Universität Ulm Abteilung Pharmakologie und Toxikologie Leiter: Prof. Dr. Peter Gierschik

Analyse des Einflusses von heterotrimeren G-Proteinen und Nicht-G-Protein-Interaktionspartnern auf die hCCR2-vermittelte Signaltransduktion

Dissertation zur Erlangung des Doktorgrades der Humanbiologie (Dr. biol. hum.) der Medizinischen Fakultät der Universität Ulm

> vorgelegt von Julia Schuhholz geb. in Dillingen a.d. Donau Ulm 2010

Amtierender Dekan: Prof. Dr. Klaus-Michael Debatin
1. Berichterstatter: PD Dr. Barbara Möpps
2. Berichterstatter: Prof. Dr. Klaudia Giehl
Tag der Promotion: 18.06.10

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	1
	1.1 Allgemeine Einführung	1
	1.2 G-Protein-gekoppelte Rezeptoren	1
	1.3 Heterotrimere G-Proteine	7
	1.4 Monomere G-Proteine	12
	1.5 Chemokine und Chemokinrezeptoren	15
	1.6 Tumorprotein D52 (TPD52)	21
	1.7 Ziele der Arbeit	22
2	Material	24
3	Methoden	34
	3.1 Mikrobiologische Methoden	34
	3.2 Molekularbiologische Methoden	36
	3.3 Kultivierung eukaryotischer Zellen	42
	3.4 Proteinexpression in Säugetierzellen	43
	3.4.1 Transfektion von Säugetierzellen	43
	3.4.2 Transfektion von HEK293-Zellen mit siRNA	44
	3.5 Methoden zur Untersuchung der Oberflächenexpression von Rezeptoren	44
	3.6 Methoden zur Untersuchung der Rezeptoraktivierung	45
	3.6.1 Luziferase-Assay	45
	3.6.2 Messung der Inositphosphatproduktion	46
	3.7 Proteinbiochemie	48
4	Ergebnisse	53
	4.1 Analyse der hCCR2-induzierten, CCL2-vermittelten Aktivierung	
	des Transkriptionsfaktors serum response factor (SRF)	53
	4.2 Untersuchung der hCCR2a/b-induzierten SRF-abhängigen Gentranskription	
	bei Stimulation mit steigenden CCL2-Mengen	57
	4.3 Untersuchung der Interaktion der Chemokinrezeptoren hCCR2a und hCCR2b	
	mit verschiedenen Ga-Untereinheiten heterotrimerer G-Proteine	59
	4.3.1 Einfluss von Pertussistoxin (PTX) auf die hCCR2-induzierte	
	SRF-abhängige Gentranskription und die Produktion von	
	Inositphosphaten durch Phospholipase C-β-Isoenzyme	59
	4.3.2 Beteiligung von G α -Untereinheiten der G α_q -Familie an der	
	hCCR2-induzierten SRF-abhängigen Gentranskription	62

10	Lebenslauf	. 182
9	Danksagung	. 181
8	Publikationen	. 180
7	Literaturverzeichnis	.150
6	Zusammenfassung	.148
5	Diskussion	.124
	für die Aktivierung zellulärer Funktionen durch diese Rezeptoren	. 103
	des carboxylterminalen Abschnitts der humanen CCR2-Chemokinrezeptoren	
2	4.6 Untersuchung zur Bedeutung eines juxtamembranären Oktapeptids	
	und Inositphosphatproduktion	.102
	hCCR2b-vermittelte serum-response-factor-abhängige Gentranskription	
	4.5.3 Einfluss der exogenen Expression von FROUNT und TPD52 auf die	
	das <i>trafficking</i> von hCCR2b	.99
	4.5.2 Einfluss von TPD52 auf die Expression und	
	Inositphosphatproduktion	.95
	serum-response- factor-abhängige Gentranskription und	
	4.5.1 Einfluss von <i>tumor protein</i> D52 auf die hCCR2-vermittelte	
	hCCR2-vermittelte Signaltransduktion	.95
2	4.5 Einfluss von <i>tumor protein</i> D52 (TPD52) auf die	
	für die hCCR2a- und hCCR2b-induzierten zellulären Funktionen	.86
2	4.4 Bedeutung von RhoGTPasen und des G α_{α} -spezifischen RhoGEFs p63RhoGEF	
	SRF-abhängige Gentranskription	.83
	4 3 8 Einfluss der Koexpression von Gaa auf die hCCR2-induzierte	. 01
	serum-response-factor-abhängige Gentranskription	81
	4 3 7 Finfluss der Koexpression von Gass und Gass auf die hCCR2-vermittelte	. 17
	4.3.0 EINIUSS IIGuq-spezifischer SIKINA auf die NUUK2-vermittelte	70
	runkuonen	. / /
	4.3.5 Einfluss von Phospholipase C-p ₂ auf die nCCR2-vermittelten zeilularen	77
	Zellulare Funktionen bei exogener Expression von Ga_q und Ga_{14}	. /4
	4.3.4 Einfluss von RGS2 und PLC β_{1-CT} auf hCCR2-vermittelte	74
	Phospholipase C- β -Isoenzymen	.72
	4.3.3 G-Protein-Spezifität der hCCR2-vermittelten Aktivierung von	

Abkürzungen

°C	Grad Celsius
μg	Mikrogramm
μl	Mikroliter
A	Adenosin
Abb.	Abbildung
ADP	Adenosin-5'-diphosphat
AK	Antikörper
Amp	Ampicillin
APS	Ammoniumpersulfat
AS	Aminosäure
bp	Basenpaare
С	Cytosin
Ca	Kalzium
CCL	CC chemokine ligand
CCR	CC chemokine receptor
COS-7	african green monkey kidney cells
CXCL	CXC chemokine ligand
cDNA	complementary DNA
Ci	Curie
Cl	Chlor
CMF-PBS	Calcium- und magnesiumfreies PBS
DAG	1,2-Diacyl-sn-glycerin
Dbl	diffuse B-cell lymphoma
ddH ₂ O	bidestilliertes Wasser
DH	dbl homology
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	2'-Desoxynukleotid-5'-triphosphat
E. coli	Escherichia coli
EC ₅₀	50 % effective concentration
ECL	enhanced chemoluminescence
ER	endoplasmatisches Retikulum

FCS	fetal calf serum (fötales Kälberserum)
g	Erdbeschleunigung $(9,81 \text{ m/s}^2)$
g	Gramm
G	Guanosin
GAP	GTPase-activating protein
GDI	GDP dissociation inhibitor
GDP	Guanosin- 5'-diphosphat
GEF	guanine nucleotide exchange factor
GPCR	G-Protein-gekoppelter Rezeptor
G-Protein	Guaninnukleotid-bindendes Protein
GRK	G-Protein-gekoppelte Rezeptorkinase
GTP	Guanosin-5'-triphosphat
Gα	α -Untereinheit eines heterotrimeren G-Proteins
Gβγ	βγ-Dimer eines hetrotrimeren G-Proteins
h	Stunde
h (als Präfix)	human
НА	Influenza-Virus-Hämagglutinin-12CA5-Epitop
HEPES	N-2-Hydroxyethylpiperazin-N'-2-ethansulfonsäure
hnRNA	heterogenous nuclear RNA
IP ₃	D-myo-Inosit-1,4,5-trisphosphat
Κ	Kalium
kb	Kilobasen
kDa	Kilodalton
konz.	Konzentriert
LARG	leukemia-associated RhoGEF
LB-Medium	Luria-Bertani-Medium
MAL	megakaryocytic acute leukemia
М	Mol pro Liter
m/V	Masse pro Volumen
mA	Milliampere
МСР	monocyte chemoattractant protein
Mg	Magnesium
min	Minute
ml	Milliliter

mRNA	messenger RNA
Na	Natrium
NF-κB	nuclear factor kappa B
ng	Nanogramm
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PBS	phosphate-buffered saline
PCR	polymerase chain reaction (Polymerase-
	Kettenreaktion)
PDZ	PSD-95/DLG/ZO-1
РН	pleckstrin homology
PLC	Phospholipase C
РТХ	Pertussistoxin
Rac	ras-related C_3 botulinum toxin substrate
RGS	regulator of G-protein signaling
Rho	ras-homologous protein
RNA	Ribonukleinsäure
RT	Raumtemperatur
S	Sekunde
siRNA	small interfering RNA
SDF-1a	stromal cell-derived factor-1α
SDS	Natriumdodecylsulfat
SRE	serum response element
SRF	serum response factor
Tab.	Tabelle
TAE	Tris-Essigsäure-EDTA
TBS	tris-buffered saline
TE	Tris-EDTA
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin
TPD52	tumor protein D52
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-aminoethan
Tween 20	Polyoxyethylensorbitan-monolaurat
U	unit
Upm	Umdrehungen pro Minute
UV	Ultraviolett

V	Volt
V/V	Volumen pro Volumen
VT	Volumenteil
W	Watt
WT	Wildtyp

1 Einleitung

1.1 Allgemeine Einführung

Zellen lebender Organismen besitzen die Fähigkeit Reize aus ihrer Umgebung wahrzunehmen, sie umzuwandeln und in das Zellinnere weiterzuleiten. Durch diesen Prozess, der als Signaltransduktion bezeichnet wird, sind Zellen in der Lage eine Vielzahl unterschiedlicher Stimuli z.B. mit einer Veränderung ihres Stoffwechsels oder ihrer Gentranskription zu beantworten. So reagieren Zellen neben optischen, olfaktorischen, akkustischen und mechanischen Reizen auch auf Botenstoffe, die von anderen Zellen abgegeben werden, wie Hormone, Neurotransmitter und Wachstumsfaktoren. Zellen nehmen diese Stimuli durch Rezeptoren auf ihrer Zelloberfläche oder über intrazelluläre, cytoplasmatische Rezeptorproteine wahr. Zu den intrazellulären Rezeptoren gehören z.B. Steroidrezeptoren, die nach Bindung von Steroidhormonen in den Zellkern wandern und Transkriptionsfaktoren die Genexpression beeinflussen. Die als Bindung von extrazellulären Signalmolekülen an membranständige Rezeptorproteine führt über die Konformationsänderung des Rezeptors zu einer Weiterleitung des Signals in das Zellinnere. Die membranständigen Rezeptoren werden anhand ihres Aufbaus und ihrer Funktion in folgende Gruppen eingeteilt: Ionenkanäle, Rezeptortyrosinkinasen und G-Protein-gekoppelte Rezeptoren (GPCRs). Dabei stellen die GPCRs die zahlenmäßig größte und am besten untersuchte Familie von Membranrezeptoren dar.

1.2 G-Protein-gekoppelte Rezeptoren

1.2.1 Einleitung

Die Familie der G-Protein-gekoppelten Rezeptoren (*G-protein-coupled receptors*, GPCRs) ist mit mehr als 1000 verschiedenen Mitgliedern die größte Proteinsuperfamilie (Gether, 2000). GPCRs vermitteln auf der einen Seite die zellulären Antworten, die von Hormonen und Neurotransmittern ausgelöst werden und sind auf der anderen Seite auch für das Sehvermögen, den Geruchssinn und den Geschmackssinn verantwortlich (Rosenbaum *et*

al., 2009). Trotz ihrer vielfältigen Funktionen besitzen die einzelnen Mitglieder dieser Familie gemeinsame charakteristische strukturelle und funktionelle Eigenschaften. Eine Gemeinsamkeit dieser Rezeptoren, die letztlich namensgebend für die Familie war, ist ihre Fähigkeit intrazelluläre, heterotrimere G-Proteine zu rekrutieren und deren Aktivität zu regulieren (Gether, 2000). Obwohl die verschiedenen GPCRs untereinander nur geringe Übereinstimmungen in ihren Aminosäuresequenzen aufweisen (Kolakowski, 1994; Probst *et al.*, 1992), verbinden sie gemeinsame strukturelle Eigenschaften. So haben alle Rezeptoren dieser Familie sieben überwiegend hydrophobe Abschnitte, die sieben transmembranäre α -Helices ausbilden. Diese α -Helices sind abwechselnd durch jeweils drei intra- und extrazelluläre Schleifen (*loops*) miteinander verbunden. Das aminoterminale Ende (N-Terminus) der Rezeptoren liegt extrazellulär und das carboxylterminale Ende (C-Terminus) intrazellulär (Wong, 2003; Oldham & Hamm, 2008).

Im Gegensatz zu den sieben transmembranären Domänen unterscheiden sich die GPCRs in der Länge ihrer extrazellulären aminoterminalen Abschnitte, ihrer cytoplasmatischen loops und ihrer carboxylterminalen Bereiche. Auf diesen strukturellen Unterschieden basierend wurden die Säugetier-GPCRs zunächst in drei große Familien eingeteilt (Klabunde & Hessler, 2002). Die rhodopsin-like Familie A ist die größte und vom strukturellen und funktionellen Gesichtspunkt auch die am besten untersuchte Gruppe. Den Prototyp dieser Familie stellt, wie der Name schon sagt, das Rhodopsin dar. Die Mitglieder der Familie A haben meist kurze aminoterminale Abschnitte und sind durch einige hochkonservierte Aminosäuren in ihren sieben transmembranären Abschnitten und bis auf wenige Ausnahmen durch Disulfidbrücken charakterisiert, die die erste und zweite extrazelluläre Schleife miteinander verbinden. Das Arginin im Asp-Arg-Tyr (DRY)-Motiv auf der cytolasmatischen Seite des dritten transmembranären Abschnitts ist die einzige Aminosäure, die bei allen Rezeptoren der Familie A konserviert vorkommt (Kolakowski, 1994; Probst et al., 1992; Fredriksson et al., 2003). Die Entschlüsselung der Kristallstruktur von Rhodopsin zeigte, dass der aminoterminale Bereich des carboxylterminalen, intrazellulären Abschnitts eine achte α-Helix ausbildet (Palczewski et al., 2000). Diese Helix 8 (H8) beginnt am carboxylterminalen Ende der siebten transmembranären Domäne, verläuft dann parallel zur intrazellulären Seite der Cytoplasmamembran und endet bei Rhodopsin mit zwei palmitoylierten Cysteinen, die über die angehefteten Fettsäurereste diesen Abschnitt in der Cytoplasmamembran verankern (Palczewski et al., 2000). Unter allen GPCRs besitzen nur die rhodopsin-like

Familie A-Rezeptoren Palmitoylierungsstellen und eine putative Helix 8 (Gether, 2000), die vermutlich eine wesentliche Rolle bei der Interaktion der GPCRs mit heterotrimeren G-Proteinen spielt (Marin et al., 2000; Natochin et al., 2003; Okuno et al., 2003; Fritze et al., 2003). Zur Familie A gehören unter anderem Vertreter der Prostaglandin-, Serotonin-, Melatonin-, Histamin- und Dopaminrezeptoren, sowie der adrenergen Rezeptoren und muskarinergen Acetylcholinrezeptoren (Fredriksson et al., 2003). Mittlerweile konnte auch für weitere GPCRs der Rhodopsinfamilie wie z.B. dem β_2 -adrenergen-Rezeptor und dem A2A-Adenosinrezeptor eine achte Helix im cytoplasmatischen carboxylterminalen Abschnitt nachgewiesen werden (Katragadda et al., 2004; Cherezov et al., 2007; Jaakola et al., 2008). Zur zweiten Familie der secretin-like Rezeptorfamilie B zählen Mitglieder, die Neuropeptide und Peptidhormone binden und die dritte Gruppe wird als metabotropic glutamate receptor-like Familie C bezeichnet (Jacoby et al., 2006). Den Rezeptoren der Familie B, die etwa 20 verschiedene Vertreter umfasst (Gether, 2000), fehlt im Gegensatz zu den Mitgliedern der Familie A das konservierte DRY-Motiv. Charakteristisch für die secretin-like Familie ist der lange (~ 100 Aminosäuren) extrazelluläre Aminoterminus, der mehrere Cysteine enthält, die wahrscheinlich ein Netzwerk von Disulfidbrücken ausbilden (Ulrich et al., 1998). GPCRs der Familie C sind durch einen außergewöhnlich langen Aminoterminus (500-600 Aminosäuren) und einen sehr kurzen. in seiner Aminosäuresequenz hochkonservierten dritten intrazellulären loop charakterisiert (Gether, 2000). Zu dieser Familie gehören metabotrope Glutamat-, γ-Aminobuttersäure (GABA)und Calciumrezeptoren (Kolakowski, 1994). Familie C-Rezeptoren besitzen genauso wie die Mitglieder der Familie A und B zwei Cysteine im zweiten bzw. dritten extrazellulären loop, die möglicherweise Disulfidbrücken ausbilden (Gether, 2000). Darüber hinaus haben Vertreter dieser Familie keine konservierten Motive mit den Mitgliedern der Familie A und B gemeinsam.

GPCRs sind in der Lage eine Vielzahl unterschiedlichster Stimuli, wie z.B. Licht, Geruchsmoleküle, Calciumionen, Nukleotide, Lipide und Peptide wahrzunehmen (Allaby *et al.*, 2007). Die Stimulation des GPCRs erfolgt durch die spezifische Interaktion des Liganden mit extrazellulären Abschnitten des Rezeptors. Die an der Interaktion mit dem Liganden beteiligten Domänen des Rezeptors sind dabei so unterschiedlich, wie die chemischen Strukturen der bekannten Agonisten selbst (Gether & Kobilka, 1998). Liganden mit einem geringen Molekulargewicht binden an Stellen innerhalb der hydrophoben Bindungstasche (*core*), die von den transmembranären α -Helices gebildet wird. Dagegen gehören zu den Bindungsstellen für Peptide und Proteine neben den transmembranären Domänen auch der aminoterminale Abschnitt und die extrazellulären, hydrophilen *loops* (Wess, 1997; Schwartz & Rosenkilde, 1996). Die Bindung des Liganden führt zu einer Konformationsänderung des Rezeptors und einer nachfolgenden Rezeptor/G-Protein-Interaktion. An der Interaktion des Rezeptors mit den G-Proteinen sind insbesondere die zweite und dritte intrazelluläre Schleife, sowie der carboxylterminale Abschnitt des Rezeptorproteins beteiligt (Wong, 2003). Nach Aktivierung durch den Rezeptor dissoziiert das heterotrimere G-Protein in seine Ga- und G $\beta\gamma$ -Untereinheiten, die das Signal auf verschiedene intrazelluläre Effektorproteine, wie Phospholipase C- β -Isoenzyme, Phosphoinositid-3-Kinasen, Ionenkanäle oder Adenylylzyklasen übertragen (Marinissen & Gutkind, 2001; Wong, 2003; Neves *et al.*, 2002; Wettschureck & Offermanns, 2005). Auf diese Weise aktivieren GPCRs eine Vielzahl unterschiedlicher intrazellulärer Signalwege.

Die durch GPCRs vermittelte Signaltransduktion ist für die Regulation zahlreicher physiologischer und pathophysiologischer Vorgänge von Vertebraten von entscheidender Bedeutung. Da GPCRs als Rezeptoren für Hormone, Neurotransmitter, Ionen, Photonen und andere Stimuli dienen, bilden sie wichtige Knotenpunkte für die Kommunikation zwischen der Umgebung und dem Zellinneren (Rosenbaum *et al.*, 2009). Auf Grund ihrer zentralen Rolle verwundert es nicht, dass GPCRs den Angriffspunkt für zahlreiche Medikamente darstellen. So wirken mehr als 40 % aller verkauften Pharmaka durch eine Interaktion mit G-Protein-gekoppelten Rezeptoren (Brink *et al.*, 2004) und unter den 100 meistverkauften Medikamente darstellen (Klabunde & Hessler, 2002), obwohl im menschlichen Genom bis zu 1000 GPCR-kodierende Gene vorliegen (Flower, 1999), bleiben viele Möglichkeiten GPCR-adressierende Medikamente zu entwickeln.

1.2.2 Aktivierung von GPCRs

Zunächst wurde ein einfaches lineares Modell herangezogen, um die molekularen Mechanismen zu erklären, die der Übertragung von extrazellulären Signalen durch GPCRs in zelluläre Antworten zu Grunde liegen. Dieses Modell geht davon aus, dass die Bindung eines Agonisten den Übergang des Rezeptors von einem *off-* in einen *on-*Zustand fördert

und somit die Bindung eines heterotrimeren G-Proteins ermöglicht (Karlin, 1967; Maudsley et al., 2005). Neuere Forschungsergebnisse deuten darauf hin, dass es verschiedene Formen eines aktiven Zustands des Rezeptors gibt und dieser Vorgang der Rezeptoraktivierung bzw. -inaktivierung sich viel komplexer darstellt als ursprünglich angenommen. De Lean et al. beschrieben 1980 die Rezeptoraktivierung mit dem ternary complex model. Dieses Modell besagt, dass in Anwesenheit von GDP die Bindung eines Agonisten zur Bildung eines stabilen Komplexes aus Agonist (H), GPCR (R) und heterotrimerem G-Protein (G) führt. Fehlt dagegen das G-Protein oder ist GTP vorhanden, das die Rezeptor-vermittelte G-Protein-Aktivierung erlaubt, zerfällt dieser H-R-G-Komplex und der Rezeptor verbleibt im H-R-Zustand. Weitere Arbeiten unterstützen die Hypothese, dass sich der Rezeptor in einem ständigen Gleichgewicht zwischen einer aktiven (R*) und einer inaktiven Konformation (R) befindet und diese Konformationen sich in ihrer Fähigkeit unterscheiden G-Proteine zu aktivieren (Samama et al., 1994). Bei dem Erklärungsansatz, der auch als two state-Modell bekannt ist, wird davon ausgegangen, dass der Rezeptor meist in der inaktiven R-Form vorliegt. Erst die Bindung eines Agonisten erlaubt es dem Rezeptor durch Konformationsänderungen die aktive R*-Form anzunehmen. Um diese Verschiebungen des Gleichgewichts in die R- oder R*-Form erklären zu können, bezieht das erweiterte ternary complex model die intrinsischen Aktivitäten der Liganden mit ein (Lefkowitz et al., 1993). Diesem Modell entsprechend stabilisieren volle Agonisten durch ihre bevorzugte stark selektive Bindung an Rezeptoren in der aktiven Form die R*-Konformation und führen so zu einer kompletten Rezeptoraktivierung und zu einer maximalen Antwort. Bei einem Partialagonisten ist die Selektivität für R* über R nicht ganz so stark ausgeprägt und somit führt seine Bindung nur zu einer unvollständigen Antwort. Antagonisten hingegen binden wahllos sowohl an Rezeptoren in der R-, als auch in der R*-Form, wobei diese Bindung zu keiner physiologischen Antwort führt, aber die Antwort auf Agonisten blockiert. Inverse Agonisten verschieben das Gleichgewicht hin zur inaktiven R-Form, da sie bevorzugt an Rezeptoren dieser Konformation binden. Dadurch können inverse Agonisten die basale Aktivität der Rezeptoren verringern und somit haben sie genau die umgekehrte Wirkung wie ein Agonist. Es gibt allerdings vermehrt Hinweise darauf, dass Rezeptoren nicht nur in der R- und R*-Form vorkommen, sondern in verschiedenen aktiven und inaktiven Konformationszuständen vorliegen. Dieses multi state-Modell postuliert, dass es drei oder möglicherweise sogar noch mehr aktive Konformationen ein und desselben Rezeptors gibt und liefert somit eine Erklärung dafür, wie ein Rezeptor über verschiedene G-Proteine verschiedene Signalwege aktivieren kann (Maudsley *et al.*, 2005). Die Bindung eines spezifischen Liganden führt also zur Ausbildung genau einer dieser postulierten aktiven Konformationen, wodurch nun ganz bestimmte intrazelluläre Domänen für die Interaktion mit den heterotrimeren G-Proteinen zugänglich werden. Auch biophysikalische Untersuchungen unterstützen die Annahme, dass verschiedene GPCR-Liganden unterschiedliche Rezeptormikrokonformationen induzieren (Ghanouni *et al.*, 2001). Dieses Phänomen, dass die Bindung verschiedener Agonisten an den gleichen Rezeptor qualitativ unterschiedliche zelluläre Antworten auslösen kann, also funktionelle Selektivität besitzt, wird auch als *agonist-specific trafficking, biased agonism, functional selectivity* oder *ligand-directed signalling* bezeichnet (Kenakin, 2001;Michel & Alewijnse, 2007; Baker & Hill, 2007; Kenakin, 2007)

Außerdem kann mit Hilfe des multi state-Modells im Gegensatz zum two state-Modell auch der Vorgang der Rezeptordesensibilisierung erklärt werden. Werden GPCRs einer längeren Stimulation durch einen Agonisten ausgesetzt, führt dies zu einer Abnahme oder zum völligen Verlust der Rezeptorantwort, ein Vorgang der als Desensibilisierung bezeichnet wird (Ferguson, 2001). Die Desensibilisierung wird durch Phosphorylierung des Rezeptors durch Kinasen G-Protein-gekoppelter Rezeptoren (GRKs) eingeleitet. GRKs phosphorylieren GPCRs an Serin- und Threoninresten in ihrem dritten intrazellulären loop und ihren carboxylterminalen Abschnitten (Premont & Gainetdinov, 2007). Diese Phosphorylierung allein hat nur eine geringe Auswirkung auf die Rezeptor/G-Protein-Kopplung, aber sie erhöht die Affinität des Rezeptors für Arrestine (Luttrell & Lefkowitz, 2002; Kovacs et al., 2009). Erst die Bindung der Arrestine verhindert eine weitere Interaktion des Rezeptors mit G-Proteinen und inaktiviert somit den Rezeptor (Wolfe & Trejo, 2007). Arrestine stellen darüber hinaus auch noch das Verbindungsglied zwischen dem Rezeptor und den clathrin coated pits - speziellen Endozytosevesikeln - dar (Shenoy & Lefkowitz, 2003; Claing et al., 2002). Durch den Kontakt mit diesen Vesikeln werden die GPCRs in das Zellinnere aufgenommen. Dieser Prozess wird als Internalisierung bezeichnet und erstreckt sich über einen Zeitraum von mehreren Minuten nach dem Kontakt mit dem Agonisten (Luttrell & Lefkowitz, 2002). Internalisierte Rezeptoren können entweder mit Arrestinen stabile Komplexe ausbilden und dann abgebaut werden oder in einem langsamen Prozess, der bis jetzt kaum verstanden ist recycled und zurück auf die Membran gebracht werden (Luttrell & Lefkowitz, 2002; Marchese et al., 2008). Bei letzterem Prozess, der als Rezeptorresensitivierung bezeichnet wird, dissoziieren die Rezeptor/Arrestin-Komplexe, die Rezeptoren werden dephosphoryliert, von ihrem Liganden befreit und schließlich wieder zurück auf die Zelloberfläche transportiert (Ferguson, 2001). Eine langfristige Desensibilisierung besteht dagegen in einer verminderten Expression der Rezeptoren (*receptor downregulation*). Auf diese Weise kommt es zu einer Reduktion der Rezeptordichte auf der Zelloberfläche. Diese kann sowohl durch Proteinabbau, als auch durch transkriptionelle bzw. posttranskriptionelle Mechanismen erreicht werden (Ferguson, 2001).

1.3 Heterotrimere G-Proteine

1.3.1 Einteilung und Funktion

Bei der Familie der heterotrimeren Guaninnukleotid-bindenden-Proteine (G-Proteine) handelt es sich wie auch bei den GPCRs um eine alte Proteinfamilie, deren Aminosäuresequenz sich im Laufe der Evolution kaum verändert hat (Milligan & Kostenis, 2006). Heterotrimere G-Proteine setzen sich aus drei Untereinheiten zusammen, die als $G\alpha$, $G\beta$ und $G\gamma$ bezeichnet werden. Die $G\alpha$ -Untereinheiten zeichnen sich durch ihre intrinsische GTPase-Aktivität aus, d.h. sie sind in der Lage gebundenes GTP unter Abspaltung eines Phosphatrests zu GDP zu hydrolysieren (Wettschureck & Offermanns, 2005). Die G β - und die G γ -Untereinheiten bilden nicht dissoziierbare Dimere aus. Bisher sind wenigstens 16 Ga-, 5 GB- und 12 Gy-kodierende Gene im menschlichen Genom identifiziert worden (McIntire, 2009). Heterotrimere G-Proteine werden basierend auf den Übereinstimmungen in den Aminosäuresequenzen ihrer $G\alpha$ -Untereinheiten in folgende vier Familien eingeteilt: $G\alpha_s G\alpha_{i/o}$, $G\alpha_q$, und $G\alpha_{12/13}$. Die Mitglieder einer Familie sind sich strukturell ähnlich und haben oft gemeinsame funktionelle Eigenschaften. So stimulieren z.B. die Ga-Untereinheiten, die zur Gas-Familie gehören Adenylylcyclasen, wohingegen Gai-Untereinheiten zu einer Inhibition der Aktivität von Adenylylcyclasen führen (Sunahara *et al.*, 1996; Neves *et al.*, 2002). Mitglieder der $G\alpha_{q}$ -Familie aktivieren Phospholipase C-β-Isoenzyme und Mitglieder der Gα_{12/13}-Familie scheinen hauptsächlich an der Regulation von kleinen GTPasen beteiligt zu sein (Mizuno & Itoh, 2009; Radhika & Dhanasekaran, 2001). Um die Funktionen der verschiedenen Ga-Untereinheiten zu charakterisieren, werden bakterielle Toxine eingesetzt, die durch ADP-Ribosylierungen an spezifischen Aminosäuren innerhalb der G α -Untereinheit die GTP-Hydrolyse bzw. den

Austausch von GDP zu GTP inhibieren (Holbourn et al. 2006). Das Choleratoxin produziert vom Bakterium Vibrio cholerae ADP-ribosyliert Gas-Proteine mit der Folge, dass das G-Protein in seiner aktiven, GTP-gebundenen Form verbleibt. Um die Funktionen von $G\alpha_i$ -Untereinheiten zu untersuchen, wird das Toxin von *Bordetella pertussis* (PTX) benutzt. Dieses Toxin inhibiert spezifisch Gai-vermittelte Signalwege, indem es eine ADP-Ribose-Einheit auf die Gα-Untereinheit überträgt. Dadurch wird der Austausch von GDP zu GTP blockiert und das Protein bleibt in seinem inaktiven Zustand. Heterotrimere G-Proteine verbinden GPCRs und nachgeschaltete Effektormoleküle. Dabei durchlaufen sie einen Zyklus, bestehend aus einem aktiven und einem inaktiven Zustand (McCudden et al. 2005). Im inaktiven Zustand hat die G α -Untereinheit ein GDP gebunden und liegt assoziiert mit dem G\u00dfy-Dimer vor. Dieser heterotrimere Komplex ist über Fettsäurereste auf der Innenseite der Plasmamembran verankert (Higgins & Casey, 1996; Evanko et al., 2001; Chen & Manning, 2001; Evanko et al., 2005). Durch die Interaktion mit einem aktivierten GPCR kommt es an der Gα-Untereinheit zum Austausch von GDP zu GTP. Daraufhin dissoziiert die G α -Untereinheit sowohl vom Rezeptor als auch vom G $\beta\gamma$ -Dimer. Damit ist nun die Gα-Untereinheit und das Gβγ-Dimer frei und in der Lage, die Aktivität verschiedenster Effektormoleküle wie Adenylylund Guanylylcyclasen, Phosphodiesterasen, Phospholipase C-Isoformen (PLC) und Phosphoinositid-3-Kinasen (PI3K) zu regulieren. Dadurch kommt es zu einer Aktivierung bzw. zu einer Inhibition der Produktion von second messenger Molekülen, wie cyclischem Adenosinmonophosphat (cAMP), cyclischem Guanosinmonophosphat (cGMP), Diacylglycerol (DAG), Inositol-Phosphatidylinositol-3,4,5-phosphat, Arachidonsäure 1,4,5-trisphosphat (IP3), und Phosphatidylsäure (Marinissen & Gutkind, 2001; Neves et al., 2002). Durch die intrinsische GTPase-Aktivität der Ga-Untereinheit wird das GTP hydrolysiert. Die Ga-Untereinheit reassoziiert in ihrem GDP-gebundenen Zustand wieder mit dem G\u00dfy-Dimer, wodurch die Interaktion mit den Effektoren beendet wird und somit der Zyklus wieder von vorne beginnen kann (Ford et al., 1998; Li et al., 1998; McCudden et al., 2005). Beobachtungen, dass die GTPase-Aktivität von isolierten G-Proteinen viel geringer ist als die unter physiologischen Bedingungen gemessene Aktivität führte zur Entdeckung einer Familie von ubiquitär exprimierten Proteinen, die die GTPase-Aktivitiät von Ga erhöhen (Arshavsky & Pugh, 1998). Diese Proteine werden als RGS-Proteine (regulator of Gprotein signaling) bezeichnet (Siderovski & Willard, 2005). Sie besitzen eine 120 Aminosäuren umfassende konservierte RGS-Domäne, die sowohl für die Bindung an die Ga-Untereinheit, als auch für die Beschleunigung der von Ga katalysierten GTP-

Hydrolyse verantwortlich ist (Day *et al.*, 2003). Derzeit sind etwa 30 RGS-Proteine bekannt, die selektiv die Aktivität verschiedener Mitglieder der G α -Subfamilien regulieren (Wettschurek & Offermanns, 2005).

1.3.2 Molekulare Struktur der Ga-Untereinheit

Die Ga-Untereinheiten heterotrimerer G-Proteine variieren in ihrer Größe zwischen 39 kDa und 52 kDa und stimmen zwischen 35 % und 95 % in ihren Aminosäureseguenzen überein (Downes & Gautam, 1999). Alle Gα-Untereinheiten setzen sich aus zwei konservierten Domänen zusammen: einer GTPase-Domäne und einer helikalen Domäne (Oldham & Hamm, 2008). Die GTPase-Domäne hydrolysiert GTP und umfasst die Abschnitte der Ga-Untereinheit, die für die Interaktion mit dem G\u00b3y-Dimer, mit dem heptahelicalen Rezeptor und den nachgeschalteten Effektorproteinen von Bedeutung sind (Oldham & Hamm, 2006). Die GTPase-Domäne besteht aus einer sechssträngigen ß-Faltblattstrukur, die von fünf α -Helices umgeben wird. Die Stränge der β -Faltblattstruktur und die α -Helices sind durch kurze Aminosäuresequenzen miteinander verbunden, die als Schleifen (loops) bezeichnet werden. Diese fünf Schleifen umfassen die am stärksten konservierten Aminosäuresequenzen in dieser Domäne und beinhalten die Konsensussequenz für die Guaninnukleotidbindung. Darüber hinaus finden sich in der GTPase-Domäne noch drei flexible loops, die als switch I, II und III bezeichnet werden. Sie verändern nach dem Austausch von GDP zu GTP ihre Konformation und ermöglichen so die Interaktion mit Effektormolekülen (Oldham & Hamm, 2008). Die helikale Domäne besteht aus sechs α -Helices, die eine Art Deckel über der Nukleotidbindungsstelle bilden. Zu den Funktionen dieser Domäne gehört es die Affinität von Ga für Guaninnukleotide zu steigern (Warner et al., 1998; Remmers et al., 1999) und die GTP-Hydrolyseaktivität des Proteins zu erhöhen (Markby et al., 1993). Da diese Domäne sich in den verschiedenen $G\alpha$ -Untereinheiten am stärksten in ihrer Aminosäuresequenz unterscheidet, dürfte sie auch eine signifikante Rolle bei der Kopplung von spezifischen G-Proteinen an spezifische Effektoren spielen (Liu et al., 1998). Über die Struktur der amino- und carboxylterminalen Bereiche der G α -Untereinheit ist relativ wenig bekannt. Beide Abschnitte spielen aber eine große Rolle bei der Spezifität der Rezeptorbindung und bei der G-Protein-Aktivierung (Oldham & Hamm, 2006). Außerdem wird die Ga-Untereinheit im aminoterminalen Bereich posttranslational modifiziert. Die Mitglieder der Gai/o-Familie besitzen im aminoterminalen Bereich ein Sequenzmotiv an dem sie myristoyliert werden und einen konservierten Cysteinrest, an dem eine Palmitoylierung erfolgt (Chen & Manning, 2001; Smotrys & Linder, 2004). Alle anderen G α -Untereinheiten verfügen nur über einen oder mehrere Cysteinreste innerhalb der 15 aminoterminal gelegenen Aminosäuren, von denen einige Ziele für posttranslationale Palmitoylierungen sind (Milligan & Kostenis, 2006). Durch die in diesem Bereich posttranslational angehefteten Lipidreste werden die löslichen G α -Untereinheiten in der Plasmamembran verankert, was für ihre Interaktion mit dem Rezeptor von entscheidender Bedeutung ist.

1.3.3 Funktion und Struktur des Gβγ-Dimers

Zunächst wurde dem G\u00dfy-Dimer heterotrimerer G-Proteine keine große Bedeutung im Bezug auf die Signalweiterleitung zugemessen. Später wurde klar, dass der G $\beta\gamma$ -Komplex, wenn er dissoziiert von der Ga-Untereinheit vorliegt in der Lage ist verschiedene Effektoren zu regulieren (Clapham & Neer, 1997; Smrcka, 2008). Zu diesen durch Gßy-Dimere regulierten Effektoren zählen Ionenkanäle (Wiser & Jan, 2004), spezifische Isoformen der Adenylylcyclase, der Phospholipase C (Exton, 1996; Sunahara et al., 1996) und der Phosphoinositid-3-Kinase (Vanhaesebroeck et al., 2001). Alle sechs verschiedenen G β -Untereinheiten haben ein Molekulargewicht von etwa 36kDa. G β_{1-4} stimmen in 80-90 % ihrer Aminosäuresequenz überein und werden ubiquitär exprimiert. Eine besondere Stellung unter den G β_5 nimmt G β_5 ein. G β_5 wird vorwiegend im Nervensystem exprimiert und seine Aminosäuresequenz stimmt nur zu etwa 50 % mit der anderer Gβ-Untereinheiten überein (Downes & Gautam, 1999). Auch funktionell zeigt $G\beta_5$ einige Besonderheiten. Im Gegensatz zu den anderen G β -Untereinheiten kann G β_5 leicht von G γ dissoziiert werden und bleibt in Lösung als Monomer stabil (Cabrera et al., 1998; Yoshikawa et al., 2000; Smrcka, 2008). Im Gegensatz dazu, sind die aus den anderen vier Gßs und Gys gebildeten Dimere sehr stabil und nur unter denaturierenden Bedingungen aufzulösen (Schmidt et al., 1992). Außerdem konnte gezeigt werden, dass freies G_{β5} mit RGS-Proteinen Komplexe ausbilden kann (Levay et al., 1999; Makino et al., 1999). Die Interaktion mit GB₅ erhöht die Fähigkeit der RGS-Proteine die GTPase-Aktivität von Ga-Untereinheiten zu beschleunigen (Kovoor et al., 2000). Dennoch kann Gß5 genauso wie die anderen vier Gß-Untereinheiten mit einer Reihe von Gy-Untereinheiten interagieren. Die Mitglieder der Gy-Familie sind kleine Proteine mit einem Molekulargewicht zwischen 7kDa und 8 kDa und einer Sequenzübereinstimmung in ihren Aminosäuresequenzen von 30-80 % (Downes & Gautam, 1999). Alle Gy-Untereinheiten werden posttranslational an einem carboxylterminal gelegenen Cys-A-A-X-Motiv isoprenyliert (McIntire, 2009). Obwohl die meisten Gßs mit den meisten Gy-Untereinheiten dimerisieren können, werden trotzdem nicht alle der 60 möglichen Kombinationen gebildet. Zum Beispiel interagiert $G\gamma_1$ mit $G\beta_1$, aber nicht mit G β_2 , obwohl G β_2 und G β_1 zu 87% in ihren Aminosäuresequenzen übereinstimmen. G β_2 bindet aber an G γ_2 , obwohl G γ_2 in seiner Aminosäuresequenz wiederum Gy₁ sehr ähnelt (Pronin & Gautam, 1992; Schmidt et al., 1992; Garritsen & Simonds, 1994; Downes & Gautam, 1999).

1.3.4 Die Gα_q-Familie

Zur $G\alpha_q$ -Familie zählen vier G-Protein α -Untereinheiten: $G\alpha_q$, $G\alpha_{11}$, $G\alpha_{14}$ und $G\alpha_{16}$. Die einzelnen Ga-Untereinheiten der Gag-Familie stimmen zu einem hohen Prozentsatz in ihren Primärsequenzen überein und zeichnen sich darüber hinaus durch bestimmte funktionelle Gemeinsamkeiten aus (Simon et al., 1991; Wettschurek & Offermanns, 2005). $G\alpha_{q}$ und $G\alpha_{11}$ stimmen in 89 % ihrer Aminosäuren überein und weisen somit innerhalb der Gα_α-Familie die größte Übereinstimmung in ihren Primärsequenzen auf. Alle Mitglieder der G α_q -Familie heterotrimerer G-Proteine sind in der Lage, die vier Isoenzyme der PLC- β zu aktivieren (Mizuno & Itoh, 2009). Aktivierte Phospholipase C-β-Isoenzyme katalysieren die Hydrolyse von Phoshatidylinosit-4,5-bisphosphat zu den beiden second messenger Molekülen 1,2-Diacyl-sn-glycerin (DAG) und Inosit-1,4,5-trisphosphat (IP₃). DAG aktiviert die Proteinkinase C und IP₃ führt durch die Bindung an den IP₃-Rezeptor in der Membran des endoplasmatischen Retikulums zur Freisetzung von Ca²⁺ aus den intrazellulären Speichern (Rhee, 2001; Neves et al., 2002; Scharenberg et al., 2007). Unterschiede zwischen den einzelnen Mitgliedern der Ga_a-Familie zeigen sich im Bezug auf ihre Fähigkeit mit verschiedenen GPCRs zu interagieren. So können z.B. alle drei Subtypen der α_1 -Adrenozeptoren (1A, 1B und 1C) PLC- β über G $\alpha_{\alpha/11}$ stimulieren, aber nur der α_{1B} -Adrenozeptor kann auch mit G α_{16} interagieren (Wu *et al.*, 1992). Die verschiedenen Mitglieder einer Ga-Familie weisen oft sehr spezifische Expressionsmuster auf (Wettschurek & Offermanns, 2005). Während $G\alpha_q$ und $G\alpha_{11}$ ubiquitär exprimiert werden, beschränkt sich die Expression von Ga₁₆ ausschließlich auf hämatopoetische Zellen (Amatruda et al., 1991; Wilkie et al., 1991; Su et al., 2009), was zu der Annahme

führte, dass $G\alpha_{16}$ eine wichtige Rolle in der Differenzierung und Funktion von hämatopoetischen Zellen spielt. Im Gegensatz dazu wird das murine $G\alpha_{16}$ -Homolog - $G\alpha_{15}$ - auch in der Milz, im Thymus, in der Lunge und im Knochenmark exprimiert (Su et al., 2009). G α_{16} kann mit einer Vielzahl verschiedener GPCRs interagieren und ist nach der Aktivierung durch die Rezeptoren in der Lage PLC-B-Isoenzyme zu stimulieren. Interessanterweise wird PLC β_2 auch spezifisch in hämotopoetischen Zellen exprimiert, so dass angenommen werden kann, dass PLC β_2 und G α_{16} in diesen Zellen funktionell miteinander verknüpft sind (Mizuno & Itoh, 2009). Außerdem lassen neuere Untersuchungen den Schluss zu, dass Ga_{16} auch eine Rolle bei der Aktivierung von Transkriptionsfaktoren wie STAT3 (signal transducer and activator of transcription 3) und NF- κ B (*nuclear factor* κ B) spielt (Su *et al.*, 2009). Die Signalweiterleitung durch Ga₁₆ wird durch dessen Interaktion mit RGS2 inhibiert. So wurde gezeigt, dass RGS2 die $G\alpha_{16}$ vermittelte Aktivierung von PLC-B-Isoenzymen und die Inositphosphatproduktion in HEK293-Zellen, die eine konstitutiv aktive $G\alpha_{16}Q212L$ -Mutante exprimieren, inhibiert (Day et al., 2003). Auch die Expression von $G\alpha_{14}$ beschränkt sich, wie die von $G\alpha_{16}$, auf wenige Gewebe (Nakamura et al., 1991; Wilkie et al., 1991). Northern-blot-Untersuchungen zeigten, dass Transkripte von $G\alpha_{14}$ hauptsächlich in der Lunge, Niere, Milz und Zunge nachweisbar sind. Im Vergleich mit den anderen Mitgliedern der $G\alpha_{q}$ -Familie wurde $G\alpha_{14}$ bislang am wenigsten untersucht. Jedoch ist bekannt, dass $G\alpha_{14}$, wie auch die anderen Mitglieder der Ga_a-Familie, in der Lage ist PLC- β -Isoenzyme zu stimulieren (Nakamura et al., 1995).

1.4 Monomere G-Proteine

1.4.1 Einteilung

Monomere G-Proteine - auch als kleine G-Proteine oder kleine GTPasen bezeichnet - haben molekulare Massen von ~ 20-29 kDa (Williams *et al.*, 2009). Die kleinen GTPasen kommen in den Zellen aller Eukaryoten vor und bilden eine Superfamilie mit mehr als 100 Mitgliedern (Takai *et al.*, 2001). Die Mitglieder dieser Superfamilie werden nach strukturellen Gemeinsamkeiten in fünf Familien eingeteilt: Ras, Rho, Rab, Sar1/Arf, und Ran (Takai *et al.*, 2001). Wie die heterotrimeren G-Proteine sind auch die monomeren G-Proteine in der Lage Guaninnukleotide zu binden und zu hydrolysieren. Sie wechseln

zwischen einem aktiven GTP-gebundenen und einem inaktiven GDP-gebundenen Zustand hin und her und übernehmen so die Funktion eines molekularen Schalters in der Signaltransduktion (Wittinghofer & Pai, 1991; Boguski & McCormick, 1993; Scheele et al., 2007). Die Mitglieder der Ras- und der Rho-Familie sind an der Regulation der Genexpression beteiligt (Sah et al., 2000). Die Rho-Proteine spielen zudem eine wichtige Rolle bei der Organisation des Aktin-Cytoskeletts und des mikrotubulären Systems und nehmen somit Einfluss auf die Zellmigration, Zelladhäsion und Zellmorphogenese (Heasman & Ridley, 2008). Mitglieder der Rab- und Sar1/Arf-Subfamilien regulieren das intrazelluläre Vesikel-*trafficking* und **Ran-Proteine** kontrollieren den nukleocytoplasmatischen Transport während der G₁-, S- und G₂-Phasen des Zellzyklus und die Mikrotubuliorganisation während der M-Phase (Takai et al., 2001; Stenmark, 2009; Kahn et al., 2005; Yudin & Fainzilber, 2009).

1.4.2 Familie der RhoGTPasen

Die Mitglieder der Rho-Familie haben eine molekulare Masse zwischen 20 kDa und 25 kDa (Sah et al., 2000) und werden aufgrund von strukturellen und funktionellen Gemeinsamkeiten in Rho-, Rac- und Cdc42-Proteine eingeteilt (Bustelo et al., 2007). Die Untergruppe der Rho-Proteine besteht aus RhoA, RhoB und RhoC, die zu mehr als 85 % in ihren Aminosäuresequenzen übereinstimmen (Wheeler & Ridley, 2004). Zu den am besten charakterisierten RhoGTPasen zählt RhoA. Um die Funktion von RhoA-Proteinen zu untersuchen wird häufig das Exoemzym C3 von Clostridium botolinum verwendet. Dieses C3-Toxin ADP-ribosyliert RhoA-Proteine (RhoA, RhoB, RhoC) spezifisch an einer Aminosäure (Asn⁴¹) in der Effektorregion und verhindert so die Interaktion von Rho mit nachgeschalteten Effektoren (Sekine et al., 1989; Wilde & Aktories, 2001; Holbourn et al., 2006). Untersuchungen an mit C3 behandelten Zellen lieferten auch erste Hinweise auf eine Beteiligung von Rho bei der Kontrolle der Dynamik des Cytoskeletts (Chardin et al., 1989; Paterson et al., 1990; Pellegrin & Mellor, 2007). Für RhoGTPasen ist darüber hinaus bekannt, dass sie Transkriptionsfaktoren, wie den serum response factor (SRF) oder nuclear factor-kB (NF-kB) aktivieren (Perona et al., 1997; Tokzoc & Merdek, 2002; Brown et al, 2006). Die Bindungsstelle für SRF - das serum response element (SRE) findet sich in den Promotoren vieler Gene, die für Komponenten des Cytoskeletts kodieren, unter anderem auch im Promotor von Aktin (Jaffe & Hall, 2005). SRF benötigt zudem den Co-Aktivator MAL (*megakaryocytic acute leukemia*), der durch die von Rho aktivierte Aktin-Polymerisation aus seiner Bindung mit monomerem G-Aktin entlassen wird und dann aus dem Cytoplasma in den Zellkern gelangt (Miralles *et al.*, 2003; Settleman, 2003). Untersuchungen zeigten, dass die über RhoA vermittelte Aktivierung von SRE-Reportergenen in Anwesenheit einer dominant negativen MAL-Mutante blockiert wurde (Cen *et. al.*, 2003).

1.4.3 Aktivierung und Regulation der RhoGTPasen

Die Aktivität von RhoGTPasen wird über unterschiedliche Proteine reguliert. Zu diesen zählen Rho guanine nucleotide exchange factors (RhoGEFs), Rho GTPase activating proteins (RhoGAPs) und Rho guanine nucleotide dissociation inhibitors (RhoGDIs) (Sah et al., 2000). RhoGDIs bilden insbesondere Komplexe mit inaktiven GDP-gebundenen RhoGTPasen aus, da sie zu Letzteren eine höhere Affinität haben als zu den GTPasen, die in der aktiven GTP-gebundenen Form vorliegen. So blockieren GDIs den Austausch von GDP zu GTP am Rho-Protein und stabilisieren auf diese Weise die RhoGTPasen in ihrer inaktiven Form. Außerdem halten GDIs die RhoGTPasen im Cytoplasma zurück und verhindern so, dass es über carboxylterminale, posttranslational angefügte Prenylgruppen zu einer Verankerung der RhoGTPasen in der Cytoplasmamembran kommt (Narumiya, 1996; Olofsson, 1999; Dransart et al., 2005). RhoGAPs beschleunigen die intrinsische GTPase-Aktivität der RhoGTPasen und führen folglich zu einer Inaktivierung der Proteine (Schmidt & Hall, 2002). RhoGEFs aktivieren RhoGTPasen, in dem sie den Austausch von GDP durch GTP katalysieren (Rossman & Sondek, 2005). Die Dbl (diffuse B-cell lymphoma)-Familie ist mit 69 Mitgliedern die größte GEF-Familie. Zu dieser Familie gehören unter anderem die RhoGEFs p115RhoGEF, PDZ(PSD-95/disc-large/ZO-1 homology)RhoGEF, LARG (leukemia associated Rho GEF) und p63RhoGEF. Alle Dbl-GEFs besitzen eine hochkonservierte DH (Dbl homology)-Domäne und bei fast allen liegt diese Domäne benachbart zu einer carboxylterminalen PH (pleckstrin homology)-Domäne. Die GEFs interagieren über die DH-Domäne mit den RhoGTPasen und diese Domäne vermittelt auch die Austauschaktivität (Rossman et al., 2002). Welche Rolle die PH-Domäne beim Austausch von GDP durch GTP spielt, ist noch unklar. In vivo wurde gezeigt, dass der Interaktion der PH-Domäne mit Phospholipiden eine entscheidende Bedeutung bei der Regulation der GEF-Aktivität zukommt (Rossman & Sondek, 2005). Die RhoGEFs p115RhoGEF, PDZRhoGEF und LARG enthalten in ihren aminoterminal zu den DH-PH-Domänen gelegenen Abschnitten zusätzlich noch eine RGS (regulator of G-protein signaling)-Domäne (Aittaleb et al., 2010). Über diesen Abschnitt wirken die GEFs auf $G\alpha_{12}$ und $G\alpha_{13}$ als GTPase-aktivierenden Proteine, dh. sie erhöhen deren intrinsische GTPase-Aktivität (Booden et al., 2002; Hart et al., 1998; Kozasa et al., 1998; Siderovski & Willard, 2005). Alle oben genannten RhoGEFs werden durch die Interaktion mit aktivierten Ga-Untereinheiten heterotrimerer G-Proteine stimuliert. Damit stellen sie entscheidende Knotenpunkte bei der Verbindung von Signalwegen dar, die durch heterotrimere G-Proteine und RhoGTPasen reguliert werden (Rossman & Sondek, 2005). Die RhoGEFs p115RhoGEF und PDZRhoGEF werden ausschließlich durch $G\alpha_{12/13}$ aktiviert (Fukuhara et al., 2001; Bhattacharyya et al., 2009; Chen et al., 2008). Für LARG liegen dagegen Hinweise auf eine Aktivierung sowohl durch $G\alpha_{12/13}$ als auch durch $G\alpha_{\alpha/11}$ vor (Tanabe et al., 2004; Kreutz et al., 2007; Sagi et al., 2001; Booden et al., 2002; Vogt et al., 2003). p63RhoGEF wird spezifisch durch $G\alpha_{q}$ und $G\alpha_{11}$ aktiviert (Lutz et al., 2005). GPCRs, die Aktinpolymerisation, Gentranskription oder Zellwachstum durch Rhoabhängige Signalwege regulieren, sind in der Lage an verschiedene G-Proteine verschiedener Subfamilien heterotrimerer G-Proteine zu koppeln (Sah et al., 2000). Die meisten GPCR-Agonisten, die Rho aktivieren, tun dies über $G\alpha_q$ -vermittelte Signalwege (Sah *et al.*, 2000). Die Aktivierung von $G\alpha_i$ hat dagegen keinen direkten Einfluss auf Rhoabhängige Signalwege. So konnte gezeigt werden, dass die Expression von konstitutivaktivem Gai in COS-7-Zellen zu keiner Zunahme der Mengen an aktiviertem Rho führt (Kranenburg *et al.*, 1999). Dagegen resultiert die heterologe Expression von $G\alpha_{12}$ und $G\alpha_{13}$ in einer Aktivierung von RhoA und nachfolgenden Effekten, wie der Ausbildung von Aktinstressfasern und Veränderung der Gentranskription (Sternweis et al., 2007).

1.5 Chemokine und Chemokinrezeptoren

1.5.1 Einteilung

Der Begriff Chemokin ist als Fusion aus *chemotactic* und *cytokine* entstanden, da alle *ca*. 50 Chemokine chemotaktische Aktivität und funktionelle Ähnlichkeiten mit den Cytokinen aufweisen (Baggiolini, 2001). Wie Cytokine spielen auch Chemokine eine wichtige Rolle bei Entzündungsreaktionen und bei der Immunantwort (Barreiro *et al.*, 2010). Im

Gegensatz zu Cytokinen weisen Chemokine geringere molekulare Massen von 8-10 kDa auf und entfalten ihre Funktion durch die Interaktion mit G-Protein-gekoppelten Rezeptoren, die als Chemokinrezeptoren bezeichnet werden (Murphy et al., 2000). Nach ihrer Synthese werden die meisten Chemokine sekretiert. Eine Ausnahme stellen Fraktalkin (CX₃CL1) und CXCL16 dar, die an die Zelloberfäche gebunden vorliegen (Allen et al., 2007). Chemokine kontrollieren immunologische und inflammatorische Prozesse, indem sie die gerichtete Migration leukozytärer und nicht leukozytärer Zellen stimulieren und eine Vielzahl anderer zellulärer Funktionen regulieren (Olson & Ley, 2002; Xia & Frangogiannis, 2007). Chemokine setzen sich aus etwa 70-130 Aminosäuren zusammen und in ihren Aminosäuresequenzen finden sich charakteristische, konservierte Cysteine (Baggiolini et al., 1994; Baggiolini et al, 1997), die untereinander Disulfidbrücken (Cys1-Cys3 und Cys2-Cys4) ausbilden. Auf diese Weise nehmen Chemokine ihre funktionell aktive, dreidimensionale Struktur ein. Entsprechend der Anzahl und der Anordnung der Cysteine im aminoterminalen Abschnitt werden die Chemokine in vier Familien eingeteilt: CXC-, CC-, C-, und CX₃C-Chemokine (Rollins, 1997). Im Jahr 2000 wurde ein neues Nomenklatursystem für Chemokine und Chemokinrezeptoren eingeführt, in dem die Liganden entsprechend ihrer Zugehörigkeit zu einer dieser vier Chemokinfamilien systematisch benannt wurden (Bacon et al., 2002; Murphy et al., 2000). So wird z.B. monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1) nun mit CCL2, also als Ligand Nummer 2 der CC-Chemokinfamilie bezeichnet. Dementsprechend wird der Rezeptor für CCL2 mit CCR2 abgekürzt, wobei das R für Rezeptor steht. Bei den Chemokinen der CXC-Chemokinfamilie sind die ersten beiden Cysteine durch eine Aminosäure getrennt, wohingegen sie bei den CC-Chemokinen direkt nebeneinander liegen (Murphy et al., 2000). Zur Familie der CC-Chemokine gehören z.B. RANTES (regulated on activation, normal T cell expressed and secreted/CCL5), MIP-1a (macrophage inflammatory protein-1a/CCL3) und MCP-1 (monocyte chemoattractant protein-1/CCL2). Bekannte Vertreter der CXC-Familie sind Interleukin-8 (IL-8/CXCL8) und stromal cell-derived factor-1 (SDF-1/CXCL12). Die CX₃C-Chemokinfamilie wird bis jetzt nur durch ein einziges Familienmitglied repräsentiert, dem Fraktalkin (CX₃CL1) (Murphy et al., 2000). Im Fall von Fraktalkin sind die ersten beiden Cysteine durch drei Aminosäuren getrennt (Bazan et al., 1997). Im Gegensatz zu den anderen Chemokinen kommt Fraktalkin sowohl als transmembranäres Molekül auf der Zelloberfläche als auch als sekretiertes Protein vor (Umehara et al., 2004). Die C-Chemokine besitzen als einzige der vier Chemokinfamilien nicht das typische Muster aus den vier konservierten Cysteinen. So weist das einzige bekannte Mitglied der C-Chemokin-Familie Lymphotaktin (XCL1) (Kelner *et al.*, 1994) nur zwei konservierte Cysteine auf, die den zweiten und vierten Cysteinen im Aminoterminus der Chemokine der anderen drei Familien entsprechen (Olson & Ley, 2002).

Die Rezeptoren für Chemokine gehören zur großen Gruppe der GPCR-Familie A (rhodopsin-like Familie) (Fredriksson et al., 2003) und besitzen den typischen Aufbau aus sieben transmembranären Domänen, einem extrazellulären aminoterminalen und einem intrazellulären carboxylterminalen Abschnitt. Trotz dieser strukturellen Übereinstimmungen mit 7TM-Rezeptoren weisen Chemokinrezeptoren einige strukturelle Besonderheiten auf. So haben sie im Vergleich zu anderen heptahelicalen Rezeptoren, wie Geschmacks- oder Photorezeptoren nur eine geringe molekulare Masse, da sie nur einen sehr kurzen dritten intrazellulären loop und einen kurzen aminoterminalen Abschnitt besitzen (Van Coillie et al., 1999). Charakteristisch für Chemokinrezeptoren ist außerdem die konservierte Aminosäuresequenz DRYLAIV im zweiten intrazellulären loop (Gerard & Gerard, 1994; Murphy, 1994). Dieses Motiv spielt eine entscheidende Rolle bei der Regulation der verschiedenen Konformationszustände der Chemokinrezeptoren (Rovati et al., 2007). Mutationen innerhalb dieses Motivs resultieren häufig in einer Veränderung der Rezeptoraktivität (Rovati et al., 2007; Mellado et al, 1998). Chemokinrezeptoren interagieren mit Chemokinen und leiten daraufhin ein Signal weiter, das bei allen Chemokinrezeptoren – beinahe schon per Definition – in der Stimulation der Zellmigration besteht (Thelen, 2001). Die meisten Chemokinrezeptoren können von verschiedenen, aber verwandten Chemokinen aktiviert werden (Van Coillie et al., 1999; Mantovani, 1999). Entsprechend der bevorzugten Interaktion mit einem oder mehreren Mitgliedern einer dieser Chemokin-Subfamilien unterscheidet man bei den Chemokinrezeptoren elf CC-Rezeptoren, sechs CXC-Rezeptoren, sowie jeweils einen XC- und CX₃C-Rezeptor (Olson & Ley, 2002). Chemokinrezeptoren werden vor allem in Leukozyten exprimiert, aber einige finden sich auch auf Endothel- und Epithelzellen, auf Neuronen und auf Mikrogliazellen des zentralen Nervensystems (Hadley et al., 1994; Gupta et al., 1998; Horuk et al., 1997; Salcedo et al., 1999; He et al., 1997). Die ersten Untersuchungen zur Chemokin-induzierten Signalübertragung wurden an humanen Neutrophilen durchgeführt, die mit IL-8 (CXCL8) stimuliert worden waren. Hier zeigte sich, dass eine Vorbehandlung der Zellen mit Bordetella pertussis-Toxin in einer Inhibition, der durch IL-8 induzierten zellulären Antwort resultiert. Diese Beobachtung führte zu dem Schluss, dass IL-8-

Rezeptoren an G-Proteine der Gai/o-Familie koppeln, was wie sich in weiteren Untersuchungen herrausstellte für alle Chemokinrezeptoren gilt (Thelen *et al.*, 1988; Baggiolini, 2001). In Leukozyten scheint ausschließlich $G\alpha_{i2}$ für die Signalübertragung durch Chemokinrezeptoren verantwortlich zu sein (Kehrl, 2006). Nach der Aktivierung des Rezeptors dissoziieren die G α - und G $\beta\gamma$ -Untereinheiten des G-Proteins und aktivieren nachgeschaltete Signalwege, wobei nicht die G α -Untereinheit, sondern der G $\beta\gamma$ -Komplex eine wichtige Rolle bei der Regulation der Zellmigration zu spielen scheint (Neptune et al., 1997; Neptune et al., 1999). Dieser G\u00e3\u00e3-Komplex aktiviert durch direkte Interaktion Phospholipase C- β_2 (PLC β_2) und Phospholipase C- β_3 (PLC β_3), die dann die Bildung von Inositol-1,4,5-trisphosphat katalysieren und damit zu einer vorübergehenden Erhöhung der intrazellulären freien Ca²⁺-Konzentration führen (Thelen, 2001). In letzter Zeit mehren sich die Hinweise, dass Chemokinrezeptoren neben Proteinen der Gailo-Familie auch an Mitglieder der Gα_a-Familie koppeln (Thelen & Stein, 2008; Molon et al., 2005). So scheint die CXCR4- und CCR7-vermittelte Chemotaxis von dendritischen Zellen neben der Aktivierung von $G\alpha_i$ - zusätzlich die Aktivierung von $G\alpha_q$ -abhängigen Signalwegen zu benötigen (Shi et al., 2007).

1.5.2 CCR2-Chemokinrezeptoren

Die CCR2-Chemokinrezeptoren wurden 1994 zum ersten Mal von Charo et al. in human acute monocytic leukemia cells 6 (Mono Mac 6)-Zellen identifiziert (Charo et al., 1994). Im Menschen wurden die zwei CCR2-Isoformen hCCR2a und hCCR2b identifiziert, deren mRNAs durch einen alternativen Spleißvorgang aus der hnRNA eines einzelnen Gens beiden CCR2-Isoformen unterscheiden sich hervorgehen. Die nur in ihren carboxylterminalen, intrazellulär gelegenen Abschnitten (Sanders et al., 2000). So sind die Aminosäuresequenzen von CCR2a und CCR2b bis einschließlich Aminosäure 313 identisch. CCR2a ist mit 374 Aminosäuren um 14 Aminosäuren länger, als CCR2b. Die CCR2-Rezeptoren werden hauptsächlich von T-Gedächtniszellen, Lymphozyten, Monozyten, dendritischen Zellen, B-Zellen und basophilen Granulozyten, sowie Endothelzellen und vaskulären, glatten Muskelzellen exprimiert (Navratilova, 2006; Stamatovic et al., 2003; Gálvez et al., 2005; Spinetti et al., 2004). Unter speziellen Bedingungen können auch neutrophile Granulozyten CCR2 exprimieren (Yoshie et al., 2001; Murphy et al., 2000). In welchem Mengenverhältnis die beiden Varianten in den verschiedenen humanen Zellen vorkommen ist kaum untersucht. In Monozyten scheint CCR2b die vorherrschende Form zu sein (Wong *et al.*, 1997). Darüber hinaus haben Untersuchungen an stabil transfizierten Zelllinien gezeigt, dass mehr CCR2b-, als CCR2a-Rezeptoren auf der Zelloberfläche nachzuweisen sind (Wong *et al.*, 1997). Weitere Untersuchungen haben Hinweise darauf geliefert, dass die CCR2-Varianten Unterschiede im *trafficking*, der subzellulären Lokalisation und der Signalübertragung aufweisen (Wong *et al.*, 1997; Sanders *et al.*, 2000; Kuang *et al.*, 1996; Arai & Charo, 1996).

Für beide CCR2-Rezeptoren wurde gezeigt, dass sie alle vier humanen MCP (monocyte chemoattractant protein)-Chemokine (Gong et al., 1997; Wain et al., 2002): MCP-1 (CCL2), MCP-2 (CCL8), MCP-3 (CCL7) und MCP-4 (CCL13) binden. Den Namen monocyte chemoattractant proteins verdankt diese Gruppe von verwandten Chemokinen ihrer Eigenschaft, Monozyten zu bakteriellen Infektionsorten und in verletzte Gewebe zu rekrutieren (Charo & Ransohoff, 2006). Die CCR2-Rezeptoren sind die einzigen bekannten Rezeptoren für MCP-1 und MCP-4 (Charo, 1999; Charo & Peters, 2003). Dagegen bindet MCP-2 sowohl an CCR2-Rezeptoren als auch an CCR5 und MCP-3 sowohl an CCR2 als auch an CCR1 und CCR3 (Charo & Ransohoff, 2006). MCP-1 wurde als erstes humanes CC-Chemokin entdeckt und ist das am besten untersuchte (Van Coillie et al., 1999; Deshmane et al., 2009). MCP-1 (CCL2) wird von einer Vielzahl verschiedener Zellen, wie Fibroblasten, Gefäßendothelzellen, glatten Muskelzellen und Monozyten/Makrophagen als Anwort auf proinflammatorische Stimuli exprimiert (Hall et al., 1989; Cushing et al., 1990; Rollins et al., 1990; Deshmane et al., 2009). Zu den Stimuli, die die Bildung von MCP-1 auslösen, zählen unter anderem Cytokine (Lee et al., 2004), Wachstumsfaktoren (Distler et al., 2001; Jost et al., 2003) und Lipopolysaccharide (Arndt et al., 2004). Die Bedeutung der Expression von MCP-1 (CCL2) und CCR2-Rezeptoren für die Chemotaxis von Zellen, wurde zuerst für Monozyten/Makrophagen beschrieben (Valente et al., 1988; Yoshimura et al., 1989; Matsushima et al., 1989). Daneben reguliert dieses Chemokin/Chemokinrezeptorpaar auch die gerichtete Migration einer Reihe weiterer Zelltypen, wie die von unreifen dendritischen Zellen (Sallusto et al., 1998), basophilen Granulozyten (Kuna et al., 1993), natürlichen Killerzellen (Allavena et al., 1994; Loetscher et al., 1996), T-Lymphozyten (Loetscher et al., 1994; Carr et al., 1994), T-Gedächtnis/T-Effektor-Zellen (Carr et al., 1994), Endothelzellen und vaskulären, glatten Muskelzellen (Mehrad et al., 2007; Keeley et al., 2008; Lo et al., 2005). Zahlreiche pathophysiologische Effekte, die auf der Aktivität der CCR2-Rezeptoren und MCP-1

beruhen, sind auf deren Funktion bei der Regulation der Zellmigration von Immunzellen zurückzuführen. So ist bekannt, dass dem Chemokin/Chemokinrezeptorpaar MCP-1/CCR2 eine wichtige Rolle bei der Ausbildung verschiedener chronischer Entzündungen, wie Asthma bronchiale und Atherosklerose zukommt (Baggiolini, 1998; Gonzalo et al., 1998; Lukacs et al., 1999; Bursill et al., 2004; Cybulsky et al., 2004). Verschiedene Tiermodelle ermöglichten weitere Einblicke in die biologische Funktion von MCP-1/CCR2 in vivo. Experimente mit MCP-1-defizienten Mäusen zeigten, dass MCP-1 (CCL2) eine zentrale Rolle bei der Regulation der Einwanderung von Monozyten in entzündetes Gewebe bei verschiedenen inflammatorischen Erkrankungen spielt (Daly & Rollins, 2003). MCP-1und CCR2-defiziente Mäuse reagieren auf ein breites Spektrum verschiedener Stimuli mit einer verminderte Monozyteneinwanderung in praktisch alle Gewebe (Charo & Peters, 2003). Auf eine Beteiligung von MCP-1 (CCL2) bei der Entstehung von frühen atherosklerotischen Läsionen lässt ein Mausmodell schließen, für das CCR2-defiziente Mäuse mit Apolipoprotein (Apo) E-defizienten-Mäusen verkreuzt wurden. Diese ApoEdefizienten-Mäuse sind ein beliebtes Modell für die Erforschung atherosklerotischer Veränderungen, da diese Tiere auch bei normaler Ernährung (chow diet) dazu neigen spontan atherosklerotische Läsionen auszubilden. Füttert man die ApoE-defizienten Mäuse mit einer western high fat diet, so wird der Vorgang der Läsionsbildung noch beschleunigt (Meir & Leitersdorf, 2004). Das Fehlen von CCR2 in den ApoE-defizienten Mäusen führt dazu, dass sich weniger Monozyten/Makrophagen in der Gefäßwand finden und sich insgesamt deutlich kleinere atherosklerotische Läsionen im Vergleich zu Mäusen ausbilden, die die CCR2-Rezeptoren besitzen (Boring et al., 1998; Dawson et al., 1999).

1.6 Tumorprotein D52 (TPD52)

Die humane *tumor protein* 52 (TPD52)-Genfamilie umfasst die vier Gene: hD52 oder PrLZ (Byrne *et al.*, 1995; Wang *et al.*, 2004), hD53 (Byrne *et al.*, 1996; 1998a), hD54 (Byrne *et al.*, 1998b; Nourse *et al.*, 1998) und hD55 (Cao *et al.*, 2006). Für das humane TPD52-kodierende Gen D52 war in ~ 40 % aller Brustkarzinome eine Überexpression beobachtet worden (Byrne *et al.*, 1995). Nachfolgende Untersuchungen zeigten, dass eine Überexpression von hD52-Transkripten auch in Karzinomen der Lunge (Chen *et al.*, 1996; Zhu *et al.*, 2007), der Prostata (Wang *et al.*, 2004; Dhanasekaran *et al.*, 2001; Rubin *et al.*, 2005)

nachzuweisen ist. TPD52-cDNAs wurden auch in der Maus (Byrne et al, 1996), dem Hasen (Parente et al., 1996) und der japanischen Wachtel (Proux et al., 1996) gefunden. Die D52-ähnlichen Sequenzen von Säugetieren kodieren alle für kleine hydrophile Polypeptide mit einer Länge zwischen 180 und 200 Aminosäuren (Byrne et al., 1996; Nourse et al., 1998). Die Proteine der TPD52-Familie weisen einige strukturelle Gemeinsamkeiten auf. So besitzen sie am amino- und carboxylterminalen Ende PEST (reich an Prolin (<u>P</u>), Glutaminsäure (<u>E</u>), Serin (<u>S</u>) und Threonin (<u>T</u>))-Sequenzen, die eine Rolle bei der Regulation der Proteinstabilität spielen (Byrne et al., 1996). Außerdem findet sich in der Aminosäuresequenz der TPD52-ähnlichen Proteine ein etwa 50 Aminosäuren umfassendes coiled coil-Motiv. Über diese coiled coil-Domäne können die D52-ähnlichen Proteine untereinander Homo- und Heterodimere ausbilden und auch mit anderen Proteinen interagieren (Byrne et al., 1998b; Proux et al., 1996; Chen et al., 1997; Proux-Gillardeaux et al., 2003). Im zentralen Bereich des Proteins, der auch das coiled coil-Motiv umfasst, weisen die Aminosäuresequenzen der einzelnen TPD52-Familienmitglieder größere Übereinstimmungen auf. Dagegen unterscheiden sie sich in den carboxylterminalen Bereichen (Byrne et al., 1996; Nourse et al., 1998). Obwohl nur wenige Erkenntnisse zu den biologischen Funktionen von TPD52 vorliegen, deuten die Befunde mehrerer Arbeitsgruppen darauf hin, dass die Proteine dieser Familie eine Rolle bei der Regulation des Vesikeltransports und der Sekretion durch Exozytose spielen (Boutros et al., 2004). Auch zahlreiche Interaktionspartner von TPD52 und TPD53 darunter MAL2 (Wilson et al., 2001), Annexin VI (Thomas et al., 2002) und die SNARE (*N-ethylmaleimide-sensitive fusion protein attachment protein receptor*)-Proteine Syntaxin 1 und Synaptobrevin 2 (oder VAMP2, vesicle-associated membran protein 2) (Proux-Gillardeaux et al., 2003) werden mit Membran-trafficking und lipid rafts in Verbindung gebracht (de Marco et al., 2002; Babiychuk et al., 1999; Chamberlain et al., 2001). Für CSPP28, dem Orthologen des humanen TPD52-Proteins im Kaninchen wurde gezeigt, dass es bei cholinerger Stimulation von Zellen der Magenwand Ca²⁺-abhängig phosphoryliert wird (Parente et al., 1996). Auch das TPD-Ortholog der Ratte (CRSHP28) wird als Antwort auf Stimulation von azinösen Pankreaszellen mit Cholezystokinin an Serinresten phosphoryliert. In diesen Zellen scheint CRSHP28 eine Rolle bei der exozytotischen Sekretion von Verdauungsenzymen zu spielen (Groblewski et al., 1996; Thomas et al., 2002). Darüber hinaus deuten Untersuchungen auf eine Rolle von TPD52-ähnlichen Proteinen bei der Regulation der Proliferation, des Zellzyklus und der Apoptose hin (Byrne *et al.*, 1996; Proux *et al.*, 1996; Boutros *et al.*, 2003; Boutros & Byrne, 2005; Cho *et al.*, 2004).

1.7 Ziele der Arbeit

Chemokine und ihre Rezeptoren, darunter die Chemokinrezeptoren CCR2a und CCR2b, spielen eine zentrale Rolle bei der Regulation der Migration von Leukozyten und kontrollieren auf diese Weise immunologische und inflammatorische Prozesse. Die humanen CCR2-Rezeptorvarianten entstehen durch einen alternativen Spleißvorgang und unterscheiden sich nur bezüglich der Aminosäuresequenz und der Länge ihrer carboxylterminalen, intrazellulären Abschnitte. Die beiden CCR2-Rezeptoren werden durch vier verschiedene CC-Chemokine (MCP-1/CCL2, MCP-2/CCL8, MCP-3/CCL7, MCP-4/CCL13) aktiviert. Die von diesen Chemokinen induzierten Signale werden durch eine Interaktion der aktivierten CCR2-Rezeptoren mit Pertussistoxin-sensitiven, wie Mitgliedern der $G\alpha_{i/o}$ -Familie und -insensitiven heterotrimeren G-Proteinen, wie Mitgliedern der Gα_q-Familie auf intrazelluläre Effektoren übertragen. Zu den von CCR2-Rezeptoren aktivierten Effektoren zählen z.B. Phospholipase C-β-Isoenzyme und Phosphoinositid-3-Kinasen, aber auch Transkriptionsfaktoren, wie nuclear factor- κB (NFκB) und activator protein-1(AP-1). Über die Interaktion von CCR2a und CCR2b mit Pertussistoxin-insensitiven heterotrimeren G-Proteinen und deren Bedeutung für die Regulation leukozytärer Funktionen ist bis jetzt wenig bekannt und Untersuchungen anderer Arbeitsgruppen in rekonstituierten Systemen lieferten widersprüchliche Ergebnisse zur Beteiligung von Pertussistoxin-insensitiven G-Proteinen an der CCR2-vermittelten Signaltransduktion. In vorausgehenden Untersuchungen der Arbeitsgruppe konnte bereits gezeigt werden, dass die Stimulation von hCCR2a- oder hCCR2b-exprimierenden COS-7-Zellen zu einer Aktivierung des Transkriptionsfaktors serum response factor (SRF) führt. Im Rahmen der vorliegenden Arbeit sollte der Frage nachgegangen werden, ob die humanen CCR2-Rezeptoren, hCCR2a und hCCR2b, die SRF-abhängige Gentranskription gleichermaßen stimulieren und, wenn ja, welche Bedeutung Pertussistoxin-insensitive heterotrimere G-Proteine für die Aktivierung der SRF-Aktivität durch hCCR2-Rezeptoren haben. Des Weiteren sollte untersucht werden, ob die hCCR2-induzierte SRF-Aktivität durch Stimulation von Rho-Guaninnukleotidaustauschfaktoren (Rho guanine nucleotide exchange factors, RhoGEFs) und spezifischen RhoAGTPasen vermittelt wird.

Neben der Kopplung von GPCRs an heterotrimere G-Proteine sind auch Interaktionen der GPCRs mit Nicht-G-Proteinen bekannt. In vorausgegangenen Untersuchungen der Arbeitsgruppe war mittels des yeast-two-hybrid-Systems mit dem Tumorprotein D52 (TPD52) ein solcher Nicht-G-Protein-Interaktionspartner identifiziert worden. Interessanterweise interagiert TPD52 mit Bereichen der Helix 8 in den carboxylterminalen Abschnitten beider hCCR2-Rezeptoren, für die bekannt ist, dass sie für die Bindung von heterotrimeren G-Proteinen und somit für die Rezeptor-vermittelte Signaltransduktion von Bedeutung ist. Um einen tieferen Einblick in die Rezeptor-nahe Signaltransduktion der hCCR2-Rezeptoren und deren Regulation durch den Nicht-G-Protein Interaktionspartner TPD52 zu gewinnen, sollte im Rahmen der Arbeit auch der Frage nachgegangen werden, ob und, wenn ja, welchen Einfluss TPD52 auf die von hCCR2-Rezeptoren durch Kopplung an spezifische G-Proteine induzierten zellulären Funktionen hat. Die funktionelle Bedeutung der in der Helix 8 der hCCR2-Rezeptoren gelegenen TPD52- und/oder G-Protein-Interaktionsstelle, für die durch hCCR2-Rezeptoren regulierten zellulären Funktionen, sollte unter Verwendung von Rezeptormutanten analysiert werden.

2 Material

2.1 Chemikalien

Acrylamid-Lösung 30 % 4K Mix Adefo Entwickler/Fixierer RTU60 Agar Agar Serva high gel-strength Agarose Ameisensäure Amersham[™] ECL[™] Ammoniumformiat Ammoniumpersulfat Ampicillin, Natrium-Salz Aprotinin (Trasylol[®]) Bacto Yeast Extract Bacto-Trypton Benzamidin Borax (Decahydrat) Bromphenolblau BSA Fraktion V Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) Dowex 1 x 8 resin, 100 x 200 mesh, Cl⁻ form EDTA, Dinatriumsalz Ethidiumbromid Fötales Kälberserum Glycerin Glycin HEPES HEPES (für Zellkultur) Immunglobulin G, (IgG) Kaninchen Immunglobulin G, (IgG) Maus Kanamycin Lambda DNA/EcoRI + Hind III Marker

AppliChem, Darmstadt Adefo-Chemie GmbH, Dietzenbach Serva Electrophoresis, Heidelberg Invitrogen GmbH, Karlsruhe Roth, Karlsruhe **GE** Healthcare Fluka, Buchs, Schweiz Serva - Bioproducts, Heidelberg Sigma, Deisenhofen Bayer, Leverkusen Serva - Electrophoresis, Heidelberg Becton Dickinson, Heidelberg Sigma-Aldrich, Deisenhofen Sigma, Deisenhofen Serva - Electrophoresis, Heidelberg Serva - Electrophoresis, Heidelberg GIBCO[®]Invitrogen Cell Culture, Karlsruhe Sigma-Aldrich, Steinheim Merck, Darmstadt AppliChem, Darmstadt GIBCO[®]Invitrogen Cell Culture, Karlsruhe Roth, Karlsruhe AppliChem, Darmstadt Roth, Karlsruhe PAA Laboratories GmbH, Cölbe Sigma, Deisenhofen Sigma, Deisenhofen Serva Elektrophoresis, Heidelberg MBI Fermentas, St. Leon-Rot

Lithiumchlorid	Merck, Darmstadt
Leupeptin	Serva Electrophoresis, Heidelberg
L-Glutamin	PAA Laboratories GmbH,
	Pasching Österreich
β-Mercaptoethanol	Roth, Karlsruhe
Natriumdodecylsulfat (SDS)	Serva - Electrophoresis, Heidelberg
Natriumformiat	Fluka, Neu-Ulm
Natriumpyruvat	PAA Laboratories GmbH,
	Pasching Österreich
OptiMEM [®] I	GIBCO [®] Invitrogen Cell Culture, Karlsruhe
Penicillin/Streptomycin (100x)	PAA Laboratories GmbH,
	Pasching Österreich
Pepstatin A	Serva Electrophoresis, Heidelberg
PMSF	Sigma, Deisenhofen
Ponceau S-Konzentrat	Sigma, Deisenhofen
Pyronin Y	Sigma, Deisenhofen
Salzsäure 37 %	VWR, BDH PROLABO®
Skim Milk Powder (Magermilchpulver)	Fluka, Neu-Ulm
Szintillationsflüssigkeit Quicksafe A	Zinser Analytic, Frankfurt
TEMED	Serva - Electrophoresis, Heidelberg
Tris (ultrarein)	USB Corporation, Ohio, USA
Trypanblau	Merck, Darmstadt
Trypsin/EDTA-Lösung	PAA Laboratories GmbH, Linz Österreich
Trypsininhibitor aus Sojabohnen (STI)	Fluka, Neu-Ulm
Tween [®] 20	Sigma, Deisenhofen
Yeast Extract SERVABACTER [®]	Serva - Electrophoresis, Heidelberg

Alle verwendeten und hier nicht aufgeführten Chemikalien, Biochemikalien und Lösungsmittel wurden in p. a.-Qualität von Merck (Darmstadt), Riedel-de Haen (Seelze) oder Roth (Karlsruhe) bezogen.

2.2 Radioaktiv markierte Chemikalien

$D-myo-[2-^{3}H(N)]-Inositol (370-925 GBq/mmol)$	Amersham, Freiburg
¹²⁵ Iod-MCP-1 (~ 74 TBq/mmol)	Amersham, Freiburg

2.3 Emzyme, Kits und Nukleinsäuren

ABI PRISM[®] BigDye[®]

Terminator v1.1 Cycle Sequencing Kit Desoxynukleosidtriphosphat-Set Dual-Luciferase[®]Reporter Assay System Passive Lysis Puffer (5x) Low molecular weight marker LMW-Marker Nucleobond[™] AX PC-Kit-100 Nucleospin[™]-Kit Phusion[™] *High-Fidelity* Polymerase Lipofectamine[™] 2000 Reagent QIAquick[®] Gel Extraction Kit *QuikChange*[™] *Site-Directed Mutagenesis* Kit Restriktionsendonukleasen Taq-DNA-Polymerase Terminator Cycle Sequencing Kit **T4-DNA-Ligase** Zero Blunt[®]PCR Cloning Kit

Applied Biosystems, Weiterstadt Boehringer, Mannheim Promega, Madison, USA Promega, Madison. USA Sigma, Deisenhofen Macherey-Nagel, Düren Macherey-Nagel, Düren Finnzymes, Espoo, Finnland Invitrogen, Karlsruhe Qiagen, Hilden Stratagene, Heidelberg MBI Fermentas, St. Leon-Rot Sigma, Deisenhofen Perkin-Elmer, Weiterstadt New England Biolabs, Frankfurt Invitrogen, Karlsruhe

2.4 Verbrauchsmaterial

Agfa Cronex5 Medical X-Ray Film Blotpapier GB002 Reagiergefäße (1,5 ml, 39 x 10,8 mm Ø, farblos) Spritzen (1 ml, 10 ml, 20 ml) Agfa-Gevaert N.V., Mortsel, Belgien Schleicher & Schuell, Dassel Sarstedt, Nürnberg Becton Dickinson, Heidelberg

Spritzenfilter Millex [®] -GS (0,22 μm)	Millipore Corporation Bedford, USA
Spritzenfilter Millex [®] -HA (0,45 µm)	Millipore Corporation Bedford, USA
Szintillationsröhrchen (20ml)	Perkin-Elmer, Rodgau-Jügesheim
96-Loch-Testplatte	$\mathrm{NUNC}^{^{\mathrm{TM}}}$ black microwell SH
Whatman [®] Protran [®] Nitrozellulose	Sigma-Aldrich [®]
Zellkulturschalen, \varnothing 100 mm	Renner, Dannstadt
6-/24-Loch-Zellkultur-Testplatten	Renner, Dannstadt
48-Loch –Zellkultur-Testplatten	Greiner, Kremsmünster, Österreich

2.5 Pro- und eukaryotische Zellstämme

COS-7 (African green monkey kidney cells-7;	American Type Culture Collection (ATCC),
ATCC:CLR-1651)	Rockville, USA. Von der Abteilung
	Virologie, Universität Ulm zur Verfügung
	gestellt.
HEK293 (human fetal kidney cells)	American Type Culture Collection (ATCC),
	Rockville, USA
Escherichia coli DH5α	Clontech/ITC Biotechnology, Heidelberg
Escherichia coli XL1-Blue Supercompetent Cells	Stratagene, Heidelberg

2.6 Plasmide

pCR [®] -Blunt	Invitrogen, Karlsruhe
pcDNA3.1(+)	Invitrogen, Karlsruhe

2.7 Verwendete Plasmid-DNA-Konstrukte

Folgende DNA-Konstrukte waren entweder in der Arbeitsgruppe bereits vorhanden oder wurden selbst hergestellt und für die Experimente in dieser Arbeit verwendet: $G\alpha_{q-EE}$, $G\alpha_{11-EE}$, $G\alpha_{14-EE}$, $G\alpha_{16-EE}$, $G\alpha_{i2-EE}$ -pcDNA3.1(+) Flag-CCR2b(WT)-pcDNA3.1(+) Flag-CCR2b- AlaninMut-pcDNA3.1(+) HA-CCR2b-1 Δ -pcDNA3.1(+) HA-CCR2a(WT)-pcDNA3.1(+) HA-CCR2a-AlaninMut-pcDNA3.1(+) Myc-RGS2-pcDNA3.1(+)

```
Myc-TPD52-pcDNA3.1(+)

Myc-FROUNT-pcDNA3.1(+)

PLC\beta_1CT-pcDNA3.1(+)

PLC\beta_2-pcDNA3.1(+)

p63RhoGEF-pcDNA3.1(+)

p63RhoGEF-PH-pcDNA3.1(+)

C3-Exoenzym-pCis-2

pSRE.L

pRL-TK
```

UMR cDNA Resource Center, Rolla, USA Dr. M. Oppermann, Göttingen Dr. B. Möpps, Ulm

Dr. B. Möpps, Ulm Dr. B. Möpps, Ulm Dr. B. Möpps, Ulm/Dr. T. Wieland, Heidelberg Dr. B. Möpps Dr. B. Möpps, Ulm Dr. B. Möpps, Ulm Dr. B. Möpps, Ulm Dr. T. Wieland, Heidelberg Dr. T. Wieland, Heidelberg Dr. T. Wieland, Heidelberg Dr. T. Wieland, Heidelberg Dr. D. Wu, New Haven, CT Promega, Madison, USA

2.8 Oligonukleotide

Die folgenden Oligonukleotide wurden von der Firma Thermo Electron Corporation, Ulm bezogen.

······································	8
pcDNA 3.1-reverse:	5'-TAG AAG GCA CAG TCG AGG-3'
pcDNA 3.1-universe:	5'-TAA TAC GAC TCA CTA TAG GG-3'
pCR Blunt-reverse:	5'-CAG GAA ACA GCT ATG AC-3'
pCR Blunt-universe:	5'-GTA AAA CGA CGG CCA G-3'

2.8.1 Vektor-spezifische Oligonukleotide
2.8.2 Oligonukleotide für in vitro DNA-Mutagenese des hCCR2b-

Oktapeptids

CCR2b-8A-sense: 5'-CT CAC TGC TGC ATC AAT CCC ATC ATC TAT GCC GCC GCT GCG GCG GCG GCC GCA AGG TAT CTC TCG GTG TTC TTC CG-3'

CCR2b-8A-antisense: 5'-CG GAA GAA CAC CGA GAG ATA CCT TGC GGC CGC CGC CGC AGC GGC GGC ATA GAT GAT GGG ATT GAT GCA GCA GTG AG-3'

CCR2b-5A-sense: 5'-CCC ATC ATC TAT GCC TTC GTT GCG GCG GCG GCC GCA AGG TAT CTC TCG GTG TTC TTC CG-3'

CCR2b-5A-antisense: 5'-CG GAA GAA CAC CGA GAG ATA CCT TGC GGC CGC CGC CGC AAC GAA GGC ATA GAT GAT GGG-3'

CCR2b-4A-sense: 5'-CT CAC TGC TGC ATC AAT CCC ATC ATC GCT GCC GCC GCT GGG GAG AAG TTC AGA AGG -3'

CCR2b-4A-antisense: 5'-CCT TCT GAA CTT CTC CCC AGC GGC GGC AGC GAT GAT GGG ATT GAT GCA GCA GTG AG-3'

CCR2b-3A-sense: 5'- CT CAC TGC TGC ATC AAT CCC ATC ATC TAT GCC TTC GCT GGG GCG AAG TTC GCA AGG TAT CTC TCG GTG TTC TTC CG-3'

CCR2b-3A-antisense: 5'-CG GAA GAA CTC CGA GAG ATA CCT TGC GAA CTT CGC CCC AGC GAA GGC ATA GAT GAT GGG ATT GAT GCA GCA GTG AG-3'

CCR2b-1Aa-sense: 5'-GC ATC AAT CCC ATC ATC TAT GCC TTC GCT GGG GAG AAG TTC AGA AGG TAT CTC-3'

CCR2b-1Aa-antisense: 5'-GAG ATA CCT TCT GAA CTT CTC CCC AGC GAA GGC ATA GAT GAT GGG ATT GAT GC-3'

CCR2b-1Ab-sense: 5'-CCC ATC ATC TAT GCC TTC GTT GGG GCG AAG TTC AGA AGG TAT CTC TCG-3'

CCR2b-1Ab-antisense: 5'-CGA GAG ATA CCT TCT GAA CTT CGC CCC AAC GAA GGC ATA GAT GAT GGG-3'

CCR2b-1Ac-sense: 5'-C GTT GGG GAG AAG TTC GCA AGG TAT CTC TCG GTG-3'

CCR2b-1Ac-antisense: 5'-CAC CGA GAG ATA CCT TGC GAA CTT CTC CCC AAC G-3'

CCR2b-2Aa-sense: 5'-GC ATC AAT CCC ATC ATC TAT GCC TTC GCT GGG GCG AAG TTC AGA AGG TAT CTC TCG GTG-3'

CCR2b-2Aa-antisense: 5'-CAC CGA GAG ATA CCT TCT GAA CTT CGC CCC AGC GAA GGC ATA GAT GAT GGG ATT GAT GC-3'

CCR2b-2Ab-sense: 5'-C TAT GCC TTC GTT GGG GCG AAG TTC GCA AGG TAT CTC TCG GTG-3'

CCR2b-2Ab-antisense: 5'-CAC CGA GAG ATA CCT TGC GAA CTT CGC CCC AAC GAA GGC ATA G-3'

CCR2b-2Ac-sense: 5'-ATC TAT GCC TTC GCT GGG GAG AAG TTC GCA AGG TAT CTC TCG GTG-3'

CCR2b-2Ac-antisense: 5'-CAC CGA GAG ATA CCT TGC GAA CTT CTC CCC AGC GAA GGC ATA GAT -3'

2.8.3 Oligonukleotide für die Polymerasekettenreaktion (PCR)

CCR2b-1A: 5'-GAT ATC CTA ATA GAT GAT GGG ATT GAT GCA GCA-3'

CCR2b-2A: 5'-GAT ATC CTA TCT GAA CTT CTC CCC AAC GAA G-3'

HA-CCR2b-5': 5'-AGG ATC CGC CAC CAT GGC TTA CCC ATA CGA TGT TCC AGA TTA CGC GTC GCT GTC CAC ATC TCG TTC TCG GT-3'

2.9 Molekulargewichtsmarker für die SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-Page)

Für die Bestimmung der molekularen Massen verschiedener Proteine wurde der *low molecular weight marker* (LMW) von der Firma Sigma (Deisenhofen) verwendet.

Protein	LMW Molekulare Masse (kDa)
Rinderserumalbumin	66
Ovalbumin	45
Glycerinaldehyd-3-P-Dehydrogenase	36
Carboanhydrase, Rindererythrozyten	29
Trypsinogen, Rinderpankreas	24
Trypsininhibitor, Sojabohnen	20
α-Lactalbumin, Rind	14,2

2.10 Antikörper

Primäre Antikörper gegen:

Anti-Myc	Polyklonales Maus-IgG	Cell Signalling Technology,
		Danvers, USA
Anti-Gaq	Polyklonales Kaninchen-IgG	Santa Cruz, Heidelberg
HA (12CA5)	Monoklonales Maus-IgG	Boehringer, Mannheim
Anti-Flag	Monoklonales Maus-IgG	Sigma, Deisenhofen
Sekundäre Peroxidase-	gekoppelte Antikörper:	
Anti-Kaninchen-IgG	Ziegen-IgG	Sigma, Deisenhofen

Anti-Kaninchen-IgG	Ziegen-IgG	Sigma, Deisenhofen
Anti-Maus-IgG	Ziegen-IgG	Sigma, Deisenhofen

2.11 Peptide

Die verwendeten humanen CC-Chemokine CCL2 (MCP-1), CCL8 (MCP-2), CCL7 (MCP-3), CCL13 (MCP-4) wurden von der Firma PeproTech Inc, Hamburg, bezogen. Pertussis-Toxin (PTX) wurde von der Firma ALEXIS Biochemicals, Lausen, Schweiz bezogen.

2.12 Geräte

ABI 310 PRISM[™] 310 Genetic Analyser Berthold gamma counter LB2101 Brutschrank Kelvitron [®]T Centrifuge 5810R Certomat[®] R (Schüttlereinheit) Concentrator 5301 (speed vac) Elektrophoresekammer groß für SDS-PAGE Elektrophoresekammer klein für SDS-PAGE Flüssigszintillationszähler, LSC 2200 CA Hamilton Microliter[™] -Spritze, 100 µl Horizontalgelkammer Immunoblot Transferkammer Inkubator CB 210 J2-HS Zentrifuge Magnetrührer IkaCombimag RCH Magnetrührer IkaCombimag RCO Mikroskop IMT-2 Milli-Q^{UF}_{PLUS} Minifuge T Multilabel Reader Mithras LB940 Netzgerät EPS 3500 Photometer Gene Quant pro pH-Meter P207 Omnifuge 2.0 RS Sicherheitswerkbank BSB 4A Sicherheitswerkbank HERA Safe Sicherheitswerkbank Uniflow UVUB 1200 Thermocycler PTC-200 Tischzentrifuge 5415 C Tischzentrifuge 5417 R Transilluminator IL 200M Videodokumentations-System CF8/1 DX

Applied Biosystems, Weiterstadt Berthold Technologies, Bad Wildbach Heraeus Instruments, Fellbach Eppendorf, Hamburg Braun, Melsungen Eppendorf, Hamburg Hoefer-Amersham Biosciences, Freiburg Sigma, Deisenhofen Canberra Packard, Dreieich Hamilton Bonaduz, Bonaduz, Schweiz MBT-Brand, Heidelberg Renner GmbH, Dannstadt Binder, Tuttlingen Beckman Instruments, München Janke & Kunkel, Staufen Janke & Kunkel, Staufen Olympus, Hamburg Millipore, Eschborn Hereaus Sepatech, Osterode Berthold Technologies, Bad Wildbad Amersham Biosciences, Freiburg Amersham Biosciences, Freiburg Consort, Turnhou Hereaus Sepatech, Osterode Gelaire, Sydney, Australien Heraeus Instruments, Fellbach Uni Equip, Martinsried MJ-Research, Biozym, Oldendorf Eppendorf, Hamburg Eppendorf, Hamburg Bachofer, Reutlingen Kappa Meßtechnik GmbH, Gleichen

2.13 Software

GraphPad Prism [®]	Version 4.0, GraphPad Software, Inc., San Diego, CA.
Micrografx Designer 9.0	Micrografx Inc. 2001, München
Microsoft [®] Word 2003	Microsoft Corp., Washington, USA
Adobe [®] Photoshop [®] 10.0	Adobe Systems Inc., San Jose, USA
Chromas 2	Version 2.33, Technelysium Pty Ltd., Tewantin,
	Australien

3 Methoden

3.1 Mikrobiologische Methoden

3.1.1 Herstellung von Luria-Bertani (LB)-Medium

Der verwendete *E. coli*-Stamm DH5 α wurde in Luria-Bertani (LB)-Medium kultiviert. Das LB-Medium wurde durch Autoklavieren sterilisiert und bei Raumtemperatur (RT) gelagert. Um die Vektor-tragenden Bakterien anhand der Plasmid-kodierten Resistenz zu selektieren, wurde dem Medium das entsprechende Antibiotikum -Ampicillin (50 µg/ml) oder Kanamycin (20 µg/ml)- zugegeben. Um LB-Agarplatten herzustellen, wurde der LB-Agar autoklaviert, auf Handwärme abgekühlt und nach Zugabe des Antibiotikums in sterile Petrischalen gegossen. Diese wurden nach dem Erstarren des Agars bei 4 °C gelagert.

LB-Medium:	1 % (m/V) Bactotrypton, 0,5 % (m/V) Hefeextrakt,
	1 % (m/V) NaCl
LB-Agar:	2 % (m/V) Agar in LB-Medium
Ampicillinlösung:	50 mg/ml in ddH ₂ O, durch einen Zelluloseacetatfilter
	(0,22 µm Porenweite) sterilfiltriert
Kanamycin-Lösung:	20 mg/ml in ddH ₂ O; sterilfiltriert

3.1.2 Herstellung kompetenter Bakterien mittels der CaCl₂-Methode

Eine Einzelkolonie des Bakterienstammes *E. coli* DH5 α wurde von der LB-Agarplatte mit Hilfe eines sterilen Zahnstochers in 50 ml LB-Medium überführt. Nach Inkubation über Nacht auf dem Bakterienschüttler bei Standardbedingungen (37 °C und 200 Upm) wurden 300 ml LB-Medium mit 10 ml dieser Vorkultur angeimpft und diese Bakterienkultur unter gleichen Bedingungen bis zu einer optischen Dichte von 0,6 bei 600 nm (OD₆₀₀) weiterinkubiert. Anschließend wurden die Bakterien abzentrifugiert (2000 *g*, 10 min, 4 °C), in 240 ml eiskaltem 100 mM CaCl₂-Puffer resuspendiert und für 30 min auf Eis inkubiert. Nach erneuter Zentrifugation (2000 *g*, 10 min, 4 °C) wurden die Bakterien in 15 ml 100 mM CaCl₂-Puffer resuspendiert und mit 2,9 ml sterilem, kaltem Glycerin (86 % ig) versetzt. Die somit zur Aufnahme von DNA kompetenten Zellen wurden dann in 100 µl Aliquots portioniert, in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80 °C gelagert.

3.1.3 Transformation kompetenter Bakterien

Ein Aliquot (100 µl bzw. 25 µl bei einer Retransformation) kompetenter DH5 α -Bakterien wurde auf Eis aufgetaut, mit 10 µl eines Ligationsansatzes (siehe 3.2.6) oder mit 1 µl Plasmid-DNA versetzt, und für 30 min auf Eis inkubiert. Der anschließende Hitzeschock bei 42 °C für 45 s führt zur Perforation der Bakterienwand und zur Aufnahme, der zur Transformation zugesetzten Plasmid-DNA. Die Bakterien wurden danach 2 min auf Eis inkubiert. Nach Zugabe von 250 µl SOC-Medium wurden die Bakterien schließlich für 60 min unter Standardbedingungen inkubiert. 50 µl dieser Bakterienkultur (bei Plasmidtransformation) bzw. der gesamte Transformationsansatz (bei einer Ligation) wurden auf zuvor getrocknete LB-Platten (mit entsprechendem Antibiotikum) ausplattiert.

SOC-Medium: 20 mM Glucose, 10 mM MgSO₄, 10 mM MgCl₂ in LB- Medium

Die Transformation in XL1-*Blue Supercompetent Cells* (Stratagene, Heidelberg) erfolgte ebenfalls wie oben beschrieben.

3.1.4 Herstellung einer Glyceringefrierkultur

Zur Herstellung einer Glycerin-Stocklösung von Plasmid-tragenden Bakterien wurden 1,5 ml Antibiotikum-haltiges LB-Medium mit einer Einzelkolonie angeimpft. Die Kultur wurde anschließend über Nacht bei Standardbedingungen inkubiert. 850 µl dieser Kultur wurden mit 150 µl 100 % Glycerin versetzt, in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80 °C gelagert.

3.2 Molekularbiologische Methoden

3.2.1 Präparation von Plasmid-DNA

Plasmid-tragende *E. coli* DH5α oder XL1-*Blue Supercompetent Cells* wurden in LB-Medium mit entsprechendem Antibiotikum über Nacht bei Standardbedingungen inkubiert. Zur Präparation der Plasmid-DNA aus 1,5 ml Bakterienkultur wurde der Nukleospin-Kit[®] von Macherey-Nagel (Minipräparation) verwendet. Für die DNA-Präparation aus 50 ml Bakterienkultur wurde der Nukleobond[®] PC 100 Kit von Macherey-Nagel (Midipräparationen) eingesetzt. Die Präparation der Plasmid-DNA erfolgte nach Angaben des Herstellers. Die präparierte Plasmid-DNA wurde bei -20 °C aufbewahrt.

3.2.2 Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren

Die Nukleinsäurekonzentration einer Lösung wurde durch die spektralphotometrische Messung der Extinktion bei 260 nm in einer Quarzküvette bestimmt. Eine optische Dichte (1 OD) entspricht dabei 50 μ g/ml doppelsträngiger DNA, 33 μ g/ml einzelsträngiger Oligonukleotid-DNA oder 40 μ g/ml RNA. Die Reinheit der Nukleinsäurelösung wurde über das Verhältnis der Extinktionen der Lösung bei 260 und 280 nm (OD_{260/280}) ermittelt. Reine Nukleinsäurelösungen ergeben Werte zwischen 1,8 und 2,0. Niedrigere Werte deuten auf Verunreinigungen durch Proteine hin.

3.2.3 Agarose-Gelelektrophorese

Nukleinsäuren wurden anhand ihrer Größe im 1 % (m/V) Agarosegel in einer Horizontalgelapparatur elektrophoretisch aufgetrennt. 0,8 g Agarose wurde in 80 ml Elektrophoresepuffer (1x TAE) unter Rühren aufgekocht. Nach Abkühlen auf *ca.* 50 °C wurde die Lösung mit 0,5 μ g/ml Ethidiumbromid versetzt und in einen Gelschlitten gegossen. Die DNA-Proben wurden mit 5 μ l Probenpuffer versetzt, in die Taschen des erstarrten Gels geladen und bei einer konstanten Feldstärke von 10 V/cm in 1x TAE elektrophoretisch aufgetrennt. Der Farbstoff Ethidiumbromid interkaliert zwischen die komplementären Basen doppelsträngiger DNA. Unter UV-Beleuchtung ($\lambda = 312$ nm) fluoresziert er rot-orange ($\lambda = 560$ nm). Dies erlaubt die photographische Dokumentation und Auswertung des Agarosegels auf einem Transilluminator (Bachofer) mit Hilfe eines Videodokumentationssystems (Kappa Messtechnik).

1x TAE:	40 mM Tris-HCl; pH 8,0,
	1,0 mM EDTA , 0,1 % (V/V) Essigsäure
6x DNA-Probenpuffer:	30 % (V/V) Glycerin, 50 mM EDTA,
	0,25 % (m/V) Bromphenolblau, pH 8,0

3.2.4 Extraktion von DNA aus Agarosegelen

Nach der gelelektrophoretischen Auftrennung der DNA wurde die gewünschte DNA-Bande auf dem Transilluminator unter UV-Beleuchtung mit einem sterilen Skalpell aus dem Agarosegel ausgeschnitten und in ein Eppendorf-Gefäß mit bekanntem Leergewicht überführt. Anschließend wurde das Eppendorf-Gefäß gewogen und so das Gewicht des ausgeschnittenen Gelstücks bestimmt. Die DNA wurde mit Hilfe des QIAquick[®] Gel Extraction Kits (Qiagen) nach Herstellerangaben aus dem Gelstück extrahiert.

3.2.5 Spaltung von DNA mit Restriktionsendonukleasen

Die Spaltungen von DNA wurden mit Restriktionsendonukleasen nach Angaben des Herstellers (Fermentas) durchgeführt.

Standardansatz:	0,5 - 1 µg	(Plasmid-)DNA
	0,3 µl	Restriktionsendonukleasen (10 U/µl)
	2 µl	10x Restriktionspuffer
	<i>ad</i> 20 µl	mit ddH ₂ O

Der Restriktionsansatz wurde bei der vom Hersteller angegebenen Temperatur mindestens 1 h inkubiert. Anschließend wurde der Ansatz mit 5 μ l 6x DNA-Probenpuffer versetzt und mit einem bekannten Marker (MarkerIII, Lambda DNA/EcoRI + HindIII Marker) gelelektrophoretisch aufgetrennt. Die Produkte der DNA-Spaltung wurden danach unter UV-Beleuchtung ausgewertet.

3.2.6. Ligation von DNA-Fragmenten in Plasmidvektoren

Zur Herstellung rekombinanter Plasmide muss ein DNA-Fragment (*insert*) mit einem linearisierten Plasmidvektor mit Hilfe einer DNA-Ligase über Phosphodiesterbindungen verknüpft werden.

Standard-Ligationsansatz:	2 µl	10x Ligationspuffer
	1,0 µl	Vektor (ca. 20 ng)
	8,0 µl	DNA-Fragment (ca. 100 ng)
	1,5 µl	T4-Ligase (1 U/µl)
	<i>ad</i> 20 µl	mit ddH ₂ O

Der Ligationsansatz wurde über Nacht bei 16 °C inkubiert.

3.2.7 Polymerasekettenreaktion (PCR)

Mit der *polymerase chain reaction* (PCR) kann enzymatisch *in-vitro* ein bestimmter DNAoder cDNA-Bereich mit Hilfe zweier Oligonukleotide (Primer), die den zu amplifizierenden Bereich in 5' \rightarrow 3'-Richtung begrenzen, vervielfältigt werden. Durch Verwendung von Oligonukleotiden, die in ihrer Basensequenz von der des *templates* abweichen, kann zudem modifizierte DNA hergestellt werden. So können gezielt Mutationen in eine Nukleinsäuresequenz eingebracht werden. Des Weiteren wird die PCR in der automatisierten, nichtradioaktiven DNA-Sequenzanalyse (*cycle sequencing*) angewendet. Das Prinzip der PCR basiert auf sich wiederholenden Zyklen aus DNA-Doppelstrangdenaturierung (*denaturation*), der Anbindung beider Oligonukleotide an ihre jeweilige Matrize (*annealing*) und der Verlängerung der Komplementärstränge an der entsprechenden Matrize (Primer *extension*) durch eine thermostabile DNA-Polymerase. Alle PCR-Versuche wurden in einem *thermocycler* (PTC-200, MJ-Research) durchgeführt.

3.2.7.1 Standard-PCR

Standard-PCR-Ansatz:	10 µl	5x Phusion HF-Puffer (Finnzymes)
	1 µl	10 μM Oligonukleotid 1
	1 µl	10 μM Oligonukleotid 2
	1 µl	10 mM dNTP-Mix
	x μl	Matrizen-DNA (ca. 500 ng)
	1µ1	Phusion [™] <i>High-Fidelity</i> Polymerase
		(2 U/µl)
	<i>ad</i> 50 µl	mit ddH ₂ O

PCR-Standardprogramm:	Start	95 °C	3 min
	Denaturierung	95 °C	1 min
	annealing	x °C	$2 \min $ $\} 40 x$
	Extension	72 °C	1 min/kb
	Schlussextension	72 °C	10 min
	Ende	4 °C	00

Vor dem Zyklusprogramm wurden alle Matrizenstränge vollständig denaturiert (Start). Die PhusionTM *High-Fidelity* Polymerase (Finnzymes) wurde hinzupipettiert, wenn der *thermocycler* auf 95 °C geheizt hatte (*hot start*). Die *annealing*-Temperatur lässt sich anhand der Oligonukleotid-Sequenzen berechnen: Jedem A- und T-Nukleotid entsprechen 2 °C, jedem G- und C-Nukleotid 4 °C (Nelson & Brutlag, 1979). Die Schlussextension diente dazu, unvollständig synthetisierte Stränge aufzufüllen. Nach Beendigung der PCR wurde ein 25 µl-Aliquot des PCR-Ansatzes auf ein 1 % (m/V) Agarosegel aufgetragen, elektrophoretisch aufgetrennt und unter UV-Beleuchtung analysiert.

3.2.7.2 Einfügen von Mutationen in eine DNA-Sequenz

Mit Hilfe des *QuikChange*[™] *Site-Directed Mutagenesis* Kit (Stratagene) können in eine DNA-Sequenz Punktmutationen eingefügt oder Nukleotide so verändert werden, dass in dem kodierten Protein eine oder mehrere Aminosäuren ausgetauscht werden. Dazu lagern sich zwei zueinander komplementäre Oligonukleotide, welche die gewünschte Mutation

tragen, an die zu verändernde rekombinante DNA an. Mittels der *Pfu Turbo* Polymerase (Stratagene) werden die in ihrer Sequenz veränderten DNA-Stränge amplifiziert. Im Anschluß an die PCR wurde das methylierte, nicht-mutierte *template* mit 1 μ l Enzym DpnI (10 U/ μ l) bei 37 °C für 1 h gespalten. Die Vermehrung der mutierten DNA erfolgt in XL1-*Blue Supercompetent Cells*.

PCR-Ansatz:	5 µl	10x Reaktionspuffer
	1,25 µl	100 ng/µl sense Oligonukleotid
	1,25 µl	100 ng/µl antisense Oligonukleotid
	1 µl	10 mM dNTP-Mix
	2 µl	Matrizen-DNA (ca. 400 ng)
	1 µl	<i>Pfu Turbo</i> DNA-Polymerase (2,5 U/µl)
	<i>ad</i> 50 µl	mit ddH ₂ O
PCR_Programm.	Denaturierung	$95 \circ C = 0.5 \min$

PCR-Programm:	Denaturierung	95 °C 0,5 min
	annealing	55 °C 1 min \rangle 18 x
	Extension	68 °C 1 min/kb
	Ende	$4 \circ C \infty$

3.2.8 Automatisierte, nichtradioaktive DNA-Sequenzanalyse

Das automatisierte Sequenzierverfahren besteht aus einer Kombination von linearer (*single primer*) PCR und der Didesoxy-Kettenabbruchmethode nach Sanger *et al.* (1977). Die rekombinante DNA eines Plasmids kann je nach Bedarf von beiden Seiten der *multiple cloning site* mit zwei Vektor-spezifischen Oligonukleotiden ansequenziert werden, wobei das eine Oligonukleotid komplementär zum *sense*-Strang, das andere komplementär zum *antisense*-Strang des Vektors bindet. Damit eine unidirektionale Strangsynthese mit einem definierten Startpunkt erfolgen kann, wird pro Sequenzieransatz ein Oligonukleotid eingesetzt. Vom 3'-OH-Ende des gebundenen Oligonukleotids aus beginnend wird ein zur Matrize komplementärer Strang unter Verwendung der vier 2'- Desoxynukleotide (dNTPs) synthetisiert. Parallel dazu erfolgt der Einbau von fluoreszenzmarkierten 2'-, 3'-Didesoxynukleotiden (ddNTPs) und damit der rein statistische Strangabbruch, da bei den ddNTPs die für die Elongation nötige 3'-OH-

Gruppe fehlt. Bei der dye terminator-Methode sind die vier ddNTPs mit unterschiedlichen Fluoreszenzfarbstoffen markiert. Somit entstehen unterschiedlich lange fluoreszenzfarbstoffmarkierte DNA-Stücke, die auf einem automatischen Sequenz-Analysegerät untersucht werden können. Nach der Elongation der Oligonukleotide durch PCR mit der Taq-DNA-Polymerase (cycle sequencing) wird die DNA gefällt, in Ladepuffer gelöst und nach der Denaturierung auf die Gelmatrix aufgetragen. Durch Laserabtastung der mit Farbstoff markierten DNA-Fragmente während der Kapillargelelektrophorese im Sequenz-Analysegerät wird die DNA-Sequenz ermittelt.

Standardansatz:	4 µl	$BigDye^{TM}$ Terminator Ready Reaction Mix
	1 µl	dsDNA-Plasmid (200-400 ng)
	2,5 µl	Sequenzier-primer (2 pmol/µl)
	<i>ad</i> 10 µl	mit ddH ₂ O

Cycle sequencing-Programm:	Denaturierung	96 °C	2,5 min	
	Denaturierung	96 °C	0,5 min	
	Anlagerung der Oligonukleotide	51 °C	20 s	- 25
	Extension	60 °C	$4 \min \int$	
	Schlussextension	60 °C	5 min	
	Lagerung	4 °C	∞	

Nach Beendigung der PCR wurden 90 µl ddH₂O zugegeben, die DNA für 10 min bei 4 °C mit 2,5 Volumen 100 %igem Ethanol gefällt und für 20 min bei Raumtemperatur und 15800 *g* zentrifugiert. Das DNA-Pellet des Sequenzieransatzes wurde mit 70 %igem Ethanol gewaschen und in der *speed vac* getrocknet. Die DNA-Pellets wurden in 11 µl *Template Suppression Reagent* (ABI) gelöst, für 2 min bei 90 °C denaturiert, kurz auf Eis inkubiert und in den Probenwechsler des Sequenzers gestellt. Die Auftrennung der DNA-Fragmente erfolgte durch Kapillargelelektrophorese (POP6 Rapid Polymer, ABI) mit 1x *Genetic Analysis Buffer* (ABI) für 36 min bei 50 °C und 15 kV. Die Sequenzierungen wurden freundlicherweise von Frau S. Gierschik durchgeführt.

3.3 Kultivierung eukaryotischer Zellen

3.3.1 Kultivierung von Säugetierzellen

3.3.1.1 Medien

Für die Kultivierung von COS-7 (a*frican green monkey kidney fibroblast*)-Zellen wurde DMEM-Medium (ohne Natriumpyruvat, mit 4500 mg/l Glucose, mit L-Glutamin) verwendet, das von der Firma Gibco Invitrogen, Karlsruhe bezogen wurde. Dem Medium wurden 10 % FCS (*fetal calf serum*), 1 % L-Glutamin (200 mM) und 1 % Penicillin-(10000 U/ml) Streptomycin- (10 mg/ml) Lösung zugesetzt.

Für die Kultivierung von HEK293 (*human embryonic kidney*)-Zellen wurde dem Medium für COS-7-Zellen noch 2,5 % HEPES (1 M) und 1 % Natriumpyruvat (100 mM) hinzugefügt.

3.3.1.2 Kultivierung von Säugetierzellen

Die adhärenten COS-7-Zellen und HEK293-Zellen wurden in 10 ml des entsprechenden Mediums (siehe 3.3.1.1) bei 37 °C und 10 % CO₂ in 100 mm Kulturschalen (Renner) kultiviert. Die konfluent gewachsenen Zellen wurden mit 5 ml sterilem 1x CMF-PBS gewaschen und mit 2 ml Trypsin/EDTA-Lösung von der Kulturschale trypsiniert. Die Trypsinierung wurde durch Zugabe von 8 ml des entsprechenden Mediums gestoppt, die Zellsuspension in ein 15 ml Röhrchen überführt und die Zellen für 3 min bei 173 g und RT pelletiert. Das Zellpellet wurde in 5 ml frischem Medium resuspendiert. 0,5 ml Zellsuspension wurden anschließend in eine neue Kulturschale ausgesät und mit 9,5 ml frischem Medium aufgefüllt.

10x CMF-PBS:	27 mM KCl, 81 mM Na ₂ HPO ₄ x 2 H ₂ O,	
	14,7 mM KH ₂ PO ₄ , 1,4 M NaCl	
Trypsin/EDTA-Lösung:	0,05 % Trypsin/ 0,022 % EDTA (m/V) in 1x CMF-PBS,	
(PAA Laboratories GmbH)	ohne Ca ²⁺ und Mg ²⁺	

3.3.1.3 Zellzahlbestimmung mittels Neubauer-Zählkammer

In Kapitel 3.3.1.2 wurde beschrieben, dass die Zellen durch eine Trypsin/EDTA-Lösung vom Zellkulturschalenboden gelöst wurden, abzentrifugiert wurden und das Zellpellet in neuem Kulturmedium resuspendiert wurde. Zur Zellzahlbestimmung wurden nun 20 μ l dieser Zellsuspension mit 60 μ l Trypanblaulösung versetzt und ein Aliquot in eine Neubauer-Zählkammer pipettiert. Die Zellen wurden anschließend unter einem Mikroskop ausgezählt. Die Anzahl der Zellen in einem der großen Quadranten mit dem Volumen von 0,1 mm³ bzw. 1 x 10⁻⁴ ml berechnete sich nach der folgenden Formel:

Zellzahl x 10^4 = Zellzahl pro ml Medium

Zellen	Zellkulturschalentyp	Zellzahl/well	Medium/well
COS-7	48-Loch-Platte	4×10^4	0,5 ml
HEK293	100 mm Schale	$2,0 \ge 10^6$	10 ml

Trypanblaulösung:

0,5 % (m/V) Trypanblau in 0,85 %iger (m/V) NaCl-Lösung

3.4 Proteinexpression in Säugetierzellen

3.4.1 Transfektion von Säugetierzellen

Für die Transfektion wurden die Säugetierzellen am Vortag in der entsprechenden Dichte (s. 3.3.1.3) ausgesät. Die Zellen wurden mit dem Transfektionsreagenz LipofectamineTM 2000 (Invitrogen Life Technologies) nach den Angaben des Herstellers transfiziert. Vor der Transfektion wurde das Medium der am Vortrag ausgesäten Zellen gewechselt. Für die Transfektion wurden zwei Lösungen angesetzt. Lösung A enthielt die zu transfizierende DNA in Opti-MEM (GIBCO[®] Invitrogen Cell Culture), wobei bei jedem Ansatz die Menge an Vektor-DNA durch Zugabe von entsprechenden Mengen leerem Expressionsvektor pcDNA3.1(+) konstant gehalten wurde. Lösung B enthielt das Transfektionsreagenz LipofectamineTM 2000, ebenfalls in Opti-MEM gelöst. Das Verhältnis der Menge an zu transfizierender DNA (μ g) zu Transfektionsreagenz (μ l) betrug 1:2.

Lösung A und Lösung B wurden 5 min nach der Zugabe des Transfektionsreagenz LipofectamineTM 2000 zu Lösung B vereint und durch Auf- und Abpipettieren gemischt. Der Transfektionsansatz wurde 20 min bei RT inkubiert und anschließend auf die Zellen gegeben. Diese wurden über Nacht bei 37 °C und 10 % CO₂ in einer mit Wasserdampf gesättigten Atmosphäre inkubiert.

3.4.2 Transfektion von HEK293-Zellen mit hGa_q-spezifischer siRNA

HEK293-Zellen wurden 48 h vor der Transfektion in einer Dichte von 15 x 10⁴-Zellen pro *well* in einer 24-*well* Platte ausgesät. Die Zellen wurden mit dem Transfektionsreagenz Lipofectamine[™] 2000 (Invitrogen Life Technologies) nach den Angaben des Herstellers für die Transfektion von HEK293-Zellen mit siRNA transfiziert. Am Tag der Transfektion wurde das Medium der Zellen gewechselt und für die Transfektion zwei Lösungen angesetzt. Lösung A enthielt die zu transfizierende DNA und 50 pmol hG α_q -spezifische siRNA (GeneSolution siRNA, Cat. No. 1027416 QIAGEN) (pro *well*) in Opti-MEM (GIBCO[®] Invitrogen Cell Culture). Lösung B enthielt das Transfektionsreagenz Lipofectamine[™] 2000, ebenfalls in Opti-MEM gelöst. Das Verhältnis der Menge an zu transfizierender DNA (µg) zu Transfektionsreagenz (µl) betrug 1:2. Lösung B wurde nach Zugabe der entsprechenden Menge Lipofectamin für 10 min bei RT inkubiert und danach mit Lösung A vereint. Der Transfektionsansatz wurde für 15 min bei RT inkubiert und anschließend auf die Zellen gegeben. Diese wurden für 24 h bei 37 °C und 10 % CO₂, in einer mit Wasserdampf gesättigten Atmosphäre inkubiert.

3.5 Methoden zur Untersuchung der Oberflächenexpression von Rezeptoren

3.5.1 Bindungsexperimente mit ¹²⁵Iod-CCL2

COS-7-Zellen wurden in 24- bzw. 48-*well* Platten ausgesät und wie oben beschrieben (3.4.1) transfiziert. 36 h nach der Transfektion wurde das Medium abgesaugt und die

Zellen einmal mit CMF-PBS gewaschen. Anschließend wurden die Zellen in An- bzw. Abwesenheit von nicht radioaktiv markiertem CCL2 (Endkonzentration 50 nM) in PBS mit 25 mM HEPES/NaOH, pH 7,0 und 1mg/ml BSA für 30 min bei 4 °C inkubiert. Danach wurde jedem *well* ¹²⁵Iod-CCL2 (MCP-1) zugefügt und die Zellen für weitere 90 min bei 4 °C inkubiert. Zur Beendigung der Bindungreaktion wurden bei 4 °C die Überstände abgenommen, die Zellen einmal mit kaltem PBS (10 mM KH₂PO₄, 150 mM NaCl) gewaschen und anschließend durch Zugabe von 500 mM NaOH aufgeschlossen. Die in den Lysaten enthaltene Radioaktivität wurde im Gammazähler LB2101 Berthold Technologies ermittelt.

¹²⁵Iod-CCL2: 2000 Ci/mmol

3.6 Methoden zur Untersuchung der Rezeptoraktivierung

3.6.1 Luziferase-Assay

Um die Aktivierung des serum response-Faktors (SRF) zu messen, wurde das Dual-Luciferase Reporter Assay System (Promega, Madison) verwendet. Dieses System beruht auf der Kotransfektion der Zellen mit den zwei Reporterplasmiden pSRE.L und pRL-TK. pSRE.L trägt die cDNA der Luziferase des amerikanischen Glühwürmchens Photinus pyralis (firefly-Luziferase). Die firefly-Luziferase steht unter der Kontrolle des transkriptionellen Regulatorelements SRE.L. Dies ist ein Derivat des serum response element (SRE) von c-fos. SRE wurde so modifiziert, dass es nur den Transkriptionsfaktor SRF, aber nicht den ternary complex factor (TCF) binden kann. Die Transkription der firefly-Luziferase-cDNA wird somit durch die Bindung von SRF an den Promotor des Reporterplasmids induziert. Die Produktion der firefly-Luziferase ist dadurch ein Maß für die SRF-Aktivität. Das zweite Reporterplasmid, pRL-TK, trägt die cDNA der Luziferase der Koralle Renilla reniformis (Renilla-Luziferase), welche unter der Kontrolle des Promotors des Herpes-simplex-Virus-Thymidinkinasegens (HSV-TK) steht. Die Renilla-Luziferase wird konstitutiv auf niedrigem Niveau exprimiert. Die Transfektion mit den Reporterplasmiden und den verschiedenen Expressionsplasmiden wurde wie beschrieben durchgeführt (siehe Punkt 3.4.1). 22 Stunden nach der Transfektion wurden den Zellen

verschiedene Chemokine oder entsprechende Mengen des Lösungsmittels zugegeben. Dazu wurde das in den Zellkulturplatten befindliche Zellkulturmedium durch 150 µl (pro well einer 48-well Platte) frisches Chemokin-enthaltendes bzw. Lösungsmittel-enthaltendes Zellkulturmedium ersetzt und die Zellen für 6 Stunden bei 37 °C und 10 % CO₂ inkubiert. Die Zellen wurden dann mit Hilfe des Lysispuffers (Passive Lysis Buffer 5 x) des Dual-Luciferase Reporter Assav System (Promega, Madison) lysiert. Dazu wurden die Zellen einmal mit 1 x CMF-PBS gewaschen und mit 60 µl des 1 x Lysispuffers (pro well/48-well Platte) für 20 min bei RT auf der Wippe inkubiert. Anschließend wurden die Lysate in Eppendorfgefäße überführt und für 2 min zentrifugiert (15800 g, RT). 10 µl des Überstandes wurden in eine 96-well Platte (NUNC) pipettiert und die Enzymaktivität der firefly- und Renilla-Luziferase im Luminometer Mithras LB 940 (Berthold Technologies, Bad Wildbad) gemessen. Die Bestimmung der Aktivität der Reportergenprodukte erfolgte nach den vom Hersteller des Assaysystems gemachten Angaben. Es wurde zunächst die Aktivität der firefly-Luziferase durch Zugabe des Substrats (Luziferase Assay Reagent II) ermittelt. Diese Reaktion wurde durch Zugabe des Stop&Glo-Reagenz gestoppt. Das Stop&Glo-Reagenz enthält auch das Substrat der Renilla-Luziferase, wodurch im direkten Anschluss die Renilla-Luziferase-Aktivität bestimmt werden konnte. Die Renilla-Luziferase-Aktivität ist ein Maß für die Transfektionseffizienz. Die für die firefly-Luziferase-Aktivität ermittelten Werte wurden anhand der Transfektionseffizienz korrigiert.

3.6.2 Messung der Inositphosphatproduktion

Durch Stimulation der PLC-β-Isoenzyme wird das Substrat Phosphatidylinosit 4,5bisphosphat in die *second messenger*-Produkte D-*myo*-Inosit-1,4,5-trisphosphat (IP₃) und 1,2-Diacyl-*sn*-glycerin (DAG) gespalten. Die durch Aktivierung der Phospholipase C β-Isoenzyme entstandenen Inositphosphate wurden mittels Anionenaustauschchromatographie analysiert. Für die Messung der Inositphosphate wurden COS-7-Zellen wie in 3.3.1.3 beschrieben in einer 48-*well* Platte ausgesät und bei 37 °C und 10 % CO₂ über Nacht inkubiert. Am nächsten Tag wurden die Zellen mit dem Transfektionsreagenz Lipofectamine[™] 2000 transfiziert (siehe 3.4.1). Danach wurden die Zellen für 24 Stunden bei 37 °C und 10 % CO₂ inkubiert. Nach Ablauf der Inkubationszeit folgte die radioaktive Markierung der Zellen. Dazu wurde das Transfektionsmedium abgenommen und die Zellen pro Loch jeweils mit 0,5 ml Kuturmedium, welches 2 µCi/ml D-*myo*-[2-³H] Inositol und 10 mM LiCl-Lösung enthielt, versetzt. Die Zellen wurden für weitere 17 Stunden bei 37 C und 10 % CO2 inkubiert. Danach wurde das Medium abgenommen und die Zellen mit 150 µl (pro *well* einer 48-*well* Platte) Zellkulturmedium, das 50 nM CCL2 und 10 mM LiCl enthielt, für 4 Stunden inkubiert. Anschließend wurde das Medium abgenommen, die Zellen zweimal mit sterilem 1 x CMF-PBS gewaschen und dann durch Zugabe von 200 µl eiskalter 10 mM Ameisensäure pro Vertiefung für 1 Stunde auf Eis lysiert. Die Lyse wurde durch Zusatz von 0,45 ml 10 mM Ammoniak-Lösung pro Vertiefung beendet und der gesamte Überstand auf mit Dowex-Harz (0,8 ml) gepackte Säulen gegeben. Die Säulen wurden mit je 3 ml ddH2O gewaschen und die nicht gebundenen Bestandteile in Abfallgefäßen gesammelt. Anschließend wurde das Diacylglycerin mit 3 ml einer 60 mM Natriumformiat/5 mM Natriumtetraborat-Lösung von den Säulen eluiert und verworfen. Die Elution der Inositphosphate, die aufgrund von elektrostatischer Anziehungskräfte an das positiv geladene Harz gebunden hatten, erfolgte durch Zugabe von 3 ml 1 M Ammoniumformiat/0,1 M Ameisensäure-Lösung in vorbereitete Szintillationsgefäße, die zuvor mit 15 ml Szintillationsflüssigkeit (Quicksafe A von Zinser Analytic) versetzt worden waren. Die Radioaktivität wurde mittels eines Flüssigszintillationszählers (LSC 2200 CA) von der Firma Packard gemessen.

D-myo-[2-³H] Inositol: 25 Ci/mmol

3.6.2.1 Regeneration des Dowex-Harzes

Zur Regenration des Dowex-Harzes wurden zunächst 9 ml 2 M Ammoniumformiat/0,1 M Ameisensäure auf die Säulen gegeben. Anschließend wurden die Säulen zur Neutralisation mit 5 ml ddH₂O gewaschen. Bis zur Wiederverwendung wurden die Säulen verschlossen und befüllt mit 3 ml ddH₂O gelagert.

3.6.2.2 Präparation der Anionenaustauschmatrix

Um die Bindung von Inositphosphaten an das Dowex-Harz zu ermöglichen, musste dieses von der Chlorid-Form in die Formiat-Form überführt werden. Dazu wurden 150 ml

Dowex-1 Harz (Cl'Form) in 500 ml 1 N NaOH für eine Stunde bei RT inkubiert, wobei die basische Lösung mit einem Glasstab alle 5 Minuten gerührt wurde. Nach der Sedimentation der gelb-orangen Matrix wurde der Überstand dekantiert und erneut mit 500 ml 1 N NaOH Lösung versetzt. Wiederum wurde die Matrix eine Stunde lang mit der basischen Lösung inkubiert und alle 5 Minuten durch Rühren gemischt. Nach der Sedimentation wurde der Überstand dekantiert und zur Neutralisation 500 ml 1 M Ameisensäure auf die Matrix gegeben. Während der nun folgenden Inkubation für eine Stunde unter Rühren konnte ein Farbumschlag des Harzes von orange-gelb zu weiß beobachtet werden. Nach der Sedimentation wurde der Überstand dekantiert und das Harz dreimal mit ddH₂O gewaschen. Die präparierte Matrix wurde anschließend in 150 ml ddH₂O aufgenommen und entweder direkt zur Befüllung der Säulen verwendet oder bei 4 °C gelagert.

3.7 Proteinbiochemie

3.7.1 Proteinpräparation aus HEK293-Zellen

Zur Herstellung von Zelllysaten aus transient transfizierten HEK293-Zellen wurden die Zellen vom Boden der Zellkulturschale abgespült und in ein 15-ml-Zentrifugenröhrchen überführt. Die Zellen wurden bei 250 g für 5 min bei Raumtemperatur zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Zellpellet mit 1 x CMF-PBS gewaschen. Die folgenden Angaben gelten pro Zellkulturschale mit einem Durchmesser von 100 mm (\emptyset 100 mm-Schale/2,0 x 10⁶ Zellen). Zur Lyse der Zellen wurde das Zellpellet in 300 µl Extraktionspuffer durch auf- und abziehen mit einer 0,5 x 23 mm (18 gauge) Kanüle resuspendiert und homogenisiert. Alle Arbeitsschritte wurden auf Eis durchgeführt. Das Zellysat wurde in ein Reagiergefäß (1,5 ml) überführt und die Zellkerne und nicht lysierte Zellen bei 2450 g für 45 s und 4 °C abzentrifugiert. Der Überstand wurde in ein neues Reagiergefäß (1,5 ml) überführt und für 30 min bei 26000 g und 4 °C zentrifugiert. Dieser Zentrifugationsschritt führte zu zwei subzellulären Fraktionen, einer cytosolischen, löslichen Fraktion (Überstand) und einer mit Plasmamembranen angereicherten, partikulären Fraktion (Pellet). Der Überstand wurde abgenommen und das Pellet in 100 µl Extraktionspuffer resuspendiert. Die in der partikulären Fraktion enthaltenen Proteine

wurden mittels einer SDS-Page (s. 3.7.3) aufgetrennt und anschließend im *Western blot* analysiert (s. 3.7.4)

Extraktionspuffer:	20 mM Tris/HCl, pH 7,5
	2,0 mM EDTA/TEA
	2,0 µg/ml Trypsininhibitor aus Sojabohnen (STI)
	3,0 mM Benzamidin
	1,0 µM Pepstatin
	1,0 µM Leupeptin
	1,0 µg/ml Aprotinin
	0,1 mM PMSF

3.7.2 Herstellung von Ganzzelllysaten aus HEK293-Zellen

Zur Herstellung von Ganzzelllysaten aus transient transfizierten HEK293-Zellen (2 x 10^6 pro 100 mm Schale) wurden die Zellen 24 h nach der Transfektion geerntet, einmal mit 1 x CMF-PBS gewaschen und das Pellet in 500 µl 1 x passivem Lysispuffer (*Passive Lysis Buffer* 5 x, Promega) resuspendiert. Nach einer Inkubation von 20 min wurden die Zelltrümmer durch Zentrifugation (15800 g, 2 min bei RT) abgetrennt und die im Überstand enthaltenen Proteine mittels einer SDS-Page (s. 3.7.3) aufgetrennt und anschließend im *Western blot* analysiert (s. 3.7.4)

3.7.3 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Die SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE) wurde nach der Methode von Laemmli (1970) durchgeführt. Es wurden zwei verschiedene Vertikalapparaturen verwendet. Für große Gele wurde ein Hoefer-System (Hoefer-Amersham Biosciences) mit 16 x 18 cm großen Glasplatten und 1,5 mm dicken Abstandshaltern und für kleine Gele ein Sigma-System (Sigma) mit 8 x 10 cm großen Glasplatten und 1 mm dicken Abstandshaltern verwendet. Ein SDS-Polyacrylamidgel setzte sich aus einem 10 %igen oder 12,5 %igen Trenngel und einem 6 %igen Sammelgel zusammen. Für das Trenngel

	Trenngellösung	Trenngellösung	Sammelgellösung
Prozent (m/V)	10 %	12,5 %	6 %
Acrylamid/Bisacrylamid (29:1)			
Monomerlösung	10 ml	12,5 ml	2 ml
ddH ₂ O	12 ml	9,5 ml	5,3 ml
Trenngelpuffer	7,5 ml	7,5 ml	2,5 ml
10 % (m/V) SDS	300 µl	300 µl	100 µl
10 % (m/V) APS	300 µl	300 µl	100 µl
TEMED	20 µl	20 µl	10 µl

und das Sammelgel wurden die in der unten angegebenen Tabelle beschriebenen Lösungen hergestellt. Die angegebenen Mengen sind für ein großes oder 4 kleine Gele ausreichend.

Die Proteinproben wurden mit 2 x Probenpuffer versetzt und mit einer 100 µl Hamilton-Spritze in die mit 1 x Laufpuffer gespülten Geltaschen geladen. Die Elektrophorese wurde in 1 x Laufpuffer bei einer konstanten Stromstärke von 45 mA für ein großes Gel (90 mA bei zwei Gelen) oder bei konstanter Spannung von 105 V für kleine Gele durchgeführt. Die Auftrennung wurde beendet, wenn der Farbmarker das Ende des Gels erreicht hatte.

Monomerlösung:	30 % (m/V)-Acrylamid-Bisacrylamid (29:1)-Fertiglösung
Trenngelpuffer:	1,5 M Tris-HCl; pH 8,8
Sammelgelpuffer:	0,5 M Tris-HCl, pH 6,8
10x Laufpuffer:	250 mM Tris, 1,9 M Glycin
1x Laufpuffer:	25 mM Tris, 190 mM Glycin, 0,1 % (m/V) SDS; pH 8,6
2x Probenpuffer:	125 mM Tris-HCl; pH 6,8, 4 % (m/V) SDS, 20 % (V/V) Glycerin,
	10 % (V/V) β-Mercaptoethanol, 0,02 % (m/V) Pyronin Y

3.7.4 Immunoblotting von Proteinen (Western blot)

Um Proteine mit spezifisch gegen sie gerichteten Antikörpern nachweisen zu können, mussten die Proteine zunächst mittels SDS-PAGE aufgetrennt und die Proteinbanden anschließend aus dem Gel auf Nitrozellulosemembran transferiert werden.

3.7.4.1 Proteintransfer auf Nitrozellulosemembranen

Nach der SDS-PAGE wurde das Gel und ein Stück Nitrozellulosemembran (Whatman Protran) passender Größe mit Transferpuffer getränkt. Die Membran wurde luftblasenfrei auf das Gel aufgelegt, das Sandwich zwischen zwei Schaumstoffschwämmen und einer Lage Blotpapier in eine Plastikhalterung eingespannt und in die mit Transferpuffer gefüllte Immunoblot-Transferkammer eingehängt. Das Gel war der Kathode, die Membran der Anode zugewandt, so dass die negativ geladenen Proteine aus dem Gel zur Membran hinwanderten. Der Transfer erfolgte bei einer konstanten Stromstärke von 125 mA und einer Leistung von 2 W für 12 h. Nach dem Transfer wurde die Membran in ddH₂O entfärbt.

Transferpuffer:	25 mM Tris, 190 mM Glycin, 20 % (V/V) Methanol
Ponceau-S-Lösung:	0,2 % (m/V) Ponceau S, 3 % (m/V) Trichloressigsäure

3.7.4.2 Immunochemischer Nachweis transferierter Proteine

Die Membran wurde nach dem Transfer für 1 h in einer 5 %igen Milchpulverlösung inkubiert, um unspezifische Bindungen des Antikörpers an die Membran zu blockieren. Anschließend wurde die Membran für 2 h bei Raumtemperatur mit dem ersten Antikörper inkubiert. Die Antikörper wurden in PBS/Tween oder TBS/Tween nach Angaben des Herstellers verdünnt. Nach dreimaligem Waschen für jeweils 5 min in PBS/Tween wurde der zweite, in PBS/Tween 1:1000 verdünnte Antikörper (Peroxidase-gekoppeltes Anti-Kaninchen- oder Anti-Maus-IgG) für 45 min auf den Blot gegeben. Danach wurde dreimal mit PBS/Tween und einmal mit PBS (jeweils für 5 min) gewaschen. Sämtliche Inkubationen wurden bei Raumtemperatur auf dem Schüttler durchgeführt. Der Nachweis

der Immunkomplexe erfolgte mit Hilfe des ECL[™]-Systems (GE Healthcare) durch Inkubation der Membran in einer 1:1-Mischung der jeweiligen Lösungen 1 und 2 für 1-2 min. Die Chemolumineszenzsignale wurden durch Schwärzung eines Röntgenfilmes sichtbar gemacht.

PBS:	80 mM Na ₂ HPO ₄ , 20 mM NaH ₂ PO ₄ , 100 mM NaCl pH 7,5
TBS:	10 mM Tris/HCl pH 8,0, 150 mM NaCl
PBS/Tween:	0,5 % (V/V) Tween 20 in PBS
TBS/Tween:	0,05 % (V/V) Tween 20 in TBS
Milchpulverlösung:	5 % (m/V) Magermilchpulver in PBS/Tween oder TBS/Tween je
	nach verwendetem Antikörper

4 Ergebnisse

Die humanen CCR2-Rezeptoren waren die ersten Chemokinrezeptoren, die kloniert (Charo et al., 1994) und bezüglich ihrer Signaltransduktion (Myers et al., 1995; Kuang et al., 1996; Arai & Charo, 1996; Arai et al., 1997b), sowie ihrer strukturellen Charakteristika (Monteclaro & Charo, 1997; Mellado et al., 1998; Han et al., 1999; Gavrilin et al., 2005) und ihrer Rolle bei der Entstehung verschiedener Krankheiten charakterisiert wurden (Gonzalo et al., 1998; Han et al., 1998; Lukacs et al., 1999). Dabei wurden die beiden CCR2-Rezeptoren als die spezifischen Rezeptoren für das CC-Chemokin MCP-1 (CCL2) identifiziert. Die beiden menschlichen CCR2-Rezeptorvarianten hCCR2a und hCCR2b entstehen durch alternatives Spleißen aus der hnRNA eines Gens und die kodierten Proteine unterscheiden sich nur in der Sequenz ihrer carboxylterminalen Abschnitte. Wie alle anderen Chemokinrezeptoren gehören auch hCCR2a und hCCR2b zur großen Familie der G-Protein gekoppelten Rezeptoren, d.h. die Signaltransduktion erfolgt über die Interaktion des Rezeptors mit heterotrimeren G-Proteinen. Verschiedene Untersuchungen haben Hinweise darauf geliefert, dass die von den hCCR2-Rezeptoren induzierten Signale sowohl von Pertussistoxin-sensitiven G-Proteinen, wie Vertretern der $G\alpha_{i/o}$ -Familie, als auch von Pertussistoxin-insensitiven heterotrimeren G-Proteinen, wie Mitgliedern der $G\alpha_{q}$ -Familie auf intrazelluläre Effektoren wie Phospholipase C-B-Isoenzyme (PLCBs) und Phosphoinositid-3-Kinasen (PI3Ks) übertragen werden. Interessanterweise ist für zahlreiche $G\alpha_{q}$ -koppelnde Rezeptoren bekannt, dass sie neben den gerade genannten Effektoren auch RhoGTPasen aktivieren. Eine Möglichkeit die Aktivierung von RhoGTPasen durch Rezeptoren zu ermitteln, besteht in der Untersuchung der Aktivierung des Transkriptionsfaktors serum response factor (SRF). Die durch Rho-Proteine vermittelten Veränderungen des Aktinzytoskeletts führen zu einer Aktivierung des SRF-Koaktivators MAL, der dann im Komplex mit SRF zur Transkription von Zielgenen führt, die das serum response element (SRE)-Bindungsmotiv in ihren Promotorregionen besitzen (Miralles et al., 2003; Settleman, 2003). Unter Verwendung eines Luziferasereportergen-Assays zur Bestimmung der Aktivität des Transkriptionsfaktors SRF, sollte in der vorliegenden Arbeit untersucht werden, ob die Stimulation der hCCR2-Rezeptoren, hCCR2a und/oder hCCR2b, durch Liganden wie CCL2 (MCP-1) zu einer Aktivierung von RhoGTPasen führt und wenn ja, welche G-Proteine diese Aktivierung vermitteln.

4.1 Analyse der hCCR2-induzierten, CCL2-vermittelten Aktivierung des Transkriptionsfaktors *serum response factor* (SRF)

Vorausgegangene Untersuchungen der Arbeitsgruppe hatten erste Hinweise darauf geliefert, dass es bei transienter Expression der beiden Varianten des humanen Chemokinrezeptors CCR2, hCCR2a und hCCR2b, in COS-7-Zellen durch Stimulation mit humanem CCL2 zu einer serum response factor (SRF)-abhängigen Gentranskription eines Luziferase-Reportergens kommt. Um zu untersuchen wie spezifisch der stimulatorische Effekt von CCL2 auf die durch hCCR2b-induzierte SRF-abhängige Gentranskription ist, wurde hCCR2b in COS-7-Zellen transient exprimiert und die SRF-abhängige transkriptionelle Genaktivierung nach Stimulation der Zellen mit verschiedenen Chemokinen analysiert. Die SRF-abhängige Gentranskription wurde mit Hilfe des Dual Luciferase[®] Reporter Assay Systems untersucht. Dazu wurden die Zellen mit zwei Reporterplasmiden kotransfiziert. Ein Reporterplasmid - pSRE.L (firefly) - trägt die cDNA der Luziferase des amerikanischen Glühwürmchens Photinus pyralis (firefly-Luziferase) unter der Kontrolle des transkriptionellen Regulatorelements SRE.L. SRE.L ist ein Derivat des serum response element (SRE) von c-fos, das so verändert wurde, dass es zwar den Transkriptionsfaktor SRF, aber nicht mehr den tertiary complex factor (TCF) binden kann. Somit führt die Bindung von SRF an den Promotor des Reporterplasmids zur Transkription des firefly-Luziferase-Gens. Die Expression der firefly-Luziferase stellt damit ein Maß für die Aktivität des Transkriptionsfaktors SRF dar. Das zweite Reporterplasmid, pRL-TK, trägt die cDNA der Luziferase der Koralle Renilla reniformis (Renilla-Luziferase) unter der Kontrolle des Promotors des Herpes-simplex-Virus-Thymidinkinasegens (HSV-TK). HSV-TK führt dazu, dass die Renilla-Luziferase konstitutiv auf niedrigem Niveau exprimiert wird. Somit stellt die Aktivität der Renilla-Luziferase ein Maß für die Transfektionseffizienz dar, anhand derer die für die *firefly*-Luziferase-Aktivität ermittelten Werte korrigiert werden. Die Bestimmung der Reportergenaktivität erfolgte nach den vom Hersteller des Assaysystems gemachten Angaben, durch Messung der Luziferase-Aktivitäten mit dem Luminometer Mithras LB 940.



Abb. 1: Einfluss verschiedener Chemokine auf die hCCR2a- und hCCR2b-induzierte serumresponse-factor-abhängige Gentranskription in COS-7-Zellen. COS-7-Zellen ($4x10^4$ pro well) in einer 48-well Platte wurden mit jeweils 0,03 µg DNA der Reporterplasmide pSRE.L und pRL-TK, sowie mit 0,1 µg des Expressionsplasmids HA-CCR2a-pcDNA3.1(+) oder 0,1 µg des Expressionsplasmids Flag-CCR2b-pcDNA3.1(+) oder mit den entsprechenden Mengen des Leerplasmids transfiziert. 22 Stunden nach der Transfektion wurden die Zellen mit CCL2, CXCL12 oder CCL5 (jeweils 100 nM) für 6 Stunden inkubiert. Anschließend wurden die Zellen mit 40 µl passivem Lysispuffer pro well aufgeschlossen und in den Lysaten die SRF-abhängige Gentranskription durch Messung der Luziferase-Aktivitäten bestimmt. Die fach-Aktivitäten wurden ermittelt, indem die Messwerte der Luziferaseaktvität auf die Aktivität der Zellen bezogen wurde, die nur mit dem leeren Kontrollvektor pcDNA3.1(+) transfiziert worden waren. Die in der Abbildung gezeigten Werte entsprechen den Mittelwerten \pm Standardabweichungen von Dreifachbestimmungen.

Die in Abbildung 1 dargestellten Ergebnisse zeigen, dass hCCR2a- und hCCR2bexprimierende COS-7-Zellen nur auf die Stimulation mit CCL2 (100 nM) mit einer Zunahme der SRF-abhängigen Gentranskription auf den *ca*. 4-fachen Wert gegenüber der SRF-abhängigen Gentranskription von Kontrollzellen reagierten, die mit der entspechenden Menge an leerem Expressionsvektor pcDNA3.1(+) transfiziert worden waren. Die Inkubation der Zellen mit CXCL12 (100 nM), dem Liganden des Chemokinrezeptors CXCR4 bzw. CCL5 (100 nM), einem Ligand von CCR1, CCR3, CCR4 und CCR5, führte dagegen zu keiner Zunahme der Reportergenexpression. Die meisten Chemokinrezeptoren sind in der Lage mit mehr als nur einem Chemokin zu interagieren. Untersuchungen anderer Arbeitsgruppen haben gezeigt, dass drei weitere CC-Chemokine, CCL8 (MCP-2) (Gong *et al.*, 1997; Moore *et al.*, 1997; Yamagami *et al.*, 1997), CCL7 (MCP-3) (Combadiere *et al.*, 1995) und CCL13 (MCP-4) (Garcia-Zepeda *et al.*, 1996; Berkhout *et al.*, 1997; Godiska *et al.*, 1997) funktionelle Liganden für hCCR2a und hCCR2b darstellen. Um der Frage nachzugehen, (i) ob auch diese Liganden die SRF-abhängige Gentranskription in hCCR2-exprimierenden Zellen stimulieren und (ii) wenn ja, ob Unterschiede in der Stimulation zwischen hCCR2a- und hCCR2b-exprimierenden Zellen zu beobachten sind, wurden COS-7-Zellen mit den Reporterplasmiden pSRE.L und pRT-TK und den Expressionsplasmiden HA-CCR2a-pcDNA3.1(+) oder Flag-CCR2b-pcDNA3.1(+) bzw. der entsprechenden Menge des Leervektors transfiziert und die Zellen am nächsten Tag für 6 Stunden mit den verschiedenen Chemokinen bzw. der entsprechenden Menge des Lösungsmittels inkubiert. Im Anschluss an die Inkubation wurden die Zellen geerntet, aufgeschlossen und in den Lysaten die SRF-abhängige Gentranskription durch Messung der Luziferaseaktivitäten bestimmt.



Abb. 2: Analyse der hCCR2-induzierten SRF-abhängigen Gentranskription nach Stimulation mit verschiedenen CC-Chemokinen. COS-7-Zellen ($4x10^4$ pro *well*) in einer 48-*well* Platte wurden mit jeweils 0,03 µg DNA der Reporterplasmide pSRE.L und pRL-TK, sowie mit 0,1 µg des Expressionsplasmids HA-CCR2a-pcDNA3.1(+) oder 0,1 µg des Expressionsplasmids Flag-CCR2b-pcDNA3.1(+) oder mit den entsprechenden Mengen des Leerplasmids transfiziert. 22 Stunden nach der Transfektion wurden die Zellen mit CCL2 (MCP-1), CCL8 (MCP-2) oder CCL7 (MCP-3) (jeweils 100 nM) für 6 Stunden inkubiert. Anschließend wurden die Zellen mit 40 µl passivem Lysispuffer pro *well* aufgeschlossen und in den Lysaten die SRF-abhängige Gentranskription durch Messung der Luziferaseaktivitäten bestimmt. Die *fach*-Aktivitäten wurden ermittelt, indem die Messwerte der Luziferaseaktivität auf die Aktivität der Zellen bezogen wurde, die nur mit dem leeren Kontrollvektor pcDNA3.1(+) transfiziert worden waren. Die in der Abbildung gezeigten Werte entsprechen den Mittelwerten \pm Standardabweichungen von Dreifachbestimmungen.

Die Stimulation von transient hCCR2a- bzw. hCCR2b-exprimierenden COS-7-Zellen mit den verschiedene Liganden der hCCR2-Rezeptoren (s. Abb. 2) zeigte, dass alle drei untersuchten Chemokine in der Lage waren eine Zunahme der SRF-abhängigen Gentranskription zu vermitteln. Jedoch zeigten sich Unterschiede zwischen den verschiedenen Liganden bezüglich der Höhe des Anstiegs der Reportergenaktivität. So führte die Stimulation der Zellen mit CCL2 zur stärksten Aktivierung (*ca.* 4.5- bis 5-fach) der SRF-abhängigen Gentranskription. Für die anderen beiden untersuchten Chemokine zeigte sich, dass CCL8 die Luziferaseaktivität im Vergleich zu CCL2 und CCL7 am geringsten erhöhte. Jedoch bleibt hier die Frage offen, ob diese Ergebnisse auf unterschiedliche Affinitäten in der Bindung der Liganden an die Rezeptoren zurückzuführen sind. Um diese Frage klären zu können, wird es das Ziel weitergehender Untersuchungen sein, Konzentrations-Wirkungskurven für die einzelnen Rezeptoren und Liganden zu erstellen. Durch diese Untersuchungen soll auch geklärt werden, ob die beobachteten geringfügigen Unterschiede in den Aktivierungen des hCCR2a- *versus* hCCR2b-Rezeptors durch die verschiedenen Liganden auf unterschiedliche Affinitäten zu den Liganden zurückzuführen sind.

4.2 Untersuchung der hCCR2a/b-induzierten SRF-abhängigen Gentranskription bei Stimulation mit steigenden CCL2-Mengen

Aufgrund der Tatsache, dass die Stimulation sowohl von hCCR2a- als auch von hCCR2bexprimierenden Zellen mit CCL2 zu einer Aktivierung der SRF-abhängigen Gentranskription geführt hatte, sollte als nächstes geklärt werden, ob Unterschiede zwischen den beiden hCCR2-Rezeptorvarianten bezüglich der Affinität und der maximalen Stimulierbarkeit durch CCL2 bestehen. Um dieser Frage nachzugehen wurden als nächstes Konzentrations-Wirkungs-Kurven erstellt. Dazu wurden COS-7-Zellen mit den Reporterplasmiden pSRE.L und pRT-TK und den Expressionsplasmiden HA-CCR2apcDNA3.1(+) bzw. Flag-CCR2b-pcDNA3.1(+) transfiziert. 22 Stunden nach der Transfektion wurden die Zellen für 6 Stunden mit steigenden Konzentrationen von CCL2 inkubiert.



Abb. 3: Dosis-Wirkungs-Kurve der CCL2-stimulierten, hCCR2a- und hCCR2b-induzierten Aktivierung der SRF-abhängigen Gentranskription. COS-7-Zellen (4x10⁴ pro well) wurden mit jeweils 0,03 µg DNA der Reporterplasmide pSRE.L und pRL-TK, sowie mit 0,1 µg des Expressionsplasmids HA-CCR2a-pcDNA3.1(+) (linke Abbildung) und 0.1 μg des Expressionsplasmids Flag-CCR2b-pcDNA3.1(+) (rechte Abbildung) transfiziert. 22 Stunden nach der Transfektion wurden die Zellen mit steigenden Konzentrationen von CCL2 (0,1 nM, 0,2 nM, 0,5 nM, 1 nM, 2 nM, 5 nM, 10 nM, 20 nM, 50 nM, 100 nM, 200 nM, 500 nM) bzw. der entsprechenden Menge an Lösungsmittel (Kontrolle) für 6 Stunden inkubiert. Anschließend wurden die Zellen mit 40 µl passivem Lysispuffer pro well aufgeschlossen und in den Lysaten die SRF-abhängige Gentranskription durch Messung der Luziferaseaktivitäten bestimmt. Die in der Abbildung gezeigten Werte entsprechen den Mittelwerten \pm Standardabweichungen von Dreifachbestimmungen.

Die in Abbildung 3 dargestellten Ergebnisse zeigen, dass CCL2 dosisabhängig die hCCR2a- und hCCR2b-vermittelte SRF-abhängige Gentranskription induziert und bei der höchsten eingesetzten CCL2-Konzentration (500 nM) mit dem *ca.* 6,5- bzw. 5,3-fachen Wert im Vergleich zu Kontrollzellen die maximale SRF-Aktivität erreicht. In der halblogarithmischen Darstellung der Dosis-Wirkungskurve zeigte sich, dass die in hCCR2a- bzw. hCCR2b-exprimierenden Zellen bestimmte SRF-Aktivität einen biphasischen Verlauf (s. kleines Diagramm in Abb. 3) aufweist (hCCR2a-EC₅₀-1: 5,6 nM, hCCR2a-EC₅₀-2: 177 nM; hCCR2b-EC₅₀-1: 0,58 nM, hCCR2b-EC₅₀-2: 177 nM). Zudem wurde ein kleiner Teil von hCCR2b-exprimierenden Zellen identifiziert, der im Gegensatz zu hCCR2a-exprimierenden Zellen eine hohe Affinität für CCL2 aufweist (hCCR2b-EC₅₀: 0,58 nM; hCCR2a-EC₅₀: 5,6 nM).

4.3 Untersuchung der Interaktion der Chemokinrezeptoren hCCR2a und hCCR2b mit verschiedenen Gα-Untereinheiten heterotrimerer G-Proteine

4.3.1 Einfluss von Pertussistoxin (PTX) auf die hCCR2-induzierte SRFabhängige Gentranskription und die Produktion von Inositphosphaten durch Phospholipase C-β-Isoenzyme

hCCR2a und hCCR2b gehören wie alle Chemokinrezeptoren zur großen Familie der G-Protein-gekoppelten Rezeptoren. GPCRs übertragen extrazelluläre Signale durch Interaktion mit heterotrimeren G-Proteinen auf intrazelluläre Effektoren, wie z.B. Phospholipase C-β-Isoenzyme (PLC-βs), Phosphoinositide-3-Kinasen (PI3Ks) und Adenylycyclasen. Dabei sind die hCCR2-Rezeptoren in der Lage, sowohl mit Pertussistoxin-sensitiven, als auch mit Pertussistoxin-insensitiven heterotrimeren G-Proteinen zu interagieren. Um zu untersuchen, ob und wenn ja welche Bedeutung Pertussistoxin-sensitiven G-Proteinen der Gai/o-Familie bei der Aktivierung der SRFabhängigen Gentranskription zukommt, wurden COS-7-Zellen mit den Reporterplasmiden pSRE.L und pRT-TK und den Expressionsplasmiden HA-CCR2a-pcDNA3.1(+) bzw. Flag-CCR2b-pcDNA3.1(+) transfiziert und mit steigenden Konzentrationen von Pertussistoxin (PTX) inkubiert. Parallel dazu wurde der Einfluss von Pertussistoxin auf die hCCR2-vermittelte Aktivierung von Phospholipase C-B-Isoenzymen untersucht, da vorausgegangene Untersuchungen der Arbeitsgruppe gezeigt hatten, dass die transiente Expression von hCCR2a und hCCR2b in COS-7-Zellen und nachfolgende Stimulation mit CCL2 zu einer Zunahme, der von PLC-β-Isoenzymen produzierten Inositphosphaten führt.



Abb. 4: Einfluss von Pertussistoxin (PTX) auf die von hCCR2a- und hCCR2b-induzierte **SRF-abhängige Gentranskription.** COS-7-Zellen ($4x10^4$ pro *well*) wurden mit jeweils 0,03 µg DNA pro well mit den Reporterplasmiden pSRE.L und pRL-TK, sowie mit 0,1 µg des HA-CCR2a-pcDNA3.1(+) Expressionsplasmids (linke Abbildung) und 0.1 μg des Expressionsplasmids Flag-CCR2b-pcDNA3.1(+) (rechte Abbildung) oder mit den entsprechenden Mengen des Leerplasmids transfiziert. 24 Stunden nach der Transfektion wurde das Medium gewechselt und die Zellen mit steigenden Konzentrationen von Pertussistoxin (0,1 ng/ml, 1 ng/ml, 3 ng/ml, 10 ng/ml, 30 ng/ml, 50 ng/ml) über Nacht inkubiert. Am nächsten Tag wurden die Zellen für 6 Stunden mit CCL2 (50 nM) inkubiert. Anschließend wurden die Zellen mit 40 µl passivem Lysispuffer pro well aufgeschlossen und in den Lysaten die SRF-abhängige Gentranskription durch Messung der Luziferaseaktivitäten bestimmt. Die in der Abbildung gezeigten Werte entsprechen den Mittelwerten ± Standardabweichungen von Dreifachbestimmungen.

Die in Abbildung 4 dargestellten Ergebnisse zeigen, dass die transiente Expression von hCCR2a (linke Seite) und hCCR2b (rechte Seite) in COS-7-Zellen und deren Stimulation mit CCL2 zu einer *ca*. 5,5- und 4,8-fachen Zunahme der SRF-abhängigen Gentranskription im Vergleich zu den Kontrollzellen führte, die mit der entspechenden Menge des leeren Expressionsplasmids transfiziert worden waren. Bei Inkubation der Zellen mit steigenden Mengen Pertussistoxin wurde in Anwesenheit des Liganden eine dosisabhängige Inhibition der Reportergenexpression um etwa 70 % in hCCR2b-exprimierenden Zellen und ein *ca*. 85 %iger Rückgang der Luziferaseaktivität in hCCR2a-exprimierenden Zellen, jeweils bei der höchsten Konzentration an Pertussistoxin (50 ng/ml) beobachtet. Die Ergebnisse zur Untersuchung des Einflusses von Pertussistoxin auf die hCCR2-vermittelte Aktivierung von Phospholipase C-β-Isoenzymen sind in Abbildung 5 dargestellt. Die Stimulation der

transient transfizierten Zellen mit 50 nM CCL2 resultierte im Vergleich zu Kontrollzellen in einer Zunahme der Inositphosphatproduktion auf den ca. 6-fachen Wert im Fall von hCCR2a- und auf den ca. 6,5 fachen Wert für hCCR2b-exprimierende Zellen. Die Inkubation der hCCR2-exprimierenden Zellen mit steigenden Mengen Pertussistoxin führte in Anwesenheit des Liganden zu einer deutlicheren Abnahme (bis auf etwa 10 %) der hCCR2a-vermittelten Aktivierung von Phospholipase C-B-Isoenzymen. Dagegen wurde die Inositphosphatproduktion in hCCR2b-exprimierenden COS-7-Zellen durch die höchste Konzentration an Pertussistoxin nur um etwa 60 % vermindert. Der inhibitorische Einfluss, den die Behandlung der hCCR2-exprimierenden Zellen mit Pertussistoxin auf beide durch die hCCR2-Rezeptoren induzierten Signalwege hatte, könnte auf die Beteiligung von Ga-Untereinheiten der Ga_{i/o}-Familie bzw. auf eine scavenger-Funktion der Gai-Untereinheit für Gby-Untereinheiten hinweisen. Auch die höchste Konzentration an Pertussistoxin führte nicht zu einer vollständigen Inhibierung der SRF-abhängigen Gentranskription und der Inositphosphatproduktion. Letztere Beobachtungen deuten darauf hin, dass auch Pertussistoxin-insensitive Gα-Untereinheiten an den beschriebenen hCCR2vermittelten zellulären Funktionen beteiligt sind.



Abb. 5: Bestimmung der Inositphosphatproduktion in hCCR2a- und hCCR2bexprimierenden COS-7-Zellen nach Behandlung mit Pertussistoxin. COS-7-Zellen $(4x10^4 \text{ pro } well)$ wurden mit 0,1 µg des Expressionsplasmids HA-CCR2a-pcDNA3.1(+) (linke Hälfte) und 0,1 µg des Expressionsplasmids Flag-CCR2b-pcDNA3.1(+) (rechte Hälfte) oder mit

den entsprechenden Mengen des Leerplasmids transfiziert. 24 Stunden nach der Transfektion wurde das Medium gewechselt und die Zellen mit 0,5 ml Medium (pro *well*), welches 2 μ Ci *myo*-[2-³H (N)]-Inositol/ml, 10 mM LiCl und Pertussistoxin (0,1 ng/ml, 1 ng/ml, 3 ng/ml, 10 ng/ml, 30 ng/ml, 50 ng/ml) enthielt, für 17 h inkubiert. Danach wurden die Zellen mit CCL2 (50 nM) in Anwesenheit von 10 mM LiCl inkubiert. Nach 4 Stunden wurden die Zellen lysiert und die Menge der gebildeten Inositphosphate ermittelt. Die in der Abbildung gezeigten Werte entsprechen den Mittelwerten ± Standardabweichungen von Dreifachbestimmungen.

4.3.2 Beteiligung von Gα-Untereinheiten der Gα_q-Familie an der hCCR2induzierten SRF-abhängigen Gentranskription

Die Ergebnisse der Untersuchung des Einflusses von Pertussistoxin auf die hCCR2vermittelte SRF-abhängige Gentranskription und die Aktivität von Phospholipase C-β-Isoenzymen (s. 4.3.1) hatten erste Hinweise darauf geliefert, dass auch Pertussistoxininsensitive G-Proteine an der Signaltransduktion durch die hCCR2-Rezeptoren beteiligt sind. Außerdem hatten vorangegangene Untersuchungen der Arbeitsgruppe bereits gezeigt, dass die Koexpression der Pertussistoxin-insensitiven G α -Untereinheit G α_q zu einem synergistischen Anstieg der hCCR2-induzierten Inositphosphatproduktion führt. Um nun weitere Belege für eine Beteiligung von $G\alpha_q$ an den hCCR2-vermittelten Signalwegen zu bekommen, wurde im Folgenden der Einfluss des Gag-bindenden Proteins regulator of Gprotein signaling 2 (RGS2) und des Gaa-bindenden, carboxylterminalen Abschnitts der Phospholipase C-B₁ (PLCB_{1-CT}) auf die hCCR2-induzierte SRF-abhängige Luziferase-Reportergenexpression untersucht. Für RGS-Proteine wurde gezeigt, dass sie zu einer Zunahme der intrinsischen Hydrolyserate von Ga-Untereinheiten heterotrimerer G-Proteine führen. Diese Fähigkeit wird durch eine ca. 120 Aminosäuren umfassende, konservierte RGS-Domäne, die charakteristisch für diese Proteinfamilie ist, vermittelt. Durch die Stimulation der Hydrolyserate der Ga-Untereinheiten führen RGS-Proteine zu einer schnelleren Inaktivierung der Gα-Proteine und zu einer Inhibition der nachfolgenden Signalwege. Die meisten RGS-Proteine sind in der Lage die Hydrolyserate von Ga-Untereinheiten der Ga_{i/o}- und Ga_a- Familien zu erhöhen. Einige RGS-Proteine dagegen stimulieren spezifisch die GTP-Hydrolyserate bestimmter Gα-Untereinheiten. So wurde für RGS2 (regulator of G-protein signaling 2) gezeigt, dass es bevorzugt die GTP-Hydrolyserate von Ga_q-Untereinheiten reguliert (Heximer et al., 1999). Vorausgegangene Untersuchungen der Arbeitsgruppe viralen $G\alpha_q$ -gekoppelten am Chemokinrezeptorhomolog pUS28 hatten gezeigt, dass der carboxylterminale Bereich von PLC β_1 als eine Art scavenger in der Lage ist, die von pUS28 durch Kopplung an G α_q - Untereinheiten induzierten zellulären Funktionen zu inhibieren. Um nun den Einfluss von RGS2 bzw. PLC β_{1-CT} auf die hCCR2-vermittelte Signaltransduktion zu untersuchen wurden COS-7-Zellen mit HA-CCR2a-pcDNA3.1(+) bzw. Flag-CCR2b-pcDNA3.1(+) und/oder Myc-RGS2-pcDNA3.1(+) und/oder PLC β_{1-CT} -pcDNA3.1(+) transfiziert und die SRF-abhängige Gentranskription nach Inkubation der Zellen mit CCL2 (50 nM) analysiert.



Abb. 8: Einfluss der Koexpression von RGS2 auf die hCCR2-vermittelte SRF-abhängige Gentranskription in COS-7-Zellen. COS-7-Zellen $(4x10^4 \text{ pro well})$ wurden mit jeweils 0,03 µg DNA pro well mit den Reporterplasmiden pSRE.L und pRL-TK, sowie mit 0,1 µg des Expressionsplasmids HA-CCR2a-pcDNA3.1(+) bzw. 0,1 µg des Expressionsplasmids Flag-CCR2b-pcDNA3.1(+) und/oder mit je 0,1 µg des Expressionsplasmids Myc-RGS2-pcDNA3.1(+) transfiziert. 22 Stunden nach der Transfektion wurden die Zellen mit CCL2 (50 nM) für 6 Stunden inkubiert, mit 40 µl passivem Lysispuffer pro well aufgeschlossen und in den Lysaten die SRF-abhängige Gentranskription durch Messung der Luziferaseaktivitäten bestimmt. Die in der Abbildung gezeigten Werte entsprechen den Mittelwerten \pm Standardabweichungen von Dreifachbestimmungen.

Die in Abbildung 8 dargestellten Ergebnisse zeigen, dass die Inkubation von hCCR2aexprimierenden COS-7-Zellen mit CCL2 (50 nM) zu einer *ca*. 5-fachen Zunahme der SRFabhängigen Gentranskription führte (linke Hälfte). In hCCR2b-exprimierenden Zellen hatte die Inkubation mit CCL2 einen *ca*. 2,4-fachen Anstieg der Reportergenaktivität, im Vergleich zu Kontrollzellen, zur Folge (rechte Hälfte). Durch die Anwesenheit von RGS2 wurde die von hCCR2a induzierte Zunahme der SRF-abhängigen Gentranskription komplett inhibiert und die hCCR2b-vermittelte Luziferaseaktivität ging durch die Koexpression von RGS2 um *ca*. 80 % zurück. Die in Abbildung 9 dargestellten Ergebnisse zeigen, dass die Koexpression von PLC β_{1CT} ebenfalls einen inhibitorischen Einfluss auf
die von den hCCR2-Rezeptorvarianten induzierte SRF-abhängige Gentranskription hatte. So wurde die hCCR2a-vermittelte Zunahme der Reportergenaktivität in Anwesenheit von PLC β_{1CT} um *ca*. 85 % und die hCCR2b-induzierte SRF-abhängige Gentranskription um *ca*. 45 % inhibiert.



Abb. 9: Einfluss der Koexpression von PLC β_{1-CT} auf die hCCR2-vermittelte SRF-abhängige Gentranskription in COS-7-Zellen. COS-7-Zellen (4x10⁴ pro *well*) wurden mit jeweils 0,03 µg DNA pro *well* mit den Reporterplasmiden pSRE.L und pRL-TK, sowie mit 0,05 µg des Expressionsplasmids HA-CCR2a-pcDNA3.1(+) bzw. 0,05 µg des Expressionsplasmids Flag-CCR2b-pcDNA3.1(+) und/oder mit 0,15 µg des Expressionsplasmids PLC β_{1-CT} -pcDNA3.1(+) transfiziert. 22 Stunden nach der Transfektion wurden die Zellen mit CCL2 (50 nM) für 6 Stunden inkubiert, mit 40 µl passivem Lysispuffer pro *well* aufgeschlossen und in den Lysaten die SRF-abhängige Gentranskription durch Messung der Luziferaseaktivitäten bestimmt. Die in der Abbildung gezeigten Werte entsprechen den Mittelwerten ± Standardabweichungen von Dreifachbestimmungen.

Da die Ergebnisse zur Untersuchung des Einflusses von RGS2 und PLC β_{1CT} auf die hCCR2-induzierte SRF-abhängige Gentranskription die Vermutung, dass Pertussistoxininsensitive G α -Untereinheiten der G α_q -Familie eine wichtige Rolle bei der hCCR2vermittelten Signaltransduktion spielen, bestätigt hatten, sollte im Folgenden geklärt werden, ob auch die Expression der verschiedenen G α -Untereinheiten der G α_q -Familie einen stimulatorischen Einfluss auf die hCCR2-induzierte SRF-abhängige Gentranskription hat. Dazu wurde hCCR2a bzw. hCCR2b zusammen mit den G-Protein Untereinheiten G α_q , G α_{11} , G α_{14} und G α_{16} , welche über Sequenzabschnitte verfügten, die für ein internes EE-Epitop kodieren (G α_{qEE} , G α_{11EE} , G α_{14EE} und G α_{16EE}), in COS-7-Zellen transient exprimiert. Anschließend wurde die CCL2-stimulierte, hCCR2-induzierte SRFabhängige Reportergenexpression ermittelt.



Abb. 10: Einfluss der Koexpression der vier G α -Untereinheiten der G α_q -Familie auf die hCCR2-vermittelte SRF-abhängige Gentranskription in COS-7-Zellen. COS-7-Zellen (4x10⁴ pro *well*) wurden mit jeweils 0,03 µg DNA pro *well* mit den Reporterplasmiden pSRE.L und pRL-TK, sowie mit 0,05 µg des Expressionsplasmids HA-CCR2a-pcDNA3.1(+) bzw. 0,05 µg des Expressionsplasmids Flag-CCR2b-pcDNA3.1(+) und/oder mit je 0,05 µg der Expressionsplasmide G α_{qEE} -pcDNA3.1(+), G α_{11EE} -pcDNA3.1(+), G α_{14EE} -pcDNA3.1(+) oder G α_{16EE} -pcDNA3.1(+) kotransfiziert. 22 Stunden nach der Transfektion wurden die Zellen mit CCL2 (50 nM) für 6 Stunden inkubiert, mit 40 µl passivem Lysispuffer pro *well* aufgeschlossen und in den Lysaten die SRF-abhängige Gentranskription durch Messung der Luziferaseaktivitäten bestimmt. Die in der Abbildung gezeigten Werte entsprechen den Mittelwerten ± Standardabweichungen von Dreifachbestimmungen.

Die in Abbildung 10 dargestellten Ergebnisse zeigen, dass die Koexpression von $G\alpha_q$ oder $G\alpha_{14}$ mit hCCR2a bzw. hCCR2b zu einer synergistischen Aktivierung der SRF-abhängigen Gentranskription auf den *ca*. 1,8- bis 3-fachen Wert im Vergleich zu Zellen führte, die die Rezeptoren allein exprimierten. Dagegen hatte die Koexpression von $G\alpha_{16}$ mit den beiden hCCR2-Rezeptorvarianten einen inhibitorischen Einfluss auf die CCL2-stimulierte,

hCCR2-induzierte Luziferase-Reportergenexpression. So führte die Koexpression von Ga_{16} mit hCCR2a zu einer Reduktion der SRF-abhängigen Gentranskription um *ca*. 85 % im Vergleich zu der durch hCCR2a induzierten Reportergenaktivität und die Koexpression von Ga_{16} mit hCCR2b resultierte in einer Reduktion der von hCCR2b vermittelten Reportergenaktivität um *ca*. 70 %. Die Koexpression von Ga_{11} hatte nahezu keine Auswirkungen auf die hCCR2b-induzierte Luziferaseaktivität. Im Gegensatz dazu führte die Koexpression von Ga_{11} mit hCCR2a zu einer 50 %igen Abnahme der hCCR2a-vermittelten SRF-abhängigen Gentranskription.

Aufgrund der Tatsache, dass die Expression der verschiedenen Gα-Untereinheiten der Gα_q-Familie zusammen mit hCCR2a oder hCCR2b unterschiedliche Auswirkungen auf die hCCR2-induzierte SRF-abhängige Gentranskription hatte, sollte als Nächstes geklärt werden, ob diese synergistischen bzw. inhibitorischen Einflüsse der verschiedenen Ga-Untereinheiten mit den zur transienten Transfektion eingesetzten Ga_{EE}-cDNA-Mengen korrelieren. Dazu wurden COS-7-Zellen mit den Reporterplasmiden pSRE.L und pRT-TK und den Expressionsplasmiden HA-CCR2a-pcDNA3.1(+) bzw. Flag-CCR2bpcDNA3.1(+), sowie mit steigenden DNA-Mengen der Expressionsplasmide $G\alpha_{\alpha EE}$ pcDNA3.1(+), $G\alpha_{11EE}$ -pcDNA3.1(+), $G\alpha_{14EE}$ -pcDNA3.1(+) und $G\alpha_{16EE}$ -pcDNA3.1(+) kotransfiziert. Am nächsten Tag wurden die Zellen für 6 Stunden mit 50 nM CCL2, bzw. der entsprechenden Menge des Lösungsmittels inkubiert.



Abb. 11: Einfluss der Expression von steigenden Mengen $G\alpha_q$ auf die hCCR2-vermittelte SRF-abhängige Gentranskription in COS-7-Zellen. COS-7-Zellen (4x10⁴ pro well) wurden mit jeweils 0,03 µg DNA pro well mit den Reporterplasmiden pSRE.L und pRL-TK sowie mit 0,05 µg Expressionsplasmids HA-CCR2a-pcDNA3.1(+) (linke Abbildung), 0.05 des μg des Expressionsplasmids Flag-CCR2b-pcDNA3.1(+) (rechte Abbildung) und/oder mit steigenden DNA-Mengen (20 ng, 50 ng, 100 ng, 200 ng, 300 ng) des Expressionsplasmids $G\alpha_{qEE}$ pcDNA3.1(+) kotransfiziert. 22 Stunden nach der Transfektion wurden die Zellen mit CCL2 (50 nM) bzw. mit der entsprechenden Menge an Lösungsmittel (Kontrolle) für 6 Stunden inkubiert. Anschließend wurden die Zellen mit 40 µl passivem Lysispuffer pro well aufgeschlossen und in den Lysaten die SRF-abhängige Gentranskription durch Messung der Luziferaseaktivitäten bestimmt. Die in der Abbildung gezeigten Werte entsprechen den Mittelwerten \pm Standardabweichungen von Dreifachbestimmungen.

Die in Abbildung 11 dargestellten Ergebnisse zeigen, dass schon die geringste zur Transfektion eingesetzte DNA-Menge des Expressionsplasmids Ga_{qEE} -pcDNA3.1(+) von 20 ng zu einer synergistischen Zunahme der hCCR2a- und der hCCR2b-vermittelten SRFabhängigen Gentranskription auf den *ca*. 2,5-fachen Wert im Vergleich zu Zellen führte, die die Rezeptoren allein exprimierten. Steigenden Mengen, des zur Transfektion eingesetzten Expressionsplasmids Ga_{qEE} -pcDNA3.1(+), führten zu einer stärkeren Aktivierung der hCCR2-stimulierten SRF-abhängige Gentranskription. Die Expression von Ga_q , in Abwesenheit von hCCR2, hatte keinen Einfluß auf die SRF-abhängige Gentranskription in COS-7-Zellen.



Abb. 12: Einfluss der Expression von steigenden Mengen $G\alpha_{11}$ auf die hCCR2-vermittelte SRF-abhängige Gentranskription in COS-7-Zellen. COS-7-Zellen (4x10⁴ pro *well*) wurden mit jeweils 0,03 µg DNA pro *well* mit den Reporterplasmiden pSRE.L und pRL-TK, sowie mit 0,05 µg des Expressionsplasmids HA-CCR2a-pcDNA3.1(+) (linke Abbildung), 0,05 µg des Expressionsplasmids Flag-CCR2b-pcDNA3.1(+) (rechte Abbildung) und/oder mit steigenden DNA-Mengen (5 ng, 10 ng, 20 ng, 50 ng, 100 ng) des Expressionsplasmids G α_{11EE} -pcDNA3.1(+) kotransfiziert. 22 Stunden nach der Transfektion wurden die Zellen mit CCL2 (50 nM) bzw. mit der entsprechenden Menge an Lösungsmittel (Kontrolle) für 6 Stunden inkubiert. Anschließend wurden die Zellen mit 40 µl passivem Lysispuffer pro *well* aufgeschlossen und in den Lysaten die SRF-abhängige Gentranskription durch Messung der Luziferaseaktivitäten bestimmt. Die in der Abbildung gezeigten Werte entsprechen den Mittelwerten ± Standardabweichungen von Dreifachbestimmungen.

Die Koexpression steigender Mengen $G\alpha_{11}$ zusammen mit hCCR2a (Abb. 12, linke Hälfte) und hCCR2b (Abb. 12, rechte Hälfte) führte bei niedrigen Konzentrationen des zur Transfektion eingesetzten Plasmids $G\alpha_{11EE}$ -pcDNA3.1(+) (5 ng, 10 ng) zu einer synergistischen Zunahme der SRF-abhängigen Gentranskription und erreichte für die Koexpression von Ga_{11} (10 ng) und hCCR2a bzw. hCCR2b mit dem *ca.* 1,5-fachen Wert, im Vergleich zu hCCR2a- bzw. hCCR2b-exprimierenden Zellen, das Maximum. Kotransfektion der Zellen mit hCCR2a-pcDNA3.1(+) oder hCCR2b-pcDNA3.1(+) und größeren DNA-Mengen von G α_{11EE} - pcDNA3.1(+) (20 ng, 50 ng und 100 ng) hatte einen inhibitorischen Effekt auf die hCCR2-Rezeptor-vermittelte SRF-abhängige Gentranskription, so dass die halblogarithmische Darstellung der Daten Kurven mit glockenförmigem Verlauf lieferte.



Abb. 13: Einfluss der Expression von steigenden Mengen Ga₁₄ auf die hCCR2-vermittelte **SRF-abhängige Gentranskription in COS-7-Zellen**. COS-7-Zellen $(4x10^4 \text{ pro well})$ wurden mit jeweils 0,03 µg DNA pro well mit den Reporterplasmiden pSRE.L und pRL-TK, sowie mit 0,05 µg Expressionsplasmids HA-CCR2a-pcDNA3.1(+) (linke Hälfte). des 0,05 μg des Expressionsplasmids Flag-CCR2b-pcDNA3.1(+) (rechte Hälfte) und/oder mit steigenden DNA-Mengen (20 ng, 50 ng, 100 ng, 200 ng, 300 ng) des Expressionsplasmids Ga_{14-FF} -pcDNA3.1(+) kotransfiziert. 22 Stunden nach der Transfektion wurden die Zellen mit CCL2 (50 nM) bzw. mit der entsprechenden Menge an Lösungsmittel (Kontrolle) für 6 Stunden inkubiert. Anschließend wurden die Zellen mit 40 µl passivem Lysispuffer pro well aufgeschlossen und in den Lysaten die SRF-abhängige Gentranskription durch Messung der Luziferaseaktivitäten bestimmt. Die in der Abbildung gezeigten Werte entsprechen den Mittelwerten \pm Standardabweichungen von Dreifachbestimmungen.

Um den Einfluss von $G\alpha_{14}$ auf die hCCR2-vermittelte Zunahme der SRF-abhängigen Gentranskription zu untersuchen, wurden COS-7-Zellen mit den Expressionsplasmiden HA-CCR2a-pcDNA3.1(+) (Abb. 13, linke Hälfte) bzw. Flag-CCR2b-pcDNA3.1(+) (Abb. 13, rechte Hälfte) und steigenden Mengen $G\alpha_{14EE}$ -pcDNA3.1(+) (20 ng, 50 ng, 100 ng, 200 ng, 300 ng) kotransfiziert. Wie die in Abbildung 13 dargestellten Ergebnisse zeigen, führte die Inkubation von hCCR2a-exprimierenden Zellen mit CCL2 zu einer *ca*. 2-fachen Zunahme der SRF-abhängigen Gentranskription im Vergleich zu Kontrollzellen, die mit der entsprechenden Menge des leeren Expressionsplasmid transfiziert worden waren. hCCR2b-exprimierende COS-7-Zellen reagierten auf die Stimulation mit CCL2 mit einem Anstieg der Luziferaseaktivität auf den *ca*. 3-fachen Wert im Vergleich zu den Kontrollzellen. Koexpression der Rezeptoren mit steigenden Mengen G α_{14} führte zu einer sukzessiv zunehmenden synergistischen Aktivierung der hCCR2-vermittelten SRFabhängigen Gentranskription. Die maximale Kostimulation wurde bei der Kotransfektion von hCCR2a-pcDNA3.1(+) und 200 ng G α_{14EE} -pcDNA3.1(+), mit einem Anstieg der Reportergenaktivität auf den *ca*. 4-fachen Wert im Vergleich zu Zellen erreicht, die hCCR2a allein exprimierten. Die Koexpression von hCCR2b und G α_{14} (200 ng) führte im Vergleich zu hCCR2b-exprimierenden Zellen zu einer maximalen synergistischen Zunahme der SRF-abhängigen Gentranskription auf den *ca*. 2,5-fachen Wert. Die Expression von G α_{14} in Abwesenheit der hCCR2-Rezeptoren hatte keinen Einfluss auf die Luziferaseaktivität.



Abb. 14: Inhibierung der hCCR2-vermittelten SRF-abhängige Gentranskription durch Koexpression von G α_{16} . COS-7-Zellen (4x10⁴ pro *well*) wurden mit jeweils 0,03 µg DNA pro *well* mit den Reporterplasmiden pSRE.L und pRL-TK, sowie mit 0,05 µg des Expressionsplasmids HA-CCR2a-pcDNA3.1(+) (linke Hälfte), 0,05 µg des Expressionsplasmids Flag-CCR2b-pcDNA3.1(+) (rechte Hälfte) und mit steigenden DNA-Mengen (5 ng, 10 ng, 20 ng, 50 ng, 100 ng) des Expressionsplasmids G α_{16-EE} -pcDNA3.1(+) kotransfiziert. 22 Stunden nach der Transfektion wurden die Zellen mit CCL2 (50 nM) bzw. mit der entsprechenden Menge an Lösungsmittel (Kontrolle) für 6 Stunden inkubiert. Anschließend wurden die Zellen mit 40 µl passivem Lysispuffer pro *well* aufgeschlossen und in den Lysaten die SRF-abhängige Gentranskription durch Messung der Luziferaseaktivitäten bestimmt. Die in der Abbildung gezeigten Werte entsprechen den Mittelwerten ± Standardabweichungen von Dreifachbestimmungen.

Die in Abbildung 14 dargestellten Ergebnisse zeigen, dass die Stimulation von hCCR2abzw. hCCR2b-exprimierenden Zellen mit CCL2 zu einem Anstieg der Luziferaseaktivität auf den *ca*. 5,8-fachen Wert bzw. auf den *ca*. 3-fachen Wert im Vergleich zu den Kontrollzellen führte, die mit leerem pcDNA3.1(+)-Vektor transfiziert worden waren und ebenfalls mit CCL2 (50 nM) inkubiert wurden. Bereits bei der geringsten Mengen von 5 ng des zur Transfektion eingesetzten Expressionsplasmids G α_{16EE} -pcDNA3.1(+) kam es zu einer Abnahme der hCCR2a-induzierten SRF-abhängigen Gentranskription um *ca*. 75 %. Dagegen wurde die hCCR2b-vermittelte Reportergenaktivität nur um *ca*. 60 % inhibiert. Je größer die Menge des zur Transfektion eingesetzten Expressionsplasmids G α_{16EE} pcDNA3.1(+) war, desto stärker wurde die durch die beiden hCCR2-Rezeptoren vermittelte SRF-abhängige Gentranskription gehemmt. So wurde bei 100 ng des zur Transfektion eingesetzten Expressionsplasmids G α_{16EE} -pcDNA3.1(+) eine Abnahme der hCCR2a-induzierten SRF-Aktivität um *ca*. 90 % und eine Abnahme der hCCR2binduzierten SRF-abhängigen Gentranskription um *ca*. 80 % beobachtet.

Zusammenfassend zeigte die Analyse der G-Protein-Kopplung der beiden hCCR2-Rezeptorvarianten, dass die Koexpression der beiden Ga-Untereinheiten Ga_q und Ga₁₄ einen synergistischen Anstieg der hCCR2-induzierten SRF-abhängigen Gentranskription zur Folge hatte. Trotz einer Übereinstimmung von 89 % in der Aminosäuresequenz zwischen Ga_q und Ga_{11} wurde für die Koexpression von Ga_{11} mit hCCR2a bzw. hCCR2b bei geringen zur Transfektion eingesetzten DNA-Mengen zunächst eine Zunahme der Reportergenaktivität beobachtet, wohingegen es bei größeren zur Transfektion eingesetzten DNA-Mengen von $G\alpha_{11EE}$ -pcDNA3.1(+) zu einer Abnahme der hCCR2-Rezeptor-induzierten SRF-abhängigen Gentranskription kam. Die Koexpression von $G\alpha_{16}$, hatte sowohl auf die hCCR2a-, als auch auf die hCCR2b-induzierte Luziferase-Reportergenexpression einen inhibitorischen Einfluss. Trotz der Unterschiede der beiden hCCR2-Rezeptorvarianten bezüglich der Länge und der Aminosäuresequenz ihrer carboxylterminalen, intrazellulären Bereiche, denen eine entscheidende Rolle bei der Interaktion mit heterotrimeren G-Proteinen zukommt, lieferten die hier beschriebenen Untersuchungen keine Hinweise auf einen Unterschied in der Spezifität der G-Protein-Kopplung zwischen den beiden hCCR2-Rezeptorvarianten.

4.3.3 G-Protein-Spezifität der hCCR2-vermittelten Aktivierung von Phospholipase C-β-Isoenzymen

Die vorausgegangenen Untersuchungen hatten gezeigt, dass hCCR2a und hCCR2b über Kopplung an $G\alpha_q$ und $G\alpha_{14}$ die SRF-abhängige Gentrankription regulieren. Um zu untersuchen, ob diese beobachtete Spezifität in der Kopplung an G-Proteine der $G\alpha_q$ -Familie auch für die von den hCCR2-Rezeptoren stimulierte Aktivierung von Phospholipase C- β -Isoenzymen zutrifft und, ob sich die beiden Rezeptoren hCCR2a und hCCR2b in ihrer Kopplung an $G\alpha_q$ bzw. $G\alpha_{14}$ unterscheiden, wurde hCCR2a bzw. hCCR2b mit steigenden Mengen von $G\alpha_q$ bzw. $G\alpha_{14}$ in COS-7-Zellen koexprimiert und die Produktion von Inositphosphaten bestimmt.



Abb. 15: Einfluss steigender Mengen $G\alpha_q$ auf die hCCR2-vermittelte **Inositphosphatproduktion**. COS-7-Zellen (4x10⁴) pro well) wurden mit 0,05 µg des Expressionsplasmids HA-CCR2a-pcDNA3.1(+) (linke Seite) und 0,05 µg des Expressionsplasmids Flag-CCR2b-pcDNA3.1(+) (rechte Seite) und/oder mit steigenden DNA-Mengen (10 ng, 20 ng, 50 ng, 100 ng, 200 ng, 300 ng) des Expressionsplasmids GaqE-pcDNA3.1(+) kotransfiziert. 24 Stunden nach der Transfektion wurde das Medium gewechselt und die Zellen mit 0,5 ml Medium (pro well), welches 2 µCi mvo-[2-³H (N)]-Inositol/ml und 10 mM LiCl enthielt, inkubiert. Nach 17 h wurden die Zellen mit CCL2 (50 nM) bzw. der entsprechenden Menge Lösungsmittel in Anwesenheit von 10 mM LiCl für 4 Stunden inkubiert. Anschließend wurden die Zellen lysiert und die Menge der gebildeten Inositphosphate ermittelt. Die in der Abbildung gezeigten Werte entsprechen den Mittelwerten ± Standardabweichungen von Dreifachbestimmungen.

Die in Abbildung 15 dargestellten Ergebnisse zeigen, dass die Stimulation von hCCR2aexprimierenden COS-7-Zellen mit CCL2 (50 nM) zu einem Anstieg der Inositphosphatproduktion auf den ca. 1,8-fachen Wert im Vergleich zu den Kontrollzellen führte, die mit der entsprechenden Menge des leeren Vektors transfiziert worden waren. Die Inkubation von hCCR2b-exprimierenden Zellen mit dem Liganden resultierte in einer Zunahme der Inositphosphatproduktion um das *ca.* 4-fache. Die Expression von $G\alpha_{q}$ zusammen mit hCCR2a (Abb. 15, linke Seite) oder hCCR2b (Abb. 15, rechte Seite) führte in beiden Fällen zu einer synergistischen Steigerung der Inositphosphatproduktion. So resultierte die transiente Kotransfektion von COS-7-Zellen mit HA-CCR2a-pcDNA3.1(+) bzw. Flag-CCR2b-pcDNA3.1(+) und der höchsten DNA-Menge von $G\alpha_{q-EE}$ -pcDNA3.1(+) (300)ng) synergistischen Anstieg der CCL2-stimulierten in einem Inositphosphatproduktion um das mehr als 4-5-fache, im Vergleich zu COS-7-Zellen, die CCR2a bzw. CCR2b allein exprimierten. Die Expression von steigenden Mengen $G\alpha_{\alpha}$ in Abwesenheit der Rezeptoren zeigte ebenfalls eine Zunahme der Inositphosphatproduktion, die jedoch deutlich unter dem hCCR2/G α_q -vermittelten Anstieg lag. Bezieht man diese durch Ga_a hervorgerufene Zunahme der Grundaktivität in die Betrachtung der Ergebnisse mit ein, ist dennoch eine synergistische Zunahme der hCCR2-induzierten Inositphosphatproduktion bei Koexpression der Rezeptoren mit $G\alpha_a$ zu beobachten.



Abb. 16: Einfluss steigender Mengen Ga_{14} auf die hCCR2-vermittelte Inositphosphatproduktion. COS-7-Zellen (4x10⁴ pro *well*) wurden mit 0,05 µg des

Expressionsplasmids HA-CCR2a-pcDNA3.1(+) (linke Seite) und 0,05 μ g des Expressionsplasmids Flag-CCR2b-pcDNA3.1(+) (rechte Seite) und/oder mit steigenden DNA-Mengen des Expressionsplasmids Ga_{14-EE}-pcDNA3.1(+) (20-300 ng bzw. 5-100 ng) kotransfiziert. 24 Stunden nach der Transfektion wurde das Medium gewechselt und die Zellen mit 0,5 ml Medium (pro *well*), welches 2 μ Ci *myo*-[2-³H (N)]-Inositol/ml und 10 mM LiCl enthielt, inkubiert. Nach 17 h wurden die Zellen mit CCL2 (50 nM) bzw. der entsprechenden Menge Lösungsmittel in Anwesenheit von 10 mM LiCl für 4 Stunden inkubiert. Anschließend wurden die Zellen lysiert und die Menge der gebildeten Inositphosphate ermittelt. Die in der Abbildung gezeigten Werte entsprechen den Mittelwerten ± Standardabweichungen von Dreifachbestimmungen.

Die Koexpression von steigenden Mengen Ga_{14} mit hCCR2a (Abb. 16, linke Hälfte) bzw. hCCR2b (Abb. 16, rechte Hälfte) hatte eine starke synergistische Zunahme der CCL2stimulierten, hCCR2-induzierten Inositphosphatproduktion zur Folge. So führte die transiente Kotransfektion von COS-7-Zellen mit HA-CCR2a-pcDNA3.1(+) und der höchsten DNA-Menge des Expressionsplasmids $Ga_{14-\text{EE}}$ -pcDNA3.1(+) (300 ng) zu einem Anstieg der Inositphosphatproduktion auf den *ca.* 9-fachen Wert im Vergleich zu Zellen, die hCCR2a allein exprimierten. Die hCCR2b-vermittelte SRF-abhängige Gentranskription erreichte bei 100 ng des zur Transfektion eingesetzten Plasmids $Ga_{14-\text{EE}}$ -pcDNA3.1(+) eine synergistische Zunahme auf das mehr als 6-fache verglichen mit Zelle, die nur mit Flag-CCR2b-pcDNA3.1(+) transfiziert worden waren. Die Expression der jeweils höchsten Menge von Ga_{14} allein, hatte dagegen keine erhöhte Inositphosphatproduktion zur Folge.

4.3.4 Einfluss von RGS2 und PLC β_{1-CT} auf hCCR2-vermittelte zelluläre Funktionen bei exogener Expression von G α_q und G α_{14}

Die vorausgegangenen Untersuchungen hatten gezeigt, dass es bei Koexpression von hCCR2-Rezeptoren mit RGS2 oder PLC β_{1-CT} zu einer Inhibierung der Ligandenstimulierten SRF-abhängigen Gentranskription kommt (s. 4.3.2). Im Folgenden sollte der Einfluss von RGS2 und PLC β_{1-CT} auf die hCCR2-induzierte SRF-abhängige Gentranskription bzw. Inositphosphatproduktion, in An- und Abwesenheit von exogenem G α_q oder G α_{14} analysiert und miteinander verglichen werden. Dazu wurden COS-7-Zellen mit Flag-CCR2b-pcDNA3.1(+), G α_{q-EE} -pcDNA3.1(+) oder G α_{14-EE} -pcDNA3.1(+) und Myc-RGS2-pcDNA3.1(+) oder PLC β_{1-CT} -pcDNA3.1(+) kotransfiziert und sowohl die SRF-abhängige Gentranskription als auch die Menge an gebildeten Inositphosphaten bestimmt.



Abb. 17: Inhibition der hCCR2-induzierten zellulären Funktionen in COS-7-Zellen durch RGS2. COS-7-Zellen ($4x10^4$ pro *well*) wurden mit 0,05 µg des Expressionsplasmids Flag-CCR2bpcDNA3.1(+) und/oder 0,05 µg Ga_{q-EE} -pcDNA3.1(+) und/oder 0,05 µg Ga_{14-EE} -pcDNA3.1(+) und/oder mit 0,15 µg Myc-RGS2-pcDNA3.1(+) und mit jeweils 0,03 µg DNA pro *well* mit den Reporterplasmiden pSRE.L und pRL-TK (linke Hälfte) oder ohne Zusatz der Reporterplasmide (rechte Hälfte) transfiziert. Zur Bestimmung der SRF-abhängigen Reportergenaktivität wurden die Zellen 22 Stunden nach der Transfektion mit CCL2 (50 nM) für 6 Stunden inkubiert, anschließend mit 40 µl passivem Lysispuffer pro *well* aufgeschlossen und in den Lysaten die SRF-abhängige Gentranskription durch Messung der Luziferaseaktivitäten bestimmt (linke Hälfte). Zur Bestimmung der gebildeten Inositphosphate wurde 24 Stunden nach der Transfektion das Medium gewechselt und die Zellen mit 0,5 ml Medium (pro *well*), welches 2 µCi *myo*-[2-³H (N)]-Inositol/ml und 10 mM LiCl enthielt, inkubiert. Nach 17 h wurden die Zellen mit CCL2 (50 nM) in Anwesenheit von 10 mM LiCl für 4 Stunden inkubiert. Anschließend wurden die Zellen lysiert und die Menge der gebildeten Inositphosphate ermittelt (rechte Hälfte). Die in der Abbildung gezeigten Werte entsprechen den Mittelwerten ± Standardabweichungen von Dreifachbestimmungen.

Die in Abb. 17 dargestellten Ergebnisse zeigen, dass die Stimulation der hCCR2bexprimierenden COS-7-Zellen mit 50 nM CCL2 zu einer Zunahme der SRF-abhängigen Gentranskription auf den *ca.* 3-fachen Wert im Vergleich zur basalen Aktivität führte. Die Koexpression von RGS2 mit hCCR2b hatte eine Inhibition der SRF-abhängigen Gentranskription um *ca.* 60 % zur Folge (Abb. 17, linke Hälfte). In hCCR2bexprimierenden Zellen führte die CCL2-stimulierte Aktivierung der Phospholipase C- β -Isoenzyme zu einer Erhöhung der gebildeten Inositphosphatmenge auf den *ca.* 11-fachen Wert im Vergleich zu den in Kontrollzellen gebildeten Inositphosphaten. Diese hCCR2binduzierte Inositphosphatproduktion wurde durch die Expression von RGS2 fast vollständig inhibiert (Abb.17, rechte Hälfte). Ein starker inhibitorischer Einfluss von RGS2 auf die von hCCR2b vermittelten zellulären Funktionen wurde auch bei gleichzeitiger Koexpression von G α_q oder G α_{14} beobachtet. So wurde die durch Koexpression von G α_q mit hCCR2b synergistisch gesteigerte SRF-abhängige Gentranskription durch die Anwesenheit von RGS2 sogar vollständig und der bei Koexpression von hCCR2b und G α_{14} beobachtete synergistische Anstieg der SRF-Aktivität durch die Koexpression von RGS2 um *ca*. 90 % inhibiert. Ein ähnlich starker inhibitorischer Einfluss von RGS2 wurde auch für die hCCR2b/G α_q - bzw. hCCR2b/G α_{14} -induzierte Inositphosphatproduktion ermittelt (Abb. 17, rechte Hälfte).

Die in Abbildung 18 dargestellten Ergebnisse zeigen, dass es bei Koexpression von PLC β_{1-CT} sowohl zu einer Inhibition der hCCR2a- als auch der hCCR2b-vermittelten zellulären Funktionen, d.h. der SRF-abhängigen Gentranskription (Abb. 18, linke Hälfte) und der Inositphosphatproduktion (Abb. 18, rechte Hälfte), kam. Eine Inhibition wurde auch in Anwesenheit der G-Protein-Untereinheiten G α_q bzw. G α_{14} beobachtet. Die PLC β_{1-CT} -vermittelte Inhibierung führte in beiden untersuchten Signalwegen sogar zu Aktivitäten, die unter denen lagen, die bei Expression der Rezeptoren ermittelt worden waren (Abb. 18, linke Hälfte). Diese Ergebnisse lassen vermuten, dass der carboxylterminale Abschnitt der PLC β_1 in Form eines *scavengers* G α_q - und G α_{14} -Untereinheiten bindet und so deren Interaktion mit Effektoren verhindert. Auf diese Weise inhibiert PLC β_{1-CT} sowohl die hCCR2-induzierte SRF-abhängige Gentranskription als auch die Aktivierung von PLC- β -Isoenzymen. Zusammenfassend zeigen diese Ergebnisse, dass die in Anwesenheit von exogenem G α_q oder G α_{14} beobachtete synergistische Steigerung der hCCR2-induzierten zellulären Funktionen auf eine Kopplung der hCCR2-Rezeptorvarianten an diese Pertussistoxin-insensitiven G-Proteine zurückzuführen ist.



Abb. 18: Einfluss von PLCβ₁-_{CT} auf die hCCR2-induzierten zellulären Funktionen in COS-7-Zellen. COS-7-Zellen (4x10⁴ pro *well*) wurden mit 0,05 µg des Expressionsplasmids HA-CCR2apcDNA3.1(+) oder 0,05 μ g Flag-CCR2b-pcDNA3.1(+) und/oder 0,05 μ g Ga_{q-EE}-pcDNA3.1(+) und/oder 0,05 μ g G α_{14-EE} -pcDNA3.1(+) und/oder mit 0,15 μ g PLC β_1 -CT-pcDNA3.1(+) und mit jeweils 0,03 µg DNA pro well mit den Reporterplasmiden pSRE.L und pRL-TK (linke Hälfte) oder ohne Zusatz der Reporterplasmide (rechte Hälfte) transfiziert. Zur Bestimmung der SRFabhängigen Reportergenaktivität wurden die Zellen 22 Stunden nach der Transfektion mit CCL2 (50 nM) für 6 Stunden inkubiert und anschließend mit 40 µl passivem Lysispuffer pro well aufgeschlossen. Anhand der Lysate wurde die SRF-abhängige Gentranskription durch Messung der Luziferaseaktivitäten bestimmt (linke Hälfte). Zur Bestimmung der gebildeten Inositphosphate wurde 24 Stunden nach der Transfektion das Medium gewechselt und die Zellen mit 0,5 ml Medium (pro *well*), welches 2 μ Ci *myo*-[2-³H (N)]-Inositol/ml und 10 mM LiCl enthielt, inkubiert. Nach 17 h wurden die Zellen mit CCL2 (50 nM) in Anwesenheit von 10 mM LiCl für 4 Stunden inkubiert. Anschließend wurden die Zellen lysiert und die Menge der gebildeten Inositphosphate ermittelt (rechte Hälfte). Die in der Abbildung gezeigten Werte entsprechen den Mittelwerten ± Standardabweichungen von Dreifachbestimmungen.

4.3.5 Einfluss von Phospholipase $C-\beta_2$ auf die hCCR2-vermittelten zellulären Funktionen

Wie die bisher beschriebenen Ergebnisse zeigen sind die beiden hCCR2-Rezeptorvarianten in der Lage durch Kopplung von $G\alpha_q$ und $G\alpha_{14}$ zwei unterschiedliche zelluläre Signalwege zu aktivieren. Damit stellte sich die Frage, ob die SRF-abhängige Gentranskription und die Aktivierung von PLC- β -Isoenzymen unabhängig voneinander reguliert werden und/oder, ob es durch die hCCR2-vermittelte Aktivierung der PLC- β -Isoenzyme zu einer Zunahme der SRF-abhängigen Gentranskription kommt. Um diese Frage zu klären, wurden hCCR2a bzw. hCCR2b mit PLC β_2 , $G\alpha_q$ oder $G\alpha_{14}$ in COS-7-Zellen koexprimiert und in den Zellen entweder die Bildung von Inositphosphaten oder die Aktivierung der SRF-abhängigen Gentranskription ermittelt.



Abb. 19: Einfluss der exogenen Expression von PLCβ₂ auf die hCCR2-induzierten zellulären Funktionen in COS-7-Zellen. COS-7-Zellen $(4x10^4 \text{ pro } well)$ wurden mit 0,05 µg des Expressionsplasmids Flag-CCR2b-pcDNA3.1(+) und/oder 0,05 μ g G α_{a-EE} -pcDNA3.1(+) und/oder $0.05 \ \mu g \ G\alpha_{14-EE}$ -pcDNA3.1(+) und/oder mit 0.15 $\mu g \ PLC\beta_2$ -pcDNA3.1(+) (linke Hälfte) und 0.05 μg PLCβ₂-pcDNA3.1(+) (rechte Hälfte) und mit jeweils 0,03 μg DNA pro well mit den Reporterplasmiden pSRE.L und pRL-TK (linke Hälfte) oder ohne Zusatz der Reporterplasmide (rechte Hälfte) transfiziert. Zur Bestimmung der SRF-abhängigen Reportergenaktivität wurden die Zellen 22 Stunden nach der Transfektion mit CCL2 (50 nM) für 6 Stunden inkubiert, anschließend mit 40 µl passivem Lysispuffer pro well aufgeschlossen und in den Lysaten die SRF-abhängige Gentranskription durch Messung der Luziferaseaktivitäten bestimmt (linke Hälfte). Zur Bestimmung der gebildeten Inositphosphate wurde 24 Stunden nach der Transfektion das Medium gewechselt und die Zellen mit 0,5 ml Medium (pro *well*), welches 2 μ Ci *mvo*-[2-³H (N)]-Inositol/ml und 10 mM LiCl enthielt für 17 h inkubiert. Danach wurden die Zellen mit CCL2 (50 nM) in Anwesenheit von 10 mM LiCl für 4 Stunden inkubiert. Anschließend wurden die Zellen lysiert und die Menge der gebildeten Inositphosphate ermittelt (rechte Hälfte). Die in der Abbildung gezeigten Werte entsprechen den Mittelwerten ± Standardabweichungen von Dreifachbestimmungen.

Wie die in Abbildung 19 dargestellten Ergebnisse zeigen, kam es durch Koexpression von PLC β_2 zu keiner Beeinflussung der CCL2-stimulierten, hCCR2b-induzierten SRFabhängigen Gentranskription. Im Gegensatz dazu wurde die von G α_q - bzw. G α_{14} vermittelte hCCR2b-induzierte synergistische Steigerung der Reportergenexpression (Abb. 19, linke Hälfte) durch die gleichzeitige Expression von PLC β_2 deutlich inhibiert. Die SRF-abhängige Genexpression entsprach hier etwa dem Wert, der bei alleiniger Expression des Rezeptors ermittelt wurde. Einen entgegengesetzten Effekt hatte die Koexpression von PLC β_2 auf die hCCR2b-induzierte Zunahme der Inositphosphatproduktion. Wie die in der rechten Hälfte von Abb. 19 dargestellten Ergebnisse zeigen, führte die Koexpression von PLC β_2 sowohl mit hCCR2b/G α_q als auch mit hCCR2b/G α_{14} im Vergleich zu hCCR2b/G α_q - bzw. hCCR2b/G α_{14} -exprimierenden Zellen zu einer Zunahme der gebildeten Mengen an Inositphosphaten. Zusammenfassend zeigen diese Ergebnisse, dass die untersuchten hCCR2-induzierten zellulären Signale unabhängig voneinander reguliert werden.

4.3.6 Einfluss hGa_q -spezifischer siRNA auf die hCCR2-vermittelte serum-response-factor-abhängige Gentranskription

Die bisher in der vorliegenden Arbeit dargestellten Ergebnisse lieferten deutliche Hinweise auf die Beteiligung der Ga-Untereinheit Ga_q, an der CCL2-stimulierten, hCCR2vermittelten Aktivierung der SRF-abhängigen Gentranskription und Inositphosphatproduktion. Um die Kopplung von hCCR2a und hCCR2b an $G\alpha_q$ noch durch eine andere experimentelle Herangehensweise zu bestätigen, wurde die Auswirkung von humaner $G\alpha_{a}$ -spezifischer small interfering (si)RNA auf die hCCR2-vermittelte SRFabhängige Gentranskription untersucht. Die siRNA erkennt eine spezifische Sequenz in der mRNA von $G\alpha_q$, wodurch in der Folge die $G\alpha_q$ -mRNA gespalten und abgebaut wird. Somit unterbleibt die Produktion des von der Gaa-mRNA kodierten Proteins. Im Folgenden wurden HEK293-Zellen mit den Reporterplasmiden pSRE.L und pRT-TK und den Expressionsplasmiden HA-CCR2a-pcDNA3.1(+) bzw. Flag-CCR2b-pcDNA3.1(+) und/oder $G\alpha_{q-EE}$ -pcDNA3.1(+) und/oder $G\alpha_{14-EE}$ -pcDNA3.1(+) in An- oder Abwesenheit hGa_a-spezifischer siRNA kotransfiziert. Zweiundzwanzig Stunden nach der Transfektion wurden alle Ansätze für 6 Stunden mit CCL2 (50 nM) stimuliert. Im Anschluss an die Inkubation wurden die Zellen geerntet und aufgeschlossen. Anhand der gewonnenen Lysate wurde einerseits die SRF-abhängige Gentranskription durch Messung der Luziferase-Aktivitäten bestimmt und andererseits die Expression von Gaq mittels einer Western blot-Analyse untersucht.



Abb. 20 : Einfluss von hG α_q -siRNA auf die CCL2-stimulierte, hCCR2-vermittelte SRFabhängige Gentranskription.(A) HEK293-Zellen wurden in einer 24-*well* Platte mit jeweils 0,06 µg DNA pro *well* mit den Reporterplasmiden pSRE.L und pRL-TK, sowie mit 0,1 µg des Expressionsplasmids Flag-CCR2b-pcDNA3.1(+) und/oder mit 0,1 µg G α_{q-EE} -pcDNA3.1(+) und/oder mit 0,1 µg G α_{14-EE} -pcDNA3.1(+) in An- oder Abwesenheit von 50 pmol hG α_q -siRNA kotransfiziert. 22 Stunden nach der Transfektion wurden die Zellen mit CCL2 (50 nM) für 6 Stunden stimuliert, anschließend mit 60 µl passivem Lysispuffer pro *well* aufgeschlossen und in den Lysaten die SRF-abhängige Gentranskription durch Messung der Luziferaseaktivitäten bestimmt. Die in der Abbildung gezeigten Werte entsprechen den Mittelwerten ± Standardabweichungen von Zweifachbestimmungen. (B) *Western blot*-Analyse der Expression von G α_q . Die in HEK293-Lysaten enthaltenen Proteine wurde in einem 12,5 %igen (m/V) SDS-Polyacrylamidgel aufgetrennt, auf Nitrozellulose transferiert und im Immunoblot unter Verwendung eines Anti-G α_q Antikörpers analysiert.

Die in Abbildung 20 dargestellten Ergebnisse zeigen, dass das Einbringen von $hG\alpha_q$ -siRNA in hCCR2b-exprimierende HEK293-Zellen zu einem Rückgang der CCL2-stimulierten,

hCCR2b-induzierten SRF-abhängigen Gentranskription auf *ca.* 50 % führte. Auch der synergistische Anstieg der hCCR2b-vermittelten Reportergentranskription in Anwesenheit von $G\alpha_q$ wurde durch Kotransfektion von h $G\alpha_q$ -spezifischer siRNA um *ca.* 70 % inhibiert. Dagegen wurde die synergistische Zunahme der hCCR2b-induzierten SRF-abhängigen Gentranskription bei Koexpression von $G\alpha_{14}$ durch die Anwesenheit von h $G\alpha_q$ -siRNA nur um *ca.* 10 % vermindert. Die Analyse der Expression von $G\alpha_q$ im *Western blot* zeigte, dass die Proteinmenge des exogen exprimierten $G\alpha_q$ in Zellen, die mit h $G\alpha_q$ -spezifischer siRNA kotransfiziert worden waren, deutlich reduziert war.

4.3.7 Einfluss der Koexpression von $G\alpha_{12}$ und $G\alpha_{13}$ auf die hCCR2vermittelte *serum-response-factor*-abhängige Gentranskription

Für verschiedene Chemokinrezeptoren, darunter auch CXCR4, ist eine Kopplung an Gα-Untereinheiten der G $\alpha_{12/13}$ -Familie beschrieben worden (Tan *et al.*, 2006). Es ist seit langem bekannt, dass G-Proteine dieser Subfamilie ebenso wie Mitglieder der G α_q -Familie in der Lage sind RhoGTPasen zu aktivieren. Da die G α -Untereinheiten der G $\alpha_{12/13}$ -Familie, wie auch die Mitglieder der G α_q -Familie, sich durch Pertussistoxin-Insensitivität auszeichnen, sollte im Folgenden untersucht werden, ob es bei der Koexpression von G α_{12} oder G α_{13} zu einer synergistischen Steigerung der hCCR2-induzierten SRF-abhängigen Gentranskription kommt. Dazu wurden COS-7-Zellen mit HA-CCR2a-pcDNA3.1(+) bzw. Flag-CCR2b-pcDNA3.1(+) und steigenden DNA-Mengen der Expressionsplasmide G α_{12} -EE-pcDNA3.1(+) oder G α_{13} -EE-pcDNA3.1(+) transient kotransfiziert. Da bekannt war, dass die Expression von G α_{12} oder G α_{13} bereits in einem Anstieg der SRF-Aktivität resultiert, wurde die SRF-Aktivität auch in Zellen ermittelt, die G α_{12} bzw. G α_{13} in Abwesenheit von hCCR2-Rezeptoren exprimierten.



Abb. 21: Einfluss der Expression von steigenden Mengen Ga_{12} auf die hCCR2vermittelte, *serum-response-factor*-abhängige Reportergenexpression. COS-7-Zellen $(4x10^4 \text{ pro well})$ wurden mit jeweils 0,03 µg DNA pro *well* mit den Reporterplasmiden pSRE.L und pRL-TK, sowie mit 0,05 µg des Expressionsplasmids HA-CCR2a-pcDNA3.1(+) (linke Hälfte), 0,05 µg des Expressionsplasmids Flag-CCR2b-pcDNA3.1(+) (rechte Hälfte) und/oder mit steigenden DNA-Mengen (0,5 ng, 1 ng, 2 ng, 5 ng, 10 ng) des Expressionsplasmids Ga_{12-EE-} pcDNA3.1(+) kotransfiziert. 22 Stunden nach der Transfektion wurden die Zellen mit CCL2 (50 nM) für 6 Stunden inkubiert. Anschließend wurden die Zellen mit 40 µl passivem Lysispuffer pro *well* aufgeschlossen und in den Lysaten die SRF-abhängige Gentranskription durch Messung der Luziferaseaktivitäten bestimmt. Die in der Abbildung gezeigten Werte entsprechen den Mittelwerten ± Standardabweichungen von Dreifachbestimmungen.

Wie die in Abb. 21 und Abb. 22 dargestellten Ergebnisse zeigen, führte die Koexpression von hCCR2a mit steigenden Mengen $G\alpha_{12}$ (Abb. 21, linke Hälfte) und hCCR2b mit steigenden Mengen $G\alpha_{12}$ (Abb. 21, rechte Hälfte) zu keiner synergistischen Zunahme der Luziferaseaktivität. Die bei der Expression der hCCR2-Rezeptoren zusammen mit $G\alpha_{12}$ beobachtete Zunahme der SRF-Aktivität beruht auf der Tatsache, dass die Expression von steigenden Mengen $G\alpha_{12}$ alleine schon eine stetige Zunahme der SRF-abhängigen Gentranskription zur Folge hatte. Somit addieren sich bei der Koexpression nur die Aktivitäten, die für die Rezeptoren bzw. $G\alpha_{12}$ jeweils alleine ermittelt wurden. Die gleiche Beobachtung wurde für die Koexpression von hCCR2a mit steigenden Mengen $G\alpha_{13}$ (Abb. 22, linke Hälfte) und hCCR2b mit steigenden Mengen $G\alpha_{13}$ (Abb. 22, rechte Hälfte) gemacht. Auch hier wurde bei Koexpression der hCCR2-Rezeptoren mit $G\alpha_{13}$ keine synergistische Zunahme der Reportergenaktivität beobachtet.



Abb. 22: Einfluss der Expression von steigenden Mengen Ga_{13} auf die hCCR2-vermittelte SRF-abhängige Gentranskription in COS-7-Zellen. COS-7-Zellen (4x10⁴ pro *well*) wurden mit jeweils 0,03 µg DNA pro *well* mit den Reporterplasmiden pSRE.L und pRL-TK, sowie mit 0,05 µg des Expressionsplasmids HA-CCR2a-pcDNA3.1(+) (linke Hälfte), 0,05 µg des Expressionsplasmids Flag-CCR2b-pcDNA3.1(+) (rechte Hälfte) und/oder mit steigenden DNA-Mengen (0,5 ng, 1 ng, 2 ng, 5 ng, 10 ng) des Expressionsplasmids Ga_{13-EE}-pcDNA3.1(+) kotransfiziert. 22 Stunden nach der Transfektion wurden die Zellen mit CCL2 (50 nM) für 6 Stunden inkubiert. Anschließend wurden die Zellen mit 40 µl passivem Lysispuffer pro *well* aufgeschlossen und in den Lysaten die SRF-abhängige Gentranskription durch Messung der Luziferaseaktivitäten bestimmt. Die in der Abbildung gezeigten Werte entsprechen den Mittelwerten ± Standardabweichungen von Dreifachbestimmungen.

4.3.8 Einfluss der Koexpression von $G\alpha_{i2}$ auf die hCCR2-induzierte SRFabhängige Gentranskription

Da die Versuche mit Pertussistoxin (s. 4.3.1) einen Hinweis auf die Beteiligung von Ga-Untereinheiten der Ga_{i/o}-Familie an den durch hCCR2a- bzw. hCCR2b-vermittelten Signalwegen geliefert hatten, wurde im Folgenden analysiert, welchen Einfluss die Koexpression von Ga_{i2} auf die hCCR2-induzierte SRF-abhängige Gentranskription hat. Dazu wurden COS-7-Zellen mit den Reporterplasmiden pSRE.L und pRT-TK und den Expressionsplasmiden HA-CCR2a-pcDNA3.1(+) bzw. Flag-CCR2b-pcDNA3.1(+), sowie mit steigenden DNA-Mengen des Expressionsplamids Ga_{i2EE}-pcDNA3.1(+) kotransfiziert und nach Stimulation mit CCL2 (50 nM) die SRF-abhängige Gentranskription bestimmt.



Abb. 23: Einfluss der Expression von steigenden Mengen $G\alpha_{i2}$ auf die hCCR2-vermittelte SRF-abhängige Gentranskription in COS-7-Zellen. COS-7-Zellen (4x10⁴ pro *well*) wurden mit jeweils 0,03 µg DNA pro *well* mit den Reporterplasmiden pSRE.L und pRL-TK, sowie mit 0,1 µg des Expressionsplasmids HA-CCR2a-pcDNA3.1(+) bzw. 0,1 µg des Expressionsplasmids Flag-CCR2b-pcDNA3.1(+) und mit steigenden DNA-Mengen (1 ng, 3 ng, 10 ng, 30 ng, 100 ng, 300 ng) des Expressionsplasmids $G\alpha_{i2EE}$ -pcDNA3.1(+) kotransfiziert. 22 Stunden nach der Transfektion wurden die Zellen mit CCL2 (50 nM) bzw. mit der entsprechenden Menge an Lösungsmittel für 6 Stunden inkubiert. Anschließend wurden die Zellen mit 40 µl passivem Lysispuffer pro *well* aufgeschlossen und in den Lysaten die SRF-abhängige Gentranskription durch Messung der Luziferaseaktivitäten bestimmt. Die in der Abbildung gezeigten Werte entsprechen den Mittelwerten ± Standardabweichungen von Dreifachbestimmungen.

Die in Abbildung 23 dargestellten Ergebnisse zeigen, dass die Stimulation von hCCR2abzw. hCCR2b-exprimierenden Zellen mit CCL2 zu einer mehr als 3-fachen Zunahme der SRF-Aktivität im Vergleich zu Kontrollzellen führte. Die Koexpression von steigenden Mengen G α_{i2} resultierte in einer konzentrationsabhängigen Inhibierung der Rezeptorvermittelten SRF-abhängigen Gentranskription. Dabei zeigte sich, dass die durch hCCR2a vermittelte SRF-Aktivität im Vergleich zu der hCCR2b-induzierten SRF-Aktivität deutlich stärker und bereits bei wesentlich geringeren zur Transfektion eingesetzten Menge an G α_{i2EE} -pcDNA3.1(+) inhibiert wurde. So hatte die Kotransfektion der Zellen mit der zweithöchsten eingesetzten DNA-Menge von G α_{i2EE} -pcDNA3.1(+) (100 ng) eine nahezu vollständige Inhibition der hCCR2a-vermittelten SRF-aktivität bei der gleichen zur Transfektion eingesetzten DNA-Menge von G α_{i2EE} -pcDNA3.1(+) nur um *ca*. 55 % inhibiert. Eine mögliche Erklärung für den inhibitorischen Einfluss von $G\alpha_{i2}$ auf die hCCR2-vermittelte SRF-Aktivität könnte sein, dass G α -Untereinheiten der $G\alpha_{i/o}$ -Familie zwar nicht SRF aktivieren, aber durch eine höhere Affinität zu den hCCR2-Rezeptoren mit der Bindung von endogenen G-Proteinen, z.B. $G\alpha_q$, an die Rezeptoren konkurrieren. Sollte Letzteres der Fall sein, dann müsste der beobachtete inhibitorische Effekt von $G\alpha_{i2}$ auf die hCCR2-vermittelte SRF-abhängige Gentranskription durch gleichzeitige Koexpression von steigenden Mengen $G\alpha_q$ aufgehoben werden können. Um dieser Hypothese nachzugehen, wurden COS-7-Zellen mit den Reporterplasmiden pSRE.L und pRT-TK und den Expressionsplasmiden HA-CCR2a-pcDNA3.1(+) bzw. Flag-CCR2b-pcDNA3.1(+), sowie mit $G\alpha_{i2EE}$ -pcDNA3.1(+) und steigenden Mengen des Expressionsplasmids $G\alpha_{qEE}$ -pcDNA3.1(+) kotransfiziert und nach Stimulation mit CCL2 (50 nM) durch Messung der Luziferasaktivität die SRF-abhängige Gentranskription bestimmt.



Abb. 24: Einfluss der Expression von steigenden Mengen $G\alpha_q$ auf die $G\alpha_{i2}$ -vermittelte Inhibierung der hCCR2-induzierten SRF-abhängigen Gentranskription in COS-7-Zellen. COS-7-Zellen (4x10⁴ pro *well*) wurden mit jeweils 0,03 µg DNA pro *well* mit den Reporterplasmiden pSRE.L und pRL-TK, sowie mit 0,1µg des Expressionsplasmids HA-CCR2apcDNA3.1(+) bzw. 0,1 µg des Expressionsplasmids Flag-CCR2b-pcDNA3.1(+) und mit 0.1 µg G α_{i2EE} -pcDNA3.1(+) und steigenden DNA-Mengen (10 ng, 20 ng, 50 ng, 100 ng, 200 ng) des Expressionsplasmids G α_{qEE} -pcDNA3.1(+) kotransfiziert. 22 Stunden nach der Transfektion wurden die Zellen mit CCL2 (50 nM) bzw. mit der entsprechenden Menge an Lösungsmittel für 6 Stunden inkubiert. Anschließend wurden die Zellen mit 40 µl passivem Lysispuffer pro *well* aufgeschlossen und in den Lysaten die SRF-abhängige Gentranskription durch Messung der Luziferaseaktivitäten

bestimmt. Die in der Abbildung gezeigten Werte entsprechen den Mittelwerten \pm Standardabweichungen von Dreifachbestimmungen.

Die in Abbildung 24 dargestellten Ergebnisse zeigen, dass die Koexpression von $G\alpha_{i2}$ zu einer nahezu vollständigen Inhibierung der CCL2-stimulierten, hCCR2a-induzierten SRFabhängigen Gentranskription führte, wohingegen die hCCR2b-vermittelte SRF-Aktivität nur um *ca*. 40 % in Anwesenheit von $G\alpha_{i2}$ zurückging. Die gleichzeitige Koexpression von steigenden Mengen $G\alpha_q$ resultierte in einer konzentrationsabhängigen Zunahme der SRF-Aktivität. Bei der höchsten zur Transfektion eingesetzten DNA-Menge von $G\alpha_{qEE}$ pcDNA3.1(+) (200 ng) erreichte die hCCR2a-vermittelte SRF-abhängige Gentranskription in Anwesenheit von $G\alpha_{i2}$ wieder *ca*. 50 % der für hCCR2a-exprimierende Zellen ermittelten SRF-Aktivität. Der inhibitorische Einfluss von $G\alpha_{i2}$ auf die hCCR2b-induzierte SRF-abhängige Gentranskription konnte durch die Koexpression von steigenden Mengen $G\alpha_q$ sogar vollständig aufgehoben werden und die höchste zur Transfektion eingesetzten DNA-Menge von $G\alpha_{qEE}$ -pcDNA3.1(+) führte im Vergleich zu hCCR2b-exprimierenden Zellen zu einer *ca*. 1,4-fach höheren SRF-Aktivität.

4.4 Bedeutung von RhoGTPasen und des $G\alpha_q$ -spezifischen RhoGEFs p63RhoGEF für die hCCR2a- und hCCR2binduzierten zellulären Funktionen

4.4.1 Rolle von RhoGTPasen für die hCCR2-vermittelten zellulären Funktionen

Für das an $G\alpha_q$ koppelnde virale Chemokinrezeptorhomolog pUS28 war in vorausgegangenen Untersuchungen der Arbeitsgruppe bereits ermittelt worden, dass RhoGTPasen der RhoA-Familie eine wesentliche Rolle bei der pUS28-vermittelten Aktivierung der SRF-abhängigen Gentranskription spielen. So konnte für pUS28 gezeigt werden, dass es bei Expression der ADP-Ribosyltransferase C3 aus *Clostridium botolinum*, welche RhoAGTPasen spezifisch durch ADP-Ribosylierung inaktiviert, zu einem vollständigen Verlust der pUS28-induzierten SRF-abhängigen Gentranskription kommt (Moepps *et al.*, 2008). Um zu untersuchen, welche Rolle RhoAGTPasen bei der hCCR2b-

vermittelten SRF-abhängigen Gentranskription zukommt, wurde die ADP-Ribosyltransferase C3 in COS-7-Zellen mit hCCR2b koexprimiert.



Abb. 25: Einfluss der ADP-Ribosyltransferase C3 auf die hCCR2b-induzierte Ga_q -vermittelte SRF-abhängige Gentranskription in COS-7-Zellen. COS-7-Zellen (4x10⁴ pro *well*) wurden mit jeweils 0,03 µg DNA pro *well* mit den Reporterplasmiden pSRE.L und pRL-TK, sowie mit 0,1 µg des Expressionsplasmids HA-CCR2b-pcDNA3.1(+), 0,05 µg Ga_{q-EE} -pcDNA3.1(+) und/oder 0,05 µg des Expressionsplasmids C3-Exoenzym-pCis-2 transfiziert. 24 Stunden nach der Transfektion wurden die Zellen mit CCL2 (50 nM) für 6 Stunden inkubiert. Anschließend wurden die Zellen mit 40 µl passivem Lysispuffer pro *well* aufgeschlossen und in den Lysaten die SRF-abhängige Gentranskription durch Messung der Luziferaseaktivitäten bestimmt. Die in der Abbildung gezeigten Werte entsprechen den Mittelwerten ± Standardabweichungen von Dreifachbestimmungen.

Die in Abbildung 25 dargestellten Ergebnisse zeigen, dass die CCL2-stimulierte, hCCR2bvermittelte *ca.* 2-fache Zunahme der SRF-abhängigen Gentranskription in Anwesenheit der ADP-Ribosyltransferase C3 völlig inhibiert wurde und sogar noch das Niveau der SRF-Aktivität von Kontrollzellen unterschritt, die mit der entsprechenden Mengen des leeren Expressionsvektors transfiziert worden waren. Auch der synergistische Anstieg auf den *ca.* 5-fachen Wert der Luziferaseaktivität bei Koexpression von hCCR2b mit G α_q wurde durch das C3-Exoenzym vollständig inhibiert. Diese Ergebnisse bestätigen die Annahme, dass Mitglieder der RhoA-Subfamilie eine entscheidende Rolle bei der hCCR2b-induzierten, G α_q -vermittelten Aktivierung der SRF-abhängigen Gentranskription spielen.

4.4.2 Rolle von RhoGTPasen in den hCCR2-vermittelten zellulären Funktionen und deren Regulation durch p63RhoGEF

Untersuchungen verschiedener Arbeitsgruppen haben gezeigt, dass die Aktivierung von RhoGTPasen durch $G\alpha_{q}$ -gekoppelte Rezeptoren von spezifischen Rho-Guaninnukleotidaustauschfaktoren (Rho guanine nucleotide exchange factors) sog. RhoGEFs vermittelt wird. RhoGEFs beschleunigen den Austausch von GDP zu GTP der RhoGTPasen und überführen diese so in den aktiven Zustand. Mit p63RhoGEF wurde ein RhoGEF identifiziert, das spezifisch von Gα-Untereinheiten der Gα_q-Subfamilie aktiviert wird (Lutz et al., 2005; Rojas et al., 2007). Da die bisherigen Ergebnisse der vorliegenden Arbeit auf eine wichtige Rolle von $G\alpha_a$, $G\alpha_{14}$ und RhoAGTPasen bei der hCCR2induzierten Aktivierung der SRF-abhängigen Gentranskription hinwiesen, sollte im Folgenden geklärt werden, welchen Einfluss die Anwesenheit von p63RhoGEF auf die hCCR2-Rezeptor-induzierte Reportergenaktivität hat.



Abb. 26: Einfluss von p63RhoGEF auf die hCCR2-, hCCR2/G α_q - und hCCR2/G α_{14} vermittelte SRF-abhängige Gentranskription in COS-7-Zellen. COS-7-Zellen (4x10⁴ pro *well*) wurden mit jeweils 0,03 µg DNA pro *well* mit den Reporterplasmiden pSRE.L und pRL-TK, sowie

mit 0,05 μ g des Expressionsplasmids HA-CCR2a-pcDNA3.1(+) oder 0,05 μ g des Expressionsplasmids Flag-CCR2b-pcDNA3.1(+) und/oder 0,05 μ g G α_{q-EE} -pcDNA3.1(+) und/oder 0,05 μ g G α_{q-EE} -pcDNA3.1(+) und/oder mit 0,15 μ g Myc-p63RhoGEF-pcDNA3.1(+) transfiziert. 24 Stunden nach der Transfektion wurden die Zellen mit CCL2 (50 nM) für 6 Stunden inkubiert. Anschließend wurden die Zellen mit 40 μ l passivem Lysispuffer pro *well* aufgeschlossen und in den Lysaten die SRF-abhängige Gentranskription durch Messung der Luziferaseaktivitäten bestimmt. Die in der Abbildung gezeigten Werte entsprechen den Mittelwerten \pm Standardabweichungen von Dreifachbestimmungen.

Die in Abbildung 26 dargestellten Ergebnisse zeigen, dass es bei Koexpression von p63RhoGEF mit hCCR2a oder hCCR2b zu einer ca. 3-fachen Zunahme der hCCR2vermittelten SRF-abhängigen Gentranskription kam. Der Anstieg der SRF-abhängigen Gentranskription bei Koexpression der hCCR2-Rezeptorvarianten und p63RhoGEF wurde durch Expression von $G\alpha_q$ noch weiter erhöht und stieg auf das *ca*. 17-fache im Vergleich zu den Zellen an, die hCCR2a allein exprimierten. Im Fall von hCCR2b ließ die Koexpression von p63RhoGEF und $G\alpha_q$ die SRF-Aktivität auf das *ca*. 16-fache gegenüber hCCR2b-exprimierenden Zellen ansteigen. Die Koexpression von Ga₁₄ mit den hCCR2-Rezeptoren und p63RhoGEF führte ebenfalls zu einer synergistischen Steigerung der SRF-Aktivität um das ca. 6 bzw. 9-fache. Damit lag die Zunahme der hCCR2-induzierten Reportergenexpression jedoch deutlich unter der, die in Anwesenheit von $G\alpha_{q}$ und p63RhoGEF beobachtet worden war. Diese Ergebnisse lassen den Schluss zu, dass an der hCCR2-induzierten, $G\alpha_{q/14}$ -vermittelten SRF-abhängigen Gentranskription Gα_{q/14}spezifische RhoGEFs, wie p63RhoGEF beteiligt sind.

In den vorausgegangenen Untersuchungen war beobachtet worden, dass die Aktivierung der SRF-abhängigen Gentranskription durch die hCCR2-Rezeptoren unabhängig von der Aktivierung von PLC- β -Isoenzymen erfolgt (s. 4.3.5). Im Folgenden sollte untersucht werden, welchen Einfluss die Expression von p63RhoGEF auf die von hCCR2-Rezeptoren stimulierte Inositphosphatproduktion hat.



Abb. 27: Einfluss vom p63RhoGEF auf die hCCR2-, hCCR2/ Ga_q - und hCCR2/ Ga_{14} vermittelte Inositphosphatproduktion in COS-7-Zellen. COS-7-Zellen (4x10⁴ pro *well*) wurden mit 0,05 µg des Expressionsplasmids HA-CCR2a-pcDNA3.1(+) oder 0,05 µg des Expressionsplasmids Flag-CCR2b-pcDNA3.1(+) und/oder 0,05 µg Ga_{q-EE} -pcDNA3.1(+) und/oder 0,05 µg Ga_{14-EE} -pcDNA3.1(+) und/oder mit 0,15 µg Myc-p63RhoGEF-pcDNA3.1(+) transfiziert. 24 Stunden nach der Transfektion wurde das Medium gewechselt und die Zellen mit 0,5 ml Medium (pro *well*), welches 2 µCi *myo*-[2-³H (N)]-Inositol/ml und 10 mM LiCl enthielt, inkubiert. Nach 17 h wurden die Zellen mit CCL2 (50 nM) in Anwesenheit von 10 mM LiCl für 4 Stunden inkubiert. Anschließend wurden die Zellen lysiert und die Menge der gebildeten Inositphosphate ermittelt. Die in der Abbildung gezeigten Werte entsprechen den Mittelwerten ± Standardabweichungen von Dreifachbestimmungen.

Die in Abbildung 27 dargestellten Ergebnisse zeigen, dass die Koexpression von p63RhoGEF zu einer vollständigen Inhibition sowohl der von hCCR2a- als auch der von hCCR2b-vermittelten Aktivierung von PLC- β -Isoenzymen führte. Auch der durch Koexpression von G α_q und G α_{14} hervorgerufene synergistische Anstieg der Inositphosphatproduktion wurde durch die Anwesenheit von p63RhoGEF stark inhibiert. Diese Ergebnisse zeigen, dass p63RhoGEF mit den PLC- β -Isoenzymen um die Aktivierung durch G α_q bzw. G α_{14} konkurriert.

4.4.3 Einfluss der exogenen Expression der PH-Domäne von p63RhoGEF auf hCCR2-induzierte zelluläre Funktionen

Alle RhoGEFs, die zur Dbl-Familie gehören besitzen zwei charakteristische hintereinanderliegende Domänen, die als Dbl-homology (DH)-Domäne und als pleckstrin*homology* (PH)-Domäne bezeichnet werden. Die DH-Domäne ist für den Guaninnukleotidaustausch und damit für die Aktivierung der Rho-Proteine von Bedeutung. Die PH-Domänen der einzelnen RhoGEFs sind weniger homolog als die DH-Domänen und übernehmen folglich auch verschiedene Funktionen. Beispielsweise spielen sie eine Rolle bei der Interaktion von RhoGEFs mit den RhoGTPasen und bei der subzellulären Lokalisation der GEFs. Da für die PH-Domäne von p63RhoGEF bereits gezeigt wurde, dass sie von zentraler Bedeutung für die Interaktion zwischen p63RhoGEF und aktivierten Ga_{a/11}-Proteinen ist (Lutz et al., 2005), sollte im Folgenden untersucht werden, welche Auswirkungen die exogene Expression der PH-Domäne von p63RhoGEF auf die hCCR2-induzierten zellulären Funktionen hat. Um diese Fragen zu klären wurden die hCCR2-Rezeptorvarianten zusammen mit der PH-Domäne von p63RhoGEF (p63RhoGEF-PH) und $G\alpha_q$ bzw. $G\alpha_{14}$ in COS-7-Zellen exprimiert und sowohl die hCCR2-induzierte SRF-abhängige Gentranskription als auch die Inositphosphatproduktion ermittelt.



Abb. 28: Einfluss der Expression der PH-Domäne von p63RhoGEF auf die hCCR2-, hCCR2/Ga_q und hCCR2/Ga₁₄-vermittelte SRF-abhängige Gentranskription in COS-7-Zellen. COS-7-Zellen (4x10⁴ pro *well*) wurden mit jeweils 0,03 µg DNA pro *well* mit den Reporterplasmiden pSRE.L und pRL-TK, sowie mit 0,05 µg des Expressionsplasmids HA-CCR2apcDNA3.1(+) oder 0,05 µg Flag-CCR2b-pcDNA3.1(+) und/oder 0,05 µg Ga_{q-EE}-pcDNA3.1(+) und/oder 0,05 µg Ga_{14-EE}-pcDNA3.1(+) und/oder mit 0,15 µg Myc-p63RhoGEF-PH-pcDNA3.1(+) transfiziert. 24 Stunden nach der Transfektion wurden die Zellen mit CCL2 (50 nM) für 6 Stunden inkubiert. Anschließend wurden die Zellen mit 40 µl passivem Lysispuffer pro *well* aufgeschlossen und in den Lysaten die SRF-abhängige Gentranskription durch Messung der Luziferaseaktivitäten bestimmt. Die in der Abbildung gezeigten Werte entsprechen den Mittelwerten ± Standardabweichungen von Dreifachbestimmungen.

Die in Abbildung 28 dargestellten Ergebnisse zeigen, dass hCCR2a-exprimierende Zellen nach Stimulation mit CCL2 eine Zunahme der SRF-abhängigen Gentranskription auf den *ca.* 2,5-fachen Wert gegenüber Kontrollzellen aufwiesen, die mit der entsprechenden Menge des leeren Expressionsplasmids pcDNA3.1(+) transfiziert worden waren. Die Expression von hCCR2b führte zu einem Anstieg der Reportergenaktivität auf den *ca.* 3,5fachen Wert gegenüber der basalen Aktivität. Bei Koexpression von Gaq bzw. Ga₁₄ mit den beiden Rezeptorvarianten kam es zu einer synergistischen Zunahme der hCCR2induzierten SRF-abhängigen Gentranskription. So resultierte die Koexpression von hCCR2a bzw. hCCR2b und Gaq in einer *ca.* 2-fachen Zunahme der SRF-Aktivität und die Anwesenheit von $G\alpha_{14}$ führte zu einem *ca.* 2,5- bis 3-fachen Anstieg der Reportergenaktivität, bezogen auf die Aktivitäten, die jeweils für die Rezeptoren allein ermittelt worden waren. Die Expression der PH-Domäne von p63RhoGEF mit hCCR2a bzw. hCCR2a/Gaq hatte eine Inhibierung der SRF-Aktivität um *ca.* 70 % bzw. *ca.* 85% zur Folge. Auch die von hCCR2a/Ga₁₄-vermittelte synergistische Zunahme der Reportergenexpression ging in Anwesenheit von p63RhoGEF-PH um *ca.* 60 % zurück. Bei Expression der PH-Domäne von p63RhoGEF mit hCCR2b konnte eine *ca.* 30 %ige Inhibierung der SRF-Aktivität beobachtet werden. Die hCCR2b/Gaq- bzw. hCCR2b/Ga₁₄vermittelten synergistischen Anstiege der SRF-abhängigen Gentranskription wurden durch die Koexpression von p63RhoGEF-PH um *ca.* 60 % bzw. 40 % inhibiert.



Abb. 29: Einfluss der Expression der PH-Domäne von p63RhoGEF auf die hCCR2-, hCCR2/G a_q - und hCCR2/G a_{14} -vermittelte Inositphosphatproduktion in COS-7-Zellen. COS-7-Zellen (4x10⁴ pro *well*) wurden in 48-*well* Platten mit 0,05 µg des Expressionsplasmids HA-CCR2a-pcDNA3.1(+) oder 0,05 µg Flag-CCR2b-pcDNA3.1(+) und/oder 0,05 µg G α_{q-EE} -pcDNA3.1(+) und/oder 0,05 µg G α_{14-EE} -pcDNA3.1(+) und/oder mit 0,15 µg Myc-p63RhoGEF-PH-pcDNA3.1(+) transfiziert. 24 Stunden nach der Transfektion wurde das Medium gewechselt und die Zellen mit 0,5 ml Medium (pro *well*), welches 2 µCi *myo*-[2-³H (N)]-Inositol/ml und 10 mM LiCl enthielt, inkubiert. Nach 17 h wurden die Zellen mit CCL2 (50 nM) in Anwesenheit von 10 mM LiCl für 4 Stunden inkubiert. Anschließend wurden die Zellen lysiert und die Menge der

gebildeten Inositphosphate ermittelt. Die in der Abbildung gezeigten Werte entsprechen den Mittelwerten \pm Standardabweichungen von Dreifachbestimmungen.

In weitergehenden Untersuchungen wurde auch die hCCR2-vermittelte Inositphosphatproduktion in Anwesenheit der PH-Domäne von p63-RhoGEF untersucht. Die in Abbildung 29 dargestellten Ergebnisse zeigen, dass die gleichzeitige Expression der PH-Domäne von p63RhoGEF die hCCR2a- bzw. hCCR2a/Ga_a-vermittelte Zunahme der Inositphosphatproduktion um ca. 40 % bzw. 30 % inhibierte. Dagegen ging die hCCR2a/Ga14-vermittelte Inositphosphatproduktion bei Koexpression von p63RhoGEF-PH nur um *ca.* 15 % zurück. Bei Koexpression von hCCR2b oder hCCR2b/G α_0 - bzw. hCCR2b/Ga14 mit der PH-Domäne von p63RhoGEF konnte eine Inhibierung der Inositphosphatproduktion um ca. 25-30 % beobachtet werden. Interessanterweise ist der inhibitorische Effekt der PH-Domäne von p63RhoGEF auf die hCCR2-induzierte Inositphosphatproduktion deutlich geringer, als der, der für das full length Protein beobachtet wurde (s. Abb. 27). Außerdem zeigen die Ergebnisse, dass die hCCR2vermittelte SRF-abhängige Gentranskription durch die Anwesenheit von p63RhoGEF-PH die stärker inhibiert wird, als hCCR2-vermittelte Inositphosphatproduktion. Möglicherweise bindet die PH-Domäne von p63RhoGEF an RhoA, ohne aber zu einer Aktivierung der RhoGTPase zu führen und inhibiert somit die SRF-abhängige Gentranskription. Daneben zeigen die Ergebnisse, dass die PH-Domäne von p63RhoGEF in der Lage ist, sowohl die hCCR2/G α_{a} -, als auch die hCCR2/G α_{14} -induzierte, synergistische Zunahme der SRF-abhängigen Gentranskription der und Inositphosphatproduktion zu inhibieren. Diese Beobachtungen legen die Vermutung nahe, dass die PH-Domäne von p63RhoGEF als eine Art scavenger mit den eigentlichen Effektoren um die aktivierten G-Proteine konkurriert.

4.5 Einfluss von *tumor protein* D52 (TPD52) auf die hCCR2vermittelte Signaltransduktion

4.5.1 Einfluss von *tumor protein* D52 auf die hCCR2-vermittelte *serumresponse-factor*-abhängige Gentranskription und Inositphosphatproduktion

Im Rahmen von vorausgegangenen Untersuchungen der Arbeitsgruppe war unter Verwendung des *yeast-two-hybrid*-Systems nach Nicht-G-Protein-Interaktionspartnern von hCCR2a und hCCR2b gesucht worden. Als Interaktionspartner für beide hCCR2-Rezeptorvarianten wurde in diesen Untersuchungen das humane tumor protein D52 (TPD52) identifiziert. Die Interaktion von TPD52 mit den carboxylterminalen, intrazellulären Abschnitten der beiden hCCR2-Rezeptorvarianten wurde unter Glutathion-S-Transferase (GST)-Fusionsproteinen Verwendung von der carboxylterminalen Abschnitte der hCCR2-Rezeptoren, mittels eines GST-pulldowns bestätigt. Weitere Untersuchungen lieferten erste Hinweise darauf, dass die Expression von TPD52 in COS-7-Zellen die Signaltransduktion von hCCR2b beeinflusst. In der vorliegenden Arbeit sollte der Einfluss von TPD52 sowohl auf die von hCCR2a-, als auch auf die von hCCR2b-vermittelten zellulären Funktionen, wie die Stimulation der SRFabhängigen Gentranskription und Aktivierung der Inositphosphatproduktion untersucht und miteinander verglichen werden. Dabei sollte insbesondere der Frage nachgegangen werden, welchen Einfluss TPD52 auf die Interaktion der hCCR2-Rezeptoren mit G-Proteinen der $G\alpha_{q}$ -Familie hat. Dazu wurden COS-7-Zellen mit HA-CCR2a-pcDNA3.1(+) bzw. Flag-CCR2b-pcDNA3.1(+) und/oder $G\alpha_{q-EE}$ -pcDNA3.1(+) und/oder $G\alpha_{14-EE}$ pcDNA3.1(+) und/oder Myc-TPD52-pcDNA3.1(+) transfiziert. Nach Stimulation mit CCL2 wurde sowohl die hCCR2-vermittelte SRF-abhängige Gentranskription als auch die Inositphosphatproduktion untersucht.



Abb. 30: Einfluss von TPD52 auf die hCCR2-vermittelten zellulären Funktionen in COS-7-Zellen. COS-7-Zellen ($4x10^4$ pro *well*) wurden mit 0,05 µg des Expressionsplasmids HA-CCR2a-pcDNA3.1(+) oder 0,05 µg Flag-CCR2b-pcDNA3.1(+) und/oder 0,15 µg Myc-TPD52-pcDNA3.1(+) und mit jeweils 0,03 µg DNA pro *well* mit den Reporterplasmiden pSRE.L und pRL-TK (linke obere und untere Hälfte der Abbildung) oder ohne Reporterplasmide (rechte obere und untere Hälfte der Abbildung) transfiziert. Um die SRF-abhängige Reportergenaktivität zu bestimmen, wurden die Zellen 24 Stunden nach der Transfektion mit CCL2 (50 nM) für 6 Stunden inkubiert, mit 40 µl passivem Lysispuffer pro *well* aufgeschlossen und in den Lysaten die SRF-abhängige Gentranskription durch Messung der Luziferaseaktivitäten bestimmt. Zur Bestimmung der Inositphosphatproduktion wurde 24 Stunden nach der Transfektion das Medium gewechselt und die Zellen mit 0,5 ml Medium (pro *well*), welches 2 µCi *myo*-[2-³H (N)]-Inositol/ml und 10 mM LiCl enthielt, inkubiert. Nach 17 h wurden die Zellen mit CCL2 (50 nM) in Anwesenheit von 10 mM LiCl für 4 Stunden inkubiert. Die in der Abbildung gezeigten Werte entsprechen den Mittelwerten ± Standardabweichungen von Dreifachbestimmungen.

Die in der oberen, linken Hälfte von Abbildung 30 dargestellten Ergebnisse zeigen, dass hCCR2a-exprimierende Zellen durch Inkubation mit 50 nM CCL2 eine Zunahme der SRF-

abhängigen Gentranskription auf den ca. 3,5-fachen Wert gegenüber den Kontrollzellen aufwiesen, die nur mit dem leeren Expressionsplasmid pcDNA3.1(+) transfiziert worden waren. Die hCCR2a-vermittelte Inositphosphatproduktion (obere, rechte Hälfte Abb. 30) stieg im Vergleich zur basalen Aktivität auf den beinahe 14-fachen Wert an. Die Koexpression von TPD52 und hCCR2a führte zu einer ca. 90 %igen Inhibierung der CCL2 induzierten, hCCR2a-vermittelten SRF-abhängigen Gentranskription und zu einer ca. 70 %igen Inhibierung der hCCR2a-stimulierten Inositphosphatproduktion (Abb. 30, obere Hälfte). Die untere Hälfte von Abbildung 30 zeigt den Einfluss der Koexpression von TPD52 auf die hCCR2b-vermittelte SRF-abhängige Gentranskription (linke Hälfte) und Inositphosphatproduktion (rechte Hälfte). Die Koexpression von TPD52 führte auch in hCCR2b-exprimierenden Zellen zu einer Inhibition der CCL2-induzierten, Rezeptorvermittelten Signalwege. So die hCCR2b-vermittelte SRF-abhängige wurde Gentranskription in Anwesenheit von TPD52 um ca. 80 % inhibiert. Dagegen führte die Koexpression von TPD52 mit hCCR2b nur zu einer ca. 40 %igen Inhibition der Inositphosphatproduktion. Die Ergebnisse zeigen, dass die Expression von TPD52 sowohl zu einer Inhibition der hCCR2a-, als auch der hCCR2b-induzierten zellulären Funktionen, wie SRF-abhängiger Gentranskription und Inositphosphatproduktion führt. Um zu untersuchen, ob die Anwesenheit von TPD52 auch einen Einfluss auf die hCCR2/ $G\alpha_{q/14}$ vermittelte synergistische Zunahme der zellulären Funktionen hat, wurden die beiden

hCCR2-Rezeptorvarianten mit $G\alpha_a$ bzw. $G\alpha_{14}$ in COS-7-Zellen koexprimiert und der

Einfluss von TPD52 auf die CCL2-induzierte, hCCR2-vermittelte SRF-abhängige

Gentranskription und Inositphosphatproduktion untersucht.



Abb. 31: Einfluss von TPD52 auf die hCCR2/G-Protein-vermittelten zellulären Funktionen in **COS-7-Zellen.** COS-7-Zellen (4x10⁴ pro *well*) wurden mit 0,05 μ g des Expressionsplasmids HA-CCR2a-pcDNA3.1(+) oder 0,05 μ g Flag-CCR2b-pcDNA3.1(+) und/oder 0,05 μ g G α_{q-EE} pcDNA3.1(+) und/oder 0.05 μ g Ga_{14-EE}-pcDNA3.1(+) und/oder mit 0.15 μ g Myc-TPD52pcDNA3.1(+) und mit jeweils 0,03 µg DNA pro well mit den Reporterplasmiden pSRE.L und pRL-TK (linke obere und untere Hälfte der Abbildung) oder ohne Reporterplasmide (rechte obere und untere Hälfte der Abbildung) transfiziert. Um die SRF-abhängige Reportergenaktivität zu bestimmen wurden die Zellen 24 Stunden nach der Transfektion mit CCL2 (50 nM) für 6 Stunden inkubiert und dann mit 40 µl passivem Lysispuffer pro well aufgeschlossen und in den Lysaten die SRF-abhängige Gentranskription durch Messung der Luziferaseaktivitäten bestimmt. Zur Bestimmung der Inositphosphatproduktion wurde 24 Stunden nach der Transfektion das Medium gewechselt und die Zellen mit 0,5 ml Medium (pro well), welches 2 µCi myo-[2-³H (N)]-Inositol/ml und 10 mM LiCl enthielt, inkubiert. Nach 17 h wurden die Zellen mit CCL2 (50 nM) in Anwesenheit von 10 mM LiCl für 4 Stunden inkubiert. Anschließend wurden die Zellen lysiert und die Menge der gebildeten Inositphosphate ermittelt. Die in der Abbildung gezeigten Werte entsprechen den Mittelwerten ± Standardabweichungen von Dreifachbestimmungen.

Die in der oberen, linken Hälfte der Abbildung 31 dargestellten Ergebnisse zeigen, dass die Expression von $G\alpha_{q}$ bzw. $G\alpha_{14}$ zu einer synergistischen Zunahme der hCCR2a-vermittelten SRF-abhängigen Gentranskription führte, die durch gleichzeitige Expression von TPD52 um ca. 80-95 % abnahm. Ein inhibitorischer Einfluss von TPD52 wurde auch für die von hCCR2a/GaahCCR2a/G α_{14} -vermittelte synergistische Zunahme bzw. der Inositphosphatproduktion beobachtet (Abb. 31, obere Hälfte, rechts). So wurde die hCCR2a/ Gaa- bzw. hCCR2a/Ga14-induzierte Inositphosphatproduktion durch TPD52 um ca. 40-50 % inhibiert. Entsprechende Untersuchungen wurden auch an hCCR2bexprimierenden COS-7-Zellen durchgeführt (Abb. 31, untere Hälfte). Auch hier führte die Koexpression von TPD52 zu einer deutlichen, etwa 40-60 %igen Inhibierung der hCCR2b/Gaa- bzw. hCCR2b/Ga14-vermittelten synergistischen Zunahme der SRFabhhängigen Reportergenexpression (untere, linke Hälfte Abb. 31). Dagegen war der inhibitorische Einfluss von TPD52 auf die hCCR2b/Gaa- bzw. hCCR2b/Ga14-vermittelte Zunahme der Inositphosphatproduktion mit ca. 5 % bzw. ca. 20 % Inhibition deutlich geringer, als der für die SRF-abhängige Gentranskription beobachtete Rückgang. Zusammenfassend zeigen diese Ergebnisse, dass die Expression von TPD52 sowohl zu einer Inhibierung der hCCR2a- als auch der hCCR2b-Rezeptor-induzierten $G\alpha_{q}$ - bzw. Ga₁₄-vermittelten synergistischen Zunahme der SRF-abhängigen Gentranskription und Inositphosphatproduktion führt. Die Ergebnisse zeigen darüber hinaus, dass die von hCCR2a- im Vergleich zu den von hCCR2b-induzierten zellulären Funktionen durch die Expression von TPD52 stärker beeinflusst werden.

4.5.2 Einfluss von TPD52 auf die Expression und das *trafficking* von hCCR2b

Die Untersuchung des Einflusses von TPD52 auf die hCCR2-vermittelten zellulären Funktionen hat gezeigt, dass die Koexpression des hCCR2-Interaktionspartners eine deutliche Inhibierung der CCL2-induzierten SRF-abhängigen Gentranskription und Inositphosphatproduktion zur Folge hat. Im Folgenden sollte untersucht werden, ob es durch Koexpression von TPD52 zu Veränderungen in der Expression des Rezeptorproteins kommt und sich somit der beobachtete Rückgang in der Luziferaseaktivität und Inositphosphatprodukion erklären lässt. Dazu wurden HEK293-Zellen mit HA-CCR2b-
pcDNA3.1(+) und/oder Myc-TPD52-pcDNA3.1(+) transfiziert und die Proteinexpression mittels einer *Western blot*-Analyse untersucht.



Abb. 32: Einfluss von TPD52 auf die Expression von hCCR2b in HEK293-Zellen. HEK293-Zellen (2 x 10^6 , 100 mm Schale) wurden mit 5,0 µg des Expressionsplasmids HA-CCR2b-pcDNA3.1(+) und/oder 5,0 µg Myc-TPD52-pcDNA3.1(+) bzw. der entsprechenden Menge pcDNA3.1(+) transfiziert (Kontrolle). Am nächsten Tag wurden die Zellen geerntet und in passivem Lysispuffer (Promega) lysiert. Die in den Proben enthaltenen Proteine wurden in einem 12,5 %igen (m/V) SDS-Polyacrylamidgel aufgetrennt, auf Nitrozellulose transferiert und im Immunoblot mittels eines Anti-Myc- bzw. Anti-HA-Antikörpers detektiert.

Wie die Ergebnisse der in Abbildung 32 dargestellten *Western blot*-Analyse zeigen, führte die Koexpression von TPD52 zu keiner Abnahme der Expression von hCCR2b. Im dargestellten Immunoblot ist sogar eine Zunahme der Proteinmenge von hCCR2b bei Koexpression von TPD52 zu beobachten. Somit ist die Inhibition der hCCR2b-vermittelten zellulären Antworten in Anwesenheit von TPD52 nicht auf eine Abnahme der Rezeptorproteinmenge zurückzuführen. Es stellte sich jedoch die Frage, in welchem Ausmaß die Expression von TPD52 zu einer veränderten Oberflächenexpression der Rezeptoren führt. Um die Oberflächenexpression von hCCR2b in Anwesenheit von TPD52 zu untersuchen, wurden COS-7-Zellen mit HA-CCR2b-pcDNA3.1(+) und/oder Myc-TPD52-pcDNA3.1(+) transfiziert und die Anwesenheit der Rezeptoren auf der Zelloberfläche durch Bindung von radioaktiv-markiertem CCL2 (¹²⁵Iod-CCL2) an die Rezeptoren analysiert.



Abb. 33: Analyse der Bindung von ¹²⁵I-CCL2 an hCCR2b-exprimierende COS-7-Zellen. COS-7-Zellen ($4x10^4$ pro well) wurden in 48-well Platten mit 0,1 µg des Expressionsplasmids HA-CCR2b-pcDNA3.1(+) und/oder 0,1 µg Myc-TPD52-pcDNA3.1(+) transfiziert. Als Kontrolle dienten Zellen, die mit der entsprechenden Menge des leeren Vektors pcDNA3.1(+) transfiziert wurden. Die Zellen wurden mit 0,14 µM¹²⁵Iod-CCL2 inkubiert. Um die Spezifität der Bindung zu bestätigen, erfolgte die Inkubation in An- bzw. Abwesenheit von nicht radioaktiv markiertem CCL2 (50nM). Die *fach*-Bindung wurde ermittelt, indem die Menge an gebundenem ¹²⁵I-CCL2 auf die von Kontrollzellen gebundene Menge an ¹²⁵I-CCL2 bezogen wurde. Die in der Abbildung Werte entsprechen den Mittelwerten \pm Standardabweichungen gezeigten von Dreifachbestimmungen.

Die Analyse der Bindung von ¹²⁵I-CCL2 an hCCR2b-exprimierende Zellen (Abb. 33) zeigt, dass die Menge an gebundenem ¹²⁵Iod-CCL2 in Zellen die TPD52 koexprimierten, im Vergleich zu hCCR2b-exprimierenden Zellen, um *ca.* 35 % geringer war. Dieses Ergebnis könnte darauf hindeuten, dass die Expression von TPD52 zu einer Verringerung der Rezeptordichte auf der Zelloberfläche führt und/oder, dass es durch die Anwesenheit von TPD52 zu einer Änderung der Affinität von hCCR2b zu CCL2 kommt. Die Spezifität der Bindung von ¹²⁵Iod-CCL2 an hCCR2b und/oder hCCR2b/TPD52-exprimierende Zellen wurde in Anwesenheit von nicht markiertem CCL2 ermittelt.

4.5.3 Einfluss der exogenen Expression von FROUNT und TPD52 auf die hCCR2b-vermittelte *serum-response-factor*-abhängige Gentranskription und Inositphosphatproduktion

Untersuchungen von Terashima *et al.* führten 2005 unter Verwendung des *yeast-two-hybrid* Systems zur Entdeckung des Proteins FROUNT, einem bis dahin unbekannten Interaktionspartners von hCCR2b. Im Gegensatz zu TPD52 interagiert FROUNT mit dem carboxylterminalen Abschnitt von hCCR2b, nicht jedoch mit dem von hCCR2a. Die Arbeitsgruppe von Terashima konnte außerdem zeigen, dass FROUNT an den aktivierten Rezeptor bindet und eine Überexpression von FROUNT zu einer Verstärkung der Chemokin-induzierten Ausbildung von Lamellipodien und der Chemotaxis von Zellen führt. In der vorliegenden Arbeit sollte in transient transfizierten COS-7-Zellen der Einfluss der exogenen Expression von FROUNT auf die hCCR2b-vermittelten zellulären Antworten mit dem von TPD52 verglichen werden.



Abb. 34: Vergleich des Einflusses der exogenen Expression von FROUNT bzw. TPD52 auf die hCCR2b-vermittelten zellulären Funktionen in COS-7-Zellen. COS-7-Zellen ($4x10^4$ pro *well*) wurden mit 0,05 µg des Expressionsplasmids Flag-CCR2b-pcDNA3.1(+) und/oder steigenden Mengen Myc-FROUNT-pcDNA3.1(+) (0,05–0,5 µg) und/oder steigenden Mengen Myc-TPD52-pcDNA3.1(+) (0,05-0,5 µg) und mit jeweils 0,03 µg DNA pro *well* mit den Reporterplasmiden pSRE.L und pRL-TK (linke Hälfte) oder ohne Reporterplasmide (rechte Hälfte) transfiziert. Um die SRF-abhängige Reportergenaktivität zu bestimmen, wurden die Zellen 24 Stunden nach der Transfektion mit CCL2 (50 nM) für 6 Stunden inkubiert, mit 40 µl passivem Lysispuffer pro *well* aufgeschlossen und in den Lysaten die SRF-abhängige Gentranskription durch Messung der Luziferaseaktivitäten bestimmt. Zur Bestimmung der Inositphosphatproduktion wurde 24 Stunden nach der Transfektion das Medium gewechselt und die Zellen mit 0,5 ml Medium (pro *well*), welches 2 µCi *myo*-[2-³H (N)]-Inositol/ml und 10 mM LiCl enthielt, inkubiert. Nach 17 h wurden die Zellen mit CCL2 (50 nM) in Anwesenheit von 10 mM LiCl für 4 Stunden inkubiert.

Anschließend wurden die Zellen lysiert und die Menge der gebildeten Inositphosphate ermittelt. Die in der Abbildung gezeigten Werte entsprechen den Mittelwerten \pm Standardabweichungen von Dreifachbestimmungen.

Wie die in Abbildung 34 dargestellten Ergebnisse zeigen, führte die Koexpression von steigenden Mengen TPD52 zu einer stetig zunehmenden Inhibierung sowohl der CCL2induzierten hCCR2b-vermittelten SRF-abhängigen Gentranskription (linke Hälfte, Abb. 34) als auch der Inositphosphatproduktion (rechte Hälfte, Abb. 34). Dagegen hatte die Expression von steigenden Mengen FROUNT keine Inhibierung der hCCR2b-vermittelten zellulären Antworten zur Folge. Bei der höchsten zur Transfektion eingesetzten DNA-Menge von Myc-FROUNT-pcDNA3.1(+) konnte sogar eine leichte Zunahme der CCL2induzierten, Rezeptor-vermittelten Inositphosphatproduktion beobachtet werden. Die Transfektion von COS-7-Zellen mit der höchsten DNA-Menge von Myc-FROUNT-pcDNA3.1(+) führte in Abwesenheit des Rezeptors zu einer *ca*. 3-fachen Zunahme der SRF-abhängigen Gentranskription im Vergleich zur basalen Aktivität der Kontrollzellen. Diese Ergebnisse zeigen, dass FROUNT im Gegensatz zu TPD52 keinen inhibitorischen Einfluss auf die hCCR2b-vermittelten zellulären Funktionen hat.

4.6 Untersuchung der Bedeutung eines juxtamembranären Oktapeptids des carboxylterminalen Abschnitts der humanen CCR2-Chemokinrezeptoren für die Aktivierung zellulärer Funktionen durch diese Rezeptoren

4.6.1 Analyse der Stimulation von zellulären Funktionen durch hCCR2b-Deletionsmutanten

Für die Interaktion von GPCRs mit heterotrimeren G-Proteinen oder Nicht-G-Protein-Interaktionspartnern sind insbesondere die intrazellulären, carboxylterminalen Abschnitte der Rezeptoren von Bedeutung. Die beiden CCR2-Isoformen des Menschen unterscheiden sich genau in diesen carboxylterminalen Abschnitten. Trotzdem lieferte keine der in der vorliegenden Arbeit durchgeführten Untersuchungen Hinweise auf einen deutlichen Unterschied zwischen hCCR2a und hCCR2b im Bezug auf deren Interaktion mit G-

Proteinen oder dem Nicht-G-Protein-Interaktionspartner TPD52. Untersuchungen mit Glutathion-S-Transferase-Fusionsproteinen der carboxylterminalen Abschnitte von hCCR2a und hCCR2b hatten jedoch Hinweise auf die Bedeutung von acht Aminosäuren, die sich genau am Übergang von der siebten transmembranären Domäne zu den zwischen hCCR2a und hCCR2b variierenden carboxylterminalen Abschnitten befinden (s. Abb. 35), für die Interaktion zwischen dem Nicht-G-Protein-Interaktionspartner TPD52 und den hCCR2-Rezeptoren, geliefert. So resultierte die Deletion dieses Oktapeptids an den Gluthathion-S-Transferase-Fusionsproteinen der carboxylterminalen Abschnitte von hCCR2a und hCCR2b im Verlust der Interaktion mit TPD52. Dieses Ergebnis führte zur Frage, welche Bedeutung diesem Oktapeptid bei der Regulation von hCCR2b-vermittelten zellulären Funktionen zukommt und insbesondere, ob die beobachtete Inhibition der TPD52 hCCR2-Funktionen durch durch Interferenz des Nicht-G-Protein-Interaktionspartners mit der Kopplung der hCCR2-Rezeptoren an G-Proteine zu erklären ist. Um diesen Fragen nachzugehen, wurden zunächst zwei hCCR2b-Deletionsmutanten verschiedener Länge hergestellt. Bei der Mutante hCCR2b-2∆ wurden die Aminosäuren 314-360 deletiert, also der Bereich in dem sich die Aminosäuresequenz von hCCR2a und hCCR2b unterscheidet. Damit verfügt hCCR2b-2A aber noch über das Oktapeptid. Im Gegensatz dazu wurde bei der zweiten Mutante, hCCR2b-1A (1-305 AS), auch das Oktapeptid entfernt (s. Abb. 35). Um die Bedeutung des Oktapeptids bzw. des carboxylterminalen Abschnitts von hCCR2b für die CCL2-induzierte, Rezeptor-vermittelte SRF-abhängige Gentranskription und Inositphosphatproduktion zu untersuchen, wurden COS-7-Zellen mit Flag-CCR2b-pcDNA3.1(+) oder einer der beiden Flag-CCR2b-Deletionsmutanten transfiziert und die zellulären Antworten analysiert (s. Abb. 36).



Abb. 35: Schematische Darstellung der intrazellulären, carboxylterminalen Abschnitte der hCCR2-Rezeptorvarianten und -mutanten. Die Aminosäuresequenz der carboxylterminalen Abschnitte von hCCR2a und hCCR2b, ab der Aminosäure 305, sind vergleichend dargestellt. Das juxtamembranäre Oktapeptid, in dem die Aminosäuresequenzen der beiden hCCR2-Rezeptorvarianten noch übereinstimmen, ist in rot hervorgehoben. Zur Analyse der Bedeutung des Oktapeptids für die von hCCR2b regulierten zellulären Funktionen wurden zwei Deletionsmutanten hergestellt: hCCR2b-1 Δ und hCCR2b-2 Δ . Die Deletionsmutanten hCCR2b-2 Δ umfasst die Aminosäuren 1-313 und die Mutante hCCR2b-1 Δ die Aminosäuren 1-305 des kodierten Proteins.

Wie die in Abb. 36 dargestellten Ergebnisse zeigen, führte die Stimulation der mit Flag-CCR2b-pcDNA3.1(+) transfizierten COS-7-Zellen mit CCL2 (50 nM) zu einer Zunahme der SRF-abhängigen Gentranskription auf den *ca.* 3,5-fachen Wert im Vergleich zur Aktivität von Kontrollzellen, die mit der gleichen Menge des leeren Expressionsplasmids transfiziert worden waren. Auch die CCL2-induzierte Inositphosphatproduktion war in hCCR2b-exprimierenden Zellen im Vergleich zu Kontrollzellen um mehr als das 6-fache erhöht (Abb. 36, rechte Hälfte). Dagegen wiesen hCCR2b-1 Δ -exprimierende COS-7-Zellen weder einen Anstieg in der SRF-abhängigen Gentranskription, noch in der Inositphosphatproduktion auf. Auch die Expression der hCCR2b-2 Δ -Mutante, die noch über das Oktapeptid verfügt, führte nach Stimulation mit CCL2 zu keiner Aktivierung der untersuchten zellulären Funktionen. Beide hCCR2b-Mutanten hatten darüber hinaus durch die Deletion der carboxylterminalen Abschnitte auch die Fähigkeit eingebüßt durch die Kopplung an koexprimierte Ga_q- oder Ga₁₄-Untereinheiten eine synergistische Zunahme der Luziferaseaktivität und der Inositphosphatproduktion zu induzieren. Die Ergebnisse zeigen, (i) dass der carboxylterminale Abschnitt für die Übertragung der Rezeptoraktivität auf die Effektoren essentiell ist und, (ii) dass die Präsenz des Oktapeptids allein nicht ausreicht, um die hCCR2b-induzierten zellulären Funktionen zu aktivieren.



der Stimulation von zellulären Funktionen Abb. 36: Analyse durch hCCR2b-**Deletionsmutanten.** COS-7-Zellen $(4x10^4 \text{ pro } well)$ wurden mit 0,05 µg des Expressionsplasmids Flag-CCR2b-pcDNA3.1(+) oder 0,05 µg HA-CCR2b-1Δ-pcDNA3.1(+) oder 0,05 µg HA-CCR2b- 2Δ -pcDNA3.1(+) und/oder 0.05 µg Ga_{qEE}-pcDNA3.1(+) und/oder 0.05 µg Ga_{14EE}-pcDNA3.1(+) und mit jeweils 0,03 µg DNA pro well mit den Reporterplasmiden pSRE.L und pRL-TK (linke Hälfte) oder ohne Reporterplasmide (rechte Hälfte) transfiziert. Um die SRF-abhängige Reportergenaktivität zu bestimmen, wurden die Zellen 24 Stunden nach der Transfektion mit CCL2 (50 nM) für 6 Stunden inkubiert, mit 40 µl passivem Lysispuffer pro well aufgeschlossen und in den Lysaten die SRF-abhängige Gentranskription durch Messung der Luziferaseaktivitäten bestimmt. Zur Bestimmung der Inositphosphatproduktion wurde 24 Stunden nach der Transfektion das Medium gewechselt und die Zellen mit 0,5 ml Medium (pro well), welches 2 µCi myo-[2-³H (N)]-Inositol/ml und 10 mM LiCl enthielt, inkubiert. Nach 17 h wurden die Zellen mit CCL2 (50 nM) in Anwesenheit von 10 mM LiCl für 4 Stunden inkubiert. Anschließend wurden die Zellen lysiert und die Menge der gebildeten Inositphosphate ermittelt. Die in der Abbildung gezeigten Werte entsprechen den Mittelwerten \pm Standardabweichungen von Dreifachbestimmungen.

4.6.2 Analyse der Stimulation von zellulären Funktionen durch Alanin-Substitutionsmutationen

Die in den vorangegangenen Untersuchungen erzielten Ergebnisse haben gezeigt, dass der carboxylterminale Abschnitt von hCCR2b einen entscheidenden Einfluss auf die

Regulation von zellulären Funktionen durch den Rezeptor hat. Jedoch konnte mit den trunkierten hCCR2-Mutanten die Bedeutung des juxtamembranären Oktapeptids nicht geklärt werden. Um weitere Einblicke in die Funktion des Oktapeptids zu gewinnen, wurden verschiedene Alanin-Substitutionsmutanten von hCCR2b und hCCR2a hergestellt. In diesen Mutanten wurden z.B. alle acht Aminosäuren oder auch nur drei oder zwei Aminosäuren im Bereich des Oktapeptids durch Alanine ersetzt. Die einzelnen hCCR2b-Mutanten sind in Abbildung 37 schematisch dargestellt. Um die Auswirkungen der veränderten Aminosäuren auf die von hCCR2-Rezeptoren regulierten zellulären Funktionen zu untersuchen, wurden die verschiedenen Alanin-hCCR2b-Substitutionsmutanten in COS-7-Zellen exprimiert und die Stimulation zellulärer Funktionen durch diese Mutanten (SRF-abhängige Gentranskription, Inositphosphatproduktion) mit der des wildtypischen hCCR2-Proteins verglichen (s. Abb. 38).

CCR2b:	³⁰² PIIYAFVGEKFRRYLS ³¹⁷
CCR2b-8A:	PIIYAAAAAAAARYLS
CCR2b-5A:	PIIYAFVAAAAARYLS
CCR2b-4A:	PIIAAAAGEKFRRYLS
CCR2b-3A:	PIIYAFAGAKFARYLS

Abb. 37: Schematische Darstellung der Alanin-Substitutionsmutationen im Bereich des juxtamembranären Oktapeptids von hCCR2b. Dargestellt sind die Aminosäuren 302 bis 317 von hCCR2b. Die acht Aminosäuren des Oktapeptids sind rot hervorgehoben, die jeweiligen Alaninsubstitutionen sind in grün gekennzeichnet.



Abb. 38: Einfluss von Alaninsubstitutionen innerhalb des juxtamembranären Oktapeptids auf hCCR2b-regulierte zelluläre Funktionen. COS-7-Zellen (4x10⁴ pro well) wurden mit 0,1 µg des Expressionsplasmids Flag-CCR2b-pcDNA3.1(+) oder 0,1 µg Flag-CCR2b-3A-pcDNA3.1(+) oder 0,1 µg Flag-CCR2b-4A-pcDNA3.1(+) oder 0,1 µg Flag-CCR2b-5A-pcDNA3.1(+) oder 0,1 µg Flag-CCR2b-8A-pcDNA3.1(+) und mit jeweils 0,03 µg DNA pro well mit den Reporterplasmiden pSRE.L und pRL-TK (linke Hälfte) oder ohne Reporterplasmide (rechte Hälfte) transfiziert. Um die SRF-abhängige Reportergenaktivität zu bestimmen, wurden die Zellen 24 Stunden nach der Transfektion mit CCL2 (50 nM) für 6 Stunden inkubiert, mit 40 µl passivem Lysispuffer pro well aufgeschlossen und in den Lysaten die SRF-abhängige Gentranskription durch Messung der Luziferaseaktivitäten bestimmt. Zur Bestimmung der Inositphosphatproduktion wurde 24 Stunden nach der Transfektion das Medium gewechselt und die Zellen mit 0,5 ml Medium (pro well), welches 2 µCi myo-[2-³H (N)]-Inositol/ml und 10 mM LiCl enthielt, inkubiert. Nach 17 h wurden die Zellen mit CCL2 (50 nM) in Anwesenheit von 10 mM LiCl für 4 Stunden inkubiert. Anschließend wurden die Zellen lysiert und die Menge der gebildeten Inositphosphate ermittelt. Die in der Abbildung gezeigten Werte entsprechen den Mittelwerten \pm Standardabweichungen von Dreifachbestimmungen.

Wie die in Abbildung 38 dargestellten Ergebnisse zeigen, führte die Stimulation von Flag-CCR2b-pcDNA3.1(+) transfizierten Zellen mit CCL2 (50 nM) zu einer *ca.* 5-fachen Zunahme der SRF-abhängigen Gentranskription im Vergleich zu den Kontrollzellen, die mit der entsprechenden Menge des Expressionsvektors pcDNA3.1(+) transfiziert worden waren. Dagegen war keine der hCCR2b-Alanin-Substitutionsmutanten (hCCR2b-8A, hCCR2b-5A, hCCR2b-4A, hCCR2b-3A) in der Lage, nach Stimulation mit CCL2 effektiv die Reportergenexpression zu aktivieren. Selbst durch die Substitution von nur drei Aminosäuren (hCCR2b-3A-Mutante) im Bereich des juxtamembranären Oktapeptids verlor der Rezeptor seine Fähigkeit, eine Zunahme der SRF-abhängigen Gentranskription zu induzieren. Ähnliche Ergebnisse wurden auch für die Rezeptor-stimulierte Inositphosphatproduktion ermittelt. Auch hier kam es zu einem *ca.* 5,5-fachen Anstieg der

Inositphosphatproduktion in den Zellen, die den wildtypischen Rezeptor exprimierten. Im Gegensatz dazu wurde in Zellen, die eine der vier untersuchten hCCR2b-Alanin-Substitutionsmutanten (hCCR2b-8A, hCCR2b-5A, hCCR2b-4A, hCCR2b-3A) exprimierten, nach Stimulation mit CCL2 (50 nM) keine Zunahme der Inositphosphatproduktion beobachtet (Abb. 38, rechte Hälfte). Diese Ergebnisse unterstreichen die Bedeutung des juxtamembranären Oktapeptids für die hCCR2bvermittelte Aktivierung zellulärer Funktionen, wie der SRF-abhängigen Gentranskription und der Bildung von Inositphosphaten. Im Folgenden sollte nun untersucht werden, welche Auswirkungen die Alaninsubstitutionen im Bereich des Oktapeptids auf die Interaktion des Rezeptors mit $G\alpha_q$ - und $G\alpha_{14}$ -Untereinheiten hat. Um diese Frage zu klären, wurden COS-7-Zellen mit Flag-CCR2b-pcDNA3.1(+), Flag-CCR2b-3A-pcDNA3.1(+) oder Flag-CCR2b-8A-pcDNA3.1(+) transfiziert und durch Koexpression mit $G\alpha_{q-EE}$ bzw. $G\alpha_{14-EE}$ auf ihre Fähigkeit zur Interaktion mit Gα-Untereinheiten untersucht. Nach Stimulation der transient transfizierten Zellen mit CCL2 wurde sowohl die Rezeptor-vermittelte SRFabhängige Gentranskription als auch die Inositphosphatproduktion analysiert.



Abb. 39: Einfluss von Alaninsubstitutionen innerhalb des juxtamembranären Oktapeptids auf hCCR2b/G-Protein-regulierten zellulären Funktionen. COS-7-Zellen (4x10⁴ pro well) wurden mit 0,1 µg des Expressionsplasmids Flag-CCR2b-pcDNA3.1(+) oder 0,1µg Flag-CCR2b-3A-pcDNA3.1(+) oder 0,1 μ g Flag-CCR2b-8A-pcDNA3.1(+) und/oder 0,05 μ g G $\alpha_{\alpha_{\text{EE}}}$ pcDNA3.1(+) und/oder 0,05 μ g Ga_{14EE}-pcDNA3.1(+) und mit jeweils 0,03 μ g DNA pro well mit den Reporterplasmiden pSRE.L und pRL-TK (linke Hälfte) oder ohne Reporterplasmide (rechte Hälfte) transfiziert. Um die SRF-abhängige Reportergenaktivität zu bestimmen, wurden die Zellen 24 Stunden nach der Transfektion mit CCL2 (50 nM) für 6 Stunden inkubiert, mit 40 µl passivem Lysispuffer pro well aufgeschlossen und in den Lysaten die SRF-abhängige Gentranskription durch Messung der Luziferaseaktivitäten bestimmt. Zur Bestimmung der Inositphosphatproduktion wurde 24 Stunden nach der Transfektion das Medium gewechselt und die Zellen mit 0,5 ml Medium (pro well), welches 2 µCi myo-[2-³H (N)]-Inositol/ml und 10 mM LiCl enthielt, inkubiert. Nach 17 h wurden die Zellen mit CCL2 (50 nM) in Anwesenheit von 10 mM LiCl für 4 Stunden inkubiert. Anschließend wurden die Zellen lysiert und die Menge der gebildeten Inositphosphate ermittelt. Die in der Abbildung gezeigten Werte entsprechen den Mittelwerten \pm Standardabweichungen von Dreifachbestimmungen.

Die in Abbildung 39 dargestellten Ergebnisse zeigen, dass die Stimulation von hCCR2b-WT-exprimierenden Zellen mit CCL2 (50nM) zu einer Zunahme der Luziferaseaktivität um *ca.* den 3-5-fachen Wert (Abb. 39, linke Hälfte oben und unten) bzw. der Inositphosphatproduktion um den *ca.* 6-7-fachen Wert im Vergleich zu den Kontrollzellen führte. Bei Koexpression des wildtypischen hCCR2b-Rezeptors mit $G\alpha_q$ (Abb. 39, obere Hälfte) bzw. $G\alpha_{14}$ (Abb. 39, untere Hälfte) kam es zu einer synergistischen Zunahme der CCL2-induzierten Luziferaseaktivität und Inositphosphatproduktion um den *ca.* 1,5-2,5-fachen Wert im Vergleich zu COS-7-Zellen, die nur hCCR2b exprimierten. Im Gegensatz dazu war weder die hCCR2b-3A- noch die hCCR2b-8A-Mutante in der Lage in Ab- oder Anwesenheit von $G\alpha_q$ bzw. $G\alpha_{14}$ nach Stimulation mit dem Liganden eine Zunahme der SRF-abhängigen Gentranskription oder der Inositphosphatproduktion zu induzieren. Diese Ergebnisse zeigen, dass die Alanin-Substitutionen in hCCR2b-3A und hCCR2b-8A sehr wahrscheinlich durch die Entkopplung des Rezeptors von den heterotrimeren G-Proteinen zu einem Verlust der Regulation von zellulären Funktionen durch die Rezeptormutanten führt.

Um zu klären, ob es durch die Alaninsubstitutionen im juxtamembranären Oktapeptid zu Änderungen in der Affinität des Rezeptors zum Liganden kommt, wurde exemplarisch für die bisher analysierten hCCR2b-Mutanten hCCR2b-3A-exprimierende Zellen mit steigenden Mengen CCL2 (1-1000 nM) inkubiert (Abb. 40).



Abb. 40: Konzentrations-Wirkungskurve der CCL2-induzierten, hCCR2b-3A-vermittelten SRF-abhängigen Gentranskription. COS-7-Zellen $(4x10^4 \text{ pro well})$ wurden mit jeweils 0,03 µg DNA der Reporterplasmide pSRE.L und pRL-TK, sowie mit 0,1 µg des Expressionsplasmids Flag-CCR2b-pcDNA3.1(+) oder mit 0,1 µg Flag-CCR2b-3A-pcDNA3.1(+) transfiziert. 24 Stunden nach der Transfektion wurden die Zellen mit CCL2 (1-1000 nM) für 6 Stunden inkubiert, im Anschluss mit 40 µl passivem Lysispuffer pro *well* aufgeschlossen und in den Lysaten die SRF-abhängige Gentranskription durch Messung der Luziferaseaktivitäten bestimmt. Die in der Abbildung gezeigten Werte entsprechen den Mittelwerten \pm Standardabweichungen von Dreifachbestimmungen.

Die in Abbildung 40 dargestellten Ergebnisse zeigen, dass die Stimulation von wildtypischen hCCR2b-exprimierenden Zellen mit 500 nM CCL2 zu einem Anstieg der SRF-abhängigen Reportergentranskription führte, der um das mehr als 4-fache über der von hCCR2b-exprimierenden Zellen lag, die nur mit Medium ohne Ligand inkubiert worden waren. Im Gegensatz dazu, wurde für COS-7-Zellen, die die Alanin-Substitutionsmutante hCCR2b-3A exprimierten, nach Stimulation mit 500 nM CCL2 nur eine geringe Zunahme der SRF-abhängigen Gentranskription von *ca.* 13 % im Vergleich zur maximalen Aktivität des wildtypischen hCCR2b-Proteins beobachtet. Die Ergebnisse zeigen deutlich, dass die hCCR2b-3A-Mutante auch nach Stimulation mit höheren Konzentrationen von CCL2 nur in einem deutlich geringeren Umfang in der Lage war die Aktivierung der SRF-abhängigen Gentranskription in einer konzentrationsabhängigen Weise zu vermitteln.

Um zu klären, welche der Aminosäuren der hCCR2b-Alanin-Substitutionsmutante hCCR2b-3A für den Verlust bzw. die Reduktion der Fähigkeit zelluläre Funktionen zu regulieren von Bedeutung ist, wurden weitere Mutanten hergestellt, bei denen nur eine bzw. zwei Aminosäuren durch Alanine ausgetauscht wurden (Abb. 41 bzw. 43). In den Mutanten hCCR2b-1Aa, -1Ab und -1Ac wurde jeweils eine der drei Aminosäuren (Valin³⁰⁸, Glutamat³¹⁰ und Arginin³¹³) durch ein Alanin ersetzt (Abb. 41) und in den Mutanten hCCR2b-2Aa, -2Ab und -2Ac wurden Kombinationen von je zwei dieser drei Aminosäuren substituiert (Val³⁰⁸/Glu³¹⁰; Val³⁰⁸/Arg³¹³; Glu³¹⁰/Arg³¹³) (Abb. 43). Um die Auswirkung der Substitution einzelner Aminosäuren innerhalb des Oktapeptids von hCCR2b zu untersuchen, wurden COS-7-Zellen mit Flag-CCR2b-pcDNA3.1(+), Flag-CCR2b-1Aa-pcDNA3.1(+), Flag-CCR2b-1Ab-pcDNA3.1(+) oder Flag-CCR2b-1Ac-pcDNA3.1(+) transfiziert und nach Stimulation mit CCL2 die SRF-abhängige Reportergenexpression (Abb. 42, linke Hälfte) und die Inositphosphatproduktion (Abb. 42, rechte Hälfte) analysiert. Außerdem sollte durch Koexpression von Gα_q die Auswirkung der Mutation mit Gα-Untereinheiten untersucht werden.

CCR2b :	PIIYAFVGEKFRRYLS ³¹⁷
CCR2b-1Aa :	PIIYAFAGEKFRRYLS
CCR2b-1Ab :	PIIYAFVGAKFRRYLS
CCR2b-1Ac :	PIIYAFVGEKFARYLS

Abb. 41: Schematische Darstellung der Alanin-Substitutionsmutationen innerhalb des juxtamembranären Oktapeptids von hCCR2b. Dargestellt sind die Aminosäuren 302 bis 317 von hCCR2b. Die acht Aminosäuren des Oktapeptids sind rot hervorgehoben, die jeweiligen Alaninsubstitutionen sind in grün gekennzeichnet.



Abb. 42: Analyse der Bedeutung einzelner Aminosäuren des Oktapeptids für hCCR2bvermittelte zelluläre Funktionen. COS-7-Zellen ($4x10^4$ pro well) wurden mit 0,1 µg des Expressionsplasmids Flag-CCR2b-pcDNA3.1(+) oder 0,1 µg Flag-CCR2b-1Aa-pcDNA3.1(+) oder 0,1 µg Flag-CCR2b-1Ab-pcDNA3.1(+) oder 0,1 µg Flag-CCR2b-1Ac-pcDNA3.1(+) und/oder 0,05 $\mu g \ G\alpha_{\alpha-FF}$ -pcDNA3.1(+) und mit jeweils 0,03 μg DNA pro *well* mit den Reporterplasmiden pSRE.L und pRL-TK (linke Hälfte) oder ohne Reporterplasmide (rechte Hälfte) transfiziert. Um die SRF-abhängige Reportergenaktivität zu bestimmen, wurden die Zellen 24 Stunden nach der Transfektion mit CCL2 (50 nM) für 6 Stunden inkubiert, mit 40 µl passivem Lysispuffer pro well aufgeschlossen und in den Lysaten die SRF-abhängige Gentranskription durch Messung der Luziferaseaktivitäten bestimmt. Zur Bestimmung der Inositphosphatproduktion wurde 24 Stunden nach der Transfektion das Medium gewechselt und die Zellen mit 0,5 ml Medium (pro well), welches 2 µCi myo-[2-³H (N)]-Inositol/ml und 10 mM LiCl enthielt, inkubiert. Nach 17 h wurden die Zellen mit CCL2 (50 nM) in Anwesenheit von 10 mM LiCl für 4 Stunden inkubiert. Anschließend wurden die Zellen lysiert und die Menge der gebildeten Inositphosphate ermittelt. Die in der Abbildung gezeigten Werte entsprechen den Mittelwerten ± Standardabweichungen von Dreifachbestimmungen.

Wie die in Abbildung 42 dargestellten Ergebnisse zeigen, hatte die Stimulation von wildtypischen hCCR2b-exprimierenden COS-7-Zellen mit CCL2 (50 nM) eine *ca.* 3,5fache Zunahme der SRF-abhängigen Gentranskription und eine *ca.* 6-fache Zunahme der Inositphosphatproduktion im Vergleich zu den Kontrollzellen, die mit der entsprechenden Menge des leeren Expressionsplasmids pcDNA3.1(+) transfiziert worden waren, zur Folge. Auch die Mutante hCCR2b-1Ab vermittelte eine dem wildtypischen Rezeptor ähnlich starke Aktivierung beider zellulärer Funktionen. Die hCCR2b-1Aa-vermittelte SRF-Aktivität und Inositphosphatproduktion erreichte dagegen nur etwa *ca.* 70 % und *ca.* 60 % der für den wildtypischen hCCR2b-Rezeptor bestimmten Zunahme. Im Gegensatz dazu hatte der Austausch der Aminosäure Arginin³¹³ einen deutlichen Einfluss auf die hCCR2b-vermittelten zellulären Funktionen. So wurde für die hCCR2b-1Ac-Mutante nach Stimulation mit CCL2 weder eine Induktion der SRF-Aktivität, noch eine Zunahme Inositphosphatproduktion beobachtet. Auch die Koexpression von Gaq mit der hCCR2b1Ac-Mutante resultierte in keiner bzw. nur in einer geringen Zunahme der SRF-Aktivität und der Inositphosphatproduktion. Im Gegensatz dazu wurde für den wildtypischen hCCR2b-Rezeptor und die Mutante hCCR2b-1Ab eine nahezu gleich starke Zunahme der SRF-Aktivität und der Inositphosphatproduktion ermittelt. Interessanterweise wies die hCCR2b-1Aa Mutante eine im Vergleich zum wildtypischen Rezeptor ähnliche Inositphosphatproduktion bei Koexpression von G α_q auf, während die von der hCCR2b-1Aa-Mutante vermittelte SRF-abhängige Gentranskription in Anwesenheit von G α_q nur etwa 45 % der Aktivität erreichte, die für den wildtypischen Rezeptor in Anwesenheit von G α_q beobachtet wurde. Die Ergebnisse dieser Untersuchungen zeigen, dass bereits die Substitution einzelner Aminosäuren innerhalb des juxtamembranären Oktapeptids von hCCR2b zu einer starken Beeinträchtigung der Rezeptor-vermittelten zellulären Funktionen führt. Dabei scheinen vor allem die Aminosäuren Valin³⁰⁸ und im noch stärkeren Maße das Arginin³¹³ eine wichtige Rolle für die Funktionalität des Rezeptors zu spielen.

Um die Bedeutung der Aminosäuren Valin³⁰⁸ und Arginin³¹³ für die hCCR2b-vermittelten zellulären Funktionen weitergehend zu untersuchen, wurden hCCR2b-Mutanten hergestellt, in denen je zwei der Aminosäuren an Position 308, 310 und 313 durch Alanine ersetzt wurden. So wurden in der 2Aa-Mutante das Valin³⁰⁸ und das Glutamat³¹⁰, in der 2Ab-Mutante die Aminosäuren Glutamat³¹⁰ und Arginin³¹³ und in der Mutante hCCR2b-2Ac das Valin³⁰⁸ und das Arginin³¹³ durch Alanine ersetzt (Abb. 43). Um den Einfluss dieser Substitutionen im Oktapeptid auf die hCCR2b-vermittelten zellulären Funktionen zu untersuchen, wurden COS-7-Zellen mit Flag-CCR2b-pcDNA3.1(+), Flag-CCR2b-2Aa-pcDNA3.1(+), Flag-CCR2b-2Ab-pcDNA3.1(+) oder Flag-CCR2b-2Ac-pcDNA3.1(+) und/oder Ga_{q-EE}-pcDNA3.1(+) transfiziert und nach Stimulation mit CCL2 die SRF-abhängige Genexpression (Abb. 44, linke Hälfte) und die Inositphosphatproduktion (Abb. 44, rechte Hälfte) analysiert.



Abb. 43: Schematische Darstellung der Alanin-Substitutionsmutationen innerhalb des juxtamembranären Oktapeptids von hCCR2b. Dargestellt sind die Aminosäuren 302 bis 317 von hCCR2b. Die acht Aminosäuren des Oktapeptids sind rot hervorgehoben, die jeweiligen Alaninsubstitutionen sind in grün gekennzeichnet.



Abb. 44: Analyse der Bedeutung einzelner Aminosäuren des Oktapeptids für hCCR2bvermittelte zelluläre Funktionen. COS-7-Zellen $(4x10^4 \text{ pro } well)$ wurden mit 0,1 µg des Expressionsplasmids Flag-CCR2b-pcDNA3.1(+) oder 0,1 µg Flag-CCR2b-2Aa-pcDNA3.1(+) oder 0,1 µg Flag-CCR2b-2Ab-pcDNA3.1(+) oder 0,1 µg Flag-CCR2b-2Ac-pcDNA3.1(+) und/oder 0,05 $\mu g \ G\alpha_{q-EE}$ -pcDNA3.1(+) und mit jeweils 0,03 μg DNA pro *well* mit den Reporterplasmiden pSRE.L und pRL-TK (linke Hälfte) oder ohne Reporterplasmide (rechte Hälfte) transfiziert. Um die SRF-abhängige Reportergenaktivität zu bestimmen, wurden die Zellen 24 Stunden nach der Transfektion mit CCL2 (50 nM) für 6 Stunden inkubiert, mit 40 µl passivem Lysispuffer pro well aufgeschlossen und in den Lysaten die SRF-abhängige Gentranskription durch Messung der Luziferaseaktivitäten bestimmt. Zur Bestimmung der Inositphosphatproduktion wurde 24 Stunden nach der Transfektion das Medium gewechselt und die Zellen mit 0,5 ml Medium (pro well), welches 2 µCi myo-[2-³H (N)]-Inositol/ml und 10 mM LiCl enthielt, inkubiert. Nach 17 h wurden die Zellen mit CCL2 (50 nM) in Anwesenheit von 10 mM LiCl für 4 Stunden inkubiert. Anschließend wurden die Zellen lysiert und die Menge der gebildeten Inositphosphate ermittelt. Die in der Abbildung gezeigten Werte entsprechen den Mittelwerten \pm Standardabweichungen von Dreifachbestimmungen.

Wie die in Abbildung 44 dargestellten Ergebnisse zeigen, hatte die Stimulation von hCCR2b-WT-exprimierenden COS-7-Zellen mit CCL2 (50 nM) eine *ca.* 3,5-fache

Zunahme der SRF-abhängigen Gentranskription und eine *ca.* 6-fache Zunahme der Inositphosphatproduktion im Vergleich zu den Kontrollzellen zur Folge. Keine der untersuchten hCCR2b-Mutanten (hCCR2b-2Aa, hCCR2b-2Ab und hCCR2b-2Ac) vermittelte eine dem wildtypischen Rezeptor ähnliche Aktivierung beider zellulärer Funktionen. Während für hCCR2b-2Aa-exprimierende COS-7-Zellen noch eine mehr als 2-fache Zunahme der SRF-abhängigen Gentranskription und Inositphosphatproduktion zu verzeichnen war, wurde für die beiden anderen Mutanten (hCCR2b-2Ab und hCCR2b-2Ac) nur noch eine geringe Aktivierung der SRF-abhängigen Gentranskription und keine Zunahme der Inositphosphatproduktion ermittelt. Bei Koexpression von G α_q wurde für hCCR2b-2Ab und hCCR2b-2Ac keine Zunahme der Rezeptor-vermittelten Aktivität zellulärer Funktionen beobachtet. Die Koexpression von G α_q in hCCR2b-2Aaexprimierenden Zellen führte zwar zu einer synergistischen Zunahme der zellulären Funktionen, die aber etwa 30 % geringer ausfiel, als der Anstieg, der bei Koexpression von G α_q mit wildtypischem hCCR2b-Rezeptor ermittelt worden war

Da sich beide hCCR2-Rezeptorvarianten, wie bereits erwähnt, erst nach dem juxtamembranären Oktapeptid in ihrer Aminosäuresequenz unterscheiden, sollte im Folgenden die Frage geklärt werden, ob die Substitution von Aminosäuren innerhalb des Oktapeptids von hCCR2a die gleichen Auswirkungen auf die Rezeptor-vermittelten zellulären Antworten und die Kopplung an G α -Untereinheiten hat, wie sie für die Alaninsubstitutionsmutanten von hCCR2b beobachtet wurden. Dazu wurde eine hCCR2a-Alaninsubstitutionsmutante generiert, bei der entsprechend der hCCR2b-2Ab-Mutante, ebenfalls das Glutamat³¹⁰ und das Arginin³¹³ durch Alanine ersetzt wurden. Um den Einfluss dieser Substitutionen im Oktapeptid auf die hCCR2a-vermittelten zellulären Funktionen zu untersuchen und mit der hCCR2b-2Ab-Mutante zu vergleichen, wurden COS-7-Zellen mit HA-CCR2a-pcDNA3.1(+), Flag-CCR2b-pcDNA3.1(+) bzw. den Alaninsubstitutionsmutanten HA-CCR2a-2Ab-pcDNA3.1(+) oder Flag-CCR2b-2Ab-pcDNA3.1(+) und/oder G α_{q-EE} -pcDNA3.1(+) transfiziert und nach Stimulation mit CCL2 die SRF-abhängige Genexpression analysiert.



Abb. 45: Analyse der Bedeutung einzelner Aminosäuren des Oktapeptids für die hCCR2abzw- hCCR2b-vermittelte SRF-abhängige Gentranskription. COS-7-Zellen ($4x10^4$ pro *well*) wurden mit jeweils 0,03 µg DNA der Reporterplasmide pSRE.L und pRL-TK, sowie mit 0,1 µg des Expressionsplasmids HA-CCR2a-pcDNA3.1(+), 0,1 µg Flag-CCR2b-pcDNA3.1(+), 0,1 µg HA-CCR2a-2Ab-pcDNA3.1(+) oder 0,1 µg Flag-CCR2b-2Ab-pcDNA3.1(+) und/oder 0,05 µg G α_{q-EE} -pcDNA3.1(+) transfiziert. 24 Stunden nach der Transfektion wurden die Zellen mit CCL2 (50 nM) für 6 Stunden inkubiert, im Anschluss mit 40 µl passivem Lysispuffer pro *well* aufgeschlossen und in den Lysaten die SRF-abhängige Gentranskription durch Messung der Luziferaseaktivitäten bestimmt. Die in der Abbildung gezeigten Werte entsprechen den Mittelwerten ± Standardabweichungen von Dreifachbestimmungen.

Die in der Abbildung 45 dargestellten Ergebnisse zeigen, dass die Stimulation von hCCR2a-exprimierenden Zellen mit CCL2 zu einer *ca.* 4-fachen Zunahme der SRF-Aktivität im Vergleich zu Kontrollzellen führte, die mit der entsprechenden Menge des leeren Expressionsplasmids transfiziert worden waren. Die Substitution von Glutamat³¹⁰ und Arginin³¹³ im juxtamembranären Oktapeptid von hCCR2a durch Alanine hatte einen vollständigen Verlust der Fähigkeit des Rezeptors die SRF-abhängige Gentranskription zu aktivieren zur Folge. Die gleiche Beobachtung konnte auch für die Substitution dieser beiden Aminosäuren im Oktapeptid von hCCR2b gemacht werden. Außerdem war die hCCR2a-2Ab-Mutante nicht mehr in der Lage über eine Kopplung an $G\alpha_q$ eine synergistische Zunahme der SRF-abhängigen Gentranskription zu induzieren. Die gleichen Beobachtungen wurden auch für die hCCR2b-2Ab-Mutante gemacht. Diese Ergebnisse zeigen, dass die beiden Aminosäuren, Glutamat³¹⁰ und Arginin³¹³, innerhalb des

juxtamembranären Oktapeptids nicht nur für die hCCR2b-, sondern auch für die hCCR2avermittelte SRF-abhängige Gentranskription von entscheidender Bedeutung sind.

4.6.3 Analyse der Expression verschiedener hCCR2b-Alanin-Substitutionsmutanten

Die bisherigen Untersuchungen der hCCR2b-Alanin-Substitutionsmutanten hatten gezeigt, dass Mutationen im Bereich des juxtamembranären Oktapeptids die Fähigkeit des Rezeptors beeinträchtigen, die Aktivität bestimmter Effektoren zu regulieren. Im Folgenden sollte nun geklärt werden, ob die Alaninsubstitutionen Auswirkungen auf die Expression der Rezeptorproteine haben. Dazu wurden HEK293-Zellen mit der DNA der verschiedenen Flag-CCR2b-Mutanten und zum Vergleich mit wildtypischem Flag-CCR2bpcDNA3.1(+) transfiziert.



Abb. 46: *Western blot*-Analyse der Expression von hCCR2b-Alanin-Substitutionsmutanten. HEK293-Zellen (2,0 x 10⁶, 100 mm Schale) wurden mit 8 μg DNA der Expressionsplasmide Flag-CCR2b-pcDNA3.1(+), Flag-CCR2b-1Aa-pcDNA3.1(+), Flag-CCR2b-1Ab-pcDNA3.1(+), Flag-CCR2b-1Ac-pcDNA3.1(+), Flag-CCR2b-2Aa-pcDNA3.1(+), Flag-CCR2b-2Ab-pcDNA3.1(+), Flag-CCR2b-2Ac-pcDNA3.1(+), Flag-CCR2b-2Ac-pcDNA3.1(+), Flag-CCR2b-2Ac-pcDNA3.1(+), oder der entsprechenden Menge des leeren Expressionsplasmids (Kontrolle) transfiziert. Die Zellen wurden nach 24 Stunden geerntet und aufgeschlossen. Anschließend wurden die Zellysate durch Zentrifugation in eine lösliche und partikuläre Fraktion aufgetrennt. Die Proteine der partikulären Fraktion wurden in einem 10 %igen (m/V) SDS-Polyacrylamidgel aufgetrennt, auf Nitrozellulose transferiert und im Immunoblot mittels eines Anti-Flag-Antikörpers analysiert.

Die Analyse der Proteinexpression verschiedener hCCR2b-Mutanten (Abb. 46) zeigte, dass alle der untersuchten Mutanten exprimiert wurden. Dabei wurden im Gegensatz zu beobachteten Unterschieden in der Rezeptor-vermittelten Aktivität nur geringe (hCCR2b-1Ac, -2Aa und -2Ab) oder gar keine Unterschiede (hCCR2b-1Aa, -1Ab, -2Ac und -3A) in der Proteinexpression der einzelnen Mutanten ermittelt. Dennoch konnte nicht ausgeschlossen werden, dass sich die einzelnen hCCR2b-Mutanten in ihrer Präsenz auf der Zelloberfläche oder in ihrer Affinität zum Liganden unterscheiden. Um die Präsenz der Rezeptoren auf der Zelloberfläche und/oder die Affinität der Rezeptormutanten zu den Liganden zu ermitteln, wurden Radioliganden-Bindungsstudien durchgeführt. Dazu wurden COS-7-Zellen mit dem wiltypischen Rezeptor Flag-CCR2b-pcDNA3.1(+) und verschiedenen hCCR2b-Alanin-Substitutionsmutanten transient transfiziert. Am nächsten Tag wurden die Zellen mit ¹²⁵Iod-CCL2 in An- bzw. Abwesenheit von nicht radioaktivmarkiertem CCL2 inkubiert und anschließend die Menge an gebundenem ¹²⁵Iod-CCL2 analysiert.



Abb. 47: Bindung von radioaktiv-markiertem ¹²⁵Iod-CCL2 an hCCR2b-Alanin-Substitutionsmutanten-exprimierende COS-7-Zellen. COS-7-Zellen ($4x10^4$ pro *well*) wurden mit 0,2 µg des Expressionsplasmids Flag-CCR2b-pcDNA3.1(+) oder 0,2 µg Flag-CCR2b-1Ac-pcDNA3.1(+) oder 0,2 µg Flag-CCR2b-2Aa-pcDNA3.1(+) oder 0,2 µg Flag-CCR2b-2Ab-pcDNA3.1(+) oder 0,2 µg Flag-CCR2b-2Ac-pcDNA3.1(+) oder 0,2 µg Flag-CCR2b-3A-pcDNA3.1(+) transfiziert. Als Kontolle dienten Zellen, die mit der entsprechenden Menge des leeren Vektors pcDNA3.1(+) transfiziert wurden. Die Zellen wurden mit 0,36 µM ¹²⁵Iod-CCL2 inkubiert. Um die Spezifität der Bindung zu bestätigen, erfolgte die Inkubation in An- bzw. in Abwesenheit von nicht radioaktiv markiertem CCL2 (50nM). Die in der Abbildung gezeigten Werte entsprechen den Mittelwerten ± Standardabweichungen von Dreifachbestimmungen.

Die durchgeführten Radioliganden-Bindungsstudien an hCCR2b-Alanin-Substitutionsmutanten-exprimierenden COS-7-Zellen (Abb. 47) zeigten, dass die jeweiligen Zellen unterschiedliche Mengen an gebundenem ¹²⁵Iod-CCL2 aufwiesen. So entsprachen die Mengen an gebundenem ¹²⁵Iod-CCL2 an hCCR2b-WT-exprimierende Zellen, denen von hCCR2b-1Ab-exprimierenden Zellen. Die Menge an gebundenem ¹²⁵Iod-CCL2 war bei hCCR2b-2Aa-exprimierenden Zellen sogar noch größer. Im Gegensatz dazu wurde bei den hCCR2b-1Ac-, hCCR2b-2Ac- und hCCR2b-3A-exprimierenden Zellen eine deutliche Reduzierung des gebundenen ¹²⁵Iod-CCL2 auf *ca.* 45 %, 45 % und 23 % und bei hCCR2b-2Ab-exprimierenden Zellen kaum noch eine Bindung von ¹²⁵Iod-CCL2 (*ca.* 12 %) beobachtet. Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass die Substitution von Aminosäuren innerhalb des juxtamembranären Oktapeptids von hCCR2b zu einer Abnahme der Rezeptordichte auf der Zelloberfläche und/oder Änderung in der Affinität der Rezeptoren zu den Liganden führt. Dabei zeigte sich wieder, wie auch schon bei den funktionellen Untersuchungen der Rezeptormutanten (s. 4.6.2), dass die Substitution des Arginin³¹³ von besonderer Bedeutung für die Funktionalität des Rezeptors ist und im Zusammenspiel mit der Substitution der Aminosäure Glutamat³¹⁰ die stärkste Auswirkung auf die Oberflächenexpression von hCCR2b hat. Die Spezifität der Bindung von ¹²⁵Iod-CCL2 an wildtypischem hCCR2b und den hCCR2b-Mutanten wurde in Anwesenheit von nicht markiertem CCL2 ermittelt.

5 Diskussion

Im Jahr 1994 gelang es Charo et al., zwei Rezeptoren, CCR2a und CCR2b, in einer monozytären Zelllinie zu identifizieren, die das CC-Chemokin monocyte chemoattractant protein 1/MCP-1 (CCL2) binden. Die mRNAs dieser Rezeptoren gehen durch einen alternativen Spleißvorgang aus der hnRNA eines einzigen Gens hervor. Dies hat zur Folge, dass die von diesen mRNAs kodierten Rezeptorproteine zum größeren Teil in ihrer Aminosäuresequenz übereinstimmen und sich nur bezüglich der Länge und der Aminosäuresequenz ihrer intrazellulären, carboxylterminalen Abschnitte unterscheiden. CCR2 Rezeptoren werden von verschiedenen Zellen des Immunsystems, wie Monozyten/Makrophagen, aktivierten T-Lymphozyten und dendritischen Zellen (Van Coillie et al., 1999; Deshmane et al., 2009), aber auch von Endothelzellen und vaskulären glatten Muskelzellen exprimiert (Weber et al., 1999; Roque et al., 2002; Stamatovic et al., 2003; Gálvez et al., 2005; Hayes et al., 1998; Spinetti et al., 2004). Mit CCL8 (MCP-2) (Yamagami et al., 1997; Moore et al, 1997), CCL7 (MCP-3) (Combadiere et al., 1995) und CCL13 (MCP-4) (Berkhout et al., 1997) wurden im Laufe der Jahre drei weitere CC-Chemokine identifiziert, die an die CCR2-Rezeptoren binden. Im Gegensatz zu CCL2 aktivieren diese Chemokine neben CCR2 auch andere Chemokinrezeptoren. So binden CCL7, CCL8 und CCL13 neben CCR2 auch noch an CCR1 und CCR3; CCL8 interagiert darüber hinaus noch mit CCR5 (Deshmane et al., 2009). Die Bindung der MCPs an die Rezeptoren führt zur Regulation der Funktionen verschiedener Effektorproteine, wie Adenylylcyclasen, Phospholipase C-\beta-Isoenzymen, Phosphoinositid-3-Kinasen (PI3K) und Proteinkinase B und C (Myers et al., 1995; Kuang et al., 1996; Jimenez-Sainz et al., 2003; Pacheco et al., 2007; O'Boyle et al., 2007; Stamatovic et al., 2006a). Infolge dieser intrazellulären Signalübertragung kommt es zu Änderungen in der cytoplasmatischen Ca²⁺-Konzentration und zu Änderungen der Organisation des Cytoskeletts. Letztere sind für die Regulation der gerichteten Migration durch CCL2/CCR2 von entscheidender Bedeutung (Baggiolini, 1998). Jedoch beeinflusst die Signalübertragung durch CCR2-Rezeptoren auch andere zelluläre Funktionen, wie die Proliferation (Viedt et al., 2002a) und die Genexpression der Zellen (Gavrilin et al., 2000). So wurde gezeigt, dass eine Behandlung von humanen vascular smooth muscle cells (VSMCs) mit CCL2 zu einer Aktivierung der Transkriptionsfaktoren nuclear factor- κB (NF- κB) und activator protein-1 (AP-1) führt (Viedt et al., 2002b). Für zahlreiche GPCRs ist bekannt, dass sie über Kopplung an Pertussistoxin-insensitive G-Proteine der G $\alpha_{12/13}$ - bzw. der G α_q -Familie in der Lage sind, RhoGTPasen zu aktivieren. RhoGTPasen regulieren zahlreiche zelluläre Funktionen, darunter die Organisation des Cytoskeletts und die Gentranskription (Whitehead *et al.*, 2001). So wurde mit dem Transkriptionsfaktor *serum response factor* ein wichtiger *downstream* Effektor von RhoGTPasen identifiziert (Hill *et al.*, 1995).

Zahlreiche Untersuchungen an verschiedenen GPCRs haben gezeigt, dass die carboxylterminalen Abschnitte von GPCRs eine Rolle bei der G-Protein-Selektivität spielen (Namba et al., 1993; Lai et al., 2002). Obwohl sich hCCR2a und hCCR2b in ihren carboxylterminalen Abschnitten unterscheiden, wurde eine Interaktion beider Rezeptoren mit Pertussistoxin-sensitiven G-Proteinen der $G\alpha_{i/o}$ -Familie und Pertussistoxin-insensitiven Mitgliedern der Ga_q-Familie ermittelt (Arai & Charo, 1996) und es liegen nur wenige Hinweise auf Unterschiede in der Aktivierung intrazellulärer Signalwege durch die beiden Rezeptoren vor (Sanders et al., 2000). Die eigene Beobachtung, dass die transiente Expression von hCCR2-Rezeptoren in Anwesenheit von Gα_q-Proteinen in beiden Fällen in einer starken Stimulation der Phospholipase C-β-Isoenzym-vermittelten Inositphosphatproduktion resultiert, führte in der vorliegenden Arbeit zur Frage, (i) ob hCCR2a und hCCR2b SRF Liganden-spezifisch aktivieren und, wenn ja, (ii) ob Unterschiede in der Aktivierung des Transkriptionsfaktors durch die hCCR2 Rezeptoren zu beobachten sind, (iii) welche Rolle Pertussistoxin-insensitive G-Proteine in der Rezeptorvermittelten SRF-Aktivierung spielen und (iv) welche Bedeutung Rho-Guaninnukleotidaustauschfaktoren (RhoGEFs) und RhoGTPasen für die hCCR2-Rezeptorvermittelte SRF-Aktivierung haben.

Wie die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit gezeigt haben, führt die Aktivierung der beiden humanen CCR2-Varianten durch CCL2 zur Regulation der Aktivität des Transkriptionsfaktors *serum response factor* (SRF). So wurde sowohl nach Stimulation von hCCR2a-, als auch von hCCR2b-exprimierenden COS-7-Zellen mit CCL2 eine Zunahme der SRF-abhängigen Gentranskription um das *ca.* 4- bis 5-fache gegenüber Kontrollzellen beobachtet. Bei der Zugabe steigender Mengen an CCL2 (Konzentrations-Wirkungskurve) konnte gezeigt werden, dass CCL2 die hCCR2a- und hCCR2b-vermittelte SRF-abhängige Gentranskription konzentrationsabhängig induziert. Interessanterweise wurde in diesen Untersuchungen eine biphasische Liganden-stimulierte SRF-Aktivität in den hCCR2a- bzw. hCCR2b-exprimierenden Zellen beobachtet, die auf jeweils zwei

Rezeptorpopulationen, eine niedrigempfindliche und eine hochempfindliche Population schließen lässt. Während die niedrigempfindlichen hCCR2aund hCCR2b-Rezeptorpopulation ähnliche EC₅₀-Werte aufwiesen (EC₅₀: 177 nM), wurden für die hochempfindlichen hCCR2a- und hCCR2b-Rezeptorpopulation mit EC₅₀-Werten von 5,6 nM (hCCR2a) und von 0,58 nM (hCCR2b) Unterschiede zwischen den Rezeptoren ermittelt. Auch für die Neurokinin-Rezeptoren 1 und 2 wurden biphasische Rezeptorantworten beschrieben. Dabei vermittelt die hochaffine Rezeptoraktivität des Neurokinin-1-Rezeptors die Kopplung an $G\alpha_s$, die mit niedriger Affinität die Kopplung an $G\alpha_{q}$ (Holst *et al.*, 2001). Für den Neurokinin-2-Rezeptor scheint das Gegensätzliche der Fall zu sein. So wurden bei niedrigen Neurokinin A-Konzentrationen Änderungen in der intrazellulären Calciumkonzentration beobachtet, die wahrscheinlich auf die Kopplung des Rezeptors an $G\alpha_{a/11}$ zurückzuführen sind. Bei hohen Neurokinin A-Konzentrationen wurde dagegen eine durch Kopplung an $G\alpha_s$ -generierte cAMP-Antwort ermittelt (Palanche *et al.*, 2001). Demnach scheinen die Rezeptoren spezifische Konformationen einzunehmen, die Unterschiede in den Affinitäten zu den Liganden aufweisen und infolge deren es zu einer Kopplung an spezifische heterotrimere G-Proteine kommt. Ob die für CCR2-Rezeptoren gemachten Beobachtungen auf einen solchen Mechanismus der funktionellen Selektivität zurückzuführen sind, müssen weitere Untersuchungen zeigen.

Auch die zwei anderen untersuchten funktionellen Liganden der CCR2-Rezeptoren, CCL7 (MCP-3) und CCL8 (MCP-2), induzierten in hCCR2-exprimierenden Zellen die SRFabhängige Gentranskription. Jedoch lag die Aktivierung der SRF-Aktivität durch diese Liganden deutlich unter der von CCL2 (MCP-1). Die geringsten Änderungen in der SRF-Aktivität wurden in Anwesenheit von CCL8 ermittelt. Verschiedene Untersuchungen anderer Arbeitsgruppen haben Hinweise darauf geliefert, dass sich insbesondere CCL2 und CCL7 in den induzierten, zellulären Funktionen ähneln. So wurde gezeigt, dass sowohl CCL2 als auch CCL7 eine essentielle Funktion bei der Mobilisierung von Monozyten aus dem Knochenmark und somit bei der Regulation der Homöostase der Leukozyten zukommt (Tsou *et al.*, 2007). Die Ergebnisse einer weiteren Arbeit zeigten, dass CCL7 und CCL2 kooperativ ihren Teil zur CCR2-vermittelten Rekrutierung von Monozyten zum Ort einer mikrobiellen Infektion beitragen und damit beide Chemokine für eine optimale Immunantwort benötigt werden (Jia *et al.*, 2008). Im Gegensatz dazu mehren sich die Hinweise, dass CCL8 in der Aktivierung der CCR2-Rezeptoren und intrazellulärer Effektoren von den anderen MCPs abweicht. So wurde in CCR2b stabil exprimierenden HEK293-Zellen beobachtet, dass es bei Stimulation der Zellen mit CCL8 zu einer, im Vergleich mit den anderen Chemokinen, schnelleren *extracellular signal-regulated kinase* (ERK)-Aktivierung kommt (Wain *et al.*, 2002). Dagegen induzierten CCL2, CCL7 und CCL13 (MCP-4) im Vergleich zu CCL8 eine schnellere maximale Aktivierung der Proteinkinase B (Akt) (O'Boyle *et al.*, 2007). Interessanterweise führte die Inkubation von CCR2b stabil exprimierenden HEK293-Zellen mit Choleratoxin zu einer reduzierten chemotaktischen Antwort auf die Stimulation mit CCL8, wohingegen die durch die anderen MCPs vermittelte, gerichtete Migration durch dieses Toxin nicht beeinflusst wurde (O'Boyle *et al.*, 2007). In weitergehenden Untersuchungen muss geklärt werden, ob die in der vorliegenden Arbeit beobachteten Unterschiede in der durch MCPs induzierten, hCCR2-Rezeptor-vermittelten SRF-Aktivität auf die Aktivierung unterschiedlicher G-Proteine oder auf Unterschiede in der Effizienz der Chemokine zurückzuführen sind, diesen spezifischen Signalweg zu aktivieren.

Die Signalübertragung von Chemokinrezeptoren erfolgt vornehmlich durch die Kopplung der Rezeptoren an Pertussistoxin-sensitive G-Proteine der $G\alpha_{i/o}$ -Familie (Baggiolini, 2001; Thelen, 2001). Bereits die 1988 an humanen neutrophilen Granulozyten durchgeführten Analysen hatten gezeigt, dass die Inkubation der Zellen mit Bordetella pertussis-Toxin (PTX) zu einer Inhibition der von Interleukin 8 (IL8) induzierten funktionellen Antworten führt (Thelen *et al.*, 1988). Pertussistoxin ADP-ribosyliert die G α -Untereinheiten G α_i G α_o und Gat heterotrimerer G-Proteine an einem Cystein im carboxylterminalen Abschnitt und blockiert auf diese Weise die Interaktion des G-Proteins mit dem Rezeptor (Neves et al., 2002). Des Weiteren wurden in Untersuchungen zur Signaltransduktion von Chemokinrezeptoren in transfizierten HEK293-Zellen eine starke Agonisten-abhängige Inhibition der Adenylylcyclase und eine Mobilisierung des intrazellulären Calziums ermittelt. Diese Ergebnisse sprechen ebenfalls für eine Kopplung der Rezeptoren an $G\alpha_i$ (Myers et al., 1995). Zahlreiche in den darauffolgenden Jahren durchgeführte Untersuchungen weisen auf eine zentrale Rolle von Gai-Proteinen in der von Chemokinrezeptoren regulierten gerichteten Migration von Leukozyten hin (Thelen, 2001; Thelen & Stein, 2008; Sozzani et al., 1991; Arai et al., 1997b). Dennoch ist auch seit mehreren Jahren bekannt, dass Chemokinrezeptoren auch an Pertussistoxin-insensitive heterotrimere G-Proteine koppeln, darunter Mitglieder der $G\alpha_{q}$ - und der $G\alpha_{12/13}$ -Familie, und auf diese Weise verschiedene zelluläre Effektoren, wie RhoGTPasen, Phospholipase C-β und Transkriptionsfaktoren, aktivieren (Tan et al., 2006; Tian et al., 2008; Yang et al., 2001; Lee & Wong, 2009). Auch für die humanen CCR2-Rezeptoren wurde beobachtet, dass sie neben $G\alpha_i$ auch mit $G\alpha_q$, $G\alpha_{14}$ und $G\alpha_{16}$ interagieren können (Arai *et al.*, 1996; Kuang *et al.*, 1996).

Wie die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit gezeigt haben, führt die Expression von $G\alpha_{q}$ -, nicht jedoch von Gai2-Untereinheiten, zusammen mit den hCCR2-Rezeptoren zu einer synergistischen Steigerung der SRF-abhängigen Gentranskription. Erste Hinweise auf eine Beteiligung von Ga_q -Proteinen an der CCL2-induzierten hCCR2-Rezeptor-vermittelten SRF-abhängigen Gentranskription lieferten Ergebnisse, die an hCCR2a- und hCCR2bexprimierenden Zellen in Anwesenheit von exogenem RGS2 (regulator of G-protein signaling 2) ermittelt wurden. Proteine der RGS-Familie zeichnen sich dadurch aus, dass sie die intrinsische Rate, mit der G α -Untereinheiten GTP zu GDP hydrolysieren, stark erhöhen. Aufgrund dieser Fähigkeit werden sie auch als GTPase activating proteins (GAPs) bezeichnet (Kehrl & Sinnarajah, 2002). RGS2 scheint aufgrund von besonderen strukturellen Eigenschaften in seiner G-Protein-Bindungsstelle bevorzugt die Aktivität von $G\alpha_{\alpha}$ zu regulieren (Heximer *et al.*, 1999). Während RGS4 GAP-Aktivität für $G\alpha_{i}$ und $G\alpha_{\alpha}$ besitzt, zeigt RGS2 in vitro keine GAP-Aktivtität für Gai, aber eine 10-fach stärkere Inhibierung der $G\alpha_{q}$ -vermittelten Aktivierung von Phospholipase C- β als RGS4 (Heximer et al., 1999). In der vorliegenden Arbeit führte die Expression von RGS2 in hCCR2aexprimierenden COS-7-Zellen zu einer vollständigen Inhibierung und in hCCR2bexprimiernden Zellen zu einer 80 %igen Inhibierung der Rezeptor-vermittelten SRF-Somit liegt es nahe, dass die hCCR2-vermittelte SRF-abhängige Aktivität. Gentranskription vor allem auf einer Kopplung der Rezeptoren an Gaq beruht. Letztere Vermutung wird durch Ergebnisse bestätigt, die zeigen, dass die Koexpression des carboxylterminalen Abschnitts von PLC β_1 (PLC β_{1-CT}) ebenfalls zu einer Inhibierung der von hCCR2a- bzw. hCCR2b-induzierten SRF-Aktivität führt. Für den carboxylterminalen Abschnitt der Phospholipase C- β -Isoenzyme ist bekannt, dass er spezifisch mit G α_{q} interagiert. So führt die Deletion von ~ 400 Aminosäuren am carboxylterminalen Ende von PLCβ₁ zum Verlust der Interaktion mit Gα_q (Wu et al., 1993; Lee et al., 1993; Runnels & Scarlata, 1999). Wahrscheinlich fungiert PLC β_{1-CT} als eine Art *scavenger*-Protein, d.h. es bindet Gaq-Untereinheiten und verhindert auf diese Weise deren Interaktion mit nachgeschalteten Effektoren. Weitere Hinweise auf die Bedeutung von $G\alpha_q$ für die hCCR2-Rezeptor-vermittelte SRF-Aktivierung lieferten die Untersuchungen zur Auswirkung von hG α_{a} -spezifischer siRNA auf diesen Signalweg. Die Transfektion der hCCR2b- bzw. hCCR2b/G α_q -exprimierenden Zellen mit hG α_q -spezifischer siRNA hatte einen starken Rückgang der CCL2-stimulierten SRF-abhängigen Gentranskription (*ca.* 50 % bzw. 70 %) zur Folge.

Interessanterweise hatten die in der vorliegenden Arbeit durchgeführten Untersuchungen gezeigt, dass insbesondere $G\alpha_q$ und $G\alpha_{14}$, nicht jedoch $G\alpha_{16}$ und nur in geringem Umfang $G\alpha_{11}$ die hCCR2-Rezeptor-induzierte SRF-Aktivität synergistisch steigern und somit eine Spezifität der Interaktion von Mitgliedern der $G\alpha_q$ -Familie mit den hCCR2-Rezeptoren bezüglich der transkriptionellen Aktivierung durch SRF besteht. So führte sowohl die Koexpression steigender Mengen $G\alpha_q$ als auch $G\alpha_{14}$ zu einer deutlichen synergistischen Steigerung der hCCR2-Rezeptor-vermittelten SRF-Aktivität um das 4-fache. Im Gegensatz dazu wurde bei der Koexpression von $G\alpha_{11}$ nur eine geringe Zunahme der SRF-Aktivität um maximal das 1,5-fache und bei Koexpression von $G\alpha_{16}$ sogar eine Inhibierung der SRF-Aktivität beobachtet. Die beiden hCCR2-Varianten wiesen hinsichtlich ihrer Kopplung an die einzelnen Mitglieder der $G\alpha_q$ -Familie keine Unterschiede auf.

Untersuchungen anderer Arbeitsgruppen hatten gezeigt, dass auch bezüglich der Stimulation der Inositphosphatproduktion durch CCR2-Rezeptoren Unterschiede in der Kopplung an G-Proteine der Ga_q-Familie vorliegen. Die in diesen Untersuchungen erzielten Ergebnisse stimmen zum Teil mit denen der vorliegenden Arbeit überein; zum Teil stehen sie im Widerspruch dazu. So wurde von Arai & Charo berichtet, dass die CCR2-Rezeptorvarianten in transient transfizierten COS-7-Zellen keine Unterschiede bezüglich ihrer G-Protein-Spezifität aufweisen und die Rezeptoren PLC-β-Isoenzyme durch Kopplung an $G\alpha_i$, $G\alpha_a$ oder $G\alpha_{16}$ aktivieren können (Arai & Charo, 1996). Dagegen wurde in zwei weiteren Untersuchungen keine Aktivierung von PLC-β-Isoenzymen in CCR2-Rezeptor-exprimierenden COS-7-Zellen in Anwesenheit von $G\alpha_q$ beobachtet (Kuang et al., 1996; Tian et al., 2008). Die letzteren Autoren ermittelten in diesen Untersuchungen außerdem eine Kopplung von CCR2b, nicht jedoch von CCR2a an $G\alpha_{14}$ (Kuang et al., 1996; Tian et al., 2008). In der vorliegenden Arbeit wurde dagegen für beide hCCR2-Rezeptoren sowohl für die Rezeptor-stimulierte Inositphosphatproduktion, als auch für die SRF-Aktivität eine synergistische Steigerung in Anwesenheit von Gaa und $G\alpha_{14}$ beobachtet. Eine mögliche Erklärung für die widersprüchlichen Ergebnisse könnte in Unterschieden in den Transfektionseffizienzen und/oder in Unterschieden in der erzielten Stöchiometrie von exogen exprimierten Rezeptoren, G-Proteinen und Effektoren liegen.

Das Ergebnis der vorliegenden Arbeit, dass sich $G\alpha_q$ und $G\alpha_{11}$ bezüglich ihrer Wirkung auf die CCL2-induzierte, hCCR2-vermittelte SRF-abhängige Gentranskription unterscheiden, war überraschend, da die Aminosäuresequenzen von $G\alpha_a$ und $G\alpha_{11}$ zu 88 % übereinstimmen (Day et al., 2003) und in zahlreichen Untersuchungen bisher keine Unterschiede in der Funktion von $G\alpha_q$ und $G\alpha_{11}$ beobachtet wurden (Gaudreau *et al.*, 1998; Rashid et al., 2004). Vielmehr wird die Kopplung an $G\alpha_q$ und $G\alpha_{11}$ in zahlreichen Publikationen als synonym verstanden (Rashid et al., 2004). Zwar zeigte die Koexpression von $G\alpha_{11}$ mit den hCCR2-Rezeptoren zunächst bei niedrigen zur Transfektion eingesetzten cDNA-Mengen einen geringfügigen Anstieg der SRF-Aktivität (um das 1,5-fache), bei größeren cDNA-Mengen wurde jedoch ein Rückgang der hCCR2-induzierten SRF-Aktivität beobachtet. Somit wies die Dosis-Wirkungskurve einen glockenförmigen Verlauf auf. die Modulation der Aktivität der Auch für Adenylylcyclase durch Prostaglandinrezeptoren wurden z.B. in glatten Muskelzellen der mesenterialen Aorten von Kaninchen glockenförmige Dosis-Wirkungskurven ermittelt (Accomazzo et al., 2002). Die Autoren diskutieren, dass die Kopplung an unterschiedliche G-Proteine mit gegensätzlichen Auswirkungen auf die Effektoraktivierung eine Ursache für die gemachten Beobachtungen sein könnte (Accomazzo et al., 2002). Ob dies auch für die Interaktion der hCCR2-Rezeptoren mit G α_{11} zutrifft, ist Gegenstand weiterer Untersuchungen.

Die Koexpression von steigenden Mengen Ga_{16} hatte sowohl auf die hCCR2a-, als auch auf die hCCR2b-vermittelte SRF-abhängige Gentranskription einen starken inhibitorischen Einfluss, der bei der höchsten zur Transfektion eingesetzten DNA-Menge bei *ca.* 83 % bzw. 90 % lag. Obwohl Hinweise vorliegen, dass konstitutiv aktive Ga_{16} -Untereinheiten SRF aktivieren können (Mao, *et al.*, 1998, eigene Beobachtungen), wurde in der Arbeitsgruppe für das Ga_q -koppelnde Chemokinrezeptorhomolog pUS28 ebenfalls eine Inhibierung der Rezeptor-induzierten SRF-Aktivität bei Koexpression von Ga_{16} beobachtet (Moepps *et al.*, 2008). Wie auch in dieser Untersuchung vermutet, könnte eine Erklärung für die Inhibierung der hCCR2-Rezeptor-induzierten SRF-Aktivierung durch Ga_{16} in den unterschiedlichen Affinitäten der verschiedenen G-Proteine zu nachgeschalteten, endogen vorhandenen RhoGEFs zu finden sein. Möglicherweise ist die Affinität von aktiviertem Ga_{16} als partieller Agonist zu gering, um das endogen vorhandene, durch die hCCR2-Rezeptoren aktivierte Ga_q aus der Bindung an endogene RhoGEFs zu verdrängen. Erst kürzlich wurde mit p63RhoGEF ein Ga_q -spezifisches GEF beschrieben, das direkt mit Ga_q interagiert und das als Prototyp einer neuen Proteinfamilie von RhoGEFs gilt, zu der auch Trio und Duett zählen (Lutz *et al.* 2007; Rojas *et al.*, 2007). Interessanterweise zeigten Untersuchungen von Yeung & Wong, dass p63RhoGEF mit einer konstitutiv aktiven $G\alpha_{16}$ -Mutante interagiert und stabile Komplexe ausbildet, was zu einer Inhibition der von dieser $G\alpha_{16}$ -Mutante vermittelten Inositphosphatproduktion führt (Yeung & Wong, 2009).

Wie bereits erläutert, spielen Rho-Guaninnukleotidaustauschfaktoren (RhoGEFs) und RhoAGTPasen eine wichtige Rolle bei der Aktivierung von SRF durch Gα_q-gekoppelte Rezeptoren (Lutz et al., 2005). Darüber hinaus liegen Hinweise aus Untersuchungen anderer Gruppen vor, dass die Aktivierung von Phospholipase C-β-Isoenzymen zu einer Aktivierung von SRF beitragen kann (Katoh et al., 1998; Sagi et al., 2001; Hao et al., 2003). Wie die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit gezeigt haben, führte die Koexpression der C3 ADP-Ribosyltransferase von Clostridium botolinum – einem Enzym, das spezifisch RhoA, RhoB und RhoC, nicht jedoch Rac- und Cdc42-GTPasen inhibiert - zu einem vollständigen Verlust der hCCR2b- bzw. hCCR2b/Gaq-vermittelten SRF-Aktivierung. Die Aktivierung der RhoAGTPase(n) erfolgt dabei sehr wahrscheinlich über die Interaktion der aktivierten G-Proteine mit RhoGEFs, da die Koexpression von PLCβ₂ mit hCCR2b bzw. hCCR2b/Ga_q keiner Zunahme der hCCR2b-vermittelten zu SRF-abhängigen Gentranskription führte. Dagegen wurde bei Expression der Rezeptoren mit dem Ga_aspezifischen p63RhoGEF eine deutliche Steigerung der SRF-Aktivität beobachtet. Die Zunahme der SRF-Aktiviät in hCCR2/p63RhoGEF-exprimierenden Zellen wurde sowohl in Anwesenheit von exogenem $G\alpha_q$ als auch von exogenem $G\alpha_{14}$ synergistisch gesteigert. Diese Ergebnisse zeigen zum ersten Mal, dass p63RhoGEF neben $G\alpha_q$ und $G\alpha_{11}$ auch durch $G\alpha_{14}$ aktiviert werden kann. Jedoch bleibt zu klären, welches endogen vorhandene RhoGEF die hCCR2-induzierte SRF-Aktivität reguliert. Interessanterweise führte die Expression von p63RhoGEF zusammen mit hCCR2- bzw. hCCR2/Ga_a/a₁₄-Proteinen zu vollständigen einer nahezu Inhibition der Rezeptor/G-Protein-stimulierten Inositphosphatproduktion. Diese Ergebnisse implizieren, dass die Effektoren p63RhoGEF und Phospholipase C- β -Isoenzyme um die Bindung an aktiviertes G α_q bzw. G α_{14} konkurrieren. Einen weiteren Beleg dafür, dass $G\alpha_q$ bzw. $G\alpha_{14}$ an der von hCCR2a- und hCCR2b-stimulierten SRF-Aktivität beteiligt sind, lieferten die mit der Gaa-bindenden PH-Domäne des p63RhoGEFs durchgeführten Untersuchungen. Die PH-Domäne des p63RhoGEF besitzt keine katalytische Aktivität und kann somit RhoA nicht aktivieren (Lutz et al., 2005). Jedoch kann die PH-Domäne durch Bindung der aktivierten G-Proteine als *scavenger* fungieren. In der Tat führte die Koexpression der PH-Domäne sowohl zur Inhibition der von hCCR2-Rezeptoren bzw. der von hCCR2-Rezeptoren und exogenen $G\alpha_q/G\alpha_{14}$ -Proteinen vermittelten Inositphosphatproduktion als auch der SRF-abhängigen Gentranskription.

Aus zahlreichen früheren Untersuchungen anderer Arbeitsgruppen ist bekannt, dass die SRF-anhängige Gentranskription neben G-Proteinen der G α_q -Familie auch von Mitgliedern der G $\alpha_{12/13}$ -Familie vermittelt wird (Fromm *et al.*, 1997; Mao *et al.*, 1998). Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit haben jedoch gezeigt, dass die Koexpression der hCCR2-Rezeptoren mit G α_{12} oder G α_{13} in COS-7-Zellen zu keiner synergistischen Steigerung der SRF-Aktivität führt. Diese Ergebnisse lassen den Schluss zu, dass den Vertretern der G $\alpha_{12/13}$ -Familie keine Rolle bei der CCL2-induzierten, hCCR2-vermittelten SRF-Aktivierung in COS-7-Zellen zukommt.

Obwohl zahlreiche der in der vorliegenden Arbeit beschriebenen Ergebnisse darauf hindeuten, dass die hCCR2-stimulierte SRF-Aktivität auf die Kopplung der Rezeptoren an $G\alpha_{\alpha}$ zurückzuführen ist, implizieren die mit Pertussistoxin durchgeführten Experimente auch eine Beteiligung von Gai-Proteinen. So kommt es bei Vorbehandlung der Zellen mit Pertussistoxin zu einer ca. 70-85 %igen und einer ca. 60-90 %igen Inhibierung der SRF-Aktivität und der Inositphosphatproduktion. Für die Inositphosphatproduktion wird davon ausgegangen, dass die von $G\alpha_i$ -Proteinen freigesetzten $G\beta\gamma$ -Untereinheiten die Phospholipase C- β-Isoenzyme stimulieren (Clapham & Neer, 1997; Thelen et al., 2001). Die einfachste Erklärung, warum auch die hCCR2-induzierte SRF-Aktivität Pertussistoxin-Sensitivität aufweist, könnte in der Stimulation der RhoGTPasen durch Gai-Untereinheiten bzw. durch Gai-regulierte RhoGEFs liegen. Jedoch wurde bisher kein von Gai-Untereinheiten reguliertes RhoGEF beschrieben und Mao et al. berichteten, dass die Expression von konstitutiv aktiven $G\alpha_i$ -Untereinheiten in NIH3T3-Zellen im Gegensatz zur Expression von konstitutiv aktiven $G\alpha_{q}$ - bzw. $G\alpha_{12/13}$ -Proteinen zu keiner Aktivierung der SRF-Aktivität führen (Mao et al., 1998). Hinzu kommt, dass die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit zeigen, dass die Koexpression von $G\alpha_{i2}$ -Untereinheiten in einer Inhibierung und nicht in einer synergistischen Steigerung der hCCR2-stimulierten SRF-Aktivität resultiert. Eine weitere Erklärung für die gemachten Beobachtungen könnte die Beteiligung von Gβγ-Untereinheiten und die Aktivierung von Rho/Rac-spezifischen GEFs liefern. So ist bekannt, dass $G\beta_1\gamma_2$ -Untereinheiten das RhoA-Rac1-spezifische

p114RhoGEF aktivieren und auf diese Weise die SRF-Aktivität induzieren (Niu et al., 2003). Gegen die Beteiligung eines Rac-aktivierten Signalwegs an der hCCR2-induzierten SRF-Aktivität sprechen jedoch Ergebnisse der Arbeitsgruppe (Dissertation Pfreimer, in Vorbereitung), die zeigen, dass die Koexpression von Rac1b oder Rac2 zu einer Inhibition der hCCR2-stimulierten SRF-Aktivität führt. Außerdem kam es in Anwesenheit der C3 ADP-Ribosyltransferase von Clostridium botolinum zu einer vollständigen Inhibition der SRF-abhängigen Gentranskription. Somit bliebe die Möglichkeit, dass die hCCR2-Rezeptoren über Stimulation von G\u00dfy-spezifischen RhoGEFs RhoAGTPasen aktivieren. Unklar ist, ob die durch Stimulation der hCCR2-Rezeptoren aus den G-Proteinen freigesetzten G $\beta\gamma$ -Untereinheiten aus G α_i -Proteinen stammen. Für diese Annahme spricht die beobachtete Pertussistoxin-Sensitivität der hCCR2-Rezeptor-induzierten SRF-Aktivität; dagegen spricht, dass es bei Expression von exogenem $G\alpha_{i2}$ zu einer Inhibition dieser zellulären Antwort kommt. Letztere Beobachtung könnte darauf hinweisen, dass die Ga_{i2}-Untereinheiten als scavenger für Gby-Untereinheiten fungieren und diese der Interaktion mit $G\alpha_{a}$ -Untereinheiten entziehen. So kann der inhibitorische Einfluss von exogenem $G\alpha_{i2}$, wie gezeigt, durch steigende Mengen an exogenem $G\alpha_q$ aufgehoben werden. Auch die Inhibition der hCCR2-induzierten SRF-Aktivität durch Pertussistoxin könnte auf eine scavenger Funktion zurückzuführen sein. So ist bekannt, dass die ADP-Ribosylierung von $G\alpha_i$ -Untereinheiten durch Pertussistoxin in Anwesenheit von $G\beta\gamma$ -Untereinheiten deutlich gesteigert wird (Gierschik, 1992; Neer et al., 1984; Huff & Neer, 1986; Katada et al., 1986; Gierschik et al., 1987; Casey et al., 1989; Linder et al., 1990). Dabei scheinen die G\u00dfy-Untereinheiten die G\u00e4;-Untereinheiten zu stabilisieren und/oder als Katalysatoren der ADP-Ribosylierung zu fungieren, indem sie Änderungen in der Konformation der Gai-Untereinheit induzieren (Katada et al., 1986). Somit könnten ADPribosylierte $G\alpha_i$ -Untereinheiten mit $G\alpha_0$ -Proteinen um die Bindung von $G\beta\gamma$ -Untereinheiten konkurrieren. Für diese Annahme spricht, dass in Anwesenheit von Pertussistoxin die hCCR2b-stimulierte SRF-Aktivität durch steigende Mengen an exogenem Gα_a rekonstituiert werden kann (Daten nicht gezeigt). Zur Klärung der Frage, welche Rolle Gai-Proteine für die hCCR2-Rezeptor-stimulierte SRF-Aktivität spielen, werden weitere Untersuchungen nötig sein. Ein möglicher Ansatz wäre, die hCCR2regulierte SRF-Aktivität in Zellen zu untersuchen, die kein endogenes Ga_i exprimieren. Dazu könnten die endogen-exprimierten Gai-Proteine z.B. mit hGai-spezifischer siRNA ausgeschaltet werden.

Eine andere mögliche Erklärung für die Pertussistoxin-Sensitivität der hCCR2-stimulierten SRF-Aktivierung wäre, dass es durch einen crosstalk zwischen endogenen Gaigekoppelten Rezeptoren und Gα_a-gekoppelten hCCR2-Rezeptoren zu einer Steigerung der Effektorantwort kommt. So haben Untersuchungen anderer Arbeitsgruppen gezeigt, dass die Signalübertragung verschiedener Rezeptoren auf Effektoren konvergieren kann (Selbie & Hill, 1998). Die Inhibierung eines dieser Signalwege würde demnach eine verringerte zelluläre Antwort zur Folge haben. Gegen diese Annahme spricht, dass es bei Koexpression von Gai2-Untereinheiten zu einer Inhibierung der hCCR2-Rezeptorstimulierten SRF-Aktivität kommt. Jedoch liegen aus anderen Untersuchungen Hinweise vor, dass, obwohl Gα_i-Proteine einen spezifischen Signalweg nicht oder nur geringfügig aktivieren können, die Kopplung an diese G-Proteine notwendig ist, um eine maximale Antwort der von $G\alpha_{\alpha}$ -gekoppelten Rezeptoren regulierten Effektoren zu erzielen, wie Aktivierung von Phospholipase C-β-Isoenzymen und Proteinkinase C-Isoenzymen sowie Änderungen in der intrazellulären Ca²⁺-Konzentration und der Arachidonsäureproduktion (Megson et al., 1995; Felder et al., 1991; Selbie et al., 1995; Dickenson & Hill, 1997). Entsprechend führt die Inhibierung der Funktion der Gai-Proteine durch Pertussistoxin zu einer scheinbaren Inhibition der von Rezeptor/G α_{a} -Proteinen aktivierten Signalwege. Sollte letztere Erklärung für die gemachte Beobachtung der vorliegenden Arbeit herangezogen werden, dann müsste auch in diesem Fall die Koexpression von $G\alpha_{i2}$ in einer Verstärkung und nicht in einer Inhibierung der hCCR2-stimulierten SRF-Aktivität resultieren. Interessanterweise berichteten Shi et al. erst kürzlich, dass Gai zwar nötig ist, aber alleine nicht ausreicht um die Chemokin-induzierte Migration von spezifischen primären Leukozyten zu vermitteln. Die Autoren konnten zeigen, dass für die Chemokin-

induzierte Migration von primären neutrophilen Granulozyten und dendritische Zellen die Kopplung von Chemokinrezeptoren, darunter CCR2-Rezeptoren sowohl an $G\alpha_i$ - als auch an $G\alpha_q$ -Proteine eine entscheidende Rolle spielt (Shi *et al.*, 2007).

Obwohl die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit die Stimulation des Transkriptionsfaktors SRF durch die Kopplung der hCCR2-Rezeptoren an G-Proteine der $G\alpha_q$ -Familie aufzeigen und deutliche Hinweise auf eine Beteiligung von RhoGEFs und RhoAGTPasen an diesen Vorgängen vorliegen, ist unklar, welche Bedeutung der Aktivierung dieses Signalwegs im Rahmen physiologischer und/oder pathophysiologischer Bedingungen zukommt. Auch wenn die Aktivierung der RhoAGTPasen RhoA, RhoB und RhoC durch hCCR2-Rezeptoren im Rahmen der vorliegenden Arbeit nicht im Detail untersucht worden ist, zeigt die Sensitivität der hCCR2-stimulierten SRF-Aktivität gegenüber der Expression des ADP-ribosylierenden C3-Toxins doch deutlich, dass diese Rezeptoren RhoAGTPasen aktivieren können. Zahlreiche Untersuchungen haben belegt, dass die Aktivierung von RhoAGTPasen auch mit verändertem Zellwachstum korreliert (Vega & Ridley, 2008; Heasman & Ridley, 2008) und, dass vor allem Ga_a-gekoppelte Rezeptoren häufig in Tumoren überexprimiert werden. Zu den von aktivierten Gag-Proteinen kontrollierten zählen die Regulation der Gentranskription, physiologischen Funktionen der Zellproliferation und des Zellwachstums und der Hypertrophy (Rosethorne et al., 2008; Heasley, 2001; Adams & Brown, 2001; Offermanns, 2001). Darüber hinaus wird eine durch RhoA vermittelte hohe SRF-Aktivität mit der epithelial-mesenchymalen Transition von Tumorzellen in Verbindung gebracht (Psichari et al., 2002). Auch von CCL2 (MCP-1) und CCR2 ist bekannt, dass sie zur Tumorentwicklung beitragen können. So wurde beobachtet, dass einige Tumore vermehrt CCL2 produzieren (Nakashima et al., 1995; Valković et al., 1998; Amann et al., 1998) und MCP-1/CCR2 die Chemotaxis von humanen Endothelzellen ins Tumorgewebe induziert (Salcedo et al., 2000). Auf diese Weise scheinen MCP-1 (CCL2) und CCR2 zur Neovaskularisierung von Tumoren beizutragen (Salcedo et al., 2000; Nakashima et al., 1995). In der Tat wurde bei Inhibition der Produktion von MCP-1 (CCL2) durch neutralisierende Antikörper oder bei dem Einsatz einer dominant negativen MCP-1-Mutante eine erhöhte Überlebensrate und eine Wachstums von Lungenmetastasen, bzw. eine Inhibition Inhibition des der Tumorangiogenese und des Wachstums von maligenen Melanomen in Mäusen beobachtet (Salcedo et al., 2000; Koga et al., 2008). Für Letzteres scheint u.a. die Inhibition der MCP-1 (CCL2)-regulierten Produktion des vascular endothelial growth factor (VEGF) von Bedeutung zu sein (Koga et al., 2008).

Wie neuere Untersuchungen zeigen, spielt die von CCL2/CCR2 regulierte Aktivierung von RhoAGTPasen eine wichtige Rolle bei der Regulation der Durchlässigkeit der Bluthirnschranke (Stamatovic *et al.*, 2006). So wurde ermittelt, dass MCP-1 (CCL2) durch Stimulation von CCR2-Rezeptoren in Hirnendothelzellen über Aktivierung eines RhoAGTPase/PKCα-abhängigen Wegs zu Änderungen in der Organisation des Aktinzytoskeletts und der *tight junction* (TJ)-Proteine führt (Stamatovic *et al.*, 2003; Song & Pachter, 2004; Stamatovic *et al.*, 2005; Stamatovic *et al.*, 2006). Ein Vorgang, der letztendlich in einer erhöhten Durchlässigkeit der Bluthirnschranke mündet (Stamatovic *et al.*, 2006). Die Erhöhung der Permeabilität der Bluthirnschranke und die nachfolgende

Einwanderung von Leukozyten stehen im Zusammenhang mit einer Reihe von Erkrankungen des zentralen Nervensystems, wie multiple Sklerose, HIV-Enzephalomyelitis oder Alzheimer und ist als Folge eines Schlaganfalls von Bedeutung (Halliday et al., 2000; Becker, 2001; Langford & Masliah, 2001). Neuere Untersuchungen zeigen, dass CCR2-defiziente Mäuse nach Induktion einer fokalen, zentralen Ischämie eine reduzierte Infarktgröße, eine verringerte Durchlässigkeit der Bluthirnschranke und eine verringerte Ödembildung aufweisen (Dimitrijevic et al., 2007). Erst kürzlich berichteten Korhonen *et al.* (2009) unter Verwendung eines Mausmodells, in dem $G\alpha_{a/11}$ oder $G\alpha_{12/13}$ spezifisch ausgeschaltet werden können, dass die $G\alpha_{\alpha/11}$ -vermittelte Signalübertragung in endothelialen Zellen für das Öffnen der endothelialen Barriere und der Stimulation der NO-Produktion durch verschiedene inflammatorische Mediatoren wie platelet-activating factor von essentieller Bedeutung ist (Korhonen et al. 2009). Ob die in der vorliegenden Arbeit beobachtete hCCR2-vermittelte Aktivierung der RhoAGTPasen über Kopplung an Ga_q/Ga₁₄ zu den Veränderungen in der Durchlässigkeit der Bluthirnschranke und/oder endothelialen Barrieren beitragen, müssen weitergehende Untersuchungen zeigen.

Zahlreiche Untersuchungen weisen auf eine zentrale Rolle von MCP-1 (CCL2) und CCR2-Rezeptoren für kardiovaskulären Erkrankungen hin, darunter Atherosklerose (Peters & Charo, 2001; Libby, 2002), Myokarditis sowie Gefäßveränderungen, die in Folge von Gefäßverletzungen bei Ischämie mit anschließender Reperfusion auftreten (Niu & Kolattukudy, 2009). Dabei ist die Chemokin-induzierte Rekrutierung von Leukozyten aus den peripheren Geweben ein entscheidender Schritt für die Ausbildung der inflammatorischen Antworten, die bei diesen Krankheiten beobachtet werden (Charo & Taubmann, 2004; Frangogiannis, 2004; Galkina & Ley, 2007; Schober & Zernecke, 2007; Schober, 2008; Zernecke & Weber, 2010; Koenen & Weber, 2010). In murinen Hypercholesterämiemodellen führt die Abwesenheit sowohl von MCP-1 (CCL2) als auch von CCR2 zu einer deutlichen Reduktion der Makrophagendichte in atherosklerotischen Läsionen (Charo & Taubmann, 2004; Barlic & Murphy, 2007; Charo & Peters 2003). Auch in anderen Zellen des kardiovaskulären Systems, darunter glatte Muskelzellen und Endothelzellen, wurden CCR2-Rezeptoren nachgewiesen (Schecter et al., 2003; Lo et al., 2005). So wurde gezeigt, dass MCP-1/CCR2 die Migration, aber auch die Proliferation von Endothel- und glatten Muskelzellen beeinflusst (Salcedo et al., 2000; Keeley et al., 2008; Schober & Zernecke, 2007; Spinetti et al., 2004; Lo et al., 2005; Schepers et al., 2006). Als Regulator der Angiogenese und Arteriogenese stimuliert MCP-1 so das Aussprießen
Kapillargefäßen und die phänotypischen Veränderungen (remodeling) von von Kollateralgefäßen (Buschmann et al., 2003; Schober, 2008; Mehrad et al., 2007). Neben den genannten Funktionen sind MCP-1 (CCL2) und CCR2 auch an der Regulation der transkriptionellen Aktivität in Zellen des kardiovaskulären Systems beteiligt (Niu & Kolattukudy, 2009). So stimuliert MCP-1 (CCL2) in Kombination mit IL-6 (Interleukin-6) eine anhaltende signal transducer and activator of transcription-3 (STAT3)-Aktivierung in Kardiomyozyten (Morimoto et al., 2006), erhöht die Genexpression von hypoxia-inducible factor-1a (HIF-1a) in humanen Endothelzellen von Aorten (Hong et al., 2005) und induziert in peripheren Blutmonozyten und Kardiomyozyten den pro-apoptotischen Transkriptionsfaktor MCP-1-induced protein (MCPIP) (Zhou et al., 2006, Niu & Kolattukudy, 2009). Wie die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit zeigen, gehört auch der Transkriptionsfaktor serum response factor (SRF) zur Gruppe von Transkriptionsfaktoren, die durch CCL2 (MCP-1) reguliert werden. Das Bindemotiv für SRF, das serum response element (SRE) findet sich in der Promotorregion zahlreicher Gene, darunter die immediate early Gene c-fos, fosB, junB (Treisman, 1986, Lazo et al., 1992, Perez-Albuerne et al., 1993), neuronale Gene nur77 und nurr1 (Williams & Lau, 1993; Castillo et al., 1997) und muskelspezifische Gene, wie α -Aktin, α -myosin heavy chain (α -MHC), Troponin T und Tropomyosin (Muscat et al., 1988, Molkentin et al., 1996, Wang et al., 1994, Toutant et al., 1994). Indem SRF die Expression dieser Gene kontrolliert, reguliert dieser Transkriptionsfaktor sowohl Zellwachstum und Differenzierung als auch neuronale Übertragung sowie Muskelentwicklung und -funktion (Chai & Tarnawski, 2002). Auch für die Regulation der Differenzierung von vaskulären glatten Muskelzellen und Herzmyozyten (Parmacek, 2007) und für das im Rahmen von Gefäßverletzungen beobachteten remodeling ist SRF von Bedeutung (Xin et al., 2009). Bei Gefäßverletzungen kommt es z.B. in glatten Muskelzellen zur Aktivierung von Genen, in deren Promotorregionen sich CArG (CC A/T-reiche GG)-Boxen finden, und die für die Migration und Proliferation der Zellen und für die Bildung von extrazellulärer Matrix von Bedeutung sind (Owens et al., 2004; McDonald & Owens, 2007). Auf diese Weise scheint die Aktivität von SRF mit den tiefgreifenden Veränderungen während der Neointima-Bildung nach Gefäßverletzungen oder innerhalb von atherosklerotischen Plaques in Verbindung hCCR2a/hCCR2bstehen. Somit könnten und $G\alpha_{a/14}$ -vermittelte Veränderungen der SRF-abhängigen Gentranskription zur phänotypischen Veränderung von vaskulären glatten Muskelzellen beitragen und dadurch das Risiko für die Entwicklung von vaskulären Erkrankungen erhöhen.

Verschiedene Untersuchungen der letzten Jahre haben Hinweise darauf geliefert, dass an der durch GPCRs vermittelten Signalübertragung neben heterotrimeren G-Proteinen auch nicht G-Protein-Interaktionspartner beteiligt sind (Ritter & Hall, 2009; Bockaert et al., 2004a). So ist inzwischen bekannt, dass GPCRs nicht nur in der Lage sind, mit G-Proteinen, sondern auch mit GPCR-interacting proteins (GIPs) zu interagieren. Nach der Entdeckung von inactivation-no-afterpotential D (INAD) (Montell, 1997; Huber, 2001), Ste5 (Ptashne & Gann, 1998; Park et al., 2003) und Arrestinen (McDonald & Lefkowitz, 2001; Pierce et al., 2002) wurde eine Vielzahl weiterer GIPs beschrieben (Brady & Limbird, 2002; El Far & Betz, 2002; Kreienkamp, 2002; Bockaert et al., 2003; Fagni et al., 2004). Diese GIPs haben verschiedenste Funktionen. So spielen sie z.B. eine Rolle bei der subzellulären Lokalisation der GPCRs und bei der Ausbildung von großen funktionellen Komplexen, den sog. receptosomes, die aus den Rezeptoren und interagierenden Proteinen bestehen (Bockaert et al., 2004b; Gavarini et al., 2004; Shenoy & Lefkowitz, 2003). Außerdem kontrollieren GIPs das trafficking der GPCRs zur Zelloberfläche und beeinflussen deren Signalübertragung (Bockaert et al., 2004a). Wie die Ergebnisse verschiedener Arbeitsgruppen gezeigt haben, sind für die Interaktion zwischen GPCRs und GIPs die carboxylterminalen Abschnitte der GPCRs von entscheidender Bedeutung (Heydorn et al., 2004; He et al., 2006; Ward et al., 2009). So wurden bisher mehr als 50 GIPs identifiziert, die mit den carboxylterminalen Abschnitten von GPCRs interagieren (Bockaert et al., 2003). Auch für mehrere Chemokinrezeptoren konnten bereits Interaktionen mit Nicht-G-Protein-Interaktionspartnern nachgewiesen werden (Fan et al., 2004; Terashima et al., 2005; Rey et al., 2007; Favre et al., 2008). Mittels Ko-Immunopräzipitations- und Protein-Protein-Bindungsstudien konnte gezeigt werden, dass die schwere Kette des Nicht-Muskel-Myosins Typ IIA (MIIA) mit dem cytoplasmatischen Abschnitt von CXCR4 und β-Arrestin interagiert und auf diese Weise eine Rolle bei der Endocytose von CXCR4 spielt (Rey et al., 2007). Fan et al. konnten 2004 eine Ligandenabhängige Interaktion des Chemokinrezeptors CXCR2 mit Myosin Vb und Rab11-FIP2 (*Rab11-family interacting protein 1*) nachweisen. Durch die Interaktion mit dem Rezeptor regulieren die beiden Proteine Rab11-FIP2 und Myosin Vb das recycling von CXCR2 und die Rezeptor-vermittelte Chemotaxis (Fan et al., 2004). Für CCR2b wurde mittels Ko-Immunopräzipitations-Analysen eine Interaktion mit transportin 1 (TRN1) nachgewiesen, das eine Rolle bei der Internalisierung und der Translokation des Rezeptors zum Nukleus spielt (Favre et al., 2008). Die in diesen drei Beispielen beschriebenen Interaktionspartner von Chemokinrezeptoren scheinen alle eine Rolle bei der Regulation der subzellulären Lokalisation, des *traffickings* und der Internalisierung von Rezeptoren zu spielen. Mit dem Protein FROUNT wurde ein weiterer CCR2b-Interaktionspartner beschrieben (Terashima *et al.*, 2005). FROUNT bindet direkt an aktivierte CCR2b-Rezeptoren und stellt das Bindeglied zu einer nachfolgenden Signalkaskade dar, die über Phosphoinositid-3-Kinasen (PI3Ks) und Rac zur Ausbildung von Lamellipodien und somit zur gerichteten Migration der Zellen führt (Terashima *et al.*, 2005).

In vorausgegangenen Untersuchungen der Arbeitsgruppe war unter Verwendung des yeasttwo-hybrid-Systems das tumor protein D52 (TPD52) als Bindungspartner der beiden humanen CCR2-Rezeptorvarianten identifiziert worden. Die Interaktion zwischen den Rezeptoren und TPD52 war unter Verwendung von Glutathion-S-Transferase (GST)-Fusionsproteinen der carboxylterminalen Abschnitte von hCCR2a (Aminosäure 306-374) und hCCR2b (Aminosäure 306-360) und TPD52 enthaltenden Zelllysaten mittels Kopräzipitations-Analysen bestätigt worden. Dabei konnte ein den carboxylterminalen Abschnitten von hCCR2a und hCCR2b gemeinsames, acht Aminosäuren langes Sequenzmotiv (Oktapeptid) identifiziert werden, das für die Interaktion mit TPD52 von Bedeutung ist. Bei TPD52 handelt es sich um ein kleines Protein mit einem Molekulargewicht von 28 kDa, das aufgrund seiner starken Expression in Brustkarzinomzellen identifiziert wurde (Byrne et al., 1995). TPD52 war damit das erste Mitglied einer mittlerweile drei Mitglieder umfassenden Proteinfamilie (Boutros et al., 2004). Über die Funktion der Mitglieder der TPD52-Familie ist relativ wenig bekannt. Ergebnisse verschiedener Arbeitsgruppen deuten darauf hin, dass TPD52 eine Rolle bei der Ca²⁺/Calmodulin-vermittelten Signalübertragung und bei der Regulation der Zellproliferation und des Vesikeltransportes spielt (Parente et al., 1996; Proux et al., 1996; Thomas et al., 2002).

In vorausgegangenen Untersuchungen der Arbeitsgruppe konnte bereits gezeigt werden, dass die Koexpression von TPD52 in kultivierten Säugetierzellen hCCR2a- und hCCR2bvermittelte zelluläre Funktionen inhibiert. Diese Ergebnisse führten in der vorliegenden Arbeit zur Frage, (i) welchen Einfluss TPD52 auf die hCCR2/Ga_q/Ga₁₄-induzierte synergistische Aktivierung der SRF-abhängigen Gentranskription und der Inositphoshatproduktion hat und (ii) welche strukturellen Merkmale der Interaktion von hCCR2a- und hCCR2b-Rezeptoren mit TPD52 zu Grunde liegen bzw. wie die Beeinflussung der Rezeptor/G-Protein-Interaktion durch TPD52 erfolgt. Die Ergebnisse

der Koexpression von TPD52 mit den beiden hCCR2-Rezeptorvarianten bestätigten den bereits in vorangegangenen Untersuchungen beobachteten inhibitorischen Einfluss von TPD52 auf die Rezeptor-vermittelten zellulären Funktionen. So wurde die CCL2induzierte hCCR2a-vermittelte SRF-abhängige Gentranskription durch die Koexpression von TPD52 in COS-7-Zellen um ca. 90 % und die Inositphosphatproduktion um ca. 70 % Vergleich Rückgang der hCCR2b-vermittelten inhibiert. Im dazu war der Luziferaseaktivität und Inositphosphatproduktion in Anwesenheit von TPD52 geringer und lag nur bei ca. 80 % bzw. ca. 40 %. Die Koexpression von TPD52 mit hCCR2a/Gα_a/Gα₁₄ führte zu einer ca. 60 % igen Inhibierung der $G\alpha_0/G\alpha_{14}$ -vermittelten synergistischen Zunahme der SRF-abhängigen Gentranskription und einem ca. 40-50 %igen Rückgang der Inositphosphatproduktion. Dagegen wurde der von hCCR2b/G α_a /G α_{14} -vermittelte synergistische Anstieg der SRF-abhängigen Gentranskription in Anwesenheit von TPD52 nur um ca. 40 % und die Inositphosphatproduktion nur um ca. 5-20 % gehemmt. Diese Ergebnisse zeigen, dass die Anwesenheit von TPD52 sowohl die hCCR2-Rezeptorstimulierte als auch die hCCR2-Rezeptor/G-Protein-vermittelte SRF-abhängige Gentranskription und Inositphosphatproduktion inhibiert. Diese Untersuchungen deuten aber auch auf mögliche Unterschiede zwischen der Interaktion von TPD52 mit hCCR2a und hCCR2b hin. Eine mögliche Erklärung für die gemachten Beobachtungen könnte darin liegen, dass TPD52 durch eine Interaktion mit den carboxylterminalen Abschnitten der hCCR2-Rezeptoren die Kopplung von $G\alpha_q$ bzw. $G\alpha_{14}$ an die Rezeptoren unterbindet und, dass für die Interaktion sowohl Abschnitte von hCCR2a und hCCR2b benötigt werden, die den Rezeptoren gemeinsam sind, als auch Abschnitte, in denen sie sich unterscheiden. Eine Möglichkeit, diese Vermutung zu bestätigen, wäre carboxylterminal trunkierte hCCR2-Rezeptorvarianten einzusetzen, oder Varianten zu verwenden, in denen Bereiche des in der Aminosäuresequenz abweichenden, carboxylterminalen Abschnitts von hCCR2a und hCCR2b gegeneinander ausgetauscht werden.

Obwohl Proteinexpressionsanalysen von hCCR2b in HEK293-Zellen gezeigt hatten, dass es in Anwesenheit von TPD52 zu keinem Rückgang der Expression des Rezeptors kam, war in Bindungsstudien mit ¹²⁵Iod-markiertem MCP-1 (CCL2) eine Abnahme der MCP-1-Bindung an hCCR2b/TPD52-exprimierenden, gegenüber hCCR2b-exprimierenden Zellen beobachtet worden. So wurde in Anwesenheit von TPD52 ein Rückgang der Rezeptordichte auf der Zelloberfläche von *ca*. 35 % ermittelt. Diese Ergebnisse deuten auf einen Einfluss von TPD52 auf die Regulation der Oberflächenexpression der Rezeptoren hin. Da für viele der bisher bekannten nicht G-Protein-Interaktionspartner von Chemokinrezeptoren eine Rolle bei der Regulation des Rezeptor-traffickings und der Rezeptorinternalisierung beschrieben wurde (Bermak et al., 2002; Onoprishvili et al., 2003; McDonald & Lefkowitz; 2001), liegt die Vermutung nahe, dass TPD52 eine Rolle bei der Internalisierung der hCCR2-Rezeptoren spielen könnte. Diese Vermutung wird durch Untersuchungen anderer Arbeitsgruppen unterstützt, die zeigen konnten, dass TPD52 mit zwei Proteinen interagiert, die mit der Regulation der Endozytose in Verbindung gebracht werden: Annexin VI (Thomas et al., 2002; Tiacci et al., 2005) und MAL2 (Wilson et al., 2001). Außerdem wurde gezeigt, dass die Calmodulin-abhängige Kinase II (CaMKII) TPD52 Calcium-abhängig phosphoryliert (Thomas et al, 2001) und, dass es zu einer Kolokalisation der beiden Proteine in frühen Endosomen kommt (Thomas et al., 2004). Für CaMKII ist bekannt, dass sie für die Internalisierung von G-Proteingekoppelten PY2-Rezeptoren von Bedeutung ist (Tulapukar et al., 2006). Allerdings ist die bei Koexpression von TPD52 beobachtete Abnahme der Oberflächenexpression von hCCR2b mit 35 % zu gering, um als alleinige Erklärung für die 80 % ige Inhibierung der hCCR2b-vermittelten SRF-abhängigen Gentranskription zu dienen. Interessanterweise konnte mit FROUNT unter Verwendung des yeast-two-hybrid-Systems ein spezifisch mit dem carboxylterminalen Abschnitt von hCCR2b interagierendes Protein identifizieren. Für dieses Protein war gezeigt worden, dass es die Lamellipodienausbildung durch Aktivierung von RacGTPasen reguliert. Wie die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit zeigen, hatte die Koexpression von hCCR2b mit FROUNT im Gegensatz zur Koexpression mit TPD52 keinen inhibitorischen Einfluss auf die CCL2-induzierte, hCCR2b-vermittelte SRFabhängige Gentranskription und Inositphosphatproduktion. Diese Beobachtung weist darauf hin, dass es sich bei der TPD52-vermittelten Inhibition der hCCR2-induzierten Signalwege um eine spezifische Eigenschaft von TPD52 handelt. Hinzu kommt, dass TPD52 die zellulären Wirkungen von beiden Rezeptoren, hCCR2a und hCCR2b, reguliert. Für FROUNT wurde dagegen bisher nur eine Regulation von hCCR2b nachgewiesen. Eine Erklärung für die unterschiedlichen Wirkungen der beiden hCCR2b-Interaktionspartner könnte in Unterschieden in der Beeinflussung der Kopplung von G-Proteinen liegen. So scheint FROUNT nach Kopplung der Rezeptoren an Gai-Proteine die Aktivierung auf RacGTPasen zu übertragen, während TPD52 wahrscheinlich durch Bindung an das Oktapeptid im carboxylterminalen Abschnitt der hCCR2-Rezeptoren die Interaktion mit Ga_a-Proteinen unterbindet. Allerdings liegen bisher noch keine Informationen über den exakten Bindungsort von FROUNT innerhalb des carboxylterminalen Abschnitts von hCCR2b vor. Die Kenntnis des genauen Bindungsortes würde es ermöglichen, Struktur-Funktionsbeziehungen zwischen dem akzessorischen Protein und dem carboxylterminalen Abschnitt des Rezeptors vorzunehmen und diese mit den für TPD52 gewonnenen Erkenntnissen zu vergleichen. Erst kürzlich wurde von Belema-Bedada *et al.* beschrieben, dass es bei Expression einer dominant negativen Mutante von FROUNT nach Ligandenstimulation zur Ausbildung von Stressfasern anstelle von Lamellipodien kommt (Belema-Bedada *et al.*, 2008). Stessfasern werden bekannterweise nach Aktivierung von RhoAGTPasen ausgebildet (Paterson *et al.*, 1990; Pellegrin & Mellor, 2007). Dieses Ergebnis könnte darauf hinweisen, dass es durch das dominant negative FROUNT zu einer Inhibierung der Liganden-stimulierten hCCR2b/Ga_i-vermittelten Rac-Aktivierung kommt und auf diese Weise eine Rezeptor-Ga_q-vermittelte RhoA-Aktivierung verstärkt wird.

Interessanterweise haben vorangegangene Untersuchungen der Arbeitsgruppe gezeigt, dass die acht Aminosäuren Alanin³⁰⁶-Arginin³¹³, die sich direkt am Übergang von der siebten transmembranären Domäne zum intrazellulären, carboxylterminalen Abschnitt beider hCCR2-Rezeptorvarianten befinden, die Interaktion von TPD52 mit den hCCR2-Rezeptoren vermitteln. So konnten GST-Fusionsproteine der carboxylterminalen Abschnitte von hCCR2a bzw. hCCR2b, aus denen die letzten, den Rezeptorvarianten gemeinsamen, acht Aminosäuren entfernt worden waren, nicht mit TPD52 interagieren. Die Entschlüsselung der Kristallstruktur des Rinder-Rhodopsins im Jahr 2000 (Palczewski et al., 2000) hat nicht nur die sieben-transmembranäre Struktur der GPCRs bestätigt, sondern hat auch eindeutige Hinweise darauf geliefert, dass sich direkt am Übergang der siebten transmembranären Domäne des Rhodopsins zum carboxylterminalen intrazellulären Abschnitt eine achte, zytoplasmatische Helix befindet. Im Rhodopsin besteht dieser helikale Bereich, der als Helix 8 (H8) bezeichnet wird, aus zwölf Aminosäuren und erstreckt sich vom carboxylterminalen Ende der siebten transmembranären Domäne bis zu zwei benachbarten Cysteinen, die über Palmitoyl-Gruppen in der Zellmembran verankert sind. Unter allen GPCRs besitzen nur die Rezeptoren der Familie A (Rhodopsinfamilie) Palmitoylierungsstellen und der Vergleich der Aminosäuresequenz von ~180 GPCRs der Rhodopsinfamilie zeigte, dass viele dieser GPCRs eine H8-Domäne in ihren carboxylterminalen Bereichen aufweisen (Krishna et al., 2002; Gether, 2000; Okuno et al., 2005). Untersuchungen zahlreicher Arbeitsgruppen haben gezeigt, dass die Helix 8 eine wichtige Interaktionsstelle für G-Proteine und Nicht-G-Proteine darstellt. So interagiert z.B. das Protein dopamine receptor interacting protein

78 (DRiP 78) mit einem konservierten Sequenzmotiv (FxxxFxxxF) innerhalb der Helix 8 von Dopamin D1-Rezeptoren (Bermak et al., 2001). Durch diese Interaktion kontrolliert DRiP 78 den Export der Rezeptoren aus dem ER und das trafficking zur Plasmamembran (Bermak et al., 2001). Ein anderes Beispiel für einen GPCR-Interaktionspartner, der im Bereich der Helix 8 bindet, ist Periplakin. Bei Periplakin handelt es sich um ein Aktinbindendes Protein, das durch seine Interaktion mit den humanen u-Opioid-Rezeptoren zu einer Inhibition der Rezeptor-vermittelten G-Protein-Aktivierung führt (Feng et al., 2003). Verschiedene Untersuchungen haben gezeigt, dass der Helix 8 der GPCRs auch eine wichtige Rolle bei der Aktivierung von G-Proteinen zukommt. Dabei ist vor allem der aminoterminale Bereich der Helix 8 von Bedeutung. So wurde bereits in früheren Untersuchungen, ohne die Kenntnis der besonderen helikalen Konformation dieses Abschnittes gezeigt, dass die aminoterminalen Bereiche der carboxylterminalen Abschnitte des N-Formylpeptid-Rezeptors (Schreiber et al., 1994) und des Angiotensin II (Typ1)-Rezeptors (Shirai et al., 1995) für die Kopplung der Rezeptoren an heterotrimere G-Proteine entscheidend sind. Im Rhodopsin stellt dieser Abschnitt der achten Helix ebenfalls den Teil der Bindungsstelle für die Ga-Untereinheit von Gat dar und spielt eine Rolle bei der Regulation der Bindung der G\u00e3\u00e3-Untereinheiten (Ernst et al., 2000). Marin et al. zeigten, dass die Mutation von drei Aminosäuren im aminoterminalen Abschnitt der achten Helix des Rhodopsins die Fähigkeit des Rezeptors, mit $G\alpha_t$ zu interagieren, stark beeinträchtigt (Marin et al., 2000). Für Peptide, die der Sequenz der achten Helix von Rhodopsin entsprechen, wurde außerdem eine direkte Bindung an Transducin und an Gßy-Untereinheiten nachgewiesen (Ernst et al., 2000; Marin et al., 2000). Auch Peptide, die die Bereiche der Helix 8 des Angiotensin-II-Rezeptors oder des Cannabinoid-Rezeptors 1 (CB1) umfassen, interagieren mit G-Protein-Untereinheiten (Sano et al., 1997; Mukhopadhyay et al., 1999; Mukhopadhyay et al., 2000). Vergleiche der Aminosäuresequenzen verschiedener Rhodopsin-ähnlicher GPCRs (Swift et al., 2006) lassen den Schluss zu, dass das Oktapeptid von hCCR2a und hCCR2b, das sich direkt an das konservierte NPXXY-Motiv am carboxylterminalen Ende der siebten transmembranären Domäne anschließt, dem aminoterminalen Abschnitt der Helix 8 entspricht und, dass diesem Oktapeptid somit eine besondere Funktion bei der Bindung und Aktivierung von heterotrimeren G-Proteinen zukommt. Dies liefert auch eine Erklärung dafür, dass in der vorliegenden Arbeit, trotz deren unterschiedlicher Sequenz und Länge ihrer carboxylterminalen Abschnitte, keine Unterschiede in der G-Protein-Spezifität zwischen hCCR2a und hCCR2b beobachtet wurden. Allerdings zeigten

Untersuchungen mit der Mutante hCCR2b-2A (Aminosäure 1-313), die noch über das Oktapeptid verfügt, aber bei der der Rest des carboxylterminalen Abschnitts deletiert wurde, dass diese Mutante nicht mehr in der Lage war die SRF-abhängige Gentranskription und die Inositphosphatproduktion zu aktivieren. Außerdem wurde für die Mutante hCCR2b-2 Δ trotz des vorhandenen Oktapeptids weder bei Koexpression mit Ga_qnoch mit $G\alpha_{14}$ -Untereinheiten eine synergistische Steigerung der hCCR2b-induzierten SRF-Aktivität beobachtet. Diese Ergebnisse zeigen, dass das Oktapeptid allein nicht ausreicht, um eine normale Funktionalität von hCCR2b zu gewährleisten. Offensichtlich spielen die carboxylterminalen Abschnitte der hCCR2-Rezeptoren, die auf das Oktapeptid folgen, ebenfalls eine wichtige Rolle für die strukturelle Integrität der Rezeptoren und somit für die Übertragung der von hCCR2b generierten Signale ins Zellinnere. Mittels weiterer Rezeptormutanten mit intakten carboxylterminalen Abschnitten wurde der Frage nachgegangen, welche Rolle einzelne Aminosäuren des Oktapeptids für die von hCCR2/Ga_a-induzierten zellulären Funktionen spielen. Wie die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit gezeigt haben, führte der Austausch von acht, fünf, vier bzw. drei Aminosäuren des juxtamembranären Oktapeptids gegen Alanine zu Rezeptormutanten (hCCR2b-8A, hCCR2b-5A, hCCR2b-4A, hCCR2b-3A), die nicht mehr in der Lage waren, nach Stimulation mit CCL2 die SRF-abhängige Gentranskription und Inositphosphatproduktion gleich dem wiltypischen hCCR2b-Rezeptor zu induzieren. Für die Mutante hCCR2b-3A wurde außerdem gezeigt, dass bereits die Substitution der Aminosäuren Valin³⁰⁸, Glutamat³¹⁰ und Arginin³¹³ durch Alanine zu einer Entkopplung der Rezeptormutanten von $G\alpha_a$ und $G\alpha_{14}$ führte.

Ähnliche Ergebnisse wurden bei Untersuchungen am Protease-aktivierten Rezeptor 1 (PAR1) erzielt. Hier führte die Substitution von Aminosäuren im Bereich der Helix 8 durch Alanine zu einer starken Beeinträchtigung der Kopplung des Rezeptors an $G\alpha_q$ und es wurde ein Rückgang der Rezeptor-stimulierten Inositphosphatproduktion um 60 % beschrieben (Swift *et al.*, 2006). Verschiedene Untersuchungen an Rhodopsin deuteten darauf hin, dass auch hier Mutationen einzelner Aminosäuren im Bereich der Helix 8 Auswirkungen auf dessen Funktionalität und Interaktion mit heterotrimeren G-Proteinen haben (Marin *et al.*, 2000; Cai *et al.*, 1999). So zeigten Rhodopsinmutanten, bei denen die Aminosäuren Asn³¹⁰-Gln³¹² durch die entsprechende Sequenz des β_2 -Adrenozeptors ersetzt worden waren, eine starke Reduktion der $G\alpha_t$ -Aktivierung (Marin *et al.*, 2000). Dies wurde sogar bei Austausch einer einzelnen Aminosäure (Asn³¹⁰Cys) im aminoterminalen Bereich

der Helix 8 von Rhodopsin beobachtet (Cai et al., 1999). Ähnliche Ergebnisse liegen auch aus den Untersuchungen der vorliegenden Arbeit vor. So wurde mit weiteren Alanin-Substitutionsmutanten, bei denen eine bzw. zwei Aminosäuren gegen Alanine ausgetauscht worden waren - hCCR2b-1Aa (Val³⁰⁸Ala), -1Ab (Glu³¹⁰Ala), -1Ac (Arg³¹³Ala) und hCCR2b-2Aa (Val³⁰⁸Ala, Glu³¹⁰Ala), -2Ab (Glu³¹⁰Ala, Arg³¹³Ala), -2Ac (Val³⁰⁸Ala, Arg³¹³Ala)- gezeigt, dass es bereits bei Änderungen der Aminosäuren Glu³¹⁰/Arg³¹³ (hCCR2-2Ab: Glu³¹⁰Ala, Arg³¹³Ala) bzw. Arg³¹³ (hCCR2b-1Ac: Arg³¹³Ala) zu einem vollständigen Verlust der SRF-abhängige Gentranskription und Inositphosphatproduktion im Vergleich zum wildtypischen Rezeptor kam. Darüber hinaus wurde für die hCCR2b-1Ac-Arg³¹³Ala-Mutante bei Koexpression mit $G\alpha_q$ keine synergistische Aktivierung der untersuchten zellulären Funktionen mehr ermittelt. Die Beobachtung, dass der Austausch der genannten Aminosäuren Glu³¹⁰ und Arg³¹³ bzw. nur von Arg³¹³ gegen Alanin(e) auch bei hCCR2a zu einem fast vollständigen Verlust der hCCR2a-induzierten SRF-Aktivität führt, unterstreicht die Bedeutung des Oktapeptids für die hCCR2-Rezeptor-vermittelten zellulären Funktionen und weist auf eine untergeordnete Rolle des carboxylterminalen Abschnitts für diese Funktionen hin.

Untersuchungen verschiedener Arbeitsgruppen haben gezeigt, dass für die Konformation GPCRs das konservierte Sequenzmotiv NPXXY am Ende der siebten der transmembranären Domäne von Bedeutung ist (Prioleau et al., 2002). Für die Seitenketten der Aminosäuren dieses Motivs wird angenommen, dass sie Wasserstoffbrückenbindungen mit dem downstream im aminoterminalen Abschnitt der Helix 8 gelegenen konservierten Phenylalanins innerhalb des Phenylalanin-Lysin/Arginin-Motivs ausbilden (Swift et al., 2006). Außerdem scheinen bei einigen Rhodopsin-ähnlichen GPCRs Ionenbindungen zwischen dem aminoterminalen Bereich der achten Helix und dem ersten intrazellulären loop zu bestehen (Swift et al., 2006). In den hCCR2-Chemokinrezeptoren erstreckt sich der NPXXY-Sequenzabschnitt von Aminosäure Asn³⁰¹ bis Tyr³⁰⁵ und sechs Aminosäuren downstream findet sich ein Phenylalanin³¹²/Arginin³¹³-Motiv. Somit sind die in der vorliegenden Arbeit gemachten Beobachtungen zur veränderten Signalübertragung der hCCR2b-Arg³¹³Ala-Mutante sehr wahrscheinlich auf die Beeinflussung der Rezeptorkonformation durch die veränderte Aminosäure zurückzuführen. Dabei scheint insbesondere die positive Ladung des Arginins an Position 313 für die Aufrechterhaltung der Konformation der hCCR2-Rezeptoren von Bedeutung zu sein. Die an der Helix 8 des Cannabinoid-Rezeptors 1 (CB1) durchgeführten Untersuchungen stellen ebenfalls die

von positiv geladenen Aminosäuren in diesem Bereich Bedeutung für die Rezeptorkonformation heraus (Choi et al., 2005). So lieferten 2D-¹H-(nuclear magnetic resonance) NMR-Spektroskopiedaten Hinweise darauf, dass ein den Bereich der achten Helix des Cannabinoid-Rezeptors umfassendes Peptid in wässrigem Medium keine Sekundärstruktur ausbildet, aber bei Überführung in ein amphipatisches membranähnliches Medium eine klare helikale Struktur einnimmt. Dabei scheint die Helix 8 des CB1-Rezeptors sich selbst parallel zur Membranoberfläche auszurichten, indem positiv geladene Seitenketten mit anionischen Phospholipid-Kopfgruppen der Membran interagieren (Choi et al., 2005). Somit könnte der in der vorliegenden Arbeit durch den Austausch des positiv geladenen Arginins³¹³ in der achten Helix von hCCR2b beobachtete Funktionsverlust des Rezeptors darauf zurückzuführen sein, dass der Bereich der Helix 8 durch den Verlust der Interaktion mit der Plasmamembran keine korrekte helikale Konformation einnimmt. Darüber hinaus könnte durch fehlende Interaktionen mit dem carboxylterminalen Abschnitt der siebten transmembranären Helix auch die übergeordnete räumliche Anordnung der einzelnen hCCR2-Rezeptorabschnitte zueinander beeinträchtigt werden und auf diese Weise zu einem inkorrekt gefalteten Protein führen. Für eine Reihe von Rezeptoren wie Rhodopsin (Tai et al., 1999), Dopamin-D1- (Bermak et al., 2001), Vasopressin-V2- (Schülein et al., 1998), Melanocortin-4- (VanLeeuwen et al., 2003) und α_{2B} -Adrenergen-Rezeptor (Duvernay *et* al., 2004) wurde gezeigt, dass der carboxylterminale Abschnitt für die Freisetzung aus dem ER wichtig ist. Allerdings ist unklar, ob dieser Abschnitt der Rezeptoren das Exportsignal an sich darstellt, oder dieser Bereich eine Rolle bei der korrekten Faltung der Proteine spielt. Eine korrekte Faltung ist normalerweise nötig, um die "Qualitätskontrolle" im ER zu passieren. Eine kürzlich veröffentlichte Untersuchung zeigte, dass die Helix 8 des humanen Leukotrien-B₄-Rezeptors Typ 2 (hBLT2) für die korrekte Faltung des Rezeptors und somit für den Export aus dem ER benötigt wird. (Yasuda et al., 2009). So kam es bei Deletion der Helix 8 von hBLT2 zu einer Akkumulation der Rezeptoren im ER. Die Untersuchungen dieser Arbeitsgruppe legen die Vermutung nahe, dass die Alaninsubstitutionen in der Helix 8 der hCCR2-Rezeptoren deren Transporteigenschaften beeinflussen und zu einer Akkumulation der Rezeptoren im ER führen. Dies könnte auch eine Erklärung für die in der vorliegenden Arbeit gemachte Beobachtung sein, dass, obwohl in Western-blot-Analysen die hCCR2b-Alaninsubstitutionsmutanten im Vergleich zum wildtypischen Rezeptor keine verringerte Gesamtproteinexpression aufwiesen, die an hCCR2b-Alaninsubstitutionsmutantenexprimierenden Zellen gebundenen Mengen an Iod¹²⁵-makiertem CCL2 (MCP-1) aber um mehr als 50 % vermindert waren. Letzteres Ergebnis könnte für eine verringerte Oberflächenexpression sprechen. Der deutlichste Rückgang der Menge an gebundenem Iod¹²⁵-CCL2 wurde dabei für die Mutante hCCR2b-2Ab (Glu³¹⁰Ala, Arg³¹³Ala) beobachtet. Jedoch muss herausgestellt werden, dass in den am hBLT2-Rezeptor durchgeführten Untersuchungen ermittelt worden war, dass insbesondere hydrophobe Aminosäuren der Helix 8 des hBLT2-Rezeptors eine entscheidende Rolle bei dessen Export aus dem ER spielen (Yasuda et al., 2009), während die Untersuchungen in der vorliegenden Arbeit auf eine besondere Bedeutung des basischen Arginins³¹³ für die Oberflächenpräsenz hindeuten. Um die Rolle des Oktapeptids von hCCR2 für die Oberflächenexpression des Rezeptors und/oder für die mögliche Regulation der Internalisierung und des Transports der hCCR2-Rezeptoren klären zu können, wird es notwendig sein, weitergehende vergleichende Untersuchungen zwischen wiltypischen Rezeptoren und Rezeptormutanten bezüglich (i) Internalisierung, (ii) subzellulärer Lokalisation im endosomalen Kompartiment, (ii) Recycling und (iv) Synthese und Export aus dem ER vorzunehmen. In diesem Zusammenhang muss auch geklärt werden, welche Rolle TPD52 durch seine Bindung an das juxtamembranäre Oktapeptid der hCCR2-Rezeptoren für diese Vorgänge spielt und auf welche Weise TPD52 dadurch die hCCR2-Rezeptorfunktionen beeinflusst.

6 Zusammenfassung

Die humanen CC-Chemokinrezeptoren CCR2a und CCR2b, hCCR2a und hCCR2b, sind als zentrale Regulatoren der Funktionen von Leukozyten, Endothel- und glatten Gefäßmuskelzellen maßgeblich an der Entstehung kardiovaskulärer Erkrankungen beteiligt. hCCR2a und -b gehören zur großen Gruppe der G-Protein-gekoppelten Rezeptoren (*G protein-coupled receptors*, GPCRs) und nach Aktivierung durch ihre spezifischen Liganden interagieren die beiden Rezeptoren sowohl mit Pertussistoxinsensitiven Ga_{i/o}-Proteinen als auch mit Perussistoxin-insensitiven Mitgliedern der Ga_q-Familie, wie Ga_q und Ga₁₆.

Vorausgehende Untersuchungen unserer Arbeitsgruppe hatten darauf hingewiesen, dass die Expression von hCCR2b in transient transfizierten COS-7-Zellen eine Ligandenstimulierte, wahrscheinlich $G\alpha_q$ -vermittelte Aktivierung des Transkriptionsfaktors serum response factor (SRF) erlaubt. Ausgehend von dieser Beobachtung und mit dem Wissen, dass Gag-gekoppelte Rezeptoren SRF über die Aktivierung von RhoAGTPasen (RhoA, RhoB und/oder RhoC) regulieren, stellten sich im Rahmen der vorliegenden Arbeit die Fragen, (i) ob hCCR2a und -b SRF Liganden-spezifisch aktivieren und, wenn ja, (ii) ob Unterschiede in der Aktivierung durch die beiden Rezeptoren zu beobachten sind, (iii) welche Rolle Pertussistoxin-insensitive G-Proteine bei der hCCR2-vermittelten SRF-Aktivierung spielen und (iv) welche Bedeutung Rho-Guaninnukleotidaustauschfaktoren (Rho guanine nucleotide exchange factors, RhoGEFs) und RhoAGTPasen für die Aktivierung haben. Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit zeigen, dass es sowohl in hCCR2a- als auch in hCCR2b-exprimierenden Zellen bei Zugabe von CCL2 (CC chemokine ligand 2), CCL7 oder CCL8 zur Aktivierung der SRF-abhängigen Gentranskription kommt. Interessanterweise wurden bei Untersuchungen der CCL2-Konzentrations-Wirkungs-Beziehungen der Rezeptoren verschiedene hochempfindliche und niedrigempfindliche Rezeptorpopulationen festgestellt. Dieses Ergebnis könnte auf einer unterschiedlichen Kopplung der Populationen an die SRF-Aktivierung, möglicherweise unter Vermittlung unterschiedlicher G-Proteine und diesen Proteinen nachgeschalteter Signalwege, beruhen. Die Untersuchungen zur G-Protein-Spezifität der Aktivierung von SRF durch die hCCR2-Rezeptoren zeigten, dass die Koexpression der beiden hCCR2-Rezeptoren mit Pertussistoxin-insensitiven $G\alpha_q$ -Untereinheiten, nicht jedoch deren Koexpression mit Pertussistoxin-sensitiven $G\alpha_{i/o}$ -Untereinheiten, z.B. $G\alpha_{i2}$, zu einer synergistischen Steigerung der SRF-Aktivität führt. Weitere Belege für die Beteiligung von Mitgliedern der $G\alpha_q$ -Familie lieferten die hemmenden Effekte des $G\alpha_q$ -

spezifischen RGS2-Proteins (regulator of G protein signaling 2), des $G\alpha_{q}$ -bindenden carboxylterminalen Abschnitts der Phospholipase C- β_1 und die Suppression der G α_{q} -Expression durch Behandlung der Zellen mit spezifischer siRNA(small interfering RNA). Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit zeigten darüber hinaus, dass die hCCR2-induzierte SRF-Aktivierung durch die $G\alpha_q$ -Untereinheiten $G\alpha_q$ und $G\alpha_{14}$, aber nicht oder nur in geringem Umfang durch $G\alpha_{16}$ und $G\alpha_{11}$ erfolgt. Die Kopplung der Rezeptoren an Mitglieder der $G\alpha_{12/13}$ -Familie spielt in diesem Zusammenhang keine Rolle. Die Beobachtung, dass die Vorbehandlung der Rezeptor-exprimierenden Zellen mit Pertussistoxin zu einer Inhibierung der hCCR2-induzierten SRF-Aktivität führte, lässt vermuten, dass auch Pertussistoxin-sensitive $G\alpha_{i/o}$ -Proteine an diesem Signalweg beteiligt sind. Da die Expression von $G\alpha_{i2}$ inhibitorisch wirkte, könnten insbesondere $G\beta\gamma$ -Dimere für die positive Kopplung der Rezeptoren an SRF von entscheidender Bedeutung sein. Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit haben des Weiteren ergeben, dass RhoAGTPasen die Aktivierung der SRF-abhängigen Gentranskription durch beide hCCR2-Rezeptoren vermitteln und, dass sehr wahrscheinlich sowohl $G\alpha_{q}$ - als auch $G\beta\gamma$ -regulierte RhoAGTPasen-spezifische GEFs wie p63RhoGEF und/oder p114RhoGEF an der Übertragung des von den Chemokinrezeptoren generierten Signals auf die RhoAGTPasen beteiligt sind.

In vorausgegangenen Untersuchungen der Arbeitsgruppe war mit dem tumor protein D52 (TPD52) ein Nicht-G-Protein-Interaktionspartner von hCCR2a- und hCCR2b identifiziert worden. In der vorliegenden Arbeit sollten die Fragen geklärt werden, (i) welchen Einfluss TPD52 auf hCCR2/Ga_q/Ga₁₄-regulierte zelluläre Funktionen hat und (ii) welche funktionelle Bedeutung der TPD52-Bindungsstelle der hCCR2-Rezeptoren im Bereich der Helix 8 zukommt. Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit zeigen, dass TPD52 die von hCCR2-Rezeptoren in Anwesenheit von exogenem $G\alpha_{\alpha}$ bzw. $G\alpha_{14}$ synergistisch gesteigerte SRF-Aktivität inhibiert. Die unter Einsatz von hCCR2-Deletionsmutanten und durchgeführten Analysen zur Alaninsubstitutionsmutanten Bedeutung einzelner Aminosäuren der TPD52-Bindungsstelle ergaben, dass dem Arginin³¹³ der Helix 8 eine zentrale Bedeutung bei der Kopplung an G-Proteine der Ga_q-Familie und bei der Regulation intrazellulärer Signalwege durch diese G-Proteine zukommt. Vergleichende Western blot-Analysen und Radioligandenbindungsstudien lassen vermuten, dass die TPD52-Bindungsstelle auch eine wichtige Rolle bei der Regulation der Oberflächenexpression, der Internalisierung und/oder des intrazellulären Transports der hCCR2-Rezeptorproteine spielt.

7 Literaturverzeichnis

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

2. Adams JW, Brown JH (2001) G-proteins in growth and apoptosis: lessons from the heart *Oncogene* **20**, 1626-34

3. Aittaleb M, Boguth CA, Tesmer JJ (2010) Structure and function of heterotrimeric G protein-regulated Rho guanine nucleotide exchange factors *Mol Pharmacol* 77, 111-25

4. Allaby RG, Woodwark M (2007) Phylogenomic Analysis Reveals Extensive Phylogenetic Mosaicism in the Human GPCR Superfamily *Evol Bioinform Online* **3**, 357–370

5. Allavena P, Bianchi G, Zhou D, van Damme J, Jílek P, Sozzani S, Mantovani A (1994) Induction of natural killer cell migration by monocyte chemotactic protein-1, -2 and -3 *Eur J Immunol* **24**, 3233-6

6. Allen SJ, Crown SE, Handel TM (2007) Chemokine: receptor structure, interactions, and antagonism *Annu Rev Immunol* 25,787-820

7. Amann B, Perabo FG, Wirger A, Hugenschmidt H, Schultze-Seemann W (1998) Urinary levels of monocyte chemo-attractant protein-1 correlate with tumour stage and grade in patients with bladder cancer *Br J Urol* **82**, 118-21

8. Amatruda TT 3rd, Steele DA, Slepak VZ, Simon MI (1991) $G\alpha_{16}$, a G protein α subunit specifically expressed in hematopoietic cells *Proc Natl Acad Sci U S A* **88**, 5587-91

9. Arai H, Charo IF (1996) Differential regulation of G-protein-mediated signaling by chemokine receptors *J Biol Chem* 271, 21814-9

10. Arai H, Monteclaro FS, Tsou CL, Franci C, Charo IF (1997a) Dissociation of chemotaxis from agonist-induced receptor internalization in a lymphocyte cell line transfected with CCR2B. Evidence that directed migration does not require rapid modulation of signaling at the receptor level *J Biol Chem* **272**, 25037-42

11. Arai H, Tsou CL, Charo IF (1997b) Chemotaxis in a lymphocyte cell line transfected with C-C chemokine receptor 2B: evidence that directed migration is mediated by betagamma dimers released by activation of Galphai-coupled receptors *Proc Natl Acad Sci USA* 94, 14495-9

12. Arndt PG, Suzuki N, Avdi NJ, Malcolm KC, Worthen GS (2004) Lipopolysaccharide-induced c-Jun NH2-terminal kinase activation in human neutrophils: role of phosphatidylinositol 3-Kinase and Syk-mediated pathways *J Biol Chem* 279, 10883-91 13. Arshavsky VY, Pugh EN Jr (1998) Lifetime regulation of G protein-effector complex: emerging importance of RGS proteins *Neuron* 20, 11-4

14. **Babiychuk EB, Palstra RJ, Schaller J, Kämpfer U, Draeger A** (1999) Annexin VI participates in the formation of a reversible, membrane-cytoskeleton complex in smooth muscle cells *J Biol Chem* **274**, 35191-5

15. Bacon K, Baggiolini M, Broxmeyer H, Horuk R, Lindley I, Mantovani A, Maysushima K, Murphy P, Nomiyama H, Oppenheim J, Rot A, Schall T, Tsang M, Thorpe R, Van Damme J, Wadhwa M, Yoshie O, Zlotnik A, Zoon K; IUIS/WHO Subcommittee on Chemokine Nomenclature (2002) Chemokine/chemokine receptor nomenclature *J Interferon Cytokine Res* 22,1067-8

16. **Baggiolini M, Dewald B, Moser B** (1994) Interleukin-8 and related chemotactic cytokines--CXC and CC chemokines *Adv Immunol* **55**, 97-179

17. Baggiolini M, Dewald B, Moser B (1997) Human chemokines: an update Annu Rev Immunol 15, 675-705

18. Baggiolini M (1998) Chemokines and leukocyte traffic Nature 392, 565-8

19. Baggiolini M (2001) Chemokines in pathology and medicine J Intern Med 250, 91-104

20. **Baker JG, Hill SJ** (2007) Multiple GPCR conformations and signalling pathways: implications for antagonist affinity estimates *Trends Pharmacol Sci* **28**, 374-81

21. Barlic J, Murphy PM (2007) Chemokine regulation of atherosclerosis *J Leukoc Biol* 82, 226-36

22. Becker KJ (2001) Targeting the central nervous system inflammatory response in ischemic stroke *Curr Opin Neurol* 14, 349-53

23. Barreiro O, Martín P, González-Amaro R, Sánchez-Madrid F (2010) Molecular cues guiding inflammatory responses *Cardiovasc Res*

24. Bazan JF, Bacon KB, Hardiman G, Wang W, Soo K, Rossi D, Greaves DR, Zlotnik A, Schall TJ (1997) A new class of membrane-bound chemokine with a CX3C motif *Nature* **385**, 640-4

25. Belema-Bedada F, Uchida S, Martire A, Kostin S, Braun T (2008) Efficient homing of multipotent adult mesenchymal stem cells depends on FROUNT-mediated clustering of CCR2 *Cell Stem Cell* **2**, 566-75

26. Berkhout TA, Sarau HM, Moores K, White JR, Elshourbagy N, Appelbaum E, Reape RJ, Brawner M, Makwana J, Foley JJ, Schmidt DB, Imburgia C, McNulty D, Matthews J, O'Donnell K, O'Shannessy D, Scott M, Groot PH, Macphee C (1997) Cloning, in vitro expression, and functional characterization of a novel human CC chemokine of the monocyte chemotactic protein (MCP) family (MCP-4) that binds and signals through the CC chemokine receptor 2B *J Biol Chem* 272, 16404-13

27. Bermak JC, Li M, Bullock C, Weingarten P, Zhou QY (2002) Interaction of γ -COP with a transport motif in the D1 receptor C-terminus *Eur J Cell Biol* **81**, 77-85

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

29. Bockaert J, Marin P, Dumuis A, Fagni L (2003) The 'magic tail' of G proteincoupled receptors: an anchorage for functional protein networks *FEBS Lett* **546**, 65-72

30. Bockaert J, Dumuis A, Fagni L, Marin P (2004b) GPCR-GIP networks: a first step in the discovery of new therapeutic drugs? *Curr Opin Drug Discov Devel* **7**, 649-57

31. Bockaert J, Roussignol G, Bécamel C, Gavarini S, Joubert L, Dumuis A, Fagni L, Marin P (2004a) GPCR-interacting proteins (GIPs): nature and functions *Biochem Soc Trans* 32, 851-5

32. Bhattacharyya R, Banerjee J, Khalili K, Wedegaertner PB (2009) Differences in $G\alpha_{12}$ - and $G\alpha_{13}$ -mediated plasma membrane recruitment of p115-RhoGEF *Cell Signal* **21**, 996-1006

33. Boguski MS, McCormick F (1993) Proteins regulating Ras and its relatives *Nature* 366, 643-54

34. Booden MA, Siderovski DP, Der CJ (2002) Leukemia-associated Rho guanine nucleotide exchange factor promotes $G\alpha_q$ -coupled activation of RhoA *Mol Cell Biol* 22, 4053-61

35. Boring L, Gosling J, Cleary M, Charo IF (1998) Decreased lesion formation in CCR2-/- mice reveals a role for chemokines in the initiation of atherosclerosis *Nature* **394**, 894-7

36. Boutros, R., Bailey, A.M., Wilson, S.H., and Byrne, J.A (2003) Alternative splicing as a mechanism for regulating 14-3-3 binding: interactions between hD53 (TPD52L1) and 14-3-3 proteins *J MolBio* **332**, 675-87

37. Boutros R, Fanayan S, Shehata M, Byrne JA (2004) The tumor protein D52 family: many pieces, many puzzles *Biochem Biophys Res Commun* **325**, 1115-21

38. **Boutros, R., and Byrne, J.A** (2005) D53 (TPD52L1) is a cell cycle-regulated protein maximally expressed at the G2-M transition in breast cancer cells *Exp Cell Res* **310**, 152-65

39. **Brady AE, Limbird LE** (2002) G protein-coupled receptor interacting proteins: emerging roles in localization and signal transduction *Cell Signal* **14**, 297-309

40. Brink CB, Harvey BH, Bodenstein J, Venter DP, Oliver DW (2004) Recent advances in drug action and therapeutics: relevance of novel concepts in G-protein-coupled receptor and signal transduction pharmacology *Br J Clin Pharmacol* **57**, 373-87

41. Brown JH, Del Re DP, Sussman MA (2006) The Rac and Rho hall of fame: a decade of hypertrophic signaling hits *Circ Res* **98**, 730-42

42. Bursill CA, Channon KM, Greaves DR (2004) The role of chemokines in atherosclerosis: recent evidence from experimental models and population genetics *Curr Opin Lipidol* **15**, 145-9

43. Buschmann I, Heil M, Jost M, Schaper W (2003) Influence of inflammatory cytokines on arteriogenesis *Microcirculation* **10**, 371-9

44. **Bustelo XR, Sauzeau V, Berenjeno IM** (2007) GTP-binding proteins of the Rho/Rac family: regulation, effectors and functions in vivo *Bioessays* **29**, 356-70

45. Byrne JA, Tomasetto C, Garnier JM, Rouyer N, Mattei MG, Bellocq JP, Rio MC, Basset P (1995) A screening method to identify genes commonly overexpressed in carcinomas and the identification of a novel complementary DNA sequence *Cancer Res* 55, 2896-903

46. Byrne JA, Mattei MG, Basset P (1996) Definition of the tumor protein D52 (TPD52) gene family through cloning of D52 homologues in human (hD53) and mouse (mD52) *Genomics* **35**, 523-32

47. Byrne JA, Mattei MG, Basset P, Gunning P (1998a) Identification and in situ hybridization mapping of a mouse Tpd5211 (D53) orthologue to chromosome 10A4-B2 *Cytogenet Cell Genet* **81**, 199-201

48. Byrne JA, Nourse CR, Basset P, Gunning P (1998b) Identification of homo- and heteromeric interactions between members of the breast carcinoma-associated D52 protein family using the yeast two-hybrid system *Oncogene* **16**, 873-81

49. Byrne JA, Balleine RL, Schoenberg Fejzo M, Mercieca J, Chiew YE, Livnat Y, St Heaps L, Peters GB, Byth K, Karlan BY, Slamon DJ, Harnett P, Defazio A (2005) Tumor protein D52 (TPD52) is overexpressed and a gene amplification target in ovarian cancer *Int J Cancer* **117**, 1049-54

50. Cabrera JL, de Freitas F, Satpaev DK, Slepak VZ (1998) Identification of the $G\beta_5$ -RGS7 protein complex in the retina *Biochem Biophys Res Commun* **249**, 898-902

51. Cai K, Klein-Seetharaman J, Farrens D, Zhang C, Altenbach C, Hubbell WL, Khorana HG (1999) Single-cysteine substitution mutants at amino acid positions 306-321 in rhodopsin, the sequence between the cytoplasmic end of helix VII and the palmitoylation sites: sulfhydryl reactivity and transducin activation reveal a tertiary structure *Biochemistry* **38**, 7925-30

52. Cao Q, Chen J, Zhu L, Liu Y, Zhou Z, Sha J, Wang S, Li J (2006) A testis-specific and testis developmentally regulated tumor protein D52 (TPD52)-like protein TPD52L3/hD55 interacts with TPD52 family proteins *Biochem Biophys Res Commun* **344**, 798-806

53. Carr MW, Roth SJ, Luther E, Rose SS, Springer TA (1994) Monocyte chemoattractant protein 1 acts as a T-lymphocyte chemoattractant *Proc Natl Acad Sci U S A* 91, 3652-6

54. Casey PJ, Graziano MP, Gilman AG (1989) G protein $\beta\gamma$ subunits from bovine brain and retina: equivalent catalytic support of ADP-ribosylation of α subunits by pertussis toxin but differential interactions with $G\alpha_s$ *Biochemistry* 28, 611-6

55. Castillo SO, Xiao Q, Lyu MS, Kozak CA, Nikodem VM (1997) Organization, sequence, chromosomal localization, and promoter identification of the mouse orphan nuclear receptor Nurr1 gene *Genomics* **41**, 250-7

56. Cen B, Selvaraj A, Burgess RC, Hitzler JK, Ma Z, Morris SW, Prywes R (2003) Megakaryoblastic leukemia 1, a potent transcriptional coactivator for serum response factor (SRF), is required for serum induction of SRF target genes *Mol Cell Biol* 23, 6597-608

57. Chai J, Tarnawski AS (2002) Serum response factor: discovery, biochemistry, biological roles and implications for tissue injury healing *J Physiol Pharmacol* 53, 147-57

58. Chamberlain LH, Burgoyne RD, Gould GW (2001) SNARE proteins are highly enriched in lipid rafts in PC12 cells: implications for the spatial control of exocytosis *Proc Natl Acad Sci U S A* **98**, 5619-24

59. Chardin P, Boquet P, Madaule P, Popoff MR, Rubin EJ, Gill DM (1989) The mammalian G protein RhoC is ADP-ribosylated by Clostridium botulinum exoenzyme C3 and affects actin microfilaments in Vero cells *EMBO J* **8**, 1087-92

60. Charo IF, Myers SJ, Herman A, Franci C, Connolly AJ, Coughlin SR (1994) Molecular cloning and functional expression of two monocyte chemoattractant protein 1 receptors reveals alternative splicing of the carboxyl-terminal tails *Proc Natl Acad Sci U S A* 91, 2752-6

61. **Charo IF** (1999) CCR2: from cloning to the creation of knockout mice *Chem Immunol* **72**, 30-41

62. Charo IF, Peters W (2003) Chemokine receptor 2 (CCR2) in atherosclerosis, infectious diseases, and regulation of T-cell polarization *Microcirculation* **10**, 259-64

63. Charo IF, Taubman MB (2004) Chemokines in the pathogenesis of vascular disease *Circ Res* **95**, 858-66

64. Charo IF, Ransohoff RM (2006) The many roles of chemokines and chemokine receptors in inflammation *N Engl J Med* **354**, 610-21

65. Chen CA, Manning DR (2001) Regulation of G proteins by covalent modification *Oncogene* 20, 1643-52

66. Chen SL, Maroulakou IG, Green JE, Romano-Spica V, Modi W, Lautenberger J, Bhat NK (1996) Isolation and characterization of a novel gene expressed in multiple cancers *Oncogene* **12**, 741-51

67. Chen SL, Zhang XK, Halverson DO, Byeon MK, Schweinfest CW, Ferris DK, Bhat NK (1997) Characterization of human N8 protein *Oncogene* 15, 2577-88

68. Chen Z, Singer WD, Danesh SM, Sternweis PC, Sprang SR (2008) Recognition of the activated states of Ga_{13} by the rgRGS domain of PDZRhoGEF *Structure* **16**, 1532-43

69. Cherezov V, Rosenbaum DM, Hanson MA, Rasmussen SG, Thian FS, Kobilka TS, Choi HJ, Kuhn P, Weis WI, Kobilka BK, Stevens RC (2007) High-resolution crystal structure of an engineered human β_2 -adrenergic G protein-coupled receptor *Science* **318**, 1258-65

70. Cho, S., Ko, H.M., Kim, J.M., Lee, J.A., Park, J.E., Jang, M.S., Park, S.G., Lee, D.H., Ryu, S.E., and Park, B.C (2004) Positive regulation of apoptosis signal-regulating kinase 1 by hD53L1 *J Biol Chem* 279, 16050-56

71. Choi G, Guo J, Makriyannis A (2005) The conformation of the cytoplasmic helix 8 of the CB1 cannabinoid receptor using NMR and circular dichroism *Biochim Biophys Acta* **1668**, 1-9

72. Claing A, Laporte SA, Caron MG, Lefkowitz RJ (2002) Endocytosis of G proteincoupled receptors: roles of G protein-coupled receptor kinases and β -arrestin proteins *Prog Neurobiol* **66**, 61-79

73. **Clapham DE, Neer EJ** (1997) G protein βγ subunits *Annu Rev Pharmacol Toxicol* **37**, 167-203

74. Combadiere C, Ahuja SK, Van Damme J, Tiffany HL, Gao JL, Murphy PM (1995) Monocyte chemoattractant protein-3 is a functional ligand for CC chemokine receptors 1 and 2B *J Biol Chem* **270**, 29671-5

75. Cushing SD, Berliner JA, Valente AJ, Territo MC, Navab M, Parhami F, Gerrity R, Schwartz CJ, Fogelman AM (1990) Minimally modified low density lipoprotein induces monocyte chemotactic protein 1 in human endothelial cells and smooth muscle cells *Proc Natl Acad Sci U S A* 87, 5134-8

76. Cybulsky MI, Won D, Haidari M (2004) Leukocyte recruitment to atherosclerotic lesions *Can J Cardiol* 20, 24-28

77 **Daly C, Rollins BJ** (2003) Monocyte chemoattractant protein-1 (CCL2) in inflammatory disease and adaptive immunity: therapeutic opportunities and controversies *Microcirculation* **10**, 247-57

78. Dawson TC, Kuziel WA, Osahar TA, Maeda N (1999) Absence of CC chemokine receptor-2 reduces atherosclerosis in apolipoprotein E-deficient mice *Atherosclerosis* 143, 205-11

79. Day PW, Carman CV, Sterne-Marr R, Benovic JL, Wedegaertner PB (2003) Differential interaction of GRK2 with members of the $G\alpha_q$ family *Biochemistry* 42, 9176-84

80. **De Lean A, Stadel JM, Lefkowitz RJ** (1980) A ternary complex model explains the agonist-specific binding properties of the adenylate cyclase-coupled β -adrenergic receptor *J Biol Chem* **255**, 7108-17

81. de Marco MC, Martín-Belmonte F, Kremer L, Albar JP, Correas I, Vaerman JP, Marazuela M, Byrne JA, Alonso MA (2002) MAL2, a novel raft protein of the MAL family, is an essential component of the machinery for transcytosis in hepatoma HepG2 cells *J Cell Biol* **159**, 37-44

82. **Deshmane SL, Kremlev S, Amini S, Sawaya BE** (2009) Monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1): an overview *J Interferon Cytokine Res* **29**, 313-26

83. Dhanasekaran SM, Barrette TR, Ghosh D, Shah R, Varambally S, Kurachi K, Pienta KJ, Rubin MA, Chinnaiyan AM (2001) Delineation of prognostic biomarkers in prostate cancer *Nature* **412**, 822-6

84. **Dickenson JM, Hill SJ** (1997) Transfected adenosine A1 receptor-mediated modulation of thrombin-stimulated phospholipase C and phospholipase A2 activity in CHO cells *Eur J Pharmacol* **321**, 77-86

85. Distler O, Pap T, Kowal-Bielecka O, Meyringer R, Guiducci S, Landthaler M, Schölmerich J, Michel BA, Gay RE, Matucci-Cerinic M, Gay S, Müller-Ladner U (2001) Overexpression of monocyte chemoattractant protein 1 in systemic sclerosis: role of platelet-derived growth factor and effects on monocyte chemotaxis and collagen synthesis *Arthritis Rheum* 44, 2665-78

86. Dimitrijevic OB, Stamatovic SM, Keep RF, Andjelkovic AV (2007) Absence of the chemokine receptor CCR2 protects against cerebral ischemia/reperfusion injury in mice *Stroke* **38**, 1345-53

87. Downes GB, Gautam N (1999) The G protein subunit gene families Genomics 62, 544-52

88. Dransart E, Olofsson B, Cherfils J (2005) RhoGDIs revisited: novel roles in Rho regulation *Traffic* 6, 957-66

89. Duvernay MT, Zhou F, Wu G (2004) A conserved motif for the transport of G protein-coupled receptors from the endoplasmic reticulum to the cell surface *J Biol Chem* **279**, 30741-50

90. El Far O, Betz H (2002) G-protein-coupled receptors for neurotransmitter amino acids: C-terminal tails, crowded signalosomes *Biochem J* 365, 329-36

91. Ernst OP, Meyer CK, Marin EP, Henklein P, Fu WY, Sakmar TP, Hofmann KP (2000) Mutation of the fourth cytoplasmic loop of rhodopsin affects binding of transducin and peptides derived from the carboxyl-terminal sequences of transducin α and γ subunits *J Biol Chem* **275**, 1937-43

92. Evanko DS, Thiyagarajan MM, Siderovski DP, Wedegaertner PB (2001) $G\beta\gamma$ isoforms selectively rescue plasma membrane localization and palmitoylation of mutant $G\alpha_s$ and $G\alpha_q J Biol Chem$ 276, 23945-53

93. Evanko DS, Thiyagarajan MM, Takida S, Wedegaertner PB (2005) Loss of association between activated $G\alpha_q$ and $G\beta\gamma$ disrupts receptor-dependent and receptor-independent signaling *Cell Signal* 17, 1218-28

94. Exton JH (1996) Regulation of phosphoinositide phospholipases by hormones, neurotransmitters, and other agonists linked to G proteins *Annu Rev Pharmacol Toxicol* **36**, 481-509

95. Fagni L, Ango F, Perroy J, Bockaert J (2004) Identification and functional roles of metabotropic glutamate receptor-interacting proteins *Semin Cell Dev Biol* **15**, 289-98

96. Fan GH, Lapierre LA, Goldenring JR, Sai J, Richmond A (2004) Rab11-family interacting protein 2 and myosin Vb are required for CXCR2 recycling and receptor-mediated chemotaxis *Mol Biol Cell* **15**, 2456-69

97. Favre N, Camps M, Arod C, Chabert C, Rommel C, Pasquali C (2008) Chemokine receptor CCR2 undergoes transportin1-dependent nuclear translocation *Proteomics* **8**, 4560-76

98. Felder CC, Williams HL, Axelrod J (1991) A transduction pathway associated with receptors coupled to the inhibitory guanine nucleotide binding protein G_i that amplifies ATP-mediated arachidonic acid release *Proc Natl Acad Sci U S A* **88**, 6477-80

99. Feng GJ, Kellett E, Scorer CA, Wilde J, White JH, Milligan G (2003) Selective interactions between helix VIII of the human μ -opioid receptors and the C terminus of periplakin disrupt G protein activation *J Biol Chem* **278**, 33400-7

100. Ferguson SS (2001) Evolving concepts in G protein-coupled receptor endocytosis: the role in receptor desensitization and signaling *Pharmacol Rev* 53, 1-24

101. Flower DR. (1999) Modelling G-protein-coupled receptors for drug design *Biochim Biophys Acta* 1422, 207-34

102. Ford CE, Skiba NP, Bae H, Daaka Y, Reuveny E, Shekter LR, Rosal R, Weng G, Yang CS, Iyengar R, Miller RJ, Jan LY, Lefkowitz RJ, Hamm HE (1998) Molecular basis for interactions of G protein $\beta\gamma$ subunits with effectors *Science* **280**, 1271-4

103. **Frangogiannis NG** (2004) Chemokines in the ischemic myocardium: from inflammation to fibrosis *Inflamm Res* **53**, 585-95

104. Fredriksson R, Lagerström MC, Lundin LG, Schiöth HB (2003) The G-proteincoupled receptors in the human genome form five main families. Phylogenetic analysis, paralogon groups, and fingerprints *Mol Pharmacol* **63**, 1256-72

105. Fritze O, Filipek S, Kuksa V, Palczewski K, Hofmann KP, Ernst OP (2003) Role of the conserved NPxxY(x)5,6F motif in the rhodopsin ground state and during activation *Proc Natl Acad Sci U S A* **100**, 2290-5

106. Fromm C, Coso OA, Montaner S, Xu N, Gutkind JS (1997) The small GTPbinding protein Rho links G protein-coupled receptors and Ga_{12} to the serum response element and to cellular transformation *Proc Natl Acad Sci U S A* **94**, 10098-103

107. Fukuhara S, Chikumi H, Gutkind JS (2001) RGS-containing RhoGEFs: the missing link between transforming G proteins and Rho? *Oncogene* **20**, 1661-8

108. Galkina E, Ley K (2007) Leukocyte influx in atherosclerosis Curr Drug Targets 8, 1239-48

109. Gálvez BG, Genís L, Matías-Román S, Oblander SA, Tryggvason K, Apte SS, Arroyo AG (2005) Membrane type 1-matrix metalloproteinase is regulated by chemokines monocyte-chemoattractant protein-1/ccl2 and interleukin-8/CXCL8 in endothelial cells during angiogenesis *J Biol Chem* 280, 1292-8

110. Garcia-Zepeda EA, Combadiere C, Rothenberg ME, Sarafi MN, Lavigne F, Hamid Q, Murphy PM, Luster AD (1996) Human monocyte chemoattractant protein (MCP)-4 is a novel CC chemokine with activities on monocytes, eosinophils, and basophils induced in allergic and nonallergic inflammation that signals through the CC chemokine receptors (CCR)-2 and -3 *J Immunol* 157, 5613-26

111. Garritsen A, Simonds WF (1994) Multiple domains of G protein β confer subunit specificity in $\beta\gamma$ interaction *J Biol Chem* **269**, 24418-23

112. Gaudreau R, Le Gouill C, Métaoui S, Lemire S, Stankovà J, Rola-Pleszczynski M (1998) Signalling through the leukotriene B4 receptor involves both α_i and α_{16} , but not α_q or α_{11} G-protein subunits *Biochem J* **335**, 15-8

113. Gavarini S, Bécamel C, Chanrion B, Bockaert J, Marin P (2004) Molecular and functional characterization of proteins interacting with the C-terminal domains of 5-HT2 receptors: emergence of 5-HT2 "receptosomes" *Biol Cell* **96**, 373-81

114. Gavrilin MA, Deucher MF, Boeckman F, Kolattukudy PE (2000) Monocyte chemotactic protein 1 upregulates IL-1beta expression in human monocytes *Biochem Biophys Res Commun* 277, 37-42

115. Gavrilin MA, Gulina IV, Kawano T, Dragan S, Chakravarti L, Kolattukudy PE (2005) Site-directed mutagenesis of CCR2 identified amino acid residues in transmembrane helices 1, 2, and 7 important for MCP-1 binding and biological functions *Biochem Biophys Res Commun* **327**, 533-40

116. Gerard C, Gerard NP (1994) C5A anaphylatoxin and its seven transmembranesegment receptor *Annu Rev Immunol* **12**, 775-808

117. Gether U, Kobilka BK (1998) G protein-coupled receptors. II. Mechanism of agonist activation *J Biol Chem* 273, 17979-82

118. Gether U (2000) Uncovering molecular mechanisms involved in activation of G protein-coupled receptors *Endocr Rev* **21**, 90-113

119. Ghanouni P, Gryczynski Z, Steenhuis JJ, Lee TW, Farrens DL, Lakowicz JR, Kobilka BK (2001) Functionally different agonists induce distinct conformations in the G protein coupling domain of the β 2 adrenergic receptor *J Biol Chem* 276, 24433-6

120. Gierschik P, Sidiropoulos D, Spiegel A, Jakobs KH (1987) Purification and immunochemical characterization of the major pertussis-toxin-sensitive guanine-nucleotide-binding protein of bovine-neutrophil membranes *Eur J Biochem* **165**, 185-94

121. **Gierschik P** (1992) ADP-ribosylation of signal-transducing guanine nucleotidebinding proteins by pertussis toxin *Curr Top Microbiol Immunol* **175**, 69-96

122. Godiska R, Chantry D, Raport CJ, Schweickart VL, Trong HL, Gray PW (1997) Monocyte chemotactic protein-4: tissue-specific expression and signaling through CC chemokine receptor-2 *J Leukoc Biol* **61**, 353-60

123. Gong X, Gong W, Kuhns DB, Ben-Baruch A, Howard OM, Wang JM (1997) Monocyte chemotactic protein-2 (MCP-2) uses CCR1 and CCR2B as its functional receptors *J Biol Chem* 272, 11682-5

124. Gonzalo JA, Lloyd CM, Wen D, Albar JP, Wells TN, Proudfoot A, Martinez-A C, Dorf M, Bjerke T, Coyle AJ, Gutierrez-Ramos JC (1998) The coordinated action of CC chemokines in the lung orchestrates allergic inflammation and airway hyperresponsiveness *J Exp Med* **188**, 157-67

125. Groblewski GE, Wishart MJ, Yoshida M, Williams JA (1996) Purification and identification of a 28-kDa calcium-regulated heat-stable protein. A novel secretagogue-regulated phosphoprotein in exocrine pancreas *J Biol Che.* **271**, 31502-7

126. Gupta SK, Lysko PG, Pillarisetti K, Ohlstein E, Stadel JM (1998) Chemokine receptors in human endothelial cells. Functional expression of CXCR4 and its transcriptional regulation by inflammatory cytokines *J Biol Chem* 273, 4282-7

127. Hadley TJ, Lu ZH, Wasniowska K, Martin AW, Peiper SC, Hesselgesser J, Horuk R (1994) Postcapillary venule endothelial cells in kidney express a multispecific chemokine receptor that is structurally and functionally identical to the erythroid isoform, which is the Duffy blood group antigen *J Clin Invest* 94, 985-91

128. **Hall DJ, Brownlee C, Stiles CD** (1989) Interleukin-1 is a potent regulator of JE and KC gene expression in quiescent BALB/c fibroblasts *J Cell Physiol* **141**, 154-9

129. Halliday G, Robinson SR, Shepherd C, Kril J (2000) Alzheimer's disease and inflammation: a review of cellular and therapeutic mechanisms *Clin Exp Pharmacol Physiol* 27, 1-8

130. Han KH, Tangirala RK, Green SR, Quehenberger O (1998) Chemokine receptor CCR2 expression and monocyte chemoattractant protein-1-mediated chemotaxis in human monocytes. A regulatory role for plasma LDL *Arterioscler Thromb Vasc Biol* **18**, 1983-91

131. Han KH, Green SR, Tangirala RK, Tanaka S, Quehenberger O (1999) Role of the first extracellular loop in the functional activation of CCR2. The first extracellular loop contains distinct domains necessary for both agonist binding and transmembrane signaling *J Biol Chem* **274**, 32055-62

132. Hao S, Kurosaki T, August A (2003) Differential regulation of NFAT and SRF by the B cell receptor via a PLC γ -Ca(2+)-dependent pathway *EMBO J* **22**, 4166-77

133. Hart MJ, Jiang X, Kozasa T, Roscoe W, Singer WD, Gilman AG, Sternweis PC, Bollag G (1998) Direct stimulation of the guanine nucleotide exchange activity of p115 RhoGEF by Gα₁₃ Science 280, 2112-4

134. Hayes IM, Jordan NJ, Towers S, Smith G, Paterson JR, Earnshaw JJ, Roach AG, Westwick J, Williams RJ (1998) Human vascular smooth muscle cells express receptors for CC chemokines *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 18, 397-403

135. He J, Chen Y, Farzan M, Choe H, Ohagen A, Gartner S, Busciglio J, Yang X, Hofmann W, Newman W, Mackay CR, Sodroski J, Gabuzda D (1997) CCR3 and CCR5 are co-receptors for HIV-1 infection of microglia *Nature* **385**, 645-9

136. He J, Bellini M, Inuzuka H, Xu J, Xiong Y, Yang X, Castleberry AM, Hall RA (2006) Proteomic analysis of β_1 -adrenergic receptor interactions with PDZ scaffold proteins *J Biol Chem* **281**, 2820-7

137. **Heasley LE** (2001) Autocrine and paracrine signaling through neuropeptide receptors in human cancer *Oncogene* **20**, 1563-9

138. Heasman SJ, Ridley AJ (2008) Mammalian Rho GTPases: new insights into their functions from in vivo studies *Nat Rev Mol Cell Biol* **9**, 690-701

139. Heximer SP, Srinivasa SP, Bernstein LS, Bernard JL, Linder ME, Hepler JR, Blumer KJ (1999) G protein selectivity is a determinant of RGS2 function *J Biol Chem* 274, 34253-9

140. Heydorn A, Søndergaard BP, Ersbøll B, Holst B, Nielsen FC, Haft CR, Whistler J, Schwartz TW (2004) A library of 7TM receptor C-terminal tails. Interactions with the proposed post-endocytic sorting proteins ERM-binding phosphoprotein 50 (EBP50), N-ethylmaleimide-sensitive factor (NSF), sorting nexin 1 (SNX1), and G protein-coupled receptor-associated sorting protein (GASP) *J Biol Chem* **279**, 54291-303

141. **Higgins JB, Casey PJ** (1996) The role of prenylation in G-protein assembly and function *Cell Signal* **8**, 433-7

142. Hill CS, Wynne J, Treisman R (1995) The Rho family GTPases RhoA, Rac1, and CDC42Hs regulate transcriptional activation by SRF *Cell* **81**, 1159-70

143. Holbourn KP, Shone CC, Acharya KR (2006) A family of killer toxins. Exploring the mechanism of ADP-ribosylating toxins *FEBS J* **273**, 4579-93

144. Holst B, Hastrup H, Raffetseder U, Martini L, Schwartz TW (2001) Two active molecular phenotypes of the tachykinin NK1 receptor revealed by G-protein fusions and mutagenesis *J Biol Chem* **276**, 19793-9

145. Hong KH, Ryu J, Han KH (2005) Monocyte chemoattractant protein-1-induced angiogenesis is mediated by vascular endothelial growth factor-A *Blood* **105**, 405-7

146. Horuk R, Martin AW, Wang Z, Schweitzer L, Gerassimides A, Guo H, Lu Z, Hesselgesser J, Perez HD, Kim J, Parker J, Hadley TJ, Peiper SC (1997) Expression of chemokine receptors by subsets of neurons in the central nervous system *J Immunol* 158, 2882-90

147. **Huber A** (2001) Scaffolding proteins organize multimolecular protein complexes for sensory signal transduction *Eur J Neurosci* **14**, 769-76

148. Huff RM, Neer EJ (1986) Subunit interactions of native and ADP-ribosylated α_{39} and α_{41} , two guanine nucleotide-binding proteins from bovine cerebral cortex *J Biol Chem* **261**, 1105-10

149. Jaakola VP, Griffith MT, Hanson MA, Cherezov V, Chien EY, Lane JR, Ijzerman AP, Stevens RC (2008) The 2.6 angstrom crystal structure of a human A2A adenosine receptor bound to an antagonist *Science* **322**, 1211-7

150. Jacoby E, Bouhelal R, Gerspacher M, Seuwen K (2006) The 7 TM G-proteincoupled receptor target family *ChemMedChem* 1, 761-82

151. Jaffe AB, Hall A (2005) Rho GTPases: biochemistry and biology *Annu Rev Cell Dev Biol* 21, 247-69

152. Jia T, Serbina NV, Brandl K, Zhong MX, Leiner IM, Charo IF, Pamer EG (2008) Additive roles for MCP-1 and MCP-3 in CCR2-mediated recruitment of inflammatory monocytes during Listeria monocytogenes infection *J Immunol* **180**, 6846-53

153. Jiménez-Sainz MC, Fast B, Mayor F Jr, Aragay AM (2003) Signaling pathways for monocyte chemoattractant protein 1-mediated extracellular signal-regulated kinase activation *Mol Pharmacol* **64**, 773-82

154. Jost MM, Ninci E, Meder B, Kempf C, Van Royen N, Hua J, Berger B, Hoefer I, Modolell M, Buschmann I (2003) Divergent effects of GM-CSF and TGF β_1 on bone marrow-derived macrophage arginase-1 activity, MCP-1 expression, and matrix metalloproteinase-12: a potential role during arteriogenesis *FASEB J* **17**, 2281-3

155. Kahn RA, Volpicelli-Daley L, Bowzard B, Shrivastava-Ranjan P, Li Y, Zhou C, Cunningham L (2005) Arf family GTPases: roles in membrane traffic and microtubule dynamics *Biochem Soc Trans* 33, 1269-72

156. Karlin A (1967) On the application of "a plausible model" of allosteric proteins to the receptor for acetylcholine *J Theor Biol* **16**, 306-20

157. Katada T, Oinuma M, Ui M (1986) Two guanine nucleotide-binding proteins in rat brain serving as the specific substrate of islet-activating protein, pertussis toxin. Interaction of the α -subunits with $\beta\gamma$ -subunits in development of their biological activities *J Biol Chem* **261**, 8182-91

158. Katoh H, Aoki J, Yamaguchi Y, Kitano Y, Ichikawa A, Negishi M (1998) Constitutively active $G\alpha_{12}$, $G\alpha_{13}$, and $G\alpha_q$ induce Rho-dependent neurite retraction through different signaling pathways *J Biol Chem* **273**, 28700-7

159. Katragadda M, Maciejewski MW, Yeagle PL (2004) Structural studies of the putative helix 8 in the human β_2 adrenergic receptor: an NMR study *Biochim Biophys Acta*. 27, 74-81

160. Keeley EC, Mehrad B, Strieter RM (2008) Chemokines as mediators of neovascularization *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 28, 1928-36

161. **Kehrl JH** (2006) Chemoattractant receptor signaling and the control of lymphocyte migration *Immunol Res* **34**, 211-27

162. Kehrl JH, Sinnarajah S (2002) RGS2: a multifunctional regulator of G-protein signaling *Int J Biochem Cell Biol* **34**, 432-8

163. Kelner GS, Kennedy J, Bacon KB, Kleyensteuber S, Largaespada DA, Jenkins NA, Copeland NG, Bazan JF, Moore KW, Schall TJ (1994) Lymphotactin: a cytokine that represents a new class of chemokine *Science* **266**, 1395-9

164. Kenakin T (2001) Inverse, protean, and ligand-selective agonism: matters of receptor conformation *FASEB J* **15**, 598-611

165. Kenakin T (2007) Functional selectivity through protean and biased agonism: who steers the ship? *Mol Pharmacol* 72, 1393-401

166. Klabunde T, Hessler G (2002) Drug design strategies for targeting G-proteincoupled receptors *Chembiochem* **3**, 928-44

167. Koenen RR, Weber C (2010) Therapeutic targeting of chemokine interactions in atherosclerosis *Nat Rev Drug Discov* **9**, 141-53

168. Koga M, Kai H, Egami K, Murohara T, Ikeda A, Yasuoka S, Egashira K, Matsuishi T, Kai M, Kataoka Y, Kuwano M, Imaizumi T (2008) Mutant MCP-1 therapy inhibits tumor angiogenesis and growth of malignant melanoma in mice *Biochem Biophys Res Commun* **365**, 279-84

169. Kolakowski LF Jr (1994) GCRDb: a G-protein-coupled receptor database *Receptors Channels* **2**, 1-7

170. Korhonen H, Fisslthaler B, Moers A, Wirth A, Habermehl D, Wieland T, Schütz G, Wettschureck N, Fleming I, Offermanns S (2009) Anaphylactic shock depends on endothelial $G_q/G_{11}J Exp Med$ 206, 411-20

171. Kovacs JJ, Hara MR, Davenport CL, Kim J, Lefkowitz RJ (2009) Arrestin development: emerging roles for β -arrestins in developmental signaling pathways *Dev Cell* **17**, 443-58

172. Kovoor A, Chen CK, He W, Wensel TG, Simon MI, Lester HA (2000) Coexpression of $G\beta_5$ enhances the function of two $G\gamma$ subunit-like domain-containing regulators of G protein signaling proteins *J Biol Chem* **275**, 3397-402

173. Kozasa T, Jiang X, Hart MJ, Sternweis PM, Singer WD, Gilman AG, Bollag G, Sternweis PC (1998) p115 RhoGEF, a GTPase activating protein for $G\alpha_{12}$ and $G\alpha_{13}$ Science 280, 2109-11

174. Kranenburg O, Poland M, van Horck FP, Drechsel D, Hall A, Moolenaar WH (1999) Activation of RhoA by lysophosphatidic acid and $G\alpha_{12/13}$ subunits in neuronal cells: induction of neurite retraction *Mol Biol Cell* **10**, 1851-7

175. **Kreienkamp HJ** (2002) Organisation of G-protein-coupled receptor signalling complexes by scaffolding proteins *Curr Opin Pharmacol* **2**, 581-6

176. Kreutz B, Hajicek N, Yau DM, Nakamura S, Kozasa T (2007) Distinct regions of $G\alpha_{13}$ participate in its regulatory interactions with RGS homology domain-containing RhoGEFs *Cell Signal* **19**, 1681-9

177. Krishna AG, Menon ST, Terry TJ, Sakmar TP (2002) Evidence that helix 8 of rhodopsin acts as a membrane-dependent conformational switch *Biochemistry* **41**, 8298-309

178. Kuang Y, Wu Y, Jiang H, Wu D (1996) Selective G protein coupling by C-C chemokine receptors *J Biol Chem* 271, 3975-8

179. Kuna P, Reddigari SR, Schall TJ, Rucinski D, Sadick M, Kaplan AP (1993) Characterization of the human basophil response to cytokines, growth factors, and histamine releasing factors of the intercrine/chemokine family *J Immunol* **150**, 1932-43

180. Laemmli UK (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4 *Nature* 227, 680-5

181. Lai FP, Mody SM, Yung LY, Kam JY, Pang CS, Pang SF, Wong YH (2002) Molecular determinants for the differential coupling of Ga_{16} to the melatonin MT1, MT2 and Xenopus Mel1c receptors *J Neurochem* **80**, 736-45

182. Langford D, Masliah E (2001) Crosstalk between components of the blood brain barrier and cells of the CNS in microglial activation in AIDS *Brain Pathol* 11, 306-12

183. Lazo PS, Dorfman K, Noguchi T, Mattéi MG, Bravo R (1992) Structure and mapping of the fosB gene. FosB downregulates the activity of the fosB promoter *Nucleic Acids Res* 20, 343-50

184. Lee MM, Wong YH (2009) CCR1-mediated activation of Nuclear Factor- κ B in THP-1 monocytic cells involves Pertussis Toxin-insensitive Ga₁₄ and Ga₁₆ signaling cascades *J Leukoc Biol* **86**, 1319-29

185. Lee SB, Shin SH, Hepler JR, Gilman AG, Rhee SG (1993) Activation of phospholipase C- β_2 mutants by G protein α_q and $\beta\gamma$ subunits *J Biol Chem* 268, 25952-7

186. Lee YW, Eum SY, Chen KC, Hennig B, Toborek M (2004) Gene expression profile in interleukin-4-stimulated human vascular endothelial cells *Mol Med* **10**, 19-27

187. Lefkowitz RJ, Cotecchia S, Samama P, Costa T (1993) Constitutive activity of receptors coupled to guanine nucleotide regulatory proteins *Trends Pharmacol Sci* 14, 303-7

188. Levay K, Cabrera JL, Satpaev DK, Slepak VZ (1999) $G\beta_5$ prevents the RGS7-G α_0 interaction through binding to a distinct $G\beta$ -like domain found in RGS7 and other RGS proteins *Proc Natl Acad Sci U S A* **96**, 2503-7

189. Li Y, Sternweis PM, Charnecki S, Smith TF, Gilman AG, Neer EJ, Kozasa T (1998) Sites for G α binding on the G protein β subunit overlap with sites for regulation of phospholipase C β and adenylyl cyclase *J Biol Chem* 273, 16265-72

190. Libby P (2002) Inflammation in atherosclerosis Nature 420, 868-74

191. Linder ME, Ewald DA, Miller RJ, Gilman AG (1990) Purification and characterization of $G\alpha_0$ and three types of $G\alpha_i$ after expression in Escherichia coli *J Biol Chem* 265, 8243-51

192. Liu W, Clark WA, Sharma P, Northup JK (1998) Mechanism of allosteric regulation of the rod cGMP phosphodiesterase activity by the helical domain of transducin α subunit *J Biol Chem* 273, 34284-92

193. Lo IC, Shih JM, Jiang MJ (2005) Reactive oxygen species and ERK 1/2 mediate monocyte chemotactic protein-1-stimulated smooth muscle cell migration *J Biomed Sci* 12, 377-88

194. Loetscher P, Seitz M, Clark-Lewis I, Baggiolini M, Moser B (1994) Monocyte chemotactic proteins MCP-1, MCP-2, and MCP-3 are major attractants for human CD4+ and CD8+ T lymphocytes *FASEB J* **8**, 1055-60

195. Loetscher P, Seitz M, Clark-Lewis I, Baggiolini M, Moser B (1996) Activation of NK cells by CC chemokines. Chemotaxis, Ca2+ mobilization, and enzyme release *J Immunol* 156, 322-7

196. Lukacs NW, Oliveira SH, Hogaboam CM (1999) Chemokines and asthma: redundancy of function or a coordinated effort *J Clin Invest* **104**, 995-9

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

198. Lutz S, Freichel-Blomquist A, Yang Y, Rümenapp U, Jakobs KH, Schmidt M, Wieland T (2005) The guanine nucleotide exchange factor p63RhoGEF, a specific link between $G_{q/11}$ -coupled receptor signaling and RhoA *J Biol Chem* **280**,11134-9

199. Lutz S, Shankaranarayanan A, Coco C, Ridilla M, Nance MR, Vettel C, Baltus D, Evelyn CR, Neubig RR, Wieland T, Tesmer JJ (2007) Structure of $G\alpha_q$ -p63RhoGEF-RhoA complex reveals a pathway for the activation of RhoA by GPCRs *Science* **318**, 1923-7

200. Makino ER, Handy JW, Li T, Arshavsky VY (1999) The GTPase activating factor for transducin in rod photoreceptors is the complex between RGS9 and type 5 G protein β subunit *Proc Natl Acad Sci U S A* **96**, 1947-52

201. Malek RL, Irby RB, Guo QM, Lee K, Wong S, He M, Tsai J, Frank B, Liu ET, Quackenbush J, Jove R, Yeatman TJ, Lee NH (2002) Identification of Src transformation fingerprint in human colon cancer *Oncogene* **21**, 7256-65

202. Mantovani A (1999) The chemokine system: redundancy for robust outputs *Immunol Today* **20**, 254-7

203. Mao J, Yuan H, Xie W, Simon MI, Wu D (1998) Specific involvement of G proteins in regulation of serum response factor-mediated gene transcription by different receptors *J Biol Chem* 273, 27118-23

204. Marchese A, Paing MM, Temple BR, Trejo J (2008) G protein-coupled receptor sorting to endosomes and lysosomes *Annu Rev Pharmacol Toxicol* **48**, 601-29

205. Marin EP, Krishna AG, Zvyaga TA, Isele J, Siebert F, Sakmar TP (2000) The amino terminus of the fourth cytoplasmic loop of rhodopsin modulates rhodopsin-transducin interaction *J Biol Chem* 275, 1930-6

206. Marinissen MJ, Gutkind JS (2001) G-protein-coupled receptors and signaling networks: emerging paradigms *Trends Pharmacol Sci* 22, 368-76

207. Markby DW, Onrust R, Bourne HR (1993) Separate GTP binding and GTPase activating domains of a G α subunit. *Science* 262, 1895-901

208. Matsushima K, Larsen CG, DuBois GC, Oppenheim JJ (1989) Purification and characterization of a novel monocyte chemotactic and activating factor produced by a human myelomonocytic cell line *J Exp Med* **169**, 1485-90

209. Maudsley S, Martin B, Luttrell LM (2005) The origins of diversity and specificity in G protein-coupled receptor signaling *J Pharmacol Exp Ther* **314**, 485-94

210. McCudden CR, Hains MD, Kimple RJ, Siderovski DP, Willard FS (2005) G-protein signaling: back to the future *Cell Mol Life Sci* **62**, 551-77

211. McDonald OG, Owens GK (2007) Programming smooth muscle plasticity with chromatin dynamics *Circ Res* 100, 1428-41

212. **McDonald PH, Lefkowitz RJ** (2001) β-Arrestins: new roles in regulating heptahelical receptors' functions *Cell Signal* **13**, 683-9

213. **McIntire WE** (2009) Structural determinants involved in the formation and activation of G protein $\beta\gamma$ dimers *Neurosignals* **17**, 82-99

214. **Megson AC, Dickenson JM, Townsend-Nicholson A, Hill SJ** (1995) Synergy between the inositol phosphate responses to transfected human adenosine A1-receptors and constitutive P2-purinoceptors in CHO-K1 cells *Br J Pharmacol* **115**, 1415-24

215. Mehrad B, Keane MP, Strieter RM (2007) Chemokines as mediators of angiogenesis *Thromb Haemost* 97, 755-62

216. Meir KS, Leitersdorf E (2004) Atherosclerosis in the apolipoprotein-E-deficient mouse: a decade of progress *Arterioscler Thromb Vasc Biol* **24**, 1006-14

217. Mellado M, Rodríguez-Frade JM, Aragay A, del Real G, Martín AM, Vila-Coro AJ, Serrano A, Mayor F Jr, Martínez-A C (1998) The chemokine monocyte chemotactic protein 1 triggers Janus kinase 2 activation and tyrosine phosphorylation of the CCR2B receptor *J Immunol* 161, 805-13

218. Michel MC, Alewijnse AE (2007) Ligand-directed signaling: 50 ways to find a lover *Mol Pharmacol* **72**, 1097-9

219. Milligan G, Kostenis E (2006) Heterotrimeric G-proteins: a short history. Br J Pharmacol 147, 46-55

220. Miralles F, Posern G, Zaromytidou AI, Treisman R (2003) Actin dynamics control SRF activity by regulation of its coactivator MAL *Cell* **113**, 329-42

221. Mizuno N, Itoh H (2009) Functions and regulatory mechanisms of G_q -signaling pathways *Neurosignals* 17, 42-54

222. Moepps B, Tulone C, Kern C, Minisini R, Michels G, Vatter P, Wieland T, Gierschik P (2008) Constitutive serum response factor activation by the viral chemokine receptor homologue pUS28 is differentially regulated by $G\alpha_{q/11}$ and $G\alpha_{16}$. *Cell Signal* 20,1528-37

223. Molkentin JD, Jobe SM, Markham BE (1996) α -myosin heavy chain gene regulation: delineation and characterization of the cardiac muscle-specific enhancer and muscle-specific promoter *J Mol Cell Cardiol* **28**, 1211-25

224. Molon B, Gri G, Bettella M, Gómez-Moutón C, Lanzavecchia A, Martínez-A C, Mañes S, Viola A (2005) T cell costimulation by chemokine receptors *Nat Immunol* 6, 465-71

225. Monteclaro FS, Charo IF (1997) The amino-terminal domain of CCR2 is both necessary and sufficient for high affinity binding of monocyte chemoattractant protein 1. Receptor activation by a pseudo-tethered ligand *J Biol Chem* **272**, 23186-90

226. Montell C (1997) New light on TRP and TRPL Mol Pharmacol 52, 755-63

227. Moore UM, Kaplow JM, Pleass RD, Castro SW, Naik K, Lynch CN, Daly S, Roach AG, Jaye M, Williams RJ (1997) Monocyte chemoattractant protein-2 is a potent agonist of CCR2B *J Leukoc Biol* **62**, 911-5

228. Morimoto H, Takahashi M, Izawa A, Ise H, Hongo M, Kolattukudy PE, Ikeda U (2006) Cardiac overexpression of monocyte chemoattractant protein-1 in transgenic mice prevents cardiac dysfunction and remodeling after myocardial infarction *Circ Res* **99**, 891-9

229. Mukhopadhyay S, Cowsik SM, Lynn AM, Welsh WJ, Howlett AC (1999) Regulation of G_i by the CB1 cannabinoid receptor C-terminal juxtamembrane region: structural requirements determined by peptide analysis *Biochemistry* **38**, 3447-55

230. **Mukhopadhyay S, McIntosh HH, Houston DB, Howlett AC** (2000) The CB(1) cannabinoid receptor juxtamembrane C-terminal peptide confers activation to specific G proteins in brain *Mol Pharmacol* **57**, 162-70

231. Muscat GE, Gustafson TA, Kedes L (1988) A common factor regulates skeletal and cardiac α -actin gene transcription in muscle *Mol Cell Biol* **8**, 4120-33

232. **Murphy PM** (1994) The molecular biology of leukocyte chemoattractant receptors *Annu Rev Immunol* **12**, 593-633

233. Murphy PM, Baggiolini M, Charo IF, Hébert CA, Horuk R, Matsushima K, Miller LH, Oppenheim JJ, Power CA (2000) International union of pharmacology. XXII. Nomenclature for chemokine receptors *Pharmacol Rev* **52**, 145-76

234. Myers SJ, Wong LM, Charo IF (1995) Signal transduction and ligand specificity of the human monocyte chemoattractant protein-1 receptor in transfected embryonic kidney cells *J Biol Chem* **270**, 5786-92

235. Nakamura F, Ogata K, Shiozaki K, Kameyama K, Ohara K, Haga T, Nukada T (1991) Identification of two novel GTP-binding protein α-subunits that lack apparent ADPribosylation sites for pertussis toxin *J Biol Chem* **266**, 12676-81

236. Nakamura F, Kato M, Kameyama K, Nukada T, Haga T, Kato H, Takenawa T, Kikkawa U (1995) Characterization of G_q family G proteins GL1 α (G α_{14}), GL2 α (G α_{11}), and G α_q expressed in the baculovirus-insect cell system *J Biol Chem* **270**, 6246-53

237. Nakashima E, Mukaida N, Kubota Y, Kuno K, Yasumoto K, Ichimura F, Nakanishi I, Miyasaka M, Matsushima K (1995) Human MCAF gene transfer enhances the metastatic capacity of a mouse cachectic adenocarcinoma cell line in vivo *Pharm Res* **12**, 1598-604

238. Namba T, Sugimoto Y, Negishi M, Irie A, Ushikubi F, Kakizuka A, Ito S, Ichikawa A, Narumiya S (1993) Alternative splicing of C-terminal tail of prostaglandin E receptor subtype EP3 determines G-protein specificity *Nature* **365**, 166-70

239. Narumiya S (1996) The small GTPase Rho: cellular functions and signal transduction *J Biochem* 120, 215-28

240. Natochin M, Gasimov KG, Moussaif M, Artemyev NO (2003) Rhodopsin determinants for transducin activation: a gain-of-function approach *J Biol Chem* 278, 37574-81

241. Navratilova Z (2006) Polymorphisms in CCL2&CCL5 chemokines/chemokine receptors genes and their association with diseases *Biomed Pap Med Fac Univ Palacky Olomouc Czech Repub* 150,191-204

242. Neer EJ, Lok JM, Wolf LG (1984) Purification and properties of the inhibitory guanine nucleotide regulatory unit of brain adenylate cyclase *J Biol Chem* **259**, 14222-9

243. **Nelson T, Brutlag D** (1979) Addition of homopolymers to the 3'-ends of duplex DNA with terminal transferase *Methods Enzymol* **68**,41-50

244. Neptune ER, Bourne HR (1997) Receptors induce chemotaxis by releasing the $\beta\gamma$ subunit of G_i, not by activating G_q or G_s *Proc Natl Acad Sci U S A* **94**, 14489-94

245. Neptune ER, Iiri T, Bourne HR (1999) $G\alpha_i$ is not required for chemotaxis mediated by G_i -coupled receptors *J Biol Chem* 274, 2824-8

246. Neves SR, Ram PT, Iyengar R (2002) G protein pathways Science 296, 1636-9

247. Niu J, Profirovic J, Pan H, Vaiskunaite R, Voyno-Yasenetskaya T (2003) G Protein $\beta\gamma$ subunits stimulate p114RhoGEF, a guanine nucleotide exchange factor for RhoA and Rac1: regulation of cell shape and reactive oxygen species production *Circ Res* **93**, 848-56

248. Niu J, Kolattukudy PE (2009) Role of MCP-1 in cardiovascular disease: molecular mechanisms and clinical implications *Clin Sci (Lond)* **117**, 95-109

249. Nourse CR, Mattei MG, Gunning P, Byrne JA (1998) Cloning of a third member of the D52 gene family indicates alternative coding sequence usage in D52-like transcripts *Biochim Biophys Acta* 1443, 155-68

250. **O'Boyle G, Brain JG, Kirby JA, Ali S** (2007) Chemokine-mediated inflammation: Identification of a possible regulatory role for CCR2 *Mol Immunol* **44**, 1944-53

251. Offermanns S (2001) G_q/G_{11} -mediated cellular signal pathway and its significance for cardiac diseases *Z Kardiol* 90, 601-6

252. Okuno T, Ago H, Terawaki K, Miyano M, Shimizu T, Yokomizo T (2003) Helix 8 of the leukotriene B_4 receptor is required for the conformational change to the low affinity state after G-protein activation *J Biol Chem* **278**, 41500-9

253. Okuno T, Yokomizo T, Hori T, Miyano M, Shimizu T (2005) Leukotriene B₄ receptor and the function of its helix 8 *J Biol Chem* **280**, 32049-52

254. Oldham WM, Hamm HE (2006) Structural basis of function in heterotrimeric G proteins *Q Rev Biophys* **39**, 117-66

255. Oldham WM, Hamm HE (2008) Heterotrimeric G protein activation by G-proteincoupled receptors *Nat Rev Mol Cell Biol* 9, 60-71

256. **Olofsson B** (1999) Rho guanine dissociation inhibitors: pivotal molecules in cellular signaling *Cell Signal* **11**, 545-54

257. Olson TS, Ley K (2002) Chemokines and chemokine receptors in leukocyte trafficking *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 283, R7-28

258. **Onoprishvili I, Andria ML, Kramer HK, Ancevska-Taneva N, Hiller JM, Simon EJ** (2003) Interaction between the μ opioid receptor and filamin A is involved in receptor regulation and trafficking *Mol Pharmacol* **64**, 1092-100

259. Owens GK, Kumar MS, Wamhoff BR (2004) Molecular regulation of vascular smooth muscle cell differentiation in development and disease *Physiol Rev* 84, 767-801

260. Pacheco P, Vieira-de-Abreu A, Gomes RN, Barbosa-Lima G, Wermelinger LB, Maya-Monteiro CM, Silva AR, Bozza MT, Castro-Faria-Neto HC, Bandeira-Melo C, Bozza PT (2007) Monocyte chemoattractant protein-1/CC chemokine ligand 2 controls microtubule-driven biogenesis and leukotriene B₄-synthesizing function of macrophage lipid bodies elicited by innate immune response *J Immunol* **179**, 8500-8 261. Palanche T, Ilien B, Zoffmann S, Reck MP, Bucher B, Edelstein SJ, Galzi JL (2001) The neurokinin A receptor activates calcium and cAMP responses through distinct conformational states *J Biol Chem* **276**, 34853-61

262. Palczewski K, Kumasaka T, Hori T, Behnke CA, Motoshima H, Fox BA, Le Trong I, Teller DC, Okada T, Stenkamp RE, Yamamoto M, Miyano M (2000) Crystal structure of rhodopsin: A G protein-coupled receptor *Science* **289**, 739-45

263. Parente JA, Goldenring JR, Petropoulos AC, Hellman U, Chew CS (1996) Purification, cloning, and expression of a novel, endogenous, calcium-sensitive, 28-kDa phosphoprotein *J Biol Chem* 271, 20096-101

264. **Park SH, Zarrinpar A, Lim WA** (2003) Rewiring MAP kinase pathways using alternative scaffold assembly mechanisms *Science* **299**, 1061-4

265. **Parmacek MS** (2007) Myocardin-related transcription factors: critical coactivators regulating cardiovascular development and adaptation *Circ Res* **100**, 633-44

266. Paterson HF, Self AJ, Garrett MD, Just I, Aktories K, Hall A (1990) Microinjection of recombinant p21rho induces rapid changes in cell morphology *J Cell Biol* 111, 1001-7

267. Pellegrin S, Mellor H (2007) Actin stress fibres J Cell Sci 120, 3491-9

268. Perez-Albuerne ED, Schatteman G, Sanders LK, Nathans D (1993) Transcriptional regulatory elements downstream of the JunB gene *Proc Natl Acad Sci U S A* **90**, 11960-4

269. Perona R, Montaner S, Saniger L, Sánchez-Pérez I, Bravo R, Lacal JC (1997) Activation of the nuclear factor-κB by Rho, CDC42, and Rac-1 proteins *Genes Dev* 11,463-75

270. Peters W, Charo IF (2001) Involvement of chemokine receptor 2 and its ligand, monocyte chemoattractant protein-1, in the development of atherosclerosis: lessons from knockout mice *Curr Opin Lipidol* **12**, 175-80

271. Pierce KL, Premont RT, Lefkowitz RJ (2002) Seven-transmembrane receptors *Nat Rev Mol Cell Biol* **3**, 639-50

272. **Premont RT, Gainetdinov RR** (2007) Physiological roles of G protein-coupled receptor kinases and arrestins *Annu Rev Physiol* **69**, 511-34

273. **Prioleau C, Visiers I, Ebersole BJ, Weinstein H, Sealfon SC** (2002) Conserved helix 7 tyrosine acts as a multistate conformational switch in the 5HT2C receptor. Identification of a novel "locked-on" phenotype and double revertant mutations *J Biol Chem* **277**, 36577-84

274. **Probst WC, Snyder LA, Schuster DI, Brosius J, Sealfon SC** (1992) Sequence alignment of the G-protein coupled receptor superfamily *DNA Cell Biol* **11**, 1-20

275. **Pronin AN, Gautam N** (1992) Interaction between G-protein β and γ subunit types is selective *Proc Natl Acad Sci U S A* **89**, 6220-4

276. Proux V, Provot S, Felder-Schmittbuhl MP, Laugier D, Calothy G, Marx M (1996) Characterization of a leucine zipper-containing protein identified by retroviral insertion in avian neuroretina cells *J Biol Chem* **271**, 30790-7

277. **Proux-Gillardeaux V, Galli T, Callebaut I, Mikhailik A, Calothy G, Marx M** (2003) D53 is a novel endosomal SNARE-binding protein that enhances interaction of syntaxin 1 with the synaptobrevin 2 complex in vitro *Biochem J* **370**, 213-21

278. **Psichari E, Balmain A, Plows D, Zoumpourlis V, Pintzas A** (2002) High activity of serum response factor in the mesenchymal transition of epithelial tumor cells is regulated by RhoA signalling *J Biol Chem* **277**, 29490-5

279. Ptashne M, Gann A (1998) Imposing specificity by localization: mechanism and evolvability *Curr Biol* 8, R897

280. Radhika V, Dhanasekaran N (2001) Transforming G proteins Oncogene 20, 1607-14

281. Rashid AJ, O'Dowd BF, George SR (2004) Minireview: Diversity and complexity of signaling through peptidergic G protein-coupled receptors *Endocrinology* 145, 2645-52

282. Remmers AE, Engel C, Liu M, Neubig RR. (1999) Interdomain interactions regulate GDP release from heterotrimeric G proteins. *Biochemistry*, **38**, 13795-800

283. Rey M, Valenzuela-Fernández A, Urzainqui A, Yáñez-Mó M, Pérez-Martínez M, Penela P, Mayor F Jr, Sánchez-Madrid F (2007) Myosin IIA is involved in the endocytosis of CXCR4 induced by SDF-1 α J Cell Sci 120, 1126-33

284. **Rhee SG** (2001) Regulation of phosphoinositide-specific phospholipase C *Annu Rev Biochem* **70**, 281-312

285. Ritter SL, Hall RA (2009) Fine-tuning of GPCR activity by receptor-interacting proteins *Nat Rev Mol Cell Biol* **10**, 819-30

286. Rojas RJ, Yohe ME, Gershburg S, Kawano T, Kozasa T, Sondek J (2007) $G\alpha_q$ directly activates p63RhoGEF and Trio via a conserved extension of the Dbl homology-associated pleckstrin homology domain *J Biol Chem* **282**,29201-10

287. Rollins BJ, Yoshimura T, Leonard EJ, Pober JS (1990) Cytokine-activated human endothelial cells synthesize and secrete a monocyte chemoattractant, MCP-1/JE *Am J Pathol* 136, 1229-33

288. Rollins BJ (1997) Chemokines Blood 90, 909-28

289. Roque M, Kim WJ, Gazdoin M, Malik A, Reis ED, Fallon JT, Badimon JJ, Charo IF, Taubman MB (2002) CCR2 deficiency decreases intimal hyperplasia after arterial injury *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 22, 554-9

290. Rosenbaum DM, Rasmussen SG, Kobilka BK (2009) The structure and function of G-protein-coupled receptors *Nature* **459**, 356-63

291. Rosethorne EM, Nahorski SR, Challiss RA (2008) Regulation of cyclic AMP response-element binding-protein (CREB) by $G_{q/11}$ -protein-coupled receptors in human SH-SY5Y neuroblastoma cells *Biochem Pharmacol* **75**, 942-55

292. Rossman KL, Worthylake DK, Snyder JT, Siderovski DP, Campbell SL, Sondek J (2002) A crystallographic view of interactions between Dbs and Cdc42: PH domainassisted guanine nucleotide exchange *EMBO J* **21**, 1315-26

293. Rossman KL, Sondek J (2005) Larger than Dbl: new structural insights into RhoA activation *Trends Biochem Sci* **30**, 163-5

294. Rovati GE, Capra V, Neubig RR (2007) The highly conserved DRY motif of class A G protein-coupled receptors: beyond the ground state *Mol Pharmacol* **71**, 959-64

295. Rubin MA, Varambally S, Beroukhim R, Tomlins SA, Rhodes DR, Paris PL, Hofer MD, Storz-Schweizer M, Kuefer R, Fletcher JA, Hsi BL, Byrne JA, Pienta KJ, Collins C, Sellers WR, Chinnaiyan AM (2004) Overexpression, amplification, and androgen regulation of TPD52 in prostate cancer *Cancer Res* 64, 3814-22

296. **Runnels LW, Scarlata SF** (1999) Determination of the affinities between heterotrimeric G protein subunits and their phospholipase C- β effectors *Biochemistry* **38**, 1488-96

297. Sagi SA, Seasholtz TM, Kobiashvili M, Wilson BA, Toksoz D, Brown JH (2001) Physical and functional interactions of $G\alpha_q$ with Rho and its exchange factors *J Biol Chem* **276**, 15445-52

298. Sah VP, Seasholtz TM, Sagi SA, Brown JH (2000) The role of Rho in G proteincoupled receptor signal transduction *Annu Rev Pharmacol Toxicol* **40**, 459-89

299. Salcedo R, Wasserman K, Young HA, Grimm MC, Howard OM, Anver MR, Kleinman HK, Murphy WJ, Oppenheim JJ (1999) Vascular endothelial growth factor and basic fibroblast growth factor induce expression of CXCR4 on human endothelial cells: In vivo neovascularization induced by stromal-derived factor-1α *Am J Pathol* 154, 1125-35

300. Salcedo R, Ponce ML, Young HA, Wasserman K, Ward JM, Kleinman HK, Oppenheim JJ, Murphy WJ (2000) Human endothelial cells express CCR2 and respond to MCP-1: direct role of MCP-1 in angiogenesis and tumor progression *Blood* **96**, 34-40

301. Sallusto F, Schaerli P, Loetscher P, Schaniel C, Lenig D, Mackay CR, Qin S, Lanzavecchia A (1998) Rapid and coordinated switch in chemokine receptor expression during dendritic cell maturation *Eur J Immunol* 28, 2760-9

302. Samama P, Pei G, Costa T, Cotecchia S, Lefkowitz RJ (1994) Negative antagonists promote an inactive conformation of the β_2 -adrenergic receptor *Mol Pharmacol* **45**, 390-4

303. Sanders SK, Crean SM, Boxer PA, Kellner D, LaRosa GJ, Hunt SW 3rd (2000) Functional differences between monocyte chemotactic protein-1 receptor A and monocyte chemotactic protein-1 receptor B expressed in a Jurkat T cell *J Immunol* 165, 4877-83

304. Sanger F, Nicklen S, Coulson AR (1977) DNA sequencing with chain-terminating inhibitors *Proc Natl Acad Sci US A* 74, 5463-7

305. Sano T, Ohyama K, Yamano Y, Nakagomi Y, Nakazawa S, Kikyo M, Shirai H, Blank JS, Exton JH, Inagami T (1997) A domain for G protein coupling in carboxyl-terminal tail of rat angiotensin II receptor type 1A *J Biol Chem* **272**, 23631-6

306. Scharenberg AM, Humphries LA, Rawlings DJ (2007) Calcium signalling and cell-fate choice in B cells *Nat Rev Immunol* **7**, 778-89

307. Scheele JS, Marks RE, Boss GR (2007) Signaling by small GTPases in the immune system *Immunol Rev* 218, 92-101

308. Schecter AD, Berman AB, Taubman MB (2003) Chemokine receptors in vascular smooth muscle *Microcirculation* **10**, 265-72

309. Schepers A, Eefting D, Bonta PI, Grimbergen JM, de Vries MR, van Weel V, de Vries CJ, Egashira K, van Bockel JH, Quax PH (2006) Anti-MCP-1 gene therapy inhibits vascular smooth muscle cells proliferation and attenuates vein graft thickening both in vitro and in vivo *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 26, 2063-9

310. Schmidt A, Hall A (2002) Guanine nucleotide exchange factors for Rho GTPases: turning on the switch *Genes Dev* 16, 1587-609

311. Schmidt CJ, Thomas TC, Levine MA, Neer EJ (1992) Specificity of G protein β and γ subunit interactions *J Biol Chem* **267**, 13807-10

312. Schober A, Zernecke A (2007) Chemokines in vascular remodeling *Thromb Haemost* 97, 730-7

313. Schober A (2008) Chemokines in vascular dysfunction and remodeling *Arterioscler Thromb Vasc Biol* **28**, 1950-9

314. Schreiber RE, Prossnitz ER, Ye RD, Cochrane CG, Bokoch GM (1994) Domains of the human neutrophil N-formyl peptide receptor involved in G protein coupling. Mapping with receptor-derived peptides *J Biol Chem* **269**, 326-31

315. Schülein R, Hermosilla R, Oksche A, Dehe M, Wiesner B, Krause G, Rosenthal W (1998) A dileucine sequence and an upstream glutamate residue in the intracellular carboxyl terminus of the vasopressin V2 receptor are essential for cell surface transport in COS.M6 cells *Mol Pharmacol* 54, 525-35

316. Schwartz TW, Rosenkilde MM (1996) Is there a 'lock' for all agonist 'keys' in 7TM receptors? *Trends Pharmacol Sci* 17, 213-6
317. Sekine A, Fujiwara M, Narumiya S (1989) Asparagine residue in the rho gene product is the modification site for botulinum ADP-ribosyltransferase *J Biol Chem* 264, 8602-5

318. Selbie LA, Darby K, Schmitz-Peiffer C, Browne CL, Herzog H, Shine J, Biden TJ (1995) Synergistic interaction of Y1-neuropeptide Y and α_{1b} -adrenergic receptors in the regulation of phospholipase C, protein kinase C, and arachidonic acid production *J Biol Chem* **270**, 11789-96

319. Selbie LA, Hill SJ (1998) G protein-coupled-receptor cross-talk: the fine-tuning of multiple receptor-signalling pathways *Trends Pharmacol Sci* 19, 87-93

320. Settleman J (2003) A nuclear MAL-function links Rho to SRF Mol Cell 11, 1121-3

321. Shenoy SK, Lefkowitz RJ (2003) Multifaceted roles of β -arrestins in the regulation of seven-membrane-spanning receptor trafficking and signalling *Biochem J* **375**, 503-15

322. Shi G, Partida-Sánchez S, Misra RS, Tighe M, Borchers MT, Lee JJ, Simon MI, Lund FE (2007) Identification of an alternative $G\alpha_q$ -dependent chemokine receptor signal transduction pathway in dendritic cells and granulocytes *J Exp Med* **204**, 2705-18

323. Shirai H, Takahashi K, Katada T, Inagami T (1995) Mapping of G protein coupling sites of the angiotensin II type 1 receptor *Hypertension* **25**, 726-30

324. Siderovski DP, Willard FS (2005) The GAPs, GEFs, and GDIs of heterotrimeric G-protein α subunits *Int J Biol Sci* 1, 51-66

325. Simon MI, Strathmann MP, Gautam N (1991) Diversity of G proteins in signal transduction *Science* **252**, 802-8

326. Smotrys JE, Linder ME (2004) Palmitoylation of intracellular signaling proteins: regulation and function *Annu Rev Biochem* **73**, 559-87

327. **Smrcka AV** (2008) G protein βγ subunits: central mediators of G protein-coupled receptor signaling *Cell Mol Life Sci* **65**, 2191-214

328. Song L, Pachter JS (2004) Monocyte chemoattractant protein-1 alters expression of tight junction-associated proteins in brain microvascular endothelial cells *Microvasc Res* 67, 78-89

329. Sozzani S, Luini W, Molino M, Jílek P, Bottazzi B, Cerletti C, Matsushima K, Mantovani A (1991) The signal transduction pathway involved in the migration induced by a monocyte chemotactic cytokine *J Immunol* 147, 2215-21

330. Spinetti G, Wang M, Monticone R, Zhang J, Zhao D, Lakatta EG (2004) Rat aortic MCP-1 and its receptor CCR2 increase with age and alter vascular smooth muscle cell function *Arterioscler Thromb Vasc Biol* **24**, 1397-402

331. Stamatovic SM, Keep RF, Kunkel SL, Andjelkovic AV (2003) Potential role of MCP-1 in endothelial cell tight junction 'opening': signaling via Rho and Rho kinase *J Cell Sci* **116**, 4615-28

332. Stamatovic SM, Shakui P, Keep RF, Moore BB, Kunkel SL, Van Rooijen N, Andjelkovic AV (2005) Monocyte chemoattractant protein-1 regulation of blood-brain barrier permeability *J Cereb Blood Flow Metab* **25**, 593-606

333. Stamatovic SM, Dimitrijevic OB, Keep RF, Andjelkovic AV (2006) Protein kinase C α -RhoA cross-talk in CCL2-induced alterations in brain endothelial permeability *J Biol Chem* **281**, 8379-88

334. **Stenmark H** (2009) Rab GTPases as coordinators of vesicle traffic *Nat Rev Mol Cell Biol* **10**, 513-25

335. Sternweis PC, Carter AM, Chen Z, Danesh SM, Hsiung YF, Singer WD (2007) Regulation of Rho guanine nucleotide exchange factors by G proteins *Adv Protein Chem* 74, 189-228

336. Su Y, Ho MK, Wong YH (2009) A hematopoietic perspective on the promiscuity and specificity of Ga_{16} signaling *Neurosignals* 17, 71-81

337. Sunahara RK, Dessauer CW, Gilman AG (1996) Complexity and diversity of mammalian adenylyl cyclases *Annu Rev Pharmacol Toxicol* **36**, 461-80

338. Swift S, Leger AJ, Talavera J, Zhang L, Bohm A, Kuliopulos A (2006) Role of the PAR1 receptor 8th helix in signaling: the 7-8-1 receptor activation mechanism *J Biol Chem* **281**, 4109-16

339. Tai AW, Chuang JZ, Bode C, Wolfrum U, Sung CH (1999) Rhodopsin's carboxyterminal cytoplasmic tail acts as a membrane receptor for cytoplasmic dynein by binding to the dynein light chain Tctex-1 *Cell* **97**, 877-87

340. Takai Y, Sasaki T, Matozaki T (2001) Small GTP-binding proteins *Physiol Rev* 81, 153-208

341. Tan W, Martin D, Gutkind JS (2006) The $G\alpha_{13}$ -Rho signaling axis is required for SDF-1-induced migration through CXCR4 *J Biol Chem* **281**, 39542-9

342. Tanabe S, Kreutz B, Suzuki N, Kozasa T (2004) Regulation of RGS-RhoGEFs by $G\alpha_{12}$ and $G\alpha_{13}$ proteins *Methods Enzymol* **390**, 285-94

343. Terashima Y, Onai N, Murai M, Enomoto M, Poonpiriya V, Hamada T, Motomura K, Suwa M, Ezaki T, Haga T, Kanegasaki S, Matsushima K (2005) Pivotal function for cytoplasmic protein FROUNT in CCR2-mediated monocyte chemotaxis *Nat Immunol* **6**, 827-35

344. Thelen M, Peveri P, Kernen P, von Tscharner V, Walz A, Baggiolini M (1988) Mechanism of neutrophil activation by NAF, a novel monocyte-derived peptide agonist *FASEB J.* **2**, 2702-6

345. Thelen M (2001) Dancing to the tune of chemokines Nat Immunol 2, 129-34

346. Thelen M, Stein JV (2008) How chemokines invite leukocytes to dance *Nat Immunol* 9, 953-9

347. Thomas DD, Kaspar KM, Taft WB, Weng N, Rodenkirch LA, Groblewski GE (2002) Identification of annexin VI as a Ca2+-sensitive CRHSP-28-binding protein in pancreatic acinar cells *J Biol Chem* **277**, 35496-502

348. Thomas DD, Taft WB, Kaspar KM, Groblewski GE (2001) CRHSP-28 regulates Ca(2+)-stimulated secretion in permeabilized acinar cells *J Biol Chem* **276**, 28866-72

349. Thomas DD, Weng N, Groblewski GE (2004) Secretagogue-induced translocation of CRHSP-28 within an early apical endosomal compartment in acinar cells *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 287, 253-63

350. Tiacci E, Orvietani PL, Bigerna B, Pucciarini A, Corthals GL, Pettirossi V, Martelli MP, Liso A, Benedetti R, Pacini R, Bolli N, Pileri S, Pulford K, Gambacorta M, Carbone A, Pasquarello C, Scherl A, Robertson H, Sciurpi MT, Alunni-Bistocchi G, Binaglia L, Byrne JA, Falini B (2005) Tumor protein D52 (TPD52): a novel B-cell/plasma-cell molecule with unique expression pattern and Ca(2+)-dependent association with annexin VI *Blood* 105, 2812-20

351. Tian Y, Lee MM, Yung LY, Allen RA, Slocombe PM, Twomey BM, Wong YH (2008) Differential involvement of Ga_{16} in CC chemokine-induced stimulation of phospholipase C β , ERK, and chemotaxis *Cell Signal* **20**, 1179-89

352. Toksoz D, Merdek KD (2002) The Rho small GTPase: functions in health and disease *Histol Histopathol* 17, 915-27

353. Toutant M, Gauthier-Rouviere C, Fiszman MY, Lemonnier M (1994) Promoter elements and transcriptional control of the chicken tropomyosin gene *Nucleic Acids Res* 22, 1838-45

354. Treisman R (1986) Identification of a protein-binding site that mediates transcriptional response of the c-fos gene to serum factors *Cell* **46**, 567-74

355. Tsou CL, Peters W, Si Y, Slaymaker S, Aslanian AM, Weisberg SP, Mack M, Charo IF (2007) Critical roles for CCR2 and MCP-3 in monocyte mobilization from bone marrow and recruitment to inflammatory sites *J Clin Invest* 117, 902-9

356. **Tulapurkar ME, Zündorf G, Reiser G** (2006) Internalization and desensitization of a green fluorescent protein-tagged P2Y nucleotide receptor are differently controlled by inhibition of calmodulin-dependent protein kinase II *J Neurochem* **96**, 624-34

357. Ulrich CD, Holtmann M, Miller LJ (1998) Secretin and vasoactive intestinal peptide receptors: members of a unique family of G protein-coupled receptors *Gastroenterology* 114, 382-97

358. Umehara H, Bloom ET, Okazaki T, Nagano Y, Yoshie O, Imai T (2004) Fractalkine in vascular biology: from basic research to clinical disease *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 24, 34-40

359. Valente AJ, Graves DT, Vialle-Valentin CE, Delgado R, Schwartz CJ (1988) Purification of a monocyte chemotactic factor secreted by nonhuman primate vascular cells in culture *Biochemistry* 27, 4162-8

360. Valković T, Lucin K, Krstulja M, Dobi-Babić R, Jonjić N (1998) Expression of monocyte chemotactic protein-1 in human invasive ductal breast cancer *Pathol Res Pract* **194**, 335-40

361. Van Coillie E, Van Damme J, Opdenakker G (1999) The MCP/eotaxin subfamily of CC chemokines *Cytokine Growth Factor Rev* **10**, 61-86

362. Vanhaesebroeck B, Leevers SJ, Ahmadi K, Timms J, Katso R, Driscoll PC, Woscholski R, Parker PJ, Waterfield MD (2001) Synthesis and function of 3-phosphorylated inositol lipids *Annu Rev Biochem* 70, 535-602

363. VanLeeuwen D, Steffey ME, Donahue C, Ho G, MacKenzie RG (2003) Cell surface expression of the melanocortin-4 receptor is dependent on a C-terminal diisoleucine sequence at codons 316/317 *J Biol Chem* 278, 15935-40

364. Vega FM, Ridley AJ (2008) Rho GTPases in cancer cell biology FEBS Lett 582, 2093-101

365. Viedt C, Dechend R, Fei J, Hänsch GM, Kreuzer J, Orth SR (2002a) MCP-1 induces inflammatory activation of human tubular epithelial cells: involvement of the transcription factors, nuclear factor- κ B and activating protein-1 *J Am Soc Nephrol* **13**, 1534-47

366. Viedt C, Vogel J, Athanasiou T, Shen W, Orth SR, Kübler W, Kreuzer J (2002b) Monocyte chemoattractant protein-1 induces proliferation and interleukin-6 production in human smooth muscle cells by differential activation of nuclear factor- κ B and activator protein-1 *Arterioscler Thromb Vasc Biol* **22**, 914-20

367. Vogt S, Grosse R, Schultz G, Offermanns S (2003) Receptor-dependent RhoA activation in $G_{12/G13}$ -deficient cells: genetic evidence for an involvement of $G_{q/G11} J$ Biol Chem 278, 28743-9

368. Wain JH, Kirby JA, Ali S (2002) Leucocyte chemotaxis: Examination of mitogenactivated protein kinase and phosphoinositide 3-kinase activation by Monocyte Chemoattractant Proteins-1, -2, -3 and -4 *Clin Exp Immunol* **127**, 436-44

369. Wang G, Yeh HI, Lin JJ (1994) Characterization of cis-regulating elements and trans-activating factors of the rat cardiac troponin T gene *J Biol Chem* **269**, 30595-603

370. Wang R, Xu J, Saramäki O, Visakorpi T, Sutherland WM, Zhou J, Sen B, Lim SD, Mabjeesh N, Amin M, Dong JT, Petros JA, Nelson PS, Marshall FF, Zhau HE, Chung LW (2004) Identification and in situ hybridization mapping of a mouse Tpd5211 (D53) orthologue to chromosome 10A4-B2 *Cancer Res* **64**, 1589-94

371. Ward RJ, Jenkins L, Milligan G (2009) Selectivity and functional consequences of interactions of family A G protein-coupled receptors with neurochondrin and periplakin *J Neurochem* **109**, 182-92

372. Warner DR, Weng G, Yu S, Matalon R, Weinstein LS (1998) A novel mutation in the switch 3 region of $G\alpha_s$ in a patient with Albright hereditary osteodystrophy impairs GDP binding and receptor activation *J Biol Chem* **273**, 23976-83

373. Weber KS, Nelson PJ, Gröne HJ, Weber C (1999) Expression of CCR2 by endothelial cells: implications for MCP-1 mediated wound injury repair and In vivo inflammatory activation of endothelium *Arterioscler Thromb Vasc Biol* **19**, 2085-93

374. Wess J (1997) G-protein-coupled receptors: molecular mechanisms involved in receptor activation and selectivity of G-protein recognition *FASEB J* **11**, 346-54

375. Wettschureck N, Offermanns S (2005) Mammalian G proteins and their cell type specific functions *Physiol Rev* 85, 1159-204

376. Wheeler AP, Ridley AJ (2004) Why three Rho proteins? RhoA, RhoB, RhoC, and cell motility *Exp Cell Res* **301**, 43-9

377. Whitehead IP, Zohn IE, Der CJ (2001) Rho GTPase-dependent transformation by G protein-coupled receptors *Oncogene* 20, 1547-55

378. Wilde C, Aktories K (2001) The Rho-ADP-ribosylating C3 exoenzyme from Clostridium botulinum and related C3-like transferases *Toxicon* **39**, 1647-60

379. Wilkie TM, Scherle PA, Strathmann MP, Slepak VZ, Simon MI (1991) Characterization of G-protein α subunits in the G_q class: expression in murine tissues and in stromal and hematopoietic cell lines *Proc Natl Acad Sci U S A* **88**, 10049-53

380. Williams GT, Lau LF (1993) Activation of the inducible orphan receptor gene nur77 by serum growth factors: dissociation of immediate-early and delayed-early responses *Mol Cell Biol* **13**, 6124-36

381. Williams JA, Chen X, Sabbatini ME (2009) Small G proteins as key regulators of pancreatic digestive enzyme secretion *Am J Physiol Endocrinol Metab* **296**, 405-14

382. Wilson SH, Bailey AM, Nourse CR, Mattei MG, Byrne JA (2001) Identification of MAL2, a novel member of the mal proteolipid family, though interactions with TPD52-like proteins in the yeast two-hybrid system *Genomics* **76**, 81-8

383. Wiser O, Jan LY (2004) G protein regulation of channels *Handbook of Cell* Signaling, MA Academic Press 231, 667-670

384. Wittinghofer A, Pai EF (1991) The structure of Ras protein: a model for a universal molecular switch *Trends Biochem Sci* 16, 382-7

385. Wolfe BL, Trejo J (2007) Clathrin-dependent mechanisms of G protein-coupled receptor endocytosis *Traffic* **8**, 462-70

386. Wong LM, Myers SJ, Tsou CL, Gosling J, Arai H, Charo IF (1997) Organization and differential expression of the human monocyte chemoattractant protein 1 receptor gene Evidence for the role of the carboxyl-terminal tail in receptor trafficking *J Biol Chem* 272, 1038-45

387. **Wong SK** (2003) G protein selectivity is regulated by multiple intracellular regions of GPCRs *Neurosignals* **12**, 1-12

388. Wu D, Katz A, Lee CH, Simon MI (1992) Activation of phospholipase C by α_1 -adrenergic receptors is mediated by the α subunits of G_q family *J Biol Chem* 267, 25798-802

389. Wu D, Jiang H, Katz A, Simon MI (1993) Identification of critical regions on phospholipase C- β_1 required for activation by G-proteins *J Biol Chem* **268**, 3704-9

390. Xia Y, Frangogiannis NG (2007) MCP-1/CCL2 as a therapeutic target in myocardial infarction and ischemic cardiomyopathy *Inflamm Allergy Drug Targets* **6**, 101-7

391. Xin M, Small EM, Sutherland LB, Qi X, McAnally J, Plato CF, Richardson JA, Bassel-Duby R, Olson EN (2009) MicroRNAs miR-143 and miR-145 modulate cytoskeletal dynamics and responsiveness of smooth muscle cells to injury *Genes Dev* 23, 2166-78

392. Yamagami S, Tanaka H, Endo N (1997) Monocyte chemoattractant protein-2 can exert its effects through the MCP-1 receptor (CC CKR2B) *FEBS Lett* **400**, 329-32

393. Yang M, Sang H, Rahman A, Wu D, Malik AB, Ye RD (2001) $G\alpha_{16}$ couples chemoattractant receptors to NF-κ B activation *J Immunol* **166**, 6885-92

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

395. Yeung WW, Wong YH (2009) The RhoA-specific guanine nucleotide exchange factor p63RhoGEF binds to activated $G\alpha_{16}$ and inhibits the canonical phospholipase C β pathway *Cell Signal* **21**, 1317-25

396. Yoshie O, Imai T, Nomiyama H (2001) Chemokines in immunity *Adv Immunol* 78, 57-110

397. Yoshikawa DM, Hatwar M, Smrcka AV (2000) G protein β_5 subunit interactions with α subunits and effectors *Biochemistry* **39**, 11340-7

398. Yoshimura T, Robinson EA, Tanaka S, Appella E, Kuratsu J, Leonard EJ (1989) Purification and amino acid analysis of two human glioma-derived monocyte chemoattractants *J Exp Med* **169**, 1449-59

399. Yudin D, Fainzilber M (2009) Ran on tracks--cytoplasmic roles for a nuclear regulator *J Cell Sci* 122, 587-93

400. Zernecke A, Weber C (2010) Chemokines in the vascular inflammatory response of atherosclerosis *Cardiovasc Res*

401.Zhou L, Azfer A, Niu J, Graham S, Choudhury M, Adamski FM, Younce C, Binkley PF, Kolattukudy PE (2006) Monocyte chemoattractant protein-1 induces a novel transcription factor that causes cardiac myocyte apoptosis and ventricular dysfunction *Circ Res* **98**, 1177-85

402. Zhu H, Lam DC, Han KC, Tin VP, Suen WS, Wang E, Lam WK, Cai WW, Chung LP, Wong MP (2007) High resolution analysis of genomic aberrations by metaphase and array comparative genomic hybridization identifies candidate tumour genes in lung cancer cell lines *Cancer Lett* **245**, 303-14

8 Publikationen

Abstracts

Moepps B, Schuhholz J, Michels G, Gierschik P (2007) Regulation of pertussis-toxininsensitive signalling of CC chemokine receptor 2b by tumorprotein D52 *Naunyn Schmiedeberg's Arch Pharmacol* **375** (Suppl) #123

Moepps B, Schuhholz J, Pfreimer M, Gierschik P (2008) Regulation of CC chemokine receptor 2b signalling by tumorprotein D52 Gordon Research Conference on Chemotactic Cytokines, Aussois, France

Schuhholz J, Michels G, Gierschik P, Moepps B (2008) Structural requirements for the regulation of pertussis-toxin-insensitive signalling of CC chemokine receptor 2b by tumor protein D52 *Naunyn Schmiedeberg's Arch Pharmacol* **377**(Suppl) #91

Schuhholz J, Pfreimer M, Arndt P, Gierschik P, Moepps B (2009) Structural requirements for the regulation of pertussis-toxin-insensitive signaling of human CC chemokine receptors CCR2a and b *Naunyn Schmiedeberg's Arch Pharmacol* **379**(Suppl) #100

9 Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich bei Allen bedanken, die mich während meiner Doktorarbeit in verschiedenster Weise unterstützt haben. Mein besonderer Dank gilt

Herrn Prof. Dr. Peter Gierschik für die Ermöglichung dieser Doktorarbeit, die freundliche Aufnahme in der Abteilung und das Interesse am Fortgang meiner Arbeit

Frau PD Dr. Barbara Möpps für die wissenschaftliche Betreuung, die vielen Denkanstöße, ihr großes Engagement und ihre Hilfe, vor allem bei der Fertigstellung der Arbeit

Frau Prof. Dr. Klaudia Giehl für die Bereitschaft zur Übernahme des Koreferats

Mariana, mit der ich in den letzten dreieinhalb Jahren so Einiges erlebt habe

allen Kollegen aus dem Labor 4202, Carolin, Sandra, Melli, Manuel, Torben und Gudrun, für die angenehme Arbeitsatmosphäre, die Hilfsbereitschaft und die vielen lustigen Unterhaltungen.....schön war`s

Petra, die sich die Zeit für die Korrektur meiner Arbeit genommen hat

Norbert, der während meiner Zeit in der Abteilung besonders viel reparieren musste und mich, was grenzwissenschaftliche Phänomene betrifft, immer auf dem neuesten Stand gehalten hat

Frau Susanne Gierschik für die DNA-Sequenzierungen

allen Mitarbeitern der Abteilung für ihre Hilfe und ihre Kollegialität.

Zum Schluß möchte ich mich ganz besonders bei meiner Familie für Alles bedanken, insbesondere für ihre Unterstützung und ihre Geduld und natürlich auch noch "Dange Raube" sagen.

10 Lebenslauf

12.02.1981	geboren in Dillingen a.d. Donau
1987-1991	Besuch der Grundschule in Weisingen
1991-2000	Besuch des Gymnasiums in Dillingen a.d. Donau
2000	Abitur
2000-2006	Studium der Biologie an der Universität Tübingen
2006	Diplom in Biologie
2006-2010	Wissenschaftliche Angestellte in der Abteilung Pharmakologie und Toxikologie der Universität Ulm
2010	Promotion zum Dr. biol. hum.