

Die Anaphylatoxine C3a und C5a und ihre zellulären Rezeptoren: Molekulare Untersuchungen zur Ligand/Rezeptor-Interaktion

- 1. Molekulare Klonierung und Charakterisierung des humanen C3a-Rezeptors**
- 2. Generierung und Charakterisierung von C3a-Rezeptor/C5a-Rezeptor-Chimären**
- 3. Charakterisierung von C-terminalen C5a-Mutanten**

Vom Fachbereich Chemie
der Universität Hannover
zur Erlangung des Grades

Doktor der Naturwissenschaften

Dr. rer. nat.

genehmigte Dissertation
von

Dipl.-Biochem. Torsten Crass

geb. am 14.01.1969

in Karlsruhe

1999

Referent: PD Dr. Dr. habil. Wilfried Bausch
Korreferent: Prof. Dr. Jürgen Alves
Tag der Promotion: 18.01.1999

*"In den kleinsten Dingen
zeigt die Natur
ihre größten Wunder"*
(Carl von Linné)

Zusammenfassung

Bei der Aktivierung des Komplementsystems werden potente Mediatoren, die Anaphylatoxine C3a und C5a, durch limitierte Proteolyse aus größeren Vorläufern freigesetzt. Diese kleinen (77 bzw. 74 Aminosäuren) Proteine sind potente Entzündungsmediatoren und lösen auf verschiedenen Zielzellen und Geweben eine Vielzahl proinflammatorischer Reaktionen aus (z. B. Kontraktion glatter Muskulatur sowie Chemotaxis und Degranulation bei verschiedenen Granulozytentypen). Diese Effekte werden über spezifische Zelloberflächenrezeptoren vermittelt, den C3a-Rezeptor (C3aR) bzw. C5a-Rezeptor (C5aR). Der C5aR wurde bereits 1991 kloniert und gehört zur Rhodopsin-Superfamilie der G-Protein-gekoppelten Rezeptoren. Ziel dieser Arbeit war zunächst die Klonierung des humanen C3aRs; dann sollten molekulare Untersuchungen zur Ligand/Rezeptor-Wechselwirkung von C3a und C5a mit ihren jeweiligen Rezeptoren anhand von C3aR/C5aR-Chimären einerseits und C-terminalen C5a-Mutanten andererseits durchgeführt werden.

1) Mittels eines Expressionsklonierungsverfahrens konnte aus einer cDNA-Bibliothek aus Bt₂cAMP-differenzierten U937-Zellen ein Klon (pTC10) isoliert werden, der in HEK293-Zellen eine erhöhte ¹²⁵I-C3a-Bindung vermitteln konnte. Sequenzierung des 4,3 kBp-Inserts von pTC10 ergab ein offenes Leseraster von 1446 Bp, das für ein Protein aus 482 Aminosäuren kodierte. Die Aminosäuresequenz wies eine 36%ige Homologie zum C5aR auf und zeigte 7 hydrophobe, wahrscheinlich transmembranöse Bereiche, so daß dieser mutmaßliche C3aR – wie auch der C5aR – in die Rhodopsin-Superfamilie eingeordnet werden konnte. Als einzigartige strukturelle Besonderheit weist die C3aR-Sequenz eine 2. extrazelluläre Schlaufe (EL) auf, die mit ca. 175 Aminosäuren weit länger ist als die 2. ELs aller bisher bekannten G-Protein-gekoppelter Rezeptoren. Kompetitive Bindungsstudien mit C3a und synthetischen Peptiden nach transienter Transfektion in HEK293-Zellen bestätigten die Spezifität der C3a-Bindung; zudem konnte in Signaltransduktionsstudien mit pTC10/Gα-16-kotransfizierten CHO-Zellen bestätigt werden, daß es sich beim C3aR um einen funktionell aktiven G-Protein-gekoppelten Rezeptor handelt.

2) Für den C5aR ist bekannt, daß sein N-Terminus sowie seine 2. EL an der Ligandenbindung beteiligt sind. Im Falle des C3aRs erschien dessen ungewöhnlich große 2. EL als ein plausibler Kandidat für eine Ligandenbindungsstelle. Daher wurden unter Austausch der N-Termini sowie der 2. ELs von C3aR und C5aR Chimären generiert, um Rezeptormodule zu identifizieren, die an Ligandenbindung, Signaltransduktion und Diskriminierung der Liganden beteiligt sind. Alle 16 möglichen Chimären wurden transient in HEK293-Zellen transfiziert und a) immunologisch auf Oberflächenexpression, b) auf Bindung von ¹²⁵I-C3a und ¹²⁵I-C5a sowie c) auf Signaltransduktion nach Stimulation mit C3a, C5a sowie synthetischen Peptidanaloga der Anaphylatoxine untersucht. Dabei zeigte sich, daß nur etwa die Hälfte der Konstrukte auch tatsächlich auf der Zelloberfläche exprimiert wurde; die damit gewonnenen Daten lassen folgende Schlußfolgerungen zu: 1) Ein C5a-analoges Peptid vermochte den C3aR wie den C5aR zu aktivieren; C5a ist also ein potentieller Ligand für den C3aR. Einzig die Abwesenheit von hochaffinen C5a-Bindungsstellen im C3aR-N-Terminus bestimmt die Rezeptorspezifität, indem die Bindung von C5a verhindert wird, und diskriminiert somit gegen den "falschen" Liganden. 2) Austausch der 2. ELs führte bei beiden Rezeptoren zu einem Verlust an Signaltransduktionsfähigkeit, sogar bei erhaltener Ligandenbindung. Transmembranöses Helixbündel und 2. EL müssen daher als funktionelle Einheit betrachtet werden, die empfindlich auf Insertionen / Deletionen reagiert. 3) Austausch oder Deletion des C3aR-N-Terminus hatte keinen Einfluß auf die Bindung von C3a oder Rezeptoraktivierung. Der N-Terminus des C3aRs ist somit nicht essenziell für Ligandenbindung und Signaltransduktion: Das für den C5aR etablierte 2-Punkt-Bindungsmodell trifft in dieser Form demnach nicht für den C3aR zu.

3) Für Lys68 im C5a wird Glu199 im C5aR als Wechselwirkungspartner postuliert. Mit verschiedenen an Pos. 68 und 74 modifizierten C5a- und C5a-desArg74-Mutanten sowie einem Glu199Lys-C5aR konnte gezeigt werden, daß diese Wechselwirkung zwar für die Rezeptoraktivierung durch C5a-desArg74, nicht aber durch Wildtyp-C5a essentiell ist. Dabei scheint die An- oder Abwesenheit einer C-terminalen Carboxylat-Funktion in Pos. 74 über die Notwendigkeit der Lys68/Glu199-Wechselwirkung für die Rezeptoraktivierung zu bestimmen. Die Beobachtung, daß diese Wechselwirkung auch beim Wildtyp-C5a einen Einfluß auf die Bindungskonstante, jedoch nicht auf die ED₅₀ hat, läßt vermuten, daß Ligandenbindung und Rezeptoraktivierung zwei getrennte, konsekutive Schritte darstellen.

Abstract

Upon activation of the complement system, potent mediators, the anaphylatoxins C3a and C5a, are released by limited proteolysis of larger precursors. These small (74 – 77 amino acids) proteins are potent proinflammatory mediators and elicit a broad spectrum of reactions on many target cells and tissues, including smooth muscle contraction and degranulation of granulocytes. These effects are mediated by specific cell surface receptors, the C3a receptor (C3aR) and the C5a receptor (C5aR), respectively. The C5a receptor was cloned in 1991 and turned out to belong to the large rhodopsin superfamily of G protein-coupled receptors. The first aim of this work was to clone the human C3aR. Subsequently, C3aR/C5aR chimeras as well as C-terminal C5a mutants were generated in order to examine the molecular basis of the interaction of C3a and C5a with their respective receptors.

Using an expression cloning approach, a clone (pTC10) which was able to induce increased binding of ¹²⁵I-C3a to HEK293 cells could be isolated from a cDNA library derived from Bt₂cAMP-differentiated U937 cells. Sequence analysis of the 4.3 kbp insert of pTC10 revealed an open reading frame of 1446 bp encoding a protein of 482 amino acids. The deduced amino acid sequence shows a homology of 36% to the C5aR and 7 hydrophobic putative transmembrane regions, allowing for the classification of the C3aR as a member of the rhodopsin superfamily. As a unique structural feature, the C3aR sequence possesses a 2nd extracellular loop (EL) of 175 amino acids, which is by far the largest 2. EL reported up to now for G protein coupled receptors. Competitive binding assays with C3a and synthetic peptides on transiently transfected HEK293 cells confirmed the specificity of C3a binding. Additionally, it could be confirmed in signal transduction studies with pTC10/G α -16 cotransfected CHO cells that the C3aR is a functionally active G protein-coupled receptor.

It is known for the C5aR that both its N-terminus and its 2. EL are involved in ligand binding. On the other hand, the C3aR's extraordinarily large 2. EL recommended itself as a putative ligand binding site. For these reasons, chimeras of the C3aR and the C5aR were generated by exchanging their 2. ELs and N-termini in order to identify receptor modules involved in ligand binding, signal transduction and discrimination from the non-cognate ligand. All 16 possible chimeras were transiently transfected into HEK293 cells and examined a) immunologically for cell surface expression, b) for binding of ¹²⁵I-C3a and ¹²⁵I-C5a and c) for signal transduction upon stimulation with C3a, C5a and synthetic peptide analogues of the anaphylatoxins. Only about half of the constructs appeared to be expressed on the cell surface; the data obtained with them allow for the following conclusions: 1) A C5a peptide analogue is able to activate the C3aR as well as the C5aR; hence C5a is a potential ligand of the C3aR. The absence of high-affinity C5a binding sites in the C3aR N-terminus determines receptor specificity by preventing C5a from binding and thus discriminates from the "wrong" ligand. 2) Exchanging the 2. ELs completely abrogates signal transduction ability for both receptors, even if ligand binding is retained. So transmembrane helix bundle and 2. EL must be considered a functional unit in which neither insertions nor deletions are well tolerated. 3) Exchanging or deletion of the C3aR N-terminus has no influence on C3a binding or receptor activation. Obviously the C3aR N-terminus is not essential for either ligand binding or signal transduction; the 2-point binding model well established for the C5a receptor does not apply for the C3aR.

Glu199 of the C5aR is considered a putative interaction partner for Lys68 of C5a. Using a set of various C5a- and C5a-desArg74 mutants modified at pos. 68 and 74 as well as a Glu199Lys-C5aR it could be demonstrated that this interaction is essential for receptor activation by C5a-desArg74 but not by wild type C5a. The dependence of receptor activation from this interaction appears to be correlated with the absence or presence of the C-terminal carboxylate function in pos. 74, respectively. The observation, however, that also in case of wild type C5a this interaction has an influence on the binding constant but not the ED50 suggests that ligand binding and receptor activation represent two different, consecutive reaction steps.

Inhaltsverzeichnis

1. EINLEITUNG.....	11
1.1 DAS KOMPLEMENTSYSTEM.....	11
1.2 ANAPHYLATOXINE.....	12
1.3 ANAPHYLATOXIN-REZEPTOREN.....	15
1.4 C5A/C5AR: MODELLE DER LIGAND-REZEPTOR-INTERAKTION.....	16
1.5 C3A/C3AR: FAKTEN ZUR LIGAND-REZEPTOR-INTERAKTION	18
1.6 REZEPTORCHIMÄREN ALS MITTEL FÜR STRUKTUR/FUNKTIONSANALYSEN.....	19
1.7 ZIEL DER ARBEIT	20
2. MATERIALIEN UND METHODEN.....	23
2.1 AUSGANGSMATERIAL.....	23
2.1.1 <i>Expressionsplasmid pQE-30/C4a</i>	23
2.1.2 <i>C5a-Expressionsplasmid pME10</i>	23
2.1.3 <i>FLAG-C5a-Rezeptorplasmid pCCF2</i>	23
2.1.4 <i>cDNA-Bibliothek aus Bt₂cAMP-differenzierten U937-Zellen</i>	24
2.1.5 <i>Eukaryontischer Expressionsvektor pcDNA3</i>	24
2.2 PUFFERLÖSUNGEN.....	25
2.3 ORGANISMEN.....	26
2.3.1 <i>Bakterien</i>	26
2.3.1.1 <i>Stämme</i>	26
2.3.1.2 <i>Medien</i>	26
2.3.2 <i>Eukaryontische Zelllinien</i>	27
2.3.2.1 <i>Stämme</i>	27
2.4 MOLEKULARBIOLOGISCHE METHODEN.....	28
2.4.1 <i>Herstellung kompetenter E. coli</i>	28
2.4.1.1 <i>CaCl₂-Methode</i>	28
2.4.1.2 <i>Elektroporation</i>	28
2.4.2 <i>Transformation von E. coli</i>	29
2.4.2.1 <i>CaCl₂-Methode</i>	29
2.4.2.2 <i>Elektroporation</i>	29
2.4.3 <i>Schnelltest auf Plasmidgröße ("Quicky")</i>	29
2.4.4 <i>Präparation von Plasmid-DNA</i>	30
2.4.4.1 <i>Plasmid-Mini-Präparation</i>	30
2.4.4.2 <i>Plasmid-Midi- und Maxi-Präparation</i>	30
2.4.5 <i>Phenol-Chloroform-Extraktion</i>	31
2.4.6 <i>Ethanol-fällung</i>	31
2.4.7 <i>Bestimmung der DNA-Konzentration</i>	31
2.4.8 <i>Restriktionsverdauung</i>	32
2.4.9 <i>Agarose-Gelelektrophorese</i>	32
2.4.10 <i>DNA-Extraktion aus Agarose-Gelen</i>	32
2.4.10.1 <i>Zentrifugation durch Filterpapier</i>	33
2.4.10.2 <i>Glasmilch-Methode</i>	33
2.4.11 <i>Dephosphorylierung</i>	33
2.4.12 <i>Generierung von glatten Enden</i>	34

2.4.12.1	Auffüllen überhängender 5'-Enden mit Klenow-Polymerase	34
2.4.12.2	Abdauen überhängender 5'-Enden mit Mungbohnen-Nuklease	34
2.4.13	Ligation.....	34
2.4.14	PCR	34
2.4.15	Fusions-PCR.....	36
2.4.16	Mutagenese mit dem QuickChange-Kit (Stratagene).....	36
2.4.17	DNA-Sequenzierung	37
2.5	BIOCHEMISCHE METHODEN	39
2.5.1	Gewinnung von C3a aus Blut (nach Dissertation T. Kretzschmar, 1992).....	39
2.5.2	Expression von rekombinantem His ₆ -C4a (nach Diplomarbeit A. Hölzer 1996).....	39
2.5.3	Expression von rekombinantem C5a (nach [116]).....	40
2.5.4	Aufreinigung von Anaphylatoxinen über FPLC.....	41
2.5.5	Nachweis von C3a/C5a im Dot-Blot.....	41
2.5.6	Proteinbestimmung nach Bradford [124]	42
2.5.7	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese	42
2.5.8	Silberfärbung von SDS-Gelen	42
2.5.9	Markierung von C3a/C5a mit ¹²⁵ I (nach Dissertation T. Kretzschmar, 1992).....	43
2.6	ZELL- UND IMMUNBIOLOGISCHE METHODEN.....	44
2.6.1	ATP-Freisetzungstest mit Meerschweinchen-Thrombozyten (ARA) nach [126].....	44
2.6.2	Glucosaminidase-Freisetzungstest (GARA)	44
2.6.3	Transiente Transfektion von HEK293-Zellen.....	45
2.6.4	FACS-Analysen zur Kontrolle der Oberflächenexpression.....	45
2.6.5	Schnelltest auf ¹²⁵ I-C3a Bindung in Kulturschalen.....	46
2.6.6	Kompetitive Bindungsstudien	46
2.6.6.1	Bindungsstudien mit Saccharose-Kissen	47
2.6.6.2	Bindungsstudien mit dem MultiScreen-System (Milipore).....	47
2.6.7	Ca ²⁺ -Freisetzungstest	48
2.7	SOFTWARE	49
2.7.1	Programme.....	49
2.7.2	Internet-Ressourcen.....	49
3.	ERGEBNISSE	51
3.1	KLONIERUNG DES HUMANEN C3A-REZEPTORS.....	51
3.1.1	Voraussetzungen für das Screening	51
3.1.1.1	Erstellung einer geeigneten cDNA-Bibliothek.....	51
3.1.1.2	Etablierung eines geeigneten Expressionssystems	52
3.1.2	Durchführung des Screenings	53
3.1.2.1	Pool 15	53
3.1.2.2	Pool 43	55
3.1.3	Die isolierten cDNAs	57
3.1.3.1	Klon 15/7/3/29.....	57
3.1.3.2	Klon 43/9/38/9 (pTC10).....	57
3.1.4	Charakterisierung des C3aRs.....	58
3.1.4.1	Ligandenbindung	58
3.1.4.2	Signaltransduktion	60
3.1.5	C4a und der C3aR.....	61
3.1.5.1	Ligandenbindung	61

3.1.5.2	Signaltransduktion	62
3.2	GENERIERUNG VON C3AR/C5AR-CHIMÄREN	64
3.2.1.1	Auswahl der Rezeptormodule	64
3.2.1.2	Weitere Vorüberlegungen.....	66
3.2.2	<i>Durchführung</i>	66
3.2.2.1	Einführung zusätzlicher Schnittstellen in den C5aR.....	66
3.2.2.2	Einführung zusätzlicher Schnittstellen in den C3aR.....	67
3.2.2.3	Austausch der N-Termini	67
3.2.2.4	Generierung der Chimären.....	67
3.2.2.5	Generierung der N-terminalen Deletionsmutanten des C3aRs	68
3.2.3	<i>Oberflächenexpression</i>	68
3.2.4	<i>Bindung</i>	70
3.2.5	<i>Funktion</i>	71
3.3	CHARAKTERISIERUNG DER LIGANDENBINDUNGSSTELLE IN DER 2. EL DES C5ARs	73
3.3.1	<i>Generierung der C5a-Mutanten</i>	73
3.3.2	<i>Glucosaminidase-Freisetzungstest</i>	73
3.3.3	<i>Histamin-Freisetzungstest</i>	74
3.3.4	<i>Bindung</i>	76
4.	DISKUSSION	81
4.1	KLONIERUNG VON OM.....	81
4.2	CHARAKTERISIERUNG DES C3ARs	83
4.2.1	<i>Sequenz</i>	83
4.2.2	<i>Gewebeexpression</i>	86
4.2.3	<i>Bindung und Funktion</i>	87
4.2.4	<i>Vergleichende Charakterisierung hsC3aR/cpC3aR</i>	89
4.3	KONSTRUKTION VON C3AR/C5AR-CHIMÄREN	91
4.3.1	<i>Expression</i>	92
4.3.2	<i>Der Rezeptor-N-Terminus bestimmt die Affinität zu C5a</i>	92
4.3.3	<i>Die 2. ELs sind kritisch für die Rezeptorkonformation</i>	93
4.3.4	<i>Der C3aR-N-Terminus ist nicht essentiell für C3a-Bindung/Signaltransduktion</i>	95
4.4	WEITERFÜHRENDE CHARAKTERISIERUNG DER BINDUNGSSTELLE IN DER 2. EL DES C5ARs.....	96
4.4.1	<i>Die Lys68/Glu199-Wechselwirkung ist essentiell für Rezeptoraktivierung durch C5a-desArg74, nicht jedoch durch C5a</i>	97
4.4.2	<i>Bindung an den C5aR und Rezeptoraktivierung sind unabhängige Schritte</i>	98
4.4.3	<i>Vergleich der 2. ELs des C3aRs und des C5aRs</i>	100
5.	LITERATUR	101
6.	ANHANG	115
6.1	DER KLON 43/9/37/9 = pTC10	115
6.2	DAS OFFENE LESERASTER DER C3AR-CDNA pTC10	118
6.3	SEQUENZVERGLEICH CHEMOTAKTISCHER REZEPTOREN	120
6.4	SEQUENZVERGLEICH HUMANER C3AR / HUMANER C5AR.....	122
6.5	SEQUENZVERGLEICH C3A-REZEPTOREN VERSCHIEDENER SPECIES	123
6.6	SEQUENZVERGLEICH ANAPHYLATOXINE.....	124
6.7	DETAILLIERTE BESCHREIBUNG DER CHIMÄRENKONSTRUKTION	125
6.7.1	<i>Chimären-Vorläufer</i>	125

6.7.2	<i>C3aR/C5aRChimären</i>	126
6.8	KARTEN WICHTIGER PLASMIDE	127
6.8.1	<i>C3aR-Plasmide</i>	127
6.8.2	<i>C5aR-Plasmide</i>	128
6.8.3	<i>Plasmide mit N-terminalen Austausch-Chimären</i>	129
6.9	VERWENDETE OLIGONUKLEOTID-PRIMER	130
7.	ABKÜRZUNGEN	133
8.	LEBENS LAUF	135

1. Einleitung

1.1 Das Komplementsystem

Durch das Komplementsystem vermittelte Effekte wurden erstmals vor über hundert Jahren beschrieben als "bakterientötende Wirkung zellfreien Blutserums" [1]. Heute versteht man unter dem Komplementsystem eine Reihe von mehr als 20 Serumproteinen, die zum humoralen Arm der Immunabwehr gehören und als phylogenetisch sehr alter Teil des Immunsystems funktionell fest in das Abwehrnetz eingebunden sind (Übersicht: [2]).

Schematisch kann das Komplementsystem als Y-förmige Aktivierungskaskade der einzelnen Faktoren dargestellt werden. Ähnlich wie bei der Gerinnungs- und der Fibrinolyse-Kaskade erfolgt auch hier die Aktivierung der jeweils nächsten Komponente durch limitierte Proteolyse oder katalysierte Konformationsumwandlung, wodurch diese dann ihrerseits ebenfalls eine enzymatische Aktivität erwirbt. Durch den katalytischen Charakter der Aktivierung der jeweiligen Folgekomponente wird so eine enorme Signalverstärkung erreicht.

Die Auslösung der Kaskade kann einerseits auf dem sog. "klassischen" Weg erfolgen, d. h. durch Bindung des heterooligomeren Serumfaktors C1 an die Fc-Teile von Antigen-gebundenen Antikörpern der IgM- oder IgG-Klasse, wodurch es über C4 und C2 schließlich zur Aktivierung von C3 kommt. In diesem Fall fungiert das Komplementsystem als humorales Effektorsystem der erworbenen, spezifischen Immunität. Andererseits können auch Oberflächenstrukturen – etwa Polysaccharide – von Mikroorganismen zu einer direkten Aktivierung des Komplementfaktors C3 führen; man spricht dann vom "alternativen" Weg, und das Komplementsystem ist hier als Bestandteil der natürlichen, unspezifischen Immunität anzusehen. Als weiterer Aktivierungsweg ist seit kurzem der Lektin-Weg anerkannt, bei dem über Mannose-bindendes Lektin eine C1-unabhängige C4-Aktivierung stattfindet.

Bei der aktivierten Komponente C3b münden alle Aktivierungswege des Komplementsystems in eine gemeinsame Endstrecke, in der letztendlich die Effektorfunktionen des Systems angesiedelt sind. Im einzelnen erfüllt das Komplementsystem bei seiner Aktivierung drei Aufgaben: 1) Oponierung von Oberflächen und Solubilisierung von Immunkomplexen vor allem durch gebundenes C3b bzw. sein Abbauprodukt iC3b, aber auch C4b. Zellen mit Oberflächenrezeptoren für diese Moleküle – etwa Granulozyten und Makrophagen – werten solche Komplexe als Aktivierungssignal und werden verstärkt zur Phagozytose angeregt. 2) Zytolyse durch Bildung des Membranangriffskomplexes (MAC) durch die Komplementkomponenten C5b, C6, C7, C8 und C9. 3) Freisetzung proinflammatorischer

Peptidmediatoren, der Anaphylatoxine. Dabei handelt es sich um Spaltprodukte, die bei der Aktivierung von C3 und C5 durch limitierte Proteolyse ihrer α -Kette freierwerden.

1.2 Anaphylatoxine

Obschon die intravenöse Injektion von Anaphylatoxinen in hohen Dosen im Tiermodell Symptome ähnlich denen eines anaphylaktischen Schocks auslösen kann [3], tragen diese Entzündungsmediatoren ihren Namen eigentlich zu unrecht – stellt doch der klassische anaphylaktische Schock eine IgE-vermittelte Hypersensitivität dar, während Anaphylatoxine ihre Wirkung direkt durch rezeptorvermittelte Degranulation bestimmter Zelltypen entfalten.

Strukturell handelt es sich bei den Anaphylatoxinen C3a und C5a um kurze, basische ($pI > 8$) Polypeptide von 77 bzw. 74 Aminosäuren Länge und hoher Sequenzhomologie (ca. 24 – 31% [4-7]), wobei natürliches C5a an Pos. 64 N-glykosyliert vorliegt. NMR- und Röntgenbeugungsstudien [8-10] ergaben für beide Moleküle auch eine homologe Raumstruktur: Demnach erstrecken sich von einem N-terminalen, globulären, durch 3 Disulfidbrücken stabilisierten Kernbereich, der aus 3 bzw. 4 α -Helices gebildet wird, die C-terminalen ca. 11 Aminosäurereste als flexibler "Finger" mit wenig geordneter Struktur. Die Vorstellung eines flexiblen C-Terminus wird durch Fluoreszenz-Anisotropie-Zerfalls- und Förster-Transfer-Studien an Tryptophan-Mutanten des C5a unterstützt [11]. Neuere NMR-Studien für C5a zeigen allerdings, daß der C-Terminus aufgrund einer Wechselwirkung zwischen dem terminalen Arg74 und Arg62 dazu tendiert, sich in Richtung auf den Kernbereich zurückzufalten [12].

Als proinflammatorische Peptide entfalten Anaphylatoxine eine breite Palette biologischer Wirkungen, wobei C3a und C5a ein prinzipiell ähnliches, im Detail jedoch durchaus verschiedenes Wirkungsspektrum aufweisen. Die Wirkung des C3a ist im allgemeinen weniger breit gefächert und schwächer ausgeprägt als die des C5a; allerdings könnte dies durch die weit höhere maximal mögliche Serumkonzentration des C3-Spaltproduktes ausgeglichen werden. Generell gilt, daß Anaphylatoxine aufgrund ihrer Freisetzung durch das aktivierte Komplementsystem wohl die frühesten Entzündungsmediatoren darstellen, die im Rahmen einer Immunantwort gebildet werden.

Als direkte proinflammatorische Wirkungen der Anaphylatoxine wurden eine Erhöhung der vaskulären Permeabilität [13,14] und eine Histamin- [15] oder Prostaglandin- [16] abhängige Kontraktion glatter Muskulatur beschrieben – Effekte, die zu einer Verlangsamung der Zirkulation im betroffenen Gebiet führen und eine Voraussetzung für die Rekrutierung von Leukozyten darstellen. Tatsächlich wirken Anaphylatoxine chemotaktisch auf verschiedene Zelltypen und spielen so eine wichtige Rolle bei der Initiierung einer Entzündung: Für C5a

wurde Chemotaxis auf Granulozyten [17,18], Monozyten [19,20] und Mastzellen [21] beschrieben; C3a wirkt chemotaktisch auf Eosinophile [22], und es stellt das potenteste derzeit bekannte Chemotaxin für Mastzellen dar [21]. Als weitere Anaphylatoxin-vermittelte Effekte, die die Rekrutierung von Leukozyten fördern, wurden die Induktion von Zelladhäsionsmolekülen wie β -Integrin auf Granulozyten [23,24] beschrieben.

Weiterhin wirken Anaphylatoxine auf myeloide Zellen vielfältig aktivierend. C5a führt zur Degranulation von Granulozyten, wodurch es zur Freisetzung von z. B. hydrolytischen Enzymen [25] und Histamin [26] kommt. Auch wird die Produktion hochreaktiver Sauerstoff-Species – der sog. *oxidative burst* – angeregt [27], ebenso der Arachidonsäure-Stoffwechsel und damit die Produktion von Eicosanoiden [28]. Bei Ratten-Mastzellen vermag C5a die Freisetzung von Histamin [29], bei Meerschweinchen-Thrombozyten die Ausschüttung von Serotonin [30] und ATP [31] auszulösen. Das Wirkungsspektrum von C3a erscheint nach bisherigem Wissensstand noch deutlich schmalere; so stellte der Meerschweinchen-Thrombozyt lange Zeit den einzigen Zelltyp dar, von dem eine Antwort auf C3a-Stimulation beschrieben wurde (Aggregation [32] und Serotonin- [30] sowie ATP- [31] Freisetzung). Später gelang der Nachweis einer spezifischen, C3a-vermittelten β -Glucosaminidase-Freisetzung aus der myelomonozytären Zelllinie U937 [33]. Inzwischen konnte gezeigt werden, daß C3a Eosinophile zur Degranulation [34] und zum *oxidative burst* [35] anzuregen vermag; Basophile antworten nach Vorstimulation mit IL-3 oder GM-CSF mit Histamin-Freisetzung [36].

Durch die Anregung der Produktion von Zytokinen (IL-1, IL-6, IL-8 und TNF- α) greifen Anaphylatoxine tief in die Regulation des Immunsystems ein [37-40], wobei C3a durch Hemmung der T-Zell-Proliferation eher dämpfende [41], C5a durch Anregung der Antikörperproduktion und der zellulären Abwehr vorwiegend aktivierende Wirkung ausübt [42].

Anaphylatoxine werden im Blutstrom rasch inaktiviert: Die im Serum vorhandene Carboxypeptidase N entfernt den C-terminalen Argininrest, wobei C3a seine Aktivität vollständig, C5a zu über 90% verliert. Aufgrund der verbleibenden Restaktivität des C5a-desArg74 wird dieses jedoch noch zu den Anaphylatoxinen gezählt; seine Effekte vermittelt es wie C5a über den C5a-Rezeptor. Für C3a-desArg74 wurden vor kurzem einige Wirkungen beschrieben, die aber wohl nicht C3a-Rezeptor-vermittelt sind: 1) Freisetzung von Histamin aus Ratten-Mastzellen im mikromolaren Bereich [43]; 2) Inhibierung Fc ϵ -Rezeptor Typ I-vermittelter Aktivierung von Ratten-Mastzellen [44]; 3) Steigerung Endotoxin-induzierter Interleukin-6-Produktion von Monozyten [45]; 4) Einfluß auf den Triglycerid-Stoffwechsel von Adipozyten [46]. Zur Zeit kann allerdings noch nicht ausgeschlossen werden, daß zumindest ein

Teil dieser Effekte auf Kontamination des verwendeten C3a-desArg74 mit C3a/C5a zurückzuführen ist.

Die effektive Inaktivierung der Anaphylatoxine bewirkt, daß ihre proinflammatorische Wirkung i. d. R. lokal begrenzt bleibt. Eine überschießende Anaphylatoxinproduktion wird entsprechend mit zahlreichen entzündlichen Krankheitsbildern in Verbindung gebracht. Erhöhte Anaphylatoxinspiegel wurden z. B. beobachtet bei lokalen, chronischen Entzündungen wie Rheumatoider Arthritis und Psoriasis. Aber auch systemische Krankheitszustände wie Lupus erythematodes oder das akute respiratorische Atemnotsyndrom des Erwachsenen nach septischem Schock, Verbrennung oder Inhalationstrauma gehen mit erhöhten Anaphylatoxinkonzentrationen einher (Übersicht: [47]). Weiterhin gibt es Hinweise, daß Anaphylatoxine zur Entstehung von Reperfusionsschäden bei Organ-Ischämie beitragen [48,49].

Die Bedeutung der Anaphylatoxine für immunologische und immunpathologische Prozesse wird durch die Beobachtung unterstrichen, daß Anaphylatoxine das Ziel von Pathogenitätsfaktoren sein können: Verschiedene parasitäre Bakterienarten (Streptokokken Gruppe A und B) produzieren C5a-abbauende Enzyme [50,51], die Amöbe *Entamoeba histolytica* verfügt über Anaphylatoxin-spezifische Proteasen [52], und im Gift der Spinne *Plectruerys tristis* findet sich eine C5a-Rezeptor-spezifische Protease [53]. Wie wichtig die durch Anaphylatoxine angeworfenen Mechanismen der Pathogenabwehr sind, konnte jüngst anhand einer C5aR-K.O.-Maus gezeigt werden: Diese wies schwere Defekte bei der Abwehr von *Pseudomonas aeruginosa*-Infektionen in der Lunge auf [54].

Der Nachweis von Anaphylatoxinrezeptoren auf den verschiedensten – auch nicht-myeloischen – Zelllinien läßt die Aufdeckung von Beiträgen der Anaphylatoxine zu weiteren physiologischen und pathophysiologischen Prozessen erwarten. So konnte der C5aR immunhistochemisch auf Epithel-, Endothel- und glatten vaskulären Muskelzellen der Lunge nachgewiesen werden [55]; für umbilikale Venen-Endothelzellen wurde eine Induktion von P-Selektin – einem Zelladhäsionsmolekül, das beim *homing* von Leukozyten in entzündetes Gewebe beteiligt ist – nach C5a-Stimulation beschrieben [56]. Weiterhin wurde C5aR-Expression bei Hepatozyten und davon abgeleiteten Zelllinien beobachtet [55,57]; zudem konnte für die Hepatom-Zelllinie HepG2 nach C5a-Stimulation die Expression von Akute-Phase-Proteinen beobachtet werden [57]. Das Auftreten der Anaphylatoxinrezeptoren auf myeloischen Zellen und Zelllinien des Gehirns (Astrozyten, Mikroglia) deutet auf eine mögliche Beteiligung der Anaphylatoxine an degenerativen Erkrankungen des Zentralnervensystems hin [58-60].

Ein weiteres Komplement-Spaltprodukt, das hohe Sequenz- und Strukturhomologie zu den Anaphylatoxinen C3a und C5a aufweist, ist das bei der Aktivierung über den klassischen Weg

aus dem Vorläufer C4 freiwerdende 77er-Peptid C4a [61-63]. Im Meerschweinchensystem wurden für humanes C4a ähnliche Effekte wie für C3a und C5a (Kontraktion glatter Muskulatur, Erhöhung der vaskulären Permeabilität, Degranulation von Thrombozyten und Makrophagen) beschrieben, wenn auch mit um 2 – 3 Größenordnungen geringerer Aktivität [61,64,65]. Am Menschen hingegen konnten bisher keine überzeugenden C4a-abhängigen Effekte gezeigt werden.

Kreuzdesensitisierungsexperimente im ATP-Freisetzungstest am Meerschweinchen-Thrombozyten lieferten Hinweise, daß C4a seine Effekte evtl. über den Meerschweinchen-C3a-Rezeptor entfaltet: Stimulation der Thrombozyten mit substimulatorischen Mengen an C3a überführte die Blutplättchen in einen refraktären Zustand (Tachyphylaxie), in dem die Nachstimulation auch mit größeren C3a-Mengen zu keiner meßbaren ATP-Freisetzung führte; die C5a-abhängige ATP-Freisetzung hingegen war davon nicht betroffen. Das gleiche gilt sinngemäß für die substimulatorische Gabe von C5a: Auch höhere C5a-Gaben führten dann zu keiner Thrombozyten-Antwort mehr, wohl aber Stimulation mit C3a. C4a-abhängige Effekte hingegen zeigten sich sehr wohl als inhibierbar durch C3a-Vorstimulation und *vice versa*. Zudem reagieren Thrombozyten des vom Phänotyp her C3aR-negativen Meerschweinchenstammes C2BB/R⁻ auch nicht auf C4a [66]. Somit kann die Möglichkeit eines gemeinsamen C3a/C4a-Rezeptors im Meerschweinchen durchaus in Betracht gezogen werden. (Eine gegenseitige Desensitisierung wird allerdings auch für das C5aR/fMLPR-System beschrieben [67]. Da es sich bei der Tachyphylaxie um einen der Rezeptoraktivierung nachgeschalteten Prozess handelt, ist hier eine Kreuzdeaktivierung durch verschiedene Rezeptoren durchaus denkbar.)

1.3 Anaphylatoxin-Rezeptoren

Die im vorherigen Kapitel beschriebenen, durch Anaphylatoxine auf einer ganzen Palette von Zelltypen hervorgerufenen Reaktionen ließen schon lange die Existenz spezifischer Anaphylatoxin-Rezeptoren vermuten. Tatsächlich konnten durch Bindungsstudien, die mit aktiviertem Serum aufgereinigten und mit ¹²⁵I markierten Anaphylatoxinen durchgeführt wurden, spezifische, hochaffine Bindungsstellen (K_D im niedrig-nanomolaren Bereich) auf Meerschweinchen-Thrombozyten [68,69], Granulozyten [33,70-72] und Makrophagen [73] nachgewiesen werden. Kreuzvernetzungsexperimente ergaben für den C3aR auf Meerschweinchen-Thrombozyten und humanen polymorphkernigen neutrophilen Granulozyten ein apparentes Molekulargewicht von $M_w \approx 100$ kDa [68,69]; für den C5aR zeigten Kreuzvernetzungs- und Gelfiltrationsexperimente die Existenz eines knapp 50 kDa schweren

Rezeptors, der jedoch zu beträchtlichen Anteilen in Form eines rund 100 kDa schweren, heteromeren Komplexes vorzuliegen schien [74].

Die mit dem C5aR assoziierten Polypeptide sollten bald als G-Protein-Untereinheiten identifiziert werden. Schon früh deuteten viele Beobachtungen darauf hin, daß der C5aR zur Familie der G-Protein-gekoppelten Rezeptoren zählt. So wurde z. B. nach C5a-Gabe die Stimulierung einer GTPase-Aktivität in Membranpräparationen polymorphkerniger neutrophiler Granulozyten [75] beschrieben. Auch Beobachtungen, wie die Inhibierbarkeit oder Abschwächung C5a-vermittelter zellulärer Antworten durch Pertussis-Toxin [76] oder nichthydrolysierbare GTP-Analoga [77], deuteten darauf hin, daß sich der C5a-Rezeptor zur Signaltransduktion intrazellulärer G-Proteine bedient. Schließlich konnten die mit dem C5aR kopurifizierten Polypeptide immunologisch als α - und β -Untereinheiten "inhibitorischer" G-Proteine der G_i -Familie identifiziert werden [77]. Auch von anderen G-Protein-gekoppelten Rezeptoren (A1-Adenosin-Rezeptor, Follitropin-Rezeptor, Prostaglandin E2-Rezeptor, Vasopressin-Rezeptor) wurde berichtet, daß sie prägekoppelt vorliegen [78-81]. Die Entkopplung des Rezeptors von seinem G-Protein durch das nicht-hydrolysierbare GTP-Analogon GTP[γ S] führte zu einem dramatischen Verlust an hochaffinen Bindungsplätzen [77,82], was darauf hindeutet, daß der C5aR erst durch die Präkopplung mit dem G-Protein seine Fähigkeit erhält, C5a zu binden.

Durch die Expressions- bzw. Homologieklonierung der C5aR-cDNA aus Bt₂cAMP-differenzierten HL-60- und U937-Zellen [83,84] konnte der C5aR anhand seiner Sequenz eindeutig als Mitglied der Rhodopsin-Superfamilie der G-Protein-gekoppelten Rezeptoren identifiziert werden. Außer den typischen 7 hydrophoben transmembranösen (TM) Bereichen sowie der bei vielen chemotaktischen Rezeptoren vorhandenen N-Glykosylierungsstelle im N-Terminus (Asn5) zeigte das 1050 Bp lange offene Leseraster hohe Homologie zum Neurokinin A-Rezeptor (21%), den IL-8-Rezeptoren (ca. 23%) und dem fMLP-Rezeptor (28%).

Beim C3aR legte die beobachtete Freisetzung von intrazellulärem Calcium und ³H-IP₃ in Granulozyten bzw. myelomonozytären Zelllinien [33,70] sowie die Inhibierbarkeit dieser Antworten durch Pertussis-Toxin ebenfalls die Zuordnung dieses Rezeptors zur großen Familie der G-Protein-gekoppelten Rezeptoren nahe. Die endgültige Bestätigung dieser Vermutung sollte jedoch erst durch die Klonierung einer cDNA für den humanen C3aR gelingen.

1.4 C5a/C5aR: Modelle der Ligand-Rezeptor-Interaktion

Bindungs- und Funktionsstudien mit mutiertem C5a zeigten, daß mehrere diskontinuierlich über die Sequenz verteilte Regionen des Moleküls Kontaktpunkte für die Bindung an den C5aR

bereitzustellen scheinen [85-88]. Eine besondere Rolle kommt dabei dem flexiblen C-Terminus des C5a zu, kann doch die Affinität und Aktivität des C5a durch Entfernen des C-terminalen Arg74 drastisch gesenkt werden [89-91]. Die Bedeutung des C-Terminus für die Rezeptoraktivierung wird dadurch weiter unterstrichen, daß das C-terminale Octapeptid HKDMQLGR die Minimalsequenz darstellt, die spezifische, wenn auch geringe Affinität zum C5aR aufweist [92]; zudem vermögen dieses Peptid sowie weitere C-terminale Peptide über den C5aR Signaltransduktion auszulösen [86,93,94]. Desweiteren konnten, ausgehend von C5a-C-terminalen Peptiden, (niederaffine) kompetitive C5aR-Antagonisten entwickelt werden [95].

Auf Rezeptorseite wurden schon bald nach der Klonierung des C5aRs Beobachtungen gemacht, die darauf hinwiesen, daß der aspartatreiche N-Terminus des C5aRs an der C5a-Bindung beteiligt zu sein scheint – was im Einklang steht mit dem stark basischen Charakter des Liganden. So konnte gezeigt werden, daß poly- und monoklonale Antiseren gegen den C5aR-N-Terminus effizient die C5a-Bindung zu unterdrücken vermögen [96,97]. Zudem vermochte sowohl proteolytischer Verdau des C5aR-N-Terminus mit einer C5aR-spezifischen Metalloprotease aus dem Gift der Spinne *Plectruerys tristes* [53], als auch der Austausch bestimmter Aminosäurereste oder die Deletion N-terminaler Rezeptorbereiche durch zielgerichtete Mutagenese [98,99] die gegenseitige Affinität von Rezeptor und Ligand dramatisch zu reduzieren. Dabei fiel jedoch auf, daß die Fähigkeit kurzer C5a-C-terminaler Peptide, den Rezeptor zu aktivieren, von Veränderungen des Rezeptor-N-Terminus völlig unbeeinträchtigt blieb – was schließlich zur Postulierung eines Zwei-Punkt-Bindungsmodells für den C5aR und seinen Liganden führte. Demnach sollte der globuläre, basische Kernbereich des C5a an den sauren N-Terminus des Rezeptors binden, während der flexible C-terminale "Finger" des Liganden durch Wechselwirkung mit anderen Bereichen des C5aR – etwa den transmembranösen Regionen oder den extrazellulären Schlaufen (EL) – Signaltransduktion initiiert. Jüngste Beobachtungen einer deutlichen Assoziation von C5a und C5aR-N-terminalen Peptiden in Lösung unterstützen dieses Modell [100].

Durch zielgerichtete Mutagenese des C5aRs wurden weitere mutmaßliche Kontaktpunkte zum C5a aufgespürt; dabei leisteten der Vergleich der C5aR-Sequenzen verschiedener Species sowie Computermodelle des C5aRs [101,102] gute Dienste für die Auswahl der in Frage kommenden Aminosäurepositionen. Bei Mutageneseexperimenten, bei denen polare und geladene Aminosäuren in den transmembranösen Helices bzw. den extrazellulären Schlaufen ausgetauscht wurden, konnten tatsächlich einige Positionen identifiziert werden, die einen Einfluß auf die Ligandenbindung haben. So konnte durch die Substitution Glu199Gln eine Beteiligung dieses in der 2. extrazellulären Schlaufe gelegenen Restes an der Ligandenbindung nachgewiesen werden

[103]. Weitere Experimente mit C5a-homologen Peptiden ließen Lys68 im Liganden als wahrscheinlichen Bindungspartner für Glu199 des Rezeptors erscheinen.

Für die Seitenkette des C-terminalen Arg74 des C5a wurde Asp282 in der TM7 des Rezeptors als Gegenion diskutiert. Zwar wies ein Rezeptor mit Asp282Ala-Austausch keinerlei Affinität mehr zum Liganden auf, doch da der Austausch Asp282Asn unter Beibehaltung der Wildtyp-Affinität vonstatten ging, erscheint eine Wechselwirkung an dieser Stelle eher unwahrscheinlich [82].

Arg206 in der TM5 des Rezeptors wird als Wechselwirkungspartner der C-terminalen Carboxylatfunktion des Arg74 im Liganden angesehen. Während die Substitution dieses Restes durch Ala bei Expression in COS-M6-Zellen zu einem völligen Verlust an Bindungsaffinität führte [82], wies diese Mutante in RBL-2H3-Zellen normale Wildtyp-Affinität auf [104]. Substitution durch Gln hingegen führte zu einer verminderten Anzahl hochaffiner Bindungsplätze (und nicht etwa zu einer verminderten Affinität) bei gleicher Oberflächenexpression. Die Beobachtung, daß dieses Phänomen durch eine gleichzeitige Überexpression von G_iα-2 partiell kompensiert werden konnte, legt die Vermutung nahe, daß Arg206 an der Ausbildung des hochaffinen Zustandes des Rezeptors bei Kopplung mit dem G-Protein beteiligt ist.

1.5 C3a/C3aR: Fakten zur Ligand-Rezeptor-Interaktion

Über den *modus operandi* der Bindung des C3a an seinen Rezeptor ist weit weniger bekannt als beim C5a/C5aR-System. Zudem wurde ein Großteil der Studien mit humanem C3a und davon abgeleiteten Peptiden im heterologen Meerschweinchen-System durchgeführt, so daß die hier gewonnenen Erkenntnisse nicht ohne weiteres auf den Menschen übertragen werden können. Allerdings konnte im Meerschweinchen gezeigt werden, daß Peptide, die den C-Terminus des Liganden nachbilden, den Rezeptor aktivieren können; ein C-terminales Pentapeptid LGLAR vermochte bereits das volle Spektrum biologischer Aktivitäten auszulösen [105,106], und ein C-terminales 21er-Peptid wies immerhin 10% der wt-C3a-Aktivität auf [107,108]. Modifizierte C-terminale Peptide mit zusätzlichen hydrophoben Gruppen am N-Terminus wiesen bei kürzerer Kettenlänge ebenfalls hohe biologische Aktivität auf [69], was die Konstruktion eines im Meerschweinchen-System dem C3a äquipotenten "Superagonisten" ermöglichte [109], der im Menschen allerdings nur 10% der wt-Aktivität erreichte [110].

Die offensichtliche Bedeutung des C3a-C-Terminus steht im Einklang mit der Raumstruktur des C3a-Mokeküls [8,9,111], das – wie C5a – ebenfalls einen globulären α-helikalen Kern mit einem flexiblen C-Terminus aufweist; zudem wird C3a durch Entfernen des C-terminalen Arg77

vollständig inaktiviert [30]. Weitere Kontaktpunkte konnten im C3a bisher nicht identifiziert werden.

1.6 Rezeptorchimären als Mittel für Struktur/Funktionsanalysen

Zur Eingrenzung von Bereichen, die innerhalb der Sequenz eines Proteins eine bestimmte Funktion wahrnehmen, eignet sich die Konstruktion von Chimären mit strukturell ähnlichen Proteinen, die jedoch bezüglich des betrachteten Parameters verschiedenes Verhalten aufweisen müssen. Beispielsweise könnte es sich bei den Proteinen um homologe Rezeptoren handeln, die jedoch verschiedene Ligandenspezifität besitzen. Die Übertragung eines "Moduls" von Rezeptor R_A auf sein Gegenstück R_B kann dann verschiedene Folgen haben:

- R_B verliert die Fähigkeit, seinen natürlichen Liganden L_B zu binden. Dann wurde offenbar ein Sequenzbereich entfernt, der an der Ligandenbindung beteiligt ist (korrekte Expression und Faltung der Chimäre vorausgesetzt).
- R_B erwirbt die Fähigkeit, auch den fremden Liganden L_A zu binden. Dann beherbergt das von R_A übertragene Modul Strukturen, die die Bindung von L_A an R_A (mit-) vermitteln.
- R_B ändert sein Bindungsverhalten nicht. Dies kann einerseits daran liegen, daß das entfernte Sequenzmodul tatsächlich nicht an der Ligandenbindung beteiligt ist; andererseits könnten aber auch homologe Positionen im neu eingefügten Modul von R_A die verlorengegangenen Funktionen ersetzen. In diesem Falle müssen weitere Studien betrieben werden, um den Beitrag des Original-Moduls von R_B zur Bindung zu klären.

Tatsächlich wurden schon zahlreiche Chimären aus verschiedensten Rezeptorproteinen konstruiert, exprimiert und auf ihre Ligandenspezifität und –affinität bezüglich Bindung und Signaltransduktion untersucht. Z. B. ist es bei der großen Familie der Wachstumsfaktor-Rezeptoren mit Tyrosin-Kinase-Aktivität aufgrund ihres Aufbaus mit klar getrennten extrazellulären Bindungs- und intrazellulären Signaltransduktionsdomänen möglich, durch Austausch eben dieser Domänen Chimären zu konstruieren, die auf Stimulation mit dem Liganden des einen Rezeptors mit der typischen Signaltransduktion des anderen Rezeptors antworten (s. z. B. [112]).

Bei den G-Protein-gekoppelten Rezeptoren wurden zumeist nur sehr eng verwandte Rezeptoren, meist sogar Subtypen des gleichen Rezeptors, zur Chimärenbildung eingesetzt; so etwa – in zahlreichen Studien – beim β -adrenergen Rezeptor. Die Homologie zwischen den Rezeptorsequenzen betrug dabei in der Regel $>90\%$. Allerdings fanden auch schon die Chemokinrezeptoren CCR3 und CCR5 mit nur ca. 50%iger Sequenzhomologie Verwendung zur Chimärenbildung [113].

Der bis zur Klonierung des C3aRs nächste bekannte Verwandte des C5aRs war mit einer Sequenzhomologie von 28% der fMLPR. Trotz dieser eher geringen Homologie wurde der Versuch unternommen, Chimären aus diesen beiden Molekülen zu konstruieren, um die Ligandenbindungsstelle(n) beider Rezeptoren einzugrenzen [114,115]. Überraschenderweise wurde die überwiegende Mehrzahl dieser Chimären auch tatsächlich auf der Zelloberfläche exprimiert und lieferten Hinweise auf potentiell an der Ligandenbindung beteiligte Rezeptormodule; so konnte für den C5aR die Beteiligung der 2. extrazellulären Schlaufe an der Ligandenbindung gezeigt werden.

1.7 Ziel der Arbeit

In dieser Arbeit sollten Untersuchungen zu den molekularen Mechanismen der Rezeptor/Ligand-Interaktion der Anaphylatoxinen C3a und C5a mit ihren zellulären Rezeptoren durchgeführt werden. Dabei wurden drei verschiedene, aber inhaltlich zusammenhängende Themen bearbeitet:

1) Klonierung des humanen C3aRs. Eine cDNA des humanen C3aRs sollte aus einer cDNA-Bibliothek aus Bt₂cAMP-differenzierten U937-Zellen mittels eines Expressionsklonierungsverfahrens isoliert werden. Die Klonierung sollte durch wiederholte poolweise transiente Transfektion der Bibliothek in HEK293-Zellen, Nachweis der Rezeptorexpression durch Test auf erhöhte ¹²⁵I-C3a-Bindung an die Zellen, Reduktion der Größe positiver Pools und erneute Transfektion erfolgen. Nach erfolgreicher Isolierung eines ¹²⁵I-C3a-bindungsvermittelnden cDNA-Einzelklons sollte der mutmaßliche C3aR bezüglich Affinität und Spezifität der Bindung in kompetitiven Bindungsstudien mit ¹²⁵I-C3a als Tracer charakterisiert werden. Dazu standen außer dem natürlichen Liganden (aufgereinigtem C3a) noch verschiedene synthetische (C3a-analoga und nicht analoga) Peptide sowie rekombinant hergestelltes C4a zur Verfügung. Weiterhin sollte der C3aR auf die Fähigkeit zur Signaltransduktion getestet werden.

2) Generierung und Charakterisierung von C3aR/C5aR-Chimären, um Rezeptormodule zu identifizieren, die an der Ligandenbindung, Signaltransduktion und der Diskriminierung des jeweils heterologen Liganden beteiligt sind. Durch PCR-basierte Verfahren, Einführung neuer Restriktionsschnittstellen und Umklonierungsschritte sollten Expressionsplasmide für alle 16 C3aR/C5aR-Chimären (einschließlich der beiden Wildtyp-Rezeptoren) hergestellt werden, die durch Austausch der N-Termini und/oder der 2. extrazellulären Schlaufen möglich sind. Nach transienter Transfektion in HEK293-Zellen sollten alle chimären Proteine immunologisch auf Oberflächenexpression, in kompetitiven Bindungsstudien auf Affinität und Spezifität bezüglich C3a und C5a sowie nach Kotransfektion eines Expressionsplasmids für Gα-16 auf ihre Fähigkeit

zur Signaltransduktion untersucht werden. Für die Funktionsstudien sollten außer den natürlichen Liganden noch zwei synthetische Peptide, die den C-Termini von C3a bzw. C5a analog sind, zum Einsatz kommen.

3) ***Herstellung C-terminaler C5a-Mutanten zur Charakterisierung der Ligandenbindungsstelle in der 2. EL des C5aRs.*** Durch die rekombinante Produktion einiger C5a-Varianten mit Mutationen in den Pos. 68 (Lys68Glu, Lys68Met) und 74 (Arg74Asp; desArg74-Mutanten von wt-C5a und C5a[Glu68]) sollte das Zusammenspiel dieser Aminosäurereste mit einem mutmaßlichen Wechselwirkungspartner im C5aR (Glu199) bei Bindung und Signaltransduktion untersucht werden.

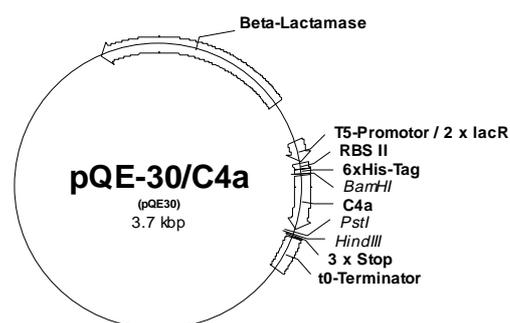
2. Materialien und Methoden

2.1 Ausgangsmaterial

Die folgenden Hilfsmittel standen zu Beginn der Arbeit bereits in der Arbeitsgruppe zur Verfügung:

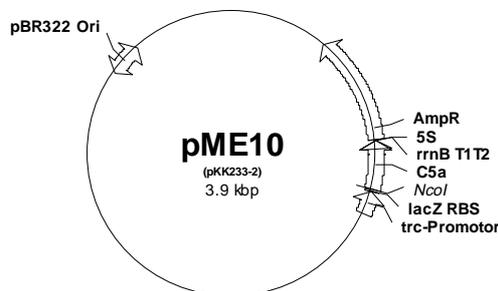
2.1.1 Expressionsplasmid pQE-30/C4a

Durch das Einklonieren des codierenden Bereichs des C4-Spaltprodukts C4a in den bakteriellen Expressionsvektor pQE-30 (Qiagen) konnte dieses Peptid als N-terminales His₆-Konstrukt exprimiert werden. Dadurch wurde eine einfache Aufreinigung über Ni-NTA-Agarose ermöglicht.



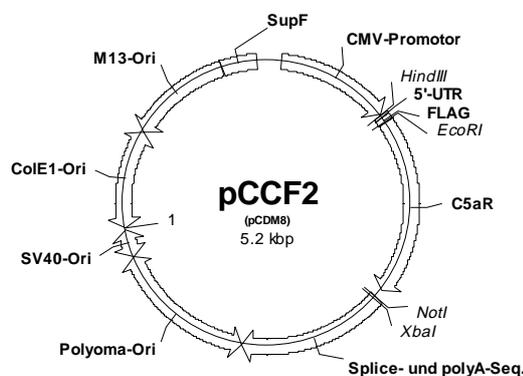
2.1.2 C5a-Expressionsplasmid pME10

Das Plasmid pME10 [116] enthält jenen Bereich des humanen C5-Gens, der dem Spaltprodukt C5a entspricht, als Insert im bakteriellen Expressionsplasmid pKK233-2 (Pharmacia) hinter einem ATG-Startcodon.



2.1.3 FLAG-C5a-Rezeptorplasmid pCCF2

Das Plasmid pCCF2 [117] enthält die natürliche 5'-UTR sowie das offene Leseraster des C5aRs im eukaryontischen Expressionsvektor pCDM8 (Invitrogen). Gleich hinter dem Startcodon wurde die Sequenz des FLAG-Epitops sowie eine EcoRI-Schnittstelle und ein zusätzliches Leucin-Codon eingefügt, so daß sich der Beginn des Inserts wie folgt liest:



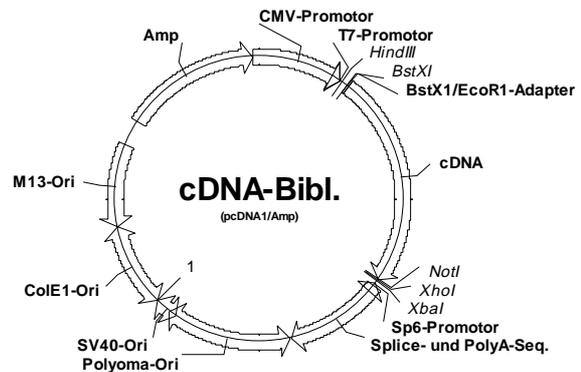
2. Materialien und Methoden

AAGCTT AGCCAGGAGACCAGAAC ATG GACTACAAGGACGATGACGATAAG GAATTC CTG AAC...
*Hind*III 5'-UTR Start FLAG *Eco*RI Leu C5aR-Aminos. 20

Außerdem enthält das C5aR-Gen an Aminosäure-Position 5 einen Asn \rightarrow Ser-Austausch, um N-Glycosylierung an dieser Stelle zu unterdrücken, die evtl. mit der Bindung von anti-FLAG-Antikörpern hätte interferieren können. Die Vermehrung des Plasmids erfolgte in *E. coli* MC1061/P3 unter Ampicillin- und Tetracyclin-Doppelselektion; die auf pCDM8 kodierte Suppressor-tRNA SupF erlaubte es dabei, die in den bakteriellen Resistenzgenen vorhandenen vorzeitigen Stopp-Codons zu überlesen und die Genprodukte in ausreichendem Maße zu exprimieren.

2.1.4 cDNA-Bibliothek aus Bt₂cAMP-differenzierten U937-Zellen

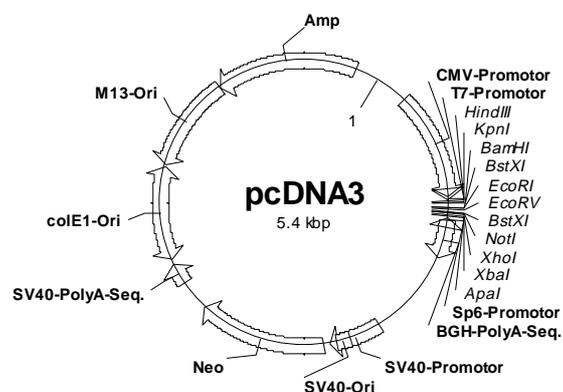
Die Bibliothek wurde erzeugt unter Zuhilfenahme des Copy-Kits (Invitrogen) aus poly-A⁺-RNA von Bt₂cAMP-differenzierten U937-Zellen (2.6.2), gewonnen mit dem Oligotex mRNA-Kit (Qiagen) aus Gesamt-RNA. Mit Hilfe eines 5'-anligierten *Bst*XI/*Eco*RI-Adapters wurde die Bibliothek über *Bst*XI und *Not*I in den eukaryontischen Expressionsvektor



pcDNA1/Amp kloniert und in *E. coli* TOP10F' ligiert. Restriktionsanalysen ergaben, daß 90% der Klone ein Insert trugen; die durchschnittliche Insert-Länge betrug ca. 1,5 kBp.

2.1.5 Eukaryontischer Expressionsvektor pcDNA3

Die Konstruktion der C3aR/C5aR-Chimären erfolgte letztendlich im eukaryontischen Expressionsvektor pcDNA3 (Invitrogen). Außer einem prokaryontischen Replikationsursprung und einer Ampicillin-Resistenz zur Vermehrung in bakteriellen Wirten enthält der Vektor die nötigen Sequenzen für eine hohe Expressionsrate in eukaryontischen Zellen sowie eine Neomycin-Resistenz für die Selektion stabiler Transfektanten.



2.2 Pufferlösungen

Alle Lösungen wurden mit Aqua dest. angesetzt und, sofern nicht anders angegeben, durch Autoklavieren oder Sterilfiltration sterilisiert.

<i>Lösung</i>	<i>Zusammensetzung</i>
Ampli-Puffer	50 mM TRIS-HCl pH 7,5 mit 0,15 M NaCl; mit NaCl auf eine Leitfähigkeit von 0,15 mS/cm eingestellt
Aufschlußpuffer	2% [w/v] SDS, 12,5% [v/v] Glycerin, 0,3 g/L Bromphenolblau, 5% [v/v] 2-Mercaptoethanol in SDS-Gellösung D
Bradford-Stammlösung	0,67 g/L Coomassie Brilliant Blue G 250 in 67% [v/v] 85% Phosphorsäure und 33% [v/v] 96% Ethanol
Chloronaphthol-Stammlösung	3 g/L 4-Chloro-1-naphthol in Methanol
CIAP-Additiv	10 mM MgCl ₂ , 10 mM ZnCl ₂
FPLC-Puffer A	30 mM Ammoniumacetat-Puffer pH 4,0, entgast, mit 0,1% [v/v] Trifluoressigsäure
FPLC-Puffer B	60 mM Ammoniumacetat-Puffer pH 4,0, entgast, mit Acetonitril zu einer Endkonzentration von 60% versetzt; dazu 0,1% [v/v] Trifluoressigsäure
GEBS	50 mM EDTA pH 8,0 mit 1% [w/v] SDS, 30% [v/v] Glycerin, 2,5 g/L Bromphenolblau
HAG-CM	20 mM HEPES pH 7,4 mit 125 mM NaCl, 5 mM KCl, 1 mM CaCl ₂ , 0,25% [w/v] BSA und 0,5 mM Glucose
PBS	10 mM Na-Phosphat pH 7,4 mit 2,7 mM KCl; mit NaCl auf eine Leitfähigkeit von 15 mS/cm eingestellt
P1	50 mM TRIS-HCl pH 8,0 mit 10 mM EDTA
P2	200 mM NaOH mit 1% [w/v] SDS
P3	2,5 M K-Acetat pH 4,8
Quicky-Puffer	40% [v/v] Glycerin mit 0,25% [w/v] Bromphenolblau
SDS-Gellsg. A	30% [w/v] Acrylamid und 0,8% [w/v] N,N'-Methylendiacylamid in Aqua dest.
SDS-Gellsg. B	1,5 M TRIS-HCl pH 8,8
SDS-Gellsg. C	10% [w/v] SDS in Aqua dest.
SDS-Gellsg. D	0,5 M TRIS-HCl pH 6,8
SDS-Laufpuffer	50 mM TRIS, 0,4 M Glycin, 0,1% [w/v] SDS; pH 8,5
SDS-Sammelgel	10% [v/v] SDS-Gellsg. A, 25% [v/v] SDS-Gellsg. D, 1% [v/v] SDS-Gellsg. C
Sequagel-Konzentrat	23,75% [w/v] Acrylamid, 1,25% [w/v] N,N'-Methylendiacylamid, 8,3 M Harnstoff (Sequagel)
Sequagel-Puffer	8,3 M Harnstoff in 10 x TBE für Sequenzgele (Sequagel)
Sequagel-Diluent	8,3 M Harnstoff (Sequagel)
Sequenzgel, Stamm 6%ig	24% [v/v] Sequagel-Konzentrat; 10% [v/v] Sequagel-Puffer; 66% [v/v] Sequagel Diluent
10 x TBE für Agarose-Gele	0,9 M TRIS, 0,9 M Borsäure, 0,2 mM EDTA
10 x TBE für Sequenzgele	1 M TRIS, 1 M Borsäure, 20 mM EDTA
TBS	50 mM TRIS-HCl pH 7,5 mit 200 mM NaCl
10 x TE	100 mM TRIS-HCl pH 7,5 - 8,0 mit 1 mM EDTA

2.3 Organismen

2.3.1 Bakterien

2.3.1.1 Stämme

Stammbezeichnung	Genotyp
<i>E. coli</i> GM48 (ATTC 39099)	F ⁻ <i>thr leu thi lacY galK galT ara fhuA tsx dam dcm supE44</i>
<i>E. coli</i> MC1061/P3 (Invitrogen)	F ⁻ <i>hsdR</i> (<i>r_k</i> ⁻ , <i>m_k</i> ⁺) <i>araD139 Δ(araABC-leu)7679 galU galK ΔlacX74 rpsL thi mcrB</i> {P3: Kan ^R Amp ^R (am) Tet ^R (am)}
<i>E. coli</i> SG13009 (Qiagen)	F ⁻ <i>lac ara gal mtl recA⁺ uvr⁺</i> {pREP4: Neo ^R }
<i>E. coli</i> TOP10F ['] (Invitrogen)	F ⁻ { <i>laqI^qTn10</i> (Tet ^R)} <i>mcrA Δ(mrr-hsdRMS-mcrBC) φ80lacZΔM15 ΔlacX74 deoR recA1 araD139 Δ(ara-leu)7697 galU galK rpsL endA1 nupG</i>
<i>E. coli</i> XL1-Blue (Stratagene)	<i>recA1 endA1 gyrA96 thi-1 hsdR17 supE44 relA1 lac</i> [F ⁻ <i>proAB lacI^qZΔM15 Tn10</i> (Tet ^R)]
<i>E. coli</i> Y1098 (DSM)	F ⁻ <i>Δ(lacZYA-argF)U169 Δlon araD139 rpsL hflA150[chr::Tn10]</i> {pMC9: Tet ^R Amp ^R <i>lacI^q</i> }

2.3.1.2 Medien

Alle Medien wurden mit Aqua dest. angesetzt und nach Zubereitung autoklaviert, falls nicht anders angegeben. Lösungen, die nachträglich zugegeben wurden, waren entweder durch Autoklavieren oder durch Sterilfiltration sterilisiert worden.

Medium	Zusammensetzung
LB-Medium	10 g/L Bacto-Trypton (Difco), 5 g/L Hefe-Extrakt (Merck) und 10 g/L NaCl
SOB-Medium	2% [w/v] Trypton, 0,5% [w/v] Hefeextrakt, 10 mM NaCl, 2,5 mM KCl
SOC-Medium	SOB-Medium mit 10 mM MgCl ₂ , 10 mM MgSO ₄ , 20 mM Glucose
5 x M9-Medium	37,6 g/L Na ₂ HPO ₄ · 2 H ₂ O, 15 g/L KH ₂ PO ₄ , 5 g/L NH ₄ Cl, 2,5 g/L NaCl
M9CA-Medium	200 mL 5 x M9-Medium mit Aqua dest. ad 1 L; nach dem Autoklavieren mit 0,5 mL 1 M MgSO ₄ , 2,3 mL 87% Glycerin, 2,5 mL 20% Casamino-säuren (Difco), 50 µL 0,5% [w/v] Vitamin B1 (Thiamin-Hydrochlorid) und 27 µL 1 M CaCl ₂ versetzen

Zur Bereitung von Agarplatten wurde dem entsprechenden Medium vor dem Autoklavieren 15 g/L Bacto-Agar (Difco) beige-setzt. Antibiotika wurden als sterilfiltrierte Stammlösungen (Ampicillin: 100 g/L in Aqua dest.; Tetracyclin: 2,5 g/L in Ethanol) bei -20°C gelagert und bei Bedarf dem fertigen Medium zugegeben (Ampicillin: ad 80 mg/L; Tetracyclin: 10 mg/L).

2.3.2 Eukaryontische Zelllinien

2.3.2.1 Stämme

<i>Stammbezeichnung</i>	<i>Beschreibung</i>	<i>Kulturbedingungen</i>
U937 (ATTC CRL 1593)	Etabliert aus malignen Zellen einer Pleuraleffusion eines 37jährigen Kaukasiers mit diffusem histiozytischem Lymphom; fast triploid (modale Chromosomenzahl 58); exprimieren viele monozytäre Marker; differenzierbar zu monozytenähnlichem Phänotyp [SUNDSTROM C., NILLSON K. (1976): <i>Int. J. Cancer</i> 17 :565].	RPMI 1640-Medium (Gibco) mit 5% [v/v] FCS sowie 50 U/mL Penicillin und 50 µg/mL Streptomycin
HEK293 (ATTC CRL 1573)	Permanente Linie aus primärem embryonalen menschlichen Nierengewebe, transformiert mit gescherter humaner Adenovirus Typ 5-DNA; hypotriploid (modale Chromosomenzahl 64 [J. Gen. Virol. (1977) 36 :59; <i>Virology</i> (1977) 77 :319; <i>ibid.</i> (1978) 86 :10].	NutMix F12-Medium (Gibco) mit 10% [v/v] FCS sowie 50 U/mL Penicillin, 50 µg/mL Streptomycin, 1 mM Natriumpyruvat und 2 mM Glutamin

Alle Medienbestandteile wurden entweder bereits steril vom Hersteller bezogen oder sterilfiltriert. Das fetale Kälberserum (Gibco) wurde durch 30minütiges Erhitzen auf 56°C inaktiviert. Zellen wurden generell im Brutschrank bei 37°C in einer Atmosphäre mit 5% CO₂ inkubiert.

2.4 Molekularbiologische Methoden

2.4.1 Herstellung kompetenter *E. coli*

Um *E. coli*-Zellen in einen Zustand zu versetzen, der das Einbringen von Fremd-DNA in die Zellen erlaubt (Kompetenz), wurden zwei verschiedene Verfahren verwendet. Für fertige Expressionsplasmide oder zur Plasmidvermehrung wurden Zellen, die nach der CaCl_2 -Methode [118] behandelt wurden, verwendet; Ligationsansätze hingegen wurden i. d. R. mittels des effizienteren Elektroporationsverfahrens transformiert. Da die Herstellung kompetenter Bakterien ein ununterbrochenes Arbeiten bei 4°C bzw. auf Eis erfordert, wurden alle verwendeten Materialien und Lösungen einige Stunden vor Beginn der Arbeit im Kühlschrank vorgekühlt.

2.4.1.1 CaCl₂-Methode

100 mL LB-Medium – evtl. mit einem Antibiotikum zur Selektion – wurden mit 1 mL einer Übernachtskultur des betreffenden *E. coli*-Stammes angeimpft und bei 37°C und 250 upm im Schüttelinkubator bis zu einer OD_{600} von 0,4 wachsen gelassen. Sodann wurden von der Zellsuspension 4 x 20 mL auf 30 mL-Corex Röhrchen verteilt und abzentrifugiert (10' bei 10.000 x g und 4°C in der Beckmann-Kühlzentrifuge J2-21 im JS13.1-Rotor). Die Bakterienpellets wurden in je 10 mL 100 mM MgCl_2 -Lösung resuspendiert, erneut zentrifugiert und nun in jeweils 10 mL 50 mM CaCl_2 -Lösung aufgenommen. Nach einer weiteren Zentrifugation wurden die Pellets in je 1 mL der CaCl_2 -Lösung resuspendiert, vereinigt und 20' auf Eis inkubiert. Nach diesem Zeitraum wurden 400 µL 87% [v/v] Glycerin zugegeben und die Zellen in Aliquots à 200 µL in flüssigem Stickstoff gefroren. Die Lagerung erfolgte bei -70°C.

2.4.1.2 Elektroporation

700 mL LB-Medium – ggf. mit einem Antibiotikum zur Selektion – wurden mit 10 mL einer Übernachtskultur des betreffenden *E. coli*-Stammes angeimpft und bei 37°C und 250 upm im Schüttelinkubator bis zu einer OD_{600} von 0,4 wachsen gelassen. Nach Erreichen dieses Wertes wurden die Kolben mit der Zellsuspension für 10' auf Eis inkubiert, bevor die Bakterien in zwei 500 mL-Zentrifugenbecher überführt und 15' bei 4.000 upm und 4°C im JA10-Rotor in der Beckmann-Kühlzentrifuge J2-21 sedimentiert wurden. Die Pellets wurden in je 250 mL eiskaltem Aqua dest. resuspendiert und erneut abzentrifugiert. Nach einer Wiederholung dieses Waschschrittes wurden die Bakterien in je 20 mL eiskaltem 10% [v/v] Glycerin resuspendiert, erneut abzentrifugiert und schließlich in insgesamt 2,5 mL 10% Glycerin vereinigt. Die so

vorbereiteten Zellen wurden in Aliquots à 100 µL in vorgekühlte Halbmikro-Reagiergefäße überführt, in flüssigem Stickstoff gefroren und bei -70°C gelagert.

2.4.2 Transformation von *E. coli*

Wie unter 2.4.1 ausgeführt, wurden zwei verschiedene Transformationsmethoden angewendet:

2.4.2.1 *CaCl₂-Methode*

Zur Transformation wurde ein eingefrorenes Aliquot kompetenter Zellen auf Eis aufgetaut und mit 1 – 100 ng Plasmid-DNA versetzt. Nach einer halbstündigen Inkubation auf Eis erfolgte ein 5minütiger Hitzeschock bei 37°C, gefolgt von einer weiteren Inkubation auf Eis (10'). Sodann wurde der Transformationsansatz mit 800 µL LB-Medium versetzt und 30' bei 37°C inkubiert. Schließlich wurden Aliquots von 5 bis einigen hundert µL auf angemessenen Selektionsmedien ausplattiert.

2.4.2.2 *Elektroporation*

Da durch eine Elektroporationsküvette kein zu großer Strom fließen darf, muß die DNA für dieses Transformationsverfahren in Wasser oder zumindest einem sehr niedrigmolaren Puffer gelöst vorliegen. Daher wurden Ligationsansätze (2.4.13) vor der Elektroporation gefällt (2.4.6), 3mal mit 70%igem Ethanol gewaschen und in 2 – 5 µL Aqua dest. aufgenommen. Fertige Plasmid-DNA, in TE-Puffer gelöst, wurde mit Aqua dest. auf 1 ng/µL verdünnt, wodurch die Ionenkonzentration in der Lösung i. d. R. auf tolerable Werte reduziert wurde.

Die vorbereitete DNA wurde – wie auch die Elektroporationsküvette – auf Eis vorgekühlt. Sodann wurden 40 µL der auf Eis aufgetauten kompetenten Zellen mit der DNA vermischt, in die Elektroporationsküvette (Invitrogen, d = 2 mm) überführt und im GenePulser (Biorad) bei 2.500 V, einer Kapazität von 25 µF und einem Parallelwiderstand von 400 Ω elektroporiert. Sofort nach dem Spannungsstoß wurde der Ansatz in 1 mL SOC-Medium überführt und 30' bei 37°C im Schüttelinkubator inkubiert. Schließlich wurden Aliquots von 5 bis einigen hundert µL auf Selektionsmedium ausgestrichen.

2.4.3 Schnelltest auf Plasmidgröße ("Quicky")

Um rasch den Erfolg einer Ligation (2.4.13) zu überprüfen, wurden nach einem Protokoll von [119] einige Kolonien des Über-Nacht-Ausstriches des elektroporierten Ligations-Ansatzes mit autoklavierten Zahnstochern abgenommen, in je 250 µL LB/Amp-Medium überführt und ca. 5 Stunden unter Schütteln bei 37°C inkubiert. Bei Auftreten einer deutlichen Trübung wurden

50 µL der Bakteriensuspension in einem Halbmikro-Reagiergefäß mit 10 µL Quicky-Puffer und 100 µL Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol 25:24:1 versetzt und kurz heftig vermischt. Nach Zentrifugation (1' bei 13.000 upm und RT, Eppendorf-Zentrifuge (Biofuge 15, Heraeus Sepatech)) wurden 20 µL der wässrigen, oberen Phase auf ein 0,6%iges Agarosegel aufgetragen und, wie unter 2.4.9 beschrieben, aufgetrennt. Von einer Midi- oder Maxi-Präparation (2.4.4.2) des jeweils verwendeten leeren Vektors wurden ca. 200 ng als Kontrolle mitgeführt. Die Plasmide zeigten sich als schwache Bande zwischen der bakteriellen genomischen DNA und den Banden der rRNAs und der tRNA.

2.4.4 Präparation von Plasmid-DNA

Je nach Anwendung wurden verschiedene Verfahren zur Plasmidpräparation eingesetzt, die DNA verschiedener Menge und Reinheit ergaben.

2.4.4.1 Plasmid-Mini-Präparation

Um nach einer Ligation eine größere Anzahl von Klonen auf korrekte Länge und/oder Schnittstellenverteilung des Inserts zu überprüfen, wurden nach einem modifizierten Protokoll zur alkalischen Lyse [120] einige µg DNA gewonnen ("Mini-Präp"). Dazu wurden 1,5 mL Übernachtskultur der betreffenden *E. coli*-Klone in der Eppendorf-Zentrifuge (Biofuge 15, Heraeus Sepatech) 30" bei 15.000 upm und RT abzentrifugiert, der Überstand restlos entfernt und das Bakterienpellet in 200 µL P1 sorgfältig resuspendiert. Die Lyse wurde durch Zugabe von 200 µL P2 und etwa 5maliges vorsichtiges Wenden des Reagiergefäßes eingeleitet. Nach exakt 5 Minuten wurde die Reaktion durch Zugabe von 200 µL P3 gestoppt und die ausgeflockten Bakterienproteine durch ca. 15minütiges Zentrifugieren (bei 13.000 upm und RT, Eppendorf-Zentrifuge (Biofuge 15, Heraeus Sepatech)) sedimentiert. Der Überstand wurde in ein neues Gefäß überführt, eine Phenol-Chloroform-Extraktion nach 2.4.5 und eine Ethanol-Fällung nach 2.4.6 durchgeführt und die DNA in 20 – 40 µL RNase-Lösung (50 mg/L in Aqua dest.) aufgenommen.

Alternativ wurden statt der Puffer P1 bis P3 die für Midi- bzw. Maxi-Präps (2.4.4.2) vom Hersteller mitgelieferten Lysepuffer verwendet; da diese bereits RNase enthielten, wurde die so präparierte DNA statt in RNase-Lösung in TE-Puffer aufgenommen.

2.4.4.2 Plasmid-Midi- und Maxi-Präparation

Zur Präparation größerer Plasmid-Mengen (einige hundert µg bis mehrere mg) mit kommerziellen Kits (Qiagen, Genomed, Macherey & Nagel) wurden 100 mL- ("Midi") bzw. 500 mL- ("Maxi") Übernachtskulturen transformierter *E. coli* aufgearbeitet. Nach alkalischer

Lyse gemäß Herstellerprotokoll wurde die DNA über die mitgelieferten Ionenaustauschersäulen aufgereinigt, mit Isopropanol gefällt, mit 70%igem Ethanol gewaschen und in 250 μ L bzw. 1 mL TE-Puffer aufgenommen.

2.4.5 Phenol-Chloroform-Extraktion

Zum Entfernen von Protein-Kontaminationen aus DNA-Lösungen – etwa nach einer Plasmid-Minipräparation (2.4.4.1) oder einer Restriktionsverdauung (2.4.8) – wurde die Lösung mit dem gleichen Volumen einer Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol-Mischung (25:24:1) versetzt und kurz heftig vermischt. Nach Trennung der beiden Phasen durch Zentrifugation für 30' bei 13.000 upm und Raumtemperatur in der Eppendorf-Zentrifuge (Biofuge 15, Heraeus Sepatech) wurde die obere, wässrige Phase vorsichtig abgenommen und in ein neues Gefäß überführt. Zur Entfernung von Phenolresten wurde die Lösung mit dem gleichen Volumen Chloroform/Isoamylalkohol 24:1 extrahiert und erneut zentrifugiert. Die obere Phase wurde abgenommen und einer Ethanol-fällung nach 2.4.6 unterzogen.

2.4.6 Ethanol-fällung

Um DNA in einen anderen Puffer zu überführen – etwa nach einer Phenol-Chloroform-Extraktion (2.4.5) oder Ligation (2.4.13) –, wurde die DNA-Lösung zunächst mit 10% ihres Volumens an 3 M Na-Acetat pH 5,2 sowie dem 2,5fachen Volumen an eiskaltem 96%igem Ethanol versetzt (für Elektroporation: zusätzlich 1 μ L 20 g/L Glycogen). Nach ca. halbstündiger Inkubation bei -70°C wurde die gefällte DNA durch 20minütiges Zentrifugieren (13.000 upm, 4°C , Eppendorf-Kühlzentrifuge (Biofuge 15R, Heraeus Sepatech)) sedimentiert und der Überstand verworfen. Das Pellet wurde – je nach erwünschtem Grad an Salzfreiheit – ein- bis dreimal mit eiskaltem 70%igem Ethanol gewaschen und im Vakuum getrocknet (SpeedVac Concentrater, Savant). Die gefällte DNA wurde schließlich in Aqua dest. (für Elektroporation, 2.4.2.2) oder TE-Puffer gelöst.

2.4.7 Bestimmung der DNA-Konzentration

Die DNA-Konzentration und -Reinheit wurde überschlagsmäßig photometrisch durch Messung der Extinktion einer angemessenen Verdünnung (Midi/Maxi-Präp: 1:20 – 1:50) bei $\lambda = 260$ und 280 nm bestimmt [121]. Als Extinktionskoeffizient wurde dabei $\epsilon = 50 \text{ mg}^{-1} \cdot \text{cm}^{-2}$ angenommen; der Quotient E_{260}/E_{280} sollte im Bereich von 1,8 – 2,0 liegen.

2.4.8 Restriktionsverdauung

Die Spaltung von DNA mit Restriktions-Endonukleasen wurde unter den Puffer- und Temperaturbedingungen durchgeführt, die der Hersteller (Boehringer Mannheim, NBI Fermentas, New England Biolabs, Pharmacia, Promega, Stratagene oder TaKaRa) für das jeweilige Enzym vorgab. Eine allgemeine Restriktion sah wie folgt aus:

1	μL	10 x Puffer
500	ng	DNA
10	U	Enzym
		Aqua dest. ad 10 μL

Die Inkubation erfolgte i. d. R. über eine Stunde; bei Bedarf wurde das Enzym nach der Verdauung durch Erhitzen inaktiviert. Bei kompatiblen Puffern wurde u. U auch eine Doppelverdauung mit zwei Enzymen durchgeführt. Für Enzyme, deren Aktivität durch *dcm*-Methylierung innerhalb ihrer Erkennungssequenz herabgesetzt wird, mußte vor dem Verdau eine Plasmidpräparation in einem *dcm*-negativen *E. coli*-Stamm (GM48) durchgeführt werden.

2.4.9 Agarose-Gelelektrophorese

DNA-Fragmente verschiedener Länge wurden durch Auftrennung in einer Agarose-Gelelektrophorese nachgewiesen und identifiziert. Dazu wurden – je nach erwarteter Fragmentlänge – 0,6 bis 1,2% ige [w/v] Agarosegele mit 1 x TBE als Gel- und Laufpuffer in einer wassergekühlten Flachbett-Gelkammer gegossen. Dabei wurde der zur Visualisierung der DNA verwendete, interkalierende Fluoreszenzfarbstoff Ethidiumbromid direkt in die Agaroselösung gegeben (Stammlösung 0,5 g/L; Endkonzentration im Gel ca. 40 μg/L), nachdem die Agarose in einem Mikrowellenofen in 1 x TBE-Puffer aufgeköchelt worden war und sich auf ca. 50 – 60°C abgekühlt hatte. Nach Erstarren der Gelmasse, Überschichten mit 1 x TBE und Entfernen der Kämme wurden die DNA-Proben im Verhältnis 2:1 bis 10:1 mit 5 x GEBS versetzt und bei 120 V gegen einen Längenstandard (1 kB-ladder, Gibco) aufgetrennt. Anschließend erfolgte die Sichtbarmachung der DNA-Banden auf einem UV-Tisch bei $\lambda = 405$ nm und unter Verwendung eines Herolab-Geldokumentationssystems.

2.4.10 DNA-Extraktion aus Agarose-Gelen

Je nach Anwendung wurden unterschiedliche Extraktionsmethoden verwendet; in der Regel wurde die Zentrifugationsmethode bevorzugt, solange nicht mit sehr geringen DNA-Mengen

oder sehr empfindlichen Folgeschritten gearbeitet wurde. In allen Fällen wurden jedoch die entsprechenden DNA-Banden auf dem UV-Tisch (Sichtschutz!) mit einem Skalpell möglichst knapp aus dem Agarosegel ausgeschnitten und in einzelne Halbmikro-Reagiergefäße überführt.

2.4.10.1 Zentrifugation durch Filterpapier

Für diese Methode wurden zunächst sowohl Boden als auch Deckel eines 500 μL -Reagiergefäßes mittels einer heißen Kanüle durchlöchert und in ein deckellooses 1,5 mL-Reagiergefäß gesteckt. Sodann wurde einige 100 μL einer autoklavierten Suspension zerissenen Whatman 3MM-Filterpapiers in TE-Puffer in das kleinere Gefäß überführt und in der Eppendorf-Zentrifuge (Biofuge 15, Heraeus Sepatech) kurz angeschleudert. Die dabei in das große Gefäß gelaufene Flüssigkeit wurde entfernt, das Papierkissen im kleinen Gefäß mit einer Pipettenspitze etwas angedrückt und die Gefäßdublette für 3' bei 13.000 upm zentrifugiert. Anschließend wurde die Restflüssigkeit aus dem großen Gefäß erneut entfernt und das ausgeschnittene Gelstück in das kleine Gefäß überführt. Durch 5minütige Zentrifugation der Dublette bei 13.000 upm und Raumtemperatur wurde die DNA-haltige flüssige Phase aus dem Gelstück durch das Papierkissen weitgehend in das untere Gefäß geschleudert. Zum Nachspülen wurden 50 μL TE-Puffer auf das Kissen gegeben und erneut 5' zentrifugiert. Die vereinigten Eluate wurden bei Bedarf vor der weiteren Verwendung nach 2.4.6 gefällt.

2.4.10.2 Glasmilch-Methode

Bei dieser Methode macht man sich zunutze, daß DNA unter bestimmten Bedingungen reversibel an Glaspartikel adsorbiert. In dieser Arbeit wurde hierfür der kommerzielle Jetsorb-Kit (Genomed) verwendet. Die Durchführung erfolgte nach dem Protokoll des Herstellers.

2.4.11 Dephosphorylierung

Sollte in einen Vektor ligiert werden, der durch Verdauung mit nur einem Restriktionsenzym linearisiert worden war, mußten die 5'-Enden der Vektor-DNA dephosphoryliert werden, um eine Religation des Vektors zu vermeiden. Die Dephosphorylierung erfolgte in TE, OPA-Puffer (Pharmacia) oder NEB-Puffer 2, 3 oder 4 (New England Biolabs); dementsprechend wurde entweder der Restriktionsansatz direkt nach Deaktivierung der Endonukleasen durch Erhitzen oder aus dem Gel aufgereinigte DNA verwendet. Die DNA-Lösung wurde mit 0,1 U alkalischer Kälberdarm-Phosphatase (CIAP, Stratagene) und 10% [v/v] CIAP-Additiv versetzt und mindestens 30' bei 37°C inkubiert. Nach Phenol-Chloroform-Extraktion oder Gelaufreinigung konnte das so vorbereitete Plasmid in eine Ligation (2.4.13) oder in weitere (2.4.8) Restriktionsverdauungen eingesetzt werden.

2.4.12 Generierung von glatten Enden

Für einige Ligationsschritte mußte – je nach zuvor verwendeten Restriktionsnukleasen – ein überhängendes in ein glattes DNA-Ende überführt werden. Je nach erwünschter Zielsequenz standen 2 Verfahren zur Verfügung:

2.4.12.1 Auffüllen überhängender 5'-Enden mit Klenow-Polymerase

Zum Auffüllen überhängender 5'-Enden wurde der Restriktionsansatz mit 1 µL 2 mM dNTP-Mix (je 0,5 mM dATP, dCTP, dGTP und dTTP) und 1 U DNA-Polymerase I (Klenow-Fragment) versetzt und mindestens 30' bei 37°C inkubiert. Nach Gelaufreinigung des Ansatzes (2.4.10) konnte die DNA in weitere Restriktions- und Ligationsschritte eingesetzt werden.

2.4.12.2 Abdauen überhängender 5'-Enden mit Mungbohnen-Nuklease

Zum Abdauen überhängender 5'-Enden wurde der Restriktionsansatz gefällt, in einem speziellen Puffer für Mungbohnen-Nuklease (New England Biolabs) aufgenommen und nach Start der Reaktion mit 5 – 10 U Mungbohnen-Nuklease 15 – 30' bei 25°C inkubiert; alternativ konnte die Reaktion auch in NEB-Puffer 1, 2 oder 4 (New England Biolabs) mit 10% [v/v] 10 mM ZnSO₄ durchgeführt werden. Nach Gelaufreinigung des Ansatzes (2.4.10) konnte die DNA in weitere Restriktions- und Ligationsschritte eingesetzt werden.

2.4.13 Ligation

Ligation erfolgte mit T4-DNA-Ligase in Ansätzen von 10 – 50 µL. Generell wurde das Insert in 5 – 10fachem (bei glatten Enden: 2fachem) molarem Überschuß gegenüber der Vektor-DNA eingesetzt. Als Puffer wurde der vom Hersteller (New England Biolabs) mitgelieferte T4-Ligase-Puffer verwendet; pro Ligation wurden 400 U (entspricht 6 Weiss-Units für ATP-PP-Austausch) Enzym eingesetzt. Nach Inkubation über Nacht bei 14 – 18°C wurde der Ligationsansatz gefällt (2.4.6) und mittels Elektroporation (2.4.2.2) in *E. coli* transformiert.

2.4.14 PCR

Die Polymerase-Kettenreaktion [122] ist ein Verfahren, das die enzymatische Vervielfältigung kleinster DNA-Mengen erlaubt. Dabei werden kurze, synthetische Oligonukleotide, die den terminalen Bereichen der zu amplifizierenden Sequenz komplementär sind, als Primer für die Polymerase verwendet. Diese Primer können bei Bedarf auch Mutationen oder zusätzliche 5'-Sequenzen – etwa zusätzliche Restriktionsschnittstellen – enthalten. Die Entwicklung thermostabiler DNA-Polymerasen – wie die hier verwendete *Taq*-Polymerase –

erlaubte die Automatisierung des Prozesses. Die Amplifikation erfolgte i. d. R. in folgendem Ansatz:

10	μL	Taq-Puffer (Gibco)
10	μL	2 mM dNTP-Mix (je 0,5 mM dATP, dCTP, dGTP und dTTP)
10	μL	Primer 1 (10 μM)
10	μL	Primer 2 (für den Gegenstrang; ebenfalls 10 μM)
3	μL	50 mM MgCl_2
1	ng	Matritzen-DNA
0,5	μL	5 U/ μL Taq-Polymerase
Aqua dest. ad 100 μL		

Um zu verhindern, daß bei den hohen Denaturierungs- und Extensionstemperaturen aus dem Ansatz Wasser verdunstet und sich am Deckel des Reagiergefäßes sammelt, wurde das Reaktionsgemisch mit einem Tropfen Mineralöl überschichtet, bevor die Reaktion im Thermocycler gestartet wurde. Für jedes Matritzen-Primer-Paar wurde i. d. R. zunächst die optimale Reaktionstemperatur ermittelt, indem das folgende Standard-Programm mit verschiedenen Annealing-Temperaturen T_a gefahren wurde:

Segment	Anz. Wdh.	Dauer [s]	Prozess
1	1	10	Aufheizen auf 90°C
		290	Denaturierung bei 90°C
2	30 – 40	10	Aufheizen auf 90°C
		80	Denaturierung bei 90°C
		10	Abkühlung auf T_a
		110	Annealing bei T_a
		10	Aufheizen auf 72°C
		110	Strangverlängerung bei 72°C
3	1	10	Aufheizen auf 72°C
		290	Strangverlängerung bei 72°C

Ergab sich ein unerwünschter Hintergrund an Nebenprodukten, wurde entweder ein Heißstart durchgeführt (d. h. die Taq-Polymerase erst beim Annealing-Prozess des 2. Segments zugegeben) oder die ersten 10 Wiederholungen von Segment 2 bei einer etwas höheren T_a gefahren. Da PCR ein sehr kontaminationsempfindliches Verfahren darstellt, wurde für jeden Ansatz eine Negativkontrolle (d. h. ohne Zugabe von Matritzen-DNA) mitgeführt.

2.4.15 Fusions-PCR

PCR kann außer zur Amplifikation von DNA auch zum Verschmelzen zweier sich über einen kurzen Bereich überlappender Sequenzen eingesetzt werden – wie in dieser Arbeit zum Austausch der N-Termini von C3aR und C5aR. Voraussetzung dafür ist die Generierung zweier überlappender PCR-Fragmente mittels geeigneter Primer (s. Abb. 2.1). In einer zweiten PCR – der eigentlichen Fusions-PCR – werden die beiden Fragmente verschmolzen, wobei sie im ersten Schritt gegenseitig als Primer für die Zweitstrangsynthese fungieren. Durch die zugegebenen Endprimer wird in den weiteren Zyklen das Fusionsprodukt amplifiziert.

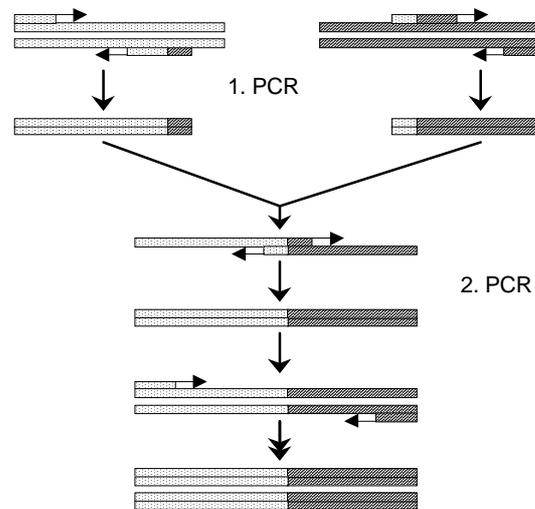


Abb. 2.1: Fusions-PCR. Schematische Darstellung

Der Reaktionsansatz für die Fusion entsprach prinzipiell dem einer Standard-PCR, jedoch mit dem Unterschied, daß statt Matrizen-DNA je ein μL des PCR-Ansatzes der Einzelfragment-PCRs eingesetzt wurde.

2.4.16 Mutagenese mit dem QuickChange-Kit (Stratagene)

Punktmutationen wurden in dieser Arbeit unter Zuhilfenahme des QuickChange-Mutagenese-Kits (Stratagene) eingeführt. Dazu wurden, entsprechend Herstellerempfehlung, je zwei komplementäre Mutagenese-Primer synthetisiert und mit einem Plasmid, das die Ausgangssequenz enthielt, in einige PCR-Zyklen mit der thermostabilen, fehlerkorrigierenden *Pfu*-Polymerase eingesetzt. Im weiteren Verlauf der Prozedur macht man sich zunutze, daß die Ausgangsplasmide aufgrund ihrer Präparation aus *dam*⁺-*E. coli*-Stämmen *dam*-methyliert sind, die neu synthetisierten, die Mutation tragenden Stränge hingegen nicht. Mit der Restriktions-Endonuklease *DpnI*, deren tetramere Erkennungssequenz GATC statistisch alle 256 Nukleotide vorkommt, werden gezielt die *dam*-methylierten Ausgangsstränge verdaut – der Reaktionsansatz sollte anschließend nur noch mutierte (neu synthetisierte und daher nicht-methylierte) Plasmide enthalten. Da *Pfu* keine Ligase-Aktivität enthält, weisen die neuen Stränge zwar jeweils einen Einzelstrangbruch 5' des jeweiligen Primers auf, aber aufgrund der Komplementarität der Primersequenzen liegen die Plasmide trotzdem doppelsträngig-zirkulär vor und können mit der CaCl_2 -Methode (2.4.2.1) direkt in *E. coli* XL1-Blue transformiert werden.

2.4.17 DNA-Sequenzierung

Die für PCR eingesetzte *Taq*-Polymerase besitzt keine Fehlerkorrekturaktivität, und auch die fehlerkorrigierende *Pfu*-Polymerase aus dem QuickChange-Kit weist lediglich eine stark verringerte Fehlerrate auf. Da also nach PCR-Schritten die Anwesenheit unerwünschter Mutationen in den amplifizierten DNA-Abschnitten nicht ausgeschlossen werden kann, mußten die entsprechenden Bereiche sequenziert werden. Dies geschah – sofern nicht ein kommerzielles Sequenzierunternehmen (Larova oder MWG Biotech) herangezogen wurde – mittels des T7-Sequencing-Kits der Firma Pharmacia, der auf der Methode des Kettenabbruchs durch Didesoxynukleotide nach Sanger [123] beruht. Einen synthetischen Primer als Startpunkt verwendend, wird hierbei die DNA-Polymerase des Bakteriophagen T7 eingesetzt, um (durch den Einbau von α -³⁵S-dATP markierte) Zweitstränge zu synthetisieren, die durch den gelegentlichen Einbau von Didesoxy-Nukleotiden an zufälligen Positionen abgebrochen werden. Da pro Sequenzierung vier verschiedene Ansätze mit jeweils nur einer Species an ddNTPs bereit werden, werden pro Ansatz verschiedene markierte DNA-Fragmente generiert, deren Längen den Positionen der entsprechenden Nukleotide relativ zum Primer entsprechen. Nach paralleler Auftrennung aller vier Ansätze in einem Polyacrylamidgel und Autoradiographie ergibt sich aus der Bandenverteilung unmittelbar die gefragte Sequenz.

Die Sequenzierung wurde weitgehend entsprechend dem Herstellerprotokoll durchgeführt. Zunächst wurden pro Sequenzierprimer 1 – 2 µg Plasmid-DNA in 50 µL Aqua dest. durch Zugabe von 12,5 µL 2 M NaOH für 10' bei Raumtemperatur denaturiert; daraufhin erfolgte eine Ethanol-fällung nach 2.4.6. Das getrocknete Pellet wurde in 10 µL Aqua dest. aufgenommen, mit 2 µL des jeweiligen Primers (10 µM) und 2 µL Annealing-Puffer (Pharmacia) versetzt und 20' bei 37°C sowie 10' bei Raumtemperatur inkubiert. Zur Markierung wurden 3,2 µL einer Mischung aus 15 µL Label-Mix (Pharmacia) und 1 µL α -³⁵S-dATP (9,25 GBq/µL, Amersham) sowie 2 µL einer 1,5 U/µL T7-DNA-Polymerase-Verdünnung zugegeben und 5' bei Raumtemperatur inkubiert. Der Kettenabbruch wurde in 15"-Intervallen durch Verteilen des Markierungsansatzes auf 4 Reagiergefäße initiiert, in denen je 2,5 µL einer Didesoxynucleosidtriphosphat-Lösung (Pharmacia) vorgelegt waren. Nach weiteren 5' bei 37°C wurde die Reaktion insgesamt durch Zugabe von je 4,5 µL Stopp-Lösung (Pharmacia) – wiederum in 15"-Intervallen – beendet.

Die so vorbereiteten Sequenzierproben wurden nach 5minütigem Aufkochen zwecks Denaturierung auf ein 6%iges Polyacrylamidgel aufgetragen, das wie folgt vorbereitet wurde: 60 mL Gel-Stammlösung wurden nach Zugabe von 20 µL TEMED und 300 µL 10% [w/v] APS zwischen zwei silanisierte (Repel-Silan, LKB), durch Abstandshalter auf 0,4 mm Distanz

gehaltene und an drei Seiten abgeklebte Glasplatten (31 x 38,5 x 0,4 cm) gegossen. Nach der Polymerisation wurde das Gel einer ca. 1stündigen Vorlaufphase bei 80 W unterzogen, bevor die ersten 2,5 µL-Aliquots der Proben aufgetragen wurden. Nachdem beide Farbstoffe der Stopp-Lösung (Bromphenolblau und Xylencyanol) das Gel verlassen hatten, wurden auf weiteren Spuren erneut 2,5 µL-Aliquots aufgetragen und bis zum Verlassen nur des ersten Farbstoffs (Bromphenolblau) laufen gelassen. Durch die zweifache, zeitlich versetzte Probenaufgabe konnte der volle Längenbereich markierter Fragmente (ca. 20 bis 300 Bp) aufgetrennt und ausgewertet werden.

Nach dem Gellauf wurden die Glasplatten getrennt und die Platte, auf der das Gel haften geblieben war, für 20' in ein Fixierbad aus 10% [v/v] Methanol und 10% [v/v] Essigsäure gelegt. Nach Aufziehen des Gels auf einen Bogen Whatman 3MM-Filterpapier wurde das Gel unter Vakuum bei 80°C ca. 60' getrocknet und durch Auflegen eines Röntgenfilms (Kodak X-Omat Ar 35 x 43) 1 – 3 Tage autoradiographiert.

2.5 Biochemische Methoden

Zu Beginn der Arbeit wurden aus Blut aufgereinigtes C3a bzw. selbst rekombinant hergestelltes His₆-C4a bzw. C5a verwendet; im Verlauf der Arbeit wurde auf kommerziell aufgereinigtes C3a (Advanced Research Technologies) bzw. kommerzielles rekombinantes C5a (Sigma) gewechselt.

2.5.1 Gewinnung von C3a aus Blut (nach Dissertation T. Kretzschmar, 1992)

Diese Methode wurde nicht selbst durchgeführt und sei daher nur kurz skizziert. Von 8 SpenderInnen wurden je 20 mL Blut entnommen, dessen zelluläre Bestandteile abzentrifugiert und im Plasma das Komplementsystem (unter Inaktivierung der Carboxypeptidase N) mit Zymosan aktiviert. Nach einer halben Stunde bei 37°C wurde das Plasma mit HCl auf pH 5,0 eingestellt und bei 70°C einer 15minütigen Hitze-Säure-Fällung unterzogen. Nach Abzentrifugation der ausgefallenen Proteine wurde der Überstand einer Ionenaustauscher-Chromatographie über eine SSFF-Säule (Pharmacia) unterzogen; die Eluation erfolgte mittels eines Salzgradienten von 0,15 – 1,5 M NaCl in 10 mM MES pH 6,2. Das Eluat wurde in 8 mL-Fractionen gesammelt und diejenigen Fractionen, die sich im ARA (2.6.1) als positiv erwiesen, vereinigt und einer FPLC-Reinigung nach 2.5.4 unterzogen.

2.5.2 Expression von rekombinantem His₆-C4a (nach Diplomarbeit A. Hölzer 1996)

Die Expression und Ni-NTA-Agarose-Aufreinigung von His₆-C4a wurde nicht selbst durchgeführt und wird daher nur kurz beschrieben. Mit einer 50 mL-Übernachtskultur von pQE-30/C4a-transfizierten *E. coli* SG13009 wurde 1 L LB beimpft. Unter Selektion mit 100 µg/mL Ampicillin und 25 µg/mL Kanamycin wurden die Bakterien bis zu einer OD₆₀₀ von 0,7 wachsen gelassen. Die Induktion der Expression erfolgte durch Zugabe von 2 mM IPTG (Endkonzentration). Nach 2,5 h wurden die Zellen geerntet und durch leichtes Schütteln in 6 M Guanodiniumchlorid pH 8,0 lysiert; der Lyse-Puffer enthielt – wie auch die Säulenpuffer (s. u.) – zusätzlich 0,1 M NaH₂PO₄ und 0,01 M TRIS. Nach Abzentrifugieren der Zelltrümmer wurde das Lysat auf eine 6 mL-Ni-NTA-Agarose-Säule gegeben und nacheinander mit 8 M Harnstoff pH 8,0 und pH 6,3 gespült. Die Eluation erfolgte sukzessive mit 8 M Harnstoff pH 5,9 und pH 4,5 in 2,5 mL-Fractionen. Nach Test im SDS-Gel mit Silberfärbung (2.5.7, 2.5.8) wurden positive Fractionen vereinigt und durch langsame (ca. 20 mL/h) Zugabe eines 50 mM TRIS-Puffers pH 8,0 mit 0,05% Tween 80 und Glutathion (2 mM reduzierte und 20 mM oxidierte Form) renaturiert. Die weitere Aufreinigung erfolgte über FPLC (2.5.4)

2.5.3 Expression von rekombinantem C5a (nach [116])

Zu Beginn der Arbeit lag die Sequenz des humanen C5a bereits als Insert im prokaryontischen Expressionsplasmid pKK233-2 (Pharmacia) vor (Plasmid pME10, 2.1.2). Die Präparation erfolgte in der Regel im 8-Liter-Maßstab. Nach CaCl_2 -Transformation in *E. coli* Y1089¹ wurden 4 x 100 mL LB/Amp mit je 4 Kolonien des Übernachts-Ausstriches auf LB/Amp beimpft und über Nacht bei 37°C im Schüttelinkubator inkubiert. Am nächsten Tag wurde die Bakteriensuspension auf 8 x 50 mL-Kunststoff-Röhrchen verteilt und bei 3.000 upm und Raumtemperatur in der Minifuge RF (Heraeus Sepatech) sedimentiert. Die Pellets wurden in 50 mL M9CA resuspendiert und zum Beimpfen der 8 Hauptkulturen à 1 L M9CA herangezogen. Nach 1 h bei 37°C wurde die Expression durch Zugabe von 1 mM IPTG (Endkonzentration) induziert, und nach 2 – 3 weiteren Stunden wurden die Bakterien durch Zentrifugation (15' bei 7.500 x g und 4°C in der Beckman-Kühlzentrifuge J2-21 im JA10-Rotor) geerntet. Das Pellet wurde je Liter Hauptkultur in 20 mL 6 M Guanidiniumchlorid in 0,1 M K-Phosphatpuffer pH 7,6 resuspendiert, mit 140 µL 2-Mercaptoethanol versetzt und die Zellen eine Stunde bei Raumtemperatur unter leichtem Schütteln lysiert. Das Lysat wurde in einen vorbereiteten (einmal mit etwas Na_2CO_3 /EDTA und zweimal mit Aqua dest. aufgekochten) Dialyseschlauch (SpectraPor R3, Ausschlußgröße 3500 D) überführt und über Nacht bei Raumtemperatur gegen 20 mM K-Phosphat pH 7,6 dialysiert. Am nächsten Tag wurde mindestens 2 h gegen frischen Puffer dialysiert; ein letzter Dialyseschritt erfolgte mit 20 mM K-Phosphat pH 6,6 (ebenfalls mindestens 2 h).

Nach Abzentrifugieren des dialysierten Lysats (30' bei 10.000 x g und 4°C in der Beckmann-Kühlzentrifuge J2-21; Rotor je nach Volumen) wurde der resultierende Überstand einer Ionenaustauscher-Chromatographie unterzogen. Dazu wurde eine mit etwas silanisierter Glaswolle abgedichtete 10 mL-Einmal-Spritze ohne Kolben mit Schlauch und Klemme ca. 3 cm hoch mit in 0,5 M NH_4 -Formiat pH 6,5 äquilibriertem SP Sephadex C-25 (Pharmacia) beladen und mit 10 mL 0,1 M NH_4 -Formiat pH 6,5 gespült. Sodann wurde das Zellysat mit 1 M NH_4 -Formiat pH 6,5 auf eine NH_4 -Formiat-Konzentration von 0,1 M eingestellte und auf die Säule aufgetragen. Nach erneutem Spülen mit 10 mL 0,1 M NH_4 -Formiat pH 6,5 erfolgte die Eluation mit 10 mL 1 M NH_4 -Formiat pH 6,5; das Eluat wurde dann über FPLC nach 2.5.4 weiter aufgereinigt. Die Lagerung der Säule erfolgte nach Spülen mit 10 mL 0,1 M NH_4 -Formiat pH 6,5 + 0,005% Thiomersal.

¹ Der im Institut verwendete *E. coli* Y1089-Stamm schien das im Genotyp aufgeführte Plasmid pMC9 verloren zu haben; Wachstum auf LB/Amp erfolgte jedenfalls nur nach Transformation mit einem Plasmid mit Ampicillin-Resistenz.

2.5.4 Aufreinigung von Anaphylatoxinen über FPLC

Die FPLC-Aufreinigung erfolgte nach Standard-Verfahren entweder über eine PepRPC-HR 10/10- oder über eine Ressource RPC 3 mL-Säule (jeweils Pharmacia), beide mit einem *reversed phase*-Säulenmaterial. Die auf Raumtemperatur erwärmten FPLC-Puffer A und B wurden direkt vor ihrer Verwendung nochmals für ca. 15' mittels einer Vakuumpumpe entgast. Nach Beschicken der Anlage mit den Puffern und Einbau und Äquilibrierung der Säule wurde die sterilfiltrierte Anaphylatoxin-Lösung über eine 50 mL-Super-Probenschleife auf die Säule aufgetragen. Nach kurzem Spülen der Säule mit Puffer A wurde die Pufferzusammensetzung innerhalb von 2 – 3 Säulenvolumina auf 30% Puffer B erhöht. Nun erfolgte die Eluation der Anaphylatoxine unter Auffangen von 1 mL-Fractionen in silikonisierten Halbmikro-Reagiergefäßen, während die Konzentration von Puffer B innerhalb von 36 – 48 mL auf 60% erhöht wurde. Während weiterer 2 – 3 Säulenvolumina wurde der Gradient auf 100% Puffer B erhöht, dort 15 mL belassen und schließlich auf Puffer A zurückgefahren. Reinigung und Lagerung von Säule und Anlage erfolgte nach Herstellerprotokoll.

Die aufgesammelten FPLC-Fractionen wurden zum Entfernen des Acetonitrils und der Trifluoressigsäure unter Vakuum (Speedvac-Concentrator, Savant) fast bis zur Trockne eingengt, mit 500 µL Aqua dest. versetzt und erneut fast bis zur Trockene eingengt. Nach Zugabe von 100 – 200 µL Aqua dest. wurden die einzelnen Fractionen auf ihren Gehalt an C3a bzw. C5a untersucht (2.5.5, 2.5.6, 2.5.7); funktionelle Charakterisierung erfolgte im ARA (2.6.1) bzw. GARA (2.6.2).

2.5.5 Nachweis von C3a/C5a im Dot-Blot

Die einzelnen FPLC-Fractionen aus 2.5.4 wurden immunologisch auf das Vorhandensein von C3a bzw. C5a untersucht. Dazu wurde je 1 µL der Fractionen zusammen mit einem Standard (ca. 500 ng C3a/C5a) auf Cellulosenitrat-Folie (Protan, Schleicher & Schuell) aufgetupft und getrocknet. Unspezifische Bindung wurde durch Inkubation in 5% Magermilchpulver (Glücksklee) in Ampli-Puffer für 1 h bei Raumtemperatur oder über Nacht bei 4°C abgesättigt. Als Primärantikörper wurde der mAK 2898 für C3a (10 mg/L in 2% Ampli-Milch) bzw. 561 für C5a (20 mg/L in 2% Ampli-Milch) verwendet; die Inkubation erfolgte auf dem Schwenker für 30' bei Raumtemperatur. Nach 3maligem Waschen mit Ampli-Puffer erfolgte die Inkubation mit dem Sekundärantikörper, einem kommerziellen Peroxidase-gekoppelten Ziege-anti-Maus-IgG-Antikörper (Sigma) 1:1.000 in Ampli-Puffer. Die Entwicklung erfolgte mit Chloronaphtol (Stammlösung 1:5 mit TBS verdünnt und mit 0,08% [v/v] 30% H₂O₂ versetzt). Zum Abstoppen

der Reaktion wurde die Entwickler-Lösung abgegossen, mit Aqua dest. gespült und die Membran getrocknet.

2.5.6 Proteinbestimmung nach Bradford [124]

Die zu bestimmende Proteinlösung wurde zu ca. 200 mg/L mit 0,9% NaCl [w/v] verdünnt und davon weitere Verdünnungen in 1:2-Schritten angefertigt. Parallel wurde eine Verdünnungsreihe mit 25 – 200 mg/L BSA in 0,9% NaCl als Standard angesetzt. Je 20 μ L der Proteinlösungen wurden als Doppelwerte in eine 96-Loch-Mikrotiterplatte pipettiert und mit je 200 μ L Bradford-Gebrauchslösung (15% [v/v] Bradford-Stammlösung in Aqua dest.) versetzt. Sofort danach erfolgte die Messung bei $\lambda = 450$ und 620 nm im Mikrotiterplatten-Photometer Multiskan MCC/340 MK II (Titertek).

2.5.7 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Die aufgereinigten Anaphylatoxine wurden in einer denaturierenden SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese nach Laemmli [125] aufgetrennt und durch Silberfärbung (2.5.8) auf ihre Reinheit untersucht. Verwendet wurden 15%ige Trenngele in einer Biometra-Minigel-Apparatur. Dazu wurden pro Gel 10 mL SDS-Gellösung A, 5 mL Lösung B, 5 mL Aqua dest., 200 μ L Lösung C, 10 μ L TEMED und 90 μ L 10% [w/v] APS vermischt, zwischen die vorbereiteten Glasplatten (1 mm Abstand) gegossen und mit 1-Butanol überschichtet. Nach Polymerisation wurde das 1-Butanol mit Aqua dest. ausgewaschen, die Geloberfläche mit Filterpapier getrocknet, das Sammelgel (2 mL SDS-Sammelgellösung, 2 μ L TEMED, 20 μ L 10% [w/v] APS) auf das Trenngel gegossen und der Probenkamm appliziert. Sobald auch das Sammelgel polymerisiert war, wurde der Kamm entfernt, das Gel in die Kammer eingebaut, die Kammer mit SDS-Laufpuffer beschickt und je 2 – 20 μ L der Proben (ca. 10 bis 500 ng Protein 5' in 3 x Aufschlußpuffer aufgekocht) aufgetragen. Die Elektrophorese erfolgte bei 100 V (Sammelgel) bzw. 200 V (Trenngel), bis der Farbstoff des Aufschlußpuffers (Bromphenolblau) bis ca. 1 cm vor das Ende des Gels gelaufen war.

2.5.8 Silberfärbung von SDS-Gelen

Direkt nach der Elektrophorese wurden SDS-Polyacrylamid-Gele ca. 1 h in einer Fixierlösung (50 mL Stopplösung, s. u., + 25 μ L 37% Formaldehyd) fixiert. Sodann erfolgten drei 20minütige Inkubationen in 50% [v/v] Ethanol. Nach 1-minütiger Behandlung des Gels mit 0,2 g/L Na₂S₂O₃ wurde das Gel 3mal mit Aqua dest. gewaschen. Nun erfolgte eine Inkubation in 50 mL 0,2% [w/v] AgNO₃ mit 37,5 μ L 37% Formaldehyd über 20'. Nach erneutem 2maligen Waschen mit

Aqua dest. wurde das Gel mit 50 mL einer 6%igen Na_2CO_3 -Lösung mit 25 μL 37% Formaldehyd und 2 mL 0,2 g/L $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ entwickelt. Abstoppen der Entwicklung erfolgte durch 2maliges Waschen mit Aqua dest. und 10minütiger Inkubation mit Stopplösung (50% [v/v] Methanol und 12% [v/v] Essigsäure). Nach je halbstündigem Tränken in 50% [v/v] Methanol, 30% [v/v] Methanol und 3% [v/v] Glycerin konnte das Gel auf Whatman 3MM-Filterpapier aufgezogen und für 2 h bei 80°C im Vakuum getrocknet werden.

2.5.9 Markierung von C3a/C5a mit ^{125}I (nach Dissertation T. Kretzschmar, 1992)

Zu Beginn der Arbeit wurde selbst markiertes C3a und C5a verwendet; dieses wurde später durch kommerziell erhältliche Radioliganden ersetzt (DuPont-NEN).

Für die Iodierung wurden 500 μL -Reagiergefäße mit je 100 μL 40 mg/L Iodo-Gen (Sigma) in wasserfreiem Dichlormethan beschickt und das Lösungsmittel im Vakuum (SpeedVac Concentrator, Savant) abgedampft. Sodann wurden 10 μL C3a (0,5 g/L) bzw. C5a (1 g/L) mit 40 μL 500 mM Na-Phosphat-Puffer pH 7,5 vorgelegt und die Iodierungsreaktion durch Zugabe von 37 MBq Na^{125}I gestartet. Nach 7 bzw. 5 Minuten wurde der Reaktionsansatz auf eine mit PBS + 0,2% [w/v] BSA äquilibrierte Gelfiltrations-Säule (PD-10, Pharmacia) gegeben und Fraktionen à ca. 1 mL gesammelt, um das nicht eingebaute ^{125}I vom markierten Anaphylatoxin abzutrennen. Die spezifische Aktivität der C3a- bzw. C5a-Fraktionen wurde als Quotient aus eingebauter Radioaktivität zu biologischer Aktivität im ARA (2.6.1) angegeben und betrug i. d. R. ca. $1,5 - 4,5 \cdot 10^{16}$ Bq/mol.

2.6 Zell- und Immunbiologische Methoden

2.6.1 ATP-Freisetzungstest mit Meerschweinchen-Thrombozyten (ARA) nach [126]

Dieser Test wurde nicht selbst durchgeführt, sei hier aber trotzdem kurz beschrieben. Zunächst wurde einem durch CO₂ getötetem Meerschweinchen (*Cavia porcellus* C2BB/R⁺) durch Herzpunktion Blut entnommen und die Gerinnung mit Citrat (Komplexierung des Calciums) inhibiert. Durch vorsichtiges Zentrifugieren wurden zunächst Erythrozyten und Leukozyten abgetrennt, wobei plättchenreiches Plasma als Überstand verblieb. Die Thrombozyten wurden einmal gewaschen und in einem Ca²⁺-freien Puffer zu einer OD₅₇₈ von 1,3 aufgenommen.

Die Messung selbst erfolgte in einem BioLumat LB 9505 C (Berthold). Stimulus (C3a oder C5a) wurde in einem Ca²⁺-haltigen Puffer vorgelegt, die ATP-Freisetzung durch Zugabe eines Aliquots der Thrombozyten initiiert und die freigesetzte ATP-Menge durch die verzögerte Zugabe von Lumit (kommerzielles Reagens auf Luziferin/Luziferase-Basis, Lumac) bestimmt.

2.6.2 Glucosaminidase-Freisetzungstest (GARA)

C5a-Präparationen wurden im β -Glucosaminidase-Freisetzungstest auf biologische Aktivität untersucht. Drei Tage vor der Durchführung eines solchen Tests wurden U937-Zellen zu einer Zelldichte von 2×10^5 Zellen pro mL Medium angeimpft. Sodann wurden sie mit 0,5 mM Bt₂cAMP in Richtung des makrophagenähnlichen Phänotyps differenziert.

Der Test selbst beruht auf einem Protokoll aus [127], wurde jedoch auf die Durchführung in 96-Loch-Mikrotiterplatten abgestimmt. Dazu wurden in einer Mikrotiterplatte Verdünnungsreihen der C5a-Präparation in HAG-CM (jeweils 30 μ L; 4fach-Werte) gegen eine bereits getestete C5a-Charge oder käuflich erworbenes rekombinantes C5a (Sigma) vorgelegt; als Kontrolle des folgenden Enzymtests wurden Löcher mit 30 μ L 1% Triton X-100 in HAG-CM für die Totallyse der Zellen vorbereitet. Zudem wurden pro Loch 10 μ L 2 mg/L Cytochalasin B (1:5-Verdünnung einer 10 mg/L-Stammlösung in DMSO mit HAG-CM) zupipettiert. Im Brutschrank wurde die so vorbereitete Platte auf 37°C vorgewärmt.

Die differenzierten U937-Zellen wurden bei 1.200 upm und Raumtemperatur in der Biofuge RF (Heraeus Sepatech) sedimentiert und zu 2×10^6 Zellen/mL in vorgewärmtem HAG-CM aufgenommen. Während einer 15minütigen Inkubation bei 37°C wurde eine zweite Mikrotiterplatte pro Loch mit 100 μ L Substratlösung für den Enzymtest (8 mM p-Nitrophenyl-N-acetyl- β -glucosaminid in 40 mM Na-Acetat pH 4,5) beschickt und der Mikrotiterplatten-Rotor auf 4°C vorgekühlt. Nach der Inkubation wurden rasch je 75 μ L der Zellsuspension in die

Löcher der Platte mit den Verdünnungsreihen pipettiert, die Platte für 2 – 3' zurück in den Brutschrank gestellt und danach im Plattenrotor bei 2.000 upm für 2' zentrifugiert. Vom Zellüberstand wurden je 75 µL in die Löcher der Platte mit dem Enzymsubstrat pipettiert und diese Platte dann für 30 – 60' bei 37°C im Brutschrank inkubiert. Durch Zugabe von je 75 µL 0,4 M Glycin-NaOH-Puffer pH 10,4 wurde das von der freigesetzten β-Glucosaminidase umgesetzte Substrat in eine gelbe Verbindung überführt, deren Konzentration photometrisch bei $\lambda = 405$ nm bestimmt wurde. Die Auswertung der Daten (Bestimmung der Dosis halbmaximaler Freisetzung, ED_{50}) erfolgte durch iterative Kurvenanpassung mit einer logistischen 4-Parameter-Gleichung unter Verwendung der Mathematik-Software Sigma-Plot 1.03 (Jandel Scientific).

2.6.3 Transiente Transfektion von HEK293-Zellen

Die transiente Transfektion von HEK293-Zellen mit Lipofectamin (einem kationischen Tensid von Gibco) erfolgte weitgehend nach Herstellerangaben. HEK293-Zellen wurden einen Tag vor der Transfektion in Kulturflaschen oder –schalen so dicht ausgesät, daß die Zellen sich untereinander berührten, aber noch keinen geschlossenen Rasen bildeten (ca. 5×10^6 Zellen pro 75 cm²-Flasche). Am nächsten Morgen wurde die zu transformierende Plasmid-DNA mit Optimem-Medium (Gibco) zu 10 mg/L Endkonzentration verdünnt (kleine Flasche: 2 µg; mittlere Flasche: 6 µg; große Flasche: 12 µg; Kulturschale: 4 µg), zum gleichen Volumen einer 1:16,7-Verdünnung von Lipofectamin in Optimem pipettiert und 30' bei Raumtemperatur inkubiert. In der Zwischenzeit wurden die Zellen vom Vortag 2 x mit PBS gewaschen und schließlich mit dem DNA-Lipofectamin-Gemisch, aufgenommen im ca. 15fachen Volumen Optimem, überschichtet. Nach 5stündiger Inkubation bei 37°C unter 5% CO₂ wurde die Transfektion mit dem gleichen Volumen Nut-Mix F12 (Gibco) mit 20% FCS gestoppt. Zwei bis drei Tage später konnten mit den Zellen weitere Versuche durchgeführt werden.

2.6.4 FACS-Analysen zur Kontrolle der Oberflächenexpression

Zur Untersuchung der Oberflächenexpression transfizierter C3aR/C5aR-Chimären wurden 4 verschiedene Antikörper herangezogen: der in der Arbeitsgruppe generierte monoklonale Maus-IgG1-Antikörper 8H1 (gegen die 2. EL des C3aRs [128]), der monoklonale Maus-IgG1-Antikörper W17/1 von O. Götze, Göttingen (gegen den N-Terminus des C5aRs [96]), sowie die beiden kommerziellen Anti-Flag-Antikörper M2 und M5 (IBI).

Transfizierte HEK293-Zellen wurden mit PBS + 1 mM EDTA von der Kulturflasche abgelöst und 15' bei 1.200 upm und 4°C in der Biofuge RF (Heraeus Sepatech) abzentrifugiert. Das Pellet wurde zu mindestens 2×10^6 Zellen pro mL in PBS + 0,5% [w/v] BSA aufgenommen und in

25 μL -Aliquots auf eine 96-Loch-Mikrotiterplatte verteilt. Zu jedem Inkubationsansatz wurden 25 μL des entsprechenden Antikörpers in PBS + BSA gegeben (8H1: 20 $\mu\text{g}/\text{mL}$; W17/1: 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$; M2 und M5: 40 $\mu\text{g}/\text{mL}$) und eine halbe Stunde auf Eis inkubiert. Sodann wurden die Zellen im Plattenrotor 1' bei 2.000 upm und 4°C abzentrifugiert und 2 x mit je 150 μL kaltem PBS + BSA gewaschen. Als Sekundärantikörper wurde FITC-markiertes Ziege-anti-Maus-IgG1-Serum verwendet (Pharmingen, 1:20 in PBS + BSA), in welchem die Zellen zu je 25 μL aufgenommen und eine halbe Stunde auf Eis im Dunkeln inkubiert wurden. Nach erneutem 2maligen Waschen in PBS + BSA wurden die Zellen in 150 – 200 μL PBS + BSA aufgenommen und in einem Becton-Dickinson FACScan bei einer Anregungswellenlänge von $\lambda_{\text{ex}} = 488 \text{ nm}$ und einem Emissionsfenster von $\lambda_{\text{em}} = 515 - 545 \text{ nm}$ untersucht. Die Auswertung der Daten erfolgte mit Hilfe der WinMDI-Software Vers. 2.6.

2.6.5 Schnelltest auf ^{125}I -C3a Bindung in Kulturschalen

Pools der cDNA-Bibliothek (s. 2.1.4) wurden nach Transfektion in HEK293-Zellen auf ihre Fähigkeit getestet, eine erhöhte ^{125}I -C3a-Bindung zu vermitteln. Da ^{125}I -C3a die Eigenschaft hat, unspezifisch an Plastikmaterialien zu adhären, wurden die für diesen Test verwendeten Kulturschalen (Greiner) vor Aussaat der HEK293-Zellen für 1 h bei 37°C mit 1% [w/v] Protaminsulfat in PBS inkubiert, wodurch die unspezifische Bindung auf ca. $\frac{1}{4}$ reduziert werden konnte. Nach Spülen der Schalen mit PBS, Aussaat der Zellen, Transfektion am folgenden Tag und anschließender dreitägiger Inkubation wurde schließlich das Medium mit einer Pipette entfernt und die Zellen 2mal mit ca. 5 mL HAG-CM gewaschen. Sodann erfolgte eine halbstündige Inkubation mit ca. 20.000 Bq ^{125}I -C3a in 5 mL HAG-CM bei 37°C. Danach wurde das Medium mit dem markierten Liganden abgezogen und die Zellen 4mal mit kaltem HAG-CM gewaschen und anschließend mit 2 x 4 mL einer 3:1-Mischung aus PBS + 1 mM EDTA und kommerzieller Trypsin-EDTA-Lösung (Gibco) abgelöst. Die Zellsuspension wurde in Plastikröhrchen überführt und die ^{125}I -Aktivität im γ -Counter (Cobra II AutoGamma, Canberra-Packard) bestimmt.

2.6.6 Kompetitive Bindungsstudien

Die Bestimmung der Affinität von C3a, C4a und C5a zu ihren Rezeptoren bzw. Rezeptorchimären erfolgte in kompetitiven Bindungsstudien, d. h. der Verfolgung des Verlaufs gebundener Aktivitätsmenge, wenn die eingesetzte konstante kleine Menge des Radioliganden durch steigende Mengen an nicht-markiertem Liganden aus der Bindung verdrängt wird. Die Saccharose-Kissen-Methode nach 2.6.6.1 wurde dabei eher für kleine Probenmengen – oft nur

Zwei-Punkt-Bindungsstudien – eingesetzt, wohingegen die teurere MultiScreen-Methode (2.6.6.2) für großen Probanddurchsatz geeigneter war. Für beide Methoden wurden jedoch Verdünnungsreihen der entsprechenden Anaphylatoxine in HAG-CM vorbereitet (maximal 5 μM , dann absteigend in 1:2-Verdünnungsschritten). Aufgrund der weiteren Verdünnung im Test ergaben sich dann die Endkonzentrationen zu einem Fünftel der eingesetzten Anaphylatoxin-Konzentration.

2.6.6.1 Bindungsstudien mit Saccharose-Kissen

Pro Punkt (mindestens Doppelwerte) wurden in einem Halbmikro-Reagiergefäß je 30 μL Anaphylatoxin-Verdünnung (bzw. HAG-CM als Negativkontrolle) mit 30 μL Radioligand (pro Punkt 500 Bq (30.000 cpm) ^{125}I -C3a bzw. 330 Bq (20.000 cpm) ^{125}I -C5a) vorgelegt. Die mit PBS + 1 mM EDTA abgelösten Zellen wurden abzentrifugiert (15' bei 1.200 upm und Raumtemperatur in der Biofuge RF (Heraeus Sepatech)) und zu 10^7 Zellen pro mL in HAG-CM aufgenommen. Zu jedem Ansatz wurden 90 μL Zellsuspension gegeben und eine halbe Stunde bei Raumtemperatur inkubiert. Dann wurden – nach Resuspendierung – von jedem Ansatz 3 x 45 μL abgenommen und auf die vorbereiteten Saccharose-Kissen (200 μL HAG-CM mit 10% [w/v] Saccharose in 0,4 mL-Mikrozentrifugenröhrchen) pipettiert. Nach 10minütiger Zentrifugation bei 13.000 upm im 1397-Rotor in der Eppendorf-Kühlzentrifuge (Biofuge RS 17, Heraeus Sepatech) wurde der untere, das Zellpellet enthaltende Teil des Röhrchens mit einem Skalpell abgeschnitten und in ein Plastikröhrchen überführt. Die an das Pellet gebundene Aktivität wurde sodann im γ -Counter (Cobra II AutoGamme, Canberra-Packard) bestimmt.

2.6.6.2 Bindungsstudien mit dem MultiScreen-System (Milipore)

Pro Punkt (mindestens Dreifach-, meist Vierfachwerte) wurden in eine 96-Loch-Mikrotiterplatte je Loch 10 μL Anaphylatoxin-Verdünnung (bzw. HAG-CM als Negativkontrolle) mit 10 μL Radioligand (pro Punkt 330 Bq (20.000 cpm) ^{125}I -C3a bzw. ^{125}I -C5a) vorgelegt. Die mit PBS + 1 mM EDTA abgelösten Zellen wurden abzentrifugiert (15' bei 1.200 upm und Raumtemperatur in der Biofuge RF (Heraeus Sepatech)) und zu 5×10^6 – 1×10^7 Zellen pro mL in HAG-CM aufgenommen. Zu jedem der vorbereiteten Ansätze wurden 30 μL Zellsuspension gegeben und eine halbe Stunde bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurden mit einer Mehrkanalpipette je 40 μL durch eine mit 50 μL HAG-CM pro Loch angefeuchtete MultiScreen-Platte mit 0,45 μm Durapore-Membran (Milipore) filtriert. Das Zellpellet wurde noch 2mal mit je 100 μL HAG-CM gewaschen und die Platte unter einer Infrarotlampe getrocknet. Die Bestimmung der zellgebundenen Aktivität erfolgte entweder durch Ausstanzen der Filtermembranen, Überführung in Plastikröhrchen und Messung im γ -Counter

(Cobra II AutoGamma, Canberra-Packard) oder im TopCount- β -Counter (Canberra-Packard) unter Verwendung der entsprechenden MultiScreen-Adapter und nach Zugabe von 50 μ L MicroScint-0 pro Loch.

2.6.7 Ca^{2+} -Freisetzungstest

Zur Bestimmung der Fähigkeit von C3aR/C5aR-Chimären, Signaltransduktion auszulösen, wurde die Mobilisierung intrazellulären Calciums in einem fluorometrischen Test gemessen. Da dieser Test nicht in unserer Gruppe, sondern bei Robert S. Ames, SmithKline Beecham, King of Prussia, durchgeführt wurde, hier nur eine kurze Beschreibung des Procedere.

Die jeweilige Rezeptorchimäre wurde unter Verwendung von Lipofectamin Plus (Gibco) zusammen mit einer cDNA für $\text{G}\alpha$ -16 in HEK293-Zellen transfiziert und nach 24 h in eine schwarze 96-Loch-Zellkulturplatte überführt. Nach einer weiteren Inkubation über 18 – 24 h wurden die Zellen für 1 h bei 37°C mit dem Ca^{2+} -abhängigen Fluoreszenzfarbstoff Fluo 3AM beladen und dann 3 x gewaschen. Parallel wurden in einer 96-Loch-Mikrotiterplatte Anaphylatoxin-Verdünnungsreihen mit der jeweils dreifachen Endkonzentration vorbereitet. Im FLIPR (*fluorometric imaging plate reader*, Molecular Devices) wurden diese Verdünnungen automatisch zu den vorbereiteten Zellen gegeben und der Verlauf der Fluoreszenz in allen 96 Proben gleichzeitig registriert. Als Positivkontrolle und zur internen Eichung wurde sodann in allen Löchern die intrazelluläre Ca^{2+} -Freisetzung nach Stimulation der Zellen mit Histamin registriert. Die Auswertung erfolgte mit der Standard-FLIPR-Software.

2.7 Software

2.7.1 Programme

Diese Arbeit wurde auf Word 97 unter Windows 98 (beides Microsoft) erstellt. Tabellenberechnungen wurden mit Excel 97 (Microsoft), Kurvenanpassungen mit SigmaPlot for Windows 1.02 (Jandel Scientific) oder GraphPad 2.0 (Prism) durchgeführt. Die Berechnung von Dissoziationskonstanten erfolgte mit dem Radlig-Modul des Software-Pakets Ligand 4.0 [129], die Auswertung von FACS-Daten mit WinMDI 2.6 von J. Trotter. Sequenzanalysen wurden z. T. mit der PC-Gene-Software (Release 4.01), z. T. mit Hilfe unten genannter Internet-Ressourcen durchgeführt. Schematische Graphiken wurden mit PowerPoint 97 (Microsoft) erstellt. Plasmidkarten wurden mit dem selbst geschriebenen Programm VecView 1.3 gezeichnet.

2.7.2 Internet-Ressourcen

Folgende Internet-Ressourcen kamen im Verlauf dieser Arbeit zum Einsatz:

URL	Institution
http://swift.embl-heidelberg.de/7tm	Die <i>G-Protein Coupled Receptor Database</i> des EMBL. Zugriff auf Sequenzgegenüberstellungen und Hydrophobizitätsdiagramme
http://www.ebi.ac.uk	Das <i>European Bioinformatics Institute</i> des EMBL. Zugriff auf die EMBL-Sequenzdatenbank sowie die Erstellung von Sequenzgegenüberstellungen mittels CLUSTALW 1.74
http://www.expasy.ch	Der ExPaSy-Server des Schweizer Instituts für Bioinformatik mit Zugang zur SwissProt-Datenbank
http://www3.ncbi.nlm.nih.gov	Das <i>National Center for Biotechnology Information</i> der <i>National Library of Medicine / National Institutes of Health</i> . Zugriff auf GenBank, die <i>Medline</i> -Literatur-Datenbank sowie das Informationssystem <i>Entrez</i>

3. Ergebnisse

3.1 Klonierung des humanen C3a-Rezeptors

Ähnlich wie bei C5aR [83] und fMLPR [130], sollte auch für den humanen C3aR eine cDNA mittels eines Expressionsklonierungsverfahrens isoliert werden. Dazu sollte eine cDNA-Bibliothek aus Bt₂cAMP-differenzierten U937-Zellen – die nachweislich den C3aR exprimieren [33] – poolweise in HEK293-Zellen transfiziert werden. Pools, die tatsächlich eine C3aR-cDNA enthielten, sollten sich dann durch eine erhöhte Fähigkeit der transfizierten Zellen, ¹²⁵I-markiertes C3a zu binden, bemerkbar machen. Solche positiven Pools sollten durch erneute Transfektion in *E. coli*, Ausstreichen auf Agarplatten mit geringerer Koloniedichte, Abschwemmen der Kolonien und Plasmidpräparation in mehrere Unterpools geringeren Umfangs aufgeteilt werden, die dann ihrerseits wieder in HEK293-Zellen transfiziert werden würden. Nach mehreren solcher Screeningrunden sollte die Poolgröße so weit reduziert sein, daß die für die ¹²⁵I-C3a-Bindung verantwortlichen cDNAs nunmehr als einzelne Klone vorliegen.

3.1.1 Voraussetzungen für das Screening

Vor Beginn der Klonierung des C3a-Rezeptors mußten einige methodische Voraussetzungen geschaffen werden. Die hierfür nötigen Untersuchungen waren in der Arbeitsgruppe zu Beginn der Arbeit – weitgehend von U. Raffetseder – bereits durchgeführt worden. Im einzelnen galt es, folgende Probleme zu lösen:

3.1.1.1 Erstellung einer geeigneten cDNA-Bibliothek

Eine cDNA-Bibliothek war aus gröbenselektionierter mRNA (> 1 kB) aus Bt₂cAMP-differenzierten U937-Zellen im eukaryontischen Expressionsvektor pCDM8 erstellt worden. 90% der Klone der Bibliothek enthielten ein Insert, wobei die durchschnittlichen Länge ca. 1,5 kbp betrug. Die Anzahl der eingesetzten Klone – ca. 40.000 – orientierte sich an den Erfahrungen, die bei der Klonierung des humanen C5aRs gemacht wurden [83]. Boulay et al. isolierten aus einer ähnlichen Bibliothek aus Bt₂cAMP-differenzierten HL-60-Zellen drei potentielle C5aR-Klone. Da der C3aR auf Bt₂cAMP-differenzierten U937-Zellen mit 67.000 ± 23.000 Rezeptoren/Zelle [33] ähnlich hoch exprimiert wird wie der C5aR auf Bt₂cAMP-differenzierten HL-60-Zellen (ca. 50.000 Rezeptoren/Zelle), schien die Menge der Klone ausreichend, um mindestens einen C3aR-Klon zu beherbergen.

Die Poolgröße von ca. 800 Klonen pro Pool bewegte sich ebenfalls im Rahmen dessen, was bei der Klonierung des C5a-Rezeptors eingesetzt wurde (700 Klone pro Pool). Ermittelt wurde

dieser Wert aus Vorversuchen, bei denen ein C5aR-Klon in pCDM8 mit verschiedenen Mengen leeren Vektors verdünnt und in das unter 3.1.1.2 beschriebene Expressionssystem eingesetzt wurde. Bei einem Mengenverhältnis von 1:800 konnte der C5aR noch deutlich durch erhöhte Bindung von ^{125}I -C5a an die transfizierten Zellen nachgewiesen werden (noch ca. 20% der bei Transfektion mit unverdünntem C5aR-Plasmid gebundenen Tracermenge).

3.1.1.2 Etablierung eines geeigneten Expressionssystems

Positive cDNA-Pools – also solche, die eine C3aR-cDNA enthielten – sollten durch ihre Fähigkeit identifiziert werden, eine erhöhte ^{125}I -C3a-Bindung an transfizierte Zellen vermitteln zu können. Als problematisch erwies sich dabei die Tendenz des ^{125}I -markierten C3a, unspezifisch an alle möglichen Oberflächen – Kulturschalen und Zellen – zu binden. Glücklicherweise konnte dieser unspezifische Hintergrund durch die im folgenden beschriebenen Maßnahmen auf ein akzeptables Niveau reduziert werden.

Klassische Zelllinien für pCDM8-basierte Expressionsverfahren sind die Affennieren-Zelllinien COS-M6 und COS-M7 [Dissertation T. Kretzschmar, 1992] sowie die Maus-Fibroblastenlinie WOP. Da diese in Vorversuchen jedoch eine hohe ^{125}I -C3a-Hintergrundbindung aufwiesen, wurde auch die Verwendung der humanen embryonalen Nierenzelllinie HEK293 in Betracht gezogen. Diese stellt zwar ein homologes, da humanes System dar, zeigt jedoch keinerlei spezifische ^{125}I -C3a-Bindung und scheint somit ihren endogenen C3aR nicht zu exprimieren. Andererseits ist bekannt, daß diese Zelllinie zumindest den C5aR nach transienter Transfektion zu exprimieren vermag. Außerdem wurde auf HEK293-Zellen nur eine geringe unspezifische ^{125}I -C3a-Hintergrundbindung beobachtet, so daß die Wahl tatsächlich auf diese Zelllinie fiel.

Weiterhin konnte die unspezifische Bindung von ^{125}I -C3a an die Plastikoberfläche der verwendeten Kulturschalen durch Vorbeschichtung mit Protaminsulfat (1% in PBS, 1 h, 37°C) deutlich (auf ca. ¼) reduziert werden.

Schließlich mußte zur Etablierung des Expressionssystems noch ein geeignetes Transfektionsverfahren gefunden werden. Dabei fiel die Wahl auf Lipofectamin als Transfektionsreagenz, mit dem bei HEK293-Zellen – wie Kontrollversuche mit einem β -Galactosidase-Vektor gezeigt hatten – eine Transfektionsausbeute von ca. 80% erreicht werden konnte.

Das Ergebnis dieser Versuche war der Schnelltest auf ^{125}I -C3a-Bindung in der Kulturschale nach 2.6.5: HEK293-Zellen wurden auf Protaminsulfat-beschichteten Kulturschalen ausgesät und am folgenden Tag mittels Lipofektamin mit cDNA-Pools transfiziert (jeweils Doppelwerte). Nach weiteren 3 Tagen wurde das Kulturmedium abgenommen, die Zellen gewaschen und bei

37°C eine halbe Stunde mit ca. 20.000 Bq ^{125}I -C3a inkubiert. Danach wurde die ungebundene Aktivität im Überstand abgenommen; die an die Zellen gebundene Aktivität wurde nach Ablösung der Zellen und Überführung in Plastikröhrchen gemessen.

3.1.2 Durchführung des Screenings

Zu Beginn des Screenings wurden alle 48 Ausgangspools der cDNA-Bibliothek im Schnelltest nach 2.6.5 in Gruppen zu 6 – 10 Pools auf ihre Fähigkeit untersucht, eine erhöhte ^{125}I -C3a-Bindung an HEK293-Zellen zu vermitteln; dabei wurde jeder Pool in mindestens zwei unabhängigen Transfektionen jeweils als Doppelwert getestet. Insgesamt fielen 2 Pools durch eine über den Schwankungsbereich des Hintergrundes erhöhte ^{125}I -C3a-Bindung auf.

3.1.2.1 Pool 15

Als erstes fiel Pool 15 auf: Die durch ihn vermittelte ^{125}I -C3a-Bindung erschien bei genauer Betrachtung in beiden Transfektionsansätzen etwas höher zu liegen als die bei den Nachbarpools gemessenen Aktivitäten, sofern extrem hohe Werte als Ausreißer angesehen wurden und dementsprechend nicht in die Beurteilung miteinfließen (Abb. 3.1A und B). Durch Elektroporation dieses Pools in *E. coli* TOP10F', Ausstreichen auf LB/Amp-Platten, Abschwemmen der Kolonien und Plasmidpräparation wurde die Poolgröße auf ca. 100 Klone pro Pool reduziert. Von den 6 getesteten Unterpools erwiesen sich 15/2 und 15/7 als positiv, d. h. sie vermittelten eine – inzwischen deutlich erhöhte – ^{125}I -C3a-Bindung nach Transfektion in HEK293-Zellen (Abb. 3.1C). Nach erneuter Elektroporation von 15/7 und Ausstreichen wurden ca. 800 Kolonien zu je 52 Kolonien geordnet auf LB/Amp-Platten einzeln isoliert; dabei wurde von jeder dieser Masterplatten eine identische Kopie angefertigt, indem der jeweils zur Isolierung verwendete Zahnstocher noch einmal in eine zweite Platte eingetaucht wurde. Von der einen Serie dieser Masterplatten wurden die Kolonien erneut abgeschwemmt und die daraus isolierten Plasmide in eine weitere Screeningrunde eingesetzt; dabei erwies sich der Pool 15/7/3" als positiv (Abb. 3.1D). Von der Kopie der entsprechenden Masterplatte wurden alle Klone zur Beimpfung von 5 mL-Übernachtskulturen herangezogen und von je 6 oder 7 vereinigten Ansätzen Plasmidpräparationen angefertigt. Im folgenden Screening erwies sich der Pool 15/7/3/e als derjenige, welcher die ^{125}I -C3a-bindungsvermittelnde cDNA enthielt (Abb. 3.1E). Einzeltests der Klone dieses Pools führten schließlich zur Isolierung des Klons 15/7/3/29, der für die beobachtete Bindung verantwortlich war. Während der Isolierungsschritte fiel allerdings auf, daß dieser cDNA-Klon nicht – wie erwartet – mit zunehmender Anreicherung zu einer

steigenden ^{125}I -C3a-Bindung führte, sondern die Gesamtbindung bereits ab dem Niveau von 100 Klonen/Pool mehr oder weniger stagnierte.

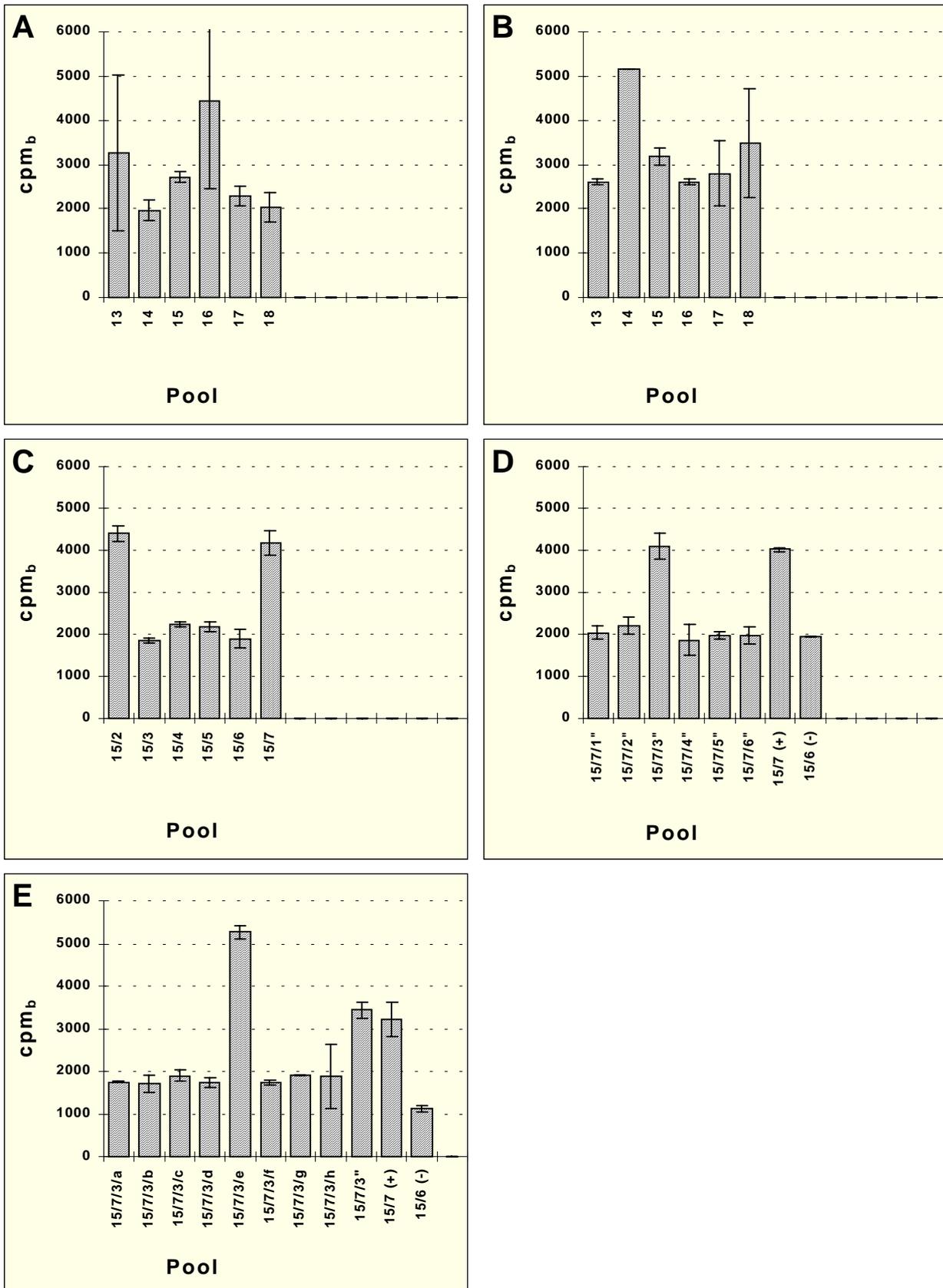


Abb. 3.1: Anreicherung des Klonen 15/7/3/29. Dargestellt ist die jeweils gebundene Menge an ^{125}I -C3a an HEK293-Zellen nach Transfektion der angegebenen cDNA-Pools (Details s. 3.1.2.1). (+) und (-) bezeichnen die jeweilige Positiv- und Negativkontrolle.

3.1.2.2 Pool 43

Ein weiterer Pool, der bereits in der ersten Screeningrunde durch eine im Vergleich zu den Nachbarpools fast doppelt so hohe ^{125}I -C3a-Bindung an HEK293-Zellen auffiel, war der Pool 43 (Abb. 3.2A). Nach einer Reduktion der Poolgröße auf ca. 130 Klone pro Pool durch Elektroporation in *E. coli* TOP10F', Ausstreichen auf LB/Amp, Abschwemmen der Kolonien und Plasmidpräparation stieg für den Pool 43/9' die im Schnelltest beobachtete ^{125}I -C3a-Bindung bereits auf das Vierfache im Vergleich zu den Nachbarpools an (Abb. 3.2B). Wiederum wurden zwei identische Serien von Masterplatten erzeugt, von denen die gepoolten Klone von jeweils zwei Platten ($2 \times 52 = 104$ Klone) in die nächste Screeningrunde eingesetzt wurden. Pool 43/9/S erwies sich dabei als derjenige Pool, der die für die erhöhte ^{125}I -C3a-Bindung verantwortliche cDNA enthielt (Abb. 3.2C).

Bereits während dieser Schritte fiel bei Routinekontrollen in der Agarose-Gelelektrophorese auf, daß sich mit jeder Screeningrunde ein unbekanntes kleines Plasmid von ca. 3 kBp Länge in den Pools anzureichern schien. So ist auch zu erklären, weshalb insgesamt ca. 3000 Klone (in Pools à 104 Klonen) untersucht werden mußten, um einen positiven Pool zu finden – obwohl die gesuchte cDNA in der vorhergehenden Screeningrunde bereits in einer Verdünnung von nur 1:130 vorlag.

Um unter den 104 bis zu diesem Stadium isolierten Klonen den richtigen zu isolieren, wurden daher alle Klone einzeln mittels des "Quickie"-Verfahrens gem. 2.4.3 zum schnellen Testen der Plasmidgröße untersucht. Klone, die das unbekannte 3-kBp-Plasmid zu enthalten schienen, wurden im folgenden nicht weiter berücksichtigt.

Die nunmehr isolierten 28 potentiellen cDNA-Klone wurden nun zur raschen Identifizierung des ^{125}I -C3a-bindungsvermittelnden Klons nach folgendem Raster gepoolt:

<i>Pool</i>	a	b	c	d	e	f	
α	37/12	37/16	37/19	37/23	37/24	37/29	–
β	37/30	37/31	37/37	37/40	37/50	38/2	–
γ	38/5	38/6	38/7	38/8	38/9	38/12	+
δ	38/20	38/22	38/25	38/29	38/30	38/37	–
ε	38/38	37/12'	37/37'	37/25'			–
	–	–	–	–	+	–	

Da sich die Pools 43/9/S/e und 43/9/S/γ als positiv erwiesen, war der Klon 43/9/38/9 damit eindeutig als ^{125}I -C3a-bindungsvermittelnde cDNA identifiziert (Abb. 3.2D). Zudem konnte im

3. Ergebnisse

Schnelltest gezeigt werden, daß die gegenüber dem Hintergrund ca. 6fach erhöhte ^{125}I -C3a-Bindung durch 500 nM unmarkiertes C3a verdrängt wird (Abb. 3.2E).

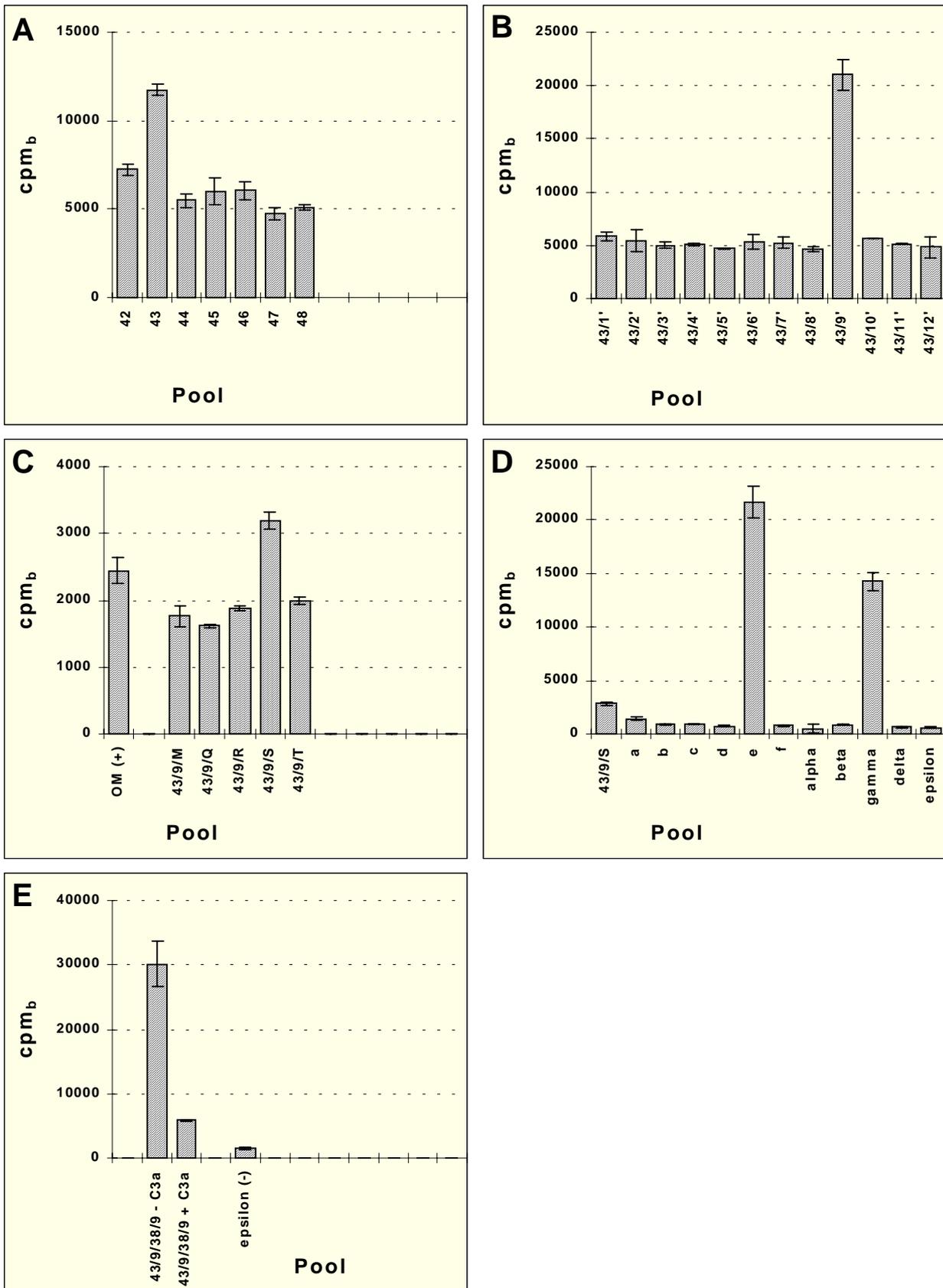


Abb. 3.2: Anreicherung des Klon 43/9/38/9. Dargestellt ist die jeweils gebundene Menge an ^{125}I -C3a (cpm_b) an HEK293-Zellen nach Transfektion der angegebenen cDNA-Pools (Details s. 3.1.2.2). In Schritt C wurde weniger Aktivität (10.000 Bq) pro Pool eingesetzt; der Klon 15/7/3/29 = OM wurde als Positivkontrolle (+) verwendet.

3.1.3 Die isolierten cDNAs

3.1.3.1 Klon 15/7/3/29

Nach erfolgreicher Isolierung wurde der ca. 1,8 kB lange cDNA-Klon 15/7/3/29 vom 5'-Ende her partiell sequenziert und die erhaltene Sequenz mit der Datenbank des Software-Pakets PC-Gene (Release 4.01) verglichen. Dabei zeigte sich, daß 15/7/3/29 ein offenes Leseraster enthielt, daß sich – auf den ersten ca. 200 Bp – als praktisch identisch mit dem zur Interleukin-6-Familie gehörenden Zytokin Onkostatin M (OM) erwies, dessen Transkript auch tatsächlich eine Länge von 1,8 kB hat [131].

Als mögliche Erklärung für die durch die OM-cDNA vermittelte ^{125}I -C3a-Bindung an HEK293-Zellen bot sich die Hypothese an, daß OM nach Transfektion in HEK293-Zellen autokrin die Expression des endogenen C3aR-Gens induzieren könnte. Um diese Hypothese zu überprüfen, wurde Zellkulturüberstand von OM-transfizierten HEK293-Zellen nach drei Tagen sterilfiltriert und, 1:1 mit frischem Medium gemischt, auf nicht-transfizierte Zellen gegeben; Zellkulturüberstand von pcDNA1/Amp-transfizierten Zellen dienten als Negativkontrolle. Wie aus Abb. 3.3 hervorgeht, zeigten die solchermaßen behandelte HEK293-Zellen tatsächlich eine erhöhte Fähigkeit zur ^{125}I -C3a-, nicht aber ^{125}I -C5a-Bindung. Diese Beobachtung wurde im Rahmen dieser Arbeit jedoch nicht weiterverfolgt.

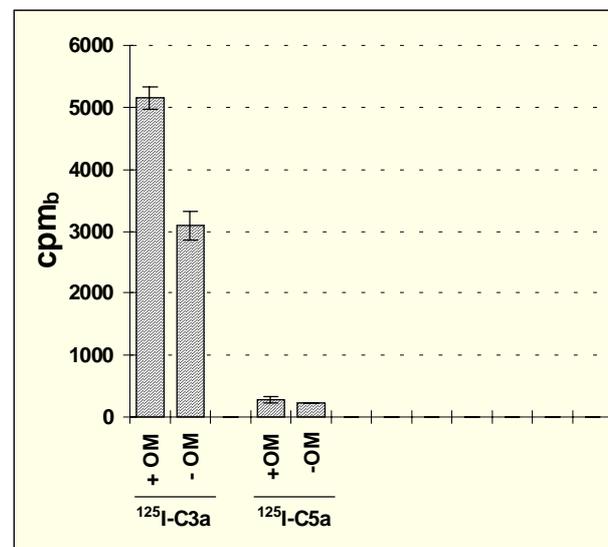


Abb. 3.3: Induktion von ^{125}I -Bindung nach Inkubation untransfizierter HEK293-Zellen mit Zellkulturüberstand OM-transfizierter (+ OM) und Vektor-transfizierter (- OM) HEK293-Zellen. Dargestellt ist die jeweils gebundene Menge an ^{125}I -C3a bzw. ^{125}I -C5a.

3.1.3.2 Klon 43/9/38/9 (pTC10)

Die Länge des cDNA-Klons 43/9/38/9 – im folgenden als pTC10 bezeichnet – wurde nach Restriktionsanalysen auf ca. 4,3 kB geschätzt. Kommerzielle Sequenzierung ergab als genaue Länge des Inserts 4.276 Bp (Anhang 6.1). Dabei zeigte sich ein 1446 Bp langes offenes Leseraster, das mit einem ATG in Pos. 68 beginnt und für ein Protein von 482 Aminosäuren und einer berechneten Molekularmasse von 53.864 Da kodiert¹. Potentielle N-Glykosylierungsstellen fanden sich in den Positionen 9 und 194. Eine Hydrophobizitätsanalyse nach [132] mit dem

¹ Zugriffsnummer für die EMBL-Nukleotid-Datenbank: Z73157

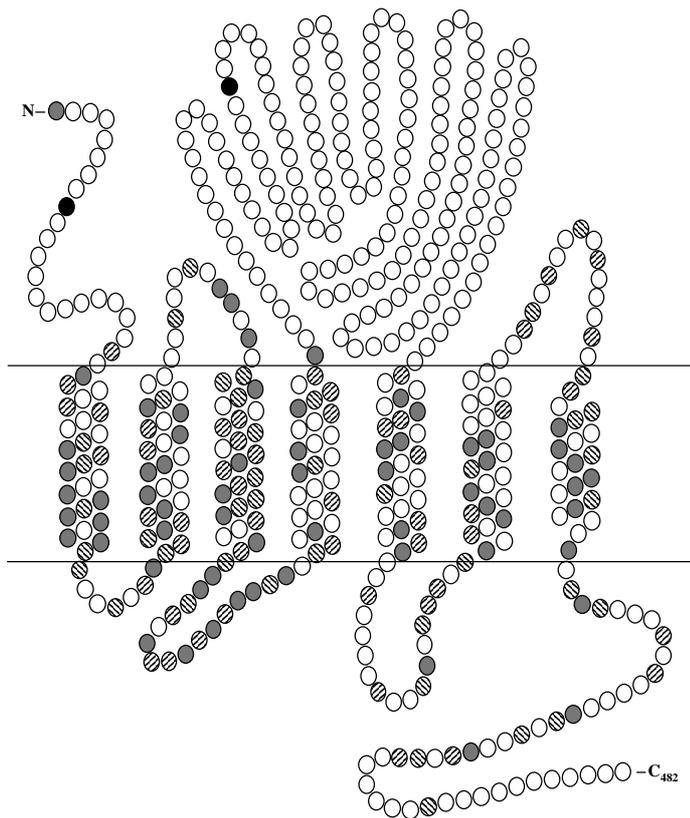


Abb. 3.4: Schematische Darstellung der Struktur des C3aRs. Dargestellt sind die sieben mutmaßlichen hydrophoben, transmembranösen Helices sowie die beiden potentiellen N-Glycosylierungsstellen (schwarze Kreise). Aminosäurereste, die im C5aR konserviert sind, tragen eine Schraffur von links unten nach rechts oben, solche, die im fMLPR vorkommen eine Schraffur von links oben nach rechts unten. Reste, die sowohl im C5aR als auch im fMLPR vorkommen, sind dunkel dargestellt.

entsprechenden Modul der PC-Gene-Software (Release 4.01) zeigte 7 hydrophobe Bereiche auf, die als transmembranöse Helices gedeutet werden können; damit würde sich das von pTC10 kodierte Protein strukturell in die Rhodopsin-Superfamilie der G-Protein-gekoppelten Rezeptoren einreihen (Abb. 3.4).

Auffällig war eine ungewöhnlich große 2. extrazelluläre Schlaufe (EL) zwischen den transmembranösen Regionen IV und V; mit ca. 175 Aminosäuren Länge ist diese Domäne weit größer als alle bisher beschriebenen 2. ELs von G-Protein-gekoppelten Rezeptoren. Auch konnten bis zur Fertigstellung dieser Arbeit keinerlei dazu homologe Sequenzen in der SwissProt-Datenbank gefunden werden. Abgesehen von der 2. EL wies pTC10

jedoch hohe Sequenzhomologie sowohl zum humanen C5aR (36%) als auch zum fMLPR (32%) auf; eine entsprechende Gegenüberstellung ist in Anhang 6.3 dargestellt.

In Verbindung mit den im folgenden vorgestellten Daten scheint es gerechtfertigt, den cDNA-Klon 43/9/38/9 = pTC10 als einen humanen C3a-Rezeptor anzusprechen.

3.1.4 Charakterisierung des C3aRs

Zur Bestätigung, daß es sich bei dem isolierten cDNA-Klon pTC10 tatsächlich um einen humanen C3aR handelt, wurden einerseits Affinität und Spezifität der durch ihn vermittelten ^{125}I -C3a-Bindung bestimmt und andererseits seine Fähigkeit untersucht, auf Stimulation mit C3a funktional zu antworten.

3.1.4.1 Ligandenbindung

Zwei bis drei Tage nach Transfektion mit pTC10 wurden HEK293-Zellen kompetitiven Bindungsstudien nach 2.6.6.2 unterzogen. Um auszuschließen, daß die mit proteinchemisch

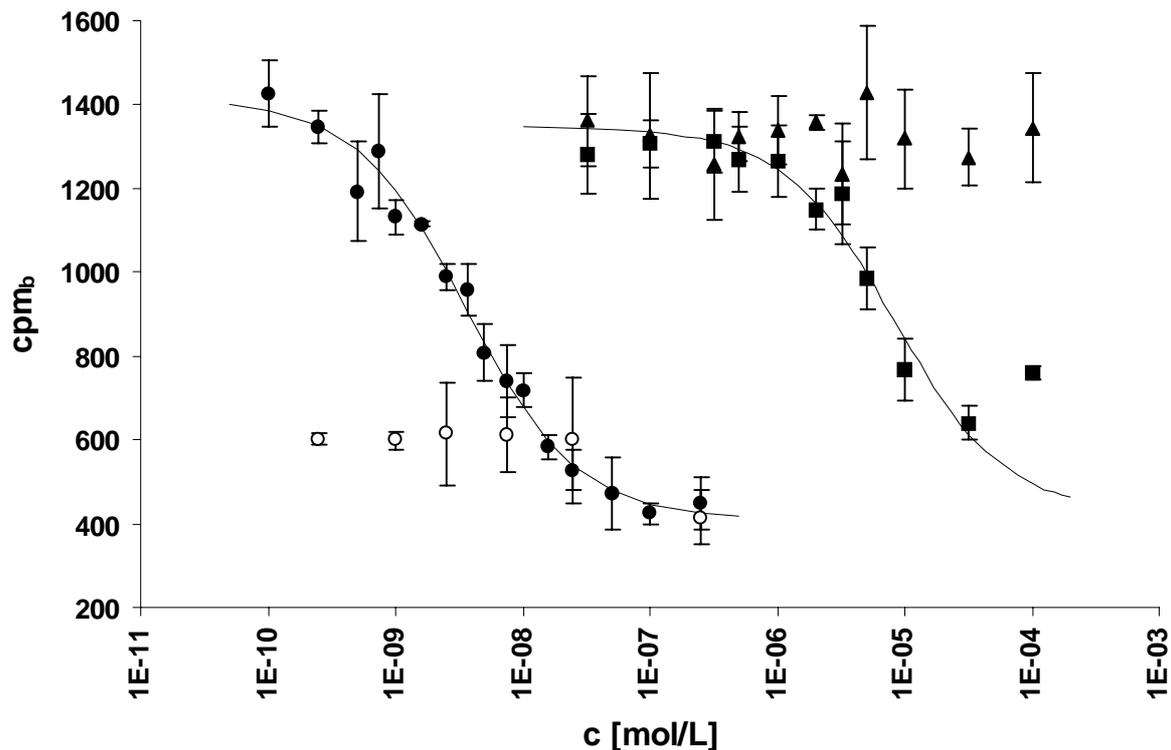


Abb. 3.5: Kompetitive Bindungsstudien mit pTC10-transfizierten HEK293-Zellen. Dargestellt ist die Verdrängung von ^{125}I -C3a durch unmarkiertes C3a (gefüllte Kreise), das C3a-analoge synthetische Peptid P117 (gefüllte Quadrate) und das nicht-analoge Peptid P251 (gefüllte Dreiecke). Mit Vektor transfierte Zellen dienten als Negativkontrolle (Verdrängung mit C3a; leere Kreise).

aufgereinigtem C3a beobachteten Effekte auf eventuelle Kontaminationen (z. B. mit C5a) zurückgehen, wurde das C3a-analoge synthetische Peptid P117 (N-Leu-Arg-Arg-Gln-Ala-Trp-Arg-Ala-Ser-Ala-Leu-Gly-Leu-Ala-Arg-C) mitgeführt. Als Spezifitätskontrolle wurde das nicht-analoge (vom C5aR-N-Terminus abgeleitete) Peptid P251 (N-His-Tyr-Asp-Asp-Lys-Asp-Thr-Leu-Asp-Leu-Gln-Asn-C) verwendet. Mit leerem Vektor pcDNA1/Amp transfizierte Zellen dienten als Negativkontrolle. In Abb. 3.5 ist das Ergebnis einer typischen Studie dieser Art dargestellt.

C3a vermochte den Radioliganden im niedrig-nanomolaren Bereich zu verdrängen; P117 verdrängte im mikromolaren Bereich. Erwartungsgemäß zeigte P251 keine Verdrängung, während die Vektor-transfizierte Zellen keine ^{125}I -C3a-Bindung aufwiesen. Eine genaue Auswertung der Daten mittels des Radlig-Moduls des Software-Pakets Ligand 4.0 [129] ergab für C3a eine Dissoziationskonstante K_D von $(4,5 \pm 1,3)$ nM ($n = 3$) bei $(1,4 \cdot 10^5 \pm 7 \cdot 10^4)$ Rezeptoren pro Zelle. Die mit den synthetischen Peptiden gewonnenen Beobachtungen zeigen die Spezifität dieser Bindung.

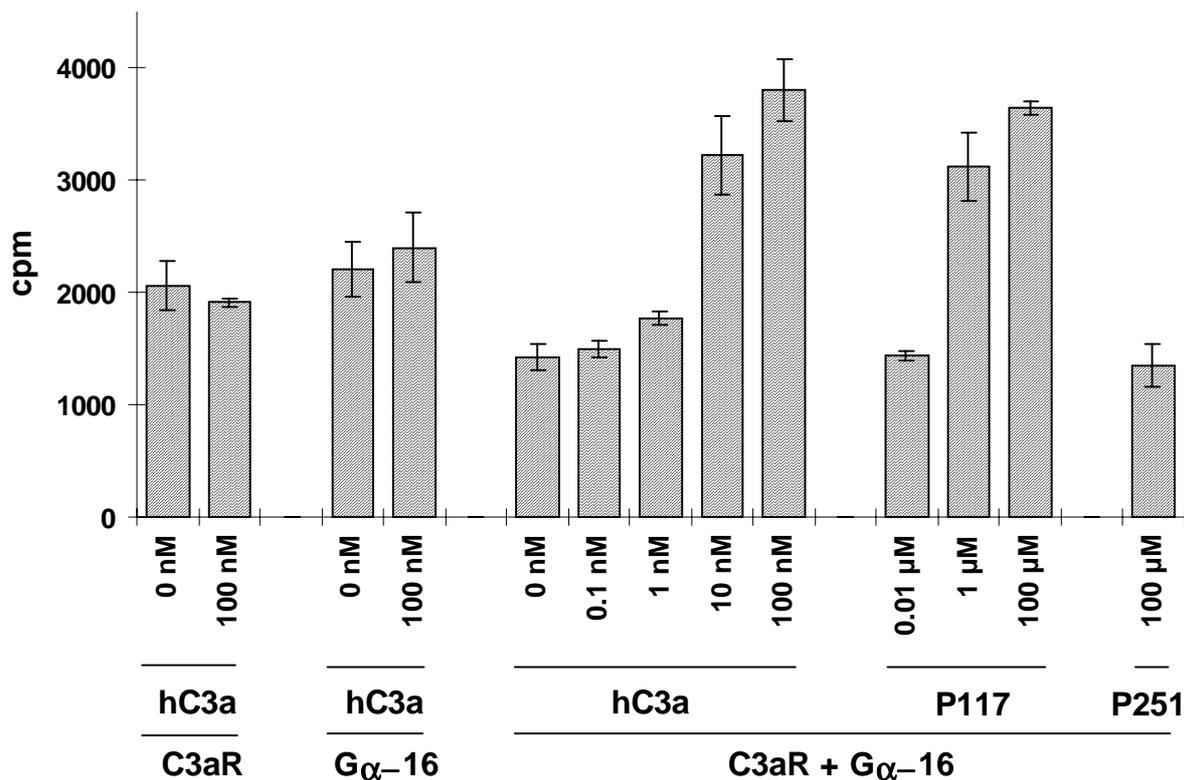


Abb. 3.6: Signaltransduktion durch den C3aR. Dargestellt ist die $^3\text{H-IP}_3$ -Freisetzung nach Stimulusgabe in $\text{G}\alpha\text{-16/pTC10}$ -transfizierten CHO-Zellen.

3.1.4.2 Signaltransduktion

Als funktionelle Antwort des C3aRs wurde die C3a-induzierte IP_3 -Freisetzung gemessen. Die Ergebnisse der von U. Raffetseder durchgeführten Funktionstests sind in Abb. 3.6 zusammengestellt; gemessen wurde die intrazelluläre Freisetzung von $^3\text{H-IP}_3$ in transient transfizierten CHO-Zellen¹ nach Stimulusgabe. Es zeigte sich, daß pTC10 alleine keine IP_3 -Freisetzung vermitteln konnte – erst nach Cotransfektion mit der promiskuitiven G-Protein-Untereinheit $\text{G}\alpha\text{-16}$ konnte Signaltransduktion beobachtet werden. Diese Beobachtung bestätigte die bereits aus der C3aR-Sequenz abgeleitete Zuordnung des C3aRs zur Familie der G-Protein-gekoppelten Rezeptoren.

Nach Komplementierung des Signalweges mit $\text{G}\alpha\text{-16}$ vermochten sowohl C3a als auch das synthetische C3a-homologe-Peptid P117 in pTC10-transfizierten CHO-Zellen eine dosisabhängige $^3\text{H-IP}_3$ -Freisetzung auszulösen. Das nicht-verwandte Peptid P251 erwies sich als

¹ Der Wechsel der Zelllinie von HEK293 zu CHO erfolgte, weil für letztere mit dem IP_3 -Freisetzungstest bereits ein etabliertes Testsystem zur Verfügung stand und die funktionelle Charakterisierung aufgrund der bereits als "Orphan"-Rezeptor veröffentlichten Sequenz des C3aRs [153] unter einem gewissen Zeitdruck stattfand.

unfähig zur Signaltransduktion, wodurch die Spezifität der beobachteten Effekte gezeigt werden konnte.

3.1.5 C4a und der C3aR

Beobachtungen, die im Meerschweinchen-System gemacht wurden, deuteten darauf hin, daß C4a seine anaphylatoxischen Effekte möglicherweise über eine Aktivierung des C3aRs vermittelt; die ungewöhnliche 2. EL des C3aRs könnte dabei als Bindungsstelle für diesen mutmaßlichen 2. Liganden fungieren. Die Frage, ob C4a tatsächlich als das "dritte Anaphylatoxin" neben C3a und C5a anzusehen ist, sollte daher durch Bindungs- und Funktionstests mit rekombinantem C4a auf dem klonierten humanen C3aR (hsC3aR) geklärt werden. Da jedoch verlässliche Daten über C4a-Wirkungen bisher nur vom Meerschweinchen vorliegen, sollte auch der in der Arbeitsgruppe klonierte Meerschweinchen-C3aR (cpC3aR) [66] in die Untersuchung mit einbezogen werden.

Bei den hohen, mikromolaren Konzentrationen, bei denen C4a seine Wirkungen im Meerschweinchen-System entfaltet, könnten schon geringste Kontaminationen von C3a in einer aus Blut aufgereinigten C4a-Charge die Ergebnisse verfälschen; daher wurde rekombinantes C4a verwendet. Dabei kamen sowohl C4a mit C-terminalem Methionin als auch C4a mit C-terminalem His₆-Tag [Diplomarbeit A. Hölzer, 1996] zum Einsatz, die sich in Bindung und Signaltransduktion jedoch praktisch identisch verhielten (Daten nicht gezeigt).

3.1.5.1 Ligandenbindung

Nach transienter Transfektion in HEK293-Zellen wurden sowohl der humane C3aR (pTCC0: FLAG-C3aR mit C5aR-5'-UTR im eukaryontischen Expressionsvektor pcDNA3, s. 3.2.1.2) als auch der Meerschweinchen-C3aR (pSL94: kodierender Bereich mit zusätzlichen 48 Bp genomischen 3'-Bereichs in pcDNA3) in kompetitiven Bindungsstudien untersucht.

¹²⁵I-markiertes C3a wurde als Tracer mit C3a, His₆-C4a und dem C3a-analogen Peptid P117 verdrängt; das nicht-analoge Peptid P251 diente wiederum als Spezifitätskontrolle.

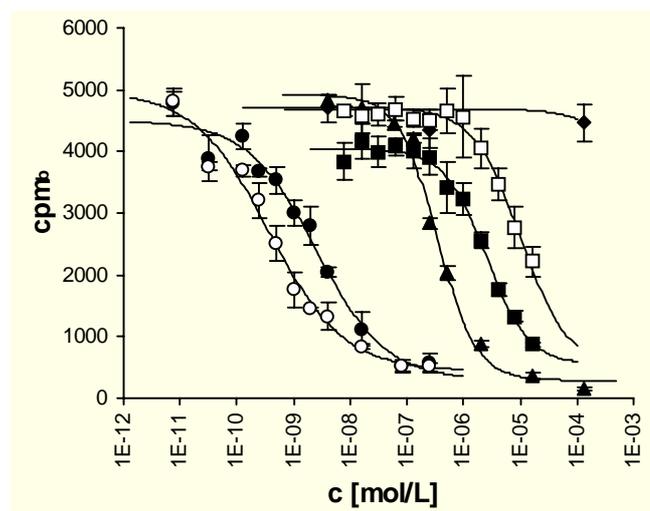


Abb. 3.7: Kompetitive Bindungsstudien mit hsC3aR- (leere Symbole) und cpC3aR- (gefüllte Symbole) transfizierten HEK293-Zellen. Dargestellt ist die Verdrängung von ¹²⁵I-C3a durch unmarkiertes C3a (Kreise), His₆-C4a (Quadrate), das C3a-analoge synthetische Peptid P117 (Dreiecke) und das nicht-analoge Peptid P251 (Rauten).

Die Ergebnisse der Bindungsstudien sind in Tab. 3.1, S. 78 zusammengefaßt; typische Bindungskurven sind in Abb. 3.7 dargestellt. Demnach bindet C3a an den cpC3aR mit ähnlicher Affinität wie an den hsC3aR ($K_D = (1,6 \pm 0,9) \text{ nM}$; $n = 3$ vs. $(1,0 \pm 0,9) \text{ nM}$; $n = 12$). Die Bindung des C3a-analogen Peptids P117 belegte, daß die beobachteten Effekte auch beim cpC3aR tatsächlich auf C3a und nicht auf evtl. Kontaminationen des proteinchemisch aufgereinigten Liganden zurückgehen; das Bindungs-Unvermögen des nicht-C3a-analogen Peptids P251 zeigte die Spezifität der Ligandenbindung an. Auch His₆-C4a schien an die Rezeptoren beider Species mit ähnlicher Affinität zu binden, die sich jedoch als um 3 Größenordnungen geringer erwies als die des C3a. Da es sich hierbei um einen rekombinanten Liganden handelt, kann davon ausgegangen werden, daß die beobachtete Verdrängung tatsächlich auf C4a zurückgeht.

3.1.5.2 Signaltransduktion

Zur Klärung der Frage, ob die Bindung von C4a an den C3aR für die im Meerschweinchen beobachteten anaphylatoxischen Eigenschaften des Peptids verantwortlich sein können und ob auch im Menschen solche Effekte zu erwarten sind, wurden der hsC3aR und der cpC3aR nach Kotransfektion mit G α -16 in HEK293-Zellen im Calcium-Freisetzungstest untersucht. Die in Kooperation mit R. S. Ames, SmithKlineBeecham Pharmaceuticals, King of Prussia, USA, gewonnenen Ergebnisse sind Tab. 3.1, S. 78 zu entnehmen und durch Abb. 3.8 illustriert.

Demnach vermögen sowohl C3a als auch C5a auf den Rezeptoren beider Species mit vergleichbarer ED_{50} (C3a: niedrig nanomolar; C5a: größer 1 μM) Signaltransduktion auszulösen. Das C3a-analoge Peptid H-1264 erwies sich auf dem cpC3aR um den Faktor 20 aktiver als auf dem hsC3aR und erreichte damit die volle Aktivität des wt-Liganden C3a. Auch C4a vermochte den cpC3aR mit recht hoher Effizienz zu aktivieren ($ED_{50} = (8,7 \pm 0,5) \text{ nM}$), wohingegen bis zu Konzentrationen von 1 μM keine Signaltransduktion durch den hsC3aR beobachtet wurde.

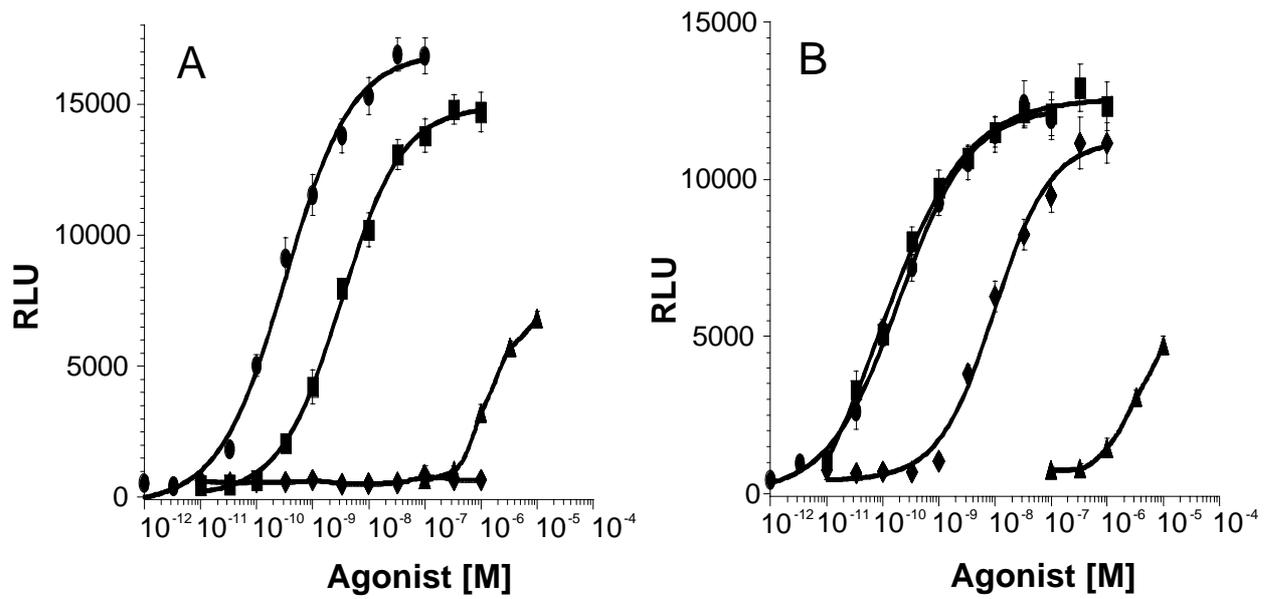


Abb. 3.8: Signaltransduktion durch den humanen (A) und den Meerschweinchen-C3aR (B). Dargestellt ist die relative Fluoreszenzintensität als Maß für die intrazelluläre Calcium-Freisetzung nach Stimulation C3aR/G α -16-kotransfizierter HEK293-Zellen mit C3a (Kreise), C4a (Rauten), C5a (Dreiecke) und dem C3a-analogen synthetischen Peptid H-1264 (Rechtecke).

3.2 Generierung von C3aR/C5aR-Chimären

Zur Identifizierung von Bereichen, die innerhalb der Sequenz eines Proteins eine bestimmte Funktion wahrnehmen, eignet sich die Konstruktion von Chimären mit strukturell ähnlichen, aber funktionell verschiedenen Proteinen. So wurden bereits z. B. C5aR/fMLPR-Chimären erfolgreich zur Definition von Rezeptorbereichen, die an der Bindung von C5a bzw. fMLP beteiligt sind, eingesetzt [114,115]. In dieser Arbeit sollten beim C3aR durch Chimärenbildung mit dem C5aR solche Bereiche eingegrenzt werden, die für die hohe Affinität und Spezifität der Ligandenbindung sowie die Signaltransduktion verantwortlich zeichnen. Alle Chimären sollten bezüglich ihrer Zelloberflächenexpression, ihrer Fähigkeit, C3a und/oder C5a zu binden und ihrer Signaltransduktionseigenschaften untersucht werden.

3.2.1.1 Auswahl der Rezeptormodule

C3a und C5a sind Moleküle mit hoher Sequenz- (ca. 24% auf Aminosäureebene; s. Anhang 6.6) und Strukturhomologie. Wie in dieser Arbeit gezeigt, sind auch C3aR und C5aR hoch homolog (36%), sofern die 2. extrazellulären Schlaufen (EL) außer acht gelassen werden; die höchste Homologie zeigt sich dabei in den transmembranösen (TM) Bereichen. Dies stellt zwar eine geringere Homologie dar als sie z. B. zwischen Subklassen ein und desselben Rezeptors gefunden werden (gewöhnlich >90%), doch zeigen die Erfahrungen, die mit dem C5aR/fMLPR-System gemacht wurden, daß auch Chimären aus Rezeptoren geringeren Verwandtschaftsgrades (hier: ca. 28%) erfolgreich exprimiert werden können.

Die hohe Sequenzhomologie sowohl von C3aR und C5aR, aber auch der Liganden C3a und C5a, ließ zunächst einen ähnlichen Bindungsmodus der beiden Rezeptor/Ligand-Paare erwarten. Daher wurde bei der Entscheidung, welche Rezeptorbereiche für die Konstruktion der C3aR/C5aR-Chimären herangezogen werden sollten, berücksichtigt, was bisher für die Bindung des C5a an den C5aR bekannt war.

Es kann als gesichert angesehen werden, daß beim C5aR der N-Terminus und die 2. EL an der Ligandenbindung/Signaltransduktion beteiligt sind (s. Einleitung). Der C3aR weist zwar einen kürzeren N-Terminus als der C5aR auf; allerdings stellt die ungewöhnlich große 2. EL des C3aRs einen weiteren möglichen Kontaktpunkt sowohl für den C-Terminus als auch für andere Bereiche des Liganden dar. Daher wurden sowohl die N-Termini als auch die 2. ELs der beiden Rezeptoren zur Chimärenkonstruktion ausgewählt. Somit kann jeder Rezeptor als aus 4 Modulen zusammengesetzt gedacht werden: 1) N-Terminus; 2) TM1 bis TM4; 3) 2. EL; 4) TM5 bis C-Terminus.

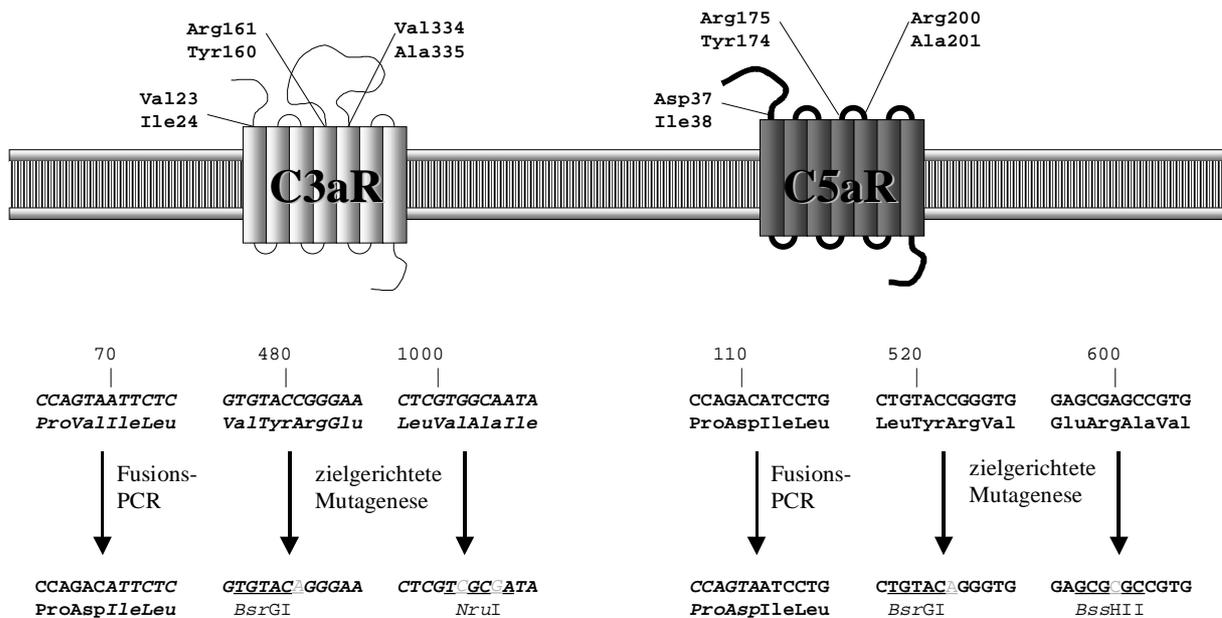


Abb. 3.9: Chimärenbildung. Austausch der N-Termini durch Fusions-PCR und Vorbereitung des Austauschs der 2. ELs durch Einführung neuer Restriktionsschnittstellen. Sequenzabschnitte, die aus dem C3aR stammen, sind kursiv dargestellt, durch Mutagenese veränderte Nucleotide grau.

Zur Definition der Module mußten die Positionen der transmembranösen Helices definiert werden. Da bisher für keinen der Rezeptoren eine experimentell bestimmte Raumstruktur vorliegt, war hierzu die Heranziehung von Modellvorstellungen notwendig. Zum einen wurde das Ergebnis einer Hydrophobizitätsanalyse nach [132] in die Betrachtung miteinbezogen; zum anderen wurden für die Definition der transmembranösen Regionen des C5aRs Computermodelle des Rezeptors berücksichtigt [101,102].

Außerdem wurde bei der Auswahl der genauen Positionen, an denen der Austausch der Module stattfinden sollte, versucht, den Sequenzwechsel von einem Rezeptor zum anderen in möglichst homologen Regionen der Moleküle stattfinden zu lassen. Die Chimärenbildung sollte vorzugsweise durch Umklonierungsschritte statt durch Fusions-PCR erfolgen, um den Aufwand der DNA-Sequenzierung aller Konstrukte möglichst gering zu halten. Der Möglichkeit, durch stumme Mutagenese passende neue Restriktionsschnittstellen zu generieren, waren jedoch Grenzen gesetzt, so daß der Austausch der N-Termini doch mittels Fusions-PCR durchgeführt werden mußte.

Im einzelnen fiel die Wahl der Sequenzwechsel-Positionen auf die Aminosäurereste, die in Abb. 3.9 dargestellt sind. Mindestens eine der beiden Endamino-säuren zweier aneinandergrenzender Module war in beiden Rezeptoren identisch (Ile24 im C3aR / Ile38 im C5aR; Tyr160 u. Arg161 im C3aR / Tyr174 u. Arg175 im C5aR; Ala 335 im C3aR/ Ala201 im C5aR).

Weiterhin wurden zur Klärung der Rolle des N-Terminus des C3aRs für die Ligandenbindung in der Arbeitsgruppe von R. S. Ames, SmithKline Beecham Pharmaceuticals, King of Prussia, USA, generierte N-terminale Deletionsmutanten ($\Delta 09$, $\Delta 16$ und $\Delta 22$) bezüglich Funktion und Bindung untersucht.

3.2.1.2 Weitere Vorüberlegungen

Zur Schaffung einer normalisierten Expressionsumgebung sollten beide Rezeptoren mit der gleichen 5'-UTR versehen werden. Die Wahl fiel auf die 5'-UTR des C5aRs, da in der Arbeitsgruppe bereits ein Konstrukt (pCCF2 [117], s. auch 2.1.3) vorlag, das die Einführung der C5aR-5'-UTR sowie des FLAG-Epitops vor alle Chimären erlaubte. Das FLAG-Epitop ist eine oktamere Aminosäuresequenz (N-DYKDDDDK-C), gegen die monoklonale Antikörper kommerziell erhältlich sind. Einige Chimären würden aufgrund ihrer modularen Zusammensetzung keine Epitope für die verfügbaren anti-C3aR- bzw. anti-C5aR-Antikörper aufweisen; das FLAG-Epitop würde hier eine Alternative zur Überprüfung der Expression dieser Chimären auf der Zelloberfläche bieten.

Da zwischenzeitlich überlegt worden war, mit den Chimären stabil transfizierte Zelllinien herzustellen, wurden alle Chimären statt in pcDNA1/Amp letztendlich in pcDNA3 konstruiert, einem Vektor, der sich für die Generierung stabiler Zelllinien eignet.

Bindungsstudien zeigten, daß die Dissoziationskonstanten für beide Rezeptor/Ligand-Paare sowohl durch einen Wechsel des Expressionsvektors oder der 5'-UTR als auch durch die Einführung des FLAG-Epitops praktisch unbeeinflusst blieben (Daten nicht gezeigt).

3.2.2 Durchführung

Der genaue Ablauf der Generierung der Chimären ist detailliert in Anhang 6.7 beschrieben; Karten der wichtigsten Plasmide, die während des Konstruktionsprozesses generiert wurden, finden sich in Anhang 6.8.

3.2.2.1 Einführung zusätzlicher Schnittstellen in den C5aR

Außer dem FLAG-C5aR-Konstrukt pCCF2 (in pCDM8) lag zu Beginn der Arbeit ein partiell sequenzierter C5aR-Klon mit einer zusätzlich eingeführten *SalI*-Schnittstelle an Pos. 709 vor. Zunächst wurde der FLAG-C5aR in den eukaryontischen Expressionsvektor pcDNA1/Amp umklontiert (\diamond pCCF3) und – mittels weiterer Umklonierungsschritte – die *SalI*-Schnittstelle eingefügt. Durch QuickChange-Mutagenese (Stratagene) wurden sodann die beiden neuen Schnittstellen *BsrGI* (in Pos. 519) und *BssHII* (in Pos. 597) eingeführt. Das erhaltene Konstrukt pCCF3M lieferte nach Umklonierung in pcDNA3 die "Chimäre" pTCCF.

3.2.2.2 Einführung zusätzlicher Schnittstellen in den C3aR

Zunächst wurde aus dem unhandlichen, da 4,3 kBp langen C3aR-Klon pTC10 mittels PCR ein verkürztes Konstrukt pTC12 generiert, das nunmehr nur noch die 5'-UTR und das offene Leseraster des C3aRs enthielt. Zur Einführung der 5'-UTR des C5aRs sowie des FLAG-Epitops wurde sodann über PCR eine *Mfe*I-Schnittstelle (C|AATTG) direkt vor Aminosäure 2 (Pos. 4) des C3aRs eingebracht. Diese zu *Eco*RI (G|AATTC) kompatible Schnittstelle wurde benutzt, um ein *Mfe*I-Fragment aus diesem Konstrukt in einen pCCF3 (s. 3.2.2.1) einzubringen, aus dem zuvor durch Verdau mit *Eco*RI und *Mfe*I der codierende Bereich des C5aRs (und ein Teil des Vektors), nicht aber die C5aR-5'-UTR und die FLAG-Sequenz entfernt worden waren; das Ergebnis war ein C3aR mit C5aR-5'-UTR und FLAG in pcDNA1/Amp. Mittels des QuickChange-Mutagenese-Kits (Stratagene) wurden sodann die neuen Schnittstellen *Bsr*GI (Pos. 476) und *Nru*I (Pos. 1003) eingeführt, um pTC13M zu erhalten. Umklonierung in pcDNA3 lieferte die "Chimäre" pTCC0.

3.2.2.3 Austausch der N-Termini

Wie in Abb. 3.9 dargestellt, wurden die N-Termini der beiden Rezeptoren durch Fusions-PCR ausgetauscht. Für die Übertragung des N-Terminus des C5aRs auf den C3aR wurden dabei die Primer TC10 (5'-GAATGACCATGGAGAGAAT|GTCTGGAACACGCAGC-3') / TC11 (5'-C|ATTCTCTCCATGGTCATTC-3'), für die Übertragung des C3aR-N-Terminus auf den C5aR die Primer TC12 (5'-GATGACCAAGGCCAGCAT|TACTGGCGGCTCATTC-3') / TC13 (5'-GTA|ATCCTGGCCTTGGTCATC-3') verwendet (s. auch Anhang 6.9). Als Außenprimer wurden Vektorprimer (Standard-T7- und -Sp6-Primer) eingesetzt. Die Fusionsprodukte wurden über *Hind*III/*Xba*I in pcDNA1/Amp kloniert und soweit wie nötig sequenziert (p5N3, p3N5).

3.2.2.4 Generierung der Chimären

Aus den 4 zum Austausch vorgesehenen Rezeptormodulen lassen sich insg. $2^4 = 16$ Chimären (einschließlich der wt-Rezeptoren) bilden. Um die verschiedenen Chimären eindeutig zu benennen, wurde eine binäre Nomenklatur eingeführt. Jede Chimäre kann mit einer 4stelligen Binärzahl eindeutig charakterisiert werden, wenn jede Binärziffer für ein Rezeptormodul steht; dabei wird der N-Terminus durch die höchstwertige, das Modul TM5 – C-Terminus durch die niederwertigste Binärziffer codiert. Die Herkunft des jeweiligen Moduls wird mit einer 0 für den C3aR und einer 1 für den C5aR dargestellt. Schließlich wird die vierstellige Binärzahl zu einer einzigen Hexadezimalziffer zusammengefaßt. Somit steht z. B. pTCC0 = 0000 = 3333 für ein Plasmid mit dem wt-C3aR, pTCCF = 1111 = 5555 für ein Plasmid mit dem wt-C5aR, und pTCCA = 1010 = 5353 enthält die Sequenz für einen C3aR mit N-Terminus und 2. EL des

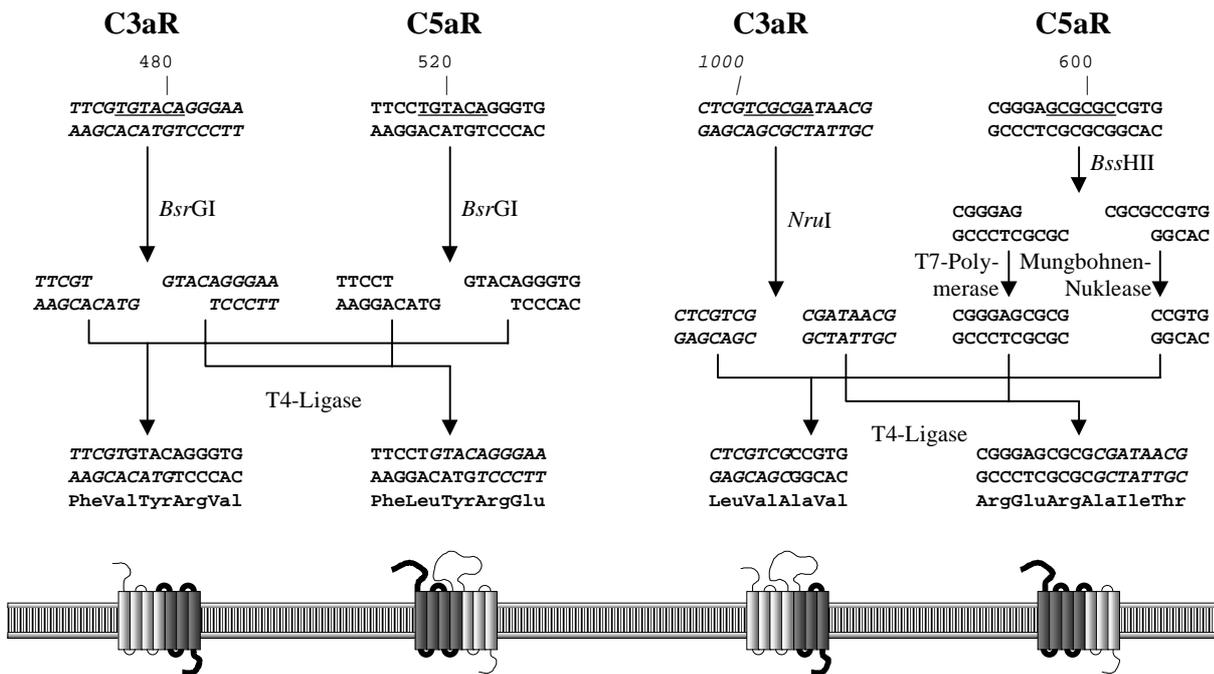


Abb. 3.10: Chimärenbildung. Austausch der 2. extrazellulären Schlaufen mit Hilfe der neu eingeführten Restriktionsschnittstellen. Sequenzabschnitte, die aus dem C3aR stammen, sind kursiv dargestellt.

C5aRs. Die exprimierten Proteine werden dementsprechend mit Ch#0, Ch#A, Ch#F usw. bezeichnet.

Die Generierung der Chimären folgte dem in Anhang 6.7 gezeigten Schema; Details des Austauschs der 2. ELs sind in Abb. 3.10 dargestellt.

3.2.2.5 Generierung der N-terminalen Deletionsmutanten des C3aRs

Die in der Arbeitsgruppe von R. S. Ames, SmithKline Beecham, King of Prussia, USA, generierten N-terminalen Deletionsmutanten des C3aRs wurden unter Verwendung der Primer Δ -9F (5'-GGGGGGGGTACCATGTCAACTGACCTAC-3'), Δ -16F (5'-GGGGGGGGTACC-ATGCCATGGAATGAG-3') und Δ -22F (5'-GGGGGGAAGCTTATGGTAATTCTCTCCATG-GTCATTCTCAG-3') sowie des die singuläre *Pst*I-Schnittstelle des C3aRs umfassenden Revers-Primers PST1R (5'-GAACCCTAGGGAGTGAATCTGCAGAAGGTC-3') mittels Standard-PCR erzeugt. Sowohl die PCR-Fragmente als auch der Vektor pcDNA3 wurden mit *Asp*718I und *Pst*I verdaut und ligiert. Diese Konstrukte enthielten demnach keine 5'-UTR und kein FLAG-Epitop.

3.2.3 Oberflächenexpression

Alle Chimären (sowie die N-terminalen Deletionsmutanten des C3aRs) wurden nach transienter Transfektion in HEK293-Zellen in FACS-Untersuchungen auf ihre Expression auf

der Zelloberfläche getestet. Dazu standen folgende monoklonalen Antikörper zur Verfügung: 1) mAK 8H1, der gegen ein Epitop in der 2. EL des C3aRs [128] gerichtet ist; 2) mAK W17/1 gegen den N-Terminus des C5aRs, ein Geschenk von O. Götze, Göttingen [96]; 3) die kommerziellen monoklonalen anti-FLAG-Antikörper M2 und M5.

Die Ergebnisse dieser Untersuchungen sind in Tab. 3.2, S. 78 zusammengefaßt; ein typisches Ergebnis eines FACS-Versuches ist in Abb. 3.11 dargestellt. Es zeigte sich, daß die chimären Konstrukte meist weniger gut exprimiert wurden als die beiden wt-Rezeptoren. 7 der 16 Chimären wiesen überhaupt keine reproduzierbar detektierbare Oberflächenexpression auf. Viele der Konstrukte mit dem N-Terminus des C3aRs erschienen nicht auf der Zelloberfläche (Ch#1 – Ch#6; Ausnahmen: Ch#0 (wt-C3aR) und Ch#7); von den Chimären mit dem C5aR-N-Terminus konnte lediglich eine einzige (Ch#9) nicht nachgewiesen werden. Von den Deletionsmutanten wurden $\Delta 09$ und $\Delta 16$ gut exprimiert; bei $\Delta 22$ konnte keine Oberflächenexpression nachgewiesen werden.

Um sicherzustellen, daß eine mangelnde Oberflächenexpression nicht auf unerwünschte Mutationen – etwa vorzeitige Stoppcodons – in den Konstrukten zurückzuführen waren, wurden die kodierenden Bereiche aller nicht auf der Zelloberfläche nachgewiesenen Konstrukte kommerziell sequenziert. Dabei konnten keine unerwünschten Sequenzänderungen festgestellt werden.

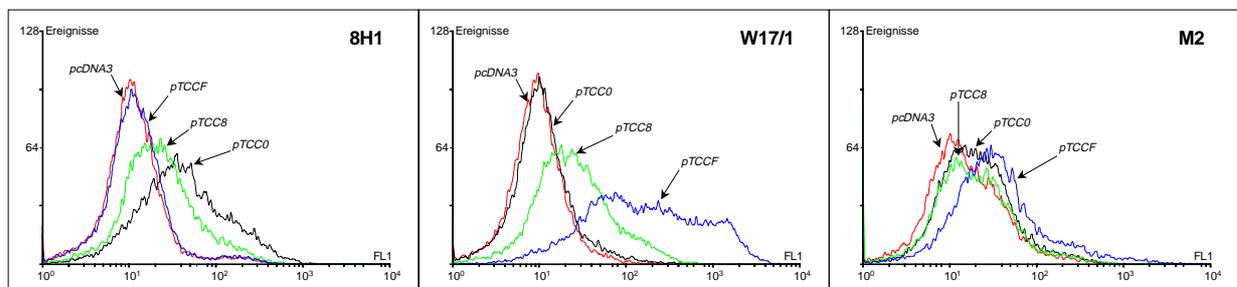


Abb. 3.11: Überprüfung der Oberflächenexpression von C3aR/C5aR-Chimären mittels FACS. Dargestellt ist exemplarisch die Reaktion von mit pTCC0, pTCC8 und pTCCF transfizierten HEK293-Zellen mit den monoklonalen Antikörpern 8H1 (gegen die 2. EL des C3aRs), W17/1 (gegen den N-Terminus des C5aRs) und M2 (gegen das FLAG-Epitop) gegenüber pcDNA3 als Negativkontrolle.

Mutationen im Vektoranteil der Plasmide wurden als Ursache dadurch ausgeschlossen, daß exemplarisch die chimären Bereiche der Plasmide pTCC1 und pTCC2 (ab der neu eingebrachten *Bsr*GI-Schnittstelle bis *Hind*III hinter dem Insert) in das nachweislich exprimierende und entsprechend vorbereitete C3aR-Wildtyp-Plasmid (pTCC0) umkloniert wurden. Auch nach diesem Schritt zeigten Ch#1 und Ch#2 keine detektierbare Zelloberflächenexpression.

3.2.4 Bindung

Nach transienter Transfektion in HEK293-Zellen wurden alle Chimären in 4-Punkt-Bindungstests auf ihre Fähigkeit untersucht, ^{125}I -C3a und ^{125}I -C5a zu binden. Wurde eine meßbare Bindung detektiert, wurde die Dissoziationskonstante des jeweiligen Liganden auf der entsprechenden Chimäre in detaillierten Bindungsstudien bestimmt.

Die Ergebnisse der Bindungsstudien sind ebenfalls aus Tab. 3.2, S. 78 zu ersehen. Außer dem wt-C3aR (Ch#0, $K_D = (1,0 \pm 0,9)$ nM; $n = 12$) zeigte lediglich die Chimäre #8 meßbare ^{125}I -C3a-Bindung ($K_D = (2,3 \pm 1,5)$ nM; $n = 8$). ^{125}I -C5a-Bindung konnte außer bei Ch#F, dem wt-C5aR ($K_D = (5,2 \pm 2,5)$ nM; $n = 6$), bei mehreren Chimären beobachtet werden – darunter auch wieder die Ch#8.

Wegen der sehr schwachen Bindung von ^{125}I -C5a an Ch#8, mußte zur Bestimmung der K_D von C5a auf dieser Chimäre ein Kunstgriff angewandt werden. Die in dieser Arbeit angewandte Methode der kompetitiven Bindungsstudie setzt nämlich die Verfügbarkeit eines hochaffinen Tracers voraus, um Dissoziationskonstanten bestimmen zu können. Mit dieser Methode können niederaffine Liganden – z. B. nach Mutagenese auf Ligandenseite – gut vermessen werden; sinkt jedoch aufgrund einer Mutation im Rezeptor die

Affinität des Radioliganden, kann u. U. schon dessen Bindung nicht mehr detektiert werden. Bei dem in dieser Arbeit verwendeten Testsystem mit einem Signal/Hintergrund-Verhältnis (gebundene Aktivität ohne und mit Verdränger) von maximal ca. 1:5 bei wt-Rezeptoren dürfte bereits eine Erhöhung der K_D um den Faktor 20 bei einer Chimäre zu einer kaum noch

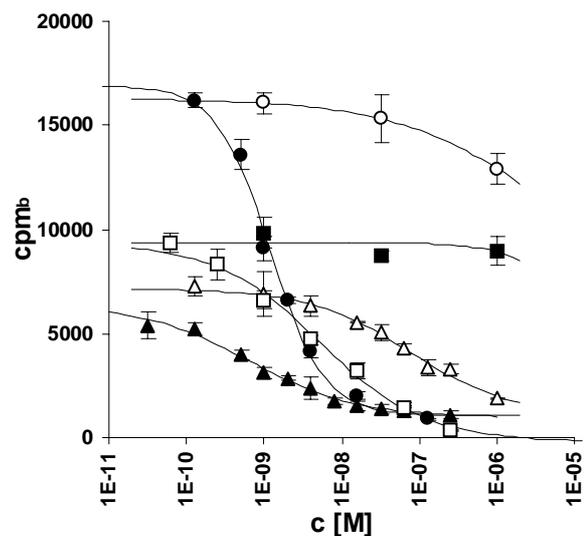


Abb. 3.12: Kompetitive Bindungsstudien mit pTCC0- (Kreise), pTCC8- (Dreiecke) und pTCCF- (Quadrate) transfizierten HEK293-Zellen mit C3a (gefüllte Symbole) und C5a (leere Symbole) als Verdränger. Als Tracer wurde für pTCC0 und pTCC8 ^{125}I -C3a und für pTCCF ^{125}I -C5a verwendet.

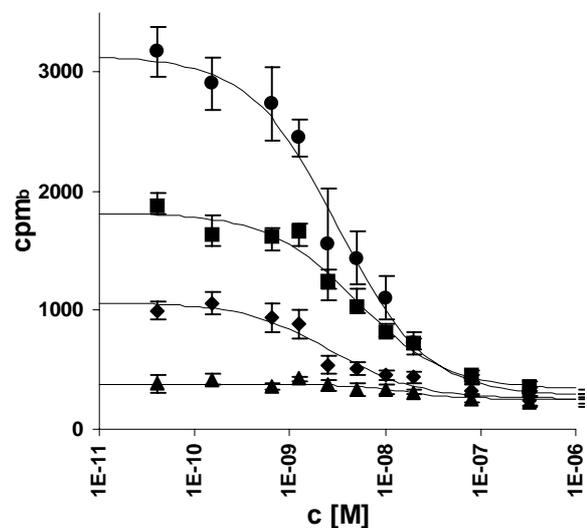


Abb. 3.13: Kompetitive Bindungsstudie mit pTCC0- (Kreise), $\Delta 09$ - (Quadrate), $\Delta 16$ - (Rauten) und $\Delta 22$ - (Dreiecke) transfizierten HEK293-Zellen. Dargestellt ist die Menge an gebundenem ^{125}I -C3a bei steigender Konzentration an unmarkiertem C3a.

nachweisbaren Bindung führen. In der Tat lag die Bindung von ^{125}I -C5a an Ch#8 im 4-Punkt-Test an der Nachweisgrenze; mit ^{125}I -C3a lag nun jedoch ein hochaffiner Ligand vor, dessen Verdrängung in einem Kreuzverdrängungsexperiment mit steigenden Mengen C5a verfolgt werden konnte. Daraus ergab sich für C5a auf Ch#8 eine K_D von (33 ± 14) nM ($n = 3$). In Abb. 3.12 sind Bindungskurven von Ch#0, Ch#8 und Ch#F im Vergleich dargestellt.

Die Ergebnisse der Bindungsversuche an den Deletionsmutanten sind in Abb. 3.13 dargestellt. Es zeigte sich, daß $\Delta 09$ und $\Delta 16$ nur geringfügig geringere Affinitäten zu C3a aufweisen als der wt-C3aR; $\Delta 22$ zeigte – in Übereinstimmung mit der mangelnden Oberflächenexpression (s. 3.2.3) – keine Bindung.

3.2.5 Funktion

In Kooperation mit der Arbeitsgruppe von R. S. Ames, SmithKline Beecham Pharmaceuticals, King of Prussia, USA, wurden alle Chimären in den USA auf ihre Fähigkeit zur Signaltransduktion untersucht. Die HEK293-Zellen wurden hierbei zur Etablierung einer funktionierenden Signaltransduktionskette außer mit den Chimären mit einem Expressionsplasmid für die universelle G-Protein-Untereinheit $G\alpha$ -16 kotransfiziert, von dem in dieser Arbeit gezeigt werden konnte, daß es mit dem C3aR koppelt (3.1.4.2); auch für den C5aR wurde Kopplung mit $G\alpha$ -16 beschrieben [82]. Als Indikator für die Signaltransduktion wurde der Anstieg der intrazellulären Calcium-Konzentration nach Stimulusgabe fluorometrisch verfolgt. Außer C3a und C5a wurden das C3a-analoge synthetische Peptid H-1264 (N-Trp-Trp-Gly-Lys-Lys-Tyr-Arg-Ala-Ser-Lys-Leu-Gly-Leu-Ala-Arg-C) sowie das C5a-analoge Peptid H-8135 (N-Phe-Lys-Ala- β Cha-Ala- β Cha-Ala-Leu-dAla-Arg-C) als Stimuli eingesetzt.

Die Ergebnisse der Funktionsstudien sind ebenfalls der Tab. 3.2, S. 78 zu entnehmen. Für C3a

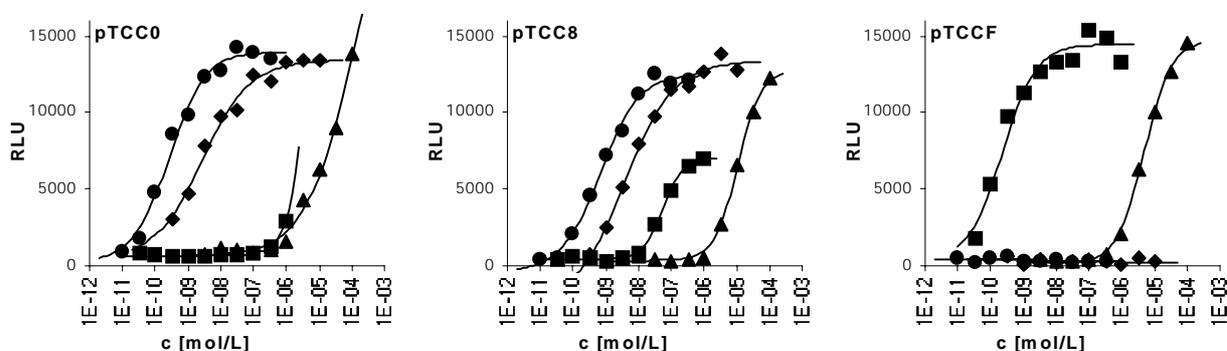


Abb. 3.14: Signaltransduktion durch C3aR/C5aR-Chimären. Dargestellt ist die relative Fluoreszenz als Maß für die intrazelluläre Calcium-Freisetzung nach Stimulation von transient mit pTCC0, pTCC8 und pTCCF sowie $G\alpha$ -16 transfizierten HEK293-Zellen mit verschiedenen Stimuli (C3a: Kreise; C5a: Quadrate; H-1264: Rauten; H-8135: Dreiecke).

zeigte sich – ähnlich wie in der Bindung – lediglich für den wt-C3aR Ch#0 sowie die Chimäre #8 eine funktionelle Antwort (mit einer ED_{50} im gleichen Konzentrationsbereich von < 1 nM). C5a hingegen vermochte außer auf dem wt-C5aR Ch#F ($ED_{50} < 1$ nM) noch drei weitere Chimären zu aktivieren. Die Signaltransduktion auf Ch#7 (> 1 μ M) und Ch#D (> 100 nM) erfolgte dabei eher wenig effizient; mit einer ED_{50} von ca. 50 nM erwies sich C5a jedoch auf Ch#8 als recht aktiv (s. auch Abb. 3.14).

Das Aktivitätsmuster des C3a-analogen Peptids H-1264 entsprach dem des C3a, d. h. größenordnungsmäßig gleiche Aktivität auf Ch#0 und Ch#8 im niedrig-nanomolaren Bereich. Das C5a-analoge Peptid H-8135 hingegen erwies sich als erstaunlich promiskuitiv: Es vermochte sowohl wt-C5aR und wt-C3aR als auch die Chimären #8 und #7 (letztere das Gegenstück zu Ch#8, also ein C5aR mit N-Terminus des C3aRs) mit gleicher Effizienz (niedrig mikromolar) zu aktivieren. Schwache Aktivität zeigte sich zudem noch bei Ch#A, Ch#D und Ch#E.

Die Deletionsmutanten $\Delta 09$ und $\Delta 16$ verhielten sich erwartungsgemäß nicht viel anders als der wt-C3aR (in etwa Wildtyp-Aktivität mit C3a sowie H-1264 und H-8135; keine Aktivität mit C5a). Entsprechend seiner mangelnden Oberflächenexpression zeigte $\Delta 22$ – wie schon in den Bindungsstudien – keine Funktion.

3.3 Charakterisierung der Ligandenbindungsstelle in der 2. EL des C5aRs

Parallel zu den Untersuchungen am C3aR wurden Experimente zur weiteren Charakterisierung der Wechselwirkung zwischen dem C5a-C-Terminus – insb. dem Lys68 – und dem mutmaßlichen Wechselwirkungspartner Glu199 in der 2. EL des C5aRs durchgeführt. Hierzu wurden verschiedene C5a-Mutanten rekombinant exprimiert und in Kooperation mit P. N. Monk, University of Sheffield, UK, bezüglich Bindung und Signaltransduktion gegenüber dem wt-C5aR und einer bereits vorhandenen Glu199Lys-Mutante des C5aRs charakterisiert.

3.3.1 Generierung der C5a-Mutanten

Alle C5a-Mutanten wurden (wie in 2.4.14 beschrieben) über PCR mit Mutagenese-Primern (s. Anhang 6.9) generiert, in *E. coli* Y1089 exprimiert (2.5.3) und über Ionenaustauscher-Chromatographie und FPLC aufgereinigt (2.5.4). Im einzelnen wurden folgende Mutanten hergestellt:

Mutante	Zielsetzung / Vermuteter Effekt
C5a[Lys68] = wt-C5a	Vermutete Wildtyp-Situation: Interaktion zwischen Lys68 im C5a und Glu199 im Rezeptor; Unterbrechung der Wechselwirkung im Glu199Lys-C5aR.
C5a[Lys68]-desArg74	<i>Dito</i> , aber verringerte Aktivität erwartet.
C5a[Glu68]	Unterbrechung der Interaktion mit Glu199 im wt-C5aR und Reetablierung der Wechselwirkung in der Glu199Lys-C5aR-Mutante.
C5a[Glu68]-desArg74	<i>Dito</i> , aber verringerte Aktivität erwartet.
C5a[Met68]	Neutrale Mutation: gleichermaßen unfähig zur Wechselwirkung sowohl mit Glu199-C5aR (wt) als auch mit Glu199Lys-C5aR.
C5a[Asp74]	Ursprünglich geplant für den Nachweis einer mutmaßlichen Wechselwirkung zwischen der Seitenkette von Arg74 und Asp282 im C5aR; aufgrund anderer Befunde wurde diese Hypothese jedoch zwischenzeitlich verworfen (s. Einleitung). Hier: Klärung, ob die Carboxylat- oder die Guanodino-Funktion des Arg74 für die beobachteten Unterschiede in der Bindung von wt-C5a und C5a[Lys68]-desArg74 verantwortlich ist.

3.3.2 Glucosaminidase-Freisetzungstest

Alle Mutanten wurden im Glucosaminidase-Freisetzungstest (GARA) auf Bt₂cAMP-differenzierten U937-Zellen auf ihre Aktivität getestet. Die Ergebnisse dieser Versuche sind in Tab. 3.3, S. 79 aufgeführt und in Abb. 3.15 dargestellt. Aufgrund der zur Auswertung verwendeten Software (GraphPad Prism 2.0) werden die Logarithmen der *ED*₅₀ / *IC*₅₀-Werte angegeben.

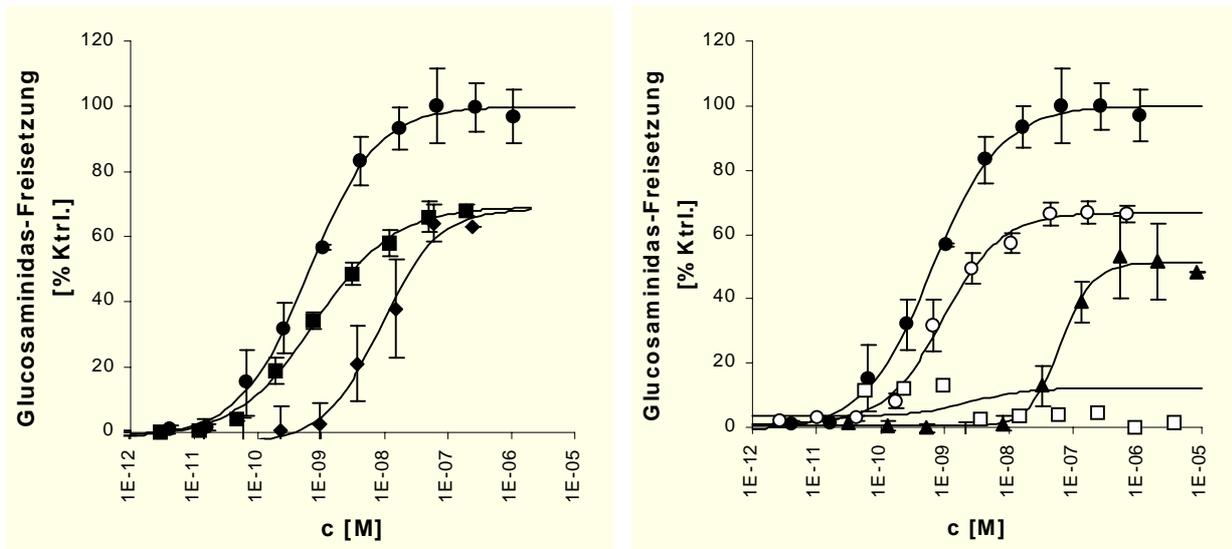


Abb. 3.15: Funktionelle Antwort von differenzierten U937-Zellen gegenüber verschiedenen C5a-Mutanten. Dargestellt ist die freigesetzte Enzymmenge relativ zur jeweils mitgeführten Wildtyp-Kontrolle. Getestet wurden C5a[Lys68] (Kreise), C5a[Glu68] (Rechtecke), C5a[Met68] (Rauten) und C5a[Asp74] (Dreiecke); leere Symbole stehen für die jeweiligen desArg74-Mutanten.

Überraschenderweise erwiesen sich C5a[Lys68]-desArg74 und C5a[Glu68] als fast genauso aktiv wie der Wildtyp C5a[Lys68]: $\log ED_{50} = -9,07 \pm 0,1$ ($n = 7$). Auch C5a[Met68] erwies sich mit einer $\log ED_{50}$ von $-8,23 \pm 0,21$ ($n = 3$) als nur um den Faktor 6 weniger aktiv als wt-C5a. C5a[Asp74] zeigte eine deutlich verringerte Aktivität ($\log ED_{50} = -7,25 \pm 0,04$; $n = 5$), während die desArg74-Form von C5a[Glu68] im betrachteten Konzentrationsbereich bis $10 \mu\text{M}$ keinerlei Aktivität aufzuweisen schien.

3.3.3 Histamin-Freisetzungstest

Als weitere funktionelle Antwort wurde in Kooperation mit P. N. Monk, University of Sheffield, UK, die Histamin-Freisetzung aus stabil mit wt-C5aR und Glu199Lys-C5aR transfizierten RBL-Zellen untersucht. Auch diese Ergebnisse aus dem oben genannten Labor sind in Tab. 3.3, S. 79 zusammengefaßt und in Abb. 3.16 dargestellt.

Alles in allem zeigte sich, daß die ED_{50} -Werte der Histamin-Freisetzung aus den wt-C5aR-transfizierten Zellen um rund eine Größenordnung höher lagen als die entsprechenden Werte des GARA, sich relativ zueinander jedoch ähnlich verhielten; auf den RBL-Zellen mit der Glu199Lys-Mutante des Rezeptors hingegen ergaben sich einige erwähnenswerte Befunde. Zunächst fiel auf, daß C5a[Glu68] auf dem Glu199Lys-C5aR erwartungsgemäß mit wt-Aktivität agierte, während wt-C5a – wenn auch an der Grenze der Meßgenauigkeit – etwas weniger aktiv schien. Dramatisch fiel der Unterschied bei den jeweiligen desArg74-Mutanten auf: Das natürliche C5a-Abbauprodukt C5a[Lys68]-desArg74 erwies sich als vollkommen inaktiv auf

dem mutierten Rezeptor, wohingegen mit der C5a[Glu68]-desArg74-Mutante die Aktivität zumindest zum Teil wiederhergestellt werden konnte ($\log ED_{50} = -4,74 \pm 0,06$; $n = 3$).

C5a[Met68] und C5a[Asp74] schienen nicht zwischen den beiden Rezeptorvarianten zu diskriminieren; in beiden Fällen lag die Aktivität auf dem Glu199Lys-C5aR in der Größenordnung des wt-C5aRs.

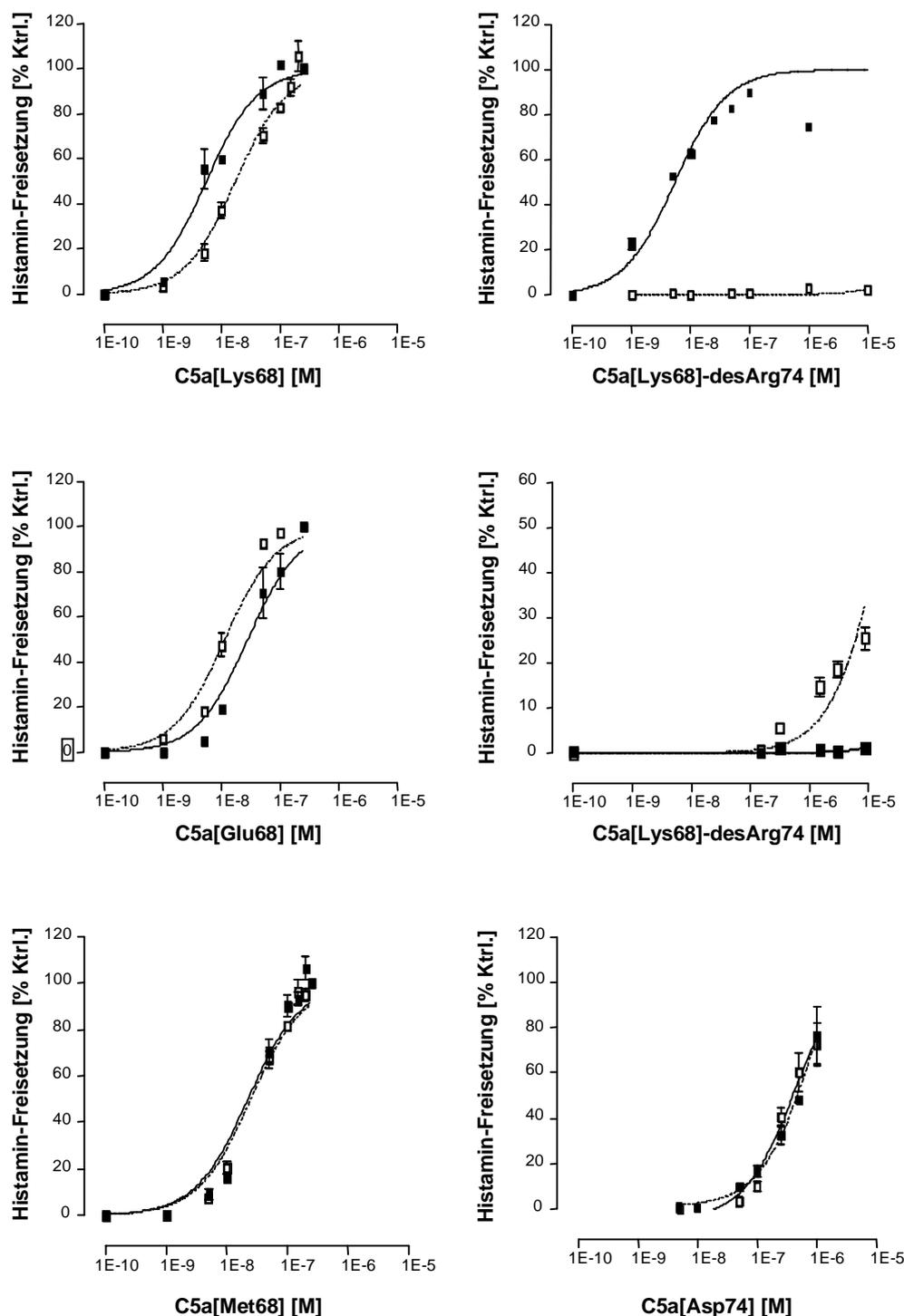


Abb. 3.16: Signaltransduktion durch verschiedene C5a-Mutanten auf Wildtyp-C5aR- (gefüllte Symbole) und Glu199Lys-C5aR- (leere Symbole) transfizierten RBL-Zellen. Dargestellt ist die freigesetzte Histamin-Menge relativ zur jeweils mitgeführten Wildtyp-Kontrolle.

3.3.4 Bindung

Auch die Untersuchung der Bindung der verschiedenen C5a-Mutanten – gemessen in kompetitiven Bindungsstudien auf mit wt-C5aR bzw. Glu199Lys-C5aR stabil transfizierten Zellen – führte zu überraschenden Ergebnissen. Die in England gewonnenen Daten sind in Tab. 3.3, S. 79 aufgeführt und in Abb. 3.17 dargestellt.

Zunächst fiel auf, daß die IC_{50} -Werte von C5a[Lys68]-desArg74 und C5a[Glu68] auf dem wt-C5aR um rund eine Größenordnung größer waren als die des wt-C5a – im Gegensatz zu den in den Funktionstests gemachten Beobachtungen. Lediglich die desArg74-Variante von

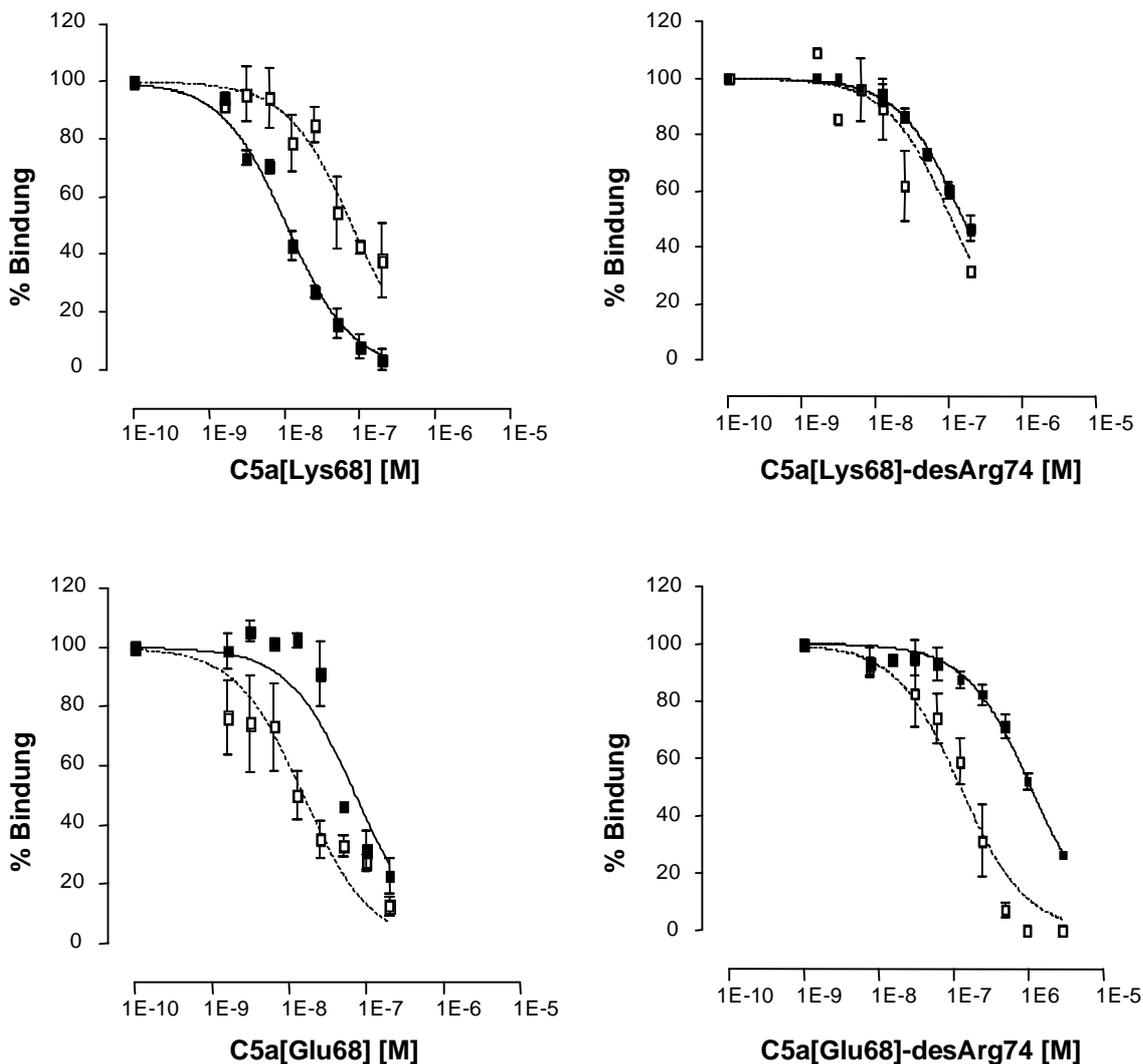


Abb. 3.17: Kompetitive Bindungsstudien mit Wildtyp-C5aR- (gefüllte Symbole) und Glu199Lys-C5aR- (leere Symbole) transfizierten RBL-Zellen. Dargestellt ist für jede C5a-Mutante die jeweils gebundene 125 I-C5a-Menge relativ zur Kontrolle ohne Kompetitor.

C5a[Glu68] zeigte in Übereinstimmung mit den Bindungsdaten einen dramatischen Verlust an Aktivität. Was den Glu199Lys-C5aR angeht, so kehrten sich die Affinitäten von wt-C5a und C5a[Glu68] erwartungsgemäß um; auch C5a[Glu68]-desArg74 band im Bereich des für diese Rezeptormutante "passenden" Liganden C5a[Glu68]. Allerdings zeigte C5a[Lys68]-desArg74 hier vergleichbare Affinität.

Tab. 3.1: Vergleichende Charakterisierung humaner C3aR (hsC3aR) und Meerschweinchen-C3aR (cpC3aR)

Rezeptor	K_D (C3a) [nM]	K_D (P117) [μ M]	IC_{50} (C4a) [μ M]	ED_{50} (C3a) [nM]	ED_{50} (H-1264) [nM]	ED_{50} (C4a) [nM]	ED_{50} (C5a) [nM]
hsC3aR	$1,0 \pm 0,9$ (12)	$2,5 \pm 1,9$ (3)	$3,3 \pm 3,2$ (3)	$0,36 \pm 0,07$ (2)	$3,1 \pm 0,3$ (2)	⁻¹	> 1000
cpC3aR	$1,6 \pm 0,7$ (3)	$0,19 \pm 0,10$ (3)	$2,9 \pm 1,7$ (4)	$0,18 \pm 0,02$ (2)	$0,15 \pm 0,01$ (2)	$8,7 \pm 0,5$ (2)	> 1000

Tab. 3.2: Charakterisierung der C3aR/C5aR-Chimären

Chimäre	Expression	K_D (C3a) [nM]	K_D (C5a) [nM]	ED_{50} (C3a) ² [nM]	ED_{50} (H-1264) ² [nM]	ED_{50} (C5a) ² [nM]	ED_{50} (H-8135) ² [μ M]
Ch#0 	++	$1,0 \pm 0,9$ (12)	–	$0,24 \pm 0,09$	$3,0 \pm 0,5$	> 1000	$2,1 \pm 1,9$
Ch#1 	–	–	–	–	–	–	–
Ch#2 	–	–	–	–	–	–	–
Ch#3 	–	–	–	–	–	–	–
Ch#4 	–	–	–	–	–	–	(+)
Ch#5 	–	–	–	–	–	–	–
Ch#6 	–	–	–	–	–	–	–
Ch#7 	++	–	–	–	–	> 1000	3,5
Ch#8 	++	$2,3 \pm 1,5$ (8)	33 ± 14 (3) ³	0,46	3,6	54	5,9
Ch#9 	–	–	–	–	–	–	(+)
Ch#A 	++	–	$2,6 \pm 0,7$ (4)	–	–	–	(+)
Ch#B 	+	–	$0,23 \pm 0,15$ (3)	–	–	–	(+)
Ch#C 	+	–	–	–	–	–	(+)
Ch#D 	++	–	–	–	–	> 100	> 10
Ch#E 	++	–	$0,7 \pm 0,3$ (3)	–	–	–	(+)
Ch#F 	+++	–	$5,2 \pm 2,5$ (6)	–	–	$0,10 \pm 0,05$	$2,8 \pm 1,5$
Δ 09 	++	$5,3 \pm 4,7$ (3)	n.b. ⁴	0,34	2,9	> 1000	20
Δ 16 	++	$1,1 \pm 0,8$ (3)	n.b. ⁴	0,50	4,6	> 1000	25
Δ 22 	–	–	n.b. ⁴	> 100	(+)	> 1000	(+)

Tab. 3.3: Charakterisierung von Glu199 im C5aR mit C-terminalen C5a-Mutanten

C5a-Mutante	wt-C5aR			Glu199Lys-C5aR	
	logED ₅₀ (GARA) ⁵ [nM]	logED ₅₀ (HRA) ^{6,7} [nM]	logIC ₅₀ ⁷ [nM]	logED ₅₀ (HRA) ^{6,7} [nM]	logIC ₅₀ ⁷ [nM]
C5a[Lys68] = wt-C5a	-9,07 ± 0,10 (7)	-8,26 ± 0,06	-7,97 ± 0,03	-7,76 ± 0,05	-7,10 ± 0,07
C5a[Lys68]-desArg74	-9,00 ± 0,04 (3)	-8,26 ± 0,08	-6,80 ± 0,02	- ⁸	-6,96 ± 0,08
C5a[Glu68]	8,55 ± 0,14 (6)	-7,56 ± 0,07	-7,14 ± 0,08	-7,95 ± 0,05	-7,82 ± 0,08
C5a[Glu68]-desArg74	- ⁸	- ⁸	-5,97 ± 0,04	-4,74 ± 0,06	-6,91 ± 0,07
C5a[Met68]	-8,23 ± 0,21 (3)	-7,65 ± 0,06	n.b. ⁴	-7,60 ± 0,05	n.b. ⁴
C5a[Asp74]	-7,25 ± 0,04 (5)	-6,05 ± 0,17	n.b. ⁴	-5,59 ± 0,01	n.b. ⁴

¹⁾ keine Antwort bis 1 µM

²⁾ alle Werte mindestens 8fach bestimmt; Standardbw. <12%, sofern nicht anders angegeben. (+) bezeichnet eine schwache Reaktion bei > 10 µM.

³⁾ ermittelt durch Kreuzverdrängung von ¹²⁵I-C3a mit C5a nicht bestimmt

⁴⁾ nicht bestimmt

⁵⁾ Glucosaminidase-Freisetzungstest

⁶⁾ Histamin-Freisetzungstest

⁷⁾ alle Werte mindestens 3fach bestimmt

⁸⁾ keine Antwort bis 10 µM

4. Diskussion

4.1 Klonierung von OM

Im Rahmen dieser Arbeit sollte eine cDNA für den humanen C3a-Rezeptor (C3aR) aus einer geeigneten cDNA-Bibliothek isoliert werden. Dazu wurde eine Bibliothek aus Bt₂cAMP-differenzierten U937-Zellen, die nachweislich den C3aR exprimieren [33], im eukaryontischen Expressionsvektor pcDNA1/Amp in Pools zu ca. 800 Klonen in die humane Zelllinie HEK293 transfiziert und auf Erhöhung der ¹²⁵I-C3a-Bindung getestet. Positive Pools wurden weiter aufgeteilt, erneut transfiziert, getestet usw., bis einzelne cDNA-Klone isoliert waren.

Eine der isolierten cDNAs (Klon 15/7/3/29) erwies sich nach Partialsequenzierung als cDNA für das Zytokin Onkostatine M (OM) [131,133]. Die per Restriktionsverdauung ermittelte Länge des Inserts von ca. 1,8 kbp stimmte gut mit der Länge des OM-Transkripts überein, so daß hier wohl ein vollständiger Klon isoliert worden war.

Die durch OM induzierte Fähigkeit zur Bindung von ¹²⁵I-C3a erwies sich als spezifisch, wie Verdrängungsversuche mit hohen Konzentrationen an nicht-markiertem C3a zeigten; auch konnte keine erhöhte ¹²⁵I-C5a-Bindung nachgewiesen werden. Es stellte sich nun die Frage, wie die Transfektion einer OM-cDNA in HEK293-Zellen eine erhöhte spezifische ¹²⁵I-C3a-Bindung vermitteln konnte.

OM wurde erstmals als ein Faktor in Zellkulturüberständen von PMA-differenzierten U937-Zellen beschrieben, der die Proliferation der Melanom-Zelllinie A375 zu inhibieren vermag [133]. Später konnte gezeigt werden, daß auch aktivierte T-Lymphozyten OM ins Medium abgeben [134]. Bald darauf wurden auf Leukozyten, vor allem aber auch auf nicht-hämopoietischen Zellen und Zelllinien, zwei Klassen recht hochaffiner Rezeptoren (Dissoziationskonstanten im niedrig picomolaren bzw. nanomolaren Bereich) für ¹²⁵I-markiertes OM nachgewiesen [135]; bei vielen dieser Zelllinien konnte auch die proliferationshemmende Wirkung von OM bestätigt werden. Die Klonierung des humanen OM-Gens [131] zeigte, daß OM zunächst als 252 Aminosäuren lange Vorstufe synthetisiert wird, aus der durch posttranslationale Abspaltung einer N-terminalen Signalsequenz und N-Glykosylierung das fertige Zytokin von 228 Aminosäuren (Molekularmasse ca. 28 kDa) entsteht. Wie auch LIF, CNTF und G-CSF gehört OM zur Interleukin-6-Familie, deren Mitglieder untereinander Sequenzhomologien von 17 – 35% auf Aminosäureebene aufweisen [136]. Ähnlich dem LIF, CNTF und IL-6, bedient sich OM des gp130-Moleküls zur Signaltransduktion, das zusammen mit dem niederaffinen LIF-Rezeptor oder einem spezifischen niederaffinen OM-Rezeptor einen

hochaffinen OM-Rezeptorkomplex ausbilden kann [137,137,138]. Die gemeinsame Nutzung eines Transducer-Moleküls stellt auch eine plausible Erklärung für das in weiten Teilen überlappende Wirkungsspektrum der Mitglieder der IL-6-Familie dar. Dieses greift mit der Differenzierung myeloischer und neuronaler Zellen und Zelllinien sowie der Induktion von Akute-Phase-Proteinen in die Regulation von Prozessen der Hämoopoese, der Embryogenese und der Immunantwort ein [136,139,140].

Zurück zur Frage nach dem Mechanismus, vermittelt dessen OM-transfizierte HEK293-Zellen zu einer erhöhten ¹²⁵I-C3a-Bindung befähigt werden. Auch unter der Annahme, daß OM tatsächlich exprimiert und ins Medium abgegeben wird, erscheint es unplausibel, daß eine direkte Wechselwirkung dieses löslichen Faktors mit dem ebenfalls löslichen ¹²⁵I-C3a zu einer erhöhten Adsorption des Radioliganden an die Zelloberfläche führt. Da HEK293 eine homologe, da humane Zelllinie darstellt, besteht jedoch die Möglichkeit, daß die Induktion des endogenen C3aR-Gens der HEK293-Zellen durch die Transfektion mit OM angeregt wird; OM würde hier also als eine Art autokrines Differenzierungs-Signal wirken. OM-induzierte C3aR-Induktion stünde durchaus im Einklang damit, daß OM als Differenzierungsfaktor für verschiedene myeloische Zelllinien (U937, M1) wirkt [139] – schließlich exprimieren ja auch myelomonozytäre Linien wie U937 und HL-60 bei Differenzierung den C3aR. Auch andere Mitglieder der IL-6-Familie können die Differenzierung von z. B. neuronalen Zelllinien [141,142] auslösen. Zudem wurde für IL-6 bereits eine entscheidende Rolle in einer autokrinen proliferativen Rückkopplungsschleife bei der myeloischen Zelllinie U266 beschrieben [143].

Zur Klärung der Frage, ob OM-transfizierte HEK293-Zellen tatsächlich einen löslichen Faktor abgeben, der die Expression des endogenen C3aR-Gens induziert, wurden nicht-transfizierte Zellen mit sterilfiltriertem Zellkulturüberstand OM-transfizierter Zellen inkubiert. Tatsächlich konnte dann auch für diese Zellen eine erhöhte Fähigkeit zur Bindung von ¹²⁵I-C3a nachgewiesen werden – ***Onkostatin M könnte also als neuer Induktor der C3aR-Expression angesprochen werden!*** Anhand des beschriebenen Experiments kann natürlich nicht ausgeschlossen werden, daß OM nicht direkt, sondern über z. B. die Induktion weiterer Wachstumsfaktoren – auch IL-6 [144], G-CSF und GM-CSF [145] können durch OM induziert werden – Einfluß auf die C3aR-Expression nimmt. Diese Frage wurde jedoch aus Zeitgründen im Rahmen dieser Arbeit nicht weiter verfolgt, ***doch zeigt dieses Ergebnis, daß sich das verwendete homologe Expressionsklonierungsverfahren im Prinzip auch zur Klonierung von Induktoren des eigentlichen Zielgens eignet.*** Umgekehrt wird hier allerdings auch deutlich, weshalb normalerweise für Expressionsklonierungen keine homologen Zelllinien, sondern solche anderer Species verwendet werden – es besteht sonst immer die Möglichkeit, Zellen zu

selektionieren, die statt des gesuchten cDNA-Klons das endogene Gen exprimieren. Im Falle des C3aRs standen jedoch keine heterologen Zelllinien zur Verfügung, da die getesteten Linien COS-M6, COS-M7 und WOP eine hohe, unspezifische ^{125}I -C3a-Hintergrundbindung aufwiesen [Dissertation T. Kretzschmar, 1992].

Die kürzlich in der Arbeitsgruppe erfolgreich durchgeführte Klonierung der Promotorregion des C3aRs [146] sollte weitere Hinweise auf den Mechanismus der OM-induzierten C3aR-Expression geben können. Die Suche nach responsiven Elementen könnte sich z. B. nach dem IL-6-responsiven Element des *acute-phase response factors* APRF [147] oder dem OM-responsiven Element des $\alpha 2(\text{I})$ -Kollagen-Promotors [148] richten.

4.2 Charakterisierung des C3aRs

Außer einer OM-cDNA, einem potentiellen Induktor der C3aR-Expression, konnte mit dem beschriebenen Expressionsklonierungsverfahren auch eine cDNA für den humanen C3aR isoliert werden. Inzwischen wurde in der Arbeitsgruppe bestätigt, daß das Gen des humanen C3aRs im Genom in nur einer Kopie vorliegt, so daß es gerechtfertigt scheint, von "dem" C3aR und nicht nur von "einem" C3aR zu sprechen [146].

4.2.1 Sequenz

Der isolierte C3aR-cDNA-Klon, 43/9/37/9 oder pTC10, erwies sich mit einer geschätzten Länge von ca. 4,3 kbp als auffällig lang – die Länge des Transkripts des verwandten C5aRs bewegt sich in der Größenordnung von gut 2 kb [83,84].

Mittels kommerzieller Sequenzierung wurde die genaue Länge des cDNA-Inserts zu 4.276 Bp bestimmt (Anhang 6.1). An Pos. 68 fand sich ein ATG-Startcodon, das den Beginn eines 1.446 Bp langen offenen Leserasters markierte (Anhang 6.2). Um das Startcodon herum befand sich – im Gegensatz zum C5aR – die für den Translationsstart eukaryontischer mRNAs typische Sequenz AGXXATGG [149], was die Echtheit des gefundenen Leserasters bestärkte. Das darin kodierte Protein wies eine Länge von 482 Aminosäuren auf und hatte eine berechnete Molekularmasse von 53.864 Da. Eine Hydrophobizitätsanalyse nach [132] ergab 7 hydrophobe Bereiche, die als transmembranöse α -Helices gedeutet werden können. Vergleich mit der Sequenz-Datenbank der Rhodopsin-Superfamilie der G-Protein-gekoppelten Rezeptoren [150] zeigte, daß etliche der typischen hochkonservierten Sequenzmotive dieser Familie ebenfalls in pTC10 enthalten waren (GNxLV am Ende der TM1; AD in TM2; C am Ende der 1. EL; CxxW in der TM4; P in der Mitte und Y am Ende von TM5; WxP in TM6; NPxxY am Ende von TM7). Mit Cys95 am Anfang von TM3 und Cys172 am Anfang der 2. EL besitzt auch der C3aR die für

diese Familie typischen Cystein-Reste, die mutmaßlich eine Disulfidbrücke bilden [151,152]. ***Aufgrund seiner Sequenz muß der humane C3aR also als G-Protein-gekoppelter Rezeptor angesehen werden.***

Fast gleichzeitig mit uns wurde von R. S. Ames, SmithKline Beecham Pharmaceuticals, King of Prussia, USA, der ca. 2 kBp lange C3aR-Klon HNFAG09 veröffentlicht [110]. Weiterhin erwies sich der schon vorher veröffentlichte kodierende Bereich des "Orphan"-Rezeptor-Klons AZ3B [153] bis auf eine Punktmutation (C608G \diamond Pro203Arg) als identisch mit dem C3aR. Dieser ebenfalls ca. 2 kBp lange Klon wurde bei Homologiesuche nach weiteren fMLPR-Subtypen isoliert.

Bei weitergehenden Sequenzanalysen wurden in der C3aR-Sequenz 2 potentielle N-Glykosylierungsstellen (N \times S/T) an den Positionen 9 im N-Terminus und 194 am Anfang der 2. EL gefunden; das N-terminale Glykosylierungs-Signal findet sich bei vielen G-Protein-gekoppelte Rezeptoren der Rhodopsin-Superfamilie. In Kreuzvernetzungs-Experimenten auf Meerschweinchen-Thrombozyten und humanen polymorphkernigen neutrophilen Granulozyten bzw. bei Immunpräzipitation aus Astrozyten und Monozyten mit anti-C3aR-Antikörpern wurde für den C3aR eine apparente Molekularmasse von 84 – 114 [69] bzw. 65 kDa [60] ermittelt; dies deutet darauf hin, daß von zumindest einer der N-Glykosylierungsstellen auch Gebrauch gemacht wird (berechnete Molekularmasse ca. 54 kDa!).

Eine einzigartige strukturelle Besonderheit des C3aRs stellt allerdings die 2. EL dar, die mit ca. 175 Aminosäuren weit größer ist als alle bisher bekannten 2. ELs G-Protein-gekoppelter Rezeptoren – die des C5aRs hat z. B. nur eine Länge von ca. 20 Aminosäureresten, die des fMLPRs ca. 40. Zudem fanden sich in der SwissProt-Datenbank bis zur Abgabe dieser Arbeit keinerlei Sequenzen, die der 2. EL des C3aRs auch nur annähernd homolog wären, so daß über ihre Funktion zunächst nur Vermutungen angestellt werden können (s. u.). Auffallend war weiterhin der hohe Anteil an Prolin-Resten, der sich mit knapp 10% weit über dem Durchschnitt bewegt.

Erwartungsgemäß stellte sich der C5aR als nächster bisher bekannter Verwandter des C3aRs heraus – mit einer Sequenzhomologie von 32% auf Aminosäureebene, die sich unter Ignorierung der ungewöhnlichen 2. EL des C3aRs noch auf 36% steigert (Anhang 6.4). Die nächsten gemeinsamen Verwandten von C3aR und C5aR sind der fMLPR sowie die beiden fMLPR-Homologen fPRH1 (Lipoxin-A4-Rezeptor) und fPRH2 mit ca. 28% Homologie. Auch chemotaktische Rezeptoren der CCR- und CXCR-Familie gehören mit rund 20% iger Homologie in die Verwandtschaft des C3aRs, bilden jedoch eine unabhängige Unterfamilie, die sich parallel zur Gruppe der Anaphylatoxin- und fMLP-Rezeptoren entwickelt zu haben scheint. (In Anhang

6.3 sind die Interleukin-8-Rezeptoren – heute CXCR2A und CXCR2B – stellvertretend mit in die Sequenzgegenüberstellung aufgenommen worden.)

Die 36%ige Homologie zum C5aR mag zunächst gering erscheinen, doch erwiesen sich Anaphylatoxin-Rezeptoren auch im Vergleich verschiedener Species als erstaunlich variabel. Zum Zeitpunkt des Abschlusses dieser Arbeit lagen bereits die Sequenzen des C3aRs und C5aRs des Menschen [83,84,110,154], des Meerschweinchens [66,155,156], der Maus [157,158] und der Ratte [159,160] kloniert vor; zusätzlich war der C5aR des Schimpansen, des Orang-Utan, des Gorillas, des Rhesusäffchens (alle [161]) und des Hundes [162] bekannt. Dabei zeigten sich unter den C3a- bzw. C5a-Rezeptoren jeweils Verwandtschaftsgrade von nur ca. 60% (Ausnahme: Ratte – Maus ca. 80%; Primaten untereinander >95%), während sich andere homologe G-Protein-gekoppelte Rezeptoren verschiedener *Mammalia* gewöhnlich nicht um mehr als 10 – 15% unterscheiden. Anaphylatoxin-Rezeptoren erwiesen sich jedoch als erstaunlich promiskuitiv, was die phylogenetische Herkunft des Liganden angeht – humanes C3a z. B. bindet auch an den C3aR des Meerschweinchens, der Maus und der Ratte. Damit scheint die Annahme gerechtfertigt, daß Aminosäurereste, die sich beim Sequenzvergleich als konserviert herausstellen, bei Anaphylatoxinrezeptoren mit besonders hoher Wahrscheinlichkeit essentielle Funktionen bei der Ligandenbindung, Signaltransduktion und/oder der Aufrechterhaltung der Rezeptorstruktur ausüben. Tatsächlich hat ein entsprechender Ansatz beim C5aR bereits wertvolle Erkenntnisse über seinen Bindungs- und Signaltransduktionsmechanismus erbracht [117,163]. Auch der C3aR wird künftig Gegenstand solcher Analysen sein.

Die relativ hohe Homologie zwischen C3aR und C5aR war angesichts der ebenfalls hohen Homologie der entsprechenden Liganden zu erwarten. Ein genauer Vergleich der beiden Sequenzen zeigt, daß die größte Homologie in den transmembranösen Bereichen, namentlich TM2, TM3 und TM5, zu finden ist. Generell sind fast alle polaren oder geladenen Aminosäurereste der TM-Regionen des C5aRs auch im C3aR zu finden. Eine Ausnahme stellt Asp37 am Anfang der TM1 des C5aRs dar, das keinen entsprechenden Rest im C3aR aufweist; allerdings konnte für diesen Aminosäurerest auch eine Beteiligung an der Ligandenbindung ausgeschlossen werden [117]. Arg206 im C5aR jedoch, für das eine Rolle für das Erreichen des hochaffinen Zustandes des C5aRs bei G-Protein-Kopplung und bei der Signaltransduktion diskutiert wird [104,117], hat in Arg340 ein Pendant im C3aR; hier müssen sich weitere Studien anschließen, um die Rolle dieses Restes im C3a/C3aR-System zu klären. Generell fällt auf, daß die TM-Domänen des C3aRs deutlich mehr polare Aminosäuren – vornehmlich Ser, Thr und Cys, also solche mit Hydroxyl- oder Sulfhydryl-Gruppen – enthalten als die des C5aRs. Mit

Lys96 am Anfang von TM3 und Arg376 am Anfang von TM6 weist der C3aR schließlich zwei geladene Reste auf, die keine Entsprechung im C5aR haben.

Eine sehr hohe Homologie zwischen C3aR und C5aR kann auch in der 2. IL beobachtet werden. Allerdings ist auch beim C5aR bisher nichts bekannt über die Rolle, die die 2. IL für die Funktion des Rezeptors spielt; über eine Beteiligung an der G-Protein-Kopplung kann nur spekuliert werden. Für die 3. IL des C5aRs hingegen wurde die Bedeutung der Reste Thr235 und Thr238 für die Signaltransduktion nachgewiesen [163]; letzterer ist im C3aR zumindest konservativ ausgetauscht (Ser372), und ein weiteres Ser findet sich 2 Positionen weiter vorne (Ser370). Weiterhin konnte für den α_2 -adrenergen und den m2-muskarinergen Acetylcholin-Rezeptor gezeigt werden, daß Ser/Thr-Reste in der 3. IL Ziel der Phosphorylierung durch G-Protein-gekoppelte-Rezeptor-Kinasen (GPCRCs) sein können [164,165] – eine Möglichkeit, die auch beim C3aR mit 3 Ser/Thr-Resten in der 3. IL besteht. Schließlich wurde auch der C-Terminus des C5aRs als Ziel von Ser/Thr-Phosphorylierung – teils durch Proteinkinase C (PKC), teils durch andere Mechanismen – identifiziert, als Komponente des Rezeptor-Desensitisierungsmechanismus durch Internalisierung [166-168]. Auch der C3aR-C-Terminus weist zahlreiche Ser- und Thr-Reste auf, die als mögliche Angriffspunkte für Kinasen fungieren könnten.

Die N-Termini schließlich von C3aR und C5aR weisen nur geringe Homologie auf. Ist der N-Terminus des C5aRs mit ca. 35 Aminosäuren schon recht kurz, so wird er in dieser Hinsicht durch den des C3aRs mit ca. 20 Resten noch übertroffen. Beim C5aR fällt im N-Terminus eine Häufung von 6 Asp-Resten auf, die höchstwahrscheinlich an der Bindung des basischen Liganden beteiligt sind. Die Tatsache, daß sich im C3aR-N-Terminus lediglich 3 saure Aminosäuren (Glu7, Asp12 und Glu20) befinden, eröffnet die Möglichkeit, daß sich C3a u. U. eines anderen *modus operandi* zur Bindung an seinen Rezeptor bedient.

4.2.2 Gewebeexpression

Um mehr über die Gewebeexpression des klonierten C3aRs zu erfahren, wurden in unserer und anderen Arbeitsgruppen Northern-Blot-Analysen von verschiedenen Zelllinien und Geweben durchgeführt. Das Insert von pTC10 wurde dazu (über *Bam*HI/*Xho*I) in pBlueskript umklontiert und zur Herstellung von Digoxigenin-markierten RNA-Sonden verwendet [154].

Es konnte gezeigt werden, daß sowohl U937- als auch HL-60-Zellen nach Differenzierung mit Bt₂cAMP eine stark mit der C3aR-Sonde hybridisierende RNA-Bande bei ca. 2,3 kB aufweisen; undifferenzierte Zellen hingegen zeigten nur ein schwaches Signal auf dieser Höhe.

Dies steht im Einklang mit der Beobachtung, daß U937 und HL-60 erst nach der Differenzierung detektierbare Mengen an C3aR exprimieren [33].

Ein weiteres, wesentlich schwächeres Signal wurde bei knapp 4 kB registriert. Zunächst wurde angenommen, daß es sich hierbei möglicherweise um ein zweites C3aR-Transkript handeln könnte – etwa einen anderen Rezeptor-Subtyp oder eine Spleißvariante. Aufgrund der immanenten Ungenauigkeit der Molekulargewichtsbestimmung in Northern-Blots, die stark mit Nukleinsäure beladen wurden, wäre es durchaus möglich gewesen, daß dieses Fragment jener 4,3 kbp-cDNA entsprach, welche in pTC10 kloniert worden war. Ein Vergleich mit den von anderen Arbeitsgruppen veröffentlichten C3aR-Klonen HNFAG09 [110] und AZ3B [153] schien das Vorliegen verschiedener Spleißvarianten zunächst zu bestätigen: Die 3'-UTR von pTC10 unterschied sich ab Pos. 413 nach dem Stoppcodon von den sich ab hier identisch fortsetzenden Klonen HNFAG09 und AZ3B. Diese Hypothese mußte jedoch verworfen werden, als in der Arbeitsgruppe die Klonierung des C3aR-Gens samt seiner genomischen Umgebung aus einer humanen genomischen Lambda-Phagen-Bibliothek gelang [146]. Hier zeigte sich, daß sich die 3'-UTR des C3aRs im Genom ab Pos. 413 nach dem Stoppcodon wie in HNFAG09 und AZ3B fortsetzt – und der Großteil der 3'-UTR in pTC10 wohl als Klonierungsartefakt angesehen werden muß, das durch Rekombinationsereignisse bei der Erstellung der Bibliothek oder den Isolierungsschritten entstanden ist.

Die Expression des 2,3 kB-Transkripts konnte durch Northern-Blot-Analysen in zahlreichen Geweben nachgewiesen werden. Neben lymphatischen Organen wie Milz und Thymus scheinen auch Nebenniere, Magen, Dick- und Dünndarm, Lunge, Plazenta, Ovarien sowie verschiedene Hirnareale den C3aR zumindest auf mRNA-Ebene zu exprimieren. Inzwischen stehen auch verschiedene polyklonale Antiseren und monoklonale Antikörper gegen den C3aR zur Verfügung [110,128,169]. Mit Hilfe eines solchen Antiserums gelang bei Leukozyten des peripheren Blutes der Nachweis, daß der C3aR zwar auf myeloischen Zellen, nicht aber auf Lymphozyten vorkommt [170]. In jüngsten Untersuchungen konnte auch eine C3aR-Expression auf Astrozyten demonstriert werden [60].

4.2.3 Bindung und Funktion

Der mutmaßliche C3aR-cDNA-Klon pTC10 wurde aufgrund seiner Eigenschaft isoliert, erhöhte ¹²⁵I-C3a-Bindung an HEK293-Zellen vermitteln zu können. Durch Bindungs- und Funktionsanalysen wurde bestätigt, daß es sich bei dem durch pTC10 kodierten Protein tatsächlich um einen C3aR handelt. Affinität zu und Spezifität gegenüber C3a wurden in kompetitiven Bindungsstudien bestimmt. Dazu wurden transient mit pTC10 transfizierte

HEK293-Zellen mit einer geringen konstanten Menge ^{125}I -markiertem C3a als Tracer und steigenden Konzentrationen eines Kompetitors inkubiert und die Menge an zellgebundenem Radioliganden nach Abfiltrieren der Zellen bestimmt.

Es konnte gezeigt werden, daß C3a den Tracer im erwarteten (niedrig nanomolaren) Konzentrationsbereich verdrängt. Frühere Studien an Meerschweinchen-Thrombozyten, neutrophilen Granulozyten und Bt_2 -differenzierten U937-Zellen ergaben Dissoziationskonstanten von 0,8 – 4,5 nM [33,68,69]; die Auswertung der mit pTC10-transfizierten HEK293-Zellen gewonnenen Bindungsdaten mit dem Software-Paket RADLIG 4.0 [129] ergab in guter Übereinstimmung mit der Literatur eine K_D von $4,5 \pm 1,3$ nM.

Bei dem verwendeten C3a handelte es sich um proteinchemisch aus aktiviertem Serum aufgereinigtes Material. Hier konnte natürlich die Verunreinigung mit anderen Proteinen, namentlich C5a, die ebenfalls für die beobachteten Effekte verantwortlich sein könnten, nicht völlig ausgeschlossen werden. Daher wurden synthetische Peptide als Spezifitätskontrolle eingesetzt. Das Peptid P117 (N-Leu-Arg-Arg-Gln-Ala-Trp-Arg-Ala-Ser-ALa-Leu-Gly-Ala-Arg-C) bildet den C-Terminus des C3a nach und vermag auf Meerschweinchen-Thrombozyten ATP-Freisetzung auszulösen, die C3a-spezifisch ist – wie die ausbleibende Antwort bei Thrombozyten des C3aR-negativen Meerschweinchen-Stammes C2BB/R⁻ zeigte [154]. P251 (N-His-Tyr-Asp-Asp-Lys-Asp-Thr-Leu-Asp-Leu-Asn) hingegen ist nicht C3a-analog. Tatsächlich konnte ^{125}I -C3a im mikromolaren Bereich durch P117 aus der Bindung verdrängt werden, nicht aber durch P251. Mit leerem Vektor transfizierte HEK293-Zellen dienten als Negativkontrolle und wiesen keine ^{125}I -C3a-Bindung auf. Damit war gezeigt, daß das durch pTC10 kodierte Protein als C3aR angesprochen werden kann.

Zur funktionellen Charakterisierung wurden transient mit pTC10 transfizierte CHO-Zellen mit ^3H -myo-Inositol inkubiert und daraufhin auf intrazelluläre Freisetzung von ^3H -IP₃ nach Stimulation untersucht. In diesen von U. Raffetseder durchgeführten Versuchen zeigte sich, daß für den Nachweis einer funktionellen Antwort die Kotransfektion der Zellen mit der promiskuitiven "inhibitorischen" G-Protein-Untereinheit G α -16 notwendig war; allein mit pTC10 transfizierte CHO-Zellen erwiesen sich als unfähig zur Signaltransduktion. ***Dieser Befund bestätigte auch experimentell die aufgrund seiner Sequenz bereits getroffene Einordnung des C3aRs in die Familie der G-Protein-gekoppelten Rezeptoren.***

Außer C3a vermochte auch das C3a-analoge Peptid P117 eine dosisabhängige ^3H -IP₃-Freisetzung zu bewirken; die Freisetzung erfolgte dabei im erwarteten Konzentrationsbereich von einigen nM bzw. μM . Die Tatsache, daß zwar P117, nicht aber das nicht-analoge Peptid P251 eine Antwort hervorzurufen vermochte, zeigt auch hier die Spezifität des Effekts für C3a.

4.2.4 Vergleichende Charakterisierung hsC3aR/cpC3aR

Das Komplement-Fragment C4a, das bezüglich Sequenz und Raumstruktur hohe Homologie zu C3a und C5a aufweist, wird gelegentlich als das "dritte Anaphylatoxin" bezeichnet [61]. Diese Klassifikation stützt sich auf die Beobachtung, daß C4a im Meerschweinchen glatte Muskulatur zur Kontraktion bringt [61], Granula aus Thrombozyten freisetzt [64] und in Makrophagen die Produktion hochreaktiver Sauerstoff-Species induziert [65], wobei diese Effekte generell bei Konzentrationen auftraten, die 2 bis 3 Größenordnungen größer waren als bei C3a. Für eine anaphylatoxische C4a-Wirkung im Menschen hingegen fehlten überzeugende Daten. Zwar wurden Hautrötungen und -schwellungen nach Injektion von C4a oder C4a-analogen Peptiden beschrieben [61,171], doch in diesen Versuchsreihen fehlte eine eindeutige Negativkontrolle. Außerdem wurde von einer Chemotaxis-inhibierenden Funktion des C4a auf Makrophagen berichtet – in einem ungewöhnlich niedrigen Konzentrationsbereich von 10^{-16} M [172]. Alles in allem war also noch offen, ob C4a auch im Menschen als Anaphylatoxin angesprochen werden darf.

Im Meerschweinchen-System gab es Hinweise, die darauf hindeuteten, daß sich C4a zur Signaltransduktion des C3aRs bedient. C3a (sowie C3a-analoge Peptide) und C4a vermochten nämlich das jeweilige Testsystem gegenseitig in einen refraktären Zustand zu versetzen: Eine substimulatorische C3a-Gabe vermochte nicht nur eine folgende C3a-, sondern auch eine C4a-Antwort zu unterdrücken (und umgekehrt). C5a hingegen war von dieser Kreuzdesensibilisierung nicht betroffen [61]. Und schließlich erschien nach der Klonierung des humanen C3aRs (hsC3aR) die Bindung eines weiteren Liganden neben C3a – eben C4a – eine durchaus denkbare Aufgabe der ungewöhnlichen 2. EL dieses Rezeptors.

Allerdings wurden auch gegenteilige Beobachtungen gemacht, die auf einen eigenständigen C4aR hinzuweisen schienen: Meerschweinchen-Makrophagen antworteten nach Desensibilisierung gegenüber C4a immer noch mit einer C3a-induzierten Ca^{2+} -Freisetzung [65]. Weiterhin wurde gezeigt, daß der humane C3aR und der murine C3aR (mmC3aR) in stabil transfizierten RBL-Zellen zwar auf C3a, nicht aber auf C4a reagieren [173]; auch dies schien zunächst für die Existenz eines eigenständigen C4a-Rezeptors zu sprechen.

Die in der Arbeitsgruppe kürzlich erfolgreich durchgeführte Klonierung des Meerschweinchen-C3aRs (cpC3aR) [66] eröffnete die Möglichkeit, die Frage nach der anaphylatoxischen Wirkung des C4a im Menschen und seinem Signalweg im Meerschweinchen durch vergleichende Experimente mit dem hsC3aR anzugehen.

Ein Manko aller bisher beschriebenen Studien war die Tatsache, daß das jeweils verwendete C4a proteinchemisch aus aktiviertem Serum oder *in vitro*-gespaltenem C4a aufgereinigt worden

war. Somit konnte eine Kontamination mit C3a oder C5a nicht völlig ausgeschlossen werden, und bei den hohen (mikromolaren!) Konzentrationen, in denen C4a erst seine Wirkungen zu entfalten beginnt, könnten schon geringste Spuren der anderen Anaphylatoxine für die beobachteten Effekte verantwortlich sein. Daher wurde für die in der Arbeitsgruppe durchgeführten Versuche rekombinant produziertes C4a verwendet, um Kontamination mit C3a oder C5a auszuschließen. Im ATP-Freisetzungstest am Meerschweinchen-Thrombozyten konnte gezeigt werden, daß sich das rekombinante C4a funktionell wie sein proteinchemisch aufgereinigtes Pendant verhielt. Es wurden sowohl wt-C4a als auch C4a mit His₆-Tag [Diplomarbeit A. Hölzer, 1996] verwendet, die sich jedoch bezüglich Bindung und Signaltransduktion praktisch gleich verhielten.

Für die Expression des hsC3aRs wurde das Plasmid pTCC0 (s. u.) verwendet, das den hsC3aR mit FLAG-Epitop und 5'-UTR des C5aRs im eukaryontischen Expressionsvektor pcDNA3 enthielt. Der cpC3aR wurde ohne 5'-UTR und mit 48 Bp genomischer 3'-Sequenz aus pcDNA3 exprimiert (pSL94). Nach Transfektion in HEK293-Zellen wurden kompetitive Bindungsstudien mit ¹²⁵I-C3a durchgeführt; als Spezifitätskontrolle wurden wiederum das C3a-analoge synthetische Peptid P117 und das nicht-verwandte P251 mitgeführt. Es zeigte sich, daß C4a den Tracer sowohl vom cpC3aR als auch vom hsC3aR im gleichen Konzentrationsbereich von $\geq 10 \mu\text{M}$ verdrängen konnte. Funktionsstudien an mit G α -16 kotransfizierten HEK293-Zellen (durchgeführt in Kooperation mit R. S. Ames, SmithKline Beecham Pharmaceuticals, King of Prussia, USA) zeigten allerdings, daß zwar der cpC3aR auf C4a-Stimulation mit einer intrazellulären Ca²⁺-Freisetzung antwortete ($ED_{50} = 8,7 \pm 0,52 \text{ nM}$), der hsC3aR aber auch bei Konzentrationen von bis zu 1 μM C4a keine Signaltransduktion auslöste (s. auch Tab. 3.1, S. 78). (Aktivierung des hsC3aRs bei noch höheren C4a-Konzentrationen wäre wohl kaum noch physiologisch relevant, liegt doch die maximal theoretisch mögliche Serumkonzentration von C4a bei nur wenigen μM .)

Offen bleibt, ob auch Meerschweinchen-C4a den cpC3aR zu aktivieren vermag. Zusammengenommen zeigen diese Ergebnisse jedoch, daß 1) humanes C4a im Meerschweinchen tatsächlich als "drittes Anaphylatoxin" angesprochen werden muß und 2) humanes C4a seine Wirkungen im Meerschweinchen, nicht aber im Menschen über den C3aR entfalten kann. Freilich kann anhand dieser Ergebnisse weder ausgeschlossen werden, daß es einen eigenständigen C4a-Rezeptor gibt, noch daß sich in Zukunft auch im Menschen noch eindeutige C4a-Effekte zeigen werden – ***Es können jedoch zumindest alle bisher beobachteten C4a-Effekte befriedigend alleine durch die Kreuzaktivierbarkeit des cpC3aRs durch humanes C4a erklärt werden!*** (Eine Ausnahme stellt vielleicht die Beobachtung einer Inhibierung C3a-

induzierter O_2^- -Generierung durch C4a in Meerschweinchen-Makrophagen dar [65] – allerdings könnte dieser Effekt auch auf einer C3a-Kontamination der in dieser Studie verwendeten C4a-Präparation zurückzuführen sein.)

4.3 Konstruktion von C3aR/C5aR-Chimären

Nach der erfolgreichen Klonierung des C3aRs sollten in der Rezeptorsequenz Bereiche eingegrenzt werden, die an der Ligandenbindung und der Signaltransduktion beteiligt sind. Dazu wurde das Verfahren der Chimärenbildung eingesetzt, das z. B. beim C5aR/fMLPR bereits erfolgreich Verwendung gefunden hat und zur Eingrenzung von Ligandenbindungsstellen in beiden Rezeptoren führte. Als Partnermolekül für die Chimärenbildung wurde – als nächster Verwandter – der C5aR ausgewählt, da er einerseits genügend homolog zum C3aR ist, um erfolgreiche Expression zu versprechen, andererseits aber auch Erkenntnisse darüber zu erwarten waren, wie die beiden homologen Rezeptoren zwischen ihren ebenfalls homologen Liganden zu diskriminieren vermögen.

Die Auswahl der für die Chimärenkonstruktion eingesetzten Rezeptormodule richtete sich zum einen nach den Erkenntnissen, die bereits über das Bindungsverhalten des C5a/C5aR-Systems bekannt waren (s. auch Einleitung): Nach einem etablierten Modell bindet C5a mit seinem globulären, basischen N-terminalen Kernbereich an den sauren N-Terminus des C5aRs, während der flexible C5a-C-Terminus mit Aminosäureresten in der 2. EL und den TM-Regionen des Rezeptors wechselwirkt. Zum anderen erschien es naheliegend anzunehmen, daß die ungewöhnliche 2. EL des C3aRs Aufgaben bei der Ligandenbindung wahrnimmt. Daher wurden die N-Termini und die 2. ELs beider Rezeptoren zum Austausch bestimmt. Damit kann jeder Rezeptor als in 4 Module geteilt gedacht werden: 1) N-Terminus; 2) TM1 – TM4; 3) 2. EL; 4) TM5 – C-Terminus.

Alle 16 durch Kombination dieser Module möglichen Chimären (einschließlich der beiden wt-Rezeptoren) wurden im eukaryontischen Expressionsvektor pcDNA3 generiert und zur Normalisierung der Expression mit der 5'-UTR des C5aRs versehen. Zusätzlich wurde jede Chimäre N-terminal mit dem FLAG-Epitop zur immunologischen Detektion mittels kommerzieller anti-FLAG-Antikörper ausgestattet. Nach transienter Transfektion in HEK293-Zellen wurden alle Chimären immunologisch auf Zelloberflächenexpression getestet, in Bindungsstudien auf ^{125}I -C3a- und ^{125}I -C5a-Bindung untersucht und funktionell charakterisiert; letzteres geschah (in Kooperation mit R. S. Ames, SmithKline Beecham Pharmaceuticals, King of Prussia, USA) nach Kotransfektion mit $G\alpha$ -16 durch fluorometrische Messung der intrazellulären Ca^{2+} -Freisetzung nach Stimulation mit C3a und C5a sowie synthetischen C3a-

bzw. C5a-analogen Peptiden. Die Ergebnisse dieser Versuche sind in Tab. 3.2, S. 78, zusammengefaßt.

4.3.1 Expression

Alle Chimären wurden in FACS-Experimenten mit monoklonalen Antikörpern gegen die 2. EL des C3aRs, den N-Terminus des C5aRs und gegen das FLAG-Epitop auf Zelloberflächenexpression getestet. Dabei zeigte sich, daß rund die Hälfte der Konstrukte nicht auf der Zelloberfläche nachzuweisen waren – darunter fast alle mit dem C3aR-N-Terminus (Ch#1 – Ch#6; Ausnahme: Ch#7). Lediglich eine der Chimären mit dem N-Terminus des C5aRs (Ch#9) wies ebenfalls mangelnde Oberflächenexpression auf. Die Expression der übrigen Chimären erfolgte generell eher schwächer als die der Wildtyp-Rezeptoren. Dies steht im Gegensatz zu dem, was über C5aR/fMLPR-Chimären berichtet wird – die überwiegende Mehrheit dieser Konstrukte wurde in großen Mengen an der Zelloberfläche nachgewiesen [114,115].

Durch vollständige Sequenzierung der nicht-exprimierten Konstrukte wurde ausgeschlossen, daß eine ungewollte Mutation im kodierenden Bereich für die fehlende Expression verantwortlich war. Mutationen im nicht-kodierenden Bereich bzw. im Vektor wurden als Ursache dadurch ausgeschlossen, daß exemplarisch aus den Chimären pTCC1 und pTCC2 die eigentlichen chimären Bereiche (ab der 2. EL) in den – gut exprimierten – wt-C3aR pTCC0 umklont wurden. Auch dieses Procedere führte zu keiner detektierbaren Expression der entsprechenden Rezeptormutanten.

Diese Beobachtungen zeigten, daß zumindest in der verwendeten Zelllinie HEK293 andere Bereiche außer 5'-UTR und N-Terminus Einfluß auf Translation, Faltung und/oder Transport zur Zelloberfläche haben. In den beschriebenen C5aR/fMLPR-Chimären wurden andere Zelllinien (COS-7 bzw. CHO-L 761H) für die Expression verwendet; möglicherweise begünstigen deren spezifische Expressionseigenschaften die Expression chimärer G-Protein-gekoppelter Rezeptoren (wobei sich in der Literatur darüber keinerlei Hinweise fanden).

4.3.2 Der Rezeptor-N-Terminus bestimmt die Affinität zu C5a

Außer für den wt-C5aR (Ch#F) konnte u. a. auch für die Chimäre #8 – vorstellbar als ein C3aR mit C5aR-N-Terminus – eine merkliche Affinität zu ¹²⁵I-C5a nachgewiesen werden; die Dissoziationskonstante für C5a war dabei nur um eine Größenordnung höher als für den wt-C5aR. Erwartungsgemäß konnte keine Bindung von C5a an den wt-C3aR (Ch#0) beobachtet werden. Diese Ergebnisse bestätigen, was für den C5aR aufgrund zahlreicher indirekter Befunde

schon länger vermutet wird [53,98-100,115] – nämlich, daß der N-Terminus des C5aRs einen beträchtlichen Anteil der Bindungsenergie zum Liganden bereitstellt. Allerdings konnte mit Ch#8 erstmals direkt anhand eines exprimierten Zelloberflächenrezeptors gezeigt werden, daß der C5aR-N-Terminus allein ausreicht, um hochaffine C5a-Bindung zu vermitteln.

Die funktionellen Studien ergaben eine Überraschung: Das C5a-analoge Peptid H-8135 erwies sich als erstaunlich promiskuitiv gegenüber der Herkunft des transmembranösen Helixbündels. Außer auf dem wt-C5aR (Ch#F) und der Chimäre #7 (ein C5aR mit C3aR-N-Terminus, also das Pendant zu Ch#8) vermochte H-8135 mit praktisch gleicher Effizienz (im niedrig-mikromolaren Bereich) auf dem wt-C3aR (Ch#0) und auf Ch#8 Signaltransduktion auszulösen. Ch#8 antwortete auch auf C5a mit gegenüber dem wt-C5aR (Ch#F) nur moderat beeinträchtigter Effizienz – nicht aber der wt-C3aR (Ch#0) oder Ch#7. Damit ergibt sich folgendes Bild: ***Prinzipiell stellt C5a einen potentiellen Liganden für den C3aR dar – einzig über die fehlende hochaffine Bindung zum N-Terminus diskriminiert der C3aR gegen den "falschen" Liganden C5a!***

Aus diesen Daten ergibt sich allerdings, daß alle bisher durch Studien mit C5a-analogen Peptiden gewonnenen Daten einer kritischen Prüfung unterzogen werden müssen. Zumindest auf Zellen, die neben dem C5aR auch den C3aR exprimieren, könnten beschriebene C5a-Peptid-Effekte auch durch den C3aR vermittelt worden sein. Dies dürfte z. B. auch die Erklärung für die mit manchen C5a-analogen Peptiden beobachtete Kreuzdesensibilisierung des C3aRs im Meerschweinchen-Thrombozyten darstellen [94]. Weiterhin könnte dies zur Erklärung des Phänomens beitragen, daß manche C5a-Peptide je nach Testsystem verschiedene Reihenfolgen bezüglich ihrer Aktivität aufweisen [174].

4.3.3 Die 2. ELs sind kritisch für die Rezeptorkonformation

Chimäre #A – ein C3aR mit N-Terminus und 2. EL des C5aRs – zeigte eine im Vergleich zu Ch#8 erhöhte Affinität zu C5a und band den Liganden sogar mit wt-Affinität (was die Vorstellung einer C5a-Bindungsstelle in der 2. EL des C5aRs unterstützt). Auch Ch#B und Ch#C, die ebenfalls diese beiden C5aR-Module enthalten, vermochten C5a mit wt-Affinität zu binden. Allerdings zeigten nur der wt-C5aR (Ch#F) und Ch#8 – beide mit Helixbündel und 2. ELs der jeweils gleichen Herkunft (Ch#F: C5aR; Ch#8: C3aR) – mit C5a Signaltransduktion. Durch den Austausch der 2. ELs gegen das jeweilige heterologe Modul (Übergänge Ch#F \diamond Ch#D; Ch#8 \diamond Ch#A) geht offenbar die Fähigkeit zur Signaltransduktion durch C5a verloren. Auch die Transduktionseffizienz des C5a-analogen Peptids H-8135 wurde durch die Austausche stark beeinträchtigt.

Diese Ergebnisse sind schwierig zu interpretieren und möglicherweise das Ergebnis eines indirekten Effekts: Die Fähigkeit zur Signaltransduktion eines Rezeptors hängt kritisch von der Positionierung der transmembranösen Helices ab. Es ist also denkbar, daß die extrem unterschiedliche Länge der 2. ELs von C3aR und C5aR – 175 vs. 20 Aminosäuren – verschiedene Effekte auf die Bewegungsfreiheit der TM-Bereiche hat. So mag der C5aR für die Signaltransduktion eine sehr rigide Positionierung der durch die 2. EL verbundenen Helices TM4 und TM5 fordern, während der C3aR hier vielleicht gerade mehr Spielraum benötigt. Demnach wäre vorstellbar, daß das Einführen der "falschen" 2. EL die Signaltransduktion – auch bei Erhaltung der Ligandenbindung wie im Falle von Ch#8 \diamond Ch#A – zum Erliegen bringt. (Die verschiedenen relativen Positionen der Cystein-Reste zu Beginn der 2. ELs der beiden Rezeptoren, die mit dem jeweiligen Cys am Anfang der TM3 mutmaßlich eine Disulfidbrücke bilden, dürften hierbei wohl keine bedeutende Rolle spielen, da sich die relativen Längen der jeweiligen Abschnitte der Schlaufen um nur 2 Reste unterscheiden.) Diese Sensitivität gegenüber Störungen der genauen Anordnung der transmembranösen Helices würde auch mit der offensichtlichen Inkompatibilität von TM-Modulen verschiedener Herkunft übereinstimmen: Chimären mit gemischten Helixbündeln (Ch#B, Ch#C und Ch#E) zeigten keinerlei Signaltransduktion.

Zur Analyse von Rezeptormutanten werden parallel zum eigentlichen Liganden meist zusätzlich Antagonisten verwendet, die an eine andere Bindungsstelle als der Ligand binden. Erhaltene Antagonistenbindung bei verringerter oder fehlender Ligandenbindung wird dabei als Hinweis dafür angesehen, daß die Rezeptorstruktur durch die Mutation nicht wesentlich beeinträchtigt wurde. Für Anaphylatoxin-Rezeptoren sind bisher leider noch keine hochaffinen Antagonisten bekannt – dieser Nachteil konnte in dieser Arbeit jedoch durch die parallele Vermessung *beider* Anaphylatoxine sowie der analogen Peptide z. T. ausgeglichen werden. ***Durch den Verlust funktioneller Antwort bei Austausch der 2. ELs oder eines TM-Moduls – z. T. sogar bei erhaltener Ligandenbindung – konnte das Zusammenwirken der transmembranösen Helices und der 2. ELs als funktionelle Einheit demonstriert werden!***

Diese Ergebnisse zeigen jedoch auch, daß künftige Deletionsmutanten in der 2. EL des C3aRs mit Vorsicht zu interpretieren sind. Bleibt die C3a-Bindung erhalten – wie im Falle einer kürzlich veröffentlichten Spleißvariante des Meerschweinchen-C3aRs, der 35 Aminosäuren in der 2. EL fehlen [155] –, so kann eine Beteiligung der jeweiligen Reste an der C3a-Bindung wohl ausgeschlossen werden. Fehlende Bindung / Rezeptoraktivierung könnte jedoch – wie bei Chimäre #A – das Ergebnis einer gestörten Rezeptorkonformation sein. In diesem Falle könnte

wiederum mit einem synthetischen C5a-analogen Peptid die generelle Fähigkeit des Konstrukts zur Signaltransduktion überprüft werden.

4.3.4 Der C3aR-N-Terminus ist nicht essentiell für C3a-Bindung/Signaltransduktion

Außer dem wt-C3aR (Ch#0) zeigte lediglich Ch#8 detektierbare C3a-Bindung und Signaltransduktion sowohl mit C3a und dem C3a-analogen Peptid H-1264. ***Da die Chimäre #8 sowohl C3a als auch C5a bindet und auch auf beide Anaphylatoxine mit Signaltransduktion antwortet, muß Ch#8 als echter hybrider C3a/C5a-Rezeptor angesehen werden!*** Ch#8 kann als C3aR mit dem N-Terminus des C5aRs beschrieben werden. Die Tatsache, daß Ch#8 weiterhin C3a bindet und funktionell auf C3a antwortet, deutet darauf hin, daß der N-Terminus des C3aRs nicht essentiell für die Ligandenbindung und die Signaltransduktion ist.

Nun ist allerdings denkbar (wenn auch aufgrund der geringen Homologie der N-Termini von C3aR und C5aR unwahrscheinlich), daß beim Übergang Ch#0 \diamond Ch#8 Aminosäurereste aus dem C5aR-N-Terminus verlorengegangene Funktionalitäten des C3aR-N-Terminus übernommen haben. Um dies auszuschließen, wurden in der Arbeitsgruppe von R. S. Ames, SmithKline Beecham Pharmaceuticals, King of Prussia, USA, generierte N-terminale Deletionsmutanten des C3aRs bezüglich C3a-Bindung und Signaltransduktion untersucht. Dabei zeigte sich, daß die Entfernung der ersten 9 bzw. 16 N-terminalen Aminosäurereste keinen nennenswerten Einfluß auf die Ligandenbindung oder die Signaltransduktion durch C3a oder H-1264 hatte. (Eine Deletionsmutante ohne die ersten 22 Aminosäuren wurde nicht mehr auf der Zelloberfläche exprimiert.) Damit war eindeutig gezeigt: ***Der N-Terminus des C3aRs ist weder für die Bindung des Liganden noch für die Signaltransduktion essentiell. Das 2-Punkt-Bindungsmodell, das sich für den C5aR etabliert hat [53], trifft also nicht auf das C3a/C3aR-System zu!***

Über die Rolle, die die anderen Module des C3aRs möglicherweise für die Bindung des Liganden spielen, kann anhand der konstruierten Chimären leider keine endgültige Aussage getroffen werden. Der Austausch jedes weiteren Moduls des C3aRs nach dem N-Terminus (Ch#0 \diamond Ch#8) führte zu einem Verlust an detektierbarer C3a-Bindung (Ch#8 \diamond Ch#C; Ch#8 \diamond Ch#A; Ch#8 \diamond Ch#9). Ch#9 wird allerdings nicht auf der Zelloberfläche exprimiert, und Ch#A und Ch#C liegen wahrscheinlich in einer inaktiven Konformation vor (4.3.3). Sollte also die C3a-Bindung – im Gegensatz zum C5a – von der genauen Rezeptorkonformation abhängen, wäre dies eine ebenso plausible Erklärung für das Verschwinden der C3a-Bindung bei Austausch eines Moduls wie die Annahme einer Bindungsstelle im jeweiligen Modul.

So kann auch die Beteiligung der ungewöhnlich großen 2. EL des C3aRs an der C3a-Bindung nicht ausgeschlossen werden – allerdings spricht außer obigen Resultaten auch die geringe Sequenzhomologie der 2. EL zwischen den C3aR-Sequenzen verschiedener Species eher gegen eine essentielle Rolle bei der Bereitstellung von Kontaktpunkten zum Liganden. Wie eine Sequenzgegenüberstellung (Anhang 6.5) zeigt, sind zwischen Mensch, Meerschweinchen, Maus und Ratte gerade 23% der Aminosäurereste in der 2. EL streng und nur 40% konservativ erhalten – gegenüber einer allgemeinen Homologie von rund 60% über die gesamte Sequenz. Allerdings vermag der C3aR aus all diesen Species humanes C3a zu binden. Dies deutet eher darauf hin, daß die variable Schlaufe nicht an der Bindung dieses einen Liganden beteiligt ist. Möglicherweise erfüllt ein Großteil der Aminosäurereste in der 2. EL des C3aRs keine spezifische Funktion, sondern sorgt lediglich für die richtige Länge der Polypeptidkette. Im Zusammenspiel mit den – wenigen – konservierten Resten ist schließlich die Bindung eines weiteren, zwischen Species möglicherweise ebenfalls sehr variablen Liganden denkbar. Über dessen Natur läßt sich derzeit allerdings nur spekulieren – möglich wäre z. B. eine Beteiligung an Zell-Matrix- oder Zell-Zell-Wechselwirkungen; so konnte etwa für die 2. ELs der großen G-Protein-gekoppelten Rezeptor-Subklasse der olfaktorischen Rezeptoren eine entscheidende Rolle bei der Zielfindung der Axone beim Wachstum olfaktorischer Neuronen gezeigt werden [175].

4.4 Weiterführende Charakterisierung der Bindungsstelle in der 2. EL des C5aRs

Für die 2. EL des C5aRs konnte bereits eine Beteiligung an der Bindung des Liganden C5a nachgewiesen werden: Die Substitution von Glu199 in der 2. EL durch Gln führte zu einer verminderten Bindung und Signaltransduktion sowohl von C5a als auch von C5a-desArg74 sowie entsprechender synthetischer C5a-analoger Peptide [103]. Als wahrscheinlicher Wechselwirkungspartner wurde das Lysin an Position 68 im C5a postuliert.

Diese Wechselwirkung wurde in Kooperation mit P. N. Monk, Department of Molecular Biology and Biotechnology, University of Sheffield, UK, weiter charakterisiert. Dazu wurden verschiedene, an den Positionen 68 und 74 mutierte C5a-Mutanten rekombinant exprimiert und bezüglich Bindung und Funktion vermessen. Dabei standen stabil mit dem wt-C5aR bzw. einer Glu199Lys-C5aR-Mutante transfizierte RBL-2H3-Zellen zur Verfügung, mit denen kompetitive Bindungsstudien und funktionelle Untersuchungen in Form des Histamin-Freisetzungstests durchgeführt wurden. Zudem wurden alle C5a-Mutanten im Glucosaminidase-Freisetzungstest (GARA) auf Bt₂cAMP-differenzierten U937-Zellen funktionell charakterisiert. Die Ergebnisse dieser Versuche sind in Tab. 3.3, S. 79 zusammengestellt.

Zunächst sei festgestellt, daß alle im GARA gewonnenen Funktionsdaten um ca. eine Größenordnung kleinere ED_{50} -Werte lieferten als die entsprechenden Histamin-Freisetzungsversuche mit wt-C5aR-transfizierten RBL-Zellen, wobei jedoch die Werte der einzelnen C5a-Mutanten relativ zueinander unabhängig vom Testsystem weitgehend gleich blieben. Da aber beim Histamin-Freisetzungstest im Gegensatz zum GARA auch Daten für den Glu199Lys-C5aR ermittelt werden konnten, wird im folgenden nur von den Funktionsdaten der RBL-Zellen die Rede sein.

4.4.1 Die Lys68/Glu199-Wechselwirkung ist essentiell für Rezeptoraktivierung durch C5a-desArg74, nicht jedoch durch C5a

Es zeigte sich, daß der Wegfall der Lys68/Glu199-Wechselwirkung tatsächlich einen geringen Verlust an Aktivität mit sich brachte, sowohl im Falle des C5a[Glu68] auf dem wt-C5aR als auch beim wt-C5a auf dem Glu199Lys-C5aR. Durch den reziproken Austausch C5a[Glu68]/Glu199Lys-C5aR konnte die wt-Aktivität jedoch weitgehend wiederhergestellt werden. Alles in allem handelte es sich jedoch nur um geringe Änderungen der Aktivität, so daß der Lys68/Glu199-Wechselwirkung für die Aktivierung des Rezeptors durch C5a keine tragende Rolle zuzukommen scheint. Dies wird bestätigt durch C5a[Met68]: Diese generell zur Wechselwirkung mit Pos. 199 im C5aR unfähige Mutante wies sowohl auf dem wt-, als auch auf dem mutierten C5aR die gleiche, gegenüber dem wt-C5a nur wenig verringerte Aktivität auf. Dies steht im Einklang mit Beobachtungen, die mit C5a-analogen Peptiden gemacht wurden: Trugen diese Met anstelle des homologen Lys, diskriminierten sie ebenfalls nicht zwischen dem wt-C5aR und einer Glu199Gln-C5aR-Mutante [103]. Außerdem demonstriert dieser Befund, daß die allgemeine räumliche Struktur des Glu199Lys-C5aR zumindest soweit intakt zu sein scheint, daß er prinzipiell wie der wt-C5aR aktivierbar ist.

Ein gänzlich anderes Bild bot sich beim C5a-desArg74. Auf dem wt-C5aR erwies sich rekombinantes C5a[Lys68]-desArg74 als praktisch genauso aktiv wie C5a (im Gegensatz zu aus Serum aufgereinigtem – glykosyliertem! – C5a-desArg74, das i. d. R. eine 10 – 100fach geringere Aktivität aufwies). Austausch von Lys68 gegen Glu führte hier allerdings zu einem vollständigen Verlust der Transduktionseffizienz; ebenso erwies sich C5a[Lys68]-desArg74 als komplett inaktiv auf dem Glu199Lys-C5aR. Durch den reziproken Austausch C5a[Glu68]-desArg74/Glu199Lys-C5aR konnte die Aktivität teilweise wiederhergestellt werden, wenn auch nur zu einem 3.000stel der wt-Aktivität. ***Offenbar ist die Lys68/Glu199-Wechselwirkung essentiell für die Aktivierung des C5aRs durch C5a-desArg74. Bei wt-C5a hingegen hat diese Wechselwirkung nur wenig Einfluß auf die Aktivität des Liganden!***

Zum Teil mag dieses Phänomen in der kürzlich in NMR-Studien gezeigten Rückfaltung des C5a-C-Terminus in Richtung auf den globulären N-Terminus des Moleküls begründet liegen [12]. Diese Struktur wird durch eine Wechselwirkung von Arg74 mit Arg62 stabilisiert, so daß der C-Terminus eine recht rigide Konformation einnehmen dürfte. Damit könnte es für C5a[Lys68] und C5a[Glu68] möglich sein, den jeweiligen Rest an Pos. 68 auch gegen die elektrostatische Abstoßung bei jeweils "falschem" Interaktionspartner im C5aR in die Bindungstasche zu zwängen und so den Rezeptor zu aktivieren. Beide C5a-desArg74-Mutanten hingegen wären aufgrund fehlender Stabilisierung des Peptid-Rückgrats dazu nicht in der Lage. Dies könnte auch erklären, weshalb C5a-analoge Peptide viel stärker – bis zu einem Faktor von 100 [176] – auf die Glu199Lys-Substitution im Rezeptor reagieren; auch bei Anwesenheit eines C-terminalen Arginin-Restes dürften Peptide keine rigide Konformation einnehmen können, da das komplementäre Arg62 fehlt.

Eine mögliche Erklärung für die nicht vollständige Wiederherstellung der wt-Aktivität bei C5a[Glu68]-desArg74/Glu199Lys-C5aR ist der Verlust an hydrophoben Wechselwirkungen, der durch die kürzere CH₂-Kette des Glu68 im Vergleich zu Lys68 auftreten könnte.

Der C5a[Asp74]-Mutante fehlt – wie im Falle des C5a-desArg74 – die Guanidino-Funktion der C-terminalen Aminosäure; allerdings besitzt sie – wie wt-C5a – die Carboxylat-Funktion des Peptid-Rückgrats in Pos. 74. Diese Mutante wies sowohl auf dem wt- als auch auf dem mutierten C5aR fast die gleiche Aktivität auf und legt somit nahe, *daß die Entscheidung, inwieweit die Lys68/Glu199-Wechselwirkung für die Aktivierung des Rezeptors durch den Liganden notwendig ist, durch die An- oder Abwesenheit der C-terminalen Carboxylat-Funktion in Pos. 74 gefällt wird.* Dabei stellt Arg206 einen möglichen Wechselwirkungspartner im C5aR dar, über den die Responsivität gegenüber C5a/C5a-desArg74 reguliert werden kann. Für diesen Rest wurde bereits eine Funktion für die Wechselwirkung mit der C-terminalen Carboxylat-Funktion des C5a [104] und für die Aufrechterhaltung eines hochaffinen Zustandes des C5aRs durch G-Protein-Kopplung [117] beschrieben. Sicherlich ist die C5a[Asp74]-Mutante wegen ihrer sauren Seitenkette in Pos. 74 zur Klärung dieser Fragestellung nicht optimal geeignet (war sie doch ursprünglich für eine ganz andere Fragestellung generiert worden), doch dürften Folgeexperimente mit z. B. C5a[Ala74] diese Hypothese bestätigen.

4.4.2 Bindung an den C5aR und Rezeptoraktivierung sind unabhängige Schritte

Alles in allem scheint C5a-desArg74 seine Wirkungen über den C5aR mittels eines anderen Bindungs/Signaltransduktionsmechanismus auszuüben als C5a. Um dies zu überprüfen, wurden kompetitive Bindungsstudien mit den transfizierten RBL-Zellen durchgeführt. Wie diese

zeigten, bewirkte der Austausch von Lys68 im C5a durch Glu eine 7fache Verringerung der Affinität des Liganden zum Rezeptor; die wt-Affinität konnte jedoch durch den reziproken Austausch von Glu199 im Rezeptor durch Lys wiederhergestellt werden. C5a[Lys68] zeigte schließlich auf dem Glu199Lys-C5aR erwartungsgemäß eine ähnlich verringerte Affinität wie C5a[Glu68] auf dem wt-C5aR. Diese Ergebnisse legen nahe, daß die Lys68/Glu199-Wechselwirkung in Übereinstimmung mit den Funktionsdaten tatsächlich einen – wenn auch kleinen (ca. 5 kJ/mol) – Beitrag zur Ligandenbindung leistet.

C5a-desArg74 bot ein komplizierteres Bild. Schon C5a[Lys68]-desArg74 wies auf dem wt-C5a eine über 10fach geringere Affinität auf als wt-C5a – was im Einklang steht mit der Hypothese, daß die Guanidino-Funktion des Arg74 durch Wechselwirkung mit einem noch unbekanntem Partner im C5aR ebenfalls einen Beitrag zur Bindungsenergie liefert [104]. Im Gegensatz zu den Funktionsdaten zeigte sich jedoch, daß C5a[Glu68]-desArg74 auf dem wt-C5aR nur um eine Größenordnung schlechter als auf dem Glu199Lys-C5aR, C5a[Lys68]-desArg74 auf dem Glu199Lys-C5aR sogar mit gleicher Affinität wie auf dem wt-C5aR bindet – bei jeweils völlig fehlender Funktion. Der reziproke Austausch C5a[Glu68]-desArg74/Glu199Lys-C5aR lieferte ebenfalls wt-Bindung.

Diese Daten legen nahe, daß die Lys68/Glu199-Wechselwirkung zwar einen großen Einfluß auf die Rezeptoraktivierung durch C5a-desArg74 hat, für die Bindung des desarginierten Liganden jedoch von weitaus geringerer Bedeutung ist. ***Demnach sind Bindung an den C5a-Rezeptor und Aktivierung desselben zwei konsekutive, unabhängige Schritte.*** Dies vermag auch zu erklären, weshalb z. B. die Aktivierung des wt-C5aRs durch C5a[Lys68]-desArg74 mit praktisch gleicher Effizienz erfolgt wie durch C5a[Lys68], obwohl ersteres 10fach schlechter an den Rezeptor bindet als wt-C5a: Bei der Durchführung von Bindungsstudien kann die Formierung des Rezeptor-Ligand-Komplexes als ein Gleichgewichtsprozess beschrieben werden, bei dem die Assoziationsreaktion – relativ unabhängig von der Art des Liganden – diffusionskontrolliert ablaufen dürfte. Die Dissoziation allerdings erfolgt mit einer Geschwindigkeit, die von der Stärke der Wechselwirkung zwischen Rezeptor und Ligand abhängt, so daß sich hier der Ausfall eines Wechselwirkungspartners durchaus in der Gleichgewichtskonstante $K_D = k_{\text{off}}/k_{\text{on}}$ bemerkbar machen sollte. Bei der Durchführung eines Funktionstests steht dem Rezeptor-Ligand-Komplex jedoch noch eine weitere Alternative zum Zerfall offen: die Aktivierung des Rezeptors mit der Geschwindigkeitskonstante k_{trans} , die letztendlich ein Signal – etwa freigesetzte Enzym- oder Histaminmenge – annähernd proportional zur Menge der aktivierten Rezeptoren ergeben sollte. Solange nun die Rezeptoraktivierung hinreichend schnell verläuft, d. h. $k_{\text{trans}} \gg k_{\text{off}}$, sollten sich Änderungen in

der Affinität nicht in der Aktivität des Liganden bemerkbar machen. Erst wenn k_{off} in die Größenordnung von k_{trans} und darüber kommt (was aufgrund verstärkter Dissoziation der Fall sein könnte) oder k_{trans} an sich sinkt (bei schlechterer Transduktionseffizienz), sollte die Aktivität des Liganden herabgesetzt werden. Dies mag beobachtet worden sein bei z. B. der im Vergleich zu C5a[Lys68]-desArg74 nur 10fach schlechteren Bindung von C5a[Glu68]-desArg74 an den wt-C5aR, wobei sich ersteres als so aktiv wie wt-C5a zeigte, während letzteres überhaupt keine meßbare Aktivität mehr aufwies.

4.4.3 Vergleich der 2. ELs des C3aRs und des C5aRs

Es konnte gezeigt werden, daß die Wechselwirkung von Lys68 im C5a mit Glu199 in der 2. EL des C5aRs keine essentielle Rolle für die Aktivierung durch den wt-Liganden spielt, C5a-desArg74 hingegen sehr wohl auf diese Interaktion angewiesen ist. Ein Sequenzvergleich von C5a mit C3a (s. Anhang 6.4) zeigt nun, daß dieses zwar keinen zu Lys68 im C5a homologen Rest aufweist – die 7. Aminosäure vom C-Terminus aus ist hier ein Serin –, doch nur zwei Positionen weiter N-terminal findet sich ein Argininrest, daß eine dem Lys68 im C5a analoge Funktion ausüben könnte. Allerdings besitzt der C3aR am Ende seiner 2. EL keine zu Glu199 im C5aR homologe saure Aminosäure – auch nicht in unmittelbarer Umgebung der fraglichen Position. Möglicherweise liegt hier die Erklärung dafür verborgen, weshalb C5a-desArg74 auf dem C5aR noch immer eine beträchtliche Restaktivität aufweist, C3a-desArg77 sich hingegen bisher als vollkommen inaktiv erwiesen hat. Auch die Tatsache, daß C5a – zumindest prinzipiell – den C3aR zu aktivieren vermag, mag ihre Ursache darin haben, daß C5a nicht auf einen Wechselwirkungspartner für Lys68 angewiesen ist. Arg206 hingegen scheint eine entscheidende Rolle bei der Aktivierung des C5aRs durch C5a zu spielen [104,117] – hat aber in Form von Arg340 auch ein Pendant im C3aR.

Das Einführen eines Glutamat-Restes etwa an Pos. 333 am Ende der 2. EL des C3aRs könnte evtl. helfen, diese Hypothese zu überprüfen. Möglicherweise ließe sich so nämlich ein C3aR erzeugen, der sowohl für C5a-desArg74 als auch für C3a-desArg77 empfänglich ist.

5. Literatur

- [1] **Buchner, H.:** *Über die bakterientötende Wirkung des zellfreien Blutserums*, Zbl. Bakt. (Naturwiss.) **5**: 817 (1889)
- [2] **Volanakis, J. E.; Frank, M. M. (Hrsg.):** *The human complement system in health and disease*, Marcel Dekker, New York (1998)
- [3] **Hugli, T. E.; Muller-Eberhard, H. J.:** *Anaphylatoxins: C3a and C5a*, Adv. Immunol **26**: 1-53 (1978)
- [4] **Hugli, T. E.:** *Human anaphylatoxin (C3a) from the third component of complement. Primary structure*, J Biol. Chem. **250**: 8293-8301 (1975)
- [5] **de Bruijn, M. H.; Fey, G. H.:** *Human complement component C3: cDNA coding sequence and derived primary structure*, Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. **82**(3): 708-712 (1985)
- [6] **Fernandez, H. N.; Hugli, T. E.:** *Primary structural analysis of the polypeptide portion of human C5a anaphylatoxin. Polypeptide sequence determination and assignment of the oligosaccharide attachment site in C5a*, J Biol. Chem. **253**: 6955-6964 (1978)
- [7] **Lundwall, A. B.; Wetsel, R. A.; Kristensen, T.; Whitehead, A. S.; Woods, D. E.; Ogden, R. C.; Colten, H. R.; Tack, B. F.:** *Isolation and sequence analysis of a cDNA clone encoding the fifth complement component*, J Biol. Chem. **260**: 2108-2112 (1985)
- [8] **Nettesheim, D. G.; Edalji, R. P.; Mollison, K. W.; Greer, J.; Zuiderweg, E. R.:** *Secondary structure of complement component C3a anaphylatoxin in solution as determined by NMR spectroscopy: differences between crystal and solution conformations*, Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A **85**: 5036-5040 (1988)
- [9] **Chazin, W. J.; Hugli, T. E.; Wright, P. E.:** *¹H NMR studies of human C3a anaphylatoxin in solution: sequential resonance assignments, secondary structure, and global fold*, Biochemistry **27**: 9139-9148 (1988)
- [10] **Zuiderweg, E. R.; Nettesheim, D. G.; Mollison, K. W.; Carter, G. W.:** *Tertiary structure of human complement component C5a in solution from nuclear magnetic resonance data*, Biochemistry **28**: 172-185 (1989)
- [11] **Federwisch, M.; Wollmer, A.; Emde, M.; Stuhmer, T.; Melcher, T.; Klos, A.; Köhl, J.; Bautsch, W.:** *Tryptophan mutants of human C5a anaphylatoxin: a fluorescence anisotropy decay and energy transfer study*, Biophys. Chem. **46**: 237-248 (1993)
- [12] **Zhang, X.; Boyar, W.; Toth, M. J.; Wennogle, L.; Gonnella, N. C.:** *Structural definition of the C5a C terminus by two-dimensional nuclear magnetic resonance spectroscopy*, Proteins **28**(2): 261-267 (1997)
- [13] **Bodamer, G.; Vogt, W.:** *Beeinflussung der Capillarpermeabilität in der Meerschweinchenhaut durch Anaphylatoxin (AT)*, Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol **266**: 255-266 (1970)
- [14] **Yancey, K. B.; Hammer, C. H.; Harvath, L.; Renfer, L.; Frank, M. M.; Lawley, T. J.:** *Studies of human C5a as a mediator of inflammation in normal human skin*, J Clin. Invest. **75**: 486-495 (1985)

- [15] **Dias de Silva, W.; Lepow, I. H.:** *Complement as a mediator of inflammation. II. Biological properties of anaphylatoxins prepared with purified components of human complement*, J. Exp. Med. **125**: 921-956 (1967)
- [16] **Bodamer, G.; Vogt, W.:** *Contraction of guinea-pig ileum induced by anaphylatoxin independent of histamin release*, Int. Arch. Allergy Appl. Immunol. **39**: 648-657 (1970)
- [17] **Fernandez, H. N.; Henson, P. M.; Otani, A.; Hugli, T. E.:** *Chemotactic response to human C3a and C5a anaphylatoxins. I. Evaluation of C3a and C5a leukotaxis in vitro and under stimulated in vivo conditions*, J Immunol **120**: 109-115 (1978)
- [18] **Morita, E.; Schroder, J. M.; Christophers, E.:** *Chemotactic responsiveness of eosinophils isolated from patients with inflammatory skin diseases*, J Dermatol. **16**: 348-351 (1989)
- [19] **Snyderman, R.:** *Regulatory mechanisms of a chemoattractant receptor on human polymorphonuclear leukocytes*, Rev. Infect. Dis. **7**(3): 390-394 (1985)
- [20] **Pieters, W. R.; Houben, L. A.; Koenderman, L.; Raaijmakers, J. A.:** *C5a-induced migration of human monocytes is primed by dexamethasone*, Am. J. Respir. Cell Mol. Biol. **12**: 691-696 (1995)
- [21] **Nilsson, G.; Johnell, M.; Hammer, C. H.; Tiffany, H. L.; Nilsson, K.; Metcalfe, D. D.; Siegbahn, A.; Murphy, P. M.:** *C3a and C5a are chemotaxins for human mast cells and act through distinct receptors via a pertussis toxin-sensitive signal transduction pathway*, J. Immunol. **157**: 1693-1698 (1996)
- [22] **Daffern, P. J.; Pfeifer, P. H.; Ember, J. A.; Hugli, T. E.:** *C3a is a chemotaxin for human eosinophils but not for neutrophils. I. C3a stimulation of neutrophils is secondary to eosinophil activation*, J. Exp. Med. **181**: 2119-2127 (1995)
- [23] **Kishimoto, T. K.; Jutila, M. A.; Berg, E. L.; Butcher, E. C.:** *Neutrophil Mac-1 and MEL-14 adhesion proteins inversely regulated by chemotactic factors*, Science **245**(4923): 1238-1241 (1989)
- [24] **Weber, C.; Katayama, J.; Springer, T. A.:** *Differential regulation of beta 1 and beta 2 integrin avidity by chemoattractants in eosinophils*, Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. **93**: 10939-10944 (1996)
- [25] **Goldstein, I. M.; Weissmann, G.:** *Generation of C5-derived lysosomal enzyme-releasing activity (C5a) by lysates of leukocyte lysosomes*, J Immunol **113**: 1583-1588 (1974)
- [26] **Hartman, C. T.; Glovsky, M. M.:** *Complement activation requirements for histamine release from human leukocytes: influence of purified C3ahu and C5ahu on histamine release*, Int. Arch. Allergy Appl. Immunol **66**: 274-281 (1981)
- [27] **Goldstein, I. M.; Roos, D.; Kaplan, H. B.; Weissmann, G.:** *Complement and immunoglobulins stimulate superoxide production by human leukocytes independently of phagocytosis*, J Clin. Invest. **56**: 1155-1163 (1975)
- [28] **Hilger, R. A.; Koller, M.; Konig, W.:** *Inhibition of leukotriene formation and IL-8 release by the paf- receptor antagonist SM-12502*, Inflammation **20**(1): 57-70 (1996)
- [29] **Johnson, A. R.; Hugli, T. E.; Muller-Eberhard, H. J.:** *Release of histamine from rat mast cells by the complement peptides C3a and C5a*, Immunology **28**: 1067-1067 (1975)

- [30] Meuer, S.; Ecker, U.; Hadding, U.; Bitter-Suermann, D.: *Platelet-serotonin release by C3a and C5a: two independent pathways of activation*, J Immunol **126**: 1506-1509 (1981)
- [31] Zanker, B.; Rasokat, H.; Hadding, U.; Bitter-Suermann, D.: *C3a induced activation and stimulus specific reversible desensitization of guinea pig platelets*, Agents Actions Suppl. **11:147-57**: 147-157 (1982)
- [32] Benner, K. U.; Schumacher, K. A.; Classen, H. G.: *Platelet aggregation induced by anaphylatoxin and its inhibition*, Arzneimittelforschung. **25**(10): 1635-1638 (1975)
- [33] Klos, A.; Bank, S.; Gietz, C.; Bautsch, W.; Köhl, J.; Burg, M.; Kretzschmar, T.: *C3a receptor on dibutyryl-cAMP-differentiated U937 cells and human neutrophils: the human C3a receptor characterized by functional responses and 125I-C3a binding*, Biochemistry **31**: 11274-11282 (1992)
- [34] Takafuji, S.; Tadokoro, K.; Ito, K.; Dahinden, C. A.: *Degranulation from human eosinophils stimulated with C3a and C5a*, Int. Arch. Allergy Immunol. **104**: 27-29 (1994)
- [35] Elsner, J.; Oppermann, M.; Czech, W.; Kapp, A.: *C3a activates the respiratory burst in human polymorphonuclear neutrophilic leukocytes via pertussis toxin-sensitive G-proteins*, Blood **83**: 3324-3331 (1994)
- [36] Bischoff, S. C.; de Weck, A. L.; Dahinden, C. A.: *Interleukin 3 and granulocyte/macrophage-colony-stimulating factor render human basophils responsive to low concentrations of complement component C3a*, Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. **87**(17): 6813-6817 (1990)
- [37] Goodman, M. G.; Chenoweth, D. E.; Weigle, W. O.: *Induction of interleukin 1 secretion and enhancement of humoral immunity by binding of human C5a to macrophage surface C5a receptors*, J Exp. Med. **156**: 912-917 (1982)
- [38] Okusawa, S.; Dinarello, C. A.; Yancey, K. B.; Endres, S.; Lawley, T. J.; Frank, M. M.; Burke, J. F.; Gelfand, J. A.: *C5a induction of human interleukin 1. Synergistic effect with endotoxin or interferon-gamma*, J Immunol **139**: 2635-2640 (1987)
- [39] Scholz, W.; McClurg, M. R.; Cardenas, G. J.; Smith, M.; Noonan, D. J.; Hugli, T. E.; Morgan, E. L.: *C5a-mediated release of interleukin 6 by human monocytes*, Clin. Immunol Immunopathol. **57**: 297-307 (1990)
- [40] Takabayashi, T.; Vannier, E.; Clark, B. D.; Margolis, N. H.; Dinarello, C. A.; Burke, J. F.; Gelfand, J. A.: *A new biologic role for C3a and C3a desArg: regulation of TNF- α and IL-1 β synthesis*, J. Immunol. **156** : 3455-3460 (1996)
- [41] Morgan, E. L.; Thoman, M. L.; Hobbs, M. V.; Weigle, W. O.; Hugli, T. E.: *Human C3a-mediated suppression of the immune response. II. Suppression of human in vitro polyclonal antibody responses occurs through the generation of nonspecific OKT8+ suppressor T cells*, Clin. Immunol Immunopathol. **37**: 114-123 (1985)
- [42] Morgan, E. L.; Thoman, M. L.; Weigle, W. O.; Hugli, T. E.: *Anaphylatoxin-mediated regulation of the immune response. II. C5a-mediated enhancement of human humoral and T cell-mediated immune responses*, J Immunol **130**: 1257-1261 (1983)
- [43] Mousli, M.; Hugli, T. E.; Landry, Y.; Bronner, C.: *A mechanism of action for anaphylatoxin C3a stimulation of mast cells*, J. Immunol. **148**: 2456-2461 (1992)

- [44] **Erdei, A.; Andreev, S.; Pecht, I.:** *Complement peptide C3a inhibits IgE-mediated triggering of rat mucosal mast cells*, *Int. Immunol.* **7**(9): 1433-1439 (1995)
- [45] **Takabayashi, T.; Vannier, E.; Burke, J. F.; Tompkins, R. G.; Gelfand, J. A.; Clark, B. D.:** *Both C3a and C3a(desArg) regulate interleukin-6 synthesis in human peripheral blood mononuclear cells*, *J. Infect. Dis.* **177**(6): 1622-1628 (1998)
- [46] **Baldo, A.; Sniderman, A. D.; St Luce, S.; Avramoglu, R. K.; Maslowska, M.; Hoang, B.; Monge, J. C.; Bell, A.; Mulay, S.; Cianflone, K.:** *The adipsin-acylation stimulating protein system and regulation of intracellular triglyceride synthesis*, *J. Clin. Invest.* **92**: 1543-1547 (1993)
- [47] **Ember, J. A.; Jagels, M.; Hugli, T. E.:** *Anaphylatoxins and biological responses*, in: **Volanakis, J. E.; Frank, M. M. (Hrsg.):** *The human complement system in health and disease*, Marcel Dekker, New York (1998)
- [48] **Maroko, P. R.; Carpenter, C. B.; Chiariello, M.; Fishbein, M. C.; Radvany, P.; Knostman, J. D.; Hale, S. L.:** *Reduction by cobra venom factor of myocardial necrosis after coronary artery occlusion*, *J. Clin. Invest.* **61**(3): 661-670 (1978)
- [49] **Weisman, H. F.; Bartow, T.; Leppo, M. K.; Marsh, H. C. J.; Carson, G. R.; Concino, M. F.; Boyle, M. P.; Roux, K. H.; Weisfeldt, M. L.; Fearon, D. T.:** *Soluble human complement receptor type 1: in vivo inhibitor of complement suppressing post-ischemic myocardial inflammation and necrosis*, *Science* **249**(4965): 146-151 (1990)
- [50] **Wexler, D. E.; Chenoweth, D. E.; Cleary, P. P.:** *Mechanism of action of the group A streptococcal C5a inactivator*, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **82**: 8144-8148 (1985)
- [51] **Bohnsack, J. F.; Mollison, K. W.; Buko, A. M.; Ashworth, J. C.; Hill, H. R.:** *Group B streptococci inactivate complement component C5a by enzymic cleavage at the C-terminus*, *Biochemical Journal* **273**: 635-640 (1991)
- [52] **Reed, S. L.; Ember, J. A.; Herdman, D. S.; DiScipio, R. G.; Hugli, T. E.; Gigli, I.:** *The extracellular neutral cysteine proteinase of Entamoeba histolytica degrades anaphylatoxins C3a and C5a*, *J. Immunol.* **155**(1): 266-274 (1995)
- [53] **Siciliano, S. J.; Rollins, T. E.; DeMartino, J.; Konteatis, Z.; Malkowitz, L.; Van Riper, G.; Bondy, S.; Rosen, H.; Springer, M. S.:** *Two-site binding of C5a by its receptor: an alternative binding paradigm for G protein-coupled receptors*, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **91**: 1214-1218 (1994)
- [54] **Höpken, U. E.; Lu, B.; Gerard, N. P.; Gerard, C.:** *The C5a chemoattractant receptor mediates mucosal defence to infection*, *Nature* **383**: 86-89 (1996)
- [55] **Haviland, D. L.; McCoy, R. L.; Whitehead, W. T.; Akama, H.; Molmenti, E. P.; Brown, A.; Haviland, J. C.; Parks, W. C.; Perlmutter, D. H.; Wetsel, R. A.:** *Cellular expression of the C5a anaphylatoxin receptor (C5aR): demonstration of C5aR on nonmyeloid cells of the liver and lung*, *J. Immunol.* **154**: 1861-1869 (1995)
- [56] **Foreman, K. E.; Vaporciyan, A. A.; Bonish, B. K.; Jones, M. L.; Johnson, K. J.; Glovsky, M. M.; Eddy, S. M.; Ward, P. A.:** *C5a-induced expression of P-selectin in endothelial cells*, *J. Clin. Invest.* **94**: 1147-1155 (1994)
- [57] **Buchner, R. R.; Hugli, T. E.; Ember, J. A.; Morgan, E. L.:** *Expression of functional receptors for human C5a anaphylatoxin (CD88) on the human hepatocellular carcinoma cell line HepG2. Stimulation of acute-phase protein-specific mRNA and protein synthesis by human C5a anaphylatoxin*, *J. Immunol.* **155** : 308-315 (1995)

- [58] **Gasque, P.; Chan, P.; Fontaine, M.; Ischenko, A.; Lamacz, M.; Gotze, O.; Morgan, B. P.:** *Identification and characterization of the complement C5a anaphylatoxin receptor on human astrocytes*, J. Immunol. **155**: 4882-4889 (1995)
- [59] **Gasque, P.; Singhrao, S. K.; Neal, J. W.; Gotze, O.; Morgan, B. P.:** *Expression of the receptor for complement C5a (CD88) is up-regulated on reactive astrocytes, microglia, and endothelial cells in the inflamed human central nervous system*, Am. J. Pathol. **150**(1): 31-41 (1997)
- [60] **Gasque, P.; Singhrao, S. K.; Neal, J. W.; Wang, P.; Sayah, S.; Fontaine, M.; Morgan, B. P.:** *The receptor for complement anaphylatoxin C3a is expressed by myeloid cells and nonmyeloid cells in inflamed human central nervous system: analysis in multiple sclerosis and bacterial meningitis*, J. Immunol. **160**(7): 3543-3554 (1998)
- [61] **Gorski, J. P.; Hugli, T. E.; Muller-Eberhard, H. J.:** *C4a: the third anaphylatoxin of the human complement system*, Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A **76**: 5299-5302 (1979)
- [62] **Moon, K. E.; Gorski, J. P.; Hugli, T. E.:** *Complete primary structure of human C4a anaphylatoxin*, J Biol. Chem. **256**: 8685-8692 (1981)
- [63] **Belt, K. T.; Carroll, M. C.; Porter, R. R.:** *The structural basis of the multiple forms of human complement component C4*, Cell **36**(4): 907-914 (1984)
- [64] **Meuer, S.; Hugli, T. E.; Andreatta, R. H.; Hadding, U.; Bitter-Suermann, D.:** *Comparative study on biological activities of various anaphylatoxins (C4a, C3a, C5a). Investigations on their ability to induce platelet secretion*, Inflammation **5**: 263-273 (1981)
- [65] **Murakami, Y.; Yamamoto, T.; Imamichi, T.; Nagasawa, S.:** *Cellular responses of guinea-pig macrophages to C4a; inhibition of C3a-induced O₂- generation by C4a*, Immunol. Lett. **36**: 301-304 (1993)
- [66] **Lienenklaus, S.; Ames, R. S.; Tornetta, M. A.; Sarau, H. M.; Foley, J. J.; Crass, T.; Sohns, B.; Raffetseder, U.; Grove, M.; Holzer, A.; Klos, A.; Kohl, J.; Bautsch, W.:** *Cutting edge: Human anaphylatoxin C4a is a potent agonist of the guinea pig but not the human C3a receptor*, J. Immunol. **161**(5): 2089-2093 (1998)
- [67] **Didsbury, J. R.; Uhing, R. J.; Tomhave, E.; Gerard, C.; Gerard, N.; Snyderman, R.:** *Receptor class desensitization of leukocyte chemoattractant receptors*, Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. **88**: 11564-11568 (1991)
- [68] **Fukuoka, Y.; Hugli, T. E.:** *Demonstration of a specific C3a receptor on guinea pig platelets*, J Immunol **140**: 3496-3501 (1988)
- [69] **Gerardy-Schahn, R.; Ambrosius, D.; Saunders, D.; Casaretto, M.; Mittler, C.; Karwarth, G.; Gorgen, S.; Bitter-Suermann, D.:** *Characterization of C3a receptor-proteins on guinea pig platelets and human polymorphonuclear leukocytes*, Eur. J Immunol **19**: 1095-1102 (1989)
- [70] **Kretzschmar, T.; Jeromin, A.; Gietz, C.; Bautsch, W.; Klos, A.; Köhl, J.; Rechkemmer, G.; Bitter, S.:** *Chronic myelogenous leukemia-derived basophilic granulocytes express a functional active receptor for the anaphylatoxin C3a*, Eur. J. Immunol. **23**: 558-561 (1993)
- [71] **Chenoweth, D. E.; Hugli, T. E.:** *Demonstration of specific C5a receptor on intact human polymorphonuclear leukocytes*, Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A **75**: 3943-3947 (1978)

- [72] **Gerard, N. P.; Hodges, M. K.; Drazen, J. M.; Weller, P. F.; Gerard, C.:** *Characterization of a receptor for C5a anaphylatoxin on human eosinophils*, J Biol. Chem. **264**: 1760-1766 (1989)
- [73] **Chenoweth, D. E.; Goodman, M. G.; Weigle, W. O.:** *Demonstration of a specific receptor for human C5a anaphylatoxin on murine macrophages*, J Exp. Med. **156**: 68-78 (1982)
- [74] **Collier, V.; Bonilla-Argudo, V.; Gimenez-Gallego, G.; Fieldhouse, J.; Kelder, B.; Rollins, T.; Siciliano, S.; Springer, M.; Kopchik, J.:** *Synthesis and secretion of recombinant C5a directed by plasmid clones encoding heterologous signal peptide sequences*, Fed. Proc. Fed. Am. Soc. Exp. Biol. **46**: 772-773 (1987)
- [75] **Feltner, D. E.; Smith, R. H.; Marasco, W. A.:** *Characterization of the plasma membrane bound GTPase from rabbit neutrophils. I. Evidence for an Ni-like protein coupled to the formyl peptide, C5a, and leukotriene B4 chemotaxis receptors*, J Immunol **137**: 1961-1970 (1986)
- [76] **Murphy, P. M.; Gallin, E. K.; Tiffany, H. L.:** *Characterization of human phagocytic cell receptors for C5A and platelet activating factor expressed in Xenopus oocytes*, J Immunol **145**: 2227-2234 (1990)
- [77] **Siciliano, S. J.; Rollins, T. E.; Springer, M. S.:** *Interaction between the C5a receptor and Gi in both the membrane- bound and detergent-solubilized states*, J. Biol. Chem. **265**: 19568-19574 (1990)
- [78] **Stiles, G. L.:** *The A1 adenosine receptor. Solubilization and characterization of a guanine nucleotide-sensitive form of the receptor*, J. Biol. Chem. **260**(11): 6728-6732 (1985)
- [79] **Dattatreya Murthy, B.; Figgs, L. W.; Reichert, L. E. J.:** *Physical and functional association of follitropin receptors with cholera toxin-sensitive guanine nucleotide-binding protein*, J. Biol. Chem. **262**(24): 11737-11745 (1987)
- [80] **Kinoshita, M.; Uetsuka, N.; Wagai, F.; Watanabe, H.; Uchida, Y.; Kitamura, S.:** *[Measurement of plasma C3a and C5a in patients with various lung diseases and rabbits with endotoxin shock]*, Nippon. Kyobu. Shikkan. Gakkai. Zasshi. **24**: 145-149 (1986)
- [81] **Bielinski, D.; McCrory, M.; Cahill, M.; Polgar, P.; Fishman, J. B.:** *Differential coupling of smooth muscle and liver vasopressin (V1) receptors to guanine nucleotide binding proteins*, Biochem. Biophys. Res. Commun. **151** (3): 1293-1298 (1988)
- [82] **Burg, M.; Raffetseder, U.; Grove, M.; Klos, A.; Köhl, J.; Bautsch, W.:** *G α -16 complements the signal transduction cascade of chemotactic receptors for complement factor C5a (C5aR) and N-formylated peptides (fMLF-R) in Xenopus laevis oocytes: G α -16 couples to chemotactic receptors in Xenopus oocytes*, FEBS Lett. **377**: 426-428 (1995)
- [83] **Boulay, F.; Mery, L.; Tardif, M.; Brouchon, L.; Vignais, P.:** *Expression cloning of a receptor for C5a anaphylatoxin on differentiated HL-60 cells*, Biochemistry **30**: 2993-2999 (1991)
- [84] **Gerard, N. P.; Gerard, C.:** *The chemotactic receptor for human C5a anaphylatoxin*, Nature **349**: 614-617 (1991)
- [85] **Mollison, K. W.; Mandeck, W.; Zuiderweg, E. R.; Fayer, L.; Fey, T. A.; Krause, R. A.; Conway, R. G.; Miller, L.; Edalji, R. P.; Shallcross, M. A.; et, a.:**

- Identification of receptor-binding residues in the inflammatory complement protein C5a by site-directed mutagenesis*, Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A **86**: 292-296 (1989)
- [86] **Mollison, K. W.; Fey, T. A.; Krause, R. A.; Miller, L.; Edalji, R. P.; Conway, R. G.; Mandecki, W.; Shallcross, M. A.; Kawai, M.; Or, Y. S.:** *C5a structural requirements for neutrophil receptor interaction*, Agents Actions Suppl. **35**: 17-21 (1991)
- [87] **Bubeck, P.; Grötzinger, J.; Winkler, M.; Köhl, J.; Wollmer, A.; Klos, A.; Bautsch, W.:** *Site-specific mutagenesis of residues in the human C5a anaphylatoxin which are involved in possible interaction with the C5a receptor*, Eur. J. Biochem. **219**: 897-904 (1994)
- [88] **Hennecke, M.; Otto, A.; Baensch, M.; Kola, A.; Bautsch, W.; Klos, A.; Kohl, J.:** *A detailed analysis of the C5a anaphylatoxin effector domain: selection of C5a phage libraries on differentiated U937 cells*, Eur. J. Biochem. **252**(1): 36-44 (1998)
- [89] **Gerard, C. G.; Chenoweth, D. E.; Hugli, T. E.:** *Molecular aspects of the serum chemotactic factor*, J. Reticuloendothel. Soc. **26**: 711-718 (1979)
- [90] **Gerard, C.; Hugli, T. E.:** *C5a: a mediator of chemotaxis and cellular release reactions*, Kroc. Found. Ser. **14**: 147-160 (1981)
- [91] **Gerard, C.; Hugli, T. E.:** *Identification of classical anaphylatoxin as the des-Arg form of the C5a molecule: evidence of a modulator role for the oligosaccharide unit in human des-Arg74-C5a*, Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A **78**: 1833-1837 (1981)
- [92] **Or, Y. S.; Clark, R. F.; Kawai, M.; Mollison, K. W.; Lane, B.; Luly, J. R.; Carter, G. W.:** *Improvements in the minimum binding sequence of C5a*, Book of Abstracts, 200th ACS National Meeting, Part I (Abstr.). ACS Publishing Wa : (1990)
- [93] **Morgan, E. L.; Sanderson, S.; Scholz, W.; Noonan, D. J.; Weigle, W. O.; Hugli, T. E.:** *Identification and characterization of the effector region within human C5a responsible for stimulation of IL-6 synthesis*, J. Immunol. **148**: 3937-3942 (1992)
- [94] **Kohl, J.; Lubbers, B.; Klos, A.; Bautsch, W.; Casaretto, M.:** *Evaluation of the C-terminal C5a effector site with short synthetic C5a analog peptides*, Eur. J. Immunol. **23**: 646-652 (1993)
- [95] **Konteatis, Z. D.; Siciliano, S. J.; Van Riper, G.; Molineaux, C. J.; Pandya, S.; Fischer, P.; Rosen, H.; Mumford, R. A.; Springer, M. S.:** *Development of C5a receptor antagonists. Differential loss of functional responses*, J. Immunol. **153**: 4200-4205 (1994)
- [96] **Oppermann, M.; Raedt, U.; Hebell, T.; Schmidt, B.; Zimmermann, B.; Gotze, O.:** *Probing the human receptor for C5a anaphylatoxin with site-directed antibodies. Identification of a potential ligand binding site on the NH₂-terminal domain*, J. Immunol. **151**: 3785-3794 (1993)
- [97] **Morgan, E. L.; Ember, J. A.; Sanderson, S. D.; Scholz, W.; Buchner, R.; Ye, R. D.; Hugli, T. E.:** *Anti-C5a receptor antibodies. Characterization of neutralizing antibodies specific for a peptide, C5aR-(9-29), derived from the predicted amino-terminal sequence of the human C5a receptor*, J. Immunol. **151**: 377-388 (1993)
- [98] **Mery, L.; Boulay, F.:** *Evidence that the extracellular N-terminal domain of C5aR contains amino-acid residues crucial for C5a binding*, Eur. J. Haematol. **51**: 282-287 (1993)

- [99] **DeMartino, J. A.; Van Riper, G.; Siciliano, S. J.; Molineaux, C. J.; Konteatis, Z. D.; Rosen, H.; Springer, M. S.:** *The amino terminus of the human C5a receptor is required for high affinity C5a binding and for receptor activation by C5a but not C5a analogs*, J. Biol. Chem. **269**: 14446-14450 (1994)
- [100] **Chen, Z.; Zhang, X.; Gonnella, N. C.; Pellas, T. C.; Boyar, W. C.; Ni, F.:** *Residues 21-30 within the extracellular N-terminal region of the C5a receptor represent a binding domain for the C5a anaphylatoxin*, J. Biol. Chem. **273**(17): 10411-10419 (1998)
- [101] **Grotzinger, J.; Engels, M.; Jacoby, E.; Wollmer, A.; Strassburger, W.:** *A model for the C5a receptor and for its interaction with the ligand [corrected] [published erratum appears in Protein Eng 1991 Dec;4(8):1021]*, Protein Eng. **4**: 767-771 (1991)
- [102] **Roper, D.; Jacoby, E.; Kruger, P.; Engels, M.; Grotzinger, J.; Wollmer, A.; Strassburger, W.:** *Modeling of G-protein coupled receptors with bacteriorhodopsin as a template. A novel approach based on interaction energy differences*, J. Recept. Res. **14**(3-4): 167-186 (1994)
- [103] **Monk, P. N.; Barker, M. D.; Partridge, L. J.; Pease, J. E.:** *Mutation of glutamate 199 of the human C5a receptor defines a binding site for ligand distinct from the receptor N terminus*, J. Biol. Chem. **270**: 16625-16629 (1995)
- [104] **DeMartino, J. A.; Konteatis, Z. D.; Siciliano, S. J.; Van Riper, G.; Underwood, D. J.; Fischer, P. A.; Springer, M. S.:** *Arginine 206 of the C5a receptor is critical for ligand recognition and receptor activation by C-terminal hexapeptide analogs*, J. Biol. Chem. **270**: 15966-15969 (1995)
- [105] **Caporale, L. H.; Tippett, P. S.; Erickson, B. W.; Hugli, T. E.:** *The active site of C3a anaphylatoxin*, J Biol. Chem. **255**: 10758-10763 (1980)
- [106] **Unson, C. G.; Erickson, B. W.; Hugli, T. E.:** *Active site of C3a anaphylatoxin: contributions of the lipophilic and orienting residues*, Biochemistry **23**: 585-589 (1984)
- [107] **Lu, Z. X.; Fok, K. F.; Erickson, B. W.; Hugli, T. E.:** *Conformational analysis of COOH-terminal segments of human C3a. Evidence of ordered conformation in an active 21-residue peptide*, J Biol. Chem. **259**: 7367-7370 (1984)
- [108] **Kola, A.; Klos, A.; Bautsch, W.; Kretzschmar, T.; Köhl, J.:** *Functional activities of synthetic anaphylatoxic peptides in widely used biological assays*, Clin. Exp. Immunol. **88**: 368-372 (1992)
- [109] **Ember, J. A.; Johansen, N. L.; Hugli, T. E.:** *A new approach to designing active analogues of proteins*, Biochem. Soc. Trans. **18**(6): 1154-1155 (1990)
- [110] **Ames, R. S.; Li, Y.; Sarau, H. M.; Nuthulaganti, P.; Foley, J. J.; Ellis, C.; Zeng, Z.; Su, K.; Jurewicz, A. J.; Hertzberg, R. P.; Bergsma, D. J.; Kumar, C.:** *Molecular cloning and characterization of the human anaphylatoxin C3a receptor*, J. Biol. Chem. **271**(34): 20231-20234 (1996)
- [111] **Huber, R.; Scholze, H.; Paques, E. P.; Deisenhofer, J.:** *Crystal structure analysis and molecular model of human C3a anaphylatoxin*, Hoppe Seylers. Z. Physiol. Chem. **361**: 1389-1399 (1980)
- [112] **Deutsch, H. H.; Chung, J.; Kalthoff, F. S.:** *Function of the human interleukin 4 receptor (IL-4R)-derived acidic motif revealed by cytoplasmic domain chimeras of the IL-4R alpha chain and the IL-2R beta chain*, Cytokine. **10**(5): 331-336 (1998)

- [113] **Rossi, A. G.; Haslett, C.; Hirani, N.; Greening, A. P.; Rahman, I.; Metz, C. N.; Bucala, R.; Donnelly, S. C.:** *Human circulating eosinophils secrete macrophage migration inhibitory factor (MIF). Potential role in asthma*, J. Clin. Invest. **101**(12): 2869-2874 (1998)
- [114] **Perez, H. D.; Holmes, R.; Vilander, L. R.; Adams, R. R.; Manzana, W.; Jolley, D.; Andrews, W. H.:** *Formyl peptide receptor chimeras define domains involved in ligand binding*, J. Biol. Chem. **268**: 2292-2295 (1993)
- [115] **Pease, J. E.; Burton, D. R.; Barker, M. D.:** *Generation of chimeric C5a/formyl peptide receptors: towards the identification of the human C5a receptor binding site*, Eur. J. Immunol. **24**: 211-215 (1994)
- [116] **Bautsch, W.; Emde, M.; Kretzschmar, T.; Köhl, J.; Suckau, D.; Bitter-Suermann, D.:** *Human C5a anaphylatoxin: Gene cloning and expression in Escherichia coli*, Immunobiology **185**: 41-52 (1992)
- [117] **Raffetseder, U.; Roper, D.; Mery, L.; Gietz, C.; Klos, A.; Grotzinger, J.; Wollmer, A.; Boulay, F.; Kohl, J.; Bautsch, W.:** *Site-directed mutagenesis of conserved charged residues in the helical region of the human C5a receptor. Arg206 determines high-affinity binding sites of C5a receptor*, Eur. J. Biochem. **235**: 82-90 (1996)
- [118] **Hanahan, D.:** *Studies on transformation of Escherichia coli with plasmids*, Journal of Molecular Biology **166**(4): 557-580 (1983)
- [119] **Akada, R.:** *Quick-check method to test the size of Escherichia coli plasmids*, Biotechniques **17**(1): 58-(1994)
- [120] **Birnboim, H. C.; Doly, J.:** *A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA*, Nucl. Acids Res. **7**: 1513-1513 (1979)
- [121] **Sambrook, J.; Fritsch, E. F.; Maniatis, T.:** *Extraction and purification of RNA*, **2**(7): 7-7 (1989)
- [122] **Saiki, R. K.; Scharf, S.; Faloona, F.; Mullis, K. B.; Horn, G. T.; Erlich, H. A.; Arnheim, N.:** *Enzymatic amplification of beta-globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia*, Science **230**(4732): 1350-1354 (1985)
- [123] **Sanger, F.; Nicklen, S.; Coulson, A. R.:** *DNA sequencing with chain-terminating inhibitors*, Proceedings in National Academy of Science **74**(12): 5463-5467 (1977)
- [124] **Bradford, M. M.:** *A Rapid and Sensitive Method for the Quantitation of Microgram Quantities of Protein Utilizing the Principle of Protein-Dye Binding*, Analytical Biochemistry **72**: 248-254 (1976)
- [125] **Laemmli, U. K.:** *Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4*, Nature **227**(259): 680-685 (1970)
- [126] **Meuer, S.; Zanker, B.; Hadding, U.; Bitter-Suermann, D.:** *Low zone desensitization: a stimulus-specific control mechanism of cell response. Investigations on anaphylatoxin-induced platelet secretion*, J Exp. Med. **155**: 698-710 (1982)
- [127] **Gerard, N. P.; Gerard, C.:** *Construction and expression of a novel recombinant anaphylatoxin, C5a-N19, as a probe for the human C5a receptor*, Biochemistry **29**: 9274-9281 (1990)

- [128] **Sohns, B.; Westermann, J.; Frank, R.; Grove, M.; Köhl, J.; Klos, A.; Bautsch, W.:** *A murine monoclonal antibody against the human C3a-receptor: high expression on non-myeloid cells of human placenta*, eingereicht (1998)
- [129] **Munson, P. J.; Rodbard, D.:** *LIGAND: A versatile computerized approach for characterization of ligand-binding systems*, *Analytical Biochemistry* **107**: 220-239 (1980)
- [130] **Boulay, F.; Tardif, M.; Brouchon, L.; Vignais, P.:** *The Human N-Formylpeptide Receptor. Characterisation of two cDNA Isolates and Evidence for a New Subfamily of G-Protein-Coupled Receptors*, *Biochemistry* **29**: 11123-11133 (1990)
- [131] **Malik, N.; Kallestad, J. C.; Gunderson, N. L.; Austin, S. D.; Neubauer, M. G.; Ochs, V.; Marquardt, H.; Zarling, J. M.; Shoyab, M.; Wei, C. M.:** *Molecular cloning, sequence analysis, and functional expression of a novel growth regulator, oncostatin M*, *Mol. Cell Biol.* **9**(7): 2847-2853 (1989)
- [132] **Kyte, J.; Doolittle, R. F.:** *A simple method for displaying the hydropathic character of a protein*, *Journal of Molecular Biology* **157**(1): 105-132 (1982)
- [133] **Zarling, J. M.; Shoyab, M.; Marquardt, H.; Hanson, M. B.; Lioubin, M. N.; Todaro, G. J.:** *Oncostatin M: a growth regulator produced by differentiated histiocytic lymphoma cells*, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **83**(24): 9739-9743 (1986)
- [134] **Brown, T. J.; Lioubin, M. N.; Marquardt, H.:** *Purification and characterization of cytostatic lymphokines produced by activated human T lymphocytes. Synergistic antiproliferative activity of transforming growth factor beta 1, interferon-gamma, and oncostatin M for human melanoma cells*, *J. Immunol.* **139**(9): 2977-2983 (1987)
- [135] **Linsley, P. S.; Bolton-Hanson, M.; Horn, D.; Malik, N.; Kallestad, J. C.; Ochs, V.; Zarling, J. M.; Shoyab, M.:** *Identification and characterization of cellular receptors for the growth regulator, oncostatin M*, *J. Biol. Chem.* **264**(8): 4282-4289 (1989)
- [136] **Rose, T. M.; Bruce, A. G.:** *Oncostatin M is a member of a cytokine family that includes leukemia-inhibitory factor, granulocyte colony-stimulating factor, and interleukin 6*, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **88**(19): 8641-8645 (1991)
- [137] **Gearing, D. P.; Bruce, A. G.:** *Oncostatin M binds the high-affinity leukemia inhibitory factor receptor*, *New Biol.* **4**(1): 61-65 (1992)
- [138] **Liu, J.; Modrell, B.; Aruffo, A.; Marken, J. S.; Taga, T.; Yasukawa, K.; Murakami, M.; Kishimoto, T.; Shoyab, M.:** *Interleukin-6 signal transducer gp130 mediates oncostatin M signaling*, *J. Biol. Chem.* **267**(24): 16763-16766 (1992)
- [139] **Bruce, A. G.; Hoggatt, I. H.; Rose, T. M.:** *Oncostatin M is a differentiation factor for myeloid leukemia cells*, *J. Immunol.* **149**: 1271-1275 (1992)
- [140] **Richards, C. D.; Brown, T. J.; Shoyab, M.; Baumann, H.; Gauldie, J.:** *Recombinant oncostatin M stimulates the production of acute phase proteins in HepG2 cells and rat primary hepatocytes in vitro*, *J. Immunol.* **148**: 1731-1736 (1992)
- [141] **Satoh, T.; Nakamura, S.; Taga, T.; Matsuda, T.; Hirano, T.; Kishimoto, T.; Kaziro, Y.:** *Induction of neuronal differentiation in PC12 cells by B-cell stimulatory factor 2/interleukin 6*, *Mol. Cell Biol.* **8**(8): 3546-3549 (1988)
- [142] **Yamamori, T.; Fukada, K.; Aebersold, R.; Korsching, S.; Fann, M. J.; Patterson, P. H.:** *The cholinergic neuronal differentiation factor from heart cells is identical to*

- leukemia inhibitory factor [published erratum appears in Science 1990 Jan 19;247(4940):271]*, *Science* **246**(4936): 1412-1416 (1989)
- [143] **Schwabe, M.; Brini, A. T.; Bosco, M. C.; Rubboli, F.; Egawa, M.; Zhao, J.; Princler, G. L.; Kung, H. F.:** *Disruption by interferon-alpha of an autocrine interleukin-6 growth loop in IL-6-dependent U266 myeloma cells by homologous and heterologous down-regulation of the IL-6 receptor alpha- and beta- chains*, *J. Clin. Invest.* **94**(6): 2317-2325 (1994)
- [144] **Brown, T. J.; Rowe, J. M.; Liu, J. W.; Shoyab, M.:** *Regulation of IL-6 expression by oncostatin M*, *J. Immunol.* **147**(7): 2175-2180 (1991)
- [145] **Brown, T. J.; Liu, J.; Brashem-Stein, C.; Shoyab, M.:** *Regulation of granulocyte colony-stimulating factor and granulocyte-macrophage colony-stimulating factor expression by oncostatin M*, *Blood* **82**(1): 33-37 (1993)
- [146] **Paral, D.; Sohns, B.; Crass, T.; Grove, M.; Kohl, J.; Klos, A.; Bautsch, W.:** *Genomic organization of the human C3a receptor*, *Eur. J. Immunol.* **28**(8): 2417-2423 (1998)
- [147] **Wegenka, U. M.; Buschmann, J.; Luttkicken, C.; Heinrich, P. C.; Horn, F.:** *Acute-phase response factor, a nuclear factor binding to acute-phase response elements, is rapidly activated by interleukin-6 at the posttranslational level*, *Mol. Cell Biol.* **13**(1): 276-288 (1993)
- [148] **Ihn, H.; LeRoy, E. C.; Trojanowska, M.:** *Oncostatin M stimulates transcription of the human alpha2(I) collagen gene via the Sp1/Sp3-binding site*, *J. Biol. Chem.* **272**(39): 24666-24672 (1997)
- [149] **Kozak, M.:** *Possible role of flanking nucleotides in recognition of the AUG initiator codon by eukaryotic ribosomes*, *Nucleic. Acids. Res.* **9**(20): 5233-5262 (1981)
- [150] **Horn, F.; Weare, J.; Beukers, M. W.; Horsch, S.; Bairoch, A.; Chen, W.; Edvardsen, O.; Campagne, F.; Vriend, G.:** *GPCRDB: an information system for G protein-coupled receptors*, *Nucleic. Acids. Res.* **26**(1): 275-279 (1998)
- [151] **Chabre, M.; Deterre, P.:** *Molecular mechanism of visual transduction*, *Eur. J. Biochem.* **179**(2): 255-266 (1989)
- [152] **Dohlman, H. G.; Caron, M. G.; Lefkowitz, R. J.:** *A family of receptors coupled to guanine nucleotide regulatory proteins*, *Biochemistry* **26**(10): 2657-2664 (1987)
- [153] **Roglic, A.; Prossnitz, E. R.; Cavanagh, S. L.; Pan, Z.; Zou, A.; Ye, R. D.:** *cDNA cloning of a novel G protein-coupled receptor with a large extracellular loop structure*, *Biochim. Biophys. Acta* **1305**: 39-43 (1996)
- [154] **Crass, T.; Raffetseder, U.; Martin, U.; Grove, M.; Klos, A.; Kohl, J.; Bautsch, W.:** *Expression cloning of the human C3a anaphylatoxin receptor (C3aR) from differentiated U-937 cells*, *Eur. J. Immunol.* **26**: 1944-1950 (1996)
- [155] **Fukuoka, Y.; Ember, J. A.; Hugli, T. E.:** *Molecular cloning of two isoforms of the guinea pig C3a anaphylatoxin receptor: alternative splicing in the large extracellular loop [In Process Citation]*, *J. Immunol.* **161**(6): 2977-2984 (1998)
- [156] **Fukuoka, Y.; Ember, J. A.; Yasui, A.; Hugli, T. E.:** *Cloning and characterization of the guinea pig C5a anaphylatoxin receptor: interspecies diversity among the C5a receptors*, *Int. Immunol.* **10**(3): 275-283 (1998)

- [157] **Gerard, C.; Bao, L.; Orozco, O.; Pearson, M.; Kunz, D.; Gerard, N. P.:** *Structural diversity in the extracellular faces of peptidergic G- protein-coupled receptors. Molecular cloning of the mouse C5a anaphylatoxin receptor*, J. Immunol. **149**(8): 2600-2606 (1992)
- [158] **Tornetta, M. A.; Foley, J. J.; Sarau, H. M.; Ames, R. S.:** *The mouse anaphylatoxin C3a receptor: molecular cloning, genomic organization, and functional expression*, J. Immunol. **158**(11): 5277-5282 (1997)
- [159] **Fukuoka, Y.; Ember, J. A.; Hugli, T. E.:** *Cloning and characterization of rat C3a receptor: differential expression of rat C3a and C5a receptors by LPS stimulation*, Biochem. Biophys. Res. Commun. **242**(3): 663-668 (1998)
- [160] **Rothermel, E.; Zwirner, J.; Vogt, T.; Rabini, S.; Gotze, O.:** *Molecular cloning and expression of the functional rat C5a receptor*, Mol. Immunol. **34**(12-13): 877-886 (1997)
- [161] **Alvarez, V.; Coto, E.; Setien, F.; Gonzalez, R.; Lopez, L.:** *Molecular evolution of the N-formyl peptide and C5a receptors in non-human primates*, Immunogenetics **44**: 446-452 (1996)
- [162] **Perret, J. J.; Raspe, E.; Vassart, G.; Parmentier, M.:** *Cloning and functional expression of the canine anaphylatoxin C5a receptor. Evidence for high interspecies variability*, Biochemical Journal **288**: 911-917 (1992)
- [163] **Kolakowski, L. F., Jr.; Lu, B.; Gerard, C.; Gerard, N. P.:** *Probing the "message:address" sites for chemoattractant binding to the C5a receptor. Mutagenesis of hydrophilic and proline residues within the transmembrane segments*, J. Biol. Chem. **270**: 18077-18082 (1995)
- [164] **Eason, M. G.; Moreira, S. P.; Liggett, S. B.:** *Four consecutive serines in the third intracellular loop are the sites for beta-adrenergic receptor kinase-mediated phosphorylation and desensitization of the alpha 2A-adrenergic receptor*, J. Biol. Chem. **270**(9): 4681-4688 (1995)
- [165] **Nakata, H.; Kameyama, K.; Haga, K.; Haga, T.:** *Location of agonist-dependent-phosphorylation sites in the third intracellular loop of muscarinic acetylcholine receptors (m2 subtype)*, Eur. J. Biochem. **220**(1): 29-36 (1994)
- [166] **Naik, N.; Giannini, E.; Brouchon, L.; Boulay, F.:** *Internalization and recycling of the C5a anaphylatoxin receptor: evidence that the agonist-mediated internalization is modulated by phosphorylation of the C-terminal domain*, J. Cell Sci. **110**(Pt 18): 2381-2390 (1997)
- [167] **Bock, D.; Martin, U.; Gartner, S.; Rheinheimer, C.; Raffetseder, U.; Arseniev, L.; Barker, M. D.; Monk, P. N.; Bautsch, W.; Kohl, J.; Klos, A.:** *The C terminus of the human C5a receptor (CD88) is required for normal ligand-dependent receptor internalization*, Eur. J. Immunol. **27**(6): 1522-1529 (1997)
- [168] **Giannini, E.; Boulay, F.:** *Phosphorylation, dephosphorylation, and recycling of the C5a receptor in differentiated HL60 cells*, J. Immunol. **154**: 4055-4064 (1995)
- [169] **Hawlich, H.; Frank, R.; Hennecke, M.; Baensch, M.; Sohns, B.; Arseniev, L.; Bautsch, W.; Kola, A.; Klos, A.; Kohl, J.:** *Site-directed C3a receptor antibodies from phage display libraries*, J. Immunol. **160**(6): 2947-2958 (1998)

-
- [170] **Martin, U.; Bock, D.; Arseniev, L.; Tornetta, M. A.; Ames, R. S.; Bautsch, W.; Kohl, J.; Ganser, A.; Klos, A.:** *The human C3a receptor is expressed on neutrophils and monocytes, but not on B or T lymphocytes*, J. Exp. Med. **186**(2): 199-207 (1997)
- [171] **Hugli, T. E.; Kawahara, M. S.; Unson, C. G.; Molinar-Rode, R.; Erickson, B. W.:** *The active site of human C4a anaphylatoxin*, Mol Immunol **20**: 637-645 (1983)
- [172] **Tsuruta, S.; Ito, S.; Mikawa, H.:** *Effects of adenosine and its analogues on actin polymerization in human polymorphonuclear leucocytes*, Clin. Exp. Pharmacol. Physiol. **20**: 89-94 (1993)
- [173] **Ames, R. S.; Tornetta, M. A.; Foley, J. J.; Hugli, T. E.; Sarau, H. M.:** *Evidence that the receptor for C4a is distinct from the C3a receptor*, Immunopharmacology **38**(1-2): 87-92 (1997)
- [174] **Ember, J. A.; Sanderson, S. D.; Taylor, S. M.; Kawahara, M.; Hugli, T. E.:** *Biologic activity of synthetic analogues of C5a anaphylatoxin*, J. Immunol. **148**: 3165-3173 (1992)
- [175] **Singer, M. S.; Shepherd, G. M.; Greer, C. A.:** *Olfactory receptors guide axons [letter]*, Nature **377**(6544): 19-20 (1995)
- [176] **Crass, T.; Bautsch, W.; Cain, S.; Pease, J. E.; Monk, P. N.:** *Receptor activation by human C5a des Arg74 but not intact C5a is dependent on an interaction between Glu199 of the receptor and Lys68 of the ligand*, eingereicht (1998)

6. Anhang

6.1 Der Klon 43/9/37/9 = pTC10

```
1          11          21          31          41          51
|          |          |          |          |          |
CAGGACTCGT GGAGACATCC AGGTGCTGAA GCCTTCAGCT ACTGTCTCAG TTTTTTGAAG    60
TTTAGCAATG GCGTCTTTCT CTGCTGAGAC CAATTCAACT GACCTACTCT CACAGCCATG    120
GAATGAGCCC CCAGTAATTC TCTCCATGGT CATTCTCAGC CTTACTTTTT TACTGGGATT    180
GCCAGGCAAT GGGCTGGTGC TGTGGGTGGC TGGCCTGAAG ATGCAGCGGA CAGTGAACAC    240
AATTTGGTTC CTCCACCTCA CCTTGGCGGA CCTCCTCTGC TGCCTCTCCT TGCCCTTCTC    300
GCTGGCTCAC TTGGCTCTCC AGGGACAGTG GCCCTACGGC AGGTTCCCTAT GCAAGCTCAT    360
CCCCTCCATC ATTGTCCTCA ACATGTTTGC CAGTGTCTTC CTGCTTACTG CCATTAGCCT    420
GGATCGCTGT CTTGTGGTAT TCAAGCCAAT CTGGTGTGAG AATCATCGCA ATGTAGGGAT    480
GGCCTGCTCT ATCTGTGGAT GTATCTGGGT GGTGGCTTTT GTGATGTGCA TTCCTGTGTT    540
CGTGTACCGG GAAATCTTCA CTACAGACAA CCATAATAGA TGTGGCTACA AATTTGGTCT    600
CTCCAGCTCA TTAGATTATC CAGACTTTTA TGGAGATCCA CTAGAAAACA GGTCTCTTGA    660
AAACATTGTT CAGCCGCCCTG GAGAAATGAA TGATAGGTTA GATCCTTCCT CTTTCCAAAC    720
AAATGATCAT CCTTGGACAG TCCCCACTGT CTTCCAACCT CAAACATTTT AAAGACCTTC    780
TGCAGATTCA CTCCCTAGGG GTTCTGCTAG GTTAACAAGT CAAAATCTGT ATTCTAATGT    840
ATTTAAACCT GCTGATGTGG TCTCACCTAA AATCCCCAGT GGGTTTCCTA TTGAAGATCA    900
CGAAACCAGC CCACTGGATA ACTCTGATGC TTTTCTCTCT ACTCATTTAA AGCTGTTCCC    960
TAGCGCTTCT AGCAATTCCT TCTACGAGTC TGAGCTACCA CAAGGTTTCC AGGATTATTA   1020
CAATTTAGGC CAATTCACAG ATGACGATCA AGTGCCAACA CCCCTCGTGG CAATAACGAT   1080
CACTAGGCTA GTGGTGGGTT TCCTGCTGCC CTCTGTTATC ATGATAGCCT GTTACAGCTT   1140
CATTGTCTTC CGAATGCAAA GGGGCCGCTT CGCCAAGTCT CAGAGCAAAA CCTTTCGAGT   1200
GGCCGTGGTG GTGGTGGCTG TCTTTCTTGT CTGCTGGACT CCATACCACA TTTTGGAGT   1260
CCTGTCATTG CTTACTGACC CAGAAACTCC CTTGGGGAAA ACTCTGATGT CCTGGGATCA   1320
TGTATGCATT GCTCTAGCAT CTGCCAATAG TTGCTTTAAT CCCTTCCTTT ATGCCCTCTT   1380
GGGGAAAGAT TTTAGGAAGA AAGCAAGGCA GTCCATTGAG GGAATTCCTGG AGGCAGCCTT   1440
CAGTGAGGAG CTCACACGTT CCACCCACTG TCCCTCAAAC AATGTCATTT CAGAAAGAAA   1500
TAGTACAACT GTGTGAAAAT GTGGAGCAGC CAACAAGCAG GGGCTCTTAG GCAATCACAT   1560
AGTGAAAGTT TATAAGAGGA TGAAGTGATA TGGTGAGCAG CGGACTTCAA AACTGTCAA   1620
AGAATCAATC CAGCGGTTCT CAAACGGTAC ACAGACTATT GGCATCAGCA TCACCTAGAA   1680
ACTTGTTAGA AATGCAAATT CTCAAGCCGC ATCCAGACT TGCTGAATCG GAATCTCTGG   1740
```

1	11	21	31	41	51	
GGGTTGGGAC	CCAGCAAGGG	CACTTAACAA	ACCCCTCGTTT	CTGATTAATG	CTAAATGTAA	1800
GAATCATTGT	AAACATTAGT	TCTATTTCTA	TCCCAAACATA	AGCTATGTGA	AATAAGAGAA	1860
GCTACTTTGT	TTTTAAATGA	TGTTGAATAT	TTGTCGATAT	TTCCATCATT	AAATTTTTC	1920
TTAGCATTGA	AAAAACGTGT	GCAAGCAACA	GTGCTTCTCC	AAAGACATCG	TGGAGAATTA	1980
TTTCATGCGT	GATAGTGCCA	GCAAGGCTGC	CACCGACGCC	CAGGATGCSA	ACCAGTGCTG	2040
CACTAGCTGT	GAGGATAATG	CCCCAGCCAC	CAGCTACTGT	GTGGAGTGCT	CGGAGCCTCT	2100
GTGTGAGACC	TGTGTAGAGG	CGCACCAGCG	GGTGAAGTAC	ACCAAGGACC	ATACTGTGCG	2160
CTCTACTGGG	CCAGCCAAGT	CTCGGGATGG	TGAACGTACT	GTCTATTGCA	ACGTACACAA	2220
GCATGAACCC	CTTGTGCTGT	TTTGTGAGAG	CTGTGATACT	CTCACCTGCC	GAGACTGCCA	2280
GCTCAATGCC	CACAAGGACC	ACCAGTACCA	GTTCTTAGAG	GATGCAGTGA	GGAACCAGCG	2340
CAAGCTCCTG	GCCTCACTGG	TGAAGCGCCT	TGGGGACAAA	CATGCAACAT	TGCAGAAGAG	2400
CACCAAGGAG	GTTTCGACGT	CAATCCGCCA	GGTGTCTGAC	GTACAGAAGC	GTGTGCAAGT	2460
GGATGTCAAG	ATGGCCATCC	TGCAGATCAT	GAAGGAGCTG	AATAAGCGGG	GCCGTGTGCT	2520
GGTCAATGAT	GCCCAGAAGG	TGACTGAGGG	GCAGCAGGAG	CGCCTGGAGC	GGCAGCACTG	2580
GACCATGACC	AAGATCCAGA	AGCACCAGGA	GCACATTCTG	CGCTTTGCCT	CTTGGGCTCT	2640
GGAGAGTGAC	AACAACACAG	CCCTTTTGCT	TTCTAAGAAG	TTGATCTACT	TCCAGCTGCA	2700
CCGGGCCCTC	AAGATGATTG	TGGATCCCGT	GGAGCCACAT	GGCGAGATGA	AGTTTCAGTG	2760
GGACCTCAAT	GCCTGGACCA	AGAGTGCCGA	GGCCTTTGGC	AAGATTGTGG	CAGAGCGTCC	2820
TGGCACTAAC	TCAACAGGCC	CTGCACCCAT	GGCCCTCCA	AGAGCCCAG	GGCCCTGAG	2880
CAAGCAGGGC	TCTGGCAGCA	GCCAGCCCAT	GGAGGTGCAG	GAAGGCTATG	GCTTTGGGTC	2940
AGGAGATGAT	CCCTACTCAA	GTGCAGAGCC	CCATGTGTCA	GGTGTGAAAC	GGTCCCCTC	3000
AGGTGAGGGC	GAGGTGAGCG	GCCTTATGCG	CAAGGTGCCA	CGAGTGAGCC	TTGAACGCC	3060
GGACCTGGAC	CTCACAGCTG	ACAGCCAGCC	ACCCGTCTTC	AAGGTCTTCC	CAGGCAGTAC	3120
CACTGAGGAC	TACAACCTTA	TTGTTATTGA	ACGTGGCGCT	GCCGCTGCAG	CTACCGCCA	3180
GCCAGGGACT	GCGCCTGCAG	GAACCCCTGG	TGCCCCACCC	CTGGCTGGCA	TGGCCATTGT	3240
CAAGGAGGAG	GAGACGGAGG	CTGCCATTGG	AGCCCTCCT	ACTGCCACTG	AGGGCCCTGA	3300
GACCAAACCT	GTGCTTATGG	CTCTTGCGGA	GGTCTCTGGT	GCTGAGGGTC	CCCGCTGGC	3360
CTCACCTAGT	GGCAGCACCA	GCTCAGGGCT	GGAGGTGGTG	GCTCCTGAGG	GTACCTCAGC	3420
CCCAGGTGGT	GGCCCGGAA	CCCTGGATGA	CAGTGCCACC	ATTTGCCGTG	TCTGCCAGAA	3480
GCCAGGCGAT	CTGGTTATGT	GCAACCAGTG	TGAGTTTGT	TTCCACCTGG	ACTGTCACCT	3540
GCCGGCCCTG	CAGGATGTAC	CAGGGGAGGA	GTGGAGCTGC	TCACTCTGCC	ATGTGCTCCC	3600
TGACCTGAAG	GAGGAGGATG	GCAGCCTCAG	CCTGGATGGT	GCAGACAGCA	CTGGCGTGGT	3660
GGCCAAGCTC	TCACCAGCCA	ACCAGCGGAA	ATGTGAGCGT	GTACTGCTGG	CCCTATTCTG	3720

1	11	21	31	41	51	
TCACGAACCC	TGCCGCCCCC	TGCATCAGCT	GGCTACCGAC	TCCACCTTCT	CCCTGGACCA	3780
GCCCGGTGGC	ACCCTGGATC	TGACCCTGAT	CCGTGCCCGC	CTCCAGGAGA	AGTTGTCACC	3840
TCCCTACAGC	TCCCCACAGG	AGTTTGCCCA	GGATGTGGGC	CGCATGTTCA	AGCAATTCAA	3900
CAAGTTAACT	GAGGACAAGG	CAGACGTGCA	GTCCATCATC	GGCCTGCAGC	GCTTCTTCGA	3960
GACGCGCATG	AACGAGGCCT	TCGGTGACAC	CAAGTTCTCT	GCTGTGCTGG	TGGAGCCCCC	4020
GCCGATGAGC	CTGCCTGGTG	CTGGCCTGAG	TTCCCAGGAG	CTGTCTGGTG	GCCCTGGTGA	4080
TGGCCCCTGA	GGCTGGAGCC	CCCATGGCCA	GCCCAGCCTG	GCTCTGTTCT	CTGTCTGTGC	4140
ACCCCATCCC	CACTCCCCTG	GTGGCCTGAC	TCCCCTCCC	TGGTGGCCCC	ATCCCCCAGT	4200
TCCTCACGAT	ATGGTTTTTA	CTTCTGTGGA	TTTAATAAAA	ACTTCACCAG	TTCAAAAAAA	4260
AAAAAAAAAA	AAAAAA					4276

Das Startcodon **ATG** ist fett und unterstrichen, das Stoppcodon *TAG* kursiv und unterstrichen dargestellt.

6.2 Das offene Leseraster der C3aR-cDNA pTC10¹

ATGGCGTCTTTCTCTGCTGAGACCAATTCAACTGACCTACTCTCACAGCCATGGAATGAG <i>MetAlaSerPheSerAlaGluThrAsnSerThrAspLeuLeuSerGlnProTrpAsnGlu</i>	60 20
CCCCAGTAATTCTCTCCATGGTCATTCTCAGCCTTACTTTTTACTGGGATTGCCAGGC <i>ProProValIleLeuSerMetValIleLeuSerLeuThrPheLeuLeuGlyLeuProGly</i>	120 40
AATGGGCTGGTGTGTGGGTGGCTGGCCTGAAGATGCAGCGGACAGTGAACACAATTTGG <i>AsnGlyLeuValLeuTrpValAlaGlyLeuLysMetGlnArgThrValAsnThrIleTrp</i>	180 60
TTCCTCCACCTCACCTTGGCGGACCTCCTCTGCTGCCTCTCCTTGCCCTTCTCGCTGGCT <i>PheLeuHisLeuThrLeuAlaAspLeuLeuCysCysLeuSerLeuProPheSerLeuAla</i>	240 80
CACTTGGCTCTCCAGGGACAGTGGCCCTACGGCAGGTTTCCTATGCAAGTCATCCCCTCC <i>HisLeuAlaLeuGlnGlyGlnTrpProTyrGlyArgPheLeuCysLysLeuIleProSer</i>	300 100
ATCATTGTCTCAACATGTTTGCCAGTGTCTTCTGCTTACTGCCATTAGCTGGATCGC <i>IleIleValLeuAsnMetPheAlaSerValPheLeuLeuThrAlaIleSerLeuAspArg</i>	360 120
TGTCTTGTGGTATTCAAGCCAATCTGGTGTGAGAATCATCGCAATGTAGGGATGGCCTGC <i>CysLeuValValPheLysProIleTrpCysGlnAsnHisArgAsnValGlyMetAlaCys</i>	420 140
TCTATCTGTGGATGTATCTGGGTGGTGGCTTTTGTGATGTGCATTCCCTGTGTTCTGTGAC <i>SerIleCysGlyCysIleTrpValValAlaPheValMetCysIleProValPheValTyr</i>	480 160
CGGGAAATCTTCACTACAGACAACCATAATAGATGTGGCTACAAATTTGGTCTCTCCAGC <i>ArgGluIlePheThrThrAspAsnHisAsnArgCysGlyTyrLysPheGlyLeuSerSer</i>	540 180
TCATTAGATTATCCAGACTTTTATGGAGATCCACTAGAAAACAGGTCTCTTGAAAACATT <i>SerLeuAspTyrProAspPheTyrGlyAspProLeuGluAsnArgSerLeuGluAsnIle</i>	600 200
GTTCAGCCGCTGGAGAAATGAATGATAGGTTAGATCCTTCTCTTTCCAAACAAATGAT <i>ValGlnProProGlyGluMetAsnAspArgLeuAspProSerSerPheGlnThrAsnAsp</i>	660 220
CATCCTTGGACAGTCCCCACTGTCTTCCAACCTCAAACATTTCAAAGACCTTCTGCAGAT <i>HisProTrpThrValProThrValPheGlnProGlnThrPheGlnArgProSerAlaAsp</i>	720 240
TCACTCCCTAGGGTTCTGCTAGGTTAACAAGTCAAACATCTGTATTCTAATGTATTTAAA <i>SerLeuProArgGlySerAlaArgLeuThrSerGlnAsnLeuTyrSerAsnValPheLys</i>	780 260
CCTGCTGATGTGGTCTCACCTAAAATCCCCAGTGGGTTTCTATTGAAGATCACGAAACC <i>ProAlaAspValValSerProLysIleProSerGlyPheProIleGluAspHisGluThr</i>	840 280
AGCCCACTGGATAACTCTGATGCTTTTCTCTCTACTCATTTAAAGCTGTTCCCTAGCGCT <i>SerProLeuAspAsnSerAspAlaPheLeuSerThrHisLeuLysLeuPheProSerAla</i>	900 300
TCTAGCAATTCCTTCTACGAGTCTGAGCTACCACAAGGTTTCAGGATTATTACAATTTA <i>SerSerAsnSerPheTyrGluSerGluLeuProGlnGlyPheGlnAspTyrTyrAsnLeu</i>	960 320
GGCCAATTCACAGATGACGATCAAGTGCCAACACCCCTCGTGGCAATAACGATCACTAGG <i>GlyGlnPheThrAspAspGlnValProThrProLeuValAlaIleThrIleThrArg</i>	1020 340
CTAGTGGTGGGTTTCTGCTGCCCTCTGTATCATGATAGCCTGTTACAGCTTCATTGTC <i>LeuValValGlyPheLeuLeuProSerValIleMetIleAlaCysTyrSerPheIleVal</i>	1080 360
TTCCGAATGCAAAGGGGCCGCTTCGCCAAGTCTCAGAGCAAAACCTTTTCGAGTGGCCGTG <i>PheArgMetGlnArgGlyArgPheAlaLysSerGlnSerLysThrPheArgValAlaVal</i>	1140 380
GTGGTGGTGGCTGTCTTCTTGTCTGCTGGACTCCATACCACATTTTGGAGTCTGTCA <i>ValValValAlaValPheLeuValCysTrpThrProTyrHisIlePheGlyValLeuSer</i>	1200 400
TTGCTTACTGACCCAGAACTCCCTTGGGGAAAACCTCTGATGTCCTGGGATCATGTATGC <i>LeuLeuThrAspProGluThrProLeuGlyLysThrLeuMetSerTrpAspHisValCys</i>	1260 420

¹ Zugriffsnummer für die EMBL-Nukleotid-Datenbank: Z73157

ATTGCTCTAGCATCTGCCAATAGTTGCTTTAATCCCTTCCTTTATGCCCTCTTGGGGAAA	1320
<i>IleAlaLeuAlaSerAlaAsnSerCysPheAsnProPheLeuTyrAlaLeuLeuGlyLys</i>	440
GATTTTAGGAAGAAAGCAAGGCAGTCCATTTCAGGGAATTCTGGAGGCAGCCTTCAGTGAG	1380
<i>AspPheArgLysLysAlaArgGlnSerIleGlnGlyIleLeuGluAlaAlaPheSerGlu</i>	460
GAGCTCACACGTTCCACCCACTGTCCCTCAAACAATGTCATTTTCAGAAAGAAATAGTACA	1440
<i>GluLeuThrArgSerThrHisCysProSerAsnAsnValIleSerGluArgAsnSerThr</i>	480
ACTGTGTGA	1449
<i>ThrVal---</i>	482

Mutmaßliche transmembranöse Bereiche sind grau unterlegt (nach [150]), potentielle N-Glykosylierungsstellen sind unterstrichen dargestellt.

6.3 Sequenzvergleich chemotaktischer Rezeptoren

CLUSTAL W (1.74) multiple sequence alignment

```

hsC5aR      ---MNSFNYTTPDYGHYDDKD-----TLDLNTPVDKTSNTLRVPDILALVIFAVVFL 49
hsC3aR      -----MASFS-----AETN-----STDLLS-QPWNEP----PVILSMVILSLTFL 35
hsfMLPR     -----METN-----SSLPTNISGGTPAVSAGYLFLDIITYLVFVAVTFV 38
hsNKAR      -----MGTCDIVTEANIS-----SGPESNTTGITAFSMP-SWQLALWAPAYLALVL 45
hsIL-8RA    -----MSNITDPQMWDFDDLN----FTGMPPADEDYSPCMELETETLNKYVVI IAYALVFL 51
hsIL-8RB    MEDFNMESDSFEDFWKGEDLSNYSYSSTLPPFLLDAAPCEPESELEINKYFVVIIYALVFL 60
              : . . . . . :
hsC5aR      VGVLGNALVVWVTAF-EAKRTINAIWFLNLAVADFLSCLALPILFTSIVQHHHWPFGGAA 108
hsC3aR      LGLPGNGLVWVAGL-KMQRVTNTIWFHLHLTLADLLCCLSLPFSLAHLALQGQWPYGRFL 94
hsfMLPR     LGVLGNGLVIWVAGF-RMTHVTVTIISYLNLAVADFCFTSTLPFFMVRKAMGGHWPFGWFL 97
hsNKAR      VAVTGNAIWIWII LAHRRMRTVTNYFIVNLALADLCMAAFNAAFNFVYASHNIWYFGRAF 105
hsIL-8RA    LSLLGNSLVMLVILYSRVGRSVTDVYLLNLALADLLFALTLPIWAASKVNG--WIFGTFL 109
hsIL-8RB    LSLLGNSLVMLVILYSRVGRSVTDVYLLNLALADLLFALTLPIWAASKVNG--WIFGTFL 118
              :.: **.:*: : . :.: . :*:*:*: . . * :*
hsC5aR      CSILPSLILLNMYASILLLATISADRFLLVFKPIWCQNFRGAGLAWIACAVAWGLALLLT 168
hsC3aR      CKLIPSIIVLNMFASVFLLTALISLDRCLVVFVKPIWCQHRNVGMACSI CGCIWVVAFVMC 154
hsfMLPR     CKFVFTIVDINLFGSVFLIALIALDRVCVLPVWTVQNHRTVSLAKKVIIGPWVMAALLLT 157
hsNKAR      CYFQNLFPITAMFVSIYSMTAIAADRYMAIVHPFQPRL--SAPSTKAVIAGIWLVALALA 163
hsIL-8RA    CKVVSLLKEVNFYSGILLLACISVDRYLAIVHATRITLT-QKRHLVKFVCLGCWGLSMNLS 168
hsIL-8RB    CKVVSLLKEVNFYSGILLLACISVDRYLAIVHATRITLT-QKRYLVKFICLSIWGLSLLLA 177
              * . : :.: .: :*: ** : :.: . * :.: :
hsC5aR      IPSFLYRVVREEYFPPKVLGVDYS----- 193
hsC3aR      IPVFVYREIFTTDN--HNRCGYKFGLSLSDYPDFYGDPLENRSLENI VQPPGEMNDRLD 212
hsfMLPR     LPVIIRVTTVPKGTG-TVACTFNFSP----- 182
hsNKAR      SPQCFYSTVTMDQG--ATKCVVAVP----- 186
hsIL-8RA    LPFFLFRQAYHPNNS-SPVCYEVLG----- 192
hsIL-8RB    LPVLLFRRTVYSSNV-SPACYEDMG----- 201
              * . *
hsC5aR      -----HD-----KRRER----- 200
hsC3aR      PSSFQTNNDHPWTVPTVFQPTFORPSADSLPRGSARLTSQNLYSNVFKPADVVSPKIPSG 272
hsfMLPR     ----WTNDP-----KERIKVAVAM----- 197
hsNKAR      -----ED-----SGGKT----- 193
hsIL-8RA    -----ND-----TAKWR----- 199
hsIL-8RB    -----NN-----TANWR----- 208
              .:
hsC5aR      ----- 332
hsC3aR      FPIEDHETSPLDNSDAFLSTHLKLFPSASSNSFYESELPQGFQDYYNLQGFTDDDQVPTP
hsfMLPR     -----
hsNKAR      -----
hsIL-8RA    -----
hsIL-8RB    -----
hsC5aR      --AVAIVRVLVGLFWPLLTITICYTFILLRTWS-----RRATRS-TKTLKVVV 245
hsC3aR      LVAITITRLVVGFLLPVIMACYSFIVFRMQR-----GRFAKSQSKTFRVAV 380
hsfMLPR     LTVRGIIRFIIIGFSAPMSIVAVSYGLIATKIHK-----QGLIKS-SRPLRVLS 244
hsNKAR      LLLYHLVVALIYFPLAVMFVAYSVIGLTLWRRRAVPGHQAHGANLRHLQAKKKFVKTMV 253
hsIL-8RA    MVLRLILPHTFGFIVPLFVMLFCYGFTRLRFLFK-----AHMGQK-HRAMRVIF 245
hsIL-8RB    MLLR-ILPQSFGFIVPLLIMLFCYGFTRLRFLFK-----AHMGQK-HRAMRVIF 254
              : . : * : .* . : : :.:

```

```

hsC5aR      AVVASFFIFWLPYQVTGIMMSFLEPSSP-----TFLLLNKLDSLCVSFAYINCCINPIIY 300
hsC3aR      VVVAVFLVCWTPYHIFGVLSLLTDPETP-----LGKTLMSWDHVCIALASANSFCNPFPLY 435
hsfMLPR     FVAAAFFLCWSPYQVVALIATVRIRELLQG---MYKEIGIAVDVTSALAFFNSCLNPMLY 301
hsNKAR      LVVLTFAICWLPYHLYFILGSFQEDIYC-----HKFIQQVYLALFWLAMSSTMYNPIIY 307
hsIL-8RA   AVVLIIFLLCWLPYNLVLLADTLMRTQVIQESCERRNNIGRALDATEILGFLHSCLNPIIY 305
hsIL-8RB   AVVLIIFLLCWLPYNLVLLADTLMRTQVIQETCERRNHIDRALDATEILGILHSCLNPLIY 314
           * . * : * **:: : . : : . **::*
```

```

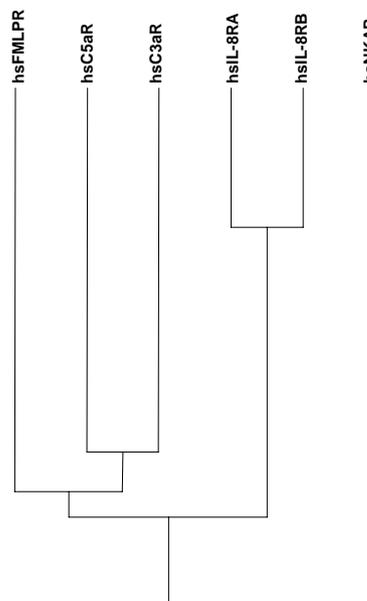
hsC5aR      VVAGQGFQGRLRKSLP-----SLLRNVLTEESVVRESKSFTRS 338
hsC3aR      ALLGKDFRKKARQSIQ-----GILEAAFSEELTRSTHCPSTNN- 472
hsfMLPR     VFMGQDFRERLIHALP-----ASLERALTEDSTQTSDTATNST 339
hsNKAR      CCLNHRFRSGFRLAFRCPPWVTPTKEDKLELTPPTSLSTRVNRCHTKETLFMAGDTAPSE 367
hsIL-8RA   AFIGQNFRRHGFLKIL-----AMHGLVSKEFLARHRVTSYT- 340
hsIL-8RB   AFIGQKFRHGLLKIL-----AIHGLISKDSLPKDSRPSFVG 350
           .: *: : : . : : : .
```

```

hsC5aR      TVDTMAQKTQAV----- 350
hsC3aR      VISERNSTTV----- 482
hsfMLPR     LPSAEVALQAK----- 350
hsNKAR      ATSGEAGRPQDGSGLWFGYGLLAPTHTHVEI 398
hsIL-8RA   SSSVNVSSNL----- 350
hsIL-8RB   SSSGHTSTTL----- 360
```

```

Sequence 1: hsC5aR      350 aa
Sequence 2: hsC3aR      482 aa
Sequence 3: hsfMLPR     350 aa
Sequence 4: hsNKAR      398 aa
Sequence 5: hsIL-8RB    360 aa
Sequence 6: hsIL-8RA    350 aa
Sequences (1:2) Aligned. Score: 32 (36)
Sequences (1:3) Aligned. Score: 28 (32)
Sequences (1:4) Aligned. Score: 21
Sequences (1:5) Aligned. Score: 23
Sequences (1:6) Aligned. Score: 22
Sequences (2:3) Aligned. Score: 30
Sequences (2:4) Aligned. Score: 16
Sequences (2:5) Aligned. Score: 21
Sequences (2:6) Aligned. Score: 19
Sequences (3:4) Aligned. Score: 18
Sequences (3:5) Aligned. Score: 26
Sequences (3:6) Aligned. Score: 25
Sequences (4:5) Aligned. Score: 18
Sequences (4:6) Aligned. Score: 22
Sequences (5:6) Aligned. Score: 75
```



Mutmaßliche transmembranöse Bereiche sind grau unterlegt (nach [150]). Die in Klammern angegebenen Homologiegrade wurden unter Auslassung der 2. EL des C3aRs gewonnen; gleiches gilt für das *average distance*-Dendrogramm (rechts).

6.4 Sequenzvergleich humaner C3aR / humaner C5aR

CLUSTAL W (1.74) multiple sequence alignment

```

hsC5aR      MNSFNYPDYGHYDDKDTLDLNTVPDKTSNTLRVPDLALVIFAVVFLVGLGNALVVW 60
hsC3aR      MASFSAET-----NSTDLSQPWNEP-----PVILSMVILSLTFLLGLPGNGLVLW 46
          *  *  *      *      *      *      *      *      *      *      *      *      *      *      *      *
          *  *  *      *      *      *      *      *      *      *      *      *      *      *      *

hsC5aR      VTAFEAKRTINAIWFLNLAVADFLSCLALPILFTSIVQHHHWPFGGAACSILPSLILLNM 120
hsC3aR      VAGLKMQRTVNTIWFLHLTLADLLCCLSLPFSLAHLALQGQWPYGRFLCKLIPSIIIVLNM 106
          *  *  *      *      *      *      *      *      *      *      *      *      *      *      *

hsC5aR      YASILLLATISADRFLLVFKPIWCQNFRAGLAWIACAVAWGLALLLTIPSFLYR|AVAI 204
hsC3aR      FASVFLLTAISLDRCLVVFKPIWCQHRNVGMACSICGCIWVVAFVMCIPVFVYR|AITI 338
          *  *  *      *      *      *      *      *      *      *      *      *      *      *      *

hsC5aR      VRLVLGFLWPLLLTLTICYTFILLRTWSRRATRS-TTKLKVVVAVVASFFIFWLPYQVTGI 263
hsC3aR      TRLVVGFLLPSVIMIACYSFIVFRMQRGRFAKSQSKTFRVAVVVAVFLVCWTPYHIFGV 398
          *  *  *      *      *      *      *      *      *      *      *      *      *      *      *

hsC5aR      MMSFLEPSSPTFLLLNKLDSLCVSFAYINCCINPIIYVVAGQGFQGRLKSLPSLLRNVL 323
hsC3aR      LSLLTDPETPLGKTLMSWDHVCIALASANSCFNPFLYALLGKDFRKKARQSIQGILEAAF 458
          :  *  *      *      *      *      *      *      *      *      *      *      *      *      *

hsC5aR      TEESVVRESKSFTRSTVDTMAQKTQAV 350
hsC3aR      SEE-LTRSTHCPSNNVIS--ERNSTTV 482
          *  *  *      *      *      *      *      *      *      *      *      *      *      *
    
```

Sequence 1: hsC5aR 325 aa
 Sequence 2: hsC3aR 309 aa
 Sequences (1:2) Aligned. Score: 36

Mutmaßliche transmembranöse Bereiche sind grau unterlegt (nach [150]); polare oder geladene Reste in den TM-Bereichen sind **fett** gedruckt. Die 2. ELs beider Rezeptoren wurden aus der Gegenüberstellung herausgenommen; die entstandene Lücke ist durch einen senkrechten Strich | markiert.


```

Sequence 1: hsC3aR          482 aa
Sequence 2: cpC3aR          475 aa
Sequence 3: muC3aR          477 aa
Sequence 4: rnC3aR          473 aa
Sequences (1:2) Aligned. Score: 57
Sequences (1:3) Aligned. Score: 63
Sequences (1:4) Aligned. Score: 58
Sequences (2:3) Aligned. Score: 57
Sequences (2:4) Aligned. Score: 54
Sequences (3:4) Aligned. Score: 80
    
```

Mutmaßliche transmembranöse Bereiche sind grau unterlegt (nach [150]).

6.6 Sequenzvergleich Anaphylatoxine

CLUSTAL W (1.74) multiple sequence alignment

```

hsC3a      SVQLTEKRMNKVKGKYP-KELRKCCEDGMRQNPMRFSCQRRTRFISLGEACKKVFLDCCSY 59
hsC4a      NVNFQKAINKLGQYASPTAKRCCQDGVTRLPMMRSCQRAARVQQ-PDCREPFLLSCCQF 59
hsC5a      --MLQKKIEEIAAKYKHSVVKCCYDGAS-VNNDTCEQRAARISLGPRCIKAFTECCVV 57
           : : : .:* :*** ** :*::*: :. * : * .**
    
```

```

hsC3a      ITELRRQHARASHLGLAR 77
hsC4a      AESLRKKS RDKGQAGLQR 77
hsC5a      ASQLRANISHKDMQ-LGR 74
           .** : . * *
    
```

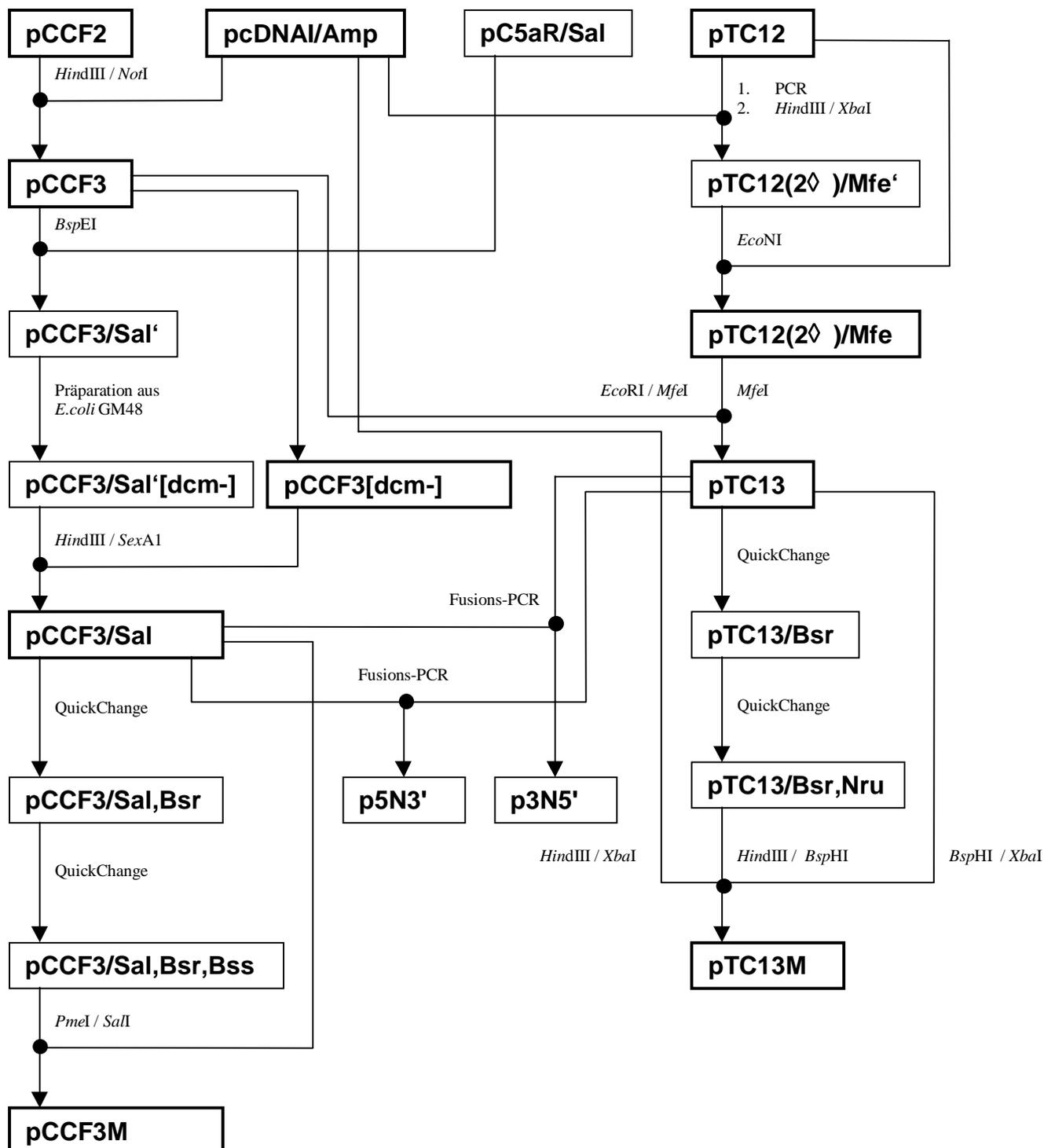
```

Sequence 1: hsC3a          77 aa
Sequence 2: hsC4a          77 aa
Sequence 3: hsC5a          74 aa

Sequences (1:2) Aligned. Score: 23
Sequences (1:3) Aligned. Score: 24
Sequences (2:3) Aligned. Score: 31
    
```

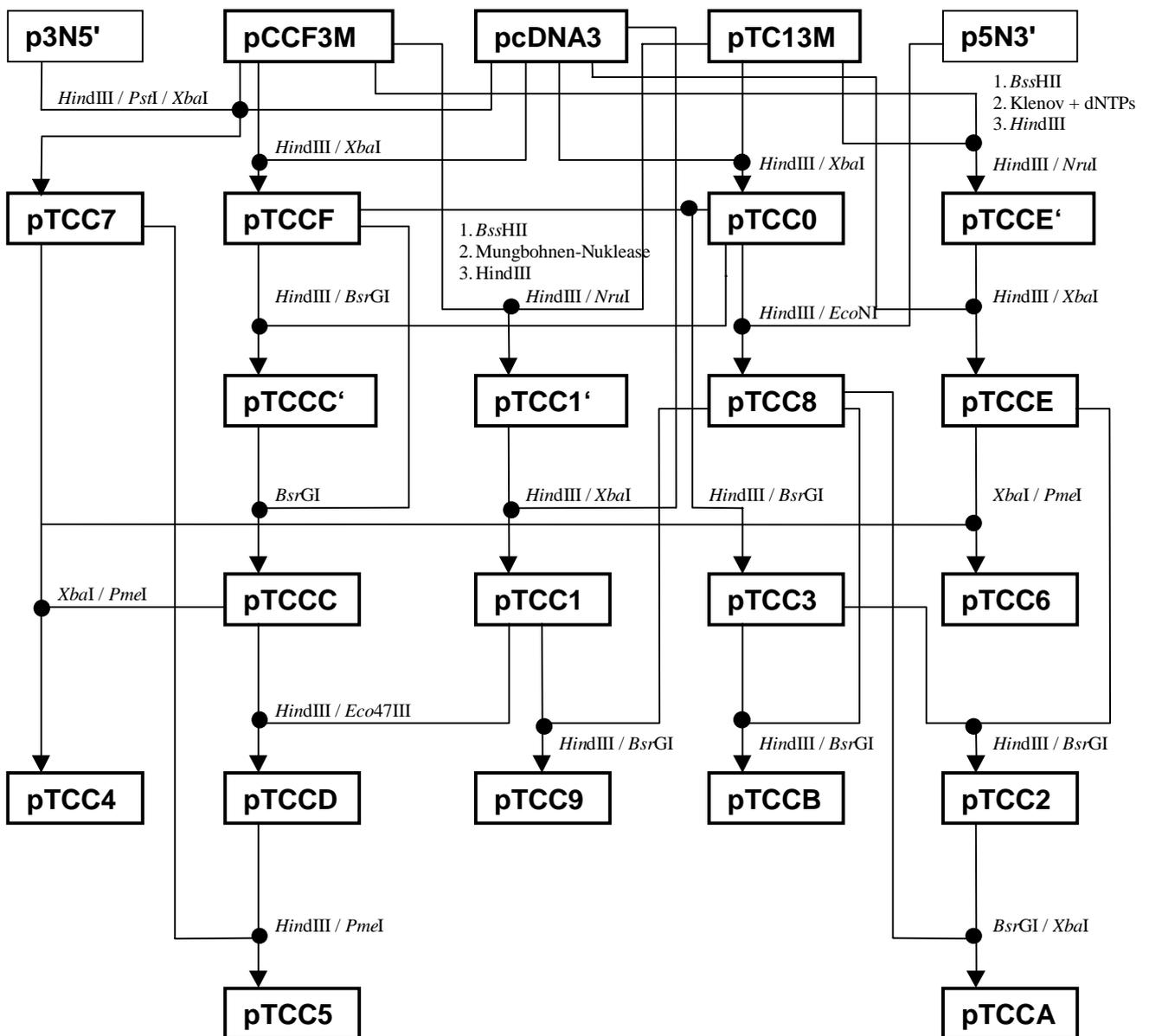
6.7 Detaillierte Beschreibung der Chimärenkonstruktion

6.7.1 Chimären-Vorläufer



Flußdiagramm zur Generierung der Chimären-Vorstufen. Bei Ligationsschritten (fette Punkte) sind die Namen der Restriktionsenzyme angegeben, die verwendet wurden, um die jeweiligen Fragmente zu erhalten. Bei fett umrahmten Plasmiden wurde entweder durch Sequenzierung oder durch Resubstitution mit sequenzierten Bereichen sichergestellt, daß keine unerwünschten Mutationen im Insert enthalten sind.

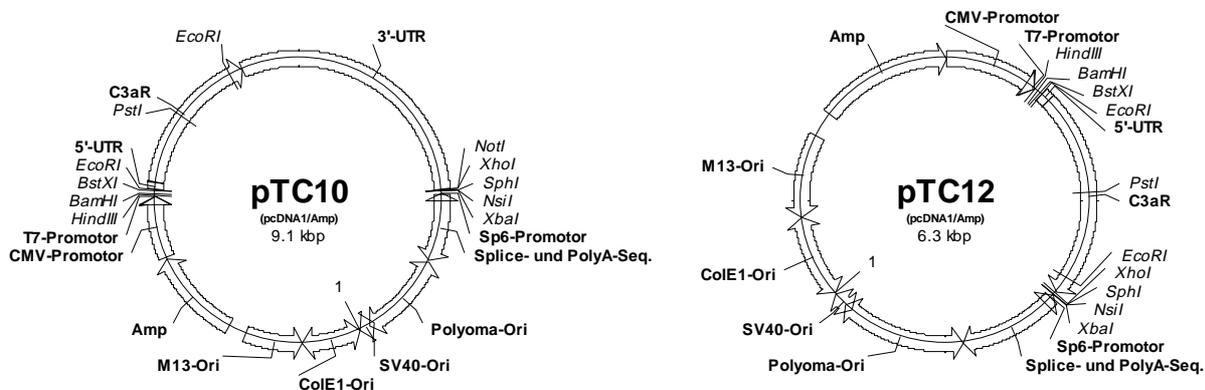
6.7.2 C3aR/C5aRChimären



Flußdiagramm zur Generierung der C3aR/C5aR-Chimären. Bei Ligationsschritten (fette Punkte) sind die Namen der Restriktionsenzyme angegeben, die verwendet wurden, um die jeweiligen Fragmente zu erhalten. Bei fett umrahmten Plasmiden wurde entweder durch Sequenzierung oder durch Resubstitution mit sequenzierten Bereichen sichergestellt, daß keine unerwünschten Mutationen im Insert enthalten sind.

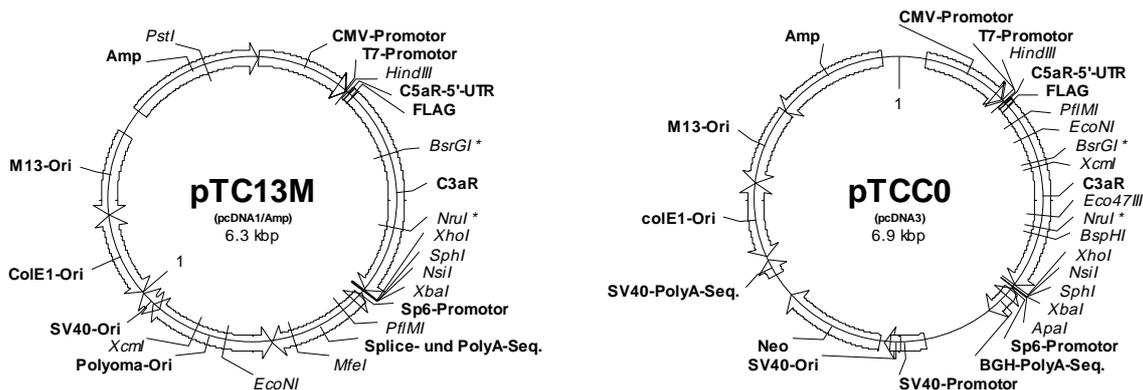
6.8 Karten wichtiger Plasmide

6.8.1 C3aR-Plasmide



pTC10: klonierte C3aR-cDNA mit 5'-anligiertem *BstXI/EcoRI*-Adapter. Über *BstXI/NotI* in pcDNA1/Amp.

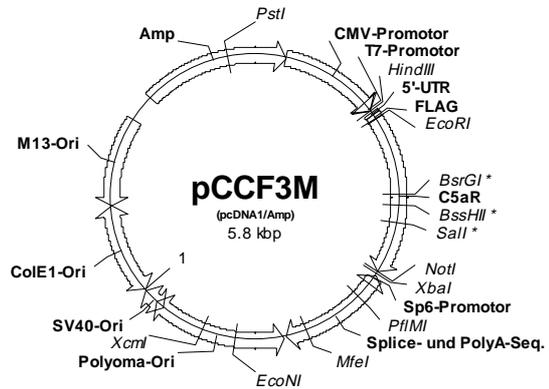
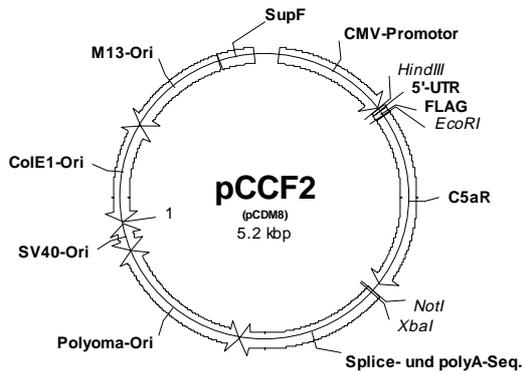
pTC12: C3aR-cDNA aus pTC10, mittels PCR von der langen 3'-UTR befreit. 5'-Ende unverändert, 3' direkt nach dem Stopp-Codon über *XhoI* einkloniert.



pTC13M: C3aR ab Aminosäure 2 mit vorgeschaltetem FLAG-Epitop und 5'-UTR des C5aRs und zusätzlich eingeführten Restriktionsschnittstellen *BsrGI* (Pos. 476) und *NruI* (Pos. 1003).

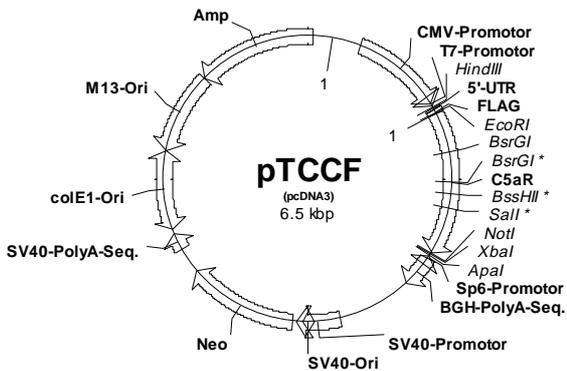
pTCC0: FLAG-C3aR mit C5aR-5'-UTR und zusätzlichen Restriktionsschnittstellen; Insert aus pTC13M über *HindIII/XbaI* in pcDNA3 umklontiert.

6.8.2 C5aR-Plasmide



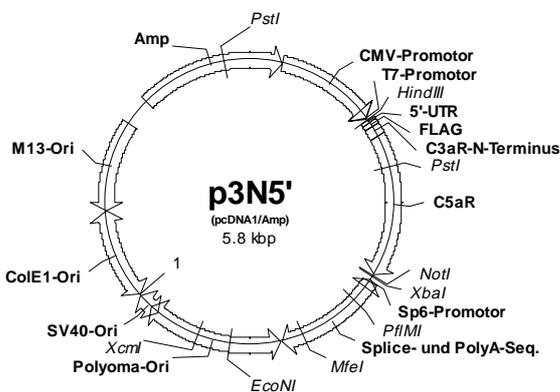
pCCF2: FLAG-C5aR mit Asn5Ala-Mutation in pCDM8.

pCCF3M: FLAG-C5aR aus pCCF2 über *HindIII/XbaI* in pcDNA1/Amp umklontiert; mit zusätzlich eingebrachten Restriktionsschnittstellen *BsrGI* (Pos. 519), *BssHII* (Pos. 597) und *Sall* (Pos. 709).

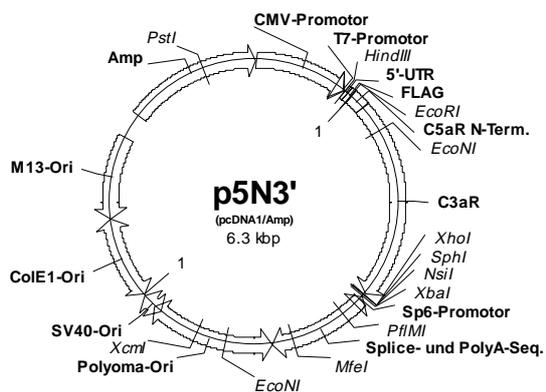


pTCCF: Flag-C5aR mit zusätzlichen Restriktionsschnittstellen; Insert aus pCCF3M über *HindIII/XbaI* in pcDNA3 umklontiert.

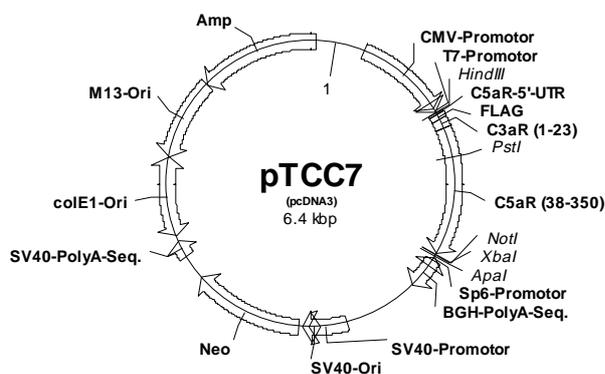
6.8.3 Plasmide mit N-terminalen Austausch-Chimären



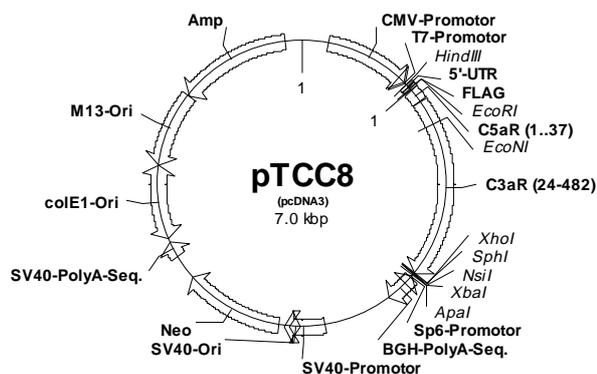
p3N5': C5aR mit C3aR-N-Terminus, FLAG und C5aR-5'-UTR, über *HindIII/XbaI* in pcDNA1/Amp. Mittels Fusions-PCR erzeugt und vom 5'-Ende her nur bis *PstI* sequenziert.



p5N3': C3aR mit C5aR-N-Terminus, FLAG und C5aR-5'-UTR, über *HindIII/XbaI* in pcDNA1/Amp. Mittels Fusions-PCR erzeugt und vom 5'-Ende her nur bis *EcoNI* sequenziert.



pTCC7: C5aR mit C3aR-N-Terminus, FLAG und C5aR-5'-UTR, über *HindIII/XbaI* in pcDNA3.



pTCC8: C3aR mit C5aR-N-Terminus, FLAG und C5aR-5'-UTR, über *HindIII/XbaI* in pcDNA3.

6.9 Verwendete Oligonukleotid-Primer

Primer	Sequenz	Beschreibung
ME54	5' -CTCCTTCCTGTACAGGGTGGTCCG-3' <i>BsrGI</i>	Einbringen einer <i>BsrGI</i> -Schnittstelle vor die 2. EL des C5aRs; Pos. 510 – 533
ME55	5' -GACCACCCTGTACAGGAAGGCGGG-3' <i>BsrGI</i>	Reversprimer zu ME54; Pos. 531 – 508
ME56	5' -GCGGGAGCGCGCCGTGGCCATC-3' <i>BssHII</i>	Einbringen einer <i>BssHII</i> -Schnittstelle hinter die 2. EL des C5aRs; Pos. 591 – 606
ME57	5' -GGCCACGGCGCGCTCCCGCCG-3' <i>BssHII</i>	Reversprimer zu ME56; Pos. 603 – 591
TC3	5' -AGCCATCTCGAGTCACACAGTTGT <i>XhoI</i> Stopp ACTATTTTC-3'	Reversprimer C3aR-C-Terminus mit Stopp-Codon und anschließender <i>XhoI</i> -Schnittstelle
TC9	5' -AAAAAAAAGCTT CAATTGGCGTC <i>HindIII MfeI</i> Bp. 40 TTTCTCTGCTG-3'	C3aR ab Pos. 4 mit vorgeschalteter <i>MfeI</i> - (für Klonierung hinter FLAG; kompatibel zu <i>EcoRI</i>) und <i>HindIII</i> -Schnittstelle
TC10	5' -GAATGACCATGGAGAGAAT GTCT GGAACACGCAGC-3'	C3aR Pos. 88 – 70 C5aR Pos. 111 – 96; für Fusion C5aR-N-Terminus mit C3aR (s. TC11)
TC11	5' -C ATTCTCTCCATGGTCATTC-3'	C5aR Pos. 111 C3aR Pos. 70 – 88; für Fusion C5aR-N-Terminus mit C3aR; revers
TC12	5' -GATGACCAAGGCCAGGAT TACTGGGGG-3'	C5aR Pos. 129 – 112 C3aR Pos. 69 – 54; für Fusion C3aR-N-Terminus mit C5aR (s. TC13)
TC13	5' -GTA ATCCTGGCCTTGGTCATC-3'	C3aR Pos. 68 – 69 C5aR Pos. 112 – 129; für Fusion C3aR-N-Terminus mit C5aR; revers
TC14	5' -CCTGTGTTTCGTGTACAGGGAAATCTTC-3' <i>BsrGI</i>	Einbringen einer <i>BsrGI</i> -Schnittstelle vor die 2. EL des C3aRs; Pos. 466 – 486
TC15	5' -GAAGATTTCCCTGTACACGAACACAGG-3' <i>BsrGI</i>	Reversprimer zu TC14; Pos. 489 – 466
TC16	5' -CACCCCTCGTCGCGATAACGATCAC-3' <i>NruI</i>	Einbringen einer <i>NruI</i> -Schnittstelle hinter die 2. EL des C3aRs; Pos. 994 – 1016
TC17	5' -GTGATCGTTATCGCGACGAGGGGTG-3' <i>NruI</i>	Reversprimer zu TC16; Pos. 1016 – 994
WB9	5' -GCTGCAGCTATTATTACCTTCCCA <i>PstI</i> 3 x Stopp ATTGCA-3'	Reversprimer C5a-C-Terminus mit 3 Stopp-Codons sowie <i>PstI</i> -Schnittstelle für Klonierung in pkk233-2
WB10	5' -GCTGCAGAATTCTATTATTATCCC <i>PstI EcoRI</i> 3 x Stopp AATTGCATGTCTTTATG-3'	Reversprimer C5a-desArg74-C-Terminus mit 3 Stopp-Codons sowie <i>EcoRI</i> - und <i>PstI</i> -Schnittstelle
WB13	5' -CGGAATTCTCATGTTTGACAG-3'	Überlappt die <i>EcoRI</i> -Schnittstelle in pkk233-2
WB29	5' -AGAGGATCCGGGATTCTC-3' <i>BamHI</i>	Entfernung der <i>EcoRI</i> -Schnittstelle aus pkk233-2; überlappt die <i>BamHI</i> -Schnittstelle in pkk233-2

Primer	Sequenz	Beschreibung
WB43	5' -AAAA <u>CTGCAGTACTATTATTAAT</u> <i>PstI</i> 3xStopp Asp/AseI CTCCAATTGCATG-3'	Reversprimer C5a-C-Terminus mit 3 Stopp-Codons für Arg74Asp-Austausch; zusätzliche <i>AseI</i> -Schnittstelle sowie <i>PstI</i> -Schnittstelle für Klonierung in pkk233-2
WB44	5' -GCTTGGCTGCAGCTATTATTACCT <i>PstI</i> 3 x Stopp TCCAATTGCATGTCCATATG-3' Met/ <i>NcoI</i>	Reversprimer C5a-C-Terminus mit 3 Stopp-Codons; für Lys68Met68-Austausch; zusätzliche <i>NcoI</i> -Schnittstelle sowie <i>PstI</i> -Schnittstelle für Klonierung in pkk233-2
WB45	5' -GCTTGGCTGCAGCTATTATTACCT <i>PstI</i> 3 x Stopp TCCAATTGCATGTCTTCATG-3' Glu/ <i>BspMI</i>	Reversprimer C5a-C-Terminus mit 3 Stopp-Codons für Lys68Glu-Austausch; zusätzliche <i>BspMI</i> -Schnittstelle sowie <i>PstI</i> -Schnittstelle für Klonierung in pkk233-2
WB48	5' -TAAGCTTGGCTGCAGCTATTATTA <i>PstI</i> 3 x Stopp TCCAATTG-3'	Reversprimer C5a-desArg74-C-Terminus mit 3 Stopp-Codons sowie <i>PstI</i> -Schnittstelle für Klonierung in pkk233-2

Schnittstellen für Restriktionsenzyme sind unterstrichen dargestellt. Besondere Nukleotide – etwa solche, die bei einer Mutagenese ausgetauscht wurden oder Stopp-Codons – sind *kursiv* hervorgehoben. Ein Matrizenwechsel ist durch einen senkrechten Strich | markiert.

7. Abkürzungen

AMP	Adenosinmonophosphat
Amp	Ampicillin
APS	Ammonium-peroxodisulfat
Aqua dest.	<i>Aqua destilata</i> , destilliertes Wasser
ARA	<i>ATP release assay</i> , ATP-Freisetzungstest
ARDS	<i>acute respiratory distress syndrome</i> , akutes Atemnotsyndrom des Erwachsenen
ATP	Adenosin-5'-triphosphat
B	Basen (bei RNA)
Bp	Basenpaare (bei DNA)
BSA	<i>bovine serum albumin</i> , Rinderserumalbumin
Bt ₂ cAMP	Dibutyryl-cAMP
C3aR	C3a-Rezeptor
C5aR	C5a-Rezeptor
cAMP	Cyclo-AMP (Adenosin-3',5'-monophosphat)
cDNA	<i>complementary DNA</i>
CIAP	<i>calf intestine alkaline phosphatase</i> , alkalische Kälberdarm-Phosphatase
CNTF	<i>ciliary neurotrophic factor</i>
cp~	<i>Cavia porcellus</i> (Meerschweinchen)
CTP	Cytidin-2'-triphosphat
dATP	2'-Desoxy-ATP
dCTP	2'-Desoxy-CTP
ddNTP	2'-Desoxy-NTP
dGTP	2'-Desoxy-GTP
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	<i>desoxyribonucleic acid</i> , Desoxyribonukleinsäure
dNTP	2'-Desoxy-nucleosidtriphosphat
dTTP	2'-Desoxy-TTP
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
ED ₅₀	Dosis halbmaximalen Effekts
EDTA	Ethylendinitrilo-N,N,N',N'-tetraessigsäure
EL	<i>extracellular loop</i> , extrazelluläre Schlaufe
FACS	<i>fluorescence activated cell scanning / sorting</i>
FCS	<i>fetal calf serum</i> , fetales Kälberserum
FITC	Fluorescein-isothiocyanat
FLIPR	<i>fluorescence imaging plate reader</i>
fMLP	N-Formyl-methionyl-leucyl-phenylalanin
fMLPR	fMLP-Rezeptor
FPLC	<i>fast protein liquid chromatography</i>
g	Erdbeschleunigung (9,81 m·s ⁻²)
GARA	<i>glucosaminidase release assay</i> , Glucosaminidase-Freisetzungstest
G-CSF	<i>granulocyte colony stimulating factor</i>
GEBS	Glycerin, EDTA, Bromphenolblau, SDS
GM-CSF	<i>granulocyte/macrophage colony stimulating factor</i>
GPCRK	<i>G-protein coupled receptor kinase</i> , G-Protein-gekoppelte-Rezeptorkinase
GTP	Guanosin-5'-triphosphat
HAG-CM	HEPES, Albumin, Glucose, Calcium, Magnesium
HEPES	N-(2-Hydroxyethyl)-piperazin-N'-2-ethansulfonsäure
hs~	<i>Homo sapiens</i>
IC ₅₀	<i>half-maximum inhibitory concentration</i>

7. Abkürzungen

IgG	Immunglobulin der Klasse G
IgM	Immunglobulin der Klasse M
IL	Interleukin
IL	<i>intracellular loop</i> , intrazelluläre Schlaufe
IL-8R	Interleukin-8-Rezeptor
IP ₃	Inositol-1,4,5-trisphosphat
IPTG	Isopropyl-β-D-thiogalactopyranosid
K _D	Dissoziationskonstante
k _{off}	Geschwindigkeitskonstante der Dissoziation
k _{on}	Geschwindigkeitskonstante der Assoziation
k _{trans}	Geschwindigkeitskonstante der Signaltransduktion
LB	Luria-Bertani-Medium
LIF	<i>leukemia inhibitory factor</i>
mAK	monoklonaler Antikörper
MES	2-(N-Morpholino)ethansulfonat
mm~	<i>Mus musculus</i> (Hausmaus)
mRNA	<i>messenger RNA</i>
M _w	<i>molecular weight</i> , Molekularmasse
NKAR	Neurokinin A-Rezeptor
NMR	<i>nuclear magnetic resonance</i> , Kernspinresonanz
OD	Optische Dichte
OM	Onkostatine M
PBS	<i>phosphate buffered saline</i>
PCR	<i>polymerase chain reaction</i> , Polymerase-Kettenreaktion
PKC	Proteinkinase C
PMA	Phorbol-12-myristat-13-acetat
PP	Pyrophosphat
rn~	<i>Rattus norvegicus</i> (Wanderratte)
RNA	<i>ribonucleic acid</i> , Ribonukleinsäure
rRNA	ribosomale RNA
SDS	<i>sodium dodecyl sulfate</i> , Natriumlaurylsulfat
Taq	<i>Thermus aquaticus</i>
TBE	TRIS, Borat, EDTA
TBS	<i>TRIS-buffered saline</i>
TE	TRIS, EDTA
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin
TM	transmembranös
TNF	Tumor-Nekrose-Faktor
TRIS	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
tRNA	Transfer-RNA
TTP	Thymidin-2'-triphosphat
U	<i>Unit</i> [μmol/min]
UTR	untranslatierte Region
wt	Wildtyp

8. Lebenslauf

von Dipl. Biochem. Torsten Crass

- 14.01.1969 Geburt in Karlsruhe als einziges Kind von Dipl. Ing. Günter Crass und Ilse Crass, geb. Dörner.
- 1975 Einschulung in die Konrad-Haenisch-Schule in Frankfurt.
- 1979 Besuch des Helmholtz-Gymnasiums in Frankfurt.
- 1988 Abitur; Beginn des Studiums der Biochemie in Hannover.
- 10.1993 Diplomprüfung in den Fächern Biochemie, Biophysikalische Chemie und Mikrobiologie.
- 09.05.1994 Fertigstellung der Diplomarbeit mit dem Thema "Wachstum und Produktbildung eines haploiden und des dazu isogenen diploiden Stammes von *Saccharomyces cerevisiae*" am Institut für Mikrobiologie der Universität Hannover unter Herrn Prof. Dr. H. Dieckmann.
- 01.06.1994 Zivildienst. Mitarbeit in der Anaphylatoxin-Arbeitsgruppe des Instituts für Medizinische Mikrobiologie der Medizinischen Hochschule Hannover unter Herrn Priv. Doz. Dr. Dr. W. Bautsch am Thema "Studien der Interaktion des humanen C5a mit seinem Rezeptor"; daneben Arbeiten zur "Erstellung einer physikalischen Genkarte von *Neisseria meningitidis* B1940".
- 01.09.1995 Mitglied des Graduiertenkollegs "Molekulare Pathophysiologie des Zellwachstums" an der Medizinischen Hochschule Hannover; Beginn der Promotion zum Thema "Die Anaphylatoxine C3a und C5a und ihre zellulären Rezeptoren: Molekulare Untersuchungen zur Rezeptor/Ligand-Interaktion"
- 18.01.1999 Promotionsprüfung in den Fächern Biochemie und medizinische Mikrobiologie
-

Bisherige Publikationen:

- Gäher M., Einsiedler K., Crass T., Bautsch W.: *A physical and genetic map of Neisseria meningitidis B1940*, Mol. Microbiol. **19**(2), 249 (1995)
- Crass T., Raffetseder U., Martin U., Grove M., Klos A., Köhl J., Bautsch W.: *Expression cloning of the human C3a anaphylatoxin receptor from differentiated U937 cells*, Eur J. Immunol **26**, 1944 (1996)
- Paral D., Sohns B., Crass T., Grove M., Köhl J., Klos A., Bautsch W.: *Genomic organization of the human C3a receptor*, Eur. J. Immunol. **28**, 2417 (1998)
- Lienenklaus S., Ames R.S., Tornetta M.A., Sarau H.M., Foley J.J., Crass T., Sohns B., Raffetseder U., Grove U., Hölzer A., Klos A., Köhl J., Bautsch W.: *Human anaphylatoxin C4a is a potent agonist of the guinea pig but not the human C3a receptor*, J. Immunol **161**, 2089 (1998)
- Crass T., Bautsch W., Cain S.A., Pease J.E., Monk P.N.: *Receptor activation by human C5a des Arg⁷⁴ but not intact C5a is dependent on an interaction between Glu¹⁹⁹ of the receptor and Lys⁶⁸ of the ligand*, eingereicht (1998)
- Crass T., Ames R.S., Tornetta M.A., Sarau H.M., Foley J.J., Köhl J., Klos A., Bautsch W.: *Chimeric receptors of the human C3a receptor (C3aR) and C5a receptor (C5aR)*, J. Biol. Chem., in Druck (1999)

Abstracts:

- Crass T. Raffetseder U., Grove M., Köhl J., Klos A., Bautsch W.: *Expression cloning of an inductor of the human C3a anaphylatoxin receptor in 293 cells*, Mol. Immunol. **33**(suppl. 1), 34 (1996)
- Crass T., Raffetseder U., Grove M., Martin U., Klos A., Köhl J., Bautsch W.: *Expression cloning of the human C3a anaphylatoxin receptor (C3aR) from differentiated U937 cells*, Immunobiol. **196**, 279 (1996)
- Monk P.N., Barker M.D., Pease J.E., Crass T., Bautsch W.: *Studies on the interaction between human C5a and its receptor*, Immunol. Letters (Abstract issue) **56**, 109 (1997)
- Paral D., Grove M., Crass T., Klos A., Köhl J., Bautsch W.: *Genomic organization of the human C3a-receptor (C3aR)*, Immunol. Letters (Abstract issue) **56**, 109 (1997)
- Crass T., Ames R.S., Köhl J., Klos A., Bautsch W.: *Chimeric receptors of the human C3a-receptor (c3aR) and C5a-receptor (C5aR; CD88)*, Immunobiology (Abstract Issue) **197**(2-4), 371 (1997)
- Lienenklaus S., Hölzer A., Crass T., Sohns S., Grove M., Klos A., Köhl J., Bautsch W.: *C4a and the guinea pig C3a-receptor (gpC3aR)*, Immunobiology (Abstract Issue) **197**(2-4), 375 (1997)
- Paral D., Grove M., Crass T., Klos A., Köhl J., Bautsch W.: *The genomic organization of the human C3a-receptor (C3aR)*, Immunobiology (Abstract Issue) **197**(2-4), 376 (1997)
- Lienenklaus S., Ames R.S., Tornetta M.A., Sarau H.M., Foley J.J., Crass T., Sohns B., Raffetseder U., Grove M., Hölzer A., Klos A., Köhl J., Bautsch W.: *Human C4a anaphylatoxin elicits C3a-receptor mediated effects in guinea pigs but not in men*, Immunobiology (Abstract Issue) **199**(3-5), 631 (1998)
- Crass T., Ames R.S., Tornetta M.A., Sarau H.M., Foley J.J., Köhl J., Klos A., Bautsch W.: *Chimeric receptors of the human C3a receptor (C3aR) and C5a receptor (C5aR)*, Immunobiology (Abstract Issue) **199**(3-5), 630 (1998)
- Lienenklaus S., Ames R.S., Tornetta M.A., Sarau H.M., Foley J.J., Crass T., Sohns B., Raffetseder U., Grove M., Hölzer A., Klos A., Köhl J., Bautsch W.: *Human C4a anaphylatoxin elicits C3a-receptor mediated effects in guinea pigs but not in men*, Mol. Immunol. **35**, 366 (1998)
- Crass T., Ames R.S., Tornetta M.A., Sarau H.M., Foley J.J., Köhl J., Klos A., Bautsch W.: *Chimeric receptors of the human C3a receptor (C3aR) and C5a receptor (C5aR)*, Mol. Immunol. **35**, 366 (1998)

Danksagungen

Zunächst möchte ich mich bei Herrn Prof. Dr. Bitter-Suermann für die Ermöglichung dieser Arbeit in seinem Institut bedanken. Prof. Dr. Jürgen Alves danke ich für die Übernahme der Vaterschaft für das vorliegende Werk.

Meinem Betreuer, PD Dr. Dr. Wilfried Bautsch, danke ich für die intensive, engagierte und immer humorvolle Betreuung. Ich habe viel gelernt über Spezifitätskontrollen, Wissenschaftspolitik, Steuerreform, mittelalterliche Kirchengeschichte und holländische Malerei.

Kaum eine Arbeitsgruppe weist wohl einen so hohen Gute-Laune-Index auf wie die, in der ich trotz Kino, Kochen und Cocktails auch noch zum Erstellen dieser Arbeit kam! Ute Raffetseder danke ich für die Schlager, Martin Gäher für die Biere im Plümecke und den einzigen netten Hund, Frauke Spilker für ihr Lachen, Anja Hölzer für ihre Herzlichkeit, Daniela Paral und Bettina Sohns für schöne Männer, Stefan Lienenklaus für die Sprüche, Ivo Meyer-Wiedenbach für die wilden 60er, Karen Eschweiler für ihren Süßigkeitenverzicht, Nicole Flemme für den Laserdrucker und Melanie Grove, der guten Seele des Labors, einfach für alles.

Natürlich ermöglichte erst die hervorragende Infrastruktur des Instituts, namentlich der AT-Gruppe, den reibungslosen Ablauf der Arbeit. Besonderer Dank gilt daher den beiden anderen Mitgliedern des AT-Triumvirats, Dr. Andreas Klos und PD Dr. Jörg Köhl, sowie deren Arbeitsgruppen. Wir sind eine große Familie...

Unseren Kooperationspartnern Dr. Robert S. Ames jenseits des großen Teiches und Dr. Peter N. Monk in der Stahl-Metropole Sheffield danke ich für die gute Zusammenarbeit im Interesse des Erreichens des gemeinsamen Ziels.

Der Abteilung für Pädiatrische Hämatologie möchte ich für die großzügige Unterstützung beim FACSen danken. Namentlich zu nennen sind Dr. Matthias Ballmeyer, Dr. Manuela Germeshausen, Dr. Andreas Herbst und Dipl.-Biochem. Harald Schulze.

Harald möchte ich weiterhin danken für schöne Ferien, die eine oder die andere gute Flasche Wein und den Grundkurs Philosophie. In diesem Zusammenhang müssen Andreas Krueger und Stefani Konrad genannt werden, ohne die Kellenhusen nicht möglich gewesen wäre. Auch allen anderen Freunden sei Dank für Unterstützung und Zuspruch, sei es in Labor- oder Lebensfragen.

Trautes Heim, Glück allein – schön, eine WG zu haben, in der man sich (weitgehend) wohl fühlt. Dank an Sanni, Wolfi, Michael, Dirk, Janina und wie sie alle hießen! Ein besonderer Dank geht natürlich an Wiebke – für's Korrekturlesen und für ein wunderschönes Jahr...

Dem Kabarett STÖRFALL danke ich für die vielen durchgeprobten Nächte und euphorischen Auftritte. In vielen Diskussionen wurde mir so immer wieder die Vielfalt menschlichen Denkens und Handelns jenseits der Anaphylatoxin-Rezeptoren vor Augen geführt. Und danke auch dafür, daß ich mitmachen durfte, obwohl ich Genforscher bin...

Last, but not least, gilt mein Dank meinen Eltern, die mir jede nur denkbare Unterstützung zukommen ließen, seit ich der Faszination der Natur erlegen bin.

Eidesstattliche Erklärung

Hiermit versichere ich, daß ich die vorliegende Dissertation mit dem Titel "Die Anaphylatoxine C3a und C5a und ihre zellulären Rezeptoren: Molekulare Untersuchungen zur Ligand/Rezeptor-Interaktion" selbständig verfaßt sowie alle benutzten Hilfsmittel und Institutionen vollständig angegeben habe. Weiterhin versichere ich, daß die Dissertation nicht bereits als Diplomarbeit oder andere Prüfungsarbeit verwendet wurde.

Hannover, Oktober 1998

