

Aus dem Walther-Straub-Institut für Pharmakologie und Toxikologie der Ludwig-  
Maximilians-Universität München  
Vorstand: Prof. Dr. med. Thomas Gudermann

**Charakterisierung der mechanischen Aktivierbarkeit von  
 $G_{i/o}$ -Protein gekoppelten Rezeptoren und deren  
cAMP-Antwort**

Dissertation  
zum Erwerb des Doktorgrades der Naturwissenschaften  
an der Medizinischen Fakultät  
der Ludwig-Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von  
Julie Peter, geb. Straub  
aus Waldshut

2017

Gedruckt mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät  
der Ludwigs-Maximilians-Universität München

Betreuer: Prof. Dr. Michael Mederos y Schnitzler

Zweitgutachter: Prof. Dr. Alexander Faußner

Dekan: Prof. Dr. med. dent. Reinhard Hickel

Tag der mündlichen Prüfung: 10.09.2018

# Eidesstattliche Versicherung

**Julie Peter, geb. Straub**

Ich erkläre hiermit an Eides statt, dass ich die vorliegende Dissertation mit dem Thema

## Charakterisierung der mechanischen Aktivierbarkeit von $G_{i/o}$ -Protein gekoppelten Rezeptoren und deren cAMP-Antwort

selbständig verfasst, mich außer der angegebenen keiner weiteren Hilfsmittel bedient und alle Erkenntnisse, die aus dem Schrifttum ganz oder annähernd übernommen sind, als solche kenntlich gemacht und nach ihrer Herkunft unter Bezeichnung der Fundstelle einzeln nachgewiesen habe.

Ich erkläre des Weiteren, dass die hier vorgelegte Dissertation nicht in gleicher oder in ähnlicher Form bei einer anderen Stelle zur Erlangung eines akademischen Grades eingereicht wurde.

Rickenbach, 15.10.2018

---

Ort, Datum

Julie Peter

---

Unterschrift Doktorandin

Für meine Eltern

# Inhaltsverzeichnis

<b><i>Inhaltsverzeichnis</i></b>	<b><i>I</i></b>
<b><i>Abbildungsverzeichnis</i></b>	<b><i>IV</i></b>
<b><i>Tabellenverzeichnis</i></b>	<b><i>V</i></b>
<b><i>Abkürzungsverzeichnis</i></b>	<b><i>VI</i></b>
<b>1 Einleitung</b>	<b>1</b>
<b>1.1 G-Protein gekoppelte Rezeptoren</b>	<b>2</b>
1.1.1 Klassifizierung der GPCR	2
1.1.2 Die Rezeptoraktivierung	4
1.1.2.1 Abläufe am Rezeptor und an den Effektorproteinen	5
1.1.2.2 Kinetik der GPCR-Signalkaskade	7
<b>1.2 Mechanosensitivität</b>	<b>10</b>
1.2.1 Mechanosensitive Strukturen	11
1.2.1.1 Ionenkanäle	11
1.2.1.2 G-Protein gekoppelte Rezeptoren	12
1.2.2 Modelle zur mechanischen Aktivierung	13
<b>1.3 Darstellung der Mechanosensitivität von G-Protein gekoppelten Rezeptoren in der Elektrophysiologie</b>	<b>14</b>
1.3.1.1 Kir-Kanäle	15
1.3.1.2 TRP-Kanal der klassischen/kanonischen Unterfamilie 5	16
<b>1.4 Darstellung der Mechanosensitivität von G-Protein gekoppelten Rezeptoren mittels Förster-Resonanzenergietransfer-Technik</b>	<b>16</b>
1.4.1 Epac-Sensoren	18
1.4.2 Rezeptor-FRET-Sensoren	19
<b>1.5 Zielsetzung der Arbeit</b>	<b>20</b>
<b>2 Material und Methoden</b>	<b>21</b>
<b>2.1 Molekularbiologische Methoden</b>	<b>21</b>
2.1.1 Plasmide und cDNAs	22
2.1.2 Agarose-Gelelektrophorese	24
2.1.3 Die Polymerase-Kettenreaktion	25
2.1.4 Design und Herstellung von Primern	25
2.1.5 Dpnl-Verdau	26
2.1.6 Plasmidamplifikation	27
2.1.6.1 Transformation	27
2.1.6.2 Mini- und Midi-Präparation von Plasmid-DNA	28
2.1.7 Sequenzierung	28
2.1.8 Molekulare Klonierung	28
2.1.8.1 Material	31
2.1.8.2 Durchführung	32
2.1.9 Zielgerichtete Mutagenese/ Einführung von Punktmutationen	34
2.1.9.1 Material	34
2.1.9.2 Durchführung	35
2.1.10 Insertion durch Mutagenese	35
2.1.10.1 Material	36
2.1.10.2 Durchführung der Insertmutation	37
2.1.11 Übersicht der hergestellten Plasmidkonstrukte	38
2.1.12 Weitere Konstrukte	38

<b>2.2</b>	<b>Zellkultur</b>	<b>40</b>
2.2.1	Material	40
2.2.2	Zellkultur	41
2.2.3	Transiente Transfektion von Plasmid-DNA	42
2.2.4	Vorbereitung der Zellen	42
2.2.5	Markierung der Zellen mit FIAsh	43
2.2.5.1	Material	43
2.2.5.2	Durchführung	43
<b>2.3</b>	<b>Elektrophysiologie</b>	<b>44</b>
2.3.1	Material	44
2.3.2	Patch-Clamp-Technik	45
2.3.2.1	Der Stromkreis	47
2.3.3	Eingesetzte Lösungen	48
2.3.3.1	Badlösungen	48
2.3.3.2	Pipettenlösungen	48
2.3.4	Experimenteller Ablauf	49
2.3.4.1	Messstand-Aufbau und Vorbereitung	49
2.3.4.2	Durchführung der Messung	50
<b>2.4</b>	<b>FRET</b>	<b>54</b>
2.4.1	Material	54
2.4.2	Förster-Resonanz-Energietransfer-Methode	55
2.4.3	Lösungen	57
2.4.4	Stimulationsmethoden bei FRET-Messungen	57
2.4.5	Experimenteller Ablauf	58
2.4.5.1	Messstand-Aufbau und Vorbereitung	58
2.4.5.2	Durchführung der Messung	59
<b>2.5</b>	<b>Datenanalyse</b>	<b>59</b>
<b>3</b>	<b>Ergebnisse</b>	<b>61</b>
<b>3.1</b>	<b>Molekularbiologie</b>	<b>61</b>
3.1.1	Konstrukte zur Ermittlung der mechanischen Aktivierbarkeit	61
3.1.2	Konstrukte zur Bestimmung des cAMP-Spiegels	62
<b>3.2</b>	<b>Mechanische Aktivierbarkeit <math>G_{i/o}</math>-PCR</b>	<b>63</b>
3.2.1	Kir-Kanal-Aktivität als Maß für die Mechanosensorik von $G_{i/o}$ -PCR	63
3.2.2	TRPC5-Aktivität als Maß für die Mechanosensorik von GPCR	68
3.2.2.1	$G_s$ -PCR	68
3.2.2.2	$G_{i/o}$ -PCR	70
3.2.3	Rezeptoren essentiell für die mechanische Signalperzeption	72
3.2.4	Mechanische Aktivierung durch Rezeptorblockade hemmbar	73
3.2.5	Pertussistoxin führt zur Hemmung der mechanischen Aktivierbarkeit	75
3.2.6	PLC-Blockade führt zur Hemmung der mechanischen Aktivierbarkeit	77
3.2.7	Alternative Applikationsmethode des mechanischen Reizes	78
<b>3.3</b>	<b>Bestimmung dynamischer cAMP-Spiegel in lebenden Zellen nach <math>G_{i/o}</math>-PCR vermittelter Rezeptoraktivierung</b>	<b>80</b>
3.3.1	Charakterisierung der Sensoren durch Messungen mit $G_s$ -PCR	80
3.3.2	Sensoren stellen cAMP-Spiegeländerung nach $G_{i/o}$ PCR vermittelter Rezeptoraktivierung dar	83
3.3.2.1	Vorstimulation mit Forskolin	83
3.3.2.2	Messungen $G_{i/o}$ PCR ohne Forskolin	87
3.3.2.3	cAMP-vermittelte FRET-Signale durch Rezeptorblockade hemmbar	89
3.3.3	Ermittlung der optimalen Messbedingungen	91
3.3.4	Mechanische Aktivierung einzelner GPCR durch Epac-Sensoren nicht darstellbar	95
<b>3.4</b>	<b>Messung der Mechanosensorik direkt am Rezeptor</b>	<b>99</b>
3.4.1	$\alpha_{2A}$ -YFP-CFP-Sensor	99

3.4.2	5-HT <sub>1B</sub> -FRET-Sensor	100
3.4.3	μ-FRET-Sensor	101
<b>3.5</b>	<b>Vergleich der Messsysteme</b>	<b>102</b>
<b>3.6</b>	<b>Vergleich der untersuchten GPCR hinsichtlich ihrer Mechanosensitivität in den verschiedenen Messsystemen</b>	<b>106</b>
<b>4</b>	<b>Diskussion</b>	<b>113</b>
<b>4.1</b>	<b>Charakterisierung verschiedener G<sub>i/o</sub>-PCR sowie G<sub>s</sub>-PCR hinsichtlich ihrer Mechanosensitivität in der Elektrophysiologie</b>	<b>113</b>
4.1.1	Mechanosensitivität von Kir-Kanälen und TRPC5	113
4.1.2	Darstellung der Mechanosensitivität von GPCR durch Ionenkanäle	115
4.1.3	Signaltransduktion	116
<b>4.2</b>	<b>Untersuchung von cAMP-Spiegeländerungen nach G<sub>i/o</sub>-PCR –Aktivierung</b>	<b>119</b>
4.2.1	Epac-basierte cAMP-Sensoren	120
4.2.2	Darstellung G <sub>s</sub> - und G <sub>i/o</sub> -PCR-vermittelter cAMP-Spiegeländerungen	120
4.2.2.1	Vorstimulation mit Forskolin	121
4.2.2.2	Methodische Voraussetzungen	121
4.2.2.3	Kinetik und Erfolgsrate	122
4.2.3	Eignung der Sensoren zur Darstellung von G <sub>i/o</sub> -vermittelten cAMP-Spiegelabnahmen	123
4.2.4	Eignung der Sensoren zur Darstellung der mechanischen Aktivierbarkeit	124
<b>4.3</b>	<b>FRET-mikroskopische Untersuchungen der Mechanosensorik direkt an G<sub>i/o</sub>-PCR</b>	<b>125</b>
<b>4.4</b>	<b>Die Rolle der Messsysteme für die Ermittlung der Mechanosensitivität von G<sub>i/o</sub>-PCR</b>	<b>127</b>
<b>4.5</b>	<b>Ausblick</b>	<b>130</b>
	<b>Zusammenfassung</b>	<b>132</b>
	<b>Summary</b>	<b>134</b>
	<b>Literaturverzeichnis</b>	<b>136</b>
	<b>Danksagungen</b>	<b>147</b>
	<b>Publikation und Kongressbeiträge</b>	<b>148</b>

## Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Die vier Hauptgruppen der G-Proteine und ihre Signalkaskaden .....	4
Abbildung 2: Funktionelle Selektivität/Biased agonism .....	7
Abbildung 3: Zeitliche Abläufe der GPCR-Aktivierung und beeinflussende Komponenten .....	9
Abbildung 4: Modelle zur mechanischen Reizwahrnehmung .....	14
Abbildung 5: Rezeptor-Sensoren .....	19
Abbildung 6: Übersicht der Klonierungsmethoden .....	22
Abbildung 7: Vektormappen pIRES und eYFP-Epac-eCFP und daraus klonierte Konstrukte .....	30
Abbildung 8: Schematische Darstellung der verschiedenen Epac-basierten cAMP-Sensoren .....	40
Abbildung 9: Schematisches Schaltbild des Patch-Clamp-Stromkreises mit Messkammer .....	48
Abbildung 10: Schematische Darstellung einer triangulären Spannungsrampe und Hystereseeffekt .....	53
Abbildung 11: Schematische Darstellung der Konstrukte zur Ermittlung der mechanischen Aktivierbarkeit ..	62
Abbildung 12: Epac-basierte Sensoren zur cAMP-Bestimmung .....	63
Abbildung 13: Osmotisch bedingte Membrandehnung aktiviert den $\alpha_{2A}R$ .....	65
Abbildung 14: 5-HT <sub>1B</sub> R, M2R und $\mu R$ reagieren im Kir-Kanal-basierten Messsystem auf osmotisch bedingte Membrandehnung .....	66
Abbildung 15: Vergleich der Stromdichten unter hypoosmolarer Lösung – Kir-Kanäle .....	67
Abbildung 16: Osmotisch bedingte Membrandehnung bei G <sub>s</sub> -PCR .....	69
Abbildung 17: Vergleich der Stromdichten unter hypoosmolarer Lösung – TRPC5 + G <sub>s</sub> -PCR .....	69
Abbildung 18: $\alpha_{2A}R$ , 5-HT <sub>1B</sub> R, M2R und $\mu R$ reagieren im TRPC5-basierten Messsystem auf osmotisch bedingte Membrandehnung .....	71
Abbildung 19: Vergleich der Stromdichten unter hypoosmolarer Lösung – TRPC5 + G <sub>i/o</sub> -PCR .....	72
Abbildung 20: Osmotisch bedingte Membrandehnung erzeugt keine Aktivierung des TRPC5 oder der Kir3.1/3.2 bzw. Kir3.1/3.4 .....	73
Abbildung 21: Mechanische Aktivierbarkeit unter Rezeptorblockade nicht darstellbar .....	74
Abbildung 22: PTX-Inkubation von G <sub>i/o</sub> -PCR-exprimierenden Zellen verhindert Signaltransduktion .....	76
Abbildung 23: PLC-Blockade verhindert Signaltransduktion zwischen G <sub>i/o</sub> -PCR und TRPC5 nach Stimulation durch Agonist oder mechanischen Reiz .....	78
Abbildung 24: Druck-bedingte Membrandehnung durch 25 cmH <sub>2</sub> O aktiviert den $\alpha_{2A}R$ .....	79
Abbildung 25: Epac-basierte cAMP-Sensoren und der G <sub>s</sub> -PCR $\beta_2AR$ in FRET-Messungen .....	81
Abbildung 26: Zusammenfassung der FRET-Signalabnahmen nach $\beta_2AR$ -Stimulation .....	82
Abbildung 27: Epac-basierte cAMP-Sensoren und der $\alpha_{2A}R$ in FRET-Messungen .....	84
Abbildung 28: Zusammenfassung der FRET-Signalzunahmen nach $\alpha_{2A}R$ -Stimulation .....	85
Abbildung 29: Epac-basierte cAMP-Sensoren und der $\mu R$ in FRET-Messungen .....	86
Abbildung 30: Zusammenfassung der FRET-Signalzunahmen nach $\mu R$ -Stimulation .....	87
Abbildung 31: Epac-S <sup>H187</sup> -Sensor und $\mu R$ in FRET-Messungen ohne FSK-Vorstimulation .....	88
Abbildung 32: FRET-Signaländerungen durch Rezeptorblockade hemmbar .....	90
Abbildung 33: Vorbedingungen der Epac-Sensor-basierten FRET-Messungen .....	92
Abbildung 34: Erfolgsrate und Kinetiken der Epac Sensor-basierten FRET-Messungen .....	94
Abbildung 35: Epac-Sensor-basierte FRET-Messungen mit mechanischen Stimuli an endogenen GPCR .....	97
Abbildung 36: Vergleich mechanisch induzierter cAMP-Effekte an endogenen und überexprimierten GPCR ..	98
Abbildung 37: FRET-Messungen des $\alpha_{2A}$ -YFP-CFP-Sensors .....	100
Abbildung 38: FRET-Messungen des 5-HT <sub>1B</sub> -FRET-Sensors .....	101
Abbildung 39: FRET-Messungen des $\mu$ -FRET-Sensors .....	102
Abbildung 40: Vergleich der Basalströme im Kir-Kanal- und TRPC5-basierten Messsystem .....	103
Abbildung 41: TRPC5-Expressionsanalyse anhand von LaCl <sub>3</sub> -Effekten .....	104
Abbildung 42: Vergleich der drei Messsysteme anhand der gemessenen Agonisten-Effekte und Effekten unter hypoosmolarer Lösung .....	105
Abbildung 43: Mechanisch induzierte Stromdichten- bzw. FRET-Signalveränderungen bezogen auf die maximale Agonistenstimulation .....	108
Abbildung 44: Mechanisch induzierte bzw. Agonisten-induzierte Stromdichtenveränderungen bezogen auf die maximale LaCl <sub>3</sub> -Stimulation .....	111
Abbildung 45: Zusammenfassung der Aktivierungswege des TRPC5 über GPCR .....	119

## Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Übersicht über zu Beginn vorhandene Plasmide und cDNAs .....	23
Tabelle 2: Primer Kir-Konstrukte und Epac-Sensor-Konstrukte.....	31
Tabelle 3: Mutageneseprimer zur Entfernung des Stopcodons im h5-HT <sub>1B</sub> - und h $\mu$ -Rezeptor .....	35
Tabelle 4: Insertionsprimer zum Einbringen des FAsH-Motivs in den h5-HT <sub>1B</sub> -und h $\mu$ -Rezeptor.....	37
Tabelle 5: Übersicht über die im Zuge der vorliegenden Arbeit hergestellten Konstrukte .....	38
Tabelle 6: Vergleich der angewandten Messsysteme .....	130

## Abkürzungsverzeichnis

<b>AC</b>	<i>Adenylyl cyclase</i> , Adenylylzyklase
<b>ATP</b>	<i>Adenosine triphosphate</i> , Adenosintriphosphat
<b>BRET</b>	<i>Bioluminescence resonance energy transfer</i> , Biolumineszenz-Resonanzenergietransfer
<b>cAMP</b>	<i>Cyclic adenosine monophosphate</i> , zyklisches Adenosinmonophosphat
<b>DAG</b>	<i>Diacylglycerol</i> , Diacylglycerin
<b>DNA</b>	<i>Deoxyribonucleic acid</i> , Desoxyribonukleinsäure
<b>dNTP</b>	<i>Deoxynucleoside triphosphate</i> , Desoxynukleosidtriphosphat
<b>ECFP</b>	<i>Enhanced cyan fluorescent protein</i> , verbessertes türkis fluoreszierendes Protein
<b>EGFP</b>	<i>Enhanced green fluorescent protein</i> , verbessertes grün fluoreszierendes Protein
<b>EYFP</b>	<i>Enhanced yellow fluorescent protein</i> , verbessertes gelb fluoreszierendes Protein
<b>ENaC</b>	<i>Epithelial Na<sup>+</sup> channel</i> , epithelialer Natriumkanal
<b>Epac</b>	<i>Exchange protein directly activated by cAMP</i> , direkt durch cAMP aktiviertes Austauschprotein
<b>FIAsH</b>	<i>Fluorescein arsenical hairpin binder</i> , gelb fluoreszierendes arsenhaltiges Fluoreszeinderivat
<b>FRET</b>	<i>Förster resonance energy transfer</i> , Förster-Resonanzenergietransfer
<b>GDP</b>	<i>Guanosine diphosphate</i> , Guanosin-5'-diphosphat
<b>GTP</b>	<i>Guanosine triphosphate</i> , Guanosin-5'-triphosphat
<b>GIRK</b>	<i>G protein-coupled inwardly-rectifying potassium channels</i> , G-Protein gekoppelte einwärts gleichgerichtete Kaliumkanäle
<b>G-Protein</b>	<i>Guanine nucleotide-binding protein</i> , Guanosintriphosphat-bindendes Protein
<b>GPCR</b>	<i>G Protein-coupled receptor(s)</i> , G-Protein gekoppelte(r) Rezeptor(en)
<b>G<sub>i/o</sub>-PCR</b>	<i>G<sub>i/o</sub>-Protein coupled receptor</i> , G <sub>i/o</sub> -Protein gekoppelter Rezeptor
<b>G<sub>q/11</sub>-PCR</b>	<i>G<sub>q/11</sub>-Protein coupled receptor</i> , G <sub>q/11</sub> -Protein gekoppelter Rezeptor
<b>G<sub>s</sub>-PCR</b>	<i>G<sub>s</sub>-Protein coupled receptor</i> , G <sub>s</sub> -Protein gekoppelter Rezeptor

<b>GRK</b>	<i>G protein-coupled receptor kinases</i> , G-Protein-gekoppelte Rezeptorkinasen
<b>h5-HT<sub>1B</sub>R</b>	<i>human 5-Hydroxytryptamine receptor 1B</i> , humaner 5-Hydroxytryptamin-1B-Rezeptor
<b>h5-HT<sub>7A</sub>R</b>	<i>human 5-Hydroxytryptamine receptor 7A</i> , humaner 5-Hydroxytryptamin-7A-Rezeptor
<b>h<math>\alpha</math><sub>2A</sub>R</b>	<i>human <math>\alpha</math><sub>2A</sub>-adrenoceptor</i> , humaner adrenerger $\alpha$ <sub>2A</sub> -Rezeptor
<b>hM2R</b>	<i>human M2 muscarinic acetylcholine receptor</i> , humaner muskarinischer Acetylcholin-M2-Rezeptor
<b>h<math>\mu</math>R</b>	<i>human <math>\mu</math> opioid receptor</i> , humaner $\mu$ Opioid-Rezeptor
<b>hCGRPR</b>	<i>human calcitonin gene-related peptide receptor</i> , humaner mit dem Calcitonin-Peptid-Gen verwandter Rezeptor
<b>hVPAC1R</b>	<i>human vasoactive intestinal polypeptide receptor 1</i> , humaner vasoaktiver intestinaler Polypeptid Rezeptor 1
<b>h<math>\beta</math><sub>2</sub>R</b>	<i>human <math>\beta</math><sub>2</sub>-adrenoceptor</i> , humaner adrenerger $\beta$ <sub>2</sub> -Rezeptor
<b>IL</b>	<i>Intracellular loop</i> , intrazelluläre Schleife
<b>IP<sub>3</sub></b>	<i>Inositol trisphosphate</i> , Inositol-1,4,5-trisphosphat
<b>K<sub>D</sub></b>	<i>Dissociation constant</i> , Dissoziationskonstante
<b>mV</b>	<i>monomeric Venus</i> , monomeres Venus
<b>mTq2</b>	<i>monomeric Turquoise2</i> , monomeres Turquoise2
<b>MCS</b>	<i>Multiple cloning site</i> , multiple Klonierungsstelle
<b>Msc</b>	<i>Mechanosensitive channel of conductance</i> , mechanosensitive Ionenkanäle
<b>PCR</b>	<i>Polymerase Chain Reaction</i> , Polymerase-Kettenreaktion
<b>PIP<sub>2</sub></b>	<i>Phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate</i> , Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat
<b>PDE</b>	<i>Phosphodiesterase</i> , Phosphodiesterase
<b>PKA</b>	<i>Protein kinase A</i> , Proteinkinase A
<b>PKC</b>	<i>Protein kinase C</i> , Proteinkinase C
<b>PLC</b>	<i>Phospholipase C</i> , Phospholipase C
<b>RT-PCR</b>	<i>Real time Polymerase Chain Reaction</i> , Echtzeit-Polymerase-Kettenreaktion

<b>TMC-Protein</b>	<i>Transmembrane channel-like protein</i> , transmembranäres Kanal-ähnliches Protein
<b>TRP</b>	<i>Transient receptor potential channel</i> , TRP-Kanal
<b>TRPC</b>	<i>Classical/ Canonical transient receptor potential channel</i> , TRP-Kanal der klassischen/kanonischen Unterfamilie
<b>TRPV</b>	<i>Vanilloid transient receptor potential channel</i> , TRP-Kanal der Vanilloid-Unterfamilie
<b>VRAC</b>	<i>Volume regulated anion channel</i> , Volumen-regulierter Anionen-Kanal

# 1 Einleitung

Lebewesen aller evolutionären Entwicklungsstufen müssen in der Lage sein, sich intern und extern wechselnden Bedingungen anzupassen. Ermöglicht wird dies durch das Vorhandensein von extrazellulären Rezeptoren, die Signale wahrnehmen, verarbeiten und weiterleiten können. Die Aktivierung solcher Membranrezeptoren bewirkt die Aktivierung einer intrazellulären Signaltransduktion, die dann der Zelle ermöglicht, eine entsprechende physiologische Reaktion hervorzurufen und sich somit an die veränderten Bedingungen anzupassen. Die Fähigkeit lebender Organismen einen gegebenen Zustand unter wechselnden Bedingungen aufrecht zu erhalten wird als Homöostase bezeichnet, und stellt ein Grundprinzip jeglicher Lebensform dar.

Die intrazelluläre Signaltransduktion besteht aus einer Vielzahl von Molekülen, die auf einzelnen oder mehreren nacheinander geschalteten Ebenen für eine Signalweitergabe, -amplifikation, und/oder -spezialisierung sorgen. Verschiedene Signaltransduktionswege können dabei miteinander interagieren, womit es etwa im Zytoplasma oder im Zellkern zu Wechselwirkungen oder Integration verschiedener Signalkaskaden kommt. In der Gesamtheit ermöglicht ein vielschichtiges Signalnetzwerk dem Organismus die Flexibilität sich an verschiedene Bedingungen dynamisch anzupassen.

Grundsätzlich gilt, dass komplexere Lebewesen komplexere Signalsysteme besitzen, mit denen sie auf eine Vielfalt unterschiedlichster Reize reagieren können. Diese beinhalten sowohl interne (wie z.B. Blutdruck, osmotische Bedingungen oder Sauerstoffkonzentration) als auch externe Reize (wie z.B. Licht, Temperatur oder Gerüche). Die weit verbreitetsten Signaltransduktionswege zur Verarbeitung interner und externer Signale in Wirbeltieren beginnen mit der Aktivierung von G-Protein gekoppelten Rezeptoren (engl. *G protein-coupled receptor*, GPCR), einer Klasse von Membranrezeptoren, die durch das Vorhandensein von sieben transmembranären Domänen und durch die Aktivierung eines intrazellulären heterotrimeren Guanosintriphosphat-bindenden Proteins (G-Protein) charakterisiert sind (Rosenbaum *et al.*, 2009). Ihre Vielfältigkeit und Bedeutung wird durch den Umstand hervorgehoben, dass ein Großteil aller durch die Behörde für Lebens- und Arzneimittel (engl. *Food and Drug Administration*, FDA) zugelassenen Medikamente über oder an GPCR wirken (Fang *et al.*, 2015; Garland, 2013).

## 1.1 G-Protein gekoppelte Rezeptoren

GPCR sind membranständige Rezeptoren, die entweder durch diverse externe Liganden (z.B. Photonen in Form von Licht, Signalmoleküle in Form von Geruch oder Geschmack) oder interne Signalmoleküle (wie z.B. Hormone, Neurotransmitter) aktiviert werden können. Die Vielfalt dieser Rezeptorklasse wird verdeutlicht durch die Tatsache, dass alleine im humanen Erbgut mehr als 800 Gene GPCR kodieren (Stevens *et al.*, 2013), und nahezu jegliche physiologische Funktion Signaltransduktionswege durch diese Rezeptoren beinhaltet (Kobilka, 2013; Rosenbaum *et al.*, 2009).

Alle GPCR sind aus sieben transmembranären Domänen aufgebaut, die jeweils aus ca. 20, hauptsächlich hydrophoben Aminosäuren bestehen (Crasto, 2010), und in Form einer  $\alpha$ -Helix die Zellmembran durchspannen (daher auch der alternative Name „7-Transmembran-Rezeptoren“). Neben den Signaltransduktionswegen über G-Proteine können GPCR auch über  $\beta$ -Arrestine agieren. Diese G-Protein-unabhängige Signalkaskade ruft dabei eigene spezifische Konformationsänderungen im Rezeptor hervor (Lefkowitz und Shenoy, 2005). Die unterschiedlichen Transduktionswege können darüber hinaus ineinander integriert werden und sich gegenseitig regulativ beeinflussen. Die Gesamtheit des Signalnetzwerks ermöglicht Zellen die Integration unterschiedlicher z.B. mechanischer, chemischer, elektrischer oder thermischer Reize.

### 1.1.1 Klassifizierung der GPCR

Die am häufigsten verwendete Einteilung erfolgt nach funktionellen Merkmalen, gegeben durch das Vorkommen gemeinsamer charakteristischer und konservierter Motive in die Klassen A (Rhodopsin-ähnlich), B (Sekretin-Rezeptor-Familie), C (metabotrope Glutamat/Pheromon-Rezeptoren), D („*Fungal mating*“ Pheromon-Rezeptoren), E (cyclische AMP-Rezeptoren) und F („*Frizzled/Smoothed*“-Rezeptoren, Wnt-Signalweg, „Wnt“ steht für *Wg* = *Wingless* in *Drosophila* und *Int-1* = Integrase-Gen-1) (Attwood und Findlay, 1994; Kolakowski, 1994). Vertreter der Klassen D und E kommen nicht in Wirbeltieren vor, sondern nur in Hefen und Fadenwürmern. Durch den Vergleich der  $\alpha$ -Untereinheiten des G-Proteins wird eine alternative Einteilung der GPCR in die vier Untergruppen  $G_{i/o}$ ,  $G_s$ ,  $G_{q/11}$  und  $G_{12/13}$  vorgenommen (Simon *et al.*, 1991; Wettschureck und Offermanns, 2005; Worzfeld *et al.*, 2008). 2009 wurde auf einem Gen des Zebrafischs der Code für eine fünfte  $\alpha$ -Untereinheit

entdeckt,  $G_v$ , die von den bekannten Untereinheiten genomisch abzugrenzen ist, jedoch schon genau so lange zu existieren scheint wie die anderen vier Untereinheiten (Oka *et al.*, 2009). Jede der vier ursprünglich definierten Untergruppen  $G_{i/o}$ ,  $G_s$ ,  $G_{q/11}$  und  $G_{12/13}$  kann unterschiedliche Signalkaskaden modulieren (s. Abbildung 1). Als erstes wurde ein G-Protein mit einer stimulierenden Wirkung auf die Adenylylzyklase (engl. *adenylyl cyclase*, AC) entdeckt und fortlaufend  $G_s$  genannt (Sunahara *et al.*, 1996). Zu dieser Gruppe gehören auch die nur im Riechsystem exprimierten  $G_{olf}$  (Jones und Reed, 1989). Anschließend wurde ein weiteres G-Protein identifiziert, welches eine inhibitorische Wirkung auf die AC besitzt, das  $G_i$ -Protein (Taussig und Gilman, 1995). Dieser zweiten Gruppe ist gemein, dass sie sensitiv für eine Inhibition durch Pertussistoxin sind, ein bakterielles Endotoxin, das Keuchhusten verursacht. Die Gruppe der  $G_i$ -Proteine umfasst zahlreiche Mitglieder. Zu ihnen gehören drei  $G_i$ -Isoformen und zwei  $G_o$ -Isoformen („o“ steht für *other*, das G-Protein wurde nach  $G_s$ ,  $G_i$  und Transducin als viertes entdeckt, im Folgenden wird allgemein die Namensgebung  $G_{i/o}$  verwendet). Ebenfalls zu den  $G_{i/o}$ -Proteinen zählen die in der visuellen Signaltransduktion involvierten G-Proteine Transducin – genannt  $G_{t(r)}$  und  $G_{t(c)}$  –, das im Geschmackssystem vorkommende G-Protein Gustducin ( $G_{gust}$ ) und eine noch weitestgehend unbekanntes Isoform  $G_z$  (Kaziro *et al.*, 1991). Eine dritte G-Proteingruppe stellen die  $G_q$ -Proteine dar. Sie sind Pertussistoxin-insensitiv und stimulieren Phospholipase C (PLC), was zu einer Inositoltrisphosphat-vermittelten Freisetzung von Kalzium in der Zelle führt (Smrcka *et al.*, 1991). Diese dritte Familie definiert sich aus den Mitgliedern  $G_q$ ,  $G_{11}$  (daher auch der Name  $G_{q/11}$ ),  $G_{14}$ ,  $G_{15}$ , und  $G_{16}$ . Die vierte Familie besteht aus den  $G_{12/13}$ -Proteinen, die zelluläre Prozesse über RhoGTPase-Guaninnukleotid-Austauschfaktoren (engl. *RhoGTPase nucleotide exchange factors*, Rho-GEF) regulieren. Bekannt sind derzeit vier Säugetier-Rho-GEFs, die sich durch aktivierte  $G_{12/13}$ -Proteine aus dem Zytosol an die Plasmamembran verlagern und dort aktiviert werden. Die aktivierten Rho-GEFs leiten die Signalkaskade an RhoA weiter. Rho-Proteine gehören zur Superfamilie der kleinen GTPasen, welche durch die alternierende Bindung von GDP oder GTP die Funktion eines molekularen Schalters besitzen. RhoA leitet das Signal wiederum an Rho-Kinasen weiter, welche dann Effektorproteine phosphorylieren und letztendlich verschiedene Zellfunktionen regulieren können (Siehler, 2009; Worzfeld *et al.*, 2008).  $G_{12/13}$ -Proteine sind ebenfalls Pertussistoxin-insensitiv und weisen eine relativ geringe Sequenzhomologie zu anderen  $G\alpha$ -Untereinheiten auf (Strathmann und Simon, 1991).

Des Weiteren vermitteln alle bisher bekannten  $G_{12/13}$ -PCR ihre Signale zusätzlich auch über  $G_{i/o}$ - und/oder  $G_{q/11}$ -Proteine (Siehl, 2009).

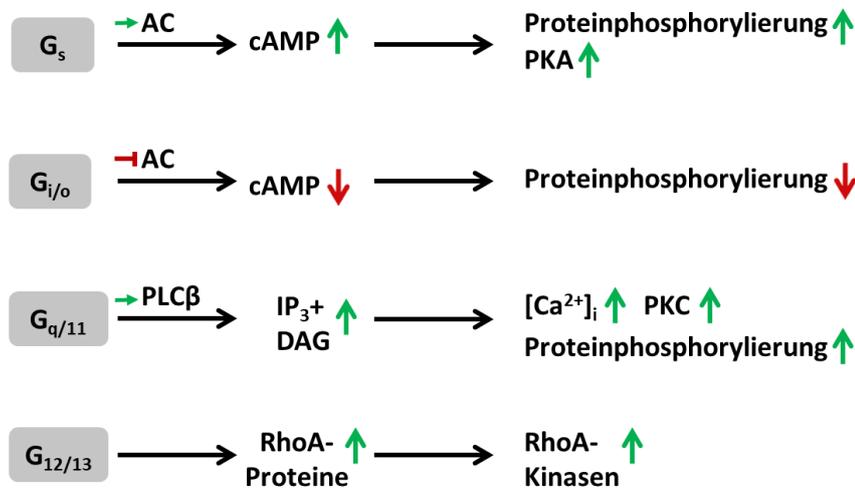


Abbildung 1: Die vier Hauptgruppen der G-Proteine und ihre Signalkaskaden

Jede Gruppe von G-Proteinen (stimulierendes G-Protein  $G_s$ , inhibierendes G-Protein  $G_{i/o}$ ,  $G_{q/11}$ ,  $G_{12/13}$ , graue Rechtecke links) kann auf unterschiedliche Art und Weise spezifische Signalkaskaden regulieren.  $G_s$ -PCR erhöhen durch die Aktivierung der Adenylylcyclase (AC) mit der  $G_{\alpha s}$ -Untereinheit den cAMP-Spiegel in der Zelle, was wiederum mittels der Proteinkinase A (PKA) zur Phosphorylierung von Zielproteinen führt.  $G_{i/o}$ -PCR erniedrigen durch Hemmung der AC durch die  $G_{\alpha i}$ -Untereinheit den cAMP-Spiegel in der Zelle, es findet kaum noch eine Phosphorylierung von Zielproteinen statt. Durch  $G_{q/11}$ -PCR wird mittels deren  $G_{\alpha q}$ -Untereinheit die Phospholipase C  $\beta$  (PLC  $\beta$ ) aktiviert, die aus Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat (PIP<sub>2</sub>) Diacylglycerin (DAG) und Inositoltrisphosphat (IP<sub>3</sub>) bildet, welche dann wiederum den Kalzium-Spiegel in der Zelle erhöhen und die Proteinkinase C (PKC) aktivieren. So kommt es zur Phosphorylierung von Zielproteinen. Die  $G_{\alpha 12/13}$  der  $G_{12/13}$ -PCR aktivieren die RhoA-Signalkaskade, wodurch Proteine durch Rho-Kinasen phosphoryliert werden und Signale weitergeben werden können.

### 1.1.2 Die Rezeptoraktivierung

Detaillierte Kenntnisse über die durch GPCR vermittelten Abläufe zu ermitteln, ist seit über vier Jahrzehnten ein Schwerpunkt der biologisch-medizinischen Forschung. Die genaue Analyse der dynamischen Konformationsänderungen und der genauen Aktivierungsmechanismen von GPCR ist von immenser Bedeutung, da diese Rezeptoren die größte Gruppe an Zielstrukturen für Arzneimittelwirkungen darstellen. Meilensteine in der modernen GPCR-Forschung waren dabei die Visualisierung der Strukturen von Rezeptoren in diversen aktiven und inaktiven Konformationszuständen (Rosenbaum *et al.*, 2009) und die Visualisierung und Lokalisation der ablaufenden Signalkaskaden durch optische Methoden (Lohse *et al.*, 2008). Durch die Auflösung der Kristallstruktur von inzwischen ca. 30 GPCR konnte der exakte Aufbau der Rezeptoren ermittelt und der Aktivierungsvorgang auf molekularer Ebene beschrieben werden (Ghosh *et al.*, 2015; Munk *et al.*, 2016; Venkatakrisnan *et al.*, 2016). Die sieben  $\alpha$ -Helices durchspannen die Membran und sind

dabei abwechselnd durch drei extrazelluläre und drei intrazelluläre Schleifen (engl. intracellular loop, IL) miteinander verbunden. Ein extrazellulärer Amino-Terminus (N-Terminus) und ein intrazellulärer Carboxy-Terminus (C-Terminus) stellen den Anfang und das Ende der Proteinsequenz dar. Die Ligandenbindestelle der GPCR liegt entweder extrazellulär oder transmembranär vor. Jeder Rezeptor wird hochspezifisch durch seine endogenen Liganden reguliert.

Durch das extrazelluläre Binden eines Agonisten findet eine Konformationsänderung im Rezeptor statt, die intrazellulär zur Interaktion mit G-Proteinen führt, welche daraufhin aktiviert werden und die Signalkaskade in die Zelle fortführen. Ob die Interaktion zwischen Rezeptor und G-Protein dabei durch zufällige Kollision der in der Plasmamembran frei lateral diffundierenden Reaktionspartner stattfindet - in der Literatur als „Kollisionskopplung“ beschrieben (Nobles *et al.*, 2005) - oder ob die Rezeptoren schon im inaktiven Zustand mit dem G-Protein verbunden sind, bleibt noch Diskussionsgegenstand (Hein *et al.*, 2005; Jakubik *et al.*, 2011; Oldham und Hamm, 2008).

Die Rezeptorkonformationsänderung ist die Grundlage für die Weiterleitung des Signals in die Zelle, die Signaltransduktion wird so initiiert. Welche konkreten Prozesse ablaufen (G-Protein-abhängige Signalwege,  $\beta$ -Arrestin-abhängige Signalwege, Rezeptordesensitierung und/oder -internalisierung), ist dabei von der durch den jeweiligen Agonisten bestimmten Konformation des Rezeptors sowie von den  $\beta$ -Arrestinen und dem Phosphorylierungsmuster am GPCR abhängig (Lefkowitz und Shenoy, 2005; Liggett, 2011; Shenoy und Lefkowitz, 2005). Untersuchungen haben gezeigt, dass die Wechselwirkungen zwischen G-Proteinen,  $\beta$ -Arrestinen und GPCR von einer hohen Diversität, Geschwindigkeit und Dynamik gekennzeichnet sind (DeWire *et al.*, 2007; Nuber *et al.*, 2016; Park *et al.*, 2016).

#### 1.1.2.1 *Abläufe am Rezeptor und an den Effektorproteinen*

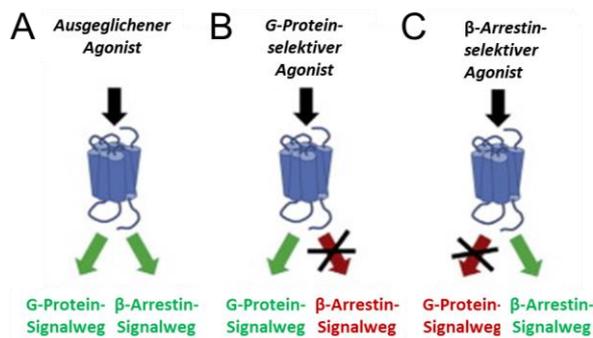
Die Aktivierung der G-Proteine nach Rezeptoraktivierung erfolgt durch den Austausch von Guanosin-5'-diphosphat (GDP) gegen Guanosin-5'-triphosphat (GTP) im G-Protein. Das heterotrimere G-Protein besteht aus einer  $\alpha$ -,  $\beta$ - und  $\gamma$ -Untereinheit (Hamm, 1998). Der Austausch von GDP zu GTP findet an der  $\alpha$ -UE des G-Proteins statt. Es existieren derzeit zwei Modelle, inwiefern die Rezeptorkonformationsänderung dazu führt, dass GDP von der  $\alpha$ -Untereinheit freigegeben wird (Oldham und Hamm, 2008): Im ersten Modell verursacht ein Hebel am N-Terminus der  $\alpha$ -Untereinheit das Wegklappen der  $\beta\gamma$ -Untereinheit, wodurch die Nukleotid-Bindetasche offengelegt wird und GDP freigibt. Ein zweites Modell besagt, dass

die  $\beta\gamma$ -Untereinheit durch die Rezeptorkonformationsänderung näher an die  $\alpha$ -Untereinheit gedrückt wird und so eine Öffnung der Bindetasche und ein Freigeben des GDPs erzwingt. Die Bindung von GTP an die  $\alpha$ -Untereinheit führt zur Destabilisierung des G-Proteins und damit zur Aufspaltung in eine  $\alpha$ - und eine  $\beta\gamma$ -Untereinheit. Ob die beiden Untereinheiten des G-Proteins und der Rezeptor tatsächlich voneinander wegdissoziieren, oder ob sie trotz Aktivierung physisch verbunden bleiben, ist noch nicht vollständig geklärt (Bunemann *et al.*, 2003; Digby *et al.*, 2006).

Die so aktivierten Untereinheiten können dann unterschiedliche Signalwege einleiten. Die  $\beta\gamma$ -Untereinheiten können z.B. direkt G-Protein gekoppelte einwärts gleichgerichtete Kaliumkanäle (engl. *G protein-coupled inwardly-rectifying potassium channels*, GIRKs oder Kir3.X) aktivieren. Effektorproteine der  $\alpha$ -Untereinheit können dagegen die AC oder die PLC sein, die intrazelluläre Signalmoleküle (z.B. zyklisches Adenosinmonophosphat [cAMP], Inositol-1,4,5-trisphosphat [IP<sub>3</sub>] oder Diacylglycerin [DAG]) freisetzen, und so letztendlich den Effekt an der Zielstruktur hervorrufen. Beendet wird der Vorgang durch die Hydrolyse des an die  $\alpha$ -Untereinheit gebundenen GTP zu GDP und H<sub>2</sub>O. Dadurch können die Untereinheiten wieder reassoziieren und die Signalkaskade terminieren.

Insgesamt konnten bislang 21  $\alpha$ -, 6  $\beta$ - und 12  $\gamma$ -Untereinheiten identifiziert werden (Baltoumas *et al.*, 2013; Hermans, 2003; Milligan und Kostenis, 2006). Verschiedene Untereinheiten können intrazellulär unabhängig voneinander verschiedene Signalkaskaden beeinflussen (Chisari *et al.*, 2009). Diese hohe Diversität an G-Proteinen trägt maßgeblich zur Spezifizierung und Diversifizierung der Signalkaskaden bei. Neben den klassischen Signalkaskaden über G-Proteine wird durch GPCR eine weitere alternative Effektorproteingruppe reguliert, die  $\beta$ -Arrestine. Dabei konnte inzwischen gezeigt werden, dass diese nicht nur, wie ursprünglich vermutet, für Rezeptordesensibilisierung und -internalisierung verantwortlich sind (Luttrell und Lefkowitz, 2002), sondern vielmehr eigene, unabhängige Signalkaskaden initiieren (Lefkowitz und Shenoy, 2005). GPCR können dynamisch diverse aktive und inaktive Konformationen einnehmen, und die jeweilige Konformation in Kombination mit bestimmten Schlüsselstrukturen im Rezeptor definiert die genau aktivierte Signalkaskade. Agonisten mit sogenannter funktioneller Selektivität („*biased agonism*“, Abbildung 2) sind dazu in der Lage, spezifische Rezeptorkonformationen hervorzurufen und damit bevorzugt eine von diversen möglichen Signalkaskaden zu initiieren. Der Begriff der funktionellen Selektivität kann sich auf die Liganden beziehen

(„*biased ligands*“), oder auch auf die Rezeptoren, die einen oder mehrere Signalwege selektiv induzieren („*biased signalling*“).



**Abbildung 2: Funktionelle Selektivität/Biased agonism**

Schematische Darstellung von funktionell selektiven Agonisten bzw. Liganden und Rezeptoren. **A** Ein ausgeglichener Agonist ohne Selektivität aktiviert diverse Signalwege gleichzeitig und in ähnlichem Ausmaß. **B** Agonisten mit einer Selektivität für den G-Protein-vermittelten Signalweg induzieren nur die G-Protein-Signalkaskade, die  $\beta$ -Arrestin-Signalkaskade bleibt inaktiv. **C** Agonisten mit einer Selektivität für den  $\beta$ -Arrestin-vermittelten Signalweg induzieren nur die  $\beta$ -Arrestin-Signalkaskade, die G-Protein-Signalkaskade bleibt inaktiv. Angepasst von (Rankovic et al., 2016).

Es konnte inzwischen gezeigt werden, dass sich der G-Protein-vermittelte Signalweg und der  $\beta$ -Arrestin-vermittelte Signalweg zeitlich und räumlich voneinander unterscheiden, und auch pharmakologisch unterschiedliche Wirkungen hervorrufen (Ahn et al., 2004). Es gibt Hinweise darauf, dass auch die mechanische Aktivierung von GPCR eine spezifische Rezeptorkonformation hervorruft (Cabana et al., 2015; Rakesh et al., 2010). Die Aufklärung der genauen Details der dynamischen Konformationsänderungen von GPCR und deren Manipulation bleibt dabei ein wichtiges Ziel in der aktuellen Medikamenten- und Therapieentwicklung (Kenakin und Christopoulos, 2013).

#### 1.1.2.2 Kinetik der GPCR-Signalkaskade

Zur Ermittlung der Reaktionskinetik von GPCR wurde in den letzten Jahrzehnten eine große Anzahl an optisch auslesbaren Sensoren entwickelt, die es ermöglichten, einzelne Teilschritte der Aktivierung zu visualisieren (Hein et al., 2005; Herenbrink et al., 2016; Lohse et al., 2012; Nikolaev et al., 2005; Thomsen et al., 2016; Vilardaga et al., 2009). Dadurch konnten die zeitlichen Parameter für die einzelnen Teilschritte von diversen GPCRs bestimmt werden (Lohse et al., 2012; Stumpf und Hoffmann, 2016). Die Bindung des Liganden und Aktivierung des GPCR erfolgt im Verhältnis relativ schnell (ab 40 ms – 1 s,  $G_s$ -PCR vs.  $G_{i/o}$ -PCR), und die anschließende Rekrutierung des G-Proteins erfolgt ebenfalls zeitnah (ca. 40 ms). Die Kinetik und Spezifität der Rezeptoraktivierung deuten darauf hin, dass Rezeptor und G-Protein schon vor der Agonistenbindung miteinander verbunden sind (Oldham und Hamm, 2008). Hein et al. konnten jedoch keine direkte Interaktion zwischen Rezeptor und G-Protein vor der Agonistenaktivierung beobachten, was für die Theorie der Kollisionskopplung spricht (Hein et al., 2005). Die Aktivierung des G-Protein dauert etwas länger (ca. 0,5 – 5 s)

(Hein *et al.*, 2006), ebenso wie die beginnende Aktivierung oder Hemmung der Adenylylzyklase (ca. 0,5 s). Der Beginn einer effektiven Veränderung des cAMP-Spiegels benötigt daher mindestens 2 – 30 s. cAMP kann dann weitere Effektorproteine regulieren, unter anderem das „*Exchange protein directly activated by cAMP*“ (Epac), welches Zell-Adhäsion, Sekretion und die Bildung von Zell-Zell-Verbindungen reguliert (Cheng *et al.*, 2008). Die cAMP-Hydrolyse durch Phosphodiesterasen (PDE) läuft in lebenden Zellen nach einer Rezeptoraktivierung schneller ab (ca. 15 s) als die zuvor stattgefundene cAMP-Synthese durch AC (ca. 35 s) (Nikolaev *et al.*, 2005). Durch 8-Br-cAMP (membranpermeables cAMP), 3-isobutyl-1-methylxanthin (IBMX, unspezifischer cAMP-Phosphodiesteraseinhibitor) und Forskolin (FSK, AC-Aktivator) können die intrazellulären cAMP-Spiegel pharmakologisch manipuliert werden. Die Inaktivierung der Rezeptoren bei Entfernung des Agonisten erfolgt innerhalb einer Halbwertszeit von ca. 2 s (s. Abbildung 3). Die Beendigung der Rezeptor-G<sub>s</sub>-Protein-Interaktion ist jedoch zeitlich verzögert und dauert, wie am Beispiel des Adenosin A<sub>2A</sub>-Rezeptors gezeigt, ca. 10 s während die Deaktivierung des G<sub>s</sub>-Proteins sogar ca. 25 s (Lohse *et al.*, 2012) dauert. Diese zeitliche Verzögerung führt dazu, dass es zu einer Signalamplifikation in der Zelle kommt (Lohse und Hoffmann, 2014).

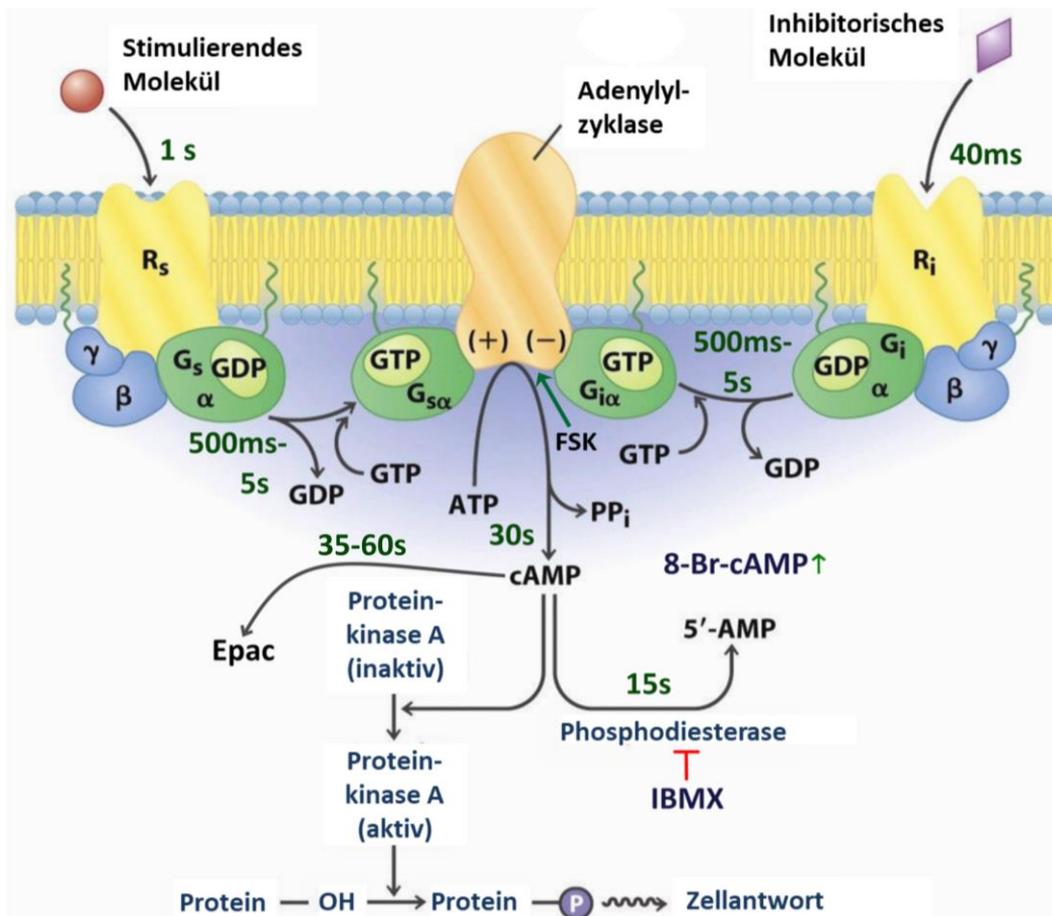


Abbildung 3: Zeitliche Abläufe der GPCR-Aktivierung und beeinflussende Komponenten

Die Bildung des intrazellulären cAMP-Spiegels wird durch stimulierende Hormone (oben links, rote Kugel) oder durch inhibitorische Hormone (oben rechts, lila Raute) bestimmt, Dauer ca. 40 ms – 1 s. Nach Aktivierung des G-Proteins (bestehend aus  $\alpha$ -,  $\beta$ - und  $\gamma$ -Untereinheit) durch Austausch des GDP (inaktives G-Protein) zum GTP (instabiles G-Protein, die  $\alpha$ -Untereinheit dissoziiert ab), aktiviert oder hemmt die  $\alpha$ -Untereinheit die Adenylylcyklase (AC), Dauer ca. 1 – 5 s. Diese katalysiert die Bildung von cAMP aus ATP unter Abspaltung von Diphosphat (Mitte oben), Dauer insgesamt bis zu 30 s. cAMP kann nun als intrazelluläres Signalmolekül u.a. Proteinkinasen aktivieren, die durch Phosphorylierung weitere Zielstrukturen aktivieren können, um so Zellprozesse zu regulieren (links unten). Eine weitere Zielstruktur des cAMP ist das „Exchange Protein directly activated by cAMP“ (Epac), Dauer der Aktivierung ca. 35 – 60 s. Abgebaut wird cAMP durch Phosphodiesterasen (PDE), welche die Umwandlung von cAMP zu AMP (Adenosinmonophosphat) katalysieren (unten rechts), Dauer 15 s. Extern beeinflusst werden kann der intrazelluläre cAMP-Spiegel durch Applikation eines zellpermeablen cAMP-Analogons (8-Br-cAMP), durch IBMX (unspezifischer PDE-Blocker, kein Abbau des vorhandenen cAMPs) oder durch FSK (Aktivierung der AC, vermehrte Bildung von cAMP). Zu beachten ist, dass die Kinetik und das Ausmaß des cAMP-Abbaus der Mikrokompartimentierung von PDE und Epac unterliegen. IBMX = 3-isobutyl-1-methylxanthine, FSK = Forskolin. Angepasst von „Principles of Biochemistry“, 4. Edition, Neena Groover et al. (Grover, 2006).

Insgesamt ist die Aufklärung der genauen zeitlichen und räumlichen Abläufe der cAMP-Bildung sowie die Optimierung der verwendbaren Bestimmungsmethoden nach wie vor von wissenschaftlichen Interesse, da durch die aktuell verfügbaren Methoden noch methodische Restriktionen hinsichtlich der Untersuchung aller G-Protein-Untergruppen bestehen.

## 1.2 Mechanosensitivität

Mechanosensitivität gehört zu den ältesten und einfachsten Mechanismen, mit denen Zellen mit ihrer Umwelt und untereinander kommunizieren können. Sie ist in allen Formen des Lebens ubiquitär verbreitet (Kocer, 2015). Dabei ist diese Eigenschaft nicht nur essentiell für Sinne wie Tasten, das Gleichgewicht und Hören, sondern spielt auch eine entscheidende Rolle bei der Adaptierung von Zellen an Veränderungen in der osmotischen Umgebung, sowie in der Volumenregulation, Zellbewegung und Zellmigration (Kamkin und Kiseleva, 2005).

Der Begriff der Mechanosensitivität vereint drei Teilprozesse: Reizaufnahme, Reizweiterleitung und Zellantwort auf das mechanische Signal. Die Reizaufnahme findet durch biologische Makromoleküle statt, die physikalische Kräfte wahrnehmen können. Anschließend erfolgt die Reizweiterleitung durch die Übertragung der physikalischen Kräfte auf zelluläre Komponenten. Die Zellantwort auf die mechanische Stimulation ist durch einen chemischen, biologischen oder elektrischen Effekt in der Zelle gekennzeichnet. Empfänger der mechanischen Reize können Plasmamembran, extrazelluläre Matrix und Zytoskelett sein. Als Mechanosensoren (Elemente mit der Fähigkeit, mechanische Reize zu erkennen) kommen Ionenkanäle, Zelladhäsionsproteine, membrangebundene Enzyme, Teile des Zytoskeletts oder auch GPCR in Frage (Mederos y Schnitzler *et al.*, 2011).

Ziel der aktuellen Forschung ist es, mögliche Mechanosensoren zu definieren und den genauen Mechanismus der Umwandlung eines mechanischen Stimulus in eine Zellantwort zu analysieren (Delmas *et al.*, 2011; Hamill und Martinac, 2001; Kung, 2005; Mederos y Schnitzler *et al.*, 2016; Nilius und Honore, 2012; Ranade *et al.*, 2015). Die Differenzierung zwischen Reizübermittlern und tatsächlich mechanosensitiven Elementen ist häufig problematisch. Direkte und inhärente Mechanosensoren sollten daher folgende experimentellen Definitionen erfüllen (Ernstrom und Chalfie, 2002; Mederos y Schnitzler *et al.*, 2011):

- Der Mechanosensor sollte bei der Beobachtung einer mechanischen Aktivierung in einer räumlich sinnvollen Weise in der untersuchten Zelle vorhanden sein.
- Die Zellantwort sollte in einem zeitlichen Rahmen ablaufen, der zur physiologischen Aktivierungszeit des jeweiligen Mechanosensors passt. Die Reaktionszeiten bewegen

sich hierbei im Rahmen von Mikro- bis Millisekunden (membrangebundene Enzyme:  $<50 \mu\text{s}$ , Ionenkanäle:  $<5 \text{ ms}$ , GPCR:  $<500 \text{ ms}$ ). Der physiologisch adäquate Rahmen sollte sowohl bei dem applizierten mechanischen Reiz als auch bei der Proteinreaktion eingehalten werden.

- Der mechanische Reiz sollte eine für diesen Reiz spezifische Modifikation im Mechanosensor hervorrufen, wie z.B. eine erkennbare Konformationsänderung.
- Um zu zeigen, dass die Mechanosensitivität des untersuchten Proteins tatsächlich eine intrinsische Eigenschaft darstellt, muss der aufgereinigte und in einem künstlichen Milieu eingebrachte Mechanosensor weiterhin in der Lage sein, einen mechanischen Reiz aufzunehmen und Effektorproteine zu aktivieren.
- Zwischen der Aktivierung des Mechanosensors und dem mechanischen Reiz muss eine klare Abhängigkeit vorliegen, wie etwa die Offenwahrscheinlichkeit bei Ionenkanälen, die Stärke der G-Protein-Rekrutierung bei GPCR oder die Geschwindigkeit der ablaufenden Reaktion bei membrangebundenen Enzymen. Spezifische Manipulationen durch Blocker, Inhibitoren, inverse Agonisten oder Herabregulation des Mechanosensors sollten möglich sein.

### 1.2.1 *Mechanosensitive Strukturen*

Jede Zelle eines lebendigen Wesens wird beständig einer Vielzahl von mechanischen Reizen ausgesetzt, sei es durch Zellbewegungen, Gravitationsdruck, zusammendrückende oder auseinanderziehende Kräfte sowie Scherkräften verursacht durch Flüssigkeitsströme. Damit Zellen in der Lage sind, auf diese Reize zu reagieren, benötigen sie Mechanosensoren. Verschiedene Komponenten der Zelloberfläche können als Mechanosensoren dienen.

#### 1.2.1.1 *Ionenkanäle*

Ionenkanäle, die auf mechanische Stimuli reagieren können, kommen in unterschiedlichen Zelltypen vor, wie z.B. in Spinalganglien-innervierenden Neuronen (Delmas *et al.*, 2011; McCarter *et al.*, 1999), in Nervenzellen des Hinterwurzelganglions (Schrenk-Siemens *et al.*, 2015), in Haarsinneszellen im Innenohr (Beurg *et al.*, 2006; Gillespie und Muller, 2009), in Erythrozyten (Albuisson *et al.*, 2013), oder in den glatten Muskelzellen der Pulmonalarterien (Ducret *et al.*, 2010). Zu den ersten elektrophysiologisch charakterisierten mechanosensitiven

Ionenkanälen zählen die drei prokaryotischen Kanäle MscM, MscS und MscL („*Mechanosensitive channel of mini, small or large conductance*“) (Berrier *et al.*, 1996). Sie unterscheiden sich in ihrer Leitfähigkeit, Öffnungswahrscheinlichkeit und Selektivität. Der MscL-Kanal wird direkt über die Lipidzusammensetzung der Membran reguliert, der MscS ist dahingegen spannungsabhängig. Ein weiterer, früh entdeckter mechanosensitiver Kanal kommt aus der Familie der epithelialen Natriumkanäle („*Epithelial Na<sup>+</sup> channel*“, ENaC). In Säugetierzellen konnte eine deutliche Modulation des Kanals durch Scherkräfte gezeigt werden (Althaus *et al.*, 2007). Der Volumen-regulierte Anionen-Kanal („*Volume regulated anion channel*“, VRAC) wird durch Zellschwellung aktiviert. Bis heute konnten zwar Komponenten des Kanals identifiziert werden (Voss *et al.*, 2014), aber ob der Kanal durch Änderungen in der Ionenkonzentration, seitlich ausgeübte Scherkräfte an der Membran oder durch ein Zusammenspiel mit weiteren Makromolekülen aktiviert wird, ist nach wie vor unklar. Neuere Forschungsarbeiten enthüllten zwei weitere Gruppen von mechanisch aktivierbaren Ionenkanälen, TMC-Proteine („*Transmembrane channel-like*“) sowie Piezo1 und -2 (Coste *et al.*, 2010; Kawashima *et al.*, 2015). TMC-Proteine werden in Haarsinneszellen exprimiert, Piezo1 und -2 in Blase, Haut, Lunge und Grimmdarm. TRP-Kanäle („*Transient receptor potential*“) besitzen in vielen verschiedenen Spezies ebenfalls mechanosensitive Eigenschaften. Einige Mitglieder der TRP-Familie wurden im Zusammenhang mit direkter Mechanosensitivität oder als Übermittler der mechanosensitiven Eigenschaft diskutiert (Liu und Montell, 2015; Plant, 2014). Mitglieder der TRPC-Familie werden bisher als nicht mechanosensitiv eingestuft, können jedoch in Komplexen mit anderen Strukturen wie Orai1 („*Calcium release-activated calcium channel protein 1*“) oder Phospholipasen zur Mechanosensitivität führen (Sexton *et al.*, 2016).

#### 1.2.1.2 *G-Protein gekoppelte Rezeptoren*

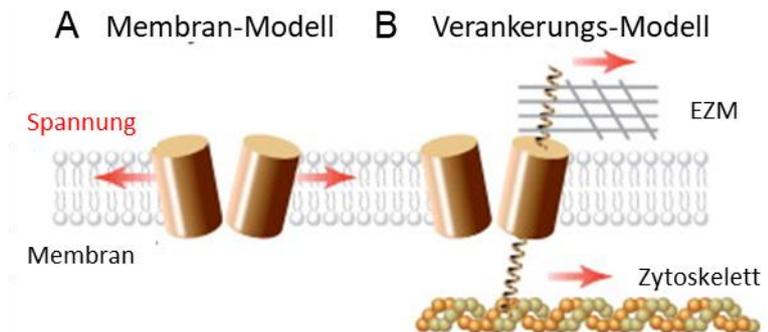
Über die letzten fünf Jahre konnte gezeigt werden, dass GPCR ebenfalls als Mechanosensoren fungieren können (Storch *et al.*, 2012). Der in dieser Hinsicht am besten untersuchte Vertreter, der humane Angiotensin-II-Rezeptor-Subtyp-1 (AT<sub>1</sub>R) aus der Subfamilie der G<sub>q/11</sub>-PCR, kann Agonisten-unabhängig durch einen mechanischen Reiz aktiviert werden (Mederos y Schnitzler *et al.*, 2011), und trägt damit zur Dehnungs-induzierten Hypertrophie von Myozyten bei (Zou *et al.*, 2004). Des Weiteren konnten diese Rezeptoren zusammen mit dem Cysteinyl-Leukotrien-Rezeptor 1 (CysLT<sub>1</sub>R) als Vermittler der myogenen Vasokonstriktion (auch Bayliss-Effekt genannt) identifiziert werden (Mederos y

Schnitzler *et al.*, 2011; Storch *et al.*, 2015). Aus derselben Subfamilie wurde auch der Bradykinin-2-Rezeptor ( $B_2R$ ) untersucht. Bei der Expression in Endothelzellen aus der Rinderaorta konnte mittels FRET-Technik eine Konformationsänderung nach der Applikation von hypotoner Lösung oder Scherkräften beobachtet werden (Chachisvilis *et al.*, 2006). Ähnliche Ergebnisse konnten auch bei Vertretern aus anderen Subfamilien der GPCR ermittelt werden. Der Parathyroidhormon-Rezeptor-1 (PTH1R) koppelt  $G_s$ - und  $G_{q/11}$ -Proteine, der Dopamin- $D_5$ -Rezeptor ( $D_5R$ ) ist  $G_s$ -Protein-gekoppelt. Beide Rezeptoren sind mechanisch aktivierbar (Abdul-Majeed und Nauli, 2011; Zhang *et al.*, 2009). Die Fähigkeit zur mechanischen Aktivierbarkeit konnte am  $G_s$ -Protein gekoppelten adrenergen  $\beta_2$ -Rezeptor nicht gezeigt werden (Mederos y Schnitzler *et al.*, 2008; Zou *et al.*, 2004). Unter den  $G_{i/o}$ -PCR wurde beim humanen 5-Hydroxytryptamin-1B-Rezeptor ( $5-HT_{1B}R$ ), der unter anderem in Knochenzellen exprimiert wird, unter einem mechanischen Stimulus eine Veränderung in der Konformation detektiert (Candelario und Chachisvilis, 2012).

### 1.2.2 Modelle zur mechanischen Aktivierung

Mechanosensitive Strukturen sind meist in die Plasmamembran integrierte Proteine wie Ionenkanäle, Rezeptoren oder Enzyme, die eine Veränderung im Druckprofil der Membran wahrnehmen können. Membranen sind aus einer Doppellipidschicht aufgebaut und bilden damit eine hydrophobe Barriere zwischen dem Zytoplasma und dem Extrazellularraum. Mit einem Durchmesser von 6-10 nm sind sie aus amphiphilen Phospholipiden zusammengesetzt, wobei die hydrophilen Phosphatköpfchen nach außen zeigen und die lipophilen Schwanzgruppen (Kohlenwasserstoffketten) nach innen gewandt sind. So entsteht im wässrigen Milieu eine Doppelschicht, die nahezu undurchlässig für Wasser, aber mechanisch sehr flexibel. Reize können durch Druck, Schub, Zug, Dehnung, Auslenkung oder Scherung an der Membran entstehen. Ändert sich das Kräfteprofil der Membran durch einen dieser Reize oder durch Abbau eines Membranproteins, passt sich die Membran den neuen Gegebenheiten an und damit auch die noch vorhandenen integrierten Membranproteine. Dies geschieht durch die Einnahme einer energetisch günstigen Konformation. Derzeit beschreiben zwei Modelle wie integrierte Membranproteine mechanische Reize wahrnehmen können. Das Membran-Modell („*membrane model*“ oder „*bilayer model*“) postuliert, dass die Steuerung mechanosensitiver Strukturen, die innerhalb der Membran verankert sind, über mechanisch verursachte Deformation der Membran oder

Veränderungen in der Membranspannung erreicht wird (Christensen und Corey, 2007). Das Verankerungs-Modell („*Tethered model*“, engl. *tether* = Spannseil, Anker) besagt, dass die mechanosensitiven Strukturen mit intrazellulären Komponenten des Zytoskeletts und/oder Bestandteilen der extrazellulären Matrix verbunden sind. Die Übertragung des mechanischen Reizes erfolgt hier über die mit dem Mechanosensor verknüpften Komponenten (Hamill und Martinac, 2001).



**Abbildung 4: Modelle zur mechanischen Reizwahrnehmung**

**A** Im Membran-Modell überträgt sich eine Deformation oder Änderung in der Membranspannung (rote Pfeile) auf den Mechanosensor (braune Zylinder). **B** Im Verankerungs-Modell bewirken mechanische Kräfte (rote Pfeile) an intrazellulären Komponenten wie der extrazellulären Matrix (EZM, graues Gitter) oder dem Zytoskelett (orange-weiße Helix) durch einen Anker am Mechanosensor (braune Zylinder) dessen Aktivierung. Angepasst von (Nilius und Honore, 2012).

Zusammengefasst kann gesagt werden, dass unabhängig vom Übertragungsmodell eine Veränderung des Kräfteprofils durch den mechanischen Reiz zu einer Konformationsänderung im Mechanosensor führt, die wiederum in der Aktivierung einer Signalkaskade resultiert. Im Falle von Ionenkanälen bewirkt die Krafteinwirkung eine Deformation des Kanals und damit eine Veränderung im Aktivitätszustand (Sukharev und Sachs, 2012). GPCR nehmen durch die Veränderung der Membranspannung und der Membranfluidität eine neue Rezeptorkonformation ein, die zu einer Beeinflussung der G-Protein-Affinität führt (Deupi und Kobilka, 2010).

### 1.3 Darstellung der Mechanosensitivität von G-Protein gekoppelten Rezeptoren in der Elektrophysiologie

Die vorliegende Arbeit untersucht die mechanische Aktivierbarkeit  $G_{i/o}$ -Protein gekoppelter Rezeptoren. Dazu wurden Kandidaten gewählt, die vermehrt an Orten exprimiert werden, in denen mechanische Reize eine übergeordnete Rolle spielen, wie z.B. in Blutgefäßen, in der glatten Muskulatur, im Herzen, in der Lunge oder im Magen-Darm-Trakt. Speziell werden der

h5-HT<sub>1B</sub><sup>-</sup>, hα<sub>2A</sub><sup>-</sup>, hM2<sup>-</sup>, und der hμ-Rezeptor in elektrophysiologischen Messungen untersucht. Zur Frage der Verallgemeinerung der Ergebnisse für andere Subklassen wurden der G<sub>s</sub>-Protein gekoppelte adrenerge hβ<sub>2</sub>-Rezeptor sowie die primär über G<sub>s</sub>-Proteine koppelnden h5-HT<sub>7A</sub><sup>-</sup>, hCGRP- und hVPAC1-Rezeptoren analysiert. Zur Untersuchung der GPCR-Aktivierung können die Rezeptoren mit Ionenkanälen koexprimiert werden, die durch GPCR reguliert werden. Durch Darstellung der Ionenkanal-vermittelten Stromveränderungen bei der Durchführung elektrophysiologischer Experimente kann so neben der Agonistenaktivierung auch die mechanisch induzierte Aktivierbarkeit GPCR dargestellt werden. Mögliche GPCR-regulierte Ionenkanäle sind Kir-Kanäle oder TRPC5-Kanäle.

#### 1.3.1.1 Kir-Kanäle

Kir3.X-Kanäle werden direkt durch Liganden-aktivierte Pertussistoxin-sensitive GPCR aktiviert (s.1.1.2.1). Dabei stellt die βγ-Untereinheit eines durch die Rezeptoraktivierung dissoziierten G<sub>i/o</sub>-Proteins den Signalübermittler an die einwärts gleichgerichteten Ionenkanäle dar (Dascal, 1997; Hibino *et al.*, 2010; Yamada *et al.*, 1998). Der Name beschreibt die Tatsache, dass Ionen (in diesem Fall K<sup>+</sup>) durch den Kanal in eine Richtung effektiver fließen als in die andere Richtung. Dieses Phänomen entsteht dadurch, dass die Kanäle in der Regel bei Ruhemembranpotentialen (-70 bis -80 mV) geöffnet sind. Bei Potentialen negativer dem Gleichgewichtspotential von Kalium kommt es zu einem Einstrom von Kalium in die Zelle. Bei einer Depolarisation von positiver als -50 mV werden die Kanäle jedoch durch positiv geladene Polyamine oder intrazelluläres Magnesium geblockt, so dass kein Kaliumausstrom mehr stattfinden kann. Dadurch entsteht das Phänomen der Einwärts-Gleichrichtung der Kanäle (Hibino *et al.*, 2010), welches dazu dient, das Ruhemembranpotential von erregbaren Zelltypen wie z. B. Herzmuskelzellen oder Neuronen zu stabilisieren.

Obwohl Kir3.1-Kanäle in einem Überexpressionssystem Homotetramere bilden, konnte in Säugetierzelllinien kein funktioneller homotetramerer Kanal nachgewiesen werden (Corey *et al.*, 1998). Endogen kommen in vielen verschiedenen Zelltypen und Geweben jedoch Heterotetramere aus Kir3.1- und Kir3.2- bzw. aus Kir3.1- und Kir3.4-Untereinheiten vor (Krapivinsky *et al.*, 1995). Es konnte speziell gezeigt werden, dass die hier verwendeten Kombinationen aus Kir3.1/Kir3.2- und Kir3.1/Kir3.4-Untereinheiten größere Stromamplituden zeigen als die getrennt exprimierten Untereinheiten (Dascal, 1997; Wischmeyer *et al.*, 1997; Yamada *et al.*, 1998). Dabei sollten die Untereinheiten optimalerweise in einem 2:2-

Verhältnis vorliegen und gleiche Vertreter diagonal positioniert sein, z.B. in der Reihenfolge Kir3.1-Kir3.4-Kir3.1-Kir3.4 (Corey *et al.*, 1998).

### 1.3.1.2 **TRP-Kanal der klassischen/kanonischen Unterfamilie 5**

TRPC beschreibt die klassische (engl. *classical* oder *canonical*) Unterfamilie der TRP-Kanäle, bestehend aus sieben Vertretern, TRPC1-TRPC7. TRPC sind basal-aktive, nicht-selektive, kalziumpermeable Kationenkanäle, wobei der TRPC5 durch GPCR aktiviert werden kann (Schaefer *et al.*, 2000; Yamada *et al.*, 2000). Klassischerweise wird er Phospholipase C (PLC)-abhängig in Folge einer Aktivierung von  $G_{q/11}$ -Protein gekoppelten Rezeptoren aktiviert (Clapham *et al.*, 2005). Inzwischen ist allerdings bekannt, dass TRPC5 auch durch andere GPCR-Subfamilien aktiviert werden kann, wie z.B. durch  $G_{i/o}$ -PCR (Beech, 2013; Jeon *et al.*, 2012; Jeon *et al.*, 2016; Kim *et al.*, 2012; Lee *et al.*, 2003; Miller *et al.*, 2011) und möglicherweise durch  $G_s$ -PCR (Hong *et al.*, 2012). Dabei muss bedacht werden, dass manche GPCR in der Lage sind mit mehr als einem G-Protein-Subtyp zu interagieren (Rajagopal *et al.*, 2010; Rosenbaum *et al.*, 2009).

## 1.4 *Darstellung der Mechanosensitivität von G-Protein gekoppelten Rezeptoren mittels Förster-Resonanzenergietransfer-Technik*

Eine Alternative zur Koexpression von Ionenkanälen und folgender elektrophysiologischer Ableitung besteht in der Verwendung optischer Methoden zur Untersuchung von GPCR-Aktivität. Davon beruhen die meisten der derzeit existierenden Methoden auf dem Prinzip des Förster-Resonanzenergietransfers (FRET) (Lohse *et al.*, 2012). FRET beschreibt das Phänomen der strahlungslosen Energieübertragung zwischen einem Donor-Fluorophor und einem Akzeptor-Fluorophor. Nach Anregung des Donors kommt es zum Energietransfer vom Donor zum Akzeptor. Dieser ist entweder durch die Abnahme der Strahlungsintensität und der Fluoreszenzlebensdauer des Donors oder durch die nach der Energieübertragung stattfindende Emission des Akzeptors messbar. Da die Energieübertragung zwischen Donor und Akzeptor maßgeblich von der physischen Distanz zwischen den zwei Molekülen bestimmt wird, kann die FRET-Effizienz direkt als Messmethode zur Untersuchung der räumlichen Anordnung von Proteinen verwendet werden. Im Englischen wird diese Methode „*sensitized emission*“ (SE) genannt (van Rheenen *et al.*, 2004) und wird als Ratio zwischen der Donor- und der Akzeptoremission dargestellt. Die FRET-Technik wurde innerhalb der

letzten Jahre zu einer immer wichtigeren Methode, da es dadurch möglich ist, Molekül-Interaktionen in zahllosen biologischen Anwendungsbereichen zu detektieren (Shrestha *et al.*, 2015). So können nicht nur Protein-Protein-Wechselwirkungen (intermolekulare Ereignisse) untersucht werden (Aguila *et al.*, 2011; Hidaka *et al.*, 2016; Storch *et al.*, 2017), sondern z.B. auch Konformationsänderungen innerhalb eines Proteins (intramolekulare Ereignisse) (Depry und Zhang, 2010; Doucette *et al.*, 2016; Takanaga *et al.*, 2008). Je nach Zielsetzung einer Arbeit werden dazu Fluorophore, zwischen denen ein Energietransfer stattfinden kann („FRET-Paare“) (Bajar *et al.*, 2016), entweder an zwei vermutlich interagierenden Proteinen eingebracht oder an geeigneten Positionen in einem Protein. Wird die stimulus- oder zeitabhängige Veränderung des Signals beobachtet, spricht man von einer dynamischen FRET-Messung. Die FRET-Effizienz wird definiert als der Anteil an Energie, der von einem Donor-Molekül auf ein Akzeptor-Molekül übertragen wird. Die Überlappung zwischen dem Emissionsspektrum des Donors und des Akzeptors ermöglicht eine gute FRET-Effizienz (Müller *et al.*, 2013; Sun *et al.*, 2011). Die Effizienz ist abhängig von den Fluorophoren selbst, von deren Abstand und Orientierung zueinander sowie von dem umgebenden Medium. So kann ein FRET-Signal detektiert werden, wenn die beiden Fluorophore näher als 10 nm zueinanderstehen (Takanishi *et al.*, 2006). Über die letzten Jahrzehnte hat die Auswahl der verfügbaren fluoreszierenden Proteinen zugenommen, wobei sich jede neue Variante in ihrer Farbe, ihrer Leuchtdichte oder anderen Eigenschaften von den bisherigen Versionen unterscheidet (Giepmans *et al.*, 2006). Auf dem Gebiet der türkis-fluoreszierenden Proteine ist das monomere Turquoise2 (mTurquoise2) mit seiner sehr hohen Leuchtdichte der derzeitige Standard (Dean und Palmer, 2014; Goedhart *et al.*, 2012). Es besitzt eine hohe Photostabilität und zeigt eine strikt monoexponentielle Fluoreszenzabnahme auf. Der gelbe Fluorophor monomericVenus (mVenus) weist verbesserte Eigenschaften hinsichtlich pH-Wert- und Chloridkonzentrationsänderungen auf und erlangt schneller seine proteinchemische Reife (engl. *maturation time*) (Nagai *et al.*, 2002), was ein klarer Vorteil gegenüber YFP ist (Kremers *et al.*, 2006). Eine weitere Strategie um gesteigerte FRET-Effizienzen (bei geringer Dimerisierung) zu erhalten, ist die Verwendung von zirkulär permutierten Doppel- bzw. Tandem-Akzeptoren (Baird *et al.*, 1999; Topell *et al.*, 1999). Bei der Messung eines intramolekularen FRET gibt es neben der direkten Einbringung der fluoreszierenden Moleküle in das Zielprotein eine alternative Variante. Hier findet die Fluoreszenzmarkierung der Rezeptoren nicht auf DNA-Ebene statt, sondern wird erst nach

der Proteinexpression durch spezielle Markierungsmethoden vorgenommen. In den Rezeptor wird dabei nur ein Bindemotiv für einen Fluorophor, wie z.B. das gelb fluoreszierende, arsenhaltige Fluoreszeinderivat FAsH, inkliniert (Hoffmann *et al.*, 2010). Da dieses Motiv vier Cysteine enthält, spricht man auch von einem Tetracystein-Bindemotiv. Durch die geringe Größe können diese jedoch an beinahe jeder beliebigen Stelle im Protein eingefügt werden und erlauben die spezifische Fluoreszenzmarkierung einer Zielstruktur *in vivo*.

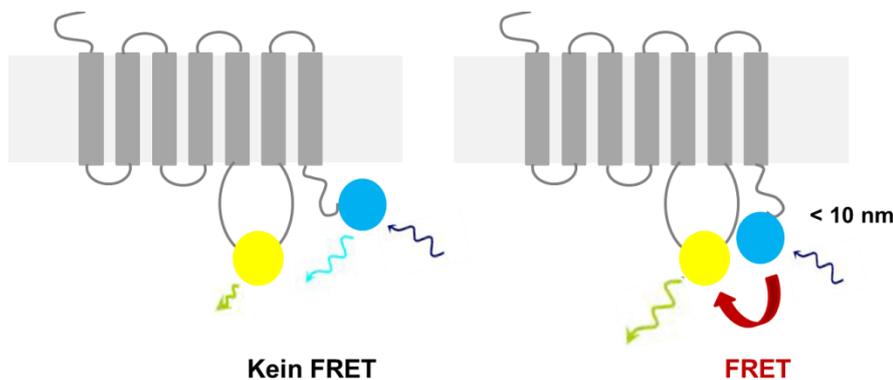
#### 1.4.1 Epac-Sensoren

Das intrazelluläre Signalmolekül cAMP wirkt in spezialisierten, subzellulären Kompartimenten innerhalb der Zelle, was den Begriff der „Kompartimentierung“ geprägt hat (Berrera *et al.*, 2008; Ellisdon und Halls, 2016; Zaccolo und Pozzan, 2002). Die Messung von cAMP Aktivität mit subzellulärer Auflösung ist jedoch schwierig, da die klassisch angewandte biochemische Methode des Radioimmunassay (Brooker *et al.*, 1979; Williams, 2004) keine Aussage über die zeitlichen und räumlichen Abläufe in lebenden Zellen erlaubt. Eine optische Alternative bieten hier die für FRET-Messungen entwickelten cAMP-Sensoren. Sie basieren auf dem cAMP-regulierten Protein Epac. Dieses hat die Funktion eines Guaninnukleotid-Austauschfaktors (engl. *guanine-nucleotide-exchange factor*, GEF), der die Aktivität des molekularen Schalter-Proteins Rap (engl. *Ras-related protein*, GTPase aus der Ras-Superfamilie) reguliert. Epac ist ein cAMP-geregelter GEF, welcher einen GDP/GTP-Austausch begünstigt. Damit beeinflusst es direkt die Aktivierung von Rap und als Folge dessen viele verschiedene zelluläre Funktionen und Regulationsmechanismen. Die hoch-affinen cAMP-Bindestellen sind bei beiden Isoformen Epac1 und Epac2 N-terminal lokalisiert. Epac2 besitzt darüber hinaus eine zweite cAMP-Bindestelle mit geringerer Affinität (Schmidt *et al.*, 2013). Auf den biologischen Erkenntnissen basierend wurde daraus ein direkter Sensor für cAMP entwickelt (DiPilato *et al.*, 2004; Nikolaev *et al.*, 2004; Ponsioen *et al.*, 2004). Dieser Epac-basierte cAMP-Sensor reagiert auf die Bindung von cAMP mit einer Konformationsänderung, die in einer vergrößerten physischen Distanz zweier eingebauter Fluophore resultiert (Rehmann *et al.*, 2007), und sich als Abnahme einer FRET-Effizienz optisch messen lässt. Damit ist es möglich, Veränderungen des cAMP-Spiegels in Zellen zeitlich und räumlich aufgelöst auf Einzelzellebene zu untersuchen. Die Sensoren werden bereits auf vielfältige Art verwendet, hauptsächlich um cAMP-Spiegelzunahmen nach G<sub>s</sub>-

PCR-Aktivierung nachzuverfolgen (Borner *et al.*, 2011; Godinho *et al.*, 2015; Nikolaev *et al.*, 2004; Vardjan *et al.*, 2014).

#### 1.4.2 Rezeptor-FRET-Sensoren

Molekulare Abläufe, wie z.B. die mechanische Aktivierung von GPCR, können durch FRET-Technik direkt am Rezeptor untersucht werden. Dies ist möglich durch den Einsatz von spezifisch entwickelten Rezeptormutanten (Rezeptor-FRET-Sensoren oder Rezeptorsensoren) (Lohse *et al.*, 2003; Vilardaga *et al.*, 2003). Vergleichbar wie in Epac-basierten cAMP-Sensoren werden dabei zwei FRET-taugliche Fluorophore an spezifischen Positionen in die Rezeptorenstruktur eingefügt (s. Abbildung 5). Ein Fluorophor befindet sich dabei in der dritten intrazellulären Schleife (engl. *intracellular loop*, IL3), ein Zweiter am C-Terminus des Rezeptors.



**Abbildung 5: Rezeptor-Sensoren**

**Links:** Schematische Darstellung eines GPCR, der in der IL3 (gelber Kreis) und am C-Terminus (blauer Kreis) mit einem Fluorophor markiert ist. Bei zu großem Abstand kann kein Energietransfer stattfinden. **Rechts:** Darstellung eines Rezeptorsensors, bei dem ein FRET stattfinden kann, da die beiden Fluorophore näher als 10 nm und in der richtigen Orientierung zueinanderstehen. Angepasst von Laborunterlagen Arbeitsgruppen Storch/Mederos 2015.

Zwischen den Fluorophoren kann je nach Rezeptorkonformation ein Energietransfer stattfinden, der durch FRET detektiert wird. Dabei kommt es zu Signaländerungen wenn die Fluorophore aufgrund einer Bewegung im Rezeptor (in der transmembranären Domäne 6) ihre relative Position verändern. Auf der Grundlage, dass bei FRET-Messungen eine Abstandsabhängigkeit für eine Signaldetektion vorherrscht, kann bei einer FRET-Abnahme davon ausgegangen werden, dass sich die Fluorophore voneinander entfernen, da bei einer Distanzzunahme weniger Energie vom Donor auf den Akzeptor übertragen werden kann. Die gleichen Annahmen bestehen bei einer FRET-Signalzunahme in umgekehrter Weise. Eine Variante des intramolekularen FRET an Rezeptorsensoren stellt der Einsatz eines

Tetracystein-Bindemotivs dar, an welches in einer kurzen Prozedur direkt vor dem Experiment das gelb fluoreszierende FIAsh geheftet wird.

### 1.5 Zielsetzung der Arbeit

Die GPCR-vermittelten Signalkaskaden sind hinsichtlich ihrer Effektorproteine und Aktivierbarkeit durch Agonisten ausführlich beschrieben worden. Die Aufklärung der Aktivierung von GPCR aller Subfamilien durch einen mechanischen Stimulus ist jedoch noch weitestgehend unbekannt. Im Zuge dieser Arbeit soll aufgeklärt werden,

- ob mittels Ionenkanal-basierten (Kir-Kanäle und TRPC5) elektrophysiologischen Messsystemen die mechanische Aktivierbarkeit auch für  $G_{i/o}$ -PCR und  $G_s$ -PCR demonstriert werden kann.
- ob eine systematische Charakterisierung von Epac-basierten cAMP-Sensoren die Etablierung einer vielseitig anwendbaren Messmethode ermöglicht, um  $G_{i/o}$ -PCR-vermittelte cAMP-Spiegelabnahmen (Agonisten- oder mechanisch-induziert), robust und mit zeitlicher und räumlicher Auflösung zu visualisieren.
- ob Rezeptorsensoren mittels FRET-Technik die mechanische Aktivierbarkeit von  $G_{i/o}$ -PCR zeigen können.
- inwiefern sich die Ergebnisse der untersuchten Rezeptoren und angewandten Messsysteme unterscheiden. Dabei ist das Ziel die Etablierung eines Messsystems zur optimierten Darstellung einer mechanisch induzierten Aktivierung sowie die Quantifizierung der Mechanosensitivität verschiedener GPCR.

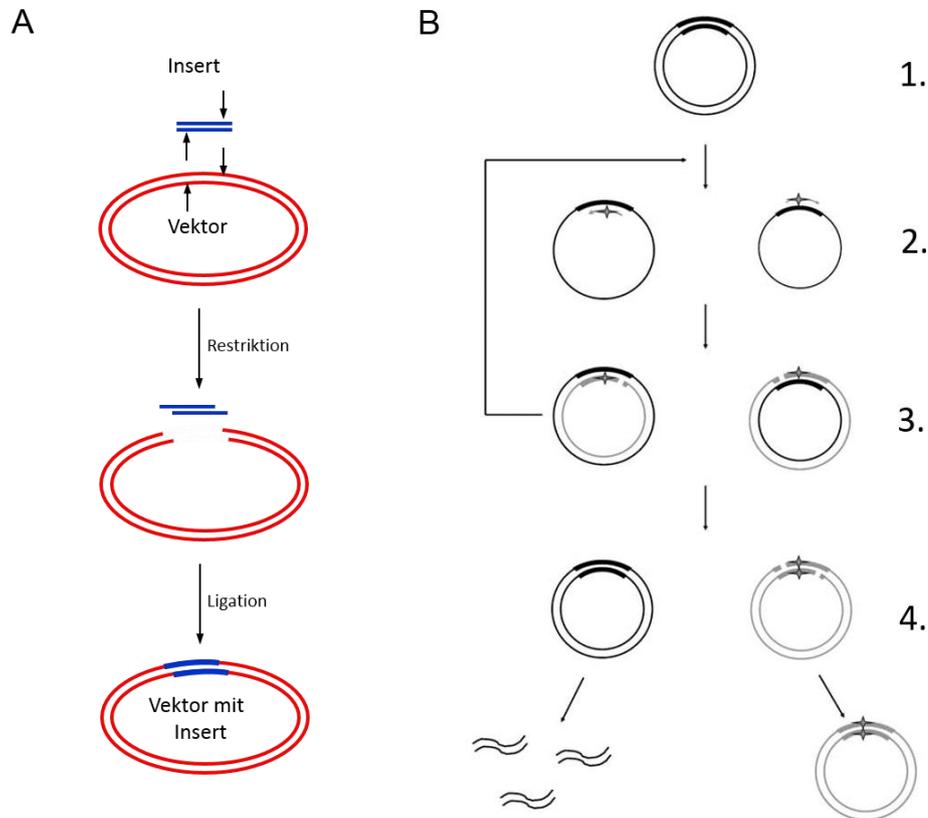
## 2 Material und Methoden

### 2.1 Molekularbiologische Methoden

Die in der vorliegenden Arbeit verwendeten molekularbiologischen Methoden dienten dazu, eine gezielte Veränderung an einer vorhandenen DNA-Sequenz vorzunehmen. Meist dient dazu als DNA ein selbst-replizierendes Plasmid (in der Gentechnik auch Vektor genannt), das die massenhafte Vermehrung dieses veränderten DNA-Fragmentes erlaubt. Dabei kann unterschieden werden, ob eine DNA-Polymerase, also ein Enzym, welches die Synthese von DNA aus Desoxyribonukleotiden katalysiert, zur Anwendung gekommen ist oder nicht (Gabrowski, 2005). Mit der klassischen Klonierung ohne DNA-Polymerase wurde in einem Vektor der zu mutierende Bereich mit zwei Restriktionsenzymen herausgeschnitten und mit einem doppelsträngigen DNA-Fragment ligiert (Abbildung 6A). In diesem Falle wurde das Fragment mittels Polymerase-Kettenreaktion (engl. *Polymerase Chain Reaction*, PCR, s. 2.1.3) generiert. Der Ausgangs-Vektor und das amplifizierte DNA-Fragment wurden ligiert (s. 2.1.8.2.6). Bei Mutagenesen, die DNA-Polymerasen verwenden, fand die gezielte Veränderung der DNA durch zwei Primer statt, die einmal positiv-strängig- und einmal negativ-strängig ansetzten und die die gewünschte(n) Mutation(en) enthielten (s. Abbildung 6B). Mit dieser Methode wurden eine oder mehrere Punktmutation(en) pro Ausgangs-Vektor durchgeführt (s. 2.1.9). In einer weiteren Variante kam die thermostabile Q5<sup>®</sup> High-Fidelity DNA Polymerase (New England Biolabs, Frankfurt am Main, Deutschland) zum Einsatz. Diese zeichnet sich durch hohe Effektivität aus und wurde verwendet, um mittels PCR ein 18-Basen-Nukleotid an einer spezifischen Stelle im Ausgangs-Vektor einzufügen (s. 2.1.10). Nach der gezielten Veränderung durch eine der oben beschriebenen Methoden wurde die amplifizierte, mutierte DNA in DH5 $\alpha$ -E. coli-Bakterien transformiert. Dort wird sie zu doppelsträngiger DNA vervollständigt (Shenoy und Visweswariah, 2003). Die Ligationen und Mutationen wurden durch Sequenzierung bestätigt (s. 2.1.7) und anschließend größere Mengen an rekombinanter DNA durch Mini- oder Midi-Präparationen hergestellt (s. 2.1.6.2).

Wenn nicht anderweitig angegeben, wurden die eingesetzten Chemikalien von den jeweiligen Firmen in den Qualitäten *pro analysi* oder für molekularbiologische Zwecke bezogen. Die Lösungen wurden unter Verwendung von hochreinem, entionisiertem Wasser

(ddH<sub>2</sub>O) (Reinstwassersystem membraPure GmbH, Henningsdorf, Deutschland) hergestellt. Lösungen, die besonders sensitiv waren oder länger gelagert wurden, wurden autoklaviert bzw. steril filtriert.



**Abbildung 6: Übersicht der Klonierungsmethoden**

**A** Klassische Klonierung; Vektor (rot) und einzuklonierendes Fragment (blau) werden mit den gleichen Restriktionsenzymen (schwarze Pfeile oberstes Bild) geschnitten (Restriktion) und anschließend durch eine Ligase zusammengefügt (Ligation). **B** Ortsspezifische Mutagenese bzw. Insertion; 1. Schematische Darstellung eines doppelsträngigen Plasmids mit dem zu verändernden Bereich (fette schwarze Kreisbögen.) 2. Nach der Denaturierung liegen die inneren und äußeren Matrizen-DNA-Stränge einzeln vor (linker bzw. rechter Zweig), die Primer mit der enthaltenen Mutation lagern sich an. 3. Die Polymerase synthetisiert komplementär zu beiden DNA-Plasmid-Einzelsträngen von den Primern ausgehend einen neuen DNA-Einzelstrang, es liegen nun zwei neue doppelsträngige DNA-Moleküle vor, die wieder als DNA-Matrize dienen können (Rückpfeil). 4. Nach der durchgeführten PCR wird die Probe mit dem Restriktionsenzym DpnI verdaut, wobei die methylierte, nicht mutierte DNA zerschnitten wird (links), die mutierte, nicht methylierte DNA bleibt unverdaut (rechts). Im Anschluss daran wird die DNA in DH5 $\alpha$ -E. coli-Bakterien transformiert, so erhält man eine aufgereinigte DNA, die zusätzlich in großer Menge vorliegt.

**A** angepasst von (Quail, 2001)

**B** angepasst von (Olafsen et al., 2006)

### 2.1.1 Plasmide und cDNAs

In dieser Arbeit wurden als Plasmide pcDNA3, pcDNA3.1(+), pSVSport (Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA), pIRES, und pIRES2-EGFP verwendet (Takara Bio USA Inc., Mountain View, USA). Bis auf letztgenanntes pIRES2-EGFP besaßen alle Plasmide eine Ampicillin-Resistenz, pIRES2-EGFP eine Kanamycin-Resistenz. In Tabelle 1 sind die cDNAs sowie die umgebenden Plasmide mit Herkunft und Akzessionsnummer zusammengestellt,

die bei Antritt der vorliegenden Arbeit vorhanden waren. Zur Orientierung des jeweiligen nachfolgenden Einsatzes und der angewandten molekularbiologischen Methode wurden außerdem das Projekt und die verwendete Methode zusammengestellt.

Tabelle 1: Übersicht über zu Beginn vorhandene Plasmide und cDNAs

<b>Projekt</b>	<b>cDNAs</b>	<b>Plasmid</b>	<b>Akzessionsnummer</b>	<b>Literatur/Herkunft</b>	<b>Molekularbiologische Methode</b>
<b>Mechano-sensitivität</b> <b>G<sub>i/o</sub>-PCRs</b>	<i>rKir3.1</i>	<i>pSVSport</i>	U01071.1	<i>E. Wischmeyer, Würzburg</i>	<i>Klassische Klonierung</i>
	<i>hKir3.2</i>	<i>pSVSport</i>	L78480.1	<i>E. Wischmeyer, Würzburg</i>	<i>Klassische Klonierung</i>
	<i>hKir3.4</i>	<i>pcDNA3</i>	L47208.1	<i>E. Wischmeyer, Würzburg</i>	<i>Klassische Klonierung</i>
	<i>mTRPC5</i>	<i>pIRES2-EGFP</i>	NM_009428	<i>Walther-Straub-Institut, AG Mederos</i>	
	<i>h5-HT<sub>1B</sub>R</i>	<i>pcDNA3.1(+)</i>	AY225227	<i>cDNA Resource Center, Bloomsberg, USA</i>	<i>Ortsspezifische Mutagenese, Insertion</i>
	<i>h5-HT<sub>7A</sub>R</i>	<i>pcDNA3.1(+)</i>	NM_000872.4	<i>cDNA Resource Center, Bloomsberg, USA</i>	
	<i>hα<sub>2A</sub>R</i>	<i>pcDNA3.1(+)</i>	NM_000681	<i>cDNA Resource Center, Bloomsberg, USA</i>	
	<i>hM2R</i>	<i>pcDNA3.1(+)</i>	AF498916	<i>cDNA Resource Center, Bloomsberg, USA</i>	
	<i>hμR</i>	<i>pcDNA3.1(+)</i>	AY521028	<i>cDNA Resource Center, Bloomsberg, USA</i>	<i>Ortsspezifische Mutagenese, Insertion</i>
	<i>hCGRPR</i>	<i>pcDNA3.1(+)</i>	AY430048.1	<i>cDNA Resource Center, Bloomsberg, USA</i>	
	<i>hVPAC1R</i>	<i>pcDNA3.1(+)</i>	NM_004624	<i>cDNA Resource Center, Bloomsberg, USA</i>	
	<i>hβ<sub>2</sub>R</i>	<i>pcDNA3.1(+)</i>	NM_000024.3	<i>cDNA Resource Center, Bloomsberg, USA</i>	

Zu Tabelle 1

Projekt	cDNA	Plasmid	Akzessionsnummer	Literatur/ Herkunft	Molekularbiologische Methode
<b>cAMP-Bestimmung</b>	eYFP-hEpac1-eCFP	pcDNA3		Nikolaev et al., 2004	Klassische Klonierung
	eYFP-mEpac2B-eCFP	pcDNA3		Nikolaev et al., 2004	Klassische Klonierung
	mVenus-N1	pcDNA3.1 Zeo(+)		Walther-Straub-Institut, AG Mederos	Klassische Klonierung
	mTurquoise2-N1	pcDNA3.1(+)		Walther-Straub-Institut, AG Mederos	Klassische Klonierung
	m $\alpha_{2A}$ -YFP <sup>H3</sup> -CFP <sup>ct</sup>	pcDNA3		Vilardaga et al., 2003	
	EpacS <sup>H74</sup>	pcDNA3		Klarenbeek et al., 2010	
	EpacS <sup>H187</sup>	pcDNA3		Klarenbeek et al., 2015	

### 2.1.2 Agarose-Gelelektrophorese

Die Agarose-Gelelektrophorese dient der Auftrennung von DNA-Fragmenten in einem elektrischen Feld nach ihrer Größe. Die DNA ist aufgrund ihrer Phosphatgruppen negativ geladen und wandert daher bei angelegter Spannung zur Anode. Die Größenauftrennung erfolgt dabei nach dem Phänomen, dass sich kleinere DNA-Fragmente schneller im elektrischen Feld durch die Maschen des Agarosegels bewegen als große DNA-Fragmente. Zur Herstellung des Gels wurde 1 % Agarose gentechnologischer Qualität (#6352, Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland) zu 180 ml eines 1:50 verdünnten TAE-Puffers (50fach: 2 M TRIS, 1 M Acetat, 50 mM EDTA, pH 8,5) gegeben und aufgeköcht. Zur Sichtbarmachung der DNA unter UV-Licht wurden dem Ansatz noch 10  $\mu$ l Rotisafe<sup>®</sup> (DNA-bindendes Benzimidazol, #3865.1, Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland) beigefügt. Das flüssige Gel wurde in eine 12 x 12 cm große Gelkammer gegossen, je nach Bedarf ein Zinkenamm, der 12 oder 20 Taschen bildet und das Gel bei Raumtemperatur ausgehärtet. Nach dem Aushärten wurde der Kamm entfernt und das Gel in eine mit TAE-Puffer befüllte Elektrophoresekammer gegeben. Die 20  $\mu$ l Proben und 5  $\mu$ l einer 1-Kilobasen-DNA-Marker (GeneRuler 1kb DNA Leiter, #SM0311, Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA) wurden aufgetragen und bei einer Spannung von 150 Volt und einer Stromstärke von 1 Ampere die Elektrophorese für 45 Minuten (Min.) durchgeführt. Zur Kontrolle und zum Ausschneiden der DNA-Banden wurde

die DNA unter 254 nm kurzwelligem UV-Licht detektiert und das Gel zur Dokumentation fotografiert.

### 2.1.3 Die Polymerase-Kettenreaktion

Die PCR bewirkt die selektive Vervielfältigung eines beliebigen DNA-Abschnitts (Brown, 2011). Diese Methode wurde verwendet, um kodierende Sequenzen von Interesse zu amplifizieren. In einem Reaktionsgefäß werden Ausgangs-DNA (10-50 ng), beide Oligonukleotidprimer (*sense* und *antisense*), freie Nukleotide (Desoxyribonukleosidtriphosphate, dNTPs) und eine thermostabile Polymerase gemischt und der Ansatz in die PCR-Maschine gegeben. Der sich am codierenden Strang anlagernde Primer hat eine (+)-Polarität und wird auch positiv-strängig (engl. *sense*) genannt, der sich am codogenen Strang anlagernde Primer eine (–)-Polarität und wird daher auch negativ-strängig (engl. *antisense*) genannt. Der Ablauf einer PCR lässt sich in drei Reaktionsschritte einteilen: Zu Beginn der Reaktion wird die DNA bei 94 – 98 °C denaturiert (Denaturierung). Hier lösen sich die Wasserstoffbrücken zwischen den beiden Polynukleotiden der Doppelhelix. Nach Ablauf dieses Reaktionsschritts liegt die DNA in zwei Einzelsträngen vor. Nun wird die Temperatur auf 50 – 68 °C gesenkt, was den Primern eine Anlagerung an die Einzelstränge erlaubt („*Annealing*“). Im Anschluss wird die Temperatur auf 72 °C erhöht. Dies stellt die optimale Arbeitstemperatur für die Polymerasen dar. So können sie nun die komplementäre Einzelstrang-DNA mit Nukleotiden („*Elongation*“) vervollständigen. Es entsteht neue, doppelsträngige DNA. Dieser Zyklus aus Denaturierung, Annealing und Elongation wird 25 – 35 Mal wiederholt. Dabei entsteht bei jedem Zyklus doppelt so viel neu synthetisierte DNA wie im vorangegangenen Zyklus, d.h. nach ca. 30 Zyklen liegt neben der 8 – 12 kb-langen Ursprungs-DNA vorwiegend die durch die Primer synthetisierte, neue DNA vor .

### 2.1.4 Design und Herstellung von Primern

Um eine selektive und korrekte Vervielfältigung einer bestimmten Region oder einer Mutation der Ausgangs-DNA zu garantieren, müssen beim Design der Primer einige Faktoren berücksichtigt werden. Die Länge der Primer sollte zwischen 18 und 30 Nukleotiden liegen, die Schmelztemperatur zwischen 65 °C und 80 °C betragen und sich nicht mehr als 5 °C voneinander unterscheiden. Optimalerweise sollte der Gehalt an den Basen Guanin und Cytosin zwischen 40 – 60 % liegen und häufige Wiederholungen einzelner Basen oder

Basenabfolgen vermieden werden. Beim Design von Mutageneseprimern sollte sich die Lokalisation der Mutation etwa in der Mitte des Primers befinden (Chuang *et al.*, 2013). In der vorliegenden Arbeit wurden die Primer entweder von Hand oder mit Hilfe des „*QuikChange Primer Design*“-Programms (Agilent Technologies, Santa Clara, USA) konstruiert. Die Synthese erfolgte per Festphasen-Phosphoramidit-Oligonukleotidsynthese durch Metabion (Martinsried, Deutschland) oder Sigma Aldrich (Taufkirchen, Deutschland).

Bei Primern für die klassische Klonierung mussten meist die erforderlichen Schnittstellen für die Ligation mit dem Zielvektor ebenfalls per PCR generiert werden. Dazu wurde die Nukleotidsequenz für die Schnittstellen dem gewünschten Bereich in *sense* und *antisense*-Richtung vorangestellt und um fünf Nukleotide in beliebiger Abfolge der Basen Adenin oder Thymin ergänzt. Diese zusätzlichen Basen erlauben den Restriktionsenzymen später ein besseres Anlagern und führen so zu effizienterem Zerschneiden (Dieffenbach *et al.*, 1993).

Für die Konstruktion der Primer der Insertionsmutagenese wurde der Bereich in der Plasmidsequenz, in den das Bindemotiv inseriert werden sollte, definiert und diente als Grundlage des Primerdesigns. Der Primer bestand aus der für die Aminosäuren CCPGCC (Cystein-Cystein-Prolin-Glycin-Cystein-Cystein) kodierenden Nukleotidsequenz und 10 – 15 Basen der Ausgangs-DNA vor und nach der Bindemotiv-Sequenz. Die Hinweise hierzu finden sich im Handbuch zum *QuikChange Site Directed Mutagenesis Kit II* (AgilentTechnologies, 2015).

### 2.1.5 DpnI-Verdau

Ein Verdau mit dem Restriktionsenzym DpnI (#FD1704, Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA) war nur dann durchzuführen, wenn vorher eine ortsspezifische Mutagenese-PCR oder Insertions-PCR mit DNA-Polymerase stattgefunden hatte. Bei der Amplifizierung eines DNA-Fragments mittels PCR wurde dieser Schritt nicht benötigt, da sich am Ende der Fragmente die Schnittstellen befanden, die noch mit den jeweiligen Restriktionsenzymen verdaut wurden.

Nach erfolgter PCR liegen im Ansatz noch Ausgangs-DNA und die synthetisierte DNA nebeneinander vor. Um die Ausgangs-DNA nach der Amplifizierung aus dem Reaktionsansatz zu entfernen, wird diese dem Verdau mit einer Endonuclease (DpnI) unterzogen. Im

Gegensatz zu anderen Typ II-Restriktionsendonukleasen schneidet das Restriktionsenzym DpnI die DNA nur dann, wenn Adenin methyliert vorliegt. Das ist bei der Ausgangs-DNA der Fall da sie mit einem *E. coli*-Stamm isoliert wurde, der Desoxyadenosin-Methylase synthetisiert. Die Methylase bindet in bakterieller DNA eine Methylgruppe an den Adenin-Rest. Da die mittels PCR synthetisierte DNA keine Methylgruppen besitzt, spaltet DpnI diese nicht. So liegt nach dem Verdau mit dem Restriktionsenzym DpnI nur noch die synthetisierte, ungeschnittene DNA im Reaktionsansatz vor.

### 2.1.6 Plasmidamplifikation

Vor der Plasmidamplifikation lagen entweder Reaktionsansätze aus einer Mutagenese- bzw. Insertions-PCR vor (s. 2.1.9.2 und 2.1.10.2) oder aber Reaktionsansätze aus einer Ligationsreaktion (s. 2.1.8.2.6).

#### 2.1.6.1 Transformation

Transformation beschreibt das Einbringen von freier, löslicher Fremd-DNA in Bakterien (Avery *et al.*, 1944). Durch  $\text{CaCl}_2$  und andere Chloridverbindungen erhöht sich die Permeabilität von Membranen, so dass es zu einer gesteigerten Aufnahmefähigkeit von Fremd-DNA kommt (Chan *et al.*, 2013; Inoue *et al.*, 1990; Worm und Schulte-Frohlinde, 1991). Mit  $\text{CaCl}_2$  und  $\text{MnCl}_2$  behandelte DH5 $\alpha$ -*E. coli* werden durch ein Spezialprotokoll nach Sambrook *et al.* zu kompetenten Bakterien gemacht (Sambrook und Russell, 2006). Das bedeutet, dass sie in Lösung befindliche freie DNA aufnehmen können. Die in 100  $\mu\text{l}$  bei  $-80^\circ\text{C}$  aufbewahrten DH5 $\alpha$ -*E. coli*-Aliquots wurden auf Eis 10 Min. aufgetaut. Anschließend wurden die oben beschriebenen Reaktionsansätze zu den Bakterien pipettiert und auf Eis 30 Min. inkubiert. Nach 30 Min. wurden die Bakterien in einem Heizblock bei  $42^\circ\text{C}$  für 30 Sekunden (s) einem Hitzeschock unterzogen, weitere zwei Min. auf Eis gelagert und danach mit 250  $\mu\text{l}$  LB-Nährmedium (engl. *lysogeny broth*, LB) ohne Antibiotikumszusatz versetzt. Damit sich die Bakterien nun rasch vermehren konnten, wurden die Ansätze bei  $37^\circ\text{C}$  und 250 Umdrehungen pro Min. geschüttelt. Plasmid-DNA mit einer Ampicillin-Resistenz wurde für 30 Min. im Rotationsschüttler inkubiert, Plasmid-DNA mit Kanamycin-Resistenz für 60 Min. Das Ausstreichen der Bakterien erfolgte auf LB-Agarplatten mit dem entsprechenden Selektionsantibiotikum (100  $\mu\text{g}/\text{ml}$  Ampicillin oder 50  $\mu\text{g}/\text{ml}$  Kanamycin). Die Agarplatten wurden für 14-16 Stunden bei  $37^\circ\text{C}$  inkubiert. Die Bakterien bildeten über Nacht punktförmige Kolonien, die auf monoklonale *E. coli*-Stämme zurückzuführen sind, die

die eingebrachte Fremd-DNA in großen Mengen enthielt. Je nach Experimentschritt wurde anschließend eine Mini- oder Midi-Präparation durchgeführt.

#### *2.1.6.2 Mini- und Midi-Präparation von Plasmid-DNA*

Um die in den gewachsenen Kolonien vervielfältigte DNA zu überprüfen oder in größeren Mengen herzustellen, wurden sogenannte Mini- oder Midi-Präparationen durchgeführt. Mittels dieser Methode lässt sich aus Bakterienkulturansätzen Plasmid-DNA extrahieren. Dies war notwendig, um die durch die Transformation gewonnene DNA mittels Sequenzierung zu analysieren und ausreichend DNA für weiterführende Experimente zu generieren. Mini-Präparationen führen zu einer DNA-Ausbeute von bis zu 25 µg aus 3 – 10 ml Medium, Midi-Präparationen zu einer DNA-Ausbeute von 100 – 400 µg aus 200 – 400 ml Medium. Einzelne (Mini) oder mehrere (Midi) Bakterienkolonien wurden mit einer gelben Pipettenspitze von der Agar-Platte gepickt und in 3 ml bzw. 250 ml LB-Medium mit entsprechendem Selektionsantibiotikum gegeben. Die Ansätze wurden bei 37 °C und 250 Umdrehungen pro Min. für 14 – 16 Stunden inkubiert. Die DNA-Extraktion erfolgte mit dem HiYield Plasmid Mini Kit (#30HYPD300, Süd-Laborbedarf, Gauting/Planegg, Deutschland) oder dem NucleoBond Xtra Midi Kit (#740410.50, Macherey-Nagel GmbH & Co.KG, Düren, Deutschland) nach Angaben des jeweiligen Herstellers.

#### *2.1.7 Sequenzierung*

Um zu bestätigen, dass die Mutagenese, Insertion oder molekulare Klonierung korrekt stattgefunden hatte, wurden die durch die Mini-Präparation extrahierte DNA zum Sequenzieren eingeschickt. Die Sequenzierung erfolgte durch GATC Biotech (Konstanz, Deutschland) mittels der Didesoxymethode nach Sanger (auch Kettenabbruch-Synthese genannt). Dabei führen unterschiedlich fluoreszierende Didesoxynukleotidtriphosphate zu Brüchen innerhalb der DNA. Die nach der Reaktion vorliegenden DNA-Kettenabbruchprodukte werden mittels Kapillarelektrophorese aufgetrennt und durch einen Laser zur Fluoreszenz angeregt. Das entstehende Elektropherogramm spiegelt direkt die Sequenz der untersuchten DNA wieder.

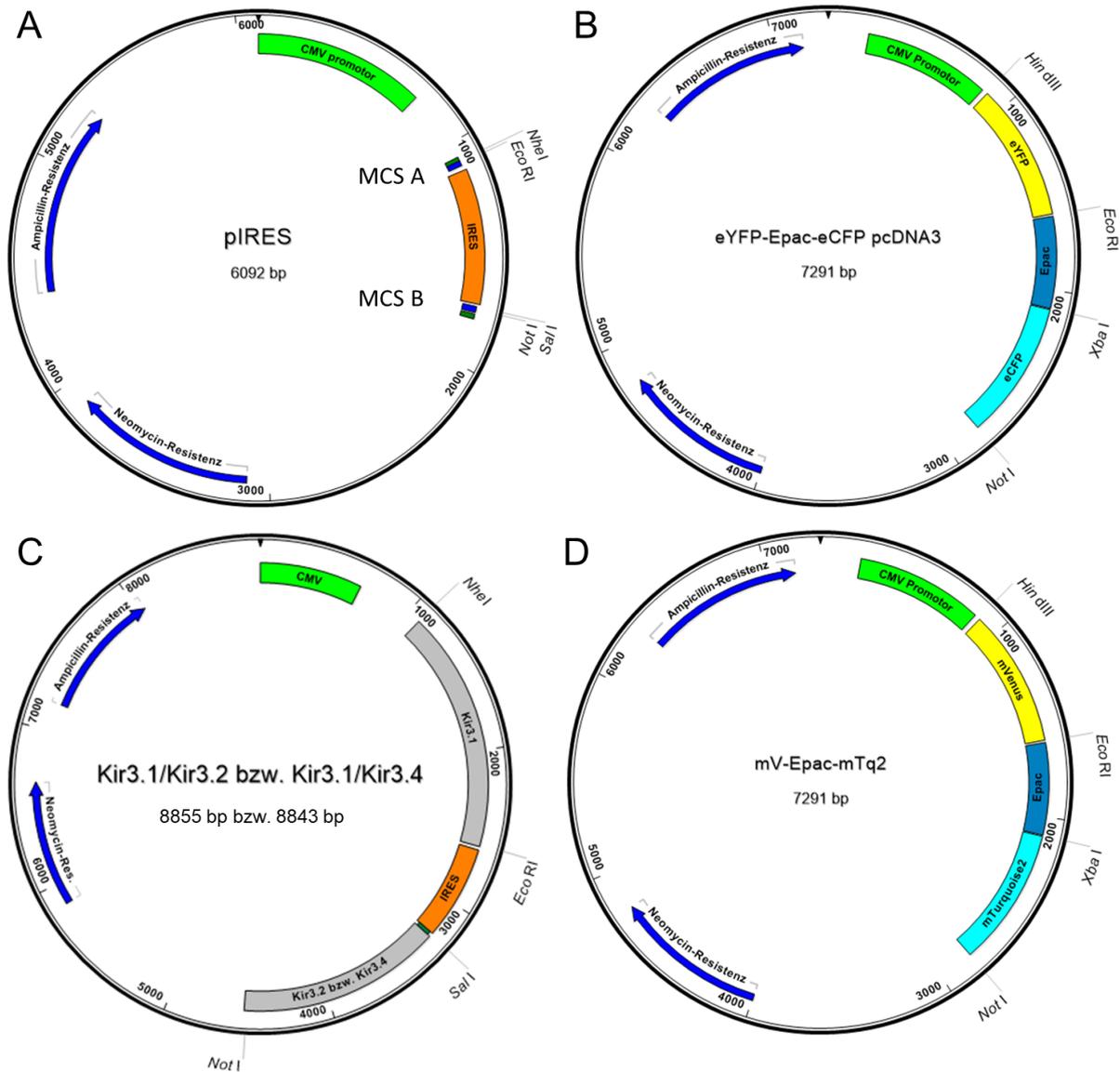
#### *2.1.8 Molekulare Klonierung*

Klonierung beschreibt als Oberbegriff den Vorgang der Herstellung identischer DNA-Moleküle (Mülhardt, 2013). Dabei kann ein DNA-Fragment (Insert), welches das erwünschte

zu klonierende Gen enthält, in einen Vektor (ringförmiges DNA-Molekül) eingefügt werden, was die massenhafte Vermehrung der zusammengefügt DNA ermöglicht. So entsteht ein neues rekombinantes DNA-Molekül (Brown, 2011). Diese Methode wurde angewandt, um zwei Kir-Kanal-Konstrukte (rKir3.1-IRES-hKir3.2-pIRES, rKir3.1-IRES-hKir3.4-V419M-pIRES) und zwei Epac-Sensor-Konstrukte (mVenus-hEpac1-mTurquoise2, mVenus-mEpac2B-mTurquoise2) zu generieren. Bei der Herstellung unterschieden sich die verwendeten Klonierungsstrategien in ihren Restriktionsenzymen und Ausgangs-Vektoren. Die experimentelle Durchführung sowie die grundlegenden Abläufe waren gleich. Nachstehend werden folgende Kurzbezeichnungen für die Konstrukte verwendet: Kir3.1/Kir3.2 (rKir3.1-IRES-hKir3.2-pIRES), Kir3.1/Kir3.4 (rKir3.1-IRES-hKir3.4-V419M-pIRES), mV-Epac1-mTq2 (mVenus-hEpac1-mTurquoise2-pcDNA3), mV-Epac2-mTq2 (mVenus-mEpac2B-mTurquoise2-pcDNA3).

Um zwei Kir-Kanal-Untereinheiten in einen Expressionsvektor zu klonieren, war ein Plasmid mit zwei multiplen Klonierungsstellen A und B (engl. *multi cloning site*, MCS) nötig, welche der pIRES-Vektor besitzt (s. Abbildung 7A). Aus beiden MCS wurde jeweils ein Stück zwischen den beiden gewünschten Restriktionsenzymen herausgeschnitten und das Kir-Oligonukleotid-Insert, welches vorher mit den entsprechenden Schnittstellen per PCR generiert worden war, eingefügt (s. Abbildung 7 C).

Für die Epac-Sensor-Konstrukte war das Ziel, die in den Sensoren „*enhanced yellow fluorescent protein-hEpac1-enhanced cyan fluorescent protein*“ (kurz YFP-Epac1-CFP) und eYFP-mEpac2B-eCFP (kurz YFP-Epac2-CFP) vorhandenen Fluorophore auszutauschen (s. Abbildung 7 B). Dabei wurde eYFP durch mVenus ersetzt und eCFP durch mTurquoise2. Um dies zu erreichen, wurden die Fluorophore aus den vorhandenen Sensoren heraus geschnitten und die per PCR mit entsprechenden Schnittstellen generierten mVenus- und mTurquoise2-Oligonukleotid-Inserts an den gleichen Stellen wieder eingefügt (Abbildung 7D).



**Abbildung 7: Vektormappen pIRES und eYFP-Epac-eCFP und daraus klonierte Konstrukte**

**A** Schematische Darstellung des pIRES-Expressionsvektors, der den Ausgangs-Vektor für die Kir-Kanal-Konstrukte darstellt. Dieser besitzt eine Ampicillin- und eine Neomycin-Resistenz (blaue Pfeile), einen Cytomegalovirus-Promoter (dunkelgrünes Kreisbogensegment, dunkelgrüner Pfeil), eine interne, ribosomale Eintrittsseite (IRES, oranger Kreisbogenabschnitt) sowie zwei MCS A und B (dunkelblaue und grüne Rechtecke). Zur Klonierung der Kir-Kanal-Konstrukte wurde die MCS A mit den Restriktionsenzymen EcoRI und NheI geschnitten und dort das Oligonukleotid für den Kir3.1-Kanal eingefügt. Die MCS B wurde mit Sall und NotI geschnitten und entweder das Oligonukleotid für den Kir3.2- oder den Kir3.4-Kanal eingefügt.

**B** Schematische Darstellung des pcDNA3 Expressionsvektors mit der kodierenden cDNA-Sequenz für eYFP (gelber Kreisbogen), Epac1 oder Epac2 (mittelblauer Kreisbogen), eCFP (türkisfarbiger Kreisbogen), der Ampicillin- und Neomycin-Resistenz (blaue Pfeile) sowie einen Cytomegalovirus (CMV)- und einen SV40-Promotor (hellgrüne Kreisbögen). Zur Klonierung der mV-Epac1-mTq2- und mV-Epac2-mTq2-Konstrukte diente dieser Vektor als Ausgangsvektor. Die eYFP-kodierende Sequenz wurde für eYFP das mVenus-Oligonukleotid und für eCFP das mTurquoise2-Oligonukleotid eingefügt.

**C** Vektormappe der generierten Kir-Kanal-Konstrukte. Das Oligonukleotid für den Kir3.1-Kanal (grauer Kreisbogen vor der IRES-Sequenz) und den Kir3.2- oder den Kir3.4-Kanal (grauer Kreisbogen nach der IRES-Sequenz) markieren das neue Konstrukt.

**D** Vektormappe der generierten Epac-Sensor-Konstrukte. mVenus dient jetzt als gelber Fluorophor, mTurquoise2 als blauer Fluorophor.

2.1.8.1 *Material***Kir-Konstrukte**

FastDigest NheI	#FD0973, Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
EcoRI	#FD0274, Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
Sall	#FD0644, Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
NotI	#FD0593, Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA

**Epac-Sensor-Konstrukte**

HindIII	#FD0504, Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
EcoRI	#FD0274, Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
XbaI	#FD0684, Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
NotI	#FD0593, Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA

**Konstrukt-unabhängig**

Alkalische Phosphatase aus dem Kälberdarm, CIAP (HC) 1000 units (20 units/ $\mu$ l)	#M2825, Promega, Madison, USA
T4 DNA Ligase 200 units (5,0 units/ $\mu$ l)	#EL0014, Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
Pfu-DNA-Polymerase 500 units (2,5 units/ $\mu$ l)	#EP0502, Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
dNTP Mix, 10 mM each	#R0192, Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
Primer 100 $\mu$ M	Metabion, Martinsried
Adenosintriphosphat- $\text{Na}_2$ (ATP)	#127531, Böhlinger-Ingelheim, Ingelheim, Deutschland
Polyethylenglykol (PEG 6000)	mitgeliefert bei #EL0014

Tabelle 2: Primer Kir-Konstrukte und Epac-Sensor-Konstrukte

<b>Konstrukt, Restriktionsenzym</b>	<b>Basenabfolge</b>
<i>Kir3.1 cDNA sense (mit NheI)</i>	5'-AATAAGCTAGCATGTCTGCACTCCGAAGG-3'
<i>Kir3.1 cDNA antisense (mit EcoRI)</i>	5'-AATAAGAATTCCTATGTGAAGCGGTCAGAG-3'
<i>Kir3.2 cDNA sense (mit Sall)</i>	5'-AATAAGTCGACATGGCCAAGCTGACAGAATC-3'
<i>Kir3.2 cDNA antisense (mit NotI)</i>	5'-AATAAGCGGCCGCCTAAACTTTGGATTCATTC-3'
<i>Kir3.4 cDNA sense (mit Sall)</i>	5'-AATAAGTCGACATGGCTGGCGATTCTAGG-3'
<i>Kir3.4 cDNA antisense (mit NotI)</i>	5'-AATAAGCGGCCGCTCACATTGAGCCCCTTGTTG-3'
<i>mVenus sense (mit HindIII)</i>	5'-AAATTAAGCTTATGGTGAGCAAGGGCGAGGA-3'
<i>mVenus antisense (mit EcoRI)</i>	5'-AAATTGAATTCCTGTACAGCTCGTCCATGC-3'
<i>mTurquoise2 sense (mit XbaI)</i>	5'-AAATTCTAGAGTGAGCAAGGGCGAGGAGCT-3'
<i>mTurquoise2 antisense (mit NotI)</i>	5'-AAATGCGGCCGCTTACTTGTACAGCTCGTCCAT-3'

Rechts in der Tabelle die in positiv-strängiger Leserichtung dargestellten Primer. Die Nukleotide der Restriktionsenzyme sind in rot gekennzeichnet, die Nukleotide in grün erlauben dem Restriktionsenzym ein effizienteres Zerschneiden.

### 2.1.8.2 Durchführung

#### 2.1.8.2.1 Präparativer DNA-Verdau Ausgangs-Vektor

Für den restriktionsenzymatischen Verdau der Vektoren wurden in einem Reaktionsgefäß jeweils 1 µg DNA, 2 µl FastDigest Green Buffer (Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA) und jeweils 1 µl der erforderlichen Restriktionsenzyme mit ddH<sub>2</sub>O auf ein Volumen von 20 µl aufgefüllt und bei 37 °C für 30 Min. inkubiert. Dabei enthielten die Ansätze bei der molekularen Klonierung immer zeitgleich beide zum Aufschneiden des Vektors benötigten Restriktionsenzyme. Die Ansätze wurden auf ein präparatives 1%iges Agarosegel aufgetragen und per Agarose-Gelelektrophorese aufgetrennt (s. 2.1.2).

#### 2.1.8.2.2 Gelelution

Nach Ablauf der elektrophoretischen Auftrennung wurden die DNA-Fragmente bei 254 nm kurzweiligem Licht sichtbar gemacht. Mit Hilfe eines Skalpellens wurden die entsprechenden Banden präzise ausgeschnitten und in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt. Die Elution der DNA aus dem Gel erfolgte per Gene Jet Extraction Kit (#K0691, Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA) nach Herstellerangaben. Abweichend von den Angaben des Herstellers wurde die DNA im letzten Schritt nicht per Elutionspuffer aus der Säule eluiert, sondern mit 30 µl ddH<sub>2</sub>O.

#### 2.1.8.2.3 Dephosphorylierung

Mit Restriktionsenzymen verdaute DNA besitzt an ihrem 5'-Ende eine Phosphatgruppe, die für eine Ligase benötigt wird, um zwei DNA-Stränge über eine Phosphodiesterbindung zu verknüpfen. Um sicher zu stellen, dass sich der Vektor während der Ligation nicht mit sich selbst ligiert, wurde die Vektor-DNA dephosphoryliert. 1 µg der geschnittenen Vektor-DNA wurden zusammen mit 2 µl 10fach konzentriertem, vom Hersteller empfohlenen alkalischen Phosphatasepuffer und 2 µl der 1:10 verdünnten alkalischen Phosphatase mit ddH<sub>2</sub>O auf ein Volumen von 20 µl aufgefüllt und bei 37 °C für 30 Min. inkubiert. Nach Ablauf der 30 Min. wurden erneut 2 µl 10fach-konzentrierter alkalischer Phosphatasepuffer und 2 µl der 1:10 verdünnten alkalischen Phosphatase hinzu pipettiert und der Ansatz erneut für 30 Min. bei 37 °C inkubiert.

#### 2.1.8.2.4 Insert-Amplifikation durch PCR

Zur Vervielfältigung der kodierenden cDNAs wurden 50 ng der Inserts-Ausgangs-DNA, jeweils 1 µl eines 1:10 verdünnten positiv-strängigen und eines negativ-strängigen Primers, 1 µl

dNTP-Mix, 2,5 µl Pfu-Polymerase-Puffer und 1 µl Pfu-Polymerase in ein Reaktionsgefäß pipettiert und mit ddH<sub>2</sub>O auf ein Volumen von 25 µl aufgefüllt. Anschließend durchlief der Ansatz folgendes PCR-Programm:

- |                     |                                      |
|---------------------|--------------------------------------|
| 1. Deckelheizung:   | 110 °C                               |
| 2. Denaturierung:   | 94 °C für 1 Min.                     |
| 3. 35 Zyklen:       | Denaturierung: 94 °C für 30 s        |
|                     | Primeranlegung: 30 s bei 50 – 65 °C  |
|                     | Kettenverlängerung: 72 °C für 2 Min. |
| 4. Endverlängerung: | 72 °C für 5 Min.                     |

Im Anschluss an die PCR wurden die Ansätze auf ein präparatives 1%iges Agarosegel aufgetragen, um die korrekte Länge der DNA-Fragmente zu überprüfen. Die betreffenden Banden wurden mit einem Skalpell ausgeschnitten und in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt. Die Elution der DNA aus dem Gel erfolgte per Gene Jet Extraction Kit (#K0691, Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA) nach Herstellerangaben. Abweichend von den Angaben des Herstellers wurde die DNA im letzten Schritt nicht per Elutionspuffer sondern mit 20-30 µl ddH<sub>2</sub>O eluiert.

#### 2.1.8.2.5 Präparativer DNA-Verdau Insert

Für den restriktionsenzymatischen Verdau der mittels PCR generierten Inserts wurden in einem Reaktionsgefäß jeweils die Hälfte des kompletten Ansatzes des Geleluats aus der Insertamplifikation, 2 µl vom Hersteller empfohlener FastDigest Green Buffer (Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA) und jeweils 1 µl der erforderlichen Restriktionsenzyme mit ddH<sub>2</sub>O auf ein Volumen von 20 µl aufgefüllt und bei 37 °C für 30 Min. inkubiert. Anschließend wurden die Ansätze auf ein präparatives 1%iges Agarosegel aufgetragen und per Agarose-Gelelektrophorese aufgetrennt (s. 2.1.2). Nach Extraktion der DNA aus dem Gel wurde die Insert-DNA zur Ligation mit dem Vektor verwendet.

#### 2.1.8.2.6 Ligation

Um die amplifizierten cDNA-Fragmente (Inserts) mit den geschnittenen und dephosphorylierten Vektoren zu ligieren, wurden 1 µl T4-DNA-Ligase, 2 µl vom Hersteller empfohlener T4-DNA-Ligase-Puffer, 1 µl einer 1 mM frisch hergestellten ATP-Lösung (gelöst in ddH<sub>2</sub>O) und 1 µl PEG verwendet. Jeder Ansatz enthielt 1 µl des Vektors und jeweils 0 (als

Negativkontrolle), 1 µl, 3 µl oder 5 µl des Inserts. Die mit ddH<sub>2</sub>O auf ein Endvolumen von 20 µl aufgefüllten Ansätze wurden eine Stunde lang bei Raumtemperatur stehen gelassen und anschließend in DH5α-Bakterien transformiert (s. 2.1.6.1). Zur weiteren Verwendung der rekombinanten DNA wurden die durch die Transformation erzeugten Klone in einer 3 ml-Bakterienkultur vervielfältigt, die gewonnene DNA extrahiert (s. 2.1.6.2) und zur Sequenzierung eingeschickt (s. 2.1.7). Wurde der Erfolg der Klonierung durch die Sequenzierung bestätigt, wurde eine Midi-Präparation durchgeführt (s. 2.1.6.2).

### 2.1.9 Zielgerichtete Mutagenese/ Einführung von Punktmutationen

Für die vorliegende Arbeit wurde die zielgerichtete Mutagenese verwendet, um das Stopcodon am Ende der kodierenden Sequenz des h5-HT<sub>1B</sub>-Rezeptors und des hµ-Rezeptors so zu verändern, dass es nicht mehr als Stopcodon fungieren konnte. Der Zweck dieser Mutation war, dass die Sequenz nach der Rezeptorsequenz weiter abgelesen werden sollte, da nach dem C-Terminus mTurquoise2 inseriert wurde. Zum Einsatz kam die QuikChange<sup>TM</sup>-Methode (entwickelt von Stratagene Cloning Systems, La Jolla, USA), die bereits in 2.1 erläutert wurde.

#### 2.1.9.1 Material

Pfu-DNA-Polymerase 500 units (2,5 units/µl)	#EP0502, Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
dNTP Mix, jeweils 10 mM	#R0192, Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
FastDigest DpnI 100 Reaktionen	#FD1704, Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
Primer 100 µM	Metabion, Martinsried
Adenosintriphosphat-Na <sub>2</sub> (ATP)	#127531, Böhringer-Ingelheim, Ingelheim, Deutschland
DMSO (Dimethylsulfoxid)	#D8418, Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Schnelldorf, Deutschland

Tabelle 3: Mutageneseprimer zur Entfernung des Stopcodons im h5-HT<sub>1B</sub>- und h $\mu$ -Rezeptor

<b>Konstrukt, Restriktionsenzym</b>	<b>Basenabfolge</b>
<i>h5-HT<sub>1B</sub>RpcDNA3.1(+)</i> Stopcodon sense	5'-TTTAAGTGCAACAAGTTG <b>G</b> CTCGAGTCTAGAGGGCC-3'
<i>h5-HT<sub>1B</sub>RpcDNA3.1(+)</i> Stopcodon antisense	5'-GGCCCTCTAGACTCGAG <b>CCA</b> ACTTGTGCACTTAAA-3'
<i>h<math>\mu</math>RpcDNA3.1(+)</i> Stopcodon sense	5'-CTGCTCCGTTGCCCTA <b>C</b> CTCGAGTCTAGAGG-3'
<i>h<math>\mu</math>RpcDNA3.1(+)</i> Stopcodon antisense	5'-CCTCTAGACTCGAG <b>G</b> TAGGGCAACGGAGCAG-3'

Rechts in der Tabelle die in positiv-strängiger Leserichtung dargestellten Mutageneseprimer. Die ausgetauschten Basen sind in rot gekennzeichnet, das für die mutierte Aminosäure kodierende Basentriplett ist fett markiert.

### 2.1.9.2 Durchführung

Zur Einführung der Punktmutation wurden 50 ng der Ausgangs-DNA (h5-HT<sub>1B</sub>pcDNA3.1(+), h $\mu$ pcDNA3.1(+)), jeweils 1  $\mu$ l eines 1:10 verdünnten Primers in *sense* und *antisense* Richtung, 1  $\mu$ l dNTP-Mix, 1  $\mu$ l DMSO, 2,0  $\mu$ l Pfu-Polymerase-Puffer und 1  $\mu$ l Pfu-Polymerase in ein Reaktionsgefäß pipettiert und mit ddH<sub>2</sub>O auf ein Volumen von 20  $\mu$ l aufgefüllt. DMSO dient der besseren Anlagerung der Primer an die Ausgangs-DNA, da es an Cytosin bindet und die Konformation der DNA ändert und in einer effizienteren Denaturierung resultiert. Anschließend durchlief der Ansatz ein wie unter 2.1.8.2.4 aufgeführtes PCR-Programm mit folgenden Abweichungen: Während der Zyklen Denaturierung bei 95 °C für 30 s, Kettenverlängerung bei 72 °C für 15 Min., Endverlängerung bei 72 °C für 20 Min. Im Anschluss an die PCR wurde ein Verdau mit dem DpnI-Enzym durchgeführt (2.1.5). Nach 120 Min. wurden die Ansätze in DH5 $\alpha$ -*E. coli* transformiert (s. 2.1.6.1), die DNA vervielfältigt und extrahiert (s. 2.1.6.2) und zum Sequenzieren eingeschickt (s. 2.1.7).

### 2.1.10 Insertion durch Mutagenese

Eine besondere Version der Mutagenese ist die Insertion eines längeren DNA-Fragmentes von bis zu 18 Basen im Vergleich zum Einbau von einzelnen oder einigen wenigen Basen. Für den Einbau von längeren DNA-Fragmenten wurden Oligonukleotidprimer verwendet, bei denen 18 Basen sowohl im positiv-strängigen Primer war als auch im negativ-strängigen Primer als Insert enthalten waren (gängig sind 1-3 Basen) und sich somit eine Gesamtprimerlänge von 39 - 52 Basen ergab. Dies stellt eine Herausforderung für die Polymerase dar, da sich lange Primer langsamer mit der Ausgangs-DNA hybridisieren und außerdem die Gefahr besteht, dass die Primer unspezifische Bindungen eingehen oder

Haarnadel-Strukturen bilden. Eine leistungsstarke Polymerase mit geringer Fehlerrate ist die thermostabile Q5<sup>®</sup> High-Fidelity DNA Polymerase (New England Biolabs, Frankfurt am Main). Sie wurde durch Klonierungen aus verschiedenen thermostabilen Polymerasen entwickelt. Entscheidende Elemente sind hier die DNA-Klammer des DNA-bindenden Proteins SSo7d und die Anteile der einzelnen Polymerasen. Dadurch hat die Q5<sup>®</sup> High-Fidelity DNA Polymerase eine sehr niedrige Fehlerrate (>100x geringer als die Taq DNA Polymerase und 12x geringer als die Pyrococcus furiosus (Pfu) DNA Polymerase) bei gleichzeitig hoher Syntheserate (Wang *et al.*, 2004). Diese Polymerase wurde verwendet um die kodierende Sequenz für ein Tetracysteinbindemotiv (Nukleotidabfolge kodierend für die Aminosäuren CCPGCC) am Ende der IL3 des h5-HT<sub>1B</sub>- und des h $\mu$ -Rezeptors einzufügen. An dieses Bindemotiv kann ein gelb fluoreszierendes, arsenhaltiges Fluoresceinderivat (engl. *Fluorescein arsenical hairpin binder*, FIAsh) binden, wodurch ein FRET-Signal zwischen FIAsh und mTurquoise2 am C-Terminus der Rezeptoren stattfinden kann. Im h5-HT<sub>1B</sub>-Rezeptor wurde das Bindemotiv am Ende der IL3 zwischen den Aminosäuren Arginin<sup>310</sup> und Lysin<sup>311</sup> eingefügt, im h $\mu$ -Rezeptor am Ende der IL3 zwischen den Aminosäuren Arginin<sup>278</sup> und Arginin<sup>279</sup>. Nach Elimination des Stopcodons wurde mTurquoise2 direkt an den C-Terminus zwischen den Schnittstellen für XhoI und XbaI eingefügt. Beide Rezeptorvektoren enthielten diese Restriktionsschnittstellen. Der Ablauf der Insertions-Mutagenese entsprach dem der zielgerichteten Mutagenese (s. 2.1.9).

#### 2.1.10.1 *Material*

Q5 <sup>®</sup> High-Fidelity DNA Polymerase 100 units (2,0 units/ $\mu$ l)	#M0491S, New England Biolabs GmbH, Frankfurt am Main, Deutschland
dNTP Mix, jeweils 10 mM	#R0192, Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
FastDigest DpnI 100 Reaktionen	#FD1704, Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
Primer 100 $\mu$ M	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland.
Adenosintriphosphat-Na <sub>2</sub> (ATP)	#127531, Böhlinger-Ingelheim, Ingelheim, Deutschland
DMSO (Dimethylsulfoxid)	#D8418, Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Schnelldorf, Deutschland

XhoI	#FD0695, Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
XbaI	#FD0684, Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA

Tabelle 4: Insertionsprimer zum Einbringen des FIASH-Motivs in den h5-HT<sub>1B</sub>- und h $\mu$ -Rezeptor

<b>Konstrukt, Restriktionsenzym</b>	<b>Basenabfolge</b>
<i>h5-HT<sub>1B</sub>RpcDNA3.1(+)</i> FIASH-Insertion sense	5'-GCGGCCGCTAGGGAGCGCTGTTGTCCGGGGTGTGTAAAGC CACCAAGACCC-3'
<i>h5-HT<sub>1B</sub>RpcDNA3.1(+)</i> FIASH-Insertion antisense	5'-TAGGGTCTTGGTGGCTTTACAACACCCCGGACAACAGCGCTC CCTAGCGGCCGCGAGT-3'
<i>h<math>\mu</math>RpcDNA3.1(+)</i> FIASH-Insertion sense	5'-AAAGGACCGGTATCTTCGATGTTGTCCGGGGTGTGTAGGAT CACCAGGATG-3'
<i>h<math>\mu</math>RpcDNA3.1(+)</i> FIASH-Insertion antisense	5'-CATCCTGGTGATCCTACAACACCCCGGACAACATCGAAGATA CCAGTCCTTT-3'

Rechts in der Tabelle die in positiv-strängiger Leserichtung dargestellten Insertionsprimer. Die inserierten Basen sind in rot gekennzeichnet, die schwarz geschriebenen Basen geben die Ausgangs-DNA wieder.

#### 2.1.10.2 Durchführung der Insertmutation

Zur Einführung der Insertmutation wurden 50 ng der Ausgangs-DNA (h5-HT<sub>1B</sub>ohne-StopcodonpcDNA3.1(+), h $\mu$ ohneStopcodonpcDNA3.1(+)), jeweils 1,25  $\mu$ l eines 1:10 verdünnten Primers in *sense* und *antisense* Richtung, 0,5  $\mu$ l dNTP-Mix, 1,25  $\mu$ l DMSO, 2,0  $\mu$ l Q5<sup>®</sup> High-Fidelity DNA Polymerase-Puffer und 0,3  $\mu$ l Q5<sup>®</sup> High-Fidelity DNA Polymerase in ein Reaktionsgefäß pipettiert und mit ddH<sub>2</sub>O auf ein Volumen von 20  $\mu$ l aufgefüllt. Anschließend durchlief der Ansatz ein wie unter 2.1.8.2.4 aufgeführtes PCR-Programm mit folgenden Abweichungen: Erste Denaturierung bei 98 °C für 30 s, während der Zyklen Denaturierung bei 98 °C für 10 s, Primeranlegung bei 30 s bei 68 °C, Kettenverlängerung bei 72 °C für 6 Min. Im Anschluss an die PCR wurde ein Verdau mit dem Restriktionsenzym DpnI durchgeführt (s. 2.1.5). Die Ansätze wurden in DH5 $\alpha$ -*E. coli* transformiert (s. 2.1.6.1), die DNA vervielfältigt und extrahiert (s. 2.1.6.2) und zum Sequenzieren eingeschickt (s. 2.1.7). Zur vollständigen Klonierung des gewünschten Konstruktes fehlte mTurquoise2 am C-Terminus der Rezeptoren h5-HT<sub>1B</sub>R und h $\mu$ R. Dazu wurde aus dem mTurquoise2-N1pcDNA3.1(+)-Vektor mit den Restriktionsenzymen XhoI und XbaI die kodierende Sequenz für mTurquoise2 herausgeschnitten und in den Zielvektoren h5-HT<sub>1B</sub>ohneStopcodon+BindemotivpcDNA3.1(+), h $\mu$ ohneStopcodon+BindemotivpcDNA3.1(+), zwischen den Schnittstellen für die Restriktionsenzyme XhoI und XbaI am Ende des C-Terminus eingefügt. Der Ablauf und das benötigte Material entsprachen bis auf einen Unterschied und die beiden Restriktionsenzyme der Vorgehensweise der klassischen

molekularen Klonierung (s. 2.1.8). Der Unterschied bestand darin, dass das mTurquoise2-Insert nicht mittels PCR generiert wurde, sondern aus einem anderen Plasmid herausgeschnitten wurde.

### 2.1.11 Übersicht der hergestellten Plasmidkonstrukte

Die molekularbiologisch generierten Konstrukte in dieser Arbeit dienten der Untersuchung der mechanischen Aktivierbarkeit  $G_{i/o}$ -Protein gekoppelter Rezeptoren und der damit verbundenen Änderung des cAMP-Spiegels.

Tabelle 5: Übersicht über die im Zuge der vorliegenden Arbeit hergestellten Konstrukte

Projekt	Ausgangs-Vektoren/cDNAs	Hergestellte Konstrukte
<b>Mechanosensitivität</b> <b><math>G_{i/o}</math>-PCRs</b>	<i>rKir3.1 pSVSport</i>	<i>rKir3.1-IRES-hKir3.2-pIRES (Kir3.1/3.2)</i>
	<i>hKir3.2 pSVSport</i>	
	<i>hKir3.4 pcDNA3</i>	
	<i>pIRES</i>	<i>rKir3.1-IRES-hKir3.4-V419M-pIRES (Kir3.1/3.4)</i>
	<i>h5-HT<sub>1B</sub> pcDNA3.1(+)</i>	<i>h5-HT<sub>1B</sub>ohneStopcodon+Bindemotiv-mTq2-pcDNA3.1(+)</i>
	<i>h<math>\mu</math> pcDNA3.1(+)</i>	<i>(5-HT<sub>1B</sub>-FRET-Sensor)</i>
	<i>p mTurquoise2-N1 pcDNA3.1(+)</i>	<i>h<math>\mu</math>ohneStopcodon+Bindemotiv-mTq2-pcDNA3.1(+)</i> <i>(<math>\mu</math>-FRET-Sensor)</i>
<b>cAMP-Bestimmung</b>	<i>eYFP-hEpac1-eCFP pcDNA3</i>	<i>mVenus-hEpac1-mTurquoise2 (mV-Epac1-mTq2)</i> <i>mVenus-mEpac2B-mTurquoise2 (mV-Epac2-mTq2)</i>
	<i>eYFP-mEpac2B-eCFP pcDNA3</i>	
	<i>mVenus-N1 pcDNA3.1 Zeo(+)</i>	
	<i>mTurquoise2-N1 pcDNA3.1(+)</i>	

Überblick der generierten Konstrukte mit Zuordnung zum jeweiligen Projekt und der Angabe der zur Herstellung verwendeten Ausgangs-Vektoren und cDNAs.

### 2.1.12 Weitere Konstrukte

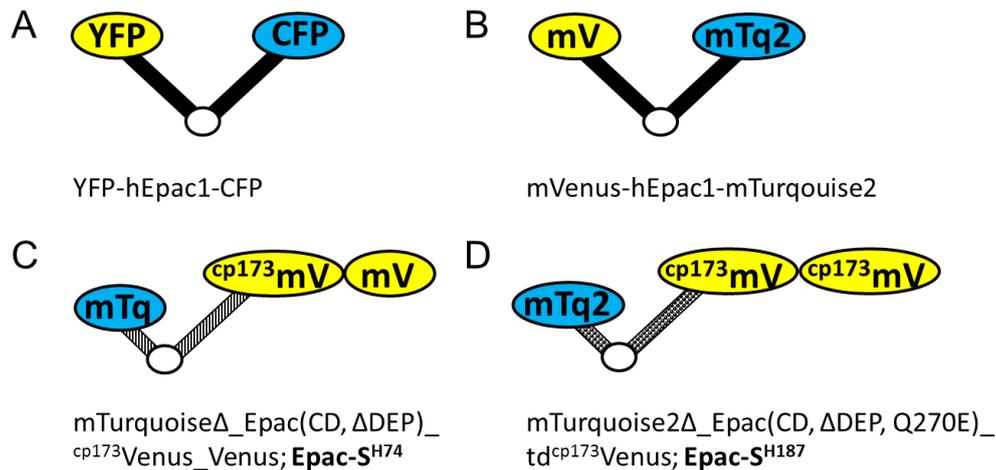
Während der Erstellung dieser Arbeit wurden durch Kooperationen zwei weitere Konstrukte erworben: Epac-S<sup>H74</sup> und Epac-S<sup>H187</sup> (Klarenbeek *et al.*, 2015; Klarenbeek *et al.*, 2011). Das  $m\alpha_{2A}$ -YFP<sup>fl3</sup>-CFP<sup>ct</sup>-Konstrukt (kurz  $\alpha_{2A}$ -YFP-CFP) lag zu Beginn der Arbeit bereits vor (Villardaga *et al.*, 2003). Im Unterschied zu den in der Gruppe um DiPilato entwickelten cAMP-Sensoren wurde dabei wie bei Nikolaev *et al.* eine gekürzte Version des nativen Epacs verwendet (minus Aminosäuren 1 – 148 von 881 des endogenen Epac1) und die Fluorophore andersherum an das Epac-Protein angefügt. Damit der Sensor ausschließlich zytosolisch vorlag, war die sogenannte DEP-Region entfernt worden, die endogen für die Membranbindung des Proteins verantwortlich ist (Bos, 2003; Qiao *et al.*, 2002). DEP steht für

Disheveled,  $\underline{E}$ GL-10,  $\underline{P}$ leckstrin und beschreibt eine hochkonservierte Region (Ponting und Bork, 1996). Des Weiteren wurden zwei Mutationen eingeführt (T781A, F782A), die dazu führten, dass Epac katalytisch inert (engl. *catalytically dead*, CD) war und somit keinen Interaktionspartner mehr für das endogene Zielprotein Rap1 darstellte (Epac(CD,  $\Delta$ DEP)). Epac-S<sup>H74</sup> war mit Varianten der Fluorophore mTurquoise und mVenus flankiert. Dabei waren von mTurquoise C-Terminal die letzten 11 Aminosäuren (GITLGMDELYK) entfernt worden (mTurquoise $\Delta$ ), was zu einer weiteren Verstärkung des FRET-Signals führte (Goedhart *et al.*, 2010). Als Akzeptor diente ein Tandem-Venus, von denen eines zirkulär permutiert war (<sup>cp173</sup>Ven\_Ven) (Baird *et al.*, 1999; Nagai *et al.*, 2002; Topell *et al.*, 1999). Im Epac-S<sup>H187</sup>-Sensor war im Epac zusätzlich eine weitere Mutation (Q270E) eingefügt worden (Epac(CD,  $\Delta$ DEP, Q270E)), die sich zwar nicht direkt in der Bindestelle für cAMP befand, aber durch den Austausch von Glutamin zu Glutaminsäure eine zusätzliche Wasserstoffbrücke mit cAMP interagieren kann (Rehmann *et al.*, 2003). Dies hat eine 2,5fach höhere Affinität für cAMP zur Folge. Die Fluorophore im Epac-S<sup>H187</sup> waren zusätzlich weiterentwickelt worden. So wurden als Donor eine ebenfalls um 11 Aminosäuren gekürzte Version von mTurquoise2 verwendet und als Akzeptor ein Tandem-Venus, bei welchem beide Fluorophore zirkulär permutiert waren (td<sup>cp173</sup>Ven). Diese Kombination führte zu höheren Initial-Effizienzen und FRET-Signalen von bis zu 100 % (Klarenbeek *et al.*, 2015). Die vollständige Bezeichnung der beiden Konstrukte lautet:

Epac-S<sup>H74</sup>, H74: mTurquoise $\Delta$ \_Epac(CD,  $\Delta$ DEP)\_<sup>cp173</sup>Venus\_Venus

Epac-S<sup>H187</sup>, H187: mTurquoise2 $\Delta$ \_Epac(CD,  $\Delta$ DEP, Q270E)\_td<sup>cp173</sup>Venus.

Eine graphische Darstellung der Entwicklung der Epac-basierten cAMP-Sensoren ist in Abbildung 8 aufgezeigt.



**Abbildung 8: Schematische Darstellung der verschiedenen Epac-basierten cAMP-Sensoren**

**A** Der erste entwickelte Epac1-basierte cAMP-Sensor von Nikolaev et al. besteht aus dem stark verkürzten humanen endogenen Epac1-Protein (schwarze Balken mit schwarzem Kreis als cAMP-Bindestelle), flankiert von den Fluorophoren YFP (gelbe Ellipse) und CFP (türkise Ellipse). **B** Der im Zuge dieser Arbeit umklonierte Epac1-basierte cAMP-Sensor trägt die beiden Fluorophore mVenus (gelbe Ellipse) und mTurquoise2 (türkise Ellipse). **C** Der Epac1-basierte cAMP-Sensor Epac-S<sup>H74</sup> enthält ein verkürztes Epac1-Protein mit zwei Mutationen, die zu einer katalytisch inerten („catalytically dead“, CD) Version führen. Durch Entfernung der DEP-Region ( $\Delta$ DEP) lag der Sensor ausschließlich zytosolisch vor. Die Veränderungen am Epac-Protein sind durch das Schraffieren des Balkens visualisiert. Der blaue Fluorophor mTurquoise $\Delta$  war C-Terminal um 11 Aminosäuren gekürzt worden (verkürzter schwarzer Balken, türkise Ellipse), der gelbe Fluorophor bestand aus einem Tandem-mVenus, von denen das erste zirkulär permutiert war (zwei gelbe Ellipsen, cp173Venus\_Venus). **D** Die nach dem Epac-S<sup>H74</sup>-Sensor weiter optimierte Version Epac-S<sup>H187</sup>. Dieser besaß eine zusätzliche Mutation im Epac-Protein (Q270E, dargestellt als Muster im Balken), die zu einer 2,5fach höheren Affinität zu cAMP führte. Als blauer Fluorophor war mTurquoise2 $\Delta$  ebenfalls C-Terminal um 11 Aminosäuren gekürzt worden (verkürzter schwarzer Balken, türkise Ellipse) und als gelber Fluorophor war ein Tandem aus zwei zirkulär permutierten mVenus verwendet worden (zwei gelbe Ellipsen, tdcp173Venus).

## 2.2 Zellkultur

### 2.2.1 Material

Dulbeccos Phosphat-gepufferte Saline	#D8537, Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Schnelldorf, Deutschland
Earls minimal essentielles Medium	#4655, Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Schnelldorf, Deutschland
Nutrient mixture F12 Ham	#N6658, Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Schnelldorf, Deutschland
Fetales Kälberserum (FCS)	#10270, Live Technologies, Carlsbad, USA
Gene Juice <sup>®</sup> Transfektionsreagenz	#70969-3, Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
Penicillin-Streptomycin	#P4333, Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Schnelldorf, Deutschland
T75-Kulturflaschen	#83.3911, Sarstedt, Nürnbrecht, Deutschland

6-Lochschale	#83.3920, Sarstedt, Nürmbrecht, Deutschland
Trypsin-EDTA Lösung (1x)	#T3924, Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Schnelldorf, Deutschland
Poly-L-Lysin Hydrobromid (PLL)	#P1524, Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Schnelldorf, Deutschland
Deckgläser 30 mm, rund	#1-6292, neoLab Migge Laborbedarf-Vertriebs GmbH, Heidelberg, Deutschland
ibidi®-Messkammer 0.1 VI 6er $\mu$ -Slide	#80666, ibidi GmbH, Martinsried, Deutschland

### 2.2.2 Zellkultur

Als Expressionssystem wurden in der vorliegenden Arbeit HEK293- und CHO-K1-Zellen verwendet. Bei HEK-293-Zellen handelt es sich um eine Fibroblastenzelllinie aus humanen Nierenzellen (engl. *human embryonic kidney*, HEK) dar, bei CHO-K1-Zellen um eine immortalisierte Eierstock-Zelllinie des chinesischen Hamsters (engl. *chinese hamster ovary*, CHO). HEK293-Zellen sind einfach zu kultivieren, lassen sich sehr gut transfizieren und sind in der Lage Proteine aus Säugetierzellen als auch aus Viren korrekt zu prozessieren und zu generieren (Thomas und Smart, 2005). Sie wurden in der vorliegenden Arbeit als Expressionssystem für alle zelleperimentellen Untersuchungen, außer der Kir-Kanal-Expression, eingesetzt. Da CHO-K1-Zellen endogen nur in einem geringen Ausmaß einwärts gerichtete K-Kanäle exprimieren (Yu und Kerchner, 1998), stellen sie ein geeignetes Modellsystem zu Untersuchung von Kir3.X-Kanälen dar. Zur Kultivierung der HEK293-Zellen wurde das Nährmedium, *Earls minimal* essentielles Medium' (EMEM) eingesetzt. Vor der Verwendung wurde diesem fetales Kälberserum (FCS) im Verhältnis 1:10 sowie Penicillin (100  $\mu$ g/ml) und Streptomycin (100  $\mu$ g/ml) zugesetzt. Die Kultivierung der Zellen erfolgte in T75-Kulturflaschen. Bei einer Konfluenz von 80 – 90 % wurden die adhärenenten Zellen mit einer 0,02 % EDTA-haltigen 0,05%igen Trypsinlösung vom Flaschenboden abgelöst und in den Verdünnungen 1:10 und 1:20 auf zwei neue T75-Kulturflaschen verteilt. Insgesamt wurde die Zelllinie ca. drei Monate in einem Inkubationsschrank bei 37 °C und einer CO<sub>2</sub>-Konzentration von 5 % inkubiert und nach Ablauf dieser Zeitspanne verworfen. Zur Kultivierung der CHO-K1-Zellen wurde als Nährmedium das *Nutrient mixture* F12 Ham verwendet, das entsprechend den oben genannten Konzentrationen mit FCS, Penicillin und

Streptomycin versetzt wurde. Auch die Verdünnungen der Zellsuspension entsprachen den der HEK293-Zellen, 1:10 und 1:20. Zellen zur Transfektion wurden in 6-Lochschalen ein bis zwei Tage zuvor ausgesät. Dabei wurde die Zelldichte so moduliert, dass am Transfektionstag eine Konfluenz von etwa 70 % in jeder Lochschale vorlag.

### *2.2.3 Transiente Transfektion von Plasmid-DNA*

Die Transfektionen der HEK293- und CHO-K1-Zellen erfolgte mit dem Transfektionsmittel Gene Juice<sup>®</sup>. 100 µl serumfreies Kulturmedium wurde mit Gene Juice<sup>®</sup> in einem Verhältnis von 3:1 zur der Expressionsplasmid-DNA-Menge versetzt und 5 Min. bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurde dieses Gemisch zur vorbereiteten DNA gegeben und 20 Min. inkubiert. Danach wurde die vorbereitete Lösung zu den Zellen pipettiert. Die eingesetzten DNA-Mengen betragen für Rezeptor- und Ionenkanal-DNA 1,0 bis 2,0 µg, für Fluorochrom-enthaltende DNA 0,2 bis 0,4 µg pro Loch in einer 6-Loch-Schale.

### *2.2.4 Vorbereitung der Zellen*

Die Handhabung der transfizierten Zellen unterschied sich von Experiment zu Experiment, je nachdem ob die Zellen in der Elektrophysiologie oder im FRET mittels Perfusion, Überdruckapplikation, Scherspannung oder extrazellulärem Überdruck gemessen wurden. Bei Einsatz der Zellen in der Elektrophysiologie wurden diese vor Messbeginn in den 6-Lochschalen mittels der EDTA-haltigen Trypsinlösung vom Boden abgelöst und durch Auf- und Abpipettieren vereinzelt. Je nach Transfektionsrate und Zelldichte wurde die Zellsuspension auf vier bis acht einzelne vorbereitete 33 mm-Kulturschälchen (Nunclon<sup>™</sup> Delta Surface, 153066, Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, USA) verteilt. Bei Verwendung der transfizierten Zellen in FRET-Messungen mit Perfusion wurden die Zellen auf 35 mm-Glasbodenschälchen (FluoroDish FD35-100, World Precision Instruments, Inc., Sarasota, FL, USA) umgesetzt, die vorher für 1 Stunde mit 1 ml Polylysin (1 mg/ml) beschichtet wurden. In Experimenten, bei welchen mittels ALA-Überdruckapplikation Pharmaka eingebracht wurden oder bei Experimenten mit extrazellulärem Überdruck wurden Polylysin-beschichtete 30 mm-Glasplättchen (#1-6292, 30 mm runde Deckgläser, neoLab Migge Laborbedarf-Vertriebs GmbH, Heidelberg, Deutschland) verwendet. Bei Scherspannungs-Experimente wurden die Zellen in ibidi<sup>®</sup>-Messkammern mit einer speziellen hydrophilen Oberfläche (ibitreat<sup>®</sup>) zur optimalen Adhäsion der Zellen ausgesät (#80666,

ibidi®-Messkammer 0.1 VI 6er  $\mu$ -Slide, ibidi GmbH, Martinsried, Deutschland). Diese bestanden aus jeweils sechs Kanälen und hatten ein Volumen von jeweils 60  $\mu$ l. Messungen mit HEK293- als auch CHO-K1-Zellen erfolgten frühestens eine Stunde nach dem Umsetzen. Die Transfektionsdauer betrug bei Messungen mit dem TRPC5-pIRES-EGFP-Konstrukt 72 Stunden, bei allen anderen Experimenten fanden die Messungen 24 Stunden nach der Transfektion statt.

## 2.2.5 Markierung der Zellen mit FIAsh

### 2.2.5.1 Material

#### Pharmaka:

Gelb fluoreszierendes arsenhaltiges Fluoresceinderivat (FIAsh), 2mM	Freundlicherweise zur Verfügung gestellt von Prof. Dr. C. Hoffmann, Würzburg
1,2-Ethanedithiol (EDT)	#8.00795.0100, Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
DMSO (Dimethylsulfoxid)	#A3672.0250, Applichem, Darmstadt, Deutschland
BAL (2,3-Dimercapto-1-propanol)	#64046, Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Schnelldorf, Deutschland
Hanks' balanced salt solution (HBSS)/Glukose	#6648 Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Schnelldorf, Deutschland

### 2.2.5.2 Durchführung

Um ein FRET-Signal mit dem 5-HT<sub>1B</sub>-FRET-Sensor oder dem  $\mu$ -FRET-Sensor messen zu können, wurden die transfizierten Zellen mit dem gelben Fluorophor FIAsh markiert (engl. *label*) werden (Hoffmann *et al.*, 2005). Jegliche Arbeitsschritte des Markierens wurden unter dem Abzug durchgeführt, um eine Intoxikation sowie Geruchsbelästigung zu vermeiden. Außerdem wurde auf eine möglichst geringe Lichtexposition der FIAsh-Lösung geachtet, um eine vorzeitige Beeinträchtigung des Fluorophors zu verhindern. Alle Waschschrte wurden mit großer Vorsicht ausgeführt, um ein vorzeitiges Ablösen der Zellen zu vermeiden. In einem 1,5 ml-Reaktionsgefäß wurde frisch hergestellte 25 mM EDT-Lösung und 2 mM FIAsh-Stammlösung zu gleichen Teilen vermennt, wenige Sekunden auf einem Vortexmischer geschüttelt und 5 Min. inkubiert, damit das gesamte FIAsh in die FIAsh-EDT<sub>2</sub>-Form übergehen konnte. Anschließend wurde die Lösung in HBSS/Glukose-Lösung gegeben, so

dass eine finale FIAsh-Konzentration von 1  $\mu\text{M}$  vorlag. Die auf mit Polylysin-beschichteten 30 mm-Glasplättchen ausgesäten Zellen wurden 1,5 Stunden vor Experimentbeginn aus dem Inkubator geholt, das Medium abgesaugt und 1 ml HBSS/Glukose-Lösung pro Loch der 6-Lochschale (jedes Loch enthielt ein Glasplättchen mit Zellen) vorgelegt. Zu dem ml HBSS/Glukose-Lösung wurde 1 ml der vorinkubierten FIAsh-EDT<sub>2</sub>-Lösung gegeben, die 6-Lochschale vorsichtig geschwenkt und die überschichteten Zellen für eine Stunde in den Inkubator (37 °C und 5 % CO<sub>2</sub>) gestellt. Nach 60 Min. wurde die FIAsh-EDT<sub>2</sub>-Lösung von den Zellen abgesaugt, zweimal mit 2 ml HBSS/Glukose-Lösung gewaschen und mit 2 ml einer 250  $\mu\text{M}$  EDT-Waschlösung überschichtet, um unspezifisch gebundenes FIAsh zu entfernen. Nach 10-minütiger Inkubation bei 37 °C wurde die EDT-Waschlösung abgesaugt, die Zellen erneut zweimal mit 2 ml HBSS/Glukose-Lösung gewaschen und mit 2 ml Medium überschichtet. Die so markierten Zellen wurden fluorimetrisch wie in 2.4.2 beschrieben gemessen.

## 2.3 Elektrophysiologie

### 2.3.1 Material

#### Pharmaka:

$\alpha$ -CGRP(human)	#1186, Tocris House, Bristol, UK
Carbachol	#C4382, Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Schnelldorf, Deutschland
D-Phe-Cys-Tyr-D-Trp-Arg-Thr-Pen-Thr-NH <sub>2</sub> (CTAP)	#1560, Tocris House, Bristol, UK
D-Ala <sup>2</sup> -N-MePhe <sup>4</sup> -Gly-ol-enkephalin (DAMGO)	#E7384, Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Schnelldorf, Deutschland
Guanfacin-HCl	#1030, Tocris House, Bristol, UK
DL-Isoproterenol HCl	#I5627, Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Schnelldorf, Deutschland
Lanthanchlorid	#449830, Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Schnelldorf, Deutschland
Noradrenalin	#74880, Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Schnelldorf, Deutschland
PACAP 1-38	#3012, Tocris House, Bristol, UK
Pertussis Toxin 50 $\mu\text{g}$ (gelöst in H <sub>2</sub> O)	#3097, Tocris House, Bristol, UK

Propranolol-HCl	#P04884, Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Schnelldorf, Deutschland
SB216641-HCl	#1242, Tocris House, Bristol, UK
Serotonin-HCl	#56610, Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Schnelldorf, Deutschland
Yohimbin-HCl	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Schnelldorf, Deutschland

**Weitere Substanzen:**

BAPTA (1,2-Bis(aminophenoxy)-ethan-N,N,N',N'-tetraessigsäure)	#4926, Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Schnelldorf, Deutschland
CaCl <sub>2</sub> -Lösung 1M in H <sub>2</sub> O	#21115, Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Schnelldorf, Deutschland
CsCl	#C3032, Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Schnelldorf, Deutschland
DMSO (Dimethylsulfoxid)	#D8418, Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Schnelldorf, Deutschland
D-(+)-Glukose	#G7528, Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Schnelldorf, Deutschland
HEPES (2-[4-(2-Hydroxyethyl)-1-piper-azin]ethansulfonsäure)	#H3375, Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Schnelldorf, Deutschland
KCl	#K9333, Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Schnelldorf, Deutschland
MgCl <sub>2</sub>	#M2670, Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Schnelldorf, Deutschland
D-Mannitol	#63559, Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Schnelldorf, Deutschland
NaCl	#N31434, Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Schnelldorf, Deutschland

**2.3.2 Patch-Clamp-Technik**

In der vorliegenden Arbeit wurde die Patch-Clamp-Methode angewandt, um die mechanische Aktivierbarkeit von G<sub>i/o</sub>-Protein gekoppelten Rezeptoren in der Elektrophysiologie zu messen. Da es nicht möglich ist, die Aktivierung der Rezeptoren direkt elektrophysiologisch zu visualisieren, wurden die durch in Folge der Rezeptorstimulation

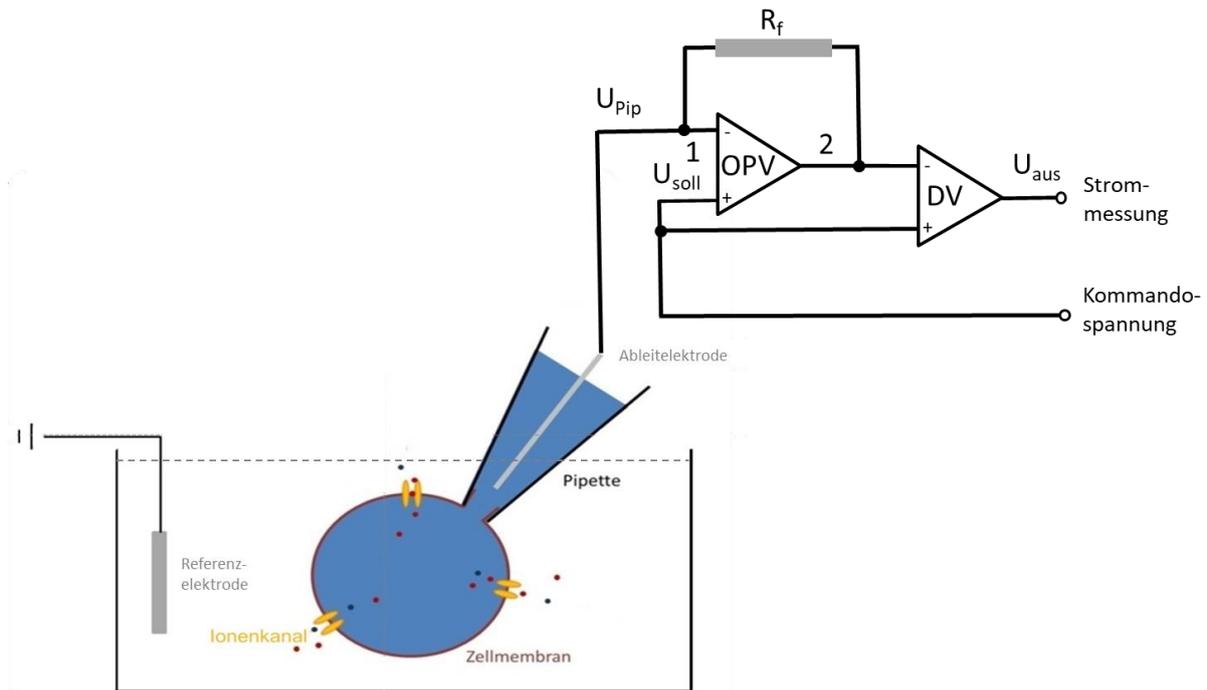
nachgeschalteten Signalkaskaden aktivierten TRPC5- und Kir-Kanäle gemessen. Als mechanischer Reiz wurde eine hypoosmolare Lösung verwendet. Sinnvoll ist dabei eine Applikation der Lösung von 15-30 s (Elektrophysiologie) bzw. 5-15 s (FRET, s. 2.4), da sonst die Zellen einen irreversiblen Schaden erleiden. Durch die höhere intrazelluläre Salzkonzentration strömt Wasser in die Zelle ein. Dies führt zu einer Vergrößerung des Zellvolumens, wodurch es unter anderem zu einer Dehnung der Membran kommt, was als mechanischer Reiz angesehen wird.

Das elektrophysiologische Analyseverfahren erlaubt die Messung von durch die Zellmembran gerichteten Strömen mittels einer sogenannten Patch-Elektrode (Neher und Sakmann, 1976). In der vorliegenden Arbeit wurden Messungen von Ganzzellströmen an kleinen Zellen durchgeführt (engl. *whole-cell measurement*, Ganzzellmessung). Dabei wird eine mit Pipettenlösung gefüllte Patchpipette mit einem chlorierten Silberdraht an die Zellmembran angelegt. Diese stellt die Ableitelektrode dar. Durch Anlegen eines Unterdrucks an die Pipette kann ein enger Kontakt zur Zellmembran aufgebaut werden, was dafür sorgt, dass keine Leckströme gemessen werden. Eine kurzzeitige Erhöhung des Pipettenunterdrucks führt zur Zerstörung des unter der Patchpipette liegenden Membranabschnitts. So erhält man einen direkten, nach außen isolierten elektrischen Zugang zur gesamten Zelle und gelangt in den Ganzzell-Modus. Da die Pipette dabei direkt mit dem Inneren der Zelle verbunden ist, findet innerhalb einer Equibrierungszeit ein Austausch des gesamten Zytosols mit der Pipettenlösung statt. Dabei verliert das Zytoplasma zwar seine natürliche Zusammensetzung, aber so ist es möglich das intrazelluläre Milieu der Zelle genau zu definieren und damit zu kontrollieren. Die zweite Elektrode wird Bad- oder Referenzelektrode genannt und besteht aus einem gesinterten Silber-Silberchlorid-Zylinder. Sie befindet sich in der die Zelle umgebenden Badlösung und hat die Aufgabe die Messkammer elektrisch zu erden. Die Ableit- und die Referenzelektrode ermöglichen so einen geschlossenen Stromkreis. Kommt es durch die Aktivierung von Ionenkanälen nun zu einem Stromfluss durch die Zellmembran, entstehen Abweichungen des definiert aufgezwungenen Membranpotentials (Sollspannung). Um die Sollspannung wiederherzustellen, wird ein Stromfluss über den Operationsverstärker erzeugt. Der dem zur Aufrechterhaltung der Sollspannung entsprechende Strom ist letztendlich die gemessene Größe einer Patch-Clamp-Messung. Durch einen Verstärker mit einer entsprechenden Empfindlichkeit können Ströme in der Größenordnung von wenigen Picoampere gemessen

werden. Durch die gezielte Auswahl von Bad- und Pipettenlösungen können diverse Ionenkanäle genau charakterisiert werden.

### 2.3.2.1 *Der Stromkreis*

Das Prinzip einer Patch-Clamp-Messung mit einer Spannungsklemme besteht darin, definierte Membranpotentiale an eine Zelle anzulegen und die resultierenden Ströme der Ionenkanäle durch Injektion von ausgleichenden Strömen zu kompensieren. Dieser Kompensationsstrom stellt die eigentliche Messgröße einer Patch-Clamp-Messung dar. Der Stromkreis bei einer solchen Messung besteht im Wesentlichen aus vier wichtigen Komponenten: Ableitelektrode, Bad-oder Referenzelektrode, Verstärker mit Operationsverstärker (OPV, engl. *operational amplifier*, OPA) und Rückkopplungswiderstand  $R_f$  (engl. *Resistance feedback*,  $R_f$ ). In Abbildung 9 ist ein solcher Stromkreis im oberen Bereich schematisch dargestellt. Im unteren Bereich ist eine Messkammer mit einer Zelle im Ganzzell-Modus abgebildet. Durch die Referenzelektrode ist die Messkammer geerdet. An den beiden Eingängen des OPA liegen zunächst die Spannung der Ableitelektrode in der Patchpipette  $U_{pip}$  (-Eingang) und die vom Experimentator vorgegebene Sollspannung  $U_{soll}$  (+Eingang) vor. Kommt es aufgrund von Ionenströmen in der Zellmembran zu einer Abweichung zwischen Pipettenpotential  $U_{pip}$  und der Sollspannung  $U_{soll}$  am Ausgang des OPA, entsteht eine Potentialdifferenz zwischen Punkt 1 und 2. Da der Eingangswiderstand des OPA in der Theorie unendlich hoch ist, fließt ein Strom über den Rückkopplungswiderstand  $R_f$  in die Patchpipette und damit in die Zelle. Der Stromfluss in die Zelle versiegt, sobald die Zellspannung wieder der Sollspannung  $U_{soll}$  entspricht. Auf diese Weise gleicht die Schaltung Abweichungen zwischen  $U_{pip}$  und  $U_{soll}$  aus und erzeugt gleichzeitig eine Spannung an  $R_f$ , die proportional zum in die Zelle injizierten Strom ist. Am Differenzverstärker (DV) liegt eine dem Strom in  $R_f$  entsprechende Spannung an, wobei noch die Kommandospannung zugeschaltet ist. Diese wird im DV abgezogen und als Ausgangsspannung  $U_{aus}$  an die Steuereinheit weitergegeben. Aus der Spannung  $U_{aus}$  und dem Rückkopplungswiderstand  $R_f$  kann nun der Kompensationsstrom  $I_{pip}$  ermittelt werden, der den Ionenströmen in der Zellmembran entspricht. Dargestellt wird dieser Strom in Abhängigkeit von der Zeit.



**Abbildung 9: Schematisches Schaltbild des Patch-Clamp-Stromkreises mit Messkammer**

Im unteren Bereich ist schematisch die Messkammer mit einer Zelle im Ganzzellmodus dargestellt. Die graue gestrichelte Linie gibt den Flüssigkeitsstand der sich in der Messkammer befindlichen Badlösung an. Der obere Bereich zeigt den vereinfacht dargestellten Schaltplan einer Patch-Clamp-Messung. OPV = Operationsverstärker, DV = Differenzverstärker,  $R_f$  = Rückkopplungswiderstand, nähere Erläuterungen s. Text.

### 2.3.3 Eingesetzte Lösungen

#### 2.3.3.1 Badlösungen

HEK293-Zellen und CHO-K1-Zellen wurden mit unterschiedlichen Badlösungen gemessen. HEK293-Zellen: 5 mM CsCl, 2 mM CaCl<sub>2</sub>, 10 mM HEPES, 1 mM MgCl<sub>2</sub>, 10 mM Glukose, 110 mM NaCl. CHO-K1-Zellen: 25 mM KCl, 0,1 mM CaCl<sub>2</sub>, 10 mM HEPES, 1 mM MgCl<sub>2</sub>, 10 mM Glukose, 88 mM NaCl. Die Einstellung des pH-Wertes auf 7,40 erfolgte durch Titration mit 1 M NaOH. Bei diesen Zusammensetzungen besaßen die Lösungen eine Osmolarität von 250 mosm/l  $\pm$  4 mosm/l und wurden als hypotone Lösungen eingesetzt. Ein Anteil der hergestellten hypotonen Lösung wurde unter Verwendung von osmotisch aktivem, aber in der Elektrophysiologie ansonsten inertem Mannitol anschließend auf 300 mosm/l  $\pm$  5 mosm/l als Badlösung eingestellt. Die Pharmaka zur Stimulation der Ionenkanäle und Rezeptoren wurden in maximaler Wirkkonzentration zur Badlösung zugegeben.

#### 2.3.3.2 Pipettenlösungen

Für die Ganzzelleableitung von HEK293-Zellen wurde eine 297 mosmol/l Pipettenlösung mit folgender Zusammensetzung verwendet: 120 mM CsCl, 3,95 mM CaCl<sub>2</sub>, gepuffert auf 100 nM freies Ca<sup>2+</sup> mit 10 mM BAPTA, 10 mM HEPES, 1 mM MgCl<sub>2</sub>, 0,2 mM Na<sub>3</sub>-GTP, 9,4 mM

NaCl. Die Titration erfolgte mit 5 M CsOH auf einen pH-Wert von 7,20. Für die Ganzzelleableitung von CHO-K1-Zellen wurde eine 293 mosmol/l Pipettenlösung mit folgender Zusammensetzung verwendet: 80 mM KCl, 50 mM K-Glutamat, 3,949 mM CaCl<sub>2</sub>, gepuffert auf 100 nM freies Ca<sup>2+</sup> mit 10 mM BAPTA, 10 mM HEPES, 2 mM MgCl<sub>2</sub>, 2 mM Mg-ATP. Die Titration erfolgte mit 1 M KOH auf einen pH-Wert von 7,20.

### **2.3.4 Experimenteller Ablauf**

#### **2.3.4.1 Messstand-Aufbau und Vorbereitung**

Der Messstand befand sich in einem faradayschen Käfig (Eigenbau aus rostfreiem Stahl, Feinmechanik-Werkstatt, Institut für Pharmakologie und Toxikologie der Universität Marburg, Marburg, Deutschland), durch den eine elektrische Abschirmung gewährleistet wurde. Ein inverses Mikroskop (Olympus IX 70, Hamburg, Deutschland), drei Mikromanipulatoren (Ln mini/combi, Luigs und Neumann, Ratingen, Deutschland), ein Patch-Clamp-Verstärker (EPC 10, HEKA Electronics, Dr. Schulz GmbH, Lambrecht, Deutschland) mit Pipettenhalter (Eigenbau aus Polycarbonat) und eine Kamera (EHD KamPro 02 CCD-Kamera, EHD Imaging GmbH, Damme, Deutschland) waren dabei auf einem schwingungsgedämpften Tisch (Kinetic Systems, Inc., Roslindale, MA, USA) installiert. Des Weiteren befand sich im faradayschen Käfig ein Perfusionssystem für die Badlösungen, welches mittels Gravitation betrieben wurde. Die Lösungen waren in 50 ml-Spritzen (Original Perfusor Spritzen, Braun, Homberg/Efze, Deutschland) gefüllt, die über ein Schlauchsystem mit der Messkammer verbunden waren. Alle Schläuche (1,6 mm Innendurchmesser, #20004451, Saint-Gobain Ceramics & Plastics Inc., Courbevoie, Frankreich) wurden vor der Messkammer mit Y-förmigen Endstücken zusammengeführt, an dessen anderen Ende sich ein sogenannter Reduzierschlauch (0,25 mm Innendurchmesser, #27148, Reichelt Chemietechnik GmbH + Co., Heidelberg) befand. Dieser hatte einen kleineren Durchmesser als die Schläuche vor dem Y-Stück, was zu einer geringeren Flussgeschwindigkeit von 1 ml/min führte. Der Reduzierschlauch endete in einer 180 µl fassenden Perfusionskammer aus Plexiglas (32 x 23 x 12 mm, Feinmechanik-Werkstatt, Institut für Pharmakologie und Toxikologie der Universität Marburg, Deutschland) in einer dafür vorgesehenen Bohrung. Die Perfusionskammer wurde in eine 33-mm-Kulturschale (Nunclon™ Delta Surface, #153066, Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, USA) eingesetzt und mit Befestigungsklemmen aus Federstahl fixiert. Neben der Bohrung für den Reduzierschlauch besaß die

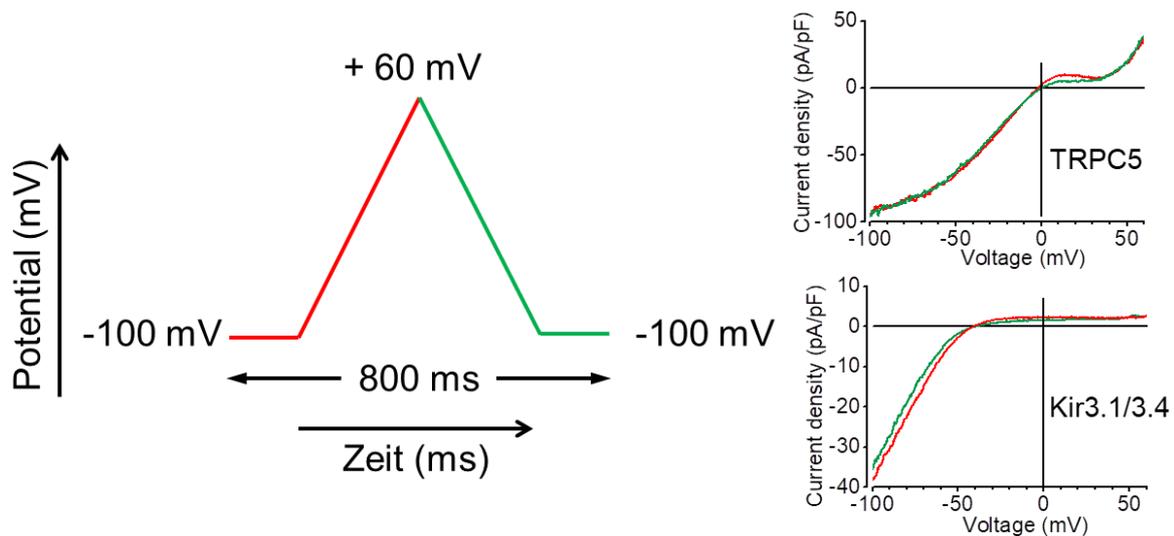
Perfusionskammer eine weitere Öffnung für die Referenzelektrode. In der Mitte befand sich eine breite Aussparung, in welcher die Messungen durchgeführt wurden. Die Badlösung wurde während einer Messung fortwährend über eine Vakuum-Pumpe abgesaugt (ALA Scientific Instruments, Farmingdale, USA). Alle metallischen Komponenten innerhalb des faradayschen Käfigs waren sternförmig geerdet. Außerhalb des faradayschen Käfigs befanden sich der Patch-Clamp-Verstärkeransteuerung, ein Monitor und der zur Messung verwendete Computer. Vor der Messung wurden die jeweils verwendeten Patchpipetten neu hergestellt. Dazu wurden Borosilikatglaskapillaren, die ein Glasfilament enthielten (#GB 150TF-8P, Science Products GmbH, Hofheim, Deutschland) in ein horizontales Pipettenziehgerät (DMZ-Universal-Puller, Zeitz Instrumente, München, Deutschland) gelegt. Anschließend wurde die Kapillare durch ein rot bis gelb glühendes Heizfilament mittig zweimal erhitzt und in einem dritten Erhitzungsschritt bis zur Trennung der Kapillare auseinandergezogen. Danach wurden beide Pipettenspitzen hitzepoliert. Dadurch erhielt man zwei Pipetten mit einem Pipettenwiderstand von 2,5 bis 4,5 M $\Omega$ , was den Bereich widerspiegelt, der in den durchgeführten Messungen zu einem niedrigen Zugriffswiderstand und einer guten Sealbildung führt. Vor der Messung musste das Diffusionspotential (engl. *liquid junction potential*) bestimmt werden. Dies beschreibt eine Spannung, die zwischen verschiedenen Elektrolyten wie Bad- und Pipettenlösung entsteht, wenn diese unterschiedlichen Ionen und Ionenkonzentrationen aufweisen. Abhängig von der Größe und der Ladung der einzelnen Ionen entstehen unterschiedliche Diffusionsgeschwindigkeiten. Durch Eingabe der jeweils verwendeten Konzentrationen und Ionen in ein Programm der Firma Axon Instruments (Union City, USA) wurde rechnerisch ein Diffusionspotential von +4,0mV für die Lösungen bei HEK293-Zell-Messungen und ein Diffusionspotential von +7,3 mV für die Lösungen bei CHO-K1-Zell-Messungen ermittelt. Jede Messung im Ganzzellmodus wurde mit diesen Werten korrigiert.

#### 2.3.4.2 Durchführung der Messung

Alle Messungen wurden bei einer Raumtemperatur von 20 – 23 °C durchgeführt. Die in 2.2.4 beschriebenen Zellen wurden dem Inkubator entnommen und die Kulturschale direkt in die Halterung im Mikroskopisch gespannt. Bei der Auswahl der Zellen wurde darauf geachtet, fusiforme einzelne Zellen herauszusuchen, die mittelstark fluoreszierten. Dies erlaubt stabilere Ableitungen, da stark fluoreszierende Zellen oft sehr empfindlich sind. Nach der Befüllung der Patchpipette mit der entsprechenden Pipettenlösung wurde diese in den

Pipettenhalter eingespannt und ein leichter Überdruck von 10 – 15 cm Wassersäule angebracht um ein Eindringen von kleinen Partikeln auf der Badoberfläche in die Pipettenspitze zu verhindern. Bei 10facher Vergrößerung wurde die Pipette mit Hilfe des Mikromanipulators in die Badlösung getaucht und dann in eine 40fache Vergrößerung gewechselt. Die Pipettenspitze wurde an die in der Mitte des Sichtfelds justierte Zelle bis auf 1-2  $\mu\text{m}$  herangefahren und eine sogenannte Offset-Korrektur durchgeführt. Als Offset-Potential bezeichnet man die Summe aller Potentiale in der Messkette, die nicht von der abzuleitenden Zelle oder vom Kommandopotential stammen. Diese Potentiale entstehen innerhalb der Messkette zum einen zwischen chlorierten Silberdraht der Ableitelektrode und der Pipettenlösung, zum anderen zwischen Referenzelektrode und Badlösung. Damit sich diese Offset-Potentiale nicht mit den Kommandopotentialen addieren, wurde nach dem Eintauchen der Patchpipette in die Badlösung 1  $\mu\text{m}$  über den Zellen das Nullpotential definiert, an dem kein Strom zwischen Pipette und Badlösung fließt. Zur Herstellung eines „Gigaseals“ wurde in der Spannungsklemme über ein rechteckiges Kommando-Spannungssignal von  $\pm 5$  mV die Stromamplitude der Pipette auf dem Monitor beobachtet. Kam es durch die Annäherung der Pipette an die Membran bei gleichbleibender Spannung zu einer Zunahme des Widerstands, wurden die Stromamplituden kleiner. Bei einer Reduktion der Stromamplitude von 10 – 30 % wurde der Überdruck schlagartig abgelassen. Sofort danach wurde ein leichter Unterdruck an die Zelle angelegt bis der Abdichtwiderstand höher als ein Gigaohm war, ein „Gigaseal“ war nun erreicht. Nachdem die Verbindung zwischen Pipettenglas und Membran zustande gekommen war, herrschte die „cell-attached-Konfiguration“ vor. Die Patchpipettenkapazität wurde mittels der „cell-attached“- bzw. „on cell“-Aktivierung des Messprogramms kompensiert und der Membranabschnitt unter der Patchpipette durch einen kurzzeitig stark erhöhten Pipettenunterdruck aufgerissen. Sobald ein elektrischer Zugang zur Zelle bestand, wurde die Zellmembrankapazität durch das Messprogramm Patchmaster kompensiert. Durch den nun bestehenden Zugang konnte die gesamte Zellmembran auf das angelegte Potential geklemmt werden und die Messung im Ganzzellmodus durchgeführt werden. Die Bestimmung der Membrankapazität sowie deren Kompensation wurde automatisch durch den EPC 10 Verstärker bestimmt und ausgeführt. Das Haltepotential betrug bei den durchgeführten Messungen  $-60$  mV. Um die Analyse der Strom-Spannungsbeziehungen zu ermöglichen, wurden aufsteigende und wieder absteigende - sog. trianguläre - Spannungsrampen von  $-100$  mV bis  $+60$  mV und wieder

bis  $-100$  mV mit einer Frequenz von 1 Hz mit einer Rampengeschwindigkeit von  $0,4$  V/s appliziert (s. Abbildung 10 links). Es wurden zu jedem Zeitpunkt in der Spannungsklemme Einwärts- oder Auswärtsströme im zweistelligen bis dreistelligen Picoampere-Bereich gemessen, bei CHO-K1-Zellen zuweilen auch Einwärtsströme im Nanoampere-Bereich. Trianguläre Spannungsrampen werden verwendet, um die Strom-Spannungsbeziehung eines Kanals zu untersuchen und um einen eventuell vorliegenden Hystereseeffekt anzuzeigen. Dieser beschreibt die Abhängigkeit der Stromänderungen von der Richtung der Spannungsänderung. Die Strom-Spannungsbeziehung ist bei der Aufwärts- und Abwärtsrampe für den TRPC5 und den Kir3.1/3.4-Kanal bei maximaler Aktivierung leicht unterschiedlich (s. Abbildung 10 rechts), es liegt also ein kleiner Hystereseeffekt vor. Für die Darstellung der Strom-Spannungsbeziehung wurden in der vorliegenden Arbeit diese marginalen Unterschiede nicht berücksichtigt und nur die Spannungen der Aufwärtsrampe von  $-100$  mV -  $+60$  mV analysiert. Anhand der Strom-Spannungskurve lässt sich die Spannungsabhängigkeit des TRPC5 klar erkennen. Bei maximaler Aktivierung durch einen Stimulus ist bei Spannungen unter  $-60$  mV nur eine geringe Aktivierung in Form eines Einwärtsstroms erkennbar, dieser nimmt erst bei steigender Spannung zu um bei  $0$  mV das Umkehrpotential mit einem Null-Nettostrom zu erreichen. Bei positiven Potentialen kann man eine Zunahme des Auswärtsstroms beobachten, wobei es zwischen  $0$  und  $+40$  mV aufgrund einer intrazellulären magnesiumabhängigen Blockade zu einem Plateau ohne Stromzunahme kommt (Obukhov und Nowycky, 2005). Bei Werten über  $+40$  mV kommt es wieder zu einer Zunahme des Auswärtsstroms. Die für den TRPC5 charakteristische Strom-Spannungskurve wird „doppelt-rektifizierend“ genannt (Schaefer *et al.*, 2000; Yamada *et al.*, 2000). Diese Bezeichnung ist genaugenommen inkorrekt, da im physikalisch-technischen Sinne keine doppelt-rektifizierende Strom-Spannungskennlinie dargestellt wird. Ein Kir3.X-Kanal weist ebenfalls eine charakteristische Strom-Spannungsbeziehung auf, die als „einwärts rektifizierend“ bezeichnet wird. Bei stark negativen Spannungen ( $-100$  mV bis  $-42$  mV) findet eine starke Zunahme des Einwärtsstroms statt. Bei Erreichen des Umkehrpotentials von  $-42$  mV findet aufgrund einer intrazellulären Magnesium- und Polyamin-abhängigen Blockade keine Zunahme des Auswärtsstroms statt, es bleibt bei einem Strom-Plateau. Erst wenn wieder negative Spannungen erreicht werden, kommt es erneut zu einer Zunahme des Einwärtsstroms (Dascal, 1997).



**Abbildung 10: Schematische Darstellung einer triangulären Spannungsrampe und Hystereseeffekt**

**Links:** Während einer Ganzzell-Messung ablaufendes Spannungsprotokoll. Innerhalb von 800 ms wird ein Pipetten-Potential in Sprüngen von  $-100$  mV auf  $+60$  mV (Aufwärtsrampe, rot) und wieder auf  $-100$  mV appliziert (Abwärtsrampe, grün). **Rechts:** Strom-Spannungsbeziehung der Aufwärtsrampe (rot) und der darauffolgenden Abwärtsrampe (grün) für den TRPC5 (oben) und den Kir-Kanal (unten) bei maximaler Aktivierung.

Die zur Stimulation der Rezeptoren eingesetzten Pharmaka wurden in der gewünschten Konzentration in der Badlösung gelöst und anschließend appliziert. Dabei wurden die Wirkstoffe so lange eingewaschen, bis der Maximalstrom erreicht wurde, anschließend wurde mit Pharmaka-freier Badlösung ausgewaschen. Bei Experimenten, in denen Rezeptorblocker eingesetzt wurden, wurden diese ebenfalls in den Badlösungen gelöst. Die Konzentration wurde so gewählt, dass der  $EC_{50}$  der Blocker den  $EC_{50}$  der Agonisten um ein mehrfaches überstieg. Nach einer Equibrilierungsphase, in der sich zwischen Pipettenlösung und Intrazellulärraum ein Ionenfließgleichgewicht eingestellt, wurde der jeweilige Rezeptorblocker für ca. 1 Min. eingewaschen. Anschließend wurde der Agonist zusammen mit dem Blocker appliziert. Bei Messungen mit Pertussistoxin wurden die Zellen 12 – 16 Stunden vor Experimentbeginn mit 50 ng/ml des Toxins gelöst in EMEM inkubiert. Die Patch-Clamp-Ableitungen wurden mit Hilfe des Datenerfassungsprogrammes Patchmaster v2.67 (HEKA Electronics, Dr. Schulz GmbH, Lambrecht, Deutschland) durchgeführt und aufgezeichnet.

## 2.4 FRET

### 2.4.1 Material

#### Pharmaka:

8-Bromo-cAMP	#B7880, Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Schnelldorf, Deutschland
D-Phe-Cys-Tyr-D-Trp-Arg-Thr-Pen-Thr-NH <sub>2</sub> (CTAP)	#1560, Tocris House, Bristol, UK
D-Ala <sup>2</sup> -N-MePhe <sup>4</sup> -Gly-ol-enkephalin (DAMGO)	#E7384, Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Schnelldorf, Deutschland
Forskolin	# T2939, Biozol, Eching, Deutschland
Guanfacin-HCl	#1030, Tocris House, Bristol, UK
3-isobutyl-1-methylxanthin (IBMX)	#13347, Cayman Chemical, Ann Arbor, USA
DL-Isoproterenol-HCl	#15627, Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Schnelldorf, Deutschland
Noradrenalin	#74880, Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Schnelldorf, Deutschland
Propranolol-HCl	#P04884, Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Schnelldorf, Deutschland
Serotonin-HCl	#H9523, Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Schnelldorf, Deutschland
Yohimbin-HCl	#Y3125, Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Schnelldorf, Deutschland

#### Weitere Substanzen:

CaCl <sub>2</sub> -Lösung 1 M in H <sub>2</sub> O	#21115, Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Schnelldorf, Deutschland
D-(+)-Glukose	#G7528, Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Schnelldorf, Deutschland
HEPES (2-[4-(2-Hydroxyethyl)-1-piper-azin] ethansulfonsäure)	#H3375, Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Schnelldorf, Deutschland
KCl	#K9333, Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Schnelldorf, Deutschland

MgCl <sub>2</sub>	#M2670, Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Schnelldorf, Deutschland
D-Mannitol	#63559, Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Schnelldorf, Deutschland
NaCl	#N31434, Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Schnelldorf, Deutschland

#### 2.4.2 Förster-Resonanz-Energietransfer-Methode

Der Förster-Resonanzenergietransfer (FRET) beschreibt den strahlungslosen Energietransfer zwischen zwei Fluorophoren (Förster, 1948). Die in dieser Arbeit durchgeführten FRET-Messungen wurden an einem inversen Mikroskop IX70 von Olympus durchgeführt, das mit einem UPlanSApo 100x/1.40 Öbobjektiv (Olympus Deutschland GmbH, Hamburg) ausgestattet war. Gemessen wurde unter Verwendung eines Dual-Emission-Detektionssystems von FEI Munich GmbH (ursprünglich TILL Photonics, 2011 übernommen von FEI Munich GmbH). Ein Polychrom V (TILL Photonics) diente zur Fluoreszenzanregung und wurde durch eine Kontrolleinheit (engl. *Imaging Controller Unit*, ICU) reguliert, die eine flexible Echtzeitsteuerung der Lampe, der Verschlüsse (engl. *shutter*) und die Einstellung unterschiedlicher Intensitäten ermöglichte. Als Donorfluorophor diente entweder das blau-fluoreszierende CFP oder mTurquoise2 und als Akzeptorfluorophor wurde entweder YFP, FIAsh oder mVenus (auch als zirkulär permutierte Variante) verwendet. Die Signale wurden über zwei Photodioden detektiert und in einem A/D-Wandler (analog/digital) digitalisiert. Die Fluoreszenzintensitäten der beiden Einzelkanäle sowie das Ratio (FRET-Signal) aus den Signalen der Fluorophore YFP/CFP, mVenus/mTurquoise2 oder FIAsh/mTurquoise2 wurden mittels der Patchmaster Software (HEKA) dargestellt. Die Donormoleküle wurden durch den Polychrom V mit monochromatischem Licht der Wellenlänge 430 nm angeregt und die emittierte Strahlung über einen Strahlenteiler DCLP 460 nm in das Mikroskop geleitet. Die Abtastrate bzw. Messfrequenz betrug 5 Hz. Die Fluoreszenzemission von CFP bzw. mTurquoise2 wurden mit einem Filter erfasst, der Wellenlängen im spektralen Fenster von 40 nm um den Mittelpunkt 480 nm passieren lässt. Bezeichnet wird dies in der Kurzschreibweise als 480/40 nm ( $F_{480}$ , Strahlenteiler DCLP 505 nm). Die Emission von YFP, FIAsh oder mVenus wurde bei 535/30 nm ( $F_{535}$ , Strahlenteiler DCLP 505 nm) erfasst. Nach der Messung wurden die erhaltenen Werte um das Durchbluten („*bleed-through*“) der CFP/mTurquoise2-Emission in den YFP/mVenus/FIAsh-Aufnahmekanal korrigiert. Diese

wurde experimentell ermittelt, indem nur mit CFP bzw. mTurquoise2 transfizierte Zellen mit 430 nm angeregt und die Signalintensität mehrerer einzelner HEK293-Zellen im CFP/mTurquoise2-Aufnahmekanal und im YFP/mVenus/FIAsH-Aufnahmekanal verglichen wurden. Dabei ergab sich, dass die Werte von CFP um 48 % des Signals von YFP, mTurquoise2 um 41 % des Signals von mVenus und mTurquoise2 in Kombination mit FIAsH um 41 % des Signals von FIAsH reduziert werden mussten. Weiterer Korrekturbedarf ergab sich durch die Tatsache, dass bei der Anregung mit 430 nm auch eine direkte Anregung von YFP/mVenus/FIAsH stattfand, die eine FRET-unabhängige Emission von YFP/mVenus/FIAsH hervorrief („cross-talk“). Durch experimentelle Bestimmung wurde das Fluoreszenzsignal im YFP/mVenus/FIAsH-Aufnahmekanal von nur mit YFP bzw. mVenus transfizierten bzw. FIAsH-markierten HEK293-Zellen nach Anregung mit 430 nm ermittelt. Die direkte Anregung bei 430 nm betrug 9,3 % (YFP) bzw. 6,3 % (mVenus) bzw. 0 % (FIAsH). Daher wurden die erhaltenen Werte von YFP/mVenus/FIAsH um die entsprechenden Anteile reduziert. Das sogenannte Bleichen der Zellen wurde rechnerisch nicht berücksichtigt. Die experimentellen Bedingungen wurden so gewählt, dass das Bleichen der Fluorophore keine nennenswerte Störgröße darstellte. Dafür wurde zu Beginn jeder Messung so lange mit einer Stimulation gewartet, bis sich das FRET-Signal auf ein gleichbleibendes Niveau eingependelt hatte. Zur finalen Bestimmung des Ratios zwischen den korrigierten Signalintensitäten von gelben (YFP/mVenus/FIAsH, Fluorophor<sup>gelb</sup> =  $F^{gelb}_{430nm}$ ) und blauen (CFP/mTurquoise2, Fluorophor<sup>blau</sup> =  $F^{blau}$ ) Fluorophoren kam folgende Formel zum Einsatz (ratiometrisches FRET):

$$FRET_{ratio} = \frac{F^{gelb}_{430nm} - 0,093 / 0,063 * F^{gelb}_{490nm} - 0,48 / 0,41 * F^{blau}_{430nm}}{F^{blau}_{430nm}}$$

$F^{gelb}_{430nm}$  = Emission von  $F^{gelb}$  bei Anregung mit 430 nm

$F^{gelb}_{490nm}$  = Emission von  $F^{gelb}$  bei Anregung mit 490 nm

$F^{blau}_{430nm}$  = Emission von  $F^{blau}$  bei Anregung mit 430 nm

Die Fluoreszenzsignale der einzelnen Kanäle müssen im Sinne eines FRETs in einer gegensinnigen Weise auftreten. Eine gleichsinnige Fluoreszenzänderung stellt kein FRET-Signal dar und wurde daher als negatives Selektionskriterium verwendet.

### 2.4.3 Lösungen

Für Messungen von HEK293-Zellen, die mit einem der Epac-Sensor-Konstrukte transfiziert waren, wurde eine Badlösung mit folgender Zusammensetzung verwendet: 140 mM NaCl, 5,4 mM KCl, 1 mM MgCl<sub>2</sub>, 2 mM CaCl<sub>2</sub>, 10 mM Glukose, 10 mM HEPES. Die Titration erfolgte mit 1 M NaOH auf einen pH-Wert von 7,40. Bei Messungen von HEK293-Zellen, die mit h5-HT<sub>1B</sub>-FRET-Sensor, h $\mu$ -FRET-Sensor oder  $\alpha_{2A}$ -YFP-CFP transfiziert waren, wurden folgende Badlösungen eingesetzt: 5 mM KCl, 2 mM CaCl<sub>2</sub>, 10 mM HEPES, 1 mM MgCl<sub>2</sub>, 10 mM Glukose, 55 mM NaCl. Die Titration erfolgte mit 1 M NaOH auf einen pH-Wert von 7,40. Bei dieser Zusammensetzung besaß die Lösung eine Osmolarität von 150 mosm/l  $\pm$ 4 mosm/l und wurde als hypoosmolare Lösung eingesetzt. Unter Verwendung von osmotisch aktiven, inerten Mannitol wurde die Osmolarität anschließend auf 300  $\pm$ 5 mosm/l eingestellt. Die Pharmaka zur Stimulation der Rezeptoren wurden in maximaler Wirkkonzentration zur Badlösung zugegeben. Forskolin wurde in submaximaler Konzentration von 1  $\mu$ M verwendet.

### 2.4.4 Stimulationsmethoden bei FRET-Messungen

Die Applikation der Pharmaka und des mechanischen Reizes erfolgten in der vorliegenden Arbeit je nach Fragestellung auf unterschiedliche Arten.

Bei FRET-Messungen der Rezeptorsensoren wurde die Applikation der Pharmaka mit einem ALA-Überdruck-Superfusions-Systems durchgeführt. Dieses besteht aus einem Druckregulator, mit welchem einzelne oder multiple Pharmakalösungen mit einem definierten Druck von 0,8-1 bar über ein Mehrkanalsystem (Quartz MicroManifold®, ALA Scientific Instruments, Inc., Farmingdale, NY, USA) unter Zuhilfenahme eines Mikromanipulators direkt neben eine spezifische Zelle (Abstand ca. 100  $\mu$ M) appliziert werden können. 3 – 8 Eingangsschläuche mit einem Durchmesser von 100  $\mu$ M werden durch Mikro-Quarzkapillaren zu einem einzigen Auslass zusammengefasst und münden in einer ebenfalls 100  $\mu$ M großen Spitze. Dabei wurde eine Flussrate von 100 – 150  $\mu$ l/min eingesetzt.

Bei Untersuchungen der Epac-Sensoren wurden zur Applikation eines mechanischen Reizes mehrere Methoden durchgeführt und verglichen. Wurde der mechanische Reiz durch hypoosmolare Lösung simuliert, wurde ein Perfusionssystem mittels Gravitation verwendet. Bei der Einbringung von Scherspannung wurde ein mit Badlösung gefüllter Perfusor mit einem Kanal einer ibidi®-Messkammer verbunden. Durch die Applikation von Badlösung mit

einer Flussrate von 22,2 ml/h bzw. 33,6 ml/h in das geschlossene System der Messkammer konnte eine definierte Scherspannung von 40 bzw. 60 dyn/cm<sup>2</sup> erzeugt werden. Bestand der mechanische Reiz aus der Einbringung von extrazellulärem Überdruck, wurde dieser über eine Wassersäule von 109 cm appliziert, was einem Druck von 80 mmHg und damit einem optimalen diastolischen Blutdruckwert entsprach. Die zu untersuchenden Zellen befanden sich dabei auf einem Glasplättchen in einem rostfreiem Edelstahlhalter (Eigenbau), der durch die Einspannung eines zweiten Glasplättchens in ein druckgeschlossenes System umgewandelt werden konnte.

#### **2.4.5 Experimenteller Ablauf**

##### **2.4.5.1 Messstand-Aufbau und Vorbereitung**

Der Messstand entsprach jenem aus den elektrophysiologischen Messungen (s. 2.3.4.1). Ein Mikromanipulator (Ln mini/combi, Luigs und Neumann, Ratingen, Deutschland) wurde bei Messungen mit dem Überdruck-Superfusions-System (ALA Scientific Instruments, Farmingdale, NY, USA) dazu genutzt, die 100 µm große Spitze neben die zu messende Zelle zu positionieren (Messungen mit den Konstrukten 5-HT<sub>1B</sub>-FRET-Sensor bzw. µ-FRET-Sensor und α<sub>2A</sub>-YFP-CFP). Wurde mit dem Perfusionssystem mittels Gravitation gemessen (alle Epac-Sensor-Konstrukte und α<sub>2A</sub>-YFP-CFP-Sensor), befand sich ein Äquivalent zu dem in der Elektrophysiologie verwendeten Messaufbau im Messtand (s. 2.3.4.1). Eine Kamera (EHD KamPro 02 CCD-Kamera, EHD Imaging GmbH, Damme, Deutschland) und ein Monitor dienten zur Auswahl von fluoreszierenden Zellen. Mit Hilfe von Blenden wurde genau der Bereich eingegrenzt, in dem sich die zu messende Zelle befand. Wurden die Zellen mit dem ALA-Überdruckapplikationssystem stimuliert, wurden die Glasplättchen mit den Zellen in einen extra zu diesem Zweck angefertigten, rostfreien Edelstahlhalter (Eigenbau) eingespannt und in das Mikroskop eingebracht. Bei Messungen mit dem Perfusionssystem mittels Gravitation wurden die Glasbodenschälchen mit den Zellen analog zu den in der Elektrophysiologie verwendeten Kulturschälchen im Messtand fixiert. Zusätzlich musste noch eine Einlegscheibe in das Glasbodenschälchen gelegt werden, da sich die Form des Bodens von den Nunc-Kulturschälchen unterschied und erst so ein Perfusionskanal erzeugt werden konnte. Die Badlösung wurde während Messungen mit dem Perfusionssystem fortwährend über eine Vakuum-Pumpe abgesaugt (ALA Scientific Instruments, Farmingdale, USA). Bei Messungen mit ibidi®-Messkammern wurden diese mit rostfreien Stahlklammern

auf dem Messtisch fixiert. Damit kein Streulicht in die Dioden gelangt, wurde vor Messbeginn ein den Messstand umgebender, lichtundurchlässiger Vorhang (Eigenkonstruktion) angebracht. So konnte auch bei Tageslicht unter Lichtausschluss gemessen werden.

#### *2.4.5.2 Durchführung der Messung*

Alle Messungen fanden bei einer Raumtemperatur von 20 – 23 °C statt. Die in 2.2.4 beschriebenen Zellen wurden direkt aus dem Inkubator entnommen, zweimal mit Badlösung gewaschen und die Schale mit Zellen in den Mikroskopisch eingebracht. Zur Suche von transfizierten Zellen wurde dauerhaft mit monochromatischem Licht von 430 nm angeregt und die Intensität auf 100 % eingestellt. Dabei wurde Wert darauf gelegt, die Zellen so kurz wie möglich bei 100%iger Intensität anzustrahlen, um diese nicht zu schädigen. Bei der Auswahl der Zellen wurde darauf geachtet, fusiforme, einzelne oder in kleinen Verbänden vorkommende Zellen herauszusuchen, die mittelstark und dabei hauptsächlich an der Membran fluoreszierten. Nach Auswahl der Zelle wurde entweder die ALA-Überdruckapplikation neben die Zelle positioniert und so eingestellt, dass keine Bewegung an der Zelle selbst wahrnehmbar war oder die Perfusion mittels Gravitation angeschaltet, wobei ebenfalls keine Bewegung der Zelle sichtbar sein sollte. Bei Experimenten mit involviertem Perfusor wurde dieser an die ibidi®-Messkammern angeschlossen. Nach Start der Messung wurde die Zelle konstant mit Badlösung überspült. Bei Messungen mit den Konstrukten 5-HT<sub>1B</sub>-FRET-Sensor bzw.  $\mu$ -FRET-Sensor und  $\alpha_{2A}$ -YFP-CFP wurden zuerst die Agonisten appliziert und anschließend die hypotone Lösung eingewaschen. Zwischen den Stimulationen wurde jeweils mit Badlösung ausgewaschen. Die Epac-Sensor-Konstrukte wurden bei Messungen mit Forskolin mit submaximaler Konzentration (1  $\mu$ M) des Pharmakons stimuliert, bis ein gleichbleibendes FRET-Signal erreicht wurde. Nachfolgend wurde mit Rezeptoragonisten stimuliert. In der Kombination mit IBMX wurden Konzentrationen Forskolin/ IBMX von 1  $\mu$ M/ 10  $\mu$ M verwendet. Bei Rezeptorblockern wurde die Konzentration wie unter 2.3.4.2 beschrieben gewählt.

### *2.5 Datenanalyse*

Die Auswertung der elektrophysiologischen Messungen erfolgte mit dem Computerprogramm Fitmaster v2.69. Die Stromwerte aus den Spannungsrampen wurden

durch die Zellmembrankapazitäten normiert und anschließend gemittelt. Mit den Tabellenkalkulationsprogrammen Origin 7.5 und 8.0 wurden die Strom-Spannungsbeziehungen, Stromzeitverläufe und die Stromdichten (Quotient aus absoluter Stromgröße und Zellkapazität) erstellt sowie die statistische Auswertung durchgeführt, wenn nur zwei Gruppen miteinander verglichen wurden. Als statistisch signifikant unterschiedlich wurden dabei Daten definiert, welche beim Zweistichproben-*t*-Test einen *p*-Wert von unter 0,05 aufwiesen. Wurden mehr als zwei Gruppen miteinander verglichen, wurde eine Varianzanalyse (engl. *analysis of variance*, ANOVA) für normalverteilte Datensätze durchgeführt. Zeigten die Datensätze keine Normalverteilung auf, wurde ein Kruskal-Wallis-Test als nicht-parametrisches Verfahren für ungepaarte Daten durchgeführt. Für letztgenannten Test wurde das Statistik-Computerprogramm GraphPad Prism 7.03 verwendet. Es wurde für alle Stromdichten die Standardabweichung vom Mittelwert berechnet. Für alle Abbildungen in der vorliegenden Arbeit gilt: n. s. = nicht signifikant; \* =  $p < 0,05$ ; \*\* =  $p < 0,01$ ; \*\*\* =  $p < 0,001$ .

Für die statistische Auswertung der FRET-Experimente wurde Origin® 8.0 (Originlab Corp.) verwendet. Die durch das PatchMaster-Computerprogramm aufgezeichneten Daten wurden in Origin® exportiert und dort prozessiert. Die Daten einer Messreihe wurden als arithmetisches Mittel mit Standardfehler des Mittelwerts dargestellt. Sofern nicht anders angegeben, wurden die Daten nach Versuchsablauf jeweils mit einem gepaarten oder ungepaarten Zweistichproben-*t*-Test analysiert. Dabei wurden ausschließlich Daten verwendet, die einen *p*-Wert von unter 0,05 aufwiesen. Bei der Verwendung von Kastendiagrammen (engl. *boxplot*) wurden 25 %- bzw. 75 %-Quartile gewählt und Median sowie Mittelwert aufgezeigt. Die FRET-Signale während einer Agonistenstimulation wurden mittels monoexponentiellen Annäherungen genauer bestimmt. Dabei wurde das Simplex-Verfahren und der Levenberg-Marquardt-Optimierungsalgorithmus angewandt, bis keine weitere Reduktion von Chi-Quadrat mehr zu verzeichnen war. Biexponentielle Annäherungen erbrachten keine verbesserten Werte. Zur Bestimmung der mittleren effektiven Konzentration ( $EC_{50}$ ) wurden die Konzentrations-Wirkungs-Kurven durch Anwendung der Hill-Gleichung so lange angepasst, bis keine weitere Reduktion von Chi-Quadrat mehr zu verzeichnen war.

## 3 Ergebnisse

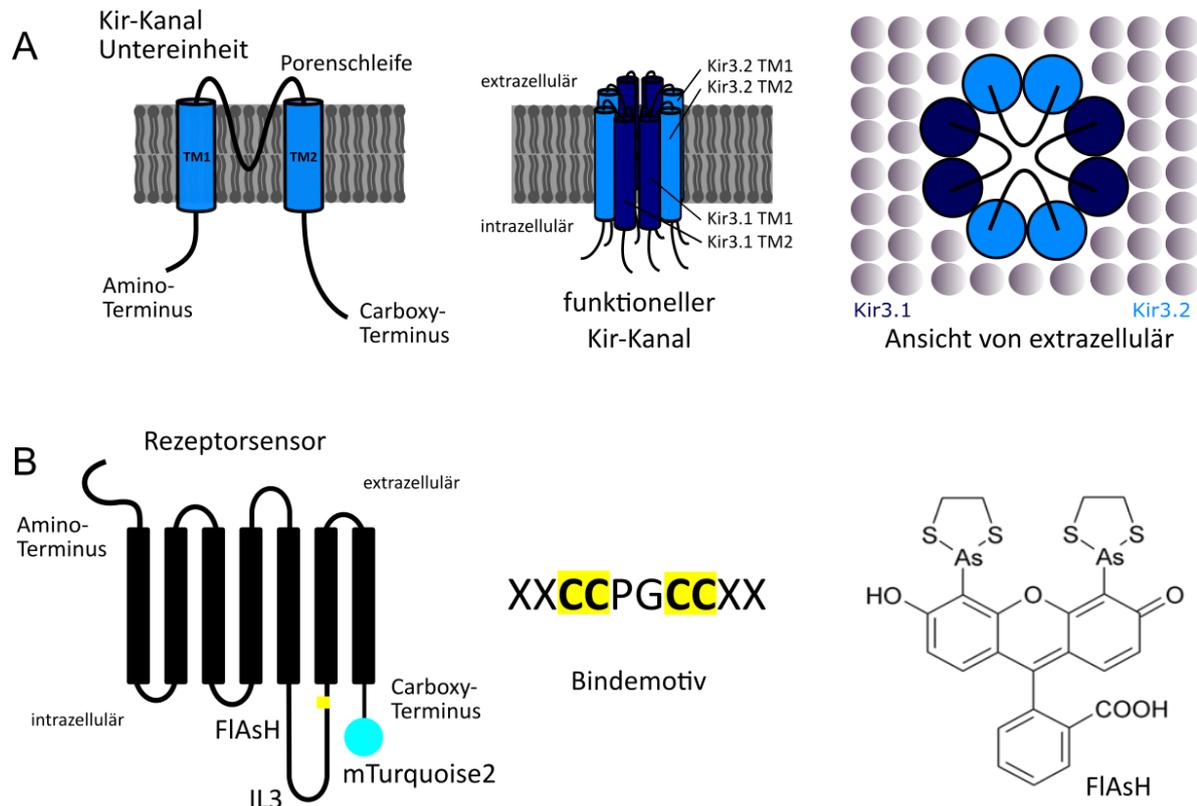
Im folgenden Abschnitt werden die im Rahmen der vorliegenden Arbeit erhobenen Ergebnisse vorgestellt. Dabei wird zunächst auf die mittels Molekularbiologie generierten Konstrukte eingegangen. Anschließend werden die Ergebnisse von Untersuchungen der mechanischen Aktivierbarkeit  $G_{i/o}$ -PCR durch elektrophysiologische Experimente dargestellt, gefolgt von Erläuterungen zur Entwicklung einer cAMP-Sensor-basierten FRET-Methode zur Visualisierung dynamischer cAMP-Spiegeländerungen. Zuletzt werden die Untersuchungen zur Mechanosensorik direkt an  $G_{i/o}$ -PCR dargelegt.

### 3.1 Molekularbiologie

#### 3.1.1 Konstrukte zur Ermittlung der mechanischen Aktivierbarkeit

Es ist im Bereich der GPCR-Forschung allgemein anerkannt, dass G-Protein-gekoppelte einwärts gleichgerichtete Kaliumkanäle durch die  $\beta\gamma$ -Untereinheit von  $G_{i/o}$ -PCR aktiviert werden (Hibino *et al.*, 2010). Aufgrund der unter 1.3.1.1 aufgeführten Erläuterungen war es zweckmäßig, Heterotetramer-Konstrukte aus Kir3.1 und Kir3.2 bzw. Kir3.4 mittels molekularbiologischer Methoden zu generieren (s. 2.1.8 und 2.1.11), um die Aktivierung von  $G_{i/o}$ -PCR zu visualisieren. Für den schematischen Aufbau der Kir-Kanal-Konstrukte siehe Abbildung 11 A.

Da das Messsystem mit Kir-Kanälen und auch die Kombination mit TRPC5 die Rezeptoraktivierung nur indirekt widerspiegelt, wurden außerdem Rezeptor-FRET-Konstrukte generiert, die im Folgenden auch Rezeptorsensoren genannt werden. Um die Konformationsänderungen des Rezeptors nach Aktivierung detektieren zu können, wurde gemäß bereits vorhandener Arbeiten (Hoffmann *et al.*, 2005; Maier-Peuschel *et al.*, 2010; Ziegler *et al.*, 2011) der h5-HT<sub>1B</sub>- und der h $\mu$ -Rezeptor modifiziert. Dazu wurde jeweils am Ende der IL3 ein Tetracysteinbindemotiv eingefügt (s. 2.1.10), an das sich das gelb fluoreszierende, arsenhaltige Fluoresceinderivat (FIAsH) binden konnte (s. 2.2.5). Als türkis-fluoreszierendes Molekül wurde mTurquoise2 am Ende des C-Terminus eingefügt. Für eine schematische Darstellung der Rezeptorsensoren und deren Funktionsweise siehe Abbildung 11.B.



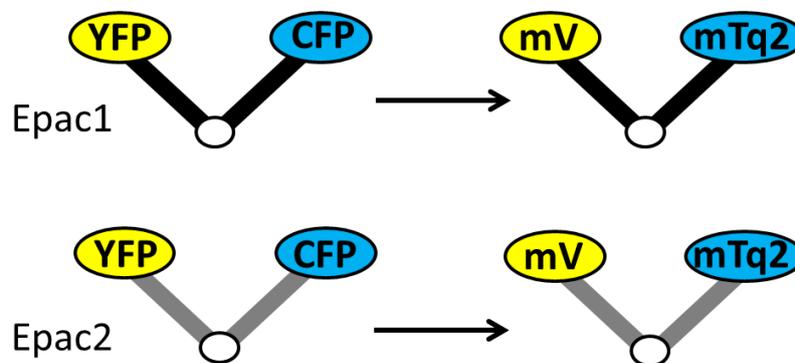
**Abbildung 11: Schematische Darstellung der Konstrukte zur Ermittlung der mechanischen Aktivierbarkeit**

**A** Links: Aufbau einer Kir-Kanal-Untereinheit. Diese besteht aus zwei transmembranären Domänen, einer Porenschleife und einem intrazellulären Amino- sowie Carboxy-Terminus. Mitte: Ein funktioneller Kir-Kanal besteht aus vier Kir-Kanal-Untereinheiten. Die in der vorliegenden Arbeit verwendeten Kir-Kanäle waren Heterotetramere aus Kir3.1 (dunkelblaue Zylinder) und entweder Kir3.2 oder Kir3.4 (hellblaue Zylinder, in der Abbildung beispielhaft mit Kir3.2 dargestellt). Rechts: Ansicht eines funktionellen Kir-Kanals von extrazellulär in einer Membran. Zu sehen ist, dass die jeweiligen Untereinheiten (dunkelblau: Kir3.1, hellblau: Kir3.2 oder Kir3.4, in der Abbildung beispielhaft mit Kir3.2 dargestellt) gegenüberliegend positioniert sind und die Porenschleifen nach innen gerichtet sind. **B** Links: Vereinfachter Aufbau eines Rezeptorsensors mit den sieben transmembranären Domänen eines GPCR. Am Ende der dritten intrazellulären Schleife (IL3) wurde das FIAsh-Bindemotiv (gelbe Markierung) einkloniert. Am Ende des Carboxy-Terminus wurde mTurquoise2 (türkiser Kreis) angehängt. Mitte: Das FIAsh-Bindemotiv besteht aus der dargestellten Aminosäuresequenz, X = variable Aminosäure. Mit den Cysteinen (gelbe Markierung) wird das FIAsh gebunden. Rechts: Strukturformel des gelb fluoreszierenden Chromophors FIAsh. Bei Bindung des Reagenzes an das Tetracysteinmotiv über Schwefelbrücken entsteht ein fluoreszierender Komplex.

### 3.1.2 Konstrukte zur Bestimmung des cAMP-Spiegels

Bereits 2004 erschienen mehrere Arbeiten, in welchen sogenannte Epac-basierte cAMP-Sensoren beschrieben wurden (DiPilato *et al.*, 2004; Nikolaev *et al.*, 2004; Ponsioen *et al.*, 2004). Allerdings wurde bislang nur die cAMP-Spiegelzunahme nach  $G_s$ -PCR-Aktivierung untersucht. Ziel dieser Arbeit war es, cAMP-Sensoren zu entwickeln, die eine schwieriger zu detektierende cAMP-Spiegelabnahme nach  $G_{i/o}$ -PCR-Aktivierung darstellen konnten. Die in dieser Arbeit für die Klonierung zugrundeliegenden Sensoren stammten aus der Gruppe um Nikolaev *et al.* und basieren auf einer stark gekürzten Version des nativen Epacs. Die isolierte(n) cAMP-Bindestelle(n) aus Epac1&2 waren am vorderen Bereich mit einem YFP fusioniert und am Ende mit einem CFP. Um cAMP-Sensoren mit verbesserter Effizienz zur

Detektion von cAMP-Spiegelabnahmen nach  $G_{i/o}$ -PCR-Aktivierung zu generieren, wurden die Fluorophore in den Sensoren YFP-Epac1-CFP und YFP-Epac2-CFP ausgetauscht. YFP wurde durch mVenus ersetzt und CFP durch mTurquoise2 (s. 2.1.8 und 2.1.11). In Abbildung 12 ist eine schematische Darstellung der Sensoren aufgezeigt.



**Abbildung 12: Epac-basierte Sensoren zur cAMP-Bestimmung**

*Epac1 (schwarze Verbindungsbalken im Sensor) ist zu Beginn der Arbeit von YFP und CFP flankiert. Nach der Umklonierung trägt der Sensor die beiden Fluorophore mVenus und mTurquoise2. Entsprechend wurde der Epac2-Sensor (graue Verbindungsbalken) verändert. Der schwarze Kreis symbolisiert die cAMP-Bindestelle.*

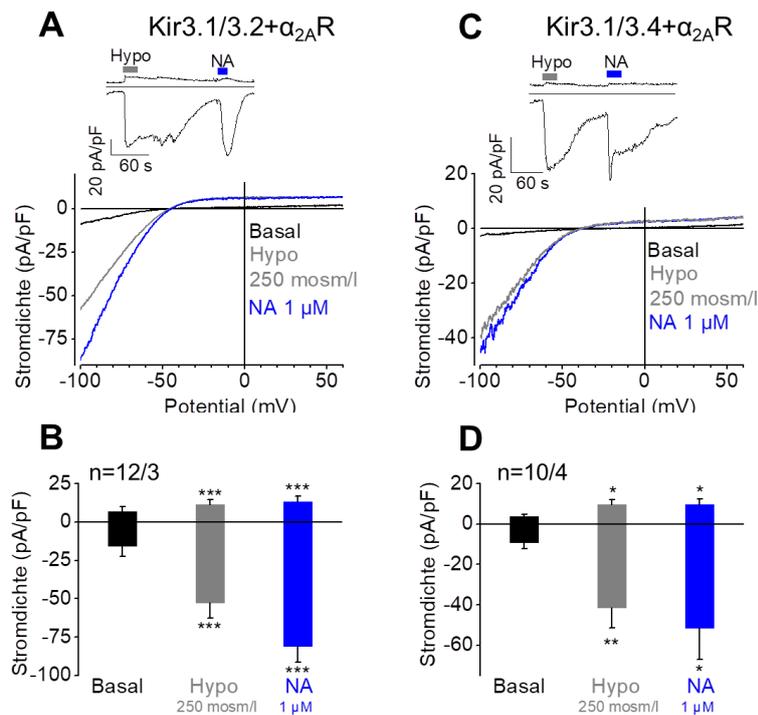
### 3.2 Mechanische Aktivierbarkeit $G_{i/o}$ -PCR

In den letzten Jahren konnte die Forschung im Gebiet der mechanischen Reizwahrnehmung und Weiterleitung von Signalen auf zellulärer Ebene große Fortschritte erzielen. Ein besonderes Augenmerk lag dabei auf dem  $G_{q/11}$ -PCR  $AT_1R$  (Blodow *et al.*, 2014; Storch *et al.*, 2015). Weiterführende Arbeiten weisen darauf hin, dass auch GPCR mit anderen G-Proteinen durch mechanische Reize aktivierbar sein könnten (s. 1.2.1.2). Um zu untersuchen, ob neben  $G_{q/11}$ -PCR auch  $G_{i/o}$ -PCR mechanosensitiv sind, wurde in verschiedenen elektrophysiologischen Experimenten deren Aktivierbarkeit durch einen mechanischen Stimulus analysiert.

#### 3.2.1 Kir-Kanal-Aktivität als Maß für die Mechanosensorik von $G_{i/o}$ -PCR

Um die mechanische Aktivierbarkeit mittels osmotisch bedingter Membrandehnung des  $\alpha_{2A}$ ,  $h5-HT_{1B}$ ,  $hM2$ , und  $h\mu$ -Rezeptors zu untersuchen, wurden ein Rezeptor, eines der beiden Kir-Kanal-Konstrukte (Kir3.1/Kir3.2 oder Kir3.1/Kir3.4) und grün fluoreszierendes Protein (engl. *enhanced green fluorescent protein*, EGFP) zur Lokalisation von transfizierten Zellen in CHO-K1-Zellen überexprimiert. In elektrophysiologischen Patch-Clamp-Messungen im Ganzzellmodus wurde zuerst hypoosmolare Lösung und anschließend der jeweilige

Rezeptoragonist eingewaschen. Dabei wurde für den  $\alpha_{2A}$ -Rezeptor Noradrenalin (1  $\mu\text{M}$ ), den  $5\text{-HT}_{1B}$ -Rezeptor Serotonin (100  $\mu\text{M}$ ), den  $\text{hM2}$ -Rezeptor Carbachol (100  $\mu\text{M}$ ) und für den  $\text{h}\mu$ -Rezeptor D-Ala<sup>2</sup>-N-MePhe<sup>4</sup>-Gly-ol-enkephalin (DAMGO 2,5  $\mu\text{M}$ ) verwendet. Über trianguläre Spannungsrampen wurden charakteristische Strom-Spannungsbeziehungen bei -100 mV und +60 mV gewonnen und gleichzeitig Strom-Zeitverläufe bei  $\pm 60$  mV aufgezeichnet. Ein Kir-Kanal zeigt nach Aktivierung einen typischen, einwärts gerichteten Strom in seiner Strom-Spannungsbeziehung. Das Gleichgewichtspotential des Kanals für  $\text{K}^+$  lag bei Verwendung der unter 2.3.3 genannten Lösungen bei -42 mV. Exemplarische Stromzeitverläufe, Strom-Spannungsbeziehungen sowie die Stromdichtensäulendiagramme für den  $\alpha_{2A}$ -Rezeptor ( $\alpha_{2A}\text{R}$ ) sind in Abbildung 13 dargestellt.

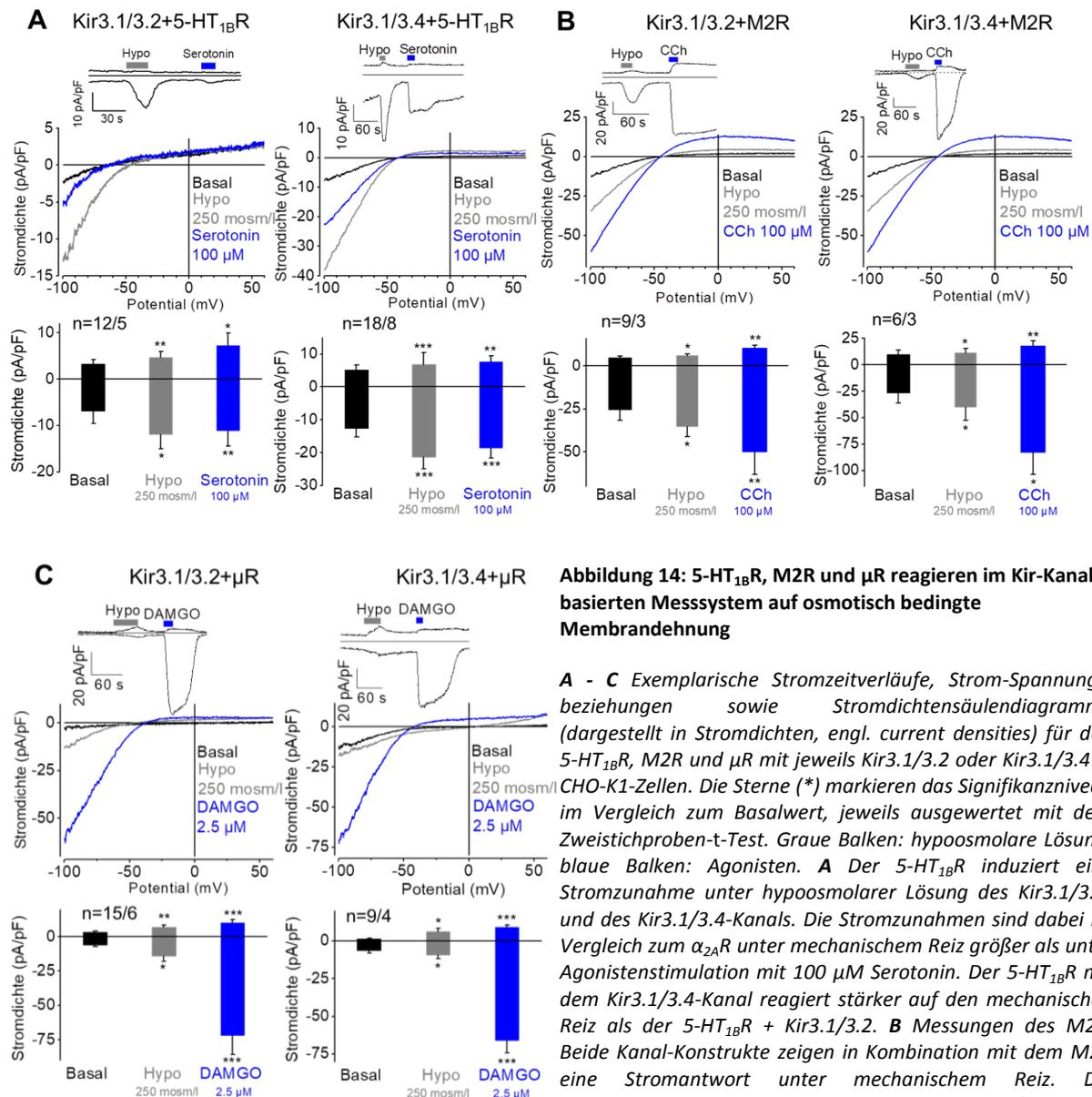


**Abbildung 13: Osmotisch bedingte Membrandehnung aktiviert den  $\alpha_{2A}R$**

**A** Dargestellt ist ein exemplarischer Stromzeitverlauf (oben) sowie Strom-Spannungsbeziehungen (unten) von CHO-K1-Zellen transfiziert mit  $\alpha_{2A}R$  und Kir3.1/3.2. Sowohl unter hypoosmolarer Lösung von 250 mosm/l (grauer Balken) als auch unter 1  $\mu M$  Noradrenalin (NA, blauer Balken) kommt es zu deutlichen Zunahmen des einwärts rektifizierenden Stroms. Die Stromzeitverläufe wurden bei einem Haltepotential von  $\pm 60$  mV aufgezeichnet. Die Linie im Stromzeitverlauf zeigt hier das Nullstromniveau an. Die Länge der Balken impliziert die Applikationsdauer der Stimuli. **B** Das Stromdichtensäulendiagramm zeigt die Stromdichten des Kir3.1/3.2 mit  $\alpha_{2A}R$  während der Badlösung (schwarzer Balken) und während der Strommaxima unter Applikation von hypoosmolarer Lösung (grauer Balken) und NA (blauer Balken). Es ist deutlich zu sehen, dass der mechanische Reiz zu einer Stromantwort der Kir3.1/3.2-Kanäle führt. Diese Stromzunahme unter hypoosmolarer Lösung war nicht zu verzeichnen, wenn Kir3.1/3.2 alleine überexprimiert war, s. 3.2.3. Zum Vergleich wurde die Stromantwort unter Agonistenstimulation des  $\alpha_{2A}R$  gemessen. **C** Stromzeitverlauf (oben) und Strom-Spannungsbeziehungen (unten) von CHO-K1-Zellen transfiziert mit  $\alpha_{2A}R$  und Kir3.1/3.4. Auch mit diesem Kir-Kanal-Konstrukt kommt es zu Stromzunahmen unter hypoosmolarer Lösung von 250 mosm/l (grauer Balken) und unter 1  $\mu M$  NA (blauer Balken). **D** Das Stromdichtensäulendiagramm zeigt die Stromdichten des Kir3.1/3.4 mit  $\alpha_{2A}R$  während der Badlösung (schwarzer Balken) und während der Strommaxima unter Applikation von hypoosmolarer Lösung (grauer Balken) und NA (blauer Balken). Ein mechanischer Reiz ruft eine Stromantwort des Kir3.1/3.4-Kanal-Konstruktes hervor, ebenso wie eine Agonistenstimulation des  $\alpha_{2A}R$ . Auch das Kir3.1/3.4-Konstrukt ist funktionell.

Nach dem Einwaschen von hypoosmolarer Lösung reagierten die transfizierten Zellen mit einer raschen Zunahme des Einwärtsstromes. Dabei strömt Kalium bei Membranpotentialen unterhalb des Umkehrpotentials (kleiner als -42 mV) in die Zelle hinein. Durch ein nachfolgendes Einwaschen des Rezeptoragonisten kam es ebenfalls zu einer deutlichen Stromantwort. Dabei behielten die Strom-Spannungsbeziehungen die für Kir-Kanäle charakteristische Form unter der osmotisch bedingten Membrandehnung bei. Zum Vergleich fanden unter der Applikation von hypoosmolarer Lösung auf Zellen, die ausschließlich Kir3.1/3.2 überexprimierten, keine signifikanten Stromzunahmen statt, s. 3.2.3. Nach der Feststellung, dass der  $\alpha_{2A}R$  mechanisch aktivierbar sein könnte und die Kir-Kanal-Konstrukte funktionell waren, stellte sich die Frage, ob auch andere Rezeptoren aus der  $G_{i/o}$ -PCR-

Subklasse mechanosensitiv waren. Dazu wurden der h5-HT<sub>1B</sub>-, hM2-, oder hμ-Rezeptor (kurz 5-HT<sub>1B</sub>R, M2R, μR) mit jeweils einem der beiden Kir-Kanal-Konstrukte in CHO-K1-Zellen überexprimiert und auf gleiche Weise gemessen (Abbildung 14).

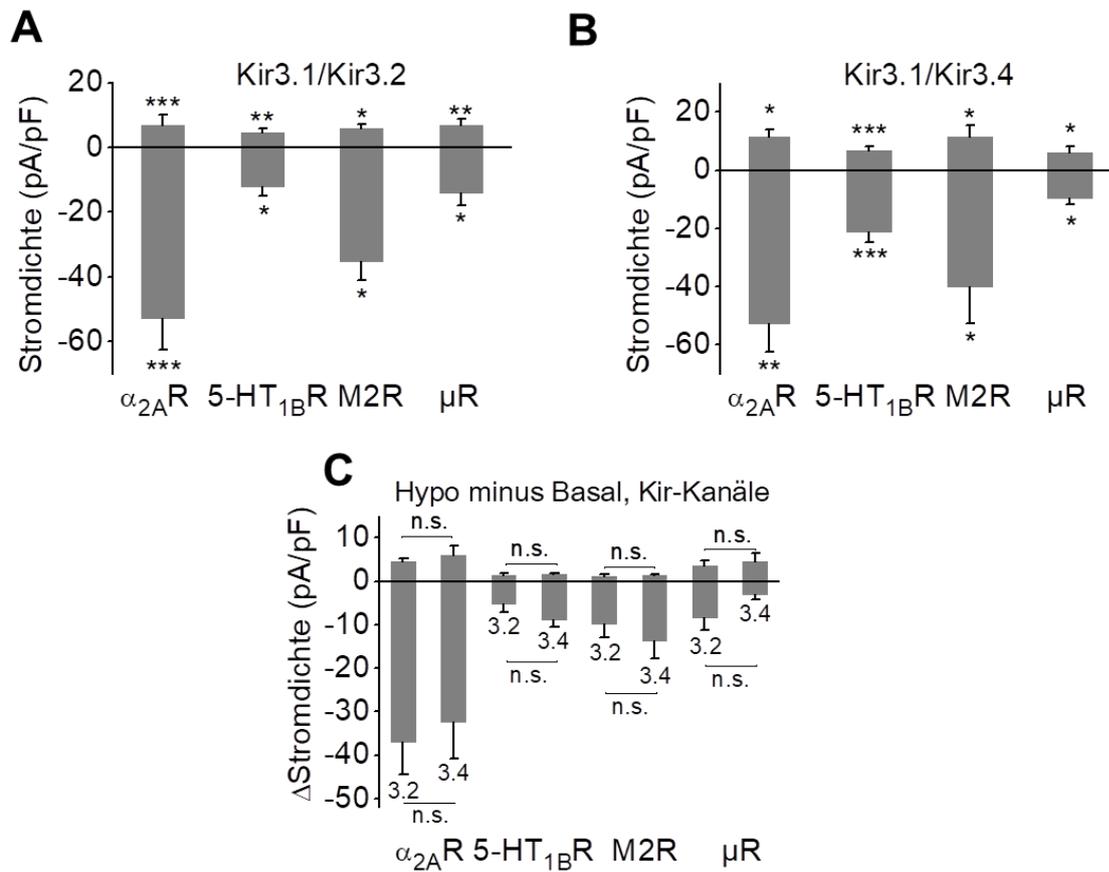


**Abbildung 14: 5-HT<sub>1B</sub>R, M2R und μR reagieren im Kir-Kanal-basierten Messsystem auf osmotisch bedingte Membrandehnung**

**A - C** Exemplarische Stromzeitverläufe, Strom-Spannungsbeziehungen sowie Stromdichtensäulendiagramme (dargestellt in Stromdichten, engl. current densities) für den 5-HT<sub>1B</sub>R, M2R und μR mit jeweils Kir3.1/3.2 oder Kir3.1/3.4 in CHO-K1-Zellen. Die Sterne (\*) markieren das Signifikanzniveau im Vergleich zum Basalwert, jeweils ausgewertet mit dem Zweistichproben-t-Test. Graue Balken: hypoosmolare Lösung; blaue Balken: Agonisten. **A** Der 5-HT<sub>1B</sub>R induziert eine Stromzunahme unter hypoosmolarer Lösung des Kir3.1/3.2- und des Kir3.1/3.4-Kanals. Die Stromzunahmen sind dabei im Vergleich zum α<sub>2A</sub>R unter mechanischem Reiz größer als unter Agonistenstimulation mit 100 μM Serotonin. Der 5-HT<sub>1B</sub>R mit dem Kir3.1/3.4-Kanal reagiert stärker auf den mechanischen Reiz als der 5-HT<sub>1B</sub>R + Kir3.1/3.2. **B** Messungen des M2R. Beide Kanal-Konstrukte zeigen in Kombination mit dem M2R eine Stromantwort unter mechanischem Reiz. Die Agonistenstromantwort mit 100 μM Carbachol fällt dabei größer aus als die Antwort auf die mechanische Stimulation. **C** Der μR reagiert im Vergleich zu den anderen Rezeptoren unabhängig vom Kir-Konstrukt schwächer auf hypoosmolare Lösung. Der μ-Agonist DAMGO (2,5 μM) induziert dahingegen die größten Ströme der Kir-Kanäle in Kombination mit einem G<sub>i/o</sub>-PCR.

Die Patch-Clamp-Messungen des 5-HT<sub>1B</sub>R, M2R und μR in Kombination mit dem Kir3.1/Kir3.2- oder Kir3.1/Kir3.4-Kanal zeigten, dass diese drei G<sub>i/o</sub>-PCR ebenfalls durch osmotisch bedingte Membrandehnung aktivierbar waren. Gemessen an der Stromdichte zeigte insgesamt der α<sub>2A</sub>R die größten Stromantworten unter mechanischem Reiz, gefolgt

vom M2R. Der 5-HT<sub>1B</sub>R und  $\mu$ R reagierten mit kleineren Stromantworten, die aber statistisch signifikant unterschiedlich zum Basalwert waren (s. Abbildung 15 A und B). Der Kir3.1/3.2- und der Kir3.1/3.4-Kanal erbrachten bis auf vernachlässigbare Unterschiede vergleichbare Stromantworten (s. Abbildung 15 C und 3.5).



**Abbildung 15: Vergleich der Stromdichten unter hypoosmolarer Lösung – Kir-Kanäle**

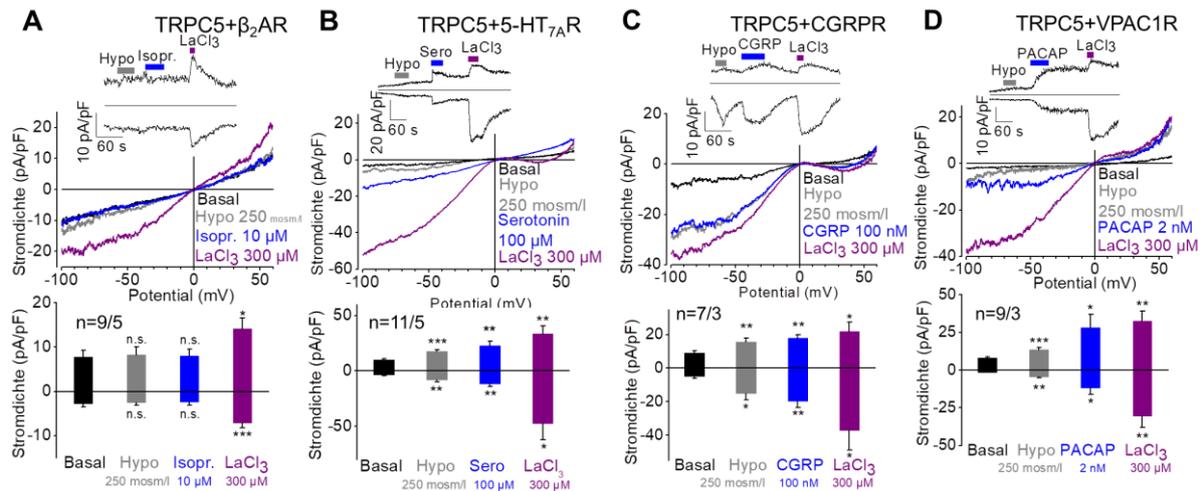
**A, B** Balkendiagramme der Stromdichten für die Stromzunahme nach der Applikation von hypoosmolarer Lösung auf den  $\alpha_{2A}$ R, 5-HT<sub>1B</sub>R, M2R und  $\mu$ R koexprimiert mit jeweils Kir3.1/3.2 (A) oder Kir3.1/3.4 (B) in CHO-K1-Zellen. Die Sterne (\*) markieren das Signifikanzniveau im Vergleich zum Basalwert, jeweils ausgewertet mit dem Zweistichproben-t-Test. **C** Balkendiagramm der Stromdichten für den Effekt unter hypoosmolarer Lösung minus der jeweiligen Basalstromdichten ( $\Delta$ Stromdichte) für den Kir3.1/3.2 (im Diagramm kurz als 3.2) und Kir3.1/3.4 (im Diagramm kurz als Kir3.4). Zwischen den einzelnen Kir-Kanalkonstrukten besteht bezüglich der jeweiligen Rezeptoren  $\alpha_{2A}$ , 5-HT<sub>1B</sub>, M2 und  $\mu$  kein statistisch signifikanter Unterschied in der maximalen  $\Delta$ Stromdichte, ausgewertet mit dem Zweistichproben-t-Test.

Um die mechanische Aktivierbarkeit der G<sub>i/o</sub>-PCR zu bestätigen, weitere Erkenntnisse über den detaillierten Ablauf zu erlangen und um bessere Vergleiche der einzelnen Rezeptoren untereinander zu ermöglichen, wurde ein in der Masse weniger bekanntes Anzeigesystem für die Aktivierung von G<sub>i/o</sub>-PCR herangezogen. Dabei handelt es sich um einen Ionenkanal aus der Transient-Rezeptor-Potential-(TRP)-Familie.

### 3.2.2 TRPC5-Aktivität als Maß für die Mechanosensorik von GPCR

#### 3.2.2.1 $G_s$ -PCR

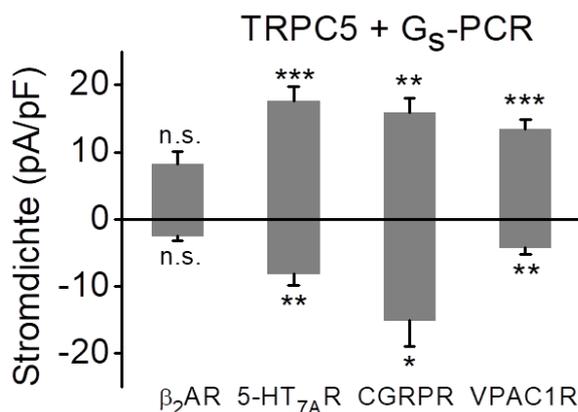
Die Subfamilie der  $G_s$ -PCR wurde im Zuge der Untersuchungen der mechanischen Aktivierbarkeit von  $G_{i/o}$ -PCR ebenfalls elektrophysiologisch analysiert. Dabei sollte zunächst geklärt werden, ob ein TRPC5-basiertes Messsystem eine  $G_s$ -PCR-Aktivierung darzustellen vermag. Zu Beginn wurde der in diesem Zusammenhang häufig diskutierte rein  $G_s$ -Protein koppelnde adrenerge  $\beta_2$ -Rezeptor (kurz  $\beta_2$ AR) gemessen und im Anschluss die vorrangig  $G_s$ -Protein koppelnden 5-HT<sub>7A</sub>-Rezeptoren (kurz 5-HT<sub>7A</sub>R), hCGRP-Rezeptoren (kurz CGRPR) und der hVPAC1-Rezeptoren (kurz VPAC1R). Über trianguläre Spannungsrampen von -100 mV bis +60 mV wurden charakteristische Strom-Spannungsbeziehungen gewonnen und gleichzeitig Strom-Zeitverläufe bei  $\pm 60$  mV aufgezeichnet. Ein TRPC5 zeigt nach Aktivierung einen typischen, doppelt-rektifizierenden Strom in seiner Strom-Spannungsbeziehung. Das Umkehrpotential lag bei Verwendung der unter 2.3.3 genannten Lösungen bei 0 mV. Der  $\beta_2$ AR wurde mit Isoprenalin (10  $\mu$ M), der 5-HT<sub>7A</sub>R mit Serotonin (100  $\mu$ M), der CGRPR mit „*Calcitonin gene-related peptide*“ (CGRP, 100 nM) und der VPAC1R mit „*Pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide*“ (PACAP, 2 nM) stimuliert. Die Konzentrationen der Pharmaka entsprechen der maximalen Wirkkonzentration an den Rezeptoren. Als Kontrolle wurde im Anschluss an die hypoosmolare Lösung und den Rezeptoragonisten der TRPC5 durch den Potentiator dieses Kanals, LaCl<sub>3</sub> (Schaefer *et al.*, 2000), stimuliert. Exemplarische Stromzeitverläufe, Strom-Spannungsbeziehungen sowie die Stromdichtensäulendiagramme für die Rezeptoren sind in Abbildung 16 dargestellt.



**Abbildung 16: Osmotisch bedingte Membrandehnung bei  $G_s$ -PCR**

**A - D** Exemplarische Stromzeitverläufe, Strom-Spannungsbeziehungen und Stromdichtensäulendiagramme für den  $\beta_2AR$ ,  $5-HT_{7A}R$ ,  $CGRPR$  und den  $VPAC1R$  koexprimiert mit dem  $TRPC5$  in HEK293-Zellen. Die Sterne (\*) markieren das Signifikanzniveau im Vergleich zum Basalwert, jeweils ausgewertet mit dem Zweistichproben-t-Test. Graue Balken: hypoosmolare Lösung; blaue Balken: Agonisten; lila Balken:  $LaCl_3$ . **A** Der  $\beta_2AR$  weist keine Zunahme des Stromes unter hypoosmolarer Lösung und unter Isoprenalin (Isopr.) auf und bestätigt damit die Arbeiten von Zou und Akazawa et.al (Zou et al., 2004). Die Funktionalität des  $TRPC5$  wird durch Einwaschen von  $LaCl_3$  ( $300 \mu M$ ) angezeigt. **B** Messungen mit dem vorrangig  $G_s$ -Protein gekoppelten  $5-HT_{7A}R$  ergeben eine Stromzunahme unter hypoosmolarer Lösung und unter Agonistenapplikation sowie unter Einwaschen von  $LaCl_3$ . Dabei fallen die beiden ersten Stromantworten beinahe gleich groß aus. **C** Messungen mit dem vorrangig  $G_s$ -Protein gekoppelten  $CGRPR$  ergeben eine Stromzunahme unter hypoosmolarer Lösung und unter Agonistenapplikation sowie unter Einwaschen von  $LaCl_3$ . Dabei fallen die beiden ersten Stromantworten erneut beinahe gleich groß aus. **D** Messungen mit dem vorrangig  $G_s$ -Protein gekoppelten  $VPAC1R$  ergeben ebenfalls eine Stromzunahme unter hypoosmolarer Lösung und unter Agonistenapplikation sowie unter Einwaschen von  $LaCl_3$ . Hier fällt die Stromantwort auf Agonistenapplikation groer aus als auf hypoosmolare Lösung.

Bei der Untersuchung der  $G_s$ -PCR ergaben sich für die einzelnen Rezeptoren der Subfamilie unterschiedliche Ergebnisse. So zeigte der  $\beta_2AR$  weder eine Stromantwort auf osmotisch bedingte Membrandehnung noch auf Agonistenapplikation. Die vorrangig, jedoch nicht ausschließlich  $G_s$ -Protein gekoppelten  $5-HT_{7A}$ -,  $CGRPR$ - sowie  $VPAC1$ -Rezeptoren reagierten auf beide dieser Stimuli, das  $TRPC5$ -basierte Messsystem war also funktionell. Zwischen den Rezeptoren traten jedoch Unterschiede in der maximalen Stromantwort auf hypoosmolare Lösung (gemessen als Stromdichte) auf (s. Abbildung 17).

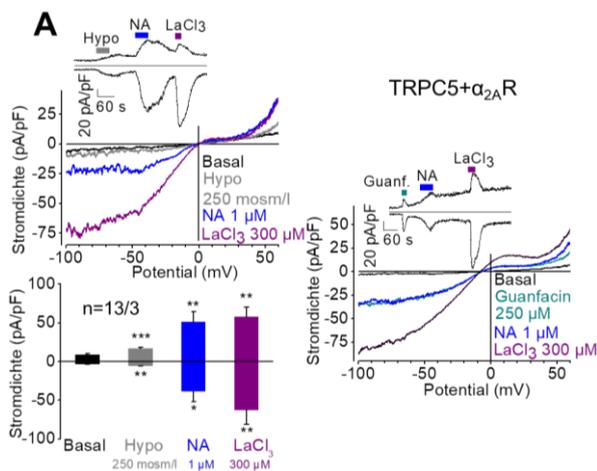


**Abbildung 17: Vergleich der Stromdichten unter hypoosmolarer Lösung –  $TRPC5 + G_s$ -PCR**

Balkendiagramme der Stromdichten für die Stromzunahme nach der Applikation von hypoosmolarer Lösung auf den  $\beta_2AR$ ,  $5-HT_{7A}R$ ,  $CGRPR$  und den  $VPAC1R$  koexprimiert mit dem  $TRPC5$  in HEK293-Zellen. Die Sterne (\*) markieren das Signifikanzniveau im Vergleich zum Basalwert, jeweils ausgewertet mit dem Zweistichproben-t-Test.

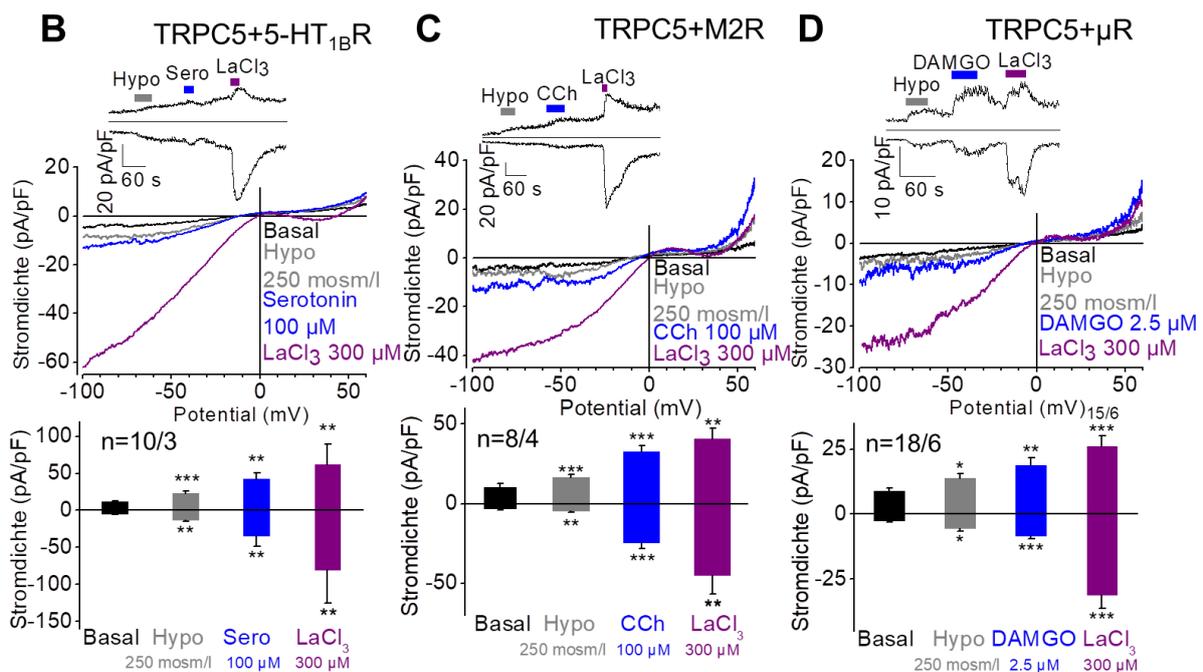
### 3.2.2.2 $G_{i/o}$ -PCR

Da die mechanische Aktivierbarkeit  $G_{q/11}$ -PCR durch das TRPC5-basierte Messsystem schon gezeigt worden war (Mederos y Schnitzler *et al.*, 2016; Mederos y Schnitzler *et al.*, 2008), und dabei festgestellt worden war, dass auch  $G_{i/o}$ -PCR den TRPC5 aktivieren konnten, wurden Ganzzellmessungen mit dem  $\alpha_{2A}$ R, 5-HT<sub>1B</sub>R, M2R und  $\mu$ R und koexprimierten TRPC5 durchgeführt. Wieder wurde zuerst hypoosmolare Lösung und anschließend der jeweilige Rezeptoragonist eingewaschen. Dabei wurde für den  $\alpha_{2A}$ R Noradrenalin (1  $\mu$ M) verwendet. Da Noradrenalin auch den in HEK293-Zellen endogen vorkommenden  $\beta_2$ AR aktiviert und dies zu Störungen führen könnte, wurde auch noch der spezifische  $\alpha_{2A}$ -Agonist Guanfacin getestet. Der 5-HT<sub>1B</sub>R wurde mit Serotonin (100  $\mu$ M), der M2R mit Carbachol (100  $\mu$ M) und der  $\mu$ R mit D-Ala<sup>2</sup>-N-MePhe<sup>4</sup>-Gly-ol-enkephalin (DAMGO, 2,5  $\mu$ M) stimuliert. Die Konzentrationen der Pharmaka entsprechen der maximalen Wirkkonzentration an den Rezeptoren. Als Kontrolle wurde der TRPC5 auch hier durch dessen direkten Aktivator LaCl<sub>3</sub> (300  $\mu$ M) stimuliert. Exemplarische Stromzeitverläufe, Strom-Spannungsbeziehungen sowie die Stromdichtensäulendiagramme für die Rezeptoren sind in Abbildung 18 dargestellt.



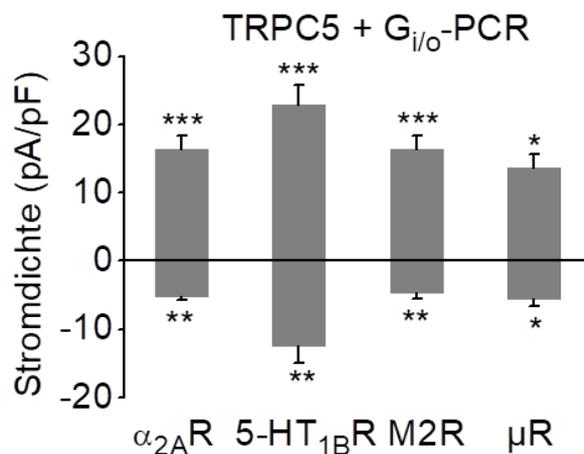
**Abbildung 18:  $\alpha_{2A}R$ , 5-HT<sub>1B}R</sub>, M2R und  $\mu R$  reagieren im TRPC5-basierten Messsystem auf osmotisch bedingte Membrandehnung**

**A - D** Exemplarische Stromzeitverläufe, Strom-Spannungsbeziehungen und Stromdichtensäulendiagramme für den  $\alpha_{2A}R$ , 5-HT<sub>1B}R</sub>, M2R, und  $\mu R$  koexprimiert mit dem TRPC5 in HEK293-Zellen. Die Sterne (\*) markieren das Signifikanzniveau im Vergleich zum Basalwert, jeweils ausgewertet mit dem Zweistichproben-t-Test. **A** Links: Es kommt zu Stromzunahmen unter hypoosmolarer Lösung (graue Balken) sowie nach Agonistenapplikation (Noradrenalin (NA), 1  $\mu M$ , blaue Balken) und Anwendung des direkten TRPC5-Aktivators LaCl<sub>3</sub> (300  $\mu M$ , lila Balken). Rechts: Vergleichbare Stromzunahmen werden unter Anwendung des spezifischen  $\alpha_{2A}R$  Agonisten Guanfacin (250  $\mu M$ ) beobachtet. **B - D** Unter hypoosmolarer Lösung kommt es beim 5-HT<sub>1B}R</sub>, M2R, und  $\mu R$  bei Koexpression mit dem TRPC5 zu Stromzunahmen. Nachfolgend applizierte Agonisten und LaCl<sub>3</sub> zeigen durch Stromzunahmen die Funktionalität der Rezeptoren und des Kanals. Dabei reagiert der Rezeptor aus der 5-HT-Familie und der  $\alpha_{2A}R$  am deutlichsten.



Obwohl der genaue Signalweg der TRPC5-Aktivierung durch  $G_{i/o}PCR$  noch nicht vollständig aufgeklärt ist, kann unter Koexpression beider kodierenden Plasmide in HEK293-Zellen eine Stromzunahme nach Rezeptoragonistenapplikation beobachtet werden. Dieses Messsystem wurde verwendet, um zu untersuchen, ob auch eine Stromzunahme durch osmotisch bedingte Membrandehnung unter Verwendung von hypoosmolarer Lösung beobachtet werden kann. In Zellen, die sowohl einen der  $G_{i/o}PCR$   $\alpha_{2A}$ , 5-HT<sub>1B}</sub>, M2 oder  $\mu$  als auch den TRPC5 exprimierten, kam es unter dem mechanischen Stimulus zu einer signifikanten

Zunahme der maximalen Stromdichte. Im Vergleich zur maximalen Stromdichte unter Agonistenapplikation fiel diese kleiner aus. Unter den analysierten Rezeptoren zeigten der 5-HT<sub>1B</sub>R und der  $\alpha_{2A}$ R die deutlichste Stromzunahme (gemessen als maximale Stromdichte) durch osmotisch bedingte Membrandehnung, gefolgt vom M2R und  $\mu$ R (s. Abbildung 19).



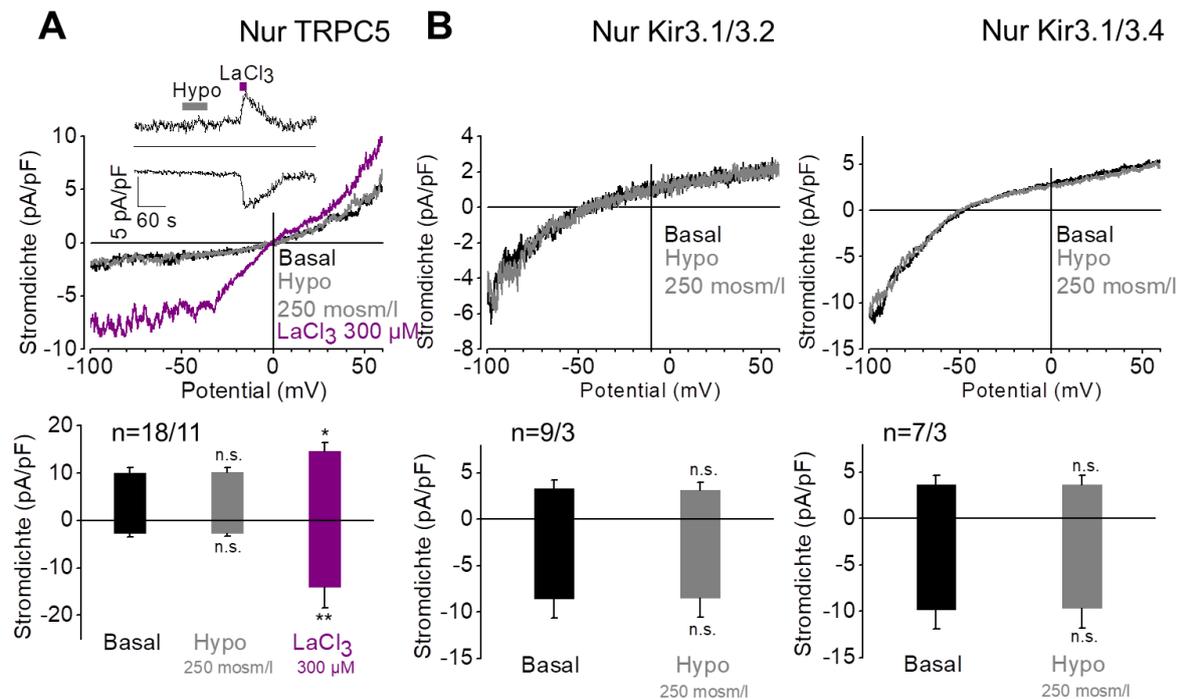
**Abbildung 19: Vergleich der Stromdichten unter hypoosmolarer Lösung – TRPC5 + G<sub>i/o</sub>-PCR**

Balkendiagramme der Stromdichten für die Stromzunahme nach der Applikation von hypoosmolarer Lösung auf den  $\alpha_{2A}$ R, 5-HT<sub>1B</sub>R, M2R und  $\mu$ R koexprimiert mit dem TRPC5 in HEK293-Zellen. Die Sterne (\*) markieren das Signifikanzniveau im Vergleich zum Basalwert, jeweils ausgewertet mit dem Zweistichproben-t-Test.

Zur Beantwortung der Fragestellung ob G<sub>i/o</sub>PCR mechanisch aktivierbar sind, konnte in einem zweiten, unabhängigen Messsystem gezeigt werden, dass die Rezeptoren auf einen mechanischen Reiz mit einer Stromzunahme reagieren und dabei eine gleiche typische, doppelt-rektifizierende Strom-Spannungsbeziehung zeigen wie unter Rezeptoragonistenapplikation. Um die Frage zu beantworten, ob die Kanäle nicht auch ohne koexprimierte Rezeptoren auf hypoosmolare Lösung mit einer Stromzunahme reagieren, wurden anschließend Zellen mit überexprimierten Kanälen aber ohne überexprimierte Rezeptoren untersucht, s. 3.2.3.

### 3.2.3 Rezeptoren essentiell für die mechanische Signalperzeption

Nach der Identifikation diverser Rezeptoren bei der potentiellen Beteiligung an mechanisch induzierten Abläufen stellt die Frage nach direkter oder indirekter Involvierung der Kanäle die größte Herausforderung dar. Viele TRP-Kanäle und auch Ionenkanäle scheinen im Allgemeinen einen komplexeren Aktivierungsmechanismus mit mehr Komponenten zu besitzen als bisher angenommen (Storch *et al.*, 2017). Um zu untersuchen, ob die verwendeten Kanäle direkt auf einen mechanischen Reiz reagieren, wurden unter ausschließlicher Überexpression von TRPC5 oder Kir3.1/3.2 bzw. Kir3.1/3.4 ohne dazu koexprimiertem Rezeptor elektrophysiologische Messungen durchgeführt (s. Abbildung 20).



**Abbildung 20: Osmotisch bedingte Membrandehnung erzeugt keine Aktivierung des TRPC5 oder der Kir3.1/3.2 bzw. Kir3.1/3.4**

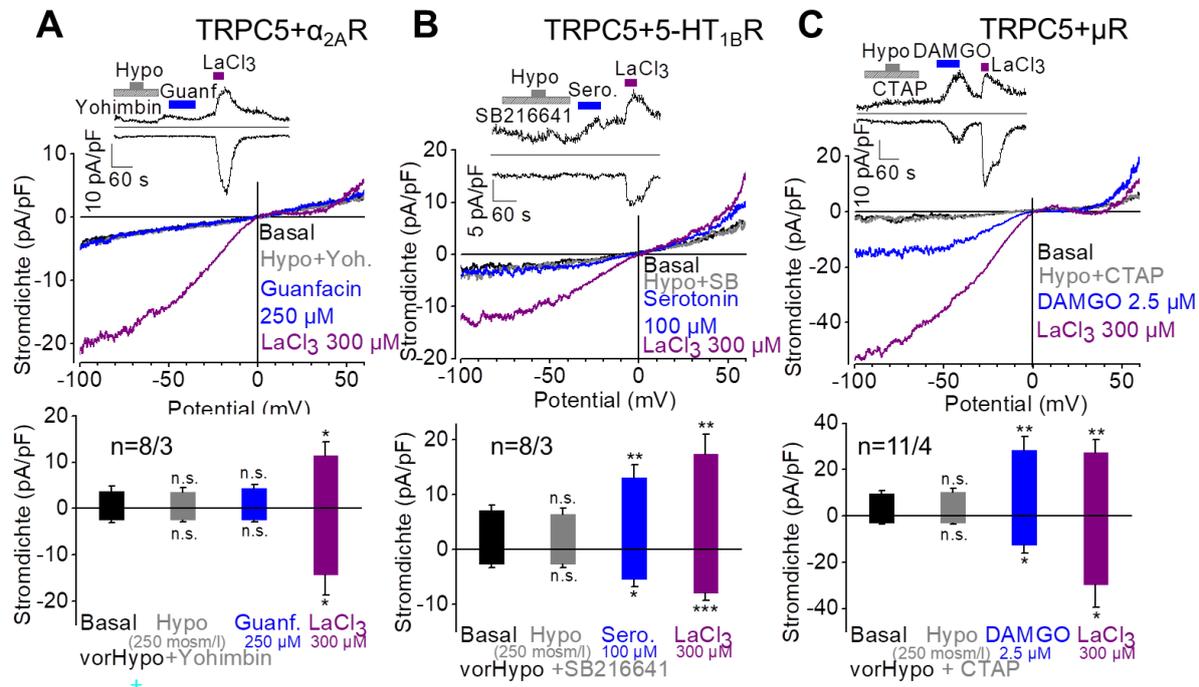
Graue Balken: hypoosmolare Lösung; lila Balken: LaCl<sub>3</sub>. Die Sterne (\*) markieren das Signifikanzniveau im Vergleich zum Basalwert, jeweils ausgewertet mit dem Zweistichproben-t-Test. **A** HEK293-Zellen, die ausschließlich TRPC5 überexprimieren, werden mit hypoosmolarer Lösung perfundiert. Die Kanäle zeigen keine Stromzunahme. Die Funktionalität des Kanals wird durch anschließende Applikation von LaCl<sub>3</sub> verdeutlicht, hier ist eine Stromzunahme zu verzeichnen. **B** CHO-K1-Zellen, die ausschließlich Kir3.1/3.2 (links) oder Kir3.1/3.4 (rechts) überexprimieren, werden mit hypoosmolarer Lösung perfundiert. Die Kanäle zeigen keine Stromzunahme. Ein direkter Kir-Kanal-Aktivator wurde nicht getestet.

Nach der Applikation von hypoosmolarer Lösung bei HEK293- oder bei CHO-K1-Zellen, die nur die jeweiligen Ionenkanäle überexprimierten, konnte keine statistisch signifikante Stromzunahme gemessen werden. Im Messsystem der TRPC5 konnte jedoch eine Stromzunahme nach direkter Stimulation des Kanals durch den Potentiator LaCl<sub>3</sub> detektiert werden. Dies zeigt, dass der TRPC5 im verwendeten Versuchsaufbau funktionell war. Die Kir-Kanäle waren im Überexpressionssystem anhand ihrer Basalaktivität identifizierbar, was darauf hinweist, dass die Kanäle exprimiert und funktionsfähig waren.

### 3.2.4 Mechanische Aktivierung durch Rezeptorblockade hemmbar

Zur Analyse, ob endogen exprimierte G<sub>i/o</sub>-PCR für unspezifische Signalzunahmen nach einem mechanischen Reiz in elektrophysiologischen Messungen verantwortlich sind, wurden die im Zuge dieser Arbeit analysierten Rezeptoren aus der G<sub>i/o</sub>-PCR-Subfamilie α<sub>2A</sub>, 5-HT<sub>1B</sub> oder μ wie in den vorangegangenen Experimenten zusammen mit dem TRPC5 in

HEK293-Zellen überexprimiert. Dabei wurde der Badlösung jeweils ein Rezeptorblocker zugesetzt. Als Blocker wurden für den  $\alpha_{2A}R$  Yohimbin (800  $\mu\text{M}$ ), für den  $5\text{-HT}_{1B}R$  SB216641 (50  $\mu\text{M}$ ) und für den  $\mu R$  CTAP (5  $\mu\text{M}$ ) verwendet.



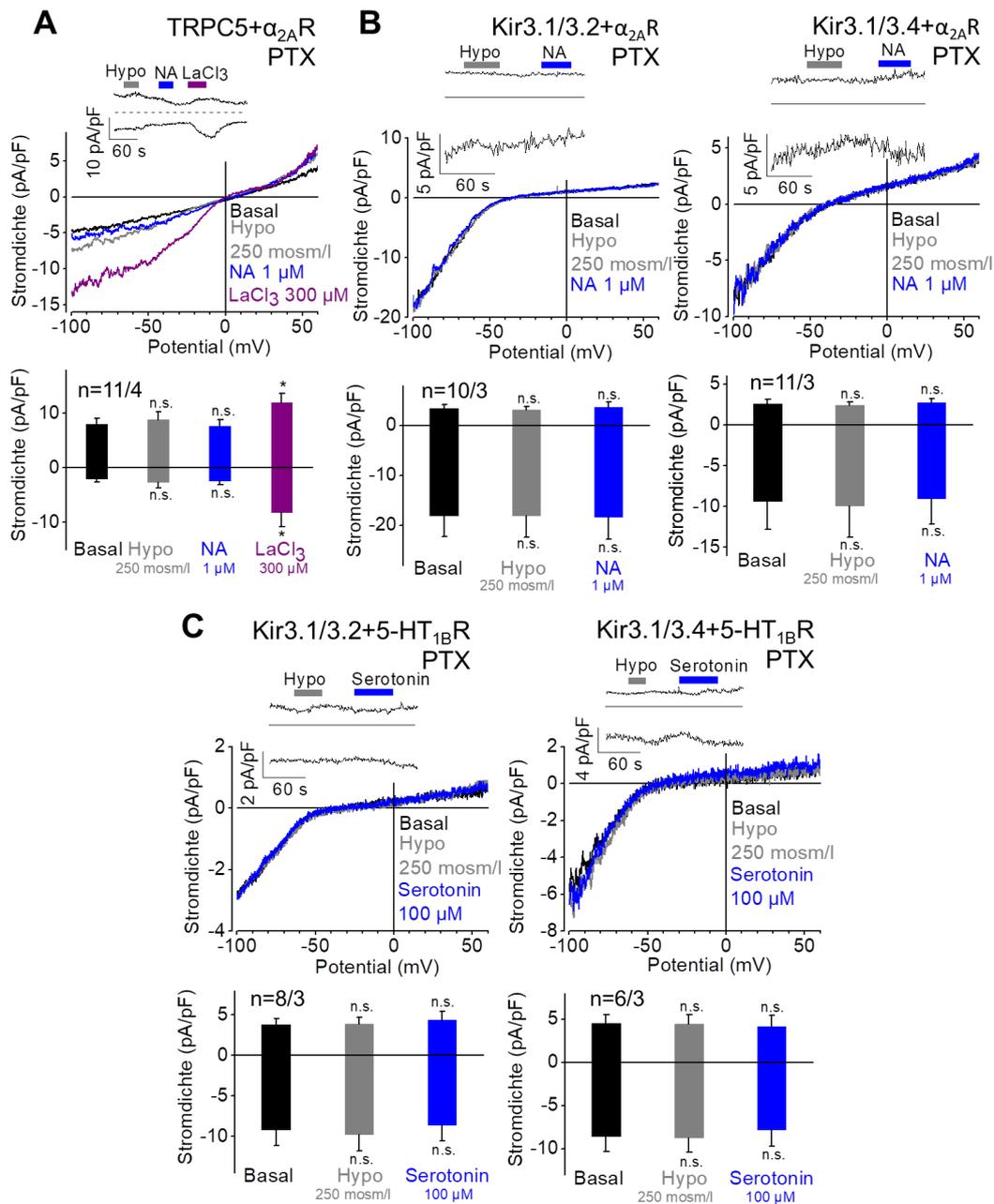
**Abbildung 21: Mechanische Aktivierbarkeit unter Rezeptorblockade nicht darstellbar**

**A - C** Exemplarische Stromzeitverläufe, Strom-Spannungsbeziehungen und Stromdichtensäulendiagramme für den  $\alpha_{2A}R$ ,  $5\text{-HT}_{1B}R$  und den  $\mu R$  koexprimiert mit dem TRPC5 in HEK293-Zellen. Die Sterne (\*) markieren das Signifikanzniveau im Vergleich zum Basalwert, jeweils ausgewertet mit dem Zweistichproben-t-Test. Hellgraue, schraffierte Balken: Blocker; graue Balken: hypoosmolare Lösung; blaue Balken: Agonisten; lila Balken: LaCl<sub>3</sub>. **A** Der  $\alpha_{2A}R$  zeigt unter Yohimbin keine Stromzunahme bei der Applikation von hypoosmolarer Lösung. Auch bei Einwaschen des Agonisten Guanfacin kommt es zu keiner Stromantwort. Unter LaCl<sub>3</sub> (300  $\mu\text{M}$ ) reagiert der TRPC5. **B** Der  $5\text{-HT}_{1B}R$  zeigt keine Stromzunahme unter hypoosmolarer Lösung, reagiert jedoch auf den Agonisten Serotonin sowie der TRPC5 auf Einwaschen von LaCl<sub>3</sub>. **C** Messungen mit dem  $\mu R$  ergeben ebenfalls keine Stromzunahme unter hypoosmolarer Lösung. Der Rezeptor reagiert auf den Agonisten DAMGO und der TRPC5 auf LaCl<sub>3</sub>.

Nach gleichzeitiger Applikation eines Rezeptorblockers wurde bei keinem der drei untersuchten  $G_{i/o}PCR$   $\alpha_{2A}$ ,  $5\text{-HT}_{1B}$  und  $\mu$  mehr eine Aktivierung des TRPC5 nach osmotisch bedingter Membrandehnung verzeichnet. Da jedoch in jeder Messung eine Stromzunahme nach Applikation des TRPC5-Potentiators LaCl<sub>3</sub> stattfand, war deutlich, dass dieser weiterhin funktionell war. Aufgrund des Verhaltens der Rezeptoren bei der erneuten Agonistenapplikation nach Auswaschen des Blockers konnte festgestellt werden, dass Yohimbin bei  $\alpha_{2A}R$ -exprimierenden Zellen irreversibel an den Rezeptor bindet. Bei  $5\text{-HT}_{1B}R$ - und  $\mu R$ -exprimierenden Zellen konnte eine Stromzunahme verzeichnet werden, was auf eine reversible Bindung der Rezeptorblocker hinweist.

### 3.2.5 *Pertussistoxin führt zur Hemmung der mechanischen Aktivierbarkeit*

Um die untersuchten Rezeptoren als  $G_{i/o}$ PCR zu definieren, wurde deren Verhalten nach der Inkubation mit Pertussistoxin (PTX) analysiert. Das Toxin katalysiert die Ribosylierung des Cysteinrestes im C-Terminus von  $G_i$ -Proteinen, welche dann nicht mehr in der Lage sind, die AC zu inhibieren. Da das Toxin spezifisch GPCR der  $G_{i/o}$ -Subfamilie blockt, stellt es ein hilfreiches Werkzeug bei der Untersuchung dieser Rezeptortypen dar. In der vorliegenden Arbeit wurden von  $\alpha_{2A}R$ -exprimierenden Zellen, die zusätzlich mit TRPC5 transfiziert waren oder von CHO-K1-Zellen, die mit  $\alpha_{2A}R$  oder  $5-HT_{1B}R$  und entweder mit Kir3.1/3.2 oder Kir3.1/3.4 transfiziert waren, Ganzzelleableitungen aufgenommen (s. Abbildung 22). Die Zellen wurden 12-16 Stunden vor Experimentbeginn mit PTX inkubiert. Dies sollte weitere Erkenntnisse erbringen, inwiefern die Signalkaskade zwischen den  $G_{i/o}$ -PCRs und dem TRPC5 reguliert ist.



**Abbildung 22: PTX-Inkubation von  $G_{i/o}$ -PCR-exprimierenden Zellen verhindert Signaltransduktion**

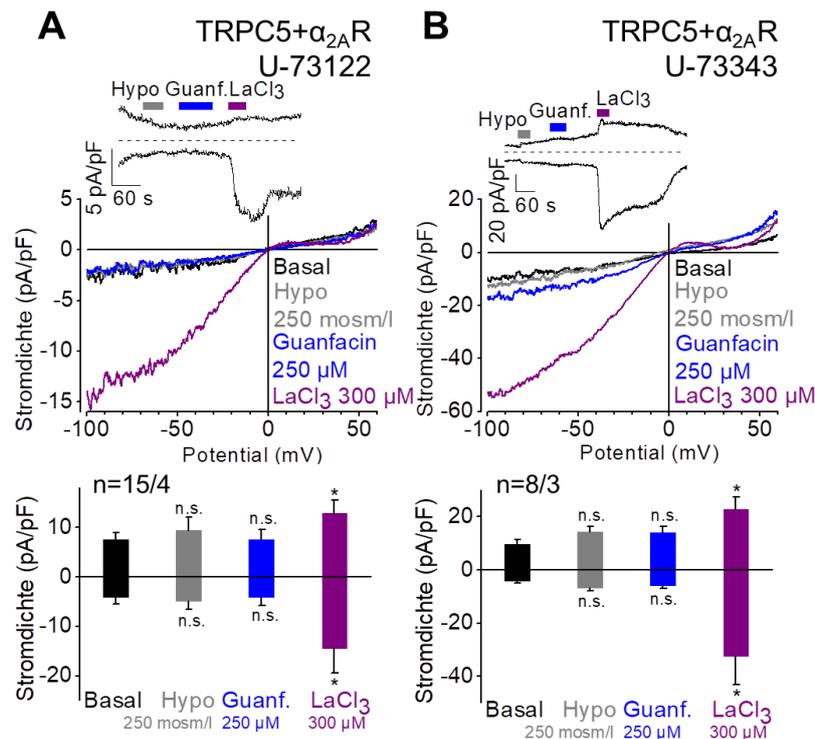
**A - C** Exemplarische Stromzeitverläufe, Strom-Spannungsbeziehungen und Stromdichtensäulendiagramme für den  $\alpha_{2A}R$  und 5-HT<sub>1B}R</sub>, koexprimiert mit dem TRPC5 in HEK293-Zellen oder Kir-Kanälen in CHO-K1-Zellen. Der Schriftzug über den Balken (n.s.) markiert das Signifikanzniveau im Vergleich zum Basalwert, jeweils ausgewertet mit dem Zweistichproben-t-Test. Graue Balken: hypoosmolare Lösung; blaue Balken: Agonisten; lila Balken: LaCl<sub>3</sub>. **A + B** Der  $\alpha_{2A}R$  reagiert sowohl im TRPC5- (A) als auch im Kir-Kanal-Messsystem (B) nicht auf hypoosmolare Lösung oder den Agonisten NA nachdem durch PTX die  $G_{i/o}$ PCR geblockt wurden. Unter LaCl<sub>3</sub> reagiert der TRPC5 (A). **C** Koexprimiert mit den Kir-Kanal-Konstrukten reagiert auch der 5-HT<sub>1B}R</sub> nicht auf hypoosmolare Lösung oder den Agonisten Serotonin.

Nach der Inkubation mit PTX konnte weder eine Stromantwort auf hypoosmolare Lösung noch auf den  $\alpha_{2A}R$ -Agonisten Noradrenalin im TRPC5-basierten Messsystem detektiert werden. Dies zeigt, dass die  $G_{i/o}$ -PCR-vermittelte Signalkaskade geblockt war und kein Signal an den TRPC5 weitergegeben werden konnte. Auch im Kir-basierten Messsystem für  $G_{i/o}$ -PCR

konnte keine statistisch signifikante Stromzunahme nach Noradrenalin- bzw. Serotoninapplikation oder hypoosmolarer Lösung detektiert werden. Dies macht deutlich, dass in dem anerkannten Messsystem  $G_{i/o}$ -PCR durch PTX geblockt wurden und keine Signalweitergabe möglich war. Auch ein mechanischer Stimulus wird somit  $G_{i/o}$ -PCR-vermittelt verarbeitet.

### 3.2.6 PLC-Blockade führt zur Hemmung der mechanischen Aktivierbarkeit

Um zu untersuchen, ob die Signalübertragung noch unter Blockade der womöglich in der Signaltransduktion eines mechanischen Reizes beteiligten PLC ablaufen kann, wurden Messungen in Anwesenheit von 10  $\mu$ M des PLC-Blockers U-73122 (Bleasdale *et al.*, 1990) und von 10  $\mu$ M des inaktiven Analogons U-73343 durchgeführt. Bei  $\alpha_{2A}$ R und TRPC5 koexprimierenden HEK293-Zellen wurde während Ganzzellmessungen U-73122 oder U-73343 über die Pipettenlösung in das Zellinnere eingebracht, um die PLC zu beeinflussen (s. Abbildung 23).



**Abbildung 23: PLC-Blockade verhindert Signaltransduktion zwischen  $G_{i/o}$ -PCR und TRPC5 nach Stimulation durch Agonist oder mechanischen Reiz**

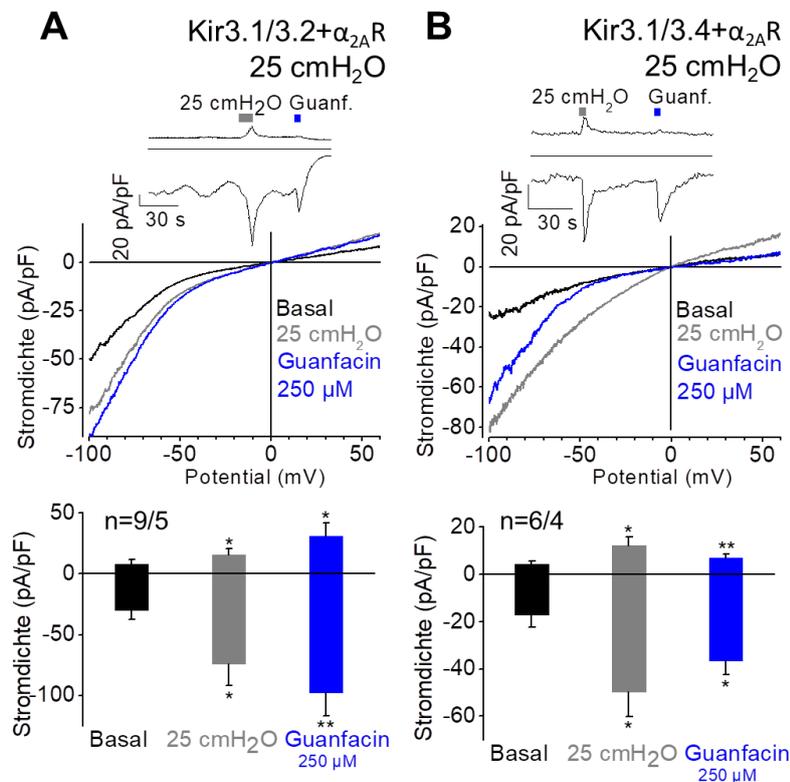
**A + B** Exemplarische Stromzeitverläufe, Strom-Spannungsbeziehungen und Stromdichtensäulendiagramme für den  $\alpha_{2A}R$ , koexprimiert mit dem TRPC5 in HEK293-Zellen unter PLC-Blockade und unter inaktivem Analogon. Der Schriftzug über den Balken (n.s.) markiert das Signifikanzniveau im Vergleich zum Basalwert, jeweils ausgewertet mit dem Zweistichproben-t-Test. Graue Balken: hypoosmolare Lösung; blaue Balken: Agonisten; lila Balken: LaCl<sub>3</sub>. **A** Der  $\alpha_{2A}R$  reagiert nicht auf hypoosmolare Lösung oder den Agonisten Guanfacin wenn durch die Pipettenlösung intrazellulär U-73122 (10  $\mu M$ ) appliziert wird. Unter LaCl<sub>3</sub> reagiert der TRPC5). **B** Bei Applikation des inaktiven Analogons U-73343 (10  $\mu M$ ) reagiert der Rezeptor auf hypoosmolare Lösung und den Agonisten Guanfacin.

Durch die Inhibition der PLC mittels U-73122 wurde keine Stromzunahme unter hypoosmolarer Lösung oder Agonist detektiert. Als Kontrolle wurde ein inaktives Analogon des Blockers, U-73343, getestet. Hier kam es zu Stromanstiegen nach hypoosmolarer Lösung und Agonist. Dies zeigt, dass die PLC eine bedeutende Rolle in der Signalkaskade zwischen  $G_{i/o}$ -PCR und TRPC5 einnimmt.

### 3.2.7 Alternative Applikationsmethode des mechanischen Reizes

Bei der mechanischen Stimulation durch hypoosmolare Lösung kommt es durch das Einströmen von Wasser zur Verdünnung von zytosolischen Komponenten wie Ionen und diversen Makromolekülen sowie zu Veränderungen im Zytoskelett. Um den Einfluss dieser Faktoren zu untersuchen, wurde eine alternative Applikationsmethode angewandt, um eine Membrandehnung hervorzurufen. Dazu wurde bei CHO-K1-Zellen, die den  $\alpha_{2A}R$  und den Kir3.1/3.2 oder Kir3.1/3.4 exprimierten, in Patch-Clamp-Experimenten im Ganzzellmodus mit

Hilfe eines Wassermanometers ein positiver Druck von ca. 25 cmH<sub>2</sub>O über die Patchpipette appliziert. Anschließend wurde als Vergleich der spezifische Agonist Guanfacin eingewaschen (s. Abbildung 24).



**Abbildung 24: Druck-bedingte Membrandehnung durch 25 cmH<sub>2</sub>O aktiviert den  $\alpha_{2A}$ R**

**A + B** Exemplarische Stromzeitverläufe, Strom-Spannungsbeziehungen und Stromdichtensäulendiagramme für den  $\alpha_{2A}$ R koexprimiert mit Kir3.1/3.2 (A) oder Kir3.1/3.4 (B) in CHO-K1-Zellen unter Druck-bedingter Membrandehnung mittels 25 cmH<sub>2</sub>O. Die Sterne (\*) markieren das Signifikanzniveau im Vergleich zum Basalwert, jeweils ausgewertet mit dem Zweistichproben-t-Test. Graue Balken: hypoosmolare Lösung; blaue Balken: Agonisten. **A** Koexprimierte  $\alpha_{2A}$ R und Kir3.1/3.2-Kanäle zeigen eine rasche Stromzunahme unter 25 cmH<sub>2</sub>O. Unter anschließender Applikation von Guanfacin kommt es ebenfalls zu einer Stromzunahme. **B** Bei Applikation von 25 cmH<sub>2</sub>O an Zellen, die den  $\alpha_{2A}$ R und den Kir3.1/3.4-Kanal koexprimieren, kommt es zu einem raschen Stromanstieg. Bei folgender Applikation von Guanfacin reagieren die Zellen ebenfalls mit einer Stromzunahme. Diese fällt im Vergleich zur Druck-bedingten Membrandehnung und zum Kir3.1/3.2 kleiner aus.

Beide Kir-Kanal-Konstrukte in Kombination mit dem  $\alpha_{2A}$ R reagierten auf Druck-bedingte Membrandehnung appliziert durch 25 cmH<sub>2</sub>O mit einer Stromzunahme. Dabei war es auffällig, dass die Geschwindigkeit der Reaktion wesentlich schneller war als unter osmotisch bedingter Membrandehnung. Bei der anschließenden Applikation von Guanfacin verzeichneten beide Kombinationen erneut einen Stromanstieg. Im Falle von  $\alpha_{2A}$ R und Kir3.1/3.4 fiel dieser geringer aus als bei  $\alpha_{2A}$ R und Kir3.1/3.2 und im Vergleich zur Stromantwort auf Druck-bedingte Membrandehnung.

### 3.3 Bestimmung dynamischer cAMP-Spiegel in lebenden Zellen nach $G_{i/o}$ -PCR vermittelter Rezeptoraktivierung

Um zu untersuchen, ob die Agonisten- oder mechanisch-induzierte Aktivierung  $G_{i/o}$ -PCR auch an dem direkt in der GPCR-Signalkaskade beteiligten cAMP zu visualisieren ist, wurde im Rahmen der vorliegenden Arbeit eine Epac-Sensor-basierte FRET-Methode entwickelt.

#### 3.3.1 Charakterisierung der Sensoren durch Messungen mit $G_s$ -PCR

Nach Bindung von cAMP an Epac-Sensoren ändert sich deren Konformation und damit auch der Abstand und die Orientierung der Fluorophore zueinander. Dies hat zur Folge, dass das FRET-Signal bei zunehmenden cAMP-Spiegel abnimmt und bei abnehmenden cAMP-Spiegel zunimmt. Die  $G_s$ -PCR-vermittelte cAMP-Zunahme ist bereits erfolgreich untersucht worden und eignet sich daher, um die Funktionalität unterschiedlicher Epac-basierter cAMP-Sensoren zu analysieren (Borner *et al.*, 2011; Godinho *et al.*, 2015). In der vorliegenden Arbeit standen sechs verschiedene Sensoren für den Vergleich zur Verfügung. YFP-Epac1-CFP und YFP-Epac2-CFP waren die von Nikolaev *et al.* (Nikolaev *et al.*, 2004) entwickelten Sensoren, mV-Epac1-mTq2 und mV-Epac2-mTq2 waren die im Zuge dieser Arbeit klonierten Sensoren und Epac-S<sup>H74</sup> (H74) und Epac-S<sup>H187</sup> (H187) die durch Kooperationen erhaltenen Sensoren von Klarenbeek und Goedhart (Klarenbeek *et al.*, 2015; Klarenbeek *et al.*, 2011). Die Sensoren wurden in HEK293-Zellen exprimiert und über die Aktivierung endogen exprimierter  $\beta_2$ AR durch Isoprenalin der cAMP-Spiegel erhöht. Durch den Vergleich konnte der potenteste cAMP-Sensor ermittelt werden (s. Abbildung 25 und Abbildung 26).

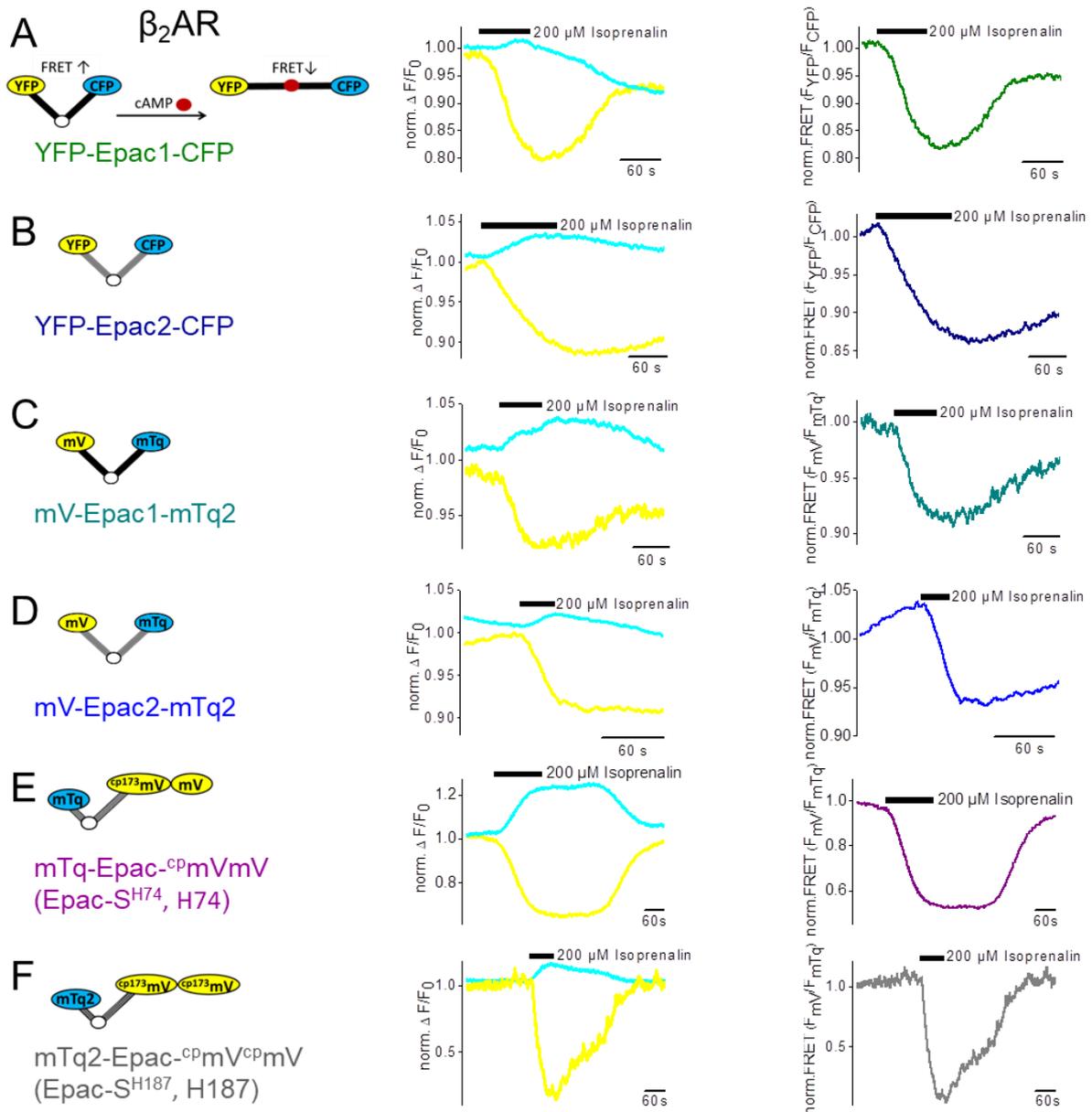
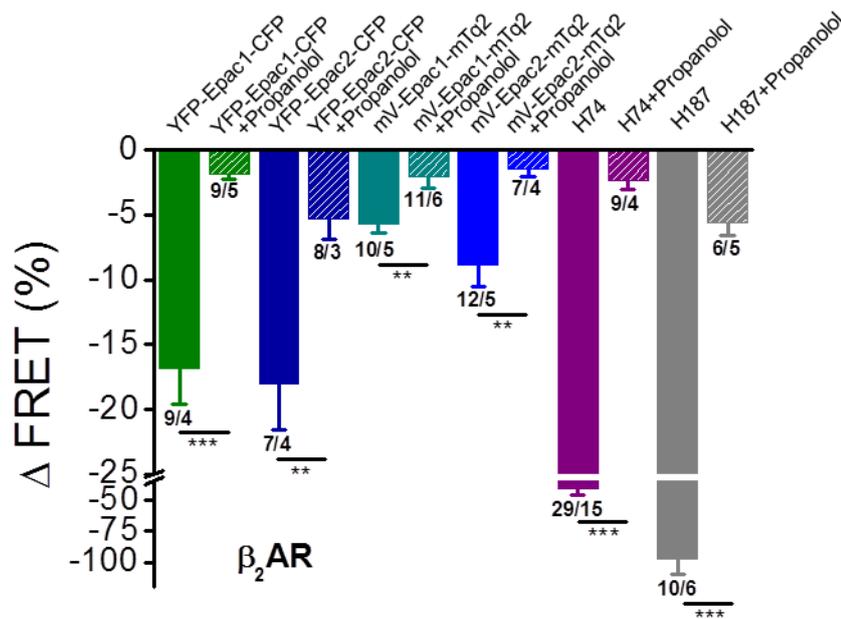


Abbildung 25: Epac-basierte cAMP-Sensoren und der  $G_s$ -PCR  $\beta_2AR$  in FRET-Messungen

Die Sensoren YFP-Epac1-CFP (A), YFP-Epac2-CFP (B), mV-Epac1-mTq2 (C), mV-Epac2-mTq2 (D), mTq-Epac-<sup>CP</sup>mVmV (Epac-S<sup>H74</sup>, H74) (E) und mTq2-Epac-<sup>CP</sup>mV<sup>CP</sup>mV (Epac-S<sup>H187</sup>, H187) (F) werden in HEK293-Zellen, die endogen den  $\beta_2AR$  enthalten, exprimiert. A - F Schematischer Aufbau der verschiedenen Sensoren (links). Das Epac-Protein ist N- und C-Terminal von zwei Fluorophoren flankiert, in Abwesenheit von cAMP (roter Punkt) befinden sich die Fluorophore näher als 10 nm beieinander, ein Energietransfer kann stattfinden. Bei Erhöhung des cAMP-Spiegels nach  $G_s$ -PCR-Aktivierung wird cAMP gebunden (schwarzer Kreis: cAMP-Bindestelle). Dadurch ändert sich die Epac-Konformation, sodass kein Energietransfer mehr möglich ist (links oben). Exemplarische Zeitverläufe der normalisierten Einzelspuren der gelben (YFP, mV, <sup>CP</sup>mVmV, <sup>CP</sup>mV<sup>CP</sup>mV) und blauen (CFP, mTq, mTq2) Fluoreszenzsignale (Mitte) sowie der normalisierten FRET-Signale. Der schwarze Balken impliziert die Applikation von Isoprenaline (200  $\mu$ M).



**Abbildung 26: Zusammenfassung der FRET-Signalabnahmen nach  $\beta_2$ AR -Stimulation**

Dargestellt ist die Zusammenfassung der FRET-Signalabnahmen nach der Stimulation von  $\beta_2$ AR durch Isoprenalin. Die Sterne (\*) markieren das Signifikanzniveau im Vergleich zum FRET-Signal unter Blocker-Applikation, jeweils ausgewertet mit dem Zweistichproben-t-Test. Ausgefüllte Balken zeigen die FRET-Signalabnahmen in Anwesenheit von Isoprenalin (200  $\mu$ M), die schraffierten Balken in Anwesenheit von Isoprenalin und des  $\beta_2$ AR-Blockers Propranolol (1,5 mM). Die Nummern über dem Graphen bezeichnen die Anzahl der gemessenen Zellen sowie die Anzahl der unabhängigen Experimente.

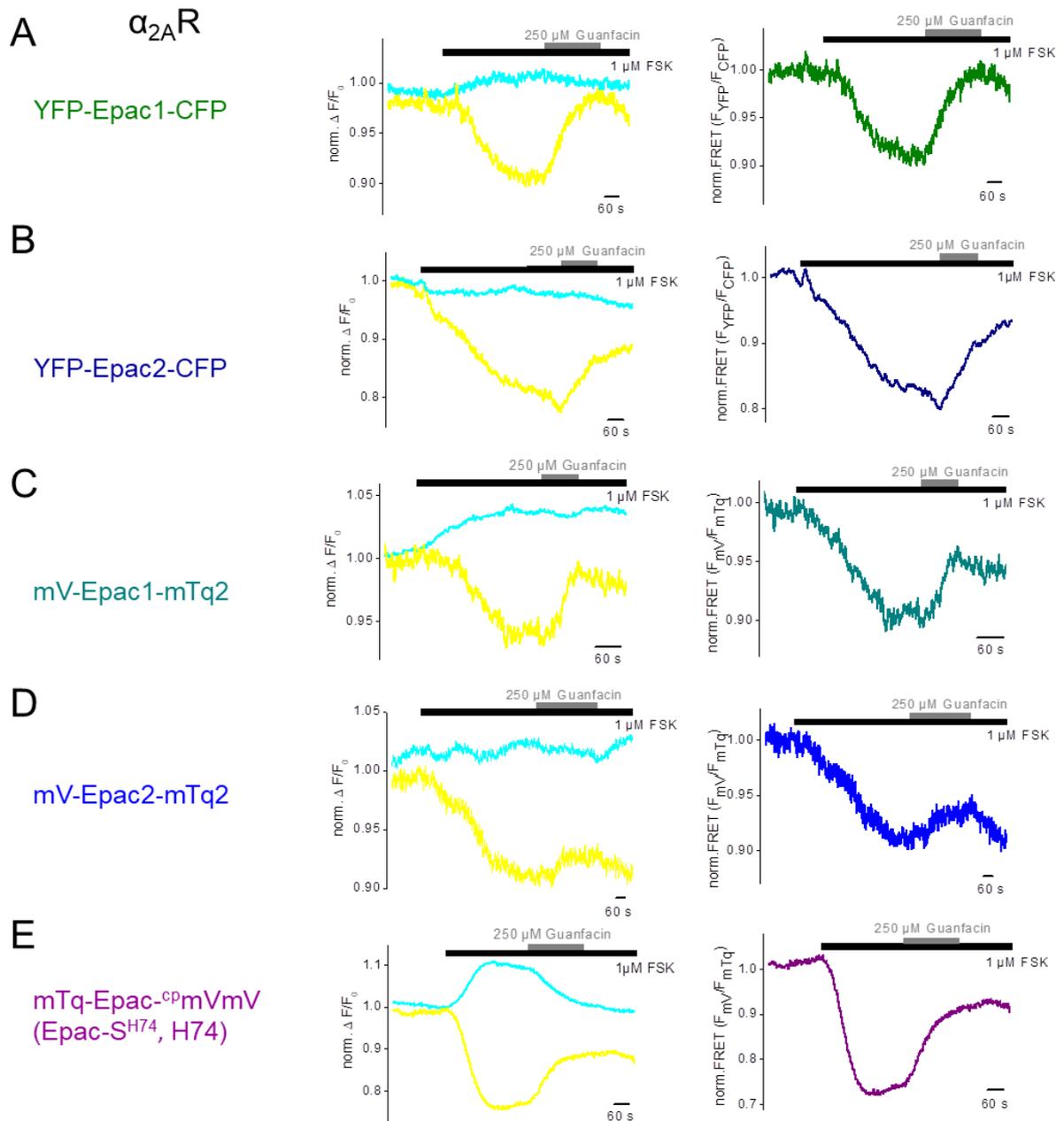
Nach Stimulation der  $\beta_2$ AR durch Isoprenalin kam es in HEK293-Zellen zu einem Anstieg von cAMP. Dieser wurde von allen sechs Epac-basierten cAMP-Sensoren detektiert, was bedeutet, dass alle Sensoren funktionell sind. Die FRET-Signalabnahmen variierten zwischen -5,7 % (mV-Epac1-mTq2) und -97,2 % (Epac-S<sup>H187</sup>, H187). Insgesamt führte die Fluorophorpaarung YFP/CFP zu besseren Ergebnissen als die Paarung mV/mTq2, ersichtlich in der absoluten prozentualen FRET-Signaländerung. Zwischen Epac1 und Epac2 war kein signifikanter Unterschied zu sehen (YFP-Epac1-CFP vs. YFP-Epac2-CFP p=0,79; mV-Epac1-mTq2 vs. mV-Epac2-mTq2 p=0,11). Die größten FRET-Signalabnahmen zeigten die beiden Sensoren Epac-S<sup>H187</sup> (H187) und Epac-S<sup>H74</sup> (H74). Diese Konstrukte sind also am ehesten dazu geeignet, Änderungen des cAMP-Spiegels zu detektieren. Um die Frage zu beantworten, ob Epac-basierte cAMP-Sensoren auch fähig sind, durch  $G_{i/o}$ -PCR verursachte cAMP-Spiegelabnahmen zu visualisieren, wurden alle sechs funktionellen Sensoren in Kombination mit  $G_{i/o}$ -PCR untersucht.

### 3.3.2 Sensoren stellen cAMP-Spiegeländerung nach $G_{i/o}$ -PCR vermittelter Rezeptoraktivierung dar

Die cAMP-Spiegelabnahmen-Visualisierung stellt eine größere Herausforderung dar als die Darstellung von  $G_s$ -PCR-vermittelten cAMP-Zunahmen, da eine absolut gemessen geringere Differenz gezeigt werden muss. In Messungen mit HEK293-Zellen, die den  $\alpha_{2A}$ R und einen der bis dahin verfügbaren Sensoren YFP-Epac1-CFP, YFP-Epac2-CFP, mV-Epac1-mTq2, mV-Epac2-mTq2 oder Epac-S<sup>H74</sup> (H74) überexprimierten, konnten keine verlässlichen FRET-Signalzunahmen unter dem  $\alpha_{2A}$ R-Agonisten Guanfacin detektiert werden. Daher wurde der cAMP-Spiegel vor der Stimulation der  $\alpha_{2A}$ R künstlich durch den direkten AC-Aktivator Forskolin (FSK) erhöht.

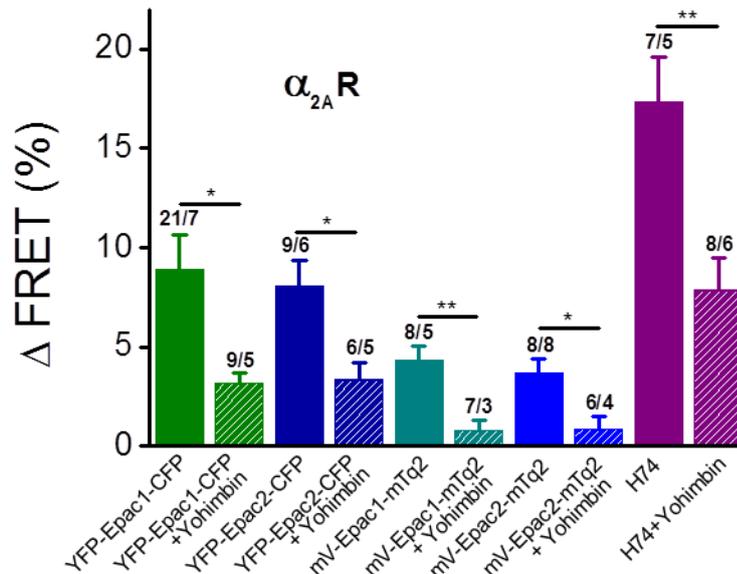
#### 3.3.2.1 Vorstimulation mit Forskolin

Für die Vorstimulation der HEK293-Zellen, in denen  $G_{i/o}$ -PCR überexprimiert waren, wurde eine Konzentration von 1  $\mu$ M gewählt. In FRET-Messungen wurden sowohl der  $\alpha_{2A}$ R (s. Abbildung 27 und Abbildung 28) als auch der  $\mu$ R (s. Abbildung 29 und Abbildung 30) zusammen mit entweder YFP-Epac1-CFP, YFP-Epac2-CFP, mV-Epac1-mTq2, mV-Epac2-mTq2 oder Epac-S<sup>H74</sup> (H74) analysiert.



**Abbildung 27: Epac-basierte cAMP-Sensoren und der  $\alpha_{2A}R$  in FRET-Messungen**

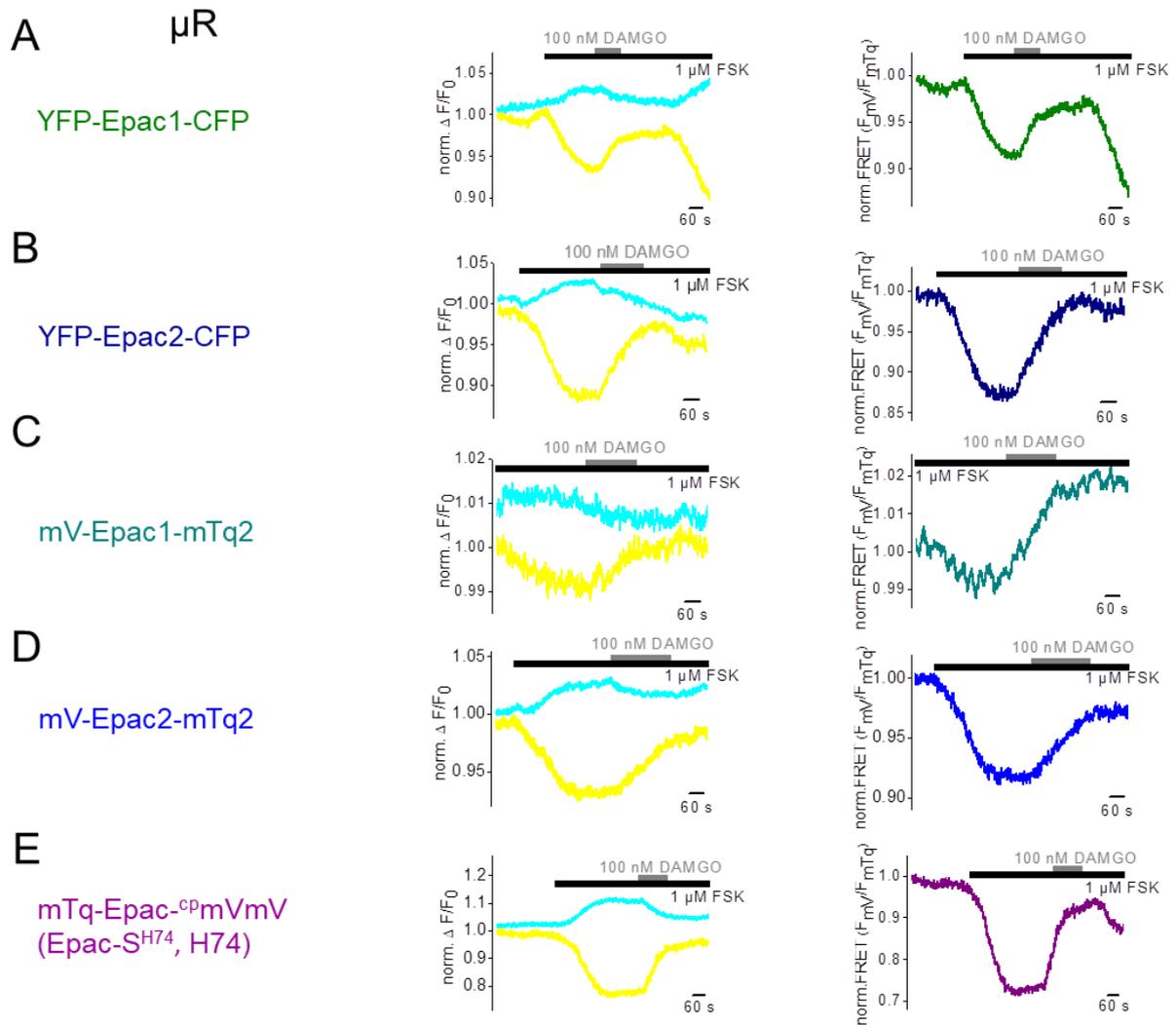
Die Sensoren YFP-Epac1-CFP (**A**), YFP-Epac2-CFP (**B**), mV-Epac1-mTq2 (**C**), mV-Epac2-mTq2 (**D**) und mTq-Epac<sup>cp</sup>mVmV (Epac-S<sup>H74</sup>, H74) werden mit dem  $\alpha_{2A}R$  in HEK293-Zellen koexprimiert. **A - E** Schematische Schriftweise der verschiedenen Sensoren (links). Exemplarische Zeitverläufe der normalisierten Einzelspuren der gelben (YFP, mV, <sup>cp</sup>mVmV) und blauen (CFP, mTq2) Fluoreszenzsignale (Mitte) sowie der normalisierten FRET-Signale (rechts). Die schwarzen Balken implizieren die Applikation von FSK (1  $\mu$ M), die grauen Balken von Guanfacin (250  $\mu$ M).



**Abbildung 28: Zusammenfassung der FRET-Signalzunahmen nach  $\alpha_{2A}R$ -Stimulation**

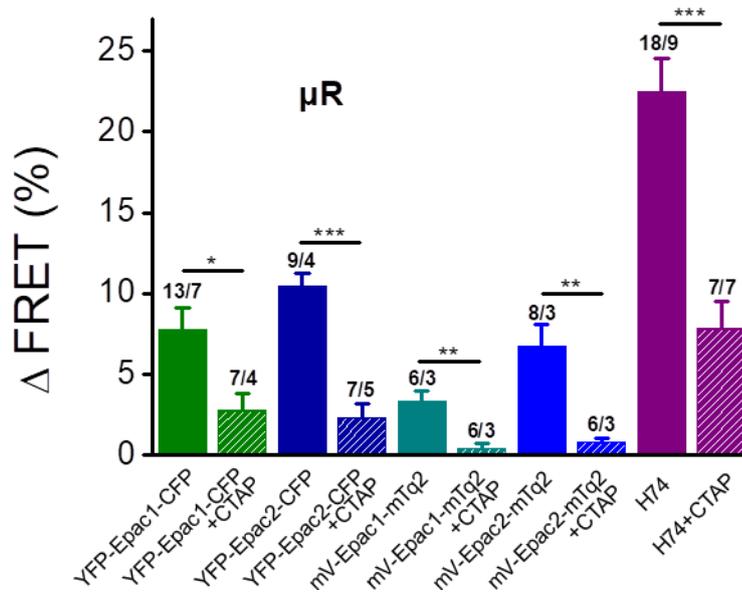
Dargestellt ist die Zusammenfassung der FRET-Signalzunahmen nach der Stimulation von  $\alpha_{2A}R$  durch Guanfacin. Die Sterne (\*) markieren das Signifikanzniveau im Vergleich zum FRET-Signal unter Blocker-Applikation, jeweils ausgewertet mit dem Zweistichproben-t-Test. Ausgefüllte Balken zeigen die FRET-Signalzunahmen in Anwesenheit von Guanfacin (250  $\mu$ M), die schraffierten Balken in Anwesenheit von Guanfacin und des  $\alpha_{2A}R$ -Blockers Yohimbine (1,0 mM). Die Nummern über dem Graphen bezeichnen die Anzahl der gemessenen Zellen sowie die Anzahl der unabhängigen Experimente.

Bei der Untersuchung des  $\alpha_{2A}R$  in FRET-Experimenten waren alle untersuchten Sensoren fähig, cAMP-Spiegelzunahmen nach FSK-Vorstimulation zu detektieren. Vergleichbar zu den Voruntersuchungen mit dem  $\beta_2AR$  wurde die cAMP-Spiegelabnahme von den sechs Epac-basierten cAMP-Sensoren in unterschiedlichem Ausmaß detektiert. Die FRET-Signalzunahmen variierten zwischen 3,7 % (mV-Epac2-mTq2) und 17,4 % (Epac-S<sup>H74</sup>, H74). Insgesamt führte auch hier die Fluorophorpaarung YFP/CFP zu besseren Ergebnissen als die Paarung mV/mTq2, gemessen an der absoluten FRET-Signaländerung. Zwischen Epac1 und Epac2 war kein signifikanter Unterschied zu sehen, beide Proteinversionen detektierten vergleichbare absolute FRET-Signaländerungen (YFP-Epac1-CFP vs. YFP-Epac2-CFP  $p=0,51$ ; mV-Epac1-mTq2 vs. mV-Epac2-mTq2  $p=0,58$ ). Die größten FRET-Signalzunahmen zeigte der Sensor Epac-S<sup>H74</sup> (H74).



**Abbildung 29: Epac-basierte cAMP-Sensoren und der  $\mu$ R in FRET-Messungen**

Die Sensoren YFP-Epac1-CFP (**A**), YFP-Epac2-CFP (**B**), mV-Epac1-mTq2 (**C**), mV-Epac2-mTq2 (**D**) und mTq-Epac-<sup>cp</sup>mVmV (Epac-S<sup>H74</sup>, H74) werden mit dem  $\mu$ R in HEK293-Zellen koexprimiert. **A - E** Schematischer Aufbau der verschiedenen Sensoren (links). Exemplarische Zeitverläufe der normalisierten Einzelspuren der gelben (YFP, mV, <sup>cp</sup>mVmV) und blauen (CFP, mTq2) Fluoreszenzsignale (Mitte) sowie der normalisierten FRET-Signale (rechts). Die schwarzen Balken implizieren die Applikation von FSK (1  $\mu$ M), die grauen Balken von DAMGO (100 nM).



**Abbildung 30: Zusammenfassung der FRET-Signalzunahmen nach  $\mu$ R-Stimulation**

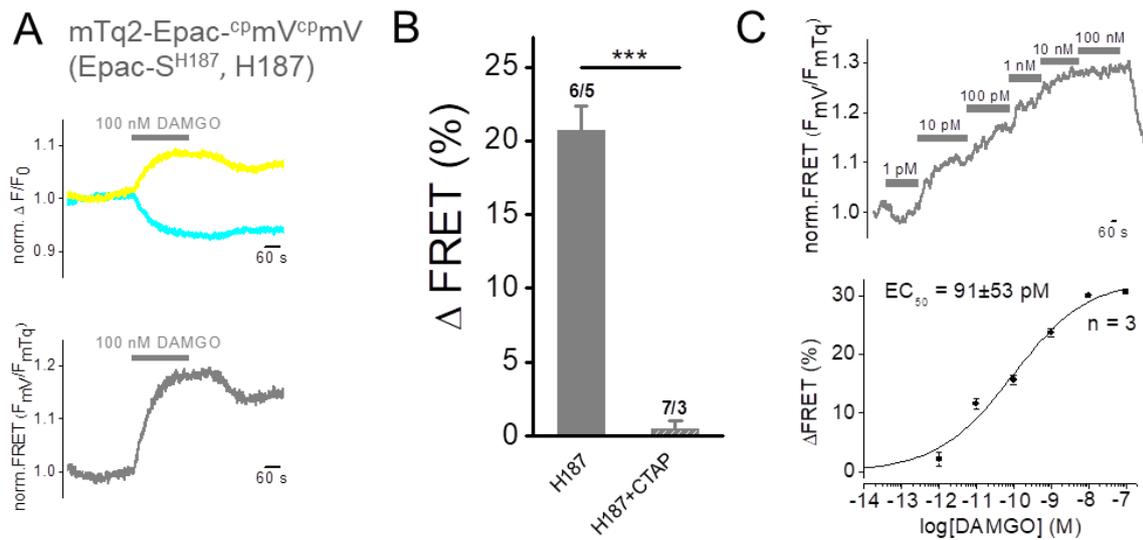
Dargestellt ist die Zusammenfassung der FRET-Signalzunahmen nach der Stimulation von  $\mu$ R durch DAMGO. Die Sterne (\*) markieren das Signifikanzniveau im Vergleich zum FRET-Signal unter Blocker-Applikation, jeweils ausgewertet mit dem Zweistichproben-t-Test. Ausgefüllte Balken zeigen die FRET-Signalzunahmen in Anwesenheit von DAMGO (100 nM), die schraffierten Balken in Anwesenheit von DAMGO und des  $\mu$ R-Blockers CTAP (500 nM). Die Nummern über dem Graphen bezeichnen die Anzahl der gemessenen Zellen sowie die Anzahl der unabhängigen Experimente.

Bei der Untersuchung des  $\mu$ R in FRET-Experimenten waren alle untersuchten Sensoren fähig, cAMP-Spiegelzunahmen nach FSK-Vorstimulation zu detektieren. Vergleichbar mit den Voruntersuchungen des  $\beta_2$ AR (s. 3.3.1) und den Ergebnissen des  $\alpha_{2A}$ AR (s. 3.3.2) wurde die cAMP-Spiegelabnahme von den sechs Epac-basierten cAMP-Sensoren in unterschiedlichem Ausmaß detektiert. Die FRET-Signalzunahmen variierten zwischen 3,3 % (mV-Epac1-mTq2) und 22,5 % (Epac-S<sup>H74</sup>, H74). Insgesamt führte auch hier die Fluorophorpaarung YFP/CFP zu besseren Ergebnissen als die Paarung mV/mTq2. Zwischen Epac1 und Epac2 war kein signifikanter Unterschied zu sehen, beide Proteinversionen detektierten vergleichbare absolute FRET-Signaländerungen (YFP-Epac1-CFP vs. YFP-Epac2-CFP  $p = 0,14$ ; mV-Epac1-mTq2 vs. mV-Epac2-mTq2  $p = 0,06$ ). Die größten FRET-Signalzunahmen zeigte der Sensor Epac-S<sup>H74</sup> (H74). Die Ergebnisse des  $\mu$ R in Kombination mit dem Epac-S<sup>H74</sup>-Sensor führten zu der Frage, ob die Darstellung  $G_{i/o}$ -PCR-vermittelter cAMP-Spiegelabnahmen auch ohne FSK-Vorstimulation möglich sein könnte.

### 3.3.2.2 Messungen $G_{i/o}$ PCR ohne Forskolin

Der Epac-S<sup>H187</sup>-Sensor zeichnet sich durch eine höhere Affinität zu cAMP und einen größeren dynamischen Bereich aus (Klarenbeek *et al.*, 2015). Mit Hilfe dieses Sensors sollte untersucht werden, ob eine FRET-Signalzunahme nach  $G_{i/o}$ -PCR-Aktivierung ohne FSK-Vorstimulation zu

detektieren war. Dazu wurden der  $\mu$ R und der Epac-S<sup>H187</sup>-Sensor in HEK293-Zellen koexprimiert und diese mit DAMGO stimuliert. Zur Ermittlung der einzusetzenden DAMGO-Konzentration wurde in Voruntersuchungen die mittlere effektive Konzentration (EC<sub>50</sub>) bestimmt. Dabei wurde festgestellt, dass 100 nM als maximale Wirkkonzentration von DAMGO bereits ausreichend war. Höhere Konzentrationen führten zu keiner gesteigerten FRET-Signalamplitude. Die Ergebnisse sind in Abbildung 31 dargestellt.



**Abbildung 31:** Epac-S<sup>H187</sup>-Sensor und  $\mu$ R in FRET-Messungen ohne FSK-Vorstimulation

Der Epac-S<sup>H187</sup>-Sensor koexprimiert mit dem  $\mu$ R in HEK293-Zellen. **A** Exemplarische Zeitverläufe der normalisierten Einzelspuren des gelben (c<sup>p</sup>mV<sup>c</sup>pV) und blauen (mTq2) Fluoreszenzsignals (oben) sowie der normalisierten FRET-Signale (unten). Die grauen Balken implizieren die Applikation von DAMGO (100 nM). **B** Zusammenfassung der FRET-Signalzunahmen nach der Stimulation von  $\mu$ R durch DAMGO (ausgefüllter Balken) und des  $\mu$ R-Blockers CTAP (500 nM, schraffierter Balken). Die Nummern über dem Graphen bezeichnen die Anzahl der gemessenen Zellen sowie die Anzahl der unabhängigen Experimente. Die Sterne (\*) markieren das Signifikanzniveau im Vergleich zum FRET-Signal unter Blocker-Applikation, ausgewertet mit dem Zweistichproben-t-Test. **C** Exemplarische FRET-Signalspur unter der Applikation von zunehmenden DAMGO-Konzentrationen (1 pM - 100 nM, oben) sowie die aus drei unabhängigen Messungen ermittelte Konzentrations-Wirkungs-Kurve (angepasst mittels der Hill-Gleichung, unten).

Unter Verwendung des Epac-S<sup>H187</sup>-Sensors konnte die  $\mu$ R-vermittelte cAMP-Spiegelabnahme ohne FSK-Vorstimulation detektiert werden. Dabei kam es unter der maximalen Wirkkonzentration von DAMGO (100 nM) zu einer durchschnittlichen FRET-Signalzunahme von 20,7 %.

### 3.3.2.3 *cAMP-vermittelte FRET-Signale durch Rezeptorblockade hemmbar*

Durch die Epac-basierten Sensoren war es möglich, auf fundierte und zuverlässige Art zeitlich aufgelöste Abnahmen des cAMP-Spiegels in Einzelzellen zu detektieren. Um zu untersuchen, ob die mittels FRET-Technik detektierten cAMP-Spiegelabnahmen und -zunahmen spezifisch den untersuchten Rezeptoren zuzuweisen war, wurden unter gleichen experimentellen Bedingungen Messungen unter Applikation der jeweiligen Rezeptorblocker durchgeführt. Für den  $\beta_2$ AR wurde Propranolol (1,5 mM), für den  $\alpha_{2A}$ R Yohimbin (1,0 mM) und für den  $\mu$ R CTAP (500 nM) eingesetzt. Die Konzentrationen der Blocker wurden hierbei so gewählt, dass der  $EC_{50}$  der Blocker den  $EC_{50}$  der Agonisten um ein 3 – 5faches überstieg. Als Sensoren wurden der Epac-S<sup>H74</sup> und der Epac-S<sup>H187</sup> verwendet. Der  $\mu$ R wurde dabei einmal mit (Epac-S<sup>H74</sup>) und einmal ohne FSK-Vorstimulation (Epac-S<sup>H187</sup>) getestet. Die Ergebnisse sind in Abbildung 32 dargestellt.

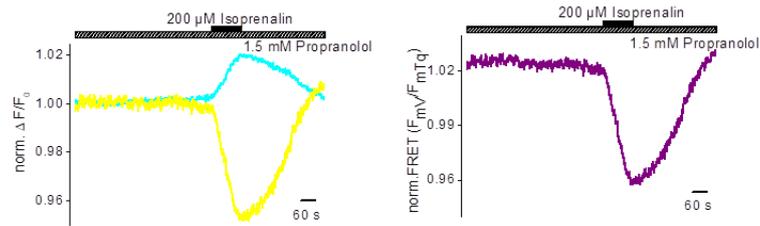
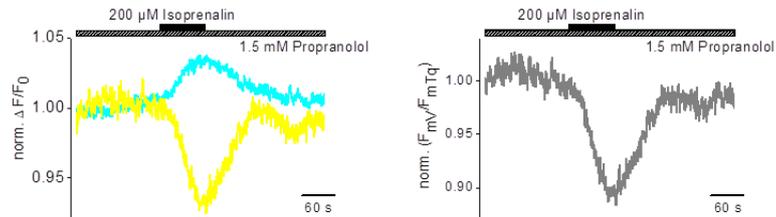
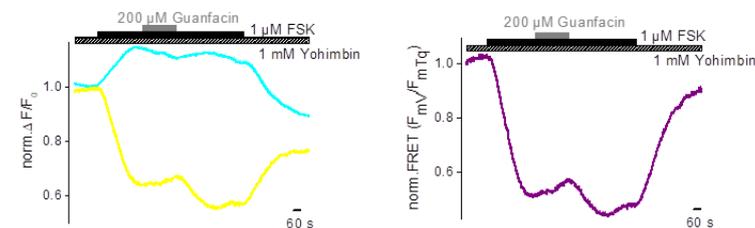
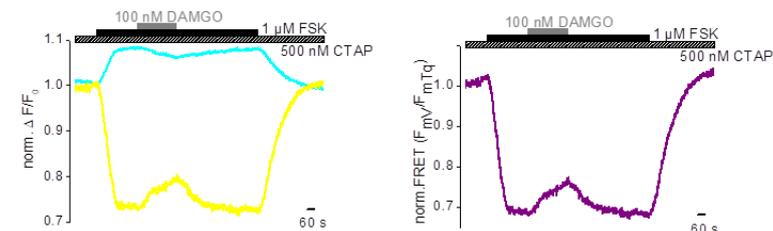
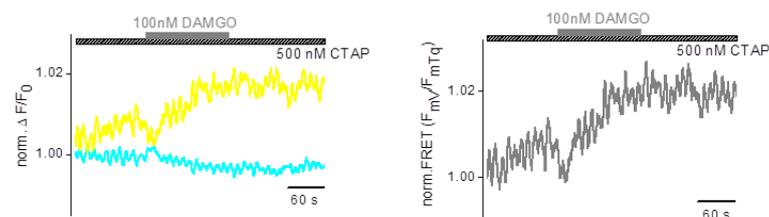
A  $\beta_2$ AREpac-S<sup>H74</sup>Epac-S<sup>H187</sup>B  $\alpha_2$ AREpac-S<sup>H74</sup>C  $\mu$ REpac-S<sup>H74</sup>Epac-S<sup>H187</sup>

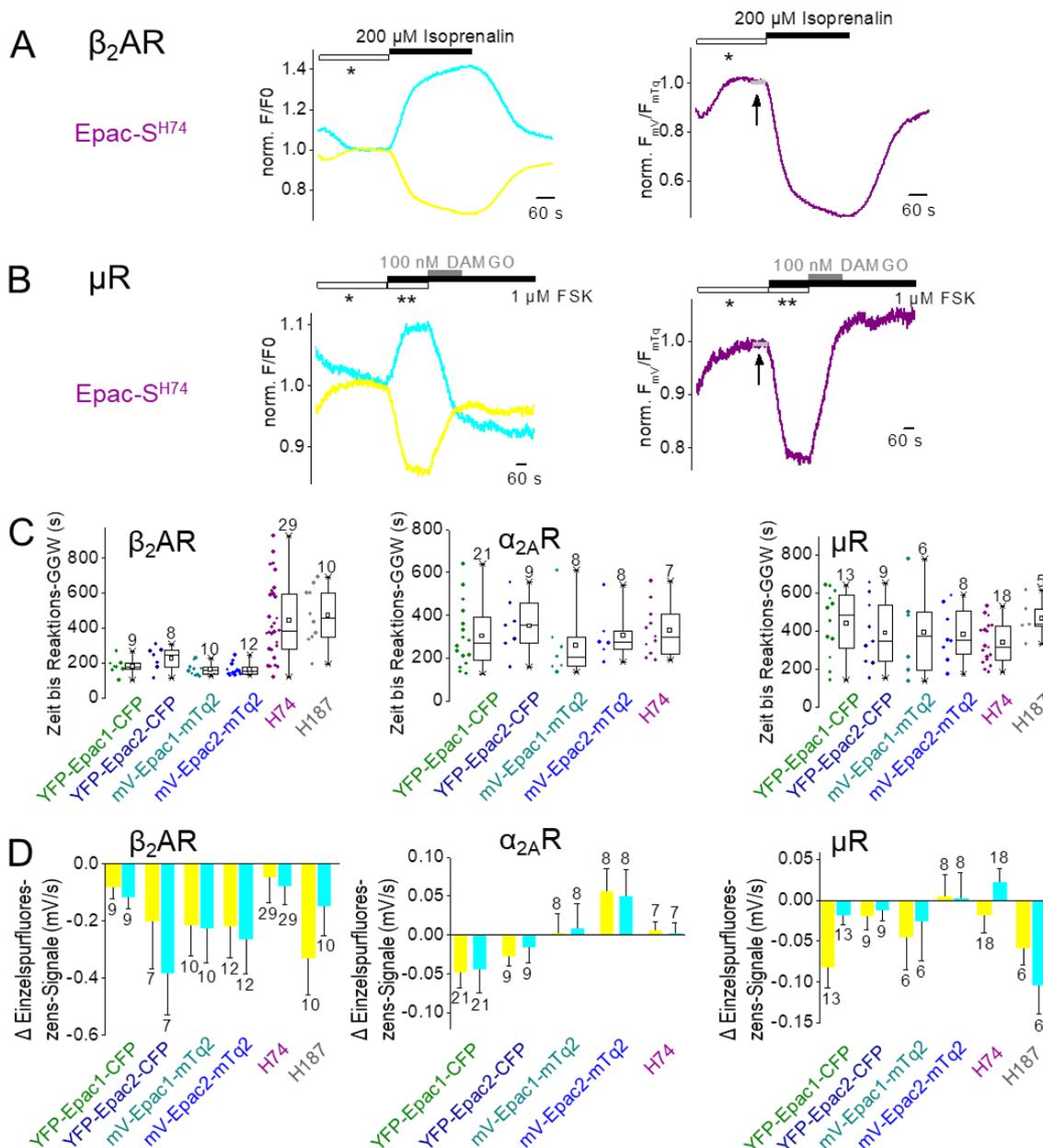
Abbildung 32: FRET-Signaländerungen durch Rezeptorblockade hemmbar

**A** FRET-Messungen in HEK293-Zellen, in denen endogen der  $\beta_2$ AR vorkommt und dazu entweder der Epac-S<sup>H74</sup>- (oben) oder der Epac-S<sup>H187</sup>-Sensor (unten) exprimiert wird. Exemplarische Zeitverläufe der normalisierten Einzelspuren des gelben (<sup>cp</sup>mV in H74, <sup>cp</sup>mV<sup>cp</sup>mV in H187) und blauen (mTq2) Fluoreszenzsignals (links) sowie der normalisierten FRET-Signale (rechts) unter Applikation des  $\beta_2$ -Rezeptorblockers Propranolol (1,5 mM, schraffierter Balken). Die schwarzen Balken implizieren die Applikation von Isoprenalin (200  $\mu$ M). **B** HEK293-Zellen, die den Epac-S<sup>H74</sup>-Sensor mit dem  $\alpha_2$ AR koexprimieren, werden in FRET-Messungen analysiert. Exemplarische Zeitverläufe der normalisierten Einzelspuren des gelben und blauen Fluoreszenzsignals (links) sowie der normalisierten FRET-Signale (rechts) unter Applikation des  $\alpha_2$ -Rezeptorblockers Yohimbine (1,0 mM, schraffierter Balken). Die schwarzen Balken implizieren die Applikation von FSK (1  $\mu$ M), die grauen Balken von Guanfacin (250  $\mu$ M). **C** HEK293-Zellen, die entweder den Epac-S<sup>H74</sup>- (oben, mit FSK) oder den Epac-S<sup>H187</sup>-Sensor (unten, ohne FSK) mit dem  $\mu$ R koexprimieren, werden in FRET-Messungen analysiert. Exemplarische Zeitverläufe der normalisierten Einzelspuren des gelben und blauen Fluoreszenzsignals (links) sowie der normalisierten FRET-Signale (rechts) unter Applikation des  $\mu$ -Rezeptorblockers CTAP (500 nM, schraffierter Balken). Die schwarzen Balken oben implizieren die Applikation von FSK (1  $\mu$ M), die grauen Balken von DAMGO (100 nM).

Die Effekte durch einen Rezeptoragonisten konnten durch die Applikation spezifischer Rezeptorblocker signifikant reduziert werden. In HEK293-Zellen, in denen der  $\beta_2$ AR und einer der sechs Sensoren exprimiert waren, war in jeder Kombination eine Verringerung des Signals zu detektieren, siehe auch Abbildung 26. Vergleichbare Ergebnisse wurden beim  $\alpha_{2A}$ R und  $\mu$ R erzielt (Abbildung 28 und Abbildung 30). Im experimentellen Ablauf der Untersuchung des  $\mu$ R in Kombination mit dem Epac-S<sup>H187</sup>-Sensor ohne Vorstimulation durch FSK konnte die Signalreduktion durch den Rezeptorblocker CTAP ebenfalls festgestellt werden. Diese Ergebnisse lassen darauf schließen, dass die ermittelten cAMP-Spiegelzunahmen oder -abnahmen rezeptorspezifisch sind, obwohl keine vollständige Signalaufhebung erzielt werden konnte.

### *3.3.3 Ermittlung der optimalen Messbedingungen*

Um zu untersuchen, welche Bedingungen für reproduzierbare und verlässliche Ergebnisse bei der Detektion GPCR-vermittelter cAMP-Spiegeländerungen unerlässlich sind, wurden die Messbedingungen detailliert untersucht und definiert. Nur Messungen, die diesen Bedingungen entsprachen, flossen in die Ermittlung einer Mess-Erfolgsrate mit ein (s. Abbildung 34).



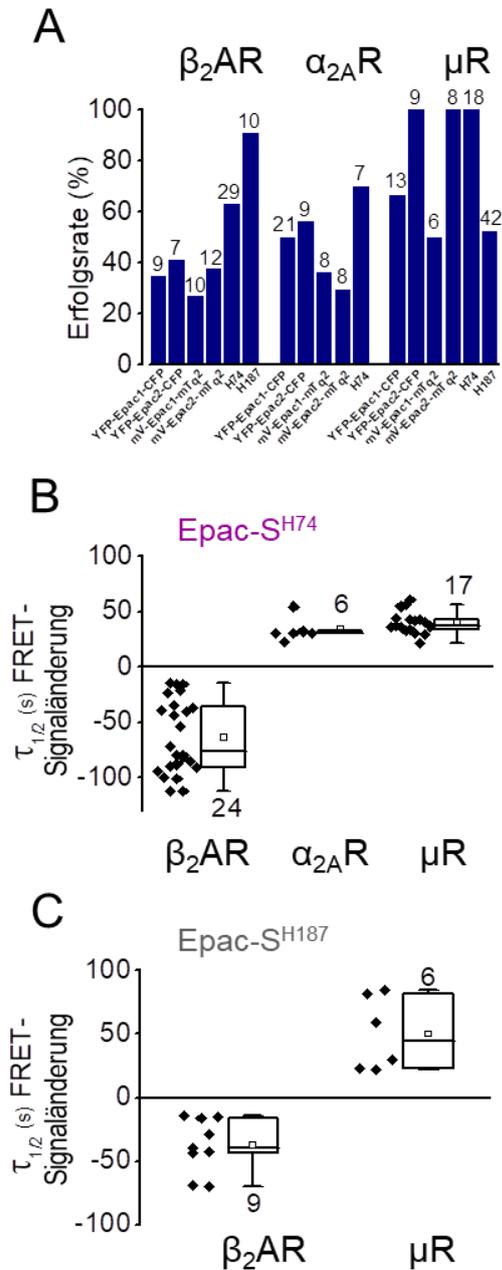
**Abbildung 33: Vorbereitungen der Epac-Sensor-basierten FRET-Messungen**

**A, B** Zeitverläufe exemplarischer FRET-Messungen in HEK293-Zellen, in denen endogen der  $\beta_2AR$  vorkommt (A) oder der  $\mu R$  überexprimiert wird (B) und dazu jeweils der Epac-S<sup>H74</sup>-Sensor exprimiert wird. Dargestellt sind normalisierte Einzelspuren des gelben (<sup>cp</sup>mV/mV) und blauen (mTq2) Fluoreszenzsignals (A + B, links) sowie der normalisierten FRET-Signale unter Applikation des  $\beta_2AR$ -Agonisten Isoprenalin (200  $\mu M$ , schwarzer Balken, A) oder des  $\mu$ -Agonisten DAMGO (100 nM, hellgrauer Balken, B) mit FSK-Vorstimulation (1  $\mu M$ , schwarzer Balken, B). Weißer Balken, \* = Zeit bis zur Gleichgewichtseinstellung vor dem ersten Stimulus. Weißer Balken, \*\* = Zeit bis zur Gleichgewichtseinstellung vor dem zweiten Stimulus. Kurzer hellgrauer Balken,  $\uparrow$  = Zeitraum zur Detektion der Fluoreszenzänderung der Einzelspuren in mV/s.

**C** Übersicht über die Zeiten bis zur Einstellung des Reaktions-Gleichgewichtes (Reaktions-GGW) in  $\beta_2AR$ -(links),  $\alpha_{2A}R$ -(Mitte) oder  $\mu R$ -(rechts) exprimierenden HEK293-Zellen, die zusätzlich die angegebenen Sensoren exprimieren. Dargestellt als Kastendiagrammen (Boxplot) plus Einzelwerte wird die Zeit in Sekunden bis zum Erreichen des Gleichgewichtszustandes vor Applikation des ersten Stimulus. Die weißen Vierecke zeigen den Mittelwert an, die Zahlen über den Boxen die Anzahl der gemessenen Zellen.

**D** Übersicht über die Steigungen der Einzelspur-Fluoreszenz-Signale in  $\beta_2AR$ -(links),  $\alpha_{2A}R$ -(Mitte) oder  $\mu R$ -(rechts) exprimierenden HEK293-Zellen, die zusätzlich die angegebenen Sensoren exprimieren. Bestimmt wurde die Steigung jeweils vor dem Einwaschen des ersten Stimulus. Die Zahlen an den Balken bzw. Boxen geben die Anzahl der gemessenen Zellen an.

Die Auswertung der Messbedingungen zeigte, dass zur Erstellung einer validen Messung eine Wartezeit bis zur Applikation eines Stimulus notwendig war, bis sich ein Gleichgewicht im System eingestellt hatte und keine Signaländerung in den Einzelkanalspuren oder im FRET-Signal mehr zu detektieren war (s. Abbildung 33 A und B). Es stellte sich heraus, dass diese Bedingung unabhängig davon eingehalten werden musste, ob das System zum ersten Mal oder weitere Male stimuliert wurde. So musste beispielsweise in Experimenten, in denen eine FSK-Vorstimulation stattfand, ebenfalls gewartet werden, bis sich das System im Gleichgewicht befand, bevor ein weiterer Stimulus eingebracht werden konnte. Anhand der Auswertungen zur Steigung der Fluoreszenzeinzelspuren war ersichtlich, dass die Änderungen der Signale sehr klein waren und so einen Gleichgewichtszustand des Systems widerspiegeln (s. Abbildung 33 D). Als Grenzen wurden hier eine Zu- oder Abnahme des Signals von unter 1 mV/s definiert. Dies wurde als eine Fluoreszenzänderung von  $\pm 0$  angesehen. Die Zeitspannen bis zur Applikation eines ersten Stimulus unterschieden sich bei den verschiedenen Rezeptoren und Sensoren und reichten von 100 bis 926 s mit einem Durchschnittswert von 345 s. Der nächste Stimulus konnte nach einer Zeitspanne von durchschnittlich 390 s eingewaschen werden. Die größten Abweichungen waren dabei beim  $\beta_2$ AR zu sehen (s. Abbildung 33 C).



**Abbildung 34: Erfolgsrate und Kinetiken der Epac Sensor-basierten FRET-Messungen**

**A** Erfolgsraten in Prozent der FRET-Messungen mit  $\beta_2AR$ -,  $\alpha_{2A}R$ - oder  $\mu R$ -exprimierenden HEK293-Zellen, die auch einen der angegebenen Sensoren exprimieren. Bei Messungen mit dem  $\mu R$  und H187 wurde nicht mit FSK vorstimuliert. Die Zahlen über den Balken geben die Anzahl der gemessenen Zellen an. **B + C** Darstellung der Kinetiken der FRET-Signaländerungen nach Rezeptorstimulation bei HEK293-Zellen, die entweder den  $\beta_2AR$ ,  $\alpha_{2A}R$  oder  $\mu R$  plus Epac-S<sup>H74</sup>-Sensor (**B**) oder den  $\beta_2AR$  bzw.  $\mu R$  plus Epac-S<sup>H187</sup>-Sensor (**C**) exprimieren. In einem Balkendiagramm dargestellt wird die Veränderung des FRET-Signals als Wert der halbmaximalen exponentiellen Signalzunahme oder -abnahme über die Zeit (Zeitkonstante  $\tau_{1/2}$ ). Stimulation von G<sub>s</sub>-PCR führt zu negativen  $\tau_{1/2}$ -Werten, Stimulation von G<sub>i/o</sub>-PCR zu positiven  $\tau_{1/2}$ -Werten. Die weißen kleinen Quader zeigen den Mittelwert an, die Zahlen unter oder über den Boxen die Anzahl der gemessenen Zellen.

Bei Ermittlung der Erfolgsraten wurde ein Prozentsatz zwischen 27 und 56 % für Messungen mit den Sensoren YFP-Epac1-CFP, YFP-Epac2-CFP, mV-Epac1-mTq2 und mV-Epac2-mTq2 in Kombination mit dem  $\beta_2AR$  oder  $\alpha_{2A}R$  errechnet. Der optimierte Epac-S<sup>H74</sup>-Sensor erlangte Erfolgsraten zwischen 61 und 70 % zusammen mit dem  $\beta_2AR$  oder  $\alpha_{2A}R$  und sogar 100 % bei Koexpression mit dem  $\mu R$ . Der Epac-S<sup>H187</sup>-Sensor in Kombination mit endogen exprimierten  $\beta_2AR$  erreichte 91 % und bei Koexpression mit dem  $\mu R$  ohne

Vorstimulation mit FSK 53 %. Bei Betrachtung der Erfolgsraten lässt sich feststellen, dass diese nicht nur vom verwendeten Sensor abhängen, sondern auch rezeptorabhängig sind. Die Ergebnisse aus den Kinetikuntersuchungen zeigen, dass die G<sub>i/o</sub>-PCR  $\alpha_{2A}$  (34 s) und  $\mu$  (40 s) bei Verwendung des Epac-S<sup>H74</sup>-Sensors vergleichbar schnell zu einer FRET-Signalzunahme führen. Im Vergleich zum G<sub>s</sub>-PCR  $\beta_2AR$  (63 s) bei Verwendung des Epac-S<sup>H74</sup>-Sensors waren die Werte ähnlich aber nicht vergleichbar (34 bzw. 40 s vs. 63 s). Einerseits kann hier die unterschiedliche GPCR-Subfamilie eine Rolle spielen andererseits aber auch die Tatsache, dass der G<sub>s</sub>-PCR  $\beta_2AR$  endogen exprimiert vorlag und die G<sub>i/o</sub>-PCR in einem

Überexpressionssystem. Die Werte des endogen exprimierten  $\beta_2$ AR und des überexprimierten  $\mu$ R zeigten bei Verwendung des Epac-S<sup>H187</sup>-Sensors eine schnellere Kinetik beim  $\beta_2$ AR (37 s, höhere Affinität des Sensors zu cAMP), jedoch eine etwas langsamere Kinetik des  $\mu$ R (49 s). Da jedoch bei Verwendung des Epac-S<sup>H187</sup>-Sensors im Gegensatz zum Epac-S<sup>H74</sup>-Sensor nicht mit FSK vorstimuliert wurde, war kein erhöhter cAMP-Spiegel vor der Rezeptoraktivierung vorhanden. Dies könnte die etwas langsamere Kinetik erklären. Die Ergebnisse zeigen, dass jedoch beide Sensoren dazu in der Lage sind, nicht nur die Kinetik von G<sub>s</sub>-PCR-vermittelten cAMP-Zunahmen zu detektieren, sondern auch die Kinetiken G<sub>i/o</sub>-PCR-vermittelter cAMP-Abnahmen darzustellen.

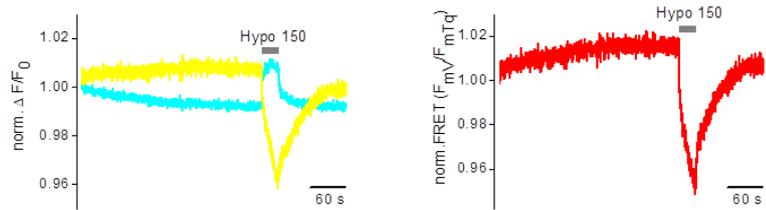
#### *3.3.4 Mechanische Aktivierung einzelner GPCR durch Epac-Sensoren nicht darstellbar*

Anhand der oben dargestellten Experimente war gezeigt worden, dass die Epac-Sensorbasierte FRET-Methode auf spezifische, valide und zuverlässige Weise Agonisten-induzierte G<sub>i/o</sub>-PCR-Aktivierung darstellen konnte. Nun sollte untersucht werden, ob diese Methode auch mechanisch-induzierte G<sub>i/o</sub>-PCR-Aktivierungen visualisieren konnte. Dazu wurden diverse mechanische Reize simuliert und appliziert (s. 2.4.4). Als cAMP-Spiegelsensoren kamen hier die Sensoren YFP-Epac1-CFP und mV-Epac1-mTq2 zum Einsatz. Diese wurden zunächst in HEK293-Zellen mit endogen exprimierten GPCR überexprimiert (s. Abbildung 35).

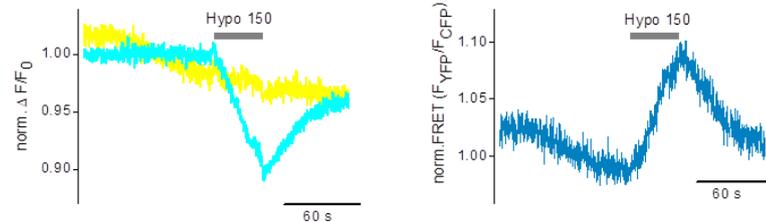
Endogene GPCR

A Hypo

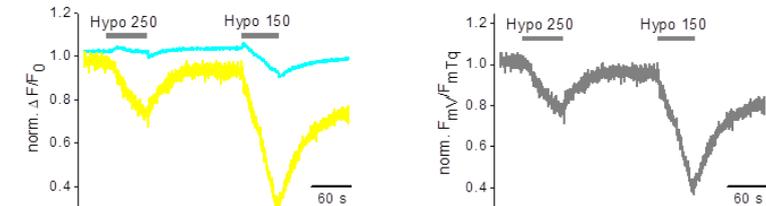
YFP-Epac1-CFP



mV-Epac1-mTq2

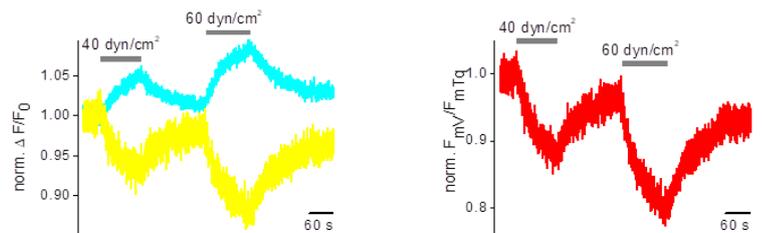


mV-Epac1-mTq2

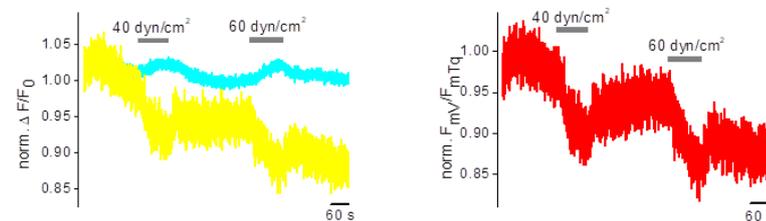


B Shear Stress

YFP-Epac1-CFP

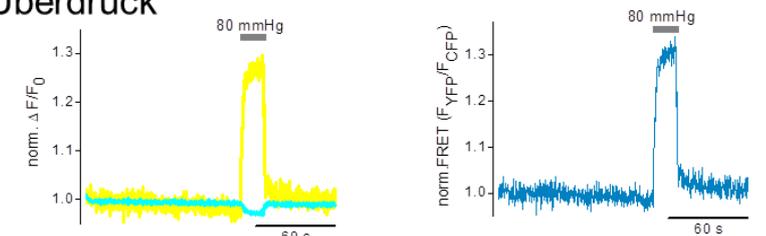


mV-Epac1-mTq2

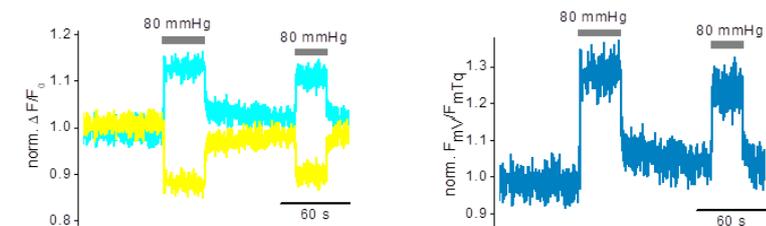


C Extrazellulärer Überdruck

YFP-Epac1-CFP



mV-Epac1-mTq2



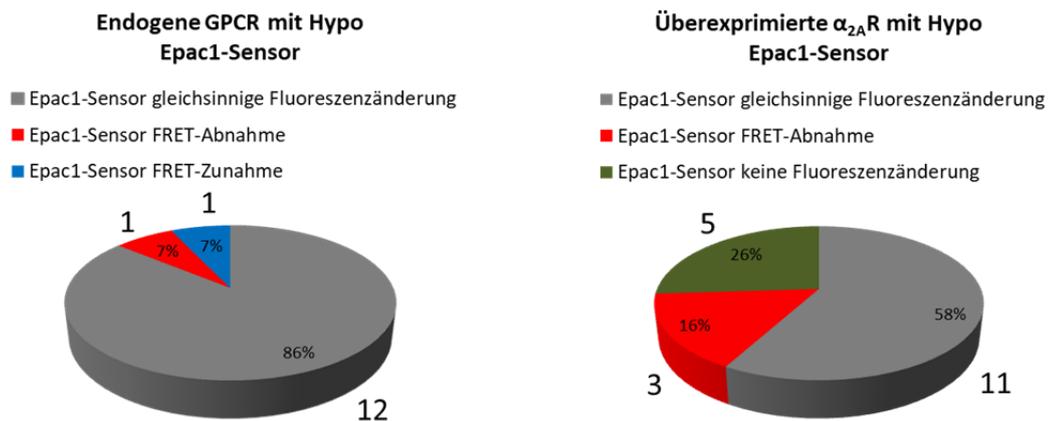
Abbildungsbeschriftung und Erklärungen s. nächste Seite

**Abbildung 35: Epac-Sensor-basierte FRET-Messungen mit mechanischen Stimuli an endogenen GPCR**

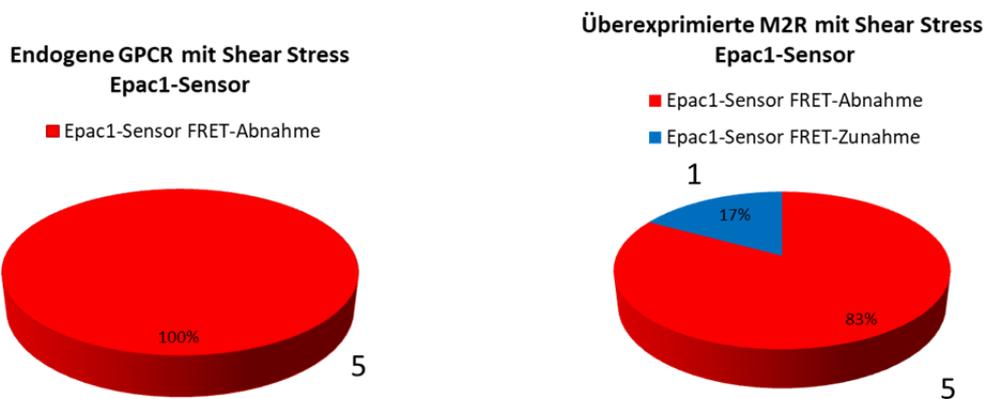
**A, B, C** FRET-Messungen in HEK293-Zellen, in denen nur die Sensoren YFP-Epac1-CFP oder mV-Epac1-mTq2 (Beschriftung links) überexprimiert sind. Die cAMP-Spiegeländerungen werden ausschließlich durch endogene GPCR verursacht. Exemplarische Zeitverläufe der normalisierten Einzelspuren des gelben (YFP oder mV) und blauen (CFP oder mTq2) Fluoreszenzsignals (Mitte) sowie der normalisierten FRET-Signale (rechts) unter Applikation eines mechanischen Stimulus. Die normalisierten FRET-Signale sind in einem Farbschema dargestellt, das die Art des Effektes kennzeichnet (blau: FRET-Signalzunahme, rot: FRET-Signalabnahme, grau: gleichsinnige Fluoreszenzänderung, vgl. Abbildung 34). **A** Einbringen von hypoosmolarer Lösung (Hypo) als mechanischer Reiz. Der graue Balken impliziert die Applikation von hypoosmolarer Lösung (150 bzw. 250 mosm/l). **B** FRET-Messungen unter Applikation von Scherspannung (Shear Stress) in Höhe von 40 bzw. 60 dyn/cm<sup>2</sup> mittels einem mit Badlösung gefüllten Perfusor. Die grauen Balken implizieren die Einbringung der Scherspannung. **C** FRET-Messungen unter Applikation von extrazellulärem Überdruck in Höhe von 80 mmHg (appliziert als 109 cmH<sub>2</sub>O). Die grauen Balken implizieren die Einbringung des extrazellulären Überdrucks.

Die Messungen zeigen, dass unter ausschließlicher Überexpression der cAMP-Sensoren YFP-Epac1-CFP und mV-Epac1-mTq2 bereits ein Signal unter hypoosmolarer Lösung hervorgerufen wurde. Auch bei Anwendung von alternativen mechanischen Reizen wie Scherspannung oder extrazellulärem Überdruck kam es zu einer FRET-Signaländerung durch endogen exprimierte Rezeptoren. Die FRET-Signaländerung unter extrazellulärem Überdruck zeigte jedoch eine zu steile Kinetik, als dass sie tatsächlich durch eine Veränderung des cAMP-Spiegels verursacht werden konnte. Daher muss hier davon ausgegangen werden, dass es sich bei den Signalen teilweise um Bewegungsartefakte handelt. Auffällig war, dass sich die Richtung des FRET-Signals nicht festlegen ließ. Je nach Messung und mechanischen Stimulus variierten Zunahmen, Abnahmen, gleichsinnige Fluoreszenzänderungen oder nicht vorhandene Fluoreszenzänderungen. Bei anschließenden Untersuchungen mit überexprimierten G<sub>i/o</sub>-PCR ( $\alpha_{2A}R$ , M2R) konnte ebenfalls keine einem spezifischen Rezeptor zugeordnete cAMP-Spiegeländerung beobachtet werden. In Abbildung 36 sind die durch die Epac-Sensoren gemessenen mechanisch induzierten cAMP-Effekte an endogenen oder überexprimierten GPCR in Kreisdiagrammen zusammengefasst.

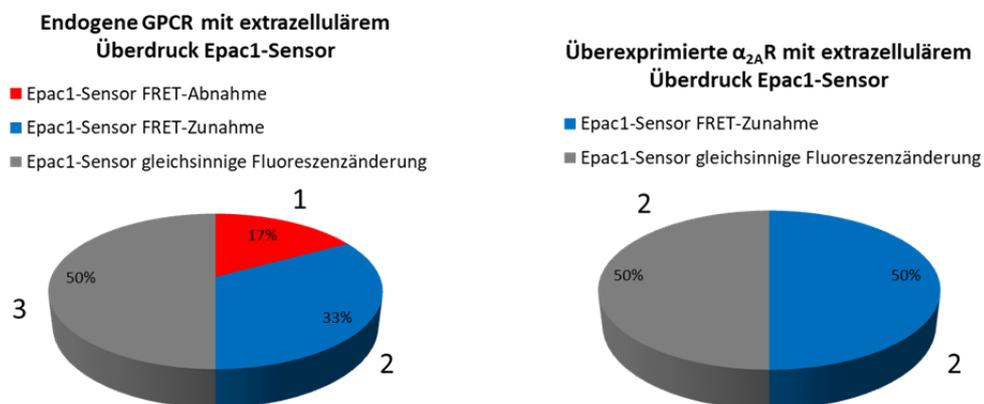
**A** Mechanischer Stimulus: Hypoosmolare Lösung (Hypo)



**B** Mechanischer Stimulus: Scherspannung (Shear Stress)



**C** Mechanischer Stimulus: Extrazellulärer Überdruck



**Abbildung 36: Vergleich mechanisch induzierter cAMP-Effekte an endogenen und überexprimierten GPCR**

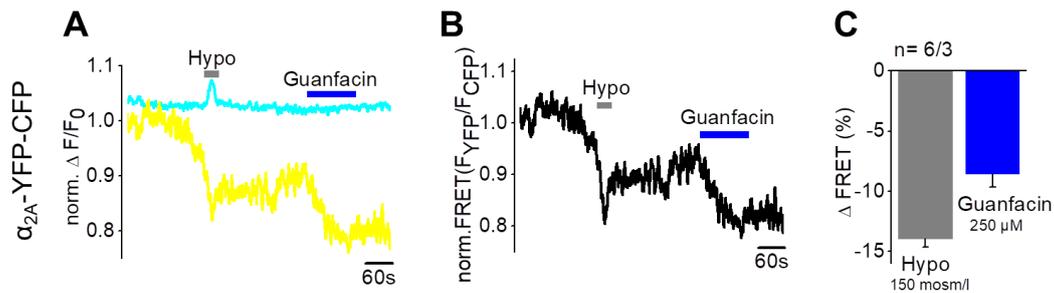
**A, B, C** Vergleichende Kreisdiagramme über die durch einen mechanischen Reiz verursachten cAMP-Spiegeländerungen in HEK293-Zellen, die neben den überexprimierten Epac1-Sensoren entweder nur endogen exprimierte GPCR enthielten (linke Kreisdiagramme) oder zusätzlich die  $G_{\gamma/o}$ -PCR  $\alpha_{2A}$  oder M2 exprimierten (rechte Kreisdiagramme). Die Farben der Tortenstücke entsprechen dem in Abbildung 33 verwendeten Schema (blau: FRET-Signalzunahme, rot: FRET-Signalabnahme, grau: gleichsinnige Fluoreszenzänderung, zusätzlich olivgrün: keine Fluoreszenzänderung). Die Nummern an den Kreisdiagrammen stellen die Anzahl der jeweilig durchgeführten Messungen dar. **A** Vergleich der cAMP-Spiegeländerungen mit endogenen und überexprimierten GPCR nach der Applikation von hypoosmolarer Lösung (Hypo). **B** Vergleich der cAMP-Spiegeländerungen mit endogenen und überexprimierten GPCR nach der Applikation von Scherspannung (Shear Stress). **C** Vergleich der cAMP-Spiegeländerungen mit endogenen und überexprimierten GPCR nach der Applikation von extrazellulärem Überdruck.

Im Vergleich der verschiedenen mechanischen Stimuli an entweder endogen exprimierten oder überexprimierten GPCR war zu sehen, dass der Anteil an den jeweiligen Effekten stark nach Art des Reizes variiert. Die Erfolgsquote der Messungen ist daher von der Art des mechanischen Reizes abhängig, zu sehen an der Menge an Messungen mit gleichsinnigen oder nicht vorhandenen Fluoreszenzänderungen. Die höchste Quote an auswertbaren Messungen konnten bei Anwendung eines mechanischen Reizes in Form von Scherspannung verzeichnet werden. Bemerkenswert war, dass die jeweiligen Effekte unabhängig davon auftraten, ob ein spezifischer Rezeptor überexprimiert war oder nicht. Das bedeutet, dass durch die FRET-Technik auch mechanisch induzierte cAMP-Spiegeländerungen dargestellt werden können, die durch endogene GPCR verursacht werden. Daher war es nötig, eine Untersuchungsmethode für die mechanische Aktivierbarkeit von  $G_{i/o}$ -PCR zu etablieren, bei der der Effekt direkt am untersuchten Rezeptor auszulesen war.

### 3.4 Messung der Mechanosensorik direkt am Rezeptor

#### 3.4.1 $\alpha_{2A}$ -YFP-CFP-Sensor

Rezeptor-Sensoren stellen nützliche Werkzeuge zur Untersuchung diverser Stimuli dar. Um die Mechanosensitivität des  $\alpha_{2A}$ R in FRET-Messungen zu analysieren, wurde der von Vilardaga *et al.* entwickelte Rezeptor-Sensor ( $\alpha_{2A}$ -YFP-CFP-Sensor) in HEK293-Zellen exprimiert und nacheinander mit hypoosmolarer Lösung (150 mosm/l) und dem spezifischen  $\alpha_{2A}$ R-Agonisten Guanfacin (250  $\mu$ M) stimuliert. Dabei kam das Perfusionssystem mittels Gravitation zum Einsatz. Die Ergebnisse der intramolekularen dynamischen FRET-Messungen sind in Abbildung 37 dargestellt.



**Abbildung 37: FRET-Messungen des  $\alpha_{2A}$ -YFP-CFP-Sensors**

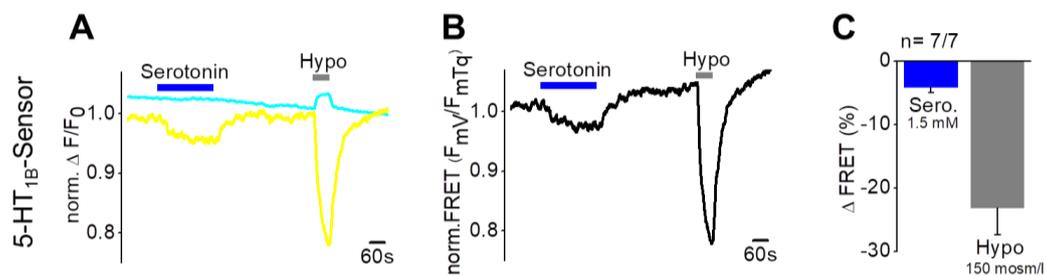
Der  $\alpha_{2A}$ -YFP-CFP-Sensor wird für die Messungen in HEK293-Zellen exprimiert. **A** Exemplarischer Zeitverlauf der normalisierten Einzelspuren des gelben (YFP) und blauen (CFP) Fluoreszenzsignals. Der graue Balken impliziert die Applikation von hypoosmolarer Lösung (150 mosm/l), der blaue Balken von Guanfacin (250  $\mu$ M). **B** Exemplarischer Zeitverlauf des normalisierten FRET-Signals (Ratio zwischen YFP und CFP). **C** Zusammenfassung der FRET-Signalabnahmen unter hypoosmolarer Lösung (grauer Balken, -14,0 %) und Guanfacin (blauer Balken, -8,5 %). Die Nummern oberhalb des Graphen bezeichnen die Anzahl gemessener Zellen (6) sowie die Anzahl unabhängiger Experimente (3).

Nach der Applikation von hypoosmolarer Lösung sowie Guanfacin kam es zu einer FRET-Signalabnahme. Dies bedeutete, dass der Rezeptor eine aktive Konformation einnahm, bei der sich die zwei Fluorophore voneinander entfernten. Die jeweilige FRET-Signalabnahme unterschied sich in ihrem Ausmaß (-14,0 % vs. -8,5 %). Da es bei beiden Stimuli zu FRET-Signaländerungen kam, bedeutet dies, dass der Rezeptor auf hypoosmolare Lösung mit einer Änderung seiner Konformation und damit mit einer Aktivierung reagiert. Um zu untersuchen, ob auch andere  $G_{i/o}$ -PCR ähnliche Reaktionen zeigen, nachdem sie in Rezeptorsensoren umklontiert wurden, wurden zwei weitere Rezeptoren festgelegt und analysiert.

### 3.4.2 5-HT<sub>1B</sub>-FRET-Sensor

Zur Untersuchung der mechanischen Aktivierbarkeit auf Rezeptorebene von  $G_{i/o}$ -PCR wurde der 5-HT<sub>1B</sub>R zu einem Rezeptorsensor kloniert. Seit der Generierung des  $\alpha_{2A}$ -YFP-CFP-Sensors 2003 war die Entwicklung weiter vorangeschritten. So führte der neueste Wissensstand einerseits zu vielfältig optimierten Fluorophoren aber auch zu einem Verzicht der direkten Insertion eines Fluorophors in der IL3. Anstatt dessen wurde nur noch ein kleines, 18-Basenlanges Tetracystein-Bindemotiv in der IL3 eingefügt. Nach diesem Vorbild wurde ein 5-HT<sub>1B</sub>-FRET-Sensor generiert (s. 2.1.9 und 2.1.10), in HEK293-Zellen exprimiert und nacheinander mit hypoosmolarer Lösung (150 mosm/l) und Serotonin (1,5 mM) stimuliert. Hierbei kam das ALA-Überdruckapplikationssystem zum Einsatz, wobei die Substanzen direkt neben der Zelle

eingbracht werden. Die Ergebnisse des 5-HT<sub>1B</sub>-FRET-Sensors in FRET-Messungen sind in Abbildung 38 dargestellt.



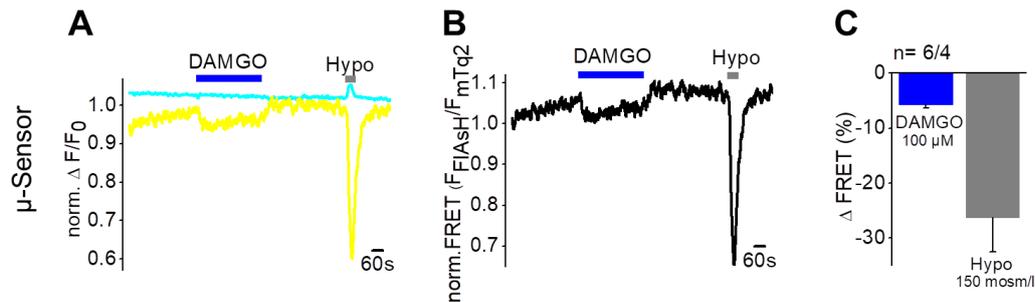
**Abbildung 38: FRET-Messungen des 5-HT<sub>1B</sub>-FRET-Sensors**

Der 5-HT<sub>1B</sub>-FRET-Sensor wird für die Messungen in HEK293-Zellen exprimiert. **A** Exemplarischer Zeitverlauf der normalisierten Einzelspuren des gelben (FAsH) und blauen (mTurquoise2) Fluoreszenzsignals. Der blaue Balken impliziert die Applikation von Serotonin (1,5 mM), der graue Balken von hypoosmolarer Lösung (150 mosm/l). **B** Exemplarischer Zeitverlauf des normalisierten FRET-Signals (Ratio zwischen FAsH und mTurquoise2). **C** Zusammenfassung der FRET-Signalabnahmen unter Serotonin (blauer Balken, -4,1 %) und hypoosmolarer Lösung (grauer Balken, -23,1 %). Die Nummern über dem Graphen bezeichnen die Anzahl der gemessenen Zellen (7) sowie die Anzahl der unabhängigen Experimente (7).

Da in vorangehenden Experimenten festgestellt worden war, dass der Agonist Serotonin nur eine kleine FRET-Signaländerung hervorruft, wurde bei Durchführung der oben dargestellten FRET-Messungen zuerst der Agonist und dann hypoosmolare Lösung appliziert. Unter Serotonin kam es zu einer statistisch signifikanten, jedoch geringen Signalabnahme von -4,1 %. Unter hypoosmolarer Lösung war eine deutlichere FRET-Signalabnahme von -23,1 % zu detektieren. Erkennbar ist, dass der 5-HT<sub>1B</sub>R vergleichbar mit den elektrophysiologischen Ergebnissen auch in diesem experimentellen Aufbau auf eine osmotisch bedingte Membrandehnung reagiert.

### 3.4.3 $\mu$ -FRET-Sensor

Als weiterer Kandidat zur Untersuchung der mechanischen Aktivierbarkeit auf Rezeptorebene von G<sub>i/o</sub>-PCR wurde der  $\mu$ R zu einem Rezeptorsensor umklontiert. Dabei kam die gleiche Klonierungsstrategie wie beim 5-HT<sub>1B</sub>R zum Einsatz (s. 2.1.9 und 2.1.10). Auch hier wurde das Tetracystein-Bindemotiv am Ende des IL3 eingefügt und das ALA-Überdruckapplikationssystem eingesetzt. Die Ergebnisse des  $\mu$ -FRET-Sensors in FRET-Messungen sind in Abbildung 39 dargestellt.



**Abbildung 39: FRET-Messungen des  $\mu$ -FRET-Sensors**

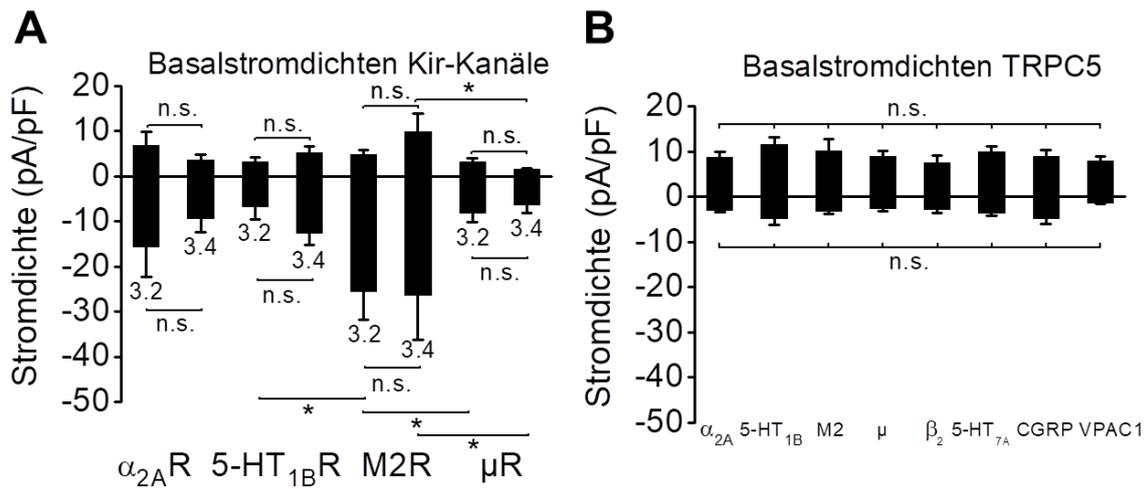
Der  $\mu$ -FRET-Sensor wird für die Messungen in HEK293-Zellen exprimiert. **A** Exemplarischer Zeitverlauf der normalisierten Einzelspuren des gelben (FAsH) und blauen (mTurquoise2) Fluoreszenzsignals. Der blaue Balken impliziert die Applikation von DAMGO (100  $\mu$ M), der graue Balken von hypoosmolarer Lösung (150 mosm/l). **B** Exemplarischer Zeitverlauf des normalisierten FRET-Signals (Ratio zwischen FAsH und mTurquoise2). **C** Zusammenfassung der FRET-Signalabnahmen unter DAMGO (blauer Balken, -5,7 %) und hypoosmolarer Lösung (grauer Balken, -26,3 %). Die Nummern über dem Graphen bezeichnen die Anzahl der gemessenen Zellen (6) sowie die Anzahl der unabhängigen Experimente (4).

Bei Experimenten mit dem  $\mu$ -FRET-Sensor kam es unter Agonist und hypoosmolarer Lösung zu FRET-Signalabnahmen. Auch hier fiel die Abnahme unter DAMGO mit -5,7 % geringer aus als unter hypoosmolarer Lösung mit -26,3 %. Es konnte bei einem weiteren  $G_{i/o}$ -PCR auf Rezeptorebene gezeigt werden, dass dieser durch osmotische bedingte Zellschwellung mechanisch aktivierbar ist. Zusammenfassend kann gesagt werden, dass der  $\alpha_{2A}$ R, der 5-HT<sub>1B</sub>R und der  $\mu$ R direkt auf einen mechanischen Stimulus reagieren können.

### 3.5 Vergleich der Messsysteme

Gemeinsam war beiden elektrophysiologischen Messsystemen und dem FRET-Rezeptorsensor-basierten Messsystem, dass sie eine mechanisch induzierte Aktivierung der untersuchten GPCR darstellten konnten. Um die mechanische Aktivierbarkeit der einzelnen Rezeptoren optimal vergleichen zu können, wurden zunächst die verschiedenen Messsysteme miteinander verglichen.

Bei genauer Betrachtung der Basalströme im Kir-Kanal-basierten Messsystem wurde festgestellt, dass sich diese teilweise signifikant zwischen den einzelnen untersuchten Rezeptoren unterschieden. Im TRPC5-basierten Messsystem konnten keine statistisch signifikanten Unterschiede bezüglich der Basalströme zwischen den einzelnen Rezeptoren beobachtet werden (s. Abbildung 40).

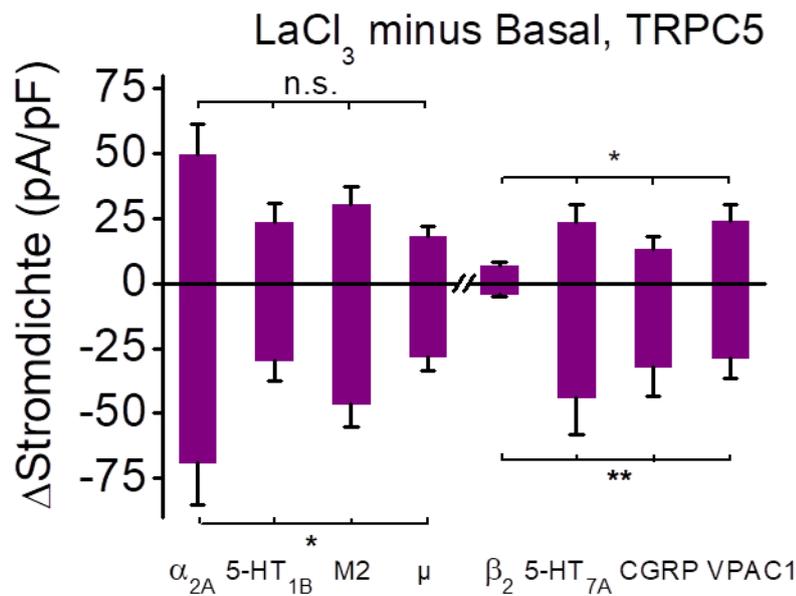


**Abbildung 40: Vergleich der Basalströme im Kir-Kanal- und TRPC5-basierten Messsystem**

**A, B** Balkendiagramme der Stromdichten für die beobachteten Basalströme bei GPCR- und Ionenkanal-exprimierenden CHO-K1-Zellen (A) bzw. HEK293-Zellen (B). **A** Basalstromdichten von  $\alpha_{2A}R$ ,  $5-HT_{1B}R$ ,  $M2R$  und  $\mu R$  koexprimiert mit jeweils Kir3.1/3.2 (im Diagramm kurz als 3.2) oder Kir3.1/3.4 (im Diagramm kurz als 3.4). Die Sterne (\*) markieren das Signifikanzniveau im Vergleich aller Rezeptoren untereinander, ausgewertet mit einer einfachen Varianzanalyse (ANOVA). Die jeweiligen Kir-Kanal-Konstrukte zeigten untereinander keinen statistisch signifikanten Unterschied, ausgewertet mit einem Zweistichproben-t-Test. **B** Basalstromdichten von  $\alpha_{2A}R$ ,  $5-HT_{1B}R$ ,  $M2R$ ,  $\mu R$ ,  $\beta_2AR$ ,  $5-HT_{7A}R$ ,  $CGRPR$  und  $VPAC1R$  koexprimiert mit dem TRPC5. Es bestand kein statistisch signifikanter Unterschied zwischen den einzelnen Rezeptoren.

Die Unterschiede in den Basalströmen weisen auf verschieden ausgeprägte konstitutive Aktivitäten der Rezeptoren hin. So zeigt der  $M2R$  im Kir-basierten Messsystem eine große konstitutive Aktivität, im TRPC5-basierten Messsystem ist diese jedoch nicht zu beobachten. Deutlich sind auch die Unterschiede im Kir-basierten Messsystem zwischen dem  $M2R$  und dem  $\mu R$  bzw. dem  $5-HT_{1B}R$  in ihren Basalaktivitäten. Interessanterweise treten die Unterschiede nur zwischen den verschiedenen Rezeptoren auf, nicht aber zwischen den beiden Kir-Kanal-Konstrukten. Dies ist ein weiteres Indiz dafür, dass die beiden Konstrukte in der Lage sind, vergleichbare Ergebnisse zu produzieren.

Um zu untersuchen, inwiefern im TRPC5-basierten Messsystem die TRPC5-Expression bei der Koexpression mit den diversen GPCR ausgeprägt war, wurden die jeweiligen maximalen Stromdichten unter  $LaCl_3$ -Applikation verglichen. Dazu wurden vor dem Vergleich jeweils die Basalstromdichten von den  $LaCl_3$ -Stromdichten abgezogen. Da der genaue Signalweg zwischen  $G_{i/o}$ -PCR und TRPC5 und die Existenz einer Signalübermittlung zwischen  $G_s$ -PCR und TRPC5 noch nicht vollständig aufgeklärt ist, wurden nur die  $LaCl_3$ -Effekte der einzelnen GPCR-Subfamilie statistisch verglichen.

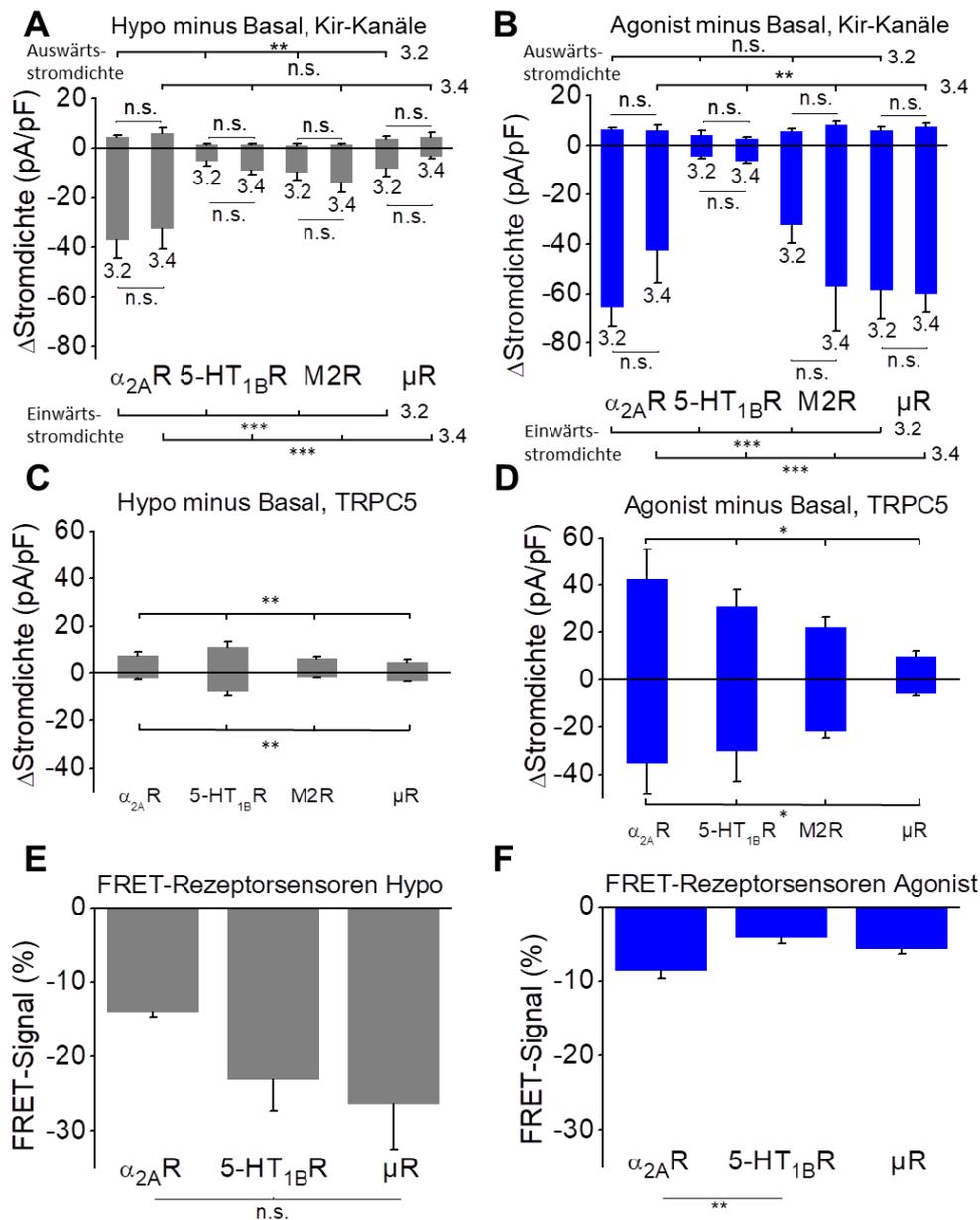


**Abbildung 41: TRPC5-Expressionsanalyse anhand von LaCl<sub>3</sub>-Effekten**

Balkendiagramme der maximalen  $\Delta$ Stromdichten unter LaCl<sub>3</sub>-Applikation (= maximale LaCl<sub>3</sub>-Stromdichten minus Basalstromdichten) von G<sub>i/o</sub>-PCR ( $\alpha_{2A}$ R, 5-HT<sub>1B</sub>R, M2R,  $\mu$ R, links der x-Achsenunterbrechung) bzw. G<sub>s</sub>-PCR ( $\beta_2$ AR, 5-HT<sub>7A</sub>R, CGRPR, VPAC1R, rechts der x-Achsenunterbrechung) und TRPC5 exprimierenden HEK293-Zellen. Die jeweiligen GPCR-Subfamilien wurden anhand ihrer Stromdichten in Einwärts- und Auswärtsrichtung mit einer Varianzanalyse für nicht parametrische Daten (Kruskal-Wallis-Test) ausgewertet, da die Werte nicht normalverteilt waren.

Innerhalb der G<sub>i/o</sub>-PCR konnte zwischen den maximalen  $\Delta$ Stromdichten unter LaCl<sub>3</sub>-Applikation nur in Einwärtsrichtung ein signifikanter Unterschied festgestellt werden, innerhalb der G<sub>s</sub>-PCR in Ein- und Auswärtsrichtung. Auffällig war, dass bei der Koexpression des  $\beta_2$ AR mit dem TRPC5 neben den nicht vorhandenen Effekten unter Agonistenapplikation und unter Applikation von hypoosmolarer Lösung (s. 3.2.2.1) auch der kleinste Effekt unter LaCl<sub>3</sub>-Applikation auftrat. Insgesamt traten bei der Koexpression von TRPC5 und G<sub>i/o</sub>-PCR größere Effekte unter LaCl<sub>3</sub>-Applikation auf als bei der Koexpression von TRPC5 und G<sub>s</sub>-PCR.

Um die verschiedenen Messsysteme optimal vergleichen zu können, wurden die in allen drei Systemen gemessenen Effekte unter Agonistenapplikation und unter Applikation von hypoosmolarer Lösung untersucht. Dazu wurden die jeweils um den Basalstrom subtrahierten Maximalströme der Effekte aus den elektrophysiologischen Messsystemen und die Signalabnahmen in Prozent aus den FRET-Technik-Messungen verglichen (s. Abbildung 42).



**Abbildung 42: Vergleich der drei Messsysteme anhand der gemessenen Agonisten-Effekte und Effekten unter hypoosmolarer Lösung**

**A - F** Balkendiagramme der  $\Delta$ Stromdichten in pA/pF (A - D) bzw. der FRET-Signale in Prozent (E - F) für die Effekte unter Agonistenapplikation und unter Applikation von hypoosmolarer Lösung bei den  $G_{i/o}$ -PCR  $\alpha_{2A}R$ ,  $5-HT_{1B}R$ , (M2R) und  $\mu R$  in drei verschiedenen Messsystemen. Die Skalierung der Ordinate ist zur besseren Vergleichbarkeit für die jeweiligen Messsysteme im gleichen Wertebereich aufgezeigt. Zwischen den Daten wurde für die verschiedenen  $G_{i/o}$ -PCR eine Varianzanalyse (Kruskal-Wallis-Test, da Daten nicht normalverteilt) durchgeführt. In den Diagrammen A und B wurde neben der Varianzanalyse (lange Signifikanzbalken „Einwärtsstromdichte“ und „Auswärtsstromdichte“ oben und unten) zusätzlich ein Zweistichproben-t-Test zum Vergleich der beiden Kir-Kanal-Konstrukte durchgeführt (kurze Signifikanzbalken). **A** Um die Basalwerte subtrahierten Effekt unter hypoosmolarer Lösung (hypoosmolare Lösung mit 250 mosm/l) im Kir-Kanal-basierten Messsystem in CHO-K1-Zellen für die beiden Konstrukte Kir3.1/3.2 (im Diagramm kurz als 3.2) oder Kir3.1/3.4 (im Diagramm kurz als 3.4). **B** Um die Basalwerte subtrahierten Agonisten-Effekte im Kir-Kanal-basierten Messsystem in CHO-K1-Zellen für die beiden Konstrukte Kir3.1/3.2 (im Diagramm kurz als 3.2) oder Kir3.1/3.4 (im Diagramm kurz als 3.4). **C** Um die Basalwerte subtrahierten Effekte unter hypoosmolarer Lösung (hypoosmolare Lösung mit 250 mosm/l) im TRPC5-basierten Messsystem in HEK293-Zellen. **D** Um die Basalwerte subtrahierten Agonisten-Effekte (hypoosmolare Lösung mit 250 mosm/l) im TRPC5-basierten Messsystem in HEK293-Zellen. **E** Effekte unter hypoosmolarer Lösung im FRET-Rezeptorsensor-basierten Messsystem (hypoosmolare Lösung mit 150 mosm/l) in HEK293-Zellen. **F** Agonisten-Effekte im FRET-Rezeptorsensor-basierten Messsystem in HEK293-Zellen. Im Gegensatz zu den elektrophysiologischen Messsystemen (A - D) wurde als Agonist für den  $\alpha_{2A}R$  nicht Noradrenalin 1  $\mu M$  sondern Guanfacin 250  $\mu M$  verwendet.

Die Auswertung zeigt, dass innerhalb der einzelnen Messsysteme der jeweils größte Effekt unterschiedlich ausfällt. In den Ionenkanal-basierten Messsystemen war jeweils der Agonisten-Effekt größer als der Effekt unter hypoosmolarer Lösung (mit Ausnahme des 5-HT<sub>1B</sub>R im Kir-Kanal-basierten Messsystem). Im FRET-Sensor-basierten Messsystem war jedoch der Effekt unter hypoosmolarer Lösung ausgeprägter als der Agonisten-Effekt. Des Weiteren zeigten die Rezeptoren in den unterschiedlichen Messsystemen jeweils verschieden große Effekte, die sich zusätzlich zwischen den jeweiligen Stimuli unterscheiden. So zeigte der  $\alpha_{2A}$ R unter hypoosmolarer Lösung im Kir-Kanal-basierten Messsystem die größte  $\Delta$ Stromdichte im Vergleich zu den anderen Rezeptoren, im Kir-Kanal-basierten Messsystem sowie im FRET-Sensor-basierten Messsystem jedoch die geringsten Effekte. Bezogen auf den Agonisten waren in allen drei Messsystemen die größten Effekte mit dem  $\alpha_{2A}$ R (mit Ausnahme des Kir3.1/3.4-basierten Messsystems in Einwärtsrichtung) im Vergleich zu den anderen Rezeptoren zu verzeichnen. Zu bemerken war außerdem, dass im Kir-Kanal-basierten Messsystem die  $\Delta$ Stromdichten für den Effekt unter hypoosmolarer Lösung bzw. Agonisten-Effekt in Auswärtsrichtung zwischen den einzelnen Rezeptoren nicht immer statistisch signifikant unterschiedlich waren.

### *3.6 Vergleich der untersuchten GPCR hinsichtlich ihrer Mechanosensitivität in den verschiedenen Messsystemen*

Die Unterschiede der Basalströme bei Messung der einzelnen Rezeptoren in den Kir-Kanal-basierten Messsystemen stellten einen Grund dar, vor Vergleich der Rezeptoren untereinander die Differenz von den ermittelten maximalen Stromdichten der Effekte und den Basalstromdichten zu erstellen. Um eine einheitliche Auswertung zu garantieren, wurden, wie bereits erwähnt, auch im TRPC5-basierten Messsystem jeweils die Basalstromdichten von den maximalen Stromdichten der Effekte subtrahiert.

Die verschiedenen Rezeptoren zeigten eine unterschiedliche Tendenz zur Mechanosensitivität, die auch je nach verwendetem Messsystem unterschiedlich ausfiel. Um zu untersuchen, in welchem Ausmaß die analysierten GPCR auf die mechanische Stimulation reagierten, wurden in der vorliegenden Arbeit die Effekte unter hypoosmolarer Lösung der einzelnen Rezeptoren in den drei verschiedenen Messsystemen verglichen. Zusätzlich wurde ein Vergleich unter den einzelnen Rezeptoren im TRPC5-basierten Messsystem angestellt, welchen prozentualen Anteil des maximalen TRPC5-Stroms, initiiert durch LaCl<sub>3</sub>, eine

Agonistenapplikation oder die Applikation von hypoosmolarer Lösung hervorruft.

Bei Vergleich der einzelnen Rezeptoren können bestimmte Faktoren wie die jeweiligen Laborbedingungen, die Zellgüte, das Expressionsniveau der untersuchten Proteine absolut und im Verhältnis zueinander oder der Experimentator selbst eine beeinflussende Rolle spielen. Ein einfaches Mittel zur Eliminierung dieser Faktoren stellt die Normierung der erhaltenen Werte auf Effekte desselben Experiments dar. Daher wurden für die folgenden Auswertungen der elektrophysiologischen Messsysteme die jeweiligen maximalen  $\Delta$ Stromdichten ( $\Delta$ Stromdichte = maximale Stromdichte jedes Effektes – Basalstromdichte) unter hypoosmolarer Lösung auf die maximalen  $\Delta$ Stromdichten unter Agonistenapplikation normiert. Diese Kalkulation erlaubt weiterhin eine Aussage darüber, in welchem Maß eine mechanische Stimulation des Rezeptors einer Stimulation durch einen Agonisten entspricht. Die verwendete Formel lautet:

$$x = \frac{\Delta\text{Hypo} * 100\%}{\Delta\text{Agonist}}$$

*$\Delta$ Hypo = maximale Stromdichte unter hypoosmolarer Lösung – Basalstromdichte*

*$\Delta$ Agonist = maximale Stromdichte unter Agonistenapplikation – Basalstromdichte*

*x = Mechanisch induzierte Stromdichtenveränderung bezogen auf max. Agonistenstimulation (%)*

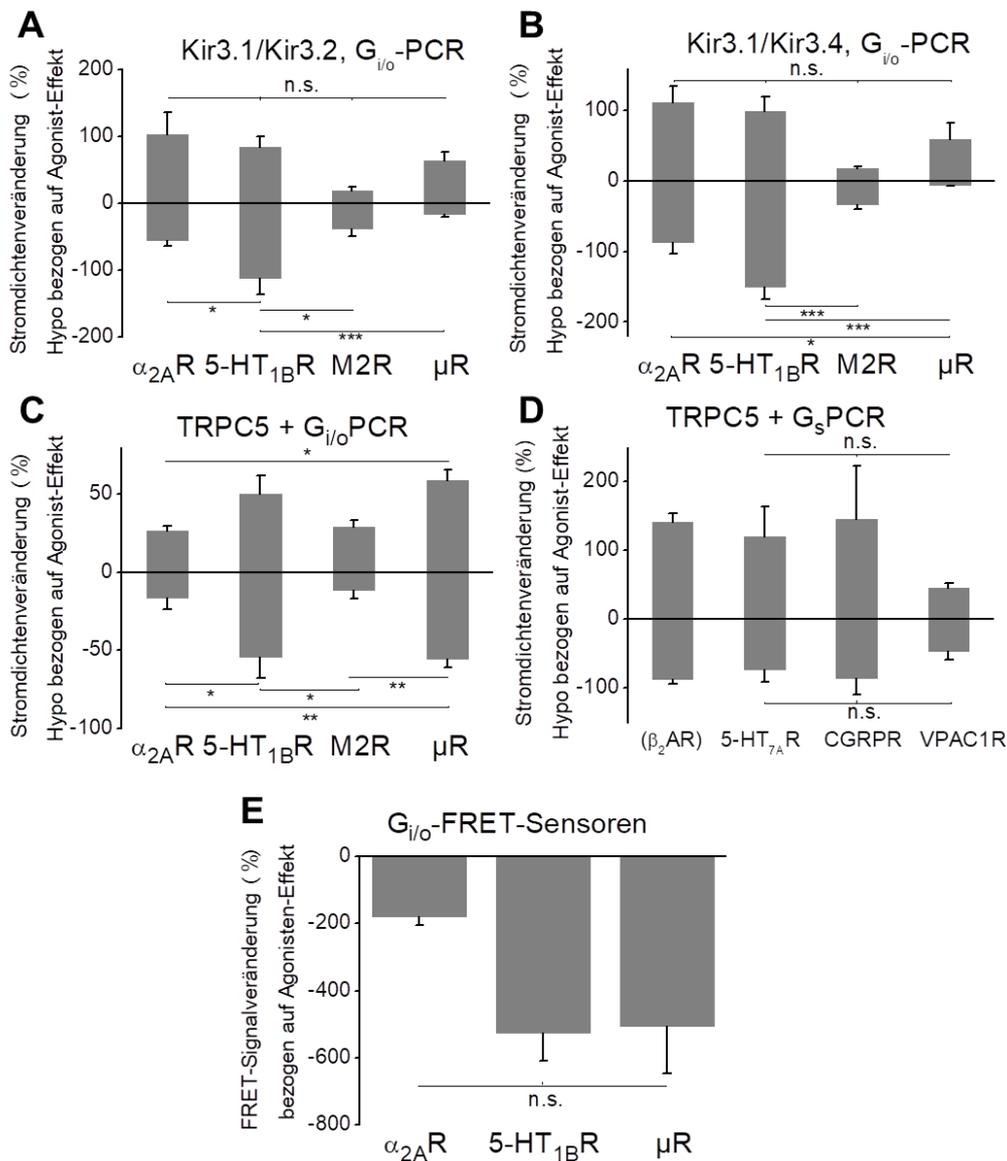
Ein Vergleich der Rezeptoren in Bezug auf deren Fähigkeit zur Mechanosensitivität wurde im FRET-Rezeptorsensor-basierten Messsystem analog zu den elektrophysiologischen Untersuchungen durch eine Normierung der prozentualen FRET-Signalabnahmen unter hypoosmolarer Lösung auf die jeweiligen prozentualen FRET-Signalabnahmen unter Agonistenstimulation durchgeführt. Die verwendete Formel lautet:

$$x = \frac{\text{Hypo} * 100\%}{\text{Agonist}}$$

*Hypo = prozentuale FRET-Signalabnahme unter hypoosmolarer Lösung*

*Agonist = prozentuale FRET-Signalabnahme unter Agonistenstimulation*

*x = Mechanisch induzierte FRET-Signalabnahme bezogen auf FRET-Signalabnahme unter Agonistenstimulation (%)*



**Abbildung 43: Mechanisch induzierte Stromdichten- bzw. FRET-Signalveränderungen bezogen auf die maximale Agonistenstimulation**

**A - E** Balkendiagramme der Stromdichtenveränderungen (**A - D**) bzw. der FRET-Signalveränderung (**E**) in Prozent für den mechanisch induzierten Effekt normiert auf den Agonisten-Effekt in drei verschiedenen Messsystemen. Zwischen den Daten wurde für die verschiedenen GPCR eine Varianzanalyse (ANOVA, da Daten normalverteilt) jeweils in Einwärtsrichtung und in Auswärtsrichtung (**A - D**) bzw. für die FRET-Signalveränderung durchgeführt (**E**). **A** Stromdichtenveränderungen der  $G_{i/o}$ -PCR  $\alpha_{2A}$ R, 5-HT<sub>1B</sub>R, M2R und  $\mu$ R gemessen im Kir3.1/3.2-basierten Messsystem in CHO-K1-Zellen. **B** Stromdichtenveränderungen der  $G_{i/o}$ -PCR  $\alpha_{2A}$ R, 5-HT<sub>1B</sub>R, M2R und  $\mu$ R gemessen im Kir3.1/3.4-basierten Messsystem in CHO-K1-Zellen. **C** Stromdichtenveränderungen der  $G_{i/o}$ -PCR  $\alpha_{2A}$ R, 5-HT<sub>1B</sub>R, M2R und  $\mu$ R gemessen im TRPC5-basierten Messsystem in HEK293-Zellen. **D** Stromdichtenveränderungen der  $G_s$ -PCR  $\beta_2$ AR, 5-HT<sub>7A</sub>R, CGRPR und VPAC1R gemessen im TRPC5-basierten Messsystem in HEK293-Zellen. Da der  $\beta_2$ AR weder unter Agonisten-Applikation noch unter der Applikation hypoosmolarer Lösung vom Basalwert statistisch signifikante Stromdichtenzunahmen zeigte, wurde er nicht in den Vergleich der Rezeptoren untereinander einbezogen. **E** FRET-Signalveränderungen im FRET-Rezeptorsensor-basierten Messsystem in HEK293-Zellen. Im Gegensatz zu den elektrophysiologischen Messsystemen (**A - D**) wurde eine hypoosmolare Lösung mit 150 mosm/l anstatt 250 mosm/l und als Agonist für den  $\alpha_{2A}$ R nicht Noradrenalin 1  $\mu$ M sondern Guanfacin 250  $\mu$ M verwendet.

Bei Betrachtung der maximalen Stromdichten als auch der um den Basalwert subtrahierten maximalen  $\Delta$ Stromdichten unter hypoosmolarer Lösung (s. Abbildung 15) war festgestellt worden, dass bei beiden Kir-Kanal-basierten Messsystemen der  $\alpha_{2A}$ R die größte Reaktion

zeigte, gefolgt vom 5-HT<sub>1B</sub>R und M2R. Die kleinsten maximalen Stromdichten zeigte der  $\mu$ R. Die maximalen Stromdichten bei Untersuchung des  $\alpha_{2A}$ R konnten sogar noch durch die Anwendung einer alternativen Applikationsmethode des mechanischen Reizes (s. 3.2.7) gesteigert werden (positiver Druck von ca. 25 cmH<sub>2</sub>O). Normiert auf den maximalen Agonisten-Effekt stellt sich bei der Klassifizierung der Rezeptoren bezüglich der Mechanosensitivität eine andere Reihenfolge auf (s. Abbildung 43 A und B). Hier zeigte bei beiden Kir-Kanal-basierten Messsystemen der 5-HT<sub>1B</sub>R die größte Stromdichtenveränderung, gefolgt vom  $\alpha_{2A}$ R. Die kleinsten Stromdichtenveränderungen zeigten der M2R und der  $\mu$ R. Diese Unterschiede erwiesen sich in beiden Kir-Kanal-Messsystemen als größtenteils statistisch signifikant (Kir3.1/3.2: 5-HT<sub>1B</sub>R im Vergleich zu  $\alpha_{2A}$ R, 5-HT<sub>1B</sub>R im Vergleich zu M2R, 5-HT<sub>1B</sub>R im Vergleich zu  $\mu$ R; Kir3.1/3.4:  $\alpha_{2A}$ R im Vergleich zu  $\mu$ R, 5-HT<sub>1B</sub>R im Vergleich zu M2R, 5-HT<sub>1B</sub>R im Vergleich zu  $\mu$ R). Für die Klassifizierung der Rezeptoren im Kir-Kanal-basierten Messsystem wurden aufgrund der unter 3.5 angebrachten Schlussfolgerungen nur die maximalen Stromdichten(veränderungen) in Einwärtsrichtung berücksichtigt.

Betrachtet man die maximalen Stromdichten als auch die um den Basalwert subtrahierten maximalen  $\Delta$ Stromdichten unter hypoosmolarer Lösung von G<sub>i/o</sub>-PCR im TRPC5-basierten Messsystem (s. 3.2.2.2), kann man folgende Klassifizierung bezüglich der Mechanosensitivität aufstellen: 5-HT<sub>1B</sub>R >  $\alpha_{2A}$ R > M2R >  $\mu$ R. Normiert auf den maximalen Agonisten-Effekt stellt sich bei den G<sub>i/o</sub>-PCR bezüglich der Mechanosensitivität wie im Kir-Kanal-basierten Messsystem eine andere Reihenfolge auf (s. Abbildung 43 C). Hier zeigte ebenfalls der 5-HT<sub>1B</sub>R die größte Stromdichtenveränderung, der  $\mu$ R die Zweitgrößte, gefolgt vom  $\alpha_{2A}$ R und M2R. Diese Unterschiede erwiesen sich als statistisch signifikant in Einwärtsrichtung (5-HT<sub>1B</sub>R im Vergleich zu  $\alpha_{2A}$ R, 5-HT<sub>1B</sub>R im Vergleich zu M2R, M2R im Vergleich zu  $\mu$ R;  $\alpha_{2A}$ R im Vergleich zu  $\mu$ R) aber nur teilweise in Auswärtsrichtung ( $\alpha_{2A}$ R im Vergleich zu  $\mu$ R).

Bei den G<sub>s</sub>-PCR zeigte im TRPC5-basierten Messsystem (s. 3.2.2.1) der CGRPR die größte Zunahme bei den maximalen Stromdichten als auch bei den um den Basalwert subtrahierten maximalen  $\Delta$ Stromdichten unter hypoosmolarer Lösung. An zweiter und dritter Stelle folgten der 5-HT<sub>7A</sub>R und der VPAC1R. Bei der Klassifizierung der G<sub>s</sub>-PCR wurde der  $\beta_2$ AR nicht berücksichtigt, da er als nicht mechanosensitiv eingestuft wurde. Normiert auf den maximalen Agonisten-Effekt stellt sich bei den vorrangig G<sub>s</sub>-Protein koppelnden Rezeptoren bezüglich der Mechanosensitivität folgende Reihenfolge auf (s. Abbildung 43 D): CGRPR > 5-

HT<sub>7A</sub>R > VPAC1R. Bei Vergleich der Rezeptoren durch eine Varianzanalyse waren jedoch keine dieser Klassifizierungen statistisch signifikant.

Im FRET-Sensor-basierten Messsystem zeigte bei Betrachtung der FRET-Signale unter hypoosmolarer Lösung der  $\mu$ R die größte Abnahme, gefolgt vom 5-HT<sub>1B</sub>R und  $\alpha_{2A}$ R. Analysiert man jedoch die mechanisch induzierte FRET-Signalabnahme bezogen auf die FRET-Signalabnahme unter Agonistenstimulation, zeigt der 5-HT<sub>1B</sub>R die größte FRET-Signalveränderung, gefolgt vom  $\mu$ R und mit Abstand vom  $\alpha_{2A}$ R (s. Abbildung 43 E). Bei Vergleich der Rezeptoren durch eine Varianzanalyse waren jedoch auch hier keine dieser Klassifizierungen statistisch signifikant.

Im TRPC5-basierten Messsystem wurden die maximalen  $\Delta$ Stromdichten unter hypoosmolarer Lösung und unter Agonistenapplikation zusätzlich auf die maximalen  $\Delta$ Stromdichten unter LaCl<sub>3</sub>-Applikation normiert. Dies soll Aufschluss darüber geben, in welchem Ausmaß eine Rezeptor-induzierte TRPC5-Aktivierung einer direkten maximalen TRPC5-Aktivierung entspricht. Die verwendete Formel lautet:

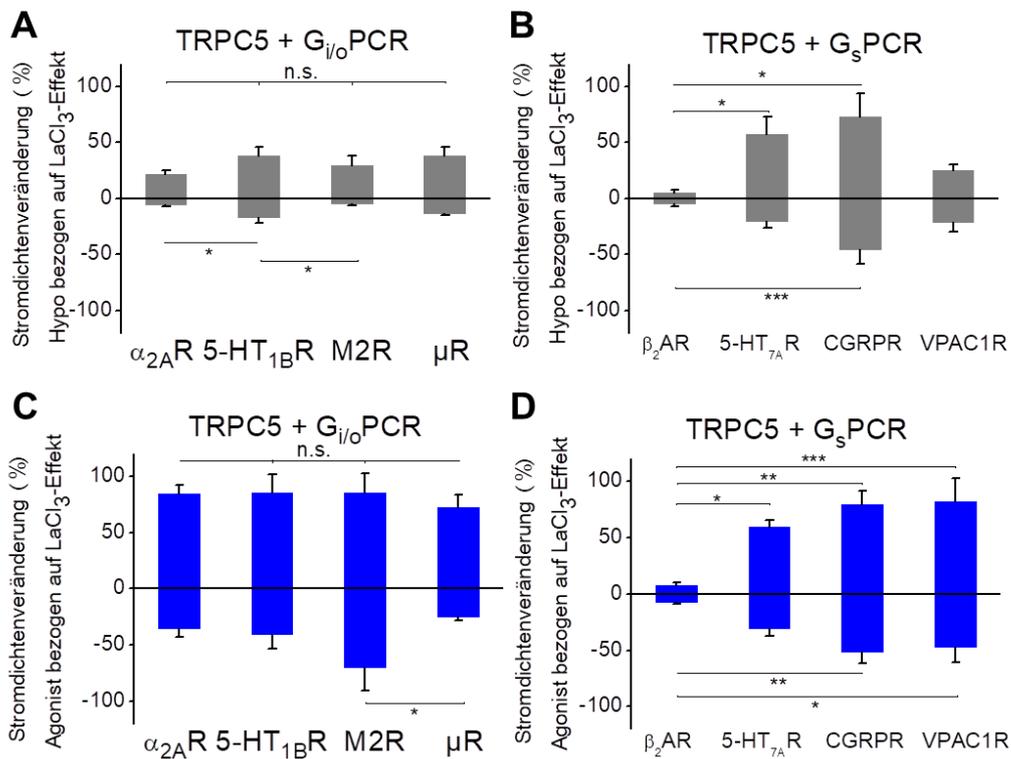
$$x = \frac{\Delta\text{Hypo bzw. } \Delta\text{Agonist} * 100\%}{\Delta\text{LaCl}_3}$$

$\Delta\text{Hypo}$  = maximale Stromdichte unter hypoosmolarer Lösung – Basalstromdichte

$\Delta\text{Agonist}$  = maximale Stromdichte unter Agonisten-Applikation - Basalstromdichte

$\Delta\text{LaCl}_3$  = maximale Stromdichte unter LaCl<sub>3</sub>-Applikation – Basalstromdichte

$x$  = Mechanisch induzierte bzw. Agonisten-induzierte Stromdichtenveränderung bezogen auf max. LaCl<sub>3</sub>-Stimulation (%)



**Abbildung 44: Mechanisch induzierte bzw. Agonisten-induzierte Stromdichtenveränderungen bezogen auf die maximale LaCl<sub>3</sub>-Stimulation**

**A - D** Balkendiagramme der Stromdichtenveränderungen in Prozent für den mechanisch induzierten Effekt (A, B) bzw. den Agonisten-induzierten Effekt (C, D) normiert auf die maximale LaCl<sub>3</sub>-Stimulation für acht GPCR im TRPC5-basierten Messsystem. Zwischen den Daten wurde für die verschiedenen GPCR eine Varianzanalyse (ANOVA, da Daten normalverteilt) jeweils in Einwärtsrichtung und in Auswärtsrichtung durchgeführt. **A** Stromdichtenveränderungen der G<sub>i/o</sub>-PCR α<sub>2A</sub>R, 5-HT<sub>1B</sub>R, M2R und μR für den mechanisch induzierten Effekt normiert auf die maximale LaCl<sub>3</sub>-Stimulation gemessen im TRPC5-basierten Messsystem in HEK293-Zellen. **B** Stromdichtenveränderungen der G<sub>s</sub>-PCR β<sub>2</sub>AR, 5-HT<sub>7A</sub>R, CGRPR und VPAC1R für den mechanisch induzierten Effekt normiert auf die maximale LaCl<sub>3</sub>-Stimulation gemessen im TRPC5-basierten Messsystem in HEK293-Zellen. Der β<sub>2</sub>AR hatte unter hypoosmolarer Lösung keine statistisch signifikante Stromzunahme im Vergleich zum Basalstrom gezeigt. Der Bezug auf die maximale LaCl<sub>3</sub>-Stimulation dient jedoch dem Vergleich zu den anderen G<sub>s</sub>-PCR. Daher wurde er im Gegensatz zu Abbildung 43 D in den Vergleich der Rezeptoren untereinander einbezogen. **C** Stromdichtenveränderungen der G<sub>i/o</sub>-PCR α<sub>2A</sub>R, 5-HT<sub>1B</sub>R, M2R und μR für den Agonisten-induzierten Effekt normiert auf die maximale LaCl<sub>3</sub>-Stimulation gemessen im TRPC5-basierten Messsystem in HEK293-Zellen. **D** Stromdichtenveränderungen der G<sub>s</sub>-PCR β<sub>2</sub>AR, 5-HT<sub>7A</sub>R, CGRPR und VPAC1R für den Agonisten-induzierten Effekt normiert auf die maximale LaCl<sub>3</sub>-Stimulation gemessen im TRPC5-basierten Messsystem in HEK293-Zellen. Der β<sub>2</sub>AR hatte unter Agonisten-Applikation keine statistisch signifikante Stromzunahme im Vergleich zum Basalstrom gezeigt. Der Bezug auf die maximale LaCl<sub>3</sub>-Stimulation dient jedoch dem Vergleich zu den anderen G<sub>s</sub>-PCR. Daher wurde er in den Vergleich der Rezeptoren untereinander einbezogen.

Bei Vergleich der beiden Stimuli „hypoosmolare Lösung“ und „Agonist“ auf die maximale TRPC5-Aktivierung durch LaCl<sub>3</sub> wurden für alle acht untersuchten GPCR größere Stromdichtenveränderungen für den Agonisten-Effekt als für den Effekt unter hypoosmolarer Lösung festgestellt. Dies bedeutet, dass die mechanische Stimulation der GPCR zu einer geringeren Aktivierung führt als eine Stimulation durch einen Agonisten. Diese Beobachtung fiel bei den G<sub>i/o</sub>-PCR deutlicher aus als bei den G<sub>s</sub>-PCR.

Die Normierung des Effekts unter hypoosmolarer Lösung auf den maximalen LaCl<sub>3</sub>-Effekt erbrachte folgende Klassifizierung der G<sub>i/o</sub>-PCR sortiert nach der Größe der

Stromdichtenveränderung:  $5\text{-HT}_{1\text{B}}\text{R} > \mu\text{R} > \alpha_{2\text{A}}\text{R}, \text{M2R}$ . Hier wurden nur die Einwärtsströme betrachtet, da die Auswärtsströme keinen statistisch signifikanten Unterschied aufzeigten. Bei Normierung der Agonisten-Effekte ergab sich folgende Einteilung:  $\text{M2R} > 5\text{-HT}_{1\text{B}}\text{R}, \alpha_{2\text{A}}\text{R} > \mu\text{R}$ . Hier wurden ebenfalls nur die Einwärtsströme betrachtet, da die Auswärtsströme wiederum keinen statistisch signifikanten Unterschied aufzeigten.

Die Normierung des Effekts unter hypoosmolarer Lösung auf den maximalen  $\text{LaCl}_3$ -Effekt erbrachte folgende Klassifizierung der vorrangig  $\text{G}_s$ -Protein koppelnden Rezeptoren sortiert nach der Größe der Stromdichtenveränderung:  $\text{CGRPR} > 5\text{-HT}_{7\text{A}}\text{R}, \text{VPAC1R} \gg \beta_2\text{AR}$ . Dabei war nur der Vergleich der drei  $\text{G}_s$ -PCR  $\text{CGRPR}$ ,  $5\text{-HT}_{7\text{A}}\text{R}$  und  $\text{VPAC1R}$  zum  $\beta_2\text{AR}$  teilweise statistisch signifikant, was nicht überraschend war, da dieser nicht mechanisch induziert aktivierbar ist. Bei Normierung der Agonisten-Effekte ergab sich folgende Einteilung:  $\text{CGRPR} > \text{VPAC1R} > 5\text{-HT}_{7\text{A}}\text{R} \gg \beta_2\text{AR}$ . Auch hier war nur der  $\beta_2\text{AR}$  statistisch signifikant unterschiedlich zu den anderen  $\text{G}_s$ -PCR. Bei Betrachtung der drei vorrangig  $\text{G}_s$ -Protein koppelnden Rezeptoren wurde ersichtlich, dass der  $\text{CGRPR}$  und der  $5\text{-HT}_{7\text{A}}\text{R}$  im TRPC5-basierten Messsystem stärker durch einen mechanischen Stimulus aktiviert werden können als der  $\text{VPAC1R}$ .

## 4 Diskussion

In der vorliegenden Arbeit wurde eine Charakterisierung diverser  $G_{i/o}$ - sowie  $G_s$ -PCR bezüglich ihrer mechanisch induzierten Aktivierbarkeit mittels zweier auf unterschiedlichen Ionenkanälen basierenden Messsystemen durchgeführt. Die erbrachten Erkenntnisse konnten in Bezug auf drei  $G_{i/o}$ -PCR durch Rezeptorsensoren in einem FRET-Technik-basierten Messsystem bestätigt werden. Ein ausführlicher Vergleich der verschiedenen Messsysteme ermöglichte dabei die methodische Charakterisierung hinsichtlich der Eignung der Messsysteme zur Untersuchung der mechanische Aktivierbarkeit von GPCR. Darüber hinaus war im Zuge dieser Arbeit die Etablierung einer optischen Methode zur detaillierten Charakterisierung von  $G_{i/o}$ -PCR-vermittelten cAMP-Spiegeländerungen erreicht worden.

### 4.1 Charakterisierung verschiedener $G_{i/o}$ -PCR sowie $G_s$ -PCR hinsichtlich ihrer Mechanosensitivität in der Elektrophysiologie

GPCR gehören inzwischen zu den etablierten Strukturen, die mechanische Reize auf der Zelloberfläche wahrnehmen und in die Zelle weiterleiten können (Mederos y Schnitzler *et al.*, 2016; Storch *et al.*, 2012).  $G_{q/11}$ -PCR wurden zuerst als Mechanosensoren definiert (Blodow *et al.*, 2014; Chachisvilis *et al.*, 2006; Mederos y Schnitzler *et al.*, 2011; Storch *et al.*, 2015), aber auch Vertreter aus anderen GPCR-Subklassen wurden als solche in Betracht gezogen (Abdul-Majeed und Nauli, 2011; Hughes-Fulford, 2004; Makino *et al.*, 2006; Silver und Siperko, 2003; Storch *et al.*, 2012). Es wird vermutet, dass die Fähigkeit zur mechanischen Aktivierbarkeit bei GPCR nicht die spezielle Eigenschaft einer oder mehrerer Subfamilien ist, sondern bestimmte strukturelle Rezeptoreigenschaften, wie Rezeptorkonformationen, relative Bewegungen der transmembranären Domänen oder Interaktionen mit der Membran Mechanosensitivität ermöglichen (Storch *et al.*, 2012).

#### 4.1.1 Mechanosensitivität von Kir-Kanälen und TRPC5

In der vorliegenden Arbeit wurde die mechanische Aktivierbarkeit von  $G_{i/o}$ - und  $G_s$ -Protein gekoppelten Rezeptoren mittels elektrophysiologischen Ganzzelleitungen in heterologen Zellsystemen analysiert. Die mechanische Stimulation erfolgte hierbei stets durch Perfusion der Zellen mit hypertoner Lösung. Das Einwaschen von hypotoner Lösung ist ein vielgenutzter mechanischer Stimulus, da er einfach zu applizieren ist und bereits in vielen

Messsystemen erfolgreich als mechanischer Reiz eingesetzt wurde (Blodow *et al.*, 2014; Mederos y Schnitzler *et al.*, 2008; Niisato *et al.*, 1999; Oliet und Bourque, 1993; Vriens *et al.*, 2004). Die in der vorliegenden Arbeit angewandte Koexpression von Ionenkanälen und GPCR ließ zunächst keine klare Zuordnung der mechanosensitiven Struktur zu und führte zu der Frage, inwiefern die eingesetzten Ionenkanäle inhärent mechanosensitiv sein könnten.

Heterotetramere aus Kir3.1 und Kir3.4 wurden bereits mittels Applikation von hypertoner Lösung hinsichtlich ihrer Mechanosensitivität analysiert (Ji *et al.*, 1998). Applikation von hypoosmolarer Lösung führte dabei zu einer Inaktivierung der Kanäle, was physiologisch sinnvoll ist, da Kir-Kanäle am Herzen nach einer Überdehnung in dieser Weise zur erleichterten Depolarisierung der Membran und einer verbesserten erneuten Erregbarkeit beitragen.  $G_{q/11}$ -PCR üben einen inhibitorischen Effekt auf Kir-Kanäle aus (Koike-Tani *et al.*, 2005; Lei *et al.*, 2001). Die mechanosensitive Eigenschaft der  $G_{q/11}$ -PCR kann daher bei Koexpression die Reaktion der Kir-Kanäle auf einen mechanischen Stimulus beeinflussen. In der vorliegenden Arbeit konnte keine Signalveränderung der Kir-Kanäle unter hypoosmolarer Lösung beobachtet werden, auch keine Inaktivierung (s. 3.2.3). Da die detektierbare Basalaktivität die Expression von Kir-Kanälen anzeigte, bedeutet dies, dass Kir-Kanäle im hier verwendeten Messsystem vermutlich nicht inhärent mechanosensitiv sind. Darüber hinaus deuten die Ergebnisse auch daraufhin, dass potentielle endogen exprimierte GPCR in CHO-K1 Zellen keinen nennenswerten Einfluss auf die Messergebnisse haben. Dies wirft zwar Fragen hinsichtlich der Unterschiede zwischen den hier erhaltenen Ergebnissen und denjenigen von Ji *et al.* (Ji *et al.*, 1998) auf, demonstriert aber auch, dass die heterologe Expression von Kir3.X Kanälen in CHO-K1 Zellen ein geeignetes Messsystem für die elektrophysiologische Analyse von GPCR-Aktivität darstellt.

Für TRPC5 gibt es dagegen nach momentanem Wissensstand keine Hinweise auf direkte Mechanosensitivität der Kanäle. Gomis *et al.* konnten eine TRPC5-Aktivierung unter hypoosmolarer Lösung beobachten (Gomis *et al.*, 2008). Diese fand jedoch mit einer für einen Ionenkanal sehr langen Verzögerung statt (vgl. 1.2, „Experimentelle Definitionen für direkte und inhärente Mechanosensoren“). Daher liegt die Vermutung nahe, dass der TRPC5 eher eine Rolle als signalweitergebendes Element der mechanisch induzierten Aktivierung von  $G_{q/11}$ -PCR spielt, die im Zuge der Applikation von hypoosmolarer Lösung oder Patchpipetten-vermittelter Membrandehnung aktiviert werden (Jemal *et al.*, 2014). Weitere Arbeiten konnten nur unter extremen Versuchsbedingungen wie einer hypoosmolaren

Lösung von 210-240 mosm/l und einem Unterdruck von -40 mmHg im „cell-attached-Modus“ auf Einzelkanalebene an CHO-K1-Zellen eine Aktivierung des TRPC5 zeigen (Shen *et al.*, 2015). Dies spiegelt keinen mechanischen Reiz in einem physiologisch erwartbaren Rahmen wieder (vgl. 1.2, „Experimentelle Definitionen für direkte und inhärente Mechanosensoren“). In der vorliegenden Arbeit konnte unter ausschließlicher Überexpression von TRPC5 in HEK293-Zellen (s. 3.2.3) keine mechanisch induzierte Aktivierung der Kanäle beobachtet werden. Dies unterstützt die Hypothese der ausschließlich signalweitergebenden Funktion des Kanals in der Signaltransduktion.

Basierend auf den Messdaten kann also zusammenfassend gesagt werden, dass die im Zuge dieser Arbeit eingesetzten Kir- und TRPC5-Kanäle in den verwendeten Messsystemen auch nach Überexpression nicht inhärent mechanosensitiv waren. Die heterologe Expression der Kanäle in CHO-K1- oder HEK293-Zellen stellt damit ein geeignetes Messsystem für die elektrophysiologische Analyse von GPCR-Aktivität dar.

Da die Stimulation mit hypotoner Lösung nur in Anwesenheit von GPCR zu einer messbaren Veränderung der Kanalaktivität führte, kann außerdem ausgeschlossen werden, dass eine Veränderung der Zytosolzusammensetzung durch die Perfusion von hypotoner Lösung Einfluss auf die Kanalaktivität hat. Es kann allerdings nicht ausgeschlossen werden, dass eine Veränderung des Zytosolkomposition Einfluss auf die Aktivität von GPCR nimmt.

#### 4.1.2 Darstellung der Mechanosensitivität von GPCR durch Ionenkanäle

Anhand der Stromzunahme nach Applikation von hypoosmolarer Lösung auf die mit Ionenkanälen koexprimierten  $G_{i/o}$ -PCR  $\alpha_{2A}$ , 5-HT<sub>1B</sub>, M2 und  $\mu$  und die  $G_s$ -PCR 5-HT<sub>7A</sub>R, CGRPR und VPAC1R war gezeigt worden, dass die Rezeptoren mechanisch induziert aktiviert werden können. Eine Perfusion mit hypertoner Lösung führt zum Ausstrom von intrazellulären Ionen wie Chlorid und Einstrom von Wasser in die Zelle und damit zu Zellschwellung. Mechanosensitive Proteine können so durch die daraus resultierende veränderte Membranspannung aktiviert werden (Brierley, 2010). Durch die Anwendung von hypoosmolarer Lösung kommt es jedoch zur Verdünnung von Ionen und Makromolekülen in der Zelle, was möglicherweise einen Einfluss auf die Signaltransduktion von Ionenkanälen haben kann. Zum Beispiel könnte eine Reduzierung der Ionenkonzentrationen Einfluss auf das Messergebnis nehmen. Darüber hinaus wird das Zytoskelett beeinflusst, da bei adhärennten Zellen durch Osmose ein uneinheitlicher Druck auf die Membran erzeugt wird.

Die Applikation eines alternativen mechanischen Stimulus wurde daher als eine unabhängige Bestätigung der Mechanosensorik von GPCR angewandt. Dies wurde in Form eines positiven Überdrucks in Höhe von 25 cmH<sub>2</sub>O unter Kontrolle eines Wassermanometers durch die Patchpipette durchgeführt (s. 3.2.7). Auch in diesen Experimenten führte der mechanische Reiz in Anwesenheit von GPCR zur Aktivierung der Ionenkanäle und bestätigte damit nicht nur, dass die Perfusion mittels hypotoner Lösung einen adäquaten mechanischen Reiz darstellt, sondern auch, dass GPCR in der Tat mechanisch aktiviert werden können.

#### 4.1.3 Signaltransduktion

Eine Behandlung von Zellen mit dem Endotoxin PTX führt zur G<sub>αi</sub>-spezifischen Blockade der heterotrimeren G<sub>i/o</sub>-Proteine (Mangmool und Kurose, 2011). Diese Inhibition des G<sub>i/o</sub>-Proteins hat zur Folge, dass es zu einer Akkumulation von cAMP in Zellen kommt, was auf Dauer toxisch für die Zelle ist (Mangmool und Kurose, 2011). Die Reaktion auf das Toxin dient als Klassifizierungsmerkmal für die Subfamilie der G<sub>i/o</sub>-PCR. Kir-Kanäle werden G<sub>i/o</sub>-PCR-vermittelt aktiviert, auch bei einem mechanisch induzierten Stimulus (s. 1.3.1.1 und 3.2.3). Die Inkubation von G<sub>i/o</sub>-PCR- und Kir-Kanal-überexprimierenden CHO-K1-Zellen mit PTX hatte zur Folge, dass keine Signaltransduktion mehr unter einem mechanischen Stimulus stattfinden konnte (siehe 3.2.5). Dies bestätigt, dass die Stromzunahme von Kir-Kanälen unter hypotoner Lösung durch eine mechanisch-induzierte Aktivierung und anschließende Signaltransduktion von G<sub>i/o</sub>-PCR an die Kir-Kanäle verursacht wird.

Die einzelnen detaillierten Abläufe der Signalübertragung zwischen GPCR und TRPC5 sind für die verschiedenen GPCR-Subfamilien unterschiedlich ausgeprägt untersucht worden. Die im Zuge der vorliegenden Arbeit durchgeführten Untersuchungen weisen jedoch darauf hin, dass neben den G<sub>q/11</sub>-PCR auch eine Aktivierung des TRPC5 durch G<sub>i/o</sub>-PCR und eine Interaktion mit G<sub>s</sub>-PCR stattfindet.

G<sub>q/11</sub>-PCR beeinflussen andere molekulare Effektoren als G<sub>s</sub>-PCR und G<sub>i/o</sub>-PCR (s.1.1.1). Es ist bekannt, dass das in Folge einer Stimulation dieser Rezeptoren involvierte PIP<sub>2</sub> eine Rolle in der TRPC5-Aktivierung spielt (Schaefer *et al.*, 2000). Die Potenzierung durch PIP<sub>2</sub>, Kalzium oder Phosphorylierung ist ein allgemein gültiger Aktivierungsmechanismus für Ionenkanäle und gilt auch für die TRP-Kanäle (Trebak *et al.*, 2009). Bezüglich der Signalübertragung wurde spekuliert, ob „ die α-Untereinheit des G<sub>q/11</sub>-Proteins an den TRPC5 bindet und ihn dadurch aktiviert“ (Pardatscher, 2015). Die PLC könnte ebenfalls zu einer Aktivierung des TRPC5

führen. Wie anhand von Photorezeptoren in *Drosophila* gezeigt wurde, verursacht PLC eine Protonen-freisetzende enzymatische Reaktion (Gudermann und Mederos y Schnitzler, 2010). Hier bewirkt die Aktivierung der PLC durch die Freisetzung von Protonen eine Ansäuerung des umgebenden Milieus um 0,2 pH. TRPC5 sind Protonen-sensitiv und werden bei sauren pH-Werten aktiviert (Semtner *et al.*, 2007). Kürzlich konnte bei der bis dahin oft kontrovers diskutierten DAG-Abhängigkeit der Signalwegs zwischen  $G_{q/11}$ -PCR und TRPC5 ein Durchbruch erzielt werden (Pardatscher, 2015; Storch *et al.*, 2017). Bisher war angenommen worden, dass im Gegensatz zu allen anderen Vertretern der TRPC die TRPC4/5 nicht alleine durch das PLC-Produkt DAG aktiviert werden können. Sie galten als DAG-insensitiv. Storch *et al.* konnten zeigen, dass der DAG-insensitive Zustand der TRPC4/5 in einen DAG-sensitiven Zustand umgewandelt werden kann. Zunächst muss  $PIP_2$  eliminiert werden. Dies führt zu einer Konformationsänderung am C-Terminus des Kanals, woraufhin das sonst gebundene Gerüstprotein „*Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> exchanger regulatory factor (NHERF) protein*“ abdissoziiert und den Kanal sensitiv gegenüber DAG macht. Damit konnte ein entscheidender Fortschritt in der Aufklärung der Signalkaskade zwischen  $G_{q/11}$ -PCR und TRPC5 erzielt werden.

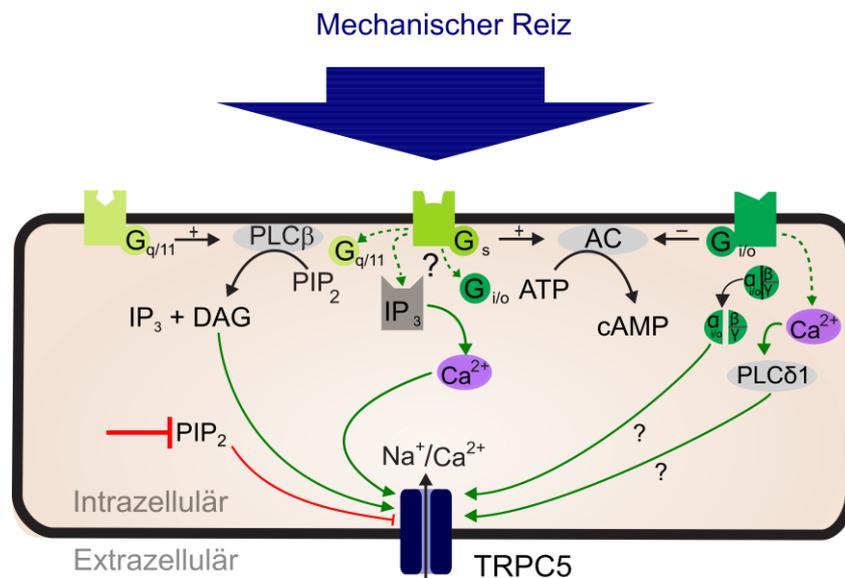
Die Untersuchung der Regulation von TRPC5 durch  $G_s$ -PCR konzentrieren sich fast ausschließlich auf den  $\beta_2$ AR (s. 3.2.2.1). Bei diesem Rezeptor wird vermutet, dass er nicht in der Lage ist, TRPC5 zu aktivieren. Es konnte jedoch gezeigt werden, dass bei der Aktivierung des  $\beta_2$ AR neben dem klassischen  $G_s$ -Protein-vermittelten Signalweg auch weitere Effektorproteine beeinflusst werden, die wiederum einen Einfluss auf die TRPC5-Aktivität ausüben können (Hong *et al.*, 2012). Nach der Aktivierung von  $\beta_2$ AR konnten Hong *et al.* eine Zunahme von Kalzium-Strömen beobachten. Obwohl kein konkreter Kalziumkanal ermittelt werden konnte, wurde gezeigt, dass durch eine externe Aktivierung der  $IP_3$ -Rezeptoren Kalzium frei gesetzt wird, welches wiederum den TRPC5-Strom verstärken kann. Des Weiteren wird vermutet, dass cAMP und Phosphoinositid-3-Kinasen (PI3K), die beide wichtige Komponenten des  $G_s$ -PCR-Signalwegs darstellen, zum vermehrten Einbau von TRPC-Kanälen in die Membran führen (Bezzarides *et al.*, 2004; Goel *et al.*, 2010). So konnten Hong *et al.* nach der Unterdrückung des hauptsächlich angeschalteten Signalwegs über AC und cAMP eine Stromantwort des TRPC5 durch Isoprenalin-stimulierte  $\beta_2$ AR detektieren. Das bedeutet, dass der  $\beta_2$ AR indirekt regulierende Effekte auf den TRPC5 haben kann. In der vorliegenden Arbeit wurden jedoch weder unter Agonistenstimulation noch unter mechanisch induzierter Aktivierung Stromzunahmen beobachtet. Dies weist darauf hin, dass

in Folge einer Aktivierung eines klassischen  $G_s$ -Protein gekoppelten Rezeptors keine TRPC5-Aktivierung stattfindet. Die anderen im Zuge der vorliegenden Arbeit untersuchen  $G_s$ -PCR 5-HT<sub>7A</sub>R, CGRPR und VPAC1R weisen alle die Eigenschaft auf, dass sie mit mehreren G-Protein-Subtypen interagieren können. CGRPR und VPAC1R wechselwirken zwar vorrangig mit  $G_s$ -Proteinen, können aber auch mit  $G_{i/o}$ - und  $G_{q/11}$ -Proteinen koppeln (Dickson und Finlayson, 2009; Langer, 2012; Walker *et al.*, 2010; Weston *et al.*, 2016). 5-HT<sub>7A</sub>R koppeln neben  $G_s$ -Proteinen auch  $G_{12/13}$ -Proteine (Kvachnina *et al.*, 2005). Daher kann spekuliert werden, dass die Stromzunahmen in diesen TRPC5-basierten Messungen nicht in Folge einer  $G_s$ -Protein-induzierten Signalkaskade stattfanden, sondern durch andere G-Proteine vermittelt wurden. Eine Überlegung zur Überprüfung dieser Theorie wäre eine vorangehende PTX-Inkubation der Zellen oder der Einsatz des spezifischen  $G_{q/11}$ -PCR-Blockers YM-254890 (Nishimura *et al.*, 2010).

Die Signalübertragung zwischen  $G_{i/o}$ -PCR und der auf der phylogenetischen Klassifizierung beruhenden Subfamilie TRPC4/TRPC5 (Zhu *et al.*, 1996), sowie die Frage, inwiefern  $G_{q/11}$ - und  $G_{i/o}$ -PCR-Signalkaskaden interagieren, wurde bereits von verschiedenen Gruppen untersucht. Jeon *et al.* postulieren, dass die  $\alpha$ -Untereinheiten von sowohl  $G_{q/11}$ - als auch  $G_{i/o}$ -Proteinen die Signaltransduktion bestimmen (Jeon *et al.*, 2012). Dabei soll, entgegen der bisherigen Vermutung, die  $G_{\alpha i/o}$ -Untereinheit zu stärkerer TRPC5-Aktivierung führen als die  $G_{\alpha q/11}$ -Untereinheit. Der  $\beta\gamma$ -Untereinheit der G-Proteine wird keine direkte Involvement in die Kanalaktivierung zugesprochen. Hier wird eher eine indirekte regulierende Funktion durch die Inaktivierung der  $\alpha$ -Untereinheit bei Bindung an die  $\beta\gamma$ -Untereinheit angenommen. Wo Schaefer *et al.* die PLC $\beta$  or PLC $\gamma$  als bestimmendes Protein in der TRPC4/5-Aktivierung sahen (Schaefer *et al.*, 2000), vermuten Thakur *et al.* eher  $G_{i/o}$ -Proteine als hauptsächlichen Signalübermittler, und dabei zusätzlich eine überraschende starke Abhängigkeit von der PLC $\delta$ 1 (Thakur *et al.*, 2016). Durch den Einsatz des PLC-Blockers U-73122 konnte die Beteiligung einer PLC in der mechanisch induzierten Signalkaskade zwischen TRPC5 und  $G_{i/o}$ PCR bestätigt werden (3.2.6). Interessanterweise konnte bei TRPC5- und  $G_{i/o}$ -PCR-überexprimierenden, PTX-inkubierten HEK293-Zellen ebenfalls keine Signaltransduktion nach einer mechanisch induzierten Aktivierung beobachtet werden. Dies bestätigt, dass entweder das  $G_{\alpha i}$ -Protein selbst oder in der nachfolgenden Signalkaskade auftretende Effektorproteine als Signalübermittler zwischen TRPC5 und  $G_{i/o}$ -PCR dienen. Die parallele Applikation spezifischer Rezeptorblocker (s. 3.2.4) und Messungen an ausschließlich

TRPC5-überexprimierenden Zellen (s. 3.2.3) bestätigten durch Ausbleiben eines Effektes nach einem mechanischen Stimulus die Rolle der  $G_{i/o}$ -PCR als mechanisch sensitive Proteine.

Die Aufklärung des genauen Signalweges zwischen  $G_{i/o}$ -PCR und TRPC5 bzw. der Regulation von TRPC5 durch  $G_s$ -PCR bedarf noch der weiteren Untersuchung. In Abbildung 45 ist eine Übersicht über die derzeit bekannten und postulierten Details der Signaltransduktion zwischen GPCR und TRPC5 zusammengestellt.



**Abbildung 45: Zusammenfassung der Aktivierungswege des TRPC5 über GPCR**

Schematische Darstellung einer Zelle mit Rezeptoren der drei verschiedenen GPCR-Subfamilien ( $G_{q/11}$ ,  $G_s$ ,  $G_{i/o}$ ) sowie des TRPC5. Dargestellt sind die soweit bekannten Details der Signalweitergabe (grüne Pfeile) nach Aktivierung der GPCR (grüne Strukturen in der die Zelle umgebenden schwarzen Membran) durch einen mechanischen Reiz. Eine Interaktion ist durch einen gestrichelten Pfeil gekennzeichnet, ein Umsatz über ein Enzym durch einen schwarzen Pfeil. Nach der Stimulation eines  $G_{q/11}$ -PCR (links oben) aktiviert dieser die PLC $\beta$ , die PIP $_2$  zu IP $_3$  und DAG umsetzt. Der TRPC5 kann in einen DAG-sensitiven Zustand umgewandelt werden, wenn das den TRPC5-inhibierende PIP $_2$  eliminiert wird. Im Falle des  $G_s$ -PCR (Mitte oben) kann dieser nach der mechanischen Aktivierung mit Kalzium-regulierenden Elementen wie dem IP $_3$ -Rezeptor interagieren, was zu einer Zunahme an intrazellulärem Kalzium führt. Kalzium kann TRPC5-Ströme verstärken. Zusätzlich können manche  $G_s$ -PCR auch mit  $G_s$ -,  $G_{q/11}$ - und  $G_{12/13}$ -Proteinen (letzteres nicht dargestellt) interagieren. Die Signalweitergabe nach der mechanischen Aktivierung eines  $G_{i/o}$ -PCR (rechts oben) erfolgt entweder über die  $G_{\alpha i}$ -Untereinheit des gespaltenen G-Proteins (grüne, halbierte Kugel) oder/und durch eine Interaktion zwischen dem  $G_{i/o}$ -PCR und Kalzium. Das Ion kann einerseits selbst den TRPC5 verstärken und andererseits die PLC $\delta 1$  aktivieren, die wiederum eine Rolle bei der TRPC5-Aktivierung spielt. PLC = Phospholipase C; AC = Adenylcyclase; PIP $_2$  = Phosphatidylinositolbisphosphat; IP $_3$  = Inositoltrisphosphat; DAG = Diacylglycerin; cAMP = cyclisches Adenosinmonophosphat; ATP = Adenosintriphosphat. Angepasst von (Storch et al., 2012).

#### 4.2 Untersuchung von cAMP-Spiegeländerungen nach $G_{i/o}$ -PCR –Aktivierung

Fluoreszierende Proteine erlauben die Visualisierung zellulärer Strukturen in Echtzeit (Giepmans et al., 2006). Durch sie ist es möglich, zelluläre Strukturen wie Organellen und kleine Moleküle wie Proteine oder intrazelluläre Signalmoleküle zu untersuchen. Um cAMP-

Spiegel in lebenden Zellen zu untersuchen, wurde eine Methode weiterentwickelt, die auf dem cAMP-Biosensor Epac basiert (Klarenbeek und Jalink, 2014).

#### 4.2.1 Epac-basierte cAMP-Sensoren

Ein Ziel dieser Arbeit war es, Epac-basierte cAMP-Sensoren zu optimieren, um die mechanische Aktivierbarkeit von  $G_{i/o}$ -PCR optisch messen zu können. Diese Sensoren wurden anschließend mit den von anderen Gruppen veröffentlichten Sensoren verglichen. Verschiedene Optimierungen an den Fluorophoren (s. 2.1.8) und am Epac-Protein selbst führten zu Sensoren mit unterschiedlichen Eigenschaften. Durch den Einsatz von mVenus und mTurquoise(2) kann eine deutlich höhere Leuchtdichte und höhere Stabilität gegenüber pH-Wert- und Ionenkonzentrationsänderungen erreicht werden (Goedhart *et al.*, 2012; Kremers *et al.*, 2006). Allerdings zeigten die im Zuge dieser Arbeit entwickelten Sensoren mV-Epac1-mTq2 und mV-Epac2-mTq2 keine erhöhten FRET-Signale in der experimentellen Anwendung, was zeigt, dass eine verbesserte Stabilität der Fluorophore nicht zwangsläufig in einer höheren FRET-Effizienz resultiert. So ist der zytoplasmatisch lokalisierte und katalytisch inaktive Sensor Epac-S<sup>H74</sup> imstande, cAMP-Spiegeländerungen im Bereich von 0,1-100  $\mu\text{M}$  zu detektieren (Klarenbeek *et al.*, 2011), wohingegen die von der Gruppe um V.O. Nikolaev entwickelten cAMP-Sensoren  $EC_{50}$ -Werte von 2,4  $\mu\text{M}$  (YFP-Epac1-CFP) und 0,9  $\mu\text{M}$  (YFP-Epac2-CFP) aufweisen (Nikolaev *et al.*, 2004). Ein entscheidender Faktor in der Sensorentwicklung ist die Verwendung von mTq in Kombination mit einem Tandem-Venus, sowie der Einsatz von zirkulär permutierten Venus-Fluorophoren (Baird *et al.*, 1999; Topell *et al.*, 1999). Die Ergebnisse zeigen, dass der Epac-S<sup>H187</sup>-Sensor der derzeit am besten geeignete Sensor für FRET-Messungen mit einer erwünschten hohen FRET-Signaleffizienz, einer verbesserten Photostabilität und einem erweiterten dynamischen Bereich ist.

#### 4.2.2 Darstellung $G_s$ - und $G_{i/o}$ -PCR-vermittelter cAMP-Spiegeländerungen

Durch den Einsatz von cAMP-Sensoren konnten bereits zahlreiche neue Erkenntnisse über die räumliche und zeitliche Auflösung der Abläufe nach einer  $G_s$ -PCR-Aktivierung gewonnen werden (Gesellchen *et al.*, 2011; Nikolaev *et al.*, 2004; Vardjan *et al.*, 2014). In der vorliegenden Arbeit war anhand von  $G_s$ -PCR eine valide und zuverlässige Methode entwickelt worden, um die cAMP-Sensoren für eine Untersuchung von  $G_{i/o}$ -PCR einzusetzen.

#### 4.2.2.1 Vorstimulation mit Forskolin

Eine Vorstimulation mit FSK wird ähnlich wie in radioaktiven Vielzellbestimmungsmethoden verwendet, um den cAMP-Spiegel in Zellen künstlich zu erhöhen (DiRaddo *et al.*, 2014; Glass und Felder, 1997). Dies erweist sich als entscheidender Vorteil bei der optischen Detektion von cAMP-Spiegelabnahmen, weist jedoch den Nachteil auf, dass so in die endogene cAMP-Regulation eingegriffen wird und daher keine physiologischen Bedingungen vorherrschen. Bei Untersuchung der  $G_{i/o}$ -Protein gekoppelten Rezeptoren Apelin, Dopamin-D2 und 5-HT<sub>1A</sub> konnte so bereits die cAMP-Spiegelabnahme mit Epac-basierten Sensoren detektiert werden (Ceraudo *et al.*, 2014; Masri *et al.*, 2008; Salonikidis *et al.*, 2011). Die Ergebnisse der Messungen unter Einsatz der Sensoren YFP-Epac1-CFP, YFP-Epac2-CFP, mV-Epac1-mTq2, mV-Epac2-mTq2 und H74 zur Ermittlung der durch  $\alpha_{2A}R$  und  $\mu R$  verursachten cAMP-Spiegelabnahmen bestätigten die Notwendigkeit der Vorstimulation mit FSK. Nur mittels FSK war mit den oben angegebenen Sensoren eine Signalveränderung detektierbar, die eindeutig ausgelesen werden konnte. Dabei war eine submaximale FSK-Konzentration von 1  $\mu M$  gewählt worden, da höhere Konzentrationen wie 10  $\mu M$  zu einer Überproduktion von cAMP führte. Agonisten-verursachte FRET-Signaländerungen konnten durch die Applikation von Rezeptorblockern signifikant verringert werden (s. 3.3.1 und 3.3.2), was zeigt, dass die Signale spezifisch waren.

#### 4.2.2.2 Methodische Voraussetzungen

Für die erfolgreiche Versuchsdurchführung war von großer Bedeutung, vor jedweder Applikation eines Stimulus abzuwarten, bis sich das System in einem Gleichgewichtszustand befand. Dieser Zustand spiegelt einen insgesamt gleichbleibenden cAMP-Spiegel in der gemessenen Zelle wider; Bildung und Abbau befinden sich dann in allen Kompartimenten der Zelle im Gleichgewicht. Es musste je nach cAMP-Sensor und Rezeptor zwischen etwa 1,5 ( $\beta_2AR$  und YFP-Epac1-CFP) und 15 Min. ( $\beta_2AR$  und Epac-S<sup>H74</sup>) gewartet werden. Gründe für die lange Equilibrierungszeit könnten der relativ langsame Austausch der Badlösungen in der Messkammer sein, aber auch endogen exprimierte und konstitutiv aktive  $\beta_2AR$  sowohl bei der Messung ebendieser als auch bei der Untersuchung der anderen GPCR. Der Epac-S<sup>H74</sup>-Sensor liegt im Gegensatz zu den Epac1&2-Sensoren hauptsächlich zytosolisch vor. Dadurch kann es zu einer Bindung von Sensor und cAMP in einzelnen Mikrodomänen kommen, die sich ebenfalls erst einpendeln muss (Calebiro und Maiellaro, 2014).

Als weiterer Punkt für eine erfolgreiche Versuchsdurchführung war eine optimale Wahl der

zu untersuchenden Zelle ausschlaggebend (siehe auch 2.4.5.2). Bei Überexpression von cAMP-Sensoren kann es dazu kommen, dass diese intrazellulär aggregieren und – obwohl sie stark fluoreszieren – nicht mehr in der Lage sind cAMP-Spiegeländerungen zu detektieren (Salonikidis *et al.*, 2011). Dies stellt den Grund dar, warum eine mittelstark und dabei hauptsächlich an der Membran fluoreszierende Zelle ausgewählt werden sollte.

#### 4.2.2.3 Kinetik und Erfolgsrate

Unabhängig von den methodischen Voraussetzungen konnten bei den verschiedenen Sensoren unterschiedliche dynamische Bereiche hinsichtlich der Detektion der FRET-Signale beobachtet werden (s. 3.3.3). Den limitierenden Schritt stellt bei der Verwendung von cAMP-Sensoren die cAMP-Bildung durch die AC dar. Bis zur cAMP-Akkumulation oder Hemmung derer vergehen ca. 30 s (Lohse *et al.*, 2012). Bei Kinetikmessungen mit den GPCR  $\beta_2$ AR,  $\alpha_{2A}$ AR und  $\mu$ R wurden je nach verwendetem cAMP-Sensor und Rezeptor Aktivierungswerte zwischen 34 und 63 s ermittelt. Das kürzere Ende des Spektrums liegt dabei im Bereich der normalen cAMP-Akkumulationsdauer, das höhere Ende außerhalb des erwarteten Wertes. Grund hierfür kann sein, dass die Kinetik sowohl vom Expressionslevel des Rezeptors als auch der G-Proteine abhängt, sowie vom verwendeten Zellsystem (Vilardaga *et al.*, 2009). Ein weiterer Faktor ist die zelluläre Verbreitung des cAMP-Sensors selbst. Nur wenn dieser einheitlich und im gesamten dafür möglichen Zellraum verteilt ist, ist eine optimale Erfassung der cAMP-Änderungen möglich. Des Weiteren lag der  $\beta_2$ AR auf einem endogenen Expressionsniveau in HEK293-Zellen vor, d.h. es könnte ein suboptimales Niveau an Rezeptor vorgelegen haben.

Die Ergebnisse zeigen, dass bei den diversen Rezeptoren und Sensoren auch hinsichtlich der Mess-Erfolgsrate Unterschiede auftraten. Alle untersuchten Epac-Sensoren waren grundsätzlich dazu in der Lage, dynamische cAMP-Spiegeländerungen zu detektieren. Zu beobachten war, dass die Optimierung der Sensoren offensichtlich zu einer höheren Mess-Erfolgsrate geführt hatte. Bei den Sensoren Epac-S<sup>H187</sup> und Epac-S<sup>H74</sup> war eine Entfernung der Membranbindestelle sowie des katalytischen Zentrums vorgenommen worden, siehe auch Abschnitt 2.1.12. Die Sensoren YFP-Epac1-CFP, YFP-Epac2-CFP, mV-Epac1-mTq2 und mV-Epac2-mTq2 besaßen diese Merkmale nicht. Die höhere Mess-Erfolgsrate mit den Sensoren Epac-S<sup>H187</sup> und Epac-S<sup>H74</sup> kann darauf beruhen, dass bei den Sensoren YFP-Epac1-CFP, YFP-Epac2-CFP, mV-Epac1-mTq2 und mV-Epac2-mTq2 das aktive, an der Membran lokalisierte Epac-Protein einen Störfaktor darstellt.

#### 4.2.3 Eignung der Sensoren zur Darstellung von $G_{i/o}$ -vermittelten cAMP-Spiegelabnahmen

Unter den untersuchten Sensoren erwies sich der Epac-S<sup>H74</sup>-Sensor als der Sensitivste, wenn es um die Detektion der FRET-Signaländerung nach FSK-Vorstimulation ging. Eine Vorstimulation war nicht mehr nötig, wenn der Epac-S<sup>H187</sup>-Sensor eingesetzt wurde. Durch die durchgeführten Verbesserungen besitzt dieser Sensor eine 2,5fach höhere Affinität zu cAMP. Dies führte bereits bei Messungen mit dem adrenergen  $G_s$ -PCR  $\beta_2$  zu einem deutlich erhöhten dynamischen Bereich. Aufgrund seiner hohen cAMP-Affinität war es möglich, Verringerungen des basalen cAMP-Spiegels durch  $G_{i/o}$ -PCR-Aktivierung zu detektieren.

Bei der Bestimmung des EC<sub>50</sub>-Wertes für DAMGO in Untersuchungen des  $\mu R$  in Kombination mit dem Epac-S<sup>H187</sup>-Sensor wurde ein Wert von 91 pM ermittelt. Im Vergleich dazu wurde bei der Bestimmung des EC<sub>50</sub>-Wertes mit Vorstimulation durch FSK in einer klassischen Vielzell-Bestimmungsmethode durch Markierung der Zellen mit <sup>3</sup>H-Adenin und Kalkulation des umgesetzten <sup>3</sup>H-cAMP ein beinahe 100fach höherer Wert ermittelt (8,4 nM) (Blake *et al.*, 1997). Dies zeigt, dass der Sensor mit hoher Sensitivität die cAMP-Spiegeländerung detektieren kann. Hervorzuheben ist außerdem, dass durch den Epac-S<sup>H187</sup>-Sensor eine Messung der FRET-Signale auf Einzelzellbasis möglich ist. Dadurch wird kein Durchschnitt aller Zellen gebildet, der womöglich auch abgestorbene oder nicht reagierende Zellen miteinschließt, sondern der konkrete Wert einer Zelle bestimmt. Durch die Bildung des Durchschnitts mehrerer Einzelzellmessungen kann so eine zusätzliche methodische Steigerung der Sensitivität erlangt werden. In der vorliegenden Arbeit ermöglichte dieses Zusammenspiel den Einsatz des Epac-S<sup>H187</sup>-Sensors bei der Bestimmung von cAMP-Spiegelabnahmen nach  $G_{i/o}$ -PCR-Aktivierung ohne vorherige FSK-Vorstimulation.

Ein weiterer Vorteil ist, dass durch den Einsatz der Epac-Sensoren ohne vorangehende FSK-Stimulation eine Bestimmung der  $G_{i/o}$ -PCR-Aktivierung unter physiologischen Bedingungen möglich ist. Obwohl eine Aktivierungsbestimmung auch durch andere FRET-Technik-basierte Methoden, wie z.B. durch  $G_{\alpha i}$ -FRET-Sensoren durchführbar ist (van Unen *et al.*, 2016), wird hier durch die Überexpression von G-Proteinuntereinheiten in die endogene Stöchiometrie von Rezeptoren und G-Proteinen eingegriffen. Da die G-Proteine bei den Epac-Sensoren nicht beeinflusst werden und in der vorliegenden Arbeit gezeigt werden konnte, dass bei Verwendung des Sensors Epac-S<sup>H187</sup> keine Vorstimulation durch FSK mehr nötig ist, könnten

die Epac-basierten Sensoren ein geeignetes Werkzeug darstellen, um cAMP-Spiegeländerungen im physiologischen Bereich auf Einzelzellbasis zu visualisieren.

#### 4.2.4 Eignung der Sensoren zur Darstellung der mechanischen Aktivierbarkeit

In der vorliegenden Arbeit musste festgestellt werden, dass ein Einsatz der Epac-basierten cAMP-Sensoren als Detektionsmöglichkeit der mechanischen Aktivierbarkeit von  $G_{i/o}$ -PCR unter den angewandten Bedingungen nicht möglich war. Dabei waren neben der mechanischen Aktivierung durch hypoosmolare Lösung noch zwei weitere Applikationsmethoden der mechanischen Aktivierung untersucht worden, die aber zum gleichen Ergebnis führten (s. 3.3.4).

Im Zuge der vorliegenden Arbeit waren GPCR zunächst auf endogenem Expressionsniveau untersucht worden. Bei den Messungen konnte nach Stimulation beobachtet werden, dass es bereits bei endogen exprimierten GPCR zu Fluoreszenzsignaländerungen kam. Dies bedeutet, dass obwohl hier noch die nicht optimalsten cAMP-Sensoren YFP-Epac1-CFP und mV-Epac1-mTq2 eingesetzt worden waren, eine sehr hohe Sensitivität des Messsystems vorliegt. HEK293-Zellen exprimieren endogen neben dem  $\beta_2$ AR den Adenosin A<sub>2A</sub>- und A<sub>2B</sub>-Rezeptor (beide  $G_s$ -PCR), den adrenergen  $\alpha_{1B}$ -Rezeptor ( $G_{q/11}$ -PCR), die 5-HT<sub>1D, 6, 7</sub> ( $G_{i/o}$ -PCR,  $G_s$ -PCR,  $G_s$ -PCR), den muskarinischen Acetylcholin-M<sub>3</sub>-Rezeptor ( $G_{q/11}$ -PCR), den EndothelinA-Rezeptor ( $G_{q/11}$ -PCR) und den Opioid  $\delta$ 1-Rezeptor ( $G_{i/o}$ -PCR) (Atwood *et al.*, 2011; Thomas und Smart, 2005). Da einige davon den cAMP-Spiegel regulieren können, ist deren Aktivierung anscheinend ausreichend, um eine FRET-Signaländerung hervorzurufen. Bemerkenswerterweise variierten je nach Messung und mechanischen Stimuli Zunahmen, Abnahmen, gleichsinnige Fluoreszenzänderungen oder nicht vorhandene Fluoreszenzänderungen. Ein vergleichbares Bild zeigte sich auch bei der anschließenden Analyse von überexprimierten  $G_{i/o}$ -PCR. Der Anteil an nicht verwertbaren Messungen in Form von gleichsinnigen Fluoreszenzänderungen oder nicht vorhandenen Fluoreszenzänderungen war dabei (außer bei der Stimulation durch Scherspannung) allerdings relativ hoch (50 – 58 %). Bei Vergleich der verschiedenen mechanischen Stimuli war aufgefallen, dass unter extrazellulärem Überdruck eine zu steile Kinetik vorherrschte, als dass das Signal tatsächlich durch eine Veränderung des cAMP-Spiegels verursacht werden konnte. Dabei handelt es sich womöglich um Bewegungsartefakte, was diese Art des mechanischen Stimulus als experimentelles System disqualifiziert. Als idealer mechanischer Stimulus erwies sich unter

den gegebenen Bedingungen die Scherspannung. Hier konnten alle Messungen verwendet werden, und sowohl bei endogen exprimierten GPCR als auch bei überexprimierten  $G_{i/o}$ -PCR kam es hauptsächlich zu Signalabnahmen. Der Vorteil dieser Art der mechanischen Stimulation besteht darin, dass es zu keinem Wassereinstrom in die Zellen kommt. Dadurch wird eine Verdünnung von zytosolischen Komponenten wie Ionen und diversen Makromolekülen sowie eine Veränderungen des Zytoskeletts vermieden. Zusammenfassend kann gesagt werden, dass es unter Anwendung der cAMP-Sensor-basierten Untersuchungsmethode schwierig ist zu differenzieren, ob mechanisch induzierte cAMP-Spiegeländerungen durch endogene oder überexprimierte GPCR verursacht wurden und die Methode in dieser Form ungeeignet ist, einzelne GPCR zu analysieren. Um die Anwendung dennoch zu ermöglichen, könnte ein anderes Zellsystem verwendet werden, in dem die endogene Expression von GPCR nicht so ausgeprägt ist wie bei HEK293-Zellen. Außerdem wäre es sinnvoll, zukünftig ausschließlich die Scherspannung als mechanischen Stimulus in derartigen Experimenten einzusetzen, da diese die vielversprechendsten Ergebnisse lieferte. Eine Etablierung der Epac-Sensor-basierten Messmethode in der Untersuchung der mechanischen Aktivierbarkeit von GPCR würde einen zusätzlichen Betrachtungswinkel der Rezeptoraktivierung hinsichtlich ihrer Auswirkung auf die cAMP-Spiegelregulierung erlauben.

#### 4.3 FRET-mikroskopische Untersuchungen der Mechanosensorik direkt an $G_{i/o}$ -PCR

Dynamische intramolekulare FRET-Messungen ermöglichen die zeitliche und räumliche Aufzeichnung der Fluoreszenzintensitätsänderung eines Donors und eines Akzeptors in einzelnen Zellen. Durch die Insertion von beiden Fluorophoren in ein und dasselbe Protein wird ein immer gleichbleibendes Verhältnis der Fluorophore garantiert. Diese fixe Stöchiometrie ermöglicht eine wesentlich einfachere Auswertung (Depry und Zhang, 2010). So ist es nicht nötig, die absolute FRET-Effizienz zu quantifizieren, solange ein eindeutiges Signal zu ermitteln ist. Des Weiteren können variable Expressionsniveaus der einzelnen Fluorophore innerhalb eines bestimmten Rahmens vernachlässigt werden, da ein optimales Verhältnis bereits durch die Auswahl der Messweise garantiert ist (Doucette *et al.*, 2016). Drei Vertreter der  $G_{i/o}$ -PCR -Subfamilie,  $\alpha_{2A}$ , 5-HT<sub>1B</sub> und  $\mu$ , waren als Rezeptorsensoren hinsichtlich ihrer Aktivierbarkeit durch ihre Agonisten und durch hypoosmolare Lösung charakterisiert worden.

Interessanterweise konnte bei der Untersuchung des  $\alpha_{2A}$ -FRET-Sensors unter Guanfacin-Stimulation eine höhere FRET-Signalabnahme detektiert werden als bei der Erstverwendung des Rezeptorsensors mit Noradrenalin (Villardaga *et al.*, 2009). Der höhere Wert der im Zuge dieser Arbeit durchgeführten Messungen kann an der höheren Spezifität von Guanfacin gegenüber Noradrenalin am  $\alpha_{2A}$ R liegen, da diverse Agonisten je nach ihrer intrinsischen Aktivität zu unterschiedlichen Signalen führen können (Zurn *et al.*, 2009).

In Kontrast zu den im Zuge dieser Arbeit generierten 5-HT<sub>1B</sub>-FRET-Sensoren und  $\mu$ -FRET-Sensoren, waren im  $\alpha_{2A}$ -FRET-Sensor noch zwei komplette Fluorophore in den Wildtyprezeptor eingefügt worden. Diese Methode war durch die Insertion eines viel kleineren Bindemotivs für einen Fluorophor optimiert worden. Dadurch ist es möglich, dass die Markierung mit einem Fluorophor nicht auf DNA-Ebene stattfindet, sondern erst nach der Proteinexpression (Hoffmann *et al.*, 2010). Die auf einer hohen Affinität, jedoch nicht-kovalenten Bindung beruhende Markierung mit FIAsh war beim 5-HT<sub>1B</sub>-FRET-Sensor und  $\mu$ -FRET-Sensor durchgeführt worden. Der freie Fluorophor leuchtet nicht (geringe Hintergrundfluoreszenz), wird nicht ausgewaschen und führt so zu einer geringeren Ausbleichrate der aktiven Fluorophore. Dies erlaubt eine Messung über längere Zeiträume wie in vorliegenden Experimenten gefordert. Die herausragendsten Vorteile liegen bei der verwendeten Messtechnik aber im kleinen Tetracystein-Bindemotiv, das bei der Untersuchung von GPCR im Gegensatz zu eingefügten Fluorophoren wie GFP/YFP/CFP keine nennenswerte Störgröße darstellt. Weiterhin weist das FRET-Paar FIAsh/mTq2 eine 5fach höhere Signalamplitude gegenüber dem FRET-Paar YFP/CFP auf (Zurn *et al.*, 2010)

Mittels der drei FRET-Rezeptorsensoren konnte die Mechanosensitivität durch die FRET-Signaländerung auf Rezeptorebene bestätigt werden. Dabei konnte beobachtet werden, dass die Rezeptoren mit einem größeren FRET-Signal auf den mechanischen Reiz reagierten als auf die Stimulation durch den jeweiligen Agonisten. Interessanterweise zeigten die Effekte unter hypoosmolarer Lösung auch eine schnellere Kinetik auf als die Agonisten-Effekte. Dies könnte ein Hinweis darauf sein, dass für den Agonisten und die mechanische Aktivierung zwei unterschiedliche aktive Rezeptorkonformationen vorkommen und dass diese auch mit einer unterschiedlichen Geschwindigkeit eingenommen werden können. Diese Ergebnisse stehen in Einklang zu den Erkenntnissen von Yasuda *et al.*, der einen eigenen Konformationszustand für die mechanisch induzierte Rezeptoraktivierung postuliert (Yasuda *et al.*, 2008). Inwiefern sich mechanisch-induzierte und Agonisten-induzierte

Konformationen gegenseitig beeinflussen, d.h. verstärken, verhindern oder miteinander in Konkurrenz stehen, bleibt derzeit noch im Detail zu untersuchen.

Zusammenfassend kann gesagt werden, dass mittels FRET-Rezeptorsensoren die Mechanosensitivität dreier verschiedener  $G_{i/o}$ -PCR in einer zweiten unabhängigen FRET-Technik-basierten Untersuchungsmethode bestätigt werden konnte und dass dieses Messsystem weitreichende Anwendungsoptionen ermöglicht.

#### *4.4 Die Rolle der Messsysteme für die Ermittlung der Mechanosensitivität von $G_{i/o}$ -PCR*

In zwei Ionenkanal-basierten Messsystemen in der Elektrophysiologie, über die Detektion dynamischer cAMP-Spiegeländerungen in FRET-Messungen und durch FRET-Rezeptorsensoren konnten weitreichende Informationen zur mechanisch induzierten Aktivierbarkeit erbracht werden. Da sich die verschiedenen Messsysteme hinsichtlich ihrer Effektorproteine unterscheiden, bestehen bei der Signaldetektion Abstufungen hinsichtlich der Nähe zur untersuchten Zielstruktur GPCR. Die elektrophysiologischen Ansätze erbringen valide, jedoch immer nur indirekte Daten bei der Rezeptoraktivierung durch mechanische Stimuli. Die Ermittlung von cAMP-Spiegeländerungen durch direkte Sensoren dieser intrazellulären Signalmoleküle stellt eine Detektionsmethode mit hoher Sensitivität und wesentlich näher am Rezeptor dar. Hier war jedoch keine Darstellung der mechanischen Aktivierbarkeit einzelner GPCR möglich. Eine Möglichkeit, Abläufe wie die mechanische Aktivierung direkt am Rezeptor zu untersuchen, bieten die entwickelten FRET-Rezeptorsensoren.

Aufgrund der verschiedenen Ionenkanäle und Zellsysteme in den elektrophysiologischen Messsystemen ergaben sich diverse Unterschiede bezüglich der Charakteristika und der Anwendbarkeit der Systeme.

So können anhand der Kir-Kanal-basierten Messsysteme ausschließlich  $G_{i/o}$ -PCR untersucht werden. Dabei erwiesen sich beide Kir-Kanal-Konstrukte als gleichwertig. Das TRPC5-basierte Messsystem ist in der Lage, die Aktivierung aller drei im Rahmen der vorliegenden Arbeit untersuchten GPCR-Subfamilien darzustellen. Obwohl beide Ionenkanäle - Kir3.X und TRPC5-basalaktiv sind, wurde bei Vergleich der Basalstromdichten deutlich, dass diese im Fall der Kir3.X innerhalb der untersuchten Rezeptoren statistisch signifikant unterschiedlich ausfielen (s. 3.5, Abbildung 40). Dies deutet auf eine unterschiedlich hohe konstitutive Aktivität der

Rezeptoren in den verwendeten Zellsystemen hin. Da sich das Expressionsmuster an endogenen Rezeptoren zwischen CHO-K1-Zellen und HEK293-Zellen unterscheidet (Schonbrunn und Steffen, 2012), kann dies auch Auswirkungen auf die Überexpression von anderen Rezeptoren haben (Thomas und Smart, 2005). Das bedeutet, dass für einen validen Vergleich verschiedener GPCR in Messsystemen mit hohen konstitutiven Aktivitäten der Rezeptoren die jeweiligen Basalstromdichten von den maximalen Stromdichten der Effekte abgezogen werden sollten oder vorangehende Experimente mit inversen Agonisten durchgeführt werden sollten.

Eine weitere interessante Beobachtung konnte durch die Analyse der Koexpression von TRPC5 und GPCR gemacht werden. Obwohl bei beiden GPCR-Subfamilien die experimentellen Abläufe der Überexpression gleich waren, konnten bei der Koexpression von  $G_{i/o}$ -PCR und TRPC5 tendenziell größere Effekte unter  $\text{LaCl}_3$ -Applikation beobachtet werden als unter der Koexpression von  $G_s$ -PCR und TRPC5. Dies weist erneut darauf hin, dass womöglich keine direkte Signalübertragung zwischen den beiden letztgenannten Proteinen stattfindet, sondern dass andere Strukturen wie die Aktivierung von Kalziumkanälen oder alternativen G-Protein-Subtypen zu einer Aktivierung des TRPC5 führen (s. 4.1.3).

Ein weiteres Charakteristikum der elektrophysiologischen Messsysteme ergibt sich anhand der biophysikalischen Eigenschaften der beiden Ionenkanäle. Kir-Kanäle haben nur bei negativen Spannungswerten eine hohe Offenwahrscheinlichkeit (Hanser und Scholtyssek, 2000), TRPC5 jedoch sowohl bei negativen als auch bei positiven Spannungswerten (Semtner, 2010). Ein Vorteil der TRPC5-basierten Messmethode ist daher, dass Stromdichtezunahmen in Einwärts- als auch in Auswärtsrichtung für eine valide Auswertung herangezogen werden können. Bei Kir-Kanal-basierten Messsystemen kann meist nur die Zunahme des Stroms in Einwärtsrichtung ausgelesen werden. Interessanterweise konnte auch teilweise bei den Kir-Kanälen der Auswärtsstrom statistisch ausgewertet werden, wenn die jeweiligen Basalströme subtrahiert worden waren. Dies zeigt, dass die Subtraktion der Basalwerte von den Effekten ein geeignetes Mittel darstellt, um die Selektivität eines Messsystems zu erhöhen.

Bei Vergleich der Effektgröße konnten im TRPC5-basierten Messsystem eindeutig Unterschiede beobachtet werden. Die verschiedenen Stimuli waren in einem unterschiedlichen Ausmaß dazu fähig, den Rezeptor-induzierten TRPC5-Signalweg zu aktivieren. Normiert man beide Effekte auf den  $\text{LaCl}_3$ -Effekt, wird deutlich, dass der  $\mu\text{R}$  und

der 5-HT<sub>1B</sub>R im Vergleich zu den jeweiligen Agonisten-Effekten am stärksten durch einen mechanischen Stimulus aktiviert werden können und der M2R am geringsten. Diese Erkenntnisse geben einen Hinweis auf einen unterschiedlichen Aktivierungsmechanismus durch einen mechanischen Reiz und sprechen letztendlich auch für verschiedene aktive Rezeptorkonformationen.

Obwohl sich im Ionenkanal-basierten Messsystemen die Osmolarität der hypotonen Lösung mit 250 mosm/l von jener in dem FRET-Rezeptorsensor-basierten Messsystem mit 150 mosm/l unterschied, war eine qualitative Aussage über die Klassifizierung der untersuchten Rezeptoren hinsichtlich ihrer Mechanosensitivität untereinander gut möglich. Die Auswertung der um die Basalwerte subtrahierten Effekte unter hypoosmolarer Lösung weist jedoch in allen drei Messsystemen unterschiedliche Favoriten hinsichtlich der Höhe des Effektes unter einem mechanischen Stimulus unter den verschiedenen G<sub>i/o</sub>-PCR auf (s. Tabelle 6). In den Kir-Kanal-basierten Messsystemen erwies sich bei exakt gleicher Klassifizierung zwischen den beiden Kir-Kanal-Konstrukten der  $\alpha_{2A}$ R als am stärksten mechanisch aktivierbar. Im TRPC5-basierten Messsystem war dies jedoch der 5-HT<sub>1B</sub>R und im FRET-Rezeptorsensor-basierten Messsystem der  $\mu$ R. Die Ergebnisse der Normierung der Werte unter hypoosmolarer Lösung auf die jeweiligen Agonistenwerte erlauben eine aussagekräftigere Wertung über die Ausprägtheit der Mechanosensitivität unter den untersuchten Rezeptoren. Werden einzelne Effekte auf Effekte desselben Experiments normiert, ähnelt dies einer Normierung auf einen internen Standard. Er stellt ein Hilfsmittel bei der Validierung quantitativer Analysen dar und ermöglicht die Größeneinordnung eines Effektes im Vergleich zu einem anderen Effekt. Somit dient er als relative Bezugsgröße und erlaubt die Eliminierung von Einflüssen eines Messsystems auf das Ergebnis. Auf diese Weise können auch Effekte aus verschiedenen Messsystemen miteinander verglichen werden. Anhand der mechanisch induzierten Stromdichteveränderung bezogen auf den Agonisten-Effekt konnte in allen drei Messsystemen der 5-HT<sub>1B</sub>R als der Rezeptor mit der größten Tendenz zu Mechanosensitivität definiert werden (s. Tabelle 6).

Der Sensitivität eines Messsystems kommt bezüglich seiner Anwendbarkeit eine große Bedeutung zu. Sie wird in der DIN-Norm DIN 1319 als „Änderung des Wertes der Ausgangsgröße eines Messsystems bezogen auf die sie verursachende Änderung des Wertes der Eingangsgröße“ (Wikipedia-Autoren, 2016) definiert. Bei Vergleich der Sensitivität (oder auch Empfindlichkeit) aller angewandter Messsysteme erwiesen sich das Kir-Kanal-basierte

und das Epac-Sensor-basierte Messsystem als vorrangig (s. Tabelle 6). Eine weiterführende Gegenüberstellung der verschiedenen Messsysteme ist in Tabelle 6 zusammengefasst.

Tabelle 6: Vergleich der angewandten Messsysteme

Messsystem	Kir3.1/3.2 Konventionelle Ganzzellableitung	Kir3.1/3.4 Konventionelle Ganzzellableitung	TRPC5 Konventionelle Ganzzellableitung	Epac-Sensor FRET-Technik	Rezeptorsensor FRET-Technik
Klassifizierung Mechanosensitivität nicht normiert	$\alpha_{2AR} > 5-HT_{1BR}, M2R > \mu R$	$\alpha_{2AR} > 5-HT_{1BR}, M2R > \mu R$	$5-HT_{1BR} > \alpha_{2AR} > M2R > \mu R$	keine Aussage möglich	$\mu R > 5-HT_{1BR} > \alpha_{2AR}$
normiert auf den Agonisten	$5-HT_{1BR} > \alpha_{2AR} > M2R, \mu R$	$5-HT_{1BR} > \alpha_{2AR} > M2R, \mu R$	$5-HT_{1BR} > \mu R > \alpha_{2AR} > M2R$		$5-HT_{1BR} > \mu R > \alpha_{2AR}$
Sensitivität des Messsystems	+++	+++	++	++ bis +++	+ bis ++
Basalaktivitätsbestimmung	sehr gut möglich	sehr gut möglich	möglich	nicht möglich	nicht möglich
Dauer der Messung	3 - 5 Min.	3 - 5 Min.	3 - 5 Min.	10 - 30 Min.	5 - 10 Min.
Reproduzierbarkeit	sehr gut	sehr gut	gut	mittel	mittel
Mögliche Störgrößen	Verstärkerrauschen, Leckströme, Störungen durch unzureichende Erdung, Pumpe	s. Kir3.1/3.2	s. Kir3.1/3.2	Hintergrundfluoreszenz, bereits verdaute Fluorophore, aggregierte Fluorophore, Tageslicht	Unspezifische FIAsh-Bindung, Toxizität von FIAsh, Lichtempfindlichkeit FIAsh, Tageslicht
Störgrößen-Einfluss	gering	gering	gering	groß	groß bis sehr groß
Zellbeeinträchtigung	hoch	hoch	hoch	gering	gering
Durchführbarkeit	einfach	einfach	einfach	komplex	schwierig
Effekteinschätzung während Messung (Kinetik, Größe)	sehr gut	sehr gut	sehr gut	schwierig	schwierig

Vergleich der angewandten Messsysteme anhand der Ergebnisse für  $G_{i/o}$ -PCR. Die Klassifizierung der mechanosensitiven Eigenschaft der Rezeptoren wurde einerseits anhand nicht normierter, jedoch um den Basalwert subtrahierte Werte vorgenommen und andererseits anhand der Effekte unter hypoosmolarer Lösung normiert auf die jeweiligen Agonisten-Effekte. Weitere Erläuterungen siehe Text.

#### 4.5 Ausblick

In der vorliegenden Arbeit wurde die Mechanosensitivität verschiedener  $G_{i/o}$ -PCR und  $G_s$ -PCR untersucht. Die Ergebnisse zeigen, dass mechanosensitive GPCR aus allen Subfamilien existieren. Daraus ergibt sich die unmittelbare Frage nach der Identität des Aminosäureabschnittes im Rezeptor, der die Mechanosensitivität vermittelt. Sollte eine konservierte Sequenz existieren, würde dies nicht nur darauf hinweisen, dass verschiedene GPCR einem gleichen Mechanismus für die mechanische Aktivierung unterliegen; es würde auch eine Möglichkeit darstellen, Mechanosensitivität in der Rezeptorenklasse *a priori* vorauszusagen. Zusätzlich wäre es interessant, ob eine mechanische Aktivierung des Rezeptors durch einen distinkten Konformationszustand gekennzeichnet ist. Dies wäre ein Meilenstein in der GPCR-Forschung, der dabei helfen würde, die bekannten GPCR hinsichtlich ihrer Mechanosensitivität zu klassifizieren und damit die Ausbreitung des Phänomens der mechanischen Aktivierbarkeit als physiologisches Prinzip auf weitere Zellen, Gewebetypen und Organe zu untersuchen. Tatsächlich gibt es Hinweise darauf, dass nicht nur verschiedene partielle Agonisten bzw. Liganden unterschiedliche aktive Rezeptorkonformationen hervorrufen (Bätz *et al.*, 2011; Swaminath *et al.*, 2004; Zurn *et al.*,

2009). Auch prototypische Klasse A GPCR nehmen womöglich nach mechanischer Aktivierung eine andere aktive Konformation ein als nach Agonisten-induzierter Aktivierung (Cabana *et al.*, 2015; Yasuda *et al.*, 2008). Dies unterstützt die Hypothese für die Existenz eines spezifischen Konformationszustandes für die mechanische Aktivierung von GPCR. Naheliegender wäre daher die Konstruktion von GPCR-Mutanten, die an unterschiedlichen definierten Positionen Fluorophore oder Bindestellen für ebensolche besitzen. Anhand von FRET-Experimenten könnten so mittels der verschiedenen Mutanten die Bewegungen des Rezeptors nach Agonistenstimulation und der Applikation eines mechanischen Reizes miteinander verglichen und analysiert werden. Dabei wäre zusätzlich eine Aussage über die an der Mechanosensitivität beteiligten Aminosäureabschnitte möglich. Alternativ wäre ein bioinformatischer Vergleich einer großen Anzahl an GPCR-Strukturen denkbar, mit der Hoffnung, durch das Ausschlussprinzip mechanosensitive Strukturen innerhalb der Rezeptoren zu identifizieren.

Interessant wäre zu untersuchen, ob durch den Einsatz des derzeit sensitivsten cAMP-Sensors Epac-S<sup>H187</sup> eine Darstellung der mechanisch induzierten Aktivierung endogen exprimierter G<sub>i/o</sub>-PCR möglich wäre. Dazu könnten beispielsweise Zelllinien eingesetzt werden, die einen spezifischen G<sub>i/o</sub>-PCR besonders hoch endogen exprimieren wie z.B. die Glatte-Muskel-Zelllinie aus humanen Magenzellen (engl. *Human Gastric Smooth Muscle Cells*, *HGSMC*). Diese Zellen besitzen ein erhöhtes Maß an muskarinischen Acetylcholinrezeptoren (Cao *et al.*, 2001).

Da der Ablauf einer Aktivierung des TRPC5 durch G<sub>i/o</sub>-PCR und die Regulation von TRPC5 durch G<sub>s</sub>-PCR bislang noch weitestgehend unbekannt ist, wäre es aufschlussreich, eine Untersuchung der Interaktion zwischen Rezeptor und Kanal durchzuführen. Beispielsweise könnte hier mittels intermolekularer FRET-Technik bestimmt werden, ob die G<sub>αi/o</sub>-Untereinheit oder die PLCδ direkt mit dem Kanal interagieren. Eine Aufklärung des detaillierten Signalwegs könnten die Kanäle als universal einsetzbares Werkzeug bei der Untersuchung von GPCR aller Subfamilien etablieren.

## Zusammenfassung

Ziel der vorliegenden Arbeit war es, die Mechanosensitivität  $G_{i/o}$ -Protein gekoppelter Rezeptoren ( $G_{i/o}$ -PCR) zu untersuchen. Zur Beantwortung dieser Fragestellung wurden die Patch-Clamp-Technik und Fluoreszenz-basierte Methoden etabliert und angewandt.

In heteromeren Kir3.1/3.2- oder Kir3.1/3.4-Kanalkomplex exprimierenden CHO-K1-Zellen wurde einer der  $G_{i/o}$ -PCR  $\alpha_{2A}$ , 5-HT<sub>1B</sub>, M2 oder  $\mu$  koexprimiert und mittels konventionellen Ganzzelleableitungen untersucht. Kir3.X-Kanäle werden durch die  $\beta\gamma$ -Untereinheit des  $G_{i/o}$ -Proteins direkt aktiviert. Die Applikation von hypoosmolarer Lösung führte zu einer Aktivierung der Kanäle durch osmotisch bedingte Membrandehnung, ersichtlich an signifikanten Zunahmen der Stromdichten. In einem weiteren Ionenkanal-basierten Messsystem wurden TRPC5-Kanäle mit entweder  $\alpha_{2A}$ , 5-HT<sub>1B</sub>, M2-,  $\mu$ -Rezeptoren oder einem der  $G_s$ -Protein gekoppelten Rezeptoren ( $G_s$ -PCR)  $\beta_2$ , 5-HT<sub>7A</sub>, CGRP oder VPAC1 in HEK293-Zellen koexprimiert. Obwohl die genaue Signaltransduktion der Aktivierung noch nicht aufgeklärt ist, zeigten die G-Protein gekoppelten Rezeptoren (GPCR) aus beiden Subfamilien bis auf den  $\beta_2$ -Adrenozeptor signifikante Zunahmen in der Stromdichte unter hypoosmotisch induzierter Membrandehnung. Die Bestätigung dieser Ergebnisse sollte anhand einer weiteren unabhängigen Methode mit Hilfe von Epac-basierten cAMP-Sensoren erfolgen. Sechs verschiedene Sensoren waren durch  $G_s$ -PCR-vermittelte cAMP-Zunahmen in HEK293-Zellen charakterisiert worden. Durch Optimierung der Methode und durch Einsatz des Sensors Epac-S<sup>H187</sup> konnte eine  $G_{i/o}$ -PCR-vermittelte cAMP-Abnahme ohne Vorstimulation durch Forskolin robust nachgewiesen werden. Die hohe Sensitivität der cAMP-Sensoren führte zur Detektion mechanisch aktivierbarer endogener Rezeptoren in HEK293-Zellen. Daher eignete sich diese Methode nicht zur Diskriminierung zwischen mechanosensitiven endogenen und überexprimierten GPCR. Der Einsatz einer weiteren FRET-Sensor-basierten Methode, die ein intramolekulares dynamisches GPCR-FRET darstellt, erlaubte die Bestätigung der Ergebnisse aus den elektrophysiologischen Untersuchungen für den  $\alpha_{2A}$ , 5-HT<sub>1B</sub>- und  $\mu$ -Rezeptor. Die Umklonierung zu GPCR-FRET-Sensoren erfolgte für die zwei letztgenannten Rezeptoren durch die Insertion eines türkis fluoreszierenden Proteins am Carboxy-Terminus und eines Bindemotivs für einen gelb fluoreszierenden Fluorophor in die dritte intrazelluläre Schleife von Wildtyprezeptoren. Unter hypoosmolarer Stimulation kam es bei der Untersuchung der  $G_{i/o}$ -PCR-basierten Rezeptorsensoren in HEK293-Zellen zu

einer signifikanten FRET-Signalabnahme, die auf eine Konformationsänderung im Rezeptor hinweist.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass neben den bereits bestätigten  $G_{q/11}$ -Proteingekoppelten Rezeptoren auch  $G_{i/o}$ -PCR und  $G_s$ -PCR direkt mechanosensitiv sind. Insbesondere konnte gezeigt werden, dass  $\alpha_{2A}$ -,  $5\text{-HT}_{1B}$ -,  $M2$ -,  $\mu$ -,  $5\text{-HT}_{7A}$ -, CGRP- und VPAC1-Rezeptoren als direkte Mechanosensoren fungieren können. Zur Untersuchung dieser Eigenschaft eignen sich sowohl elektrophysiologische Methoden, die auf Kir3.X- oder TRPC5-Kanälen basieren, als auch optische Fluoreszenz-basierte Methoden mit Rezeptor-Sensoren.

## Summary

The goal of this study was to analyze the mechanosensitivity of  $G_{i/o}$ -protein coupled receptors ( $G_{i/o}$ -PCRs). To address this question, different measuring systems based on either electrophysiological or optical techniques were established and applied.

Electrophysiological whole-cell recordings were performed with CHO-K1 cells co-expressing  $G_{i/o}$ -protein coupled receptors  $\alpha_{2A}$ , 5-HT<sub>1B</sub>, M2 or  $\mu$  along with heteromeric Kir3.1/Kir3.2 or Kir3.1/Kir3.4 channel complexes, respectively. Members of the Kir3.X channel family are directly activated by interaction with the  $\beta\gamma$  subunit of  $G_{i/o}$ -proteins. As a mechanical stimulus hypoosmotically-induced membrane stretch was applied, resulting in a significant increase in current density. Although the precise signaling pathway is still elusive, these effects could be reproduced by a parallel approach in HEK293 cells co-expressing  $G_{i/o}$ -protein coupled receptors  $\alpha_{2A}$ , 5-HT<sub>1B</sub>, M2,  $\mu$  or  $G_s$ -protein coupled receptors  $\beta_2$ , 5-HT<sub>7A</sub>, CGRP or VPAC1 along with TRPC5 channels. Except for  $\beta_2$ AR, all receptors from both subtypes showed significant current increases upon hypoosmotically-induced membrane stretch. To confirm the electrophysiological findings, an independent optical approach was used, utilizing Epac-based cAMP sensors. Six cAMP sensors were compared by determining  $G_s$ -protein coupled receptor mediated increases of intracellular cAMP levels in HEK293 cells. Method optimization and employment of the Epac-S<sup>H187</sup> sensor allowed the reliable detection of  $G_{i/o}$ -protein coupled receptor mediated cAMP level decreases, notably without pretreatment of cells with forskolin. Due to their high sensitivity, FRET-based cAMP sensors were able to detect mechanically-induced receptor activation of endogenous G protein-coupled receptors (GPCRs) in HEK293-cells which were not transfected with a receptor. Therefore, by applying this method the discrimination between mechanosensitive endogenous and overexpressed GPCR was not possible. However, further use of an alternative FRET-based method visualizing intramolecular receptor FRET allowed the confirmation of the electrophysiological findings, validating above described mechanosensitivity for the  $\alpha_{2A}$ , 5-HT<sub>1B</sub> and  $\mu$  receptor. Subcloning the GPCRs into FRET-receptor sensors was achieved by inserting a cyan fluorescent protein at the C-terminus and a binding motif for a yellow fluorophore in the third intracellular loop of the wildtype receptor. FRET measurements in HEK293 cells and activation of those engineered receptors by hypoosmotically-induced membrane stretch caused a significant decrease of the FRET signal, suggesting conformational changes in the

receptor.

In summary, the results demonstrate that not only the previously confirmed  $G_{q/11}$ -protein coupled receptors can act as direct mechanosensors but also  $G_{i/o}$ -and  $G_s$ -protein coupled receptors. Specifically, mechanosensitivity of  $\alpha_{2A}$ , 5-HT<sub>1B</sub>, M2,  $\mu$ , 5-HT<sub>7A</sub>, CGRP and VPAC1 receptors could be demonstrated. Electrophysiological Kir or TRPC5 channel based approaches as well as optical approaches using FRET-receptor sensors are well suitable to study mechanosensitivity of GPCRs.

## Literaturverzeichnis

- Abdul-Majeed, S., Nauli, S. M.** (2011). "Dopamine Receptor Type 5 in the Primary Cilia Has Dual Chemo- and Mechano-Sensory Roles." *Hypertension* 58(2): 325-331.
- Agilent Technologies** (2015), "QuikChange II Site-Directed Mutagenesis Kit, Instruction Manual", zuletzt geprüft am 15.09.16, <https://www.agilent.com/cs/library/usermanuals/Public/200523.pdf>
- Aguila, B., Simaan, M. et al.** (2011). "Study of G protein-coupled receptor/beta-arrestin interactions within endosomes using FRAP." *Methods Mol Biol* 756: 371-380.
- Ahn, S., Shenoy, S. K. et al.** (2004). "Differential kinetic and spatial patterns of  $\beta$ -arrestin and G protein-mediated ERK activation by the angiotensin II receptor." *Journal of Biological Chemistry* 279(34): 35518-35525.
- Albuissou, J., Murthy, S. E. et al.** (2013). "Dehydrated hereditary stomatocytosis linked to gain-of-function mutations in mechanically activated PIEZO1 ion channels." *Nat Commun* 4: 1884.
- Althaus, M., Bogdan, R. et al.** (2007). "Mechano-sensitivity of epithelial sodium channels (ENaCs): laminar shear stress increases ion channel open probability." *FASEB J* 21(10): 2389-2399.
- Attwood, T. K., Findlay, J. B.** (1994). "Fingerprinting G-protein-coupled receptors." *Protein Eng* 7(2): 195-203.
- Atwood, B. K., Lopez, J. et al.** (2011). "Expression of G protein-coupled receptors and related proteins in HEK293, AtT20, BV2, and N18 cell lines as revealed by microarray analysis." *BMC Genomics* 12: 14.
- Avery, O. T., MacLeod, C. M. et al.** (1944). "Studies on the chemical nature of the substance inducing transformation of pneumococcal types induction of transformation by a desoxyribonucleic acid fraction isolated from pneumococcus type III." *The Journal of experimental medicine* 79(2): 137-158.
- Baird, G. S., Zacharias, D. A. et al.** (1999). "Circular permutation and receptor insertion within green fluorescent proteins." *Proc Natl Acad Sci U S A* 96(20): 11241-11246.
- Bajar, B. T., Wang, E. S. et al.** (2016). "A Guide to Fluorescent Protein FRET Pairs." *Sensors (Basel)* 16(9).
- Baltoumas, F. A., Theodoropoulou, M. C. et al.** (2013). "Interactions of the alpha-subunits of heterotrimeric G-proteins with GPCRs, effectors and RGS proteins: a critical review and analysis of interacting surfaces, conformational shifts, structural diversity and electrostatic potentials." *J Struct Biol* 182(3): 209-218.
- Bätz, J., Ziegler, N. et al.** (2011). Fluorescence resonance energy transfer (FRET)-sensors uncover different ligand-specific conformational changes of the M-2 and M-3 muscarinic acetylcholine receptor. *Naunyn-Schmiedbergers Archives Of Pharmacology*, Springer Verlag, 233 Spring Street, New York, NY 10013 USA, Volume 383: Chapter 3, p. 18.
- Beech, D. J.** (2013). "Characteristics of transient receptor potential canonical calcium-permeable channels and their relevance to vascular physiology and disease." *Circ J* 77(3): 570-579.
- Berrera, M., Dodoni, G. et al.** (2008). "A toolkit for real-time detection of cAMP: insights into compartmentalized signaling." *Handb Exp Pharmacol*(186): 285-298.
- Berrier, C., Besnard, M. et al.** (1996). "Multiple mechanosensitive ion channels from *Escherichia coli*, activated at different thresholds of applied pressure." *J Membr Biol* 151(2): 175-187.

**Beurg, M., Evans, M. G. et al.** (2006). "A large-conductance calcium-selective mechanotransducer channel in mammalian cochlear hair cells." Journal of Neuroscience 26(43): 10992-11000.

**Bezerides, V. J., Ramsey, I. S. et al.** (2004). "Rapid vesicular translocation and insertion of TRP channels." Nat Cell Biol 6(8): 709-720.

**Blake, A. D., Bot, G. et al.** (1997). "Differential opioid agonist regulation of the mouse mu opioid receptor." J Biol Chem 272(2): 782-790.

**Bleasdale, J. E., Thakur, N. R. et al.** (1990). "Selective inhibition of receptor-coupled phospholipase C-dependent processes in human platelets and polymorphonuclear neutrophils." J Pharmacol Exp Ther 255(2): 756-768.

**Blodow, S., Schneider, H. et al.** (2014). "Novel role of mechanosensitive AT1B receptors in myogenic vasoconstriction." Pflugers Arch 466(7): 1343-1353.

**Borner, S., Schwede, F. et al.** (2011). "FRET measurements of intracellular cAMP concentrations and cAMP analog permeability in intact cells." Nat Protoc 6(4): 427-438.

**Bos, J. L.** (2003). "Epac: a new cAMP target and new avenues in cAMP research." Nat Rev Mol Cell Biol 4(9): 733-738.

**Brierley, S. M.** (2010). "Molecular basis of mechanosensitivity." Auton Neurosci 153(1-2): 58-68.

**Brooker, G., Harper, J. F. et al.** (1979). "Radioimmunoassay of cyclic AMP and cyclic GMP." Adv Cyclic Nucleotide Res 10: 1-33.

**Brown, T. A.** (2011). *Gentechnologie für Einsteiger*. Heidelberg, Spektrum Akademischer Verlag Heidelberg: Chapter 9, p. 199-214.

**Bunemann, M., Frank, M. et al.** (2003). "Gi protein activation in intact cells involves subunit rearrangement rather than dissociation." Proc Natl Acad Sci U S A 100(26): 16077-16082.

**Cabana, J., Holleran, B. et al.** (2015). "Identification of Distinct Conformations of the Angiotensin-II Type 1 Receptor Associated with the Gq/11 Protein Pathway and the  $\beta$ -Arrestin Pathway Using Molecular Dynamics Simulations." Journal of Biological Chemistry 290(25): 15835-15854.

**Calebiro, D., Maiellaro, I.** (2014). "cAMP signaling microdomains and their observation by optical methods." Front Cell Neurosci 8: 350.

**Candelario, J., Chachisvilis, M.** (2012). "Mechanical stress stimulates conformational changes in 5-hydroxytryptamine receptor 1B in bone cells." Cellular and Molecular Bioengineering 5(3): 277-286.

**Cao, W., Chen, Q. et al.** (2001). "Ca<sup>2+</sup>-induced contraction of cat esophageal circular smooth muscle cells." Am J Physiol Cell Physiol 280(4): C980-992.

**Ceraudo, E., Galanth, C. et al.** (2014). "Biased Signaling Favoring G(i) over  $\beta$ -Arrestin Promoted by an Apelin Fragment Lacking the C-terminal Phenylalanine." J Biol Chem 289(35): 24599-24610.

**Chachisvilis, M., Zhang, Y. L. et al.** (2006). "G protein-coupled receptors sense fluid shear stress in endothelial cells." Proc Natl Acad Sci U S A 103(42): 15463-15468.

**Chan, W. T., Verma, C. S. et al.** (2013). "A comparison and optimization of methods and factors affecting the transformation of Escherichia coli." Biosci Rep 33(6).

**Cheng, X., Ji, Z. et al.** (2008). "Epac and PKA: a tale of two intracellular cAMP receptors." Acta Biochim Biophys Sin (Shanghai) 40(7): 651-662.

**Chisari, M., Saini, D. K. et al.** (2009). "G protein subunit dissociation and translocation regulate cellular response to receptor stimulation." PLoS One 4(11): e7797.

**Christensen, A. P., Corey, D. P.** (2007). "TRP channels in mechanosensation: direct or indirect activation?" Nat Rev Neurosci 8(7): 510-521.

**Chuang, L.-Y., Cheng, Y.-H. et al.** (2013). "Specific primer design for the polymerase chain reaction." *Biotechnology Letters* 35(10): 1541-1549.

**Clapham, D. E., Julius, D. et al.** (2005). "International Union of Pharmacology. XLIX. Nomenclature and structure-function relationships of transient receptor potential channels." *Pharmacol Rev* 57(4): 427-450.

**Corey, S., Krapivinsky, G. et al.** (1998). "Number and stoichiometry of subunits in the native atrial G-protein-gated K<sup>+</sup> channel, IKACH." *J Biol Chem* 273(9): 5271-5278.

**Coste, B., Mathur, J. et al.** (2010). "Piezo1 and Piezo2 are essential components of distinct mechanically activated cation channels." *Science* 330(6000): 55-60.

**Craeto, C. J.** (2010). "Hydrophobicity profiles in G protein-coupled receptor transmembrane helical domains." *J Receptor Ligand Channel Res* 2010(3): 123-133.

**Dascal, N.** (1997). "Signalling via the G protein-activated K<sup>+</sup> channels." *Cell Signal* 9(8): 551-573.

**Dean, K. M., Palmer, A. E.** (2014). "Advances in fluorescence labeling strategies for dynamic cellular imaging." *Nat Chem Biol* 10(7): 512-523.

**Delmas, P., Hao, J. et al.** (2011). "Molecular mechanisms of mechanotransduction in mammalian sensory neurons." *Nature Reviews Neuroscience* 12(3): 139-153.

**Depry, C., Zhang, J.** (2010). "Visualization of kinase activity with FRET-based activity biosensors." *Curr Protoc Mol Biol* Chapter 18: Unit 18.15.

**Deupi, X., Kobilka, B. K.** (2010). "Energy landscapes as a tool to integrate GPCR structure, dynamics, and function." *Physiology (Bethesda)* 25(5): 293-303.

**DeWire, S. M., Ahn, S. et al.** (2007). "Beta-arrestins and cell signaling." *Annu Rev Physiol* 69: 483-510.

**Dickson, L., Finlayson, K.** (2009). "VPAC and PAC receptors: From ligands to function." *Pharmacol Ther* 121(3): 294-316.

**Dieffenbach, C., Lowe, T. et al.** (1993). "General concepts for PCR primer design." *PCR Methods Appl* 3(3): S30-S37.

**Digby, G. J., Lober, R. M. et al.** (2006). "Some G protein heterotrimers physically dissociate in living cells." *Proc Natl Acad Sci U S A* 103(47): 17789-17794.

**DiPilato, L. M., Cheng, X. et al.** (2004). "Fluorescent indicators of cAMP and Epac activation reveal differential dynamics of cAMP signaling within discrete subcellular compartments." *Proc Natl Acad Sci U S A* 101(47): 16513-16518.

**DiRaddo, J. O., Miller, E. J. et al.** (2014). "A real-time method for measuring cAMP production modulated by Galphai/o-coupled metabotropic glutamate receptors." *J Pharmacol Exp Ther* 349(3): 373-382.

**Doucette, J., Zhao, Z. et al.** (2016). "Flow Cytometry Enables Multiplexed Measurements of Genetically Encoded Intramolecular FRET Sensors Suitable for Screening." *J Biomol Screen* 21(6): 535-547.

**Ducret, T., El Arrouchi, J. et al.** (2010). "Stretch-activated channels in pulmonary arterial smooth muscle cells from normoxic and chronically hypoxic rats." *Cell calcium* 48(5): 251-259.

**Ellisdon, A. M., Halls, M. L.** (2016). "Compartmentalization of GPCR signalling controls unique cellular responses." *Biochemical Society Transactions* 44(2): 562-567.

**Ernstrom, G. G., Chalfie, M.** (2002). "Genetics of sensory mechanotransduction." *Annu Rev Genet* 36: 411-453.

**Fang, Y., Kenakin, T. et al.** (2015). "Editorial: Orphan GPCRs As Emerging Drug Targets." *Front Pharmacol* 6: 295.

**Förster, T.** (1948). "Zwischenmolekulare Energiewanderung und Fluoreszenz." *Annalen der Physik* 437(1-2): 55-75.

**Gabrowski, G.** (2005), "Zielgerichtete Mutagenese(I)", zuletzt geprüft am 13.09.2016, <http://www.laborjournal.de/rubric/methoden/methoden/v62.lasso>

**Garland, S. L.** (2013). "Are GPCRs still a source of new targets?" *J Biomol Screen* 18(9): 947-966.

**Gesellchen, F., Stangherlin, A. et al.** (2011). "Measuring spatiotemporal dynamics of cyclic AMP signaling in real-time using FRET-based biosensors." *Methods Mol Biol* 746: 297-316.

**Ghosh, E., Kumari, P. et al.** (2015). "Methodological advances: the unsung heroes of the GPCR structural revolution." *Nat Rev Mol Cell Biol* 16(2): 69-81.

**Giepmans, B. N., Adams, S. R. et al.** (2006). "The fluorescent toolbox for assessing protein location and function." *Science* 312(5771): 217-224.

**Gillespie, P. G., Muller, U.** (2009). "Mechanotransduction by hair cells: models, molecules, and mechanisms." *Cell* 139(1): 33-44.

**Glass, M., Felder, C. C.** (1997). "Concurrent Stimulation of Cannabinoid CB1 and Dopamine D2 Receptors Augments cAMP Accumulation in Striatal Neurons: Evidence for a G<sub>s</sub> Linkage to the CB1 Receptor." *The Journal of Neuroscience* 17(14): 5327-5333.

**Godinho, R. O., Duarte, T. et al.** (2015). "New perspectives in signaling mediated by receptors coupled to stimulatory G protein: the emerging significance of cAMP efflux and extracellular cAMP-adenosine pathway." *Front Pharmacol* 6: 58.

**Goedhart, J., van Weeren, L. et al.** (2010). "Bright cyan fluorescent protein variants identified by fluorescence lifetime screening." *Nat Methods* 7(2): 137-139.

**Goedhart, J., von Stetten, D. et al.** (2012). "Structure-guided evolution of cyan fluorescent proteins towards a quantum yield of 93%." *Nat Commun* 3: 751.

**Goel, M., Zuo, C. D. et al.** (2010). "Role of cAMP/PKA signaling cascade in vasopressin-induced trafficking of TRPC3 channels in principal cells of the collecting duct." *Am J Physiol Renal Physiol* 298(4): F988-996.

**Gomis, A., Soriano, S. et al.** (2008). "Hypoosmotic- and pressure-induced membrane stretch activate TRPC5 channels." *J Physiol* 586(23): 5633-5649.

**Grover, N.** (2006). Principles of biochemistry. *Biochemistry and Molecular Biology Education*, John Wiley & Sons Inc., Volume 34, p. 162-163.

**Gudermann, T., Mederos y Schnitzler, M.** (2010). "Phototransduction: keep an eye out for acid-labile TRPs." *Curr Biol* 20(4): R149-152.

**Hamill, O. P., Martinac, B.** (2001). "Molecular basis of mechanotransduction in living cells." *Physiol Rev* 81(2): 685-740.

**Hamm, H. E.** (1998). "The many faces of G protein signaling." *J Biol Chem* 273(2): 669-672.

**Hanser, H., Scholtyssek, C.** (2000), Deutschland, "Lexikon der Neurowissenschaft, Eintrag "Gleichrichtung"", zuletzt geprüft am 02.08.2017, <http://www.spektrum.de/lexikon/neurowissenschaft/gleichrichtung/4758>

**Hein, P., Frank, M. et al.** (2005). "Dynamics of receptor/G protein coupling in living cells." *EMBO J* 24(23): 4106-4114.

**Hein, P., Rochais, F. et al.** (2006). "Gs activation is time-limiting in initiating receptor-mediated signaling." *J Biol Chem* 281(44): 33345-33351.

**Herenbrink, C. K., Sykes, D. A. et al.** (2016). "The role of kinetic context in apparent biased agonism at GPCRs." *Nature communications* 7.

**Hermans, E.** (2003). "Biochemical and pharmacological control of the multiplicity of coupling at G-protein-coupled receptors." *Pharmacol Ther* 99(1): 25-44.

**Hibino, H., Inanobe, A. et al.** (2010). "Inwardly Rectifying Potassium Channels: Their Structure, Function, and Physiological Roles." *Physiological Reviews* 90(1): 291-366.

**Hidaka, M., Gotoh, A. et al.** (2016). "Visualization of NO<sub>3</sub>(-)/NO<sub>2</sub>(-) Dynamics in Living Cells by Fluorescence Resonance Energy Transfer (FRET) Imaging Employing a Rhizobial Two-component Regulatory System." *J Biol Chem* 291(5): 2260-2269.

**Hoffmann, C., Gaietta, G. et al.** (2005). "A FAsH-based FRET approach to determine G protein-coupled receptor activation in living cells." *Nature methods* 2(3): 171-176.

**Hoffmann, C., Gaietta, G. et al.** (2010). "Fluorescent labeling of tetracysteine-tagged proteins in intact cells." *Nat Protoc* 5(10): 1666-1677.

**Hong, C., Kim, J. et al.** (2012). "Gs cascade regulates canonical transient receptor potential 5 (TRPC5) through cAMP mediated intracellular Ca<sup>2+</sup> release and ion channel trafficking." *Biochem Biophys Res Commun* 421(1): 105-111.

**Hughes-Fulford, M.** (2004). "Signal transduction and mechanical stress." *Sci STKE* 2004(249): Re12.

**Inoue, H., Nojima, H. et al.** (1990). "High efficiency transformation of *Escherichia coli* with plasmids." *Gene* 96(1): 23-28.

**Jakubik, J., Janickova, H. et al.** (2011). "Subtype differences in pre-coupling of muscarinic acetylcholine receptors." *PLoS One* 6(11): e27732.

**Jemal, I., Soriano, S. et al.** (2014). "G protein-coupled receptor signalling potentiates the osmo-mechanical activation of TRPC5 channels." *Pflugers Arch* 466(8): 1635-1646.

**Jeon, J. P., Hong, C. et al.** (2012). "Selective Gα<sub>q</sub> subunits as novel direct activators of transient receptor potential canonical (TRPC)4 and TRPC5 channels." *J Biol Chem* 287(21): 17029-17039.

**Jeon, J. P., Thakur, D. P. et al.** (2016). "Regulator of G-protein signalling and GoLoco proteins suppress TRPC4 channel function via acting at Gα(i/o)." *Biochem J* 473(10): 1379-1390.

**Ji, S., John, S. A. et al.** (1998). "Mechanosensitivity of the cardiac muscarinic potassium channel. A novel property conferred by Kir3.4 subunit." *J Biol Chem* 273(3): 1324-1328.

**Jones, D. T., Reed, R. R.** (1989). "Golf: an olfactory neuron specific-G protein involved in odorant signal transduction." *Science* 244(4906): 790-795.

**Kamkin, A., Kiseleva, I.** (2005). *Mechanosensitivity of Cells from Various Tissues. Mechanosensitivity in Cells and Tissues.* Moscow, Academia Publishing House Ltd.: Section Editorial/Introduction.

**Kawashima, Y., Kurima, K. et al.** (2015). "Transmembrane channel-like (TMC) genes are required for auditory and vestibular mechanosensation." *Pflügers Archiv - European Journal of Physiology* 467(1): 85-94.

**Kaziro, Y., Itoh, H. et al.** (1991). "Structure and function of signal-transducing GTP-binding proteins." *Annu Rev Biochem* 60: 349-400.

**Kenakin, T., Christopoulos, A.** (2013). "Signalling bias in new drug discovery: detection, quantification and therapeutic impact." *Nature reviews Drug discovery* 12(3): 205-216.

**Kim, H., Kim, J. et al.** (2012). "The roles of G proteins in the activation of TRPC4 and TRPC5 transient receptor potential channels." *Channels (Austin)* 6(5): 333-343.

**Klarenbeek, J., Goedhart, J. et al.** (2015). "Fourth-Generation Epac-Based FRET Sensors for cAMP Feature Exceptional Brightness, Photostability and Dynamic Range: Characterization of Dedicated Sensors for FLIM, for Ratiometry and with High Affinity." *PLoS One* 10(4).

**Klarenbeek, J., Jalink, K.** (2014). "Detecting cAMP with an EPAC-based FRET sensor in single living cells." *Methods Mol Biol* 1071: 49-58.

**Klarenbeek, J. B., Goedhart, J. et al.** (2011). "A mTurquoise-based cAMP sensor for both FLIM and ratiometric read-out has improved dynamic range." *PLoS One* 6(4): e19170.

**Klarenbeek, J. B., Goedhart, J. et al.** (2011). "A mTurquoise-Based cAMP Sensor for Both FLIM and Ratiometric Read-Out Has Improved Dynamic Range." *PLoS One* 6(4).

**Kobilka, B.** (2013). "The structural basis of G-protein-coupled receptor signaling (Nobel Lecture)." *Angew Chem Int Ed Engl* 52(25): 6380-6388.

**Kocer, A.** (2015). "Mechanisms of mechanosensing - mechanosensitive channels, function and re-engineering." *Curr Opin Chem Biol* 29: 120-127.

**Koike-Tani, M., Collins, J. M. et al.** (2005). "Signal transduction pathway for the substance P-induced inhibition of rat Kir3 (GIRK) channel." *J Physiol* 564(Pt 2): 489-500.

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

**Krapivinsky, G., Krapivinsky, L. et al.** (1995). "G beta gamma binds directly to the G protein-gated K<sup>+</sup> channel, IKACH." *J Biol Chem* 270(49): 29059-29062.

**Kremers, G. J., Goedhart, J. et al.** (2006). "Cyan and yellow super fluorescent proteins with improved brightness, protein folding, and FRET Forster radius." *Biochemistry* 45(21): 6570-6580.

**Kung, C.** (2005). "A possible unifying principle for mechanosensation." *Nature* 436(7051): 647-654.

**Kvachnina, E., Liu, G. et al.** (2005). "5-HT<sub>7</sub> receptor is coupled to G alpha subunits of heterotrimeric G<sub>12</sub>-protein to regulate gene transcription and neuronal morphology." *J Neurosci* 25(34): 7821-7830.

**Langer, I.** (2012). "Conformational switches in the VPAC(1) receptor." *Br J Pharmacol* 166(1): 79-84.

**Lee, Y. M., Kim, B. J. et al.** (2003). "TRPC5 as a candidate for the nonselective cation channel activated by muscarinic stimulation in murine stomach." *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 284(4): G604-616.

**Lefkowitz, R. J., Shenoy, S. K.** (2005). "Transduction of receptor signals by beta-arrestins." *Science* 308(5721): 512-517.

**Lei, Q., Talley, E. M. et al.** (2001). "Receptor-mediated inhibition of G protein-coupled inwardly rectifying potassium channels involves G(alpha)q family subunits, phospholipase C, and a readily diffusible messenger." *J Biol Chem* 276(20): 16720-16730.

**Liggett, S. B.** (2011). "Phosphorylation barcoding as a mechanism of directing GPCR signaling." *Sci Signal* 4(185): pe36.

**Liu, C., Montell, C.** (2015). "Forcing open TRP channels: Mechanical gating as a unifying activation mechanism." *Biochem Biophys Res Commun* 460(1): 22-25.

**Lohse, M. J., Hoffmann, C.** (2014). "Arrestin interactions with G protein-coupled receptors." *Handb Exp Pharmacol* 219: 15-56.

**Lohse, M. J., Nikolaev, V. O. et al.** (2008). "Optical techniques to analyze real-time activation and signaling of G-protein-coupled receptors." *Trends Pharmacol Sci* 29(3): 159-165.

**Lohse, M. J., Nuber, S. et al.** (2012). "Fluorescence/Bioluminescence Resonance Energy Transfer Techniques to Study G-Protein-Coupled Receptor Activation and Signaling." *Pharmacological Reviews* 64(2): 299-336.

**Lohse, M. J., Vilardaga, J. P. et al.** (2003). "Direct optical recording of intrinsic efficacy at a G protein-coupled receptor." *Life Sci* 74(2-3): 397-404.

**Luttrell, L. M., Lefkowitz, R. J.** (2002). "The role of beta-arrestins in the termination and transduction of G-protein-coupled receptor signals." *J Cell Sci* 115(Pt 3): 455-465.

**Maier-Peuschel, M., Frolich, N. et al.** (2010). "A fluorescence resonance energy transfer-based M2 muscarinic receptor sensor reveals rapid kinetics of allosteric modulation." *J Biol Chem* 285(12): 8793-8800.

- Makino, A., Prossnitz, E. R. et al.** (2006). "G protein-coupled receptors serve as mechanosensors for fluid shear stress in neutrophils." *Am J Physiol Cell Physiol* 290(6): C1633-1639.
- Mangmool, S., Kurose, H.** (2011). "G(i/o) Protein-Dependent and -Independent Actions of Pertussis Toxin (PTX)." *Toxins (Basel)* 3(7): 884-899.
- Masri, B., Salahpour, A. et al.** (2008). "Antagonism of dopamine D2 receptor/ $\beta$ -arrestin 2 interaction is a common property of clinically effective antipsychotics." *Proceedings of the National Academy of Sciences* 105(36): 13656-13661.
- McCarter, G. C., Reichling, D. B. et al.** (1999). "Mechanical transduction by rat dorsal root ganglion neurons in vitro." *Neuroscience letters* 273(3): 179-182.
- Mederos y Schnitzler, M., Storch, U. et al.** (2011). "AT1 receptors as mechanosensors." *Curr Opin Pharmacol* 11(2): 112-116.
- Mederos y Schnitzler, M., Storch, U. et al.** (2016). "Mechanosensitive Gq/11-protein coupled receptors mediate myogenic vasoconstriction." *Microcirculation*: n/a-n/a.
- Mederos y Schnitzler, M., Storch, U. et al.** (2016). "Mechanosensitive Gq/11 -protein coupled receptors mediate myogenic vasoconstriction." *Microcirculation*.
- Mederos y Schnitzler, M., Storch, U. et al.** (2008). "Gq-coupled receptors as mechanosensors mediating myogenic vasoconstriction." *Embo j* 27(23): 3092-3103.
- Miller, M., Shi, J. et al.** (2011). "Identification of ML204, a Novel Potent Antagonist That Selectively Modulates Native TRPC4/C5 Ion Channels." *J Biol Chem* 286(38): 33436-33446.
- Milligan, G., Kostenis, E.** (2006). "Heterotrimeric G-proteins: a short history." *Br J Pharmacol* 147 Suppl 1: S46-55.
- Mülhardt, C.** (2013). Die Klonierung von DNA-Fragmenten. *Der Experimentator Molekularbiologie/Genomics*. Berlin, Heidelberg, Springer Verlag: Kapitel 6.1, S.133-161.
- Müller, S. M., Galliardt, H. et al.** (2013). "Quantification of Förster resonance energy transfer by monitoring sensitized emission in living plant cells." *Front Plant Sci* 4.
- Munk, C., Isberg, V. et al.** (2016). "GPCRdb: the G protein-coupled receptor database – an introduction." *Br J Pharmacol* 173(14): 2195-2207.
- Nagai, T., Ibata, K. et al.** (2002). "A variant of yellow fluorescent protein with fast and efficient maturation for cell-biological applications." *Nat Biotechnol* 20(1): 87-90.
- Neher, E., Sakmann, B.** (1976). "Single-channel currents recorded from membrane of denervated frog muscle fibres." *Nature* 260(5554): 799-802.
- Niisato, N., Post, M. et al.** (1999). "Cell Swelling Activates Stress-Activated Protein Kinases, p38 MAP Kinase and JNK, in Renal Epithelial A6 Cells." *Biochemical and Biophysical Research Communications* 266(2): 547-550.
- Nikolaev, V. O., Bunemann, M. et al.** (2004). "Novel single chain cAMP sensors for receptor-induced signal propagation." *J Biol Chem* 279(36): 37215-37218.
- Nikolaev, V. O., Gambaryan, S. et al.** (2005). "Real-time monitoring of the PDE2 activity of live cells: hormone-stimulated cAMP hydrolysis is faster than hormone-stimulated cAMP synthesis." *J Biol Chem* 280(3): 1716-1719.
- Nilius, B., Honore, E.** (2012). "Sensing pressure with ion channels." *Trends Neurosci* 35(8): 477-486.
- Nishimura, A., Kitano, K. et al.** (2010). "Structural basis for the specific inhibition of heterotrimeric Gq protein by a small molecule." *Proc Natl Acad Sci U S A* 107(31): 13666-13671.
- Nobles, M., Benians, A. et al.** (2005). "Heterotrimeric G proteins precouple with G protein-coupled receptors in living cells." *Proc Natl Acad Sci U S A* 102(51): 18706-18711.

**Nuber, S., Zabel, U. et al.** (2016). "beta-Arrestin biosensors reveal a rapid, receptor-dependent activation/deactivation cycle." *Nature* 531(7596): 661-664.

**Obukhov, A. G., Nowycky, M. C.** (2005). "A cytosolic residue mediates Mg<sup>2+</sup> block and regulates inward current amplitude of a transient receptor potential channel." *J Neurosci* 25(5): 1234-1239.

**Oka, Y., Saraiva, L. R. et al.** (2009). "The fifth class of Gα proteins." *Proc Natl Acad Sci U S A* 106(5): 1484-1489.

**Olafsen, T., Kenanova, V. E. et al.** (2006). "Tunable pharmacokinetics: modifying the in vivo half-life of antibodies by directed mutagenesis of the Fc fragment." *Nat Protoc* 1(4): 2048-2060.

**Oldham, W. M., Hamm, H. E.** (2008). "Heterotrimeric G protein activation by G-protein-coupled receptors." *Nat Rev Mol Cell Biol* 9(1): 60-71.

**Oliet, S. H. R., Bourque, C.** (1993). "Mechanosensitive channels transduce osmosensitivity in supraoptic neurons." *Nature* 364: 341.

**Pardatscher, F. M.** (2015). "Die Rolle des C-Terminus in der Regulation der TRPC5-Kanäle", Dissertation, Ludwigs-Maximilians-Universität München, München, Walther-Straub-Institut für Pharmakologie und Toxikologie, zuletzt geprüft am 17.08.2017, [https://edoc.ub.uni-muenchen.de/19849/1/Pardatscher\\_Franziska.pdf](https://edoc.ub.uni-muenchen.de/19849/1/Pardatscher_Franziska.pdf)

**Park, J. Y., Lee, S. Y. et al.** (2016). "Structural mechanism of GPCR-arrestin interaction: recent breakthroughs." *Archives of Pharmacal Research* 39(3): 293-301.

**Plant, T. D.** (2014). "TRPs in mechanosensing and volume regulation." *Handb Exp Pharmacol* 223: 743-766.

**Ponsioen, B., Zhao, J. et al.** (2004). "Detecting cAMP-induced Epac activation by fluorescence resonance energy transfer: Epac as a novel cAMP indicator." *EMBO Rep* 5(12): 1176-1180.

**Ponting, C. P., Bork, P.** (1996). "Pleckstrin's repeat performance: a novel domain in G-protein signaling?" *Trends Biochem Sci* 21(7): 245-246.

**Qiao, J., Mei, F. C. et al.** (2002). "Cell cycle-dependent subcellular localization of exchange factor directly activated by cAMP." *J Biol Chem* 277(29): 26581-26586.

**Quail, M. A.** (2001). "DNA Cloning." *Wiley Online Library*.

**Rajagopal, S., Rajagopal, K. et al.** (2010). "Teaching old receptors new tricks: biasing seven-transmembrane receptors." *Nat Rev Drug Discov* 9(5): 373-386.

**Rakesh, K., Yoo, B. et al.** (2010). "beta-Arrestin-biased agonism of the angiotensin receptor induced by mechanical stress." *Sci Signal* 3(125): ra46.

**Ranade, S. S., Syeda, R. et al.** (2015). "Mechanically Activated Ion Channels." *Neuron* 87(6): 1162-1179.

**Rankovic, Z., Brust, T. F. et al.** (2016). "Biased agonism: An emerging paradigm in GPCR drug discovery." *Bioorganic & medicinal chemistry letters* 26(2): 241-250.

**Rehmann, H., Schwede, F. et al.** (2003). "Ligand-mediated activation of the cAMP-responsive guanine nucleotide exchange factor Epac." *J Biol Chem* 278(40): 38548-38556.

**Rehmann, H., Wittinghofer, A. et al.** (2007). "Capturing cyclic nucleotides in action: snapshots from crystallographic studies." *Nat Rev Mol Cell Biol* 8(1): 63-73.

**Rosenbaum, D. M., Rasmussen, S. G. et al.** (2009). "The structure and function of G-protein-coupled receptors." *Nature* 459(7245): 356-363.

**Rosenbaum, D. M., Rasmussen S, G. F. et al.** (2009). "The structure and function of G-protein-coupled receptors." *Nature* 459(7245): 356-363.

**Salonikidis, P. S., Niebert, M. et al.** (2011). "An ion-insensitive cAMP biosensor for long term quantitative ratiometric fluorescence resonance energy transfer (FRET) measurements under variable physiological conditions." *J Biol Chem* 286(26): 23419-23431.

- Sambrook, J., Russell, D. W.** (2006). "The inoue method for preparation and transformation of competent *e. coli*: "ultra-competent" cells." *CSH Protoc* 2006(1).
- Schaefer, M., Plant, T. D. et al.** (2000). "Receptor-mediated regulation of the nonselective cation channels TRPC4 and TRPC5." *J Biol Chem* 275(23): 17517-17526.
- Schmidt, M., Dekker, F. J. et al.** (2013). "Exchange protein directly activated by cAMP (epac): a multidomain cAMP mediator in the regulation of diverse biological functions." *Pharmacol Rev* 65(2): 670-709.
- Schonbrunn, A., Steffen, D. L.** (2012), "The Endogenous GPCR List", zuletzt geprüft am 07.12.2016, <http://www.tumor-gene.org/GPCR/qpcr.html>
- Schrenk-Siemens, K., Wende, H. et al.** (2015). "PIEZO2 is required for mechanotransduction in human stem cell-derived touch receptors." *Nat Neurosci* 18(1): 10-16.
- Semtner, M.** (2010). "Elektrophysiologische Charakterisierung des klassischen TRP-Kanals TRPC5.", Dissertation, Philipps-Universität Marburg, Marburg, Pharmakologisches Institut, zuletzt geprüft am 17.08.2017, <http://archiv.ub.uni-marburg.de/diss/z2011/0363/>
- Semtner, M., Schaefer, M. et al.** (2007). "Potentiation of TRPC5 by protons." *J Biol Chem* 282(46): 33868-33878.
- Sexton, J. E., Desmonds, T. et al.** (2016). "The contribution of TRPC1, TRPC3, TRPC5 and TRPC6 to touch and hearing." *Neurosci Lett* 610: 36-42.
- Shen, B., Wong, C. O. et al.** (2015). "Plasma membrane mechanical stress activates TRPC5 channels." *PLoS One* 10(4): e0122227.
- Shenoy, A. R., Visweswariah, S. S.** (2003). "Site-directed mutagenesis using a single mutagenic oligonucleotide and DpnI digestion of template DNA." *Anal Biochem* 319(2): 335-336.
- Shenoy, S. K., Lefkowitz, R. J.** (2005). "Receptor regulation: beta-arrestin moves up a notch." *Nat Cell Biol* 7(12): 1159-1161.
- Shrestha, D., Jenei, A. et al.** (2015). "Understanding FRET as a Research Tool for Cellular Studies." *Int J Mol Sci* 16(4): 6718-6756.
- Siehler, S.** (2009). "Regulation of RhoGEF proteins by G12/13-coupled receptors." *British Journal of Pharmacology* 158(1): 41-49.
- Silver, F. H., Siperko, L. M.** (2003). "Mechanosensing and mechanochemical transduction: how is mechanical energy sensed and converted into chemical energy in an extracellular matrix?" *Crit Rev Biomed Eng* 31(4): 255-331.
- Simon, M. I., Strathmann, M. P. et al.** (1991). "Diversity of G proteins in signal transduction." *Science* 252(5007): 802-808.
- Smrcka, A. V., Hepler, J. R. et al.** (1991). "Regulation of polyphosphoinositide-specific phospholipase C activity by purified Gq." *Science* 251(4995): 804-807.
- Stevens, R. C., Cherezov, V. et al.** (2013). "GPCR Network: a large-scale collaboration on GPCR structure and function." *Nat Rev Drug Discov* 12(1): 25-34.
- Storch, U., Blodow, S. et al.** (2015). "Cysteinyl leukotriene 1 receptors as novel mechanosensors mediating myogenic tone together with angiotensin II type 1 receptors-brief report." *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 35(1): 121-126.
- Storch, U., Forst, A. L. et al.** (2017). "Dynamic NHERF interaction with TRPC4/5 proteins is required for channel gating by diacylglycerol." *Proc Natl Acad Sci U S A* 114(1): E37-e46.
- Storch, U., Mederos y Schnitzler, M. et al.** (2012). "G protein-mediated stretch reception." *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 302(6): H1241-1249.
- Strathmann, M. P., Simon, M. I.** (1991). "G alpha 12 and G alpha 13 subunits define a fourth class of G protein alpha subunits." *Proc Natl Acad Sci U S A* 88(13): 5582-5586.

**Stumpf, A. D., Hoffmann, C.** (2016). "Optical probes based on G protein-coupled receptors - added work or added value?" *Br J Pharmacol* 173(2): 255-266.

**Sukharev, S., Sachs, F.** (2012). "Molecular force transduction by ion channels – diversity and unifying principles." *Journal of Cell Science* 125(13): 3075-3083.

**Sun, Y., Wallrabe, H. et al.** (2011). "FRET microscopy in 2010: The legacy of Theodor Förster on the 100th anniversary of his birth." *Chemphyschem* 12(3): 462-474.

**Sunahara, R. K., Dessauer, C. W. et al.** (1996). "Complexity and diversity of mammalian adenylyl cyclases." *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 36: 461-480.

**Swaminath, G., Xiang, Y. et al.** (2004). "Sequential binding of agonists to the beta2 adrenoceptor. Kinetic evidence for intermediate conformational states." *J Biol Chem* 279(1): 686-691.

**Takanaga, H., Chaudhuri, B. et al.** (2008). "GLUT1 and GLUT9 as major contributors to glucose influx in HepG2 cells identified by a high sensitivity intramolecular FRET glucose sensor." *Biochim Biophys Acta* 1778(4): 1091-1099.

**Takanishi, C. L., Bykova, E. A. et al.** (2006). "GFP-based FRET analysis in live cells." *Brain Res* 1091(1): 132-139.

**Taussig, R., Gilman, A. G.** (1995). "Mammalian membrane-bound adenylyl cyclases." *J Biol Chem* 270(1): 1-4.

**Thakur, D. P., Tian, J. B. et al.** (2016). "Critical roles of Gi/o proteins and phospholipase C-delta1 in the activation of receptor-operated TRPC4 channels." *Proc Natl Acad Sci U S A* 113(4): 1092-1097.

**Thomas, P., Smart, T. G.** (2005). "HEK293 cell line: a vehicle for the expression of recombinant proteins." *J Pharmacol Toxicol Methods* 51(3): 187-200.

**Thomsen, A. R., Plouffe, B. et al.** (2016). "GPCR-G protein-β-arrestin super-complex mediates sustained G protein signaling." *Cell* 166(4): 907-919.

**Topell, S., Hennecke, J. et al.** (1999). "Circularly permuted variants of the green fluorescent protein." *FEBS Lett* 457(2): 283-289.

**Trebak, M., Lemonnier, L. et al.** (2009). "Complex functions of phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate in regulation of TRPC5 cation channels." *Pflugers Arch* 457(4): 757-769.

**van Rheenen, J., Langeslag, M. et al.** (2004). "Correcting confocal acquisition to optimize imaging of fluorescence resonance energy transfer by sensitized emission." *Biophys J* 86(4): 2517-2529.

**van Unen, J., Stumpf, A. D. et al.** (2016). "A New Generation of FRET Sensors for Robust Measurement of Galphai1, Galphai2 and Galphai3 Activation Kinetics in Single Cells." *PLoS One* 11(1): e0146789.

**Vardjan, N., Kreft, M. et al.** (2014). "Dynamics of beta-adrenergic/cAMP signaling and morphological changes in cultured astrocytes." *Glia* 62(4): 566-579.

**Venkatakrishnan, A. J., Deupi, X. et al.** (2016). "Diverse activation pathways in class A GPCRs converge near the G-protein-coupling region." *Nature* 536(7617): 484-487.

**Villardaga, J. P., Bunemann, M. et al.** (2009). "GPCR and G proteins: drug efficacy and activation in live cells." *Mol Endocrinol* 23(5): 590-599.

**Villardaga, J. P., Bunemann, M. et al.** (2003). "Measurement of the millisecond activation switch of G protein-coupled receptors in living cells." *Nat Biotechnol* 21(7): 807-812.

**Voss, F. K., Ullrich, F. et al.** (2014). "Identification of LRRC8 heteromers as an essential component of the volume-regulated anion channel VRAC." *Science* 344(6184): 634-638.

**Vriens, J., Watanabe, H. et al.** (2004). "Cell swelling, heat, and chemical agonists use distinct pathways for the activation of the cation channel TRPV4." *Proc Natl Acad Sci U S A* 101(1): 396-401.

**Walker, C. S., Conner, A. C. et al.** (2010). "Regulation of signal transduction by calcitonin gene-related peptide receptors." *Trends Pharmacol Sci* 31(10): 476-483.

**Wang, Y., Prosen, D. E. et al.** (2004). "A novel strategy to engineer DNA polymerases for enhanced processivity and improved performance in vitro." *Nucleic Acids Res* 32(3): 1197-1207.

**Weston, C., Winfield, I. et al.** (2016). "Receptor activity-modifying protein-directed G protein signaling specificity for the calcitonin gene-related peptide family of receptors." *Journal of Biological Chemistry* 291(42): 21925-21944.

**Wettschureck, N., Offermanns, S.** (2005). "Mammalian G proteins and their cell type specific functions." *Physiol Rev* 85(4): 1159-1204.

**Wikipedia-Autoren** (2016), "Seite Empfindlichkeit (Technik)", zuletzt geprüft am 27.09.2017, [https://de.wikipedia.org/w/index.php?title=Empfindlichkeit\\_\(Technik\)&oldid=151668565](https://de.wikipedia.org/w/index.php?title=Empfindlichkeit_(Technik)&oldid=151668565)

**Williams, C.** (2004). "cAMP detection methods in HTS: selecting the best from the rest." *Nat Rev Drug Discov* 3(2): 125-135.

**Wischmeyer, E., Doring, F. et al.** (1997). "Subunit interactions in the assembly of neuronal Kir3.0 inwardly rectifying K<sup>+</sup> channels." *Mol Cell Neurosci* 9(3): 194-206.

**Worm, K., Schulte-Frohlinde, D.** (1991). "Comparative study of transformation by the calciumchloride method and by electroporation using linearised plasmid DNA." *Int J Radiat Biol* 59: 573.

**Worzfeld, T., Wettschureck, N. et al.** (2008). "G(12)/G(13)-mediated signalling in mammalian physiology and disease." *Trends Pharmacol Sci* 29(11): 582-589.

**Yamada, H., Wakamori, M. et al.** (2000). "Spontaneous single-channel activity of neuronal TRP5 channel recombinantly expressed in HEK293 cells." *Neurosci Lett* 285(2): 111-114.

**Yamada, M., Inanobe, A. et al.** (1998). "G protein regulation of potassium ion channels." *Pharmacol Rev* 50(4): 723-760.

**Yasuda, N., Miura, S. et al.** (2008). "Conformational switch of angiotensin II type 1 receptor underlying mechanical stress-induced activation." *EMBO Rep* 9(2): 179-186.

**Yu, S. P., Kerchner, G. A.** (1998). "Endogenous voltage-gated potassium channels in human embryonic kidney (HEK293) cells." *J Neurosci Res* 52(5): 612-617.

**Zaccolo, M., Pozzan, T.** (2002). "Discrete microdomains with high concentration of cAMP in stimulated rat neonatal cardiac myocytes." *Science* 295(5560): 1711-1715.

**Zhang, Y. L., Frangos, J. A. et al.** (2009). "Mechanical stimulus alters conformation of type 1 parathyroid hormone receptor in bone cells." *Am J Physiol Cell Physiol* 296(6): C1391-1399.

**Zhu, X., Jiang, M. et al.** (1996). "trp, a novel mammalian gene family essential for agonist-activated capacitative Ca<sup>2+</sup> entry." *Cell* 85(5): 661-671.

**Ziegler, N., Batz, J. et al.** (2011). "FRET-based sensors for the human M1-, M3-, and M5-acetylcholine receptors." *Bioorg Med Chem* 19(3): 1048-1054.

**Zou, Y., Akazawa, H. et al.** (2004). "Mechanical stress activates angiotensin II type 1 receptor without the involvement of angiotensin II." *Nature Cell Biology* 6(6): 499-506.

**Zurn, A., Klenk, C. et al.** (2010). "Site-specific, orthogonal labeling of proteins in intact cells with two small biarsenical fluorophores." *Bioconjug Chem* 21(5): 853-859.

**Zurn, A., Zabel, U. et al.** (2009). "Fluorescence resonance energy transfer analysis of alpha 2a-adrenergic receptor activation reveals distinct agonist-specific conformational changes." *Mol Pharmacol* 75(3): 534-541.

## *Danksagungen*

Ganz herzlich danken möchte ich Herrn Prof. Dr. Michael Mederos y Schnitzler für die Betreuung meiner Arbeit, seine stete Diskussionsbereitschaft und die konstruktive Unterstützung bei der Erstellung dieser Arbeit.

Frau Dr. Ursula Storch möchte ich ganz herzlich für Ihre kompetente Betreuung im Labor und ihre allzeit vorhandene Hilfsbereitschaft sowie Unterstützung danken.

Herrn Prof. Dr. Thomas Gudermann danke ich für seine großzügige Unterstützung und das Ermöglichen dieser Arbeit am Walther-Straub-Institut.

Mein besonderer Dank gilt Frau Dr. Anna-Lena Forst als wissenschaftliches Vorbild, für die hervorragende Einarbeitung in mein Thema und ihr immer offenes Ohr bei all meinen Fragen.

Meinen lieben Kollegen im Labor, allen voran Serap Erdogmus, Laura Danner und Michaela Winter möchte ich ganz herzlich für die lustige, sehr freundschaftliche und schöne Zeit im Labor danken und für ihre dabei stets vorhandene Hilfsbereitschaft und Unterstützung. Bedanken möchte ich mich auch bei Joanna Zaisserer, Moira Mager, Dr. Franziska Pardatscher, Dr. Stephanie Blodow, Dr. Andrea Wartenberg und Dr. Evi Glas, mit denen viele freudige Erinnerungen im Laboralltag verknüpft sind.

Nicht zuletzt möchte ich von ganzem Herzen meiner Familie, meinem Mann und meinen Freunden danken, die immer für mich da waren und mir jederzeit mit Motivation, Aufmunterung und treibender Kraft beiseite standen. Besonders meinem großen Bruder Christoph, der mich mit seiner unglaublichen Laufbahn zu dieser Arbeit motiviert hat und für mich wissenschaftliche Leitbildfunktion hat, danke ich für seine große Hilfe bei der Erstellung dieser Arbeit. Als letztes danke ich meinen Eltern, die mich immer unterstützen, die mir für jeden meiner Schritte bedingungslosen Rückhalt bieten und die mir Vorbilder fürs Leben sind.

## *Publikation und Kongressbeiträge*

### Publikation

Storch, U.\*, **Straub, J.\***, Erdogmus, S., Gudermann, T., Mederos y Schnitzler, M. (2017)  
„Dynamic monitoring of  $G_{i/o}$ -protein mediated decreases of intracellular cAMP by FRET-based Epac sensors“, Pflügers Archiv - European Journal of Physiology  
doi: 10.1007/s00424-017-1975-1

\*zu gleichen Teilen beigetragen

### Kongressbeiträge

“Characterization of  $G_{i/o}$ -coupled receptors using a cAMP-sensor based FRET and a Kir channel based electrophysiological approach”

**Straub, J.**, Storch, U., Erdogmus, S., Gudermann, T., Mederos y Schnitzler, M.

Postervortrag im Rahmen des „<interact>“ Kongresses in München, 2014

“Characterization of  $G_{i/o}$ -coupled receptors using a cAMP-sensor based FRET and a Kir channel based electrophysiological approach”

**Straub, J.**, Storch, U., Gudermann, T., Mederos y Schnitzler, M.

Postervortrag im Rahmen der 80. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für experimentelle und klinische Pharmakologie und Toxikologie (DGPT) in Hannover, 2014

“The FRET based cAMP-sensor Epac as a tool to characterize  $G_{i/o}$ -coupled receptor activation”

**Straub, J.**, Storch, U., Gudermann, T., Mederos y Schnitzler, M.

Postervortrag im Rahmen der 93. Jahrestagung der Deutschen Physiologischen Gesellschaft (DPG) in Mainz, 2014

“The FRET based cAMP-sensor Epac as a tool to characterize  $G_{i/o}$ -coupled receptor activation”

**Straub, J.**, Storch, U., Gudermann, T., Mederos y Schnitzler, M.

Vortrag im Rahmen des „<interact>“ Kongresses in München, 2015

“Optical and electrophysiological methods allow detection and characterization of  $G_{i/o}$ -protein coupled receptors”

**Straub, J.**, Storch, U., Erdogmus, S., Gudermann, T., Mederos y Schnitzler, M.

Postervortrag im Rahmen der 82. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für experimentelle und klinische Pharmakologie und Toxikologie (DGPT) in Berlin, 2016

“Detection and characterization of  $G_{i/o}$ -protein coupled receptors by optical and electrophysiological methods”

**Straub, J.**, Storch, U., Erdogmus, S., Gudermann, T., Mederos y Schnitzler, M.

Postervortrag im Rahmen des *Cutting Edge Concepts in Molecular Pharmacology: GPCRs – G-proteins – TRP channels* Kongresses in Berlin, 2016