

Untersuchungen zur Expression des humanen C3a-Rezeptors

Dem Fachbereich Biologie der Universität Hannover

zur Erlangung des Grades

Doktorin der Naturwissenschaften

Dr. rer. nat.

genehmigte Dissertation

von

Dipl.-Biol. Bettina Sohns

geboren am 25.09.1971 in Hannover

2000

Referent: Prof. Dr. Bautsch

Korreferentin: Frau Prof. Dr. Szamel

Tag der Promotion: 29.06.2000

**„Und das Ende unseres Forschens
Ist, an den Ausgangspunkt zu kommen
Und zum erstenmal den Ort zu erkennen.“**

(T.S. Eliot)

Zusammenfassung

Das humane Anaphylatoxin C3a ist ein breit wirkender und potenter Entzündungsmediator, der seine Wirkungen über einen membranständigen Rezeptor, den humanen C3a-Rezeptor (C3aR) vermittelt. Der hC3aR besteht aus 482 Aminosäuren und läßt sich u.a. aufgrund seiner Struktur von sieben hydrophoben transmembranen Domänen, die durch hydrophile extra- und intrazelluläre Loops miteinander verbunden sind, in die Superfamilie der G-Protein gekoppelten Rezeptoren einordnen. Eine Besonderheit stellt sein im Vergleich zu allen anderen bisher bekannten G-Protein gekoppelten Rezeptoren außergewöhnlich großer zweiter extrazellulärer Loop dar, der gut ein Drittel des gesamten Rezeptormoleküls ausmacht und dessen Funktion bisher noch unbekannt ist. Der C3aR weist ein breites Expressionsspektrum im humanen System auf, was auf eine hohe physiologische Bedeutung von C3a hinweist. Um Hinweise auf die (patho-) physiologische Bedeutung des Anaphylatoxins C3a zu erhalten, wurden in dieser Arbeit Untersuchungen zur Expression des hC3aR durchgeführt:

1. Charakterisierung eines murinen monoklonalen gegen den zweiten extrazellulären hC3aR-Loop generierte Antikörpers der Subklasse IgG1, des 8H1-Antikörpers. Nach Epitop-Mapping ergab sich die im proximalen Bereich des Loops lokalisierte Aminosäuresequenz TNDHPW (Aminosäure 218 – 223). Der 8H1-Antikörper wurde im Westernblot, in der indirekten Immunfluoreszenz, in FACS-Analysen und in immunhistochemischen Untersuchungen eingesetzt und konnte spezifisch den hC3aR erkennen, so daß er sich für Untersuchungen unter nativen und unter denaturierenden Bedingungen eignet. Eine Einschränkung besteht durch die in FACS- und immunhistochemischen Analysen aufgetretene Kreuzreaktivität auf bestimmten Zellen, durch die es zu falsch positiven Ergebnissen kommt. Bei immunhistochemischen Untersuchungen des C3aR-Expressionsmusters in ausdifferenzierter Plazenta unter Verwendung verschiedener C3aR-Antikörper konnten die CD14-positiven, phagozytischen Hofbauerzellen als C3aR-positiv identifiziert werden.

2. In FACS- und immunhistochemischen Untersuchungen zeigte sich, daß die Bindung des 8H1-Antikörpers auf bestimmten Zellen (periphere Granulozyten, Zellen in den Periportalfeldern der Leber) durch das Epitop-enthaltende Peptid Köhl 2, nicht aber durch den His-markierten zweiten extrazellulären Loop des C3aR inhibiert werden konnte, der ebenfalls die Epitop-Sequenz enthält. Eine mögliche Erklärung für diese Beobachtung könnte in einer Bindung des zweiten extrazellulären Loops an (unbekannte) Oberflächenstrukturen auf diesen Zellen liegen. Mit dem rekombinanten Loop wurden daher Wechselwirkungspartner mit Hilfe von Biacore-Analysen, von Untersuchungen mit Nickel-NTA Magnetic Beads und einer λ TriplEx-Expressionbank aus humaner Leber gesucht: Alle Ergebnisse in diesen Untersuchungen blieben aber negativ, so daß das beobachtete Phänomen bislang nicht befriedigend erklärt werden konnte.

3. Ein weiterer Schwerpunkt der Arbeit waren die Untersuchungen zur Regulation der C3aR-Expression. Ein ungefähr 2,5 kB großer Sequenzbereich der 5'-UTR wurde isoliert und sequenziert und die Sequenz auf putative Bindungsstellen für Transkriptionsfaktoren analysiert. Durch reverse Transkription mit anschließender Einzelstrang-PCR mit verschiedenen 5'-UTR-Primern konnten in HMC-1-, IMR-32-, SK-N-MC- und U937-Zellen Sequenzbereiche eingegrenzt werden, in denen die Transkriptionsstartpunkte zu vermuten sind. In HMC-1-Zellen wurden durch Nuclease Protection Assay zwei weitere Transkriptionsstartpunkte identifiziert, die stromabwärts des über reverse Transkription bestimmten Bereichs liegen. Aufgrund der Untersuchungen zum Transkriptionsstartpunkt, Sequenzanalysen und Vergleichen mit den Genen anderer G-Protein gekoppelter Rezeptoren ist anzunehmen, daß es sich beim Promotor des hC3aR um einen TATA- und CCAAT-losen Promotor handelt, in dem Zelltyp-spezifisch multiple Transkriptionsstartpunkte genutzt werden.

Ein Reporteragenassay zur Untersuchung der Promotoraktivität verschiedener 5'-UTR-Konstrukte wurde etabliert. Neben der myelomonoblastischen Zelllinie U937 und der Mastzelllinie HMC-1, wurden noch zwei Neuroblastomazelllinien (IMR-32 und SK-N-MC) im Reporteragenassay eingesetzt. Beide Neuroblastomazelllinien exprimieren den C3aR, wie durch FACS-Analysen, Northernanalysen und kompetitive Bindungsstudien gezeigt werden konnte. Bei den Untersuchungen mit den verschiedenen Promotorkonstrukten in HMC-1-Zellen zeigte das pSEAP2-E-1511-Konstrukt mit einem 1,5 kb-Insert eine deutlich höhere Promotoraktivität als die anderen Promotorkonstrukte. Das kleinste generierte Fragment mit Promotoraktivität hat ein 5'-Ende bei Position – 283 in der 5'-UTR des hC3aR.

Bei Untersuchungen zur Cytokin-vermittelten Regulation des hC3aR konnte in Abhängigkeit von der verwendeten Zelllinie im Reporteragenassay für mehrere Cytokine, wie z. B. IFN- α und - γ , TNF- α , IL-2, IL-3 und IL-6, eine Hochregulation des Promotors detektiert werden. Mit Ausnahme von TNF- α ist anzunehmen, daß es sich dabei um eine indirekte durch das Cytokin vermittelte Regulation handelt. 1:15 h nach TNF- α -Stimulation konnte in U937-Zellen durch Northernanalyse eine Erhöhung der Menge an hC3aR-mRNA detektiert werden, so daß hier von einer direkt durch das Cytokin vermittelten Regulation ausgegangen werden kann. Damit konnte neben IFN- γ mit TNF- α ein zweiter physiologischer hC3aR-Regulator identifiziert werden.

Abstract

The human C3a anaphylatoxin is a potent proinflammatory mediator whose multifarious effects are mediated by binding to a membrane receptor, the human C3a-receptor (hC3aR). The hC3aR consists of 482 amino acid residues and it is a member of the family of G protein-coupled receptors which is characterized by seven hydrophobic transmembrane helices connected by hydrophilic extra- and intracellular loops. Uniquely among all other members of this family the C3aR has an extremely large second extracellular loop which is about a third of the whole molecule. Since now the function of this loop is unknown. The wide expression of the C3aR in the human system refers to an important physiological meaning of C3a. In this paper, explorations to the expression of the hC3aR were done to get reference to the (patho-) physiological meaning of C3a anaphylatoxin:

1. Characterization of an against the second extracellular hC3aR loop generated murin monoclonal antibody of the IgG1 subclass, the 8H1 antibody. An epitop mapping proved TNDHPW in the amino acid sequence (amino acid residues 218 – 223) localized at the proximal region of the loop. The 8H1 antibody was used in western blots, indirect immunofluorescence, FACS analysis and immunohistochemical analysis and it could specifically be recognized the hC3aR, which shows its usefulness under native and denatured conditions. A restriction is the cross reactivity to certain cells in FACS and immunohistochemical analysis leading to false positive datas. In immunohistochemical analysis in the differentiated placenta with different C3aR antibodies the CD14 positive phagocytic Hofbauer cells were C3aR positive.

2. FACS and immunohistochemical analysis showed that the binding of the 8H1 antibody on certain cells (peripheric granulocytes, cells in the periportal areas of the liver) could be inhibited by the epitop sequence carrying peptid Köhl 2 but not by the His-tagged second extracellular loop of the C3aR carrying the epitop sequence, too. One possible explanation for this observation is the binding of the second extracellular loop to an (unknown) structure on the surface of these cells. The recombinant loop was used by looking for interaction partners in Biacore analysis, an exploration with nickel-NTA magnetic beads and λ TripleEx expression library screening: all explorations resulted negative so that at now the detected phenomenon couldn't be explained satisfactory.

3. Another focal point of the paper were explorations of the regulation of the C3aR expression. A nearly 2.5 kb region of the 5'-UTR was isolated and sequenced and the sequence was analysed for possible binding sites of transcription factors. Through reverse transcription and subsequent single strand PCR with different 5'-UTR primers in HMC-1, IMR-32, SK-N-MC and U937 cells sequence regions could be defined, in which the transcriptional initiation sites are supposed. Through nuclease protection assay in HMC-1 cells two further transcription initiation sites were identified, which are located upstream of the by revers transcription determined region. Because of the explorations to the transcription initiation site, the sequence analysis and the comparisons to the genes of other G protein-coupled receptors it could be that the promoter of the hC3aR is a TATA and CCAAT less promoter, in which cell type specific multiple transcription initiation sites are used.

A reporter gene assay for the exploration of the promoter activity of different 5'-UTR constructs was established. Beside of the myelomonoblastic U937 cell line and the HMC-1 mast cell line two neuroblastoma cell lines (IMR-32 and SK-N-MC) were tested in the reporter gene assay. Both neuroblastoma cell lines expressing the C3aR shown by FACS analysis, northern analysis and competitive binding studies. The explorations in HMC-1 cells with different promoter constructs show that the pSEAP2-E-1511 construct with a 1.5 kb insert has a higher promoter activity than the other promoter constructs. The smallest of the generated fragments with promoter activity has a 5'-end at position –283 in the 5'-UTR of the hC3aR.

In explorations of the cytokine mediated regulation of the C3aR an upregulation of the promoter for several cytokines, like IFN- α and $-\gamma$, TNF- α , IL-2, IL-3 and IL-6 in dependence to the cell line one could detect. With the exception of TNF- α it is accepted that the cytokine mediated regulation is indirect. 1:15 h after TNF- α stimulation an increased hC3aRmRNA level could be detected in U937 cells so that this regulation is made directly by the cytokine mediated regulation. By this TNF- α could be identified as a second physiological hC3aR regulator beside IFN- γ .

Schlagworte:

Humaner C3a-Rezeptor – monoklonaler C3a-Rezeptor-Antikörper - Promotor

Keywords:

Human C3a-receptor – monoclonal C3a-receptor antibody - promoter

Inhaltsverzeichnis

1.	Einleitung	1
1.1	Das Komplementsystem	1
1.2	Die Anaphylatoxine	3
1.2.1	<i>Struktur und Funktion der Anaphylatoxine</i>	3
1.2.2	<i>Rezeptoren der Anaphylatoxine</i>	7
1.3	Zielsetzung	11
2.	Materialien und Methoden	13
2.1	Ausgangsmaterialien	13
2.1.1	<i>Monoklonaler 8H1-Antikörper</i>	13
2.1.2	<i>pQE-30-hC3aR-Loop</i>	14
2.1.3	<i>pBluescript II KS-</i>	14
2.1.4	<i>pDPI</i>	15
2.1.5	<i>pSEAP2-Enhancer</i>	15
2.1.6	<i>pCMVβ</i>	16
2.1.7	<i>pCDM8</i>	17
2.1.8	<i>pTCC0</i>	17
2.1.9	<i>pTCCF</i>	18
2.2	Puffer, Lösungen und Nährmedien	19
2.2.1	<i>Puffer und Lösungen</i>	19
2.2.2	<i>Nährmedien</i>	22
2.3	Organismen	23
2.3.1	<i>Bakterien</i>	23
2.3.2	<i>Eukaryotische Zelllinien</i>	23
2.4	Methoden	26
2.4.1	<i>Methoden zum Arbeiten mit DNA und RNA</i>	26
2.4.1.1	Polymerase-Kettenreaktion (PCR)	26
2.4.1.2	Agarose-Gelelektrophorese	27
2.4.1.3	Extraktion von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen	28
2.4.1.4	Polyacrylamid-Gelelektrophorese zur Auftrennung von DNA	28
2.4.1.5	Phenol-Chloroform-Extraktion	28
2.4.1.6	Ethanol-fällung von Nucleinsäuren	29
2.4.1.7	Spaltung von DNA durch Restriktionsendonucleasen	29
2.4.1.8	Ligation	30
2.4.1.9	Herstellung elektrokompetenter Bakterien	30
2.4.1.10	Transformation von Bakterien durch Elektroporation	31
2.4.1.11	Plasmid-DNA-Präparationen	31
2.4.1.12	Photometrische Bestimmung der Konzentration von Nucleinsäuren	32
2.4.1.13	DNA-Sequenzierung	33
2.4.1.14	Präparation von Gesamt-RNA	34
2.4.1.15	Reverse Transkription von Gesamt-RNA	34
2.4.1.16	Herstellung DIG-markierter RNA-Sonden	35
2.4.1.17	Northern-Transfer	36
2.4.1.18	Hybridisierung mit DIG-markierten RNA-Sonden	36
2.4.1.19	Immunologischer DIG-Nachweis mit CSPD	37
2.4.1.20	5'-Rapid Amplification of cDNA Ends (5'-RACE)	37
2.4.1.21	Herstellung α - ³⁵ S-dATP-markierter Einzelstrang DNA-Sonden	38
2.4.1.22	Nuclease Protection Assay (NPA)	40

2.4.2	<i>Proteinbiochemische Methoden</i>	40
2.4.2.1	Expression von rekombinanten 6 x His-hC3aR-Loop	40
2.4.2.2	Säulenaффinitätschromatographie des 6 x His-hC3aR-Loop	41
2.4.2.3	Präparation von Fab-Fragmenten aus Antikörpern der Subklasse IgG1	41
2.4.2.4	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)	42
2.4.2.5	Silberfärbung von Proteinen in SDS-Polyacrylamid-Gelen	43
2.4.2.6	Renaturierung des 6 x His-hC3aR-Loops	43
2.4.2.7	Fast Protein Liquid Chromatography (FPLC)	44
2.4.2.8	Proteinbestimmung nach Bradford	45
2.4.2.9	Westernblot	45
2.4.2.10	Immunofärbung von Zellulosenitratmembranen	46
2.4.2.11	Fluorescein-Markierung von Fab-Fragmenten	46
2.4.3	<i>Methoden zum Arbeiten mit Phagen</i>	47
2.4.3.1	Herstellung kompetenter Bakterien für die Phagenplattierung	47
2.4.3.2	Phagentitration	47
2.4.3.3	Plattieren von λ TriplEx-Phagen	48
	Induktion der Proteinexpression von λ TriplEx-Phagen und Protein-Transfer der exprimierten Proteine auf die Trägermembran	48
2.4.3.5	Immunofärbung von Zellulosenitratfiltern beim Phagenscreening	48
2.4.3.6	Phagenisolierung aus Agarose	49
2.4.4	<i>Zell- und immunbiologische Methoden</i>	49
2.4.4.1	Produktion von gegen den zweiten extrazellulären Loop des hC3aR gerichteten monoklonalen Antikörpern im großen Maßstab	49
2.4.4.2	Epitop-Mapping	49
2.4.4.3	Experiment mit Nickel-NTA-Magnetic Agarose Beads	50
2.4.4.4	Biacore-Analyse mit peripheren Leukozyten	50
2.4.4.5	Transiente Transfektion	51
2.4.4.6	Zellstimulation mit Cytokinen	52
2.4.4.7	Secreted Alkaline Phosphatase (SEAP)-Assay	53
2.4.4.8	β -Galactosidase-Assay	54
2.4.4.9	Fluorescence Activated Cell Sorting (FACS)	54
2.4.4.10	Indirekte Immunfluoreszenz	55
2.4.4.11	Immunhistochemie	56
2.4.4.12	Kompetitive Bindungsstudien	56
2.5	Software	58
3.	Ergebnisse	59
3.1	Untersuchungen zum monoklonalen Antikörper 8H1	59
3.1.1	<i>Charakterisierung des monoklonalen Antikörpers 8H1</i>	59
3.1.1.1	Westernblot	59
3.1.1.2	Epitop-Mapping	59
3.1.1.3	Indirekte Immunfluoreszenz	61
3.1.1.4	FACS-Analyse	62
3.1.1.5	Immunhistochemie	66
3.1.2	<i>Untersuchungen zur Funktion des zweiten extrazellulären hC3aR-Loops</i>	68
3.1.2.1	Experiment mit Nickel-NTA-Magnetic Agarose Beads	68
3.1.2.2	Biacore-Analyse	69
3.1.2.3	Screening einer λ TriplEx-Phagenbank aus humaner Leber	69
3.2	Charakterisierung von C3aR-exprimierenden Zelllinien	71
3.2.1	<i>FACS-Analysen</i>	71
3.2.2	<i>Northern-Transfer</i>	74
3.2.3	<i>Kompetitive Bindungsstudien</i>	75
3.3	Untersuchungen der 5'-UTR des hC3aR	77
3.3.1	<i>Sequenzierung</i>	77
3.3.2	<i>Eingrenzung des Transkriptionsstarts und Sequenzanalyse der 5'-UTR</i>	79

3.3.2.1	Reverse Transkription und Sequenzanalyse der 5'-UTR.....	79
3.3.2.2	5'-RACE.....	83
3.3.2.3	Nuclease Protection Assay.....	84
3.3.3	<i>Reporteragenassay</i>	85
3.3.3.1	Promotorkonstrukte im Reporteragenvektor pSEAP2-Enhancer.....	85
3.3.3.2	Etablierung und Optimierung eines Reporteragenassays.....	86
3.3.3.3	Untersuchung der verschiedenen Promotorkonstrukte.....	88
3.3.3.4	Potentiell positiv regulierendes Element: Generierung und Untersuchung von pSEAP2-E-308+.....	90
3.3.4	<i>Stimulation mit Cytokinen</i>	92
3.3.4.1	Reporteragenassay: U937-, IMR-32- und SK-N-MC-Zellen.....	92
3.3.4.2	Kompetitive Bindungsstudien: HL-60- und U937-Zellen.....	96
3.3.4.3	Northern-Transfer: U937-Zellen.....	97
4.	Diskussion	99
4.1	Untersuchungen zum monoklonalen Antikörper 8H1.....	99
4.1.1	<i>Charakterisierung des monoklonalen Antikörpers 8H1</i>	99
4.1.2	<i>Untersuchungen zur Funktion des zweiten extrazellulären hC3aR-Loops</i>	102
4.2	Charakterisierung von C3aR-exprimierenden Zelllinien.....	106
4.3	Untersuchung der 5'-UTR des hC3aR.....	108
4.3.1	<i>Eingrenzung des Transkriptionsstarts und Sequenzanalyse der 5'-UTR</i>	108
4.3.2	<i>Reporteragenassays</i>	112
4.3.3	<i>Untersuchung zur Cytokin-vermittelten hC3aR-Regulation</i>	114
5.	Literatur	119
6.	Anhang	133
6.1	Sequenz der 5'-UTR des hC3aR.....	133
6.2	Verwendete Oligonukleotid-Primer.....	134
6.3	Generierte Plasmide.....	138
6.4	Genomische Organisation des C3aR-Locus.....	143
7.	Abkürzungen	145
8.	Lebenslauf	149

1. Einleitung

1.1 Das Komplementsystem

Das Komplementsystem ist ein in Serum und Gewebe vorhandenes aus über 30 Plasma- und membranständigen Proteinen bestehendes Kaskadensystem, das einen wichtigen Teil der körpereigenen Abwehr darstellt. Die Komplementkomponenten reagieren untereinander und mit anderen Faktoren des angeborenen und erworbenen Immunsystems und komplementieren damit die Immunantwort. Ähnlich wie auch bei der Gerinnungs-, Kinin- und Fibrinolysekaskade kommt es nach Auslösung der Komplementkaskade zu einer sich verstärkenden Kettenreaktion, in deren Verlauf die Komplementkomponenten durch limitierte Proteolyse oder katalysierte Konformationsumwandlung in ihre enzymatisch aktive Form überführt werden.

Die Auslösung der Komplementkaskade kann auf drei unterschiedlichen Wegen erfolgen. Beim sogenannten klassischen Weg, bei dem es über die Komponenten C1, C4 und C2 schließlich zu einer Aktivierung von C3 kommt, erfolgt die Aktivierung im wesentlichen durch Antigen-gebundene Immunglobuline, aber auch durch Zellwandproteine (z.B. das Protein A, das bei vielen *Staphylococcus aureus* Stämmen vorkommt), durch das Lipid A der Lipopolysaccharide (LPS) gramnegativer Bakterien, durch das C-reaktive Protein (CRP), dessen Serumkonzentration während entzündlicher Reaktionen rapide ansteigt, und durch Retroviren.

Die Auslösung des sogenannten alternativen Weges, der ebenfalls zu einer Aktivierung von C3 führt, erfolgt durch Oberflächenstrukturen von Bakterien, wie z.B. durch Membranpolysaccharide grampositiver Bakterien und dem Polysaccharid-Anteil der LPS gramnegativer Bakterien, und durch Viren. Kürzlich wurde noch ein dritter Weg der Komplementaktivierung bekannt, der sogenannte Lektin-Weg. Dabei findet durch das Binden des Mannose-bindenden Lektins (MBL) an Zuckerstrukturen auf der Zelloberfläche über die Aktivierung zweier MBL-assoziiierter Serinproteasen (MASP-1 und -2) eine C1-unabhängige C4-Aktivierung statt.

Alle drei Reaktionswege konvergieren bei der Bildung von C3-Konvertasen, die C3 in die aktive Komplementkomponente C3b und das kleine Spaltprodukt C3a spalten. Die weitere Komplementkaskade verläuft gleich: Nach Spaltung von C5 in C5b und das kleine

Spaltprodukt C5a setzt das C5b-Fragment die Bildung des Membranangriffskomplexes (MAC) in Gang (lytischer Weg).

Das Komplementsystem erfüllt im wesentlichen drei Effektorfunktionen:

1. Zytolyse:

Durch Ausbildung des Membranangriffskomplexes (MAC) durch die Komplementkomponenten C5b, C6, C7, C8 und C9 kommt es zur Porenbildung und nachfolgend zur Lyse der Zelle.

2. Opsonierung:

Die Spaltprodukte C3b, bzw. dessen Abbauprodukt iC3b, und C4b können aufgrund ihrer hochreaktiven Thioestergruppen an Amino- und Hydroxylgruppen von Fremdantigenen kovalent binden. Über spezifische Komplementrezeptoren, die auf fast allen Immunzellen vorhanden sind, kann dann eine Bindung der opsonierten Zellen und die anschließende Phagozytose erfolgen.

3. Freisetzung von Anaphylatoxinen:

Durch die Freisetzung der Anaphylatoxine C3a und C5a während der Komplementkaskade wird eine inflammatorische Antwort hervorgerufen: Es kommt zur chemotaktischen Migration und Aktivierung von Phagozyten. Damit erfolgt eine Kopplung des humoralen Komplementsystems an den zellulären Arm der Immunabwehr.

Die Aktivität der Komplementkomponenten wird durch ein System von regulatorischen Proteinen kontrolliert. Eine strenge Kontrolle der Regulation ist unabdingbar zur Verhinderung von Gewebsschädigungen infolge einer unbeabsichtigten Bindung aktivierter Komplementkomponenten an Wirtszellen, sowie zur Verhinderung der spontanen Aktivierung von Komplementkomponenten im Plasma.

1.2 Die Anaphylatoxine

1.2.1 Struktur und Funktion der Anaphylatoxine

Die durch spezifische Proteolyse der Vorläufermoleküle C3 und C5 im Verlauf der Komplementkaskade entstandenen aminoterminalen Fragmente der α -Ketten C3a und C5a, sowie dessen C-terminales Abbauprodukt C5adesArg74, bezeichnet man als Anaphylatoxine [1-4].

Strukturell handelt es sich bei den Anaphylatoxinen um kurze, basische ($pI = 8,6 - 9,6$) Polypeptide, wobei C3a eine Länge von 77 [5] und C5a eine Länge von 74 Aminosäuren [6] aufweist. Humanes und aus Ratten gewonnenes C5a trägt einen komplexen Oligosaccharidanteil, der N-glykosidisch mit dem Asparagin an Position 64 verknüpft ist, so daß es sich bei ihnen um Glykoproteine handelt. Zwischen den Anaphylatoxinen besteht eine relativ hohe Sequenzhomologie von ca. 35 – 40%, zwischen den homologen Anaphylatoxinen verschiedener Spezies eine Sequenzhomologie von ca. 65 – 70% [7]. Beim Vergleich der Sequenzen verschiedener Spezies zeigte sich, daß die C-terminale Pentapeptidsequenz der einzelnen Anaphylatoxine hoch konserviert ist: LGLAR bei C3a und MQLGR bei C5a. Unter Verwendung synthetischer Peptide konnte gezeigt werden, daß diese Pentapeptidsequenzen für die Interaktion mit dem entsprechenden Rezeptor und der Auslösung einer funktionellen Antwort von entscheidender Bedeutung sind [8-11]. Daten aus 2D-NMR-spektroskopischen und röntgenkristallographischen Analysen [12-16] ergaben für C3a und C5a eine ähnliche Raumstruktur: Beide Moleküle weisen einen aus drei bzw. vier α -Helices zusammengesetzten Kernbereich auf, der durch drei Disulfidbrücken stabilisiert wird, und aus dem sich der C-Terminus mit wenig geordneter Struktur als „flexibler Finger“ erstreckt. Für C5a konnte allerdings in neueren 2D-NMR-spektroskopischen Analysen gezeigt werden, daß der C-Terminus durch Wechselwirkungen zwischen den Argininen an Position 74 und 62 dazu tendiert, sich in Richtung des Kernbereichs zurückzufalten [17].

Die Anaphylatoxine C3a und C5a sind potente Entzündungsmediatoren, die direkt oder indirekt die typischen Symptome einer Entzündung vermitteln.

Für C5a sind insbesondere folgende Effektorfunktionen zu nennen:

- die Kontraktion glatter Muskulatur [2,18]

- die Steigerung der vaskulären Permeabilität [19,20]
- die Freisetzung von präformierten Mediatoren, wie Histamin aus Ratten-Mastzellen [21], Serotonin [22] und ATP [23] aus Meerschweinchen-Thrombozyten und hydrolytischer Enzyme aus humanen Granulozyten [24]
- die Anregung der Produktion von Cytokinen, wie IL-1 und IL-6, in humanen und murinen Monozyten [25-27]. Da IL-1 insbesondere eine T-Zellaktivierung induziert und IL-6 unter anderem die Differenzierung der B-Zellen zu Antikörper-sezernierenden Plasmazellen beeinflusst, besteht hier eine Verbindung zwischen C5a und der B- und T-Zell vermittelten Immunität.
- die chemotaktische Migration von Granulozyten [28,29], humanen Monozyten [30,31] und humanen Mastzellen [32]
- die Stimulation von Granulozyten zur Produktion und Freisetzung toxischer Sauerstoffmetabolite („oxidative burst“) [33]

Die durch C3a vermittelten Effektorfunktionen sind bislang weniger gut untersucht und scheinen daher, obwohl im allgemeinen ähnlich, etwas weniger vielfältig als die des C5a. C3a vermittelt unter anderem:

- die Kontraktion glatter Muskulatur [2,18]
- die Steigerung der vaskulären Permeabilität [19]
- die Aggregation von Meerschweinchen-Thrombozyten [34]
- die Freisetzung von Serotonin [22] und ATP [23] aus Meerschweinchen-Thrombozyten
- die Freisetzung von β -Glucosaminidase aus Bt₂cAMP-differenzierten U937-Zellen [35]
- die Auslösung, zum Teil unter Beteiligung anderer Cytokine, einer funktionelle Antwort (Calcium-Erhöhung, „oxidative burst“, Histaminfreisetzung etc.) in neutrophilen, basophilen und eosinophilen Granulozyten [35-39]
- die chemotaktische Migration von eosinophilen Granulozyten [40]. Zudem stellt C3a das potenteste derzeit bekannte Chemotaxin für Mastzellen dar [32]
- die Beteiligung an der Regulation der Synthese von Cytokinen, wie TNF- α , IL-1 und IL-6 [41-43].

Über die Regulation der Synthese von Cytokinen greifen die Anaphylatoxine in die Regulation der Immunantwort ein, wobei C3a eher eine negative [44] und C5a eher eine positive Modulation [45] bewirkt.

C3a weist im Vergleich zu C5a eine geringere biologische Aktivität auf, was teilweise durch die weit höhere maximal mögliche C3a-Konzentration im Serum ausgeglichen werden kann.

Ein weiteres kleines Spaltprodukt, das bei der Aktivierung des Komplementsystems über den klassischen Weg gebildet wird, ist das C4a. Humanes C4a wurde bisher neben C3a und C5a als drittes Anaphylatoxin gesehen aufgrund seiner hohen Sequenz- und Strukturhomologie und seiner proinflammatorischen Effektorfunktionen (Kontraktion glatter Muskulatur, Erhöhung der vaskulären Permeabilität, Degranulation von Thrombozyten und Stimulation von Granulozyten zur Produktion und Freisetzung toxischer Sauerstoffmetabolite) im Meerschweinchensystem [46-49]. Im humanen System konnten bisher keine überzeugenden C4a-vermittelten Effekte gezeigt werden. Es wurde lediglich beschrieben, daß C4a in extrem niedriger Konzentration (10^{-16} M) die C3a-induzierte Chemotaxis von Makrophagen inhibiert [50], und daß C4a und C4a-analoge synthetische Peptide nach Injektion eine Dosis-abhängige Hautreaktion hervorrufen, wobei keine Negativkontrollen durchgeführt wurden [46,51]. Offen ist die Frage, ob C4a seine Effektorfunktionen über einen eigenständigen Rezeptor oder über den C3aR entfaltet. Einige Untersuchungen sprechen für das Vorliegen eines eigenständigen C4aR: Nach Präinkubation von Meerschweinchen-Makrophagen mit hC4a konnte keine Desensibilisierung der C3a-induzierten Antwort gefunden werden, und hC4a inhibiert nicht die Bindung von ^{125}I -markiertem C3a auf Meerschweinchen-Makrophagen [49]. Daten aus Kreuzdesensibilisierungsexperimenten deuten eher daraufhin, daß hC4a seine Effekte über den Meerschweinchen-C3aR entfaltet. Im ATP-Freisetzungstest am Meerschweinchen-Thrombozyten konnte gezeigt werden, daß nach Stimulation der Thrombozyten mit substimulatorischen Mengen eines C3a-analogen synthetischen Peptids die Thrombozyten in einen refraktären Zustand (Tachyphylaxie) fallen, in dem die Nachstimulation mit hC3a zu keiner meßbaren ATP-Freisetzung führt. Die Nachstimulation mit hC5a führt zu einer ATP-Freisetzung, nicht aber die Nachstimulation mit hC4a. Ebenso zeigte sich die C3a-abhängige ATP-Freisetzung inhibierbar durch Prästimulation mit hC4a [52]. Weiterhin konnte gezeigt werden, daß die Thrombozyten des phänotypisch C3aR-negativen Meerschweinchenstammes C2BB/R⁻ nicht mit ATP-Freisetzung nach Stimulation mit C4a reagieren [52]. Eine Kreuzdesensibilisierung konnte auch bei Kontraktionsassays im Meerschweinchensystem zwischen C4a und C3a, aber nicht zwischen C4a und C5a beobachtet werden [46,48]. Da es sich bei der Tachyphylaxie um einen der Rezeptoraktivierung nachgeschalteten Mechanismus handelt, wie z.B. beim C5aR/fMLPR-System beschrieben [53], ist auch durchaus eine

Kreuzdeaktivierung zwischen dem C3aR und einem Rezeptor für C4a denkbar. Weitere Untersuchungen zeigten, daß hC4a seine Effektorfunktionen über den Meerschweinchen-C3aR, nicht aber über den hC3aR vermitteln kann: hC4a bindet an beide Rezeptoren schwach, kann aber nur nach Bindung an den Meerschweinchen-C3aR eine funktionelle Calciumantwort in transient transfizierten HEK293-Zellen auslösen [52].

Zum Schutz des Organismus vor einer ihn schädigenden durch die Anaphylatoxine vermittelten inflammatorischen Immunantwort müssen die Anaphylatoxine einer strengen Kontrolle unterliegen: Die im Serum vorhandene Carboxypeptidase N entfernt den C-terminalen Argininrest unter Ausbildung der desArg-Derivate [54], wobei C3a seine biologische Aktivität vollständig und C5a zu über 90% verliert (aufgrund seiner Restaktivität wird das C5adesArg74 zu den Anaphylatoxinen gezählt). Kürzlich wurden auch einige durch C3adesArg77 vermittelte Effektorfunktionen beschrieben [43,55-57], wobei jedoch eine Kontamination des verwendeten C3adesArg77 mit C3a bzw. C5a nicht ausgeschlossen werden kann.

Trotz der strengen Kontrolle des Körpers kann es zu einer fehlerhaften oder überschießenden Komplementaktivierung und damit zu einer Überproduktion von Anaphylatoxinen 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 [Übersicht:7]. Als Krankheitsbilder können in diesem Zusammenhang der systemische Lupus erythematoses (SLE) [58], das akute respiratorische Atemnotsyndrom des Erwachsenen (ARDS) [59], die rheumatoide Arthritis [60] und die Psoriasis genannt [61,62] werden. Außerdem gibt es Evidenzen, daß Anaphylatoxine zur Entstehung von Reperfusionsschäden bei Organ-Ischämie beitragen [63,64]. In einer C5aR-Knock-Out-Maus konnte kürzlich die entscheidende Bedeutung des C5a bei der Abwehr von durch *Pseudomonas aeruginosa* hervorgerufenen Lungeninfektionen gezeigt werden [65]. 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 [66,67] und die Amöbe *Entamoeba histolytica* Anaphylatoxin-spezifische Proteasen [68]. Aufgrund ihrer pathophysiologischen Bedeutung sind weitere Untersuchungen der Anaphylatoxine und ihrer Rezeptoren von großer Wichtigkeit.

1.2.2 Rezeptoren der Anaphylatoxine

Die Anaphylatoxine entfalten ihre Wirkung über membranständige Rezeptoren. Der humane C5a-Rezeptor (hC5aR) wurde bereits 1991 kloniert [69,70], wohingegen die Klonierung des humanen C3a-Rezeptors (hC3aR) erst 1996 erfolgte [71-73]. Beide Rezeptoren lassen sich in die Rhodopsin-Superfamilie der G-Protein gekoppelten Rezeptoren einordnen, die sich unter anderem durch eine Struktur von sieben hydrophoben transmembranen Domänen auszeichnen, die durch hydrophile extra- und intrazelluläre Loops miteinander verbunden sind. Der N-Terminus liegt dabei extrazellulär und der C-Terminus intrazellulär. Die Signalübertragung der aktivierten Rezeptoren ins Zellinnere erfolgt durch G-Proteine. Der humane C3aR besteht aus 482 Aminosäuren und weist im Vergleich zu allen anderen bisher bekannten G-Protein gekoppelten Rezeptoren einen außergewöhnlich großen zweiten extrazellulären Loop auf, der mit ca. 172 Aminosäuren gut ein Drittel des gesamten Rezeptormoleküls ausmacht. Sequenzanalysen zeigen eine hohe Homologie zwischen dem humanen C3aR, dem humanen C5aR und dem zur selben Superfamilie gehörenden formyl-Met-Leu-Phe (fMLP) –Rezeptor [74]: Unter Vernachlässigung des zweiten extrazellulären Loops von Aminosäureposition 162 bis 344 konnte 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 [72].

Untersuchungen zu Bindungsstellen des C5a/C5aR-Systems zeigten, daß mindestens zwei getrennte Bereiche im C5a-Liganden an der Rezeptorbindung beteiligt sind: Zum einen scheinen Aminosäuren des C-Terminus mit dem Rezeptor zu interagieren, und dadurch die Effektorfunktion des C5a zu bedingen, und zum anderen scheint es durch Bindung von Aminosäuren des Kernbereichs zu einer Erhöhung der Affinität zu kommen [75-81]. Im Hinblick auf diese Daten wurden auch beim C5aR mindestens zwei Bindungsstellen erwartet. Es konnte gezeigt werden, daß die Bindung des Kernbereichs des C5a beim C5aR über eine Bindungsstelle am N-Terminus erfolgt [82,83]. Die weitere, mit dem C-Terminus des Liganden interagierende Bindungsstelle, die wahrscheinlich auch die Aktivierungsstelle ist, wird im Bereich des zweiten extrazellulären Loops in Aminosäureposition Glu199 [84] und im Bereich der fünften transmembranen Domäne in Aminosäureposition Arg206 [85] beschrieben. Dabei wird Glu199 des Rezeptors als Wechselwirkungspartner des Lys68 im Liganden angesehen und Arg206 als Wechselwirkungspartner des Arg74 im Liganden.

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 [86]. Diese Daten stehen im Widerspruch zu Daten, daß ein Aminosäure 185 – 193 erkennender scFv die Bindung des Liganden und eine funktionelle Calciumantwort nicht inhibieren kann [87]. Weiterhin 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 [86,88]. Bei einem um ungefähr ein Drittel verkürzten zweiten extrazellulären Loop wurde jedoch noch eine C3a-Bindung und Calciumantwort beschrieben [86], was wiederum eher gegen eine Funktion in der Ligandenbindung spricht. Durch Untersuchungen mit N-terminalen Deletionsmutanten konnte gezeigt werden, daß der hC3aR den original N-Terminus nicht für eine hoch affine Bindung von C3a und anschließender Aktivierung durch C3a benötigt [88]. Durch Austausch des C3aR N-Terminus gegen den C5aR N-Terminus wurde ein C3a/C5a-Rezeptor-Hybrid generiert, das sowohl C3a als auch C5a binden kann, und bei dem es nach Bindung beider Liganden zur Auslösung einer funktionellen Calciumantwort kommt [86,88]. Weiterhin wird nach Durchführung von Mutageneseexperimenten, bei denen einzelne Aminosäuren in den transmembranen Helices ausgetauscht wurden, eine Beteiligung der geladenen Argininreste bei Position 161, 340 und 417 postuliert [89].

Durch die Gabe einer substimulierenden Dosis des Liganden konnte sowohl beim C3aR als auch beim C5aR eine Rezeptordeaktivierung (Tachyphylaxie) beobachtet werden [90], was einen weiteren Regulationsmechanismus der Anaphylatoxinaktivität darstellt.

Die Expression des hC5aR konnte durch Northernanalysen und auch phänotypisch unter Verwendung spezifischer polyklonaler Antiseren und monoklonaler Antikörper in Monozyten, neutrophilen, basophilen und eosinophilen Granulozyten [91-94] und einigen Geweben (Lunge, Leber, Herz, Milz, Darm, Niere und Gehirn) nachgewiesen werden [95-100]. Kürzlich wurden Evidenzen für die Expression des C5aR auf humanen T- und B-Lymphozyten beschrieben [101,102], obwohl diese bisher als C5aR-negativ gesehen wurden [91].

Seit seiner Entdeckung wurde ein immer breiteres Expressionsspektrum des C3aR im humanen System gefunden. Unter anderem konnte der C3aR in verschiedenen Hirnregionen, Herz,

Lunge, Lymphknoten, Knochenmark, Milz und Plazenta nachgewiesen werden, wobei die C3aR-tragenden Zelltypen in den Geweben kaum identifiziert sind. Die Tabelle 1.1 zeigt eine Zusammenfassung von Ergebnissen aus Northernanalysen [71-73]:

Gewebe		Gewebe		Gewebe	
Hirn:		Hirn:		Schilddrüse	(+)
Cerebellum	++	Thalamus	±	Herz	+
Cortex	++	Nucleus subthalamicus	±	periphere Leukozyten	++
Medulla	++	Substantia nigra	±	Nebenniere	+
Rückenmark	++	Lunge	+++	Fetale Leber	++
Okzipitalhirn	±	Leber	-	Magen	(+)
Frontalhirn	++(+)	Skelettmuskulatur	-	Plazenta	+++
Temporalhirn	++	Niere	+	Lymphknoten	+++
Putamen	+	Pankreas	-	Knochenmark	+++
Corpus amygdaleum	+	Milz	+++	Appendix	++
Nucleus caudatus	+	Thymus	+	Colon	+(+)
Corpus callosum	++	Prostata	±	Ovarien	++
Hippocampus	++(+)	Testis	(+)	Dünndarm	-/++

Tab. 1.1: Expression des humanen C3a-Rezeptors im menschlichen Gewebe (Northernanalysen)

Die durch Daten aus Northernanalysen aufgezeigte breite Expression des C3aR im Gehirn, konnte durch immunhistochemische Analysen bestätigt werden und gleichzeitig konnten dabei C3aR-tragende Zelltypen identifiziert werden. 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 [103-105]. Auch auf einer Reihe von neuronalen Zelllinien, insbesondere Astrocytomazelllinien, konnte eine C3aR-Expression durch FACS-Analysen und Analysen auf mRNA-Ebene durch RT-PCR nachgewiesen werden [103,106,107].

Kürzlich konnte auch das Expressionsmuster des C3aR auf humanen peripheren Leukozyten ermittelt werden: Der C3aR ist auf Granulozyten und Monozyten, nicht aber auf B- und T-Lymphozyten exprimiert [108]. 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 C3aRmRNA in humanen T-Lymphozyten nachgewiesen werden [109] 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 [110]. Außerdem konnte der C3aR auf CD4⁺ oder CD8⁺ T-Zellklonen aus Patienten mit atopischer Dermatitis und allergischer Kontaktdermatitis auf mRNA- und Proteinebene detektiert werden [109].

Neben IL-2 sind 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 [111]. Einige Daten sprechen auch für die Hochregulation der C3aR-Expression nach Oncostatin M (OSM)-Stimulation: In den Zellkulturüberstand sezerniertes OSM bewirkt eine schwache Hochregulation der hC3aR-Expression in mit einer cDNA-Bank transient transfizierten HEK293-Zellen [bisher unveröffentlicht; Dissertation:112].

Neben der Sequenz des humanen C3aR wurden vor kurzem auch die Sequenzen des murinen C3aR [113-115], des Ratten-C3aR [116] und des Meerschweinchen-C3aR [52,117] publiziert, wobei – den zweiten extrazellulären Loop ausgenommen – hohe Homologien zwischen den Rezeptoren der verschiedenen Spezies vorliegen.

Untersuchungen zur genomischen Organisation des humanen [118] und murinen [115] C3aR zeigen, daß es sich bei beiden um „single copy“ Gene handelt, wobei das humane Gen auf Chromosom 12p13 lokalisiert ist und das murine auf Chromosom 6pF1. Die genomische Organisation beider Rezeptoren ist sehr ähnlich und stimmt mit der genomischen Organisation der meisten bisher bekannten chemoattractanten Rezeptoren überein: Exon 1, in dem der Hauptteil der 5'-UTR liegt, wird von Exon 2, in dem der vollständige offene Leserahmen und die 3'-UTR liegen, durch ein Intron getrennt. Im murinen System wird ein TATA-loser Promotor postuliert [115].

1.3 Zielsetzung

Als potente Entzündungsmediatoren vermitteln die Anaphylatoxine C3a und C5a direkt oder indirekt die typischen Symptome der Entzündungsreaktion. Mit der Zeit – insbesondere seit der Entdeckung der Rezeptoren – wurden immer mehr durch Anaphylatoxine vermittelte Effektorfunktionen und ein immer breiteres Expressionsspektrum im humanen System gefunden, was auf eine hohe physiologische Bedeutung der Anaphylatoxine hinweist. Weitere Forschungen auf dem Gebiet der Anaphylatoxine und ihrer Rezeptoren lassen auf ein besseres Verständnis des Entzündungsprozesses hoffen und damit auch auf die Möglichkeit, die durch Anaphylatoxine vermittelten pathophysiologischen Funktionen zu beeinflussen.

Im Hinblick auf die Klärung der (patho-) physiologischen Bedeutung des Anaphylatoxins C3a sollten in dieser Arbeit Untersuchungen zur Expression des hC3aR gemacht werden:

1. *Charakterisierung eines murinen monoklonalen gegen den zweiten extrazellulären Loop des C3aR gerichteten Antikörpers und Identifizierung von Zielzellen des C3a in verschiedenen Geweben.*

Die Eignung des gegen den zweiten extrazellulären Loop generierten monoklonalen 8H1-Antikörper zur Detektion des hC3aR sollte in Untersuchungen unter nativen und denaturierenden Bedingungen (Westernblot, indirekte Immunfluoreszenz, FACS- und immunhistochemischen Analysen) erfaßt werden. Schließlich sollten durch immunhistochemische Untersuchungen die Zielzellen des C3a in verschiedenen Geweben identifiziert werden.

2. *Untersuchungen zur Funktion des zweiten extrazellulären Loops des C3aR.*

Da die Funktion des im Vergleich zu allen anderen bisher bekannten G-Protein gekoppelten Rezeptoren außergewöhnlich großen zweiten extrazellulären Loops des C3aR bisher unbekannt ist, sollte untersucht werden, ob seine Funktion in der Bindung eines zweiten Liganden liegt.

3. *Untersuchungen zur Regulation der C3aR-Expression.*

Die 5'-UTR des hC3aR, in der der Promotor zu vermuten ist, sollte isoliert und sequenziert, die Sequenz auf putative Bindungsstellen für Transkriptionsfaktoren analysiert und der Transkriptionsstartpunkt bestimmt werden. Desweiteren sollte ein Reporterassay zur Untersuchung der Promotoraktivität verschiedener 5'-UTR-Konstrukte etabliert und Untersuchungen zur Cytokin-vermittelten Regulation des hC3aR durchgeführt werden.

2. Materialien und Methoden

2.1 Ausgangsmaterialien

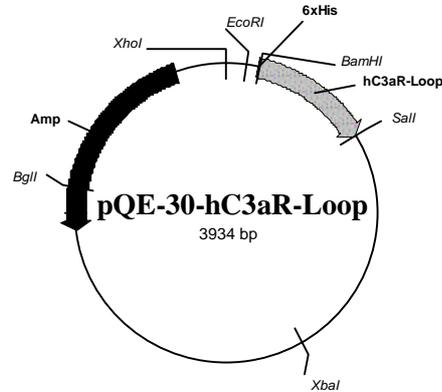
Als Ausgangsmaterialien standen in der Arbeitsgruppe zur Verfügung:

2.1.1 Monoklonaler 8H1-Antikörper

Gegen den zweiten extrazellulären Loop des hC3aR gerichtete monoklonale Antikörper wurden im Rahmen meiner Diplomarbeit (Herstellung und Charakterisierung von Antikörpern gegen den humanen C3a-Rezeptor, 1997, B. Sohns) generiert.

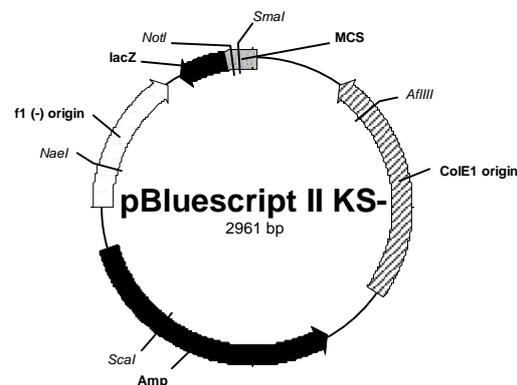
BALB/c-Mäuse wurden durch intraperitoneale Injektion eines GST-hC3aR-Loop-Fusionsproteins immunisiert. In 3-Wochen-Intervallen wurde die 1. und die 2. Boosterung durchgeführt. Vier Wochen nach der 2. Boosterung erfolgte die terminale Boosterung durch intrasplenale Injektion des Fusionsproteins. Drei Tage später wurde die Milz entnommen und die vorhandenen B-Lymphozyten mit den Myelomazellen P3X63Ag8.653 unter Einwirkung von PEG fusioniert. Die Selektion von Hybridomazellen erfolgte durch Verwendung HAT-haltigen Mediums. Die antikörperhaltigen Überstände der Hybridomazellklone wurden in einem indirekten ELISA unter Verwendung eines MBP-hC3aR-Loop-Fusionsproteins und eines alkalische Phosphatase gekoppelten Anti-Maus Antikörpers (ImmunoPure) auf ihre Spezifität getestet. Positive Klone wurden zweimal durch Verdünnung vereinzelt und die Immunglobulin-Subklasse unter Verwendung des Mouse Hybridoma Subtyping Kits (Boehringer Mannheim) bestimmt. Ein monoklonaler Antikörper der Subklasse IgG1 (genannt 8H1), der eine besonders hohe Spezifität im ELISA und ein gutes Wachstum aufwies, wurde im Rahmen dieser Arbeit weiter charakterisiert.

2.1.2 pQE-30-hC3aR-Loop



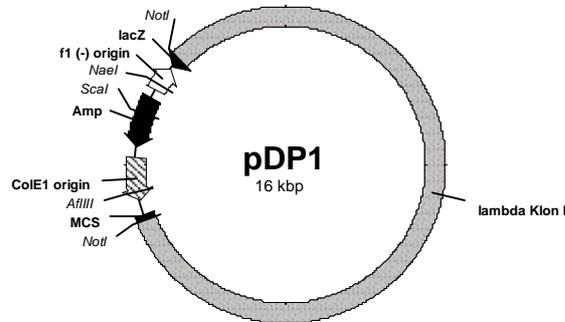
Als bakterielles Expressionsplasmid zur Expression des N-terminal 6 x His-getaggten zweiten extrazellulären Loops des hC3aR wurde das Plasmid pQE-30-hC3aR-Loop verwendet. Es wurde durch Klonierung des hC3aR-Loops über *Bam*HI und *Sal*I in pQE-30 (Qiagen) generiert (Diplomarbeit: Herstellung und Charakterisierung von Antikörpern gegen den humanen C3a-Rezeptor, 1997, B. Sohns).

2.1.3 pBluescript II KS-



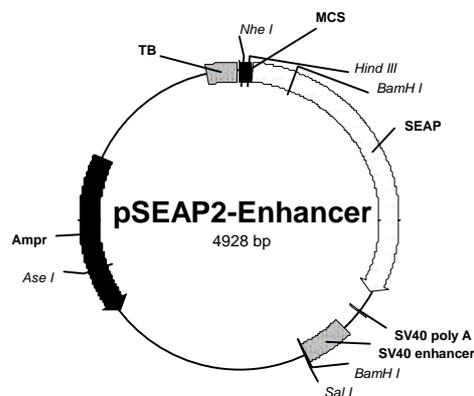
Der pBluescript II KS- Vektor wurde zur Subklonierung von 5'-RACE-Fragmenten und deren anschließender Sequenzierung verwendet.

2.1.4 pDP1



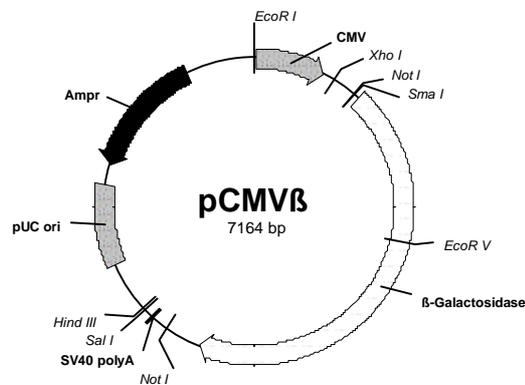
Für die Promotoranalysen standen der aus einer humanen genomischen DNA-Bank isolierte 5'-flankierende Bereich des humanen C3aR in Form mehrerer überlappender λ -Klone zur Verfügung. In dem von D. Paral im Rahmen ihrer Dissertation generiertem Plasmid pDP1 lag ein ungefähr 12 kb große Bereich der 5'-UTR des hC3aR aus λ -Klon 1 in pBluescript II KS- (Stratagene) vor. pDP1 wurde für die Sequenzierung von Teilen der 5'-UTR und als Matrize für die Klonierung von potentiellen Promotorkonstrukten eingesetzt.

2.1.5 pSEAP2-Enhancer



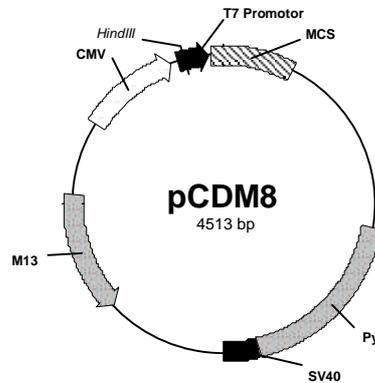
Für die Klonierung von Promotorkonstrukten und dem anschließenden Einsatz in einem Reporterassay wurde der promotorlose pSEAP2-Enhancer-Vektor (Clontech) verwendet, der eine ins Medium sezernierte alkalische Phosphatase (SEAP) als Reporter gen trägt. Nach Klonierung funktionsfähiger Promotorkonstrukte erwartet man eine Erhöhung der SEAP-Aktivität im Vergleich zum Leervektor.

2.1.6 pCMV β



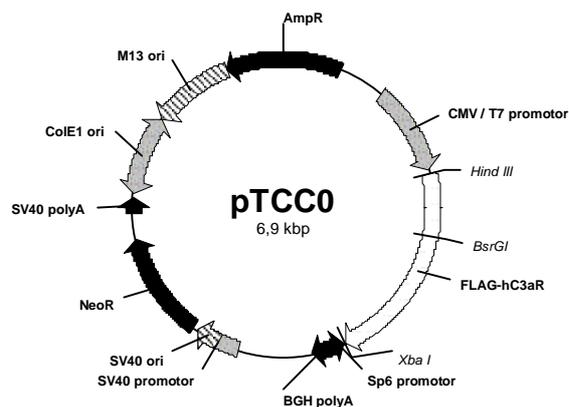
Aufgrund schwankender Transfektionseffizienzen bei unterschiedlichen Transfektionen mußte eine Normalisierung des SEAP-Assays durchgeführt werden. Dazu wurde neben dem Promotorkonstrukt in pSEAP2-Enhancer ein zweiter Vektor mit einem anderen Reporter gen kotransfiziert. Es wurde der pCMV β -Vektor (Clontech) verwendet, der neben dem CMV-Promotor β -Galactosidase als Reporter gen aufweist. Die gemessene β -Galactosidase-Aktivität wurde dann zum Abgleich der Transfektionseffizienzen verwendet.

2.1.7 pCDM8



Die Generierung eines Positivkontrollplasmids für den SEAP-Assay erfolgte durch Subklonierung des CMV-Promotors in pSEAP2-Enhancer. Der CMV-Promotor wurde dazu aus dem eukaryotischen Expressionsvektor pCDM8 (Invitrogen) amplifiziert und subkloniert.

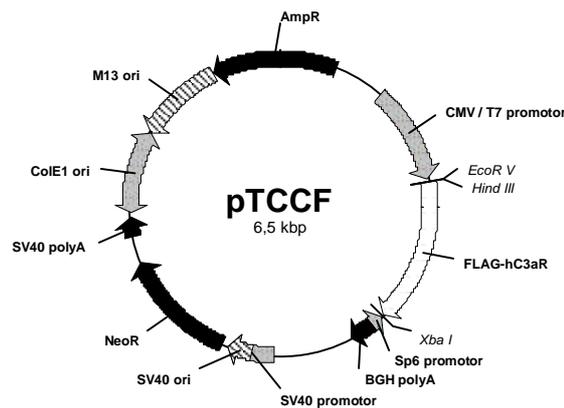
2.1.8 pTCC0



pTCC0 wurde als eukaryotisches Expressionsplasmid und zur Herstellung DIG-markierter RNA-Sonden verwendet. Es wurde aus pcDNA3 (Invitrogen) durch Subklonierung der hC3aR-Sequenz mit zusätzlichen Restriktionsschnittstellen, einem FLAG und einem Bereich der 5'-

UTR des hC5aR generiert (Dissertation: Die Anaphylatoxine C3a und C5a und ihre zellulären Rezeptoren: Molekulare Untersuchungen zur Ligand/Rezeptor-Interaktion, 1999, T. Crass).

2.1.9 pTCCF



Das ebenfalls von T. Crass im Rahmen seiner Dissertation (Die Anaphylatoxine C3a und C5a und ihre zellulären Rezeptoren: Molekulare Untersuchungen zur Ligand/Rezeptor-Interaktion, 1999) hergestellte Plasmid pTCCF setzt sich aus pcDNA3 (Invitrogen), der Sequenz des hC5aR mit zusätzlichen Restriktionsschnittstellen, einem FLAG und einem Bereich der 5'-UTR des hC5aR zusammen. Dieser eukaryotische Expressionsvektor wurde als Negativkontrolle bei der Charakterisierung des gegen den hC3aR-Loop gerichteten monoklonalen 8H1-Antikörpers eingesetzt.

2.2 Puffer, Lösungen und Nährmedien

2.2.1 Puffer und Lösungen

Ampli-Puffer	50 mM TRIS·HCl pH 7,5 mit 0,15 M NaCl; mit NaCl auf eine Leitfähigkeit von 15 mS/cm eingestellt
	* * *
<i>β-Galactosidase Assay Kit (Stratagene)</i>	
Puffer A	25 mM MOPS, 100 mM NaCl, 10 mM MgCl ₂ , pH 7,5
Lysepuffer	0,25 M TRIS·HCl pH 7,4, 0,25% [v/v] NP-40, 2,5 mM EDTA
CPRG-Substratlg.	3% [w/v] Chlorophenolrot-β-D-galactopyranosid in Puffer A
	* * *
10% Blockingreagenz	10% [w/v] Blockingreagenz (Boehringer Mannheim) 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 [(3-(4-Methoxyspiro{1,2-dioxethan-3,2'-(5'-chlorotricyclodecan)-4-yl)phenylphosphat, Dinatriumsalz; Boehringer Mannheim] in CSPD-Detektionspuffer
DEPC-H ₂ O	0,2% [v/v] Diethylpyrocarbonat (AppliChem) in Aqua dest.
FPLC-Puffer A1	30 mM Ammoniumacetat-Puffer pH 4,0, entgast, mit 0,1% [v/v] Trifluoressigsäure
FPLC-Puffer A2	10 mM Natriumphosphat pH 7,0
FPLC-Puffer B1	60 mM Ammoniumacetat-Puffer pH 4,0, entgast, mit Acetonitril zu einer Endkonzentration von 60% [v/v] versetzt; dazu 0,1% [v/v] Trifluoressigsäure
FPLC-Puffer B2	100 mM Glycinpuffer pH 2,7
GEBS	50 mM EDTA pH 8,0 mit 1% [w/v] SDS, 30% [v/v] Glycerin, 2,5 g/L Bromphenolblau
6%ige Gelstammlösung für Sequenzgele	7 M Harnstoff, 6% [v/v] Polyacrylamidlösung (40% [w/v], Roth), 1 x TBE für Sequenziergele

HAG-CM	20 mM HEPES pH 7,4 mit 125 mM NaCl, 5 mM KCl, 1 mM CaCl ₂ , 0,25% [w/v] BSA und 0,5 mM Glucose
2 x HBS	280 mM NaCl, 1,5 mM Na ₂ HPO ₄ , 100 mM HEPES-Säure, pH 7,2
Hybridisierungspuffer	5 x SSC, 50% [v/v] Formamid, 0,1% Na-Lauroylsarcosin, 0,02% SDS, 2% Blockingreagenz
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
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

* * *

Plasmid-Midipräparationspuffer (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] Trition-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

* * *

Puffer zur Aufreinigung von His-getaggen Proteinen

Puffer B	8 M Harnstoff, 0,1 M NaH ₂ PO ₄ , 10 mM TRIS, 2 mM β-Mercaptoethanol, pH 8,0
Puffer C	8 M Harnstoff, 0,1 M NaH ₂ PO ₄ , 10 mM TRIS, 2 mM β-Mercaptoethanol, pH 6,3
Puffer D	8 M Harnstoff, 0,1 M NaH ₂ PO ₄ , 10 mM TRIS, 2 mM β-Mercaptoethanol, pH 5,9

Puffer E	8 M Harnstoff, 0,1 M NaH ₂ PO ₄ , 10 mM TRIS, 2 mM β-Mercaptoethanol, pH 4,5 * * *
Quicky-Puffer	40% [v/v] Glycerin mit 0,25% [w/v] Bromphenolblau
SDS-Aufschlußpuffer	2% [w/v] SDS, 12,5% [v/v] Glycerin, 0,3 g/L Bromphenolblau, 5% [v/v] 2-Mercaptoethanol in SDS-Gellösung D
SDS-Gellsg. A	30% [w/v] Acrylamid und 0,8% [w/v] N,N'-Methylendiacrylamid in Aqua dest.
SDS-Gellsg. B	1,5 M TRIS·HCl pH 8,8
SDS-Gellsg. C	10% [w/v] SDS in Aqua dest.
SDS-Gellsg. D	0,5 M TRIS·HCl pH 6,8
SDS-Laufpuffer	50 mM TRIS, 0,4 M Glycin, 0,1% [w/v] SDS; pH 8,5
SDS-Sammelgellsg.	10% [v/v] SDS-Gellsg. A, 25% [v/v] SDS-Gellsg. D, 1% [v/v] SDS-Gellsg. C
SM-Puffer	100 mM TRIS·HCl pH 7,5, 10 mM MgSO ₄ , 50 mM NaCl, 0,01% Gelantine
20 x SSC	3 M NaCl, 0,3 Na-Citrat, pH 7,0
1 x TE	10 mM TRIS·HCl pH 7,4, 0,1 mM EDTA
10 x TBE für Agarose-Gele	0,9 M TRIS, 0,9 M Borsäure, 0,2 mM EDTA
10 x TBE für Sequenzgele	1 M TRIS, 1 M Borsäure, 20 mM EDTA
TBS	50 mM TRIS·HCl pH 7,5 mit 200 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.

2.2.2 Nährmedien

LB-Medium	1% [w/v] Bacto-Trypton (Difco), 0,5% [w/v] Hefeextrakt (Merck), 1% [w/v] NaCl, pH 7,5
LB-Agar	LB-Medium mit 1,5% Bacto-Agar (Difco)
LB-Topagarose	LB-Medium mit 0,7% Agarose (GibcoBRL)
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 MgCl ₂ , 10 mM MgSO ₄ , 20 mM Glucose

Bei Zusatz von Antibiotika wurden folgende Endkonzentrationen verwendet:

Ampicillin 80 µg/ml (Stammlösung 100 g/l in Aqua dest.), Chloramphenicol 34 µg/ml (Stammlösung 34 g/l in Ethanol) 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.

2.3 Organismen

2.3.1 Bakterien

Stamm	Genotyp
<i>E. coli</i> GM2163 (New England Biolabs)	F ⁻ <i>ara-14 leuB6 thi-1 fhuA31 lacY1 tsx-78 galK2 galT22 supE44 hisG4 rpsL136(Str^R) xyl-5 mtl-1 dam13::Tn9(Cam^R) dcm-6 mcrB1 hsdR2(r_k⁻ m_k⁺) mcrA</i>
<i>E. coli</i> SG13009[pREP4] (Qiagen)	F ⁻ <i>lac⁻ ara⁻ gal⁻ mtl⁻ recA⁺ uvr⁺ Nal^S Str^S rif^S {pREP4: Neo^R}</i>
<i>E. coli</i> XL1-Blue (Clontech)	<i>endA1 gyrA96 hsdR17(r_k⁻ m_k⁺) lac recA1 relA1 supE44 thi-1 F['][<i>proAB lacI^qZΔM15 Tn10(Tet^R)</i>]</i>

2.3.2 Eukaryotische Zelllinien

Die eukaryotischen Zelllinien wurden bei 37°C und 5% CO₂ im Brutschrank gehalten. Die Inaktivierung des fetalen Kälberserums (Sigma) erfolgte durch 30minütiges Erhitzen bei 56°C. Penicillin (Sigma) wurde in einer Endkonzentration von 50 U/ml und Streptomycin (Sigma) in einer Endkonzentration von 50 µg/ml eingesetzt. Die verwendeten Medien wurden von Biochrom KG und GibcoBRL bezogen.

Zelllinie	Beschreibung	Medium
GLC4	Humane Zelllinie, die aus einem kleinzelligen Lungenkarzinom abgeleitet wurde [Zijlstra, J. E. et al. (1987): <i>Cancer Res.</i> 47 : 1780 – 1784].	DMEM mit 10% FCS, Penicillin und Streptomycin
HEK293 (ATCC CRL 1573)	Humane frühembryonale Nierenzelllinie; transformiert mit gescherter DNA des humanen Adenovirus Typ 5 (Ad 5) [J. Gen. Virol. (1977): 36 : 59; <i>Virology</i> (1977): 77 : 319].	DMEM NutMix F12 mit 10% FCS, 1 mM Natriumpyruvat, 2 mM Glutamin, Penicillin und Streptomycin
HeLa229 (ATCC CCL 2.1)	Humane Zelllinie mit epithelartiger Morphologie, die aus einem Cervix-Karzinom isoliert wurde; wurde aus HeLa (ATCC CCL 2 [Grey, G. O. et al. (1952): <i>Cancer Res.</i> 12 : 264]) generiert, ist jedoch relativ unempfindlich für Polioviren.	DMEM mit 10% FCS, Penicillin und Streptomycin
HeLaT	Humane Zelllinie epithelartiger Morphologie, die aus einem Cervix-Karzinom isoliert wurde; weist hohe Transformationseffizienz auf [Fr. Prof. Dr. R. Heilbronn, FU Berlin].	DMEM mit 10% FCS, Penicillin und Streptomycin
HL-60 (ATCC CCL 240)	Etabliert aus Zellen einer 36jährigen Kaukasierin mit akuter promyelogenischer Leukämie [Collins et al. (1977): <i>Nature</i> 270 : 347 – 349].	RPMI 1640 mit 10% FCS, Penicillin und Streptomycin
HMC-1	Humane Mastzelllinie, die aus leukämischen Mastzellen generiert wurde [Butterfield, J. H. et al. (1988): <i>Leuk. Res.</i> 12 : 345].	RPMI 1640 mit 10% FCS, Penicillin und Streptomycin
IMR-32 (ATCC CCL 127)	Humane Neuroblastomazelllinie, die aus Zellen eines einjährigen Kaukasiers gewonnen wurde; Mischkultur aus kleinen Fibroblastenähnlichen und großen Neuroblastenähnlichen Zellen [Tumilowicz et al. (1970): <i>Cancer Res.</i> 30 : 2110].	DMEM mit 10% FCS, Penicillin und Streptomycin

<p>KG-1 (ATCC CCL 246)</p>	<p>Humane Zelllinie, die aus dem Knochenmark eines an akuter myeloischer Leukämie erkrankten 59jährigen Kaukasier gewonnen wurde, vielfältige Morphologie, hauptsächlich Myeloblasten und Promyeloblasten [Koeffler, H. P. und Golde, D. W. (1978): <i>Science</i> 200: 1153-1154].</p>	<p>RPMI 1640 mit 10% FCS, Penicillin und Streptomycin</p>
<p>SK-N-MC (ATCC HTB 10)</p>	<p>Humane Neuroblastomazelllinie aus einer Metastase des supra-orbitalen Bereichs einer 14jährigen Kaukasierin; Epithel-ähnliche Morphologie.</p>	<p>DMEM mit 10% FCS, 1 mM Natriumpyruvat, Penicillin und Streptomycin</p>
<p>SK-N-SH (ATCC HTB 11)</p>	<p>Humane Neuroblastomazelllinie aus einer Metastase des Knochenmarks eines vierjährigen Mädchens.</p>	<p>DMEM mit 10% FCS, 1 mM Natriumpyruvat, Penicillin und Streptomycin</p>
<p>SW1573</p>	<p>Humane Zelllinie, die aus einem squamösen Lungenkarzinom abgeleitet wurde [Wanamarta et al. (1989): <i>J. Cancer Res. Clin. Oncol.</i> 115: 340 – 344].</p>	<p>DMEM mit 10% FCS, Penicillin und Streptomycin</p>
<p>U-87 MG (ATCC HTB 14)</p>	<p>Humane Glioblastomazelllinie [Ponten, J. et al. (1968): <i>Acta Pathol. Microbiol. Scand.</i> 74: 465 - 486].</p>	<p>DMEM mit 10% FCS, Penicillin und Streptomycin</p>
<p>U937 (ATCC CRL 1593)</p>	<p>Humane histiocytäre Lymphoma-Zelllinie, die aus malignen Zellen eines 37jährigen Kaukasiers gewonnen und charakterisiert wurde; Expression vieler monozytärer Zellmarker; Differenzierung in ein Monozyten-ähnliches Stadium induzierbar. [Sundstrom C., Nillson, K. (1976): <i>Int. J. Cancer</i> 17: 565]</p>	<p>RPMI 1640 mit 10% FCS, Penicillin und Streptomycin</p>

2.4 Methoden

2.4.1 Methoden zum Arbeiten mit DNA und RNA

2.4.1.1 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Die PCR [119] ist ein in vitro-Verfahren zur selektiven Anreicherung von Nukleinsäure-Sequenzen aus einem Gemisch von Nukleinsäuren. Mit Hilfe zweier synthetischer Oligonukleotid-Primer, die die terminalen Bereiche der zu amplifizierenden Sequenz komplementär flankieren, und der thermostabilen *Taq*-Polymerase wird in einer sich wiederholenden dreiteiligen Reaktion aus Hitze-Denaturierung der doppelsträngigen DNA, Primer-Annealing und Extension eine exponentielle selektive Amplifikation erreicht.

Reaktionsansatz:

10	µl 10x PCR-Puffer (GibcoBRL)	(1 x im Ansatz)
10	µl 10 µM Primer 1	(Konzentration im Ansatz: 1 µM)
10	µl 10 µM Primer 2	(Konzentration im Ansatz: 1 µM)
10	µl dNTP-Mix (je 2 mM; Pharmacia)	(Konzentration im Ansatz: je 200 µM)
3	µl 50 mM MgCl ₂ (GibcoBRL)	(Konzentration im Ansatz: 1,5 mM)
0,5	µl Taq-DNA-Polymerase (Gibco; 5 U/µl)	(2,5 U im Ansatz)
1	ng DNA-Matrize	
	Aqua dest. ad 100 µl	

Es erfolgte zum Schutz vor Verdampfen von Wasser aus dem Reaktionsgemisch während der PCR eine Überschichtung mit Mineralöl (Sigma). Um Kontaminationen auszuschließen wurde für jeden Ansatz eine Negativkontrolle ohne DNA mitgeführt.

Reaktionsbedingungen im Thermocycler (Landgraf):

Vorzyklus	94°C	300 sec	Denaturierung
(1 x)	$T_a + 2^\circ\text{C}$	110 sec	Annealing
	72°C	110 sec	Extension

Hauptzyklus	94°C	80 sec	Denaturierung
(30-40 x)	T_a	110 sec	Annealing
	72°C	110 sec	Extension
Endzyklus	72°C	290 sec	Extension
(1 x)			

Zur Erhöhung der Spezifität wurde der Vorzyklus bei einer um 2°C erhöhten Annealing-Temperatur T_a durchgeführt („Touchdown-PCR“).

2.4.1.2 Agarose-Gelelektrophorese

Für analytische und präparative Zwecke wurden DNA-Fragmente in einer Agarose-Gelelektrophorese aufgetrennt. Die Agarosekonzentration der Gele wurde in Abhängigkeit von den zu erwartenden Fragmentlängen zwischen 0,6 und 1,5% [w/v] gewählt. Die entsprechende Agarosemenge wurde in 1 x TBE aufgekocht, auf ca. 60°C abgekühlt und in den horizontalen Gelträger gegossen. Nach Erstarren des Gels wurde das Gel mit dem Laufpuffer 1 x TBE überschichtet und die 1:2 bis 1:5 mit GEBS verdünnten Proben nebst Längenstandard (1 Kb DNA Ladder, GibcoBRL, 25 bp DNA Ladder, GibcoBRL oder 100 bp DNA Ladder, MBI Fermentas) aufgetragen. Die Auftrennung erfolgte bei 100 V. Zur Visualisierung wurde das Gel für 10 bis 30 min in einem Ethidiumbromidbad (0,7 µg EtBr/ml Aqua dest.) gefärbt und anschließend unter UV-Bestrahlung und Verwendung des Herolab-Geldokumentationssystems dokumentiert.

Die Agarose-Gelelektrophorese von RNA erfolgte unter denaturierenden Bedingungen in einem Formaldehyd-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 0,24-9,5 Kb RNA Ladder (GibcoBRL) 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 dokumentiert und gegebenenfalls der Transfer der RNA mittels Northernblot (2.4.1.17) durchgeführt.

2.4.1.3 Extraktion von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen

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 (Amersham Pharmacia Biotech). Bei beiden Methoden wurden die DNA-Banden im Agarosegel unter UV-Licht mit einem Skalpell ausgeschnitten. Die weitere Durchführung erfolgte nach den Protokollen der Hersteller.

2.4.1.4 Polyacrylamid-Gelelektrophorese zur Auftrennung von DNA

Zur Auftrennung der durch reverse Transkription und anschließende Einzelstrang-PCR generierten Fragmente, die ähnliche Größen aufwiesen, wurde keine Agarose-Gelelektrophorese, sondern eine Polyacrylamid-Gelelektrophorese durchgeführt.

Für die 9%ige Gellösung wurden 2,25 ml 40%ige [w/v] Acrylamidlösung (Roth), 1 ml 10 x TBE und 6,75 ml Aqua dest. vermischt, mit 10 µl TEMED und 90 µl 10% [w/v] APS versetzt und in vorbereitete Glasplatten (Abstand 1 mm) gegossen. Nach dem Einsetzen des Kamms und dem Polymerisieren des Gels wurden die 1:2 bis 1:5 mit GEBS verdünnten Proben mit 1 x TBE als Laufpuffer in der Minigel-Elektrophoresekammer G42 (Biometra) bei 150 V für 45 min aufgetrennt. Zur Visualisierung wurde das Gel für 10 min in einem Ethidiumbromidbad (0,7 µg EtBr/ml Aqua dest.) gefärbt und anschließend unter UV-Bestrahlung und Verwendung des Herolab-Geldokumentationssystems dokumentiert.

2.4.1.5 Phenol-Chloroform-Extraktion

Die Phenol-Chloroform-Extraktion [120,121] dient der Entfernung von störenden Proteinen aus Lösungen von Nukleinsäuren.

Bei dieser Methode wurde der Reaktionsansatz mit dem einfachen Volumen Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol (25:24:1, Roth) versetzt, vermischt und zur Phasentrennung 1 min bei 15000 x g zentrifugiert. Die Proteine werden dabei denaturiert und reichern sich in der Phenolphase, insbesondere an der Grenze zwischen Phenolphase und wässriger Phase an. Die wässrige, nukleinsäurehaltige Phase wurde abgenommen, zur Entfernung von Phenolresten

mit dem gleichen Volumen Chloroform/Isoamylalkohol (24:1, Roth) extrahiert und erneut zentrifugiert. Der nukleinsäurehaltige Überstand wurde dann vorsichtig abgehoben und einer Ethanol-fällung (2.4.1.6) unterzogen.

2.4.1.6 Ethanol-fällung von Nukleinsäuren

Die Ethanol-fällung ist ein Verfahren zur Aufreinigung von Nukleinsäuren. Sie wurde zur Entfernung von Phenolresten nach Phenol-Chloroform-Extraktion (2.4.1.5), zum Entsalzen von Ligationsansätzen vor der Elektroporation, zum Umpuffern und zur Konzentrierung von DNA und RNA eingesetzt.

Die Fällung der Nukleinsäuren erfolgte durch Zugabe von 1/10 des Ausgangsvolumens einer 2,5 M Na-Acetat-lösung und dem 2,5 fachen Ausgangsvolumen an 96%igem eiskalten Ethanol für ungefähr 30 min bei -70°C . Bei Ligationsansätzen, die nur eine geringe Menge DNA enthielten, wurde der Fällungsansatz zusätzlich mit 1 μl Glycogen als Fällungsmittel versetzt. Nach 20- bis 30minütiger Zentrifugation bei 4°C und $15000 \times g$ (Sepatech Biofuge 15R, Heraeus) wurde der Überstand dekantiert und verworfen. Das nukleinsäurehaltige Sediment wurde mit 500 μl 70%igem eiskalten Ethanol gewaschen, erneut für 15 min zentrifugiert und der Überstand verworfen. Anschließend wurde das Sediment bis zu dreimal mit 70%igem Ethanol gewaschen und im Vakuum oder im Heißblock bei 37°C getrocknet. Die gefällte DNA wurde schließlich in Aqua dest. gelöst.

2.4.1.7 Spaltung von DNA durch Restriktionsendonukleasen

Durch Restriktionsspaltung wurden doppelsträngige DNA-Moleküle, wie PCR-Produkte und Vektoren, für die Klonierung präpariert. Weiterhin wurden Restriktionsspaltungen zu analytischen Zwecken eingesetzt, um beispielsweise auf das Vorhandensein eines bestimmten Inserts zu prüfen. Die Spaltungen wurden unter den Puffer- und Temperaturbedingungen durchgeführt, die der Hersteller (New England Biolabs, TaKaRa oder MBI Fermentas) für die Enzyme vorgab. Es wurden 10 U Restriktionsendonuklease pro μg DNA eingesetzt. In der Regel wurde ein Reaktionsvolumen von 10 bis 20 μl gewählt und ein bis zwei Stunden

inkubiert. Die Inaktivierung der Enzyme erfolgte anschließend durch 20minütiges Erhitzen auf 65°C, GEBS-Zugabe oder Phenol-Chloroform-Extraktion (2.4.1.5).

2.4.1.8 Ligation

Ligationen erfolgten in einem Volumen von 10 bis 20 µl unter Verwendung von 200 U T4-DNA-Ligase (New England Biolabs) und 1 x Ligasepuffer (New England Biolabs) bei 14°C bis 16°C über Nacht. Die Insert-DNA wurde im 10 bis 20fachen molaren Überschuß gegenüber der Vektor-DNA eingesetzt. Vor der Transformation in *E. coli* wurden die Ligationsansätze gefällt (2.4.1.6).

2.4.1.9 Herstellung elektrokompetenter Bakterien

500 ml LB-Medium wurden mit 25 ml einer Übernachtskultur angeimpft und bis zu einer OD₅₅₀ 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 (Zentrifuge J2-21, Beckmann). Auf Eis wurde das Zellsediment nach und nach in 500 ml eiskaltem autoklavierten Aqua dest. gelöst und erneut wie oben beschrieben zentrifugiert. Das Zellsediment wurde auf Eis in 250 ml autoklavierten Aqua dest. resuspendiert und ein drittes Mal zentrifugiert. Diese Waschschrte 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 Waschschrte 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 Restglycerin resuspendiert und in vorgekühlten 0,5 ml Reaktionsgefäßen à 100 µl bei -70°C eingefroren.

2.4.1.10 Transformation von Bakterien durch Elektroporation

Die Transformation von *E. coli* erfolgte ausschließlich über die sehr effiziente Methode der Elektroporation [122], bei der die Zellmembranen durch kurze elektrische Pulse hoher Feldstärke für DNA-Moleküle durchlässig gemacht werden.

45 µl elektrokompente Bakterien wurden auf Eis kurz aufgetaut, mit der vorbereiteten DNA (gefällter Ligationsansatz oder 5 – 10 ng Plasmid-DNA) vorsichtig vermischt und 2 min auf Eis inkubiert. Nach Überführung in eine vorgekühlte Elektroporationsküvette (Invitrogen, d = 2 mm) erfolgte die Elektroporation unter folgenden Bedingungen im GenePulser (Biorad): Widerstand $R = 400 \Omega$, Kondensatorkapazität $C = 25 \mu\text{F}$ und Ausgangsspannung $U = 2,5 \text{ kV/cm}$. Die elektroporierten Zellen wurden sofort in 1 ml SOC-Medium überführt und bei 37°C zur Stabilisierung und zur Ausbildung der Plasmid-kodierten Antibiotikaresistenz 30 - 45 min im Schüttelinkubator inkubiert. Anschließend wurde der Transformationsansatz mit LB-Medium verdünnt, 50 µl der verschiedenen Verdünnungen auf vorgewärmte Selektionsagar-Platten ausgestrichen und über Nacht bei 37°C inkubiert.

2.4.1.11 Plasmid-DNA-Präparationen

Es wurden verschiedene Plasmid-DNA-Präparationsmethoden durchgeführt, wobei sich die Wahl der Methode nach der gewünschten Reinheit und Menge der Plasmid-DNA richtete.

„Quick-Check“-Methode

Die „Quick-Check“-Methode [123] wurde aufgrund ihrer Einfachheit zur Vorabanalyse von Plasmiden eingesetzt. 100 µl einer Bakterienkultur wurden dabei mit 50 µl Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol (25:24:1) und 10 µl Quicky-Puffer versetzt und 30 sec vermischt. Nach Zentrifugation für 3 min bei 15000 x g (Sepatech Biofuge 15, Heraeus) wurden 15 bis 20 µl des Überstandes gegen ein Kontrollplasmid auf einem 0,6% Agarosegel aufgetrennt. Nach Färbung mit Ethidiumbromid zeigten sich die Plasmide als schwache Banden zwischen der oberen Bande der bakteriellen genomischen DNA und den unteren Banden der bakteriellen rRNA.

Plasmid-Minipräparationen

1,5 ml Übernachtkultur wurden in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt, für 2 min bei 15000 x g zentrifugiert (Sepatech Biofuge 15, Heraeus) und das resultierende Zellsediment in 275 µl Lösung P1 resuspendiert. Die Lyse der Zellen erfolgte durch die Zugabe von äquivalentem Volumen Lösung P2. Nach fünfminütiger Inkubation erfolgte die Neutralisation durch Zugabe von 275 µl Lösung P3, wobei hauptsächlich die Plasmid-DNA renaturiert. Zur Abtrennung von Protein-SDS-Komplexen, aggregierter chromosomaler DNA und hochmolekularer RNA wurde 20 min bei 4°C und 15000 x g zentrifugiert (Sepatech Biofuge 15R, Heraeus). Der Überstand wurde zur weiteren Aufreinigung mit Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol extrahiert (2.4.1.5). Die Fällung der Plasmid-DNA erfolgte für 5 min bei RT in 650 µl Isopropanol. Nach 20 - 30 minütiger Zentrifugation bei 4°C und 15000 x g wurde das Sediment mit 500 µl 70 %igem Ethanol gewaschen. Das DNA-Sediment wurde vakuumgetrocknet und in 40 µl RNase A-Lösung (40 µg RNase A/ml Aqua dest.) aufgenommen. Der Abbau von RNA erfolgte für 15 min bei 37°C.

Im Vergleich zur „Quick-Check“-Präparation zeichnete sich die Plasmid-DNA der Minipräparation durch einen höheren Reinheitsgrad aus, da neben Proteinen auch RNA und chromosomale DNA entfernt wurden.

Plasmid-Midipräparationen

Zur Gewinnung großer Mengen Plasmid-DNA mit einem hohen Reinheitsgrad für präparative Zwecke (Klonierung, Sequenzierung, Transformation, Transfektion) wurden Plasmid-Midipräparationen mit einem kommerziellen Kit (Qiagen) laut Herstellerprotokoll durchgeführt. 100 ml *E. coli*-Übernachtkultur wurden dabei 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.

2.4.1.12 Photometrische Bestimmung der Konzentration von Nukleinsäuren

Die Konzentration von Nukleinsäuren wurde photometrisch durch Messung der Extinktion bei Wellenlänge 260 nm bestimmt. Unter Einbeziehung des entsprechenden Extinktionskoeffizienten ϵ konnte dann die Konzentration errechnet werden. Über die Bestimmung der Extinktion bei 280 nm und anschließender Quotientenbildung aus E_{260}/E_{280}

konnte eine Aussage über die Reinheit der gemessenen Nukleinsäure getroffen werden. Der Quotient sollte, um eine ausreichende Reinheit zu gewährleisten, im Bereich zwischen 1,8 – 2,0 liegen.

2.4.1.13 DNA-Sequenzierung

Während der PCR kann es zum Auftreten von Mutationen in den amplifizierten DNA-Sequenzen kommen. Deshalb wurden alle Bereiche der generierten Plasmide, die durch Amplifikation entstanden sind, durch Sequenzierung überprüft. Die Sequenzierungen erfolgten teils bei einem kommerziellen Sequenzierunternehmen (SeqLab) und teils unter Verwendung des T7-Sequencing-Kits (Pharmacia), der auf der Methode des Kettenabbruchs durch den Einbau von Didesoxynukleotiden [124] beruht.

Es wurden 2 µg Plasmid-DNA in 50 µl Aqua dest. durch Zugabe von 12,5 µl 2 M NaOH für 10 min bei RT denaturiert. Nach Ethanol-fällung (2.4.1.6) wurde das getrocknete Sediment in 10 µl Aqua dest. aufgenommen. Zum Primer-Annealing wurden 2 µl des 10 µM Primers und 2 µl Annealing-Puffer zugesetzt und für 20 min bei 37°C sowie für 10 min bei RT inkubiert. Die Matrize wurde dann mit 3,2 µl einer Mischung aus 16 µl Label-Mix A, 1 µl α -³⁵S-dATP (9,25 GBq/µl) und 2 µl T7-DNA-Polymerase (1,5 U/µl) versetzt und zur Kettenverlängerung 5 min bei RT inkubiert. Zu Reaktionsgefäßen mit vorgewärmten 2,5 µl Terminationsmix (ddATP, ddCTP, ddGTP und ddTTP) wurden 4,5 µl des Markierungsansatzes gegeben. Diese Kettenabbruchreaktion wurde nach fünfminütiger Inkubation bei 37°C durch Zugabe von 5 µl Stopp-Lösung beendet.

Die elektrophoretische Analyse erfolgte im 0,4 mm x 31 cm x 38,5 cm 6%igen Polyacrylamidgel. 60 ml 6%ige Gelstammlösung wurden mit 20 µl TEMED und 300 µl 10% [w/v] APS versetzt und zwischen die silanisierten Glasplatten gegossen. Nach Polymerisation in horizontaler Lage wurde das Gel in einer 45 min Vorlaufphase bei 80 W erwärmt. Dann wurden die durch fünfminütiges Aufkochen denaturierten Sequenzierproben aufgetragen. Die Auftrennung erfolgte für 45 min bis 1,5 h bei 65 W. Im Anschluß an die Gelelektrophorese wurde das Gel auf Whatman 3MM Filterpapier aufgezogen, 1,5 h unter Vakuum bei 80 °C getrocknet und durch Auflegen eines Röntgenfilms (Kodak X-Omat Ar 35 x 43) 2 – 3 Tage autoradiographiert.

2.4.1.14 Präparation von Gesamt-RNA

Alle Arbeiten mit RNA wurden prinzipiell an einem gesonderten Arbeitsplatz und mit nur für RNA-Arbeiten verwendeten Materialien und Substanzen durchgeführt, um so Kontaminationen mit RNasen zu vermeiden.

Die Präparation von Gesamt-RNA aus humanen Zelllinien erfolgte unter Verwendung von Trizol-Reagenz (GibcoBRL) nach Herstellerprotokoll. Dabei wurden 5 – 10 x 10⁶ Zellen mit 1 ml Trizol-Reagenz versetzt, vermischt und zur vollständigen Dissoziation der Nukleoproteinkomplexe 5 min bei RT inkubiert. Nach Zugabe von 0,2 ml Chloroform und 2 minütiger Inkubation bei RT erfolgte zur Phasentrennung eine Zentrifugation bei 12000 x g und 4°C für 15 min (Zentrifuge J2-21, Beckmann). Die RNA-haltige, nahezu farblose obere Phase wurde in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt, mit 0,5 ml Isopropanol für 10 min bei RT gefällt und für 20 min bei 15000 x g zentrifugiert (Sepatech Biofuge 15R, Heraeus). Anschließend wurde das RNA-Sediment mit 1 ml 70%igem Ethanol gewaschen, bei 37°C getrocknet, in 50 µl DEPC-H₂O aufgenommen und zum Lösen des RNA-Sediments 10 min bei 55°C inkubiert. Die Bestimmung der Konzentration erfolgte photometrisch (2.4.1.12).

2.4.1.15 Reverse Transkription von Gesamt-RNA

Zur Eingrenzung des Transkriptionsstarts wurde eine reverse Transkription mit anschließender PCR der Einzelstrang-cDNA durchgeführt.

Vor der reversen Transkription erfolgte eine Behandlung der Gesamt-RNA mit DNase I für 30 min bei 37°C:

Gesamt-RNA	20 – 40 µg
5 x First Strand Buffer (GibcoBRL)	10 µl
RQ1-DNase (RNase-frei, 1 U/µl, Promega)	10 µl
	Aqua dest. ad 100 µl

Anschließend wurde eine Phenol-Chloroform-Extraktion (2.4.1.5) und Ethanol-fällung (2.4.1.6) durchgeführt. Das RNA-Sediment wurde anschließend in 9,5 µl DEPC-H₂O aufgenommen. Zum Annealing der Primer wurden 9,5 µl DNase-behandelte Gesamt-RNA mit Oligo-d(T)₁₂₋₁₈

(100 ng/ μ l, Pharmacia) für 10 min bei 70°C inkubiert. Nach Zugabe von 4 μ l 5 x First Strand Buffer (GibcoBRL), 2 μ l 0,1 M DTT und 1 μ l 10 mM dNTP-Mix (Amersham) wurde für 2 min bei 37°C inkubiert, dann wurden 2 μ l Superscript II RT (200 U/ μ l, GibcoBRL) zugefügt und für eine weitere Stunde bei 37°C inkubiert. Die Inaktivierung der reversen Transkriptase erfolgte bei 70°C für 15 min. 4 μ l 1:2 bis 1:5 verdünnte Einzelstrang-cDNA wurden anschließend in eine PCR (2.4.1.1) mit spezifischen Primern zur Eingrenzung des Transkriptionsstarts verwendet.

2.4.1.16 Herstellung 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 (Boehringer Mannheim). Die Matrizen-DNA wurde durch Restriktionsspaltung (2.4.1.7) 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 (2.4.1.5) und Ethanol-fällung (2.4.1.6) aufgereinigt. Der *in vitro* Transkriptionsansatz wurde 2 Stunden bei 37°C inkubiert und setzte sich wie folgt zusammen:

linearisierte DNA-Matrize	ca. 1,5 μ g
10 x Transkriptionspuffer	2 μ l
10 x NTP-Markierungsgemisch	2 μ l
RNase-Inhibitor (20 U/ μ l)	1 μ l
SP6-RNA-Polymerase (20 U/ μ l)	2 μ l
	Aqua dest. ad 20 μ l

Zur Entfernung der DNA-Matrize wurden im Anschluß 2 μ l RQ₁-DNase (RNase-frei, 1 U/ μ l, Promega) zugefügt, und es wurde für 15 min bei 37°C inkubiert. Es folgte zur Aufreinigung der Sonde eine Lithiumchlorid-Präzipitation durch Zugabe von 25 μ l Lithiumchlorid-Lösung (T7 MessageMachine Kit, Ambion), 200 μ l 96%igem eiskaltem Ethanol und 30 μ l DEPC-H₂O.

Nach 30 - 60 minütiger Inkubation bei -70°C wurde für 20 min bei $15000 \times g$ und 4°C zentrifugiert (Sepatech Biofuge 15R, Heraeus) und das RNA-Sediment einmal mit 70%igem eiskalten Ethanol gewaschen. Das RNA-Sediment wurde bei 37°C im Heizblock getrocknet und in $100 \mu\text{l}$ DEPC- H_2O gelöst. Die Überprüfung der RNA-Sonde erfolgte gelelektrophoretisch (2.4.1.2).

2.4.1.17 Northern-Transfer

Beim Northern-Transfer [125] 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 $10 - 15 \mu\text{g}$ Gesamt-RNA aufgetrennt und fotografisch dokumentiert. Anschließend wurde das Gel für 20 min in $20 \times \text{SSC}$ äquilibriert. Der Transfer der RNA erfolgte durch Diffusionsblotting über Kapillarkräfte. Auf eine ca. 10 cm hohe Schicht aus Saugpapier wurden vier Blätter trockenes Whatman 3MM Filterpapier und ein Blatt in $20 \times \text{SSC}$ getränktes Whatman 3MM Filterpapier gelegt. Anschließend folgte die ebenfalls in $20 \times \text{SSC}$ getränkte Nylonmembran (Hybond-N, Amersham), das Gel, vier in $20 \times \text{SSC}$ getränkte Blätter Whatman 3MM Filterpapier und ein Blatt 5MM Whatman Filterpapier als Verbindung zu dem auf ca. 10 cm erhöhten Pufferreservoir mit $20 \times \text{SSC}$. Der Transfer erfolgte für 16 – 24 h bei RT. Zur Immobilisierung wurde die RNA bei 1200 mJ für 1 min UV-kreuzvernetzt (Stratalinker 1800, Stratagene). Anschließend wurde die Membran für 20 min bei 80°C getrocknet.

2.4.1.18 Hybridisierung mit DIG-markierten RNA-Sonden

Nach Northern-Transfer wurde die Nylonmembran in eine Hybridisierungsröhre geführt und bei $65 - 68^{\circ}\text{C}$ in Hybridisierungspuffer für 1 Stunde prähybridisiert. Anschließend wurde die DIG-markierte RNA-Sonde (1:1000 Verdünnung) zugegeben und für 18 – 24 Stunden bei $65 - 68^{\circ}\text{C}$ hybridisiert. Die Nylonmembran wurde dann für zweimal 5 min in $2 \times \text{SSC}$, 0,1% SDS bei RT und zweimal 15 min in $0,1 \times \text{SSC}$, 0,1% SDS bei 70°C gewaschen.

2.4.1.19 Immunologischer DIG-Nachweis 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 im 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; Boehringer Mannheim) 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. Zur Entwicklung wurde für unterschiedliche Zeiten ein Röntgenfilm (Hyperfilm-MP, Amersham) aufgelegt.

2.4.1.20 5'-Rapid Amplification of cDNA Ends (5'-RACE)

Im Hinblick auf die Eingrenzung des Transkriptionsstartpunkts wurde eine 5'-RACE durchgeführt. Als Matrize wurde die Marathon-Ready cDNA aus humaner Plazenta und aus humanem fetalen Gehirn (Clontech) verwendet. Bei der Marathon-Ready cDNA handelt es sich um eine aus PolyA⁺RNA generierte doppelsträngige cDNA, die 5' und 3' mit Adaptoren ligiert ist. Unter Verwendung eines Adaptorprimers AP1 und eines antisense-hC3aR-Primers wurde in einer PCR ein 5'-RACE-Fragment erzeugt, welches kloniert und sequenziert wurde.

Für die PCR wurde der Advantage cDNA PCR Kit (Clontech) und der Perkin Elmer Cycler 2400 verwendet. Es wurden Ansätze mit dem antisense-hC3aR-Primer und AP1 und als Positivkontrolle mit 5'-RACE G3PDH und AP1 durchgeführt. Als Negativkontrolle wurden Ansätze mit den Einzelprimern mitgeführt.

Reaktionsansatz:

Marathon-Ready cDNA	5 µl
10 x cDNA PCR Puffer (Clontech)	5 µl
dNTP-Mix (10 mM, Clontech)	1 µl
Advantage cDNA Polymerase Mix (50 x, Clontech)	1 µl
Aqua dest.	36 µl
Primer 1 (10 µM)	1 µl
Primer 2 (10 µM) oder Aqua dest. (Negativkontrolle)	1 µl

Reaktionsbedingungen:

1. Zyklus (1 x)	94°C	30 sec
2. Zyklus (5 x)	94°C	5 sec
	72°C	3 min
3. Zyklus (5 x)	94°C	5 sec
	70°C	3 min
4. Zyklus (22 x)	94°C	5 sec
	68°C	3 min

2.4.1.21 Herstellung α -³⁵S-dATP-markierter Einzelstrang DNA-Sonden

Für den Nuclease Protection Assay wurden α -³⁵S-dATP-markierte Einzelstrang DNA-Sonden generiert. Dazu wurde eine PCR (2.4.1.1) mit pDP1 als Matrize und dem Biotin-gekoppelten BSS1 und BSR6 als Primer (Sequenz siehe 7.2) durchgeführt. Das PCR-Produkt wurde gelelektrophoretisch aufgetrennt, aus dem Gel unter Verwendung des Jetsorb-Gel Extraction Kits (Genomed) aufgereinigt und in einer 1:50 Verdünnung in der zweiten Einzelprimer-PCR zur Generierung der Sonde eingesetzt.

Reaktionsansatz:

8	µl 10x PCR-Puffer (GibcoBRL)	(1x im Ansatz)
8	µl 10 µM BSR6 (10 µM)	(Konzentration im Ansatz: 1 µM)
2	µl dNTP-Mix ohne dATP (je 2,5 mM)	(Konzentration im Ansatz: je 62,5 µM)
2,4	µl 50 mM MgCl ₂ (GibcoBRL)	(Konzentration im Ansatz: 1,5 mM)
0,5	µl Taq-DNA-Polymerase (Gibco; 5 U/µl)	(2,5 U im Ansatz)
2	µg 1:50 verdünntes PCR-Produkt	
10	µl α- ³⁵ S-dATP (9,25 GBq/µl)	(92,5 GBq im Ansatz)

Aqua dest. ad 80 µl

Der Reaktionsansatz wurde in 0,5 ml-Schraubdeckelgefäße gegeben und mit Mineralöl überschichtet.

Reaktionsbedingungen:

Vorzyklus (1 x)	94°C	300 sec	Denaturierung
	62°C	110 sec	Annealing
	72°C	110 sec	Extension
Hauptzyklus (40 x)	94°C	80 sec	Denaturierung
	60°C	110 sec	Annealing
	72°C	110 sec	Extension
Endzyklus (1 x)	72°C	290 sec	Extension

Nach Beendigung der PCR wurde das Mineralöl entfernt und das Volumen auf 100 µl mit Aqua dest. aufgefüllt. Zur Entfernung der doppelsträngigen DNA-Matrize, die mit dem Biotin-gekoppelten Primer BSS1 und BSR6 hergestellt wurde, wurde eine Aufreinigung mit Dynabeads M-280 Streptavidin (Dyna) durchgeführt. 40 µl Dynabead-Suspension wurden zugefügt, und unter Schütteln wurde eine 20 minütige Inkubation bei RT durchgeführt. Unter Einwirkung eines Magneten wurde dann der Dynabead-freie Überstand abgenommen. Nach Ethanol-fällung (2.4.1.6) wurde das DNA-Sediment in 100 µl DEPC-H₂O aufgenommen. 2 – 5 µl α-³⁵S-dATP-markierter Sonde wurden zur Überprüfung neben einer Sequenzierreaktion auf einem Sequenzgel (2.4.1.13) aufgetrennt.

2.4.1.22 Nuclease Protection Assay (NPA)

Zur Bestimmung des Transkriptionsstarts wurden ein Nuclease Protection Assay (NPA) unter Verwendung des Multi-NPA Kits (Ambion) durchgeführt. Dazu wurden 3, 10 und 30 µg Gesamt-RNA aus HMC-1-Zellen und aus differenzierten U937-Zellen und als Negativkontrolle 30 µg Hefe-RNA (Ambion) mit 8 µl α -³⁵S-dATP-markierter BSR6-Sonde vermischt und mit DEPC-H₂O auf ein Volumen von 50 µl aufgefüllt. Nach Ethanolfällung (2.4.1.5) wurde das Sediment in 10 µl Hybridisierungspuffer aufgenommen, kurz vermischt und für 3 min bei 95°C denaturiert. Nach Hybridisierung über Nacht bei 43°C im Hybridisierungssofen wurden 200 µl des 1:200 bzw. 1:800 in 1 x Nuclease Digestion Puffer verdünnten Nuclease-Mix (Nuclease SI, RNase A und TI) zugefügt und zum Abbau nicht hybridisierter DNA- und RNA-Bereiche für 30 – 40 min bei 37°C inkubiert. Durch Zugabe von 40 µl Nuclease Inaktivierungspuffer und 625 µl 96%igem Ethanol erfolgte für 15 min bei –20 °C die Fällung der Proben. Nach 15 min Zentrifugation bei 15000 x g wurde das Sediment einmal mit 1 ml 70%igem Ethanol gewaschen, getrocknet, in 4 µl 1:2,4 verdünnter Stopp-Lösung (T7-Sequencing-Kits, Pharmacia) aufgenommen und für 5 min bei 95°C denaturiert. Die Auftrennung erfolgte neben einer Sequenzierreaktion als Längenstandard auf einem 6%igem Sequenzgel (2.4.1.13). Im Anschluß an die Gelelektrophorese wurde das Gel auf Whatman 3MM Filterpapier aufgezogen, 1,5 h unter Vakuum bei 80 °C getrocknet und durch Auflegen eines Röntgenfilms (Kodak X-Omat Ar 35 x 43) 3 - 4 Wochen autoradiographiert.

2.4.2 Proteinbiochemische Methoden

2.4.2.1 Expression von rekombinantem 6 x His-hC3aR-Loop

500-1000 ml LB/Amp/Kan-Medium mit Glucosezusatz (Endkonzentration 10 mM) wurden mit einer LB/Amp/Kan-Übernachtskultur von pQE-30-hC3aR-Loop transfizierten *E. coli* SG13009 auf eine OD₆₀₀ von ca. 0,1 angeimpft. Das Wachstum erfolgte bei 37°C unter Schütteln bis zu einer OD₆₀₀ von 0,7 - 0,9. Nach Induktion der Expression mit 2 mM IPTG und einer Expressionsdauer von 2 h wurden die Zellen bei 5000 x g für 10 min abgeerntet, das Zellsediment in 1/5 des Kulturvolumens an Puffer A aufgenommen und bei -20°C eingefroren.

Die Lyse der Zellen erfolgte durch langsames Auftauen und Schwenken für 30 min bei RT auf dem Wipptisch. Anschließend wurde der Proteinrohextrakt durch 10minütige Zentrifugation bei 4°C und 10000 x g (Beckmann-Kühlzentrifuge JS-21, JA-20-Rotor) von den Zelltrümmern befreit und bei 4°C bzw. -20°C bis zur Säulenaффinitätschromatographie (2.4.2.2) gelagert.

2.4.2.2 Säulenaффinitätschromatographie des 6 x His-hC3aR-Loops

Der 1:4 in Puffer A verdünnte Proteinrohextrakt wurde auf eine 6 ml-Ni-NTA-Agarose-Säule aufgetragen und die Säule mit 30 ml Puffer A, 30 ml Puffer B, 24 ml Puffer C und 18 ml Puffer D gewaschen. Die Elution erfolgte sukzessiv mit 10 x 2,5 ml Puffer E. Die Eluate wurden durch SDS-PAGE (2.4.2.4) mit anschließender Silberfärbung (2.4.2.5) getestet, positive Eluate vereinigt und renaturiert (2.4.2.6). Zur weiteren Aufreinigung wurde eine FPLC (2.4.2.7) durchgeführt.

2.4.2.3 Präparation von Fab-Fragmenten aus Antikörpern der Subklasse IgG1

In FACS-Analysen wurden Fab-Fragmente des monoklonalen IgG1-Antikörpers 8H1 eingesetzt. Die Herstellung der Fab-Fragmente wurde unter Verwendung des ImmunoPure IgG1 Fab und F(ab')₂ Präparationskits (Pierce) nach Herstellerangaben durchgeführt. Für die Spaltung der IgG1-Antikörper wurden 1 mg 8H1-Antikörper in 0,5 ml 10 mM PBS mit 0,5 ml Mild Elution Buffer vermischt, mit 100 µl 10 x Digestion Buffer mit 2 mg Cystein-HCl versetzt und auf die zuvor mit 15 ml 1 x Digestion Buffer äquilibrierte 2 ml-Ficin-Säule gegeben. Nach Zugabe weiterer 200 µl 1x Dilution Buffer auf die Säule erfolgte die Inkubation für 4 h bei 37°C. Die Elution der gespaltenen IgG1-Antikörper wurde durch Zugabe von 4 ml Binding Buffer erreicht. Die Trennung der Fab-Fragmente von den Fc-Fragmenten und unverdauten Antikörpern erfolgte auf einer 2,5 ml-Protein A-Säule. Nach dem Äquilibrieren der Säule mit 12 ml Binding Buffer wurden die 4 ml Eluat auf die Säule gegeben und der die Fab-Fragmente enthaltende Durchfluß in 1 ml-Fractionen aufgefangen. Weitere 1 ml-Fractionen wurden nach Zugabe von 2 ml Binding Buffer aufgefangen. Anschließend wurde die Säule mit 4 x 2 ml Binding Buffer gewaschen und die Fc-Fragmente und unverdauten Antikörper mit 8 x 1 ml Mild Elution Buffer eluiert. Die Regeneration der Protein A-Säule erfolgte mit 8 ml 0,1 M

Citronensäure, pH 3,0. Anschließend wurde 0,02% Natriumazid auf die Säule gegeben und die Säule bei 4°C gelagert. Die Überprüfung der verschiedenen Fraktionen erfolgte durch SDS-PAGE (2.4.2.4) und anschließende Silberfärbung (2.4.2.5).

2.4.2.4 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Proteinlösungen wurden in einer denaturierenden SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese nach Laemmli [126] aufgetrennt, wobei die Proteine zuerst in einem Sammelgel konzentriert und dann im Trenngel aufgetrennt wurden.

12 %iges Trenngel

(Volumina für zwei Minigele)

- 8 ml SDS-Gellösung A
- 5 ml SDS-Gellösung B
- 7 ml Aqua dest.
- 200 µl SDS-Gellösung C
- 180 µl 10% APS
- 20 µl TEMED

3 %iges Sammelgel

- 5 ml Sammelgellösung
- 20 µl 10% APS
- 5 µl TEMED

Die Elektrophorese wurde in der Minigel-Elektrophoresekammer G42 (Biometra) durchgeführt. Das 12%ige Trenngel wurde bis ca. 1 cm unter den oberen Rand in die vorbereiteten Glasplatten (1 mm Abstand) gegossen und mit n-Butanol überschichtet. Nach Polymerisation wurde das Butanol mit Aqua dest. entfernt, die Oberfläche des Trenngels mit Filterpapier getrocknet und mit dem 3 %igen Sammelgel überschichtet. Vor der Polymerisation wurde der Probenkamm eingesetzt. Die Proteinproben wurden mit dem gleichen Volumen SDS-Aufschlußpuffer versetzt, für 5 min bei 100°C denaturiert und auf das Gel aufgetragen. Als Molekulargewichtsmarker wurden entweder 2 - 5 µl SDS-PAGE Molecular Weight

Standard, Low Range (Bio-Rad) aufgetragen oder 10 µl Prestained SDS Molecular Weight Marker (Sigma). Die Elektrophorese erfolgte bei 100 V, bis die Bromphenollaufbande das Trenngel erreicht hat, und anschließend bei 200 V bis zum Auslaufen der Lauffront in den SDS-Laufpuffer. Die SDS-Gele wurden entweder mit Silberlösung (2.4.2.5) gefärbt oder geblottet (2.4.2.9).

2.4.2.5 Silberfärbung von Proteinen in SDS-Polyacrylamid-Gelen

Nach der SDS-PAGE wurde das Sammelgel entfernt und das Trenngel mindestens 45 min bei RT oder über Nacht bei 4°C in einer Fixierlösung (50% [v/v] Methanol, 12% [v/v] Essigsäure, 0,02% Formaldehyd) inkubiert. Anschließend wurde zur Entfernung der Säure dreimal 10-15 min mit 50% [v/v] Ethanol gewaschen. Um die Sensitivität der Silberfärbung zu erhöhen, wurde das Gel dann 1 min mit 0,02%iger [w/v] Na-Thiosulfatlösung behandelt und nach dreimaligem Waschen mit Aqua dest. 20 min in der Silbernitratlösung (0,2% [w/v] AgNO₃, 0,03% Formaldehyd) gefärbt. Nach zweimaligem Waschen mit Aqua dest. erfolgte die Entwicklung in der reduzierenden Entwicklerlösung (0,56M Na₂CO₃, 0,02% Formaldehyd, 0,0004% [w/v] Na-Thiosulfatlösung) so lange, bis die Banden sichtbar waren. Dann wurde die Entwicklerlösung mit Aqua dest. abgespült und das Gel zum Beenden der Reduktion 10 min mit Stopplösung (50% [v/v] Methanol, 12% [v/v] Essigsäure) versetzt. Nach 20- bis 30minütigen Inkubationen in 50% [v/v] Methanol, 30% [v/v] Methanol und 3% [v/v] Glycerin folgte die Vakuumtrocknung des auf Whatman 3MM-Filterpapier fixierten Gels bei 80°C für 75 min.

2.4.2.6 Renaturierung des 6 x His-hC3aR-Loops

Nach der Säulenaffinitätschromatographie (2.4.2.2) wurden denaturierten Proteinfractionen vereinigt und durch langsame (10 – 20 ml/h) Zugabe des Renaturierungspuffer (50 mM TRIS-HCl, pH 8,0, 0,05% [v/v] Tween 80, 2 mM red. Glutathion, 20 mM ox. Glutathion) über eine Peristalticpumpe unter Rühren bei 4°C renaturiert. Das renaturierte Proteineluat wurde durch FPLC (2.4.2.7) weiter aufgereinigt und konzentriert.

2.4.2.7 Fast Protein Liquid Chromatography (FPLC)

Das dialysierte Proteineluat des His-getaggten C3aR-Loops und die produzierten monoklonalen Antikörper wurden durch FPLC aufgereinigt und ankonzentriert. Die FPLC-Aufreinigung wurde von M. Grove (Institut für Medizinische Mikrobiologie, MH Hannover) durchgeführt, wird hier aber trotzdem kurz beschrieben.

His-getaggte hC3aR-Loop:

Nach dem Auftrag der Proteinlösung auf die Auftragsschleife wurde die Proteinlösung bei einer Flußrate von 1 ml/min über die Säule (Resource RPC, 3 ml Säulenvolumen, Pharmacia) gepumpt. Die Elution erfolgte über zwei lineare Gradienten (0% Puffer B1 in den ersten 6 ml, 25% Puffer B1 nach weiteren 6 ml und 80% Puffer B1 nach weiteren 48 ml) bei einer Flußrate von 2 ml/min. Es wurden 48 1 ml-Fraktionen aufgefangen. Jede Fraktion wurde bei 280 nm spektroskopisch aufgezeichnet. Die Reinigung der Säule erfolgte nach der Empfehlung des Herstellers. 5 µl der entsprechenden Protein-haltigen Fraktionen und zur Kontrolle 10 µl des Vor- und des Nachlaufs wurden in der SDS-PAGE (2.4.2.4) mit anschließender Silberfärbung (2.4.2.5) bzw. anschließendem Westernblot (2.4.2.9) untersucht. Positive Fraktionen wurden zur Entfernung des Acetonitrils und der Trifluoressigsäure zweimal vakuumgetrocknet und in 100 µl autoklaviertem Aqua dest. aufgenommen.

Monoklonale Antikörper:

Der ankonzentrierte Antikörper-haltige Überstand wurde vor dem Auftrag mit 1M HCl auf pH 6,0 eingestellt. Nach dem Auftrag des Überstands auf die Auftragsschleife wurde der Überstand bei einer Flußrate von 1 ml/min über die Säule (Protein G Sepharose Säule, Pharmacia) gepumpt. Die Elution erfolgte ohne Gradienten sofort mit 100% Puffer B2 bei einer Flußrate von 1 ml/min, wobei 1 ml Fraktionen aufgefangen und spektroskopisch bei 280 nm aufgezeichnet wurden. Die Antikörper-haltigen 1 ml Fraktionen wurden gepoolt und mit 50 mM TRIS-HCl, pH 9,5 auf pH 7,0 eingestellt.

2.4.2.8 Proteinbestimmung nach Bradford

Für die Quantifizierung von Proteinen wurde die Bradford-Methode [127] benutzt, bei der Coomassie Brilliantblau mit Proteinen unter Bildung blauer Farbstoffkomplexe reagiert, die im Vergleich zu ungebundenen Farbstoffmolekülen ihr Absorptionsmaximum im längerwelligen Bereich haben.

In einem Konzentrationsbereich von 25 bis 200 µg/ml wurde aus BSA bzw IgG in 0,9% [w/v] NaCl eine Standardverdünnungsreihe erstellt. Parallel wurde eine Verdünnungsreihe in 0,9% [w/v] NaCl der zu bestimmenden Proteinlösung angelegt. Je 20 µl der Proteinverdünnungen wurden in Doppelwerten und je 20 µl der Standardverdünnungen in Vierfachwerten in eine 96-Lochmikrotiterplatte gegeben und mit 200 µl 1:6,7 mit Aqua dest. verdünnter Bradford-Stammlösung versetzt. Die Auswertung der Proteinbestimmung erfolgte sofort im Mikrotiterplatten-Photometer Multiskan MCC/340 MK II (Titertek, Flow Laboratories) bichromatisch bei 450 und 620 nm. Anhand der Standardgerade der BSA-Verdünnungsreihe wurden die Konzentrationen der Proteinverdünnungen ermittelt, und unter Berücksichtigung der Verdünnungsfaktoren wurde anschließend die Durchschnittskonzentration der Proteinlösung bestimmt.

2.4.2.9 Westernblot

Mittels Westernblot wurden Proteine nach elektrophoretischer Auftrennung (2.4.2.4) auf eine Nitrozellulosemembran übertragen. Durch anschließende Immunofärbung konnten Proteine spezifisch identifiziert werden.

Auf die anodische Graphitplatte der Fast Blot B33 Blotkammer (Biometra) wurden luftblasenfrei und Blotpuffer-getränkt folgende Materialien gelegt: Zwei Lagen Whatman 3MM-Filterpapier, die Zellulosenitratmembran (Schleicher & Schüll), das Trenngel und abschließend erneut zwei Lagen Whatman 3MM-Filterpapier. Die Blotkammer wurde mit der Kathodengraphitplatte geschlossen, beschwert und der Proteintransfer für 45-180 min bei 150 mA/Gel (2 mA/cm²) durchgeführt. Der Prestained SDS Molecular Weight Marker (Sigma) diente als optische Kontrolle für den Transfer der Proteine auf die Membran.

2.4.2.10 Immunofärbung von Zellulosenitratmembranen

Nach dem Westernblot (2.4.2.9) erfolgte die Immunofärbung der geblotteten Zellulosenitratmembran. Zuerst wurden freie Bindungsstellen der Zellulosenitratmembran in 5% [w/v] Magermilch-Ampli-Puffer für 1 h bei RT oder über Nacht bei 4°C abgesättigt. Alle folgenden Schritte wurden bei RT auf dem Wipptisch durchgeführt. Nach dreimaligen Waschen mit Amplipuffer wurde die Membran in dem mit 1 - 2% [w/v] Magermilch-Ampli-Puffer verdünnten Primärantikörper für 1 - 1,5 h oder über Nacht inkubiert. Anschließend wurde erneut dreimal gewaschen. Die Inkubation mit dem in 1% [w/v] Magermilch-Ampli-Puffer verdünnten Peroxidase-gekoppelten Sekundärantikörper erfolgte für 1-1,5 h. Die Membran wurde dreimal mit TBS gewaschen und dann durch Zugabe der Substratlösung (5 ml Chloronaphthol-Stammlösung, 20 ml TBS und 25 µl Wasserstoffperoxid) entwickelt. In Bereichen der Antigen-Antikörperbindung wurde ein dunkelviolettes Präzipitat sichtbar. Zum Abstoppen der Reaktion wurde der Blot mit Aqua dest. gewaschen und zwischen Filterpapieren getrocknet.

2.4.2.11 Fluorescein-Markierung von Fab-Fragmenten

Für FACS-Analysen wurden die Fab-Fragmente des monoklonalen 8H1-Antikörpers mit Fluorescein markiert unter Verwendung des FluoReporter Fluorescein-EX Protein Labeling Kits (Molecular Probes). Dabei konjugieren die Amin-reaktiven Markierungssubstanzen mit aliphatischen, nicht-protonierten Aminen der Proteine. Die Durchführung der Markierung erfolgte im wesentlichen nach Herstellerangaben. Die Berechnung der für die Proteinmenge benötigten Menge an Markierungssubstanz erfolgte mit folgender Formel:

$$\text{benötigte Menge Markierungssubstanz [mg]} = \frac{\text{mg/ml Protein} \times \text{ml}}{\text{MW des Proteins [D]}} \times \text{MR} \times \text{MW der Markierungssubstanz [D]}$$

[MR = Molares Verhältnis der reaktiven Markierungssubstanz zum Protein; gewöhnlich ergeben 3-7 Moleküle pro Antikörper das beste Ergebnis
MW = Molekulargewicht]

Es wurden 200 µl 1,6 mg/ml Fab-Proteinlösung eingesetzt. Nach Zugabe von 20 µl frisch angesetzter 1 M Bicarbonat-Lösung, pH 8,3 und 9,7 µl 10 mg/ml Markierungslösung (2 mg Fluorescein-5-EX, Succinimidylester in 200 µl DMSO) erfolgte eine lichtgeschützte

einstündige Inkubation unter Rühren bei RT. Nach Zugabe von 5,5 µl Hydroxylamin und weiteren 15 min Inkubation wurde die Probe auf die zuvor bei 1100 x g zum Entfernen des Lagerungspuffers zentrifugierte Minisäule zum Eliminieren von ungebundenem Fluorescein-EX gegeben. Anschließend wurde für 5 min bei 1100 x g zentrifugiert (Sepatech Biofuge 15, Heraeus). Das die markierten Fab-Fragmente enthaltende Filtrat wurde bei 4°C gelagert.

2.4.3 Methoden zum Arbeiten mit Phagen

2.4.3.1 Herstellung kompetenter Bakterien für die Phagenplattierung

Zur Herstellung kompetenter Bakterien für die Phagenplattierung wurden 20 ml LB-Medium mit 10 mM MgSO₄, 0,2% [w/v] Maltose und Tetracyclin (15 µg/ml) mit zwei Kolonien *E. coli* XL1-Blue angeimpft und unter Schütteln bei 37°C für 4 – 6 Stunden inkubiert. Anschließend wurden die Zellen bei 500 x g und 4°C für 10 min abzentrifugiert (Beckmann-Kühlzentrifuge JS-21, JA-20-Rotor) und das Sediment in 10 ml 10 mM MgSO₄ resuspendiert, wobei die OD₆₀₀ bei ungefähr 0,5 liegen sollte. Bei einer höheren OD₆₀₀ wurde die Zellsuspension mit 10 mM MgSO₄ verdünnt. Die kompetenten Zellen wurden für jede Phagenadsorption neu hergestellt.

2.4.3.2 Phagentitration

Zur Bestimmung der infektiösen Phagenpartikel pro µl Phagensuspension (pfu/µl) wurde die λ Triplex 5'-STRECH PLUS cDNA Library aus humaner Leber (Clontech) titriert. Dazu wurden Verdünnungsreihen in SM-Puffer hergestellt, diese wurden mit den kompetenten *E. coli* XL1-Blue vermischt und auf LB-Platten ausplattiert. Nach Inkubation für 7 –12 Stunden bei 37°C und Auszählen der pfu wurde der Phagentiter unter Berücksichtigung des Verdünnungsfaktors und des eingesetzten Volumens bestimmt.

2.4.3.3 Plattieren von λ TriplEx-Phagen

Zur Plattierung der λ TriplEx 5'-STRECH PLUS cDNA Library aus humaner Leber (Clontech) wurden $0,5 \cdot 10^4$ pfu mit 600 μ l der kompetenten *E. coli* XL1-Blue vermischt und unter Schütteln für 15 min bei 37°C inkubiert. Anschließend wurden 6 ml LB-Topagarose (48°C) zugesetzt, und die Ansätze wurden auf vorgewärmten LB-Platten (\varnothing 145 mm) verteilt. Die Inkubation der Platten erfolgte für 4 - 6 Stunden bis zur Ausbildung kleiner Plaques bei 42°C. Dann wurde die Proteinexpression induziert (2.4.3.4).

2.4.3.4 Induktion der Proteinexpression von λ TriplEx-Phagen und Protein-Transfer der exprimierten Proteine auf die Trägermembran

Nach Ausbildung von kleinen Plaques wurden die Platten zur Induktion der Proteinexpression mit zuvor in 40 mM IPTG getränkten und nahezu getrockneten Zellulosenitratfiltern (\varnothing 137 mm, Schleicher & Schuell bzw. Stratagene) bestückt und für 4 – 8 Stunden mit dem Filter auf der Oberseite bei 37°C inkubiert. Zum Teil erfolgte eine Inkubation mit einem zweiten Filter im Anschluß.

2.4.3.5 Immunofärbung von Zellulosenitratfiltern beim Phagenscreening

Die Zellulosenitratfilter wurden nach Markierung ihrer Position auf der Platte mit der Spitze einer Kanüle abgenommen, in TBS für 1 min gewaschen und in TBS mit 2% [w/v] BSA für 1 Stunde bei RT oder über Nacht bei 4°C abgesättigt. Nach erneutem Waschen mit TBS erfolgte die Inkubation für 1 Stunde bei RT oder über Nacht bei 4°C mit dem gegen den hC3aR gerichteten 8H1-Antikörper (10 μ g/ml) und dem 6 x His-hC3aR-Loop (5 μ g/ml) in TBS mit 1% [w/v] BSA bzw. beim zweiten Filter nur mit dem 8H1-Antikörper. Die Filter wurden dann in TBS gewaschen und mit einem 1:1000 in TBS mit 1% [w/v] BSA verdünntem Anti-Maus IgG Peroxidase Konjugate aus der Ziege (Sigma) für 1 Stunde inkubiert. Nach erneutem Waschen mit TBS erfolgte die Entwicklung der Filter durch Zugabe der Substratlösung (5 ml Chloronaphthol-Stammlösung, 20 ml TBS und 25 μ l Wasserstoffperoxid) bis zur Ausbildung

dunkelvioletter Komplexe. Zum Abstoppen der Reaktion wurden die Filter mit Aqua dest. gewaschen und anschließend getrocknet.

2.4.3.6 Phagenisolierung aus Agarose

Positive pfu wurden aus der Agarose mit einer Pipettenspitze ausgestochen und in 500 µl SM-Puffer überführt. Durch Zugabe von 50 µl Chloroform erfolgte die Lyse vorhandener *E. coli* XL1-Blue. Nach Inkubation über Nacht bei 4°C wurde der Phagen-haltige SM-Puffer abgenommen und als Phagensuspension bei 4°C gelagert.

2.4.4 Zell- und immunbiologische Methoden

2.4.4.1 Produktion von gegen den zweiten extrazellulären Loop des hC3aR gerichteten monoklonalen Antikörpern im großen Maßstab

Zur Gewinnung großer Mengen gegen den zweiten extrazellulären Loop des hC3aR gerichteter monoklonaler Antikörper erfolgte das Wachstum der Hybridomazellen in dem FCS-freien Hybridomed D/F 1000 Medium (Seromed) mit 1 x HT (GibcoBRL), Penicillin und Streptomycin bei 37°C in einer Atmosphäre von 5% CO₂ für 5 – 7 Tage. Nach Zentrifugation bei 4°C und 6500 x g (Beckmann-Kühlzentrifuge JS-21, JA-14-Rotor) für 15 min wurde der zellfreie Überstand über das Pro-Vario Filtrations- und Konzentrationssystem (Filtron) konzentriert und anschließend durch FPLC (2.4.2.7) aufgereinigt.

2.4.4.2 Epitop-Mapping

Das Epitop-Mapping der gegen den zweiten extrazellulären Loop des hC3aR gerichteten monoklonalen Antikörper erfolgte an der GBF, Braunschweig von Dr. R. Frank.

Dazu wurden Peptide als N-terminal acetylierte und C-terminal kovalent über βala-βala-Dipeptide an eine Cellulosemembran gekoppelte Peptide über die Spotsynthesetechnik [128,129] unter Verwendung des ASP 222 Spot-Roboters (ABIMED) gebildet. Dabei handelte

es sich um überlappende Pentadecapeptide mit Verschiebungen von drei Aminosäuren, die die gesamte Sequenz des zweiten extrazellulären Loops des hC3aR einnahmen. Nach Inkubation mit den monoklonalen Antikörpern erfolgte die Detektion mit einem alkalische Phosphatasegekoppelten Anti-Maus aus der Ziege (ImmunoPure).

2.4.4.3 Experiment mit Nickel-NTA-Magnetic Agarose Beads

Zur Überprüfung, ob auf peripheren Granulozyten eine Struktur vorhanden ist, die mit dem zweiten extrazellulären Loop des hC3aR interagiert, wurde ein Experiment mit Ni-NTA-Magnetic Beads (5% Suspension, Qiagen) durchgeführt. Dazu wurde eine Präparation peripherer Leukozyten durchgeführt, wie unter 2.4.4.9 FACS-Analyse beschrieben. Der Überstand von 20 µl Ni-NTA-Magnetic Agarose Beads wurde nach Fixierung des 1,5 ml-Reaktionsgefäß in einem Magnethalter abgenommen, und die Beads wurden zweimal mit 10 mM PBS gewaschen. Anschließend wurden 6 µg 6 x His-hC3aR-Loop bzw. als Negativkontrolle 6 µg 6 x His-Peptid (HHHHHH) in 200 µl 10mM PBS zugegeben und im Überkopf-Schüttler zur Bindung der His-gekoppelten Proteine an die Beads für 1 h bei RT inkubiert. Nach zweimaligen Waschen mit 10 mM PBS erfolgte die Inkubation der Protein-gekoppelten Beads mit 200 µl peripherer Leukozyten für 1,5 h bei 4°C im Überkopf-Schüttler. Die Beads wurden dann erneut zweimal gewaschen und eine Bindung peripherer Leukozyten an die Beads mikroskopisch untersucht.

2.4.4.4 Biacore-Analyse mit peripheren Leukozyten

Ein zweites Experiment zur Überprüfung der Expression einer Oberflächenstruktur auf Granulozyten, die mit dem zweiten extrazellulären Loop des hC3aR interagiert, wurde innerhalb der Arbeitsgruppe von Dr. T. Crass durchgeführt und soll deshalb nur kurz aufgezeigt werden. Der 6 x His-hC3aR-Loop wurde auf dem IAsys Auto⁺ Carboxylate-Chip (Affinity Sensors) fixiert und mit humanen peripheren Leukozyten inkubiert. Die Präparation der peripheren Leukozyten erfolgte wie unter 2.4.4.9 FACS-Analyse beschrieben. Zur Messung einer potentiell vorhandenen Bindung der Leukozyten an den fixierten Loop wurde ein Biacore-X (Biacore) eingesetzt.

2.4.4.5 Transiente Transfektion

In Abhängigkeit der verwendeten Zelllinien wurden die transienten Transfektionen entweder nach der Calciumphosphat-Technik (bei IMR-32 und SK-N-MC) oder nach der Liposomen-Technik unter Verwendung von Lipofectamine (GibcoBRL, bei HEK293) bzw. von Effectene (Qiagen, bei HMC-1 und U937) durchgeführt.

Calciumphosphat-Technik:

Einen Tag vor der Transfektion wurden 1×10^6 IMR-32- bzw. SK-N-MC-Zellen pro Vertiefung einer 6-Loch-Kulturplatte ausgesät. Am folgenden Tag wurden 10 µg Plasmid-DNA mit 1 x TE auf 105 µl aufgefüllt und unter Belüftung mit einer Pasteurpipette 15 µl 2 M CaCl₂ zugeführt. Nach 45minütiger Inkubation bei RT wurde der Transfektionsansatz auf die zuvor mit 2,5 ml Opti-MEM (GibcoBRL) überschichteten Zellen gegeben. Zum Abstoppen der Reaktion erfolgte 5 Stunden später ein Mediumwechsel mit 3 ml Opti-MEM. Ungefähr 72 Stunden nach der transienten Transfektion wurden die Zellen in den Reporterassay eingesetzt. Eine Vervielfachung der verwendeten Substanzen erfolgte bei transienten Transfektionen in 75 cm²-Kulturflaschen, die dann durchgeführt wurden, wenn die Zellen vor dem Reporterassay noch mit Cytokinen stimuliert wurden.

Transiente Transfektion mit Lipofectamine:

5×10^6 HEK293-Zellen wurden einen Tag vor der Transfektion in einer 75 cm²-Kulturflasche ausgesät. Am folgenden Tag wurden 6 µg Plasmid-DNA mit 600 µl Opti-MEM (GibcoBRL) vermischt und in ein Reaktionsgefäß mit 36 µl Lipofectamine und 600 µl 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 HEK-293-Zellen zugesetzt. Nach 5 stündiger Inkubation bei 37°C wurde die Transfektion durch Zugabe von 5 ml Stopplösung (Dulbecco's MEM Nut-Mix F-12 mit 20% FCS, P/S, Glutamin und Pyruvat) abgestoppt. Zwei bis drei Tage nach der transienten Transfektion wurden die Zellen in die Immunfluoreszenz oder in FACS-Analysen eingesetzt.

Transiente Transfektion mit Effectene:

Pro Vertiefung einer 6-Loch-Kulturplatte wurden 2×10^6 HMC-1- bzw. U937-Zellen in 1,6 ml Opti-MEM vorgelegt. 1 μ g Plasmid-DNA wurde mit Puffer EC (Qiagen) auf 100 μ l aufgefüllt, mit 8 μ l Enhancer (Qiagen) versetzt und für 5 min bei RT inkubiert. Dann wurden 25 μ l Effectene zugegeben. Nach 10 – 15minütiger Inkubation wurden 600 μ l Opti-MEM zugeführt, und der Ansatz wurde auf die Zellen gegeben. 5 Stunden nach der transienten Transfektion wurde das Effectene durch Zugabe von 1 ml Opti-MEM ausverdünnt. Ungefähr 72 Stunden später wurden die Zellen in den Reporterassay eingesetzt. Für die Reporterassays, bei denen die Zellen nach der Transfektion mit Cytokinen stimuliert wurden, wurden Transfektionen in 75 cm²-Kulturflaschen durchgeführt. Hierfür wurden die verwendeten Substanzen entsprechend der Anzahl der Zellen vervielfacht.

2.4.4.6 Zellstimulation mit Cytokinen

Bei der Stimulation wurden folgende Cytokinmengen eingesetzt:

IL-2	100 ng/ml
IL-3	50 ng/ml
IL-4	100 ng/ml
IL-6	100 ng/ml
IFN- α	1000 U/ml
IFN- γ	1000 U/ml
TNF- α	100 ng/ml
LIF	200 ng/ml
TPO	100 ng/ml
EPO	10 U/ml
SCF	100 ng/ml
G-CSF	100 ng/ml
GM-CSF	50 ng/ml
Bt ₂ cAMP	1 mM

Reportergenassay:

Für Untersuchungen zur Regulation der hC3aR-Promotorkonstrukte in verschiedenen Zelllinien erfolgte eine Stimulation mit Cytokinen. Bei IMR-32- und SK-N-MC-Zellen wurden die Zellen 8 – 9 Stunden nach der transienten Transfektion mit 10 mM PBS mit 1 mM EDTA abgelöst, in 26 ml Opti-MEM pro transfizierten 7×10^6 Zellen aufgenommen und in 1 ml-Aliquots auf eine 24-Loch-Kulturplatte aufgeteilt. Bei HMC-1-Zellen wurden die Zellen direkt vor der Stimulation mit Cytokinen in 1 ml-Aliquots aufgeteilt. Die Stimulation mit Cytokinen und mit Medium als Negativkontrolle erfolgte in Doppelwerten 24 Stunden nach der Transfektion. Der Reportergenassay wurde nach weiteren 48 Stunden durchgeführt.

Kompetitive Bindungsstudie:

Nach Cytokinstimulation von HL-60- und U937-Zellen wurde der Expressionslevel des hC3aR durch kompetitive Bindungsstudien (2.4.4.12) mit C3a untersucht. Dazu wurden 1×10^6 Zellen in 7 ml Medium in kleinen Kulturflaschen stimuliert und 72 Stunden später kompetitive Bindungsstudien durchgeführt.

Northern-Transfer:

Zur Quantifizierung der Menge an hC3aR-mRNA nach Stimulation mit Cytokinen wurde ein Northern-Transfer (2.4.1.17) durchgeführt. 4×10^6 U937-Zellen in 3 ml Medium wurden in einer 6-Loch-Kulturplatte mit verschiedenen Cytokinen stimuliert. Nach 1:15 h wurden die Zellen bei 1200 rpm und 4°C für 5 – 10 min (Heraeus Sepatech, Biofuge RF) abzentrifugiert. Anschließend wurden eine Gesamt-RNA-Präparation (2.4.1.14) und ein Northern-Transfer unter Verwendung einer DIG-markierten hC3aR- und GAPDH-Sonde durchgeführt.

2.4.4.7 Secreted Alkaline Phosphatase (SEAP)-Assay

Die SEAP-Aktivität nach transients Transfektion mit Promotorkonstrukten in pSEAP2-Vektoren wurde unter Einsatz des Great EscAPe SEAP Chemiluminescence Detektion Kits (Clontech) bestimmt. 100 µl des SEAP-haltigen Zellkulturüberstandes wurden bei 8000 x g für 3 min zum Entfernen von Zellen abzentrifugiert (Biofuge 15, Heraeus Sepatech). Je 10 µl des abzentrifugierten Zellkulturüberstandes wurden in Dreifachwerten auf eine 96-Loch-OptiPlatte (Canberra Packard) gegeben, mit je 30 µl 1 x Dilutionpuffer vermischt und zur Inaktivierung

endogener alkalischer Phosphatasen für 30 min bei 65°C inkubiert. Nach dem Abkühlen der Proben auf RT wurden je 40 µl des auf RT vorgewärmten Assaypuffers zugefügt und für 5 min bei RT inkubiert. Anschließend wurden je 40 µl des 1:20 in vorgewärmten Chemilumineszenz-Enhancer verdünnten 25 mM CSPD-Chemilumineszenz-Substrats zugegeben, und es wurde für 15 min lichtgeschützt bei RT inkubiert. Die Messung der Chemilumineszenz erfolgte im TopCount β-Counter (Canberra-Packard).

2.4.4.8 β-Galactosidase-Assay

Die Bestimmung der β-Galactosidase-Aktivität nach Kotransfektion mit dem pCMVβ-Vektor zur Normalisierung des SEAP-Assays erfolgte unter Verwendung des High Sensitivity β-Galactosidase Assay Kits von Stratagene. 1 ml der transfizierten Zellen wurden bei 8000 x g für 3 min abzentrifugiert (Biofuge 15, Heraeus Sepatech). Das Zellsediment wurde in 85 µl Lysepuffer aufgenommen und für 30 min bei -20°C weggefroren. Nach Auftauen wurden die Proben gemischt und bei 15000 x g für 3 min abzentrifugiert. Je 20 µl der Proben und 20 µl Lysepuffer als Blankwert wurden in Dreifachwerten auf eine 96-Loch-Mikrotiterplatte gegeben und mit 125 µl der 1:25 in Puffer A verdünnten CPRG-Stammlösung vermischt. Bei 37°C erfolgte eine Inkubation der Platte bis zur Orange-Rot-Färbung der Proben (5 min bis 5 h). Die photometrische Bestimmung erfolgte im Mikrotiterplatten-Photometer Multiskan MCC/340 MK II (Titertek, Flow Laboratories) bei 595 nm.

2.4.4.9 Fluorescence Activated Cell Sorting (FACS)

Zur Charakterisierung des monoklonalen Antikörpers 8H1 und zur Untersuchung der Expression des C3aR und C5aR in verschiedenen Zelllinien wurden FACS-Analysen durchgeführt. Dabei wurden neben dem monoklonalen IgG1-Antikörper 8H1 die murinen monoklonalen gegen den terminalen Bereich des zweiten extrazellulären hC3aR-Loops gerichteten Antikörper der Subklasse IgG2a P4B4 und P8B5 (P. Gasque, Department of Medical Biochemistry, University of Wales, College of Medicine, Cardiff, UK) und der monoklonale Maus-IgG1-Antikörper W17/1 (gegen den N-Terminus des hC5aR generiert; O. Götze, Göttingen [130]), verwendet. Als Detektionsantikörper wurde ein Anti-Maus IgG-FITC

(Pharmingen, Becton Dickinson) und zur Kontrolle ein IgG1- oder IgG2a-Kontrollantikörper (Dianova) verwendet. Die Zellen wurden bei 1200 rpm und 4°C für 5 – 10 min (Heraeus Sepatech, Biofuge RF) abzentrifugiert, zweimal mit 10 mM PBS gewaschen und zu 5×10^6 Zellen/ml 10 mM PBS aufgenommen. Bei Verwendung von EDTA-Blut zur Gewinnung peripherer Leukozyten wurde zuvor für 20 min bei 37°C eine Lyse der Erythrozyten mit dem 10fachen Volumen an 0,87% [w/v] NH_4Cl durchgeführt. Je 50 μl Zellen wurden in der Vertiefung einer 96-Loch-Mikrotiterplatte mit 50 μl Antikörperverdünnung (8H1: 20 $\mu\text{g}/\text{ml}$, P4B4: 20 $\mu\text{g}/\text{ml}$, P8B5: 20 $\mu\text{g}/\text{ml}$, W17/1: 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$, IgG1-Ktr.: 10 - 20 $\mu\text{g}/\text{ml}$, IgG2a-Ktr.: 20 $\mu\text{g}/\text{ml}$) vermischt und für 30 min bei 4°C inkubiert. Nach Zentrifugation im Plattenrotor für 2 min bei 1200 rpm und 4°C wurden die Zellen zweimal mit 150 μl kaltem 10 mM PBS gewaschen. Die Zellsedimente wurden dann in 50 μl der Detektionsantikörperverdünnungen in 10 mM PBS (Anti-Maus IgG-FITC: 1:10 – 1:20) aufgenommen und für 30 min lichtgeschützt bei 4°C inkubiert. Nach erneutem zweimaligem Waschen wurden die Zellen in 200 μl 10 mM PBS aufgenommen. Die Messung der Ereignisse erfolgte in einem Becton-Dickinson FACScan bei einer Anregungswellenlänge von 492 nm im grünen Spektralbereich bei 520 nm und die Auswertung mit Hilfe der WinMDI-Software Version 2.6.

2.4.4.10 Indirekte Immunfluoreszenz

Zur Charakterisierung des monoklonalen Antikörpers 8H1 wurden indirekte Immunfluoreszenzen unter Verwendung transfizierter HEK293-Zellen durchgeführt. Die transfizierten Zellen wurden mit 10 mM PBS mit 1 mM EDTA von der Kulturflasche abgelöst und gezählt. Pro Ansatz wurden 1×10^5 HEK293-Zellen in ein 15 ml Falcon überführt und für 5 min bei 4°C und 200 x g zentrifugiert (Heraeus Sepatech Biofuge 15R). Das Zellsediment wurde zweimal mit 1 ml 10 mM PBS mit 1% [w/v] BSA gewaschen, in 100 μl 8H1-Antikörper (10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 10 mM PBS mit 1% [w/v] BSA) aufgenommen und für 1 h auf Eis inkubiert. Anschließend wurde das Zellsediment erneut zweimal mit 1 ml 10 mM PBS mit 1% [w/v] BSA gewaschen und 100 μl 1:100 in 10 mM PBS mit 1% [w/v] BSA verdünnten Anti-Maus IgG-TRITC (Dianova) zugesetzt. Nach lichtgeschützter Inkubation für 30 min auf Eis wurde zur Entfernung überschüssiger fluoreszenzmarkierter Antikörper erneut zweimal mit 1 ml 10 mM PBS mit 1% [w/v] BSA gewaschen. Das Zellsediment wurde in 10 μl Mounting-Fluid (50% Glycerin in 10 mM PBS) aufgenommen, auf einen Objektträger überführt und mit dem

Fluoreszenzmikroskop bei einer Anregungswellenlänge von 550 nm untersucht und fotografiert.

2.4.4.11 Immunhistochemie

Die immunhistochemischen Untersuchungen mit dem monoklonalen Antikörper 8H1 wurden von Dr. Q. Zhang bzw. K. Bankes (Institut für Medizinische Mikrobiologie/ Anatomie II, MH Hannover) durchgeführt. Die Methode soll deshalb nur kurz aufgezeigt werden.

Das verwendete Gewebe wurde direkt nach der Entfernung aus dem Körper in kleinen Stücken in flüssigem Stickstoff gefroren. Die Lagerung erfolgte bei -70°C . $0,5\ \mu\text{m}$ Kryostatschnitte wurden getrocknet und bei -20°C in Aluminiumfolie gelagert. Für die Immunofärbung wurden die Schnitte bzw. die transfizierten HEK293-Zellen in Aceton für 10 min bei 20°C fixiert, in 1 x TBS mit 0,05% [v/v] Tween gewaschen, in 1% [v/v] Formaldehyd für 30 min bei 20°C fixiert, erneut gewaschen und mit 0,2% [w/v] Glutaraldehyd für 10 min bei 20°C behandelt. Nach erneutem Waschen wurden die Proben bei 4°C über Nacht mit dem monoklonalen 8H1-Antikörper ($3,6\ \mu\text{g/ml}$) bzw. 3G7-Überstand (rekombinanter scFv gegen den hC3aR-Loop mit myc-Schwanz [87]), P4B4 oder P8B5 ($1,6$ bzw. $3\ \mu\text{g/ml}$, beides murine IgG2a-Antikörper, die ein Epitop im terminalen Bereich des zweiten extrazellulären hC3aR-Loops erkennen) in einer feuchten Kammer inkubiert. Zur Spezifitätskontrolle wurden Proben mitgeführt, die zuvor mit verschiedenen Konzentrationen (1 - $100\ \mu\text{g/ml}$) des 6 x His-hC3aR-Loops oder des synthetischen Nonapeptids Köhl 2 (TNDHPWTVP, $0,0005$ – $0,5\ \mu\text{g/ml}$) präinkubiert wurden. Am nächsten Tag wurden die Proben in 1 x TBS mit 0,05% [v/v] Tween gewaschen, mit einem Anti-Maus Serum aus Kaninchen (Dako) und anschließend mit einem Peroxidase gekoppelten Maus-Antikörper-Komplex (Peroxidase anti-Peroxidase (PAP), Dako) inkubiert. Nach Entwicklung mit Diaminobenzidin und Gegenfärbung mit Haematoxylin (Fluka) wurden die Proben in Glycergel (Dako) eingebettet und mikroskopiert.

2.4.4.12 Kompetitive Bindungsstudien

Zur Untersuchung der Expression des C3aR auf verschiedenen Zelllinien wurden kompetitive Bindungsstudien mit kleinen Mengen von ^{125}I -C3a (NEN) durchgeführt. Dabei wurde die

gebundene Aktivitätsmenge gemessen, die nach Zugabe steigender Mengen nicht-markiertem C3a (Sigma) nicht aus der Bindung verdrängt wurde.

Die Ansätze wurden in Vierfachwerten durchgeführt. Pro Punkt wurden in eine 96-Loch-Mikrotiterplatte je 10 μl C3a-Verdünnung in HAG-CM und 10 μl HAG-CM als Negativkontrolle vorgelegt und mit je 10 μl ^{125}I -C3a (20000 cpm \cong 330 Bq) vermischt. Je 30 μl der auf $5 - 10 \times 10^6$ Zellen/ml HAG-CM eingestellten Zellsuspension wurden zugefügt, und der Ansatz wurde für 30 min bei RT inkubiert. Anschließend wurden mit einer Mehrkanalpipette je 40 μl durch eine mit 50 μl HAG-CM pro Vertiefung angefeuchtet MultiScreen-Platte (0,45 μm Durapore-Membran, Millipore) filtriert. Nach zweimaligem Waschen des Zellsediments mit je 100 μl HAG-CM wurde die Platte unter Verwendung einer Infrarotlampe getrocknet. Anschließend wurden 50 μl MikroScint-O (Canberra Packard) pro Vertiefung zugegeben. Die Messung der zellgebundenen Aktivität erfolgte im TopCount β -Counter (Canberra Packard) und die Auswertung mit SigmaPlot für Windows 1.02 und dem RadLig-Modul von Ligand 4.0.

2.5 Software

Für die Erstellung dieser Arbeit wurden folgende Programme verwendet: Word 97 unter Windows 98 (Microsoft), Excel 97 (Microsoft), PowerPoint 97 (Microsoft), Adobe Photoshop 4.0, VecView (Dr. T. Crass), WinMDI 2.6 (J. Trotter), SigmaPlot für Windows 1.02 (Jandel Scientific), das RadLig-Modul von Ligand 4.0 (Dr. G. A. McPherson), PC-Gene-Software 4.01 und das EditSeq- und MegAlign-Modul von DNASTAR 4.0.

Die Analyse der 5'-UTR des hC3aR erfolgte unter Verwendung des Matinspectors professional (Genomatix, http://genomatix.gsf.de/cgi-bin/matinspector_prof/mat_fam.pl).

3. Ergebnisse

3.1 Untersuchungen zum monoklonalen Antikörper 8H1

Im Rahmen meiner Diplomarbeit erfolgte die Generierung von monoklonalen Antikörpern gegen den zweiten extrazellulären Loop des hC3aR. Ein Aufgabenbereich der Promotion lag in der Charakterisierung eines dieser generierten Antikörper, des 8H1-Antikörpers.

3.1.1 Charakterisierung des monoklonalen Antikörpers 8H1

3.1.1.1 Westernblot

Zur Überprüfung der Spezifität des monoklonalen, gegen den hC3aR-Loop gerichteten IgG1-Antikörper 8H1 wurden Westernblots durchgeführt. Es konnte gezeigt werden, daß der 8H1-Antikörper die Bande des 6 x His-hC3aR-Loops und des Maltose-bindenden Protein (MBP) gekoppelten hC3aR-Loops erkannte, nicht aber das Maltose-bindende Protein allein (Daten nicht gezeigt).

3.1.1.2 Epitop-Mapping

Das Epitop-Mapping des monoklonalen 8H1-Antikörpers wurde von Dr. R. Frank an der GBF-Braunschweig mittels der Spotsynthesetechnik [128,129] durchgeführt. Es konnten nur bei vier der 49 an die Cellulosemembran gekoppelten Pentadecapeptide des zweiten extrazellulären hC3aR-Loops starke Signale detektiert werden. Die Pentadecapeptide enthielten die gemeinsame Aminosäuresequenz TNDHPW, welche einzigartig in der humanen Datenbank (Swiss Prot, EMBL-Datenbank) zu finden war.

```

E
M
N
D D
R R
L L
D D D
P P P
S S S
S S S S
F F F F
Q Q Q Q

T T T T T
N N N N N
D D D D D
H H H H H
P P P P P
W W W W W

T T T T
V V V V
P P P P
T T T
V V V
F F F
Q Q
P P
Q Q
T
F
Q

```

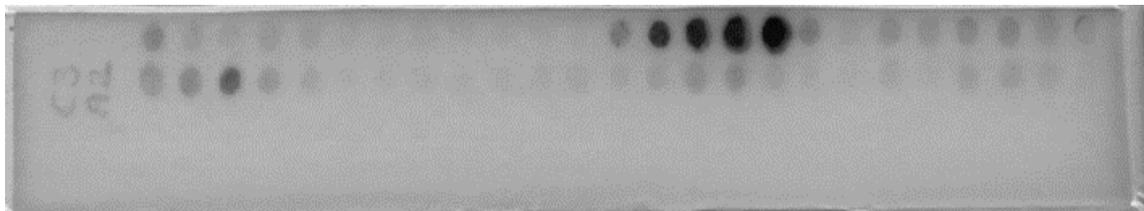


Abb. 3.1: Epitop-Mapping des monoklonalen 8H1-Antikörpers. Dargestellt ist eine Cellulosemembran mit überlappenden Pentadecapeptiden mit Verschiebung um drei Aminosäuren, die die gesamte Sequenz des zweiten extrazellulären Loops des hC3aR einnehmen. Starke Signale sind bei vier Pentadecapeptiden zu sehen, die die gemeinsame Aminosäuresequenz TNDHPW haben.

Die somit bestimmte Epitop-Sequenz TNDHPW des 8H1-Antikörpers ist im proximalen Bereich des hC3aR-Loops lokalisiert (Aminosäure 218 – 223).

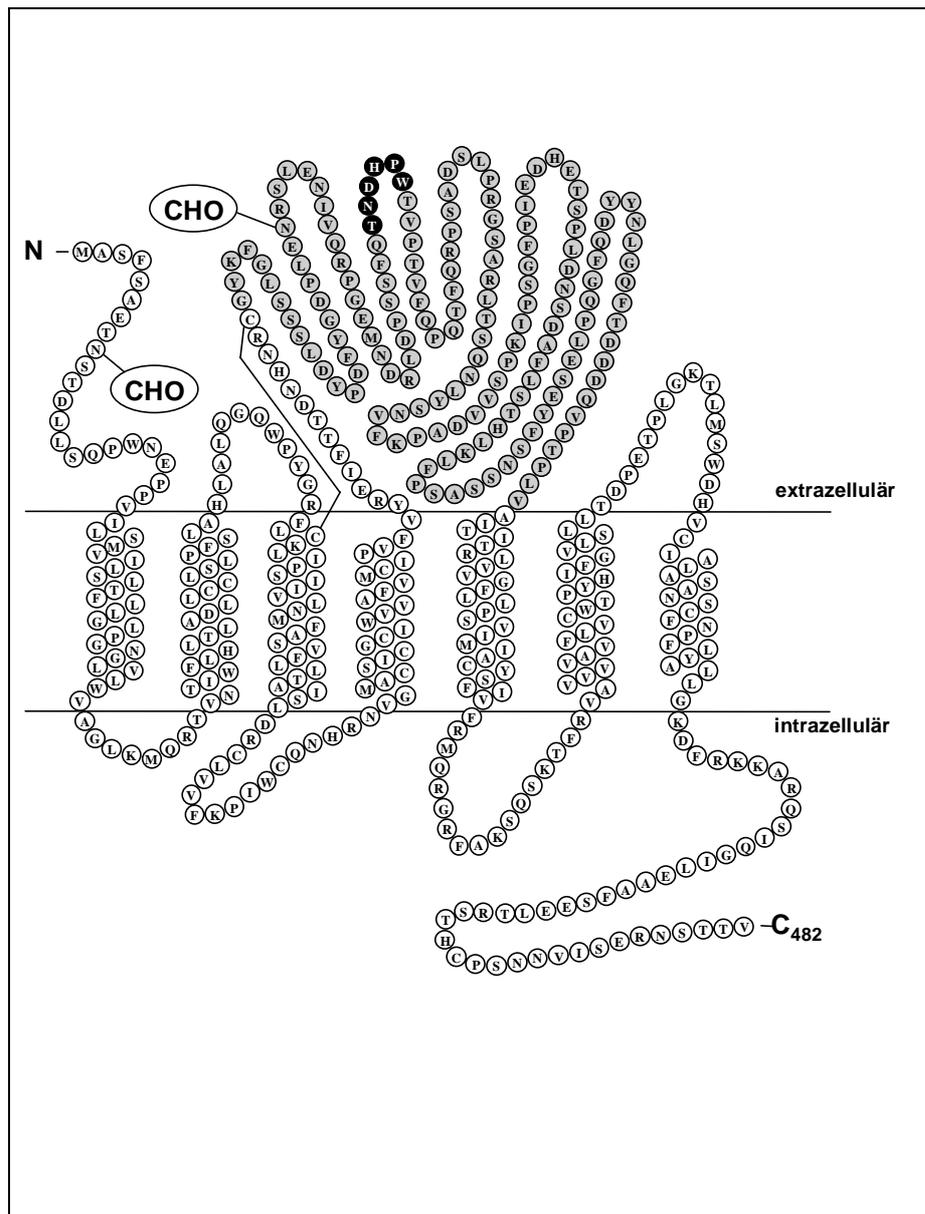


Abb. 3.2: Schematische Darstellung des hC3aR. Die Loop-Sequenz (Aminosäure 173 – 332), die für die Immunisierung verwendet wurde, ist grau und die bestimmte Epitop-Sequenz (Aminosäure 218 – 223) schwarz unterlegt.

3.1.1.3 Indirekte Immunfluoreszenz

Der monoklonale Antikörper 8H1 wurde zur weiteren Charakterisierung in der indirekten Immunfluoreszenz getestet. Dazu wurden mit pTCC0 transient transfizierte C3aR-positive HEK293-Zellen als Positivkontrolle und mit pTCCF transient transfizierte C5aR-positive

HEK293-Zellen als Negativkontrolle eingesetzt. Es konnte die spezifische Bindung des monoklonalen 8H1-Antikörpers an die C3aR-exprimierenden nicht aber an die C5aR-exprimierenden HEK293-Zellen gezeigt werden.

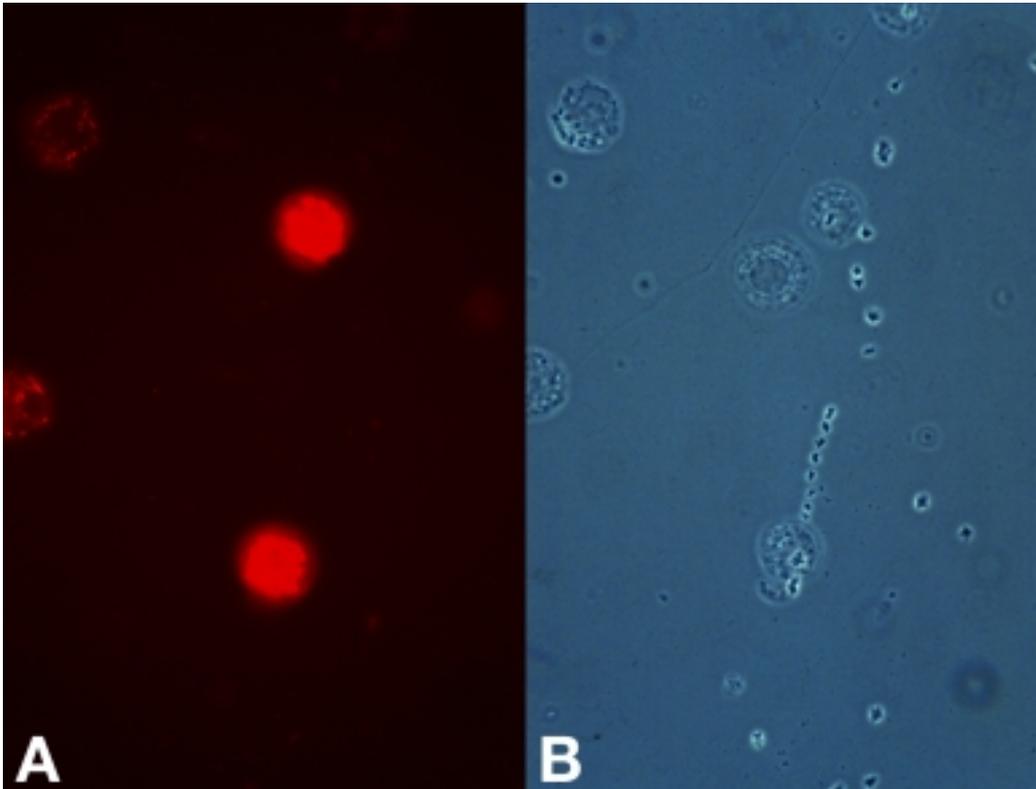


Abb. 3.3: Indirekte Immunfluoreszenz mit pTCC0 transient transfizierter C3aR-positiver HEK293-Zellen (A). In (B) ist die Durchlichtaufnahme derselben Region dargestellt.

3.1.1.4 FACS-Analysen

Zur Überprüfung der Spezifität auf nativen Zellen wurde der monoklonale 8H1-Antikörper in FACS-Analysen unter Verwendung von mit pTCC0 und pTCCF transient transfizierten HEK293-Zellen und humanen peripheren Leukozyten eingesetzt.

Bei mit pTCC0 transient transfizierten C3aR-exprimierenden HEK-293-Zellen konnte nach Inkubation mit dem 8H1-Antikörper und dem FITC-markierten Sekundärantikörper im Vergleich zum IgG1-Kontrollantikörper eine deutliche Erhöhung der Fluoreszenz gezeigt werden, wohingegen bei mit pTCCF transient transfizierten C5aR-exprimierenden HEK-293-Zellen keine Erhöhung der Fluoreszenz gezeigt werden konnte. Mit dem monoklonalen 8H1-

Antikörper konnten also spezifisch die C3aR-positiven nicht aber die C5aR-positiven Zellen nachgewiesen werden.

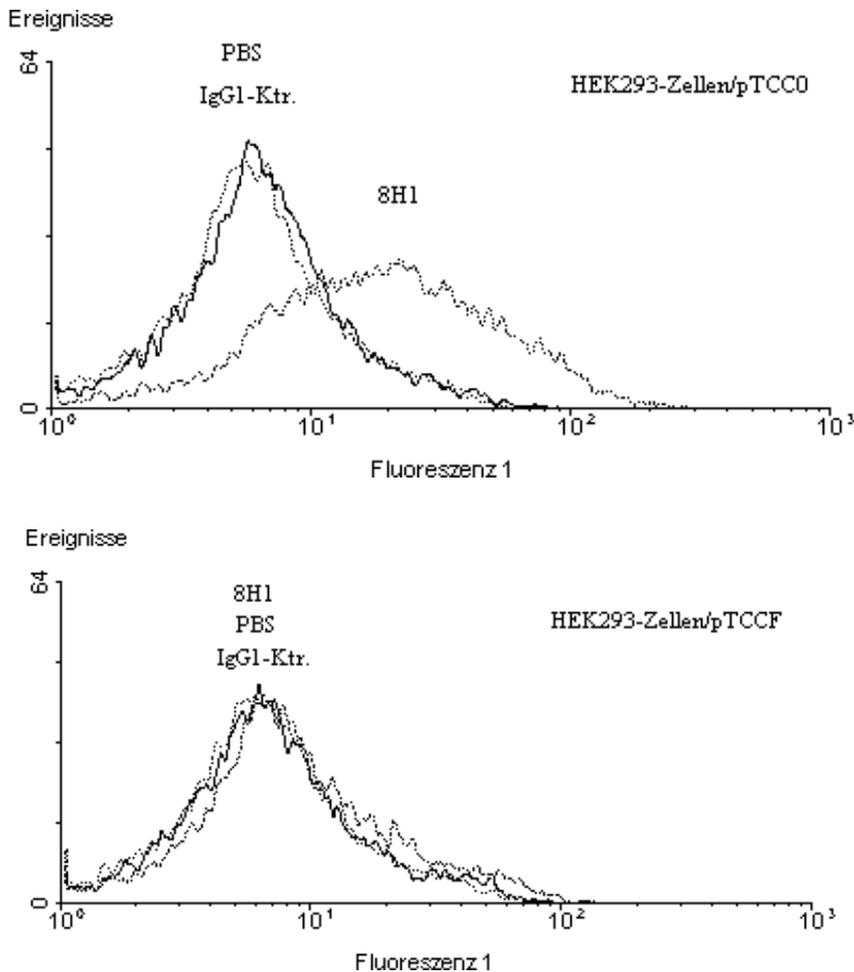


Abb. 3.4: FACS-Analyse von mit pTCC0 transient transfizierten C3aR-positiven und von mit pTCCF transient transfizierten C5aR-positiven HEK293-Zellen unter Verwendung des monoklonalen 8H1-Antikörpers und eines Kontrollantikörpers der Subklasse IgG1.

Weitere FACS-Analysen wurden mit humanen peripheren Leukozyten durchgeführt. Durch Eingrenzung der Population nach der Messung mit der WinMDI-Software Version 2.6 konnten Aussagen über die Bindung des monoklonalen 8H1-Antikörpers auf peripheren Granulozyten, Monozyten und Lymphozyten gemacht werden. Auf den peripheren Lymphozyten konnte mit dem 8H1-Antikörper wie in der Literatur beschrieben [108] keine C3aR-Expression nachgewiesen werden ($n > 10$).

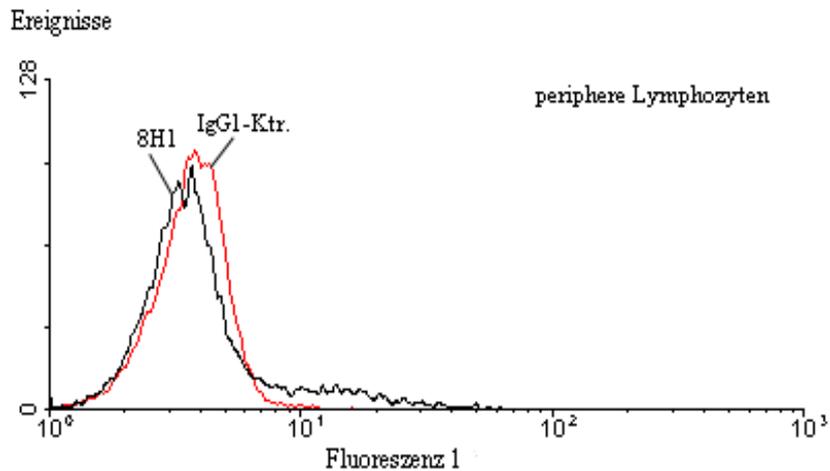


Abb. 3.5: FACS-Analyse von peripheren Lymphozyten unter Verwendung des monoklonalen 8H1-Antikörpers und eines Kontrollantikörpers der Subklasse IgG1. Im Vergleich zum Kontrollantikörper konnte nach Inkubation mit monoklonalen 8H1-Antikörper keine Verschiebung der Fluoreszenz detektiert werden.

Bei den peripheren Granulozyten und Monozyten hingegen konnte nach Inkubation mit dem 8H1-Antikörper und dem FITC-markierten Sekundärantikörper im Vergleich zum IgG1-Kontrollantikörper eine deutliche Erhöhung der Fluoreszenz detektiert werden. Durch gleichzeitige Inkubation mit dem synthetischen Nonapeptid Köhl 2 (2 $\mu\text{g/ml}$; TNDHPWTVP), welches die Epitop-Sequenz TNDHPW beinhaltet, konnte die Bindung des 8H1-Antikörpers auf Monozyten und Granulozyten kompetitiv verdrängt werden.

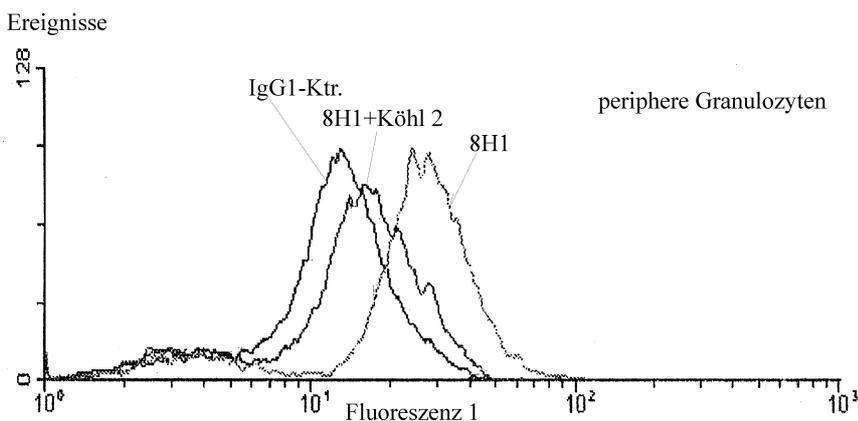


Abb. 3.6: FACS-Analyse von peripheren Granulozyten unter Verwendung eines IgG1-Kontrollantikörpers, des monoklonalen 8H1-Antikörpers und des monoklonalen 8H1-Antikörpers mit dem Nonapeptid Köhl 2. Es konnte eine kompetitive Verdrängung des 8H1-Antikörpers nach Inkubation mit dem Nonapeptid Köhl 2 detektiert werden.

Ebenso konnte man auf Monozyten die 8H1-Bindung mit dem 6 x His-hC3aR-Loop (5 µg/ml) kompetitiv verdrängen. Das gilt aber nicht für Granulozyten! Hier blieb in Abhängigkeit vom Blutspender ($n > 10$) die Rechtsverschiebung der Fluoreszenz erhalten oder verstärkte sich sogar etwas. Dieses Ergebnis war unabhängig davon, ob zuerst die Inkubation mit dem 6 x His-hC3aR-Loop und anschließend die Inkubation mit dem 8H1-Antikörper erfolgte oder mit beiden gleichzeitig inkubiert wurde. Um eine unspezifische Bindung des His-tag des hC3aR-Loops an Oberflächenstrukturen auf Granulozyten ausschließen zu können und potentielle Bindungsstellen abzusättigen, wurde ein 6 x His-Peptid im hohen Überschuß (20 µg/ml) bei der Inkubation des 8H1-Antikörpers mit dem 6 x His-hC3aR-Loop zugesetzt. Ebenso wie bei der Koinkubation des 8H1-Antikörper mit dem 6 x His-hC3aR-Loop konnte auch hier keine kompetitive Verdrängung erreicht werden.

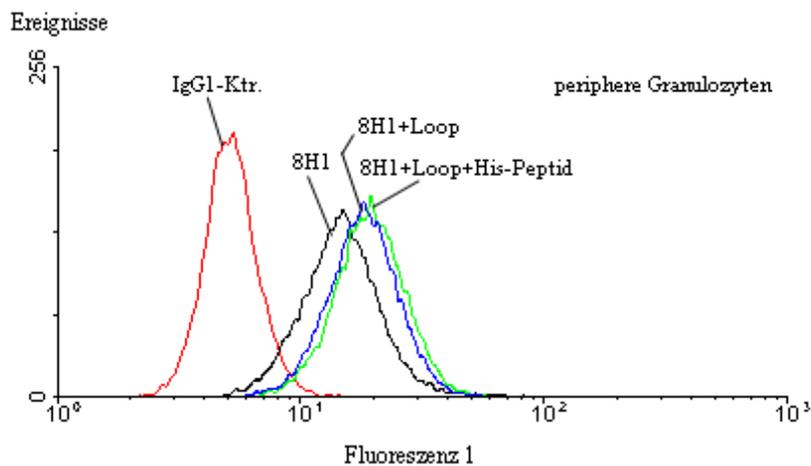


Abb. 3.7: FACS-Analyse von peripheren Granulozyten unter Verwendung eines IgG1-Kontrollantikörpers, des monoklonalen 8H1-Antikörpers, des monoklonalen 8H1-Antikörpers mit dem 6 x His-hC3aR-Loop und des monoklonalen 8H1-Antikörpers mit dem 6 x His-hC3aR-Loop und einem 6 x His-Peptid. Weder durch Koinkubation mit dem 6 x His-hC3aR-Loop noch durch Koinkubation mit dem 6 x His-hC3aR-Loop und dem 6 x His-Peptid, erfolgte eine kompetitive Verdrängung des 8H1-Antikörpers.

Als mögliche Ursache für dieses unerwartete Ergebnis (= Verdrängung mit einem Epitop-tragenden Peptid möglich, nicht aber mit dem gesamten Loop, der ja diese Epitop-Sequenz beinhaltet) wäre eine Bindung des Loop-Peptids an über Fc γ -Rezeptoren gebundene 8H1-Antikörper denkbar. Um dieses auszuschließen wurden die Experimente mit peripheren Leukozyten wiederholt, die zuvor 30 min mit murinen Fc γ -Fragmenten zur Absättigung der Fc γ -Rezeptoren vorinkubiert wurden, was aber zu keiner Veränderung der Ergebnisse führte. Zusätzlich wurden FITC-gekoppelte Fab-Fragmente des 8H1-Antikörpers eingesetzt. Aber

auch unter Verwendung der Fab-Fragmente konnte keine kompetitive Verdrängung der 8H1-Bindung auf peripheren Granulozyten erreicht werden, was ein auf Fc-Bindung beruhenden Effekt weitgehend ausschließt (Daten nicht gezeigt).

3.1.1.5 Immunhistochemie

Zur Charakterisierung des monoklonalen 8H1-Antikörpers und im Hinblick auf die Gewebeexpression des hC3aR wurden immunhistochemische Untersuchungen von Dr. Q. Zhang/K. Bankes (Medizinische Mikrobiologie/Anatomie II, MH Hannover) durchgeführt.

Zur Untersuchung der Eignung des 8H1-Antikörper für immunhistochemische Untersuchungen wurden Versuche an mit pTCC0 transient transfizierten C3aR-positiven HEK293-Zellen und mit pTCCF transient transfizierten C5aR-positiven HEK293-Zellen durchgeführt. Dabei zeigte sich, wie auch schon in den FACS-Analysen (3.1.1.4), daß der monoklonale 8H1-Antikörper spezifisch die C3aR-exprimierenden, aber nicht die C5aR-exprimierenden Zellen erkennt.

Bei Untersuchungen mit dem 8H1-Antikörper an humaner Leber zeigte sich eine C3aR-Expression auf Zellen in den Periportalfeldern der Leber. Die Bindung des 8H1-Antikörpers konnte mit dem synthetischen Nonapeptid Köhl 2 (TNDHPWTVP), nicht aber mit dem 6 x His-hC3aR-Loop verdrängt werden. Dieses Ergebnis stimmte mit dem Ergebnis der FACS-Analyse überein: Auf peripheren Granulozyten konnte die 8H1-Bindung zwar mit dem Nonapeptid Köhl 2, aber nicht mit dem 6 x His-hC3aR-Loop verdrängt werden (3.1.1.4).

Weiterhin wurde der 8H1-Antikörper dazu eingesetzt, daß Expressionsmuster des C3aR in humaner ausdifferenzierter Plazenta aufzuzeigen. Es konnte gezeigt werden, daß hauptsächlich drei Zelltypen eine Färbung aufwiesen: Arterielle Endothelzellen, der Syncytiotrophoblast und Hofbauerzellen (= CD14-positive Gewebsmakrophagen). Diese Färbung konnte unter Verwendung eines zweiten, ein anderes Epitop erkennenden hC3aR-Antikörpers, des 3G7 (rekombinanter scFv mit myc-tag, H. Hawlisch, Institut für Medizinische Mikrobiologie, MH Hannover, [87]), bestätigt werden, wobei der Hintergrund insgesamt stärker gefärbt war. Ebenso konnte eine vollständige Verdrängung der 8H1-Bindung durch gleichzeitige Inkubation mit 0,05 und 0,5 µg/ml des Epitop-Peptides Köhl 2 erreicht werden, nicht aber durch Inkubation mit dem Kontrollpeptid P251 (HYDDKDTLDLN).

Bei den arteriellen Endothelzellen war die stärkste C3aR-Expression an der apikalen Membran der Zellen zum Lumen zu detektieren, wobei die Expression einer engen Regulation

unterworfen zu sein schien, da Endothelbereiche mit starker Expression von solchen mit nicht detektierbarer Expression unterbrochen waren. Bei den venösen Endothelzellen in der Plazenta konnte hingegen keine sichere C3aR-Expression nachgewiesen werden. In der Syncytiotrophoblastenschicht war der Expressionslevel ebenfalls sehr variabel; einige Bereiche waren sehr stark gefärbt und andere sehr schwach. Bei den Hofbauerzellen handelt es sich um CD14-positive phagozytische Zellen des Stammvillus, die eine typische spindelförmige Morphologie aufwiesen und erwartungsgemäß positiv reagierten. Eine schwache C3aR-Expression konnte ebenfalls auf den in der Plazenta vorhandenen Granulozyten gezeigt werden.

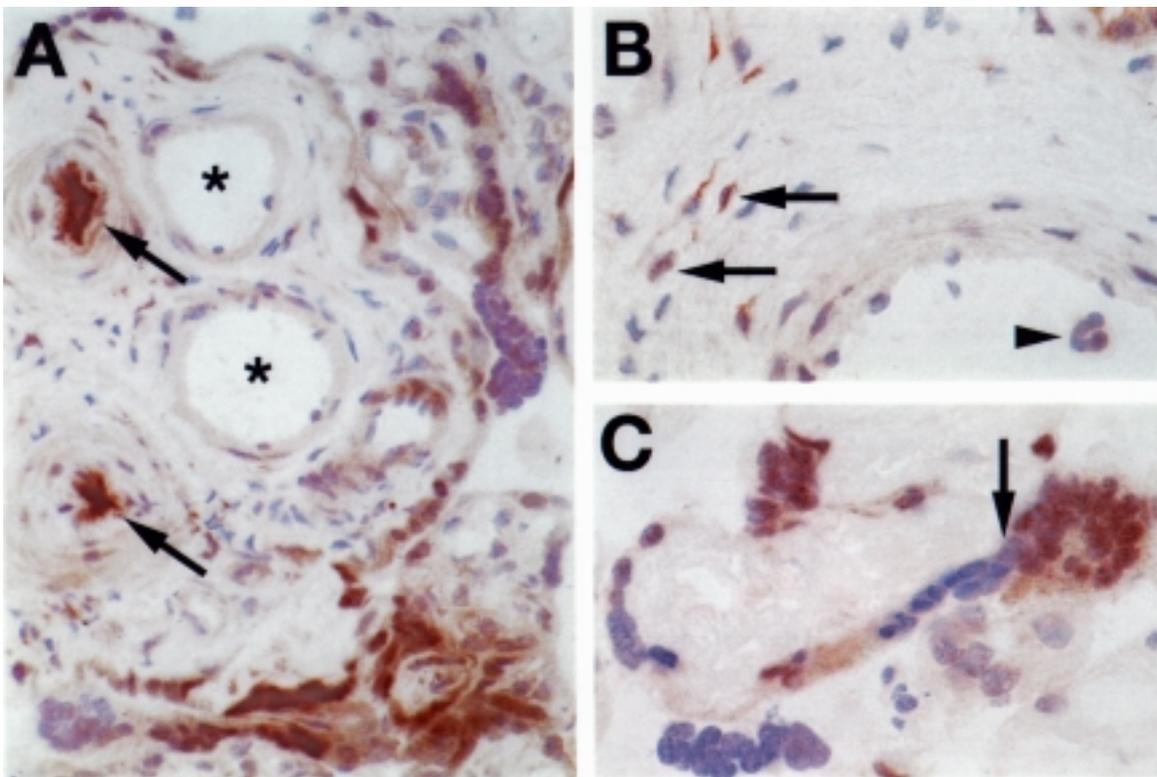


Abb. 3.8: Kryoschnitte ausdifferenzierter humaner Plazenta: Drei Zelltypen zeigen eine C3aR-Expression. (A) Arterielle Endothelzellen des Stammvillus reagieren mit dem monoklonalen 8H1-Antikörper (Pfeile) im Gegensatz zu venösen Endothelzellen (Sterne). (B) Phagozytische CD14-positive Hofbauerzellen im Stammvillus sind ebenfalls angefärbt (Pfeile). Im Lumen einer Vene ist ein Granulozyt schwach angefärbt (Pfeilkopf). (C) Variables C3aR-Expressionsmuster in der Syncytiotrophoblastenschicht (Pfeil).

Zur weiteren Bestätigung der Ergebnisse wurden zwei weitere gegen den zweiten extrazellulären Loop des hC3aR gerichtete monoklonale IgG2a-Antikörper eingesetzt, der

P4B4 und der P8B5 (P. Gasque, Cardiff, UK). Die Antikörper erkennen überlappende Epitope, die von denen des monoklonalen 8H1-Antikörper und des scFv 3G7 abweichen und im terminalen Bereich der Sequenz des zweiten extrazellulären Loops gelegen sind. Unter Verwendung dieser beiden Antikörper in immunhistochemischen Untersuchungen konnte man in humaner Plazenta nur auf den CD14-positiven phagozytischen Hofbauerzellen eine C3aR-Expression nachweisen, nicht aber auf arteriellen Endothelzellen und der Syncytiotrophoblastenschicht.

3.1.2 Untersuchungen zur Funktion des zweiten extrazellulären hC3aR-Loops

Der hC3aR hat einen im Vergleich zu verwandten Rezeptoren außergewöhnlich großen zweiten extrazellulären Loop, dessen Funktion auch drei Jahre nach seiner Entdeckung unbekannt ist. In FACS-Analysen konnte die 8H1-Bindung auf peripheren Granulozyten durch das Nonapeptid Köhl 2, nicht aber durch den 6 x His-hC3aR-Loop kompetitiv verdrängt werden, wobei eine kompetitive Verdrängung durch den 6 x His-hC3aR-Loop auf anderen Zelltypen möglich war. Dieses Phänomen konnte auch in der Immunhistochemie beobachtet werden. Auf Zellen in den Periportalfeldern der humanen Leber konnte die Immunofärbung durch Inkubation mit dem 6 x His-hC3aR-Loop nicht abgeschwächt werden, sondern nur mit dem Nonapeptid Köhl 2. Im Hinblick auf die Ergebnisse der FACS- und immunhistochemische Analysen stellte sich die Frage, ob der zweite extrazelluläre Loop des hC3aR an eine Struktur auf peripheren Granulozyten und auf Zellen in den Periportalfeldern der Leber bindet, und es deshalb nicht zu einer kompetitiven Verdrängung des 8H1-Antikörpers kommt. Aufgrund dieser Befunde wurden weitere Untersuchungen zur Funktion des zweiten extrazellulären hC3aR-Loops begonnen.

3.1.2.1 Experiment mit Nickel-NTA-Magnetic Agarose Beads

Zur Überprüfung, ob auf peripheren Granulozyten eine Oberflächenstruktur vorliegt, die mit dem zweiten extrazellulären Loop des hC3aR interagiert, wurde ein Versuch mit Ni-NTA-

Magnetic Agarose Beads durchgeführt. Es sollte untersucht werden, ob es nach Kopplung des 6 x His-hC3aR-Loops an die Ni-NTA Beads und anschließender Inkubation mit peripheren Leukozyten zu einer Bindung von Granulozyten an den gekoppelten hC3aR-Loop kommt. Als Negativkontrolle wurden Ansätze mitgeführt, bei denen anstelle des 6 x His-hC3aR-Loops ein 6 x His-Peptid an die Beads gekoppelt wurde. Nach Mikroskopie konnten keine Unterschiede zwischen den beiden Ansätzen detektiert werden. In diesem Test konnte keine spezifische Interaktion zwischen dem hC3aR-Loop und peripheren Granulozyten gezeigt werden (Daten nicht gezeigt).

3.1.2.2 Biacore-Analyse

Als zweites Experiment zur Überprüfung, ob eine Oberflächenstruktur auf peripheren Granulozyten mit dem zweiten extrazellulären Loop interagiert, wurde eine Biacore-Analyse durchgeführt. Dabei sollte untersucht werden, ob es nach Kopplung des 6 x His-hC3aR-Loop an den Carboxylate-Chip zur Bindung der in der Leukozytenpräparation vorhandenen Granulozyten kommt. Es zeigte sich, daß keine Bindung der Granulozyten an das Loop-Protein erfolgte (Daten nicht gezeigt).

3.1.2.3 Screening einer λ TriplEx-Phagenbank aus humaner Leber

Das Screening auf einen potentiellen Interaktionspartner des zweiten extrazellulären hC3aR-Loops erfolgte aufgrund der Ergebnisse der FACS- und immunhistochemischen Analysen: Auf peripheren Granulozyten und Zellen in den Periportalfeldern der Leber war keine Verdrängung des 8H1-Antikörpers durch den 6 x His-hC3aR-Loop möglich, aber durch das Nonapeptid Köhl 2. Zum Screening wurde deshalb eine λ TriplEx 5'-STRECH PLUS cDNA Library aus humaner Leber (Clontech) verwendet. Aufgrund der bei den λ TriplEx-Phagen vorliegenden zwei Translationsinitiationstellen und einer (dT)₁₃-Region, in der eine Änderung des Leserasters der Ribosomen erfolgen kann, erfolgt die Expression einer klonierten Sequenz in allen drei Leserahmen, so daß zum Screening nur 10⁵ pfu eingesetzt wurden. In der ersten Runde des Phagenscreenings wurden zwei Filter pro Platte gezogen, wobei der eine Filter nur mit dem monoklonalen 8H1-Antikörper und der andere Filter mit dem 8H1-Antikörper und

dem 6 x His-hC3aR-Loop entwickelt wurde. Bei beiden Filtern konnte man nur sehr schwach gefärbte Spots detektieren. Nach Vergleich der Spots auf beiden Filtern wurden die pfu aus den Platten isoliert, die nur auf dem Filter zu detektieren waren, der mit dem 8H1-Antikörper und dem 6 x His-hC3aR-Loop gleichzeitig entwickelt worden war. Durch den Vergleich beider Filter sollte ausgeschlossen werden, daß Phagen, die die hC3aR-Sequenz tragen, isoliert werden. Es wurde eine zweite und eine dritte Screeningrunde durchgeführt, wobei nur noch ein Filter pro Platte gezogen wurde, der mit dem 8H1-Antikörper und dem 6 x His-hC3aR-Loop entwickelt wurde. Trotz der schwachen Färbung der Spots konnte man eine Anreicherung von positiven λ TriplEx-Phagen erkennen. Anschließend wurden zwei weitere Screeningrunden durchgeführt, bei denen eine erhebliche Abnahme an Spots zu detektieren war. Aufgrund dieses Resultats wurde die λ TriplEx-Phagenbank erneut gescreent, wobei wieder 10^5 pfu eingesetzt wurden. Auch beim erneuten Screening konnten während der gesamten Screeningrunden nur schwach gefärbte Spots auf den Filtern detektiert werden, und es kam ebenfalls nur in den ersten Runden zu einer Anreicherung der Spots und in den weiteren Runden wieder zu einer Abnahme der Spots. Deshalb wurden Phagen, die in der dritten Runde isoliert wurden, mittels PCR mit dem λ TriplEx 5' LD-Insert Screening Amplimer und dem λ TriplEx 3' LD-Insert Screening Amplimer überprüft, wobei nur bei einigen Phagen ein Amplifikat erzeugt werden konnte. Um auszuschließen, daß diese Phagen die hC3aR-Sequenz tragen, wurde eine zweite PCR mit den hC3aR-Loop-spezifischen TC1 und TC2 durchgeführt. Es zeigte sich, daß bei den untersuchten Phagen nur bei einem Isolat kein PCR-Produkt mit den hC3aR-Loop-spezifischen Primern amplifiziert werden konnte. Durch Sequenzierung ergab sich, daß auch dieser Phage einen Teil der Sequenz des hC3aR trug. Insgesamt konnten durch das Screening der λ TriplEx-Phagenbank aus humaner Leber nur Phagen mit Teilen der hC3aR-Sequenz als Insert isoliert werden.

3.2 Charakterisierung von C3aR-exprimierenden Zelllinien

Für den Aufbau eines Reporterassays zur Untersuchung des Promotors des hC3aR mußte eine geeignete humane Zelllinie gefunden werden, die zum einen gut transient transfizierbar sein sollte und zum anderen den C3aR exprimieren mußte. Dazu wurden in der Literatur als C3aR-exprimierend beschriebene Zelllinien und in der Arbeitsgruppe vorhandene Zelllinien untersucht. Ein Schwerpunkt wurde dabei auf Lungenzelllinien und neuronale Zelllinien gelegt, weil diese aufgrund von Daten aus Northernanalysen [72,73] und histologischen Befunden [103-105] vielversprechend erschienen.

3.2.1 FACS-Analysen

Primär wurden FACS-Analysen bei den verschiedenen Zelllinien mit dem monoklonalen 8H1-Antikörper im Vergleich zu einem IgG1-Kontrollantikörper durchgeführt. Die folgende Tabelle zeigt eine Zusammenfassung der Ergebnisse:

Zelllinie	8H1
GLC4	–
IMR-32	+
KG-1	–
SK-N-MC	+
SK-N-SH	–/(+)
SW1573	+
U87-MG	–

Tab. 3.1: Untersuchung der C3aR-Expression mittels FACS-Analysen in verschiedenen humanen Zelllinien unter Verwendung des monoklonalen 8H1-Antikörpers. C3aR-positive Zelllinien sind mit einem + und C3aR-negative mit einem – markiert.

Die in den FACS-Analysen eindeutig negativen Zelllinien GLC4, KG-1 und U87-MG wurden nicht weiter untersucht. In den verschiedenen FACS-Analysen differieren die Ergebnisse bei

SK-N-SH-Zellen. Bei den Zelllinien IMR-32 und SK-N-MC, die sich in den FACS-Analysen als C3aR-positiv erwiesen, konnte die Bindung des 8H1-Antikörpers durch gleichzeitige Inkubation mit dem 6 x His-hC3aR-Loop und dem synthetischen Nonapeptid Köhl 2 (2 µg/ml, TNDHPWTVP), welches die Epitop-Sequenz TNDHPW beinhaltet, kompetitiv verdrängt werden.

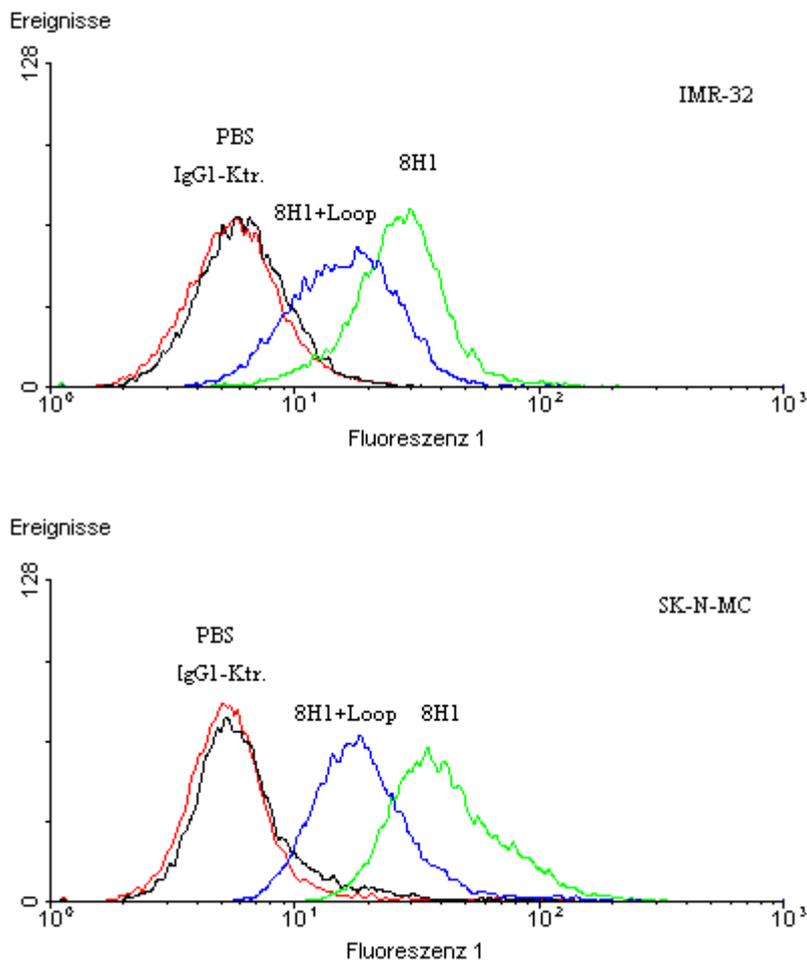


Abb. 3.9: Überprüfung der Oberflächenexpression des hC3aR mit dem monoklonalen 8H1-Antikörpers im Vergleich zu einem Kontrollantikörper der Subklasse IgG1. Die Bindung des 8H1-Antikörpers konnte mit dem 6 x His-hC3aR-Loop auf IMR-32- und SK-N-MC-Zellen kompetitiv verdrängt werden.

Diese Ergebnisse konnten mit zwei weiteren monoklonalen gegen den zweiten extrazellulären Loop des hC3aR gerichteten Antikörpern, dem P4B4 und dem P8B5 (P. Gasque, Cardiff, UK),

unter Verwendung eines IgG2a-Kontrollantikörpers bestätigt werden. Die Antikörper erkennen überlappende Epitope, die von dem Epitop des 8H1-Antikörpers abweichen. Ebenso konnte die Bindung des P4B4 und P8B5 durch Inkubation mit dem 6 x His-hC3aR-Loop verdrängt werden (Daten nicht gezeigt).

Weiterhin wurden die beiden Zelllinien auf C5aR-Expression untersucht unter Verwendung des gegen den hC5aR gerichteten monoklonalen Antikörpers W17/1 [130], wobei bei beiden Zelllinien eine Expression gezeigt werden konnte.

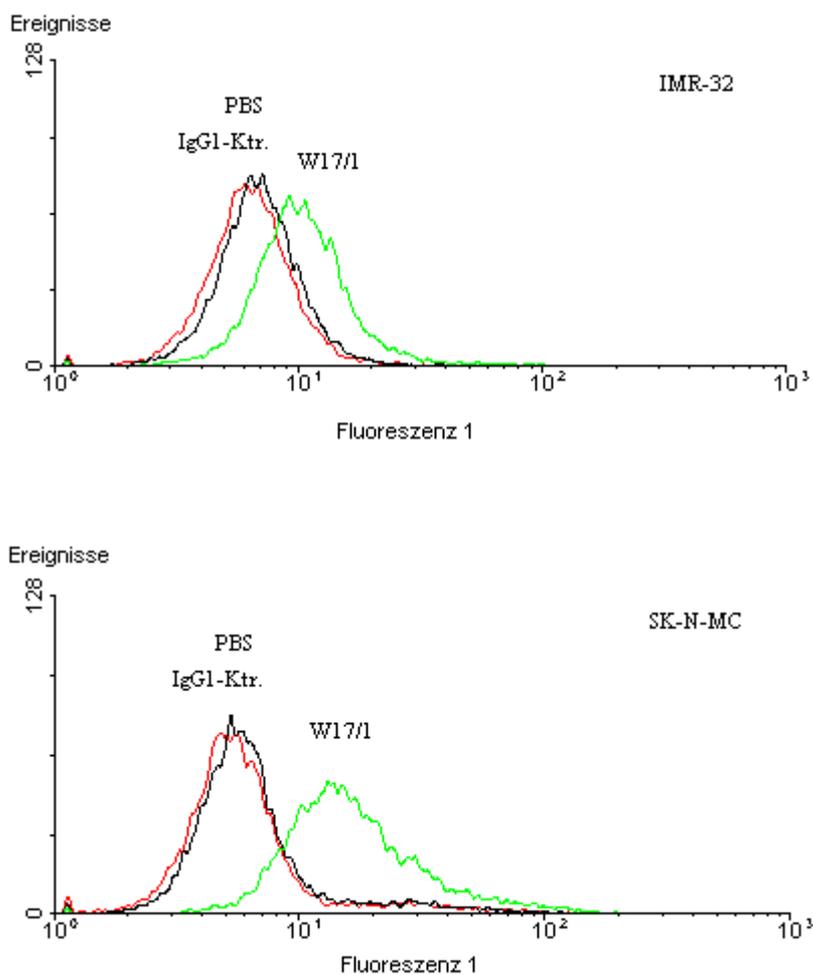


Abb. 3.10: Untersuchung der Oberflächenexpression des hC5aR mit dem monoklonalen W17/1-Antikörper im Vergleich zu einem Kontrollantikörper der Subklasse IgG1 auf IMR-32- und SK-N-MC-Zellen. Auf beiden Zelllinien war eine C5aR-Expression zu detektieren.

Die folgende Tabelle zeigt eine Zusammenfassung der Ergebnisse der FACS-Analysen unter Verwendung verschiedener monoklonaler C3aR- und C5aR-Antikörper:

Zelllinie	8H1	8H1 + Loop	8H1 + Köhl 2	P4B4	P4B4 + Loop	P8B5	P8B5 + Loop	W17/1
GLC4	–							
IMR-32	+	Verdrän- gung	Verdrän- gung	+	Verdrän- gung	+	Verdrän- gung	+
KG-1	–							
SK-N-MC	+	Verdrän- gung	Verdrän- gung	+	Verdrän- gung	+	Verdrän- gung	+
SK-N-SH	–/(+)			–		–		–/(+)
SW1573	+							
U87-MG	–							

Tab. 3.2: Zusammenfassung der Ergebnisse der FACS-Analysen mit verschiedenen monoklonalen gegen den C3aR bzw. C5aR gerichteten Antikörpern. Eine Erhöhung der Fluoreszenz im Vergleich zum Kontrollantikörper ist mit einem + und eine gleichbleibende Fluoreszenz mit einem – dargestellt.

3.2.2 Northern-Transfer

Untersuchungen der Zelllinien auf mRNA-Ebene erfolgten durch Northern-Transfer und anschließender Detektion mit einer DIG-markierten Antisense-RNA-Sonde gegen die hC3aR-mRNA. Zur Generierung der ca. 1000 bp-Sonde wurde pTCC0 mit *Bsr*GI 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 undifferenzierten und mit 1 mM Bt₂cAMP differenzierten U937-Zellen, HMC-1-Zellen, SK-N-MC-Zellen, SK-N-SH-Zellen, IMR-32-Zellen, SW1573-Zellen, Ambionzellen und HeLaT-Zellen eingesetzt. Nach Northern-Transfer erfolgte die Hybridisierung der Membran zuerst mit der hC3aR-Sonde und anschließend mit der GAPDH-Sonde. Die im Northernblot zu detektierende mRNA-Größe lag bei der hC3aR-Sonde bei 2,4 kb und bei der GAPDH-Sonde bei 1,4 kb.

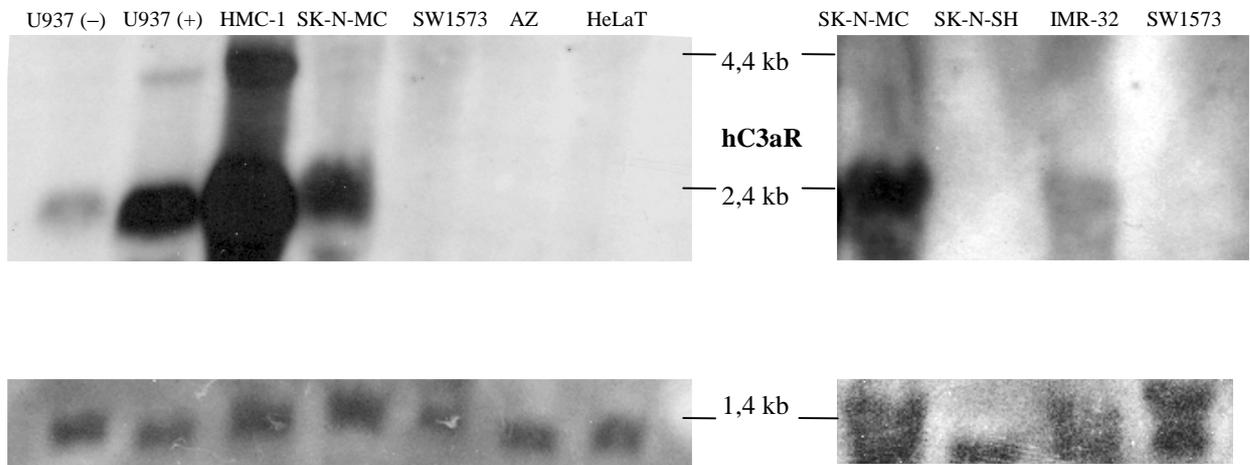


Abb. 3.11: Northern-Transfer von undifferenzierten (-) und differenzierten (+) U937-, HMC-1-, IMR-32-, HeLaT-, SK-N-MC-, SK-N-SH-, SW1573- und Amnion-Zellen (AZ). Die Blots wurden nach der Hybridisierung mit der hC3aR-spezifischen Sonde mit einer GAPDH-spezifischen Sonde rehybridisiert.

In den Northernanalysen konnte mit der hC3aR-RNA-Sonde die 2,4 kb Bande bei differenzierten und undifferenzierten U937-Zellen, HMC-1-Zellen, SK-N-MC-Zellen und IMR-32-Zellen nachgewiesen werden, nicht aber bei Amnionzellen und HeLaT-Zellen. Bei den aufgrund der FACS-Analyse fraglich C3aR-positiven SK-N-SH-Zellen und den C3aR-positiven SW1573-Zellen konnte auf RNA-Ebene kein Signal detektiert werden. Das mit Abstand höchste RNA-Signal lag bei HMC-1-Zellen vor.

3.2.3 Kompetitive Bindungsstudien

Bei den Zelllinien IMR-32 und SK-N-MC, bei denen die C3aR-Expression in FACS-Analysen und die C3aR-mRNA in Northern-Analysen nachgewiesen werden konnten, wurde die Expression zusätzlich durch kompetitive Bindungsstudien überprüft.

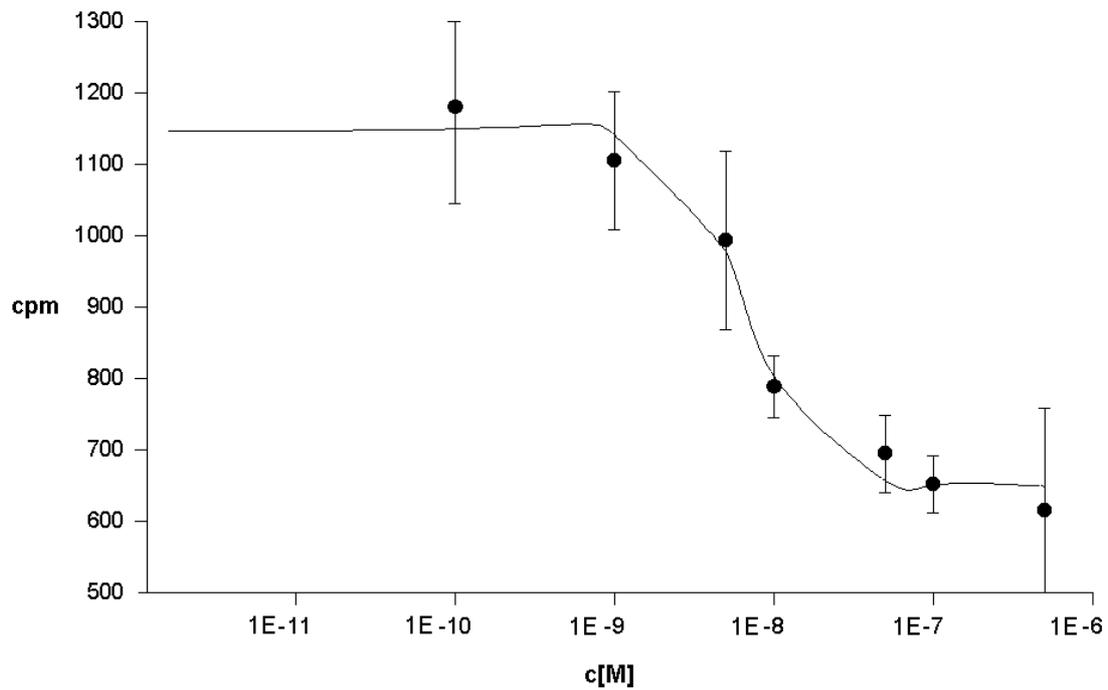


Abb. 3.12: IMR-32: Kompetitive Bindungsstudie mit C3a als Verdränger und ^{125}I -C3a als Tracer.

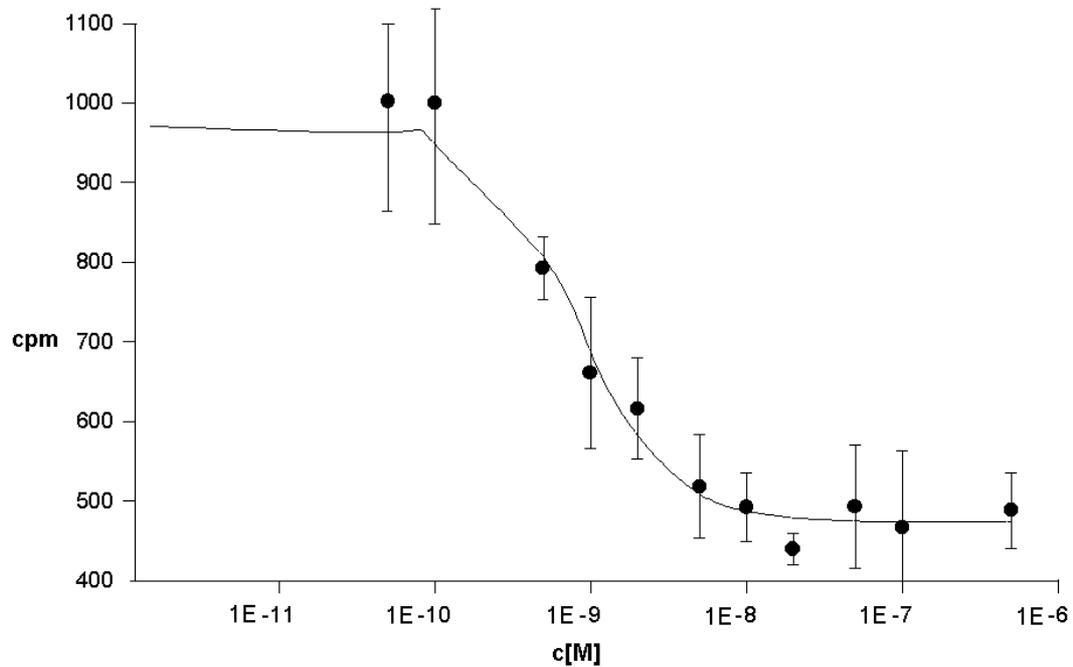


Abb. 3.13: SK-N-MC: Kompetitive Bindungsstudie mit C3a als Verdränger und ^{125}I -C3a als Tracer.

Beide Zelllinien zeigten meßbare ^{125}I -C3a-Bindungen. Unter Verwendung von SigmaPlot für Windows 1.02 ergab sich bei IMR-32-Zellen ein IC_{50} -Wert von $4,37 \text{ nM} \pm 3,45 \text{ nM}$ ($n = 2$) und bei SK-N-MC-Zellen von $0,92 \text{ nM} \pm 0,22 \text{ nM}$ ($n = 3$). Die K_D lag nach Berechnung mit dem RadLig-Modul von Ligand 4.0 bei IMR-32 bei $8,82 \text{ nM} \pm 0,9 \text{ nM}$ ($n = 3$) und bei SK-N-MC bei $0,78 \text{ nM} \pm 0,73 \text{ nM}$ ($n = 2$).

3.3 Untersuchung der 5'-UTR des hC3aR

Ein weiterer Schwerpunkt der Promotion lag in der Charakterisierung der 5'-UTR des hC3aR. Zu Beginn wurde die Sequenz von Teilen der 5'-UTR bestimmt und Fragmente davon zur Ermittlung von Promotorstrukturen in einem Reporterassay eingesetzt. Eine weitere Fragestellung war die Eingrenzung des Transkriptionsstartpunktes.

3.3.1 Sequenzierung

Durch Sequenzierungen konnte für die genomische Organisation des hC3aR gezeigt werden, daß zwei Exons vorliegen, die durch ein ca. 6 kb großes Intron unterbrochen sind, das die spezifischen 5'- und 3'-Spleißstellen aufweist (siehe auch Anhang). Weiterhin wurde ein ungefähr 2,4 kb großer Bereich im Exon 1 stromaufwärts des Introns sequenziert, indem der Promotor des hC3aR zu vermuten war.

			ACCAGCCTGG	CCAGCATGGT	GAAACCCCGT	-2341
CTCTACTAAA	AATACAAAAA	ATTAGCCAGG	TGTGGTTGTG	GGCACCTGTA	ATCCCAGCTA	-2281
CTTGGGAGGC	TGAGGCAGGA	GAATCGATTG	AAGCCAGGAG	GCAGAAGTTG	CAGTGAGCCG	-2221
AGATCGCACC	ATTGCACTCC	AACCTGGGTG	ACAAGAGCAA	AACTCTGTCT	CAGGAAAAAA	-2161
AAAAAAAAAA	GTGTAATTTG	GGCCAAGATG	TCCTGATATA	AAAAGATAAG	TGGAAAAAAT	-2101
AGAACAAAAC	AATATGCGTA	GTAGAATATG	CGTATTTAAG	AGAGAGACTA	CATCTGAAAA	-2041
GTGGAAAGAG	GATAGCTAGG	TGTTTAGGAA	ATTTTGGTTT	TTACTTTAAT	CTTCTCATAT	-1981
TTAATTTTTTA	CCATGGGGAA	TTAATTGTTT	TTATAAAAATA	TATTTTAATT	AGATATATAT	-1921
GTACATATAT	GATAATCCTA	CATTTTATAT	GCTTTCTGGA	TACCTATATT	ATTCAATATT	-1861
TCCAAATATT	GGAGGAAAGA	AAACCCAAAA	TAATCAATAG	GATTATATGT	ACTAACATGG	-1801
AAGTATGTTT	TGATATATTG	TTAAGTAAAA	AAGCAAGACA	TAAAAACACA	CATAAATTAC	-1741
CATCCCATTT	ATGTTCAAAA	CTACCTTTTTA	GAAAAATGTG	TGTTAGGCCG	GGTGGGGTGG	-1681
CTCACACCGG	TAATCACAGC	ACTTTGGGAG	GCTGAGGCAG	GTGGATCACC	TGAGCTCAGG	-1621
AGTTCAAGAC	CAGCCTGCCC	AACATGGCAA	AACCCCATCT	CTACCGAAAA	AATATAAAAA	-1561
TTAGCCGGCT	GTGGTGGCAC	ATGCCTGTAG	TCCCAGCTAC	TAAGGAGGAT	GAGGTGGGAG	-1501
AATTGCTTGA	ACCTAGGAGG	CAGAGGTTGC	AGTGAGCCAA	GATGGTGGCA	CTGCACTCCA	-1441
GCCTGGGCGA	CAGACTGAGG	CCCTGTCTCC	AACAAACAAA	ATGTGTGCTA	TATTCAGAAA	-1381
AAAAAAAAAAT	CAGGAAGAAT	GAACACTAAC	CTATTAAAAA	TAGTTACTTC	GAGCAGTGGA	-1321
ATTGAAAAGA	AAATCTTTCA	TTTTTTTTTAC	CCATTATAAT	TCTGTATTAT	TTCAATTTAT	-1261
CTCTTCTAGA	ACAAAGTATG	TTCTATTTTTT	GTAATTAGAT	GATGACAATG	GAAATAAACT	-1201
AATAAATACT	ACTCAACTCT	TGGCATTTTTT	CTTTTGATCT	TTCTGCCTCA	AAAATATTCC	-1141
GTGGTGACTT	GACTGCAAAC	AAGCAGAGGA	GCAGATATTA	TGGTTTGGAC	AAGTTGATTA	-1081
ATATAGACTG	AAGCCTATAT	CACAGACAAC	AGTGTTCAAA	TACATTTGAC	CCAAATAAAC	-1021
TTTATTTTAT	ATGCATATAT	CTAAAAGAGT	ATATGCATAT	ATCTAAAAGA	ATAATATAAG	-961
AATTATTTAC	AGCATAGTAT	TCATTAAGCA	GGAATFACCT	TCAGTCTTCT	GTACTCCTTC	-901
CTGATGAAAC	AGCACCTAGA	CTCCAGCCTG	TTCTCCAGTG	ACCACTAAGC	TCTCCACCT	-841
ACCTCCCCAC	CTACCTGCCC	TCTACCACCT	ACCTGCCTTT	GACTAGGCTC	CACTTATAGC	-781
CTAAGCAGCT	TTTCACCTTT	TTCTGTCTCT	AGAATFCCCTA	CAGGTACTTA	ATTAAGTACT	-721
TGCCCACATC	TTATTTCTAT	CTTAAGACTC	TCCTAGATTG	CCCTGGGTTA	TATATACCCC	-661
TGGCTAGAGT	GTTCTATTAT	TTTACTTCTA	TTGTTACTTC	TATTATTATA	GCCTAGTTTG	-601
TATTACAGCT	TTGTGTGTAT	ATGTATGGGT	ACATATTCCC	ACTCGATTGT	GAATCTCTGG	-541
AGATTAGAAT	ATAGCTTAAT	TCATCCTGAT	TTTGACATGG	CACCGTTTTT	CACATATATC	-481
AAGCATTTCA	GATATGTTAT	TTGAGATTAA	TTAAATGAGT	TTATTCAGGT	CATTCCTCCC	-421
CAACCACTCC	CCACTCCAAC	CCTCACATCT	CATAGAGTCT	TTTTTTTTTTC	ATTTCTAAAC	-361
AAAACCTATA	AAGTTGAACC	CTATGTACAG	AGGTACCCTC	TCTCTAACCA	TTCTCTGTGT	-301
GCTGCAGAAA	ATGTCTCAGG	ATTATAAACT	CCTACTTCTG	TTTTCCCTGCT	TTGCCTTTCT	-241
AAGCCATTTA	GAAATGACTC	ACTTTGAAAC	TCTTCTGTG	AGGTCAGATA	GTGGTCTAGA	-181
GCATAAGACT	TAACCTATTG	CCGAAACAC	GAGAGAGAAC	AGAAGAAGAG	AAAGCTCAGC	-121
AAATTTTCTT	GCCATACTTC	ATGACTTCAC	TGTGGCTAAG	TGTGGGGACC	AGACAGGACT	-61
CGTGGAGACA	TCCAGGTGCT	GAAGCCTTCA	GCTACTGTCT	CAGTTTTTTTG	<u>GTAAGAAAAC</u>	
.....	<u>ca.6 kb Intron</u>	<u>TTTTTGCA</u>	AAGTTTAGCA	-1
ATGGCGTCTT						
+1						

Abb. 3.14: 5'-UTR des hC3aR. Das ATG-Startcodon ist fett und der Übergang zum Intron unterstrichen dargestellt.

3.3.2 Eingrenzung des Transkriptionsstarts und Sequenzanalyse der 5'-UTR

Zur Bestimmung des Transkriptionsstarts wurden drei verschiedene Ansätze durchgeführt: Reverse Transkription, 5'-RACE und Nuclease Protection Assay.

3.3.2.1 Reverse Transkription und Sequenzanalyse der 5'-UTR

Die Eingrenzung des Transkriptionsstarts erfolgte mittels reverser Transkription mit Oligo-d(T)-Primern und anschließender PCR der generierten Einzelstrang-cDNA mit TC8 (hC3aR-Reversprimer) und verschiedenen 5'-UTR-Primern (n = 3).

```

GCTGCAGAAA ATGTCTCAGG ATTATAAACT CCTACTTCTG TTTTCTGCT TTGCCTTTCT      -241
                                     BSS4

AAGCCATTTA GAAATGACTC ACTTTGAAAC TCTTCCTGTG AGGTCAGATA GTGGTCTAGA      -181
                                     BSS8                                     BSS9

GCATAAGACT TAACTTATTG CCGGAAACAC GAGAGAGAAC AGAAGAAGAG AAAGCTCAGC      -121
                                     BSS10 -----
                                               BSS5

AAATTTTCTT GCCATACTTC ATGACTTCAC TGTGGCTAAG TGTGGGGACC AGACAGGACT      -61
                                     BSS6

CGTGGAGACA TCCAGGTGCT GAAGCCTTCA GCTACTGTCT CAGTTTTTTTGT GTAAGAAAAC
.....ca.6 kb Intron.....TTTTTGCAG AAGTTTAGCA      -1

ATGGCGTCTT
|
+1

```

Abb. 3.15: Anordnung der zur Eingrenzung des Transkriptionsstarts verwendeten Primer in der 5'-UTR des hC3aR. Potentielle Cap-Signale sind fett und kursiv, die Übergänge zum Intron kursiv und das ATG-Startcodon und das potentielle TATA-Box-Element fett dargestellt.

Die verschiedenen Primerpaare wurden zuvor in einer PCR mit dem Positivkontrollplasmid pSEAP2-E-308-hC3aR-234 als Matrize überprüft, da die genomische DNA aufgrund des ca. 6 kb Introns nicht als Matrize geeignet war. Zur Generierung von pSEAP2-E-308-hC3aR-234

wurde ein mit TC36 (= hC3aR-Senseprimer; Position 1 – 15) und TC37 (= hC3aR-Reversprimer; Position 220 – 204) aus pTCC0 amplifiziertes Produkt über *Hind*III und *Eco*RI in pSEAP2-E-308 kloniert. Es zeigte sich, daß bei allen Primerpaaren das zu erwartende Fragment amplifiziert werden konnte. Als Matrize für die reverse Transkription wurde Gesamt-RNA aus HMC-1-, IMR-32-, SK-N-MC- und mit 1 mM Bt₂cAMP differenzierten U937-Zellen verwendet. Die PCR-Produkte wurden in Polyacrylamidgelen aufgetrennt.

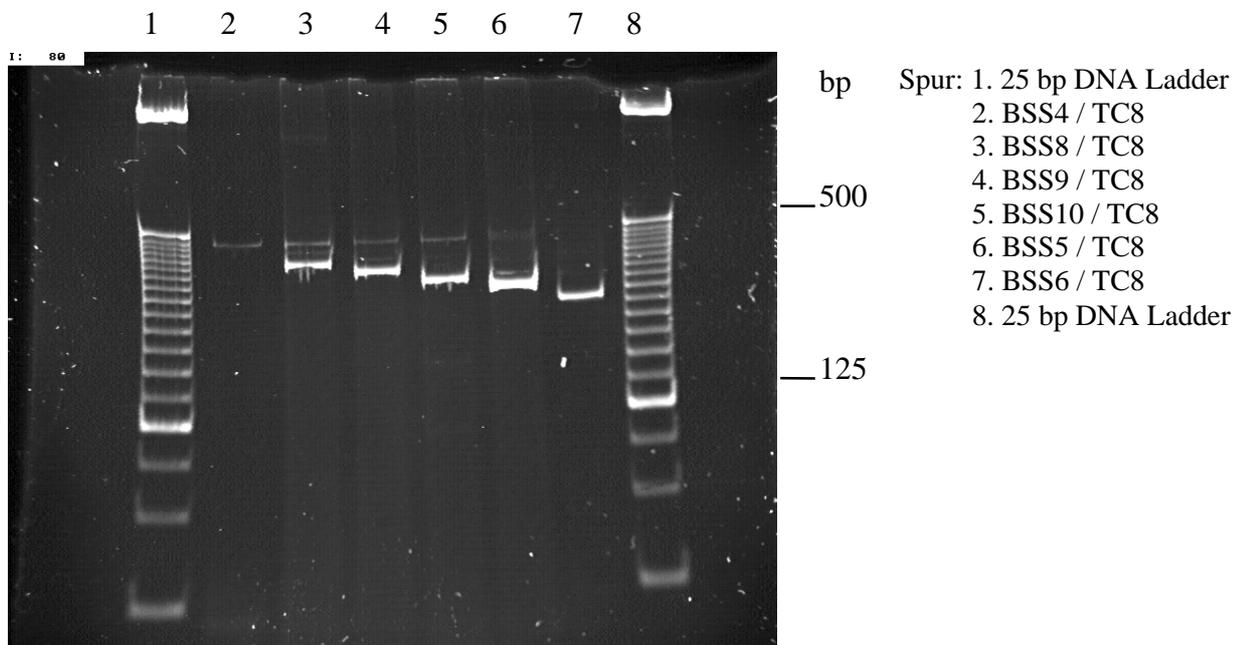


Abb. 3.16: HMC-1: Polyacrylamidgelelektrophorese nach PCR mit verschiedenen 5'-UTR-Primern. Mit dem Primerpaar BSS4/TC8 konnte kein PCR-Produkt amplifiziert werden.

Bei den Untersuchungen zur Eingrenzung des Transkriptionsstarts zeigte sich, daß unter Verwendung von HMC-1- und SK-N-MC-Gesamt-RNA als Matrize kein PCR-Fragment mit dem Primerpaar BSS4/TC8 amplifiziert werden konnte, aber mit dem Primerpaar BSS8/TC8 und den anderen Primerpaaren. Bei IMR-32-Gesamt-RNA wurde nur noch mit dem Primerpaar BSS9/TC8 ein Amplifikat erhalten, nicht aber mit BSS4/TC8 und BSS8/TC8. Mit den Primerpaaren BSS6/TC8, BSS5/TC8 und BSS10/TC8 konnten unter Verwendung von U937-Gesamt-RNA Amplifikate erzeugt werden, jedoch nicht mit den anderen Primerpaaren. Insgesamt deuten diese Ergebnisse auf unterschiedliche putative Startpunkte hin.

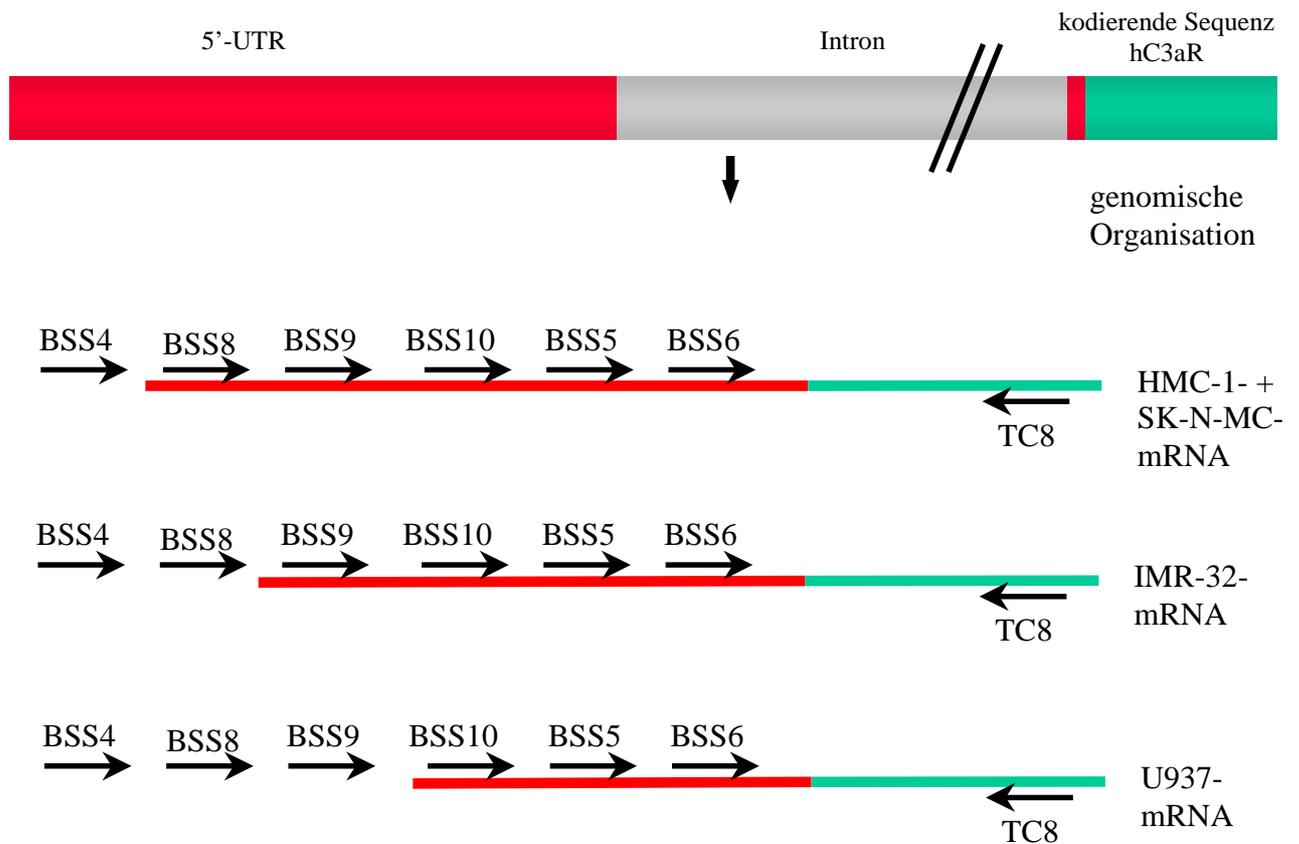


Abb. 3.17: Schematische Darstellung der Ergebnisse der Eingrenzung des Transkriptionsstarts mittels reverser Transkription bei HMC-1-, SK-N-MC-, IMR-32- und U937-Zellen. Bei den verschiedenen Zelllinien konnten mit unterschiedlichen Primerpaaren Amplifikate generiert werden.

Nach Analyse der Sequenz mit der PC-Gene-Software 4.01/Suche nach eukaryotischen Promotorelementen ergaben sich folgende potentielle Cap-Signale für die einzelnen Zelllinien:

Zelllinie	Sequenz	Position	Score (Grenze: - 3.75)
HMC-1/SK-N-MC	TCTGTTTT	- 264 bis - 257	- 3,10
	CCATTTAG	- 237 bis - 230	- 3,37
	TCACCTTG	- 222 bis - 215	- 1,42
IMR-32	TCAGATAG	- 197 bis - 190	- 2,57
U937	GCATAAGA	- 180 bis - 173	- 3,44

Die Suche nach potentiellen Bindungsstellen für Transkriptionsregulatoren in der 5'-UTR-Sequenz des hC3aR wurde unter Verwendung des Matinspector professional (Genomatix)

durchgeführt. Im Bereich der Transkriptionsstartstellen bis –300 bp konnte nur eine potentielle TATA-Box bei Position – 279 bis – 265 gefunden werden, die lediglich eine Korrelation zum Cap-Signal bei Position – 237 bis – 230 (Abstand zwischen den Zentren: 38 bp) aufweist, und eine potentielle CCAAT-Box bei Position – 242 bis – 231. Weiterhin liegen in dem Bereich bis –300 bp eine AP-1-Bindungstelle (Position – 227 bis – 219) und eine STAT-Bindungsstelle (Position – 163 bis – 155) vor. Die gesamte 5'-UTR-Sequenz weist eine Bindungsstelle für den IFN-Regulationsfaktor 1 (IRF1) bei Position – 1307 bis – 1293 auf und eine Bindungsstelle für NF-κB bei Position – 931 bis – 922.

AAAAAAAAAT	CAGGAAGAAT	GAACACTAAC	CTATTAAAAA	TAGTTACTTC	GAGCAGTGGA	-1321	
<i>IRF1</i>							
ATTGAAAAGA	AAAT <i>CTTTCA</i>	<i>TTTTTTTT</i> TAC	CCATTATAAT	TCTGTATTAT	TTCAATTTAT	-1261	
CTCTTCTAGA	ACAAAGTATG	TTCTATTTTT	GTAATTAGAT	GATGACAATG	GAAATAAACT	-1201	
AATAAATACT	ACTCAACTCT	TGGCATTFFF	CTTTTGATCT	TTCTGCCTCA	AAAATATTCC	-1141	
GTGGTGA	ACTT	GAAAC	AAGCAGAGGA	GCAGATATTA	TGGTTTGAC	AAGTTGATTA	-1081
ATATAGACTG	AAGCCTATAT	CACAGACAAC	AGTGTTCAAA	TACATTTGAC	CCAAATAAAC	-1021	
TTTATTTTAT	ATGCATATAT	CTAAAAGAGT	ATATGCATAT	ATCTAAAAGA	ATAATATAAG	-961	
<i>NF-κB</i>							
AATTATTTAC	AGCATAGTAT	TCATTAAGCA	<i>GGAATTACCT</i>	TCAGTCTTCT	GTACTCCTTC	-901	
CTGATGAAAC	AGCACCTAGA	CTCCAGCCTG	TTCTCCAGTG	ACCACTAAGC	TCTCCCACCT	-841	
ACCTCCCCAC	CTACCTGCCC	TCTACCACCT	ACCTGCCTTT	GACTAGGCTC	CACTTATAGC	-781	
CTAAGCAGCT	TTTACCTTTT	TTCTGTCTCT	AGAATTCCTA	CAGGTACTTA	ATTAAGTACT	-721	
TGCCACATC	TTATTTCTAT	CTTAAGACTC	TCCTAGATTG	CCCTGGGTTA	TATATACCCC	-661	
TGGCTAGAGT	GTTCTATTAT	TTTACTTCTA	TTGTTACTTC	TATTATTATA	GCCTAGTTTG	-601	
TATTACAGCT	TTGTGTGTAT	ATGTATGGGT	ACATATCCC	ACTCGATTGT	GAATCTCTGG	-541	
AGATTAGAAT	ATAGCTTAAT	TCATCCTGAT	TTTGACATGG	CACCGTTTTT	CACATATATC	-481	
AAGCATTTCA	GATATGTTAT	TTGAGATTAA	TTAAATGAGT	TTATTCAGGT	CATTCCTCCC	-421	
CAACCACTCC	CCACTCCAAC	CCTCACATCT	CATAGAGTCT	TTTTTTTTTC	ATTTCTAAAC	-361	
AAAACCTATA	AAGTTGAACC	CTATGTACAG	AGGTACCCTC	TCTCTAACCA	TTCTCTGTGT	-301	
<i>TATA</i>							
GCTGCAGAAA	ATGTCTCAGG	<i>ATTATAAACT</i>	<i>CCTACTTCTG</i>	TTTTCTGCT	TTGCCTTTCT	-241	
<i>CCAAT</i>							
<i>AP-1</i>							
<i>AAGCCATTTA</i>	<i>GAAATGACTC</i>	<i>ACTTTGAAAC</i>	TCTTCTGTG	AGGTCAGATA	GTGGTCTAGA	-181	
<i>STAT</i>							
GCATAAGACT	TAACTTATTG	<i>CCGAAAACAC</i>	GAGAGAGAAC	AGAAGAAGAG	AAAGCTCAGC	-121	
AAATTTTCTT	GCCATACTTC	ATGACTTCAC	TGTGGCTAAG	TGTGGGGACC	AGACAGGACT	-61	
CGTGGAGACA	TCCAGGTGCT	GAAGCCTTCA	GCTACTGTCT	CAGTTTTTTG	<u>GTAAGAAAAC</u>		
.....ca.6 kb Intron.....TTTGTGAG						-1	
<i>ATGGCGTCTT</i>							
+1							

Abb. 3.18: Potentielle Bindungsstellen für Transkriptionsregulatoren (fett und kursiv) in der 5'-UTR des hC3aR. Das ATG-Startcodon ist fett und der Übergang zum Intron unterstrichen dargestellt.

3.3.2.2 5'-RACE (Rapid Amplification of cDNA Ends)

Eine weitere Technik, die zur Eingrenzung des Transkriptionsstarts verwendet wurde, war die 5'-RACE. Dafür wurden als Matrize die Marathon-Ready cDNA aus humaner Plazenta und aus humanem fetalen Gehirn eingesetzt. Als Antisense-hC3aR-Primer wurde BSR7 (= hC3aR-Reversprimer; Position 1004 – 978) verwendet, bei dem ein Amplifikat nach den Ergebnissen der Reversen Transkription bei ungefähr 1,3 kb erwartet wurde und als Positivkontrolle der 5'-RACE G3PDH-Primer, bei dem ein ungefähr 1,1 kb Fragment erwartet wurde. Nach der 5'-RACE und anschließender Auftrennung der Produkte durch Agarosegelelektrophorese konnte bei der Positivkontrolle die erwartete 1,1 kb Bande detektiert werden, bei Verwendung des Primerpaars BSR7/AP1 aber nur eine ungefähr 1,2 kb Bande. Die 1,2 kb Bande, die mit cDNA aus humaner Plazenta als Matrize erhalten wurde, wurde aus dem Gel extrahiert, mit *NotI* (im Marathon cDNA Adaptor) und *HpaI* (hC3aR Position 746) gespalten und in den mit *NotI* und *SmaI* gespaltenen pBluescript II KS- subkloniert. Drei der erhaltenen Klone wurden zur Detektion des genauen 5'-Endes sequenziert. Die bestimmten Transkriptionsstartpunkte lagen bei Position – 58, – 75 und – 81 und damit deutlich weiter stromabwärts als die durch die reverse Transkription eingegrenzten Startpunkte.

```

GCTGCAGAAA ATGTCTCAGG ATTATAAACT CCTACTTCTG TTTTCTGCT TTGCCTTTCT      -241
AAGCCATTTA GAAATGACTC ACTTTGAAAC TCTTCCTGTG AGGTCAGATA GTGGTCTAGA      -181
GCATAAGACT TAACCTATTG CCGGAAACAC GAGAGAGAAC AGAAGAAGAG AAAGCTCAGC      -121
AAATTTTCTT GCCATACTTC ATGACTTCAC TGTGGCTAAG TGTGGGGACC AGACAGGACT      -61
                                     *          *
CGTGGAGACA TCCAGGTGCT GAAGCCTTCA GCTACTGTCT CAGTTTTTTTGT GTAAGAAAAC
*
.....ca.6 kb Intron.....TTTTTGCAG AAGTTTAGCA      -1

ATGGCGTCTT
|
+1

```

Abb. 3.19: Lage der bei drei Klonen über 5'-RACE bestimmten putativen Transkriptionsstartpunkte (unterstrichen und mit * markiert). Potentielle Cap-Signale sind fett und kursiv, die Übergänge zum Intron kursiv und das ATG-Startcodon und das potentielle TATA-Box-Element fett dargestellt.

3.3.2.3 Nuclease Protection Assay

Neben der reversen Transkription und der 5'-RACE wurde der Nuclease Protection Assay (NPA) zur Bestimmung des Transkriptionsstarts eingesetzt. Dabei wurde Gesamt-RNA von HMC-1- und U937-Zellen verwendet und als Negativkontrolle Hefe-RNA. Die Hybridisierung erfolgte mit einer α -³⁵S-dATP-markierten BSS1/BSR6-Sonde. Bei zwei der durchgeführten NPA konnte bei Proben, bei denen HMC-1-Gesamt-RNA als Matrize verwendet wurde, eine Bande im Sequenzgel detektiert werden. Nach Abgleich mit dem Größenstandard konnte der putative Transkriptionsstartpunkt beim ersten NPA auf Position – 185 in der 5'-UTR bestimmt werden und beim zweiten NPA auf Position – 172/– 173. Damit lagen die durch NPA bestimmten Startpunkte weiter stromaufwärts als die durch 5'-RACE bestimmten und eher in dem durch die reverse Transkription eingegrenzten Bereich.

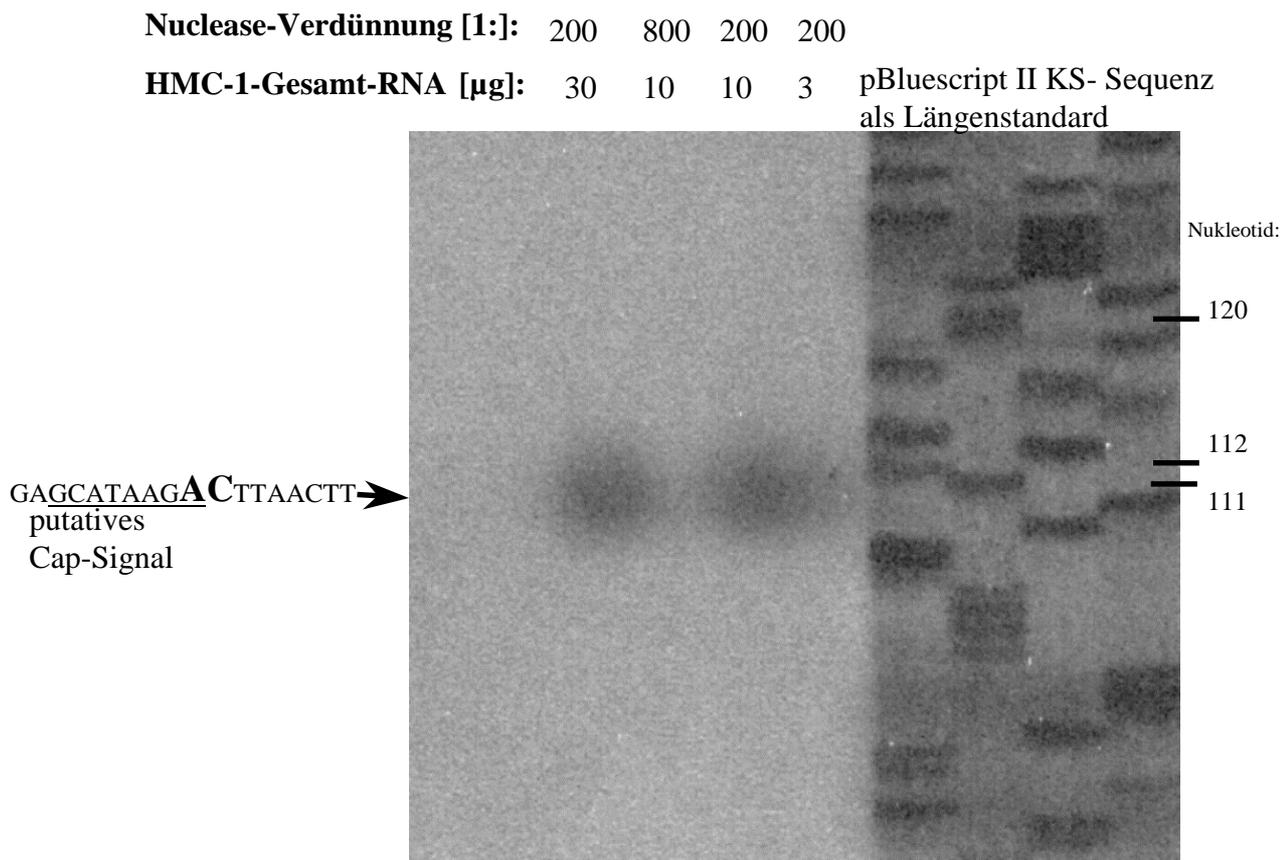


Abb. 3.20: NPA II: Sequenzgel mit Längenstandard. Bei den Proben 30 µg HMC-1-Gesamt-RNA/Nuclease-Verdünnung 1:200 und 10 µg HMC-1-Gesamt-RNA/Nuclease-Verdünnung 1:200 konnten Banden detektiert werden. Die bestimmten Nukleotide sind in der 5'-UTR-Sequenz fett und vergrößert dargestellt.

```

GCTGCAGAAA ATGTCTCAGG ATTATAAACT CCTACTTCTG TTTTCTGCT TTGCCTTTCT -241
AAGCCATTTA GAAATGACTC ACTTTGAAAC TCTTCCTGTG AGGTCAGATA GTGGTCTAGA -181
                                     *
GCATAAGACT TAACTTATTG CCGGAAACAC GAGAGAGAAC AGAAGAAGAG AAAGCTCAGC -121
                                     *
AAATTTTCTT GCCATACTTC ATGACTTCAC TGTGGCTAAG TGTGGGGACC AGACAGGACT -61
CGTGGAGACA TCCAGGTGCT GAAGCCTTCA GCTACTGTCT CAGTTTTTTT GTAAGAAAAAC
.....ca.6 kb Intron.....TTTTTGCAG AAGTTTAGCA -1

ATGGCGTCTT
|
+1

```

Abb. 3.21: Lage der über NPA bestimmten putativen Transkriptionsstartpunkte (unterstrichen und mit * markiert). Potentielle Cap-Signale sind fett und kursiv, die Übergänge zum Intron kursiv und das ATG-Startcodon und das potentielle TATA-Box-Element fett dargestellt.

3.3.3 Reporteragenassay

3.3.3.1 Promotorkonstrukte im Reporteragenvektor pSEAP2-Enhancer

Zur Identifizierung und Untersuchung der Bereiche in der 5'-UTR des hC3aR, die Promotorfunktionen aufweisen, wurden verschieden lange Fragmente der 5'-UTR in den Reporteragenvektor pSEAP2-Enhancer kloniert, der eine ins Medium sezernierte alkalische Phosphatase (SEAP) als Reporteragen trägt. Dazu wurden die entsprechenden Bereiche der 5'-UTR über PCR mit spezifischen Primern amplifiziert und anschließend nach Restriktionsspaltung in den Vektor kloniert. Die 5'-UTR-Sequenz wurde anschließend durch Sequenzierung bei allen Plasmiden überprüft. Es zeigte sich dabei, daß bei den Plasmiden pSEAP2-E-1396, pSEAP2-E-1511, pSEAP2-E-1607, pSEAP2-E-1690, pSEAP2-E-1795, pSEAP2-E-1903 und pSEAP2-E-2342 in Position – 151 die Punktdeletion eines Cytosins vorliegt. Die genaue Durchführung der Generierung der Plasmide ist im Anhang unter 7.3 beschrieben.

3.3.3.2 Etablierung und Optimierung des Reporterassays

Für die Durchführung des Reporterassays wurde das SEAP-System gewählt, bei dem eine alkalische Phosphatase in den Zellkulturüberstand sezerniert wird und die Aktivität nach Abnahme geringer Mengen Überstands in einem Chemilumineszenz-Assay einfach, schnell und über einen Zeitraum von 1 h ohne Aktivitätsverlust bestimmt werden kann. Die Messung der Promotoraktivität erfolgte 72 h nach transienter Transfektion verschiedener Zelllinien mit den entsprechenden Konstrukten in pSEAP2-Enhancer im Vergleich zur Negativkontrolle pSEAP2-Enhancer ohne Insert. Da bei verschiedenen Transfektionen die Transfektionseffizienz z.T. erheblich schwanken kann, war es nötig, eine Normalisierung durchzuführen. Dazu wurde neben den pSEAP2-E-Plasmiden ein zweiter Vektor kotransfiziert, der einen viralen Promotor und ein anderes Reporter gen beinhaltete. Es wurde der pCMV β -Vektor (Clontech) mit dem CMV-Promotor und β -Galactosidase als Reporter verwendet. Die Detektion erfolgte unabhängig von der Detektion der SEAP durch Lyse der Zellen und Einsetzen des Lysats in einem unabhängigen Assay. Die normalisierte Promotoraktivität ergab sich aus dem Quotienten von SEAP-Aktivität zu β -Galactosidase-Aktivität.

Als Positivtestvektor für die SEAP-Aktivität konnte nicht der von der Firma Clontech angebotene pSEAP2-Control verwendet werden, der den SV40-Promotor enthält, da die für den Assay eingesetzten Zelllinien (HMC-1, IMR-32, SK-N-MC und U937) nicht das große T-Antigen des SV40 tragen, das für eine Promotoraktivität essentiell ist! Deshalb wurde der CMV-Promotor aus pCDM8 in pSEAP2-Enhancer zur Generierung des Positivkontrollplasmids pSEAP2-E-CMV subkloniert.

Auf der Suche nach der für die unterschiedlichen Zelllinien geeigneten Methode zur transienten Transfektion wurden Transfektionen mittels Calciumphosphat, Lipofectamine und Effectene mit dem Positivkontrollplasmid pSEAP2-E-1511 und dem Negativkontrollplasmid pSEAP2-Enhancer durchgeführt. 72 Stunden später wurde die SEAP-Aktivität gemessen. Bei HMC-1- und U937-Zellen konnte man nach Transfektion mittels Lipofectamine keine erhöhte SEAP-Aktivität im Vergleich zur Negativkontrolle detektieren, aber nach Transfektion mittels Effectene (Daten nur zum Teil gezeigt). Es zeigte sich weiterhin, daß bei SK-N-MC-Zellen nach Transfektion mittels Calciumphosphat und Effectene gute Transfektionseffizienzen vorlagen, die Transfektionen mittels Lipofectamine aber kaum effizient waren. Bei IMR-32-Zellen konnten ebenfalls effiziente Transfektionen unter Verwendung von Calciumphosphat

und Effectene durchgeführt werden. Im folgenden wurden deshalb transiente Transfektionen bei den HMC-1- und U937-Zellen mittels Effectene und bei den IMR-32- und SK-N-MC-Zellen im Hinblick auf die geringeren Kosten mittels Calciumphosphat durchgeführt.

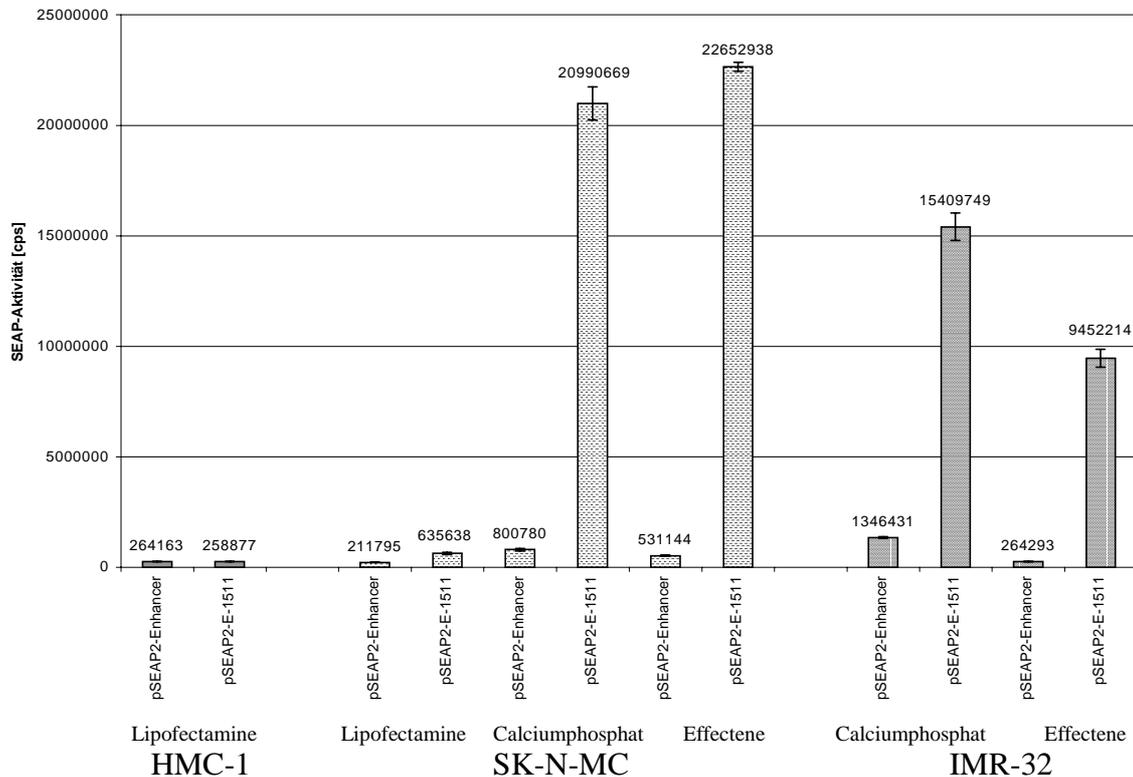


Abb. 3.22: Untersuchung der Effizienz verschiedener Transfektionsmethoden bei den Zelllinien HMC-1, SK-N-MC und IMR-32: Vergleich der SEAP-Aktivität nach Transfektion mit pSEAP2-Enhancer (Negativkontrolle) und pSEAP2-E-1511.

Bei Bestimmungen der SEAP-Aktivität stellte sich heraus, daß es aufgrund von Substanzen im FCS-Zusatz des Mediums zu einer starken Erhöhung des Hintergrunds kam, so daß geringe Aktivitätsunterschiede nur schlecht zu detektieren waren. Deshalb wurden daraufhin alle transienten Transfektionen in dem FCS-freien Opti-MEM-Medium durchgeführt (Daten nicht gezeigt).

3.3.3.3 Untersuchung der verschiedenen Promotorkonstrukte

Zur Untersuchung der Promotoraktivität verschiedener Bereiche der 5'-UTR des hC3aR wurden transiente Transfektionen bei HMC-1-, IMR-32-, SK-N-MC- und U937-Zellen mit den potentiellen Promotorkonstrukten in pSEAP2-Enhancer und pCMV β als Normalisierungsvektor durchgeführt. 72 h nach der Transfektion wurden die SEAP- und die β -Galactosidase-Aktivität gemessen. Bei den U937-Zellen erfolgte zusätzlich 24 h nach der Transfektion eine Stimulation mit 1 mM Bt₂cAMP. Die Untersuchungen wurden in jeder Zelllinie dreimal durchgeführt, wobei die Ergebnisse nur in HMC-1-Zellen reproduzierbar waren.

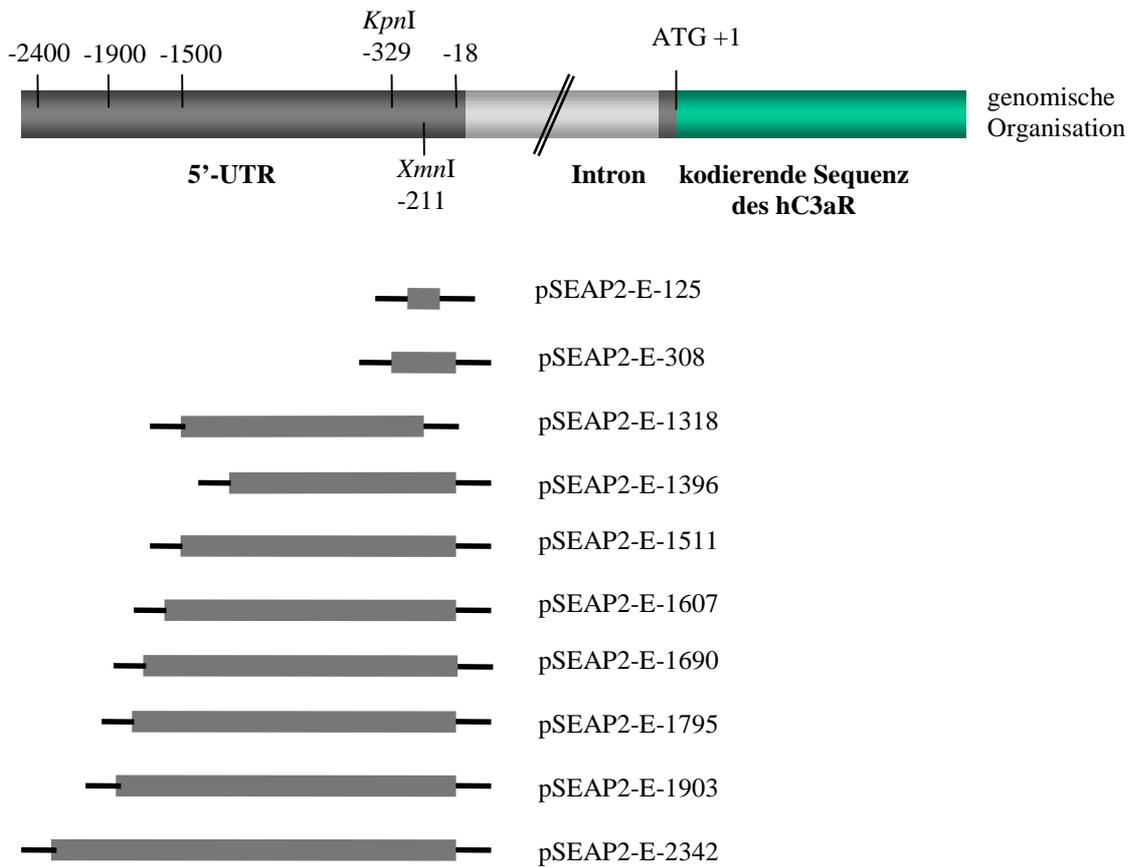


Abb. 3.23: Schematische Darstellung der Lage der verschiedenen Promotorkonstrukte zueinander und im Bezug auf die genomischen Organisation des hC3aR.

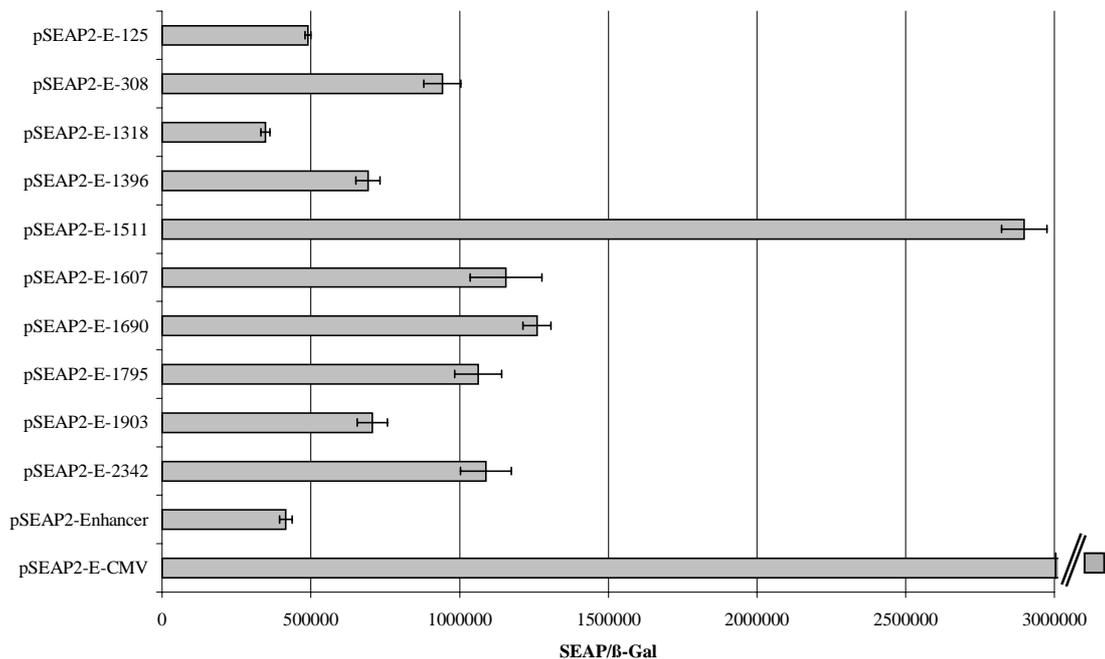


Abb. 3.24: HMC-1-Zellen: Normalisierter Promotorassay unter Verwendung der verschiedenen 5'-UTR Konstrukte in pSEAP2-Enhancer.

Bei folgenden Promotortestvektoren konnte eine signifikante Steigerung der normalisierten Aktivität SEAP/β-Galactosidase im Vergleich zur Negativkontrolle pSEAP2-Enhancer und damit Promotoraktivität detektiert werden: pSEAP2-E-308, pSEAP2-E-1396, pSEAP2-E-1511, pSEAP2-E-1607, pSEAP2-E-1690, pSEAP2-E-1795, pSEAP2-E-1903 und pSEAP2-E-2342. Dabei konnte eine außergewöhnlich hohe Aktivität bei pSEAP2-E-1511 gemessen werden, die noch um ungefähr Faktor 2,5 über der der anderen positiven Konstrukte lag. Keine Aktivität konnte bei pSEAP2-E-1318 detektiert werden, bei dem das 5'-Ende des Promotorkonstrukts dem des in pSEAP2-E-1511 vorhandenen Konstrukts entspricht und bei dem ein um ca. 200 bp verkürztes 3'-Ende vorliegt. Bei pSEAP2-E-125 konnte ebenfalls keine Promotoraktivität detektiert werden. Dieses Plasmid wurde nicht wie alle anderen Plasmide (außer pSEAP2-E-1318) mit BSR11 (Position – 18 bis – 37) als Reversprimer, sondern mit BSR14 (Position – 162 bis – 180) generiert. Somit weist pSEAP2-E-125 ein um 142 bp verkürztes 3'-Ende auf. Um zu untersuchen, ob die fehlende Promotoraktivität auf diesem verkürzten 3'-Ende oder auf dem im Vergleich zu pSEAP2-E-308 weiter verkürzten 5'-Ende beruht, wurde ein weiteres

Plasmid generiert, das das gleiche 5'-Ende wie pSEAP2-E-125 hat, aber ein um 142 bp verlängertes 3'-Ende. Das generierte pSEAP2-E-267-Plasmid wurde im Vergleich zu pSEAP2-Enhancer, pSEAP2-E-308 und pSEAP2-E-125 im Promotorassay in HMC-1-Zellen untersucht (n = 2).

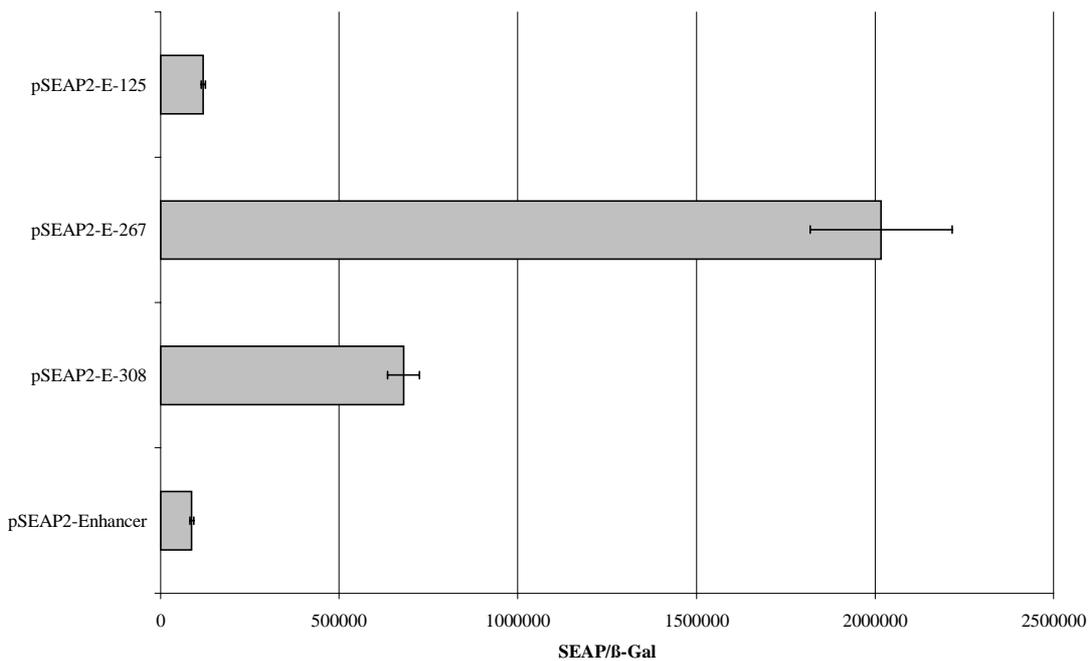


Abb. 3.25: HMC-1-Zellen: Normalisierter Promotorassay zur Untersuchung von pSEAP2-E-267.

Es zeigte sich, daß die fehlende Promotoraktivität in dem verkürzten 3'-Ende und nicht in dem verkürzten 5'-Ende begründet lag. Die Aktivität von pSEAP2-E-267 lag sogar deutlich über der von pSEAP2-E-308.

3.3.3.4 Potentiell positiv regulierendes Element: Generierung und Untersuchung von pSEAP2-E-308+

Die Ergebnisse der Untersuchung der verschiedenen Promotortestvektoren in HMC-1 zeigten, daß die Promotoraktivität von pSEAP2-E-1511 um ungefähr Faktor 2,5 über der der anderen

positiven Konstrukte lag. Dieses ließ die Annahme zu, daß in dem ungefähr 100 bp Sequenzbereich der 5'-UTR, den pSEAP2-E-1511 im Vergleich zu pSEAP2-E-1396 zusätzlich hat, ein positiv regulierendes Element vorhanden sein könnte, ebenso wie ein negativ regulierendes Element in dem Bereich zwischen pSEAP2-E-1511 und pSEAP2-E-1607 vermutet werden konnte. Deshalb wurde zur Überprüfung des potentiell positiv regulierenden Elements der entsprechende 137 bp Bereich der 5'-UTR amplifiziert und über *KpnI* in pSEAP2-E-308 kloniert. Das generierte Plasmid pSEAP2-E-308+ wurde dann in einem Reporterassay in HMC-1-Zellen im Vergleich zu pSEAP2-E-308 und pSEAP2-Enhancer untersucht.

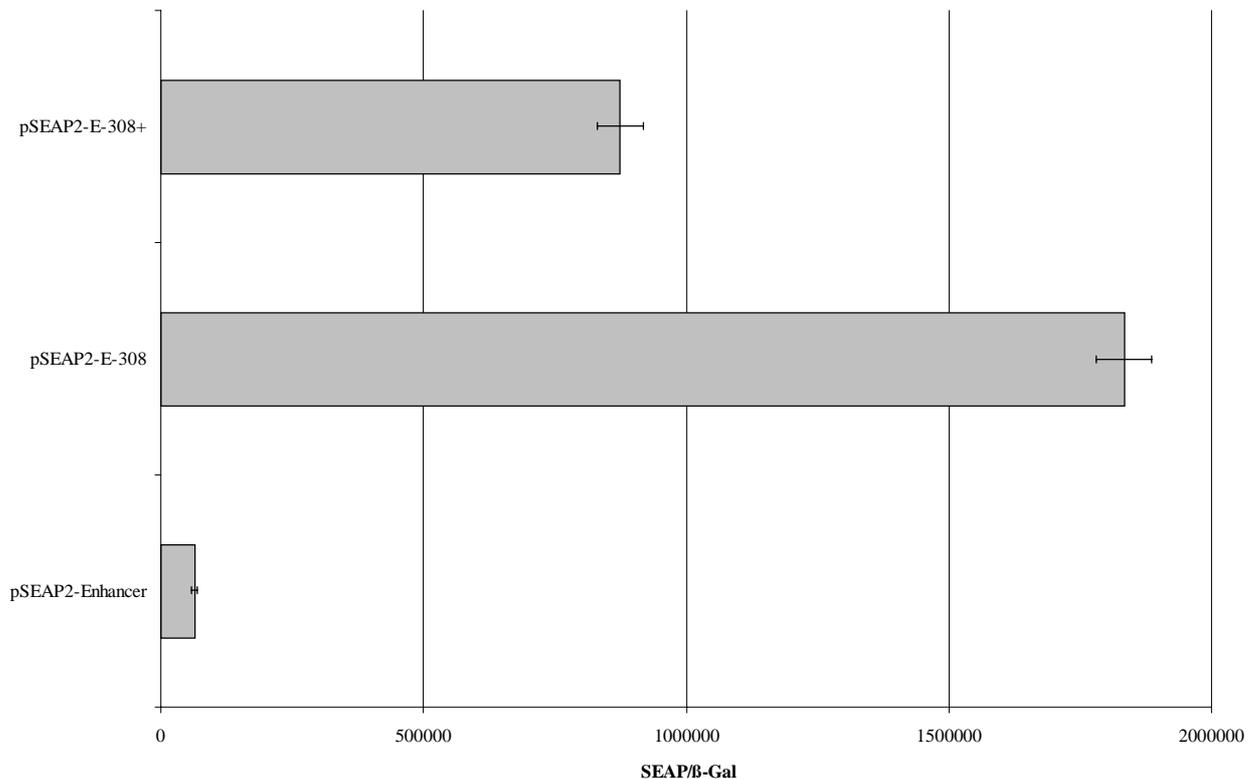


Abb. 3.26: HMC-1-Zellen: Normalisierter Promotorassay zum Vergleich von pSEAP2-E-308 und pSEAP2-E-308+.

Es zeigte sich, daß die Subklonierung des potentiell positiv regulierenden Elements in pSEAP2-E-308 nicht wie erwartet zu einer Erhöhung, sondern sogar zu einer Erniedrigung der Promotoraktivität im Vergleich zu pSEAP2-E-308 führte.

Auf der Suche nach potentiellen Regulationselementen in diesem Bereich (Position: - 1393 bis - 1510) mit dem Matinspector professional (Genomatix) ergaben sich für fünf Faktoren Bindungsstellen:

Name	Position (Strang)	Sequenz
X-Box bindendes Protein RFX1	- 1476 (-)	TTGGCTCACTGCAACCT
Nuclearfaktor 1	- 1475 (-)	TCTTGGCTCACTGCAACC
Ying und Yang 1	- 1467 (-)	GTGCCACCATCTTGGCTCAC
Apolipoprotein AI Regulatorprotein 1	- 1423 (+)	TGAGGCCCTGTCTCCA
Matrix des Forkhead Transkriptionsfaktor	- 1410 (+)	CCAACAAACAAAATG

Ebenso wurde die Sequenz (Position: - 1510 bis - 1626) des potentiell negativ regulierenden Elements auf mögliche Bindungsstellen unter Verwendung des Matinspector professional (Genomatix) mit folgendem Resultat untersucht:

Name	Position (Strang)	Sequenz
Octamerfaktor	- 1569 (+)	AAATATAAAAATTAG
Octamer-bindender Faktor 1	- 1568 (-)	CTAATTTTTATATT
Xenopus Forkhead Domänenfaktor 2	- 1568 (+)	AATATAAAAATTAG
Myogenerischer Enhancerfaktor 2	- 1567 (+)	ATATAAAAATTAGCCG
SEF1 Bindungsstelle	- 1561 (+)	AAATTAGCCGGCTGTGGTG
runt-Faktor AML-1	- 1549 (+)	TGTGGT
USF Bindungsstelle	- 1542 (+)	GCACATGC

3.3.4 Stimulation mit Cytokinen

3.3.4.1 Reporterassay: U937-, IMR-32- und SK-N-MC-Zellen

Um den Einfluß verschiedener Cytokine auf die Promotorregion des hC3aR zu untersuchen, wurden Reporterassays nach Cytokinstimulation durchgeführt. Für diese Untersuchungen

wurden nicht HMC-1-Zellen verwendet, da die Rezeptorzahl auf unstimulierten Zellen schon so hoch ist, daß eine Hochregulation kaum zu detektieren gewesen wäre. Stattdessen wurden IMR-32-, SK-N-MC- und U937-Zellen als Testsystem verwendet.

18 h nach der transienten Transfektion von U937-Zellen wurden die Zellen aufgeteilt und in Doppelwerten mit verschiedenen Cytokinen bzw. mit Opti-MEM-Medium allein inkubiert. Der Reporterassay wurde 72 h nach der Transfektion durchgeführt. Um den Einfluß der Länge des 5'-UTR-Bereichs auf die Aktivität nach Cytokinstimulation untersuchen zu können und damit unter Umständen den Sequenzbereich, der reguliert wurde, eingrenzen zu können, wurden folgende Promotorkonstrukte eingesetzt: pSEAP2-E-1511, pSEAP2-E-308 und pSEAP2-E-267. Die folgende Tabelle zeigt eine Zusammenfassung der Ergebnisse der normalisierten Reporterassays bei U937-Zellen:

Cytokin	Promotoraktivität nach Transfektion von		
	pSEAP2-E-1511	SEAP2-E-308	pSEAP2-E-267
IL-2	++-		
IL-3	++-		
IL-4	±±-		
IL-6	++ (+)	++	++
IFN-α	++ (+)	++	++
IFN-γ	++ (+)	++	++
TNF-α	+++	++	+±
LIF	±±-		
TPO	---		
EPO	(+) --		
SCF	---		
G-CSF	++±	++	++
GM-CSF	+++	+±	++
OSM*	++-		
Bt₂cAMP	+++	±-	+±

*OSM-haltiger Überstand von transient transfizierten HEK293-Zellen

Tab. 3.3: U937-Zellen: Normalisierter Promotorassay nach transienter Transfektion verschiedener Promotorkonstrukte und anschließender Cytokinstimulation. Die Zeichen stellen die Zusammenfassung der bestimmten Doppelwerte in einem Assay dar. Mit + ist eine Hochregulation der Promotoraktivität, mit - eine unveränderte Promotoraktivität und mit (+) eine schwache Hochregulation der Promotoraktivität im Vergleich zu unstimulierten Zellen gekennzeichnet. Cytokine, die eine Hochregulation bewirken, sind fett hervorgehoben.

Eine eindeutige Hochregulation der Promotoraktivität konnte bei IL-2, IL-3, IL-6, IFN- α , IFN- γ , TNF- α , G-CSF, GM-CSF, OSM-haltigem Überstand und Bt₂cAMP nachgewiesen werden. Bei den Cytokinen, die mit allen drei Promotorkonstrukten getestet wurden, konnte man keine wesentlichen Unterschiede in der Regulation zwischen den drei Promotorkonstrukten erkennen. Eine Herabregulation konnte bei keinem der Cytokine detektiert werden.

Die IMR-32- und SK-N-MC-Zellen wurden 5h nach der transienten Transfektion abgelöst und gesplittet. Ebenfalls 18 h nach der Transfektion wurden die Cytokinstimuli in Doppelwerten gesetzt und 72 h nach der Transfektion der Reporterassay durchgeführt. Um eventuell eine Aussage über den nach Cytokinstimulation regulierten Sequenzbereich treffen zu können, wurde neben pSEAP2-E-1511 auch noch pSEAP2-E-267 getestet. In den folgenden Tabellen sind die normalisierten Promotoraktivitäten bei IMR-32 und SK-N-MC dargestellt:

Cytokin	Promotoraktivität nach Transfektion von	
	pSEAP2-E-1511	pSEAP2-E-267
IL-2	+ ±	+ ±
IL-3	± -	+ +
IL-6	+ ±	+ +
IFN-α	± ±	+ +
IFN-γ	+ +	+ +
TNF-α	+ +	+ +
LIF	+ ±	+ (+)
G-CSF	- -	- -
GM-CSF	- -	- -
OSM*	+ +	+ +
Bt ₂ cAMP	± -	- -

*OSM-haltiger Überstand von transient transfizierten HEK293-Zellen

Tab. 3.4: IMR-32-Zellen: Normalisierter Promotorassay nach transienter Transfektion verschiedener Promotorkonstrukte und anschließender Cytokinstimulation. Die Zeichen stellen die Zusammenfassung der bestimmten Doppelwerte in einem Assay dar. Mit + ist eine Hochregulation der Promotoraktivität, mit - eine unveränderte Promotoraktivität und mit (+) eine schwache Hochregulation der Promotoraktivität im Vergleich zu unstimulierten Zellen gekennzeichnet. Cytokine, die eine Hochregulation bewirken, sind fett hervorgehoben.

Cytokin	Promotoraktivität nach Transfektion mit	
	pSEAP2-E-1511	pSEAP2-E-267
IL-2	(+) ±	+ ±
IL-3	(+) ±	+ +
IL-6	+ ±	--
IFN- α	--	± -
IFN- γ	--	± ±
TNF-α	+ +	+ +
LIF	+ -	--
G-CSF	+ ±	--
GM-CSF	+ +	± -
OSM*	+ -	--
Bt ₂ cAMP	↓ ↓	↓ ↓

*OSM-haltiger Überstand von transient transfizierten HEK293-Zellen

Tab. 3.5: SK-N-MC-Zellen: Normalisierter Promotorassay nach transienter Transfektion verschiedener Promotorkonstrukte und anschließender Cytokinstimulation. Die Zeichen stellen die Zusammenfassung der bestimmten Doppelwerte in einem Assay dar. Mit + ist eine Hochregulation der Promotoraktivität, mit - eine unveränderte Promotoraktivität, mit (+) eine schwache Hochregulation der Promotoraktivität und mit ↓ eine Herabregulation im Vergleich zu unstimulierten Zellen gekennzeichnet. Cytokine, die eine Hochregulation bewirken, sind fett hervorgehoben.

Die Neuroblastoma-Zelllinien reagierten unterschiedlich auf die zur Stimulation verwendeten Cytokine. Bei IMR-32-Zellen wurde eine Hochregulation der Promotoraktivität mit IL-2, IL-3, IL-6, IFN- α , IFN- γ , TNF- α , LIF und OSM-haltigem Überstand erhalten. Keine Veränderung der Promotoraktivität im Vergleich zu den unstimulierten Zellen trat bei Stimulation mit G-CSF, GM-CSF und Bt₂cAMP ein. Eine Herabregulation der Promotoraktivität konnte bei keinem der verwendeten Cytokine detektiert werden. Die Regulation der Promotoraktivität unterschied sich zwischen den transfizierten Promotorkonstrukten pSEAP2-E-1511 und pSEAP2-E-267 im Wesentlichen nicht. Bei SK-N-MC-Zellen erfolgte eine eindeutige Hochregulation der Promotoraktivität unter Verwendung von IL-2, IL-3 und TNF- α nach transienter Transfektion von pSEAP2-E-1511 und pSEAP2-E-267. Eine im Vergleich zu unstimulierten Zellen gleichbleibende Promotoraktivität konnte bei beiden Promotorkonstrukten für IFN- α , IFN- γ , LIF und OSM-haltigem Überstand gezeigt werden. Nach Transfektion von pSEAP2-E-1511 kann man nach Stimulation mit IL-6, G-CSF und GM-CSF eine Hochregulation, nach Transfektion von pSEAP2-E-267 aber nur eine gleichbleibende

Promotoraktivität im Vergleich zu unstimulierten Zellen detektieren. Nach Stimulation mit Bt_2cAMP zeigte sich eine eindeutige Herabregulation der Promotoraktivität.

3.3.4.2 Kompetitive Bindungsstudien: HL-60- und U937-Zellen

Zur Überprüfung der Ergebnisse der Promotorassays nach Cytokinstimulation auf Expressionsebene wurden kompetitive Bindungsstudien in Form von Drei-Punkt-Bindungen mit ^{125}I -C3a 72 h nach Cytokinstimulation durchgeführt ($n = 2$). Hierzu wurden U937- und HL-60-Zellen verwendet. Zur Stimulation wurden $IFN-\gamma$, $TNF-\alpha$, $IL-2$, $G-CSF$, $GM-CSF$, $IL-6$ und Bt_2cAMP eingesetzt.

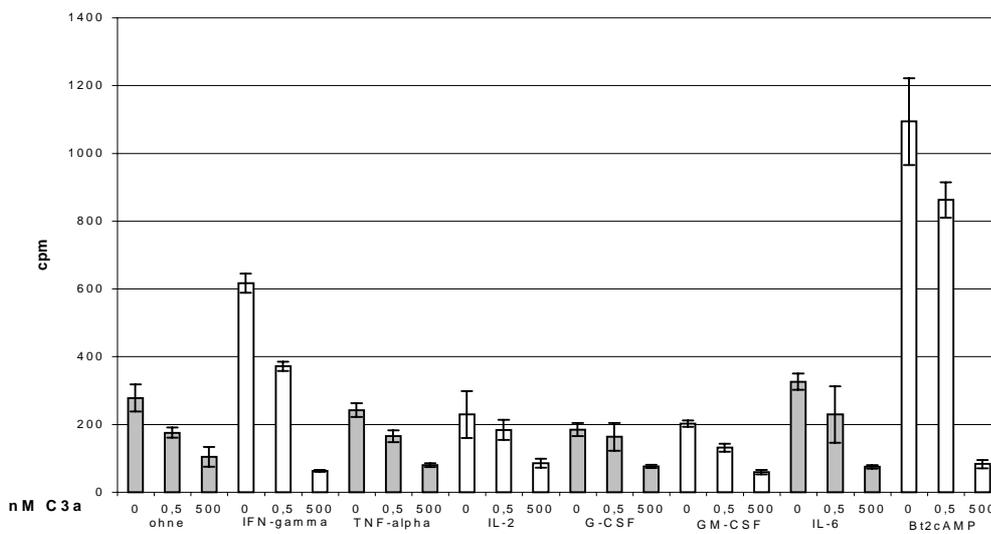


Abb. 3.27: HL-60-Zellen: Kompetitive Bindungsstudie nach Cytokinstimulation mit 0 nM, 0,5 nM und 500 nM C3a als Verdränger und ^{125}I -C3a als Tracer.

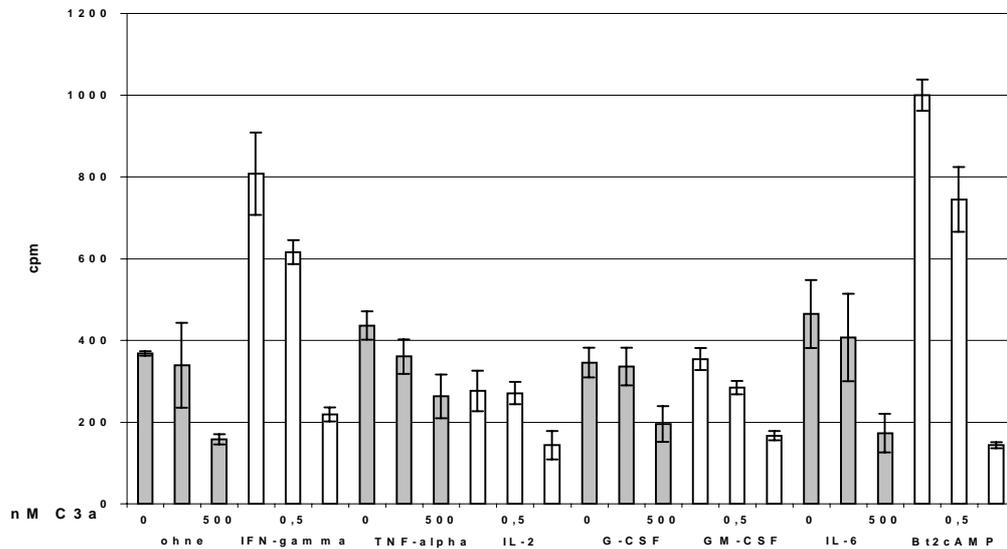


Abb. 3.28: U937-Zellen: Kompetitive Bindungsstudie nach Cytokinstimulation mit 0 nM, 0,5 nM und 500 nM C3a als Verdränger und 125 I-C3a als Tracer.

Bei beiden Zelllinien konnte eine signifikante Erhöhung der gemessenen cpm nur bei der Stimulation mit IFN- γ und Bt₂cAMP detektiert werden.

3.3.4.3 Northern-Transfer: U937-Zellen

Im Hinblick auf die Ergebnisse der kompetitiven Bindungsstudien nach Cytokinstimulation wurden Untersuchungen auf mRNA-Ebene nach Cytokinstimulation durchgeführt. Dazu wurden U937-Zellen mit INF- γ , TNF- α , IL-2 und GM-CSF stimuliert, 1:15 h später die Gesamt-RNA präpariert und im Northern-Transfer eingesetzt. Die Entwicklung erfolgte erst mit einer Anti-hC3aR-Sonde und anschließend zur Normalisierung mit einer GAPDH-Sonde.

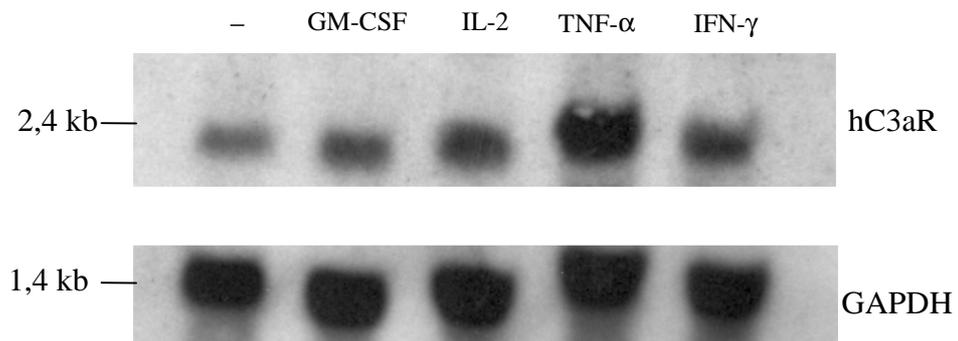


Abb. 3.29: Northern-Transfer von U937 1:15 h nach Stimulation mit Medium (–), GM-CSF, IL-2, TNF- α und IFN- γ . Der Blot wurde nach der Hybridisierung mit der hC3aR-spezifischen Sonde mit einer GAPDH-spezifischen Sonde rehybridisiert.

Ein eindeutig erhöhtes hC3aR-Signal konnte bei U937-Zellen 1:15 h nach Stimulation nur nach TNF- α -Zugabe gezeigt werden.

4. Diskussion

4.1 Untersuchungen zum monoklonalen Antikörper 8H1

4.1.1 Charakterisierung des monoklonalen Antikörpers 8H1

Ein Schwerpunkt der Dissertation bestand in der Charakterisierung des murinen monoklonalen 8H1-Antikörpers der Subklasse IgG1. Nach Epitop-Mapping ergab sich als Epitop die im proximalen Bereich des hC3aR-Loops lokalisierte Aminosäuresequenz TNDHPW, welche einzigartig in der humanen Datenbank (Swiss Prot, EMBL-Datenbank) ist. Dieses Sequenzmotiv scheint immundominant im hC3aR-Loop zu sein, da noch zwei weitere in derselben Immunisierung generierte monoklonale Antikörper dieses Epitop erkennen und ebenso ein unabhängig davon generierter scFv [87] und ein Antikörper der Subklasse IgG2a [R. Ames, Smith-Kline Beecham, USA]. Zur weiteren Charakterisierung wurde der monoklonale 8H1-Antikörper bei verschiedenen Analysen unter denaturierenden und nativen Bedingungen eingesetzt.

Verschiedene Befunde zeigen, daß der 8H1-Antikörper spezifisch erkennt: Unter denaturierenden Bedingungen im Westernblot konnte der 8H1-Antikörper spezifisch hC3aR-Loop-Fusionsproteine erkennen, nicht aber ein Protein ohne sein Epitop. In der indirekten Immunfluoreszenz wurde gezeigt, daß der monoklonale 8H1-Antikörper zwischen mit pTCC0 transfizierten C3aR-positiven und mit pTCCF transfizierten C5aR-positiven HEK293-Zellen unterscheiden kann. Dieses Ergebnis konnte in der Immunhistochemie und in FACS-Analysen bestätigt werden: Auch hier erkannte der monoklonale 8H1-Antikörper die C3aR-positiven, nicht aber die C5aR-positiven HEK293-Zellen. Ebenso konnte in FACS-Analysen die beschriebene C3aR-Expression auf der Mastzelllinie HMC-1 [131] gezeigt werden. Zur weiteren Überprüfung der Spezifität des 8H1-Antikörpers wurden FACS-Analysen mit peripheren Leukozyten durchgeführt. Dabei konnten die in der Literatur beschriebenen Daten [108] bestätigt werden: Es konnte keine Expression des C3aR auf peripheren Lymphozyten nachgewiesen werden, wohl aber auf Monozyten und Granulozyten. Beim Screening auf C3aR-exprimierende Zelllinien für den Reporterassay konnten in FACS-Analysen unter

Verwendung des 8H1-Antikörpers die Neuroblastomazelllinien IMR-32 und SK-N-MC als C3aR-positiv identifiziert werden, was in Northernanalysen und in Bindungsexperimenten bestätigt werden konnte.

Einige Befunde zeigen aber eine Kreuzreaktivität des monoklonalen 8H1-Antikörpers: In FACS-Analysen zum Screening von C3aR-exprimierenden Zelllinien für den Reporterassay konnte unter Verwendung des 8H1-Antikörpers in SW1573-Zellen eine C3aR-Expression eindeutig nachgewiesen werden und bei SK-N-SH-Zellen differierten die Ergebnisse zwischen verschiedenen FACS-Analysen. Zur weiteren Evidenz wurden Northernanalysen unter Verwendung einer hC3aR-spezifischen Sonde durchgeführt, wobei sich die SK-N-SH- und SW1573-Zellen als negativ erwiesen. Dadurch konnte gezeigt werden, daß der monoklonale 8H1-Antikörper mit Strukturen auf den SK-N-SH- und SW1573-Zellen kreuzreagiert. In ausdifferenzierter humaner Plazenta konnten drei Zelltypen nach Inkubation mit dem 8H1-Antikörper angefärbt werden: Arterielle Endothelzellen, die Syncytiotrophoblastenschicht und die phagozytischen Hofbauerzellen. Bei den drei Zelltypen war es möglich, die 8H1-Bindung mit dem Nonapeptid Köhl 2, das die Epitopsequenz beinhaltet, zu verdrängen. Diese Ergebnisse konnten unter Verwendung des scFv 3G7 [87] - wenn auch mit einem wesentlich stärkeren Hintergrund - bestätigt werden. Als zusätzliche Evidenz wurden zwei weitere monoklonale Antikörper, der P4B4 und der P8B5 (von P. Gasque, Cardiff, UK), für die immunhistochemische Analyse verwendet. Die Antikörper erkennen ein überlappendes Epitop im terminalen Bereich des hC3aR-Loops. Das mit dem 8H1-Antikörper und dem scFv 3G7 bestimmte Expressionsmuster in der Plazenta konnte mit den monoklonalen Antikörpern P4B4 und P8B5 nicht bestätigt werden: Als C3aR-positiv erwiesen sich nur die phagozytischen Hofbauerzellen, nicht aber die arteriellen Endothelzellen und die Syncytiotrophoblastenschicht! Diese kontroversen Ergebnisse deuten ebenfalls darauf hin, daß beim 8H1-Antikörper eine Kreuzreaktivität vorliegt. Nach persönlicher Mitteilung von Dr. Zhang konnte in immunhistochemischen und FACS-Analysen mit dem monoklonalen 8H1-Antikörper ebenfalls eine C3aR-Expression auf Amnionzellen nachgewiesen werden, nicht aber mit den monoklonalen Antikörpern P4B4 und P8B5. Da die C3aR-Expression von Amnionzellen in Northernanalysen ebenfalls nicht bestätigt werden konnte, scheint es sich hierbei wiederum um eine Kreuzreaktion des 8H1-Antikörpers zu handeln. Im Hinblick auf dieses Ergebnis ist es wahrscheinlich, daß die arteriellen Endothelzellen und die Syncytiotrophoblastenschicht in der Plazenta aufgrund einer Kreuzreaktion des 8H1-Antikörpers in der Immunhistochemie C3aR-

positiv waren. In der ausdifferenzierten Plazenta sind somit nur die phagozytischen Hofbauerzellen des Stammvillus als eindeutig C3aR-exprimierend charakterisiert worden, da sie unter Verwendung aller C3aR-Antikörper positiv waren. Durch dieses Ergebnis kann gezeigt werden, daß Zellen myelomonocytären Ursprungs auch noch nach dem Übertritt ins Gewebe den C3aR exprimieren, also keine Herabregulation der C3aR-Expression beim Übertritt erfolgt.

Charakteristisch für die Kreuzreaktivität des monoklonalen 8H1-Antikörpers ist, daß der Antikörper erkennt und durch das die Epitopsequenz-beinhaltende Nonapeptid bzw durch den 6 x His-C3aR-Loop verdrängbar ist, aber in Northernanalysen bzw. mit anderen monoklonalen Antikörpern keine C3aR-Expression nachgewiesen werden kann. Eine Kreuzreaktivität ist auch bei gegen den C5aR gerichteten monoklonalen Antikörpern gut bekannt: So konnte eine Kreuzreaktivität von zwei gegen den hC5aR gerichteten Antikörpern gegen ein desmosomales Antigen in Keratinozyten in humaner Haut gezeigt werden [132]. Auch differieren die Ergebnisse der C5aR-Expression auf nicht-myeloiden Zellen in der Lunge und Leber bei Verwendung von monoklonalen Antikörpern [133,134] und eines polyklonalem Antiserums [95].

Zusammenfassend ergab sich bei der Charakterisierung des monoklonalen 8H1-Antikörpers, daß ein definierter Einsatz des Antikörpers unter nativen und denaturierenden Bedingungen möglich ist. So konnte der Antikörper z.B. zur Charakterisierung von C3aR/C5aR-Chimären eingesetzt werden [88]. Eine Einschränkung besteht jedoch durch die in FACS- und immunhistochemischen Analysen aufgetretene Kreuzreaktivität, durch die sich falsch positive Ergebnisse ergaben. Deshalb ist es notwendig beim Screening auf C3aR-exprimierende Zelllinien und Zelltypen in verschiedenen Geweben, eine zweite unabhängige Kontrolle durchzuführen, wie z.B. die Verwendung weiterer gegen den hC3aR gerichtete Antikörper oder eine Northernanalyse.

Während der Charakterisierung des monoklonalen 8H1-Antikörpers ergaben sich Befunde, die auf eine Bindung des zweiten extrazellulären hC3aR-Loops an eine Oberflächenstruktur auf bestimmten Zellen schließen lassen: In FACS-Analysen konnte die 8H1-Bindung auf Monozyten und Granulozyten unter Verwendung des Nonapeptids Köhl 2 kompetitiv verdrängt werden. Eine Verdrängung der 8H1-Bindung durch den 6 x His-hC3aR-Loop war auf Monozyten, erstaunlicher Weise aber nicht auf Granulozyten möglich. Diese Beobachtung läßt sich nicht alleine durch eine Kreuzreaktivität des 8H1-Antikörpers erklären. Eine Erklärung für

die fehlende Verdrängung wäre, daß Antikörpermoleküle über ihre Fc-Teile an FcR auf der Oberfläche von Granulozyten gebunden wären, diese den 6 x His-hC3aR-Loop binden und es somit zu einer Herabsetzung der Konzentration an Verdrängermolekülen kommt. Dieses konnte durch die Präinkubation mit Fc-Fragmenten und durch die Verwendung von 8H1-Fab-Fragmenten ausgeschlossen werden. Desweiteren könnte es zu einer unspezifischen Bindung des His-Schwanzes des 6 x His-hC3aR-Loops an Granulozyten gekommen sein. Eine unspezifische Bindung wurde dadurch ausgeschlossen, daß durch Zugabe eines 6 x His-Peptids im hohen Überschuß potentielle Bindungsstellen abgesättigt wurden. Eine weitere mögliche Erklärung für die fehlende Verdrängung wäre, daß der zweite extrazelluläre Loop des C3aR mit einer Oberflächenstruktur auf den Granulozyten interagiert. Zur Untersuchung des Expressionsmuster des C3aR in verschiedenen Geweben wurden immunhistochemische Analysen unter Verwendung des 8H1-Antikörpers durchgeführt. Auf Kryoschnitten von humaner Leber konnten Zellen in den Periportalfeldern angefärbt werden. Durch Koinkubation mit dem synthetischen Nonapeptid Köhl 2 wurde die 8H1-Bindung spezifisch verdrängt, nicht aber durch Koinkubation mit dem 6 x His-hC3aR-Loop. Dieses Ergebnisse korreliert mit dem Ergebnis, daß in den FACS-Analysen eine Verdrängung der 8H1-Bindung auf peripheren Granulozyten mit dem Nonapeptid Köhl 2, nicht aber mit dem 6 x His-hC3aR-Loop möglich war. Beide Befunde werfen die Frage auf, ob es auf peripheren Granulozyten und auf Zellen in den Periportalfeldern der Leber eine Oberflächenstruktur gibt, an die der zweite extrazelluläre Loop des hC3aR bindet. Diese Fragestellung wurde weiter untersucht (4.1.2).

4.1.2 Untersuchungen zur Funktion des zweiten extrazellulären hC3aR-Loops

Der zweite extrazelluläre Loop des hC3aR ist im Vergleich zu den zweiten extrazellulären Loops aller anderen bisher bekannten G-Protein gekoppelten Rezeptoren außergewöhnlich groß. Mit etwa 172 Aminosäuren macht er gut ein Drittel des gesamten Rezeptormoleküls aus, was die Frage nach seiner Funktion aufwirft. Seit seiner Entdeckung vor drei Jahren konnte diese Frage nicht geklärt werden.

Denkbar wäre eine Funktion bei der Ligandenbindung. Nach Untersuchungen von Dr. Crass in der Arbeitsgruppe kann zumindest nach Inkubation von mit pTCC0 transfizierten C3aR-

positiven HEK293-Zellen mit dem monoklonalen 8H1-Antikörper in kompetitiven Bindungsstudien die Bindung des Liganden C3a nicht inhibiert werden, was darauf hinweist, daß der zweite extrazelluläre Loop, zumindest was das Epitop betrifft, nicht in die Ligandenbindung involviert ist. Auch unter Verwendung eines Aminosäure 185 – 193 erkennenden scFv konnte die Bindung des Liganden und die funktionelle Calciumantwort nicht blockiert [87] werden, was im Gegensatz zu der von einer anderen Arbeitsgruppe durch Mutageneseexperimente postulierten Beteiligung von Aminosäureresten am Anfang (Aminosäure 174 – 197) des zweiten extrazellulären Loops steht [86]. Durch Austausch des zweiten extrazellulären Loop des hC3aR gegen den zweiten extrazellulären Loop des hC5aR erfolgt ein Verlust der C3a-Bindung und Calcium-Antwort [86,88]. Erstaunlicher Weise weist auch noch ein um ungefähr ein Drittel verkürzter zweiter extrazellulärer Loop eine C3a-Bindung und Calcium-Antwort auf [86], was wiederum eher gegen eine Funktion in der Ligandenbindung spricht. Obwohl bei dem zum hC3aR am stärksten verwandten Rezeptor, dem hC5aR, Aminosäurereste im zweiten extrazellulären Loop identifiziert worden sind, die an der Ligandenbindung beteiligt sind [84], konnte beim C3aR aufgrund der bisher vorliegenden Daten keine entsprechenden Ligandenbindungsstellen gefunden werden. Ein Befund, der ebenfalls gegen eine Beteiligung des zweiten extrazellulären Loops an der Ligandenbindung spricht, ist die geringe Sequenzhomologie von 22% zwischen den Loops von Mensch, Maus, Ratte und Meerschweinchen, und daß alle Rezeptoren gut humanes C3a binden [52,72,73,113-117].

Nach der Entdeckung der Multimerisierung einer Reihe anderen Familien angehörender Rezeptoren wie z.B. des EGF-Rezeptors [135,136] und des IFN- γ -Rezeptors [137] konnte auch bei vielen G-Protein gekoppelten Rezeptoren, wie beim β_2 -adrenergen Rezeptor [138] und den metabotropen Glutamatrezeptor 5 (mGluR5) [139], eine Dimerisierung gefunden werden. Der mGluR5 weist im Vergleich zu anderen Mitgliedern der Superfamilie der G-Protein gekoppelten Rezeptoren einen ausgesprochen großen N-Terminus mit 17 Cytosinresten in konservierten Positionen auf, durch den die Dimerisierung vermittelt wird. Eine Funktion in der Multimerisierung wäre für den außergewöhnlich großen zweiten extrazellulären Loop des C3aR aufgrund dieser Daten durchaus denkbar. Bisher sind jedoch keine Ergebnisse über Untersuchungen zur Multimerisierung bekannt.

Als weitere mögliche Funktion des zweiten extrazellulären Loops wäre die Bindung eines zweiten Liganden neben C3a denkbar. In diesem Zusammenhang sei das ebenfalls während der

Komplementkaskade gebildete Spaltprodukt C4a zu nennen. Es konnte gezeigt werden, daß hC4a sowohl an den hC3aR, wie auch an den Meerschweinchen-C3aR bindet, aber nur nach Bindung an den Meerschweinchen-Rezeptor eine funktionelle Calciumantwort auslösen kann [52]. Ob die Bindung von C4a über Bindungsstellen im zweiten extrazellulären Loop des C3aR erfolgt, ist bisher nicht bekannt.

Während der Charakterisierung des monoklonalen 8H1-Antikörpers traten zwei Ergebnisse auf, die auf einen Interaktionspartner des zweiten extrazellulären Loops des hC3aR hindeuten. Zum einen konnte man in FACS-Analysen die Bindung des Antikörpers auf Granulozyten mit dem Nonapeptid Köhl 2, das die Epitop-Sequenz beinhaltet, nicht aber mit dem 6 x His-hC3aR-Loop kompetitiv verdrängen. Zum anderen korrelierte ein Ergebnis aus immunhistochemischen Analysen mit diesem Phänomen: Die Bindung des 8H1-Antikörpers auf Zellen in den Periportalfeldern der Leber konnte mit dem Nonapeptid Köhl 2, nicht aber mit dem 6 x His-hC3aR-Loop verdrängt werden. Eine Erklärung für diese Beobachtungen wäre die Bindung des 6 x His-hC3aR-Loops an eine Oberflächenstruktur auf diesen Zellen, die dadurch bedingte Abnahme der Konzentration an Verdrängermolekülen und die Bindung weiterer 8H1-Antikörper an die gebundenen Loop-Moleküle. Dadurch wäre das gleichbleibende bzw. leicht verstärkte Signal bei den immunhistochemischen Untersuchungen und FACS-Analysen zu erklären.

Zur Überprüfung der Hypothese eines Interaktionspartners des zweiten extrazellulären Loops wurden mehrere Untersuchungen durchgeführt.

Zum einen wurde eine Biacore-Analyse durchgeführt. Dabei wurde der 6 x His-hC3aR-Loop auf einen Carboxylate-Chip fixiert und untersucht, ob es zur Bindung von peripheren Granulozyten an den fixierten Loop kommt. Es konnte keine Bindung gezeigt werden.

In einem zweiten Experiment wurde der 6 x His-hC3aR-Loop über seinen His-Schwanz an Nickel-NTA Magnetic Agarose Beads gekoppelt. Nach Inkubation mit peripheren Leukozyten wurde untersucht, ob es zu einer Bindung von Granulozyten an die gekoppelten Loop-Moleküle kam. Dabei konnte keine Anreicherung von Granulozyten festgestellt werden.

In einem weiteren Experiment wurde versucht, den potentiellen Liganden aus einer λ TriplEx-Phagenbank zu isolieren. Nach einer Anreicherung von Phagen in den ersten Screeningrunden kam es in den folgenden Screeningrunden aus ungeklärten Gründen wieder zu einer Reduktion positiver Spots. Die Spots waren zudem aufgrund der sehr schwachen Färbung nur schwer zu

detektieren. Insgesamt blieb das Screening erfolglos, da alle isolierten Phagen entweder kein Insert oder Bereiche der C3aR-Sequenz enthielten.

Es wurden sowohl Evidenzen für, wie gegen die Existenz eines Interaktionspartners des zweiten extrazellulären Loops des hC3aR gefunden. Für das Vorhandensein eines Liganden sprechen die Beobachtungen in FACS- und immunhistochemischen Analysen: Auf peripheren Granulozyten und Zellen in den Periportalfeldern der Leber konnte die Bindung des monoklonalen 8H1-Antikörpers nicht durch den 6 x His-hC3aR-Loop, aber durch das Nonapeptid Köhl 2 verdrängt werden. Gegen einen Interaktionspartner sprechen die Ergebnisse aus der Biacore-Analyse und dem Experiment mit Nickel-NTA Magnetic Beads, bei denen keine Bindung von Granulozyten an den 6 x His-hC3aR-Loop nachgewiesen werden konnte. Dabei muß berücksichtigt werden, daß es bei der Biacore-Analyse durch Fixierung des Loops auf dem Carboxylate-Chip zu einer Zerstörung der Erkennungsstruktur gekommen sein könnte. Ein weiterer Punkt, der gegen seine Funktion in der Bindung eines neuen Liganden spricht, ist die geringe Sequenzhomologie des Loops zwischen den verschiedenen Spezies. Auch das Screening der Expressionsbank blieb erfolglos, wobei berücksichtigt werden muß, daß bei diesem Verfahren ausschließlich Proteinstrukturen erfaßt werden. Würde es sich bei dem putativen Liganden beispielsweise um eine Zuckerstruktur handeln, hätte diese mit dem Verfahren nicht detektiert werden können. Das Screening nach einer Zuckerstruktur würde sich als wesentlich aufwendiger erweisen, weil es nicht über das Screening einer Phagenbank erfolgen könnte. Vielmehr müßte versucht werden, mit verschiedenen Enzymen spezifisch Zuckerreste auf der Zelloberfläche abzubauen, und anschließend zu untersuchen, ob mit dem 6 x His-hC3aR-Loop die 8H1-Bindung auf Granulozyten verdrängt werden kann, um die betreffende Zuckerstruktur einzugrenzen.

Im Rahmen der Dissertation konnte die Funktion des zweiten extrazellulären hC3aR-Loops nicht geklärt werden. Die Suche nach einem putativen Liganden des Loops blieb erfolglos.

4.2 Charakterisierung von C3aR-exprimierenden Zelllinien

Zum Aufbau eines Reporterassays zur Untersuchung des Promotors des hC3aR mußte eine geeignete Zelllinie gefunden werden, die zum einen den C3aR exprimiert und zum anderen gut transient transfizierbar sein sollte, um das Austesten verschiedener Reporterassaykonstrukte zu erleichtern. Die in der Arbeitsgruppe vorhandenen humanen C3aR-positiven Zelllinien HMC-1 und U937 erschienen zu Beginn der Dissertation aufgrund ihrer schlechten Transfizierbarkeit nur im geringen Maße geeignet: Beide Suspensionszelllinien ließen sich nicht mit der Calciumphosphat- und der Liposomen-Technik unter Verwendung von Lipofectamin transfizieren. Erst unter Verwendung eines neu entwickelten Produktes zur transienten Transfektion, dem Effectene, konnte eine für den Reporterassay ausreichende Transfektionseffizienz bei beiden Zelllinien erreicht werden. Es wurden trotzdem weitere Zelllinien auf C3aR-Expression untersucht, um eine Zelllinie zu finden, die den C3aR exprimiert und mit einer kostengünstigeren Transfektionsmethode transfizierbar ist. Dabei wurde der Schwerpunkt auf Zelllinien gelegt, die aus Geweben stammen, die in der Literatur als C3aR-positiv beschrieben und im Institut vorhanden waren. Zum einen wurden zwei Lungenzelllinien untersucht, da Daten aus Northernanalysen [71,73] und immunhistochemischen Untersuchungen [140] eine Expression des C3aR in der Lunge zeigten. Die Lungenzelllinie GLC4 erwies sich in den FACS-Analysen mit dem monoklonalen 8H1-Antikörper als C3aR-negativ und die SW1573-Zelllinie als positiv, jedoch in Northernanalysen als negativ. Das positive Ergebnis der SW1573-Zellen in der FACS-Analyse ist der Kreuzreaktivität des monoklonalen 8H1-Antikörpers zuzuschreiben (4.1.1). Auf beiden Lungenzelllinien konnte also keine C3aR-Expression nachgewiesen werden, so daß sie für den Aufbau eines Reporterassays nicht geeignet waren. Eine weitere humane Zelllinie, die in FACS-Analysen getestet wurde, war die Pro-/Myeloblasten-Zelllinie KG-1. Trotz des positiven Signals von Knochenmark [72] in Northernanalysen konnte keine C3aR-Expression auf diesen Zellen gezeigt werden. Eine Vielzahl von Daten aus Northernanalysen [72,73] und immunhistochemischen Analysen sprechen für die Expression des C3aR in weiten Bereichen des Gehirns. In der Immunhistochemie wurden Untersuchungen am gesunden Gehirn und an entzündeten Bereichen des Gehirns bei Multipler Sklerose und bakterieller Meningitis durchgeführt, wobei sich fetale und adulte Astrocyten, Gliazellen und auch Neuronen als C3aR-positiv erwiesen [103-105]. Auch in einer Reihe von neuronalen Zelllinien, insbesondere

Astrocytoma-Zelllinien, konnte eine C3aR-Expression nachgewiesen werden: Daten aus FACS-Analysen und Analysen auf mRNA-Ebene durch RT-PCR zeigten eine C3aR-Expression in der Glioblastomazelllinie T98G [103,107], in den Astrocytomazelllinien CB193 [103,106,107], U118 MG [106,107] und CCF-STTG1 [106], in der Oligodendrocytenzelllinie HOG [103], in den Neuroblastomazelllinien IMR-32 und SK-N-SH [103] und in der Primärkultur von Astrocyten [106]. Aufgrund der Daten, die auf ein breites Expressionsspektrums des C3aR im Gehirn deuten, wurden deshalb schwerpunktmäßig neuronale Zelllinien auf C3aR-Expression untersucht. Dabei erwies sich die Glioblastomazelllinie U-87 MG in FACS-Analysen als C3aR-negativ. Die C3aR-Expression der von Gasque et al [103] beschriebenen Neuroblastomazelllinie SK-N-SH konnte in unseren Untersuchungen (FACS-Analyse und Northernanalyse) nicht bestätigt werden. Die Neuroblastomazelllinie IMR-32, die auch schon von Gasque et al [103] als C3aR-exprimierend beschrieben wurde, und die Neuroblastomazelllinie SK-N-MC erwiesen sich hingegen in FACS- und Northern-Analysen als C3aR-positiv. Bei den erstmals als C3aR-exprimierend beschriebenen SK-N-MC-Zellen handelt es sich um eine Neuroblastomazelllinie, die aus einer Metastase des supra-orbitalen Bereichs isoliert wurde. Weiterhin konnte durch kompetitive Bindungsstudien die C3a-Bindung bei IMR-32- und SK-N-MC bestätigt werden. Erstaunlicherweise unterschied sich die bestimmte K_D um ungefähr eine 10er Potenz: Sie lag bei IMR-32-Zellen bei $8,82 \text{ nM} \pm 0,9 \text{ nM}$ und bei SK-N-MC bei $0,78 \text{ nM} \pm 0,73 \text{ nM}$. Es ist unklar, weshalb die Affinitäten der Rezeptoren sich auf den beiden Zelllinien so stark unterscheiden. Vielleicht liegt die Ursache in einem unterschiedlichen G-Protein-Besatz. Die C3aR-exprimierenden IMR-32- und SK-N-MC-Zellen können durch die kostengünstigere Calciumphosphat-Methode transfiziert werden und erfüllen somit die Voraussetzungen zum Einsatz in den Reporterassay zur Untersuchung des Promotors des hC3aR.

4.3 Untersuchung der 5'-UTR des hC3aR

4.3.1 Eingrenzung des Transkriptionsstarts und Sequenzanalyse der 5'-UTR

Zur Charakterisierung der Promotorregion des hC3aR sollte zunächst der Transkriptionsstartpunkt bestimmt werden. Dazu wurden drei verschiedene Verfahren (reverse Transkription, 5'-Rapid Amplification of cDNA Ends und Nuclease Protection Assay) mit verschiedenen Matrizen durchgeführt. Die Ergebnisse differieren dabei zwischen den verschiedenen Verfahren und den verwendeten Zellen.

Die durch 5'-RACE unter Verwendung einer cDNA-Bank aus humaner Plazenta und aus humanem fetalen Gehirn ermittelten Transkriptionsstartpunkte lagen im Vergleich zu den über die anderen Verfahren ermittelten Startpunkte sehr weit stromabwärts. Sie lagen ebenfalls stromabwärts der von zwei unterschiedlichen Gruppen aus cDNA-Banken klonierten hC3aR-cDNA [71,73], was zeigt, daß in den zur 5'-RACE verwendeten cDNA-Banken keine hC3aR-cDNA voller 5'-Länge vorlag.

Als weiteres Verfahren wurde eine reverse Transkription von Gesamt-RNA mit anschließender Einzelstrang-PCR mit verschiedenen 5'-UTR-Primern durchgeführt. Die eingegrenzten Sequenzbereiche differierten zwischen den Zelllinien, wobei der für HMC-1- und SK-N-MC-Zellen eingegrenzte Sequenzbereich am weitesten stromaufwärts und der für U937-Zellen am weitesten stromabwärts in der 5'-UTR des hC3aR liegt. Bei Verwendung multipler Transkriptionsstartpunkte durch die Zellen, also einem Vorliegen von mRNA mit verschiedenen 5'-Enden, werden bei diesem PCR-Verfahren nur die am weitesten 5'-gelegenen Bereiche des Transkriptionsstarts erfaßt. Da es sich bei der durchgeführten Methode um keinen quantitativen Nachweis handelt, kann nicht ausgeschlossen werden, daß in den Zellen noch weitere Startpunkte genutzt werden, die stromabwärts vom eingegrenzten Bereich liegen. Durch reverse Transkription und anschließende Einzelstrang-PCR mit mRNA aus unterschiedlichen Zelllinien als Matrize konnten also Zelltyp-spezifische Unterschiede in der Lage der Transkriptionsstartbereiche detektiert werden. Solche Gewebe-spezifische Nutzung von Transkriptionsstartpunkten wurde schon häufiger in der Literatur beschrieben, wie z.B. für

das Diazepam-Bindungsinhibitor-Gen in der Ratte [141], für das Cholecystokinin-Gen in der Ratte [142] und für das Prostaglandin E Rezeptor Subtyp EP2-Gen in der Maus [143].

In HMC-1-Zellen konnten in den durchgeführten Nuclease Protection Assays zwei Transkriptionsstartpunkte im Abstand von 12 bp bestimmt werden, wobei der Abstand nicht zu erklären ist. Die durch NPA bestimmten Startpunkte liegen weiter stromabwärts als der mittels reverser Transkription für HMC-1-Zellen eingegrenzte Sequenzbereich, was für die Verwendung multipler Startpunkte in HMC-1-Zellen spricht. Dabei muß berücksichtigt werden, daß beim NPA nur eine Einzelbande detektiert werden konnte und nicht mehrere Banden, wie bei Nutzung multipler Transkriptionsstartpunkte zu erwarten gewesen wäre. Eine Erklärung dafür wäre, daß der bzw. die weiter stromaufwärts gelegene(n) putative(n) Startpunkt(e) nur schwach frequentiert ist bzw. sind, und deshalb die Menge des mRNA-Transkripts zu gering war, um im NPA ein Signal zu erzeugen.

Am Transkriptionsstartpunkt gibt es keine ausgeprägten Sequenzhomologien, allerdings ist die erste mRNA-Base in der Regel ein von Pyrimidinen flankiertes Adenin. In der Hauptzahl der bisher untersuchten eukaryotischen Promotoren wurde die Sequenz C(-1)A(+1) am Transkriptionsstartpunkt gefunden [144]. Die Suche nach potentiellen Cap-Signalen mit der PC-Gene-Software ergab in dem über reverse Transkription eingegrenzten Bereich bei IMR-32-Zellen ein Cap-Signal bei Position -197 bis -190 und bei U937-Zellen bei Position -180 bis -173. In dem bei SK-N-MC- und HMC-1-Zellen eingegrenzten Bereich konnten drei potentielle Cap-Signale detektiert werden und zwar bei den Positionen -264 bis -257, -237 bis -230 und -222 bis -215. Einer der durch NPA bei HMC-1-Zellen bestimmten Transkriptionsstartpunkte liegt genau im Bereich des Cap-Signals bei -180 bis -173, das auch das putative Cap-Signal in U937-Zellen ist. In dem Sequenzbereich der 5'-UTR bis -300 konnte nach Analyse mit dem Matinspector professional (Genomatix) nur ein putatives TATA-Box-Element bei Position -279 bis -265 kartiert werden, das nur zum Cap-Signal bei Position -237 bis -230 eine Korrelation (Abstand zwischen den Zentren: 38 bp) aufweist. Ebenfalls nur eine potentielle CCAAT-Box bei Position -242 bis -231 konnte in der gesamten 5'-UTR-Sequenz detektiert werden, die aber nicht in Korrelation zu einem der potentiellen Transkriptionsstartpunkte steht.

Zusammenfassend gesehen ließen die Untersuchungen keine eindeutige Bestimmung des Transkriptionsstartpunktes zu. Die durch reverse Transkription eingegrenzten Sequenzbereiche, in denen die Transkriptionsstartpunkte zu vermuten sind, unterscheiden sich bei den

verschiedenen Zelllinien und deuten auf Zelltyp-spezifische Nutzung von verschiedenen Transkriptionsstartpunkten hin. Bei HMC-1-Zellen liegen die durch NPA bestimmten Transkriptionsstartpunkte nicht in dem durch reverse Transkription eingegrenzten Bereich. Dieses ist eine Evidenz für die Nutzung von zwei oder mehreren Transkriptionsstartpunkten in HMC-1-Zellen. Das Fehlen von Nebenbanden im NPA wäre dann dadurch zu erklären, daß ein Haupttranskriptionsstartpunkt vorliegt, und der bzw. die putativen anderen nur im geringen Maße frequentiert sind. Ob in den anderen Zelllinien auch multiple Transkriptionsstartpunkte verwendet werden, kann aufgrund fehlender NPA-Ergebnisse nicht geklärt werden. Es ist aber denkbar, daß ein oder mehrere Startpunkte weiter stromabwärts des durch reverse Transkription eingegrenzten Bereichs in den anderen Zelllinien, wie auch bei HMC-1-Zellen, genutzt werden. Mehrere Fakten deuten darauf hin, daß es sich beim Promotor des hC3aR um einen TATA-losen Promotor handelt:

Zum einen liegt die in der Sequenzanalyse detektierte TATA-Box nur in Korrelation zu einem einzigen potentiellen Cap-Signal, daß ausschließlich in dem für HMC-1- und SK-N-MC-Zellen eingegrenzten Sequenzbereich liegt, nicht aber in dem für IMR-32- und U937-Zellen eingegrenzten Bereich. Bei diesem Cap-Signal handelt es sich zudem nicht um das im NPA für HMC-1-Zellen bestimmte – und mutmaßlich höchstfrequentierte (keine weiteren Banden!) - Cap-Signal.

Eine weitere Evidenz, die für das Vorliegen eines TATA-losen Promotor spricht, ist die vermutliche Nutzung multipler Transkriptionsstartpunkte im hC3aR-Gen. In Genen, in denen TATA-lose Promotoren vorliegen, werden sehr häufig multiple Transkriptionsstartpunkte genutzt [145].

Vor kurzem konnte auch der murine C3aR kloniert werden, der 65% Homologie zum humanen C3aR aufweist [113-115]. Seine genomische Organisation ist der des hC3aR sehr ähnlich: Exon 1, in dem der Hauptteil der 5'-UTR liegt, wird von Exon 2, in dem 8 bp der 5'-UTR, der offene Leserahmen und die 3'-UTR liegen, durch ein ca. 5 kb großes Intron getrennt [115]. Über Primer Extension Experimente konnte ein einzelner Transkriptionsstartpunkt bestimmt werden, und Sequenzanalysen deuten auf einen TATA-losen Promotor hin [115]. Die hohe Homologie zwischen dem murinen und dem humanen C3aR und die ähnliche genomische Organisation legen die Annahme eines TATA-losen Promotors auch beim hC3aR nahe.

Unter Annahme eines TATA- und CCAAT-losen Promotors und der Nutzung multipler Transkriptionsstartpunkte, zeigt der hC3aR-Promotor eine Übereinstimmung mit einer Vielzahl

von Promotoren anderer G-Protein gekoppelter Rezeptoren. Beispiele hierfür sind die Promotoren in den Genen für den murinen Parathyroidhormon/Parathyroidhormon-bezogenen Peptidrezeptor (mPTHr) [146], den murinen δ Opioidrezeptor (mDOR) [147], den V1a Vasopressinrezeptor der Ratte (rAVP) [148], den humanen und murinen Serotonin 1a Rezeptor [149], den Corticotropin Releasing Factor Rezeptor der Ratte (rCRFR) [150] und den humanen Histamin H1 Rezeptor [151]. Häufig ist die Promotorregion von TATA-losen Genen G-Protein gekoppelter Rezeptoren sehr GC-reich [146-149], was aber beim hC3aR-Promotor nicht zutrifft.

Ein bei den im folgenden beschriebenen Reporterassays in HMC-1-Zellen aufgetretenes Ergebnis korreliert nicht mit den Ergebnissen zur Eingrenzung des Transkriptionsstarts: Das Promotorkonstrukt pSEAP2-E-125 wies keine Promotoraktivität auf, obwohl sein 3'-Ende 12 bp stromabwärts des von HMC-1-Zellen vermutlich höchstfrequentierten Cap-Signals gelegen ist. Theoretisch hätte es funktionsfähig sein müssen, wenn die Bestimmung der Transkriptionsstartpunkte richtig ist, da das pSEAP2-E-267-Plasmid, welches das gleiche 5'-Ende, aber ein um ca. 140 bp verlängertes 3'-Ende hat, Promotoraktivität aufweist. Eine Erklärung für den Verlust der Promotoraktivität des 125 bp-Promotorkonstruktes wäre, daß durch den im Vergleich zur mRNA anderer Promotorkonstrukte wesentlich kürzeren 5'-Nichtkodierungsbereich der gebildeten mRNA, eine abgeschwächte oder fehlende Bindung der ribosomalen Untereinheiten an die mRNA erfolgt und dadurch eine herabgesetzte oder fehlerhafte Translation bedingt ist. Ein Fehlen des Purin-Nukleotids an dritter Stelle stromaufwärts des AUG-Translationsstartcodons, durch das effiziente Translationsstartstellen ausgezeichnet sind [152], kann als Ursache für den Verlust der Promotoraktivität ausgeschlossen werden. Wie bei allen anderen Promotorkonstrukten liegt auch bei dem pSEAP2-E-125-Plasmid in dem zur Klonierung verwendeten pSEAP2-Enhancer-Vector drei Nukleotide vor dem Startcodon des Reportergens ein Adenin vor.

4.3.2 Reportergenassays

Bei der Sequenzierung der durch Klonierung von Bereichen der 5'-UTR in pSEAP2-Enhancer generierten Plasmide zeigte sich, daß einige der 5'-UTR-Konstrukte eine Deletion des Cytosinrestes in Position – 151 aufweisen. Laut den Untersuchungen zum Transkriptionsstartpunkt liegt diese Punktdeletion stromabwärts der putativen Transkriptionsstartpunkte und somit nicht im Promotorbereich, sondern im 5'-Nichtkodierungsbereich der gebildeten mRNA.

Zur Untersuchung der Promotoraktivität verschiedener Bereiche der 5'-UTR des hC3aR wurden alle konstruierten Plasmide in den Zelllinien HMC-1, IMR-32, SK-N-MC und U937 getestet, wobei nur in HMC-1-Zellen reproduzierbare Ergebnisse erhalten worden sind. Bei den U937-Zellen läßt sich die fehlende Reproduzierbarkeit wahrscheinlich auf die nach der Transfektion erfolgende Differenzierung mit Bt_2cAMP zurückführen: Kleine Volumenunterschiede bei der Stimulation könnten zu einer unterschiedlichen Bt_2cAMP -Konzentration im Medium und damit zu einem unterschiedlichen Differenzierungsgrad der Zellen geführt haben. Deshalb sollte in weiteren Versuchen getestet werden, ob sich auch differenzierte U937-Zellen mit einer für den Reportergenassay ausreichenden Effizienz transient transfizieren lassen. Dieses hätte den Vorteil, daß sich alle Zellen während der Durchführung des Reportergenassays im gleichen Differenzierungsstadium befinden. Auch die Ergebnisse der Reportergenassays bei IMR-32- und SK-N-MC-Zellen waren nicht reproduzierbar. Eine Erklärung dafür könnte in der verwendeten Transfektionsmethode liegen, weil bei Transfektionen mit Calciumphosphat häufig eine höhere Schwankung in der Transfektionseffizienz als bei Transfektionen mit Lipofektamin oder Effectene beobachtet werden konnte. Die IMR-32- und SK-N-MC-Zellen konnten trotzdem für die Untersuchungen zur Regulation der Promotoraktivität durch Cytokine eingesetzt werden, da hierbei Aliquots einer Transfektion mit den verschiedenen Cytokinen stimuliert wurden, und deshalb keine Einschränkungen durch die Schwankungen in der Transfektionseffizienz bestanden.

Das kürzeste Promotorkonstrukt, das in den Reportergenassays Promotoraktivität zeigte, war das pSEAP2-E-267-Plasmid, dessen 5'-Ende bei Position – 283 der 5'-UTR liegt. Durch weitere 5'-Verkürzungen könnte der Minimalpromotor des hC3aR eingegrenzt und weitere Untersuchungen zum TATA-Box-Element durchgeführt werden. Würde man im Reportergenassay nach Entfernen der putativen TATA-Box-Sequenz durch weitere 5'-

Verkürzungen wenig bis keine Abschwächung der Promotoraktivität detektieren, würde dieses für das Vorhandensein eines TATA-losen Promotors im hC3aR-Gens sprechen.

Weiterhin zeigte sich bei den Untersuchungen der verschiedenen Promotorkonstrukte in HMC-1-Zellen, daß das Promotorkonstrukt im pSEAP2-E-1511-Plasmid im Vergleich zu dem um ca. 100 bp kürzerem Promotorkonstrukt im pSEAP2-E-1396-Plasmid und dem um ca. 100 bp längerem Promotorkonstrukt im pSEAP2-E-1607-Plasmid eine deutlich höhere Promotoraktivität aufwies. Dieses deutet auf ein positiv regulierendes Element in dem ca. 100 bp Sequenzbereich stromabwärts des Promotorkonstruktes pSEAP2-E-1511 und auf ein negativ regulierendes Element in dem ca. 100 bp Sequenzbereich stromaufwärts. Deshalb wurde die Sequenz, in der ein positive Regulatorelement vermutet wird, in das pSEAP2-E-308-Plasmid kloniert. Im Reporteragenassay, in dem eine Erhöhung der Promotoraktivität im Vergleich zum pSEAP2-E-308-Plasmid erwartet wurde, konnte erstaunlicher Weise nur eine Abschwächung der Promotoraktivität gemessen werden. Diese Abschwächung könnte in der räumlichen Orientierung bedingt sein. Es wäre denkbar, daß vorher vorhandene Sekundärstrukturen, die zur Bindung von Transkriptionfaktoren notwendig sind, durch die Uorientierung zerstört wurden. Untersuchungen zum potentiell negativ regulierenden Element wurden im Rahmen dieser Arbeit nicht durchgeführt. Zum Nachweis des negativen Regulators könnte der entsprechende Sequenzbereich in das pSEAP2-E-CMV-Plasmid kloniert werden. In Reporteragenassays würde eine Abschwächung der Promotoraktivität erwartet werden, wobei auch hier nicht ausgeschlossen werden kann, daß die räumliche Uorientierung eine Auswirkung auf die Funktion des negativen Regulationselement hat. Als weitere Methode zur Charakterisierung der in der 5'-UTR des hC3aR potentiell vorhandenen positiven oder negativen Regulationselemente könnte die Generierung von Deletionsmutanten erfolgsversprechend sein. Durch Abgleich der Ergebnisse aus Untersuchungen mit Deletionsmutanten mit den in der Sequenzanalyse identifizierten potentiellen Bindungsstellen, könnte die Charakterisierung der potentiellen positiven und negativen Transkriptionsregulationselementen weitergeführt werden.

4.3.3 Untersuchungen zur Cytokin-vermittelten hC3aR-Regulation

Unter Verwendung des etablierten Reporterassays wurde die Cytokin-vermittelte Regulation des humanen C3aR auf Transkriptionsebene untersucht, mit dem Ziel der Identifizierung von Cytokinen als Regulatoren der C3aR-Expression. Bislang sind nur wenige Daten über Regulatoren der C3aR-Expression bekannt. Neben den nicht-physiologischen Regulationsfaktoren Bt_2cAMP und PMA wurde als erster physiologischer Regulationsfaktor $IFN-\gamma$ beschrieben, der in myelomonoblastischen Zelllinien wie HL-60, THP-1 und U-937 den C3aR innerhalb von 2 – 3 Tagen hochreguliert [111]. Bei der Untersuchung der Cytokin-vermittelten Regulation des C3aR konnte somit die Stimulation mit $IFN-\gamma$ als interne Positivkontrolle in myelomonoblastischen Zellen angesehen werden. Daten, die während des Expressionsklonierungsverfahrens des hC3aR ermittelt wurden, sprechen für eine Hochregulation der hC3aR-Expression nach Stimulation mit Oncostatin M (OSM). In den Zellkulturüberstand sezerniertes OSM bewirkte eine schwache Hochregulation der hC3aR-Expression in HEK293-Zellen, die mit einer cDNA-Bank transient transfiziert waren [bisher unveröffentlicht, Dissertation:112].

Für die Reporterassays wurden verschiedene Cytokine in Standardkonzentrationen eingesetzt. In Northernanalysen könnten für die verwendeten Cytokine Dosiswirkungskurven ermittelt werden, um auszuschließen, daß eine fehlende Regulation in der zu gering gewählten Konzentration des Cytokins bedingt ist. Die Reporterassays wurden 54 h nach der Cytokinstimulation durchgeführt. Es ist daher nicht auszuschließen, daß es sich bei den detektierten Regulationen nicht um direkte, sondern um indirekte Effekte handelt, was für die Zielsetzung (= primäres „breites“ Screening auf potentielle Regulatoren) nicht von Bedeutung ist. In weiteren Untersuchungen sollten jedoch Zeitkinetiken durchgeführt werden, um Aufschlüsse darüber zu erhalten, ob die Cytokinregulatoren über die durch sie vermittelte Signaltransduktionskaskade direkt auf den Promotor des hC3aR einwirken oder nicht. Hierbei muß berücksichtigt werden, daß eine bestimmte Zeit benötigt wird, bis die Reporterproteine in einer nachweisbaren Konzentration in den Zellen vorliegen.

Bei der Mehrzahl der verwendeten Cytokine ($IFN-\alpha$ und $-\gamma$, EPO, TPO, G-CSF, IL-2, IL-4, IL-3, GM-CSF, IL-6, LIF und OSM) erfolgt die - am besten charakterisierte - Signaltransduktion über den Jak/STAT-Signalweg bei dem es letztendlich zur meist direkten Bindung von STAT-Dimeren an DNA-Sequenzen kommt. Im gesamten 5'-UTR-Sequenzbereich liegt nach

Sequenzanalyse nur eine potentielle STAT-Bindungsstelle vor, die aber stromabwärts der kartierten Transkriptionsstartpunkte liegt. Bei TNF- α münden die Signaltransduktionswege in der Aktivierung von NF- κ B, AP-1 und anderen Transkriptionsfaktoren. In der Sequenz bis – 300 bp konnte bei Position – 227 bis – 219 eine AP-1-Bindungsstelle und in der gesamten 5'-UTR-Sequenz bei Position – 931 bis – 922 eine Bindungsstelle für NF- κ B detektiert werden.

In U937-Zellen konnte eine Hochregulation der Promotoraktivität durch Bt₂cAMP (Positivkontrolle!), IFN- α und $-\gamma$ (Positivkontrolle!), G-CSF, TNF- α und den Mitglieder der β_c -Familie IL-3 und GM-CSF gezeigt werden. Bei den zwei aus der γ_c -Familie verwendeten Cytokinen induzierte nur IL-2, nicht aber IL-4 eine Hochregulation, was für das Fehlen des IL-4R α (CD124) in den U937-Zellen spricht. Ebenso konnten nur zwei der verwendeten Mitglieder der gp130-Familie, IL-6 und OSM, eine Hochregulation der Reporterexpression bewirken, nicht aber LIF, was gegen die Expression des LIFR β auf U937-Zellen spricht. gp130 ist eine gemeinsame Komponente der Rezeptoren der gp130-Familie (IL-6, IL-11, LIF, OSM, CNTF und CT1). Aufgrund des gemeinsamen Signaltransduktionsmoleküls gp130 sollte sich die Signalübertragung innerhalb der gp130-Familie gleich verhalten. OSM kann im humanen System seine Wirkung nicht nur über den LIF β , sondern auch über einen eigenen Rezeptor entfalten. Bei der Stimulation mit OSM muß berücksichtigt werden, daß ein OSM-haltiger Überstand von transient transfizierten HEK-293-Zellen verwendet wurde und kein aufgereinigtes Cytokin. Deshalb ist nicht auszuschließen, daß detektierte Effekte durch andere im Überstand vorhandene Faktoren vermittelt wurden. Die während des Expressionsklonierungsverfahrens des hC3aR beobachtete Hochregulation der C3aR-Expression durch OSM (siehe vorne) läßt aber auf einen durch OSM- und nicht durch andere Faktoren im Zellkulturüberstand vermittelten Effekt schließen. Für die Cytokine, die eine Regulation bewirkten, sind Wirkungen auf die myelomonoblastischen Zelllinie U937 bekannt. Beispielsweise bewirken GM-CSF, IFN- α und $-\gamma$ eine Zunahme der Expression von FcRI und II [153] und IFN- α der Chemokinrezeptoren CCR1 und CCR3 [154] auf U937-Zellen. TNF- α vermittelt in U937-Zellen eine Induktion der I κ B-Kinase (IKK) und der κ B-abhängigen Transkription [155]. Für IL-2 und GM-CSF ist eine Induktion der Aktivität des Gewebefaktors [156] und für IL-6 eine Hochregulation der Expression des Monozyten chemotaktischen Proteins 1 (MCP-1) [157] beschrieben. Durch Verwendung verschieden langer Promotorkonstrukte in dem Reporterassay wurde versucht, durch Cytokine direkt oder indirekt regulierte Sequenzbereiche in der 5'-UTR des hC3aR einzugrenzen. Eine Eingrenzung

war nicht möglich, weil keine deutlichen Unterschiede nach Cytokinstimulation verschiedener Promotorkonstrukte auftraten. Auch nach TNF- α -Stimulation konnte bei den getesteten Promotorkonstrukten kein Unterschied detektiert werden, obwohl die durch Sequenzanalyse bestimmte Bindungsstelle für NF- κ B in den beiden kürzeren Promotorkonstrukten pSEAP2-E-308 und pSEAP2-E-267 nicht mehr vorhanden ist. Dieses läßt wesentliche Regulationselemente in einem Bereich nahe des Transkriptionsstartpunktes vermuten. Möglicherweise – bei indirekter Wirkung - handelt es sich um denselben Transkriptionsfaktor, der nach Stimulation mit verschiedenen Cytokinen aktiviert wird.

In der Neuroblastomazelllinie IMR-32 konnte eine Hochregulation der Reporterexpression nach Stimulation mit IFN- α und - γ , TNF- α , den Mitgliedern der gp130-Familie IL-6, LIF und OSM, dem Mitglied der β_c -Familie IL-3, nicht aber GM-CSF und dem Mitglied der γ_c -Familie IL-2 detektiert werden. Nach Stimulation mit G-CSF und erstaunlicher Weise nach Stimulation mit Bt₂cAMP, durch das die intrazelluläre Konzentration an cAMP erhöht wird, kam es weder zur Hochregulation noch zur Herabregulation der Promotoraktivität. Die fehlende Regulation durch die Hämatopoetine G- und GM-CSF ist wahrscheinlich auf die fehlende Expression ihrer Rezeptoren in IMR-32-Zellen zurückzuführen. Hier müßte ein Nachweis der Rezeptoren, etwa durch RT-PCR, geführt werden. Wie auch schon in den U937-Zellen konnten auch hier keine Unterschiede in der Cytokin-vermittelten Regulation bei den verschiedenen Promotorkonstrukten ermittelt werden.

Die Ergebnisse der Untersuchungen zur Cytokin-vermittelte Regulation des C3aR-Promotors in den SK-N-MC-Zellen unterscheidet sich von den Ergebnissen in IMR-32-Zellen, obwohl es sich bei beiden Zelllinien um Neuroblastomazelllinien handelt: Bei den IMR-32-Zellen handelt es sich um eine Mischkultur aus Fibroblasten- und Neuroblasten-ähnlichen Zellen und bei den SK-N-MC-Zellen um epitheliale Zellen. Die Ergebnisse der Reporterassays in SK-N-MC-Zellen waren insgesamt weniger reproduzierbar als in IMR-32-Zellen. Auffällig ist, daß eine gleichbleibende Reporterexpression nach Stimulation mit IFN- α und - γ und sogar eine Herabregulation nach Stimulation mit Bt₂cAMP zu detektieren war. Auch bei anderen Genen [158-160] ist eine Herabregulationen nach Erhöhung des intrazellulären cAMP-Spiegels beschrieben.

Insgesamt wurde eine Hochregulation der Reporterexpression durch die Mehrzahl der verwendeten Cytokine induziert, wobei es sich auch um indirekt durch die Cytokine vermittelte Effekte handeln kann. In den Zelllinien IMR-32, SK-N-MC und U937 konnten Zelltyp-

spezifische Unterschiede in der Regulation des C3aR-Promotors durch die Cytokine festgestellt werden, was wahrscheinlich auf ein unterschiedliches Cytokinrezeptor-Expressionsmuster in den verschiedenen Zelllinien zurückzuführen ist.

Um die Cytokinregulation auf C3aR-Expressionsebene zu untersuchen, wurden HL-60- und U937-Zellen mit einigen der im Reporterassay identifizierten regulatorisch wirkenden Cytokine stimuliert. 72 h nach der Cytokinstimulation wurden kompetitive Bindungen mit ¹²⁵I-markierten C3a durchgeführt. In beiden Zelllinien konnte nur nach Stimulation mit den bekannten Regulatoren IFN- γ und Bt₂cAMP eine erhöhte Bindung detektiert werden, obwohl im Reporterassay eine eindeutig verstärkte Reporterexpression nach Stimulation mit allen bei der Bindungsstudie verwendeten Cytokinen gefunden wurde. Daß sich eine Erhöhung der Transkription nicht in einer Erhöhung der Proteinexpression auswirkt, kann folgende Gründe haben: Beim Reporterassay handelt es sich um einen sehr sensitiven Assay. Es wäre deshalb denkbar, daß die Erhöhung der Rezeptormoleküle nach Cytokinstimulation zu gering ist, um sie in der Bindungsstudie zu detektieren. Desweiteren könnte die Erhöhung der mRNA-Moleküle und nachfolgend der Proteine nur kurzfristig sein, so daß zum Zeitpunkt der Bindungsstudie (72 h nach Cytokinstimulation!) die zusätzlichen Rezeptoren nicht mehr auf der Oberfläche exprimiert sind. Da die SEAP in den Überstand sezerniert wird, bleibt diese aber erhalten, und eine Erhöhung der Promotoraktivität nach Cytokinstimulation kann auch Tage danach noch detektiert werden. Eine weitere mögliche Erklärung könnte sein, daß die Erhöhung der mRNA-Moleküle nicht zu einer erhöhten Proteinexpression aufgrund des Fehlens von Kofaktoren (z. B. Chaperonin) führt. Da aber eine gute C3aR-Expression nach transienter Transfektion von Plasmiden selbst in C3aR-negativen Zelllinien, wie z.B. HEK293 und CHO, erfolgt, scheint diese Erklärung am unwahrscheinlichsten.

Weder durch die Ergebnisse aus den Reporterassays noch durch die Ergebnisse aus den Bindungsexperimenten konnte bestimmt werden, ob es sich um direkt oder indirekt durch die Cytokine vermittelte Regulationen des hC3aR handelt. Im Hinblick auf diese Fragestellung wurde eine Northernanalyse durchgeführt. U937-Zellen wurden dabei mit Puffer (Negativkontrolle), GM-CSF, IL-2, TNF- α und IFN- γ stimuliert, und 1:15 h später wurde die Gesamt-RNA aus den Zellen präpariert. Im Northernblot konnte eine eindeutige Zunahme an hC3aR-mRNA nur nach Stimulation mit TNF- α detektiert werden. Daß schon 1:15 h nach TNF- α -Stimulation ein erhöhtes Signal gefunden wurde, spricht für eine direkte regulatorische Wirkung dieses Cytokins auf den hC3aR-Promotor. Um weitere Aussagen über die

regulatorische Wirkung von TNF- α und von anderen Cytokinen auf den hC3aR-Promotor machen zu können, müßten Zeitkinetiken (mehrere Minuten bis Tage) und auch Dosiswirkungskurven durchgeführt werden.

Erste Ergebnisse deuten darauf hin, daß mit TNF- α , neben IFN- γ , ein neuer Induktor der hC3aR-Expression identifiziert werden konnte. Im Rahmen dieser Arbeit konnten nur erste grundlegende Untersuchungen zur Regulation der C3aR-Expression durch Cytokine durchgeführt werden. Eine Weiterführung dieser Vorarbeiten könnte langfristig zum besseren Verständnis der Rolle des Anaphylatoxin C3a im Cytokinnetzwerk führen. Im folgenden könnte durch Promotorverkürzungen und -deletionen die Cytokin-responsiven Elemente im Promotorbereich des hC3aR eingegrenzt werden. Nach Abgleich mit den Daten aus der Sequenzanalyse könnten Transkriptionsfaktorbindungsstellen in den Cytokin-responsiven Elementen ermittelt und die Bindung dieser Faktoren im Electrophoretic Mobility Shift Assay (EMSA) untersucht werden. Nach der Identifizierung von Transkriptionsfaktoren wäre außerdem eine Untersuchung der vorgeschalteten Signaltransduktionswege denkbar.

5. Literatur

- [1] **Dias da Silva, W., Lepow, I. H. (1965)** Anaphylatoxin formation by purified human C1 esterase, *J. Immunol.* **95**: 1080
- [2] **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**: 921-946
- [3] **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**: 1027-1048
- [4] **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**: 371-386
- [5] **Hugli, T. E. (1975)** Human anaphylatoxins (C3a) from the third component of complement: Primary structure, *J. Biol. Chem.* **250**: 8293
- [6] **Fernandez, H. N., Hugli, T. E. (1978)** Primary structure analysis of the polypeptide portion of human C5a anaphylatoxin, *J. Biol. Chem.* **253**: 6955-6964
- [7] **Bitter-Suermann, D. (1988)** The anaphylatoxins. In: The complement system; Rother, K., Till, G. O., Springer-Verlag: 367-395
- [8] **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 and biologic activity, *Fed. Proc. Fed. Am. Soc. Exp. Biol.* **46**: 980
- [9] **Gerard, C., Chenoweth, D. E., Hugli, T. E. (1979)** Molecular aspects of the serum chemotactic factors, *J. Reticuloendothel. Soc.* **26**: 711-718
- [10] **Caporale, L. H., Tippett, P. S., Erickson, B. W., Hugli, T. E. (1980)** The active site of C3a anaphylatoxin, *J. Biol. Chem.* **255**: 10758
- [11] **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**: 1463-1468
- [12] **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**: 1389-1399

- [13] **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**: 9139
- [14] **Nettesheim, D. G., Rohinton, P. E., 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**: 5036
- [15] **Zuiderweg, E. R. P., Nettesheim, 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**: 172
- [16] **Federwisch, M., Wollmer, A., Emde, M., Stuhmer, 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**: 237-248
- [17] **Zhang, X., Boyar, W., Toth, M. J., Wennogle, L., Gonnella, N. C. (1997)** Structural definition of the C5a C terminus by two-dimensional nuclear magnetic resonance spectroscopy, *Proteins* **28**(2): 261-267
- [18] **Bodamer, G., Vogt, W. (1970)** Contraction of the guinea-pig ileum induced by anaphylatoxin independent of histamine release, *Int. Arch. Allergy. Appl. Immunol.* **39**: 648-657
- [19] **Bodamer, G., Vogt, W. (1970)** Beeinflussung der Capillarpermeabilität in der Meerschweinchenhaut durch Anaphylatoxin (AT), *Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol.* **266**: 255-266
- [20] **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**: 486-495
- [21] **Johnson, A. R., Hugli, T. E., Müller-Eberhard, H. J. (1975)** Release of histamine from rat mast cells by the complement peptides C3a and C5a, *Immunology* **28**: 1067-1080
- [22] **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**: 1506-1509
- [23] **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**: 147-157

- [24] **Goldstein, I. M., Weissmann, G. (1974)** Generation of C5-derived lysosomal enzyme-releasing activity (C5a) by lysates of leukocyte lysosomes, *J Immunol.* **113**: 1583-1588
- [25] **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.* **156**: 912-917
- [26] **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**: 2635-2640
- [27] **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**: 297-307
- [28] **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**: 109-115
- [29] **Morita, E., Schroder, J. M., Christophers, E. (1989)** Chemotactic responsiveness of eosinophils isolated from patients with inflammatory skin diseases, *J Dermatol.* **16**: 348-351
- [30] **Snyderman, R. (1985)** Regulatory mechanisms of a chemoattractant receptor on human polymorphonuclear leukocytes, *Rev. Infect. Dis.* **7**(3): 390-394
- [31] **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**: 691-696
- [32] **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**: 1693-1698
- [33] **Goldstein, I. M., Roos, D., Kaplan, H. B., Weissmann, G. (1975)** Complement and immunoglobulins stimulate superoxide production by human leukocytes independently of phagocytosis, *J Clin. Invest.* **56**: 1155-1163
- [34] **Benner, K. U., Schumacher, K. A., Classen, H. G. (1975)** Platelet aggregation induced by anaphylatoxin and its inhibition, *Arzneimittelforsch.* **25**: 1635-1638
- [35] **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**: 11274-11282

- [36] **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**: 6813-6817
- [37] **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**: 558-561
- [38] **Takafuji, S., Tadokoro, K., Ito, K., Dahinden, C. A. (1994)** Degranulation from human eosinophils stimulated with C3a and C5a, *Int. Arch. Allergy Immunol.* **104**: 27-29
- [39] **Elsner, J., Oppermann, M., Czech, W., Dobos, G., Schopf, E., Norgauer, J., Kapp, A. (1994)** C3a activates reactive oxygen radical species production and intracellular calcium transients in human eosinophils, *Eur. J. Immunol.* **24**: 518-522
- [40] **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**: 2119-2127
- [41] **Haeffner-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**: 794-799
- [42] **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 C3a desArg: regulation of TNF- alpha and IL-1 beta synthesis, *J. Immunol.* **156** : 3455-3460
- [43] **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): 1622-1628
- [44] **Morgan, E. L., Thoman, M. L., Hobbs, M. V., Weigle, W. O., Hugli, T. E. (1985)** Human C3a-mediated suppression of the immune response. II. Suppression of human in vitro polyclonal antibody responses occurs through the generation of nonspecific OKT8+ suppressor T cells, *Clin. Immunol Immunopathol.* **37**: 114-123
- [45] **Morgan, E. L., Thoman, M. L., Weigle, W. O., Hugli, T. E. (1983)** Anaphylatoxin-mediated regulation of the immune response. II. C5a-mediated enhancement of human humoral and T cell-mediated immune responses, *J Immunol* **130**: 1257-1261
- [46] **Gorski, J. P., Hugli, T. E., Müller-Eberhard, H. J. (1979)** C4a: the third anaphylatoxin of the human complement system, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **76**: 5299-5302

- [47] **Moon, K. E., Gorski, J. P., Hugli, T. E. (1981)** Complete primary structure of human C4a anaphylatoxin, *J Biol. Chem.* **256**: 8685-8692
- [48] **Meuer, S., Hugli, T. E., Andreatta, 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**: 263-273
- [49] **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**: 301-304
- [50] **Tsuruta, T., Yamamoto, T., Matsubara, S., Nagasawa, S., Tanase, S., Tanaka, J., Takagi, K., Kambara, T. (1993)** Novel function of C4a anaphylatoxin: release from monocytes of protein which inhibits monocyte chemotaxis, *Am. J. Pathol.* **142**: 1848
- [51] **Hugli, T. E., Kawahara, M. S., Unson, C. G., Molinar-Rode, R., Erickson, B. W. (1983)** The active site of human C4a anaphylatoxin, *Mol. Immunol.* **20**: 637
- [52] **Lienenklaus, S., Ames, R. S., Tornetta, M. A., Sarau, H. M., Foley, J. J., Crass, T., Sohns, B., Raffetseder, U., Grove, M., Holzer, 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): 2089-2093
- [53] **Didsbury, J. R., Uhing, R. J., Tomhave, E., Gerard, C., Gerard, N., Snyderman, R. (1991)** Receptor class desensitization of leukocyte chemoattractant receptors, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **88**: 11564-11568
- [54] **Bokisch, V. A., Müller-Eberhard, H. J. (1970)** Anaphylatoxin inactivator of human plasma: Its isolation and characterization as a carboxypeptidase; *J. Clin. Invest.* **49**: 2427-2436
- [55] **Mousli, M., Hugli, T. E., Landry, Y., Bronner, C. (1992)** A mechanism of action for anaphylatoxin C3a stimulation of mast cells, *J. Immunol.* **148**: 2456-2461
- [56] **Erdei, A., Andreev, S., Pecht, I. (1995)** Complement peptide C3a inhibits IgE-mediated triggering of rat mucosal mast cells, *Int. Immunol.* **7**(9): 1433-1439
- [57] **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**: 1543-1547
- [58] **Porcel, J. M., Vergani, D. (1992)** Complement and lupus: Old concepts and new directions, *Lupus* **1**: 343-349

- [59] **Hammerschmidt, D. E., Weaver, L. J., Hudson, L. D., Craddock, P. R., Jacobs, H. S. (1980)** Association of complement activation and elevated plasma-C5a with adult respiratory distress syndrome. Pathophysiological relevance and possible prognostic value, *Lancet* **1**: 947
- [60] **Fligiel, S. E. G., Johnson, K. J., Ward, P. A. (1988)** The role of complement in immune complex induced tissue injury. In: The complement system; Rother, K., Till, G. O., Springer-Verlag: 367-395
- [61] **Christophers, E., Henseler, T. (1989)** Patient subgroups and the inflammatory pattern in psoriasis, *Acta Derm. Venereol. Suppl. Stockh.* **151**: 88-92
- [62] **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**: 1-6
- [63] **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): 661-670
- [64] **Weisman, H. F., Bartow, T., Leppo, M. K., Marsh, H. C. J., 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): 146-151
- [65] **Höpken, U. E., Lu, B., Gerard, N. P., Gerard, C. (1996)** The C5a chemoattractant receptor mediates mucosal defence to infection, *Nature* **383**: 86-89
- [66] **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**: 8144-8148
- [67] **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**: 635-640
- [68] **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): 266-274
- [69] **Gerard, C., Gerard, N. P. (1991)** The chemotactic receptor for human C5a anaphylatoxin, *Nature* **349**: 614
- [70] **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**: 2993

- [71] **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, *Biochem. et Biophys. Acta* **1305**: 39-43
- [72] **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**: 1944-1950
- [73] **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**: 20231-20234
- [74] **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**: 1103-1109
- [75] **Chenoweth, D. E., Erickson, B. W., Hugli, T. E. (1979)** Human C5a-related synthetic peptides as neutrophil chemotactic factors, *Biochem. Biophys. Res. Comm.* **86**: 227-234
- [76] **Gerard, C., Chenoweth, D. E., Hugli, T. E. (1979)** Molecular aspects of the serum chemotactic factors, *J. Reticuloendothel. Soc.* **26**: 711-718
- [77] **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 des-Arg-74, *J. Biol. Chem.* **260**: 2613-2616
- [78] **Damerau, B., Zimmermann, B., Czorniak, K., Wüstefeld, H., Vogt, W. (1986)** Role of N-terminal regions of hog C3a, C5a and C5adesArg in their biological activities, *Mol. Immunol.* **23**: 433-440
- [79] **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 and biologic activity, *Fed. Proc. Fed. Am. Soc. Exp. Biol.* **46**: 980
- [80] **Mollison, K. W., Mandrecki, 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**: 292-296
- [81] **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**: 897-904

- [82] **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**: 282-287
- [83] **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**: 14446-14450
- [84] **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**: 16625-16629
- [85] **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**: 15966-15969
- [86] **Ta-Hsiang, C., 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**: 9721-9728
- [87] **Hawlich, H., Frank, R., Hennecke, M., Baensch, M., Sohns, B., Arseniev, L., Bautsch, W., Klos, A., Köhl, J. (1998)** Site directed C3a receptor antibodies from phage display libraries, *J. Immunol.* **160**: 2947-2958
- [88] **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**: 8367-8370
- [89] **Sun, J., Ember, J. A., Chao, T., Fukuoka, R., Hugli, T. E. (1999)** Identification of ligand effector binding sites in transmembrane regions of the human G protein-coupled C3a receptor, *Protein Science* **8**: 2304-2311
- [90] **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, *Immunopharmacology* **2**: 201-219
- [91] **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**: 151-159
- [92] **Chenoweth, D. E., Hugli, T. E. (1978)** Demonstration of specific C5a receptor on intact human polynuclear leukocytes, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **75**: 3943-3947
- [93] **Kurimoto, Y., de Weck, A. L., Dahinden, C. A. (1989)** Interleukin 3-dependent mediator release in basophiles triggered by C5a, *J. Exp. Med.* **170**: 467-479

- [94] **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**: 1760-1766
- [95] **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**: 1861-1869
- [96] **Gasque, P., Chan, P., Fontaine, M., Ischenko, A., Lamacz, M., Götze, O., Morgan, B. P. (1995)** Identification and characterization of the complement C5a anaphylatoxin receptor of human astrocytes, *J. Immunol.* **155**: 4882-4889
- [97] **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**: 31-41
- [98] **Schieferdecker, H. L., Rothermel, E., Timmermann, A., Götze, O., Jungermann, K. (1997)** Anaphylatoxin C5a receptor mRNA is strongly expressed in Kupffer and stellate cells and weakly in sinusoidal endothelial cells but not in hepatocytes of normal rat liver, *FEBS lett.* **406**: 305-311
- [99] **Braun, M., Davis III, A. E. (1998)** Cultured human mesangial cells express the C5a receptor, *J. Immunol.* **54**: 1542-1549
- [100] **Wilmer, W. A., Kaumaya, P. T., Ember, J. A. Cosio, F. G. (1998)** Receptors for the anaphylatoxin C5a (CD88) on human mesangial cells, *J. Immunol.* **160**: 5646-5652
- [101] **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**: 4018-4023
- [102] **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**: 6510-6517
- [103] **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**: 83

- [104] **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**: 3543-3554
- [105] **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): 397-402
- [106] **Ischenko, A. M., Sayah, S., Patte, C., Andreev, S., Gasque, P., Schouft, M., Vaudry, H., Fontaine, M. (1998)** Expression of a functional anaphylatoxin C3a receptor by astrocytes, *J. Neurochem.* **71**: 2487-2496
- [107] **Sayah, S., Ischenko, A. M., Zhakhov, A., Bonnard, A., 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**: 2426-2436
- [108] **Martin, U., Bock, D., Arseniev, L., Tornetta, M. A., Ames, R. S., Bautsch, W., Köhl, J., Klos, A. (1997)** The human C3a receptor is expressed on neutrophils and monocytes, but not on B and T lymphocytes, *J. Exp. Med.* **186**: 199-207
- [109] **Werfel, T., Kirchhoff, K., Wittmann, M., Kapp, A., Begemann, G., Götze, O., Zwirner, J. (1999)** Human T lymphocytes express the C3a receptor, *Immunobiology* **200**: 641-642
- [110] **Fischer, W. H., Hugli, T. E. (1997)** Regulation of B cell functions by C3a and C3a(desArg): suppression of TNF- α , IL-6, and the polyclonal immune response, *J. Immunol.* **159**: 4276
- [111] **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**: 5574-5581
- [112] **Crass, T. (1999)** Die Anaphylatoxine C3a und C5a und ihre zellulären Rezeptoren: Molekulare Untersuchungen zur Ligand/Rezeptor-Interaktion, Dissertation
- [113] **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): 5277-5282
- [114] **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): 64-72

- [115] **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**: 137-148
- [116] **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**: 663-668
- [117] **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**: 2977-2984
- [118] **Paral, D., Sohns, B., Crass, T., Grove, M., Köhl, J., Klos, A., Bautsch, W. (1998)** Genomic organization of the human C3a receptor, *Eur. J. Immunol.* **28**: 2417-2423
- [119] **Saiki, R. K., Gelfand, D. H., Stoffel, S., Scharf, S. J., Higuchi, R., Horn, G. T., Mullis, K. B., Ehrlich, H. A. (1988)** Primer directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase, *Science* **239**: 487-492
- [120] **Kirby, K. S. (1957)** A new method for the isolation of deoxyribonucleic acids: evidence on the nature of bonds between deoxyribonucleic acid and protein, *Biochem. J.* **66**: 495-504
- [121] **Mamur, J. (1961)** A procedure for the isolation of deoxyribonucleic acid from microorganisms, *J. Mol. Biol.* **3**: 208-218
- [122] **Calvin, N. M., Hanawalt, P. C. (1988)** High-efficiency transformation of bacterial cells by electroporation, *J. Bacteriol.* **170**: 2796-2801
- [123] **Akada, R. (1994)** Quick-check method to test the size of Escherichia coli plasmids, *Biotechniques* **17**(1): 58
- [124] **Sanger, F., Nicklen, S., Coulson, A. R. (1977)** DNA sequencing with chain terminating inhibitors, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **74**: 5463-5467
- [125] **Thomas, P. (1980)** Hybridization of denatured RNA and small DNA fragments transferred to nitrocellulose, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **7**:5201-5205
- [126] **Laemmli, U. K. (1970)** Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4, *Nature* **227**: 680-685
- [127] **Bradford, M. (1976)** A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein dry binding, *Anal. Biochem.* **72**: 248-254

- [128] **Frank, R. (1992)** Spot-synthesis: An easy technique for the positionally addressable, parallel chemical synthesis on a membrane support, *Tetrahedron* **48**: 9217
- [129] **Frank, R., Overwin, H. (1996)** SPOT synthesis: epitop analysis with arrays of synthetic peptides prepared on cellulose membranes. In: *Methods in Molecular Biology*; Morris, G. E., Human Press: 149
- [130] **Oppermann, M., Raedt, U., Hebell, T., Schmidt, B., Zimmermann, B., Götze, O. (1993)** Probing the human receptor for C5a anaphylatoxin with site- directed antibodies. Identification of a potential ligand binding site on the NH₂-terminal domain, *J. Immunol.* **151**: 3785-3794
- [131] **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**: 753-758
- [132] **Werfel, T., Zwirner, J., Oppermann, M., Sieber, A., Begemann, G., Drommer, W., Kapp, A., Götze, O. (1996)** CD88 antibodies specifically bind to C5aR on dermal CD117+ and CD14+ cells and react with a desmosomal antigen in human skin, *J. Immunol.* **157**: 1729-1738
- [133] **Zwirner, J., Fayyazi, A., Götze, O. (1999)** Expression of the anaphylatoxin C5a receptor in non-myeloid cells, *Mol. Immunol.* **36**: 877-884
- [134] **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**: 38-45
- [135] **Yarden, Y., Schlessinger, J. (1987)** Self-phosphorylation of epidermal growth factor: evidence for a intermolecular allosteric activation, *Biochemistry* **26**: 1434-1442
- [136] **Yarden, Y., Schlessinger, J. (1987)** Epidermal growth factor induces rapid, reversible aggregation of the purified epidermal growth factor receptor, *Biochemistry* **26**: 1443-1451
- [137] **Greenlund, A. C., Schreiber, R. D., Goeddel, D. V., Pennica, D. (1993)** *J. Biol. Chem.* **268**: 18103-18110
- [138] **Herbert, T. E., Moffett, S., Morello, J., Loisel, T. P., Bichet, D. G., Barret, C., Bouvier, M. (1996)** A peptide derived from a β_2 -adrenergic receptor transmembrane domain inhibits both receptor dimerization and activation, *J. Biol. Chem.* **271**: 16384-16392
- [139] **Romano, C., Yang, W., O'Malley, K. L. (1996)** Metabotropic glutamate receptor 5 is a disulfide-linked dimer, *J. Biol. Chem.* **271**: 28612-28616

- [140] **Gasque, P., Singhrao, S. K., Neal, J. W., Morgan, P. B. (1998)** Expression of C3aR in man and mouse: predominance in adrenal gland, skin and lung, *Mol. Immunol.* **35**: 379
- [141] **Kolmer, M., Alho, H., Costa, E., Pani, L. (1993)** Cloning and tissue-specific functional characterization of the promoter of the rat diazepam binding inhibitor, a peptide with multiple biological actions, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **90**(18): 8436-8443
- [142] **Katsel, P. L., Greenstein, R. J. (1997)** Differential cholecystokinin brain/gut transcription initiation in the rat: evidence for brain-specific start sites, *DNA Cell Biol.* **16**(8): 1013-1021
- [143] **Katsuyama, M., Sugimoto, Y., Okano, K., Segi, E., Ikegami, R., Negishi, M., Ichikawa, A. (1998)** Characterization of the gene for the mouse prostaglandin E receptor subtype EP2: tissue-specific initiation of transcription in the macrophage and the uterus, *Biochem. J.* **15**: 1115-1121
- [144] **Bucher, P. (1990)** Weight matrix descriptions of four eukaryotic RNA polymerase II promoter elements derived from 502 unrelated promoter sequences, *J. Mol. Biol.* **212**(4): 563-578
- [145] **Smale, S. T. (1997)** Transcription initiation from TATA-less promoters within eukaryotic protein-coding genes, *Biochem. et Biophys. Acta* **1351**: 73-88
- [146] **McCuaig, K. A., Clarke, J. C., White, J. H. (1994)** Molecular cloning of the gene encoding the mouse parathyroid hormone/parathyroid hormone-related peptide receptor, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **91**: 5051-5055
- [147] **Augustin, L. B., Felsheim, R. F., Min, B. H., Fuchs, S. M., Fuchs, J. A., Loh, H. H. (1995)** Genomic structure of the mouse δ opioid receptor gene, *Biochem. Biophys. Res. Comm.* **207**: 111-119
- [148] **Murasawa, S., Matsubara, H., Kijima, K., Maruyama, K., Mori, Y., Inada, M. (1995)** Structure of the rat V1a vasopressin receptor gene and characterization of its promoter region and complete cDNA sequence of the 3'-end, *J. Biol. Chem.* **270**: 20042-20050
- [149] **Parks, C. L., Shenk, T. (1996)** The serotonin 1a receptor gene contains a TATA-less promoter that responds to MAZ and Sp1, *J. Biol. Chem.* **271**: 4417-4430
- [150] **Tsai-Morris, C. H., Buczko, E., Geng, Y., Gamboa-Pinto, A., Dufau, M. L. (1996)** The genomic structure of the rat corticotropin releasing factor receptor, *J. Biol. Chem.* **271**: 14519-14525
- [151] **DeBacker, M. D., Loonen, I., Verhasselt, P., Neefs, J., Luyten, W. H. (1998)** Structure of the human histamine H1 receptor gene, *Biochem. J.* **335**: 663-670

- [152] **Kozak, M. (1986)** Point mutations define a sequence flanking AUG initiation codon that modulates translation by eukaryotic ribosomes, *Cell* **44**: 283-292
- [153] **Grattage, L. P., McKenzie, I. F., Hogarth, P. M. (1992)** Effects of PMA, cytokines and dexamethasone on the expression of cell surface Fc receptors and mRNA in U937 cells, *Immunol. Cell. Biol.* **70**: 97-105
- [154] **Barabitskaja, Z. D., Casareto, L., Romerio, F., Secchiero, P., Reitz, M. S. Jr., Gallo, R. C., Weichold, F. F. (1999)** Recombinant IFN-alpha (2b) increases the expression of apoptosis receptor CD95 and chemokine receptors CCR1 and CCR3 in monocytoid cells, *J. Immunol.* **163**(6): 3169-3175
- [155] **Nasuhara, Y., Adcock, I. M., Catley, M., Barnes, P. J., Newton, R. (1999)** Differential IkappaB kinase activation and IkappaBalpha degradation by interleukin-1beta and tumor necrosis factor-alpha in human U937 monocytic cells. Evidence for additional regulatory steps in kappaB-dependent transcription, *J. Biol. Chem.* **274**(28): 19965-19972
- [156] **Tanaka, M., Kishi, T. (1990)** Induction of tissue factor by interleukin-2 in akute myelogenous leukemia (AML) cells, *Growth factors* **4**(1): 1-8
- [157] **Biswas, P., Delfanti, F., Bernasconi, S., Mengozzi, M., Cota, M., Polentarutti, N., Mantovani, A., Lazzarin, A., Sozzani, S., Poli, G. (1998)** Interleukin-6 induces monocyte chemotactic protein-1 in peripheral blood mononuclear cells and in the U937 cell line, *Blood* **91**(1): 258-265
- [158] **Cooke, D. W., Lane, M. D. (1999)** Transcription factor NF1 mediates repression of the GLUT4 promoter by cyclic-AMP, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **260**(3): 600-604
- [159] **Duncan, M. R., Frazier, K. S., Abramson, S., Williams, S., Klapper, H., Huang, X., Grotendorst, G. R. (1999)** Connective tissue growth factor mediates transforming growth factor beta-induced collagen synthesis: down-regulation by cAMP, *FASEB J.* **13**: 1774-17786
- [160] **Nakayama, H., Ueno, S., Ikeuchi, T., Hatanaka, H. (2000)** Regulation of alpha3 nicotinic acetylcholine receptor subunit mRNA levels by nerve growth factor and cyclic AMP in PC12 cells, *J. Neurochem.* **74**(4): 1346-1354

6. Anhang

6.1 Sequenz der 5'-UTR des hC3aR

			ACCAGCCTGG	CCAGCATGGT	GAAACCCCGT	-2341
CTCTACTAAA	AATACAAAA	ATTAGCCAGG	TGTGGTTGTG	GGCACCTGTA	ATCCCAGCTA	-2281
CTTGGGAGGC	TGAGGCAGGA	GAATCGATTG	AAGCCAGGAG	GCAGAAGTTG	CAGTGAGCCG	-2221
AGATCGCACC	ATTGCACTCC	AACCTGGGTG	ACAAGAGCAA	AACTCTGTCT	CAGGAAAAAA	-2161
AAAAAAAAAA	GTGTAATTTG	GGCCAAGATG	TCCTGATATA	AAAAGATAAG	TGGAAAAAAT	-2101
AGAACAAAAC	AATATGCGTA	GTAGAATATG	CGTATTTAAG	AGAGAGACTA	CATCTGGAAA	-2041
GTGGAAAGAG	GATAGCTAGG	TGTTTAGGAA	ATTTTGGTTT	TTACTTTAAT	CTTCTCATAT	-1981
TTAATTTTTA	CCATGGGGAA	TTAATTGTTT	TTATAAAATA	TATTTTAATT	AGATATATAT	-1921
GTACATATAT	GATAATCCTA	CATTTTATAT	GCTTTCTGGA	TACCTATATT	ATTCAATATT	-1861
TCCAAATATT	GGAGGAAAGA	AAACCCAAAA	TAATCAATAG	GATTATATGT	ACTAACATGG	-1801
AAGTATGTTT	TGATATATTG	TTAAGTAAAA	AAGCAAGACA	TAAAATCACA	CATAAATTAC	-1741
CATCCCATTT	ATGTTCAAAA	CTACCTTTTA	GAAAAATGTG	TGTTAGGCCG	GGTGGGGTGG	-1681
CTCACACCGG	TAATCACAGC	ACTTTGGGAG	GCTGAGGCAG	GTGGATCACC	TGAGCTCAGG	-1621
AGTTCAAGAC	CAGCCTGCC	AACATGGCAA	AACCCCATCT	CTACCGAAAA	AATATAAAAA	-1561
TTAGCCGGCT	GTGGTGGCAC	ATGCCTGTAG	TCCCAGCTAC	TAAGGAGGAT	GAGGTGGGAG	-1501
AATTGCTTGA	ACCTAGGAGG	CAGAGGTTGC	AGTGAGCCAA	GATGGTGGCA	CTGCACTCCA	-1441
GCCTGGGCGA	CAGACTGAGG	CCCTGTCTCC	AACAAACAAA	ATGTGTGCTA	TATTCAGAAA	-1381
AAAAAAAAAAT	CAGGAAGAAT	GAACACTAAC	CTATTAAAAA	TAGTTACTTC	GAGCAGTGGA	-1321
ATTGAAAAGA	AAATCTTTCA	TTTTTTTTTAC	CCATTATAAT	TCTGTATTAT	TTCAATTTAT	-1261
CTCTTCTAGA	ACAAAGTATG	TTCTATTTTT	GTAATTAGAT	GATGACAATG	GAAATAAACT	-1201
AATAAATACT	ACTCAACTCT	TGGCATTTTTT	CTTTTGATCT	TTCTGCCTCA	AAAATATTCC	-1141
GTGGTGACTT	GACTGCAAAC	AAGCAGAGGA	GCAGATATTA	TGGTTTGGAC	AAGTTGATTA	-1081
ATATAGACTG	AAGCCTATAT	CACAGACAAC	AGTGTTCAAA	TACATTTGAC	CCAAATAAAC	-1021
TTTATTTTTAT	ATGCATATAT	CTAAAAGAGT	ATATGCATAT	ATCTAAAAGA	ATAATATAAG	-961
AATTATTTAC	AGCATAGTAT	TCATTAAGCA	GGAATTACCT	TCAGTCTTCT	GTAATCCTTC	-901
CTGATGAAAC	AGCACCTAGA	CTCCAGCCTG	TTCTCCAGTG	ACCACTAAGC	TCTCCCACCT	-841
ACCTCCCCAC	CTACCTGCC	TCTACCACCT	ACCTGCCTTT	GACTAGGCTC	CACTTATAGC	-781
CTAAGCAGCT	TTTCACCTTT	TTCTGTCTCT	AGAATTCCTA	CAGGTACTTA	ATTAAGTACT	-721
TGCCCACATC	TTATTTCTAT	CTTAAGACTC	TCCTAGATTG	CCCTGGGTTA	TATATACCCC	-661
TGGCTAGAGT	GTTCTATTAT	TTTACTTCTA	TTGTTACTTC	TATTATTATA	GCCTAGTTTG	-601
TATTACAGCT	TTGTGTGTAT	ATGTATGGGT	ACATATTCCC	ACTCGATTGT	GAATCTCTGG	-541
AGATTAGAAT	ATAGCTTAAT	TCATCCTGAT	TTTGACATGG	CACCGTTTTT	CACATATATC	-481
AAGCATTTCA	GATATGTTAT	TTGAGATTAA	TTAAATGAGT	TTATTCAGGT	CATTCCTCCC	-421
CAACCACTCC	CCACTCCAAC	CCTCACATCT	CATAGAGTCT	TTTTTTTTTTC	ATTTCTAAAC	-361
AAAACCTATA	AAGTTGAACC	CTATGTACAG	AGGTACCCTC	TCTCTAACCA	TTCTCTGTGT	-301
GCTGCAGAAA	ATGTCTCAGG	ATTATAAACT	CCTACTTCTG	TTTTCTGCT	TTGCCTTTCT	-241
AAGCCATTTA	GAAATGACTC	ACTTTGAAAC	TCTTCCTGTG	AGGTCAGATA	GTGGTCTAGA	-181
GCATAAGACT	TAACTTATTG	CCGGAAACAC	GAGAGAGAAC	AGAAGAAGAG	AAAGCTCAGC	-121
AAATTTTCTT	GCCATACTTC	ATGACTTCAC	TGTGGCTAAG	TGTGGGGACC	AGACAGGACT	-61
CGTGGAGACA	TCCAGGTGCT	GAAGCCTTCA	GCTACTGTCT	CAGTTTTTTTG	<u>GTAAGAAAAC</u>	
	ca.6 kb Intron.....	TTTTTGCG	AAGTTTAGCA		-1
			ATGGCGTCTT			

+1

Der Übergang zum ca. 6 kb Intron ist unterstrichen dargestellt und das ATG-Startcodon fett.

6.2 Verwendete Oligonukleotid-Primer

Alle Primer, außer AP1, 5'-RACE G3PDH, λ TriplEx 5' LD-Insert Screening Amplimer und λ TriplEx 3' LD-Insert Screening Amplimer, wurden bei MWG Biotech synthetisiert, entsalzt, entschützt, PSF oder HPLC aufgereinigt und zum Transport lyophilisiert.

Primer	Sequenz	Beschreibung
AP1	5'-CCATCCTAATACGACTCACTAT AGGGC-3'	Adaptor Primer 1 (Marathon-Ready cDNA, Clontech), in 5'-RACE mit 5'-RACE G3PDH und BSR7
BSS1	5'-Biotin- GAGTTTATTCAGGTCATTCC-3'	5'-UTR des hC3aR; Senseprimer; Pos. – 444 bis – 425; Klonierung des 308 bp-Fragments in pSEAP2-Enhancer mit BSR11; NPA
BSS2	5'-ACGTTTCACGCGTGCTAGCTCCAA <i>MluI</i> <i>NheI</i> CAAACAAAATGTGTGC-3'	5'-UTR des hC3aR; Senseprimer; Pos. – 1414 bis – 1393; Klonierung des 1396 bp-Fragments in pSEAP2-Enhancer mit BSR11
BSS3	5'-ACGTTTCACGCGTGCTAGCCCAGC <i>MluI</i> <i>NheI</i> TACTAAGGAGGAT-3'	5'-UTR des hC3aR; Senseprimer; Pos. – 1529 bis – 1510; Klonierung des 1511 bp-Fragments in pSEAP2-Enhancer mit BSR11 und des 1318 bp-Fragments mit BSR6
BSS4	5'-CTCAGGATTATAAACTCCTAC-3'	5'-UTR des hC3aR; Senseprimer; Pos. – 286 bis – 267; Eingrenzung des Transkriptionsstarts
BSS5	5'-CAGAAGAAGAGAAAGCTCAG-3'	5'-UTR des hC3aR; Senseprimer; Pos. – 141 bis – 121; Eingrenzung des Transkriptionsstarts
BSS6	5'-CTTCATGACTTCACTGTGGC-3'	5'-UTR des hC3aR; Senseprimer; Pos. – 104 bis – 85; Eingrenzung des Transkriptionsstarts
BSS7	5'-GACAGGACTCGTGGAGAC-3'	5'-UTR des hC3aR; Senseprimer; Pos. – 69 bis – 52
BSS8	5'-GAAACTCTTCTGTGAGGTC-3'	5'-UTR des hC3aR; Senseprimer; Pos. – 215 bis – 196; Eingrenzung des Transkriptionsstarts

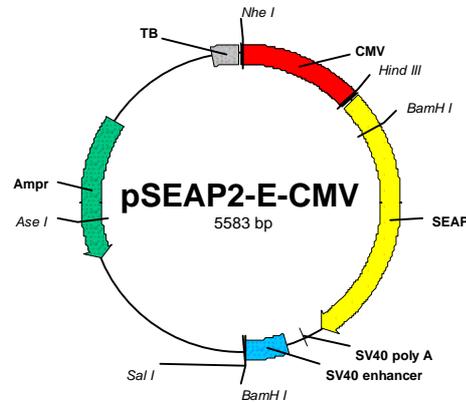
BSS9	5'-GTGGTCTAGAGCATAAGAC-3'	5'-UTR des hC3aR; Senseprimer; Pos. – 190 bis – 172; Eingrenzung des Transkriptionsstarts
BSS10	5'-CGGAAACACGAGAGAGAAC-3'	5'-UTR des hC3aR; Senseprimer; Pos. – 159 bis – 141; Eingrenzung des Transkriptionsstarts
BSS11	5'-AAACACGAGAGAGAACAG-3'	5'-UTR des hC3aR; Senseprimer; Pos. – 156 bis – 139
BSS12	5'-ACGTTC <u>ACGCGTGCTAGCGTACA</u> <i>MluI</i> <i>NheI</i> TATATGATAATCCTAC-3'	5'-UTR des hC3aR; Senseprimer; Pos. – 1920 bis – 1900; Klonierung des 1903 bp-Fragments in pSEAP2-Enhancer mit BSR11
BSS13	5'-ACGTCC <u>ACGCGTGCTAGCCTCAG</u> <i>MluI</i> <i>NheI</i> GATTATAAACTCCTAC-3'	5'-UTR des hC3aR; Senseprimer; Pos. – 286 bis – 267; Klonierung des 125 bp-Fragment in pSEAP2-Enhancer mit BSR14 und des 267 bp-Fragments mit BSR11
BSS14	5'-ACGTTC <u>ACGCGTGCTAGCGTACT</u> <i>MluI</i> <i>NheI</i> AACATGGAAGTATG-3'	5'-UTR des hC3aR; Senseprimer; Pos. – 1812 bis – 1794; Klonierung des 1795 bp-Fragments in pSEAP2-Enhancer mit BSR11
BSS15	5'-ACGTTC <u>ACGCGTGCTAGCAAATG</u> <i>MluI</i> <i>NheI</i> TGTGTTAGGCCGG-3'	5'-UTR des hC3aR; Senseprimer; Pos. – 1707 bis – 1689; Klonierung des 1690 bp-Fragments in pSEAP2-Enhancer mit BSR11
BSS16	5'-ACGTTC <u>ACGCGTGCTAGCCAGGA</u> <i>MluI</i> <i>NheI</i> GTTCAAGACCAGC-3'	5'-UTR des hC3aR; Senseprimer; Pos. – 1626 bis – 1607; Klonierung des 1607 bp-Fragments in pSEAP2-Enhancer mit BSR11
BSS17	5'-ACGTTC <u>ACGCGTGCTAGCCCAGC</u> <i>MluI</i> <i>NheI</i> ATGGTGAAACCCC-3'	5'-UTR des hC3aR; Senseprimer; Pos. – 2359 bis – 2342; Klonierung des 2342 bp-Fragments in pSEAP2-Enhancer mit BSR11
BSS19	5'-ACGTCC <u>GGTACCCCAGCTACTA</u> <i>KpnI</i> AGGAGGATG-3'	5'-UTR des hC3aR; Senseprimer; Pos. – 1529 bis – 1510; Klonierung des potentiell positiv regulierenden Elements in pSEAP2-E308 mit BSR19

BSR2	5'-GCTGAGCTTTCTCTTCTTC-3'	5'-UTR des hC3aR; Reversprimer; Pos. – 122 bis – 139; Sequenzierung der 5'-UTR
BSR6	5'-GTCCTGTCTGGTCCCCACACTT AG-3'	5'-UTR des hC3aR; Reversprimer; Pos. – 62 bis – 85; Klonierung des 1318 bp-Fragments in pSEAP2-Enhancer mit BSS3; NPA
BSR7	5'-GCCACGAGGGGTGTTGGCACT TG-3'	hC3aR-Reversprimer; Pos. 1004 bis 978; in 5'-RACE mit AP1
BSR8	5'-CCACTATCTGACCTCACAG-3'	5'-UTR des hC3aR; Reversprimer; Pos. – 187 bis – 205; Sequenzierung der 5'-UTR
BSR9	5'-GTAGAGGGCAGGTAGGTG-3'	5'-UTR des hC3aR; Reversprimer; Pos. – 816 bis – 833; Sequenzierung der 5'-UTR
BSR11	5'-ACGTTCTCGCGAAGCTTCTGAGA <i>NruI HindIII</i> CAGTAGCTGAAGGC-3'	5'-UTR des hC3aR; Reversprimer; Pos. – 18 bis – 37; Klonierungen in pSEAP2-Enhancer
BSR12	5'-CATCCTCCTTAGTAGCTGG-3'	5'-UTR des hC3aR; Reversprimer; Pos. – 1510 bis – 1529; Sequenzierung der 5'-UTR
BSR13	5'-TCACTATTAATTCCACTATG-3'	5'-UTR d. hC3aR; Reversprimer im Intron
BSR14	5'- ACGTTCTCGCGAAGCTTCAATAAG <i>NruI HindIII</i> TTAAGTCTTATGC-3'	5'-UTR des hC3aR; Reversprimer; Pos. – 162 bis – 180; Klonierung des 125 bp-Fragments in pSEAP2-Enhancer mit BSS13
BSR15	5'-CATACTTCCATGTTAGTAC-3'	5'-UTR des hC3aR; Reversprimer; Pos. – 1794 bis – 1812; Sequenzierung der 5'-UTR
BSR17	5'-CTTCAGCACCTGGATGTCTC-3'	5'-UTR des hC3aR; Reversprimer; Pos. – 37 bis – 56
BSR19	5'-ACGTTCCGGTACCGCACACATTTT <i>KpnI</i> GTTTGTGG-3'	5'-UTR des hC3aR; Reversprimer; Pos. – 1393 bis – 1412; Klonierung des potentiell positiv regulierenden Elements in pSEAP2-E308 mit BSS19
λTriplEx 5' LD-Insert Screening Amplimer	5'-CTCGGGAAGCGCGCCATTGTGT TGG-3'	λTriplEx-Senseprimer; zur Sequenzierung des Insert
λTriplEx 3' LD-Insert Screening Amplimer	5'-ATACGACTCACTATAGGG-3'	λTriplEx-Reversprimer; zur Sequenzierung des Inserts

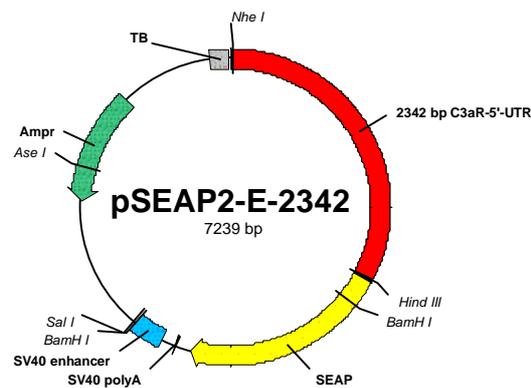
5'-RACE G3PDH	5'-TCCACCACCTGTTGCTGTAG-3'	G3PDH-Positivkontrollprimer (Marathon-Ready cDNA, Clontech); in 5'-RACE mit AP1
TC1	5'-GGCATAGA <u>AATTC</u> GGCTACAAATT <i>EcoRI</i> TGGTCTC-3'	hC3aR-Senseprimer; 2. EL: Pos. 517 bis 534; zur Überprüfung des Inserts der λ TriplEx-Phagen
TC2	5'-GGCATAG <u>TCGACTCATT</u> AGGGT <i>SalI</i> Stopp Stopp GTTGGCACTTGATC-3'	hC3aR-Reversprimer; 2. EL: Pos. 996 bis 979; zur Überprüfung des Inserts der λ TriplEx-Phagen
TC8	5'-CTGCATCTTCAGGCCAGC-3'	hC3aR-Reversprimer; Anfangsbereich der 1. intrazellulären Schlaufe; Pos. 159 bis 142; Eingrenzung des Transkriptionsstarts
TC36	5'-CGTAA <u>AAGCTTCGAA</u> ACGGCGTCT <i>HindIII BstBI</i> TTCTCT-3'	hC3aR-Senseprimer; Pos. 1 bis 15; Generierung eines Positivkontrollplasmids für die Reverse Transkription
TC37	5'-CCATGAATTCGCGAAGAGGCAG <i>EcoRI NruI</i> CAGAGGAG-3'	hC3aR-Reversprimer; Pos. 220 bis 204; Generierung eines Positivkontrollplasmids für die Reverse Transkription
VE6	5'-CGCAACTGTTGGGAAGGG-3'	pBluescript II KS- -Primer, Pos. 482 bis 499 im lacZ
VE8	5'-CGAACGCGTGCTAGCGATATACG <i>MluI NheI</i> CGTTGAC-3'	pCDM8-Senseprimer; Pos. 1530 bis 1544; Klonierung des CMV-Promotors mit VE9 in pSEAP2-Enhancer
VE9	5'-CGAGGGATCTCTAGAAGC-3'	pCDM8-Reversprimer; Pos. 2216 bis 2200; Klonierung des CMV-Promotors mit VE8 in pSEAP2-Enhancer
VE10	5'-CTAGCAAAATAGGCTGTCCC-3'	Senseprimer für pSEAP2-Vektoren; 5' von der MCS; Pos. 4864 bis 4883 in pSEAP2-Enhancer
VE11	5'-CCTCGGCTGCCTCGCGTCC-3'	Reversprimer für pSEAP2-Vektoren; 3' von der MCS; Pos. 184 bis 164 in pSEAP2-Enhancer

Schnittstellen für Restriktionsenzyme sind unterstrichen und Stoppcodons fett dargestellt.

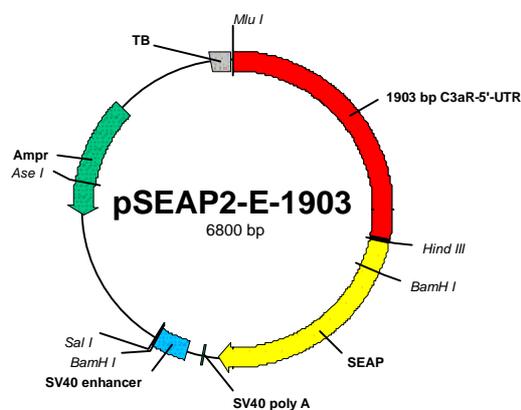
6.3 Generierte Plasmide



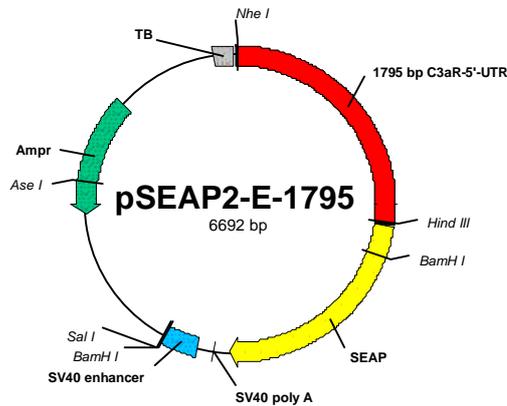
pSEAP2-E-CMV: 687 bp-Bereich aus pCDM8, der den CMV-Promotor beinhaltet, mit VE8 und VE9 amplifiziert. Über *NheI* und *HindIII* in pSEAP2-Enhancer kloniert.



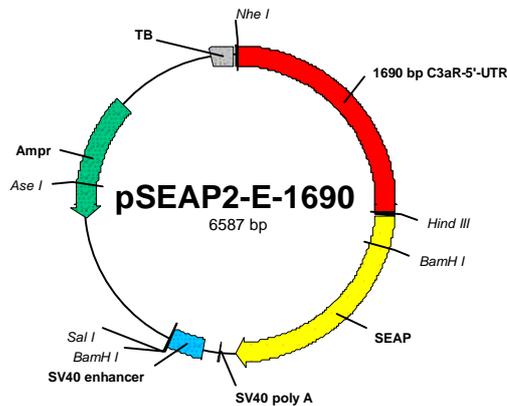
pSEAP2-E-2342: 2342 bp-5'-UTR des hC3aR mit BSS17 und BSR11 aus pDP1 amplifiziert. Über *NheI* und *HindIII* in pSEAP2-Enhancer kloniert.



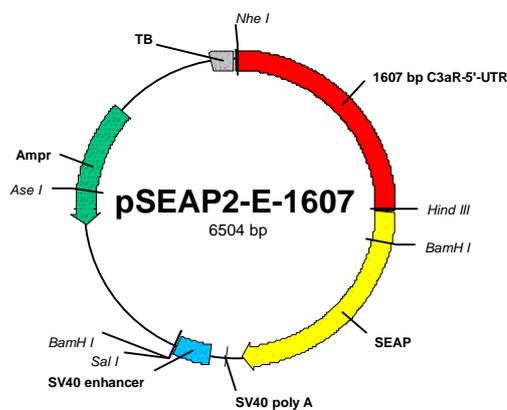
pSEAP2-E-1903: 1903 bp-5'-UTR des hC3aR mit BSS12 und BSR11 aus pDP1 amplifiziert. Über *MluI* und *HindIII* in pSEAP2-Enhancer kloniert.



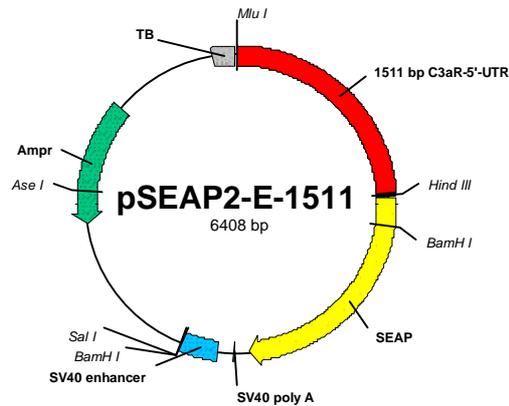
pSEAP2-E-1795: 1795 bp-5'-UTR des hC3aR mit BSS14 und BSR11 aus pDP1 amplifiziert. Über *NheI* und *HindIII* in pSEAP2-Enhancer kloniert.



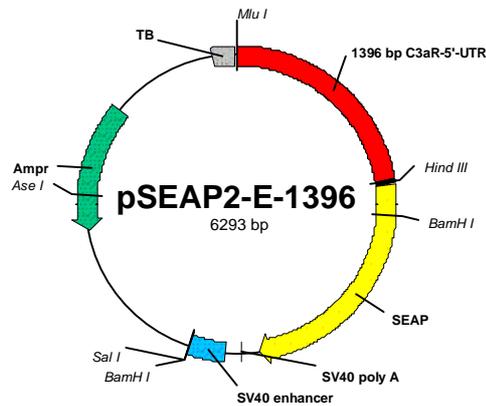
pSEAP2-E-1690: 1690 bp-5'-UTR des hC3aR mit BSS15 und BSR11 aus pDP1 amplifiziert. Über *NheI* und *HindIII* in pSEAP2-Enhancer kloniert.



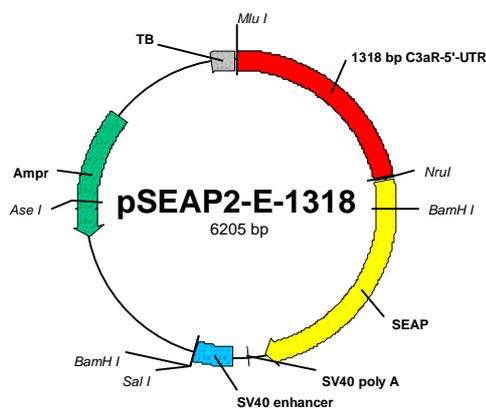
pSEAP2-E-1607: 1607 bp-5'-UTR des hC3aR mit BSS16 und BSR11 aus pDP1 amplifiziert. Über *NheI* und *HindIII* in pSEAP2-Enhancer kloniert.



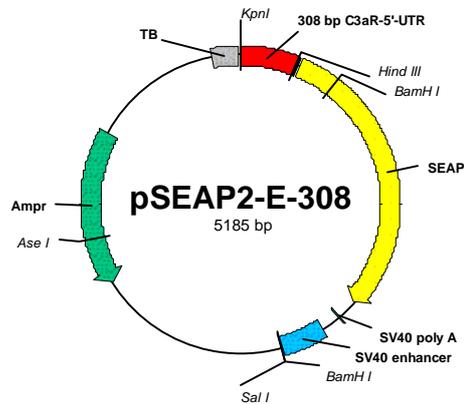
pSEAP2-E-1511: 1511 bp-5'-UTR des hC3aR mit BSS3 und BSR11 aus pDP1 amplifiziert. Über *MluI* und *HindIII* in pSEAP2-Enhancer kloniert.



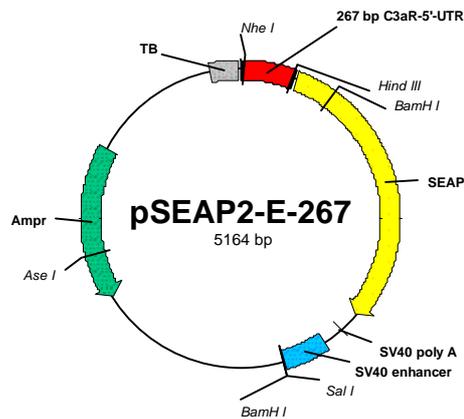
pSEAP2-E-1396: 1396 bp-5'-UTR des hC3aR mit BSS2 und BSR11 aus pDP1 amplifiziert. Über *MluI* und *HindIII* in pSEAP2-Enhancer kloniert.



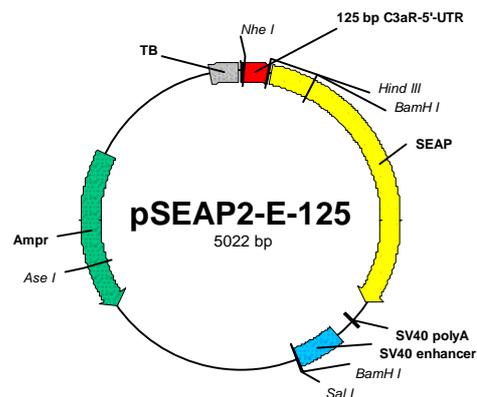
pSEAP2-E-1318: 1318 bp-5'-UTR des hC3aR mit BSS3 und BSR6 aus pDP1 amplifiziert, mit *MluI* und *XmnI* gespalten. Über *MluI* und *NruI* in pSEAP2-Enhancer.



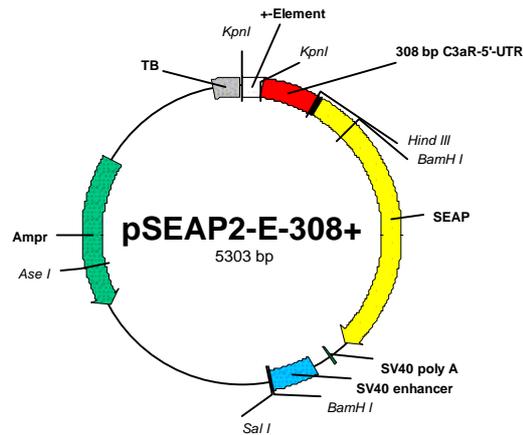
pSEAP2-E-308: 308 bp-5'-UTR des hC3aR mit BSS1 und BSR11 aus pDP1 amplifiziert. Über *KpnI* und *HindIII* in pSEAP2-Enhancer kloniert.



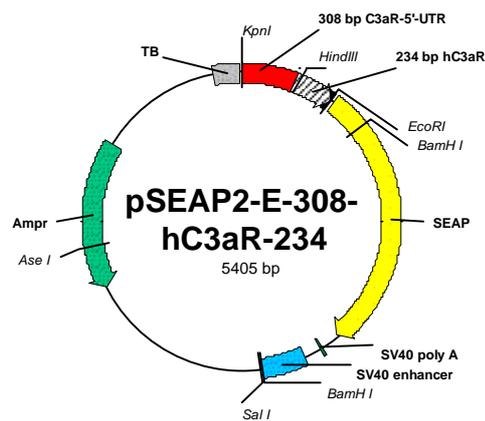
pSEAP2-E-267: 267 bp-5'-UTR des hC3aR mit BSS13 und BSR11 aus pDP1 amplifiziert. Über *NheI* und *HindIII* in pSEAP2-Enhancer kloniert.



pSEAP2-E-125: 125 bp-5'-UTR des hC3aR mit BSS13 und BSR14 aus pDP1 amplifiziert. Über *NheI* und *HindIII* in pSEAP2-Enhancer kloniert.

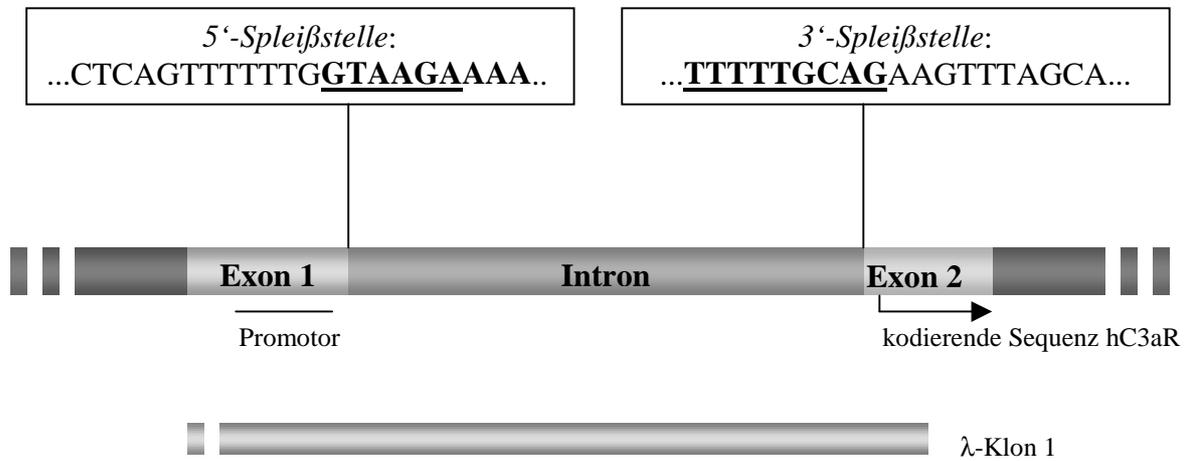


pSEAP2-E-308+: 427 bp-5'-UTR des hC3aR. 118 bp potentiell positiv regulierendes Element mit BSS19 und BSR19 aus pDP1 amplifiziert. Über *KpnI* in pSEAP2-E-308 kloniert.



pSEAP2-E-308-hC3aR-234: 234 bp der kodierenden Sequenz des hC3aR mit TC36 und TC37 aus pTCC0 amplifiziert. Über *HindIII* und *EcoRI* in pSEAP2-E-308 kloniert.

6.4 Genomische Organisation des C3aR-Locus



7. Abkürzungen

AMP	Adenosinmonophosphat
Amp	Ampicillin
APS	Ammonium-peroxidsulfat
Aqua dest.	Aqua destilata (destilliertes Wasser)
ATP	Adenosin-5'-triphosphat
b	Basen
β -Gal	β -Galactosidase
bp	Basenpaare
BSA	bovine serum albumin (Rinderserumalbumin)
Bt ₂ cAMP	Dibutyryl-cAMP
C3aR	C3a-Rezeptor
C5aR	C5a-Rezeptor
cAMP	Cyclo-AMP
cDNA	complementary DNA (komplementäre DNA)
cfu	colony forming units (Kolonie-formende Einheiten)
cpm	counts per minute
CPRG	Chlorophenolrot- β -D-galactopyranosid
cps	counts per second
CSPD	3-(4-Methoxyspiro{1,2-dioxethan-3,2'-(5'-chloro)tricyclodecan}-4-yl)phenylphosphat, Dinatriumsalz
CTP	Cytidin-5'-triphosphat
°C	Grad Celsius
d	2'-Desoxy
Da	Dalton
DEPC	Diethylpyrocarbonat
DIG	Digoxigenin
DMEM	Dulbecco's MEM with Glutamax-I
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	desoxyribonucleic acid (Desoxyribonukleinsäure)
dNTP	2'-Desoxynukleosidtriphosphat
<i>E. coli</i>	<i>Escherischia coli</i>
EDTA	Ethylendinitrilo-N, N, N', N'-tetraessigsäure
EL	extracellular loop (extrazelluläre Schlaufe)
EPO	Erythropoetin
FACS	fluorescence activated cell sorting

FCS	fetal calf serum (fetales Kälberserum)
FITC	Fluorescein-isothiocyanat
fMLP	N-Formyl-methionyl-leucyl-phenylalanin
fMLPR	fMLP-Rezeptor
FPLC	fast protein liquid chromatography
g	Gramm bzw. Erdbeschleunigung ($9,81 \text{ m}\cdot\text{s}^{-2}$)
G-CSF	granulocyte colony stimulating factor
GEBS	Glycerin, EDTA, Bromphenolblau, SDS
GM-CSF	granulocyte/macrophage colony stimulating factor
GTP	Guanosin-5'-triphosphat
h	Stunde bzw. human
HAG-CM	HEPES, Albumin, Glucose, Calcium, Magnesium
HEPES	N-(2-Hydroxyethyl)-piperazin-N'-2-ethansulfonsäure
IC_{50}	half-maximum inhibitory concentration
Ig	Immunglobulin
IL	Interleukin bzw. intracellular loop (intrazelluläre Schlaufe)
IFN	Interferon
IPTG	Isopropyl- β -D-thiogalactopyranosid
k	kilo
K_D	Dissoziationskonstante
LB	Luria-Bertani-Medium
LIF	leukemia inhibitory factor
m	milli (10^{-3}) bzw. Meter
mA	Milliampere
mAK	monoklonaler Antikörper
MCS	multiple cloning site
μ	micro (10^{-6})
min	Minute
mRNA	messenger RNA
MOPS	3-(N-Morpholino)propansulfonsäure
n	nano (10^{-9})
NPA	Nuclease Protection Assay
OD	optische Dichte
Oligo(dT)	Oligodesoxythymidylat
OSM	Onkostatin M
p	pico (10^{-12})
PBMC	peripheral blood mononuclear cell
PBS	phosphate buffered saline
PCR	polymerase chain reaction (Polymerase-Kettenreaktion)

pfu	plaque forming unit
pH	negativer dekadischer Logarithmus der H ⁺ -Konzentration
RNA	ribonucleic acid (Ribonukleinsäure)
rRNA	ribosomale RNA
RT	Raumtemperatur
SCF	stem cell factor
SDS	sodium dodecyl sulfate (Natriumlaurylsulfat)
SEAP	secreted alkaline phosphatase (sezernierte Alkalische Phosphatase)
sec	Sekunde
<i>Taq</i>	<i>Thermus aquaticus</i>
TBE	TRIS, Borat, EDTA
TBS	TRIS-buffered saline
TEMED	N, N, N', N'-Tetramethylethylendiamin
TM	transmembranös
TNF	Tumor-Nekrose-Faktor
TPO	Thrombopoetin
TRIS	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
tRNA	Transfer-RNA
TTP	Thymidin-5'-triphosphat
U	Unit [μ mol/min]
UTR	untranslatierte Region
UV	ultraviolett
V	Volt
v/v	Volumen pro Volumen
W	Watt
wt	Wildtyp
w/v	Gewicht pro Volumen

8. Lebenslauf

von Dipl. Biol. Bettina Sohns

- Schulbildung:* 1978 - 1982 Grundschule Harenberger Straße 29 in Hannover
1982 - 1991 Integrierte Gesamtschule Mühlenberg in Hannover
- Schulabschluß:* Allgemeine Hochschulreife
- Studium:* Diplom Biologie von 1991 - 1997 an der Universität Hannover;
02.05.1996 - 01.02.1997 Diplomarbeit mit dem Thema „Herstellung und Charakterisierung von Antikörpern gegen den humanen C3a-Rezeptor“ am Institut für Medizinische Mikrobiologie der MH Hannover
- Studienabschluß:* am 01.02.1997 mit Abgabe der Diplomarbeit
- Promotion:* Mitglied des Graduiertenkollegs „Molekulare Pathophysiologie des Zellwachstums“ an der MH Hannover; Beginn der Promotion zum Thema „Untersuchungen zur Expression des humanen C3a-Rezeptors“ am 01.04.1997 am Institut für Medizinische Mikrobiologie der MH Hannover

Bisherige Publikationen:

Hawlich, H., Frank, R., Hennecke, M., Baensch, M., Sohns, B., Arseniev, L., Bautsch, W., Klos, A., Köhl, J. (1998) Site directed C3a receptor antibodies from phage display libraries, *J. Immunol.* **160**: 2947-2958

Paral, D., Sohns, B., Crass, T., Grove, M., Köhl, J., Klos, A., Bautsch, W. (1998) Genomic organization of the human C3a receptor, *Eur. J. Immunol.* **28**: 2417-2423

Liebisch, G., Sohns, B., Bautsch, W. (1998) Detection and typing of *Borrelia burgdorferi* sensu lato in *Ixodes ricinus* ticks attached to human skin by PCR, *J. Clin. Microbiol.* **36**: 3355-3358

Lienenklaus, S., Ames, R. S., Tornetta, M. A., Sarau, H. M., Foley, J. J., Crass, T., Sohns, B., Raffetseder, 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): 2089-2093

Abstracts:

Sohns, B., Grove, M., Köhl, J., Martin, U., Klos, A., Bautsch, W. (1997) Generation of polyclonal antisera and monoclonal antibodies against the human C3a-receptor (C3aR), *Immunol. Letters* **56**: 113

Hawlich, H., Sohns, B., Baensch, M., Bautsch, W., Kola, A., Klos, A., Köhl, J. (1997) Anti C3a-receptor (C3aR) antibodies from mice immunized with the second extracellular C3aR domain: selection of specific antibodies from single-chain FV phage libraries, *Immunol. Letters* **56**: 114

Hawlich, H., Frank, R., Hennecke, M., Baensch, M., Sohns, B., Arseniev, L., Bautsch, W., Kola, A., Klos, A., Köhl, J. (1997) Site-directed C3a-receptor antibodies from combinatorial phage display libraries, *Immunobiol.* **197**: 372-373

Lienenklaus S., Hölzer A., Crass T., Sohns S., Grove M., Klos A., Köhl J., Bautsch W. (1997) C4a and the guinea pig C3a-receptor (gpC3aR), *Immunobiol.* **197**: 375

Sohns, B., Grove, M., Köhl, J., Klos, A., Bautsch, W. (1997) A monoclonal antibody against the human C3a-receptor (C3aR), *Immunobiol.* **197**: 377

Lienenklaus S., Ames R. S., Tornetta M. A., Sarau H. M., Foley J. J., Crass T., Sohns B., Raffetseder U., Grove M., Hölzer A., Klos A., Köhl J., Bautsch W. (1998) Human C4a anaphylatoxin elicits C3a-receptor mediated effects in guinea pigs but not in man, *Immunobiol.* **199**: 631

Lienenklaus S., Ames R. S., Tornetta M. A., Sarau H. M., Foley J. J., Crass T., Sohns B., Raffetseder U., Grove M., Hölzer A., Klos A., Köhl J., Bautsch W. (1998) Human C4a anaphylatoxin elicits C3a-receptor mediated effects in guinea pigs but not in man, *Mol. Immunol.* **35**: 366

Sohns, B., Grove, M., Klos, A., Köhl, J., Bautsch, W. (1999) Characterization of the human C3a receptor promoter region, *Biological Chem.* **380**: S197

Sohns, B., Grove, M., Klos, A., Köhl, J., Bautsch, W. (1999) Characterization of the human C3a receptor promoter region, *Immunobiol.* **200**: 368

Danksagungen

Ich bedanke mich bei Herrn Prof. Dr. Bitter-Suermann für die Möglichkeit, die vorliegende Arbeit am Institut für Medizinische Mikrobiologie anfertigen zu können. Frau Prof. Dr. Szamel danke ich herzlich für die Übernahme des Korreferats.

Meinem Betreuer, Herrn Prof. Dr. Bautsch, danke ich für die engagierte Betreuung meiner Arbeit und die vielen wertvollen Anregungen in fachlichen und nichtfachlichen Dingen.

Ein ganz besonderer Dank gilt Melanie Grove, die mich mit ihrer fachlichen Qualifikation und ihrer immer freundlichen und hilfsbereiten Art bei meiner Arbeit unterstützte.

Ich habe mich in dem netten Klima der Arbeitsgruppe immer sehr wohl gefühlt. Dafür - und auch für unsere vielseitigen Freizeitaktivitäten - möchte ich mich bei Melanie Grove, Ute Raffetseder, Torsten Crass, Stefan Lienenklaus, Nicole Flemme, Karen Eschweiler, Anja Schlotzhauer, Ivo Meyer-Wiedenbach, Ursula Raschke, Elvan Akin und Qiuwang Zhang bedanken.

Weiterhin möchte ich allen Mitgliedern der AT-Gruppe, insbesondere auch Dr. Klos und Prof. Dr. Köhl, für die freundliche Unterstützung bei meiner Arbeit danken.

Herrn Dr. Crass danke ich für die Durchführung der Biacore-Untersuchungen, Frau M. Grove für die FPLC-Aufreinigungen, Herrn Prof. Dr. Westermann, Frau K. Bankes und Herrn Dr. Zhang für die Durchführung immunhistochemischer Analysen, Herrn Prof. Dr. Welte und Herrn Dr. Ballmeyer aus der Pädiatrischen Hämatologie für die Unterstützung im Cytokinbereich, Dr. Frank von der GBF Braunschweig für das Epitop-Mapping und Dr. Gasque von der University of Wales, Cardiff, UK für die Überlassung der monoklonalen Antikörper P4B4 und P8B5.

Weiterhin möchte ich Anke, Katrin und Gerrit für ihre langjährige Freundschaft danken.

Für die vielen gemeinsamen Aktivitäten während unserer Zeit im Graduiertenkolleg, insbesondere dem Anschauen von Originalfassungen im Thielenplatzkino, danke ich Andrea Mohr.

Susanne, Swantje und Tanja danke ich für die Ausbildung meiner Stimme in der Karaokebox.

Nicole und Michaela möchte ich für die Entspannungen bei Cocktails im Caldo und Michaela für unsere Surftrips ans Steinhuder Meer danken.

Nicht zuletzt danke ich meinen Eltern und meiner Schwester Susanne für ihr Verständnis und ihre Unterstützung.

Eidesstattliche Erklärung

Hiermit versichere ich, daß ich die vorliegende Dissertation mit dem Titel „Untersuchungen zur Expression des humanen C3a-Rezeptors“ selbständig verfaßt sowie alle benutzten Hilfsmittel und Institutionen vollständig angegeben habe. Weiterhin versichere ich, daß die Dissertation nicht bereits als Diplomarbeit oder andere Prüfungsarbeit verwendet wurde.

Hannover, Mai 2000