR103; KROX24; zinc finger protein 225; AT225	E10a	1,9

Wählt man den Rahmen etwas großzügiger, so werden insgesamt 37 Gene reguliert, wobei die Regulationsfaktoren der hier nicht aufgeführten Gene generell niedrig sind und in den Bereichen von -1,7 bis -1,4 bzw. 1,4 bis 1,7 liegen (Tabelle siehe Anhang). Unter den gewählten Inkubationsbedingungen, d. h. 4 h nach C3a/C5a-Gabe lassen sich demnach keine großen Unterschiede in der Genregulation stimulierter HMC-1-Zellen im Vergleich zu unstimulierten Zellen auf mRNA-Ebene mit Hilfe der Atlas Array Methode feststellen.

4 Diskussion

4.1 Charakterisierung der C3aR-Internalisierung an Zellen der humanen Mastzelllinie HMC-1 und humanen Monozyten

Zellen sind bezüglich des Informationsaustausches auf eine Rezeptor-vermittelte Signaltransduktion angewiesen, die in ihren Komponenten einer positiven und negativen Kontrolle unterliegt. Dabei existieren neben Mechanismen, die den Liganden betreffen (Desarginierung, Scarvening) Desensitisierungsmechanismen, die eine Signaltransduktion durch den Rezeptor limitieren. Dies ist besonders dann notwendig, wenn bei permanenter oder kurzfristig periodischer Stimulus-Exposition bzw. bei einer geringen Abdissoziation des Liganden vom Rezeptor der extrazelluläre Reiz bestehen bleibt und aufgrund des stark amplifizierten Systems die Gefahr des "Überschießens" der Reaktion gegeben ist. Bei G-Protein-gekoppelten Rezeptoren, zu denen auch der im Rahmen dieser Dissertation untersuchte anaphylatoxische C3a-Rezeptor zählt [164, 165, 166], sind verschiedene Desensitisierungsmechanismen bekannt, so z. B. die Phosphorylierung und die Internalisierung.

Ein Ziel dieser Dissertation war es, das Internalisierungsverhalten des C3aR an verschiedenen Zellen und Zelllinien zu charakterisieren, auch mit dem Hintergrund, eine einfach zu handhabende und leicht zugängliche Modellzelle zu finden, die den Rezeptor möglichst endogen und in hoher Anzahl trägt und für diese Analysen und eventuell auch zur Untersuchung nachgeschalteter Vorgänge wie z. B. die Reexpression geeignet ist.

Bisher war die Internalisierung des C3a-Rezeptors nur an humanen Granulozyten, induzierten U937-Zellen und RBL-Zellen (stabil mit dem C3aR-wt transfiziert von R. Ames [164]) detailliert untersucht worden [239]. Gegen eine Verwendung dieser Zellen/Zelllinien als Modellzelle sprachen dabei die folgenden Gründe:

- Humane Granulozyten exprimieren den hC3aR in ausreichender Zahl und sind durchflusszytometrisch gut messbar, sie sind jedoch aufgrund ihrer geringen Halbwertszeit (6-8 h) für später geplante längerfristige Studien z. B. zur Rezeptorreexpression ungeeignet. Hinzu kommt, dass es bei diesen Zellen zu Schwankungen, z. B. bezüglich der Rezeptoranzahl, von Spender zu Spender kommt.
- Zellen der myelo-monozytären humanen Zelllinie U937 müssen jeweils 2-3 Tage vor einem anstehenden Versuch induziert werden, damit sie zu monozyten-/makrophagen-ähnlichen Zellen ausdifferenzieren und den C3aR exprimieren, wobei die Zahl der Rezeptoren von der Art der Induktion abhängig ist [62, 177]. Diese Zelllinie ist aufgrund ihrer im Vergleich zu Granulozyten und RBL-Zellen niedrigen Rezeptorex-

pression für einen Einsatz in den durchflusszytometrisch-antigenetischen Internalisierungsassay und damit auch als Modellzelle ungeeignet.

- Stabil mit dem humanen C3aR transfizierte RBL-Zellen scheinen prinzipiell geeignet zu sein, wobei es sich hier jedoch um eine basophile Leukämie der Ratte handelt und sich deshalb die Untersuchungsergebnisse nicht ohne weiteres auf das humane System übertragen lassen.

Aus diesem Grund wurde die Suche nach einer geeigneten Modellzelle fortgesetzt. Im Rahmen dieser Dissertation wurden Zellen der humanen Mastzelllinie HMC-1 und humane Monozyten auf ihre Eignung getestet.

Bei den HMC-1-Zellen wie auch bei den Monozyten ließ sich eine dosisabhängige, Liganden-induzierte Internalisierung des C3a-Rezeptors in einer den Granulozyten und RBL-Zellen vergleichbaren Weise feststellen. Dabei wurde der halbmaximale Effekt bei HMC-1-Zellen mit etwa 40 nM und bei Monozyten mit 15-50 nM C3a (3 min, 37°C) erreicht. Die Spezifität des Effektes konnte mit Hilfe von C3aR-analogenem und irrelevantem synthetischen Peptid eindeutig belegt werden. Zu diesen Zellen konnten folgende Aussagen ermittelt werden:

- HMC-1-Zellen haben von allen bisher untersuchten Zellen die höchste Rezeptorexpression. Sie ließen sich gut mit Hilfe des Internalisierungsassays vermessen, wo sie bereits nach einer 5minütigen Inkubation (100 nM C3a, 37°C) die maximale Internalisierungsrate erreichten. Dieses schnelle Internalisierungsverhalten war für den C3a-Rezeptor bereits an den bisher untersuchten Zellen/Zelllinien [239] beobachtet worden. Auch für die Internalisierung des C5aR wurde dieses Verhalten bei ersten Experimenten mit Fluoreszin-markierten C5a an Granulozyten und Monozyten beobachtet [151, 235]. Die schnelle Rezeptorinternalisierung steht dabei im Einklang mit der Rolle der Anaphylatoxinrezeptoren im Entzündungsgeschehen und der Notwendigkeit der lokalen Begrenzung der inflammatorischen Prozesse.

Die Höhe der erreichten Internalisierungsrate war jedoch mit etwa 70% im Vergleich zu Granulozyten (90-100% [239]) und RBL-Zellen (85%, vgl. Abb. 3.9) geringer. Hierbei stellte sich die Frage, was mit den verbleibenden 30% der Rezeptoren passiert. Es liegt die Vermutung nahe, dass sie entweder nicht internalisiert werden oder sich hierin eine Gleichgewichtssituation zwischen Rezeptorinternalisierung und -recycling widerspiegelt. Das als Reexpression bezeichnete Phänomen des Rezeptorrecyclings ist bereits von anderen G-Protein-gekoppelten Rezeptoren wie z.B. dem C5aR in HL60-Zellen [152, 154], dem Thyrotropin-releasing Hormonrezeptor (TRH) [259] und dem Cholecystokeninrezeptor Typ A (CCKAR) [260] bekannt.

Bei Untersuchungen zur Internalisierung zeigte sich dann, dass sich auch Zellen der humanen Mastzelllinie HMC-1 nicht als Modellzelle für länger dauernde Reexpressionsstudien eignen. Sie verhielten sich gegenüber den Versuchsbedingungen besonders empfindlich, erkennbar daran, dass auch die nur mit Puffer inkubierten Zellen bei der Untersuchung der Zeitabhängigkeit der Internalisierung einen Verlust von 40% der

Rezeptoren nach 30 Minuten Inkubationszeit zeigten. Bei Granulozyten waren unter vergleichbaren Versuchsbedingungen maximal die Hälfte, also kleiner 20% der Rezeptoren unspezifisch internalisiert worden.

- Monozyten tragen nach durchflusszytometrischen Untersuchungen etwa halb so viel Rezeptoren wie Granulozyten [156]. Sie sind aufgrund des experimentell ermittelten schlechten Signal-Hintergrund-Verhältnisses wenig geeignet für die durchflusszytometrischen Internalisierungsuntersuchungen. Es kann auch nicht ausgeschlossen werden, dass die Monozyten bereits unspezifisch durch den kurzfristigen Kontakt mit Plastikoberflächen im Verlauf des Versuches vorstimuliert wurden und deshalb schon ein Teil der Rezeptoren bereits im Vorfeld internalisiert wurde. Die bei der Berechnung der prozentualen Internalisierungsraten ermittelten statistischen Fehler waren aufgrund des erwähnten schlechten Signal-Hintergrund-Verhältnisses relativ hoch. Diese Tatsache und auch das Phänomen, das Monozyten an Plastikoberflächen adhären [156], wodurch sich ein großer Verlust an durchflusszytometrisch detektierbaren Zellen ergab, führte dazu, dass ein zeitabhängiges Internalisierungsverhalten an Monozyten mit Inkubationszeiten größer 5 Minuten nicht messbar war. Nach 3minütiger Inkubationszeit, wie für die Untersuchung der Dosisabhängigkeit der Internalisierung gewählt, war eine Messung jedoch unproblematisch.

Zu beachten ist, dass die hierfür eingesetzten Monozyten entweder über Ficoll aufgereinigt wurden (vgl. Kap. 2.2.2.2) oder aus Vollblut nachträglich gegatet wurden, wobei sie in jedem Fall möglichst unmittelbar nach der Blutspende in die Versuche eingesetzt wurden. Möglicherweise lassen sich Monozyten, die über ihre Adhärenz an Plastikoberflächen aufgereinigt und danach mehrere Tage unter GM-CSF kultiviert wurden, besser vermessen, da durch diese Aufreinigungsverfahren der Rezeptor hochreguliert wird [156]. Bei kürzlich in der Arbeitsgruppe durchgeführten Untersuchungen wurde nach Durchführung dieses Aufreinigungsverfahrens zunächst wie bei den zuvor angewendeten Aufreinigungsverfahren eine reduzierte Rezeptorexpression festgestellt. Bereits ab dem dritten Tag konnte jedoch eine Hochregulation des Rezeptors beobachtet werden, wobei die Zahl der Rezeptoren im Verlauf des Untersuchungszeitraumes von einer Woche noch weiter anstieg (nicht gezeigte Ergebnisse der Arbeitsgruppe).

Insgesamt lässt sich festhalten, dass die Liganden-induzierte Internalisierung sowohl bei HMC-1-Zellen als auch bei Monozyten dosisabhängig reguliert wird. Damit hat sich gezeigt, dass die Internalisierung des C3a-Rezeptors ein genereller Kontrollmechanismus bei einer Vielzahl verschiedener Zelltypen ist. Als Modellzelllinie zur Aufklärung des Internalisierungsmechanismus und nachgeschalteter Vorgänge lassen sich möglicherweise Monozyten einsetzen, sofern sie über Adhärenz aufgereinigt und anschließend mit GM-CSF kultiviert werden.

4.2 Pharmakologische Untersuchungen der C3aR-inhibierenden Substanzen der Firma Smith Kline Beecham

Auf der Suche nach einem nicht peptidischen C3aR-Antagonisten wurde mittels eines Screening-Verfahrens über ^{125}I -C3a-Bindungsstudien an Membranen von RBL-Zellen bei der Firma Smith Kline Beecham die Substanz SKF63649J, ein 1-Naphthyloxyacetylarginin, identifiziert. Diese Substanz wurde zur weiteren Steigerung ihrer inhibitorischen Potenz chemisch modifiziert, wobei der Inhibitor SB290157, ein 2,2-Diphenylethoxyacetylarginin, entstand. Parallel dazu wurde eine in die gleich Substanzklasse einzuordnende irrelevante Kontrollsubstanz SB280936 hergestellt [261]. Zu ihrer Charakterisierung wurden diese drei Substanzen in einem durchflusszytometrisch-antigenetischen Internalisierungsassay an humanen Granulozyten eingesetzt, um zu sehen, ob sie bereits auf dieser Ebene einen Einfluss auf den C3aR ausüben. Dabei zeigte die Kontrollsubstanz wie erwartet keinen Einfluss auf die Ligandeninduzierte Internalisierung. Bei dem Inhibitor SKF63649J ließ sich bei niedrigen Konzentrationen zunächst keine Konkurrenz mit dem C3a um die Bindungsplätze am Rezeptor erkennen. Erst bei höheren Konzentrationen (größer $1\ \mu\text{M}$) zeigte sich ein Einfluss auf die Internalisierung, wobei ein maximaler Effekt von 40-45% Inhibition mit $10\ \mu\text{M}$ der Substanz erreicht wurden. Die chemisch modifizierte Substanz SB290175 übte bereits bei niedrigeren Konzentrationen einen Effekt auf die Internalisierung des C3aR aus, wobei sich dieser Effekt bei höheren Konzentrationen nicht mehr vergrößerte. Bei Konzentrationen von $3\text{-}10\ \mu\text{M}$ wurde ein Plateau von ebenfalls 40-45% Inhibition erreicht.

Zur Klärung dieser Beobachtung, des Plateaus bei 40-45% Internalisierung, wurde der Effekt der drei Substanzen alleine (ohne C3a) in sehr hoher Konzentration ($10\ \mu\text{M}$) auf die Zellen untersucht. Dabei zeigte schon die Kontrollsubstanz eine intrinsische Aktivität in Höhe von 10-15% C3aR-Internalisierung. Für den Inhibitor SKF63649J wurde ein Effekt in gleicher Höhe beobachtet. Da alle drei Substanzen in DMSO gelöst waren, lässt sich dieser geringe Effekt vermutlich auf das Lösemittel zurückführen. Der chemisch modifizierte Inhibitor SB290175, bei dem DMSO in denselben Konzentrationen vorliegt, wie bei den beiden anderen Substanzen, zeigte im Vergleich eine erhöhte intrinsische Aktivität von 35%. Das lässt auf eine Funktion dieser Substanz bei extrem hohen Konzentrationen als partieller Agonist schließen. Die Beobachtung, dass ein Rezeptorantagonist entweder am selben Rezeptor unter geänderten Bedingungen oder bei einem nahe verwandten Rezeptor unter gleichen Bedingungen als partieller Agonist wirkt, ist in der Literatur mehrfach beschrieben [262, 263, 264]. Die Funktion des untersuchten Inhibitors SB290175 wird durch diesen Effekt jedoch in der Praxis nicht beeinträchtigt, da er erst bei extrem hohen Konzentrationen auftritt, die üblicherweise nicht für Untersuchungen *in vitro* oder im Tiermodell eingesetzt werden.

Die für den modifizierten Inhibitor SB290175 ermittelte inhibitorische Potenz in Bezug auf den C3a-Rezeptor konnte in zahlreichen anderen funktionellen Analysen in anderen Arbeitsgruppen ebenfalls ermittelt werden [261]. Dabei zeigte der Inhibitor nicht nur im humanen

System einen Effekt, sondern auch bezüglich des Maus-, Meerschwein- und Ratten-C3a-Rezeptors. Der Übergang vom Tiermodell, in dem der Inhibitor SB290175 ebenfalls Auswirkungen zeigte, auf den Menschen, ist aufgrund seiner Spezies-übergreifender Wirkung damit theoretisch relativ einfach möglich. Damit ist der Inhibitor SB290175 ein gutes Werkzeug zur Definition der physiologischen und pathophysiologischen Rolle des C3a-Rezeptors und seiner Bedeutung bei Entzündungserkrankungen, aber auch als Kontrollsubstanz zur Überprüfung von C3a-Effekten, z. B. in Tiermodellen an Stelle von C3aR-defizienten Mäusen, geeignet.

4.3 Struktur-/ Funktionsanalyse des C3aR C-Terminus mit dem Schwerpunkt Internalisierung

Als Internalisierung wird der innerhalb von Minuten nach Ligandenbindung ablaufende Transport des Rezeptors von der Zelloberfläche ins Zellinnere bezeichnet. Dabei ist die Internalisierung nur einer der Desensibilisierungsmechanismen, die zur Limitierung einer Signaltransduktion durch den Rezeptor bei der Gefahr einer überschiessenden Zellreaktion in Folge eines andauernden extrazellulären Reizes, beiträgt. Desensibilisierungsmechanismen sind für verschiedene G-Protein-gekoppelte Rezeptoren, zu denen auch der C3aR zählt, beschrieben worden [199, 200, 213-220]. Dabei ist der β_2 -adrenerge Rezeptor derjenige, der am detailliertesten untersucht wurde [187, 199, 201, 206-212]. Anhand dieses über G_s koppelnden Rezeptors wurde ein Modell entwickelt, das die Abläufe und Zusammenhänge von Desensibilisierung und auch Resensibilisierung veranschaulicht. Bei den über G_i koppelnden α_2 -adrenergen und M2-muscarinergen Rezeptoren wurden übereinstimmende Teilergebnisse gefunden [199, 299], die auf eine allgemeinere Gültigkeit des am β_2 -adrenergen Rezeptor entwickelten Modells auch für andere G-Protein-gekoppelte Rezeptoren hinweist. Bei dem Modell kommt es nach einer Liganden-induzierten Aktivierung der Rezeptor-gekoppelten Signaltransduktion zu einer schnellen Phosphorylierung des β_2 -adrenergen Rezeptors. Dabei werden durch unterschiedliche Ligandenkonzentrationen jeweils anderen Kinasen aktiviert. So kommt es bei Konzentrationen bis zu 10 nM zu einer Aktivierung der cAMP-abhängigen Proteinkinase, durch die die Aminosäuren innerhalb der dritten zytosolischen Schleife und des membrannahen C-Terminus phosphoryliert werden. Durch höhere Konzentrationen wird die Rezeptor-spezifische β -adrenerge Rezeptorkinase (GRK2) aktiviert, die daraufhin Threonine und Serine des extremen C-Terminus phosphoryliert [187, 203, 204, 205]. Die durch die GRK2 bewirkte Phosphorylierung unterbindet die Kopplung des G-Proteins vom Rezeptor nur marginal [199], erhöht aber die Affinität des β -Arrestins zum C-Terminus [206]. Durch die Bindung des β -Arrestins erfolgt in einem zweiten Schritt dann doch die Entkopplung des Rezeptors vom G-Protein und damit die Unterbrechung der Signaltransduktion. Einige Minuten später kommt es in Folge der Bindung von β -Arrestin an Clathrin als Adapter zu den "Clathrin-coated pits" des Endozytoseapparates zur Rezeptorinternalisierung in frühe Endosomen [208, 209]. In dem dort erniedrigten pH-Wert wird der Rezeptor nachfolgend durch Phosphatasen dephosphoryliert [212] und anschließend wieder recycelt.

Bei diesem Modell sind die Phosphorylierung und die Internalisierung unterschiedliche, aber ineinandergreifende Abläufe. Die Internalisierung trägt kurzfristig zu Desensitisierung bei, initiiert später das Rezeptorrecycling. In diesem Modell ist die Phosphorylierung Voraussetzung für die Internalisierung.

Bei dem C5a-Rezeptor wurde eine Beeinflussung der Internalisierung durch den Austausch der Hauptphosphorylierungsstellen im C-Terminus beobachtet [154]. Auch für den Gastrinrezeptor [223] und den FMLP-Rezeptor [232] wurde eine Beteiligung von Phosphorylierungsstellen im zytosolischen C-Terminus an der Internalisierung beschrieben. Für den C3a-Rezeptor lagen zu Beginn dieser Dissertation keine publizierten Hinweise vor, wie die Agonisten-induzierte Rezeptorinternalisierung abläuft und insbesondere auch keine Hinweise darauf, welcher zytosolischer Rezeptoranteil entscheidend für eine funktionierende Internalisierung des C3aR ist. Eine Klärung des Zusammenhangs zwischen C3aR-Internalisierung und -Phosphorylierung und eine Eingrenzung der für die C3aR-Internalisierung wichtigen Anteile war ein Ziel unserer Arbeitsgruppe und auch Teil der vorliegenden Dissertation.

Ein naheliegender Ansatz zur Klärung dieser Fragestellung, der auch schon bei vielen anderen G-Protein-gekoppelten Rezeptoren angewandt wurde [223, 226, 228, 230], ist eine Untersuchung mit Hilfe von C-terminalen Verkürzungsmutanten. In Analogie zum C5a-Rezeptor wurden zu einem früheren Zeitpunkt von einem anderen Arbeitsgruppenmitglied fünf Verkürzungsmutanten des C3aR generiert, von denen jedoch nur die beiden längsten Konstrukte exprimiert wurden. Der Versuch, diese Verkürzungsmutanten stabil in RBL-Zellen zur Expression zu bringen, war erfolglos, wahrscheinlich, weil bestimmte Bestandteile des zytosolischen C-Terminus Voraussetzung für die Oberflächenexpression des C3aR sind. Da die Struktur-/ Funktionszuordnung mit Verkürzungsmutanten aufgrund der oben genannten Vermutung nicht durchführbar war, wurde ein anderer Ansatz gewählt, bei dem stattdessen Austauschmutanten der zehn im C-Terminus lokalisierten putativen Phosphorylierungsstellen generiert werden sollten.

Da eine stabile Transfektion generell sehr zeitaufwendig ist, wurde zunächst nach einer geeigneten Zelllinie gesucht, die in der Lage war, den C3aR möglichst nach transienter Transfektion zu exprimieren und auch zu internalisieren. Die untersuchten HeLaT-, COS-, IMR- und HEK-293-Zellen zeigten dabei nicht den gewünschten Erfolg (Ergebnisse nicht gezeigt). Deswegen wurde auf die RBL-2H3-Zelllinie zurückgegriffen, die ein gutes Expressions- und Internalisierungsverhalten gezeigt hatte, bei der der C3aR aber leider stabil zur Expression gebracht werden muss.

Eine naheliegende Strategie zur Generierung der Austauschmutanten wäre es, die putativen Phosphorylierungsstellen jeweils einzeln auszutauschen. Im Vorfeld war schlecht abschätzbar, wie groß die zu erwartenden Effekte der einzelnen Phosphorylierungsstellen auf die Internalisierung des C3aR sind und ob die Empfindlichkeit des Assays auch für möglicherweise geringe Effekte ausreichend ist. Da bei Einzelaustauschen eher geringe Effekte zu erwarten waren, wurden die putativen Phosphorylierungsstellen in Gruppen ausgetauscht. Dabei wäre eine Generierung von zwei stabilen Zelllinien mit jeweils fünf Austauschungen sinnvoll gewesen.

Aufgrund der ungünstigen Verteilung der Restriktionsschnittstellen wurden aus praktischen Erwägungen in einer ersten Generation an Mutanten stattdessen zunächst nur die hinteren acht putativen Phosphorylierungsstellen in drei Gruppen mit entweder vier Austausch (M0 und M1) oder allen acht (M3) zur Expression gebracht und auf ihren Einfluss hin untersucht. Zusätzlich konnte noch eine Mutante mit neun der zehn Austauschen generiert werden, wobei jedoch die am weitesten C-terminal gelegene putative Phosphorylierungsstelle nicht in die Strategie mit einbezogen werden konnte.

Mit Hilfe dieser ersten Mutantengeneration wurde zunächst ein bereits zuvor entwickelter durchflusszytometrisch-antigenetischer Internalisierungsassay [239] weiterentwickelt. Anhand erster Internalisierungskinetiken zeigte sich, dass der sensitivste Zeitraum zur Detektion von Unterschieden im Internalisierungsverhalten der Mutanten im Vergleich zum Wildtyp nach ein bis vier Minuten Inkubation mit C3a bei 37°C lag. Gleichzeitig stellte sich auch heraus, dass bei längeren Inkubationszeiten (> 15 min) bereits eine Inkubation mit Puffer zu einem Verlust an Rezeptor führte. Möglicherweise ist dies auf eine Schädigung der Zellen unter den doch relativ unphysiologischen Inkubationsbedingungen zurückzuführen. Bei der Untersuchung der Zeitabhängigkeit des Internalisierungsverhaltens der Mutanten im Vergleich zum Wildtyp wurden deshalb nur Zeitpunkte bis maximal 10 Minuten untersucht. Innerhalb dieser Zeitspanne war jedoch auch bereits die maximale Internalisierung bzw. ein Plateau-Bereich erreicht.

Dieses Internalisierungsassay wurde zur Untersuchung der ersten Mutantengeneration eingesetzt. Hierzu wurde zunächst der Einfluss der putativen Phosphorylierungsstellen auf das dosisabhängige Internalisierungsverhalten untersucht. Es konnte ein genereller Einfluss der putativen Phosphorylierungsstellen, ausgenommen der in Mutante M0 ausgetauschten letzten vier C-terminalen Stellen (Ser^{475/479}, Thr^{480/481}), auf das Internalisierungsverhalten des C3a-Rezeptors festgestellt werden. Ein auffälliges Verhalten zeigte die Mutante M1, bei der die Threonine an den Positionen 463 und 466 und die Serine an den Positionen 465 und 470 gegen Alanine ausgetauscht wurden. Diese Mutationen verursachten ein deutlich geändertes Internalisierungsverhalten. Der Grad der Internalisierung scheint mit zunehmender Anzahl an Mutationen abzunehmen, wobei auch die Mutante M3 mit neun von zehn Austauschen jedoch noch eine Restinternalisierung zeigte.

Da trotz größter Bemühungen nicht für alle generierten stabilen Zelllinien Klone mit gleichem Expressionsverhalten hergestellt werden konnten, musste überprüft werden, ob die Höhe der Rezeptorexpression einen Einfluss auf die Rezeptorinternalisierung hat. Beim einem anderen G-Protein-gekoppelten Rezeptor, dem Angiotensin-II-Rezeptor, konnte durch systematische Studien zum Internalisierungsverhalten bei unterschiedlicher Rezeptordichte in einem radioaktiven Verfahren gezeigt werden, dass dadurch die Vergleichbarkeit der Internalisierung nicht wesentlich eingeschränkt wird [228]. Um sicher zu gehen, dass sich diese Beobachtung auch auf die angewandte durchflusszytometrische Methode übertragen lässt, wurde die Unabhängigkeit der Internalisierungsrate von der Höhe der Rezeptorexpression zu einem späteren Zeitpunkt mit Hilfe unterschiedlich exprimierender Klone des Wildtyps und einer weiteren Mutante (M7d) überprüft. Nach 1minütiger Stimulation der Zellen mit 100 nM C3a bei 37°C

zeigten alle Klone eines Konstruktes eine vergleichbare Internalisierungsrate. Dabei wurde zur Stimulation eine Ligandenkonzentration eingesetzt, die auch für Hochexprimierer in einem Sättigungsbereich liegt (100 nM). Somit wurde sichergestellt, dass nicht wegen eines relativen Ligandenmangels bei diesen nur ein Teil der Rezeptoren internalisiert wird.

Bei einer Untersuchung des zeitabhängigen Internalisierungsverhaltens der ersten Mutantengeneration mit dieser C3a-Konzentration bestätigten sich die aus der Untersuchung der Dosisabhängigkeit der Internalisierung ermittelten Ergebnisse. Mit den durchgeführten Untersuchungen wurden tendenzielle Unterschiede im Internalisierungsverhalten der putativen Phosphorylierungsstellen festgestellt. Diese Unterschiede waren jedoch zum Teil so gering, dass durch die im Versuch in dreifacher Wiederholung prozessierten Messwerte keine ausreichende Signifikanz erreicht wurde.

Aus den Ergebnissen aus der ersten Mutantengeneration lassen sich für die weiterführenden Untersuchungen die folgenden Punkte festhalten.

- Aufgrund der noch vorhandenen Restinternalisierung bei Mutante M3 ist zu vermuten, dass auch die zehnte, bisher noch nicht ausgetauschte putative Phosphorylierungsstelle einen Einfluss auf die Internalisierung des C3a-Rezeptors hat. Es ist daher notwendig, in einer zweiten Generation an stabilen Zelllinien den Einfluss dieser Stelle zu untersuchen. Neben einer Komplettaustauschmutante schien die Kombination der zehnten Stelle mit den in Mutante M1 realisierten Austauschen, die bisher den größten Effekt gezeigt haben, sinnvoll.
- Um eine bessere Signifikanz bezüglich der beobachteten Internalisierungsunterschiede bei den Mutanten im Vergleich zum Wildtyp und untereinander zu erhalten, wurde der Assay für die Untersuchung eines einzelnen möglichst aussagekräftigen Zeitpunktes (1 bzw. 4 min nach C3a-Inkubation) mit einer höheren Anzahl an Mehrfachwerten abgeändert.

Für die ersten beiden Generationen der C3aR-Mutanten konnte mit Hilfe dieses zweiten abgeänderten Assays sowohl eine wie auch vier Minuten nach C3a-Gabe eine signifikant reduzierte Rezeptorinternalisierung der Mutanten M1, M2, M3, M5 und M6 im Vergleich zum Wildtyp festgestellt werden. Die Mutanten M2, M3 und M1 zeigten den größten Rückgang der Internalisierungsrate. Zwischen den Mutanten M1, M2 und M3 ließ sich kein signifikanter Unterschied feststellen. Da bereits bei Mutante M1 der signifikante Rückgang in der Internalisierung zu sehen ist und die in dieser Mutante vorkommenden Mutationen in allen drei Konstrukten (M1, M2, M3) vorhanden sind, lässt sich daraus schließen, dass diese vier Stellen, die Serine an den Positionen 465 und 470 und die Threonine an den Positionen 463 und 466, einen entscheidenden Einfluss auf die Internalisierung des C3aR haben. Daraus lässt sich auch schließen, dass das Serin an Position 459 nur einen geringen Einfluss auf die Internalisierung hat. Zwischen dem Wildtyp und der Mutante M0 lässt sich kein signifikanter Unterschied in der Internalisierungsrate ermitteln. Deshalb kann ausgeschlossen werden, dass die vier in Mutante M0 ausgetauschten putativen Phosphorylierungsstellen (Ser^{475/479} und Thr^{480/481}) die C3aR-Internalisierung entscheidend beeinflussen.

Die Mutante M5, die der Mutante M1 mit einem zusätzlichem Alanin-Austausch des Serins an der Position 449 entspricht, zeigte überraschend ein im Vergleich mit der Mutante M1 signifikant erhöhtes (!) Internalisierungsverhalten, was auf einen möglichen inhibitorischen entweder direkten oder durch Konformationsänderung erzeugten Einflusses dieses Serins schließen lässt. Auch bei der Mutante M6, die sich ebenfalls nur durch den Austausch des gleichen Serins an Position 449 von der Mutante M3 unterscheidet, kann man ein im Vergleich zu M3 erhöhtes Internalisierungsverhalten feststellen, wobei dieser Unterschied allerdings nicht signifikant ist. Auffällig ist, dass selbst die Mutante M6, bei der alle zehn im C-Terminus des C3aR vorhandenen putativen Phosphorylierungsstellen ausgetauscht sind, noch internalisiert wird. Dies deutet darauf hin, dass zusätzlich neben den putativen Phosphorylierungsstellen noch andere Teile des C3aR an der schnellen Internalisierung dieses Rezeptors beteiligt sind.

Da Fehler in der C3aR-Sequenz der Mutanten M0, M1 und M5 als einfachste Erklärung für das auffällige Verhalten dieser Mutanten zwar unwahrscheinlich, aber dennoch nicht auszuschließen waren, wurde der C3a-Rezeptor aus der genomischen DNA dieser stabilen Zelllinien amplifiziert und anschließend über den gesamten Leserahmen sequenziert. Hierbei zeigten sich jedoch keine Abweichungen von den erwarteten Sequenzen. Alle beabsichtigten Austausche waren vorhanden und es traten keine zusätzlichen Austausche auf.

Für den β_2 -adrenergen Rezeptor wurde bereits gezeigt, dass ein di-Leucin-Motiv im C-Terminus des Rezeptors in die Internalisierung des Rezeptors involviert ist [258]. Auch im C3aR-C-Terminus findet sich ein vergleichbares Motiv, wobei hier allerdings ein Leucin (Pos. 453) und ein Isoleucin (Pos. 454) vorliegen. Diese Stellen wurden bisher noch nicht auf ihren Einfluss auf die Rezeptorinternalisierung hin untersucht. Beim Hm1-muscarinergen cholinergen Rezeptor hatten Verkürzungsmutanten und Teildeletionen verschiedener potentieller Phosphorylierungsstellen im C-Terminus keinen Einfluss, wohingegen Deletionen (Tyr²⁰⁸-Thr³⁶⁶) im dritten intrazellulären Loop eine reduzierte Internalisierung hervorrufen. Auch verschiedene andere Deletionen in diesem Loop führen zu einer Verschlechterung des Internalisierungsverhaltens [265]. Das Auffinden weiterer, für die Internalisierung des C3aR wichtiger Teile konnte im Rahmen dieser Dissertation nicht durchgeführt werden, ist aber ein Ansatz, der in Zukunft weiter verfolgt werden sollte.

Anhand der Ergebnisse zur Untersuchung des schnellen Internalisierungsverhaltens der ersten und zweiten Generation an Mutanten haben die in M1 ausgetauschten putativen Phosphorylierungsstellen (Thr^{463/466}, Ser^{465/470}) einen dominierenden Einfluss auf die C3aR-Internalisierung gezeigt. Um diesen Bereich weiter eingrenzen zu können, war die Generierung von Derivaten der Mutante M1 als stabile Zelllinien erforderlich. Hierbei standen mehrere Strategien zur Auswahl.

- Ein möglicher Ansatz ist es, Einzelaustausche vorzunehmen. Ein Nachteil dieser Strategie besteht in der Möglichkeit, dass die betroffenen Stellen einen jeweils gleichwertigen, im Vergleich zum Wildtyp relativ geringen Einfluss ausüben, für den das Messsystem bei einem Einzelaustausch möglicherweise nicht empfindlich genug ist.

- Eine weitere Strategie bestand darin, jeweils drei der vier Stellen gemeinsam auszutauschen. Hierdurch werden zwar die durch den Austausch der putativen Phosphorylierungsstellen hervorgerufenen Unterschiede summiert und so im Vergleich zum Wildtyp deutlicher, jedoch treffen für den Vergleich mit Mutante M1 die bereits für die Einzelaustausche aufgeführten Gründe zu.
- Deshalb wurde ein Ansatz gewählt, bei dem jeweils zwei der vier Stellen paarweise ausgetauscht wurden. Diese Strategie ermöglicht die Zuordnung des Einflusses für jede einzelne der vier Stellen. Aus Zeitgründen wurden jedoch nur vier der theoretisch möglichen Konstrukte stabil zur Transfektion gebracht. Dabei wurde auf die beiden "Überkreuzversionen" verzichtet.

Die Realisierung der Klonierungsstrategie erfolgte diesmal mit Hilfe von synthetisch, durch die Hybridisierung zweier Oligonukleotide hergestellten Inserts, die bereits für die Klonierung notwendigen Schnittstellen beinhalten. Die hierbei resultierenden Klone der einzelnen Mutanten zeigten alle ein gutes und relativ einheitliches Expressionsverhalten.

Die Mutanten dieser dritten Generation (M7a-d) wurden bezüglich ihres schnellen Internalisierungsverhaltens nach 1minütigem Liganden-Stimulus untersucht. Dabei zeigte sich, dass die Internalisierung aller vier Mutanten signifikant erniedrigt war im Vergleich zum Wildtyp, wodurch sich der bereits zuvor ermittelte deutliche Einfluss der Austausche in M1 (Thr⁴⁶³, Ser⁴⁶⁵, Thr⁴⁶⁶, Ser⁴⁷⁰) bezüglich der Internalisierung bestätigt. Im Vergleich zur Mutante M1, von denen sie alle Derivate mit nur jeweils zwei Austauschen sind, zeigen die Mutanten M7a-d eine signifikant höhere Internalisierungsrate, wodurch deutlich wird, dass mehr als zwei der vier Aminosäuren verantwortlich sind für die reduzierte Internalisierung. Dabei weisen mehrere Faktoren darauf hin, dass das Threonin an Position 463 einen größeren Einfluss auf die Internalisierung hat als die anderen drei Positionen. Die Mutanten M7c und M7a zeigen die geringste Internalisierungsrate. Beiden gemeinsam ist der Austausch des Threonins an Pos. 463. Die Mutante M7c zeigt im Vergleich zu den Mutanten M7b und M7d, die diese Mutation nicht aufweisen, ein signifikant erniedrigtes Internalisierungsverhalten. Auch bei der Mutante M7a zeigen sich deutliche Unterschiede zu diesen beiden Mutanten, wobei allerdings nur im Vergleich zu Mutante M7b eine Signifikanz festgestellt werden konnte. Die anderen drei Positionen (Ser⁴⁶⁵, Thr⁴⁶⁶, Ser⁴⁷⁰) scheinen nur zu einem geringen Grad an der Internalisierung des C3a-Rezeptors beteiligt zu sein.

Die anhand der durchgeführten Untersuchungen ermittelte Struktur-Funktionszuordnung kann wie folgt zusammengefasst werden.

- Die im C-Terminus des C3a-Rezeptors lokalisierten Serine (Pos. 465/470) und Threonine (Pos. 463/466), die in Mutante M1 ausgetauscht wurden, haben nachweislich einen entscheidenden Einfluss auf die Rezeptorinternalisierung. Dabei zeigte das Threonin an Position 463 einen größeren Effekt gegenüber den anderen drei putativen Phosphorylierungsstellen.
- Die in Mutante M0 ausgetauschten Serine (Pos. 475/479) und die Threonine (Pos. 480/481) sind nicht wichtig für die Internalisierung des C3aR.

- Da auch ein Austausch von neuen bzw. allen zehn putativen Phosphorylierungsstellen keine komplette Reduktion der Internalisierung bewirkt, müssen noch weitere Teile des C3a-Rezeptors an der Internalisierung beteiligt sein.
- Das Serin an Position 449 hat möglicherweise einen inhibitorischen Effekt auf die C3aR-Internalisierung.

Für den C3a-Rezeptor konnte bisher noch nicht gezeigt werden, ob eine Phosphorylierung der putativen Phosphorylierungsstellen Voraussetzung für die Internalisierung ist oder ob die beiden Mechanismen, wie mittlerweile bei dem nahe verwandte C5aR gezeigt [237], unabhängig voneinander ablaufen. Entsprechende Untersuchungen werden zur Zeit durchgeführt.

Zur Untersuchung des Einflusses der durchflusszytometrisch analysierten putativen Phosphorylierungsstellen auf die G-Protein-Kopplung wurden alle Konstrukte nach transienter Transfektion in HEK-293-Zellen auf ihre Liganden-induzierte Calcium-Freisetzung überprüft. Dabei wurden sie nicht mit den G-Proteinen kotransfiziert an die sie normalerweise koppeln (G_{i2} , G_{i3}), da hierbei nur schwache Messsignale mit der verwendeten FLIPR-Technik detektiert werden können. Es erfolgte stattdessen eine Kotransfektion mit $G_{\alpha 16}$, wodurch ein höheres Signal erzeugt wird. Die Aminosäuren Thr^{463/466} und Ser^{465/470} zeigen im Gegensatz zu den Internalisierungsergebnissen in der Untersuchung zur Calcium-Freisetzung nach Liganden-Stimulus keinen Einfluss. Auffällig ist die um die Hälfte reduzierte Reaktion der Mutante M5 und M6. Wenn an dieser Stelle die stabilen Konstrukte vermessen worden wären, hätte man den Effekt auf eine schlechte Expression des Rezeptors in diesen Mutanten zurückführen können. ¹²⁵I-C3a-Bindungsstudien an den hier eingesetzten transient transfizierten HEK-293-Zellen haben jedoch gezeigt, dass die Mutanten in diesem System den C3a-Rezeptor gut exprimieren. Deswegen musste es eine andere Ursache für dieses auffällige Verhalten geben. Beiden Mutanten gemeinsam ist der bei den anderen Konstrukten nicht durchgeführte Austausch des Serins an Pos. 449, auf das dieser Effekt möglicherweise zurückgeführt werden kann. Zur Bestätigung dieser Vermutung ist eine Untersuchung der Ca^{2+} -Freisetzung mit einer noch zu generierenden Einzelaustauschmutante (Ser⁴⁴⁹Ala) erforderlich.

4.4 Untersuchungen zur Charakterisierung der dem humanen anaphylatoxischen C3a-Rezeptor nachgeschalteten Regulationsvorgänge

Mit den bisher vorgestellten Untersuchungen zur Internalisierung konnten Effekte an der Oberfläche der Zellen detektiert werden. Zur Aufklärung des Internalisierungsmechanismus ist jedoch auch eine Information über die Vorgänge im Zellinneren von Interesse. Die konvokale Laserspektroskopie bietet prinzipiell die Möglichkeit der Visualisierung der Rezeptor-Ligand-Interaktion. Zu diesem Zweck muss der Rezeptor mit einem geeigneten Fluoreszenzfarbstoff gekoppelt werden. Eine Möglichkeit zur Realisierung dieser Kopplung bietet das

GFP, mit dem ein C3aR-GFP-Fusionsprotein hergestellt werden kann. Dieses erlaubt dann eine direkte Beobachtung des C3aR und ermöglicht die räumliche Zuordnung des Rezeptors zu den einzelnen Zellkompartimenten nach Liganden-induzierter Internalisierung. Im Rahmen dieser Arbeit sollte ein entsprechendes C3aR-GFP-Fusionsprotein hergestellt und auf seine prinzipielle Eignung hin überprüft werden.

In der Arbeitsgruppe existierte bereits ein Fusionsprotein, bei dem jedoch noch irrtümlicherweise ein Stop zwischen dem C3aR und dem GFP vorhanden war. Dieses Stop wurde durch gezielte Mutagenese entfernt und das entstandene C3aR-GFP-Fusionsprotein auf seine Funktionalität hin überprüft. Hierbei lassen sich die folgenden Aussagen treffen:

- Ein C3aR-GFP-Fusionsprotein konnte durch ein TOPO-Kloning erfolgreich hergestellt werden.
- Dieses Konstrukt zeigte sowohl durchflusszytometrisch wie auch in der ^{125}I -C3a-Zweipunktbindung und -Bindungsstudie eine sichtbare C3a-Rezeptorexpression. Das erzielte Expressionslevel war jedoch deutlich schlechter als das des C3aR-wt in einem entsprechenden Vektor ohne GFP.
- Fluoreszenzmikroskopische Untersuchungen zeigten nur bei einem kleinen Teil der transfizierten Zellen Fluoreszenz.

Das getestete C3aR-GFP-Fusionsprotein scheint anhand von ^{125}I -C3a-Bindungsstudien und Fluoreszenzuntersuchungen prinzipiell geeignet zu sein. Es scheint jedoch notwendig zu sein, die Expression zu verbessern. Aus Zeitgründen konnte jedoch keine weitere Optimierung erfolgen.

Eine weitere Zielsetzung der Arbeitsgruppe ist die Charakterisierung der den beiden Anaphylatoxinrezeptoren nachgeschalteten intrazellulären Regulationsmechanismen auf mRNA-Ebene. Die im Rahmen dieser Dissertation durchgeführten Voruntersuchungen zielten darauf ab, zu klären, ob durch eine Stimulation mit C3a und C5a eine dementsprechende Veränderung in den Zellen ausgelöst wird. Dazu wurden Zellen der humanen Mastzelllinie HMC-1 eingesetzt, die den C3aR und auch den C5aR nativ an ihrer Oberfläche in großer Zahl exprimieren (vgl. Kap. 3.1.1). Diese Zellen wurden für eine Dauer von 4 Stunden einem kombinierten Stimulus aus C3a und C5a unter Zellkulturbedingungen ausgesetzt. Zur Kontrolle wurden Zellen parallel mit Puffer behandelt. Die aus diesen Zellen präparierte RNA wurde zunächst mit Hilfe des Northern-Transfers qualitativ überprüft, ehe sie in das teure Atlas cDNA Array eingesetzt wurde. In der Northern-Analyse konnte mit einer generierten hC3aR-RNA-Sonde sowohl bei der RNA stimulierter als auch unstimulierter Zellen die C3aR-mRNA in scharfen Banden nachgewiesen werden. Die RNA war demnach in Ordnung und für den Einsatz im Atlas cDNA Array geeignet. Im Northern-Blot wurde als Nebenbefund keine negative Autoregulation der C3aR-mRNA-Bande festgestellt, was allerdings bei dem frühen Zeitpunkt von 4 h auch ungewöhnlich gewesen wäre.

Der Einsatz der RNA in ein Atlas cDNA Array zur Detektion von Genregulationsunterschieden zwischen stimulierten und nicht stimulierten Zellen zeigte im vorliegenden Experiment keine großen Unterschiede. Dies lässt mehrere Schlüsse zu:

- Zum einen könnte eine Stimulation mit C3a und C5a keine Auswirkung auf die Genregulation in HMC-1-Zellen haben, was jedoch relativ unwahrscheinlich ist, da durch AT-Peptide ausgelöste transkriptionelle Regulationsvorgänge in anderen Zellen schon beschrieben sind.
- Der Untersuchungszeitpunkt, nur 4 Stunden nach Inkubation mit den Anaphylatoxinen, war zu früh gewählt. Möglicherweise wird darum eine Genregulation erst zu einem späteren Zeitpunkt nach Stimulation messbar.
- Aufgrund dieser Vorergebnisse sollte für anstehende Untersuchungen ein späterer Zeitpunkt und eventuell auch eine andere Zelle (aufgereinigte Monozyten/Makrophagen) verwendet werden.

5 Ausblick

Zur Untersuchung einer möglichen, der Internalisierung des C3aR nachgeschalteten Reexpression wurde bisher keine geeignete Modellzelle gefunden. Anhand jüngster, in der Arbeitsgruppe durchgeführter Untersuchungen könnten unter GM-CSF kultivierte Monozyten, die über Adhärenz an Plastikoberflächen aufgereinigt wurden, in Frage kommen. Zur Absicherung müsste an diesen Zellen allerdings zuerst das Internalisierungsverhalten erneut überprüft werden. Bei Eignung könnten dann pharmakologische Untersuchungen bezüglich des Reexpressionsmechanismus durchgeführt werden.

Zu einer vollständigen Klärung des Einflusses der zehn putativen Phosphorylierungsstellen im C-Terminus des C3a-Rezeptors und auch zur Untersuchung der Fragestellung, ob die Phosphorylierung eine Voraussetzung für die Internalisierung ist, stehen noch folgende Untersuchungen aus:

- Eine vierte Generation an Mutanten müsste hergestellt werden. Darin sollten zum einen die in Kapitel 4.3 angesprochenen, noch ausstehenden zwei Derivate der Mutante M1 ("Kreuzmutanten" mit kombinierten Alanin-Austausch an den Positionen Thr⁴⁶³ und Thr⁴⁶⁶ bzw. Ser⁴⁶⁵ und Ser⁴⁷⁰) enthalten sein. Daneben würden sich noch zwei Einzelaustausche anbieten. Zum einen für das Threonin an Position 463, dem der größte Einfluss auf die Internalisierung des C3aR zuzukommen scheint, und zum anderen für das Serin an Position 449, das möglicherweise für die mit Hilfe des Calciumfreisetzungstestes ermittelten Unterschiede bezüglich der G-Protein-Kopplung bei den Mutanten M5 und M6 verantwortlich ist. Die Einzelaustausche würden dazu dienen, die angesprochene vermutete funktionelle Bedeutung dieser Aminosäuren zu beweisen.
- Für alle bisher generierten und noch zu generierenden Konstrukte steht eine Untersuchung des Phosphorylierungsverhaltens, allerdings in einem anderen Vektor nach transienter Transfektion in HEK-293-Zellen, aus. Dadurch könnte der Zusammenhang zwischen der Phosphorylierung und der Internalisierung des C3aR geklärt werden.

Bezüglich der Untersuchung der den Anaphylatoxinrezeptoren nach Ligandenbindung nachgeschalteten Regulationsvorgänge auf mRNA-Ebene könnten die bereits verwendeten HMC-1-Zellen zu einem späteren Zeitpunkt nach Inkubation mit C3a/C5a im Atlas cDNA Array eingesetzt werden. Zudem wäre ein Wechsel auf eine humane physiologisch wichtige Zelle mit guter AT-Rezeptorexpression wie den mit GM-CSF vorbehandelten Monozyten zu überlegen, da die physiologische Bedeutung der HMC-1-Zelle nur schwer abschätzbar ist und für Monozyten schon einzelne AT-induzierte Regulationsvorgänge auf mRNA-Ebene beschrieben sind. Diese beiden Punkte werden bereits in der Arbeitsgruppe umgesetzt.

6 Literatur

- [1] Frank, M. M.; Fries, L. F. (1989): Complement. In: Paul, W.E.: *Fundamental Immunology*. sec. Edition. New York: Raven press S. 679-701.
- [2] Müller-Eberhardt H. J. (1988): Molecular organization and function of the complement system. *Ann. Rev. Biochem.* 57, S. 321-347.
- [3] Chenoweth, D. E.; Soderberg, C. S.; Von Wedel, R. (1984): Dibutyryl cAMP induced expression of C5a receptors on U937 cells. *J. Leukoc. Biol.* 36, Abstract (Abstract).
- [4] Matsushita, M.; Fujita, T. (1992): Activation of the classical complement pathway by mannose-binding protein in association with a novel C1s-like serine protease. *J. Exp. Med.* 176, S. 1497-1502.
- [5] Matsushita, M.; Takahashi, A.; Hatsuse, H.; Kawakami, M.; Fujita, T. (1992): Human mannose-binding protein is identical to a component of Ra-reactive factor. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 183 (2), S. 645-651.
- [6] Epstein, J.; Eichbaum, Q.; Sheriff, S.; Ezekowitz, R. A. (1996): The collectins in innate immunity. *Curr. Opin. Immunol.* 8 (1), S. 29-35.
- [7] Pillemer, L.; Blum, L.; Lepow, I. H.; Ross, O. A.; Todd, E. W.; Wardlow, A. C. (1954): The properdin system and immunity. I. Demonstration and isolation of a new serum protein, properdin, and its Role in immune phenomena. *Science* 120, S. 279-285.
- [8] Fearon, D. T.; Austen, K. F. (1975): Initiation of C3 cleavage in the alternative complement pathway. *J. Immunol.* 115 (5), S. 1357-1361.
- [9] Pangburn, M. K.; Müller-Eberhard, H. J. (1984): The alternative pathway of complement. *Springer Semin. Immunopathol.* 7 (2-3), S. 163-192.
- [10] Meri, S.; Pangburn, M. K. (1990): A mechanism of activation of the alternative complement pathway by the classical pathway: protection of C3b from inactivation by covalent attachment to C4b. *Eur. J. Immunol.* 20 (12), S. 2555-2561.
- [11] Eds.: Morley, B. J.; Walport, M. J. (2000): *The Complement FactsBook*. San Diego: Academic Press.
- [12] Mold, C. (1998): Cellular Responses to the Membran Attak Complex. In: Eds.: Volanakis, J. E.; Frank, M. M.: *The human complement system in health and disease*. New York: Marcel Dekker Inc., S. 309-325.
- [13] Bhakdi, S.; Trantum-Jensen, J. (1991): Complement lysis: a hole is a hole. *Immunol. Today* 12 (9), S. 318-320.
- [14] Liszewski, M. K.; Atkinson, J. P. (1998): Regulatory Proteins of Complement. In: Eds.: Volanakis, J. E.; Frank, M.M.: *The human complement system in health and disease*. New York: Marcel Dekker Inc., S. 149-165.
- [15] Bitter-Suermann, D.; Köhl, J. (1997): Komplementsystem. In: Hrsg.: Gemsa, D.; Kalden, J. R.; Resch, K.: *Immunologie*. 4. Aufl. Stuttgart, New York: Thieme-Verlag S. 70-86.
- [16] Eds.: Volanakis, J. E.; Frank, M. M. (1998): *The Human Complement System in Health and Disease*. New York: Marcel Dekker Inc.
- [17] Lu, J.; Sim, R. B. (1994): In: Eds.: Erdei, A.: *New Aspects of Complement Structure and Function*. Austin, Tx: R. G. Landes Co. S. 85-106.
- [18] Davies, K. A.; Schifferli, J. A.; Walport, M. J. (1994): Complement deficiency and immune complex disease. *Springer Semin. Immunopathol.* 15 (4), S. 397-416.
- [19] Eds.: Janeway, C. A.; Travers, P.; Walport, M. Capra, J. D. (1999): *Immunobiology: The Immune System in Health and Disease*. 4th edn. New York: Elsevier Science LTD/ Garland Publishing.

- [20] Dias da Silva, W.; Lepow, I. H. (1966): Anaphylatoxin formation by purified human C'1 esterase. *J. Immunol.* 95, S. 1080-1089.
- [21] Dias da Silva, W.; Lepow, I. H. (1967): Complement as a mediator of inflammation. II.: Biological properties of anaphylatoxin prepared with purified components of human complement. *J. Exp. Med.* 125, S. 921-946.
- [22] Dias da Silva, W.; Eisele, J. W.; Lepow, I. H. (1967): Complement as a mediator of inflammation. III.: Purification of the activity with anaphylatoxin properties generated by interaction of the first four components of complement and its identification as a cleavage product of C3a. *J. Exp. Med.* 126, S. 1027-1047.
- [23] Cochrane, C. G.; Müller-Eberhard, H. J. (1968): The derivation of two distinct anaphylatoxin activities from the third and fifth components of human complement. *J. Exp. Med.* 127, S. 371-386.
- [24] Bokisch, V. A.; Müller-Eberhard, H. J. (1970): Anaphylatoxin inactivator of human plasma: Its isolation and characterization as a carboxypeptidase. *J. Clin. Invest.* 49, S. 2427-2436.
- [25] Marder, S. R.; Chenoweth, C. E.; Goldstein, I. M.; Perez, H. D. (1985): Chemotactic responses of human peripheral blood monocytes to the complement - derived peptides C5a and C5a des Arg. *J. Immunol.* 134, S. 3325-3331.
- [26] Wilken, H.-C.; Götze, O.; Werfel, T.; Zwirner, J. (1999): C3a(desArg) does not bind to and signal through the human C3a receptor. *Immunol. Lett.* 67, S. 141-145.
- [27] Takabayashi, T.; Vannier, E.; Burke, J. F.; Tompkins, R. G.; Gelfand, J. A.; Clark, B. D. (1998): Both C3a and C3a_{desArg} regulate interleukin-6 synthesis in human peripheral blood mononuclear cells. *J. Infect. Dis.* 177 (6), S. 1622-1628.
- [28] Mousli, M.; Hugli, T. E.; Landry, Y.; Bronner, C. (1992): A mechanism of action for anaphylatoxin C3a stimulation of mast cells. *J. Immunol.* 148, S. 2456-2461.
- [29] Erdei, A.; Andreev, S.; Pecht, I. (1995): Complement peptide C3a inhibits IgE-mediated triggering of rat mucosal mast cells. *Int. Immunol.* 7 (9), S. 1433-1439.
- [30] Baldo, A.; Sniderman, A. D.; St-Luce, S.; Avramoglu, R. K.; Maslowska, M.; Hoang, B.; Monge, J. C.; Bell, A.; Mulay, S.; Cianflone, K. (1993): The adipsin-acylation stimulating protein system and regulation of intracellular triglyceride synthesis. *J. Clin. Invest.* 92, S. 1543-1547.
- [31] Murray, I.; Parker, R. A.; Kirchgessner, T. G.; Tran, J.; Zhang, Z. J.; Westerlund, J.; Cianflone, K. (1997): Functional bioactive recombinant acylating stimulating protein is distinct from C3a anaphylatoxin. *J. Lipid Res.* 38 (12), S. 2492-2501.
- [32] Murray, I.; Köhl, J.; Cianflone, K. (1999): Acylation-stimulating protein (ASP): structure-function determinants of cell surface binding and triacylglycerol synthetic activity. *Biochem. J.* 342, S. 41-48.
- [33] Gorski, J. P.; Hugli, T. E.; Müller-Eberhard, H. J. (1979): C4a: the third anaphylatoxin of the human complement system. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 76, S. 5299-5302.
- [34] Moon, K. E.; Gorski, J. P.; Hugli, T. E. (1981): Complete primary structure of human C4a anaphylatoxin. *J. Biol. Chem.* 256, S. 8685-8692.
- [35] Meuer, S.; Hugli, T. E.; Andretta, R. H.; Hadding, U.; Bitter-Suermann, D. (1981): Comparative study on biological activities of various anaphylatoxins (C4a, C3a, C5a). Investigations on their ability to induce platelet secretion. *Inflammation* 5, S. 263-273.
- [36] Murakami, Y.; Yamamoto, T.; Imamichi, T.; Nagasawa, S. (1993): Cellular responses of guinea-pig macrophages to C4a; inhibition of C3a-induced O₂-generation by C4a. *Immunol. Lett.* 36 (3), S. 301-304.
- [37] Lienenklaus, S.; Ames, R. S.; Tornetta, M. A.; Sarau, H. M.; Foley, J. J.; Crass, T.; Sohns, B.; Raffetseider, U.; Grove, M.; Hölzer, A.; Klos, A.; Köhl, J.; Bautsch, W. (1998): Cutting edge: Human anaphylatoxin C4a is a potent agonist of the guinea pig but not the human C3a receptor. *J. Immunol.* 161 (5), S. 2089-2093.

- [38] Fernandez, H. N.; Hugli, T. E. (1976): Partial characterization of human C5a anaphylatoxin. I. Chemical description of the carbohydrate and polypeptide portions of human C5a. *J. Immunol.* 117, S. 1688-1694.
- [39] Hugli, T. E. (1982): Bioactive factors of the blood complement system. In: Eds.: Bradshaw, R. A.; Hill, R. L.; Tang, J.: *Proteins in biology and medicine. Proceedings of P.R.C.-USA, conference in Shanghai, China.* New York: Academic Press S. 91-117
- [40] Hugli, T. E. (1984): Structure and function of the anaphylatoxins. *Springer-Semin. Immunopathol.* 7, S. 193-219.
- [41] Bitter-Suermann, D. (1988): The Anaphylatoxins. In: Eds.: Rother, K.; Till, G. O.: *The complement system.* Heidelberg: Springer-Verlag, S. 367-395.
- [42] Hugli, T. E.; Erickson, B. W. (1977): Synthetic peptides with the biological activities and specificity of human C3a anaphylatoxin. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 74, S. 1826-1830.
- [43] Edalji, R. P.; Mollison, K. W.; Zuiderweg, E. R. P.; Fey, T. A.; Krause, R. A.; Conway, R. G.; Miller, L.; Lane, B.; Henkin, J.; Greer, J.; Carter, G. W. (1987): Truncation of the amino or carboxyl terminus of recombinant human C5a reduces receptor binding activity. *Fed. Proc. Fed. Am. Soc. Exp. Biol.* 46, S. 980.
- [44] Gerard, C.; Chenoweth, D. E.; Hugli, T. E. (1979): Molecular aspects of the serum chemotactic factors. *J. Leuk. Biol.* 26, S. 711-718.
- [45] Caporale, L. H.; Tippet, P. S.; Erickson, B. W.; Hugli, T. E. (1980): The active site of C3a anaphylatoxin. *J. Biol. Chem.* 255, S. 10758-10763.
- [46] Köhl, J.; Casaretto, M.; Gier, M.; Karwath, G.; Gietz, C.; Bautsch, W.; Saunders, D.; Bitter-Suermann, D. (1990): Reevaluation of the C3a active site by using short synthetic C3a analogues. *Eur. J. Immunol.* 20, S. 1463-1468.
- [47] Huber, R.; Scholze, H.; Paques, E. P.; Deisenhofer, J. (1980): Crystal structure analysis and molecular model of human C3a anaphylatoxin. *Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem.* 361, S. 1389-1399.
- [48] Chazin, W. J.; Hugli, T. E.; Wright, P. E. (1988): ¹H NMR studies of human C3a anaphylatoxin in solution: Sequential resonance assignments, secondary structure, and global fold, *Biochemistry* 27, S. 9139-9148.
- [49] Nettlesheim, D. G.; Edalji, R. P.; Mollison, K. W.; Greer, J.; Zuiderweg, E. R. P. (1988): Secondary structure of complement component C3a anaphylatoxin in solution as determined by NMR spectroscopy: Differences between crystal and solution conformations. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85, S. 5036-5040.
- [50] Zuiderweg, E. R. P.; Nettlesheim, D. G.; Mollison, K. W.; Carter, G. W. (1989): Tertiary structure of human complement component C5a in solution from nuclear magnetic resonance data. *Biochemistry* 28, S. 172-185.
- [51] Federwisch, M.; Wollmer, A.; Emde, M.; Stühmer, T.; Melcher, T.; Klos, A.; Köhl, J.; Bautsch, W. (1993): Tryptophan mutants of human C5a anaphylatoxin: a fluorescence anisotropy decay and energy transfer study. *Biophys. Chem.* 46, S. 237-248.
- [52] Gorski, J. P.; Hugli, T. E.; Müller-Eberhard, H. J. (1981): Characterization of human C4a anaphylatoxin. *J. Biol. Chem.* 256, S. 2707-2711.
- [53] Hugli, T. E. (1981): The structural basis for anaphylatoxin and chemotactic functions of C3a, C4a, and C5a. *Crit. Rev. Immunol.* 1 (4), S. 321-366.
- [54] Hugli, T. E.; Morgan, W. T.; Müller-Eberhard, H. J. (1975): Circular dichroism of C3a anaphylatoxin. Effects of pH, heat, guanidinium chloride, and mercaptoethanol on conformation and function. *J. Biol. Chem.* 250, S. 1479-1483.
- [55] Zhang, X.; Boyar, W.; Toth, M. J.; Wennogle, L.; Gonnella, N. C. (1997): Structural definition of C5a C terminus by two-dimensional nuclear magnetic resonance spectroscopy. *Proteins* 28 (2), S. 261-267.

- [56] Bodamer, G.; Vogt, W. (1970): Contraction of the guinea pig ileum induced by anaphylatoxin independent of histamine release. *Int. Arch. Allergy*. 39, S. 648-657.
- [57] Bodamer, G.; Vogt, W. (1970): Beeinflussung der Capillarpermeabilität in der Meerschweinchenhaut durch Anaphylatoxin (AT). *Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol.* 266, S. 255-266.
- [58] Yancey, K. B.; Hammer, C. H.; Harvath, L.; Renfer, L.; Frank, M. M.; Lawley, T. J. (1985): Studies of human C5a as a mediator of inflammation in normal human skin. *J. Clin. Invest.* 75, S. 486-495.
- [59] Johnson, A. R.; Hugli, T. E.; Müller-Eberhard, H. J. (1975): Release of histamine from rat mast cells by complement peptides C3a and C5a. *Immunology* 28, S. 1067-1080.
- [60] Meuer, S.; Ecker, U.; Hadding, U.; Bitter-Suermann, D. (1981): Platelet-serotonin release by C3a and C5a: two independent pathways of activation. *J. Immunol.* 126, S. 1506-1509.
- [61] Goldstein, I. M.; Weissmann, G. (1974): Generation of C5-derived lysosomal enzyme-releasing activity (C5a) by lysates of leukocyte lysosomes. *J. Immunol.* 113, S. 1583-1588.
- [62] Klos, A.; Bank, S.; Gietz, C.; Bautsch, W.; Köhl, J.; Burg, M.; Kretzschmar, T. (1992): C3a receptor on dibutyryl-cAMP-differentiated U937 cells and human neutrophils: the human C3a receptor characterized by functional responses and ¹²⁵I-C3a binding. *Biochemistry* 31, S. 11274-11282.
- [63] Zanker, B.; Rasokat, H.; Hadding, U.; Bitter-Suermann, D. (1982) C3a induced activation and stimulus specific reversible desensitization of guinea pig platelets. *Agents Actions Suppl.* 11, S. 147-157.
- [64] Fernandez, H. N.; Henson, P. M.; Otani, A.; Hugli, T. E. (1978): Chemotactic response to human C3a and C5a anaphylatoxins. I. Evaluation of C3a and C5a leukotaxis in vitro and under stimulated in vivo conditions. *J. Immunol.* 120, S. 109-115.
- [65] Morita, E.; Schroder, J. M.; Christophers, E. (1989): Chemotactic responsiveness of eosinophils isolated from patients with inflammatory skin diseases. *J. Dermatol.* 16 (5), S. 348-351.
- [66] Snyderman, R. (1985): Regulatory mechanisms of a chemoattractant receptor on human polymorphonuclear leukocytes. *Rev. Infect. Dis.* 7 (3), S. 390-394.
- [67] Pieters, W. R.; Houben, L. A.; Koenderman, L.; Raaijmakers, J. A. (1995): C5a-induced migration of human monocytes is primed by dexamethasone. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* 12 (6), S. 691-696.
- [68] Nilsson, G.; Johnell, M.; Hammer, C. H.; Tiffany, H. L.; Nilsson, K.; Metcalfe, D. D.; Siegbahn, A.; Murphy P. M. (1996): C3a and C5a are chemotaxins for human mast cells and act through distinct receptors via a pertussis toxin-sensitive signal transduction pathway. *J. Immunol.* 157, S. 1693-1698.
- [69] Daffern, P. J.; Pfeifer, P. H.; Ember, J. A.; Hugli, T. E. (1995): C3a is a chemotaxin for human eosinophils but not for neutrophils. I. C3a stimulation of neutrophils is secondary to eosinophil activation. *J. Exp. Med.* 181, S. 2119-2127.
- [70] Showell, H. J.; Glovsky, M. M.; Ward, P. A. (1982): Morphological changes in human polymorphonuclear leukocytes induced by C3a in the presence and absence of cytochalasin B. *Int. Arch. Allergy Appl. Immunol.* 69, S. 62-67.
- [71] Ehrenguber, M. U.; Geiser, T.; Deranleau, D. A. (1994): Activation of human neutrophils by C3a and C5a. Comparison of the effects of shape changes, chemotaxis, secretion and respiratory burst. *FEBS Lett.* 346, S. 181-184.
- [72] Bischoff, S. C.; De Weck, A. L.; Dahinden, C. A. (1990): Interleukin 3 and granulocyte/makrophage-colony-stimulating factor render human basophils responsive to low concentrations of complement component C3a. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 87, S. 6813-6817.
- [73] Kretzschmar, T.; Jeromin, A.; Gietz, C.; Bautsch, W.; Klos, A.; Köhl, J.; Rechkemmer, G.; Bitter-Suermann, D. (1993): Chronic myelogenous leukemia-derived basophilic granulocytes express a functional active receptor for the anaphylatoxin C3a. *Eur. J. Immunol.* 23, S. 558-561.
- [74] Takafuji, S.; Tadokoro, K.; Ito, K.; Dahinden, C. A. (1994): Degranulation from human eosinophils stimulated with C3a and C5a. *Int. Arch. Allergy Immunol.* 104, suppl. 1 (1), S. 27-29.

- [75] Elsner, J.; Oppermann, M.; Czech, W.; Dobos, G.; Schöpf, E.; Norgauer, J.; Kapp, A. (1994): C3a activates reactive oxygen radical species production and intracellular calcium transients in human eosinophils. *Eur. J. Immunol.* 24, S. 518-522.
- [76] Goodman, M. G.; Chenoweth, D. E.; Weigle, W. O. (1982): Induction of interleukin 1 secretion and enhancement of humoral immunity by binding of human C5a to macrophage surface C5a receptors. *J. Exp. Med.* 1156, S. 912-917.
- [77] Okusawa, S.; Dinarello, C. A.; Yancey, K. B.; Endres, S.; Lawley, T. J.; Frank, M. M.; Burke, J. F.; Gelfand, J. A. (1987): C5a induction of human interleukin 1. Synergistic effect with endotoxin or interferon-gamma. *J. Immunol.* 139, S. 2635-2640.
- [78] Scholz, W.; McClurg, M. R.; Cardenas, G. J.; Smith, M.; Noonan, D. J.; Hugli, T. E.; Morgan, E. L. (1990): C5a-mediated release of interleukin 6 by human monocytes. *Clin. Immunol. Immunopathol.* 57, S. 297-307.
- [79] Morgan, E. L. (1986): Modulation of the immune response by anaphylatoxins. *Complement* 3 (3), S. 128-136.
- [80] Haeflner-Cavaillon, N.; Cavaillon, J. M.; Laude, M.; Kazatchkine, M. D. (1987): C3a (C3adesArg) induces production and release of interleukin 1 by cultured human monocytes. *J. Immunol.* 139, S. 794-799.
- [81] Takabayashi, T.; Vannier, E.; Clark, B. D.; Margolis, N. H.; Dinarello, C. A.; Burke, J. F.; Gelfand, J. A. (1996): A new biologic role for C3a and C3adesArg: regulation of TNF- α and IL-1 β synthesis. *J. Immunol.* 156, S. 3455-3460.
- [82] Cianflone, K.; Roncari, D. A. K.; Maslowska, M.; Baldo, A.; Forden, J.; Sniderman, A. D. (1994): Adipsin/Acylation stimulating protein system in human adipocytes: Regulation of triacylglycerol synthesis. *Biochemistry* 33, S. 9489-9495.
- [83] Metzner, B.; Elsner, J.; Dobos, G.; Kownatzki, E.; Parlow, F.; Schraufstatter, I.; Norgauer, J. (1994): $[Ca^{2+}]_i$ -transients and actin polymerization in human neutrophils under stimulation with GRO α and complement fragment C5a. *Agents Actions* 42 (3/4), S. 101-106.
- [84] Islam, L. N.; Wilkinson, P. C. (1988): Chemotactic factor-induced polarization, receptor redistribution, and locomotion of human blood monocytes. *Immunology* 64, S. 501-507.
- [85] Norgauer, J.; Dobos, G.; Kownatzki, E.; Dahinden, C.; Burger, R.; Kupper, R.; Gierschik, P. (1993): Complement fragment C3a stimulates Ca^{2+} influx in neutrophils via a pertussis-toxin-sensitive G protein. *Eur. J. Biochem.* 217, S. 289-294.
- [86] Walport, M. (1995): Komplement. In: Eds.: Riott, I. M.; Brostoff, J.; Male, D. K. (dt. Übersetzung: Harabacz, I.): *Kurzes Lehrbuch der Immunologie*. 3. Aufl. Stuttgart, New York: Thieme-Verlag S. 158-173.
- [87] Hammerschmidt, D. E.; Weaver, L. J.; Hudson, L. D.; Craddock, P. R.; Jacob, H. S. (1980): Association of complement activation and elevated plasma-C5a with adult respiratory distress syndrome. Pathophysiological relevance and possible prognostic value. *Lancet* 1, S. 947-949.
- [88] Hack, C. E.; Nuijens, J. H.; Felt-Bersma, R. J. F.; Schreuder, W. O.; Eerenberg-Belmer, A. J. M.; Paardekooper, J.; Bronsveld, W.; Thijs, L. G. (1989): Elevated plasma levels of the anaphylatoxins C3a and C4a are associated with a fatal outcome in sepsis. *Am. J. Med.* 86, S. 20-26.
- [89] Moxley, G.; Ruddy, S. (1985): Elevated C3 anaphylatoxin levels in synovial fluids from patients with rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum.* 28, S. 1089-1095.
- [90] Fligiel, S. E. G.; Johnson, K. J.; Ward, P. A. (1988): The role of complement in immune complex induced tissue injury. In: Rother, K.; Till, G. O.: *The complement System*. Heidelberg: Springer-Verlag S. 487-504.
- [91] Christophers, E.; Henseler, T. (1989): Patient subgroups and the inflammatory pattern in psoriasis. *Acta Derm. Venereol. Suppl.* Stockh. 151, S. 88-92.

- [92] Takematsu, H.; Ohkohchi, K.; Tagami, H. (1986): Demonstration of anaphylatoxin C3a, C4a and C5a in the scales of psoriasis and inflammatory pustular dermatoses. *Br. J. Dermatol.* 114, S. 1-6.
- [93] Morgan, B. P. (1990): *Complement: clinical aspects and relevance to disease*. Ed. 1. London: Academic Press S. 1-215.
- [94] Stove, S.; Welte, T.; Wagner, T. O.; Kola, A.; Klos, A.; Bautsch, W.; Kohl, J. (1996): Circulation complement proteins in patients with sepsis or systemic inflammatory response syndrome. *Clin. Diagn. Lab. Immunol.* 3(2), S. 175-183.
- [95] Maroko, P. R.; Carpenter, C. B.; Chiariello, M.; Fishbein, M. C.; Radvany, P.; Knostman, J. D.; Hale, S. L. (1978): Reduction by cobra venom factor of myocardial necrosis after coronary artery occlusion. *J. Clin. Invest.* 61 (3), S. 661-670.
- [96] Weisman, H. F.; Bartow, T.; Leppo, M. K.; Marsh, H. C. Jr; Carson, G. R.; Concino, M. F.; Boyle, M. P.; Roux, K. H.; Weisfeldt, M. L.; Fearon, D. T. (1990): Soluble human complement receptor type 1: in vivo inhibitor of complement suppressing post-ischemic myocardial inflammation and necrosis. *Science* 249 (4965), S. 146-151.
- [97] Howard, R. J.; Crain, C.; Frazini, D. A.; Hood, C. I.; Hugli, T. E. (1988): Effects of cardiopulmonary bypass on pulmonary leukostasis and complement activation. *Arch. Surg.* 123, S. 1496-1501.
- [98] Humbles, A. A.; Lu, B.; Nilsson, C. A.; Lilly, C.; Israel, E.; Fujiwarw, Y.; Gerard, N. P.; Gerard, C. (2000): A role for the C3a anaphylatoxin receptor in the effector phase of asthma. *Nature* 406, S. 998-1001.
- [99] Teran, L. M.; Campos, M. G.; Begishvilli, B. T.; Schröder, J.-M.; Djukanovic, R.; Shute, J. K.; Church, M. K.; Holgate, S. T.; Davies, D. E. (1997): Identifikation of neutrophil chemotactic factors in bronchoalveolar lavage fluid of asthmatic patients. *Clin. Exp. Allergy* 27, S. 396-405.
- [100] Karp, C. L.; Grupe, A.; Schadt, E.; Ewart, S. L.; Keane-Moore, M.; Cuomo, P. J.; Köhl, J.; Wahl, L.; Kuperman, D.; Germer, S.; Aud, D.; Peltz, G.; Wills-Karp, M. (2000): Identification of complement factor 5 as a susceptibility locus for experimental allergic asthma. *Nature Immunol.* 1 (3), S. 221-226.
- [101] Höpken, U. E.; Lu, B.; Gerard, N. P.; Gerard, C. (1996): The C5a chemoattractant receptor mediates mucosal defence to infection. *Nature* 383, S. 86-89.
- [102] Wexler, D. E.; Chenoweth, D. E.; Cleary, P. P. (1985): Mechanism of action of the group A streptococcal C5a inactivator. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 82, S. 8144-8148.
- [103] Bohnsack, J. F.; Mollison, K. W.; Buko, A. M.; Ashworth, J. C.; Hill, H. R. (1991): Group B streptococci inactivate complement component C5a by enzymic cleavage at the C-terminus. *Biochemical Journal* 273, S. 635-640.
- [104] Reed, S. L.; Ember, J. A.; Herdman, D. S.; DiScipio, R. G.; Hugli, T. E.; Gigli, I. (1995): The extracellular neutral cysteine proteinase of *Entamoeba histolytica* degrades anaphylatoxins C3a and C5a. *J. Immunol.* 155 (1), S. 266-274.
- [105] Henderson, R.; Baldwin, J. M.; Ceska, T. A.; Zemlin, F.; Beckmann, E.; Downing, K. H. (1990): Model for the structure of bacteriorhodopsin based on high-resolution electron cryo-microscopy. *J. Mol. Biol.* 213, S. 899-929.
- [106] Schertler, G. F. X.; Villa, C.; Henderson, R. (1993): Projection structure of rhodopsin. *Nature* 362, S. 770-772.
- [107] Boulay, F.; Tardif, M.; Brouchon, L.; Vignais, P. (1990): Synthesis and use of a novel N-formyl peptide derivative to isolate a human N-formyl peptide receptor cDNA. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 168, S. 1103-1109.
- [108] Boulay, F.; Mery, L.; Tardif, M.; Brouchon, L.; Vignais, P. (1991): Expression cloning of a receptor for C5a anaphylatoxin on differentiated HL-60 cells. *Biochemistry* 30, S. 2993-2999.
- [109] Dohlman, H. G.; Thorner, J.; Caron, M. G.; Lefkowitz, R. J. (1991): Model systems for the study of seven-transmembrane-segment receptors. *Annu. Rev. Biochem.* 60, S. 653-688.

- [110] Gerard, C.; Gerard, N. P. (1994): C5a anaphylatoxin and its seven transmembrane-segment receptor. *Annu. Rev. Immunol.* 12, S. 775-808.
- [111] Chenoweth, D. E.; Hugli, T. E. (1978): Demonstration of specific C5a receptor on intact human polymorphonuclear leukocytes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 75, S. 3943-3947.
- [112] Gerard, N. P.; Gerard, C. (1991): The chemotactic receptor for human C5a anaphylatoxin. *Nature* 349, S.614-617.
- [113] Werfel, T.; Oppermann, M.; Schulze, M.; Krieger, G.; Weber, M.; Götze, O. (1992): Binding of fluorescein-labeled anaphylatoxin C5a to human peripheral blood, spleen, and bone marrow leukocytes. *Blood* 79 (1), S.152-160.
- [114] Kurimoto, Y.; de Weck, A. L.; Dahinden, C. A. (1989): Interleukin 3-dependent mediator release in basophils triggered by C5a. *J. Exp. Med.* 170, S. 467-479.
- [115] Gerard, N. P.; Hodges, M. K.; Drazen, J. M.; Weller, P. F.; Gerard, C. (1989): Characterization of a receptor for C5a anaphylatoxin on human eosinophils. *J. Biol. Chem.* 264, S. 1760-1766.
- [116] Chenoweth, D. E.; Goodmann, M. G. (1983): The C5a receptor of neutrophils and macrophages. *Agents Actions Suppl.* 12, S. 252-273.
- [117] Elsner, J.; Oppermann, M.; Kapp, A. (1996): Detection of C5a receptors on human eosinophils and inhibition of eosinophil effector functions by anti-C5a receptor (CD88) antibodies. *Eur. J. Immunol.* 26, S. 1560-1564.
- [118] Werfel, T.; Oppermann, M.; Begemann, G.; Gotze, O.; Zwirner, J. (1997): C5a receptors are detectable on mast cells in normal human skin and in psoriatic plaques but not in weal and flare reactions or in urticaria pigmentosa by immunohistochemistry. *Arch. Dermatol. Res.* 289 (2), S. 83-86.
- [119] Kretzschmar, T. (1992): Rezeptoren der Anaphylatoxine C3a und C5a. Funktionelle und molekulare biologische Untersuchungen an verschiedenen Zellarten. Dissertation.
- [120] Harris, P.; Ralph, P. (1985): Human leukemic models of myelomonocytic development: A review of the HL-60 and U937 cell lines. *J. Leukoc. Biol.* 37, S. 407-422.
- [121] Buchner, R. R.; Hugli, T. E.; Ember, J. A.; Morgan, E. L. (1995): Expression of functional receptors for human C5a anaphylatoxin (CD88) on the human hepatocellular carcinoma cell line HepG2. *J. Immunol.* 155, S. 308-315.
- [122] Haviland, D. L.; McCoy, R. L.; Whitehead, W. T.; Akama, H.; Molmenti, E. P.; Brown, A.; Haviland, J. C.; Parks, W. C.; Perlmutter, D. H.; Wetsel, R. A. (1995): Cellular expression of the C5a anaphylatoxin receptor (C5aR): Demonstration of C5aR on nonmyeloid cells of the liver and lung. *J. Immunol.* 154, S. 1861-1869.
- [123] Gasque, P.; Singhrao, S. K.; Neal, J. W.; Götze, O.; Morgan, B. P. (1997): Expression of the receptor for complement C5a (CD88) is up-regulated on reactive astrocytes, microglia, and endothelial cells in the inflamed human central nervous system. *Am. J. Pathol.* 150 (1), S. 31-41.
- [124] Lacy, M.; Jones, J.; Whittemore, S. R.; Haviland, D. L.; Wetsel, R. A.; Barnum, S. R. (1995): Expression of the receptors for the C5a anaphylatoxin, interleukin-8 and FMLP by human astrocytes and microglia. *J. Neuroimmunol.* 61, S. 71-78.
- [125] Wetsel, R. A. (1995): Expression of the complement C5a anaphylatoxin receptor (C5aR) on nonmyeloid cells. *Immunol. Lett.* 44, S. 183-187.
- [126] Zwirner, J.; Fayyazi, A.; Götze, O. (1999): Expression of the anaphylatoxin C5a receptor in nonmyeloid cells. *Mol. Immunol.* 36, S.877-884.
- [127] Fayyazi, A.; Scheel, O.; Werfel, T.; Schweyer, S.; Oppermann, M.; Götze, O.; Radzun, H. J.; Zwirner, J. (2000): The C5a receptor is expressed in normal renal proximal tubular but not in normal pulmonary or hepatic epithelial cells. *Immunology* 99, S. 38-45.

- [128] Farkas, I.; Baranyi, L.; Takahashi, M.; Fukada, A.; Liposits, Z.; Yamamoto, T.; Okada, H. (1998): A neuronal C5a receptor and an associated apoptotic signal transduction pathway. *J. Physiol.* 507.3, S. 679-687.
- [129] Natlaf, S.; Davoust, N.; Ames, R. S.; Barnum, S. R. (1999): Human T cells express the C5a receptor and are chemoattracted to C5a. *J. Immunol.* 162, S. 4018-4023.
- [130] Ottonello, L.; Corcione, A.; Tortolina, G.; Airoidi, I.; Albesiano, E.; Favre, A.; D'Agostino, R.; Malavasi, F.; Pistoia, V.; Dallegri, F. (1999): rC5a directs the in vitro migration of human memory and naive tonsillar B lymphocytes: implications for B cell trafficking in secondary lymphoid tissues. *J. Immunol.* 162, S. 6510-6517.
- [131] Kiener, H. P.; Baghestanian, M.; Dominkus, M.; Walchshofer, S.; Ghannadan, M.; Willheim, M.; Sillaber, C.; Graninger, W. B.; Smolen, J. S.; Valent, P. (1998): Expression of the C5a receptor (CD88) on synovial mast cells in patients with rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum.* 41 (2), S. 233-245.
- [132] Füreder, W.; Agis, H.; Willheim, M.; Bankl, H. C.; Maier, U.; Kishi, K.; Müller, M. R.; Czerwenka, K.; Radaszkiewicz, T.; Butterfield, J. H.; Klappacher, G. W.; Speer, W. R.; Oppermann, M.; Lechner, K.; Valent, P. (1995): Differential expression of complement receptors on human basophils and mast cells. *J. Immunol.* 155, S. 3152-3160.
- [133] Heller, T.; Hennecke, M.; Baumann, U.; Gessner, J. E.; Meyer zu Vilsendorf, A.; Baensch, M.; Boulay, F.; Kola, A.; Klos, A.; Bautsch, W.; Köhl, J. (1999): Selection of a C5a receptor antagonist from phage libraries attenuating the inflammatory response in immune complex disease and Ischemia/Reperfusion injury. *J. Immunol.* 163, S. 985-994.
- [134] Höpken, U. E.; Lu, B.; Gerard, N. P.; Gerard, C. (1997): Impaired inflammatory responses in the reverse Arthus Reaction through genetic deletion of the C5a receptor. *J. Exp. Med.* 185 (5), S. 749-756.
- [135] Chenoweth, D. E.; Erickson, B. W.; Hugli, T. E. (1979): Human C5a-related synthetic peptides as neutrophil chemotactic factors. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 86, S. 227-234.
- [136] Gerard, C.; Showell, H. J.; Hoepflich, P. D. Jr.; Hugli, T. E.; Stimler, N. P. (1985): Evidence for a role of the amino-terminal region in the biological activity of the classical anaphylatoxin, porcine C5a desArg-74. *J. Biol. Chem.* 260, S. 2613-2616.
- [137] Damerau, B.; Zimmermann, B.; Czorniak, K.; Wüstefeld, H.; Vogt, W. (1986): Role of the N-terminal regions of hog C3a, C5a and C5a-desArg in their biological activities. *Mol. Immunol.* 23, S. 433-440.
- [138] Mollison, K. W.; Mandecki, W.; Zuiderweg, E. R.; Fayer, L.; Fey, T. A.; Krause, R. A.; Conway, R. G.; Miller, L.; Edalji, R. P.; Shallcross, M. A.; et al. (1989): Identification of receptor-binding residues in the inflammatory complement protein C5a by site-directed mutagenesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 86, S. 292-296.
- [139] Bubeck, P.; Grötzinger, J.; Winkler, M.; Köhl, J.; Wollmer, A.; Klos, A.; Bautsch, W. (1994): Site-specific mutagenesis of residues in the human C5a anaphylatoxin which are involved in possible interaction with the C5a receptor. *Eur. J. Biochem.* 219, S. 897-904.
- [140] Mery, L.; Boulay, F. (1993): Evidence that the extracellular N-terminal domain of C5aR contains amino-acid residues crucial for C5a binding. *Eur. J. Haematol.* 51, S. 282-287.
- [141] DeMartino, J. A.; Van Riper, G.; Siciliano, S. J.; Molineaux, C. J.; Konteatis, Z. D.; Rosen, H.; Springer, M. S. (1994): The amino terminus of the human C5a receptor is required for high affinity C5a binding and for receptor activation by C5a but not C5a analogs. *J. Biol. Chem.* 269 (20), S. 14446-14450.
- [142] Monk, P. N.; Barker, M. D.; Partridge, L. J.; Pease, J. E. (1995): Mutation of glutamate 199 of the human C5a receptor defines a binding site for ligand distinct from the receptor N terminus. *J. Biol. Chem.* 270 (28), S. 16625-16629.
- [143] DeMartino, J. A.; Konteatis, Z. D.; Siciliano, S. J.; Van Riper, G.; Underwood, D. J.; Fischer, P. A.; Springer, M. S. (1995): Arginine 206 of the C5a receptor is critical for ligand recognition and receptor activation by C-terminal hexapeptide analogs. *J. Biol. Chem.* 270 (27), S. 15966-15969.

- [144] Raffetseder, U.; Röper, D.; Mery, L.; Gietz, C.; Klos, A.; Grötzinger, J.; Wollmer, A.; Boulay, F.; Köhl, J.; Bautsch, W. (1996): Site-directed mutagenesis of conserved charged residues in the helical region of human C5a receptor. *Eur. J. Biochem.* 235, S. 82-90.
- [145] Monk, P. N.; Pease, J. E.; Barker, M. D. (1994): C5a stimulus-secretion coupling in rat basophilic leukaemia (RBL-2H3) cells transfected with the human C5a receptor is mediated by pertussis and cholera toxin-sensitive G proteins. *Biochem. Mol. Biol. Int.* 32 (1), S. 13-20.
- [146] Rollins, T. E.; Siliciano, S.; Kobayashi, S.; Cianciarulo, D. N.; Bonilla-Agudo, V.; Collier, K.; Springer, M. S. (1991): Purification of the active C5a receptor from human polymorphonuclear leukocytes as a receptor-G_i complex. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 88, S. 971-975.
- [147] Amatruda, T. T.; Gerard, N. P.; Gerard, C.; Simon, M. I. (1993): Specific interactions of chemoattractant factor receptors with G-proteins. *J. Biol. Chem.* 268 (14), S. 10139-10144.
- [148] Offermans, S.; Schäfer, R.; Hoffmann, B.; Bombien, E.; Spicher, K.; Hinsch, K. D.; Schultz, G.; Rosenthal, W. (1990): Agonist-sensitive binding of a photoreactive GTP analog to a G-protein α -subunit in membranes of HL-60 cells. *FEBS Lett.* 260, S. 14-18.
- [149] Buhl, A. M.; Eisfelder, B. J.; Worthen, G. S.; Johnson, G. L.; Russell, M. (1993): Selective coupling of the human anaphylatoxin C5a receptor and α_{16} in human kidney 293 cells. *FEBS Lett.* 323, S. 132-134.
- [150] Kolakowski, L. F., Jr.; Lu, B.; Gerard, C.; Gerard, N. P. (1995): Probing the "message: address" sites for chemoattractant binding to the C5a receptor. Mutagenesis of hydrophilic and proline residues within the transmembrane segments. *J. Biol. Chem.* 270 (30), S. 18077-18082.
- [151] Van Epps, D. E.; Simpson, S.; Bender, J. G.; Chenoweth, D. E. (1990): Regulation of C5a and formyl peptide receptor expression on human polymorphonuclear leukocytes. *J. Immunol.* 144 (3), S. 1062-1068.
- [152] Giannini, E.; Boulay, F. (1995): Phosphorylation, dephosphorylation, and recycling of the C5a receptor in differentiated HL60 cells. *J. Immunol.* 154, S. 4055-4064.
- [153] Giannini, E.; Brouchon, L.; Boulay, F. (1995): Identification of the major phosphorylation sites in human C5a anaphylatoxin receptor in vivo. *J. Biol. Chem.* 270 (32), S. 19166-19172.
- [154] Naik, N.; Giannini, E.; Brouchon, L.; Boulay, F. (1997): Internalization and recycling of the C5a anaphylatoxin receptor: evidence that the agonist-mediated internalization is modulated by phosphorylation of the C-terminal domain. *J. Cell. Sci.* 110, S. 2381-2390.
- [155] Gerardy-Schahn, R.; Ambrosius, D.; Saunders, D.; Casaretto, M.; Mittler, C.; Karwarth, G.; Görgen, S.; Bitter-Suermann, D. (1989): Characterization of C3a receptor-proteins on guinea pig platelets and human polymorphonuclear leukocytes. *Eur. J. Immunol.* 19, S. 1095-1102.
- [156] Martin, U.; Bock, D.; Arseniev, L.; Tornetta, M. A.; Ames, R. S.; Bautsch, W.; Köhl, J.; Ganser, A.; Klos, A. (1997): The human C3a receptor is expressed on neutrophils and monocytes, but not on B or T lymphocytes. *J. Exp. Med.* 186 (2), S. 199-207.
- [157] Werfel, T.; Kirchhoff, K.; Wittmann, M.; Kapp, A.; Begemann, G.; Götze, O.; Zwirner, J. (1999): Human T lymphocytes express the C3a receptor. *Immunobiology* 200, S. 641-642.
- [158] Fischer, W. H.; Hugli, T. E. (1997): Regulation of B cell functions by C3a and C3a(desArg): suppression of TNF-alpha, IL-6, and the polyclonal immune response. *J. Immunol.* 159, S. 4279-4286.
- [159] Zwirner, J.; Götze, O.; Begemann, G.; Kapp, A.; Kirchhoff, K.; Werfel, T. (1999): Evaluation of C3a receptor expression on human leucocytes by the use of novel monoclonal antibodies. *Immunology* 97 (1), S.166-172.
- [160] Glovsky, M. M.; Hugli, T. E.; Ishizaka, T.; Lichtenstein, L. M.; Erickson, B. W. (1979): Anaphylatoxin-induced histamine release with human leukocytes: Studies of C3a leukocyte binding and histamine release. *J. Clin. Invest.* 64 (3), S. 804-811.

- [161] Hartman, C. T. Jr; Glovsky, M. M. (1981): Complement activation requirements for histamine release from human leukocytes: influence of purified C3a_{hu} and C5a_{hu} on histamine release. *Int. Arch. Allergy Appl. Immunol.* 66, S. 274-281.
- [162] Hartmann, K.; Henz, B. M.; Krüger-Krasagakes, S.; Köhl, J.; Burger, R.; Guhl, S.; Haase, I.; Lippert, U.; Zuberbier, T. (1997): C3a and C5a stimulate chemotaxis of human mast cells. *Blood* 89 (8), S. 2863-2870.
- [163] Legler, D. F.; Loetscher, M.; Jones, S. A.; Dahinden, C. A.; Arock, M.; Moser, B. (1996): Expression of high- and low-affinity receptors for C3a on the human mast cell line, HMC-1. *Eur. J. Immunol.* 26, S. 753-758.
- [164] Ames, R. S.; Li, Y.; Sarau, H. M.; Nuthulaganti, P.; Foley, J. J.; Ellis, C.; Zeng, Z.; Su, K.; Jurewicz, A. J.; Hertzberg, R. P.; Bergsma, D. J.; Kumar, C. (1996): Molecular cloning and characterization of human anaphylatoxin C3a receptor. *J. Biol. Chem.* 271 (34), S. 20231-20234.
- [165] Crass, T.; Raffetseder, U.; Martin, U.; Grove, M.; Klos, A.; Köhl, J.; Bautsch, W. (1996): Expression cloning of the human C3a anaphylatoxin receptor (C3aR) from differentiated U-937 cells. *Eur. J. Immunol.* 26 (8), S. 1944-1950.
- [166] Roglic, A.; Prossnitz, E. R.; Cavanagh, S. L.; Pan, Z.; Zou, A.; Ye, R. D. (1996): cDNA cloning of a novel G protein-coupled receptor with a large extracellular loop structure. *Biochim. Biophys. Acta* 1305, S. 39-43.
- [167] Gasque, P.; Singhrao, S. K.; Neal, J. W.; Morgan, B. P. (1997): The anaphylatoxin C3a receptor (C3aR) expressed by neurons and glial cells in vitro is found in normal and inflamed brain. *Exp. Clin. Immunogenet.* 14, S. 83.
- [168] Gasque, P.; Singhrao, S. K.; Neal, J. W.; Wang, P.; Sayah, S.; Fontaine, M.; Morgan, B. P. (1998): The receptor for complement anaphylatoxin C3a is expressed by myeloid cells and nonmyeloid cells in inflamed human central nervous system: analysis in multiple sclerosis and bacterial meningitis. *J. Immunol.* 160 (7), S. 3543-3554.
- [169] Nataf, S.; Stahel, P. F.; Davoust, N.; Barnum, S. R. (1999): Complement anaphylatoxin receptors on neurons: new tricks for old receptors? *Trends Neurosci.* 22 (9), S. 397-402.
- [170] Ischenko, A.; Sayah, S.; Patte, C.; Andreev, S.; Gasque, P.; Schouft, M.-T.; Vaudry, H.; Fontaine, M. (1998): Expression of a functional anaphylatoxin C3a receptor by astrocytes. *J. Neurochem.* 71, S. 2487-2496.
- [171] Sayah, S.; Ischenko, A. M.; Zhakhov, A.; Bonnard, A.-S.; Fontaine, M. (1999): Expression of Cytokines by human astrocytomas following stimulation by C3a and C5a anaphylatoxins: specific increase in interleukin-6 mRNA expression. *J. Neurochem.* 72, S. 2426-2436.
- [172] Tornetta, M. A.; Foley, J. J.; Sarau, H. M.; Ames, R. S. (1997): The mouse anaphylatoxin receptor: molecular cloning, genomic organization, and functional expression. *J. Immunol.* 158 (11), S. 5277-5282.
- [173] Hsu, M. H.; Ember, J. A.; Wang, M.; Prossnitz, E. R.; Hugli, T. E.; Ye, R. D. (1997): Cloning and functional characterization of the mouse C3a anaphylatoxin receptor gene. *Immunogenetics* 47 (1), S. 64-72.
- [174] Hollmann, T. J.; Haviland, D. L.; Kildsgaard, J.; Watts, K.; Wetsel, R. A. (1998): Cloning, expression, sequence determination, and chromosome localization of the mouse complement C3a anaphylatoxin receptor gene. *Mol. Immunol.* 35, S. 137-148.
- [175] Fukuoka, Y.; Ember, J. A.; Hugli, T. E. (1998): Cloning and characterization of rat C3a receptor: differential expression of rat C3a and C5a receptors by LPS stimulation. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 242, S. 663-668.
- [176] Fukuoka, Y.; Ember, J. A.; Hugli, T. E. (1998): Molecular cloning of two isoforms of the guinea pig C3a anaphylatoxin receptor: alternative splicing in the large extracellular loop. *J. Immunol.* 161, S. 2977-2984.

- [177] Burg, M.; Martin, U.; Bock, D.; Rheinheimer, C.; Köhl, J.; Bautsch, W.; Klos, A. (1996): Differential regulation of the C3a and C5a receptors (CD88) by IFN- γ and PMA in U937 cells and related myeloblastic cell lines. *J. Immunol.* 157, S. 5574-5581.
- [178] Crass, T. (1999): Die Anaphylatoxine C3a und C5a und ihre zellulären Rezeptoren: Molekulare Untersuchungen zur Ligand/Rezeptor-Interaktion. Dissertation.
- [179] Chao, T. H.; Ember, J. A.; Wang, M.; Bayon, Y.; Hugli, T. E.; Ye, R. D. (1999): Role of the second extracellular loop of human C3a receptor in agonist binding and receptor function. *J. Biol. Chem.* 274 (14), S. 9721-9728.
- [180] Hawlisch, H.; Frank, R.; Hennecke, M.; Baensch, M.; Sohns, B.; Arseniev, L.; Bautsch, W.; Kola, A.; Klos, A.; Köhl, J. (1998): Site directed C3a receptor antibodies from phage display libraries. *J. Immunol.* 160 (6), S. 2947-2958.
- [181] Crass, T.; Ames, R. S.; Sarau, H. M.; Tornetta, M. A.; Foley, J. J.; Köhl, J.; Klos, A.; Bautsch, W. (1999): Chimeric receptors of the human C3a receptor and C5a receptor (CD88). *J. Biol. Chem.* 274 (13), S. 8367-8370.
- [182] Sun, J.; Ember, J. A.; Chao, T. H.; Fukuoka, Y.; Ye, R. D.; Hugli, T. E. (1999): Identification of ligand effector binding sites in transmembrane regions of the human G protein-coupled C3a receptor. *Protein Sci.* 8 (11), S. 2304-2311.
- [183] Webster, R. O.; Hong, S. R.; Johnson, R. B.; Henson, M. H. (1980): Biological effects of the human complement fragments C5a and C5adesArg on neutrophil function. *Internat. J. of Immunopharmacol.* 2, S. 201-219.
- [184] Dohlman, H. G.; Caron, M. G.; Lefkowitz, R. J. (1987): A family of receptors coupled to guanine nucleotide regulatory proteins. *Biochemistry* 26, S. 2657-2664.
- [185] Gilman, A. G. (1987): G-proteins: Transducers of receptor-generated signals; *Ann. Rev. Biochem.* 56, S. 615-649.
- [186] Bouvier, M.; Hausdorff, W. P.; De Blasi, A.; O'Dowd, B. F.; Kobilka, B. K.; Caron, M. G.; Lefkowitz, R. J. (1988): Removal of phosphorylation sites from the β_2 -adrenergic receptor delays onset of agonist-promoted desensitization. *Nature* 333, S. 370-373.
- [187] Hausdorff, W. P.; Bouvier, M.; O'Dowd, B. F.; Irons, G. P.; Caron, M. G.; Lefkowitz, R. J. (1989): Phosphorylation sites on two domains of the β_2 -adrenergic receptor are involved in distinct pathways of receptor desensitization. *J. Biol. Chem.* 264, S. 12657-12665.
- [188] Lohse, M. J.; Benovic, J. L.; Caron, M. G.; Lefkowitz, R. J. (1990): Multiple pathways of rapid β_2 -adrenergic receptor desensitization. *J. Biol. Chem.* 265 (6), S. 3202-3209.
- [189] Kaziro, Y.; Itoh, H.; Kozasa, T.; Nakafuku, M.; Satoh, T. (1991): *Annu. Rev. Biochem.* 60, S. 349-400.
- [190] Dhanasekaran, N.; Tsim, S.-T.; Dermott, J. M.; Onesime, D. (1998): Regulation of cell proliferation by G proteins. *Oncogene* 17, S. 1383-1394.
- [191] Birnbaumer, L.; Abramowitz, J.; Brown, A. M. (1990): Receptor-effector coupling by G proteins. *Biochim. Biophys. Acta* 1031, S. 163-224.
- [192] Snyderman, R.; Uhing, R. J. (1988): Phagocytic cells: Stimulus-response coupling mechanisms. In: Eds.: Gallin, J. I.; Goldstein, I. M.; Snyderman, R.: *Inflammation: Basic principles and clinical correlates.* New York: Raven-Press, S. 309-323.
- [193] Metz, G. (1996): Signalübertragung: G-Proteine: Funktionen und zelluläre Mechanismen. *Bioforum* 12, S. 558-564.
- [194] Koolman, J.; Röhm, K.-H. (1998): Taschenatlas der Biochemie. 2. überarb. u. erw. Aufl. Stuttgart, New York: Thieme Verlag.
- [195] Gudermann, T.; Kalkbrenner, F.; Schultz, G. (1996): Diversity and selectivity of receptor-G protein interaction. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 36, S. 429-459.

- [196] Gudermann, T.; Nurnberg, B.; Schultz, G. (1995): Receptors and G proteins as primary components of transmembrane signal transduction. Part 1. G-protein-coupled receptors: structure and function. *J. Mol. Med.* 73 (2), S. 51-63.
- [197] Offermanns, S.; Schultz, G. (1994): Complex information processing by the transmembrane signaling system involving G Proteins. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol.* 350, S. 329-338.
- [198] Camps, M.; Hou, C.; Sidiropoulos, D.; Stock, J. B.; Jacobs, K. H.; Gierschik, P. (1992): Stimulation of phospholipase C by guanine-nucleotide-binding protein $\beta\gamma$ subunits. *Eur. J. Biochem.* 206, S. 821-831.
- [199] Benovic, J. L.; Regan, J. W.; Matsui, H.; Mayor, F. Jr.; Cotecchia, S.; Leeb-Lundberg, L. M.; Caron, M. G.; Lefkowitz, R. J. (1987): Agonist-dependent phosphorylation of the α_2 -adrenergic receptor by the β -adrenergic receptor kinase. *J. Biol. Chem.* 262, S. 17251-17253.
- [200] Richardson, R. M.; Kim, C.; Benovic, J. L.; Hosey, M. M. (1993): Phosphorylation and desensitization of human m2 muscarinic cholinergic receptors by two isoforms of the β -adrenergic receptor kinase. *J. Biol. Chem.* 268 (18), S. 13650-13656.
- [201] Roth, N. S.; Campbell, P. T.; Caron, M. G.; Lefkowitz, R. J.; Lohse, M. J. (1991): Comparative rates of desensitization of β -adrenergic receptors by the β -adrenergic receptor kinase and the cyclic AMP-dependent protein kinase. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 88 (14), S. 6201-6204.
- [202] Palczewski, K.; Benovic, J. L. (1991): G-protein-coupled receptor kinases. *Trends Biochem. Sci.* 16 (10), S. 387-391.
- [203] Fredericks, Z. L.; Pitcher, J. A.; Lefkowitz, R. J. (1996): Identification of the G protein-coupled receptor kinase phosphorylation sites in the human β_2 -adrenergic receptor. *J. Biol. Chem.* 271 (23), S. 13796-13803.
- [204] Bouvier, M.; Collins, S.; O'Dowd, B. F.; Campell, P. T.; De Blasi, A.; Kobilka, B. K.; MacGregor, C.; Irons, G. P.; Caron, M. G.; Lefkowitz, R. J. (1989): Two distinct pathways for cAMP-mediated down-regulation of the β_2 -adrenergic receptor. Phosphorylation of the receptor and regulation of its mRNA level. *J. Biol. Chem.* 264, S. 16786-16792.
- [205] Clark, R. B.; Friedman, J.; Dixon, R. A.; Strader, C. D. (1989): Identification of a specific site required for rapid heterologous desensitization of the β -adrenergic receptor by cAMP-dependent protein kinase. *Mol. Pharmacol.* 36, S. 343-348.
- [206] Lohse, M. J.; Benovic, J. L.; Codina, J.; Caron, M. G.; Lefkowitz, R. J. (1990): β -Arrestin: a protein that regulates β -adrenergic receptor function. *Science* 248, S. 1547-1553.
- [207] Lohse, M. J.; Andexinger, S.; Pitcher, J.; Trukawinski, S.; Codina, J.; Faure, J.-P.; Caron, M. G.; Lefkowitz, R. J. (1992): Receptor-specific desensitization with purified proteins. Kinase dependence and receptor specificity of β -arrestin and arrestin in the β_2 -adrenergic receptor and rhodopsin systems. *J. Biol. Chem.* 267 (12), S. 8558-8564.
- [208] Von Zastrow, M.; Kobilka, B. K. (1992): Ligand-regulated internalization and recycling of human β_2 -adrenergic receptors between the plasma membrane and endosomes containing transferrin receptors. *J. Biol. Chem.* 267, S. 3530-3538.
- [209] Goodman, O. B. Jr.; Krupnick, J. G.; Santini, F.; Gurevich, V. V.; Penn, R. B.; Gagnon, A. W.; Keen, J. H.; Benovic, J. L. (1996): β -Arrestin acts as a clathrin adaptor in endocytosis of the β_2 -adrenergic receptor. *Nature* 383, S. 447-450.
- [210] Barak, L. S.; Ferguson, S. S. G.; Zhang, J.; Caron, M. G. (1997): A β -arrestin/green fluorescent protein biosensor for detecting G protein-coupled receptor activation. *J. Biol. Chem.* 272 (44), S. 27497-27500.
- [211] Ruiz-Gómez A.; Mayor, F. (1997): β -adrenergic receptor kinase (GRK2) colocalizes with β -adrenergic receptors during agonist-induced receptor internalization. *J. Biol. Chem.* 272 (15), S. 9601-9604.
- [212] Krueger, K. M.; Daaka, Y.; Pitcher, J. A.; Lefkowitz, R. J. (1997): The role of sequestration in G protein-coupled receptor resensitization. Regulation of β_2 -adrenergic receptor dephosphorylation by vesicular acidification. *J. Biol. Chem.* 272 (1), S. 5-8.

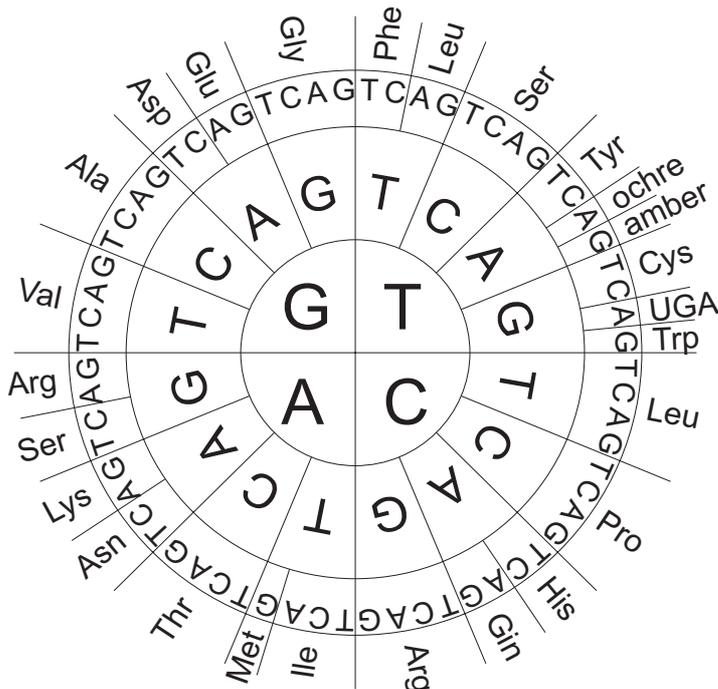
- [213] Benya, R. V.; Kusui, T.; Shikado, F.; Battey, J. F.; Jensen, R. T. (1994): Desensitization of neuromedin B receptors (NMB-R) on native and NMB-R-transfected cells involves down-regulation and internalization. *J. Biol. Chem.* 269 (16), S. 11721-11725.
- [214] Mahan, L. C.; Koachman, A. M.; Insel, P. A. (1985): Genetic analysis of β -adrenergic receptor internalization and down-regulation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 82 (1), S. 129-133.
- [215] Pippig, S.; Andexinger, S.; Lohse, M. J. (1995): Sequestration and recycling of β_2 -adrenergic receptors permit receptor resensitization. *Mol. Pharmacol.* 47 (4), S. 666-676.
- [216] Danner, S.; Frank, M.; Lohse, M. J. (1998): Agonist regulation of human β_2 -adrenergic receptor mRNA stability occurs via a specific AU-rich element. *J. Biol. Chem.* 273 (6), S. 3223-3229.
- [217] Liggett, S. B.; Freedman, N. J.; Schwinn, D. A.; Lefkowitz, R. J. (1993): Structural basis for receptor subtype-specific regulation revealed by a chimeric β_3/β_2 -adrenergic receptor. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90 (8), S. 3665-3669.
- [218] Ghinea, N.; Hai M. T. V.; Groyer-Picard, M.-T.; Houllier, A.; Schoevaert, D.; Milgrom, E. (1992): Pathways of internalization of the hCG/LH receptor: immunoelectron microscopic studies in Leydig cells and transfected L-cells. *J. Cell Biol.* 118 (6), S. 1347-1358.
- [219] Hein, L.; Ishii, K.; Coughlin, S. R.; Kobilka, B. K. (1994): Intracellular targeting and trafficking of thrombin receptors. A novel mechanism for resensitization of a G protein-coupled receptor. *J. Biol. Chem.* 269 (44), S. 27729-27726.
- [220] Hoxie, J. A.; Ahuja, M.; Belmonte, E.; Pizarro, S.; Parton, R.; Brass, L. F. (1993): Internalization and recycling of activated thrombin receptors. *J. Biol. Chem.* 268 (18), S. 13756-13763.
- [221] Bommakanti, R. K.; Klotz, K.-N.; Dratz, E. A.; Jesaitis, A. J. (1993): A carboxyl-terminal tail peptide of neutrophil chemotactic receptor disrupts its physical complex with G protein. *J. Leukoc. Biol.* 54 (6), S. 572-577.
- [222] Prossnitz, E. R.; Kim, C. M.; Benovic, J. L.; Ye, R. D. (1995): Phosphorylation of the N-formyl peptide receptor carboxyl terminus by the G protein-coupled receptor kinase, GRK2. *J. Biol. Chem.* 270 (3), S. 1130-1137.
- [223] Benya, R. V.; Fathi, Z.; Battey, J. F.; Jensen, R. T. (1993): Serines and threonines in the gastrin-releasing peptide receptor carboxyl terminus mediate internalization. *J. Biol. Chem.* 268 (27), S. 20285-20290.
- [224] Nussenzweig, D. R.; Heinfliink, M.; Gershengorn, M. C. (1993): Agonist-stimulated internalization of the thyrotropin-releasing hormone receptor is dependent on two domains in the receptor carboxyl terminus. *J. Biol. Chem.* 268 (4), S. 2389-2392.
- [225] Negishi, M.; Sugimoto, Y.; Irie, A.; Narumiya, S.; Ichikawa, A. (1993): Two isoforms of prostaglandin E receptor EP₃ subtype. Difference COOH-terminal domains determine sensitivity to agonist-induced desensitization. *J. Biol. Chem.* 268 (13), S. 9517-9521.
- [226] Chabry, J.; Botto, J.-M.; Nouel, D.; Beaudet, A.; Vincent, J.-P.; Mazalla, J. (1995): Thr-422 and Tyr-424 residues in the carboxyl terminus are critical for the internalization of the rat neurotensin receptor. *J. Biol. Chem.* 270 (6), S. 2439-2442.
- [227] Parker, E. M.; Swigart, P.; Nunnally, M. H.; Perkins, J. P.; Ross, E. M. (1995): Carboxyl-terminal domains in the avian β_1 -adrenergic receptor that regulate agonist-promoted endocytosis. *J. Biol. Chem.* 270 (12), S. 6482-6487.
- [228] Thomas, W. G.; Baker, K. M.; Motel, T. J.; Thekkumkara, T. J. (1995): Angiotensin II receptor endocytosis involves two distinct regions of the cytoplasmic tail. A role for residues on the hydrophobic face of a putative amphipathic helix. *J. Biol. Chem.* 270, S. 22153-22159.
- [229] Thomas, W. G.; Thekkumkara, T. J.; Motel, T. J.; Baker, K. M. (1995): Stable expression of a truncated AT_{1A} receptor in CHO-K1 cells. The carboxyl-terminal region directs agonist-induced internalization but not receptor signaling or desensitization. *J. Biol. Chem.* 270 (1), S. 207-213.

- [230] Tseng, M. J.; Detjen, K.; Struk, V.; Logsdon, C. D. (1995): Carboxyl-terminal domains determine internalization and recycling characteristics of bombesin receptor chimeras. *J. Biol. Chem.* 270 (32), S. 18858-18864.
- [231] Prossnitz, E. R. (1997): Desensitization of N-formylpeptide receptor-mediated activation is dependent upon receptor phosphorylation. *J. Biol. Chem.* 272 (24), S. 15213-15219.
- [232] Hsu, M. H.; Chiang, S. C.; Ye, R. D.; Prossnitz, E. R. (1997): Phosphorylation of the N-formyl peptide receptor is required for receptor internalization but not chemotaxis. *J. Biol. Chem.* 272 (47), S. 29426-29429.
- [233] Becker, E. L.; Kermode, J. C.; Naccache, P. H.; Yassin, R.; Marsh, M. L.; Munoz, J. J.; Sha'afi, R. I. (1985): The inhibition of neutrophil granule enzyme secretion and chemotaxis by pertussis toxin. *J. Cell. Biol.* 100, S. 1641-1646.
- [234] Wilde, M. W.; Carlson, K. E.; Manning, D. R.; Zigmond, S. H. (1989): Chemoattractant-stimulated GTPase activity is decreased on membranes from polymorphonuclear leukocytes incubated in chemoattractant. *J. Biol. Chem.* 264, S. 190-196.
- [235] Van Epps, D. E.; Simpson, S. J.; Chenoweth, D. E. (1992): C5a and formyl peptide receptor regulation on human monocytes. *J. Leukoc. Biol.* 51, S. 393-399.
- [236] Bock, D.; Martin, U.; Gärtner, S.; Rheinheimer, C.; Raffetseder, U.; Arseniev, L.; Barker, M. D.; Monk, P. N.; Bautsch, W.; Köhl, J.; Klos, A. (1997): The C terminus of the human C5a receptor (CD88) is required for normal ligand-dependent receptor internalization. *Eur. J. Immunol.* 27, S. 1522-1529.
- [237] Christophe, T.; Rabet, M.-J.; Tardif, M.; Milcent, M.-D.; Boulay, F. (2000): Human Complement 5a (C5a) Anaphylatoxin Receptor (CD88) Phosphorylation Sites and Their Specific Role in Receptor Phosphorylation and Attenuation of G Protein-mediated Responses. *J. Biol. Chem.* 275 (3), S. 1656-1664.
- [238] Langkabel, P.; Zwirner, J.; Oppermann, M. (1999): Ligand-induced phosphorylation of anaphylatoxin receptors C3aR and C5aR is mediated by G protein-coupled receptor kinases. *Eur. J. Immunol.* 29, S. 3035-3046.
- [239] Settmacher, B.; Bock, D.; Saad, H.; Gärtner, S.; Rheinheimer, C.; Köhl, J.; Bautsch, W.; Klos, A. (1999): Modulation of C3a activity: internalization of the human C3a-receptor and its inhibition by C5a. *J. Immunol.* 162, S. 7409-7416.
- [240] Shapiro, H. M. (1995): *Practical Flow Cytometry*. 3rd ed. New York: Wiley-Liss, Inc.
- [241] Mizushima, S.; Nagata, S. (1990): pEF-BOS, a powerful mammalian expression vector. *Nucleic Acids Res.* 18 (17), S. 5322.
- [242] Graham, F. L.; Van der Eb, A. J. (1973): A new technique for the assay of infectivity of human adenovirus-5-DNA. *Virology* 52; S. 456-467
- [243] Graham, F. L.; Smiley, J.; Russel, W. C.; Naim, R. (1977): Characteristics of a human cell line transformed by DNA from human adenovirus type 5. *J. Gen. Virol.* 36 (1), S. 59-74
- [244] Butterfield, J. H.; Weiler, D.; Dewald, G.; Gleich, G. J. (1988): Establishment of an immature mast cell line from a patient with mast cell leukemia. *Leuk. Res.* 12 (4), S. 345-355.
- [245] Saiki, R. K.; Gelfand, D. H.; Stoffels, S.; Scharf, S. J.; Higuchi, R.; Horn, G. T.; Mullis, K. B.; Erlich, H. A. (1988): Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science* 239, S.487-491.
- [246] Vogelstein, B.; Gillespie, D. (1979): Preparative and analytical purification of DNA from Agarose. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 76, S.615-615.
- [247] Wallace, D. M. (1987): Large- and small-scale phenol extractions. *Meth. Enzym.* 152, S. 33-48.
- [248] Simsek, M.; Ziegenmeyer, J.; Heckman, J.; Rajbhandary, U. L. (1973): Absence of the sequence G-T-Psi-C-G(A)- in several eukaryotic cytoplasmic initiator transfer RNAs. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 70 (6), S. 1041-1045.

- [249] Brady, G.; Timmis, K. N. (1984): Ligation of cohesive ended and flush ended DNA fragments. In: Eds.: Pühler, A.; Timmis, K. N.: *Adv. Mol. Gen.* New York : Springer-Verlag, S. 154.
- [250] Calvin, N. M.; Hanawalt, P. C. (1988): High-efficiency transformation of bacterial cells by electroporation. *J. Bacteriol.* 170, S. 2796-2801.
- [251] Birnboim, H. C.; Doly, J. (1979): A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucl. Acids Res.* 7, S. 1513-1513.
- [252] Berger, S. L. (1987): Quantifying ³²P-labeled and unlabeled nucleic acids. *Meth. Enzym.* 152, S. 49-52.
- [253] Chomczynski, P.; Sacchi, N. (1987): Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal. Biochem.* 162, S. 156-159.
- [254] Thomas, P. (1980): Hybridization of denatured RNA and small DNA fragments transferred to nitrocellulose. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 77, S. 5201-5205.
- [255] Gerard, N. P. and Gerard. C. (1990): Construction and expression of a novel recombinant anaphylatoxin, C5a-N19, as a probe for the human C5a receptor. *Biochemistry* 29 (39), S. 9274-9281.
- [256] Grynkiewicz, G.; Poenie, M.; Tsien, R. Y. (1985): A new generation of Ca²⁺ indicators with greatly improved fluorescence properties. *J. Biol. Chem.* 270 (2), S. 720-731.
- [257] Kim, D. W.; Uetsuki, T.; Kaziro, Y.; Yamaguchi, N.; Sugano, S. (1990): Use of the human elongation factor 1 α promoter as a versatile and effective expression system. *Gene* 91, S.217-233.
- [258] Gabilondo, A. M.; Hegler, J.; Krasel, C.; Boivin-Jahns, V.; Hein, L.; Lohse, M. J. (1997): A dileucine motif in the C terminus of the β_2 -adrenergic receptor is involved in receptor internalization. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 94 (23), S. 12285-12290.
- [259] Ashworth, R.; Yu, R.; Nelson, E. J.; Dermer, S.; Gershengorn, M. C.; Hinkle, P. M. (1995): Visualization of the thyrotropin-releasing hormone receptor and its ligand during endocytosis and recycling. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 92, S. 512-516.
- [260] Tarasova, N. I.; Stauber, R. H.; Choi, J. K.; Hudson, E. A.; Czerwinski, G.; Miller, J. L.; Pavlakis, G. N.; Michejda, C. J.; Wank, S. A. (1997): Visualization of G protein-coupled receptor trafficking with the aid of the green fluorescent protein. *J. Biol. Chem.* 272 (23), S. 14317-14824.
- [261] Ames, R. S.; Lee, D.; Foley, J. J.; Jurewicz, A. J.; Tornetta, M. A.; Bautsch, W.; Settmacher, B.; Klos, A.; Erhard, K. F.; Sulpizio, A. C.; Hieble, J. P.; McCafferty, G.; Ward, K. W.; Adams, J. L.; Underwood, D. C.; Badger, A. M.; Sarau, H. M. (2000): Identification of a selective non-peptide antagonist of the anaphylatoxin C3a receptor. (submitted)
- [262] Nonno, R.; Pannacci, M.; Lucini, V.; Angeloni, D.; Fraschini, F.; Stankov, B. M. (1999): Ligand efficacy and potency at recombinant human MT2 melatonin receptors: evidence for agonist activity of some mt1-antagonists. *Br. J. Pharmacol.* 127 (5), S. 1288-1294.
- [263] Teh, M. T.; Sudgen, D. (1999): The putative melatonin receptor antagonist GR128107 is a partial agonist on *Xenopus leavis* melanophores. *Br. J. Pharmacol.* 126 (5), S. 1237-45.
- [264] Wood, M.; Chaubey, M.; Atkinson, P.; Thomas, D. R. (2000): Antagonist activity of meta-chlorophenylpiperazine and partial agonist activity of 8-OH-DPAT at the 5-HT(7) receptor. *Eur. J. Pharmacol.* 396 (1), S. 1-8.
- [265] Lameh, J.; Philip, M.; Sharma, Y. K.; Moro, O.; Ramachandran, J.; Sadee, W. (1992): Hm1 muscarinic cholinergic receptor internalization requires a domain in the third cytoplasmic loop. *J. Biol. Chem.* 267 (19), S. 13406-13412.

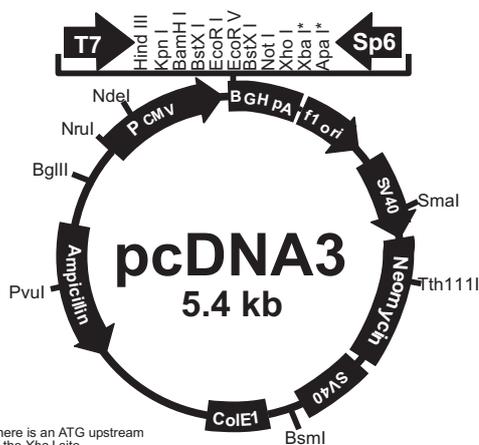
7 Anhang

Genetischer Code und Aminosäurecode (Kap. 1):

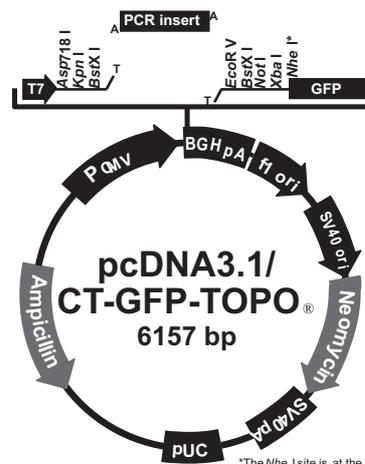


Aminosäure	Drei-buchstaben-code	Ein-buchstaben-code
Alanin	Ala	A
Arginin	Arg	R
Asparagin	Asn	N
Aspartat	Asp	D
Cystein	Cys	C
Glutamat	Glu	E
Glycin	Gly	G
Histidin	His	H
Isoleucin	Ile	I
Leucin	Leu	L
Methionin	Met	M
Phenylalanin	Phe	F
Prolin	Pro	P
Serin	Ser	S
Threonin	Thr	T
Tryptophan	Trp	W
Tyrosin	Tyr	Y
Valin	Val	Z

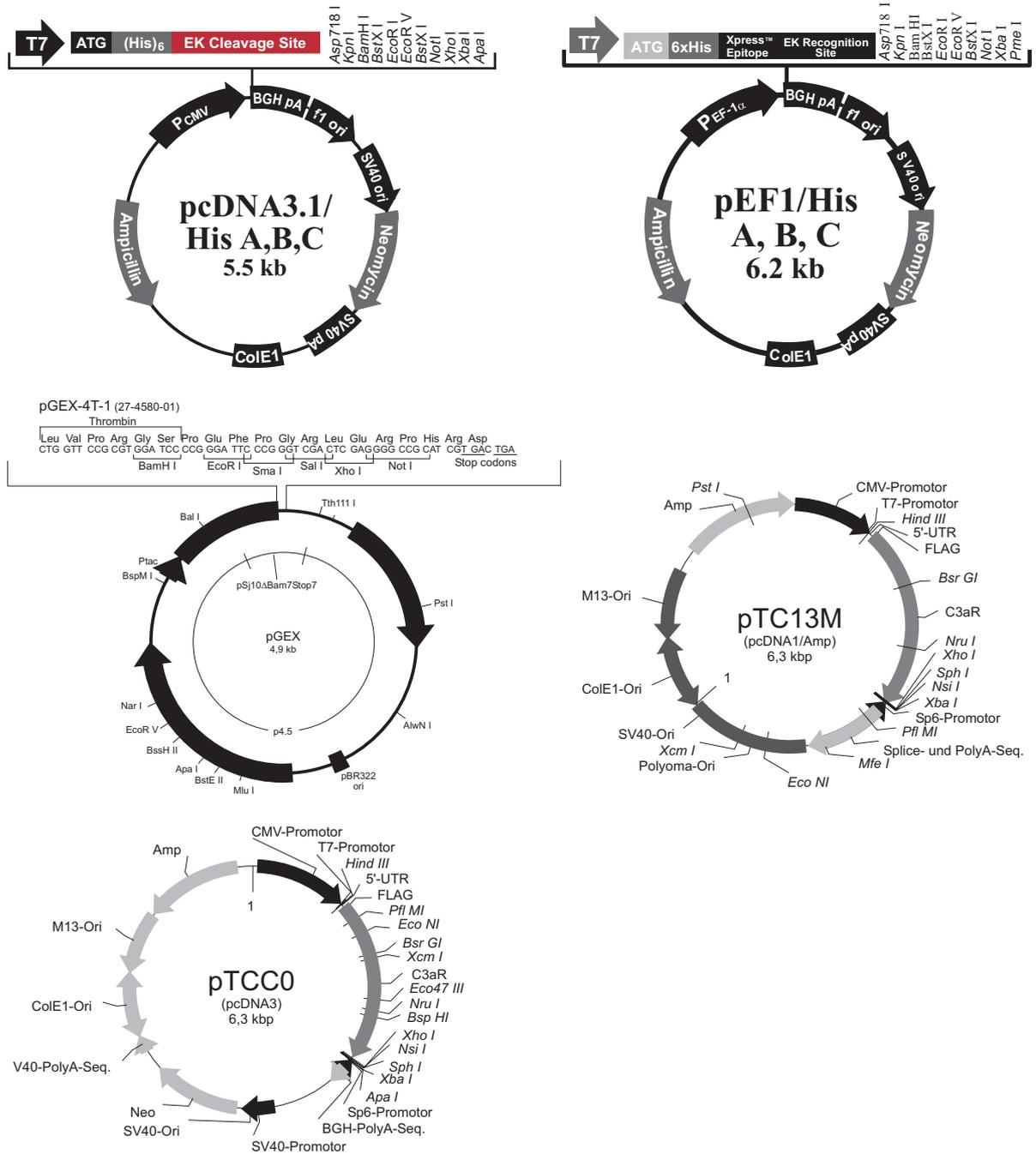
Vektoren (Kap. 2):



* There is an ATG upstream of the Xba I site.



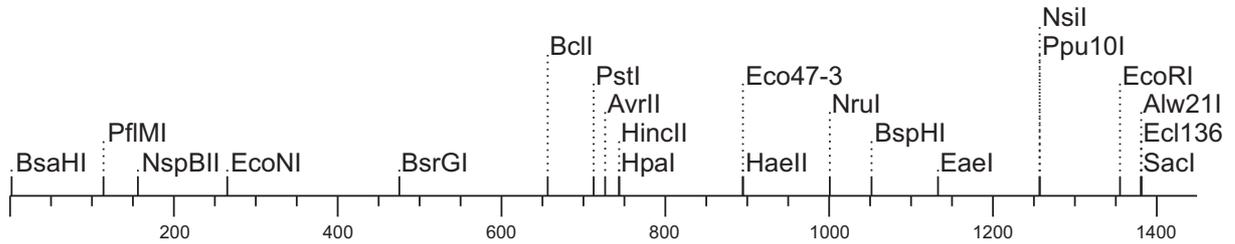
*The Nhe I site is at the N-terminus of GFP



¹²⁵I-C3a-Bindungsdaten, generiert von H. Hamacher (Kap. 3):

Konstrukt	0 nM C3a (ohne Verdränger)	400 nM C3a (mit Verdränger)
C3aR-wt in pcDNA3	5504,5 +/- 1805,8	3320,3 +/- 1794,1
C3aR-wt in pcDNA3.1/HisA (pCR7)	4032,0 +/- 718,2	2518,5 +/- 442,1
C3aR-wt in pEF-BOS	7088,0 +/- 223,9	2424,0 +/- 155,7
C3aR-wt in pEF1/HisA (pEF7/11)	3929,8 +/- 230,2	2054,5 +/- 838,9

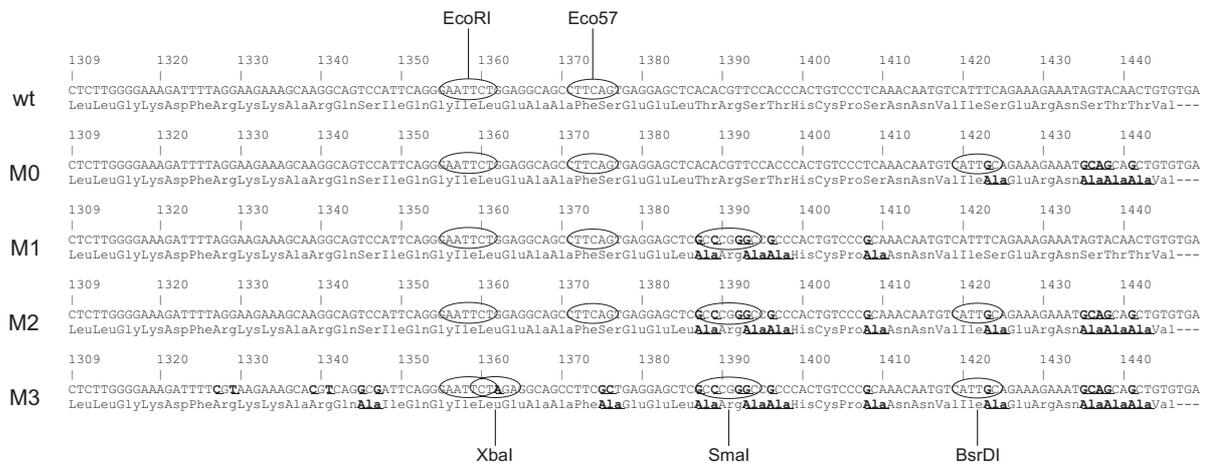
Sequenz und Restriktionsschnittstellen des hC3aR-wt (TC), (Kap. 3):

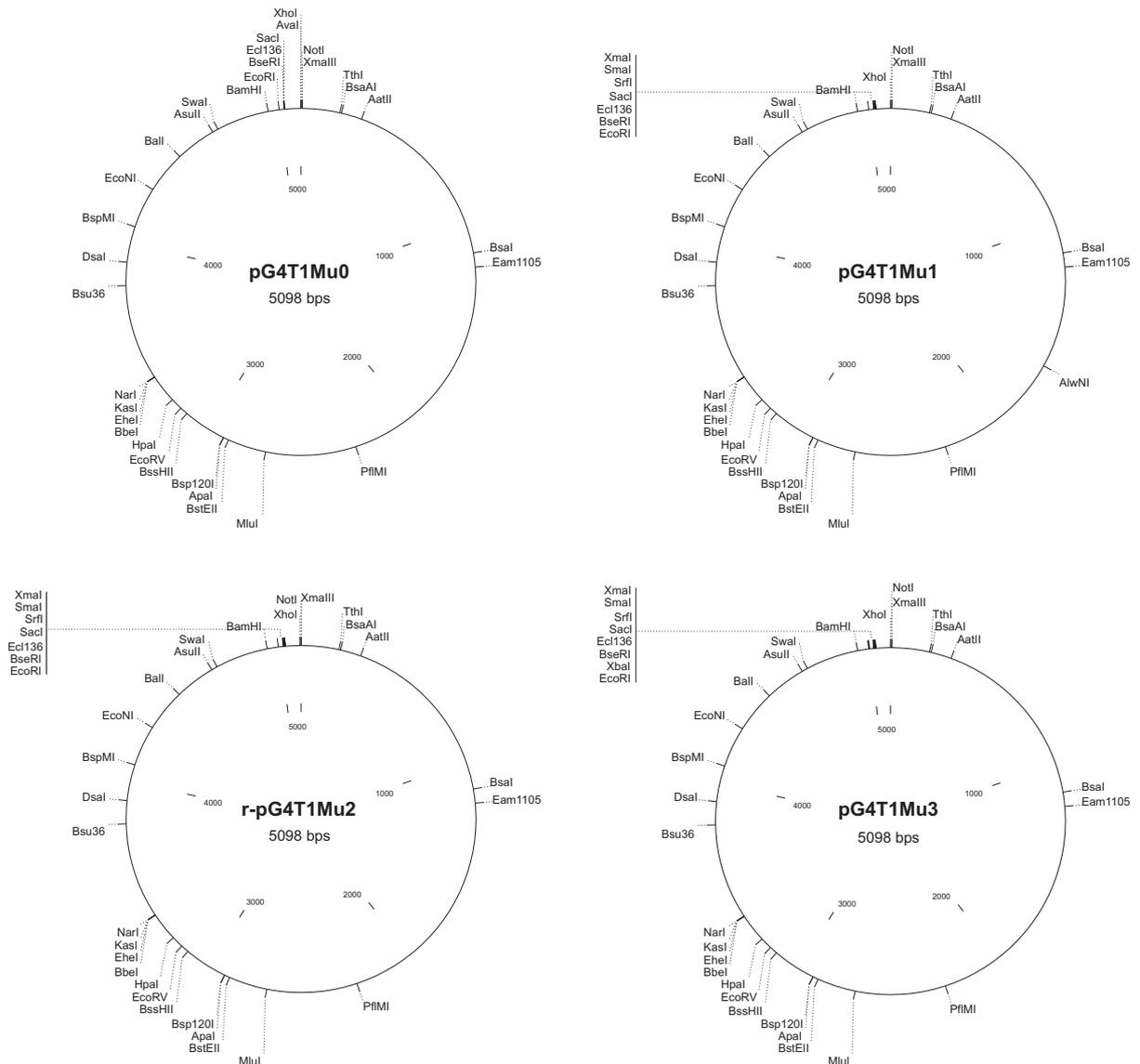


Sequenz des C3aR-wt (TC) mit zusätzlicher BsrGI- und NroI-Schnittstelle:

TGGATCCAGGCGTCTTCTCTGCTGAGACCAATTCAACTGACCTACTCTCACAGCCATGGAATGAGCCCCAGTAA
 TTCTCTCATGGTCATTCTCAGCCTTACTTTTTTACTGGGATTGCCAGGCAATGGGCTGGTGTGTGGGTGGCTGG
 CCTGAAGATGCGCAGCGGACAGTGAACACAATTTGGTTCTCCACCTACCTTGGCGGACCTCTGTCTGCCTCTC
 CTGGCCCTTCTCGTGGCTCACTTGGCTCTCCAGGGACAGTGGCCCTACGGCAGGTTCCATGCAAGCTCATCCCC
 TCCATCATTGTCCTCAACATGTTTGCCAGTGTCTTCTGCTTACTGCCATTAGCCTGGATCGCTGTCTTGTGGTATT
 CAAGCCAATCTGGTGTGAGAATCATCGCAATGTAGGGATGGCCTGCTCTATCTGTGGATGTATCTGGGTGGTGGCT
 TTGTGATGTGCATTCTGTGTTTCGTGTACAGGGAAATCTTCACTACAGACAACCATAATAGATGTGGCTACAAAT
 TTGGTCTCTCCAGCTCATTAGATTATCCAGACTTTTATGGAGATCCACTAGAAAACAGGTCTCTTGA AAAACATTGTT
 CAGCCGCTGGAGAAATGAATGATAGGTTAGATCCTTCTCTTCCAAACAAATGATCATCCTTGGACAGTCCCA
 CTGTCTTCCAACCTCAAACATTTCAAAGACCTTCTGCAGATTCACTCCCTAGGGGTTCTGCTAGGTTAACAAGTCA
 AAATCTGTATTCTAATGTATTTAAACCTGCTGATGTGGTCTCACCTAAAATCCCAGTGGGTTTCTTATTGAAGATC
 ACGAAACCAGCCCACTGGATAACTCTGATGCTTTTCTCTACTCATTTAAAGCTGTTCCCTAGCGCTTCTAGCAAT
 TCCTTCTACGAGTCTGAGCTACCACAAGGTTTCCAGGATTTTACAATTTAGGCCAATTTACAGATGACGATCAAG
 TGCCAAACCCCTCGTCGCGATAACGATCACTAGGCTAGTGGTGGGTTTCTGCTGCTTCTGTTATCATGATGATG
 CTGTTACAGCTTCATTGTCTTCCGAATGCAAAGGGGCCGTTTCCGCAAGTCTCAGAGCAAAAACCTTTTCGAGTGGC
 CGTGGTGGTGGTGGCTGTCTTTCTGTCTGCTGGACTCCATAACCACATTTTGGAGTCTGTCTTACTGACTGACC
 CAGAAACTCCCTTGGGGAAAACCTCTGATGTCCTGGGATCATGTATGCATTGCTCTAGCATCTGCCAATAGTTGCTT
 AATCCCTTCTTTATGCCCTCTTGGGGAAAAGATTTTAGGAAGAAAGCAAGGCAGTCCATTACAGGGAATTTGGAG
 GCAGCCTTCAAGTGGAGCTCACACGTTCCACCCACTGTCCCTCAAACAATGTCATTTTCAGAAAAGAAATAGTACA
 ACTGTGTGACTCGAGAT

Austauschmutanten der C-terminalen putativen Phosphorylierungsstellen des C3a-Rezeptors in pGEX-4T1, generiert von Dr. D. Bock (Kap. 3):





Vergleich der Rezeptorexpression verschiedener Konstrukte mit Hilfe des FACS und von Bindungsstudien (Kap. 3):

Klon (RBL ₀ -Zellen)	Δ -mean (FACS-Analyse, 3' 37°C) eigene Daten	Rezeptorzahl pro Zelle (Bindungsstudien) Daten von H. Hamacher
wt FC2	38,6	73123
wt JF8	19,4	26308
wt ID2	12,6	12005
M0 AB4	9,1	23479
M1 CF5	47,8	48161
M3 BE12	11,0	20589
M5 BH9	10,1	67554
M6 AD6	10,0	60443

Übersicht über die in HMC-1-Zellen nach 4 h Stimulation mit C3a/C5a regulierten Gene, ermittelt mit Hilfe des Atlas cDNA Arrays (Kap. 4):

GenBank Accession	Gene Group	Coordinate	Data
M95712	B-raf proto-oncogene (RAFB1)	A01e	-1,7
L25080	transforming protein rhoA H12 (RHO12; ARH12; ARHA)	A01g	-1,7
X51688	G2/mitotic-specific cyclin A (CCNA; CCN1)	A01h	-1,5
M54968	transforming protein p21/K-ras 2B	A02g	-2,5
AF008552	aurora- & IPL1-like midbody-associated protein kinase 1 (AIM1); ARK2	A02k	1,5
X02751	N-ras; transforming p21 protein	A03g	-1,5
M90813 + D13639	G1/S-specific cyclin D2 (CCND2) + KIAK0002	A04h	-1,6
L27211	cyclin-dependent kinase 4 inhibitor (CDK4I; CDKN2); p16-INK4; multiple tumor suppressor 1 (MTS1)	A04k	2,0
U40343; U20498	cyclin-dependent kinase 4 inhibitor D (CDKN2D); p19-INK4D	A05k	-1,5
M14694; M14695	p53 cellular tumor antigen	A10a	1,6
AF091433	cyclin E2 (Gene Name)	A14g	-1,4
M36340	ADP-ribosylation factor 1	B01n	1,5
M35203	Janus kinase 1 (JAK1)	B02j	-2,5
U09578	MAPKAP kinase (3pK)	B06h	1,6
Z18956	sodium- & chloride-dependent taurine transporter	B10a	-1,5
X66363	serine/threonine-protein kinase PCTAIRE 1 (PCTK1)	B10j	1,4
M36429	guanine nucleotide-binding protein G-i/G-s/G-t beta subunit 2; transducin beta 2 subunit 2	B10n	1,5
D10924	stromal cell derived factor 1 receptor (SDF1 receptor); fusin; CXCR4; leukocyte-derived seven transmembrane domain receptor (LESTR); LCR1	B13d	-1,9
J02853	casein kinase II alpha subunit (CK II); CSNK2A1	B13i	-135,1
U25265	dual specificity mitogen-activated protein kinase kinase 5 (MAP kinase kinase 5; MAPKK 5)	B14h	-1,5
L08807	protein-tyrosine phosphatase 2C (PTP-2C); SH-PTP2	C04a	-1,5
U17032	GAP-associated protein	C07e	-1,5
L20046; X69978	xeroderma pigmentosum group G complementing protein (XPG); DNA excision repair protein ERCC5	C07n	-1,5
U18321 + X83544	ionizing radiation resistance-conferring protein + death-associated protein 3 (DAP3)	C08k	-1,5
AF068920	leucine-rich repeat protein SHOC-2; ras-binding protein SUR-8	C10e	-1,6
U33286	cellular apoptosis susceptibility protein (CAS); chromosome segregation gene homolog	C11j	-1,5
U14188	ephrin A4 precursor (EFNA4); EPH-related receptor tyrosine kinase ligand 4 (EPLG4); LERK4	C12b	2,0
M36067	DNA ligase I; polydeoxyribonucleotide synthase (ATP) (DNL1) (LIG1)	C12m	-1,5
M97935	signal transducer and activator of transcription 1 alpha/beta (STAT1); transcription factor ISGF-3 components p91/p84	C13c	1,8
X06745	DNA polymerase alpha catalytic subunit (POLA)	C14k	-1,7
AF009353	transcription intermediary factor 1 (TIF1)	D02k	1,5
X69391	60S ribosomal protein L6 (RPL6); TAX-responsive enhancer element binding protein 107 (TAXREB107); neoplasm-related protein C140	D02n	1,6
U60800	semaphorin; CD100	E02j	-1,5
M97287	special AT-rich sequence binding protein 1 (SATB1); MAR/SAR DNA-binding protein	E09b	1,6
X52541; M62829	early growth response protein 1 (hEGR1); transcription factor ETR103; KROX24; zinc finger protein 225; AT225	E10a	1,9
M34079	26S protease regulatory subunit 6A; TAT-binding protein 1 (TBP1); proteasome subunit p50	E10d	1,5
D16431	hepatoma-derived growth factor (HDGF)	F05e	1,5

Lebenslauf

von Dipl. Biochem. Britta Settmacher, geb. am 30.03.1968

Ausbildungsdaten

Schulbildung:	1974-1978 1978-1987	Grundschule, Düsseldorf Gymnasium, Düsseldorf
Schulabschluss:	01.06.1987	Abitur
Ausbildung:	9/1987-6/1990	Fa. Henkel KGaA, Düsseldorf, Ausbildung zur Chemielaborantin
Beruf:	6/1990-9/1991	Chemielaborantin, Fa. Henkel KGaA, Düsseldorf
Studium:	seit 10/1991	Studium an der Universität Hannover, Diplomstudiengang Biochemie
	2/1994	Vordiplom
	1/1997	Diplomprüfungen in den Fächern Biochemie, Biophysikalische Chemie und Pflanzenphysiologie
	2/1997-7/1998	Diplomarbeit im Institut für med. Mikrobiologie der MHH, Thema: <i>Untersuchungen zur Regulation des C3a-Rezeptors: Internalisierung</i>
Studienabschluss:	09.08.1997	Diplom in der Fachrichtung Biochemie
Promotion:	seit 8/1998	Im Rahmen der Promotion angestellt als wissenschaftliche Mitarbeiterin am Institut für med. Mikrobiologie der MHH, Thema der Dissertation: <i>Regulation des humanen anaphylatoxischen C3a-Rezeptors: Struktur-/ Funktionsanalyse des C-Terminus mit dem Schwerpunkt Internalisierung</i>

Verzeichnis eigener Publikationen

Bisherige Publikationen:

Settmacher, B., D. Bock, H. Saad, S. Gärtner, C. Rheinheimer, J. Köhl, W. Bautsch and A. Klos. 1999. Modulation of C3a activity: internalization of the human C3a-receptor and its inhibition by C5a. *J. Immunol.* 162: 7409-7416

R. S. Ames, D. Lee, J. J. Foley, A. J. Jurewicz, M. A. Tornetta, W. Bautsch, **B. Settmacher**, A. Klos, K. F. Erhard, A. C. Sulpizio, J. P. Hieble, G. McCafferty, K. Ward, D. Underwood, A. M. Badger and H. M. Sarau: Identification of the selective non-peptide antagonist of the anaphylatoxin C3a-receptor. submitted

Abstracts:

B. Settmacher, D. Bock, U. Martin, J. Köhl, W. Bautsch and A. Klos: Internalization of the human C3a-receptor; 28. Tagung der Deutschen Gesellschaft für Immunologie, Würzburg; September 1997; veröffentl. in: *Immunobiology*, Vol. 197, No. 2-4, p. 376 (Abstract, Poster und Vortrag)

B. Settmacher, D. Bock, H. Saad, S. Gärtner, C. Rheinheimer, J. Köhl, W. Bautsch and A. Klos: Human C3a-receptor internalization and cross-talk by C5a, 29. Tagung der Gesellschaft für Immunologie, Freiburg; September 1998; veröffentl. in: *Immunobiology*, Vol. 199, No. 3-5, p. 635 (Abstract und Poster)

D. Bock, **B. Settmacher**, C. Rheinheimer, J. Köhl, W. Bautsch and A. Klos: Analysis of phosphorylation of the C3a-receptor C-terminus using GST-fusionproteins, 29. Tagung der Gesellschaft für Immunologie, Freiburg; September 1998; veröffentl. in: *Immunobiology*, Vol. 199, No. 3-5, p. 635-636 (Abstract und Poster)

B. Settmacher, D. Bock, H. Saad, S. Gärtner, C. Rheinheimer, J. Köhl, W. Bautsch and A. Klos: Human C3a-receptor internalization and cross-talk by C5a, XVII International Complement Workshop, Rhodos, Oktober 1998, veröffentl. in: *Molecular Immunology*, Vol. 35, No. 6-7, p. 366 (Abstract, Poster und Vortrag)

D. Bock, **B. Settmacher**, C. Rheinheimer, J. Köhl, W. Bautsch and A. Klos: Analysis of phosphorylation of the C3a-receptor C-terminus using GST-fusionproteins, XVII International Complement Workshop, Rhodos, Oktober 1998, veröffentl. in: *Molecular Immunology*, Vol. 35, No. 6-7, p. 366 (Abstract und Poster)

B. Settmacher, C. Rheinheimer, H. Hamacher, S. Stolzenberg, J. Köhl, W. Bautsch and A. Klos: The role of the cytosolic C-terminus in the internalization of the human anaphylatoxic C3a-receptor, 30. Tagung der Gesellschaft für Immunologie, Hannover; September 1999; veröffentl. in: *Immunobiology*, Vol. 200, No. 3-5, p. 638 (Abstract und Poster)

B. Settmacher, C. Rheinheimer, H. Hamacher, S. Stolzenberg, J. Köhl, W. Bautsch and A. Klos: The role of the cytosolic C-terminus in the internalization of the human anaphylatoxic C3a-receptor, 51. Jahrestagung der Gesellschaft für Hygiene und Mikrobiologie, Regensburg; Oktober 1999; (Abstract, Poster und Vortrag)

B. Settmacher, C. Rheinheimer, M. Oppermann, H. Hamacher, D. Bock, J. Köhl, W. Bautsch and A. Klos: Structure/ Funktion Analysis of the C3a-receptor C-terminus. XVIII International Complement Workshop, Salt Lake City, August 2000, veröffentl. in: *Immunopharmacology*, Vol. 49, No. 1-2, p. 53 (Abstract und Poster)

R. S. Ames, D. Lee, J. J. Foley, M. A. Tornetta, W. Bautsch, **B. Settmacher**, A. Klos, A. C. Sulpizio, J. P. Hieble, G. McCafferty and H. M. Sarau: Pharmacology of SB290157, a selective small molecule antagonist of the C3a-receptor. XVIII International Complement Workshop, Salt Lake City, August 2000, veröffentl. in: *Immunopharmacology*, Vol. 49, No. 1-2, p.89 (Abstract, Poster)

Danksagung

Bei Herrn Prof. Dr. Bitter-Suermann bedanke ich mich für die Möglichkeit, die vorliegende Dissertation am Institut für Medizinische Mikrobiologie anfertigen zu können.

PD Dr. Andreas Klos danke ich für die engagierte wissenschaftliche Betreuung besonders in der Endphase meiner Arbeit, den mir gewährten Freiraum bei den experimentellen Ausführungen, seine stete Diskussionsbereitschaft und die Übernahme des Koreferats.

Bei Frau Prof. Dr. Rita Gerardy-Schahn bedanke ich mich für die Adoption als Doktorkind und die Übernahme des Hauptreferats.

Bettina Sohns danke ich für ihre vielen Tipps und Anregungen bezüglich der kleinen Laboralltagssorgen, für ihre geduldige Beantwortung oft gestellter Fragen, ihre Hilfestellung bei experimentellen Arbeiten und fürs Korrekturlesen.

Simone Hess danke ich für die Einweisung in die Geheimnisse der Atlas Array Technik und Fluoreszenzspektroskopie, die ständigen Aufmunterungen, ihre gute Laune, die viele Dinge gleich positiver erscheinen ließ und fürs Korrekturlesen.

Bei Claudia Rheinheimer möchte ich mich für die Unterweisungen in die Zellkultur- und molekularbiologischen Techniken und für die Übernahme auch ungeliebter "Auftragsarbeiten" bedanken.

Bei Henning Hamacher möchte ich mich für die gute Zusammenarbeit auf dem Anaphylatoxin-gebiet, seine geduldig durchgeführten Bindungsstudien und die Zusammenstellung seiner Daten bedanken.

Allen Mitgliedern der Klosschen Truppe, Claudia Reinheimer, Simone Hess, Gerda Bartling, Felicitas Tidow, Henning Hamacher, Lorenzo Klein, Alexander Akur, Myriam Schäfer und Jan Peters danke ich für die fachlichen Tipps, die Hilfe bei der Durchführung von Experimenten, ihre Bereitschaft zur Blutspende, die guten Koch- und Backrezepte und nicht zuletzt für die Aufrechterhaltung der guten Laune, auch bei Fehlschlägen.

Ferner möchte ich mich bei allen Mitarbeiterinnen und Mitarbeitern der AT-Gruppe und des gesamten Instituts für Medizinische Mikrobiologie, insbesondere bei Martina Mühlenhoff, für die freundlich, nachbarlaborliche Hilfsbereitschaft und die angenehme Arbeitsatmosphäre bedanken.

Fritz danke ich für seine unermüdliche Aufmunterung und Unterstützung, für die ständige Einsatzbereitschaft und SOS-Hilfe bei computertechnischen Problemen, für das Ertragen meiner Launen, vieler Unannehmlichkeiten und den geduldigen Verzicht auf gemeinsame Stunden während meiner Promotionszeit.

Meiner Schwester, ohne deren moralische Unterstützung ich mein Studium niemals beendet hätte, und meinem Onkel Helmut möchte ich für ihre stete Anteilnahme an meinem Werdegang, ihre Ratschläge und ihre finanzielle Unterstützung danken.