

Mutagenese und funktionelle Charakterisierung des humanen CCR3 Rezeptors

Diplomarbeit

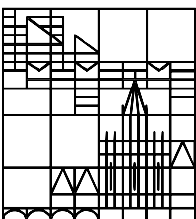
vorgelegt von
Jennifer Brasseit

Erstellt bei:

Boehringer-Ingelheim Pharma GmbH & Co. KG

Universität Konstanz, Fachbereich Biologie

Februar 2008



Danksagung

Diese Arbeit wurde in der Abteilung Atemwegsforschung (AAF), Lungenpharmakologie III, im Labor von Dr. Peter Seither der Firma Boehringer-Ingelheim Pharma GmbH & Co. KG, Biberach, angefertigt. An dieser Stelle möchte ich mich ganz herzlich bei allen bedanken, die zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben.

Mein bester Dank gilt Herrn PD Dr. Florian Gantner für die freundliche Aufnahme in seine Abteilung, die Begutachtung der Diplomarbeit sowie seine wissenschaftlichen und praktischen Ratschläge zur Arbeit wie auch darüber hinaus, trotz stets vollem Terminkalender.

Ebenso gilt PD Dr. Corinna Hermann mein bester Dank, die es mir von Seiten der Universität Konstanz ermöglicht hat, meine Diplomarbeit extern durchzuführen sowie für die Begutachtung der Diplomarbeit.

Besonderer Dank gilt Herrn Dr. Peter Seither für die Bereitstellung des interessanten Themas sowie die hervorragende Betreuung dieser Diplomarbeit. Er stand mir immer mit vielen Ideen und Vorschlägen bei Problemlösungen zur Seite. Seine wissenschaftlichen Anregungen sowie die kritischen Anmerkungen bei der Durchsicht des Manuskripts waren mir eine sehr große Hilfe und haben sehr zum Erfolg dieser Arbeit beigetragen.

Ein ganz herzlicher Dank gilt meinen direkten Kollegen Dirk Gester, Sandra Keil, Carmen Lerner und Melanie Trojahn für die äußerst angenehme Arbeitsatmosphäre in ihrem Labor. Sie standen mir mit viel Geduld in praktischen wie auch theoretischen Problemen über den gesamten Zeitraum zur Seite und wurden nicht müde, meine Fragen zu beantworten. Nicht zuletzt danke ich ihnen für die gemeinsamen Pausen und ihren Humor, die den Arbeitsalltag stets aufgelockert haben.

Vielen Dank an Dr. Jan Kriegl für das Erstellen der in dieser Arbeit gezeigten Modelle sowie für die wertvollen Hinweise zur Interpretation der Daten.

Allen Mitarbeitern der AAF danke ich für die große Hilfsbereitschaft und Freundlichkeit, die mir entgegen gebracht wurde sowie für das sehr gute Arbeitsklima. Speziellen Dank an Doris Bräuchle und Margot Bechter, unsere fleißigen Helferinnen im Hintergrund.

Schließlich möchte ich mich ganz herzlich bei meiner Familie bedanken. Über den gesamten Zeitraum des Studiums haben sie mich hervorragend in jeglicher Hinsicht unterstützt und mir damit diesen Abschluss ermöglicht. Vielen lieben Dank auch an Birgit Götz, Karin Kolbe und Luise Olbrecht für ihre moralische Unterstützung sowie für die Durchsicht des Manuskripts.

Inhaltsverzeichnis

DANKSAGUNG	I
INHALTSVERZEICHNIS	II
ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS	IV
ZUSAMMENFASSUNG	VI
1 EINLEITUNG	1
1.1 Asthma	1
1.2 CCR3	3
1.2.1 Rolle des CCR3 bei Asthma	4
1.2.2 Therapieansätze von Asthma: CCR3 als therapeutisches Ziel.....	4
1.3 Chemokine	6
1.3.1 Natürliche Liganden des CCR3	7
1.4 Aufklärung der Struktur des CCR3	9
1.4.1 Mutagenesestudien an Liganden und Rezeptor	9
1.4.2 Rezeptoraktivierungsmodell.....	11
1.4.3 Signaltransduktion	12
1.5 Auswahl der CCR3 Mutationen	14
1.6 Assays zur funktionellen Charakterisierung des CCR3	17
2 ZIELSETZUNG DER ARBEIT	18
3 MATERIAL UND METHODEN	19
3.1 Mutagenese des CCR3	19
3.2 Stabile Transfektion mit CCR3	20
3.3 Flp-In™ System	21
3.4 Zellkultur	22
3.4.1 Isolation von hochexprimierenden Einzelklonen.....	23
3.5 Membranpräparation	24
3.5.1 Membranpräparation mittels Potter (für GTPγS-Assay)	25
3.5.2 Membranpräparation mittels „Cell-Disruption Bomb“	25
3.6 Proteinbestimmung nach Bradford	26
3.7 Scintillations-Proximity (SPA)-Bindungsassay	26
3.7.1 Durchführung des SPA-Assays	27
3.8 GTPγS-Assay	28
3.9 Durchflusszytometrie (FACS)	29
3.9.1 Antikörperinkubation der Zellen	32
3.9.2 Antikörperinkubation nach Stimulation mit Liganden	33

3.10 FACS-basierter Internalisierungsassay	34
3.10.1 Rezeptorinternalisierung durch natürliche Liganden und Agonisten.....	34
3.10.2 Inhibitionsvermögen von Antagonisten	35
3.10.3 Verwendete chemische Moleküle	36
3.11 High Content Screening Assay	37
3.11.1 CCR3 Internalisierungsassay	37
3.11.2 ERK-Phosphorylierungsassay	38
3.11.3 CCR3 Aktivierung über fluoreszenzmarkiertes Eotaxin 1	39
3.12 Statistik/Analyse	39
4 ERGEBNISSE	40
4.1 Auswahl von Aminosäuren zur Mutagenese des humanen CCR3	40
4.2 Stabile CCR3 Expression in CHO-Flp-InTM-Zellen	41
4.3 Isolation von hochexprimierenden Einzelklonen	42
4.4 Untersuchungen zur Bindung von Eotaxin-1 an die CCR3 Mutanten	45
4.5 Untersuchungen zur Funktionalität des CCR3 mittels GTPγS-Assay	48
4.6 Einfluss der CCR3 Mutanten auf die Rezeptorinternalisierung	49
4.6.1 Kinetik der Internalisierung	50
4.6.2 Rezeptorinternalisierung durch natürliche CCR3 Liganden.....	51
4.6.3 Rezeptorinternalisierung durch agonistische Molekülen.....	58
4.6.4 Inhibition der Eotaxin 1 induzierten Internalisierung durch Antagonisten	64
4.6.5 Internalisierungsvermögen der Antagonisten	70
4.7 High-Content-Screening (HCS) zur Untersuchung der Funktionalität des CCR3	73
4.7.1 Rezeptorinternalisierung	73
4.7.2 CCR3 abhängige Phosphorylierung von ERK	75
4.7.3 Aktivierung von CCR3 über fluoreszenzmarkiertes Eotaxin 1	76
5 DISKUSSION	78
5.1 Flp-InTM System und Rezeptorexpression	79
5.2 Verlust der Rezeptorexpression	80
5.3 Einfluss der CCR3 Mutationen auf das Bindungsvermögen von Eotaxin 1	80
5.4 Bestimmung der funktionellen Aktivität des CCR3 mittels GTPγS-Assay	83
5.5 Einfluss der CCR3 Mutationen auf die Rezeptorinternalisierung	83
5.5.1 Kinetik der Rezeptorinternalisierung	84
5.5.2 Rezeptorinternalisierung durch natürliche Liganden.....	84
5.5.3 Rezeptorinternalisierung durch Agonisten	87
5.5.4 Inhibition der Rezeptorinternalisierung durch Antagonisten	90
5.5.5 Rezeptorinternalisierung durch Antagonisten	93
6 LITERATUR	95

Abkürzungsverzeichnis

AAF	Abteilung Atemwegsforschung
ADP	Adenosindiphosphat
AK	Antikörper
AS	Aminosäure
ATP	Adenosintriphosphat
bp	Basenpaare
cAMP	engl: cyclic adenosine monophosphate
CCR1,2,5,8	C-C Chemokinrezeptor 1,2,5,8
CCR3	C-C Chemokinrezeptor 3
CXCR	CXC-Chemokinrezeptor
DNA	engl.: Deoxyribonucleic acid (Desoxyribonukleinsäure)
DPBS	engl: Dulbecco`s phosphate buffered saline, Phosphat gepufferte Kochsalzlösung
ECL	engl: Extracellular loops
EDTA	engl: Ethylene diamine tetra-acetic acid (Ethylendiamin-Tetraessigsäure)
EGTA	engl: Ethylene glycol tetra-acetic acid (Ethyleneglykol-Tetraessigsäure)
FACS	engl: Fluorescence activated cell sorting
FCS	engl: Fetal calf serum (fötales Kälberserum)
FITC	engl: Fluorescein Isothyocyanat
FSC	engl: Forward Scatter
GPCR	engl: G-protein coupled receptor (G-Protein gekoppelter Rezeptor)
h/hu	human
HBSS	engl.: Hank`s Balanced Salt Solution
HCS	engl: High content screening
HEPES	4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl-Ethansulfonsäure
HIV	Humaner Immundefizienz Virus

HTS	engl: High throughput screening
ICL	engl: Intracellular loops
IFN	Interferon
Ig E	Immunglobulin E
IL	Interleukin
kDa	kilo-Dalton
K_i	Dissoziationskonstante des Inhibitors
MCP 1	engl.: Monocyte chemoattractant Protein 1
MCP 2	engl.: Monocyte chemoattractant Protein 2
MCP 3	engl.: Monocyte chemoattractant Protein 3
MCP 4	engl.: Monocyte chemoattractant Protein 4
$MgCl_2$	Magnesiumchlorid
MS	Massenspektrometrie
n.b.	nicht bestimmt
NaCl	Natriumchlorid
NaOH	Natronlauge
NMR	engl.: nuclear magnetic resonance
OD	optische Dichte
PBS	Phosphat-gepufferte Kochsalzlösung
PCR	engl.: Polymerase Chain Reaction (Polymerase-Kettenreaktion)
RANTES	Chemokin: Regulated upon activation, normal T-cell expressed and secreted
rcf	engl: relative centrifugal force (=g)
RNA	engl: Ribonucleic acid (Ribonukleinsäure)
RT	Raumtemperatur
SD	engl.: Standard deviation (Standardabweichung)
SEM	engl.: Standard error of the mean (Standardfehler des Mittelwertes)
Th-Zelle	T-Helfer Zelle
WHO	engl: World Health Organization (Weltgesundheitsbehörde)
xg	relative Zentrifugalkraft (=rcf)

Zusammenfassung

Bei Asthma handelt es sich um eine chronisch-entzündliche Erkrankung der Atemwege, an der bis zu 15% der Bevölkerung in den industrialisierten Ländern leiden. Die charakteristische Entzündungsreaktion wird mitunter durch eosinophile Granulozyten vermittelt, die über den CCR3 Rezeptor aktiviert werden. Der CCR3 stellt daher eine viel versprechende therapeutische Zielstruktur dar, um diese Entzündungsreaktion und die damit einhergehende Zerstörung des Lungengewebes mit geeigneten Rezeptorantagonisten zu unterbinden. Um die Rezeptor-Ligand-Wechselwirkung besser verstehen zu können, wurde ein Rezeptormodell erstellt, das es im Rahmen dieser Arbeit zu überprüfen galt. Dazu wurden 8 ausgewählte Aminosäuren der Transmembrandomäne (TMD) des humanen CCR3 mutiert, Zellen mit den CCR3-Mutanten transfiziert und deren Einfluss auf die Ligandeninteraktion experimentell mittels eines Rezeptorinternalisierungsassays überprüft. Die in dieser Arbeit generierten Daten belegen eindeutig, dass einige der Aminosäuren (Y113, H114 und Y291) starken Einfluss auf die Wechselwirkung der Liganden mit dem Rezeptor haben. Demgegenüber konnte für andere Aminosäuren (R95A, Y41A) gezeigt werden, dass diese die Wirkung verschiedener Liganden erhöhen oder beeinträchtigen. Erstaunlich dabei ist, dass sowohl natürliche Liganden als auch untersuchte chemische Moleküle für einige Mutationen gleichermaßen in ihrer Wirkung beeinträchtigt werden. Dies erweitert die bisherige Vorstellung, dass natürliche Liganden nur über den N-Terminus sowie über die extrazellulären Loops mit dem Rezeptor, nicht aber mit Bereichen der TMD interagieren. Die entsprechenden Aminosäuren sind nach den hier erhaltenen Daten an der Interaktion von Ligand und Rezeptor und/oder der nachgeschalteten Signaltransduktion beteiligt. Der Vergleich zu anderen GPCR Studien legt eine Beeinträchtigung der Bindung und damit überlappender Interaktionsstellen für natürliche Liganden und chemische Moleküle sehr nahe.

1 Einleitung

1.1 Asthma

Bei Asthma handelt es sich um eine chronisch-entzündliche Erkrankung der Atemwege. Charakteristische Symptome sind neben einer akuten bzw. chronischen Entzündung, eine Überempfindlichkeit der Atemwege („airway hyperresponsiveness“), die mit einer Veränderung der Bronchialwände („airway remodelling“) und vermehrter Schleimsekretion einhergeht (10). Dies wiederum führt bei einem akuten Asthmaanfall zu Atemnot der Betroffenen sowie zu Hustenanfällen aufgrund der vermehrten Schleimbildung. Laut der Weltgesundheitsorganisation (WHO) gab es im Jahre 2005 weltweit rund 300 Millionen Asthmakranke, darunter ein Großteil Kinder (112). Für weitere Details zur Prävalenz von Asthma sei hier auf Übersichtsartikel von Eder *et al.* (27) sowie von Braman *et al.* (9) verwiesen. Die Ursachen von Asthma sind vielfältig und oft nicht eindeutig auszumachen. Klar ist, dass es sich bei den Ursachen um eine Kombination aus genetisch bedingter Prädisposition (Atopie) sowie zahlreicher Umweltfaktoren handelt (16). Eine große Rolle in der Entwicklung einer Asthmaerkrankung spielen dabei Allergene wie Hausstaubmilben, Pollen und Staub sowie Zigarettenrauch (112).

Man unterscheidet zwei Formen des Asthmas: Das nicht-allergische (intrinsische), das durch unspezifische Reize wie körperliche Anstrengung, Stress oder kalte Luft verursacht wird, und das allergisch bedingte (extrinsische) Asthma, bei dem eine allergische Reaktion, beispielsweise auf Pollen oder Staub, der Auslöser ist. Nach Kontakt eines Allergens mit in der Lunge ansässigen dendritischen Zellen kommt es über den Weg der adaptiven Immunantwort zur Bildung von verschiedenen Entzündungsmediatoren, die letztlich zu den charakteristischen Symptomen wie Schleimsekretion und Atemnot führen. Es kommt dabei zu einer Aktivierungskaskade, an der vor allem Th2-Zellen, Mastzellen und IgE produzierende B Zellen beteiligt sind. Dabei werden Th2-Zytokine wie IL-4 und -5, IL-9, -10 und -13, Entzündungsmediatoren wie Histamin, Leukotriene und Prostaglandine, IgE und Chemokine freigesetzt (10, 100). In einer späteren Phase der adaptiven Immunantwort kommt es vor allem zur Rekrutierung von eosinophilen Granulozyten (Eosinophile), die über den C-C Chemokinrezeptor 3 (CCR3) aktiviert werden. CCR3 Liganden wie Eotaxin 1 (neben Eotaxin 2,3, MCP 2-4 und RANTES), die vorwiegend von Epithel-, Endothelzellen und Makrophagen sezerniert werden (117), spielen eine

zentrale Rolle bei der Migration von Eosinophilen in das Lungengewebe. So kann man bei Asthmatikern nach Allergengabe zum Teil eine erhöhte Menge an Eotaxin in den Atemwegen feststellen, was wiederum mit einer ebenfalls steigenden Anzahl an Eosinophilen korreliert (62, 118). Sezerniertes Interleukin-5 (IL-5) führt in der Lunge zur Reifung der eingewanderten Eosinophilen und zu deren Aktivierung (41, 58, 72). Im aktivierten Zustand sezernieren sie neben Sauerstoffradikalen verschiedene inflammatorische Proteine wie beispielsweise das „Major Basic Protein“ (MBP), die zur Epithelschädigung führen. Folglich kommt es zu strukturellen Veränderungen des Lungengewebes, die sich unter anderem in einer Verdickung der glatten Muskulatur manifestieren (10). Die Sekretion von Leukotrienen (LT) (v.a. von LTC₄) führt zur weiteren Kontraktion der glatten Muskulatur und verstärkt damit die Atemnot.

Zu den gängigen Therapieansätzen zählen neben Bronchodilatoren wie β -Agonisten (37, 76), die bei einem akuten Asthmaanfall eine Entspannung der verkrampften glatten Atemwegsmuskulatur bewirken (82), auch Leukotrienantagonisten. Zur Vorbeugung von Asthmaanfällen werden anti-inflammatorische Therapeutika wie Kortikosteroide inhalativ verabreicht (ICS, inhaled corticosteroids). Diese Medikamente können aber vor allem in hohen Dosen teilweise zu erheblichen Nebenwirkungen führen wie z.B. Wachstumsstörungen bei Kindern oder Osteoporose bei Erwachsenen (1, 106).

Asthma bedeutet eine starke Einschränkung für die betroffenen Patienten und die Behandlung ist mit erheblichen Kosten für das Gesundheitswesen verbunden. Beispielsweise belaufen sich die Kosten für Europa auf 17,7 Milliarden Euro ((29) zitiert nach Braman (9)). Es ist daher äußerst erstrebenswert, bessere und günstigere Behandlungsmethoden mit geringeren Nebenwirkungen zu entwickeln.

1.2 CCR3

Bei den G-Protein gekoppelten Rezeptoren (GPCR, G-protein coupled receptors) handelt es sich um Rezeptoren, die die Zellmembran mit 7-transmembranen Helices (auch bezeichnet als 7 Transmembrandomänen, TMD) durchspannen (50). Dabei liegt der N-Terminus auf der extrazellulären und der C-Terminus auf der zytoplasmatischen Seite. Zu der Familie der GPCR gehören unter anderem Neuro- und Hormonrezeptoren, lichtaktivierte Rezeptoren wie das Rhodopsin sowie die große Gruppe der Chemokinrezeptoren, zu der auch der CCR3 Rezeptor zählt.

Der CCR3 Rezeptor wird vorwiegend auf Eosinophilen und Th2-Helferzellen exprimiert (89, 90). Uguccioni *et al* (103) konnten CCR3 auf humanen Basophilen detektieren und beschrieben Eotaxin und MCP 4 als wirksame Chemokine für diese Zellen. Zudem wurde CCR3 auf Mastzellen entdeckt. Er wird nach Bindung von IgE an Mastzellen an deren Oberfläche transportiert (32, 80). Abbildung 1 gibt eine Übersicht über CCR3 exprimierende Zelltypen mit entsprechenden Liganden.

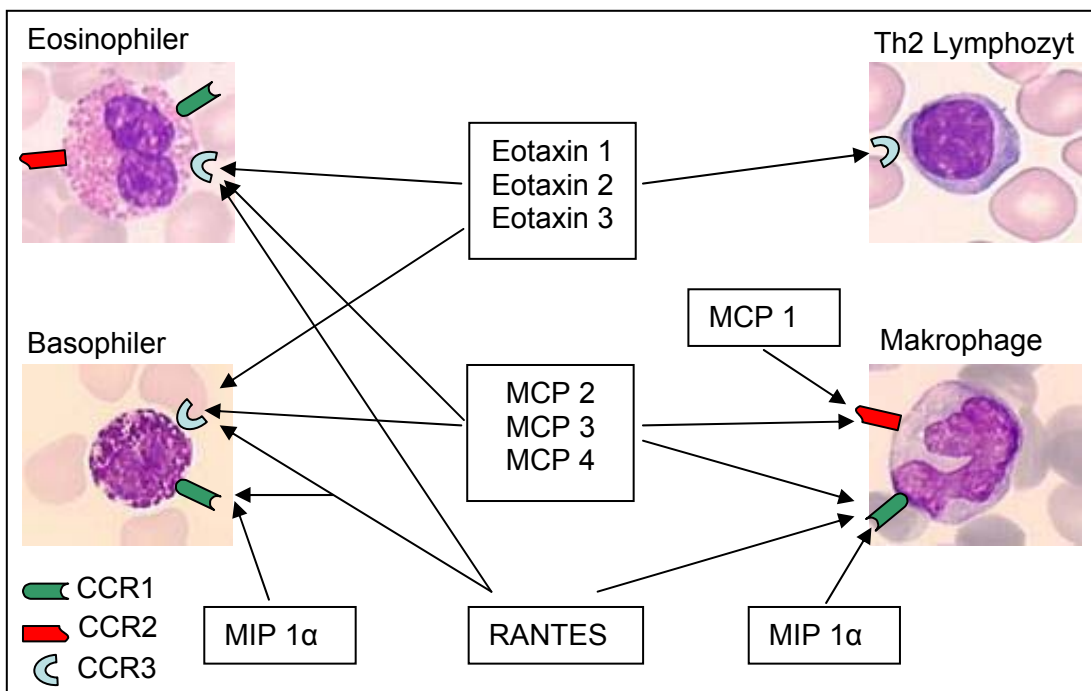


Abbildung 1: CCR3 Expression auf Zellen des Immunsystems mit natürlichen Liganden

Dargestellt sind 4 Zelltypen, die CCR1, 2 und/oder CCR3 exprimieren. RANTES und MCP 2-4 binden sowohl an die Rezeptoren CCR 1 und 3, Eotaxin 1-3 binden ausschließlich an CCR3. MIP1α ist ausschließlicher Ligand für CCR1. Abkürzungen: MIP: Macrophage inflammatory protein, MCP: Monocyte chemoattractant protein, RANTES: Regulated upon activation, normal T-cell expressed and secreted. Modifiziert nach (28), Bilder (7)

1.2.1 Rolle des CCR3 bei Asthma

Wie bereits unter 1.1 beschrieben, spielt der CCR3 Rezeptor im Zusammenhang mit Asthma eine wichtige Rolle. Eosinophile werden über ihn aktiviert und tragen dadurch zur charakteristischen Symptomatik dieser Erkrankung bei. So konnten Ma *et al.* beispielsweise zeigen, dass CCR3-knockout-Mäuse nach Allergenstimulation keine „Airway hyperresponsive reaction“ (AHR) zeigen (59). Diese Zusammenhänge legen nahe, dass eine selektive Blockade des CCR3 Rezeptors ein viel versprechender Ansatz für die Behandlung von Asthma ist.

1.2.2 Therapieansätze von Asthma: CCR3 als therapeutisches Ziel

Chemokinrezeptoren stellen interessante Ansatzpunkte für therapeutische Behandlungen dar, da viele Krankheiten mit GPCR und deren Liganden assoziiert sind. Darunter fallen beispielsweise Autoimmunerkrankungen wie Multiple Sklerose (53), Vaskuläre Erkrankungen (13) sowie Erkrankungen der Atemwege wie Asthma und COPD (Chronisch obstruktive Lungenerkrankung). Auch der HI-Virus (Humaner Immundefizienz Virus) tritt über CCR5 und CXCR4 als Ko-Rezeptor in die entsprechenden Zellen ein. Hauptaugenmerk für die Therapie ist dabei auf die Hemmung der Rezeptoren gelegt, die man auf verschiedene Arten erreichen kann. Knapp 50% aller verfügbaren Medikamente sind gegen GPCR gerichtet (25).

Eine Möglichkeit, die Aktivierung der Chemokinrezeptoren zu unterbinden, besteht in der Modifikation des N-Terminus am Chemokin selbst. Der N-Terminus ist an der Wechselwirkung zwischen Ligand und Rezeptor beteiligt (91) und teilweise für die Rezeptorspezifität verantwortlich (35). Moser *et al.* (67) konnten beispielsweise mittels N-terminaler Modifikation von Interleukin-8 den entsprechenden Il-8 Rezeptor blocken, wodurch unter anderem die Chemotaxis und der normalerweise bei der aktivierten Zellen induzierte „respiratory burst“ reduziert wurden. Gong *et al.* (35) stellten fest, dass Deletionen im N-Terminus von RANTES die Affinität dieses Liganden für verschiedene Chemokinrezeptoren beeinflusst. Da viele Chemokine redundant wirken, scheint es allerdings erfolgsversprechender, direkt auf der Ebene der Rezeptoren zu agieren, um derartige Wechselwirkungen zu vermeiden.

Eine Möglichkeit der spezifischen Rezeptorinhibition bietet die Entwicklung von monoklonalen Antikörpern gegen den jeweiligen Rezeptor. So gelang es z.B. die Anzahl an Eosinophilen in Mäusen durch den Einsatz eines monoklonalen AK gegen CCR3 zu reduzieren (38). Wie Heath *et al.* (43) zeigten, konnte mittels eines spezifischen monoklonalen Antikörpers (mAb 7B11) die Bindung radioaktiv markierter natürlicher CCR3 Liganden (RANTES, MCP2-4) erfolgreich unterbunden werden. Auch im Zusammenhang mit der über den CCR5 Rezeptor laufenden HIV Infektion konnten bereits Erfolge verbucht werden (22, 68, 94, 116).

Neben monoklonalen Antikörpern wird an der Entwicklung von spezifischen Rezeptorantagonisten geforscht. Einige sind bereits beschrieben worden, allerdings für den CCR3 noch von der konkreten therapeutischen Anwendung entfernt (66, 87, 99, 111). Demgegenüber konnte kürzlich bereits ein potenter Antagonist („Maraviroc“) für den CCR5 als Medikament zugelassen werden, der den Eintritt des HI-Virus in die Zielzelle über CCR5 verhindert (23, 30). Wie unter 1.2.1 beschrieben kommt es zur charakteristischen Entzündungsreaktion in der Lunge unter anderem durch die Aktivierung von Eosinophilen über den CCR3 Rezeptor. Um diese Aktivierung und die damit einhergehende Zerstörung des Lungengewebes zu unterbinden, scheint die Blockierung dieses Weges ein viel versprechender Ansatz in der Asthmatherapie zu sein. Deshalb besteht großes Interesse in der vollständigen Strukturaufklärung des CCR3 Rezeptors (wie auch der anderen Chemokinrezeptoren), um potentielle antagonistische Moleküle optimieren zu können. Um diesem Ziel einen Schritt näher zu kommen, befasst sich die vorliegende Arbeit mit der Strukturaufklärung des CCR3 Rezeptors.

1.3 Chemokine

Chemokine sind chemotaktisch wirksame Zytokine mit einem Molekulargewicht von ca. 8-10 kDa. Man kennt bisher über 50 verwandte Proteine dieser Art, die in 4 Subfamilien unterteilt werden. Die Unterteilung in C, CC, CXC und CX3C Familien erfolgt dabei anhand ihrer N-terminal gelegenen konservierten Cysteinreste (C) (121). Das X/X3 steht dabei für eine bzw. 3 variable Aminosäuren zwischen den Cysteinen. Da die Liganden zur Familie der CC-Chemokine (CC-L) gehören, handelt es sich beim Chemokinrezeptor 3 folglich um einen CC-Rezeptor. Beispielsweise handelt es sich bei CCL11 (neue Nomenklatur) um Eotaxin 1 (alter Name), bei CCL5 um RANTES. Aus Vereinfachungsgründen sollen für die verwendeten Chemokine im Folgenden die Namen nach alter Nomenklatur verwendet werden. Eine Übersicht über die verwendeten CCR3 Liganden mit neuer und alter Nomenklatur gibt Tabelle 1.

Viele der Chemokine sind funktionell redundant, d.h. sie sind in der Lage, die gleiche Reaktion bei Zellen auszulösen. Zudem können verschiedene Chemokine an mehrere Rezeptoren binden. Andererseits wirken einige Chemokine auf diverse Rezeptoren agonistisch oder antagonistisch. Als ein Beispiel soll hier das Eotaxin 1 genannt werden, das agonistisch auf CCR3 und nach Ogilvie *et al.* auch auf CCR5, jedoch antagonistisch auf CCR2 wirkt (73). Dabei ist auffällig, dass für Chemokine einer Familie generell eine relativ geringe Sequenzhomologie zu verzeichnen ist (20-90%). Dennoch weisen diese Chemokine eine sehr ähnliche Quartärstruktur auf (8, 17).

Über Deletions- und Mutagenesestudien wurde der N-Terminus als essentieller Bereich für die Interaktion mit dem Rezeptor identifiziert (4, 26, 47, 65) Ähnliche Beobachtungen konnten für den CCR1 Rezeptor gemacht werden (12, 46) Nicht nur bei der Interaktion mit Rezeptoren spielt der N-Terminus eine wichtige Rolle wie Casarosa *et al.* herausfanden. In ihrer Studie konnten sie zeigen, dass CC und CX3C Chemokine mit dem N-Terminus des Cytomegalovirus wechselwirken (12).

Tabelle 1: verwendete natürlich vorkommende Liganden des hCCR3 Rezeptors mit Hersteller

Natürlicher Ligand	CCL-NK	Hersteller	Lot No	MG [kDa]
Eotaxin 1	CCL11	Pepro Tech, Rocky Hill, USA	120469 G2607	8,3
Eotaxin 2	CCL24	BIOTREND Chemikalien GmbH, Köln, Deutschland	067114	8,8
Eotaxin 3	CCL26		1002167	8,4
MCP 2	CCL8		03741	8,9
MCP 3	CCL7		036423	9,0
MCP 4	CCL13		01281	8,6
RANTES	CCL5		010433	7,8

1.3.1 Natürliche Liganden des CCR3

Derzeit sind sieben natürlich vorkommende Liganden des CCR3 beschrieben, die die entsprechenden Zellen über den Rezeptor mit unterschiedlicher Effizienz aktivieren. Eotaxin 1 ist der prominenteste Ligand und wurde zum ersten Mal in einem Meerschweinchenmodell zur allergischen Atemwegsentzündung von Jose *et al.* entdeckt (51). Infolgedessen gelang es, sowohl das Eotaxin der Maus (84), als auch das humane Eotaxin 1 (78), als auch das der Ratte (113) zu klonieren.

Das nahezu äquipotente Eotaxin 2 erhielt seinen Namen aufgrund seiner biologischen Ähnlichkeit zu Eotaxin 1. Eotaxin 1 und 2 zeigen 34% Homologie auf Proteinebene und beide Chemokine induzieren effektiv eine Freisetzung von intrazellulärem Kalzium in Eosinophilen (110). Menzies-Gow *et al.* (64) konnten nach subkutaner Injektion der beiden Chemokine an gesunden Freiwilligen eine starke Infiltration von Eosinophilen an den betreffenden Stellen nachweisen. Dies verdeutlicht, dass die beiden Chemokine in der Lage sind, Eosinophile effizient anzulocken.

Eotaxin 3 wurde erst 1999 als Ligand identifiziert, der humane Eosinophile, nicht aber Neutrophile und Monozyten aktiviert. Shinkai *et al.* (92) mutmaßten anhand ihrer Daten, dass Eotaxin 3 eher in der frühen Phase der Immunantwort präsent ist, während Eotaxin 1, MCP 4 oder RANTES in der Spätphase die Zellen aktivieren.

Die MCPs (Monocyte chemotactic proteins) sind nicht nur auf Monozyten aktiv, wie der Name suggeriert. Ebenso aktivieren sie T-Zellen, Basophile und über den CCR3 oder CCR1 Rezeptor auch Eosinophile (19, 57, 101, 109). MCP 4 wirkt auf den genannten Zellen ausschließlich über den CCR3, nicht aber über CCR1 oder CCR5 wie MCP 3 und RANTES (33). Für MCP 1, 2 und 3 konnte eine ungefähre Sequenzhomologie von 65% festgestellt werden (105). White *et al.* 1997 (110) konnten zeigen, dass MCP 3 und RANTES eine geringere Affinität für den CCR3 Rezeptor haben als beispielsweise Eotaxin 1, da sie nur begrenzt in der Lage sind, mit ¹²⁵J-markiertem Eotaxin 1 im Bindungsassay zu kompetieren.

Als natürlich vorkommende Antagonisten des CCR3 sind Mig, IP-10 sowie I-TAC als potentester der drei beschrieben (56, 108, 109). Loetscher *et al.* (56) stellten fest, dass die benannten Liganden in der Lage sind, eine durch Eotaxin 1, Eotaxin 2, MCP 2-4 und RANTES vermittelte Aktivierung in transfizierten Zellen (CCR3-B300-Zellen) zu reduzieren (verminderte Ca²⁺ Freisetzung). Des weiteren konnten sie eine Konkurrenz der drei Liganden mit Eotaxin 1 um die Bindung an CCR3 sehen.

1.4 Aufklärung der Struktur des CCR3

1.4.1 Mutagenesestudien an Liganden und Rezeptor

Wie unter 1.2.2 beschrieben stellen Chemokinrezeptoren wie der CCR3 interessante therapeutische Ziele dar. Um die Behandlungsmöglichkeiten z.B. in Form eines Antagonisten zu optimieren, ist es essentiell, die Struktur des Rezeptors zu kennen. Bisher war es nur möglich, Rhodopsin als Vertreter der GPCR vollständig zu kristallisieren und seine genaue Struktur zu bestimmen (75, 95). Kürzlich ist es Forschern zudem gelungen, den β -adrenergen Rezeptor zu kristallisieren. Dieser ist wie erwartet dem Rhodopsin ähnlich, hat jedoch insgesamt eine offenere Struktur (83). Alle anderen GPCR kommen in der Regel in zu geringen Mengen vor und sind zu instabil, als dass eine Röntgenstrukturanalyse möglich wäre. Aus diesem Grund wurden für die übrigen GPCR viele computergestützte Modellversuche, Mutagenese- und Deletionsstudien an den Rezeptoren und ihren korrespondierenden Liganden durchgeführt. Auch Untersuchungen mit Rezeptor- und Ligandenchimären¹ haben zur Aufklärung der Rezeptor-Ligand-Wechselwirkungen beigetragen.

Abbildung 2 gibt das Modell eines 7-TMD-Rezeptors (CCR3) (modifiziert nach (26)) wider und zeigt Bereiche bzw. einzelne Aminosäuren auf, denen mittels Mutagenese- und Deletionsstudien oder Rezeptorchimären verschiedene Funktionen zugewiesen werden konnten. Hauptaugenmerk wurde dabei bisher auf N- und C-Terminus, bzw. die extra- und intrazellulären Bereiche (ECL, ICL) gelegt. Der N-Terminus als Ganzes ist danach hauptverantwortlich für die Bindung der Liganden. Besonders wichtige, einzelne Aminosäuren konnten dabei nicht identifiziert werden. Des weiteren scheint an der Bindung der Bereich um die β_2 - β_3 Haarnadelschleife beteiligt zu sein. Duchesnes *et al.* (26) fanden heraus, dass für die Bindung von Eotaxin 1 vorwiegend geladene Reste am ECL 3 verantwortlich sind, wohingegen für Eotaxin 2 zusätzlich noch Reste am ECL 2 benötigt werden. Von den drei Eotaxinen scheint Eotaxin 3 am stärksten von geladenen Resten im extrazellulären Bereich des CCR3 abhängig zu sein (26).

¹ Chimäre: hier ein Rezeptor, der aus Bereichen von unterschiedlichen GPCR zusammengesetzt ist, z.B. ein Rezeptor mit N-Terminus von CCR1 und dem Rest von CCR3; entsprechendes gilt für Chemokin-Chimären

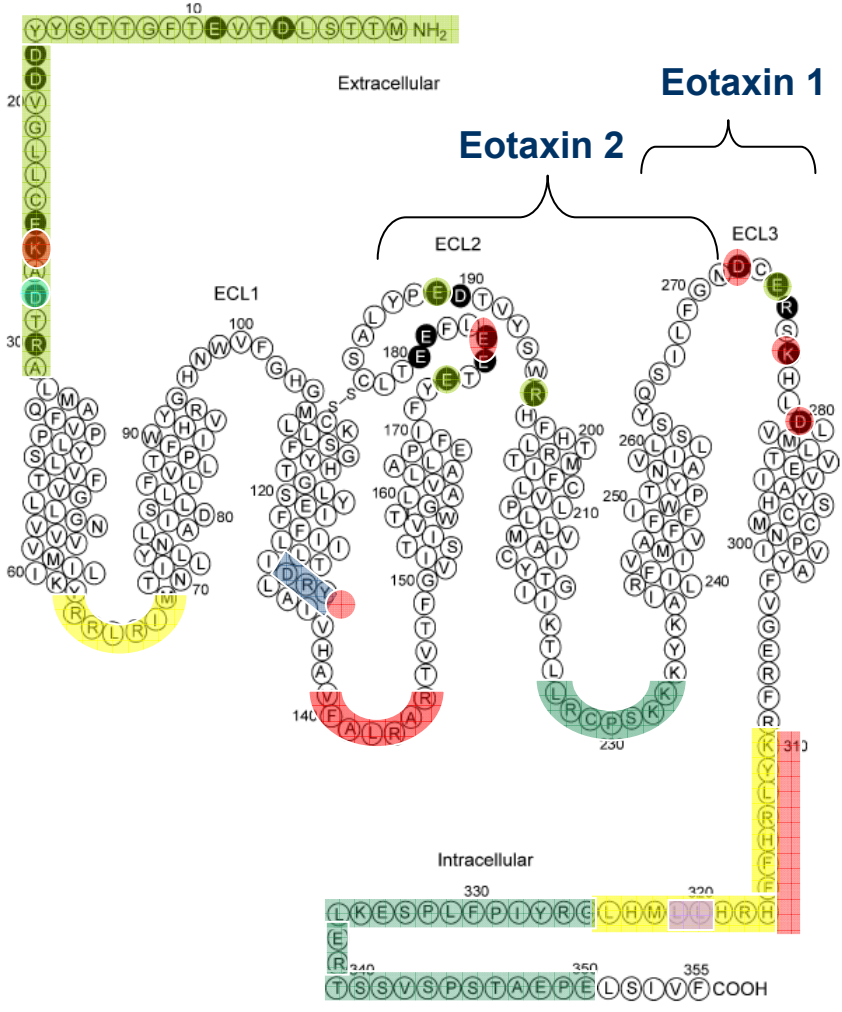


Abbildung 2: Schema eines GPCR mit essentiellen Bereichen für die Funktionalität
In dem dargestellten Modell entspricht jeder Buchstabe einer Aminosäure. Farblich markiert sind Aminosäuren/Bereiche, denen nach Mutagenese/Deletionsstudien bestimmte Funktionen zugeschrieben werden konnten. Grün: Ligandenbindung, Blau: Expression, Gelb: Konformation & Signaling, Rot: Chemotaxis, Türkis: G-Protein Interaktion, Lila: Internalisierung. Modifiziert nach (26).

Am C-Terminus sind die Aminosäuren 310-324 obligatorisch für die Expression des Rezeptors sowie für Chemotaxis und Internalisierung (85). Kraft *et al.* (52) demonstrierten die Wichtigkeit des im C-Terminus vorhandenen Di-Leucin-Motivs für die Rezeptorinternalisierung des CCR5. Dort binden Clathrin-Adapterproteine, die unter anderem die Internalisierung vermitteln (45). Es ist zu vermuten, dass diesem Motiv am CCR3 Rezeptor eine ähnliche Funktion zukommt. Die drei ICL sind vorwiegend für den Kontakt des CCR3 mit den G-Proteinen verantwortlich (5). Die so genannte „DRY-Sequenz“ ist ein konservierter Bereich aller GPCR. Man kann daher davon ausgehen, dass sie eine essentielle Rolle für einen bisher nicht genauer definierten Prozess spielt. Wie Auger *et al.* herausfanden (5) sind die dort vorhandenen Ladungen unter anderem essentiell für die Funktionalität des

Rezeptors (Expression und Chemotaxis). Des weiteren scheinen zwei Glutamatreste im so genannten „EELFEET“-Motiv im ECL 2 für die Rezeptorexpression wichtig zu sein (26). Auffallend ist, dass mehrfach keine Korrelation zwischen Ligandenbindung und Rezeptoraktivierung gezeigt werden konnte.

1.4.2 Rezeptoraktivierungsmodell

Damit es zu einer Aktivierung mit nachgeschalteter Signaltransduktion eines GPCR kommt, muss zunächst der entsprechende Ligand binden. Dies geschieht vorrangig an den extrazellulären Bereichen des Rezeptors (N-Terminus sowie ECL). Ausgehend von einer Studie von Montecarlo *et al.* (65) am MCP 1 Rezeptor (CCR2), übertrug man deren entwickeltes Rezeptoraktivierungsmodell auch auf andere GPCR. Dabei handelt es sich um ein „Zwei-Schritt-Aktivierungsmodell“ (siehe Abbildung 3), nach dem der Ligand zunächst mit hoher Affinität („high affinity“) an den N-Terminus bindet, und es dadurch zu einer Konformationsänderung kommt. Der so „pseudogebundene“ Ligand bindet danach die extrazellulären Loops, wodurch erst die Signaltransduktion in Gang gesetzt wird. Zudem ist eine Aktivierung ohne vorausgehende „high-affinity“-Bindung möglich, sofern der Ligand in sehr hoher Konzentration vorliegt. Ein ähnliches Modell wurde bereits von Vu *et al.* für den humanen Thrombinrezeptor entwickelt (107).

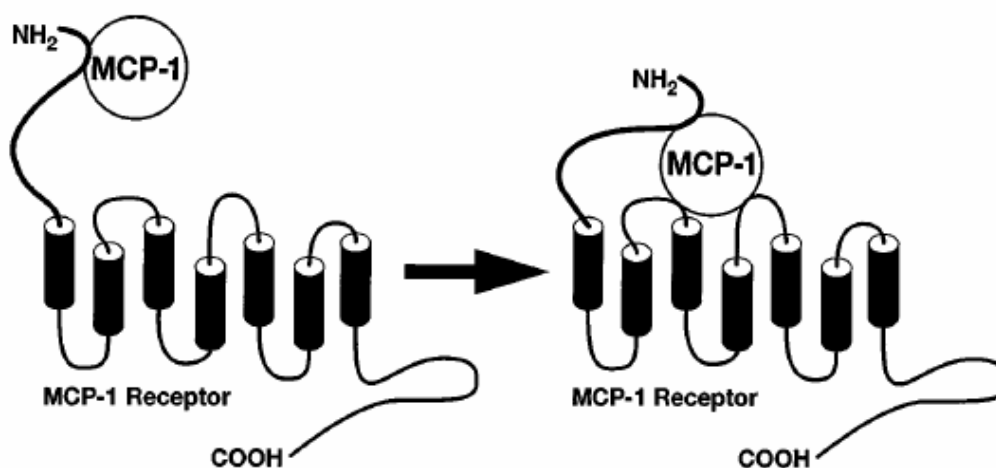


Abbildung 3: Rezeptoraktivierungsmodell für den MCP 1 Rezeptor (CCR2)

„Zwei-Schritt-Aktivierungsmodell“, bei dem es zunächst zu einer hoch affinen Bindung zwischen Ligand und N-Terminus kommt. Es folgt eine Bindung mit geringerer Affinität, indem der pseudogebundene Ligand durch Konformationsänderung zusätzlich mit den extrazellulären Loops wechselwirkt und es dadurch zur Signaltransduktion kommt. Quelle (65).

1.4.3 Signaltransduktion

Nach dem Binden spezifischer Liganden an den GPCR kommt es zur Aktivierung einer nachgeschalteten Signalkaskade, die über sekundäre Botenstoffe wie cAMP und Kalzium unter anderem letztlich das Genexpressionsmuster sowie die Chemotaxis der Zellen beeinflussen können.

Der zytoplasmatische Teil des Rezeptors steht in Kontakt zu trimeren G-Proteinen (79) (G_s oder G_i), die je aus einer G_α , β und γ -Untereinheit (UE) bestehen. In inaktivem Zustand bindet an der G_α -Untereinheit GDP (Guanosin-Diphosphat). Nach Bindung des spezifischen Liganden auf der extrazellulären Seite eines GPCR kommt es zu einer Konformationsänderung wodurch GDP mit GTP (Guanosin-Triphosphat) ausgetauscht wird. Infolgedessen löst sich die G_α -Untereinheit vom Komplex und interagiert unter anderem mit der benachbarten Adenylatcyclase (AC), wodurch die Synthese von cAMP (zyklisches Adenosin-Monophosphat) kontrolliert wird. Es gibt dabei $G_{s\alpha}$ und $G_{i\alpha}$ -Untereinheiten, die jeweils stimulierend (s) oder inhibierend (i) auf die AC wirken. Das Toxin des Keuchhustenerregers *Bordetella pertussis* inhibiert durch irreversible Modifikation der α -Untereinheit das G_i . Durch Hydrolyse des GTP löst sich die $G_{s\alpha}$ -UE von der AC und bindet wieder den $G_{\beta\gamma}$ -Komplex (55). Durch das cAMP als sekundärer Botenstoff wird eine Signalkaskade in Gang gesetzt, die über verschiedene Kinasen letztlich Einfluss auf die Genexpression nimmt. Abbildung 4 gibt einen Überblick über die Aktivierungskaskade, die über cAMP sowie Ca^{2+} zu verschiedenen zellulären Reaktionen führt.

Nach der Aktivierung der GPCRs durch Bindung der entsprechenden agonistisch wirkenden Liganden kommt es zu verschiedenen intrazellulären Abläufen. Es werden z.B. die „G-Protein-coupled receptor kinases“ (GRK) aktiviert, indem sie die GPCRs an spezifischen Serin- bzw. Threonin Resten phosphorylieren, was wiederum die Bindung von Arrestin an den Komplex zur Folge hat. Des Weiteren interagieren die GRKs mit anderen Proteinen wie beispielsweise Calmodulin und Caveolin sowie nicht-rezeptor-assoziierten Proteinen wie MEK und PI3K. Eine Übersicht über die Signaltransduktionskaskade von CCR3 und die beteiligte Proteine gibt Abbildung 4.

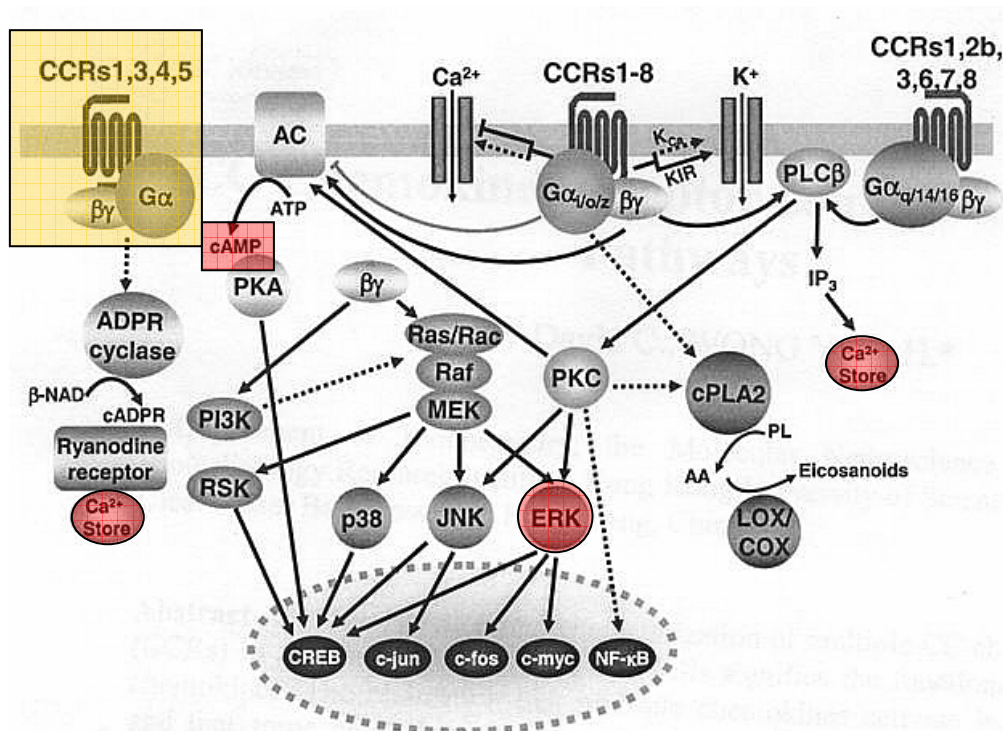


Abbildung 4: Signaltransduktion nach Aktivierung eines Chemokinrezeptors

Nach Aktivierung eines Chemokinrezeptors (gelb) über spezifische Liganden kommt es unter anderem durch Wechselwirkung der G α -Untereinheit des Rezeptors mit der Adenylatcyclase (AC). Diese produziert cAMP, welches zu einer weiteren Signaltransduktionskaskade führt. Unter anderem kommt es über den MAP-Kinase Weg zur Aktivierung von p38 (eine Mitogen activated kinase) sowie ERK (Extracellular signal regulated Receptor Kinase), die wiederum Einfluss auf das Genexpressionsmuster der Zellen nehmen. Des Weiteren werden intrazelluläre Ca²⁺ Reserven mobilisiert und freigesetzt. Modifiziert nach (71).

Die Geschwindigkeit der Rezeptorendozytose ist bei diesem Prozess abhängig vom jeweiligen Liganden sowie vom jeweiligen Rezeptor (Übersichtsartikel von Neel *et al.* (69). Beispielsweise konnten Zimmermann *et al.* (119) zeigen, dass der Aktivierung des CCR3 über RANTES im Vergleich zu Eotaxin 1 ein langsamerer Recyclingprozess folgt. Ein Modell, das die komplexen Zusammenhänge umfasst, die zur Internalisierung des Rezeptors führen, haben Claing *et al.* entworfen (15). Des Weiteren wurde berichtet, dass in CHO Zellen die Rezeptorinternalisierung des CCR5 sehr schnell und vorwiegend über den Clathrin-vermittelten Weg läuft (93). Unabhängig davon, ob ein Ligand an den Rezeptor bindet und dadurch zu dessen Internalisierung führt, gibt es eine basale Internalisierungsrate. Es wird stets ein bestimmter Prozentsatz an Rezeptoren endozytiert, intrazellulär recycled und nach einiger Zeit wieder auf die Zelloberfläche zurück transportiert. Für weitere Informationen zum Recycling- wie auch Degradationsprozesses sei hier auf eine Publikation von Drake *et al.* (24) verwiesen.

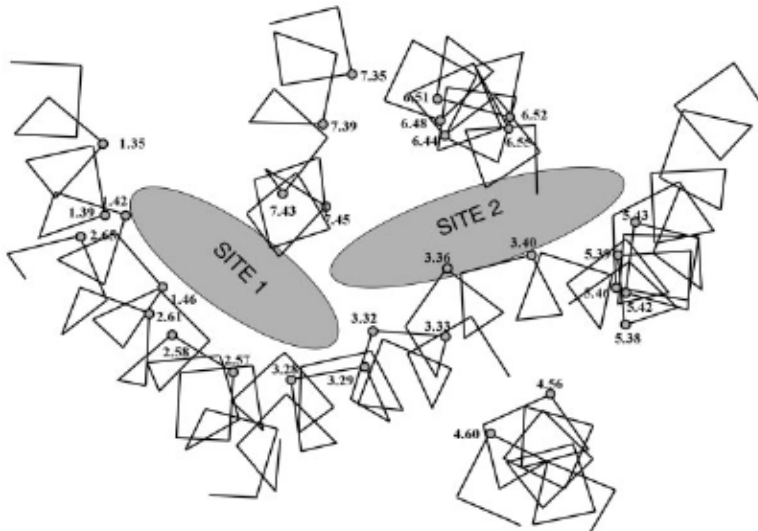
1.5 Auswahl der CCR3 Mutationen

Um die potentielle Bindetasche für antagonistisch wirkende Substanzen am CCR3 genauer charakterisieren zu können, wurden 10 Aminosäuren mutiert. Es sollte in nachfolgenden Experimenten untersucht werden, welche Konsequenzen diese Mutationen auf die Wirkung von Antagonisten haben. Die Auswahl der Mutationen in der Transmembrandomäne des hCCR3 wurde von Dr. Jan Kriegl, Boehringer Ingelheim, Biberach, basierend auf einer Publikation von Surgand *et al.* (98) getroffen. In dieser Publikation wurden die potentiellen Bindetaschen in der 7TM Region von 369 GPCRs identifiziert und anschließend in einem phylogenetischen Baum zusammengefasst. Als Templat für die Familie der Klasse A GPCRs (Rhodopsin like Receptors) wurde Rinder-Rhodopsin verwendet. Hier wurde die Bindetasche im TM Bereich durch alle Reste im Abstand von 10 Å vom Retinal bestimmt. 30 Aminosäuren wurden auf diese Art bestimmt, anhand derer die weitere Charakterisierung der anderen GPCRs vorgenommen wurden („Rognan's Residues“, siehe Abbildung 2). Für alle anderen GPCRs wurden zunächst die TM Helices und anschließend durch ein Sequenzvergleich mit Rhodopsin die entsprechenden charakteristischen Reste der Bindetaschen identifiziert. Abbildung 5 zeigt ein Sequenzvergleich der „Rognan's Residues“ für die Gruppe der Chemokinrezeptoren. Diese Reste bildeten die Basis zur Auswahl der Punktmutationen.

Ein weiterer wichtiger Aspekt zur Auswahl der Aminosäuren waren die Speziesunterschiede für bestimmte Aminosäurepositionen am Rezeptor. Einige Aminosäuren in der Bindetasche unterscheiden sich für Ratte, Maus und Mensch (siehe Tabelle 2 und Abbildung 5). Dies könnte die bereits in diversen Assays detektierten Speziesunterschiede für bestimmte Liganden erklären. Des weiteren sollte eine direkte Substanzinteraktion über die Aminosäuren C207, H114, Y291 und R95 adressiert werden. H114 wurde dabei in Ala oder Phe mutiert, um die unterschiedlichen Interaktionsmöglichkeiten (Wasserstoffbrücke, hydrophobe Wechselwirkung) zu überprüfen. Aus demselben Grund wurde Y291 in Ser und Phe mutiert. Alle anderen Aminosäuren wurden zu Ala umgewandelt. Aufschluss über die Begrenzung der Bindungstasche sollten die Mutationen Y255A und Y41A geben. Daneben ist es interessant, den Einfluss von konservierten Resten wie Y113 und E287 auf die Rezeptor-Liganden-Wechselwirkung zu untersuchen. Ein Modell des CCR3 Rezeptors mit den mutierten Aminosäuren gibt Abbildung 6 wider.

Für einige der hier ausgewählten Reste konnte für CCR1, 2 und 5 bereits gezeigt werden, dass sie an der Interaktion mit nicht-natürlichen Liganden beteiligt sind (6, 61, 104). Kurz nachdem die Auswahl der Reste für die Punktmutationen getroffen worden war, wurde in einer Arbeit von Wise *et al.* gezeigt, dass die Reste Y41, Y113 und E287 an der Interaktion zwischen chemischen Molekülen und dem CCR3 Rezeptor beteiligt sind.

A



B

hCCR3 :	Y	V	G	L	P	I	R	L	S	Y	H	L	I	A	E	H	T	M	T	C	F	W	Y	N	I	M	E	Y	H
mCCR3 :	L	Y	V	G	V	P	I	L	L	S	Y	L	I	A	E	H	A	M	N	G	F	W	Y	N	L	M	E	Y	H
rCCR3 :	L	Y	V	G	V	P	I	L	L	S	Y	L	I	A	E	H	A	M	N	G	F	W	Y	N	L	M	E	H	H

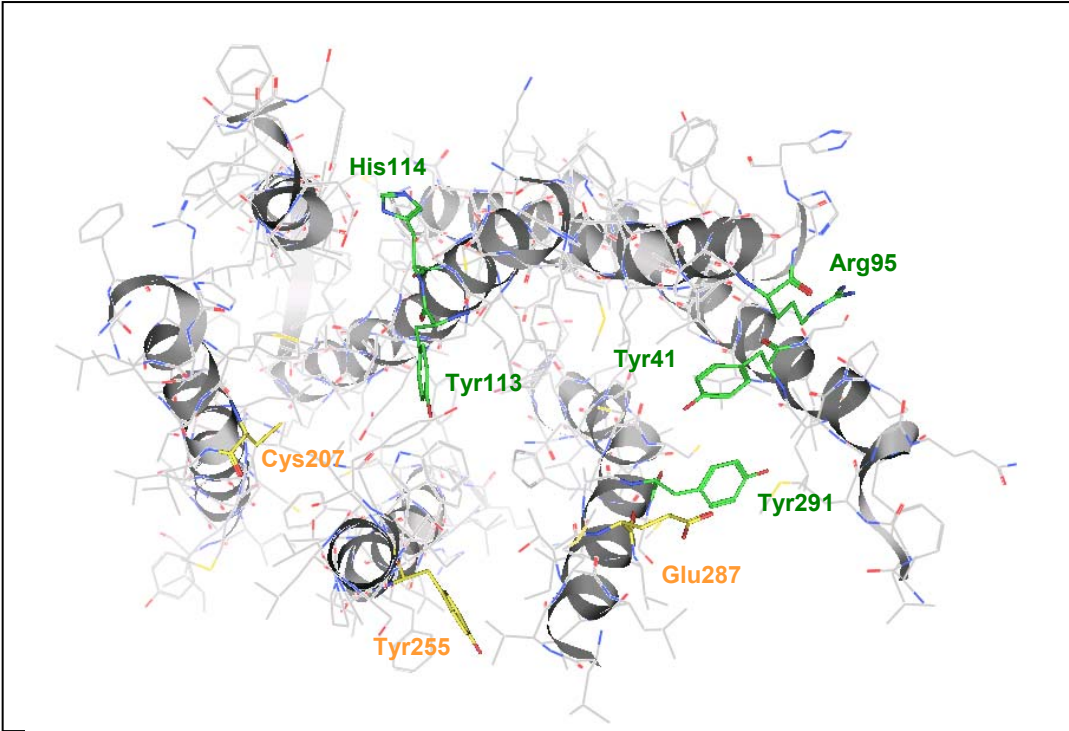
Abbildung 5: 30 für die Substanzbindung kritische Aminosäuren (Rognan`s Residues“) mit Sequenz-Vergleich

A) gibt eine Aufsicht der 7 TMD-Region eines GPCR wieder. Gezeigt sind 30 AS, die voraussichtlich an der Bindung von Substanzen beteiligt sind („Rognan`s Residues“) und die potentiellen Bindetaschen (Site 1 und Site 2). In B) ist der Sequenz-Vergleich der 30 AS Reste im Vergleich zwischen Mensch (h-), Ratte (r-) und Maus (m-) dargestellt. Farbig markiert sind die Aminosäuren, die sich für die genannten Spezies unterscheiden. A) aus und B) nach (98).

Tabelle 2: Ausgewählte Speziesunterschiede für Aminosäuren im CCR3

Aminosäure-Position	Mensch	Maus	Ratte
95	Arginin	Leucin	Leucin
114	Histidin	Tyrosin	Tyrosin
207	Cystein	Glycin	Glycin
291	Tyrosin	Tyrosin	Histidin

A



B

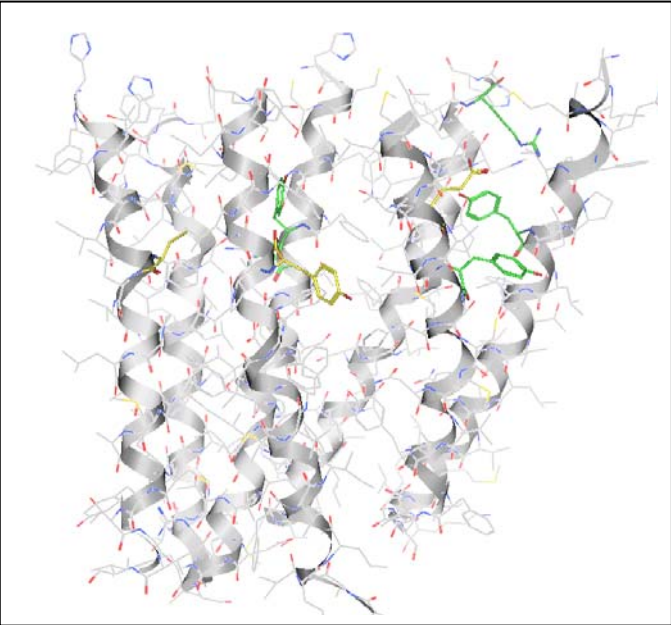


Abbildung 6: Modellerte 7 TMD-Region des hCCR3

A) und B) zeigen die Helices des CCR3 Rezeptors, einmal als Aufsicht (A) sowie in der Seitenansicht (B). Die im Rahmen dieser Arbeit mutierten AS sind farbig gekennzeichnet. Orange: mutierte Aminosäuren, für die keine CCR3 Expression erreicht wurde, Grün: Mutationen, für die eine CCR3 Expression erreicht wurde und ihr Einfluss auf die Ligandeninteraktion untersucht werden konnte. Die Modelle wurden freundlicherweise von Dr. Jan Kriegl mit dem Programm „Modeler“ von Accelrys Inc (San Diego) (v2006.05) erstellt.

1.6 Assays zur funktionellen Charakterisierung des CCR3

Um die Wirkung von Substanzen am Rezeptor zu untersuchen, bedient man sich verschiedener biochemischer und funktioneller Assays. Zum einen kann man mittels eines SPA-Bindungsassays mit radioaktiv markierten Liganden, die Bindung von Liganden bzw. Substanzen an den Rezeptor detektieren (siehe 3.7) (2). Aussagen über die Potenz von Liganden, einen GPCR zu aktivieren, erhält man mittels des GTP γ S Assays, bei dem der Austausch von gebundenem GDP mit radioaktiv markiertem GTP detektiert wird (siehe 3.8.) (42). Je potenter ein Ligand in der Lage ist, den Rezeptor zu binden und damit zu aktivieren, desto stärker wird das detektierte Signal sein. Nachdem entsprechende Liganden am Rezeptor gebunden und diesen aktiviert haben, kommt es nach gewisser Zeit zur Internalisierung des Rezeptors. Dies kann man als Reduktion der Oberflächenexpression z.B. über spezifische Antikörper mittels Durchflusszytometrie messen. Ebenso stellen auf Immunfluoreszenz basierende Untersuchungen über spezifische fluoreszenzmarkierte Antikörper eine Möglichkeit dar, Rezeptoren sowie in der Signalkaskade nachgeschaltete Parameter zu detektieren. Als ein sehr umfassendes Werk sei an dieser Stelle auf „Methods in Molecular BiologyTM, Volume 138, Chemokine Protocols“ (speziell Kapitel 14, 15, 16) verwiesen, das alles Wissenswerte über das Arbeiten mit und an Chemokinen und ihren Rezeptoren abdeckt (81). Als funktionelle Assays lassen sich neben einem cAMP Assay, Chemotaxis- sowie Kalzium-Assays durchführen. Im cAMP Assay (engl. cyclic adenosine monophosphate) wird das nach Stimulation der GPCR durch Wechselwirkung mit der Adenylatcyclase produzierte cAMP bestimmt (Handbuch „Whole Cell cAMP Functional Assay“, Technical Note AN002-ASc, Packard Instrument Company, Meriden, USA). Bei einem Chemotaxis-Assay wird das Vermögen der Zellen untersucht, sich entlang eines Ligandengradienten zu bewegen. Auf potente Liganden reagieren die Zellen mit effizienter Chemotaxis. Über die beiden genannten funktionellen Assays hinaus stellt die Messung von intrazellulär freigesetztem Kalzium nach Stimulation der entsprechenden Zellen eine weit verbreitete Methode zur Untersuchung der Rezeptoraktivität dar. Die fluoreszenzbasierte Messung erfolgt dabei an einem FLIPR (Fluorometric Imaging Plate Reader). Zur Charakterisierung der in dieser Arbeit untersuchten CCR3 transfizierten Zelllinien sollten verschiedene dieser Assays herangezogen werden.

2 Zielsetzung der Arbeit

Der humane CC-Chemokinrezeptor 3 spielt eine zentrale Rolle in der Pathogenese von Asthma. Um hier therapeutisch intervenieren zu können, ist es notwendig, die Vorgänge der Rezeptor-Ligand Wechselwirkung aufzuklären.

Von anderen Arbeiten weiß man bereits, dass natürliche Liganden vorwiegend mit dem N-Terminus sowie den extrazellulären Bereichen des CCR3 wechselwirken, wohingegen man davon ausgeht, dass Rezeptorantagonisten im Bereich der Transmembrandomäne mit dem Rezeptor wechselwirken. Um dies zu bestätigen, sollten 8 ausgewählte Aminosäuren in der Transmembrandomäne des CCR3 mutiert werden und deren Einfluss auf die Wechselwirkung von Rezeptor mit natürlichen Liganden sowie agonistischen und antagonistischen chemischen Molekülen untersucht werden. Ziel war es dabei, ein hypothetisches Rezeptormodell des humanen CCR3 experimentell zu überprüfen, und gleichzeitig ein besseres Verständnis von den Interaktionsstellen der natürlichen Liganden und chemischen Moleküle mit dem Rezeptor zu bekommen.

3 Material und Methoden

3.1 Mutagenese des CCR3

Die Klonierung wurde von der Trenzyme GmbH, Konstanz, durchgeführt. Das Zielgen (*hCCR3*) wurde dabei über PCR (engl. Polymerase chain reaction) in einen PCR-Klonierungsvektor zur nachfolgenden Subklonierung in den Vektor pcDNA/FRT überführt. Im PCR-Klonierungsvektor wurden 10 einzelne Aminosäurepositionen des CCR3 mutiert und in den pcDNA5/FRT Vektor subkloniert. Die Klonierung von *hCCR3* erfolgte unter Verwendung der Schnittstellen HindIII/NotI und wurde durch Oligomere eingeführt. Zusätzlich wurde vor dem Startcodon eine Kozak Konsensus-Sequenz eingeführt. Die Amplifizierung wurde mit folgenden Primern durchgeführt (die targetspezifische Sequenz ist in Großbuchstaben dargestellt):

1142_CCR_Hind(57) 5` - aagcttaccaccATGACAACCTCACTAGATACAGTTG -3`

1142_CCR_Not(57) 5` - gcggccgcCTAAAACACAATAGAGAGTTCCGG -3`

Das PCR-Produkt wurde unter Verwendung von Standardprimern in den PCR-Klonierungsvektor pAlli10 bzw. pAlli11 kloniert. Im zweiten Schritt wurden verschiedene Punktmutanten erzeugt. Da die erste gewählte Mutagenese-strategie nicht bei allen Mutanten erfolgreich war, wurden fehlende Mutanten durch „Fusions-PCR“ erzeugt, in pAlli10 kloniert und dort sequenziert. Nach erfolgreicher Sequenzierung des Wildtyps und der Mutanten erfolgte die Umklonierung der Targetsequenzen über HindIII/NotI in den Zielvektor pcDNA/FRT. Dort wurden alle Klone erneut sequenziert.

3.2 Stabile Transfektion mit CCR3

CHO-Flp-InTM Zellen (3×10^5 Zellen/Well) wurden einen Tag vor der Transfektion in 6-Well-Platten (n=12 Wells) in je 2 ml Ham's F12 Medium (Lonza, Verviers, Belgien) mit 10% FCS (engl.: fetal calf serum, Foetales Kälberserum) (InvitrogenTM, Auckland, Neuseeland) ausgesät und über Nacht im Brutschrank bei 37°C und 5% CO₂ kultiviert. Am nächsten Tag erfolgte die stabile Transfektion der Zellen für den hCCR3 Wildtyp sowie der zehn Mutationen. Die Kontrolle wurde mit reinem Medium behandelt. Die zu untersuchenden Punktmutationen des CCR3 sind in Tabelle 3 angegeben.

Tabelle 3: Mutationen des hCCR3 mit Sequenzierprimern Trenzyme GmbH

	Mutation	c [ng/μl]	Sequenzierprimer
1	pcDNA5/FRT_CCR_wt	2800	pcDNA3.1-FP pcDNA3.1-RP1
2	pcDNA5/FRT_CCR_H114F	2800	
3	pcDNA5/FRT_CCR_Y41A	1298	
4	pcDNA5/FRT_CCR_R95A	1562	
5	pcDNA5/FRT_CCR_Y113A	980	
6	pcDNA5/FRT_CCR_H114 A	538	
7	pcDNA5/FRT_CCR_C207A	1358	
8	pcDNA5/FRT_CCR_Y255 A	1496	
9	pcDNA5/FRT_CCR_E287A	1382	
10	pcDNA5/FRT_CCR_Y291S	994	
11	pcDNA5/FRT_CCR_Y291F	1352	

Der für die Klonierung benötigte Transfektionsvektor pOG44 wurde freundlicherweise von Labor Dr. John Park, Boehringer-Ingelheim, Biberach, zur Verfügung gestellt. Für die stabile Transfektion wurde die Punktmutanten-DNA auf 1 μg/μL mit serumfreien Ham's F12 Medium (Lonza, Verviers, Belgien) verdünnt. Pro Ansatz wurden 10 μg DNA (1 μg der Punktmutanten-DNA und 9 μg des pOG44 Vektors) in 500 μL FCS-freiem Medium angesetzt und unter leichtem Mischen 25 μL FuGene[®] HD Transfection Reagent (Roche Diagnostics, Indianapolis, USA) zugegeben. FuGene[®] HD Transfection Reagent ist eine Mischung aus Lipiden, gelöst in 80% Ethanol. Es formt mit DNA einen Komplex und transportiert diesen durch die Membran in die jeweiligen Zellen. Nach 15 minütiger Inkubation bei RT wurde die Lösung langsam auf die in 6-Well-Platten ausgesäten Zellen getropft und die Platte leicht rotiert, um eine Durchmischung zu erreichen. Die Zellen wurden bei 37°C und 5% CO₂ 48 h im Brutschrank belassen. Danach wurde das Medium abgenommen, die Zellen mit DPBS (InvitrogenTM, Auckland, Neuseeland) gewaschen und Medium mit 10% FCS zugefügt. Nach weiteren 24h im Brutschrank wurden die Zellen wie

unter 3.4 beschrieben abgelöst und in eine 25 cm² Zellkulturflasche (BD Biosciences, Bedford, USA) übertragen. Ab diesem Zeitpunkt wurden die Zellen mittels Hygromycin B unter Selektionsdruck gesetzt, indem dem Medium 600 µg/ml Hygromycin B (Invitrogen™, Carlsbad, USA) beigefügt wurden. Die Zellen wurden nach Bedarf gesplittet und auf größere Zellkulturflaschen übertragen (siehe auch 3.4).

3.3 Flp-In™ System

CHO-Flp-In™-Zellen (Labor Dr. Jörg Rippmann, Boehringer-Ingelheim, Biberach) wurden mit humanem CCR3 Rezeptor mittels Flp-In™-System (Invitrogen™, Auckland, Neuseeland) transfiziert. Dabei sollten 10 unterschiedliche Punktmutationen in der Transmembrandomäne des hCCR3 Rezeptors sowie des WildtypCCR3 (WtCCR3) untersucht werden. Der Vorteil des Flp-In™-System liegt in der stabilen Integration des gewünschten Zielgenes an immer derselben Stelle in das Genom. Somit kann ausgeschlossen werden, dass eventuell vorliegende Unterschiede zwischen den einzelnen Rezeptormutanten auf die Integration an unterschiedlichen Orten im Genom zurückzuführen sind. Ein detektierter Unterschied der Rezeptorexpression oder in Assays sollte demnach das Resultat der jeweiligen Mutation sein. Beim Flp-In™-System kommt es zur intermolekularen Rekombination von DNA, die durch eine Flp-Rekombinase vermittelt wird. Zu diesem Zweck werden zwei Plasmide in die Flp-In™-Zielzelle gebracht, die eine FRT-Site in ihrem Genom enthält: Auf dem pOG44-Plasmid wird die Flp-Rekombinase kodiert. Sie besitzt eine Bindestelle für die FRT-Sites und führt somit dort zur Integration des pcDNA5/FRT/TO[®] in das Genom. Das zweite Plasmid, das pcDNA5/FRT/TO[®]-Plasmid, trägt ein Hygromycinresistenzgen und das Zielgen (GOI, gene of interest, Vgl. Abbildung 7) (48). Durch die Integration in das Zellgenom geht die dort bisher vorhandene Zeocinresistenz verloren, gleichzeitig wird die Hygromycinresistenz erworben. Veranschaulicht wird der Prozess in Abbildung 7. Da das pOG44-Plasmid keinerlei Antibiotikaresistenzgene trägt, steht die Flp-Rekombinase folglich unter keinem Selektionsdruck und verschwindet nach und nach wieder aus dem Genom (49).

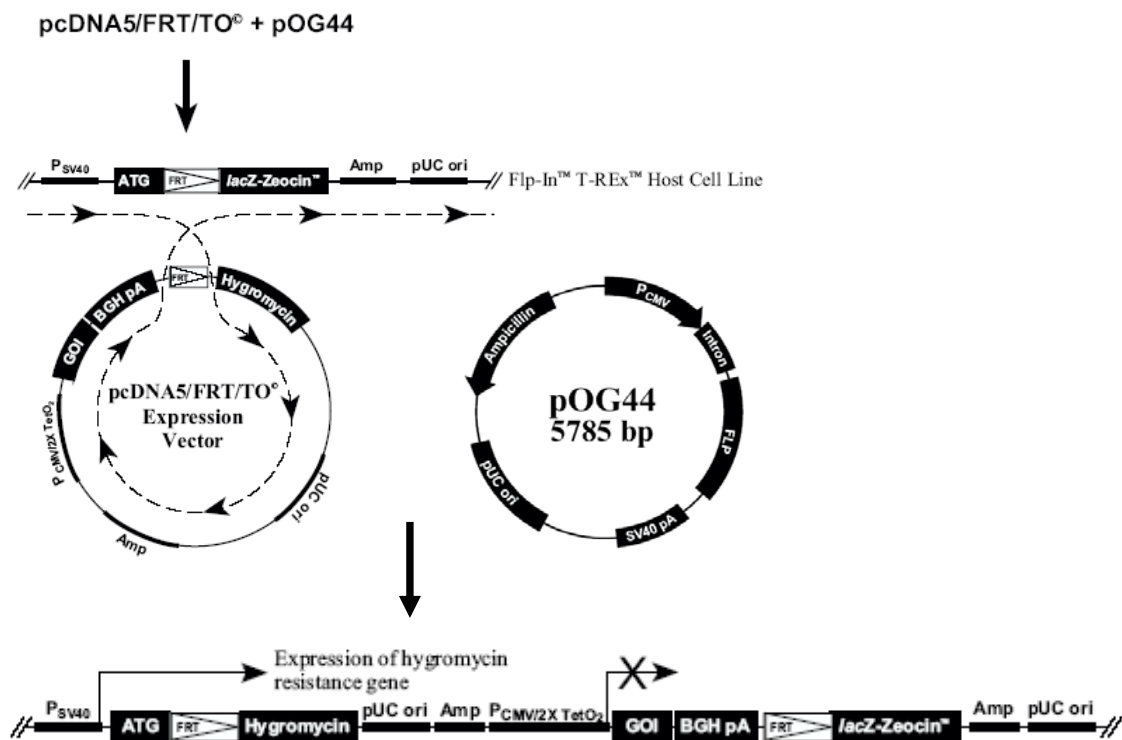


Abbildung 7: Prinzip des Flp-In™ Systems mit zwei Plasmiden

Der pOG44 kodiert für die FLP-Rekombinase, die zur homologen Rekombination benachbarter FRT-sites führt. Dadurch wird das GOI (gene of interest) zusammen mit Hygromycinresistenzgenen in das Zielgenom integriert. Modifiziert nach (48, 49).

3.4 Zellkultur

Für alle Versuche wurden transfizierte CHO-K1-Flp-In-Zellen verwendet. Dabei handelt es sich um epitheliale „Chinese-hamster-ovary cells“. Die transfizierten CHO-Zellen wurden in „Ham`s F12 Medium with Glutamine“ (Lonza, Verviers, Belgien) mit 10% FCS (Invitrogen™, Auckland, Neuseeland) und 600 µg/ml Hygromycin B in DPBS (beide Invitrogen™) bei einer Temperatur von 37°C und einem CO₂-Gehalt von 5% im Brutschrank (HERA Cell Incubator, Kendro Laboratory Products, UK) kultiviert. Das Hygromycin diente dabei als Selektionsmarker für die erfolgreich transfizierten Zellen. Die käuflich erwerbbar hCCR3- α 16 transfizierte CKO-K1-Zelllinie (Euroscreen S.A., Belgien) wurde als Referenzzelllinie in den Assays mitgetestet. Diese wurden mit Ham`s F12 Medium mit 10% FCS, 50 Units/ml Penicillin/Streptomycin (Invitrogen Corporation, Carlsbad, USA) 400 µg/ml G418 und 125 µg/ml Zeocin (beide Invitrogen™, Auckland, Neuseeland) kultiviert. Die Kultivierung aller Zellen erfolgte je nach Bedarf in 75 cm² oder 175 cm² Zellkulturflaschen aus Polystyrene (BD Biosciences, Bedford, USA). Die Zellen wurden zur Stammhaltung alle 2-3 Tage je nach Konfluenz (80-100%) im Verhältnis 1:3 bzw. 1:4, über Wochenenden 1:10 wie folgt passagiert: Das Medium wurde

abgenommen und die adhärent wachsenden Zellen mit DPBS (1x ohne $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$) (Invitrogen™, Auckland, Neuseeland) gespült, um restliches Medium zu entfernen. Es folgte eine 3-4 minütige Inkubation mit 0,5% Trypsin-EDTA (1x) (Invitrogen™, Auckland, Neuseeland) bei 37°C. Trypsin ist ein proteolytisches Enzym aus der Familie der Endopeptidasen, das spezifische Peptidbindungen zwischen Aminosäuren spaltet (11). Dadurch werden die Bindungen zwischen Zellen und Flaschenboden gespalten, was zum Ablösen der Zellen führt. Die Reaktion wurde durch die Zugabe von 4-6 ml Medium gestoppt und die Zellen nach Bedarf gesplittet bzw. für die jeweiligen Versuche weiterbehandelt. In die 175 cm² Zellkulturflaschen wurden abschließend ca. 20 ml Medium, in die 75 cm² Flaschen (BD Biosciences, Bedford, USA) ca. 10 ml Medium hinzugegeben.

Sofern eine Zellzahlbestimmung erforderlich war, wurden 100 µl der Zellsuspension in 10 ml (1:100) isotoner Salzlösung (Casy®ton, Innovatis AG, Reutlingen, Deutschland) verdünnt und anschließend die Zellzahl mit dem Casy® (Innovatis AG, Reutlingen, Deutschland) durch Zweifachmessung unter Bildung des Mittelwertes bestimmt.

3.4.1 Isolation von hochexprimierenden Einzelklonen

Mit dem Ziel eine möglichst hohe CCR3 Expression der transfizierten CHO-K1-Flp-In-Zellen für jede Mutante zu erhalten, wurden aus den transfizierten Mischpopulationen pro CCR3-Mutation Einzelklone isoliert. Dies wurde über eine Verdünnungsreihe erreicht. Dabei wurde die Zellzahl der Mischpopulationen bestimmt (siehe unter 3.4) und die Suspension soweit verdünnt, dass nach Aussaat in einer 96-Well Platte (Nunclon™ surface) (Nunc™, Roskilde, Dänemark) statistisch 0,5 bzw. 1 Zelle pro Well in 100 µl Medium vorhanden sein sollten. Pro Mutante wurden auf diese Weise je zwei 96er Platten ausgesät. Die Platten wurden mit Verpackungsfolie (Saran, The Dow® Chemical Company, Edegem, Belgien) umwickelt, um die Verdunstung möglichst gering zu halten. Die Zellen wurden bei 37°C und 5% CO₂ im Brutschrank belassen. In regelmäßigen Abständen wurden die Wells unter dem Mikroskop auf das Wachstum einzelner Zellen untersucht.

Nach ca. 12-14 Tagen waren größere, aber noch voneinander zu unterscheidende Kolonien erkennbar. Wells, in denen nur eine Zellkolonie sichtbar war, d.h., in denen

alle Zellen dieser Population auf eine Zelle zurückführen waren, wurden markiert, neues Medium zugefügt und bis zur Konfluenz im Brutschrank belassen. Es folgte ein Transfer auf 24-Well-Platten (Nunclon™ surface) (Nunc™, Roskilde, Dänemark). Nach erneutem konfluenten Wachstum wurden die Zellen in 75 cm² Zellkulturflaschen (siehe auch 3.4, BD Biosciences, Bedford, USA) überführt. Das Waschen und Ablösen der Zellen wurde wie unter 3.4 beschrieben mit angepassten Mengen durchgeführt. Überstände wurden wegen der einfacheren Handhabung mittels einer Vakuumpumpe (Vacusafe Comfort, IBS Integra Biosciences) mit aufgesetzten Pasteurpipetten (WU, Mainz, Deutschland) abgesaugt.

In den meisten Fällen waren innerhalb zweier Tage nach Überführen in die 75 cm² Flaschen ausreichend Zellen (ca. 5×10^5 Zellen pro Ansatz) vorhanden, so dass diese auf ihre hCCR3-Expression nach spezifischer Antikörperfärbung mittels Durchflusszytometrie untersucht werden konnten (siehe 3.9.1). Auf diese Weise wurden pro Mutante 7-50 Einzelklone untersucht und jeweils soweit vorhanden fünf hochexprimierende Exemplare in flüssigem Stickstoff eingefroren. Der jeweils am höchsten exprimierende Klon wurde für die durchgeführten Versuche verwendet.

3.5 Membranpräparation

Pro Membranpräparation wurden 30-36 Zellkulturschalen (24.5 x 24.5 cm, Nunc™, Roskilde, Dänemark) benötigt. Um die entsprechende Menge an Zellen zu erhalten, wurden die Zellen aus 10 konfluent bewachsenen 175 cm²⁺ Zellkulturflaschen abgelöst (siehe 3.4) und je Flasche auf 300 ml mit Medium (Ham's F12 + 10% FCS) aufgefüllt. Je 100 ml der Zellsuspension wurden anschließend auf die Zellkulturschalen verteilt. Nach Erreichen der Konfluenz (nach etwa 2-3 Tagen im Brutschrank bei 37 °C und 5% CO₂) wurde die Präparation durchgeführt. Das Medium wurde abgegossen und die Zellen mit auf Eis gekühltem DPBS (10x, Invitrogen™, Auckland, Neuseeland, 1:10 verdünnt mit Aqua bidest) gewaschen. Die Zellen wurden mit einem Zellschaber (Sarstedt Inc., USA) von der Platte entfernt und in DPBS in einen Messzylinder (Brand GmbH und CO KG, Deutschland) auf Eis überführt. Die Zellzahl wurde bestimmt. Die Zellsuspension wurde auf Zentrifugengefäße verteilt und die Zellen 15 min bei 410xg und 4 °C abzentrifugiert (Sorvall Evolution RC, Rotor: Sorvall SLA3000, Thermo Electron Corporation).

3.5.1 Membranpräparation mittels Potter (für GTPyS-Assay)

Die Zellen wurden hierbei über mehrere Zentrifugationsschritte und mittels Pufferlösungen aufgeschossen. Um die Membranen zu schonen, wurden alle Arbeiten auf Eis und mit gekühlten Lösungen durchgeführt. Die Zellen wurden wie unter 3.5 beschrieben geerntet und abzentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und die Pellets mit DPBS durch Resuspendieren gewaschen und wiederholt zentrifugiert wie unter 3.5 beschrieben. Die Zellpellets wurden durch Aufnahme in ca. 30 ml Lösung A (15 mM Tris HCL pH 7.5, 2.0 mM MgCl₂, 0.3 mM EDTA, 1 mM EGTA) vereinigt und mittels des Potters (Potter S, B.Braun Biotech, Göttingen, Deutschland) homogenisiert. Um den erfolgreichen Aufschluss zu überprüfen wurde ein Aliquot abgenommen, mit Trypanblau (Invitrogen™, Auckland, Neuseeland) 1:5 gefärbt und unter dem Mikroskop angesehen. Falls nötig, wurde der Homogenisationsprozess wiederholt. Die homogenisierten Zellen wurden auf Zentrifugenröhrchen verteilt und 30 min bei 50.228xg und 4 °C zentrifugiert (Sorvall Evolution® RC, SS-34 Rotor, Sorvall). Der Überstand wurde verworfen, und es folgte ein Waschschrift mit Lösung A mit wiederholter Zentrifugation. Anschließend wurde das Pellet in 10 ml Lösung B (75 mM Tris HCL pH 7,5, 12,5 mM MgCl₂, 0,3 mM EDTA, 1 mM EGTA, 250 mM Saccharose) resuspendiert. Die Lösung wurde zunächst mit 10, 3 und 2 ml Pipetten homogenisiert und schließlich durch zuerst durch eine Kanüle mit 20xg, danach mit 22xg geschert (BD Microlane™ 3, BD Drogheda, Irland). In Aliquoten zu je 200 µl wurden die Membranlösungen bei -80 °C eingefroren. Um den Proteingehalt zu bestimmen wurde eine Proteinbestimmung nach Bradford durchgeführt (siehe 3.6).

3.5.2 Membranpräparation mittels „Cell-Disruption Bomb“

Nachdem die Zellen wie unter 3.5 beschrieben abgeschabt und zentrifugiert wurden, erfolgte die Aufnahme und Vereinigung der Pellets in Zelllysepuffer. Für den Lysepuffer wurde 1 Tablette Proteaseinhibitor „complete, EDTA-free“ (Roche Diagnostics, Indianapolis, USA) in 50 ml DPBS (mit Ca²⁺ und Mg²⁺) gelöst. Die Suspension wurde für 1h bei 4 °C unter Rühren in der „Cell Disruption Bomb“ (4635, Parr Instrument Company, Moline, USA) bei 900 psi Stickstoffatmosphäre („N₂ cavitation“) unter Druck gesetzt. Danach wurde der Druck zügig reduziert und die Membransuspension aufgefangen. Durch den starken Druckabfall werden die Zellen durch das Abflussventil „gepresst“ und dadurch aufgeschossen. Der Aufschluss

wurde unter dem Mikroskop überprüft. Die Suspension wurde bei 4° C für 30 min bei 400xg (Sorvall Evolution® RC, SS-34 Rotor, Sorvall) zentrifugiert, wobei sich die Zellkerne absetzen, die Membranen aber in Lösung bleiben. Der Überstand wurde bei 50.228xg 1h bei 4 °C zentrifugiert (Sorvall Evolution® RC, SS-34 Rotor, Sorvall). Die Pellets wurden anschließend in SPA-Puffer (25 mM HEPES, 25 mM MgCl₂ x 6H₂O, 1mM CaCl₂ x 2H₂O, pH 7,6) aufgenommen und mittels einer 5 und 2 ml Pipette und schließlich mit einer Kanüle (20xg) (BD Microlane™ 3, BD Drogheda, Irland) resuspendiert. Abschließend folgte das dreifache Homogenisieren mit 22xg mittels einer Kanüle. In Aliquoten zu 50-100 µl wurden die Membransuspensionen bei -80 °C eingefroren.

3.6 Proteinbestimmung nach Bradford

Um den Proteingehalt der unter 3.5 gewonnenen Membranen zu bestimmen, wurde eine Konzentrationsbestimmung nach Bradford durchgeführt. Zu diesem Zweck wurden BSA-Standards in den Konzentrationen 0,25, 0,35, 0,7, 1,0 und 1,4 mg/ml hergestellt. Die Membranen wurden rein, 1:5 und 1:10 verdünnt eingesetzt. Aqua bidest diente als Leerwert. Jeweils 20 µl aller Proben wurden mit 1 ml Dye Reagent, Sigma-Aldrich, St.Louis, USA) in Einmalküvetten (PLASTIBRAND®, Brand GmbH & CO KG, Wertheim, Deutschland) pipettiert, gemischt und ca. 5 min bei RT inkubiert. Danach erfolgte die Messung der Absorption bei 595 nm am Photometer UltroSpec 3000 (Pharmacia Biotech, Freiburg, Deutschland).

3.7 Scintillations-Proximity (SPA)-Bindungsassay

Bei einem SPA-Bindungsassay werden Bindungsreaktionen von Liganden an Membranen bzw. spezifische Rezeptoren gemessen. Das Prinzip des hier verwendeten Bindungsassays beruht auf SPA-Technologie (engl.: Scintillation Proximity Assay) unter dem Einsatz radioaktiv markierter Moleküle. Als Nuklide werden hierbei meist schwache β-Strahler wie das ³H-Tritium oder das ¹²⁵Jod verwendet. Für die hier durchgeführten Versuche am CCR3 Rezeptor wurde ¹²⁵J-markiertes Eotaxin 1 verwendet.

Um eine Detektion der Bindung dieses markierten Eotaxins zu ermöglichen, werden im Assay WGA-Beads (engl: Wheat germ agglutinin, Weizenkeim) (Amersham™ WGA Agglutinin SPA Beads, GE Healthcare, Buckinghamshire, UK) eingesetzt. Bei WGA handelt es sich um ein Lektin, das eine hohe Affinität zu N-Acetyl-β-Glucosamin-Resten hat und für einen SPA-Assay kovalent an Polyvinyltoluene Scintillant gebunden ist. Diese Szintillations-Polymer-Kügelchen binden an Membranen bzw. Rezeptoren und emittieren Photonen unter der Einwirkung von β-Strahlung. Diese β-Strahlung entsteht aber ausschließlich durch Binden des radioaktiv markierten Liganden an spezifische Zelloberflächenstrukturen wie Rezeptoren. Die induzierte Photonenemission ist dabei proportional der Rezeptor-Liganden-Komplexe (70). Die Distanz, die ein emittiertes β-Teilchen in wässriger Lösung zurücklegt, ist sehr gering, was zur Folge hat, dass ausschließlich gebundene Radioliganden aktiviert werden (102). Die Detektion erfolgte am Szintillations-Beta-Counter (1450 MICROBETA Plus, Liquid Scintillation counter, Wallac-ADL-GmbH, Deutschland). Um die spezifische Bindung der Liganden an den Rezeptor zu erhalten, wurden zwei Werte bestimmt: Der NSB-Wert (engl.: non specific binding) gibt die maximale Verdrängung mit nicht markiertem Eotaxin 1 an und resultiert damit in einem Minimum an spezifischer Bindung. Bei dem zweiten Wert handelt es sich um den B0-Wert, der ein Maximum an spezifischer Bindung mit den radioaktiv markierten Liganden liefert. Dies wird durch Zugabe von radioaktiv markierten Liganden erreicht, die um die Bindungsstellen mit den nicht markierten Molekülen kompetieren. Alternativ dazu wurde mit der antagonistisch wirkenden Substanz 5 versucht, die Bindung durch Eotaxin 1 zu kompetieren.

3.7.1 Durchführung des SPA-Assays

Der SPA-Bindungsassay wurde sowohl als Ganzzellassay als auch mit Membranen durchgeführt. Die Zellen wurden abgenommen, die Zellzahl bestimmt, mit SPA-Puffer (ohne BSA) gewaschen und abzentrifugiert (5 min, 290xg, Centrifuge 5810, Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland). Anschließend wurden die Zellen in entsprechender Menge an SPA-Puffer (mit 0,1% BSA) aufgenommen und auf Eis gestellt (2×10^5 Zellen/50 µl/Well). Der ursprüngliche SPA-Puffer enthielt 25 mM HEPES, 25 mM MgCl₂ 6xH₂O, 1mM CaCl₂6xH₂O (beide Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland), 25 mM HEPES sowie 0,1% BSA (beide Sigma-Aldrich, St. Louis, USA). 60 µl der Zellsuspension, 80 µl der WGA-Beads (c=0,04 mg/ml SPA-Puffer)

und 40 µl des radioaktiv markierten Eotaxins wurden eingesetzt. Das radioaktiv markierte Eotaxin (^{125}J rhEotaxin (GE Healthcare, Buckinghamshire, UK) wurde mit SPA-Puffer auf ca. 50.000 counts eingestellt und am „Gamma-Counter“ LB 211 (Berthold, Bad Wildbad, Deutschland) bestimmt (Verdünnung ca. 1:10). Der Antagonist wurde mit 10^{-6} M im Assay eingesetzt und dazu zuvor mit SPA-Puffer entsprechend verdünnt. Nacheinander wurden das unmarkierte Eotaxin 1 (ebenfalls mit SPA-Puffer verdünnt), das radioaktiv markierte Eotaxin 1, die Zellen und zuletzt die Beads in eine 96-Well-Platte (Isoplate-clear bottom, PerkinElmer LAS GmbH, Rodgau-Jügesheim, Deutschland) gegeben. Für den SPA-Assay mit Membranen wurde die benötigte Menge an Membran bereits zuvor mit Beads verdünnt und zusammen zugegeben. Sofern Antagonisten eingesetzt wurden, wurden diese zuletzt zugegeben. Pro Datenpunkt wurde eine Dreifachmessung durchgeführt. Nach 30minütiger Inkubation bei RT wurde über einen Zeitraum von 300 min stündlich gemessen, um den optimalen Zeitpunkt mit einem Maximum an Signal zu erreichen (Gleichgewicht der Reaktion). Die Messung erfolgte am Szintillations-Beta-Counter (1450 MICROBETA Plus, Liquid Scintillation counter, Wallac-ADL-GmbH, Deutschland). Zur Optimierung der Versuchsbedingungen wurden die Pufferzusammensetzung (Mg^{2+} und NaCl-Konzentration sowie pH von 7,0 bis 7,6), eingesetzte Zellzahl (für den zellbasierten Assay) bzw. Membranmenge (für den membranbasierten Assay), Beadmenge und Inkubationstemperatur (RT vs. 4 °C) variiert. Als Positivkontrolle diente eine Membran von hCCR3 transfizierten K562 Zellen (Euroscreen S.A., Belgien), die hier standardmäßig im Labor verwendet wird. Bei diesen K562 Zellen handelt es sich um leukemisch-myeloische Leukoblasten

3.8 GTPγS-Assay

Mittels des GTPγS-Assays kann man der Aktivitätslevel eines GPCR nach dessen Stimulation durch einen Agonisten messen. Der GTPγS-Assay basiert auf dem Prinzip eines SPA-Assays (Vgl. 3.7), bei dem ebenso WGA-PVT-Beads verwendet werden, die eine Bindung des Rezeptors ermöglichen. Wie unter 1.4.3 beschrieben, sind Chemokinrezeptoren an trimere G-Proteine gekoppelt. Durch die Stimulation des Rezeptors wird das gebundene GDP durch GTP an der α-Untereinheit der G-Proteine ausgetauscht. Im Assay wird hierfür radioaktiv markiertes [^{35}S]GTPγ (im folgenden GTPγS) verwendet, das nicht durch endogene GTPase hydrolysierbar ist und folglich akkumuliert (42). Gelangen die Membranen mit gebundenem radioaktiv

markierten Liganden nah genug an das Szintillant des PVT-Beads, stimuliert das [³⁵S]GTPγS das Szintillant zur Emission von Licht, welches detektiert werden kann (SPA G-Protein Coupled Receptor Assay (for use with [³⁵S]GTPγS), Handbuch RPNQ 0210 PL/AA, Amersham Biosciences, Buckinghamshire, UK, 2002).

Der verwendete Puffer für den Assay enthielt 20 mM HEPES, 100 mM NaCl, 10 µg/ml Saponin, 3 mM MgCl₂ und 0,1 % BSA (NaCl von Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland; alle anderen Zusätze Sigma-Aldrich, St. Louis, USA) bei einem pH von 7,4. Der Versuch wurde in einer 96-Well-Mikrotiterplatte (Microtest™ 96well-Assay Plate, Optilux™, clear bottom, TC surface BD Falcon™, BD Biosciences) mit einem Totalvolumen von 100 µl durchgeführt (10 µl des zu testenden Liganden, 20 µl der Membransuspension (2-10 µg/Well, zuvor wurde das Optimum ausgetestet) und 20 µl GDP (finale Konzentration im Assay von 3 µM)). Danach wurden 20 µl des [³⁵S]GTPγS (bei ca. 70.000 cpm, Amersham™/GE Healthcare, Buckinghamshire, UK) und 30 µl der WGA-PVT-Beads bei einer Konzentration von 16,67 mg/ml (Wheatgerm Agglutinin SPA Beads, GE Healthcare, UK). Es folgte eine zweistündige Inkubation. Als Positivkontrolle wurden 100 nM Eotaxin 1 sowie eine agonistische BI-Substanz eingesetzt. Die Messung erfolgte am Szintillations-Beta-Counter (1450 MICROBETA Plus, Liquid Scintillation counter, Wallac-ADL-GmbH, Deutschland).

Des weiteren wurden auf Membranen der CHO-K1-CCR3-Gα16 Zellen (Zellen von Euroscreen S.A., Belgien) die im Rahmen dieser Arbeit verwendeten natürlich vorkommenden hCCR3 Liganden mittels des GTPγS-Assays getestet. Ermittelt wurden EC₅₀ Werte sowie Kontrollwerte in % (% Ktrl) im Vergleich zu Eotaxin 1.

3.9 Durchflusszytometrie (FACS)

Da der Großteil der in dieser Arbeit generierten Daten über durchflusszytometrische Messungen bestimmt wurde, soll das Prinzip der Durchflusszytometrie ausführlicher beschrieben werden. Mittels der Durchflusszytometrie lassen sich in sehr kurzer Zeit (Zeitraumen von Sekunden bis Minuten) sehr viele (Größenordnung 10.000-100.000) Zellen oder Partikel analysieren. Dabei sind diese in einer Flüssigkeit gelöst, die vor der eigentlichen Messung mit einer Trägerflüssigkeit („Sheath fluid“) zusammenkommt. Bei dieser Trägerflüssigkeit handelt es sich in der Regel um eine

isotone Salzlösung (96). Eine Grobübersicht zur Durchflusszytometrie zeigt Abbildung 8.

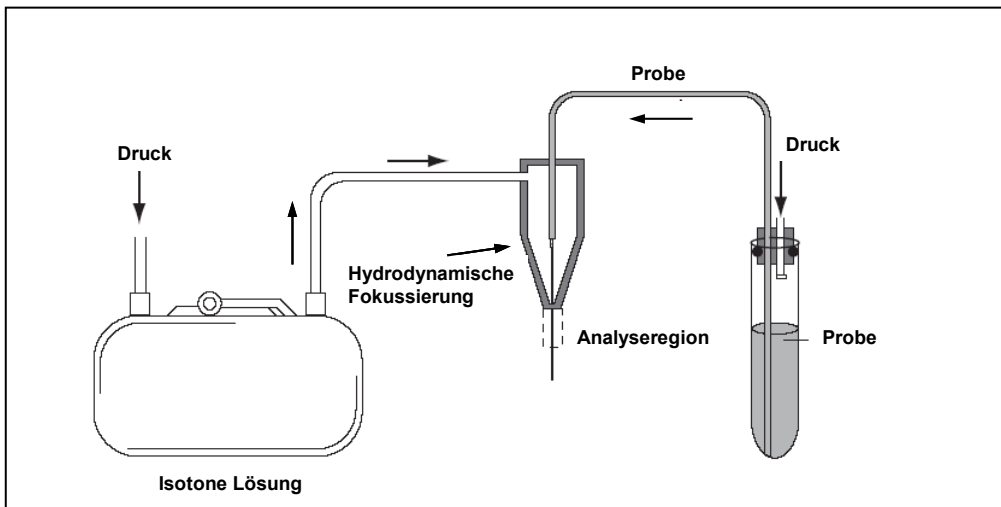


Abbildung 8: Grundaufbau eines Durchflusszytometers

Proben- und Trägerflüssigkeitsstrahl (Isotone Lösung) werden unter Ausnutzen der hydrodynamischen Fokussierung unter Druck vereint. Dadurch gelangen die zu untersuchenden Zellen vereinzelt in die Analyseregion wo sie einen Laserstrahl passieren [modifiziert nach (96)].

Die Durchflusszytometrie nutzt die so genannte „Hydrodynamische Fokussierung“, bei der die Zellen in einem exakten Strahl gehalten werden. Dies wird dadurch erreicht, dass der eigentliche Probenstrahl, der mit ca. 100 $\mu\text{l}/\text{min}$ fließt, durch die mit sehr viel höherer Geschwindigkeit (10 ml/min) einströmende Trägerflüssigkeit („Sheath fluid“, hier: Coulter Isoton[®] II Diluent, Beckman Coulter GmbH, Krefeld, Deutschland) begrenzt und damit zum Zentrum der Messkammer geleitet wird, wo sie einen Laserstrahl passieren (21). Dies wird in Abbildung 9 veranschaulicht. Jede Zelle wird dadurch vereinzelt durch die Messregion geschleust und analysiert.

Bei der Durchflusszytometrie unterscheidet man vorrangig folgende Messgrößen: Die Absorption und Streuung von Licht sowie die Fluoreszenz der Zellen oder beispielsweise daran gebundener Farbstoffe. Während die zu untersuchenden Zellen den Laserstrahl passieren, wird die reflektierte Strahlung abgelenkt. Dabei erhält man je nach Beschaffenheit einer Zelle eine charakteristische Kombination zweier Maße: Dem Forward- und dem Sideward Scatter. Der Forward Scatter (FSC) wird durch die Beugung des Lichtes verursacht und korreliert mit der Größe der Zellen, der Sideward Scatter (SSC) wird durch die Brechung des Lichtes hervorgerufen und korreliert mit der Granularität der Zellen. Somit lassen sich Zellen nach Größe und Granularität auftrennen und in einem Histogramm darstellen. Neben den beiden

genannten Größen spielt auch die Fluoreszenz eine Rolle. Unter Fluoreszenz versteht man die Emission (einer bestimmten Wellenlänge) von längerwelligem Licht nach Anregung durch eine kürzere und damit energiereichere Wellenlänge. Dieses Prinzip macht man sich auch bei der Durchflusszytometrie zunutze, indem man beispielsweise die zu untersuchenden Zellen zuvor mit einem fluoreszenzmarkierten Antikörper (AK) oder Farbstoff inkubiert, um somit Aussagen über die Quantität markierter Oberflächenrezeptoren zu machen.

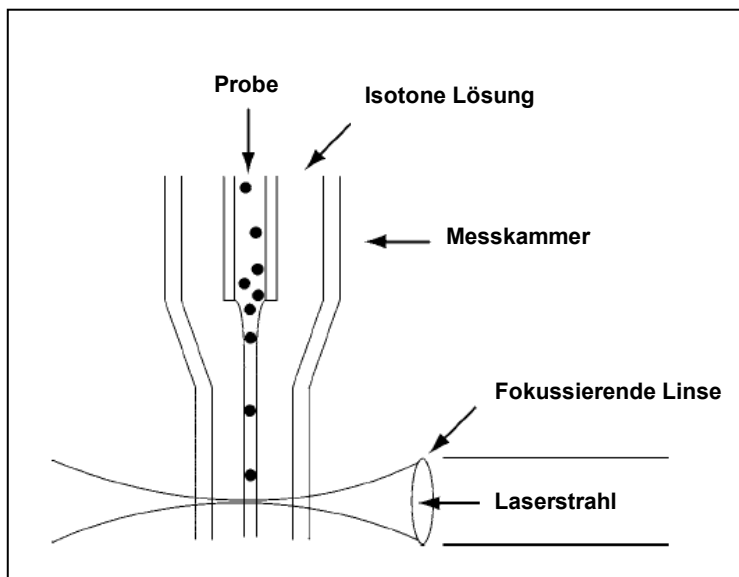


Abbildung 9: Längsschnitt durch eine Messkammer in einem Durchflusszytometer

Die Trägerflüssigkeit (Isotone Lösung) führt durch ihre höhere Flussgeschwindigkeit (FG 10ml/min) den Probenstrahl (FG 100 μ l/min) zum Zentrum der Messkammer, wo die Zellen einzeln durch einen Laserstrahl treten [modifiziert nach (21)].

Für die hier durchgeführten Versuche wurden die Zellen mit einem fluoreszenzmarkierten anti-human-CCR3-AK inkubiert. Dieser Antikörper ist dabei mit FITC gekoppelt (Fluorescein-Isothiocyanat), einem Farbstoff, der Licht im blauen Bereich absorbiert. Beim Durchtritt durch den Laserstrahl einer Wellenlänge von 488 nm wird dabei der Farbstoff angeregt und emittiert Licht einer höheren Wellenlänge, die wiederum detektiert wird. In Abhängigkeit der Menge an gebundenem Antikörper (die wiederum mit der Menge an exprimiertem CCR3 Rezeptor korreliert) entstehen stärkere oder schwächere Fluoreszenzsignale (CytomicsTM Animated Flow Cytometry Theory, Beckman Coulter[®] GmbH, Krefeld, Deutschland 2002). Auf diese Weise erhält man pro analysierter Zelle einen Datenpunkt und sämtliche Datenpunkte ergeben einen „Scatterplot“ (z.B. Auftragung FSC vs. SSC) aller

Einzelpunkte, die Auskunft über die Eigenschaften der analysierten Population an Zellen gibt.

An dieser Stelle sei noch eine Sonderform der Durchflusszytometrie, das „Fluorescence activated cell sorting“ (FACS) erwähnt. Dabei findet nach Analyse der Zellen ein „sorting“ im Sinne von physikalischer Trennung nach vorgegebenen Parametern statt. Zur Vereinfachung wird für den weiteren Text vereinzelt der Begriff FACS mit Durchflusszytometrie gleichgesetzt und an dessen Stelle verwendet, auch wenn keine Zellsortierung stattfand.

3.9.1 Antikörperinkubation der Zellen

Die Zellen wurden wie unter 3.4 beschrieben abgelöst und die Zellzahl bestimmt. Die pro Ansatz benötigte Anzahl an Zellen (5×10^5 Zellen) wurde je in ein Plastikröhrchen (5 ml Tubes, PP, Sarstedt, Nürmbrecht) überführt und 5 min bei 290xg und Raumtemperatur (RT) zentrifugiert (Centrifuge 5810 R, Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland). Der Überstand wurde danach abgenommen und die Zellen in FACS Puffer (DPBS ohne $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$ (Invitrogen™, Auckland, Neuseeland) mit 1% BSA (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA) resuspendiert und abzentrifugiert. Nachdem erneut der Überstand entfernt worden war, erfolgte die Antikörperinkubation. Zu diesem Zweck wurde ein monoklonaler anti-human-CCR3-Antikörper (Anti-hCCR3 Fluorescein conjugated Rat IgG2a) oder der passende Isotyp als Negativkontrolle (Isotype Control Rat IgG2a, beide von R&D Systems, Minneapolis, USA) mit FACS Puffer im Verhältnis 1:5 verdünnt. Die Ausgangskonzentrationen der Antikörper betragen dabei 50 µg/ml für den anti-hCCR3-AK und 25 µg/ml für den Isotyp. Die Zellpellets wurden in je 100 µl dieser Antikörperverdünnungen aufgenommen und 30-60 min auf Eis (4°C) im Dunkeln inkubiert. Es folgten 2 Waschschrte mit je 1-2 ml FACS-Puffer und die Zellen wurden abschließend in 500 µl Cellfix™ (BD Biosciences, Belgien), verdünnt im Verhältnis 1:10 mit DPBS (ohne $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$ (Invitrogen™, Auckland, Neuseeland)), aufgenommen und per Durchflusszytometrie am Cytomics FC 500 (Beckman Coulter® GmbH, Krefeld, Deutschland) analysiert. (Ablauf Vgl. (119)). Pro Ansatz wurden jeweils 10.000 Zellen gemessen. Für die sich daran anschließende Auswertung der erhaltenen Daten wurde die CXP Software (Beckman Coulter®, Version 2006) verwendet.

3.9.2 Antikörperinkubation nach Stimulation mit Liganden

Die Antikörperinkubation nach Stimulation mit entsprechenden Liganden wurde wie unter 3.9.1 beschrieben durchgeführt. Bedingt durch die Inkubation in 96-Well-Platten (PS, V-Boden) (VWR international, Deutschland) wurden die Mengen an Puffer und AK-Verdünnungen dementsprechend angepasst. Nach Inkubation der Zellen mit entsprechenden Liganden (siehe 3.10.1) wurden die Zellen bei 290xg 5 min und 4°C abzentrifugiert bei 290xg und Raumtemperatur (RT) (Centrifuge 5810 R, Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland) und der Überstand durch Klopfen der Platte auf mehrlagigen Zellstoff entfernt. Für Waschschriffe wurden die Zellpellets in 180 µl FACS-Puffer pro Well resuspendiert. Nach einem weiteren Zentrifugationsschritt erfolgte die Antikörper-Inkubation in einem Gesamtvolumen von 20 µl (Verdünnung 1:5 (in Ausnahmefällen bis 1:8 aufgrund von Antikörpermangel) 30 min auf Eis. Die unterschiedlich eingesetzte Menge an Antikörper hat keinen Einfluss auf die Ergebnisse, was in einem Vorversuch (Daten nicht gezeigt) getestet wurde. Danach folgten 2 Waschriffe mit je 180 µl FACS-Puffer. Abschließend wurden die Zellpellets in 235 µl Cellfix™ (BD Biosciences, Belgien), verdünnt im Verhältnis 1:10 mit DPBS (ohne Ca²⁺/Mg²⁺ (Invitrogen™, Auckland, Neuseeland)) aufgenommen. Um die Verdunstung gering zu halten und Verunreinigungen zu vermeiden, wurden die Platten während Zentrifugations- und Inkubationsphasen mit Klebefolie (S695, Fasson®) geschützt. Der Großteil der Messungen wurde wie unter 3.9.1 beschrieben am Cytomics FC 500 vorgenommen, wozu die Proben in Röhrchen umpipettiert werden mussten. Einige Messungen zur Testung der Antagonisten und Agonisten wurden direkt in der Platte am Cytomics FC 500 MPL (Beckman Coulter® GmbH, Krefeld, Deutschland) gemessen. Die Analysesoftware war in beiden Fällen dieselbe (CXP Software (Beckman Coulter®, Version 2006)).

3.10 FACS-basierter Internalisierungsassay

Nach der Bindung eines Liganden an den CCR3 Rezeptor wird letzterer aktiviert, nach gewisser Zeit internalisiert und verschwindet damit von der Zelloberfläche (siehe 1.4.3). Bei der Durchflusszytometrie wird klassischerweise durch Verwendung rezeptorspezifischer Antikörper das Vorhandensein entsprechender Rezeptoren untersucht. Mittels des FACS-basierten Internalisierungsassays wird also in Abhängigkeit der eingesetzten Konzentration der Liganden und deren Vermögen zu einer Internalisierung zu führen, eine Reduktion der detektierbaren Menge an Rezeptor auf der Zelloberfläche beobachtet.

3.10.1 Rezeptorinternalisierung durch natürliche Liganden und Agonisten

Wie unter 3.4 beschrieben wurden die transfizierten Zellen abgelöst, die Zellzahl bestimmt und pro Ansatz in je 90 µl HBSS (mit $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$) (Invitrogen™, Auckland, Neuseeland) mit 0,1% BSA aufgenommen und auf unsterile 96-Well Mikrotiterplatten (PS, V-Boden) (VWR international, Deutschland) ausgebracht. Pro Datenpunkt wurden je nach vorhandener Anzahl an Zellen 200.000-300.000 Zellen eingesetzt. Variationen bedingt durch unterschiedliche Zellzahlen konnten nach Austestung (Daten nicht gezeigt) ausgeschlossen werden. Die natürlichen Liganden (Vgl. Tabelle 1), gelöst in DPBS (ohne $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$) bei einer Konzentration von 10^{-5} M, wurden mit HBSS (mit $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$) (Invitrogen™, Auckland, Neuseeland) mit 0,1% BSA seriell verdünnt und mit einer finalen Konzentration von 0-300 nM im Assay eingesetzt (1:10, d.h. 10 µl der Ligandenverdünnung auf 90 µl Zellsuspension). Es erfolgte eine Inkubation bei 37°C im Brutschrank für eine Stunde. Pro Konzentration wurde eine Dreifachbestimmung durchgeführt. Die Inkubation mit agonistischen Verbindungen, die *per se* in reinem DMSO (Dimethylsulfoxide, Sigma-Aldrich, St. Louis, USA) gelöst sind, erfolgte analog, wobei diese in Konzentrationen von 0-10.000 nM getestet wurden.

Nach der Inkubation wurden die Platten 5 min bei 290xg (Centrifuge 5810, Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland) abzentrifugiert und der Überstand durch Klopfen der Platte auf mehrere Lagen Zellstoff verworfen. Nach einem weiteren Waschschrift mit HBSS (mit $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$) (Invitrogen™, Auckland, Neuseeland) mit 0,1% BSA erfolgte die Antikörperinkubation wie unter 3.9.2 beschrieben. Um die Verdunstung möglichst

gering zu halten und Verunreinigungen zu vermeiden wurden die Platten während der Inkubationszeit und der Zentrifugation mit selbstklebender Klarsichtfolie (S695, Fasson) abgeklebt.

Die natürlich vorkommenden Liganden Eotaxin 2,3, MCP 2,3,4 und RANTES wurden von der BioTrend Chemikalien GmbH, Köln, Deutschland bezogen, das Eotaxin 1 von Pepro Tech, Rocky Hill, USA (siehe Tabelle 1).

3.10.2 Inhibitionsvermögen von Antagonisten

Die Testung von Antagonisten wurde analog der Testung von Liganden und Agonisten durchgeführt (siehe 3.10.1). Pro Ansatz wurden die Zellen hier allerdings in 80 µl HBSS (mit $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$) (Invitrogen™, Auckland, Neuseeland) mit 0,1% BSA (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA) aufgenommen. In diesem Fall sollte das Kompetitionsvermögen potentieller antagonistischer Verbindungen mit Eotaxin 1 als wichtigsten CCR3 Liganden untersucht werden. Zu diesem Zweck wurden die Zellen zunächst mit Antagonisten in entsprechenden Verdünnungen (0-10.000 nM) inkubiert (1:9, d.h. 10 µl der Substanzverdünnungen mit 80 µl Zellsuspension). Die Inkubation erfolgte im Wasserbad bei 37°C für 10 min. Danach wurden analog der natürlichen Liganden und Agonisten 10 µl an Eotaxin zu den 90 µl hinzugegeben und für eine Stunde bei 37 °C im Brutschrank inkubiert. Es wurden dabei die aus 3.10.1 bestimmten EC80 für Eotaxin 1 pro Mutante eingesetzt, die von 30 nM (für H114A und H114F, Y41A, R95A, Y291S) über 100 nM (Wt, Y291F) bis zu 300 nM (Y113A) reichten. Um die Verdunstung möglichst gering zu halten und Verunreinigungen zu vermeiden, wurden auch hier die Platten mit Klarsichtfolie abgeklebt. Es folgten analoge Schritte wie unter 3.10.1 und 3.9.2 beschrieben.

3.10.3 Verwendete chemische Moleküle

Die im Rahmen dieser Arbeit getesteten Substanzen (Substanzen 1-8) sind Vertreter unterschiedlicher Strukturklassen aus einem internen Forschungsprogramm bei Boehringer-Ingelheim und wurden aus produktrechtlichen Gründen nicht genauer spezifiziert (siehe Tabelle 4).

Tabelle 4: Verwendete Substanzen mit ermittelten Werten aus verschiedenen Assays

Agonisten	Substanz- klasse	RB Ki	GTPyS Agonismus %KTRL	GTPyS EC50	GTPyS IC50	Ca ²⁺ Eos IC50	SC Eos IC50
Substanz 1	A	8,5	152,0	76,0			
Substanz 2	B	29,7	26,5	5943,5	523,0	24,0	
Substanz 3	C	82,7	15,0	832,0			
Substanz 4	A	4,4	135,0	13,9			
Antagonisten							
Substanz 5	D	2,1	-6,0		5,8	4,0	158,7
Substanz 6	E	2,8	-9,0		8,8	7,5	189,1
Substanz 7	B	17,4	-4,5		47,0	39,8	531,8
Substanz 8	F	7,3	-16,0		13,5	76,8	183,1

RB: Rezeptorbindungsassay mit radioaktiv markiertem Eotaxin

Ki: Dissoziationskonstante des Inhibitors

Ca²⁺ Eos: Ca²⁺ Freisetzung in Eosinophilen nach Eotaxinstimulation

SC Eos: "Shape change" Assay mit Eosinophilen

3.11 High Content Screening Assay

Das Prinzip des High Content Screenings (HCS) stellt eine Kombination aus fluoreszenzmikroskopischer Bildanalyse sowie automatisierter Bildanalyse dar. Es bietet die Möglichkeit aufgrund einer sehr hohen Auflösung auch adhärent wachsende Zellen ohne starke Hintergrundsignale exakt zu analysieren (40, 44). Da es gleichzeitig die Analyse vieler Datenpunkte im 384er-Plattenformat ermöglicht, stellt es ein Verfahren von hohem Durchsatz dar. Die hier zu untersuchenden CCR3-transfizierten Zelllinien sollten daher mittels dieser fluoreszenzmikroskopischen Methode charakterisiert werden. Dazu sollte zum einen ein CCR3 Internalisierungsassay mit zwei verschiedenen Analyseparametern sowie ein ERK~P Assay (Extracellular Regulated Kinase, siehe auch Abbildung 4) durchgeführt werden. Für die genauen Versuchsbeschreibungen sei hier auf die kürzlich erschienene Publikation von Haasen *et al.* (39) verwiesen, in der die Vorgehen detailliert beschrieben werden. Hier soll nur ein kurzer Überblick gegeben werden.

3.11.1 CCR3 Internalisierungsassay

Es wurden 2500 Zellen mittels Multidrop 384 (Thermo Electron, Waltham, USA) in 30 µl Medium/Well in BD 384-Well Assayplatten am Vortag des Versuches ausgesät (BD Biosciences Discovery Labware, MA, USA). Die Platten wurden mit Waschpuffer gewaschen (1x HBSS, 10 mM HEPES, pH 7.2) (Plattenwaschgerät Bio-Tek Instruments, Winooski, USA). Die zu testenden Liganden (Vgl. Tabelle 1) wurden mit Ham's F12 (Lonza, Verviers, Belgien) mit 1,25% DMSO (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA) entsprechend verdünnt und im Assay in Konzentrationen von 0-316 nM eingesetzt. Die Zellen wurden 30 min bei 37 °C und 5% CO₂ mit den Liganden inkubiert und danach bei gleichzeitiger Kernfärbung mit Hoechst (33342 Trihydrochloride-trihydrate, 1,4 mg/ml) (Invitrogen™, Carlsbad, CA) mit Formaldehyd fixiert (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA) (5% in DPBS). Die Zellen wurden permeabilisiert (Permeabilisationslösung: 0,25% Saponin in DPBS, 0,05% BSA) und es folgte die Immunfluoreszenzfärbung. Zu diesem Zweck wurden die Zellen mit CCR3 spezifischem Antikörper inkubiert (Anti-hCCR3 allophycocyanin conjugated rat IgG2a (R&D systems) in DPBS). Nach jedem der genannten Schritte wurden die Platten gewaschen. Um ein Austrocknen der Platten zu vermeiden, verblieb nach jedem Waschschrift ein geringes Restvolumen. Die nachfolgenden Messungen

wurden am IN Cell Analyzer 3000™ System (GE Healthcare) durchgeführt. Pro Well wurde dabei ein Bild gemacht, das etwa 200 einzelne Zellen umfasst.

Es wurden zwei verschiedene Parameter der Internalisierung untersucht. Nach Stimulation wird der Rezeptor internalisiert und in Granula im Zellinneren transportiert. Für den Internalisierungsassay wurde daher ein GRN0 (Granularity analysis) Algorithmus verwendet, der Bildpunkte oberhalb einer festgelegten Fluoreszenzintensität erkennt. Mit steigender Ligandenkonzentration und damit steigender Menge an internalisiertem Rezeptor werden folglich mehr dieser Granula (so genannte F-Grains) detektiert (39).

Analog zum FACS-basierten Internalisierungsassay wurde ein weiterer Algorithmus verwendet, der die Fluoreszenzintensität der Zelloberfläche erfasst. Zur Auswertung dieser Experimente wurden die behandelten Zellen nicht permeabilisiert, um lediglich das Vorhandensein von Rezeptoren auf der Oberfläche analysieren zu können. In diesem Fall ist folglich wie im FACS-basierten Internalisierungsassay eine Reduktion der Signale mit steigender Ligandenkonzentration zu erwarten. Für diese Auswertung wurde ein OB10 (object intensity) Algorithmus verwendet (39). Für weitere Informationen zur Methode des HCS sowie speziell zu den genannten Algorithmen sei hier erneut auf die Publikation von Haasen *et al.* (39) verwiesen, die einen detaillierten Einblick liefert.

3.11.2 ERK-Phosphorylierungsassay

Ein weiterer Weg, die Aktivierung von GPCR zu bestimmen, ist der Phosphorylierungsgrad von ERK 1/2 (74). Auch die hier zu charakterisierenden CCR3-Mutanten sollten im ERK-Assay untersucht werden. Die Stimulation der Zellen wurde wie oben beschrieben durchgeführt. Zeitabhängig wurde die der Phosphorylierungsgrad von ERK untersucht (5-60 min). Nachdem ein Maximalsignal der ERK-Phosphorylierung nach 5 min für alle CCR3 Mutanten beobachtet werden konnte, wurden die Zellen 5 min nach Zugabe von Eotaxin 1 mit der Fixierungs/Färbelösung inkubiert (siehe 3.11.1). Es folgte eine 2-stufige Antikörperinkubation. Als primärer Antikörper wurde ein anti-pERK1/2 Antikörper verwendet (1:100 verdünnt in DPBS) (Anti-Phospho p44l/42 MAP kinase rabbit monoclonal antibody (Cell signalling technologies). Als sekundärer Antikörper wurde

ein AF-anti-Rabbit Antikörper eingesetzt (1:1000 in DPBS) (AlexaFlour 647 goat anti-rabbit IgG 2mg/ml (InvitrogenTM, Carlsbad, USA)). Mit zunehmender Stimulation des CCR3 durch die getesteten Liganden ist eine vermehrte Phosphorylierung von ERK und damit eine zunehmende Fluoreszenzintensität über die gebundenen Antikörper zu messen. Auch hierfür wurde der GRN0 Algorithmus zur Analyse verwendet.

3.11.3 CCR3 Aktivierung über fluoreszenzmarkiertes Eotaxin 1

Die Inkubation der Zellen mit fluoreszenzmarkiertem Alexa647-Eotaxin 1 (Almac Sciences, Scotland) wurde analog wie unter 3.11.1 beschrieben durchgeführt. Der Unterschied bestand darin, dass aufgrund der Fluoreszenz des an das Eotaxin gekoppelten Alexa-Farbstoffes kein fluoreszenzmarkierter Antikörper eingesetzt werden musste. Dadurch war eine direkte Analyse der Zellen nach Fixierung und Permeabilisierung im IN Cell Analyzer möglich. Um die internalisierte Menge an Eotaxin-Rezeptorkomplexen zu analysieren, wurde der GRN0 (Granularity analysis) Algorithmus (39) verwendet.

3.12 Statistik/Analyse

Statistische Analysen wurden mit dem Programm GraphPad Prism 5.0 (GraphPad software, San Diego, CA, USA) durchgeführt. Zur Ermittlung der EC50 und IC50 Werte wurde eine Transformation der Daten ($x=\log[x]$) und eine nichtlineare Regression (curve fit) Konzentration-Wirkung vorgenommen (log [agonist/inhibitor] vs. Response).

4 Ergebnisse

Ziel dieser Arbeit war es, den Einfluss von Punktmutationen in der Transmembrandomäne des humanen CCR3 Rezeptors auf die Bindung und Aktivierung des Rezeptors durch natürliche Liganden, vor allem aber agonistische sowie antagonistische Substanzen zu untersuchen. Zu diesem Zweck wurden CHO-Flp-InTM Zellen mit den mutierten Rezeptoren sowie dem Wildtyp-CCR3 stabil transfiziert und in verschiedenen Assays untersucht.

4.1 Auswahl von Aminosäuren zur Mutagenese des humanen CCR3

Ausgehend von der Analyse der Substanzbindestellen in verschiedenen G-Protein gekoppelten Rezeptoren basierend auf der Struktur von Rhodopsin (75, 95, 98) (PDB entry 1F88) wurden 30 Aminosäuren identifiziert, die an der Bindung von Antagonisten an den CCR3 Rezeptor beteiligt sein könnten („Rognan's Residues“). Auf der Grundlage dieser gewonnenen Daten wurden Docking-Experimente in zwei CCR3 Rezeptor Modellen mit potentiellen antagonistischen sowie nicht bindenden Molekülen durchgeführt (J. Kriegl, unveröffentlichte Daten), um Aminosäuren zu identifizieren, die an der Bindung beteiligt sind. Überdies hinaus konnten durch den Sequenz- und Strukturvergleich von humanem CCR3 mit dem CCR3 von Maus und Ratte einige Aminosäuren identifiziert werden, die sich in den genannten Spezies unterscheiden und damit zu unterschiedlichen Affinität von Spezies-selektiven Antagonisten beitragen könnten. Um das entwickelte Bindungsmodell von CCR3 Antagonisten experimentell zu überprüfen, wurden 8 Aminosäuren in der potentiellen Bindetasche ausgewählt und mittels PCR-basierter Mutagenese verändert, wobei zwei der Aminosäuren mit je zwei unterschiedlichen Aminosäuren substituiert wurden. Die 8 Aminosäuren wurden folgendermaßen mutiert. Der erste Buchstabe gibt die jeweilige Aminosäure an, die ausgetauscht wurde, die folgende Zahl entspricht der Position der Aminosäure im Rezeptor und der letzte Buchstabe gibt an, mit welcher Aminosäure die ursprüngliche substituiert wurde: Y41A, R95A, Y113A, H114A sowie H114F, C207A, Y255A, E287A sowie Y291S und Y291F. Durch die Substitution der 8 Aminosäuren sollte herausgefunden werden, welche Aminosäurereste für die Interaktionen der Liganden mit dem Rezeptor verantwortlich sind. Beispielsweise können das Hydroxylgruppen oder aber die Wechselwirkung

von Aromaten sein, wie das im Falle der Tyrosine (Y) möglich ist. Diese Aminosäure besitzt sowohl einen aromatischen Ring als auch eine OH-Gruppe. Der Einfluss der gewählten Mutationen auf die Affinität und Potenz zur Rezeptoraktivierung der endogenen CCR3 Liganden sowie einiger ausgewählter Antagonisten und Agonisten des CCR3 sollte in verschiedenen Assays charakterisiert werden.

Die Mutagenese des CCR3 Rezeptors und die Gewinnung von Endotoxin-freien Plasmiden mit den entsprechenden CCR3 Mutationen (siehe Tabelle 3) wurden von der Firma Trenzyme GmbH, Konstanz durchgeführt. Die CCR3 Mutanten wurden in den Vektor pcDNA/FRT5 kloniert und die Mutationen durch doppelsträngige Sequenzierung der Plasmide bestätigt.

4.2 Stabile CCR3 Expression in CHO-Flp-InTM-Zellen

Die stabile Expression der humanen CCR3 Mutanten und des Wildtyp-CCR3 (WtCCR3) erfolgte in CHO-Flp-InTM Zellen. Dieses Expressionssystem wurde ausgewählt, da es die stabile Integration einer cDNA an einer definierten Stelle im Genom der Zelllinie gewährleistet und damit eine vergleichbare Expressionshöhe des natürlichen CCR3 und aller CCR3 Mutanten zu erwarten ist. Expressionsunterschiede bedingt durch unterschiedliche Integrationsorte im Genom der CHO-Flp-InTM Zellen, sollten dadurch ausgeschlossen werden. Sollte eine der Mutationen beispielsweise zu einer niedrigen Expressionshöhe führen, so wäre dies nicht auf eine ungünstige Insertionsstelle im Genom der transfizierten Zelle zurückzuführen, sondern würde auf eine fehlerhafte Faltung des Rezeptors oder geringere Stabilität hinweisen. Die CHO-Flp-InTM-Zellen wurden wie unter 3.2 beschrieben mit dem CCR3 Rezeptor bzw. dessen Mutanten transfiziert und anschließend in Gegenwart von 600 µg/ml Hygromycin B selektioniert. Die hCCR3 Expression wurde mittels hCCR3 spezifischer, fluoreszenzmarkierter Antikörper über durchflusszytometrische Messung bestimmt. Nach vier Wochen Selektion konnte der hCCR3 Rezeptor in allen Zelllinien, den 10 Punktmutanten sowie dem Wildtyp, detektiert werden. Während bei einigen Zelllinien eine hohe Expression von CCR3 nachgewiesen werden konnte (Vgl. Abbildung 11A) zeigten andere Zelllinien nur eine schwache Expression (C207A, Y255 A, E287A, Y291S). Aufgrund der unterschiedlichen Expressionshöhe war es nicht möglich, Experimente zur Charakterisierung der Mutanten durchzuführen. Es stellte sich zudem heraus, dass

selbst die untransfizierten CHO-Flp-InTM Zellen unter dem Einfluss des Hygromycins weiterhin proliferierten, obwohl diese das Gen zur Hygromycinresistenz nicht im Genom tragen sollten. Es ist daher anzunehmen, dass die isolierten Zelllinien eine Mischung aus rekombinierten und nicht-rekombinierten Zellen darstellten. Ohne eine weitere Subklonierung der isolierten Zelllinien wären nur die Zellen mit der CCR3 Mutation Y113A und H114A mit einer CCR3 Expression von knapp 60% für weitere Untersuchungen geeignet. Aus den Beobachtungen ergibt sich, dass das CHO-Flp-InTM System von InvitrogenTM selbst unter hohen Hygromycinkonzentrationen keine vollständige Selektion von rekombinierten CCR3-Zelllinien ermöglichte. Im nächsten Schritt sollten daher hoch exprimierende Einzelklone aus allen Mischpopulationen isoliert werden.

4.3 Isolation von hochexprimierenden Einzelklonen

Um aus den transfizierten Mischpopulationen hochexprimierende Einzelklone für jede CCR3 Mutante und den Wildtyp CCR3 zu isolieren, wurden über Verdünnungsreihen (Vgl. 3.4.1) zwischen 7 und 50 Einzelklone isoliert, vermehrt und deren Expression mittels Durchflusszytometrie überprüft. In Abbildung 11A ist die CCR3 Expression der am höchsten exprimierenden Einzelklone im Vergleich zu den zuerst gewonnenen Mischpopulationen dargestellt. Abbildung 10 gibt die CCR3 Expression aller untersuchten Einzelklone wider. Wie aus beiden Abbildungen (Abbildung 10 und Abbildung 11A) hervorgeht, konnte für die meisten CCR3 Mutanten (n=7) und den CCR3 Wildtyp jeweils hoch exprimierende Einzelklone isoliert werden, die für eine weitere Charakterisierung geeignet waren. Für die CCR3 Mutanten C207A, Y255A und E287A konnte keine vergleichbar hohe Expression zu den übrigen Mutanten erreicht werden. Trotz zweimaliger Transfektion mit sich daran anschließender Isolation und Analyse von insgesamt je 50 Einzelklonen, konnten lediglich Einzelklone mit maximal 25%, im Falle von Y255A von 8% isoliert werden. Diese Beobachtung lässt den Schluss zu, dass die Expression, Proteinfaltung oder die Oberflächenlokalisierung von CCR3 durch diese Mutationen gestört ist.

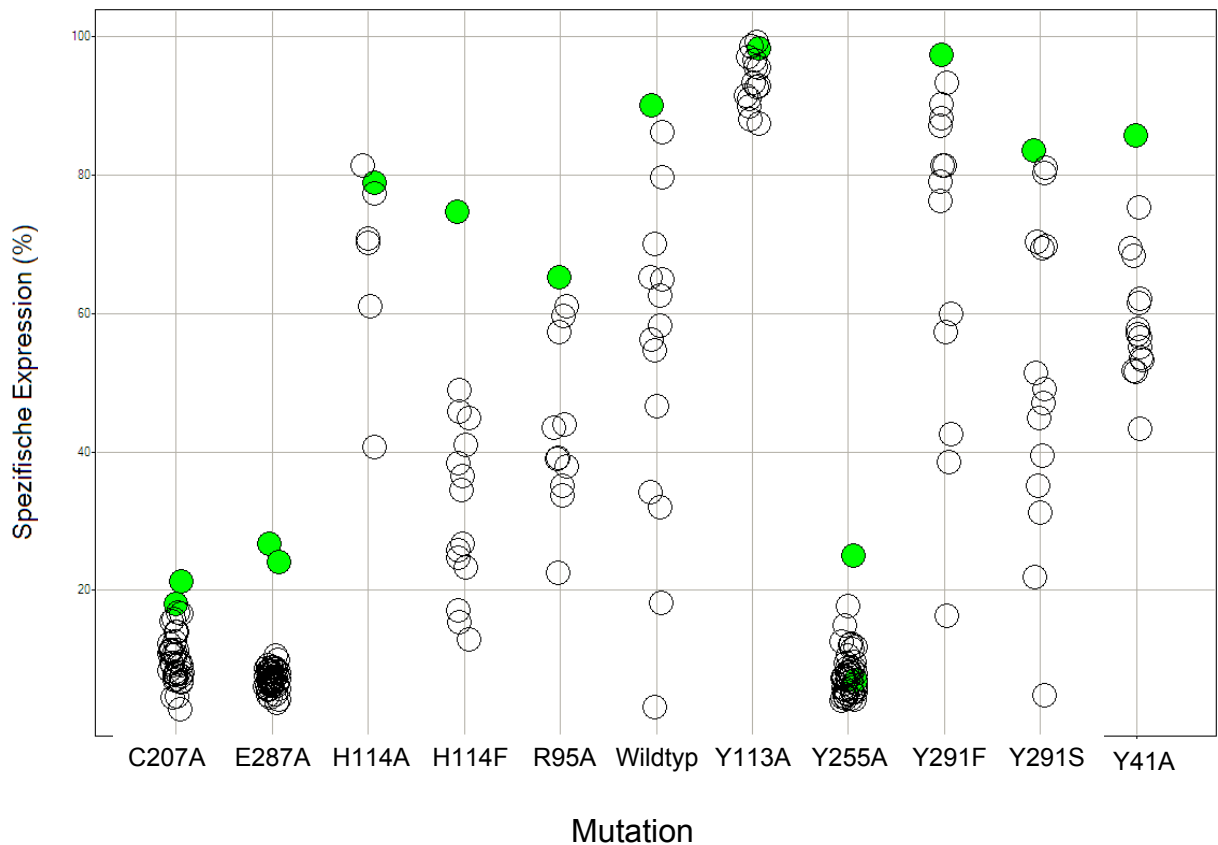


Abbildung 10: Rezeptorexpression isolierter Einzelklone für die CCR3-Mutanten

Um hoch exprimierende Zellen für die einzelnen CCR3 Mutationen zu erhalten, wurden Einzelklone (n=7-50) isoliert und auf ihre Rezeptorexpression über CCR3-spezifische Antikörper mittels Durchflusszytometrie untersucht. Dargestellt sind die pro Mutation analysierten Einzelklone mit ihrer Expression an CCR3. Mit den am höchsten exprimierenden Klonen (grün markiert) wurden nachfolgende Experimente durchgeführt. Für C207A, E287A und Y255A wurde zweimalig eine Isolation von Einzelklonen durchgeführt.

Auffallend war zudem, dass in einem Zeitraum über 48 Tage die CCR3 Expression aller transfizierter Zelllinien stark abnahm, mit Ausnahme der Zelllinie mit der Mutation Y113A (Abbildung 11B). Aus diesem Grund musste immer wieder auf eingefrorene Subklone zurückgegriffen werden. Dieser Befund stützt die Annahme, dass der CCR3 nicht stabil in das Genom der Zielzellen integriert wurde, sondern nach und nach wieder aus dem Genom entfernt worden ist.

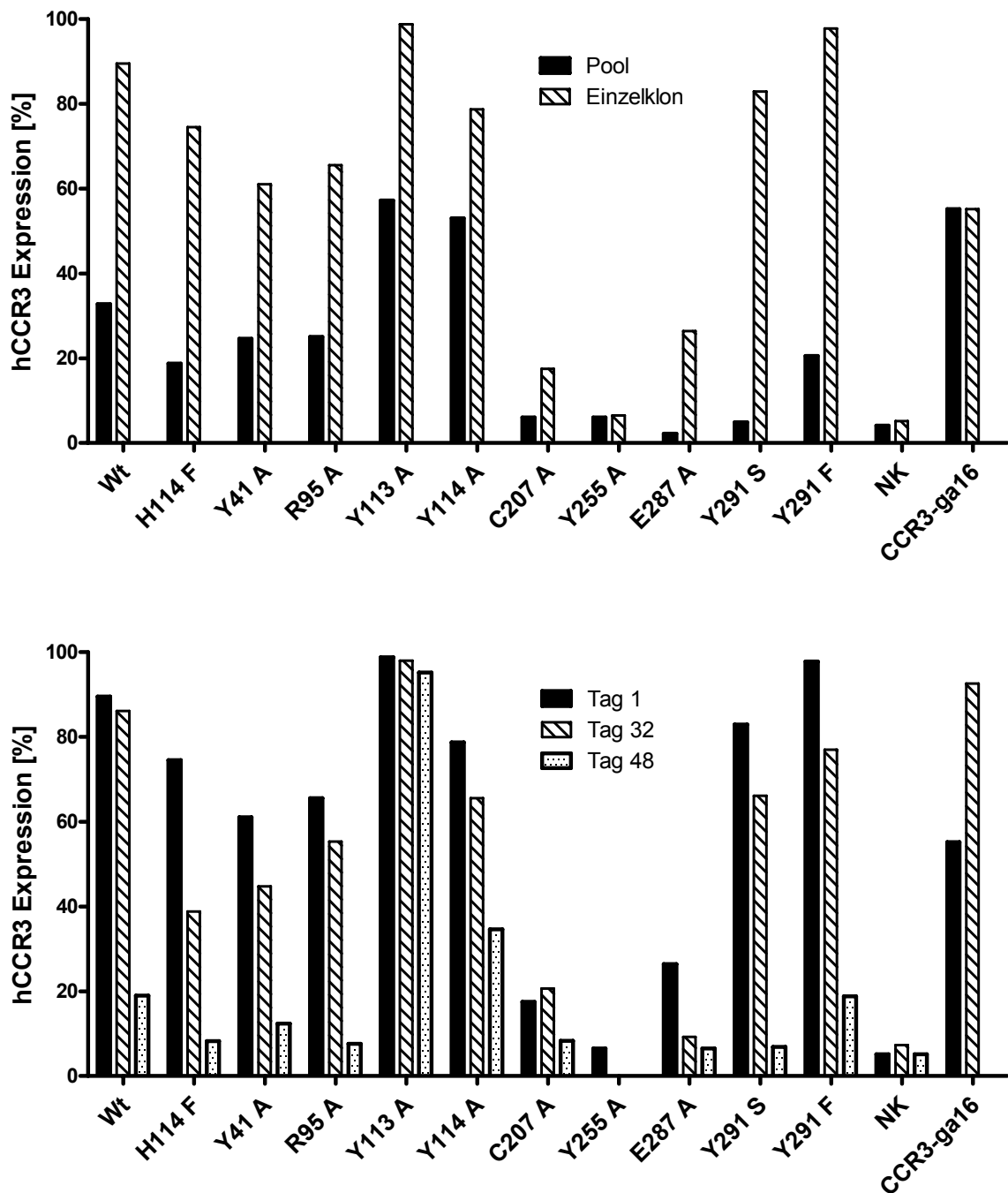


Abbildung 11: hCCR3 Expression der transfizierten CHO-Flp-In™-Zellen

A) Expression des humanen CCR3 Rezeptors in den isolierten Mischklonen und hoch exprimierenden Einzelklonen. Die Expression ist in % CCR3 nach Abzug der Isotyp-Kontrollexpression von 5% dargestellt. Zur Kontrolle wurde die Expression von CCR3 in untransfizierten CHO-Flp-In™ Zellen (NK) und CHO-CCR3-Gα16 Zellen von Euroscreen (CCR3Gα16) bestimmt. Durch die Isolation der Einzelklone konnte in den meisten Fällen eine Erhöhung der hCCR3-Expression erreicht werden. B) Verlust der CCR3 Expression mit zunehmender Dauer der Zellkultur. Dargestellt ist die Expression von CCR3 1, 32 und 48 Tage nach Kulturbeginn. Mit Ausnahme von Y113 A verlieren alle Mutanten mit der Zeit an hCCR3 Expression.

4.4 Untersuchungen zur Bindung von Eotaxin-1 an die CCR3 Mutanten

Um die funktionelle Aktivität aller CCR3 Mutanten zu überprüfen, sollte zunächst die Fähigkeit zur Bindung des natürlichen Liganden Eotaxin 1 bestimmt werden. Dazu wurden Zellen der CCR3 Wildtyp Mischpopulation mittels flüssigen Stickstoffs unter Druck aufgeschlossen und die Zellmembranen über Ultrazentrifugation gewonnen. Die isolierten Membranen wurden mit SPA Beads und radioaktiv-markiertem ^{125}J -Eotaxin 1 in Standard-Assaypuffer inkubiert und die spezifische Bindung durch Verdrängung des Radioliganden mit Überschuss an nicht markiertem Eotaxin 1 (10^{-6} M) oder durch Zugabe eines CCR3 Antagonisten (10^{-5} M) bestimmt. Wie Abbildung 12 zeigt, konnte unabhängig von der eingesetzten Membranmenge jedoch keine spezifische Bindung von radioaktiv markiertem humanem Eotaxin 1 an die CHO-WtCCR3 Membranen gemessen werden. In einem parallelen Kontrollexperiment unter identischen Puffer- und Inkubationsbedingungen mit Membranen von K562-CCR3 Zellen konnte dagegen eine relativ hohe spezifische Bindung beobachtet werden.

Um eine Beschädigung des Rezeptors durch den Zellaufschluss ausschließen zu können, wurde das Experiment zusätzlich mit isolierten, ganzen Zellen durchgeführt. Hierbei wurden zum einen CCR3-Wildtyp Zellen eingesetzt sowie transfizierte CCR3-Zellen mit Mutation Y113A, da bei diesen die höchste Rezeptorexpression zu verzeichnen war. Um ein optimales Signal-Hintergrund Verhältnis zu erhalten, wurde die Rezeptorbindung bei verschiedenen Zellzahlen untersucht. Da die Möglichkeit der Proteolyse des Rezeptors bei der Zellernte (durch Trypsin) bestand, wurden die Zellen außerdem mit Acutase von der Zellkulturflasche gelöst. In einem weiteren Ansatz wurden die Zellen in unterschiedlicher Zellzahl in einer 96-Well Zellkulturplatte ausgesät und der Versuch ohne vorhergehende Zellernte durchgeführt. In allen Experimenten wurde jedoch nur eine geringe unspezifische Bindung mit stark schwankender und zudem schwacher spezifischer Bindung beobachtet.

Da die Zelllinien, wie über FACS-Analysen gezeigt wurde, CCR3 exprimierten, und der Zellaufschluss sowie das Trypsin keinen Einfluss auf die Bindung des Eotaxins an den Rezeptor hatten, sollte im nächsten Schritt untersucht werden, ob eine

Variation der Pufferzusammensetzung die Bindung des Radioliganden beeinflussen konnte. Dairaghi *et al.* (20) konnten zeigen, dass die Bindung von Eotaxin 1 an den CCR3 durch die Veränderung von BSA, Detergenzien und Ionenstärke beeinflusst wird. Daher wurden diese Parameter in weiteren Experimenten variiert. Tabelle 5 gibt eine Übersicht über die ausgetesteten Pufferbedingungen wider. Versuche mit Saponin als Detergens wurden zusätzlich getestet, führten allerdings nicht zum Erfolg.

Tabelle 5: Puffervariationen zum SPA Bindungsassay

	c Mg ²⁺ [M]	c NaCl [M]	pH	T [°C]
Puffer 1	5	-	7.6	24
Puffer 2	5	-	7.6	4
Puffer 3	10	-	7.6	24
Puffer 4	15	-	7.6	24
Puffer 5	20	-	7.6	24
Puffer 6	25	-	7.6	24
Puffer 7	5	10	7.6	24
Puffer 8	5	40	7.6	24
Puffer 9	5	100	7.6	4/24
Puffer 10	5	-	7.0	4/24
Puffer 11	5	-	7.2	4/24
Puffer 12	5	-	7.4	4/24
Puffer 13	5	-	7.6	4/24

In Abbildung 12 sind exemplarisch Ergebnisse zweier Experimente dargestellt. Im zellbasierten Assay konnte eine höhere spezifische Bindung durch Reduktion der Magnesiumkonzentration in allen Fällen erreicht werden. Ausnahme hierzu stellte Mutante Y113A dar, bei der mit 5 mM Magnesium die schwächste spezifische Bindung ermittelt werden konnte. Da auf den nicht transfizierten Zellen (NK) eine vergleichbare spezifische Bindung wie für die mit CCR3-Wt oder CCR3-Y113A WtCCR3 transfizierten Zelllinien beobachtet wurde, kann man daraus folgern, dass es sich um unspezifische Signale handelte. Der Einsatz von Substanz 5 als potenter Antagonist bestätigt diese Beobachtung, da keine Inhibition einer Eotaxin 1 vermittelten spezifischen Bindung möglich ist. Im membranbasierten Assay wurde mit den hCCR3-Wildtyp-Membranen nur eine sehr geringe spezifische Bindung erreicht, wohingegen im Falle der K562-Kontrollmembranen wiederholt eine spezifische Bindung von ca. 50% detektiert werden konnte.

Es bleibt unklar, warum in den Bindungsexperimenten keine spezifische Bindung des Eotaxin 1 an den WtCCR3 und den CCR3-Y113A Rezeptor nachgewiesen werden konnte, obwohl die CCR3-Expression mittels Durchflusszytometrie eindeutig belegt wurde. Weder mit unterschiedlichen Mengen der präparierten Membranen, noch mit ganzen Zellen unter Variation der Erntebedingung sowie der Zellzahl konnte eine stabile, spezifische Bindung des natürlichen Liganden an CCR3 gemessen werden. Auch die Änderung der Zusammensetzung des Assaypuffers im Bezug auf pH und Salzkonzentrationen sowie der Inkubationszeiten und -temperaturen führten nicht zum Erfolg. Da alle offensichtlichen Variationsmöglichkeiten der Versuchsbedingungen untersucht worden waren, wurden die SPA Bindungsexperimente eingestellt.

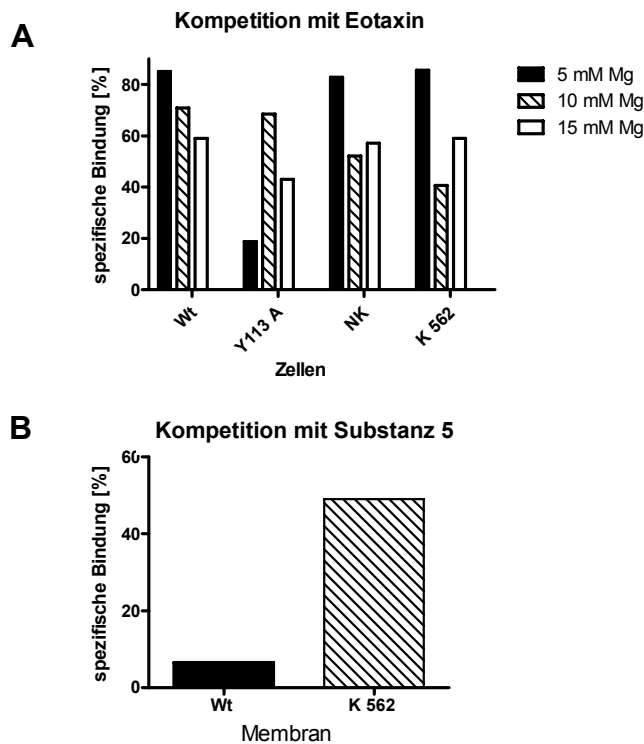


Abbildung 12: Untersuchungen zur Bindung von ¹²⁵J-Eotaxin 1 an CCR Wt sowie CCR3 Y113A im SPA Bindungsassay

A). Es wurden Zellen des Wildtyps (Wt), der Mutante Y113A, der untransfizierten Negativkontrolle (NK) sowie der CCR3 transfizierten K562 Zellen getestet. Die Bindung des radioaktiv markierten Eotaxins wurde mit unmarkiertem Eotaxin 1 kompetiert. Der Assay wurde mit 5 mM Mg²⁺ im Puffer sowie bei pH 7,6 durchgeführt. In B) ist die gemessene spezifische Bindung an den Membranen von Flp-In-Wt CCR3 und der K562 Kontrollmembran dargestellt. Die Bindung des radioaktiv markierten Eotaxins wurde mit dem Antagonisten Substanz 5 kompetiert.

4.5 Untersuchungen zur Funktionalität des CCR3 mittels GTPγS-Assay

Neben dem SPA Bindungsassay stellt der ebenfalls auf SPA Technologie basierende GTPγS Assay eine weitere Möglichkeit dar, um die funktionelle Aktivität von CCR3-exprimierenden Zelllinien nachzuweisen (42). Zu diesem Zweck wurden die wie unter 3.5.1 beschriebenen präparierten Zellmembranen der CHO-WtCCR3 Mischpopulation im GTPγS Assay eingesetzt. Es sollte dabei der an die CCR3 Aktivierung gekoppelte Austausch von GDP durch ³⁵S-GTPγS durch Zugabe von humanem Eotaxin 1 bestimmt werden. Die Membranen der CHO-WtCCR3 Mischpopulationen wurden im GTPγS-Assay zweimal getestet, zeigten jedoch keinerlei Effekte nach Stimulation. Es konnte zwar in Abhängigkeit der eingesetzten Membranmenge eine Erhöhung der Gesamtsignale detektiert werden, jedoch gleichermaßen für Eotaxin 1, eine agonistische Kontrollverbindung sowie reinen Puffer. Daraus kann man schließen, dass es sich bei den gemessenen Werten um unspezifische Signale handelte und es zu keinem durch Eotaxin 1 bzw. den Agonisten vermittelten Austausch des GTP im Assay kam. Aus diesem Grund wurde auch dieser Assay zur Charakterisierung der Mutanten nicht weiter verfolgt. Möglich ist, dass die Rezeptoren durch den Potteraufschluss beschädigt worden sind oder aber, dass trotz Rezeptordetektierung mittels Durchflusszytometrie die Rezeptordichte auf der Oberfläche zu gering für ein ausreichendes Signal war. Denkbar ist auch ein ungünstiges Verhältnis von Rezeptor zu G-Proteinen oder, dass die G-Proteine der Hamsterzellen nicht in der Lage sind an den humanen CCR3 zu koppeln und damit kein Signal detektiert werden kann.

Die Testung der natürlichen Liganden von hCCR3 (Eotaxin 1-3, MCP 2-4, RANTES) auf Membranen von CHO-Gα16-CCR3 Zellen identifizierte Eotaxin 1, Eotaxin 2, MCP 2 und MCP 4 als nahezu equipotente, volle Agonisten des CCR3, wohingegen Eotaxin 3, MCP3 und RANTES partielle Agonisten sind. Die Werte gibt Tabelle 6 im Vergleich zu den Ergebnissen von Wan et al (108) wider. Dadurch konnte gezeigt werden, dass die verwendeten Liganden funktionell aktiv waren, die Membranpräparationsmethode an sich funktionierte und die Ko-Expression von Gα16 zu einer spezifischen Aktivität des CCR3 führt.

Tabelle 6: Ermittelte EC50 Werte aus GTPγS-Assay für die hCCR3 Liganden sowie deren Aktivitätswerte im Vergleich zu Eotaxin 1 (%Ktrl Werte) (Vgl. Wan (108) mit eigenen Daten)

Natürlicher Ligand	EC50 [nM] (Wan)*	% Ktrl (Wan)*	EC50 [nM]	% Ktrl
Eotaxin 1	3,6 ± 1,1	100	1,0	98,5
Eotaxin 2	3,3 ± 0,8	94,9	0,7	94,7
Eotaxin 3	14,0 ± 6,4	14,8	16,6	44,4
MCP 2			4,1	97,1
MCP 3	14,4 ± 0,6	49,3	9,8	56,4
MCP 4	3,1 ± 0,7	115,4	1,5	127,4
RANTES	17,8 ± 0,8	50,1	1,3	63,4

* Die Messung der %Ktrl-Werte wurde bei 1 μM Eotaxin 1 durchgeführt.

4.6 Einfluss der CCR3 Mutanten auf die Rezeptorinternalisierung

Wie von Zimmermann *et al.* (119, 120) beschrieben, wird der CCR3 Rezeptor durch Stimulation mit einem Liganden internalisiert, um dann nach einiger Zeit wieder an die Zelloberfläche zurück zu gelangen (Rezeptorrecycling). Da in den bisher angewendeten Assays (SPA Bindung sowie SPA GTPγS) keine Charakterisierung der Mutanten möglich war, sollte zunächst für den CHO-WtCCR3 getestet werden, ob es zu einer konzentrationsabhängigen Internalisierung des Rezeptors kommt. Zu diesem Zweck wurde ein wie unter 3.4.1 beschriebener isolierter hochexprimierender Einzelklon des WtCCR3 mit steigenden Konzentrationen an Eotaxin 1 stimuliert (0-300 nM) und anschließend die Internalisierung des hCCR3 über die Reduktion der Oberflächenexpression mittels durchflusszytometrischer Messung bestimmt. Da eine konzentrationsabhängige Internalisierung des Rezeptors festgestellt werden konnte, bot dieser Assay nun eine geeignete Möglichkeit, die Mutanten zu charakterisieren. Die kommerziell erhältliche Zelllinie CHO-CCR3-Gα16 (Euroscreen S.A., Belgien) wurde für die durchgeführten Experimente als Referenz verwendet.

4.6.1 Kinetik der Internalisierung

Um eine maximale Internalisierung, d.h. eine minimal verbleibende Oberflächenexpression des hCCR3 zu erreichen, wurde zunächst die Internalisierung im Zeitraum von einer Stunde nach Stimulation untersucht. Das Resultat ist in Abbildung 13 gezeigt. Dabei ist eine sukzessive Abnahme der Oberflächenexpression innerhalb von 60 min nach Stimulation zu sehen, die auch nach längerer Inkubation konstant niedrig bleibt. Basierend auf diesem Ergebnis wurde die Inkubationszeit mit Liganden für die nachfolgenden Experimente für 60 min angesetzt.

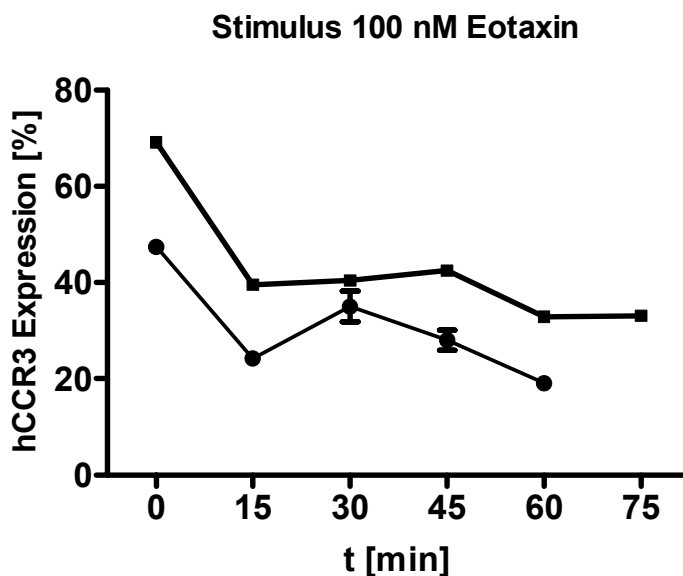


Abbildung 13: Kinetik der hCCR3 Internalisierung auf der Wildtyp Zelllinie (Wt)

Dargestellt sind die Daten aus zwei repräsentativen Experimenten. Pro Datenpunkt wurde eine Zweifachbestimmung durchgeführt. Zellen wurden mit 100 nM Eotaxin 1 stimuliert und die Reaktion durch Abnahme der Überstände zu den angegebenen Zeitpunkten gestoppt. Die Zellen wurden unmittelbar danach auf Eis gekühlt und mit FITC-markiertem anti-hCCR3 Antikörper inkubiert. Die Rezeptorexpression wurde mittels durchflusszytometrischer Analyse bestimmt. Ein FITC-markierter Antikörper mit dem entsprechenden Isotyp wurde als Kontrolle eingesetzt. Die erhaltenen Expressionswerte ergeben sich aus der Subtraktion der mittels Isotyp-Antikörper bestimmten Werte von der Expression, die mit den CCR3 spezifischen Antikörpern gemessen wurde.

4.6.2 Rezeptorinternalisierung durch natürliche CCR3 Liganden

Nachdem eine konzentrationsabhängige Internalisierung für Eotaxin 1 auf den CHO-WtCCR3 Zellen erreicht werden konnte und eine maximale Internalisierung nach 60 min zu verzeichnen war, sollte nun auf dem Wildtyp-hCCR3 Rezeptor sowie den Mutanten das Verhalten von Eotaxin 1 im Bezug auf das Internalisierungsvermögen untersucht werden. Zu diesem Zweck wurden die jeweiligen isolierten transfizierten Einzelklone mit Eotaxin der Konzentration 0,1-300 nM inkubiert. Bisher ist nur bedingt bekannt, ob die weiteren CCR3 Liganden (Eotaxin 2,3, MCP 2,3,4 sowie RANTES) in ähnlicher Weise mit dem Rezeptor wechselwirken wie das Eotaxin 1. Chung *et al.* (14) fanden beispielsweise heraus, dass der N-Terminus von MCP 3 für die Rezeptoraktivierung notwendig ist, wohingegen Eotaxin 1 zusätzlich zu N-Terminus und N-Loop weitere Elemente für die Aktivierung des CCR3 benötigt. Da aber bislang unbekannt ist, ob für die Aktivierung einzelne Aminosäuren verantwortlich sind, sollte neben Eotaxin 1 gleichzeitig das Internalisierungsverhalten der oben genannten CCR3 Liganden auf den Mutanten untersucht werden, um eventuelle Unterschiede aufzudecken. Jede Ligandenkonzentration wurde in einer Dreifachmessung bestimmt. Die Resultate geben Abbildung 14 und Abbildung 15 wider. Sofern leichte Unterschiede von Experiment 1 zu Experiment 2 zu erkennen waren, wurden beide Resultate dargestellt. Im Falle der Mutanten CCR3 Y41A und R95A wurden die Liganden MCP 2 und 3 sowie Eotaxin 2 in einem separaten Experiment im Vergleich zu Eotaxin 1 getestet. Aufgrund der sehr geringen Rezeptorexpression der Mutanten C207A, Y255A und E287A wurden diese nicht im Internalisierungsassay untersucht.

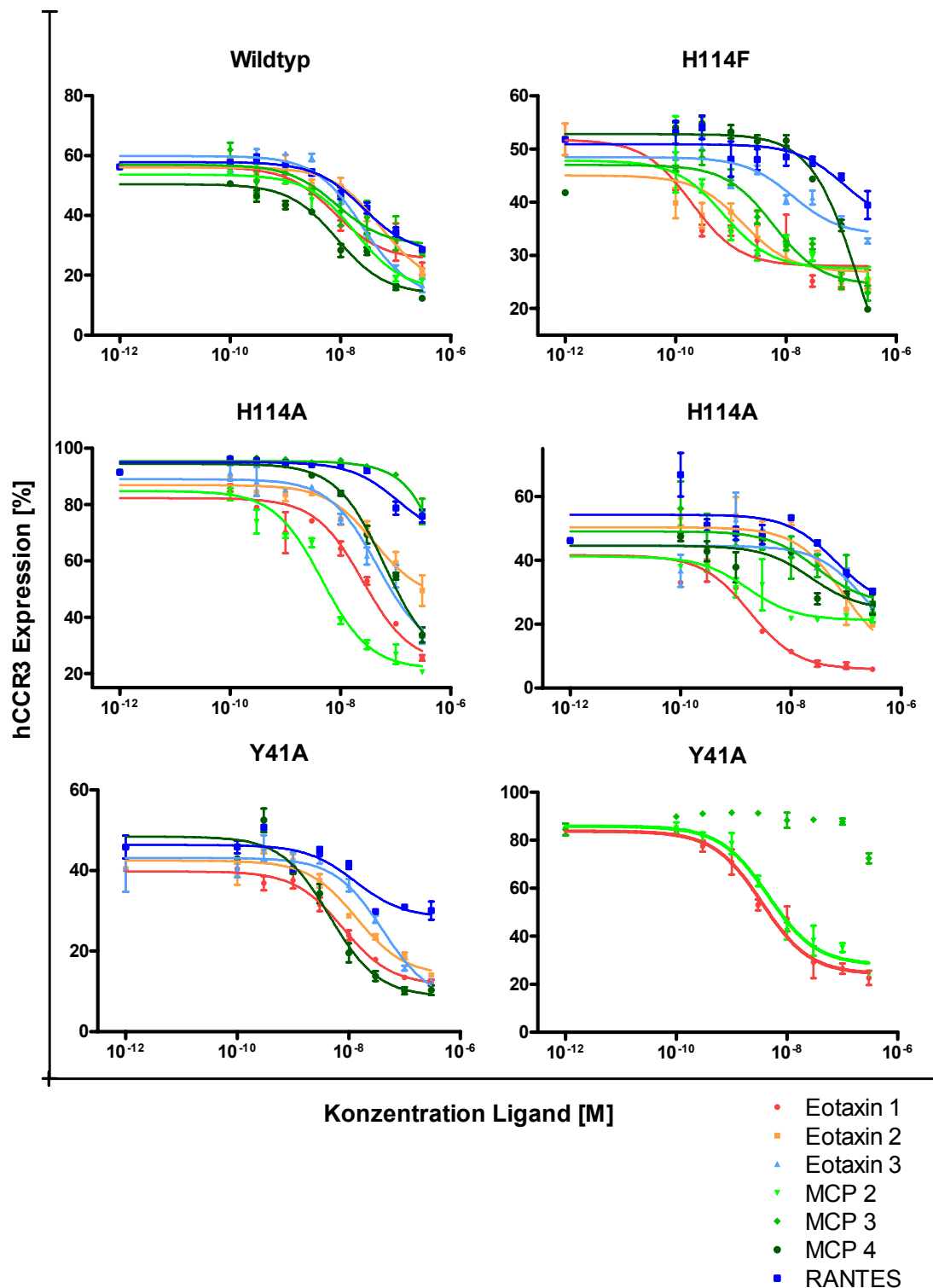


Abbildung 14: Internalisierungsvermögen der natürlich vorkommenden CCR3 Liganden auf den Punktmutanten -Fortsetzung in Abbildung 15-

Dargestellt ist die durch die Liganden induzierte konzentrationsabhängige Internalisierung des CCR3 Rezeptors auf den Punktmutanten sowie dem WtCCR3 ± SEM (n=1-3). Die Zellen wurden mit den entsprechenden Liganden 60 min inkubiert, die Reaktion danach abgestoppt und die Zellen mit hCCR3-spezifischem FITC-gekoppeltem Antikörper inkubiert. Ein entsprechender Isotyp-Antikörper wurde als Kontrolle verwendet. Die erhaltenen Expressionsdaten ergeben sich aus der Subtraktion des unspezifischen Signals, das mittels des Isotyp-AK erhalten wurde, von der mit dem spezifischen CCR3-AK detektierten Expression.

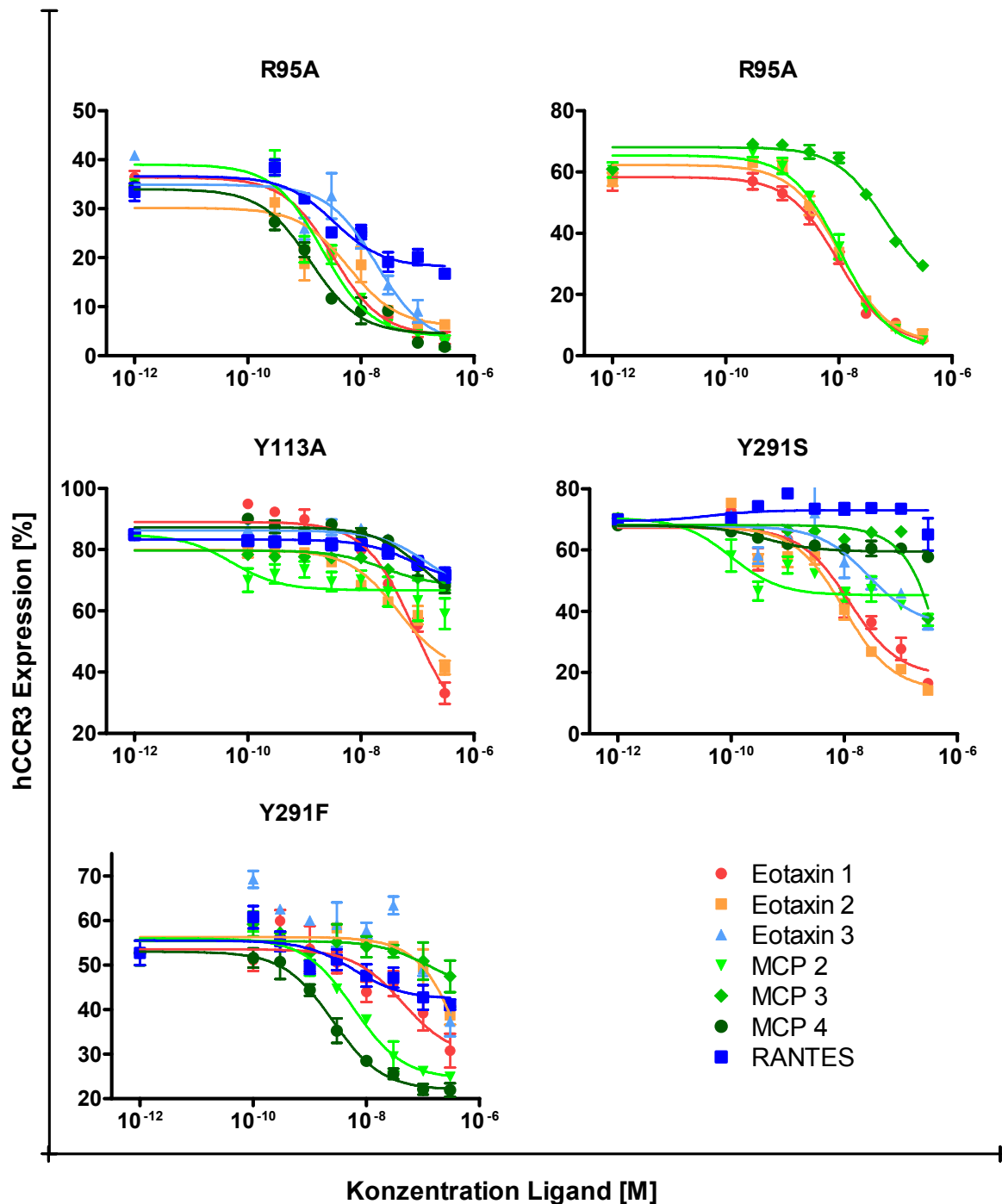


Abbildung 15: -Fortsetzung von Abbildung 14- Internalisierungsvermögen der natürlich vorkommenden CCR3 Liganden auf den Punktmutanten

Dargestellt ist die durch die Liganden induzierte konzentrationsabhängige Internalisierung des CCR3 Rezeptors auf den Punktmutanten sowie dem WtCCR3 \pm SEM (n=1-3). Die Zellen wurden mit den entsprechenden Liganden 60 min inkubiert, die Reaktion danach abgestoppt und die Zellen mit hCCR3-spezifischem FITC-gekoppeltem Antikörper inkubiert. Ein entsprechender Isotyp-Antikörper wurde als Kontrolle verwendet. Die erhaltenen Expressionsdaten ergeben sich aus der Subtraktion des unspezifischen Signals, das mittels des Isotyp-AK erhalten wurde, von der mit dem spezifischen CCR3-AK detektierten Expression.

Alle Liganden waren in der Lage, den hCCR3 Wildtyp sowie die Mutanten zu internalisieren. MCP 4 und Eotaxin 1 waren die potentesten Internalisierungsinduktoren. MCP 2 sowie Eotaxin 2 stellten ebenfalls potente CCR3 Agonisten dar. Eotaxin 3 zeigte eine Rechtsverschiebung der Konzentrations-Wirkungskurve im Vergleich zu den beiden zuletzt genannten Liganden, führte aber auch zu einer Reduktion der Oberflächenexpression um ca. 40%. Eine Stimulation mit RANTES und MCP 3 führte zur geringsten Rezeptorinternalisierung um ca. 20%.

Zusätzlich zu den CHO-Flp-InTM-CCR3Wt Zellen wurde die Internalisierung mit CHO-K1-hCCR3- α 16 Zellen vergleichsweise getestet (Daten nicht gezeigt). Die CCR3 Liganden verhielten sich bei den beiden Zelllinien sehr ähnlich. Auf den CHO-K1-hCCR3- α 16 Zellen induzierten Eotaxin 1 sowie MCP 4 die Internalisierung am stärksten (nahezu 100%), gefolgt von Eotaxin 2. MCP 2 und Eotaxin 3 zeigten eine Rechtsverschiebung der Konzentrations-Wirkungskurve im Vergleich zu den drei erstgenannten Liganden und reduzierten die Oberflächenexpression um beinahe 60%. MCP3 und RANTES führten nur zu einer geringeren Internalisierung (75-80%). Die im GTP γ S-Assay bestimmte Potenz der jeweiligen Liganden (siehe 4.5) konnte im Internalisierungsassay für die CHO-K1-hCCR3- α 16 sowie die CHO-Flp-InTM-WtCCR3 Zellen bestätigt werden. Danach konnten Eotaxin 1, Eotaxin 2 sowie MCP 2 und MCP 4 als volle Agonisten, und Eotaxin 3, MCP 3 und RANTES als partielle CCR3 Agonisten identifiziert werden.

Im Folgenden sollen nur Abweichungen von den auf WtCCR3 und CHO-K1-hCCR3- α 16 gefundenen Internalisierungsverhalten der Liganden beschrieben werden. Zunächst soll auf das Internalisierungsvermögen der Eotaxine (Eotaxin 1-3), danach auf das der MCPs sowie RANTES eingegangen werden. Wie die Abbildungen 14 und 15 zeigen, reagierten die Zellen mit den CCR3 Mutationen Y41A, Y113A sowie H114F und Y291F besonders auffallend auf die Stimulation mit den endogenen CCR3 Liganden im Vergleich zum WtCCR3. Durch die Mutationen Y113A und Y291F wurde die Potenz zur Internalisierung von Eotaxin 1 deutlich reduziert. Demgegenüber führte die Mutation H114F im Vergleich zum Wt-Rezeptor zu einer starken Erhöhung der Potenz der Eotaxine 1-3 zur Rezeptorinternalisierung. Die Mutation Y41A führte dazu, dass der partielle Agonist Eotaxin 3 den Rezeptor in hohen Konzentrationen (300 nM) ebenso wie Eotaxin 1, Eotaxin 2 und MCP 4 fast vollständig internalisieren konnte, allerdings mit höherem EC50 Wert. Mutation R95A

führt ebenso zu einer höheren Rezeptorinternalisierung bei Stimulation von Eotaxin 2 und Eotaxin 3. Im Vergleich zum WtCCR3 hatten diese Mutationen erstaunlicherweise keinen Einfluss auf die Potenz von Eotaxin 1. Besonders auffallend war, dass der Austausch der Aminosäure Y291 zu einem Phenylalanin (F) bei Stimulation durch Eotaxine zu einer verringerten Rezeptorinternalisierung führte, während ein Austausch mit Serin (S) die Internalisierung für diese nicht beeinflusste.

Betrachtete man die Veränderungen für das Internalisierungsverhalten der MCP Liganden, so wurde deutlich, dass hierfür andere Aminosäuren für die Wechselwirkung zwischen Rezeptor und Ligand beteiligt waren als für die drei Eotaxine. Die Aktivität von MCP 4, einem weiteren vollen Agonisten von CCR3, wurde vor allem durch die mutierten Aminosäuren Y113A, H114F und Y291S stark beeinträchtigt. Aufgrund der Mutationen Y113A und Y291S war keine nennenswerte Rezeptorinternalisierung zu verzeichnen. MCP 4 führte auf diesen Mutanten nur zu einer sehr geringen Internalisierung von knapp 10%, obwohl der Ligand den Wt-Rezeptor sehr potent und vollständig internalisieren konnte.

Demgegenüber führten die Mutationen Y41A, R95A und Y291F zu einer verstärkten Rezeptorinternalisierung bei Stimulation mit MCP 4. Die Mutation H114F führte dazu, dass MCP 4 zwar mit einem EC₅₀ von 221 nM deutlich weniger potent im Vergleich zum WtCCR3 ist, aber dennoch in der Lage war, in der höchsten eingesetzten Konzentration zu einer vollständigen Internalisierung der Rezeptoren zu führen.

MCP 3 scheint in seiner Wirkung am wenigsten von den mutierten Aminosäuren beeinflusst zu werden. Als partieller Agonist trug es nur bedingt zur Rezeptorinternalisierung bei. Lediglich Mutation H114F führte dazu, dass MCP 3 zwar mit höherem EC₅₀ Wert aber ebenfalls wie Eotaxin 1 zu einer vollständigen Internalisierung des Rezeptors führte. Durch die Mutationen Y41A und R95A wurde die Internalisierungspotenz von MCP 2 erhöht, so dass es equipotent zu Eotaxin 1 und 2 zur Internalisierung des Rezeptors beitrug. Der Austausch des Tyrosins an Position 291 gegen ein Serin (Y291S) reduzierte die Potenz des MCP 2 den CCR3 Rezeptor zu internalisieren.

Der partielle Agonist RANTES war wie bereits aus GTPγS-Assay Daten bekannt (Wan *et al.* (108) und eigene Daten) der schwächste Ligand auf dem WtCCR3 und allen Mutanten und zeigte auf Y113A auf Y291S keinerlei konzentrationsabhängige Internalisierung des Rezeptors.

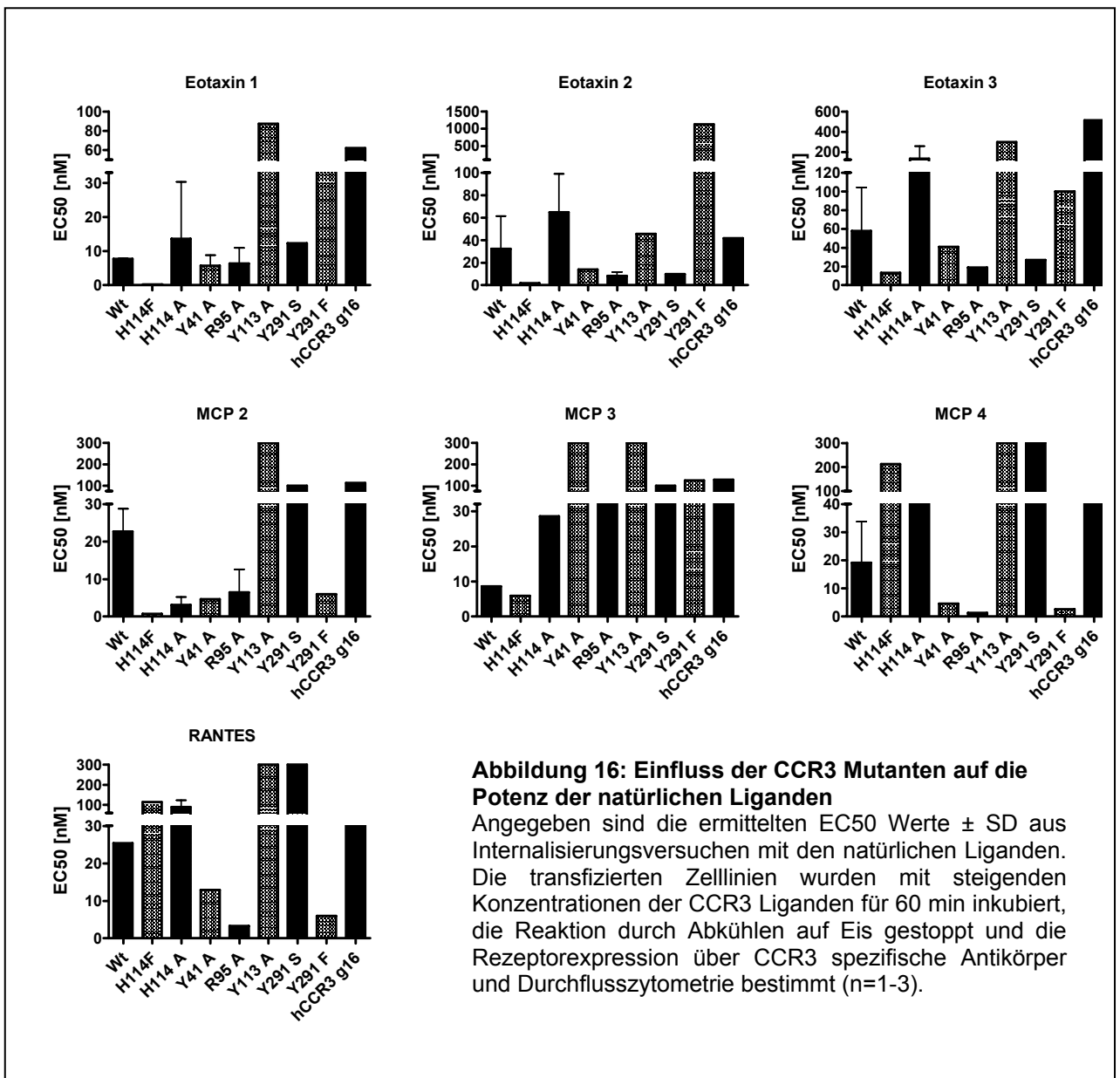
Zur Verdeutlichung der detektierten Unterschiede sind in Abbildung 16 die erhaltenen EC50 Werte für das Internalisierungsvermögen der natürlichen Liganden dargestellt. Zusätzliche Information gibt Tabelle 7. Hier sind zu den EC50 Werten auch die entsprechenden Kontrollwerte in % (%Ktrl) für die maximal erreichbare Internalisierung angegeben. Die maximale Internalisierung mit Eotaxin 1 wurde dabei auf 100% gesetzt und die maximale Oberflächenexpression (keine Internalisierung) auf 0% gesetzt.

Tabelle 7: Internalisierungsvermögen von natürlichen CCR3 Liganden

Angegeben sind die EC50 Werte für das Internalisierungsvermögen natürlicher CCR3 Liganden sowie Kontrollwerte in % (%Ktrl) ± SD im Bezug auf die maximale Internalisierung innerhalb einer Mutante. Die maximale Internalisierung mit Eotaxin 1 wurde 100% gesetzt (n=1-3).

	Eotaxin 1	Eotaxin 2	Eotaxin 3	MCP 2	MCP 3	MCP 4	RANTES	
Wt	7,7 ± 0,2 100	32,2 ± 20,7 103,4 ± 0,3	57,8 ± 32,9 116,3	22,7 ± 4,3 111,3	8,6 58,6 ± 26,3	19,1 ± 10,4 132,6 ± 3,8	25,4 81,2	EC50 % Ktrl
H114F	0,2 100	1,7 86,1 ± 25,8	13,1 85 ± 5,1	0,7 87,8 ± 19	5,9 79,5	212,7 92,4	114,6 52	
H114A	13,8 ± 11,8 100	64,8 ± 24,4 62,8 ± 5,2	135 ± 88,7 72,0 ± 18	3,1 ± 1,5 85,0 ± 21,8	28,5 20,9	42,8 ± 19,7 86,5	89,3 ± 24,3 23,4	
Y41A	3,8 ± 3,2 100	4,6 ± 6,5 83,2 ± 4,8	41 98,6 ± 16,1	4,57 96,8	> 300 19,4	4,6 105,7	12,9 47	
R95A	6,4 ± 3,2 100	8,4 ± 2,4 93,0 ± 5,0	18,8 69,3 ± 45,5	6,5 ± 4,4 103,1±4,0	66,7 60,4	1,3 100	3,3 50,8	
Y113A	87,1 100	45,6 94,1 ± 10,1	>300 43,8 ± 20,0	>300 55,7 ± 5,8	>300 30,9	>300 32,5	>300 25,4	
Y291S	12,3 100	9,8 86,7 ± 17,5	27 70,1 ± 6,3	>100 100,0 ± 38	> 100 60,6	> 300 19,3	> 300 9	
Y291F	43,9 100	1126 71,7 ± 2,5	>100 69,3 ± 7,2	6 102,9 ± 34,6	124,6 26	2,6 152,2	6 57,3	

Die Daten zeigen, dass die drei Eotaxine über ähnliche Aminosäuren mit dem Rezeptor wechselwirkten, während die MCP Liganden und RANTES mitunter andere Interaktionsstellen mit dem Rezeptor nutzten. Mutation Y113A führte zur besonders starken Reduktion der Affinität und Potenz aller CCR3 Liganden zur Rezeptorinternalisierung. Bei dieser Mutante konnte nur für Eotaxin 1 und Eotaxin 2 in den beiden höchsten Konzentrationen eine Internalisierung des Rezeptors beobachtet werden. Genau umgekehrt verhielt es sich für die Mutante Y291F. Der Austausch des Tyrosins gegen ein Phenylalanin an dieser Stelle resultierte in deutlich stärkerer Potenz von MCP 2 und MCP 4, während die EC50 Werte für Eotaxin 1 und Eotaxin 2 deutlich höher lagen.



4.6.3 Rezeptorinternalisierung durch agonistische Molekülen

Bisherige Studien zu Rezeptor-Ligand-Wechselwirkungen (26, 34) lassen den Schluss zu, dass natürliche Liganden in erster Linie mit dem N-Terminus sowie den extrazellulären Loops des Rezeptors wechselwirken. Im Gegensatz dazu geht man im hier zu prüfenden Rezeptormodell davon aus, dass agonistisch und antagonistisch wirksame Moleküle vorwiegend mit Aminosäuren der Transmembrandomäne interagieren (75, 95, 98). Daher sollten neben den natürlichen Liganden des hCCR3 Rezeptors agonistisch wirksame, also hCCR3 aktivierende, Substanzen auf den Mutanten getestet werden. Aufgrund der sehr geringen Rezeptorexpression der Mutanten C207A, Y255A und E287A wurden diese auch hier nicht getestet. Es wurden drei oder vier Substanzen auf den Mutanten untersucht und die Internalisierungseffizienz mit Eotaxin 1 verglichen. Die auf dem Wildtyp getesteten Substanzen 1 und 4 gehören zur gleichen Strukturklasse. Charakteristika der getesteten Substanzen aus vorausgehenden Assays sind Tabelle 4 zu entnehmen. Die Substanzen wurden in Konzentrationen von 0,1-10.000 nM seriell verdünnt und die Zelllinien 60 min damit inkubiert. Nach dieser Zeit wurde die Internalisierungsreaktion gestoppt und die CCR3 Expression an der Zelloberfläche mittels Durchflusszytometrie untersucht. Die erhaltenen Internalisierungskurven sind in Abbildung 17 und Abbildung 18 dargestellt.

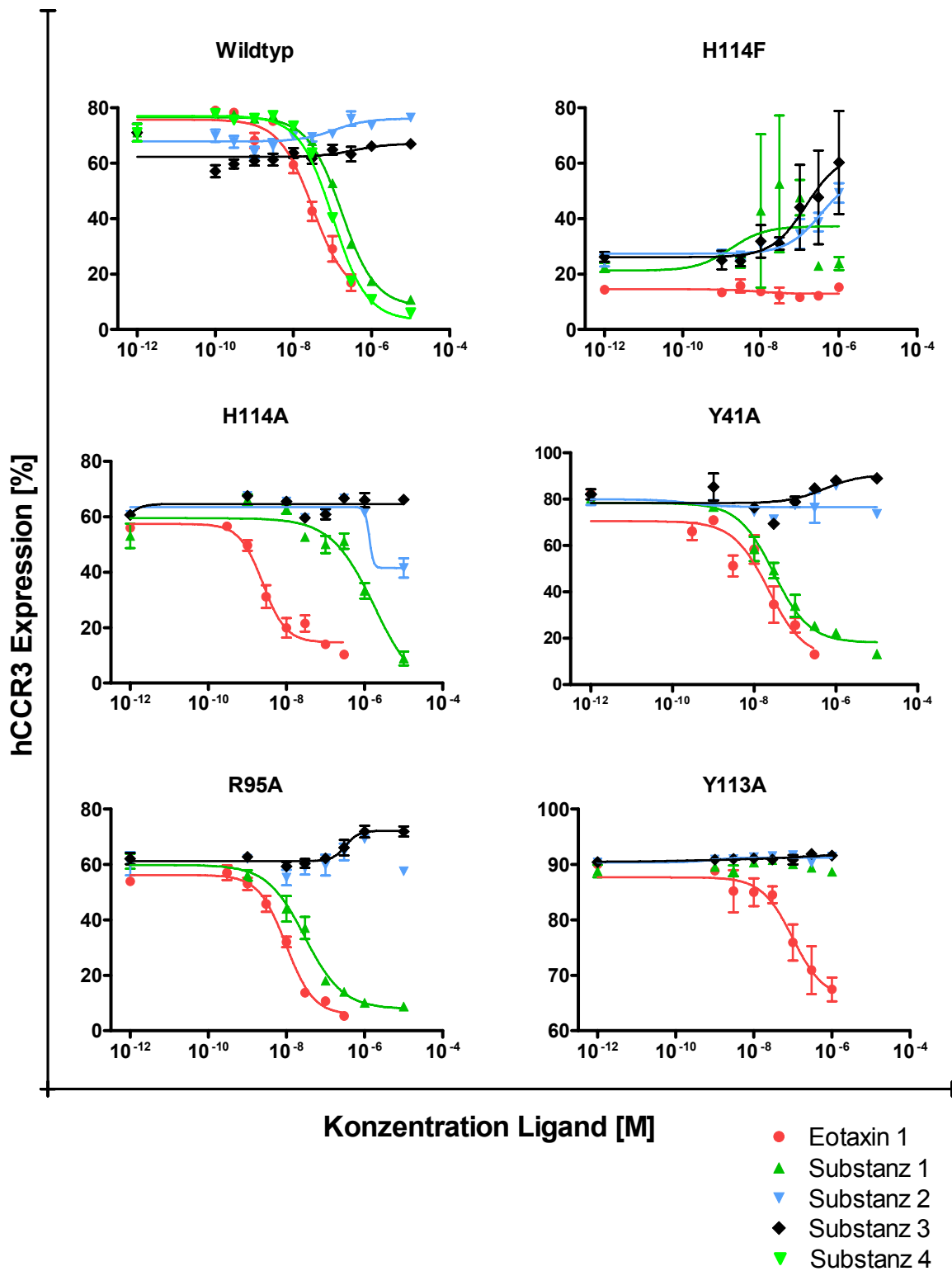


Abbildung 17: Internalisierungsvermögen von Agonisten sowie Eotaxin 1 im FACS-basierten Internalisierungsassay -Fortsetzung in Abbildung 18-
-Erläuterungen siehe Abbildung 18- (n=2-3).

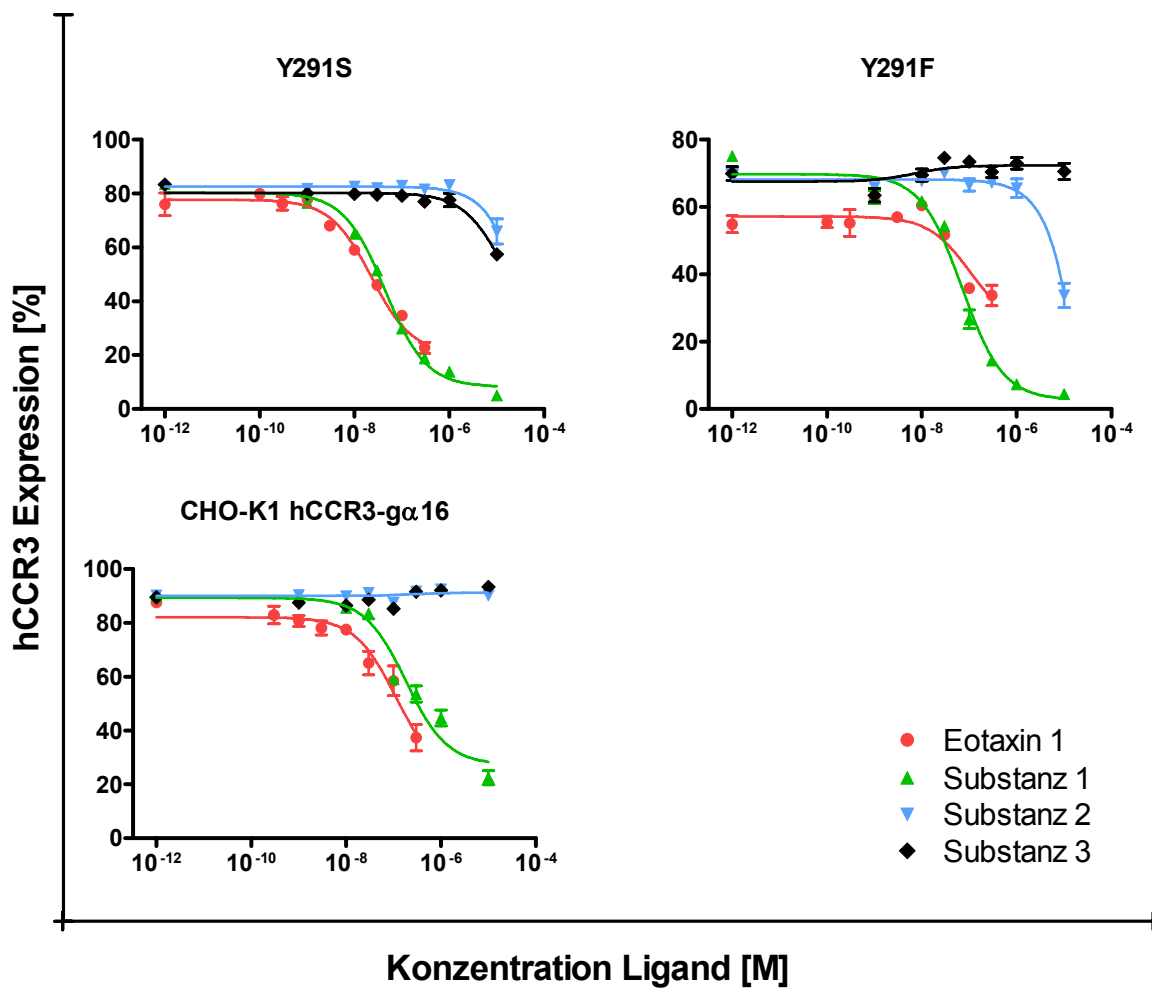


Abbildung 18: -Fortsetzung von Abbildung 17- Internalisierungsvermögen von Agonisten sowie Eotaxin 1 im FACS-basierten Internalisierungsassay

Dargestellt ist das konzentrationsabhängige Internalisierungsvermögen von Eotaxin 1 sowie 3 (oder 4) ausgewählten, potentiell agonistischen Substanzen als Reduktion der Oberflächenexpression des CCR3 [%] \pm SEM (n=2-3). Die Zellen wurden mit den entsprechenden Liganden 60 min inkubiert, die Reaktion danach abgestoppt und die Zellen mit hCCR3-spezifischem FITC-gekoppeltem Antikörper inkubiert. Ein entsprechender Isotyp- Antikörper wurde als Kontrolle verwendet. Die erhaltenen Expressionsdaten ergeben sich aus der Subtraktion des unspezifischen Signals, das mittels des Isotyp-AK erhalten wurde, von der mit dem spezifischen CCR3-AK detektierten Expression. Aufgrund der hohen Datenschwankung lassen sich für Mutation H114F keine verlässlichen Aussagen über das Verhalten der Substanzen machen.

Substanz 1 zeigte auf den meisten Mutanten eine gleich starke Wirkung wie Eotaxin 1, d.h. die Substanz führte zu einer maximalen Internalisierung der Rezeptoren von der Oberfläche. Die erhaltenen EC50 Werte für Substanz 1 (beispielsweise für den WtCCR3 von 64.6 ± 7.8 nM) sind vergleichbar mit denen für Eotaxin 1 (mit 24.8 ± 6.3 nM). Substanz 1 konnte daher für den WtCCR3 als voller Agonist charakterisiert werden. Diese Beobachtung ließ sich allerdings nicht für die beiden CCR3 Zelllinien mit den Mutationen H114A und Y113A bestätigen. Im Vergleich zu Eotaxin 1 war Substanz 1 auf H114A deutlich weniger potent und zeigte eine offensichtliche Rechtsverschiebung des EC50 Wertes mit 1332 ± 483 nM. Während Eotaxin 1 auf Y113A in hohen Konzentrationen noch zu einer hCCR3 Internalisierung führte, so war Substanz 1 überhaupt nicht in der Lage, den Rezeptor zu internalisieren. Folglich beeinträchtigen diese beiden Mutationen die Wechselwirkung von Substanz 1 mit dem Rezeptor.

Die Substanzen 2 und 3 sind aufgrund der vorhandenen Daten aus dem GTP γ S-Assay weder als volle Agonisten noch als potente Antagonisten einzustufen, obwohl sie in der Lage waren, Eotaxin 1 in einem Rezeptorbindungsassay vom Rezeptor zu verdrängen (Vgl. Tabelle 4, K_i von 29,7 nM für Substanz 2 und 82,7 nM für Substanz 3). Die Zugabe beider Substanzen führte weder in WtCCR3 Zellen noch in den Mutanten zu einer Rezeptorinternalisierung. Substanz 2 konnte jedoch die Internalisierung bei den Mutanten R95A, H114A und Y291F bei hohen Konzentrationen von 10.000 nM stimulieren. Der umgekehrte Effekt war für Substanz 3 zu beobachten. Sie führte zu Erhöhung der detektierbaren hCCR3 Expression auf den drei zuletzt benannten Mutanten sowie dem Wildtyp. Es ließ sich folglich keine Rezeptorinternalisierung detektieren. Es nahm im Gegenteil die Rezeptormenge auf der Oberfläche mit steigender Konzentration des Agonisten zu. Daraus lässt sich schließen, dass die Substanzen 2 und 3 an die Rezeptoren mit den Mutationen R95A, H114A, Y291F und Y291S binden konnten. Diese aktivierten die Rezeptoren allerdings nicht und fixierten sie damit an der Oberfläche. Dadurch wurde auch der normale Rezeptorrecyclingprozess gestört. Es wurden weniger Rezeptormoleküle basal endozytiert als wieder zurück an die Oberfläche kamen (siehe auch Substanzen 2 und 3 unter 4.6.3). Dies wiederum führte zu einer Erhöhung der Zahl der Rezeptormoleküle auf der Oberfläche. Im Umkehrschluss war damit eine Bindung der beiden Substanzen an den WtCCR3 sowie an den CCR3 mit den

Mutationen Y113A und Y291 nur eingeschränkt möglich. Bei den drei genannten Zelllinien kam es weder zu einer Internalisierung noch zu einer Erhöhung der Expression. Auch Wise *et al.* (115) konnten die Wichtigkeit der Aminosäure Y113 im CCR3 für eine Zellaktivierung über entsprechende Liganden demonstrieren. Sie konnten für ihre mit CCR3-Y113A transfizierten Zellen eine stark reduzierte chemotaktische Reaktion nach Stimulation mit Eotaxin 1 sehen.

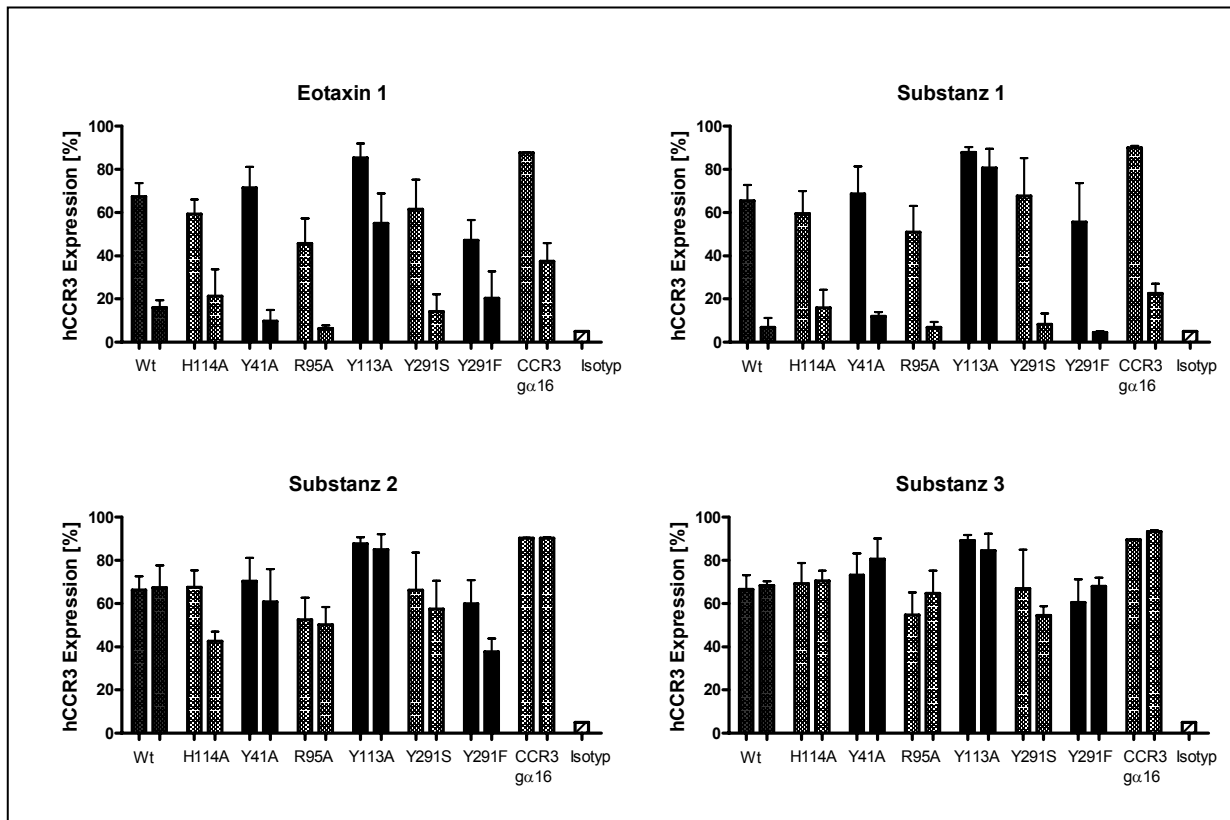


Abbildung 19: Internalisierung von CCR3 und CCR3 Mutanten bei maximaler Stimulation mit Eotaxin 1 oder CCR3 Agonisten

Dargestellt ist jeweils die maximale Internalisierung für die untersuchten agonistischen Substanzen oder Eotaxin 1 auf den Mutanten (n=2-3). Der erste Wert gibt dabei den Expressionswert ohne Ligandenzugabe, der zweite jeweils den gemessenen Expressionswert nach Stimulation mit dem jeweiligen Liganden in der höchsten Konzentration (Eotaxin 1 300 nM, Substanz 1-3 10 µM). Die Expression wurde mittels Durchflusszytometrie nach CCR3 spezifischer AK-Inkubation bestimmt.

In Abbildung 19 ist die jeweils maximale Internalisierung verdeutlicht, die auf den Mutanten erreicht werden konnte. Dargestellt ist jeweils die gemessene Expression ohne Zugabe eines Liganden sowie der verbleibende Expressionswert, der bei höchster Ligandenmenge erreicht wurde. Die Zugabe von Eotaxin 1 sowie Substanz 1 führte bei allen Mutanten zu einer effektiven Reduktion der Oberflächenexpression. Ausnahme hierzu stellte die Zelllinie mit Mutation Y113A dar. Hier führte die Zugabe von 300 nM Eotaxin 1 nur noch zu einer partiellen Internalisierung während Substanz

1 hingegen nicht mehr mit dem Rezeptor interagierte. Die Substanzen 2 und 3 führten nur vereinzelt zu einer Internalisierung. Tabelle 8 gibt zusammenfassend eine Übersicht über die EC50 Werte zur Rezeptorinternalisierung sowie die maximale Internalisierung relativ zu Eotaxin 1 (%Ktrl) für die einzelnen Substanzen. Dabei ist zum einen die relative CCR3 Internalisierung innerhalb jeder Mutante (oberer Wert) wie auch im Bezug auf die Potenz des Eotaxin 1 auf dem WtCCR3 (unterer Wert) angegeben.

Tabelle 8: Internalisierungsvermögen von CCR3 Agonisten und Eotaxin 1

Angegeben sind EC50 sowie %Ktrl-Werte im Bezug auf das Internalisierungsvermögen der Liganden mit Standardabweichungen. Die oberen %Ktrl Werte wurden ermittelt, indem die maximal erreichbare Internalisierung mit Eotaxin 1 für jede Mutante 100% gesetzt wurde und die anderen Liganden ins Verhältnis gesetzt wurden. Der zweite % Ktrl- Wert bezieht sich auf die Maximalinternalisierung des Eotaxin 1 auf dem WtCCR3. Die Farbcodes charakterisieren die jeweiligen Liganden als volle (dunkelgrün), partielle (hellgrün) und keine (rot) Agonisten. (Abk.: Eot 1=Eotaxin 1; n.b.=Wert nicht bestimmt)

	Eotaxin 1	Substanz 1	Substanz 2	Substanz 3	Substanz 4	
Wt	24,8 ± 6,3	64,6 ± 7,8	> 10 000	> 10 000	102,8	EC50
	100	119,9 ± 1,7	-183 ± 8,8	-4,37 ± 12,5	107,7	% Ktrl Eot 1
	100	119,9 ± 1,7	-183 ± 8,8	-4,37 ± 12,5	107,7	% Ktrl Wt Eot 1
H114F	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.	
	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.	
	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.	
H114A	5,9 ± 3,4	1332,5 ± 483	2763 ± 1447	> 10 000	n.b.	
	100	107 ± 10,2	63,1 ± 21,1	-1,65 ± 10,5	n.b.	
	88,2	93,3	53,6	-2,5	n.b.	
Y41A	17,1 ± 5	69,5 ± 39,8	> 10 000	> 10 000	n.b.	
	100	87,36 ± 9,6	15,6 ± 6,6	-11,5 ± 1,5	n.b.	
	137,7 ± 10,3	121,3±22,5	20,8 ± 7,5	-15,7 ± 0,89	n.b.	
R95A	5,8 ± 4,0	18,7 ± 10,8	> 10 000	> 10 000	n.b.	
	100	114,9 ± 6,6	6,01 ± 0,4	-32,8 ± 12,6	n.b.	
	84,3 ± 19,6	95,5±16,9	5,0 ± 0,86	-25,2 ± 4,2	n.b.	
Y113A	444,8 ± 346,7	> 10 000	> 10 000	> 10 000	n.b.	
	100	16,05 ± 15,5	6,27 ± 11,0	7,42 ± 12,7	n.b.	
	65,0 ± 16,8	13,02±12,7	5,9 ± 8,2	6,96 ± 9,5	n.b.	
Y291S	18,1 ± 4,5	78,2 ± 34,6	> 8 000	> 8 000	n.b.	
	100	122,2 ± 25,3	22,1 ± 8,1	25 ± 23,7	n.b.	
	101,2 ± 12,8	126,9 ± 41,2	23,4 ± 11,0	28,2 ± 27,2	n.b.	
Y291F	58,7 ± 44,5	51,3 ± 18,2	> 8 000	> 10 000	n.b.	
	100	135,7	31,7	-52	n.b.	
	52,6 ± 7,3	116,4 ± 35,0	47,8 ± 28,9	-1,36 ± 15,5	n.b.	
CCR3-gα16	113	183	> 10 000	> 10 000	n.b.	
	100	134,2	0,1	-7,9	n.b.	
	107,6	144,4	0,07	0	n.b.	

voller Agonist 70-100%
 partieller Agonist 20-70%
 kein Agonist 0-20%

4.6.4 Inhibition der Eotaxin 1 induzierten Internalisierung durch Antagonisten

Nachdem sowohl natürliche Liganden als auch CCR3-Agonisten auf den Mutanten getestet wurden, sollte das Verhalten von antagonistisch wirkenden Substanzen untersucht werden. Dazu wurden Substanzen aus verschiedenen Strukturklassen ausgewählt. Charakteristika der untersuchten Antagonisten aus vorausgehenden Assays sind Tabelle 4 zu entnehmen. Die Resultate der Internalisierungsassays sind graphisch in Abbildung 20 und Abbildung 21 gezeigt. Die ermittelten IC₅₀- sowie Kontrollwerte in % (%Ktrl) sind Tabelle 9 zu entnehmen. Substanz 5, Substanz 6 sowie Substanz 7 waren in der Lage, die Eotaxin 1 vermittelte Internalisierung in gleicher Weise und sehr potent auf allen Zelllinien zu inhibieren. Die Internalisierungsexperimente bestätigten die Charakterisierung der drei Substanzen als volle Antagonisten basierend auf GTPγS-Daten. Im Gegensatz dazu konnte Substanz 8 eine durch Eotaxin 1 induzierte Rezeptorinternalisierung des CCR3 nicht vollständig inhibieren. Dies war ein überraschender Befund, da die Substanz 8 in allen vorausgehenden Assays als potenter Antagonist klassifiziert wurde (Vgl. Tabelle 4) und auch *in vivo* potent auf den Eotaxin-vermittelten Einstrom von Eosinophilen wirkt (K. Erb und T. Bouyssou, Boehringer Ingelheim, Biberach, unveröffentlichte Daten).

Substanz 5 konnte die durch Eotaxin 1 induzierte Internalisierung des WtCCR3 mit einem IC₅₀ von 1,25 nM sehr wirksam inhibieren. Die Mutationen Y113A, Y291F und Y291S führten jedoch zu einer starken Reduktion der Wirksamkeit dieser Substanz (IC₅₀ Werte: 201 nM, 24 nM und 1941 nM). Im Gegensatz dazu resultierten die mutierten Aminosäuren Y41A sowie R95A in einer deutlichen Erhöhung der Wirksamkeit (IC₅₀ Werte: 0,27 nM bzw. 0,09 nM).

Die Substanzen 6 und 7 zeigten ein sehr ähnliches Verhalten im Bezug auf die CCR3 Mutationen Y291F und Y291S sowie Y113A. Die zuletzt genannte Mutante führte dazu, dass erstaunlicherweise die beiden Substanzen sehr viel potenter die Eotaxin-induzierte Internalisierung inhibieren konnten als Substanz 5 und Substanz 8. Durch die beiden Mutationen der Aminosäure Y291 wurde die Wirksamkeit von Substanz 5 sowie Substanz 7 stark reduziert. Die IC₅₀ Werte auf Y291F wurden mit knapp 70 nM für beide Substanzen bestimmt. Deutlich drastischer war die reduzierte

Wirkung für Y291S mit einem IC50 von 590 nM für Substanz 6 und 330 nM für Substanz 7. Ebenso wie Substanz 5 zeigten die Substanzen 6 und 7 eine erhöhte Wirksamkeit für die CCR3 Mutation Y41A. Die Substanz 7 konnte die Rezeptorinternalisierung der CCR3 Mutante H114F mit einem IC50 von 20 nM noch recht potent inhibieren. Für H114F ließ sich aufgrund der relativ hohen Datenschwankung leider keine verlässliche Aussage über die Potenz der drei anderen Antagonisten machen. Die Mutante mit R95A veränderte die Wirkung von Substanz 6 nicht, wohingegen sie die Potenz von Substanz 5 gegenüber dem WtCCR3 erhöhte. Aus den hier generierten Daten kann man schließen, dass die Mutation Y113A nicht nur starken Einfluss auf das Bindevermögen von natürlichen Liganden und Agonisten, sondern auch auf die Wirkung von Antagonisten hat.

Tabelle 9: Inhibitionsvermögen von CCR3 Antagonisten auf die Eotaxin 1 induzierte Internalisierung

Angegeben sind die EC50 Werte (oberer Wert) sowie das relative Inhibitionsvermögen der Antagonisten (%Ktrl, unterer Wert) ± SD (n=2-3). Die %Ktrl Werte beziehen sich auf das maximale Internalisierungsfenster (basale Expression abzüglich der Expression bei voller Stimulation mit Eotaxin 1). Dieses Fenster wurde 100% gesetzt. Das Vermögen der Antagonisten diese maximale Eotaxin vermittelte Internalisierung zu inhibieren ist in den %Ktrl Werten angegeben. (Abk.: k.W. =es konnte kein Wert ermittelt werden).

	Substanz 5	Substanz 6	Substanz 7	Substanz 8	
Wt	1,25 ± 0,05 124,3 ± 1,9	5,6 ± 1,9 111,8 ± 7,9	1,9 ± 1,8 103,5 ± 6,2	712,4 52,6 ± 5,8	EC50 % Ktrl
H114F	k.W. 100	k.W. 20,1	20 13,8	k.W. 80,2	
H114A	3,3 ± 1,0 137,59 ± 24,1	13,6 ± 7,7 107,8 ± 24,1	2,1 ± 2,0 110,1 ± 7,6	> 10 000 28,7 ± 5,8	
Y41A	0,27 ± 0,1 140,2 ± 5,2	1,1 ± 0,4 124,8 ± 10,1	0,07 ± 0,06 126,3 ± 10,9	15,6 ± 20,6 77,8 ± 17,5	
R95A	0,09 ± 0,02 143,9 ± 1,9	3,4 ± 2,1 141,9 ± 8,9	0,25 ± 0,2 124,5 ± 25,6	27,9 ± 18,0 38,3 ± 56,0	
Y113A	201,1 73,1	0,36 87,2	0,77 88,5	16,21 78,1	
Y291S	1941 ± 102 79,7 ± 50,2	590,9 25,8 ± 42	329,6 ± 10,8 107,7 ± 11,0	> 10 000 -26,7 ± 84,3	
Y291F	24,0 ± 8,2 223,8 ± 24,8	67,6 ± 10,6 216,8 ± 6,9	69,2 ± 3,7 187,6 ± 48,3	> 10 000 64,4 ± 191,9	

Ebenso auffällig war das Inhibitionsverhalten von Substanz 8. Sie war zwar bedingt in der Lage die Rezeptorinternalisierung zu unterbinden, jedoch sehr viel weniger effektiv als die anderen drei getesteten Antagonisten. Während die Mutationen H114A, Y291F und Y291S zu einem vollständigen Aktivitätsverlust von Substanz 8 führten, konnte sie auf CCR3-Y41A mit einem IC₅₀ von 15,6 ±20,6 nM und einer maximalen Inhibition von 77,8% noch recht potent eine Internalisierung blockieren. Auch durch die Mutationen R95A sowie Y113A wirkte Substanz 8 potenter einer Rezeptorinternalisierung entgegen als für den WtCCR3. Da Substanz 8 zuvor im GTPγS-Assay ebenso als potenter Antagonist charakterisiert wurde, lassen die vorliegenden Ergebnisse den Schluss zu, dass Substanz 8 im Vergleich zu den anderen Antagonisten einen anderen Wirkmechanismus zur Blockade der CCR3 Aktivierung hat. Denkbar ist zudem, dass die Substanz *per se* in der Lage ist, den Rezeptor zu internalisieren. Dieses konnte wie unter 4.6.5 gezeigt bestätigt werden.

Abschließend sei noch folgende Beobachtung erwähnt: Vergleicht man die basalen Expressionswerte aller Zelllinien mit den Expressionswerten nach Inkubation mit Antagonisten in den höchsten Konzentrationen, so war ein Anstieg der Rezeptorexpression auf der Zelloberfläche zu verzeichnen. Daraus kann man schließen, dass die Substanzen an den Rezeptor gebunden und ihn dadurch auf der Oberfläche fixiert haben. Dadurch wurden weniger Rezeptormoleküle basal endozytiert als wieder zurück an die Oberfläche gelangten (siehe auch Substanzen 2 und 3 unter 4.6.3). Dies wiederum führte zu einer Erhöhung der Zahl der Rezeptormoleküle auf der Oberfläche.

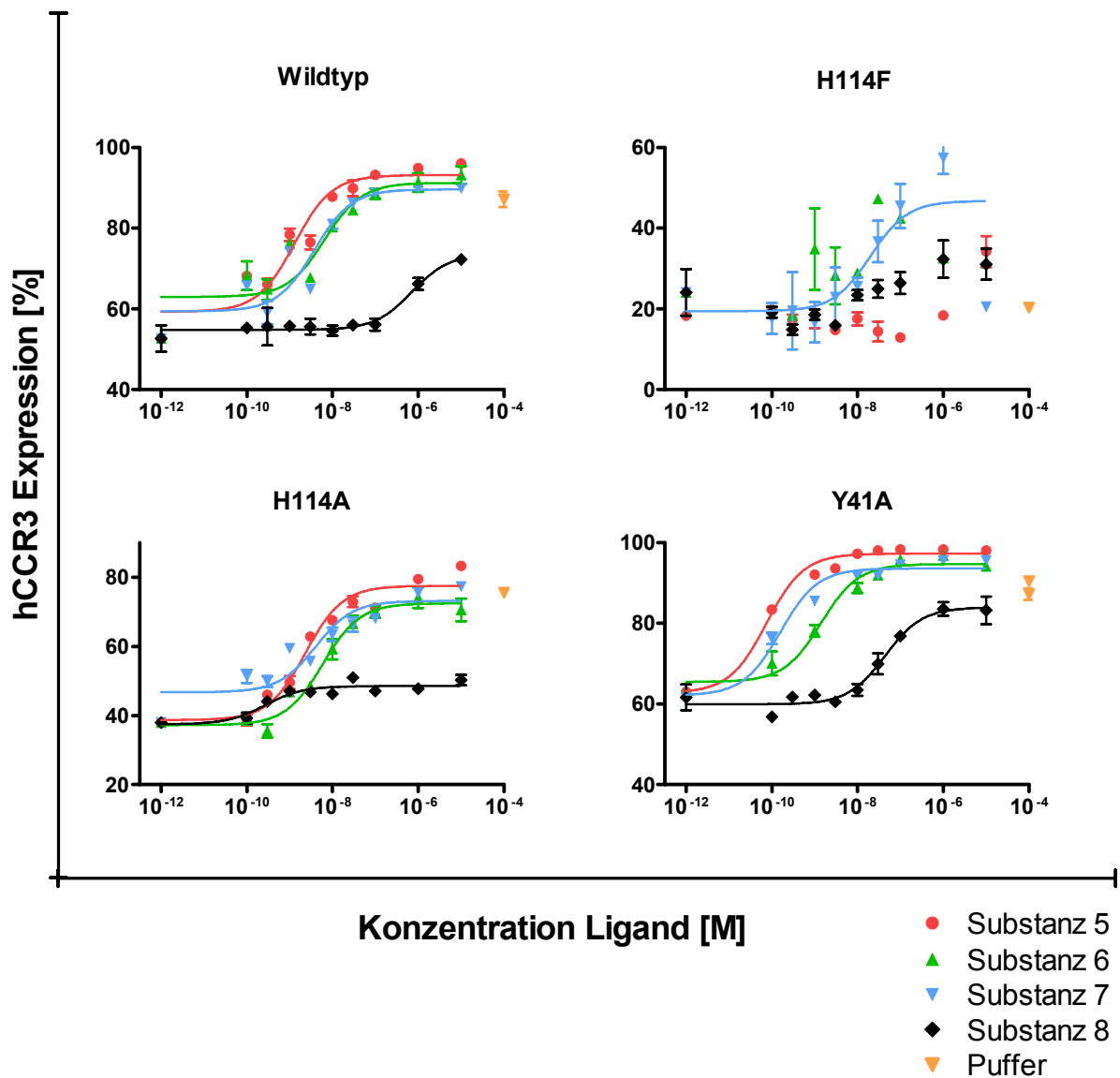


Abbildung 20: Potenz von Antagonisten eine Rezeptorinternalisierung zu inhibieren

Zellen wurden mit den entsprechenden Substanzen 10 min inkubiert und anschließend die Bindung mit Eotaxin 1 für 60 min kompetiert. Danach wurde die Zellen mit CCR3-spezifischem Antikörper inkubiert und die Oberflächenexpression mittels Durchflusszytometrie bestimmt (n=2-3). Die basale Expressionsrate der Zellen (Pufferwert) wurde bestimmt, indem die Zellen mit Puffer ohne Zugabe von Substanz oder Eotaxin inkubiert wurden. Dargestellt sind die gemessenen Expressionswerte \pm SEM.

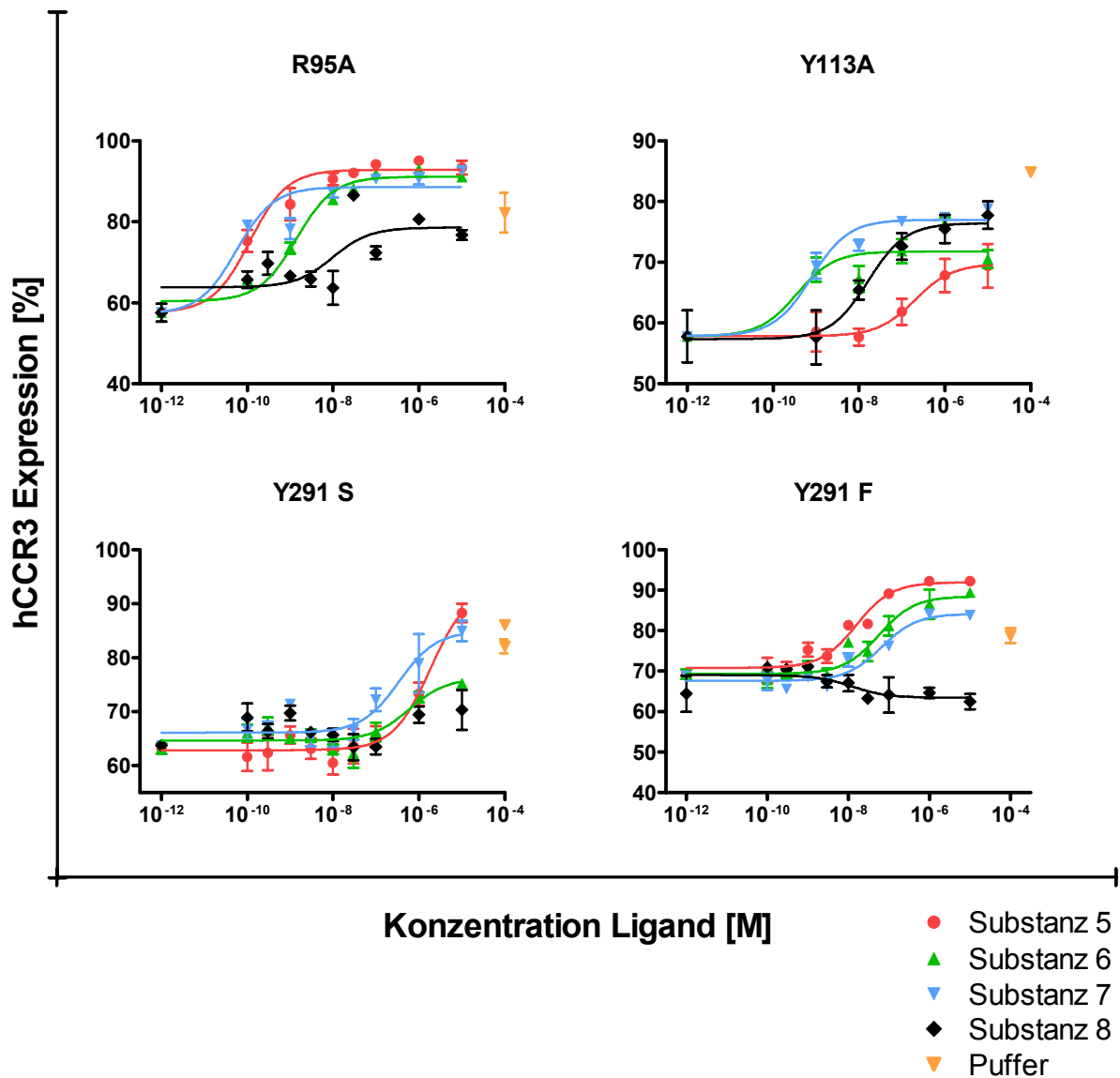


Abbildung 21: Potenz von Antagonisten eine Rezeptorinternalisierung zu inhibieren

Zellen wurden mit den entsprechenden Substanzen 10 min inkubiert und anschließend die Bindung mit Eotaxin 1 für 60 min kompetiert. Danach wurde die Zellen mit CCR3-spezifischem Antikörper inkubiert und die Oberflächenexpression mittels Durchflusszytometrie bestimmt (n=2-3). Die basale Expressionsrate der Zellen (Pufferwert) wurde bestimmt, indem die Zellen mit Puffer ohne Zugabe von Substanz oder Eotaxin inkubiert wurden. Dargestellt sind die gemessenen Expressionswerte \pm SEM.

Eine zusammenfassende Übersicht über die Bedeutung der untersuchten Aminosäuren in der TMD des CCR3 für die Interaktion des Rezeptors mit natürlichen Liganden, Agonisten sowie Antagonisten liefert Tabelle 10.

Tabelle 10: Einfluss der mutierten Aminosäuren auf die Interaktion mit den untersuchten Liganden

Dargestellt sind die jeweils mutierten Aminosäuren und ihr Einfluss auf die Rezeptorinternalisierung des CCR3 nach Stimulation. Das Ergebnis für den WtCCR3 wurde als Referenz verwendet. Weiß: keine Veränderung, hellblau: leichte Veränderung und dunkelblau: starke Veränderung gegenüber dem Wt. + erhöhte Potenz, - verminderte Potenz der Liganden gegenüber dem WtCCR3. Abk.: n.b.=Werte **n**icht **b**estimmt.

Liganden	Wt	Y41A	R95A	Y113A	H114A	H114F	Y291S	Y291F
Eotaxin 1				-		+		-
Eotaxin 2				-	-	+		-
Eotaxin 3			-	-	-	+	-	-
MCP 2		+	+	-	+	+	-	+
MCP 3		-	-	-	-		-	-
MCP 4			+	-		-	-	+
RANTES		-	+	-	-	-	-	+
Substanz 1				-		n.b.		
Substanz 2					+	n.b.	+	+
Substanz 3						n.b.	+	
Substanz 5		+	+	-		n.b.	-	-
Substanz 6		+	+	+		n.b.	-	-
Substanz 7		+	+	+		n.b.	-	-
Substanz 8		+	+	+	-	n.b.	-	

4.6.5 Internalisierungsvermögen der Antagonisten

Aufgrund der Tatsache, dass Substanz 8 im FACS-basierten Internalisierungsassay eine Eotaxin vermittelte Internalisierung nicht effektiv unterbinden konnte (Vgl. 4.6.4), obwohl sie basierend auf GTP γ S Daten als potenter CCR3 Antagonist charakterisiert ist, sollte nun überprüft werden, ob die Substanz *per se* zur Internalisierung des hCCR3 Rezeptors führt. Die Zelllinien wurden daher wie unter 3.10.1 beschrieben mit den Substanzen 60 min inkubiert und anschließend die Rezeptorexpression über spezifische Antikörpermarkierung und Durchflusszytometrie bestimmt. Die Ergebnisse sind in Abbildung 22 und Abbildung 23 graphisch dargestellt. Zunächst wurden alle 4 Substanzen getestet. Da Substanz 5, Substanz 6 sowie Substanz 7 wie unter 4.6.4 gezeigt gleich potent eine Eotaxin vermittelte Internalisierung inhibieren konnten und auch auf den hier zunächst getesteten Zelllinien (WtCCR3, Y41A, R95A und Y114 A) keine Internalisierung nach Stimulation mit den drei Substanzen festgestellt werden konnte, wurde für die übrigen Mutanten nur noch Substanz 5 als Repräsentant der drei Substanzen getestet.

Es ist klar zu erkennen, dass nur Substanz 8 zu einer konzentrationsabhängigen Internalisierung des Rezeptors bei allen Mutanten führte. Die anderen drei Substanzen führten wie bereits unter 4.6.4 beschrieben zu keinem Effekt oder aber zur Erhöhung der Rezeptorexpression auf der Oberfläche. Aus diesen Beobachtungen kann man schließen, dass Substanz 8 im Gegensatz zu den anderen getesteten Substanzen einen anderen Wirkmechanismus zur Inhibition des CCR3 hat. Interessant wäre jetzt, weitere Antagonisten auf ihr Internalisierungsvermögen zu testen, um zu klären, ob dieses Phänomen strukturklassenspezifisch ist.

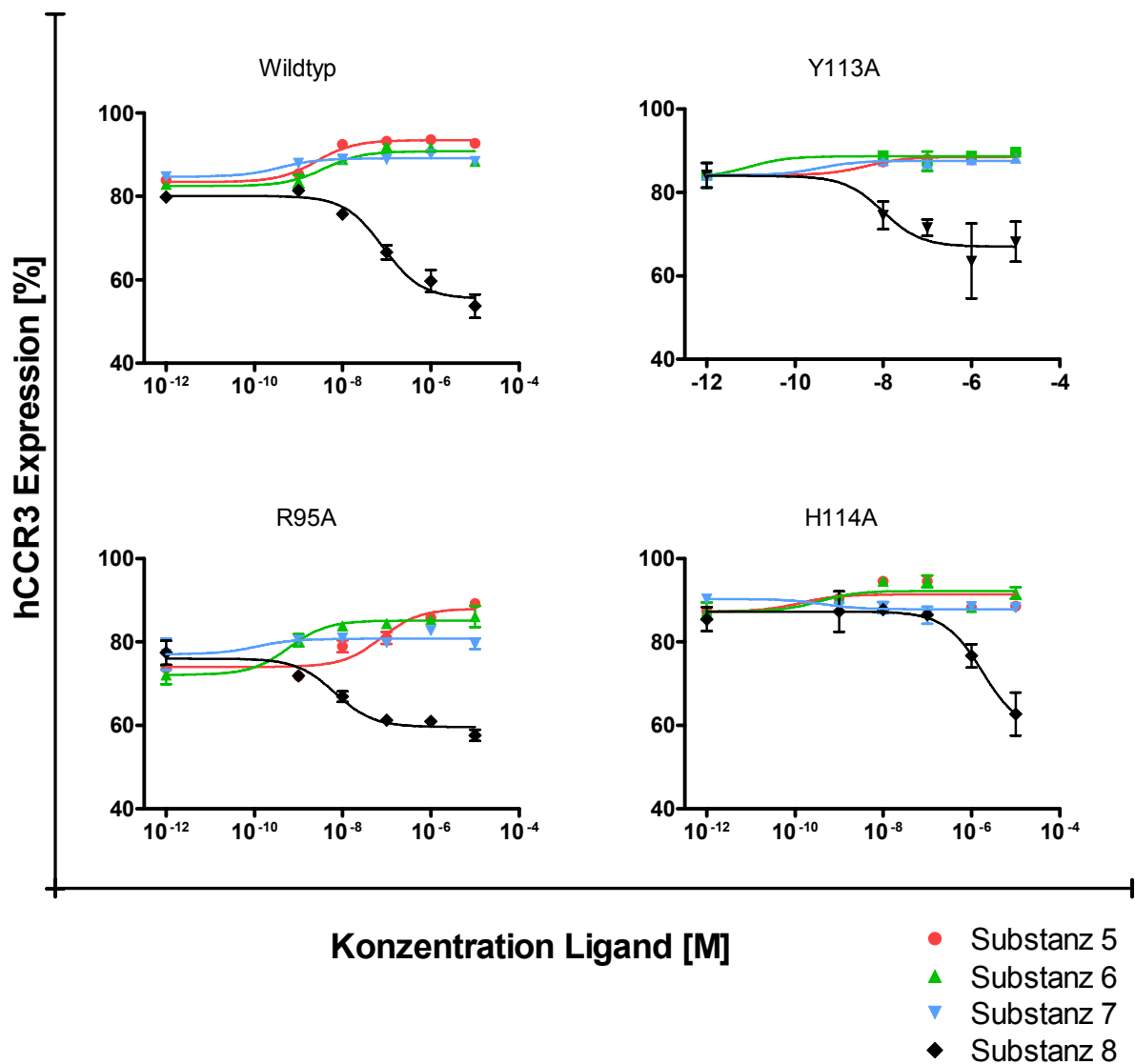


Abbildung 22: Internalisierungsvermögen von Antagonisten auf den Punktmutanten
-Fortsetzung in Abbildung 23-

Die Zellen wurden mit den antagonistischen Substanzen 60 min inkubiert und anschließend die Rezeptorexpression mittels spezifischer CCR3-Antikörper über Durchflusszytometrie bestimmt. Da sich Substanz 5, Substanz 6 und Substanz 7 auf dem WtCCR3, R95A, H114A, Y41A gleich verhalten, wurde für Y41A Y291S und F nur noch Substanz 5 als Repräsentant für die drei sich gleichverhaltenden Substanzen getestet (n=1-3). Dargestellt sind die gemessenen Expressionswerte ± SEM.

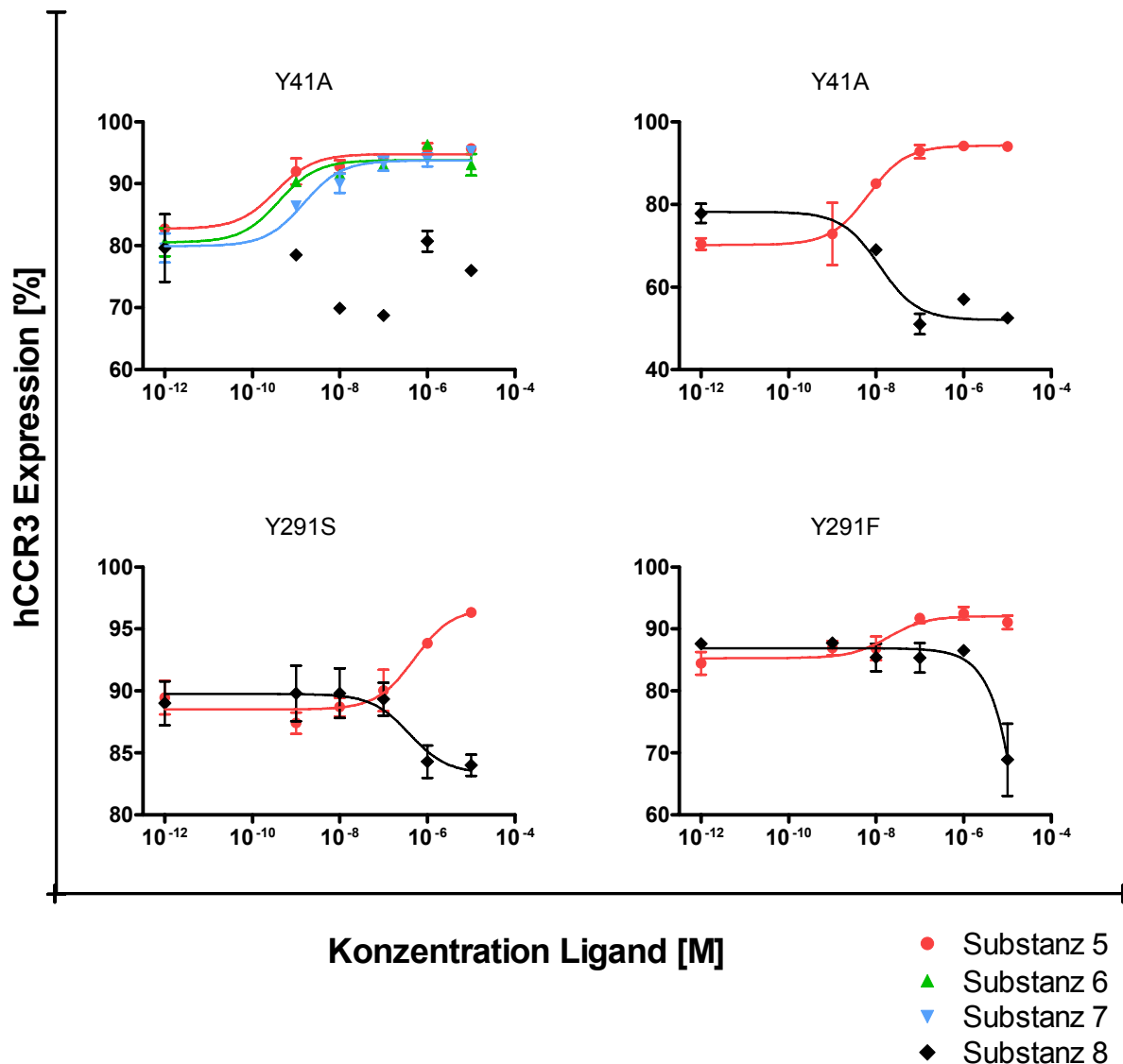


Abbildung 23: -Fortsetzung von Abbildung 22- Internalisierungsvermögen von Antagonisten auf den Punktmutanten

Die Zellen wurden mit den antagonistischen Substanzen 60 min inkubiert und anschließend die Rezeptorexpression mittels spezifischer CCR3-Antikörper über Durchflusszytometrie bestimmt. Da sich Substanz 5, Substanz 6 und Substanz 7 auf dem WtCCR3, R95A, H114A, Y41A gleich verhalten, wurde für Y41A Y291S und F nur noch Substanz 5 als Repräsentant für die drei sich gleichverhaltenden Substanzen getestet (n=1-3). Dargestellt sind die gemessenen Expressionswerte \pm SEM.

4.7 High-Content-Screening (HCS) zur Untersuchung der Funktionalität des CCR3

4.7.1 Rezeptorinternalisierung

Da die Untersuchungen zur Rezeptorinternalisierung im FACS-basierten Assay wie unter 3.10.1 und 4.6 beschrieben vergleichsweise zeitintensiv sind und nur eine relativ geringe Anzahl an parallelen Messungen möglich ist, wurde nach Alternativen gesucht, mit denen der gleiche Parameter mit höherem Durchsatz gemessen werden kann. Eine Möglichkeit hierzu stellt die Parallelisierte Konfokale Mikroskopie („High Content Screening“) dar. Diese Methode ermöglicht die gleichzeitige Analyse von Immunfluoreszenzsignalen in 384er Zellplatten. Dazu wurden die CHO-CCR3Wt Zellen oder CCR3 Mutanten in 384er Zellplatten ausgesät und mit den jeweiligen Liganden 30 min inkubiert. Es folgte eine Permeabilisierung der Zellen mit anschließender Kern- sowie CCR3-Färbung mittels spezifischer, unterschiedlich markierter Antikörper. Die Fluoreszenzsignale wurden mittels des IN Cell Analyzers 3000 (GE Healthcare) detektiert und die gewonnenen Daten mit entsprechenden Algorithmen (siehe unten) analysiert. Der Rezeptor wird nach Stimulation endozytiert und in Granula in der Zelle transportiert. Je nach Menge des internalisierten Rezeptors werden diese Granula im Zellinneren mehr oder weniger CCR3 beinhalten und damit nach Antikörper-Inkubation mehr oder weniger stark fluoreszieren. Die Anzahl der Granula im Zellinnern wurde mittels des GRN0 Algorithmus bestimmt (39).

In einem zweiten Ansatz wurde die Fluoreszenzintensität der Zelloberfläche analysiert. Wie bereits erwähnt, wird CCR3 nach Stimulation internalisiert und ist damit nicht mehr auf der Membran zu detektieren. Die Zellen wurden wie oben beschrieben stimuliert, aber nicht permeabilisiert, da in diesem Ansatz analog des FACS-basierten Assays die verbleibende Oberflächenexpression gemessen werden sollte. Konzentrationsabhängig nahm auch hier die detektierbare Menge des Rezeptors auf der Oberfläche ab. Die relative Fluoreszenz der Oberfläche wurde mittels des OBI0 Algorithmus (Object intensity) bestimmt (39).

Abbildung 24 zeigt Fluoreszenzaufnahmen stimulierter Zellen mit Puffer oder 100 nM Eotaxin 1. Man konnte deutlich eine Zunahme der intrazellulären Granula nach Eotaxin-Inkubation erkennen. Prinzipiell funktionierten beide Methoden (Detektion

der Granula wie auch der Oberflächenfluoreszenz) für die hier verwendeten CHO-Flp-InTM Zellen. Aufgrund der sehr hohen Assayschwankungen, die bis zum Abschluss der Arbeit nicht vollständig behoben werden konnten, werden keine weiteren Daten gezeigt. Die Optimierung des Assays läuft derzeit noch und bietet für künftige Untersuchung die Möglichkeit in relativ kurzer Zeit viele Datenpunkte zu generieren.

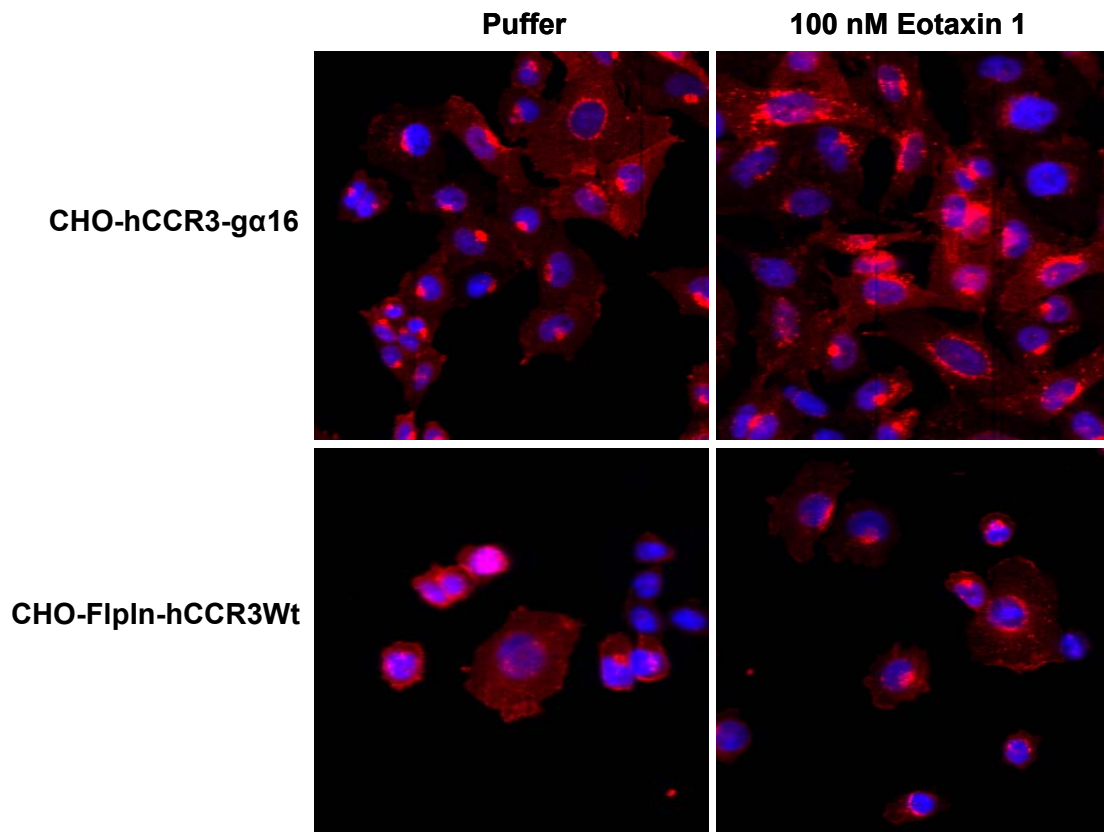


Abbildung 24: Immunfluoreszenzaufnahmen von hCCR3 transfizierten CHO-Zellen nach Stimulation mit Eotaxin

Die CHO Zellen wurden 30 min mit Puffer bzw. 100 nM Eotaxin 1 inkubiert und fixiert. Der hCCR3 Rezeptor wurde mit APC-markiertem anti-hCCR3 Antikörper detektiert. Die Internalisierung des Rezeptors nach Stimulation wurde mittels eines GRN0 Bildalgorithmus (39) quantifiziert.

4.7.2 CCR3 abhängige Phosphorylierung von ERK

Neben der Detektion des Rezeptors über die Reduktion der Oberflächenexpression nach Stimulation mit entsprechenden Liganden besteht die Möglichkeit, weitere, in der Signalkaskade nachgeschaltete Parameter zu untersuchen. Eine Möglichkeit bietet hierzu die Messung der Phosphorylierung der Extrazellulären Rezeptor Kinase (ERK). Nach Aktivierung des CCR3 durch Liganden kommt es über den MAP-Kinaseweg (engl.: Mitogen-activated protein kinase) unter anderem zur Phosphorylierung von ERK, die wiederum Einfluss auf die Genexpression der Zelle nimmt. Im Bezug auf die im Rahmen dieser Arbeit untersuchten Punktmutanten bietet dieser Assay die Möglichkeit, den Einfluss der Mutationen auf die nachgeschaltete Signaltransduktion nach Stimulation mit entsprechenden Liganden zu untersuchen.

Die Phosphorylierung von ERK wurde ebenfalls wie unter 4.7.1 beschrieben über Immunfluoreszenz gemessen. Zunächst wurden die CHO-Flp-InTM Zellen mit dem WtCCR3 mit 100 nM Eotaxin stimuliert und die Phosphorylierung von ERK in Abhängigkeit der Zeit untersucht. Wie in Abbildung 25 zu erkennen ist, erhält man für die untersuchten WtCCR3 Zellen 5 min nach Stimulation mit Eotaxin ein Maximalsignal. Im folgenden wurde für alle Mutanten die Zeitabhängigkeit der ERK~P untersucht, und es konnte für alle ein Maximalsignal nach 5 min ermittelt werden. Anschließend wurden Konzentrationswirkungskurven für die natürlichen Liganden wie auch für die bereits im FACS basierten Internalisierungsassay untersuchten Substanzen für alle verfügbaren CCR3 Mutanten durchgeführt. Prinzipiell konnte eine konzentrationsabhängige Phosphorylierung von ERK festgestellt werden. Aufgrund von sehr hohen Assayschwankungen, die bis zum Abschluss der Arbeit nicht vollständig behoben werden konnten, werden keine weiteren Daten gezeigt. Die Optimierung des Assays läuft derzeit noch und kann dann eine gute Möglichkeit darstellen, die Punktmutanten des CCR3 weiter zu charakterisieren.

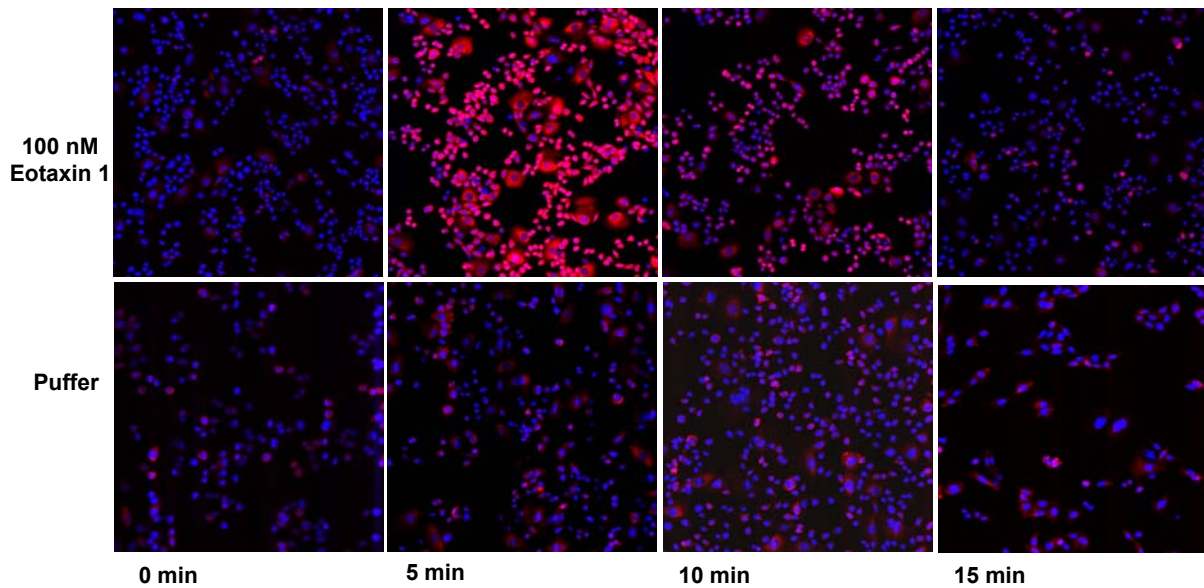


Abbildung 25: Zeitabhängige ERK-Phosphorylierung nach Eotaxin Stimulation in CHO-Flp-InTM Zellen

CCR3 transfizierte CHO-Flp-InTM Zellen wurden mit 100 nM Eotaxin stimuliert und die Zellen zu den angegebenen Zeitpunkten mit 4% Formaldehyd und Hoechst 33342 Farbstoff fixiert. P~ERK wurde mittels spezifischer Antikörper detektiert und dieser Antikörper wiederum mit einem Alexa Fluor 647 markierten Sekundärantikörper. Die Bildanalyse erfolgte mittels eines OBI0 (Object intensity algorithm) (39).

4.7.3 Aktivierung von CCR3 über fluoreszenzmarkiertes Eotaxin 1

Da eine Bindung von Eotaxin an den CCR3 Rezeptor der transfizierten CHO-Flp-InTM Zellen mittels des dazu standardmäßig verwendeten SPA-Bindungsassay nicht nachgewiesen werden konnte, sollte mit fluoreszenzmarkiertem Eotaxin getestet werden, ob es möglich ist, über Immunfluoreszenzaufnahmen sowohl auf der Oberfläche gebundenes wie auch bereits mit dem Rezeptor internalisiertes Eotaxin 1 zu detektieren.

Die hCCR3-transfizierten Zellen (CHO-Flp-InTM-Wt) sowie die CHO-K1-hCCR3 α 16 Zellen wurden mit Alexa647-markiertem Eotaxin 1 (Eotaxin Alexa 647 (human), Almac Sciences, Edinburgh, GB) stimuliert, die Reaktion nach 30 min gestoppt und die Fluoreszenzintensität im IN Cell Analyzer 300 (GE Healthcare) ermittelt. Die Menge an Granula wurde mittels eines GRN0 Algorithmus bestimmt. Dabei konnte mit zunehmender Eotaxinkonzentration ein Anstieg der A-Granula festgestellt werden (Vgl. Abbildung 26). Das fluoreszenzmarkierte Eotaxin bot demnach die Möglichkeit gebundenes wie auch internalisiertes Eotaxin über entsprechende Algorithmen für die Immunfluoreszenz zu quantifizieren.

Denkbar ist ebenfalls eine Anwendung des fluoreszenzmarkierten Eotaxins im Rahmen der Durchflusszytometrie. Aufgrund der vergleichsweise hohen Kosten für das fluoreszenzmarkierte Eotaxin wurde diese Methode allerdings vorerst nicht weiterverfolgt.

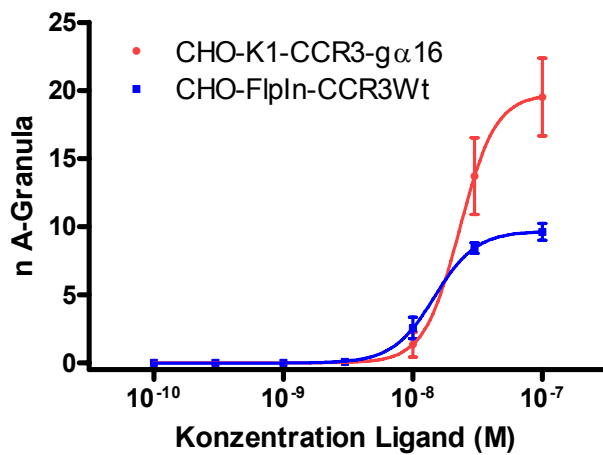


Abbildung 26: Stimulation von hCCR3-transfizierten CHO-Flp-InTM-Zellen (Wt) und CHO-K1-hCCR3-gα16-Zellen mit Alexa647-Eotaxin 1. Die Zellen wurden mit steigenden Konzentrationen Alexa647-Eotaxin 1 stimuliert und anschließend fixiert. Die Fluoreszenzintensität wurde im IN Cell Analyzer (GE Healthcare) ermittelt. Mittels eines GRN0 Algorithmus wurde die Anzahl an A-Granula im Zellplasma bestimmt. Konzentrationsabhängig konnte man eine Zunahme der Granula sehen.

	CHO-K1-hCCR3-gα16	CHO-FlpIn-CCR3Wt
EC50	2.305e-008	1.465e-008

5 Diskussion

Asthma ist eine chronisch-entzündliche Erkrankung der Atemwege, die mit stark steigender Prävalenz in der Bevölkerung auftritt. Verschiedene äußere Reize resultieren letztlich in einer Aktivierung von in die Lunge eingewanderten Eosinophilen über den CCR3 Rezeptor. Die von aktivierten Eosinophilen sezernierten Entzündungsmediatoren führen zur charakteristischen Entzündungsreaktion in der Lunge und für die Betroffenen bedeuten die daraus resultierenden Symptome wie Atemnot, Husten und eine vermehrte Schleimsekretion bisweilen eine starke Einschränkung für ihre Lebensqualität. Die Behandlung eines akuten Asthmaanfalls erfolgt vorrangig mit Bronchodilatoren wie β -Agonisten und inhalativ verabreichte Kortikosteroide sollen Asthmaanfällen vorbeugen. Das Ziel neue, spezifischere therapeutische Ansätze zur Behandlung des Asthmas zu finden, macht den CCR3 Rezeptor zum Gegenstand aktueller Forschung.

Bisher konnte die Struktur des CCR3 Rezeptors wie auch anderer Chemokinrezeptoren nur bedingt aufgeklärt werden. Um beispielsweise spezifische Rezeptorantagonisten entwickeln und zu optimieren können, ist es von essentieller Bedeutung, die Rezeptor-Ligand-Wechselwirkung zu verstehen. Bisherige Mutagenesestudien am CCR3 Rezeptor beschäftigten sich hauptsächlich mit den extrazellulären Bereichen des GPCR, die vorwiegend an der Bindung von natürlichen Liganden beteiligt sind, und den intrazellulären Bereichen, die für die Signalweiterleitung eine Rolle spielen. Man vermutet dagegen, dass antagonistisch wirksame Moleküle in der Transmembrandomäne des Rezeptors analog des Retinals beim Rhodopsin binden.

Ziel dieser Arbeit war die genauere Charakterisierung der TMD des CCR3 Rezeptors, um ein besseres Verständnis für die Rezeptor-Ligand Wechselwirkung zu bekommen. Zu diesem Zweck wurden CHO-Flp-InTM-Zellen mit dem CCR3 sowie 10 verschiedenen Punktmutationen in der TMD des CCR3 stabil transfiziert. Der Einfluss dieser Mutationen auf das Bindevermögen, Internalisierungs- sowie Aktivierungsvermögen von natürlichen Liganden wie auch agonistisch und antagonistisch wirkenden Substanzen sollten in verschiedenen biochemischen und funktionellen Assays untersucht werden.

5.1 Flp-In™ System und Rezeptorexpression

Das verwendete CHO-Flp-In™-System ermöglicht über zwei Plasmide (pOG44 und pcDNA/FRT-Vektor) eine stabile Integration des CCR3 Rezeptors an immer derselben Stelle in das Zellgenom. Eine Selektion erfolgreich transfizierter Zellen sollte über Hygromycin gewährleistet werden. Die zunächst in dieser Arbeit aufgetretenen Probleme wie die ungleiche Expressionshöhe für die einzelnen CCR3 Mutanten, das Wachstum der nicht transfizierten Zellen und der Verlust der Rezeptorexpression im Laufe der Kultivierung legen nahe, dass es sich um inhomogene Mischpopulationen aus transfizierten und nicht transfizierten Zellen handelte. Ein möglicher Grund dafür könnte ein suboptimal gewähltes Verhältnis von pcDNA/FRT- zur pOG44-Vektor DNA sein. Aus diesem Grund wäre es denkbar, dass es in einem Teil der Zellen zu einer FRT-Site unabhängigen, unspezifischen Integration der Zielgene (*CCR3*- und Hygromycinresistenzgen) ins Genom kam, so dass teilweise die Expression eben doch gestört war. Denkbar wäre auch, dass es sich bei den verwendeten CHO-Flp-In™-Zellen um eine inhomogene Zellpopulation von bereits vom Hersteller FRT-transfizierten und nicht transfizierten Zellen handelte, jedoch kann darüber nur spekuliert werden.

Für einen Großteil der CCR3-Mutanten gelang es, hoch exprimierende Einzelklone zu isolieren. Der Sachverhalt liegt anders für die Mutationen C207A, Y255A sowie E287A. Bei diesen war es auch nach wiederholter Transfektion mit nachfolgender Isolation von Einzelklonen aus der zuerst transfizierten Mischpopulation nicht möglich, eine Expression höher als 25% zu erreichen. In diesen Fällen ist es sehr wahrscheinlich, dass die Mutation Einfluss auf die Faltung und/oder die Expression des Rezeptors hat. Bei E287A handelt es sich um einen konservierten Rest unbekannter Funktion. Basierend auf den gewonnenen Daten scheint diese Aminosäure essentiell für die Faltung bzw. Expression des Rezeptors zu sein. Wise *et al.* untersuchten ebenfalls den Einfluss von E287 und konnten eine Expression in ihren transfizierten Zellen erreichen. Dabei ist zu bemerken, dass es sich in ihrem Fall um eine transiente Transfektion von L1.2 Zellen (murine pre-B Zellen) handelte, die mehrfach in der Literatur als Zelllinie der Wahl zu finden sind (77, 86). Zudem wählten Wise *et al.* einen konservativen Austausch der Aminosäure 287 von Glutamat (E) zu Glutamin (Q), so dass kein direkter Vergleich gezogen werden kann.

Dennoch konnten sie aufgrund dieses Austausches geringere Chemotaxis nach Stimulation mit Eotaxin 1 feststellen (115).

5.2 Verlust der Rezeptorexpression

Nachdem aus den zunächst transfizierten Mischpopulationen pro CCR3-Mutation Einzelklone isoliert werden konnten, trat im Laufe der Zeit ein Verlust der Rezeptorexpression auf. Zu vermuten ist, dass der Rezeptor trotz stabiler Integration nach gewisser Zeit wieder aus dem Genom entfernt worden war oder aber, dass der Promotor aus unbekanntem Grund abgeschaltet wurde. Allerdings hätten dann die Zellen theoretisch unter Hygromycinselektion nicht mehr wachsen können, da das Gen für Hygromycinresistenz vom selben Promotor kontrolliert wurde. Des Weiteren kann spekuliert werden, dass die transfizierten Zellen aus unbekanntem Grund nur noch die Hygromycinresistenz, nicht aber die für den CCR3 Rezeptor exprimierten. Dadurch konnte kein CCR3 mehr detektiert werden, die Zellen wurden dennoch nicht in ihrem Wachstum unter Hygromycineinfluss gehemmt. Wahrscheinlicher ist jedoch, dass durch hohe Splits (1:10 über das Wochenende) in einer inhomogenen Population an exprimierenden Zellen das Verhältnis von hoch- zu nieder exprimierenden Zellen zu Ungunsten der höher exprimierenden verschoben wurde. Dieses Phänomen des Rezeptorverlustes trat für die später isolierten Einzelklone nicht mehr auf, als die Zellen alle zwei Tage maximal 1:4 passagiert wurden.

5.3 Einfluss der CCR3 Mutationen auf das Bindungsvermögen von Eotaxin 1

Der Einfluss der gewählten Mutationen in der Transmembrandomäne des CCR3 Rezeptors auf das Bindungsvermögen von Eotaxin 1 sollte mittels des SPA-Bindungsassays untersucht werden. Zu diesem Zweck wurden Membranen der transfizierten CHO-Flp-InTM Zellen präpariert und im Bindungsassay eingesetzt. Neben den Membranen wurde der Assay mit ganzen Zellen durchgeführt.

Trotz Variation von verschiedenen Zellzahlen sowie der eingesetzten Membranmenge konnte nur eine geringe spezifische Bindung detektiert werden. Denkbar ist, dass die Zellen bzw. die Rezeptoren auf der Oberfläche bei der Membranpräparation einen nicht genaueren zu definierenden Schaden erlitten haben, was die Bindung der Liganden stark beeinträchtigte. Bei zwei der drei durchgeführten

Membranpräparationen waren die Zellen bereits sehr dicht auf der Platte gewachsen und zum Teil leicht abgerundet. Über den negativen Einfluss des dichten Wachstums auf die Zellen bzw. die Rezeptorexpression kann nur spekuliert werden. Mittels durchflusszytometrischer hCCR3-Detektion konnte keine Beeinträchtigung der Rezeptorexpression *per se* bei bereits sehr dicht wachsenden, abgerundeten Zellen gegenüber flächig adhärent wachsenden festgestellt werden (Daten nicht gezeigt). Um auszuschließen, dass der Rezeptor beschädigt wurde, wie für die Membranpräparation angenommen, wurde der Assay mit ganzen Zellen durchgeführt und diese zudem mit Acutase an Stelle von Trypsin abgenommen. Im Gegensatz zu Trypsin, das die Zellen anverdaut, depletiert Acutase Ca^{2+} und stört damit die Bindung der Zellen an den Zellkulturflaschenboden. Es gilt dadurch als schonenderes Reagens für das Ablösen von Zellen. Um den Ablöseprozess komplett und damit eine potentielle Schädigung des Rezeptors zu umgehen, wurde der SPA-Bindungsassay zudem mit bereits in Platten ausgesäten Zellen durchgeführt. Allerdings führten auch diese Modifikationen nicht zu einer höheren spezifischen Bindung, so dass ziemlich sicher ausgeschlossen werden kann, dass die Rezeptoren beschädigt waren.

Da Dairaghi *et al.* (20) eine Abhängigkeit der Bindung von Liganden an den hCCR3 Rezeptor von pH und der Ionenzusammensetzung des verwendeten Puffers feststellen konnten, sollten verschiedene Pufferzusammensetzungen verglichen werden. Die letztlich gewählte Magnesiumkonzentration von 5 mM ist auch die Standard- Mg^{2+} -Konzentration, die Dairaghi *et al.* (20) verwendeten und bei Euroscreen/PerkinElmer im Assayprotokoll (Handbuch für Assays mit CCR3 transfizierten CHO-K1 Zellen, ES-138-A, PerkinElmer Cellular Sciences, Belgien, 09/2003) zu finden. Dennoch ließ sich mit dem Antagonisten (Substanz 5) unter keiner der getesteten Bedingungen trotz erhöhter unspezifischer Signale eine Verdrängung des eingesetzten ^{125}J -Eotaxin 1 und damit keine Reduktion der spezifischen Bindung erreichen. Dairaghi *et al.* (20) fanden dagegen eine „high affinity condition“ bei pH 7,6 und zusätzlich 120 mM NaCl. Allerdings verwendeten sie transfizierte Y3 Zellen, so dass kein direkter Vergleich gezogen werden kann. Auch Sabroe *et al.* (86) konnten nur eine schwache Konkurrenz ihres CCR3 Antagonisten im Bindungsassay mit transfizierten L1.2 Zellen feststellen, obwohl er potent auf Eosinophilen wirkte und eine Rezeptorinternalisierung inhibieren konnte.

Da auch die Versuche mit den frisch geernteten Zellen (abgenommen mit Trypsin sowie Acutase) keine Verbesserung gegenüber den eingesetzten Membranen brachten, ist anzunehmen, dass die fehlende spezifische Bindung nicht auf das eventuelle Zerstören des Rezeptors zurückzuführen war. Da auch an den nicht transfizierten Zellen eine vermeintliche Bindung gemessen werden konnte, muss es sich bei den detektierten Signalen um unspezifische Signale handeln. Interessant dabei ist, dass Mutante Y113A ein leicht reduziertes Signal gegenüber den anderen getesteten Zellen zeigte. Diese Mutation, hat wie die Internalisierungsdaten unter 4.6.2 zeigen sowie Wise et al. durch reduzierte Chemotaxis sehen konnten (115), Einfluss auf die Bindung der natürlichen Liganden.

Trotz nicht optimaler Pufferbedingungen für die K562 Zellen (normalerweise 25 mM Mg^{2+} und nicht 5 mM wie in diesem Fall) konnte für diese eine spezifische Bindung von circa 50% detektiert werden, was im Rahmen der hier im Labor sonst erreichten spezifischen Bindung liegt (persönliches Gespräch). Dies belegt, dass zum einen die verwendete Zellaufschlussmethode funktioniert und der Bindungsassay an sich korrekt durchgeführt wurde.

Es ist zu vermuten, dass die verwendeten Pufferbedingungen trotz vieler versuchter Varianten für die gewählten transfizierten CHO-Flp-InTM-Zellen nicht die optimalen waren. Möglich ist auch, dass trotz detektierter hCCR3 Expression mittels Durchflusszytometrie, die Rezeptordichte auf der Oberfläche in den zunächst verwendeten transfizierten Mischpopulationen für einen derartigen Assay zu gering war. Um den Einfluss der Rezeptordichte auf die spezifische Bindung zu untersuchen, wurde Y113A als Mutante mit der höchsten hCCR3 Expression mit untersucht. Wie sich im Nachhinein herausstellte, beeinträchtigte diese Mutation die Bindung der natürlich vorkommenden Liganden stark (115), so dass trotz hoher Rezeptorexpression bei der eingesetzten Konzentration an Eotaxin 1 kein Signal hätte entstehen können.

5.4 Bestimmung der funktionellen Aktivität des CCR3 mittels GTP γ S-Assay

Da mittels des SPA-Bindungsassays keine spezifische Bindung des Eotaxins an den CCR3 Rezeptor detektiert werden konnte, sollte die funktionelle Aktivität in einem GTP γ S-Assay getestet werden. Es konnte dabei zwar mit steigender Membranmenge eine Erhöhung der Signale detektiert werden, jedoch konnte dies gleichermaßen für die Pufferkontrolle wie die mit Eotaxin 1 oder einem CCR3-Agonisten stimulierten Membranen festgestellt werden. Daraus kann man schließen, dass es sich ausschließlich um unspezifische Signale handelt und kein spezifischer Austausch von GDP mit radioaktiv markiertem GTP (^{35}S -GTP γ) an der α -Untereinheit der trimeren G-Proteine gemessen wurde. Auch in diesem Assay schienen die gewählten Pufferbedingungen nicht optimal für die verwendeten CHO-Flp-InTM Zellen gewesen zu sein. Denkbare Gründe sind ebenfalls wie unter 5.4 diskutiert eine Zerstörung des Rezeptors bei der Präparation oder eine zu geringe Rezeptordichte auf der Oberfläche. Aus diesem Grund wurde dieser Assay nicht weitergeführt.

Die Testung der natürlichen Liganden von hCCR3 (Eotaxin 1-3, MCP 2-4, RANTES) auf den K562 Membranen ergab ein vergleichbares Ergebnis wie bereits von Wan *et al.* (108) beschrieben (siehe Tabelle 6). Danach stellten Eotaxin 1, Eotaxin 2, MCP 2 und MCP 4 nahezu equipotente, volle Agonisten des CCR3 dar, wohingegen Eotaxin 3, MCP3 und RANTES partielle Agonisten waren. Die verwendeten Liganden waren also alle funktionell aktiv.

5.5 Einfluss der CCR3 Mutationen auf die Rezeptorinternalisierung

Nachdem eine Charakterisierung der CCR3 Mutanten weder mittels SPA-Bindungsassay noch im GTP γ S-Assay möglich war, sollte die ligandeninduzierte Rezeptorinternalisierung untersucht werden. Es wurde die prozentuale Reduktion der Oberflächenexpression nach Stimulation mit Liganden mittels Durchflusszytometrie bestimmt.

5.5.1 Kinetik der Rezeptorinternalisierung

Zunächst sollte ermittelt werden, in welchem Zeitraum nach Stimulation des CCR3 mit Ligand es zu einer Internalisierung des Rezeptors kommt. Zimmermann *et al.* (119) konnten eine Internalisierung des CCR3 Rezeptors auf Eosinophilen bereits 15 min nach Stimulusgabe (in Form von Eotaxin 1) feststellen. In den hier durchgeführten Versuchen konnte das Ergebnis bedingt für die CHO-Flp-InTM-Zellen bestätigt werden. 15 min nach Stimulation mit Eotaxin 1 war bereits ein Großteil der Rezeptoren internalisiert, und es konnte mehrfach noch ein weiterer Rückgang der Rezeptormenge auf der Oberfläche im Zeitraum bis zu einer Stunde nach Stimulusgabe festgestellt werden. Da jedoch kein Unterschied im Bezug auf das Internalisierungsvermögen der getesteten Liganden untereinander bzw. deren Potenz zwischen 30 und 60 minütiger Inkubation festgestellt werden konnte (Daten nicht gezeigt), wurden alle Versuche mit 1h Inkubation durchgeführt, um eine maximale Internalisierung zu erhalten.

5.5.2 Rezeptorinternalisierung durch natürliche Liganden

Nachdem eine Inkubationsdauer von 60 min festgelegt wurde, wurde der Einfluss der Mutationen auf das Internalisierungsverhalten der natürlich vorkommenden CCR3-Liganden charakterisiert. Auf dem WtCCR3 wie auch den vergleichsweise getesteten CHO-K1-CCR3-g α 16 transfizierten Zellen konnte für alle Liganden eine konzentrationsabhängige Rezeptorinternalisierung gezeigt werden. Im Bezug auf die Potenz der einzelnen Liganden konnten die Resultate des GTP γ S-Assays bestätigt werden, auch wenn sich assaybedingt für alle Liganden ein höherer EC50 Wert im Internalisierungassay ergab. Für die getesteten Mutanten ergaben sich dagegen einige Unterschiede im Bezug auf das Internalisierungsvermögen der natürlichen Liganden.

Dieser Befund ist äußerst interessant, da man nach bisherigen Studien davon ausgeht, dass die natürlichen Liganden in erster Linie mit dem N-Terminus des Rezeptors wechselwirken und es in einem zweiten Schritt zur Interaktion mit Bereichen der extrazellulären Loops kommt (63, 65). Basierend auf den vorliegenden Daten kann diese Annahme nun widerlegt bzw. dahingehend erweitert werden, dass an der Wechselwirkung zwischen dem Rezeptor und den natürlichen Liganden auch Aminosäurereste der Transmembrandomäne mit beteiligt sind. Der größte Effekt war

für die Aminosäure Y113A zu verzeichnen. Durch eine Mutation zu Alanin wurde die Wechselwirkung aller Liganden mit dem Rezeptor sehr stark beeinträchtigt, so dass eine nennenswerte Internalisierung ausschließlich für Eotaxin 1 und 2 zu sehen war. Den Einfluss dieses Restes auf eine reduzierte Chemotaxis stimulierter Zellen konnten Wise *et al.* ebenfalls feststellen (115). Bei Y113 handelt es sich um einen in der Chemokinfamilie konservierten Rest. Für CCR5 konnte gezeigt werden, dass der entsprechende Rest (Tyr108) an der Wechselwirkung mit MCP 2 beteiligt ist (36).

Ebenso auffällig waren die Internalisierungsunterschiede für Aminosäurepositionen, die mit je zwei unterschiedlichen Aminosäuren substituiert wurden. Es sind dies H114F und H114A sowie Y291S und Y291F. Die Mutation H114F führte zu einer deutlich höheren Potenz von Eotaxin 1, 2 und MCP 2. Es ist daher zu vermuten, dass die beiden Eotaxine sowie das MCP 2 über den aromatischen Rest des Histidins mit dem Rezeptor wechselwirken. Durch den Austausch gegen ein Phenylalanin (F) wurde diese Wechselwirkung verstärkt. Dies kann einerseits auf eine stärkere Wechselwirkung zwischen Ligand und Rezeptor hindeuten, kann aber auch bedingt durch eine Konformationsveränderung am Rezeptor sein. Da allerdings alle Liganden in ihrer Wirkung beeinträchtigt wurden (höhere EC₅₀ Werte), wenn das Histidin gegen ein Alanin ausgetauscht wurde, scheint H114 wichtig für die Interaktion mit den Liganden zu sein. Anders verhielt es sich für das MCP 4, dessen Interaktion mit dem CCR3 durch den Austausch des Histidins gegen ein Phenylalanin, nicht aber gegen ein Alanin beeinträchtigt wurde.

Noch auffallender war der Unterschied zwischen den Aminosäuren Y291S und Y291F. Phenylalanin ist eine Aminosäure mit ebenfalls aromatischem Seitenrest wie das Tyrosin. Mittels dieser beiden Mutationen (F und S) kann man Aufschluss darüber bekommen, ob die Wechselwirkung von Liganden und Rezeptor über den Aromatenring vermittelt wird, oder aber die im Tyrosin zusätzlich vorhandene OH-Gruppe eine Rolle spielt. Diese kann sowohl in einer direkten Interaktion als auch in einer Stabilisierung einer bestimmten Rezeptorkonformation bestehen. Für die entsprechende Aminosäure im CCR5 Rezeptor, M287, wird beispielsweise eine Beteiligung an einem TM H-Brücken-Netzwerk postuliert (61). Die Substitution mit Serin beeinflusste vor allem die Wechselwirkung von MCP 2 und MCP 4, die nur noch eingeschränkt zur Internalisierung der Rezeptoren führten. Auch die Internalisierung von RANTES wurde durch diese Mutation reduziert. Die beiden

MCPs 2 und 4 wechselwirken nach den vorliegenden Daten vorwiegend mit dem Aromatenring des Tyrosins, da ein Austausch der Aminosäure mit Serin ihr Internalisierungsvermögen stark beeinträchtigte. Im Gegensatz dazu beeinflusste der Austausch mit Phenylalanin (F) vor allem die Potenz des Eotaxin 1 und 2. Daraus folgt, dass an der Wechselwirkung der beiden Eotaxine mit dem Rezeptor die OH-Gruppe des Tyrosins direkt oder indirekt beteiligt ist, beispielsweise durch das Ausbilden einer Wasserstoffbrücke. Interessant ist, dass beide Eotaxine stark beeinträchtigt wurden, obwohl sie strukturell lediglich 39% identisch sind. Gerade im N-terminalen Bereich, der an der Bindung beteiligt ist, differieren sie stark (31). Der beobachtete Unterschied für Eotaxin 2 und MCP 4 könnte damit erklärt werden, dass die beiden Liganden nach Forssmann *et al.* (31) nur 43% in ihrer Aminosäuresequenz übereinstimmen und damit auch strukturell unterschiedlich sein können. Im Gegensatz zu Y291F führte der Austausch der Aminosäure R95 gegen ein Alanin dazu, dass Eotaxin 1 und Eotaxin 2 wiederum potenter als auf dem WtCCR3 eine Internalisierung stimulierten. Denkbar ist, dass die beiden Liganden durch den Wegfall der recht großen Seitenkette des Arginins sich leicht modifiziert in die Bindetasche lagern und dadurch mit anderen, benachbarten Aminosäuren stärker interagieren können.

Die beiden partiellen Agonisten MCP 3 und RANTES wurden am wenigsten von den Mutationen des CCR3 beeinträchtigt. Dies kann unter anderem damit begründet werden, dass beispielsweise MCP 3 im Vergleich zu Eotaxin 1 auf andere Art mit dem Rezeptor wechselwirkt wie Chung *et al.* 2003 (14) über Chimären aus Eotaxin 1 und MCP 3 herausfanden. Für die Bindung von MCP 3 an CCR3 ist nach ihren Ergebnissen ausschließlich der N-Terminus verantwortlich. Demgegenüber nehmen sie an, dass für Eotaxin 1 weitere Bereiche involviert sind. Außerdem ist denkbar, dass sowohl MCP 3 als auch RANTES eine höhere Flexibilität zeigen, wenn es um die Wechselwirkung mit dem Rezeptor geht und dadurch weniger auf die Interaktion mit einzelnen Aminosäuren angewiesen sind. Dies kann damit erklärt werden, dass MCP 3 und RANTES z.B. auch über den CCR1 und CCR2 Rezeptor agieren (33). Dass die Chemokine vor allem im N-terminalen Bereich sowie dem N-Loop hoch flexibel sein können, zeigten beispielsweise Crump *et al.*(18).

Aufgrund von fehlenden Bindungsdaten lässt sich keine Aussage darüber machen, ob die jeweiligen mutierten Aminosäuren die Bindung der Liganden beeinträchtigten

und dadurch keine Internalisierung des Rezeptors möglich war. Der andere Fall wäre, dass die nachgeschaltete Signaltransduktion durch die Mutationen beeinflusst wurde und dadurch eine Internalisierung verhindert wurde. Da für die CCR3-Mutanten unterschiedliche Effekte für die verschiedenen Chemokine beobachtet werden konnten und die Signaltransduktion nach Aktivierung aber vermutlich unabhängig vom Chemokin in gleicher Weise abläuft, legen die hier generierten Daten nahe, dass es sich um eine direkte Wechselwirkung der Liganden mit den entsprechenden Aminosäuren handelt. Um diese wichtige und spannende Frage letztlich zu klären, ist es erstrebenswert, einen weiteren Bindungsassay zu etablieren. Denkbar ist dies mit transfizierten L1.2 Zellen, mit denen bereits erfolgreich Bindungsdaten generiert werden konnten (5, 26). Denkbar ist auch, dass es ausschließlich zu einer Signalweiterleitung, aber zu keiner Internalisierung kam. Diesbezüglich wäre es interessant, die jeweiligen Mutanten in einem weiteren funktionellen Assay wie einem Chemotaxisassay zu testen.

5.5.3 Rezeptorinternalisierung durch Agonisten

Neben natürlichen Liganden des hCCR3 Rezeptors sollten agonistisch wirksame, also hCCR3 aktivierende, Substanzen auf den Mutanten getestet werden. Basierend auf Daten zuvor durchgeführter Assays konnten Substanz 1 und 4 auch im Internalisierungsassay als volle Agonisten des WtCCR3 identifiziert werden. Demgegenüber hatten die Mutationen H114A sowie Y113A einen starken Einfluss auf das Internalisierungsvermögen von Substanz 1. Für H114A war Substanz 1 noch gleich effizient (maximale Internalisierung möglich), aber deutlich weniger potent mit einem $EC_{50} > 1000$ nM. Diese Aminosäure hat also Einfluss auf die Wechselwirkung von Substanz 1 mit dem Rezeptor, nicht aber von Eotaxin 1. Demgegenüber führte der Austausch von Y113 gegen ein Alanin dazu, dass Substanz überhaupt nicht mehr in der Lage war, zu einer Internalisierung des Rezeptors zu führen. Diese beiden Mutationen beeinflussten also die Substanzwechselwirkung stark. Histidin (H) hat ebenso wie Tyrosin (Y) ein aromatisches Ringsystem, was durch die Substitution mit Alanin (A) verloren ging.

Für Substanz 1 ist folglich eine Interaktion mit den aromatischen Ringsystemen von H114 und Y113 unabdingbar. In diesem Zusammenhang ist es schade, dass keine verlässlichen Daten für H114F generiert werden konnten. Es kann nur spekuliert werden, dass H114F demnach keinen Einfluss auf die Wirkung von Substanz 1 hat. Eotaxin 1 war zwar auch auf die Interaktion mit Y113 angewiesen ist, führte aber dennoch in hohen Konzentrationen zu einer partiellen Internalisierung.

Da auf H114F eine sehr starke Datenschwankung bzw. kaum Effekte zu verzeichnen waren, kann für diese Mutation keine verlässliche Aussage getroffen werden. Aufgrund der Tatsache, dass derartig große Schwankungen wiederholt auftraten (siehe auch 4.6.2) kann einerseits vermutet werden, dass diese Mutation starken Einfluss auf die Wechselwirkung der Agonisten nimmt. Denkbar ist auch eine Wechselwirkung des verwendeten Antikörpers mit der betreffenden Aminosäure und dass durch Mutation dessen Bindung an den Rezeptor beeinträchtigt wurde. Dies lässt sich allerdings nicht eindeutig mit den unter 4.6.2 erhaltenen Daten in Einklang bringen. Allerdings handelte es sich dabei um einen anderen Einzelklon als bei dem, der in diesem Assay verwendet wurde. Da der zuerst verwendete, wie unter 4.3 beschrieben, seine Expression im Laufe der Zeit verloren hat und auch nach erneutem Auftauen der Zellen keine hohe Expression mehr zu verzeichnen war, wurde für weitere Experimente ein anderer Einzelklon verwendet. Theoretisch sollte dies allerdings keinen Unterschied machen, was bei allen übrigen Mutanten auch nicht festgestellt werden konnte.

Neben der sehr potenten agonistischen Substanz 1 wurden die nicht eindeutig als Agonisten oder Antagonisten charakterisierten Substanzen 2 und 3 ebenfalls auf ihr Internalisierungsverhalten auf den CCR3 Mutanten untersucht. Bei diesen beiden Substanzen galt die spannende Frage zu klären, ob eine der gewählten Mutationen ihre Wirkung auf CCR3 stark zum Agonismus oder Antagonismus verändert. Ein derartig drastischer Effekt konnte allerdings nicht beobachtet werden. Basierend auf den hier gewonnenen Daten muss man davon ausgehen, dass es sich bei den Substanzen 2 und 3 nicht um volle Agonisten, sondern sogar eher um Antagonisten handelt und dass diese Eigenschaft nicht durch eine der Mutationen verändert wird.

Für den Wt, bedingt für H114F, Y41A, R95A, Y113A sowie für die CHO-hCCR3- α 16 Zellen konnte gezeigt werden, dass die Substanzen zu einer leichten Erhöhung der Rezeptorexpression auf der Oberfläche führten. Man kann daraus folgern, dass die Substanzen zwar an den Rezeptor binden konnten, es jedoch zu keiner weiteren Aktivierungskaskade kam. Normalerweise herrscht ein stetiger basaler Umsatz des Rezeptors, d.h. ein gewisser Prozentsatz der Rezeptoren wird internalisiert und wieder an die Oberfläche gebracht. Denkbar ist, dass die Rezeptoren nach Binden der genannten Substanzen auf der Oberfläche fixiert und damit nicht mehr endozytiert wurden, wohl aber intrazellulär vorhandene Rezeptoren weiter an die Oberfläche gelangten.

Auffallend beim Betrachten der Konzentrations-Wirkungskurven war jedoch, dass für die Mutationen H114A, Y291S und Y291F und R95A eine leichte Reduktion der Oberflächenexpression nach Stimulation mit 10 μ M Substanz 2 erreicht werden konnte. Man kann also davon ausgehen, dass die 4 genannten Mutationen in der TM-Region dazu führen, dass Substanz 2 etwas besser mit dem Rezeptor interagieren kann als mit dem WtCCR3. Denkbar ist, dass der einfach geladene basische Stickstoff im Arginin einen Einfluss auf die Wechselwirkung hat. Es soll an dieser Stelle allerdings nicht weiter über den Einfluss von R95 spekuliert werden, da die Rolle dieser Aminosäure weiterhin sehr unklar ist. Denn es ist darüber hinaus möglich, dass R95 an der Stabilisierung der ECL Bereiche beteiligt ist und dadurch indirekt Einfluss auf die Ligandenwechselwirkung nimmt. Da der Austausch des Tyrosins 291 gegen ein Phenylalanin (mit ebenfalls aromatischer Seitenkette) keinen negativen Einfluss auf das Internalisierungsvermögen von Substanz 2 im Vergleich zu Y291S hatte, scheint diese Aminosäure des CCR3 für die Wechselwirkung mit Substanz 2 nicht relevant zu sein. Interessant wäre jetzt zu untersuchen, inwieweit die Substanz 2 und Substanz 3 in der Lage sind, eine Eotaxin-induzierte Rezeptorinternalisierung zu inhibieren.

5.5.4 Inhibition der Rezeptorinternalisierung durch Antagonisten

Mit dem Ziel die Rezeptor-Antagonisten-Wechselwirkung besser verstehen zu können, sollte der Einfluss der mutierten Aminosäuren auf die Potenz ausgewählter antagonistisch wirkender Substanzen überprüft werden. Vier strukturell unterschiedliche, als potente CCR3 Inhibitoren charakterisierte Substanzen, sollten im Internalisierungsassay getestet und auf ihr Vermögen, eine Eotaxin-induzierte Rezeptorinternalisierung zu inhibieren, untersucht werden. Substanz 5, Substanz 6 sowie Substanz 7 konnten trotz ihrer unterschiedlichen Strukturen auf allen Mutanten inklusive dem WtCCR3 nahezu equipotent eine Eotaxin 1 vermittelte Internalisierung blocken. Daraus lässt sich ableiten, dass keine der gewählten Aminosäuren ausschließlich entscheidenden Einfluss auf eine Rezeptor-Antagonisten-Interaktion hat.

Die Potenz von Substanz 5 und Substanz 7 wurde durch die Mutationen Y41A und R95A gesteigert. Es kann spekuliert werden, dass durch das Alanin diese beiden Substanzen besser mit anderen benachbarten Resten interagieren konnten, da die relativ großen Aminosäurereste des Arginins sowie der Aromat des Tyrosins nicht mehr vorhanden waren. Substanz 6 blieb in ihrer Wirkung dagegen von diesem Austausch unbeeinflusst und scheint daher nicht auf eine Wechselwirkung mit dem im Tyrosin vorhandenen Aromaten angewiesen zu sein.

Für die Wechselwirkung von Substanz 5 mit dem Rezeptor ist anhand der erhaltenen Daten der aromatische Rest der Aminosäure Y113A notwendig, da ein deutlicher Verlust der Potenz im Vergleich zu den anderen Antagonisten zu verzeichnen war. Problematisch für diese Mutante war, dass die Zellen mit unverhältnismäßig viel Eotaxin 1 (300 nM) stimuliert werden mussten, um überhaupt ein geringes Fenster der Internalisierung zu erhalten. Dass für Y113A als einzige der Mutanten nicht das volle Internalisierungsfenster inhibiert werden konnte, kann auf die hohe Menge an Eotaxin zurückzuführen sein. Zudem ist es nicht gelungen, dieses Experiment trotz zweimaliger Wiederholung zu reproduzieren, weil keine verlässliche Internalisierung mit Eotaxin in diesen Versuchen möglich war. Vaidehi *et al.* konnten für den CCR1 Rezeptor jedoch auch zeigen, dass Y113A (nicht aber Y113F) sowohl die Bindung des natürlichen Liganden als auch des Antagonisten Bx 471 negativ beeinflussten (104). Des Weiteren wurde durch die Mutationen Y113A sowie Y41A und Y291A eine

durch Bx 471 unterdrückte Chemotaxis aufgehoben. Vergleicht man deren Ergebnisse mit den hier beobachteten Effekten, scheint der Einfluss von Y113A auf die Wirkung von Substanz 5 durchaus trotz mangelnder Reproduzierbarkeit glaubwürdig.

Der stärkste Einfluss auf die Potenz aller getesteten Antagonisten war für Y291S zu beobachten. Daraus kann man schließen, dass diese Aminosäure essentiell für die Wechselwirkung von Antagonisten mit dem CCR3 ist. Der konservative Austausch des Tyrosins gegen ein Phenylalanin an dieser Stelle beeinträchtigte die Potenz aller Antagonisten ebenfalls, allerdings weniger stark als der Austausch gegen ein Serin. Daraus folgt, dass alle Substanzen zu einem gewissen Grad mit der OH-Gruppe des Tyrosins wechselwirken, allerdings das Vorhandensein eines aromatischen Ringsystems unerlässlich für die Antagonistenwirkung ist. Auch in diesem Bereich ist alternativ eine Beteiligung der OH-Gruppe des Tyrosins an einem TM H-Brücken-Netzwerk denkbar (siehe oben, (61)). Unglücklich in diesem Zusammenhang ist, dass für die Mutation H114F keine verlässlichen Daten generiert werden konnten. Für die Aminosäure H114 gab es ebenso wie für Y291 zwei unterschiedliche Aminosäureaustausche. Mit Phenylalanin (F) wurde Histidin (H) konservativ ausgetauscht, indem das Ringsystem erhalten blieb. Durch den Austausch mit Alanin ging dieser verloren.

Durch diese Untersuchungen konnte gezeigt werden, dass die Substanzen 5, 6 und 7 zwar über die gleichen Aminosäuren des CCR3 wechselwirken, die Wirkung der drei getesteten Substanzen jedoch je nach Mutation unterschiedlich moduliert wurde. Aus den Ergebnissen ergibt sich, dass fast alle untersuchten Mutationen des CCR3 zu einer veränderten Wechselwirkung der Antagonisten mit dem Rezeptor führen. Interessant dabei war, dass einige Aminosäuren zur Aktivitätserhöhung (Y41A, R95A) oder Aktivitätsreduktion (Y291F und Y291S) aller Substanzen beitrugen. Dagegen hatten andere Aminosäureaustausche (H114F und Y113A) unterschiedlichen Einfluss auf die Wechselwirkung des Rezeptors mit den Substanzen. Bei der Mutation Y113A verlor Substanz 5 an Potenz, wohingegen Substanz 6 sowie Substanz 7 effektiver wirkten.

Der markanteste Effekt in der Reduktion der Potenz der Antagonisten sei an dieser Stelle noch einmal besonders betont. Es ist dies der Wirkungsunterschied der Antagonisten zwischen den CCR3 Mutationen Y291F und Y291S. Während auf den mit Y291F transfizierten Zellen eine effektive Inhibition der Eotaxin-induzierten Internalisierung möglich war, waren die Antagonisten auf Mutation Y291S lediglich in der Lage, in sehr hohen Konzentrationen einer Internalisierung entgegen zu wirken. Der vorhandene Aromatenring im Tyrosin (Y) sowie im Phenylalanin (F) scheint also verantwortlich für die Antagonisteninteraktion zu sein. Wurde der Aromat mit einer SH Gruppe, wie in der Aminosäure Serin (S) vorhanden ist, ausgetauscht, ist die Interaktion stark beeinträchtigt.

Wie bereits oben erwähnt, konnten Vaidehi *et al.* zeigen, dass auch die Substitution des Tyrosins 291 mit einem Alanin am CCR1 zu stark reduzierter Chemotaxis führte. Sowohl für den CCR1 als auch den CCR3 Rezeptor ist Aminosäure Y291 also unablässig für die Interaktion mit Antagonisten wie auch aktivierenden Liganden. Diese Beobachtung untermauert die relativ hohe Strukturhomologie des CCR1 und CCR3 Rezeptors (54).

Die aus vorausgehenden Assays als ebenso potenter Antagonist charakterisierte Substanz 8 fiel völlig aus dem Rahmen. Schon auf dem WtCCR3 war sie nur zu einer schwachen Inhibition der Eotaxin-induzierten Internalisierung fähig. Lediglich eine Substitution mit Alanin für die Reste R95, Y41 und Y113 führte zu einer leichten Steigerung des Inhibitionsvermögens im Vergleich zum WtCCR3. Es könnte sein, dass Substanz 8 folglich in seiner Wechselwirkung mit dem Rezeptor durch die Reste des Arginins und Tyrosins gehindert wurde. Die Beobachtungen legen nahe, dass Substanz 8 im Gegensatz zu den anderen 3 getesteten Antagonisten einen anderen Wirkmechanismus zur Blockade des CCR3 besitzt.

5.5.5 Rezeptorinternalisierung durch Antagonisten

Aufgrund der Tatsache, dass Substanz 8 eine Eotaxin vermittelte Rezeptorinternalisierung nicht effizient inhibieren konnte, sollte untersucht werden, ob die verwendeten Antagonisten *per se* in der Lage sind, den Rezeptor zu internalisieren. Im Gegensatz zu den 3 anderen getesteten Antagonisten, führte Substanz 8 selbst zu einer CCR3-Internalisierung, jedoch zu keiner nachgeschalteten Aktivierungskaskade. Damit lässt sich die beobachtete verminderte Potenz, eine Eotaxin vermittelte Internalisierung zu inhibieren, erklären. Eine ähnliche Beobachtung machten Mack *et al.*(60). Durch AOP-RANTES (aminooxypentane RANTES) konnten sie eine Internalisierung des CCR5 Rezeptors feststellen. Ein darauf folgender Recyclingprozess des Rezeptors konnte jedoch nicht nachgewiesen werden. Zu vermuten ist, dass man gerade in hohen Konzentrationen zwei sich überlagernde Effekte für Substanz 8 hatte. Zum einen das Inhibitionsvermögen des CCR3 Rezeptors durch Substanz 8, und zum anderen die durch sie verursachte Rezeptorinternalisierung. In diesem Zusammenhang ist es nun interessant, weitere Antagonisten auf ihr Internalisierungsvermögen zu untersuchen, um herauszufinden, ob es sich bei dem beobachteten Phänomen um ein strukturklassenspezifisches handelt.

Basierend auf den hier gewonnenen Daten ist zu vermuten, dass natürliche Liganden wie auch agonistisch sowie antagonistisch wirkende Moleküle zwar in ihrer Wechselwirkung mit dem Rezeptor überlappende Strukturbereiche/Aminosäuren haben, jedoch prinzipiell über verschiedene Weisen interagieren. Dies bekräftigt eine Untersuchung von Sabroe *et al.* (86) mit ihrem CCR1/CCR3 Antagonisten UCB 35625. Sie konnten beobachten, dass ihr Antagonist zwar potent einen Eotaxin-induzierten „Shape Change“ von Eosinophilen sowie eine Rezeptorinternalisierung unterbinden konnte, jedoch nur sehr schwach in der Lage war, mit Eotaxin um die Bindung an die Rezeptoren zu kompetieren. Daraus folgerten sie, dass die Aminosäuren/Rezeptorbereiche für die Wechselwirkung von natürlichem Liganden und Antagonisten mit dem Rezeptor nur teilweise überlappen. Auch Saita *et al.* (88) konnten nachweisen, dass ihr identifizierter und charakterisierter CCR5 Antagonist (YM-370749) mit Aminosäuren in den TMD III, V, VI und VII wechselwirkt, und damit in erster Linie nicht mit den Interaktionsstellen von RANTES überlappt.

Der Grat zwischen Agonismus und Antagonismus ist oft sehr schmal, wie beispielsweise Anderskewitz *et al.* (3) herausfanden. Bereits die Modifikation bzw. Austausch einer oder zweier Seitengruppen (z.B. von NH) oder einzelner Atome (Cl→Br) kann die Aktivität eines Moleküls verändern und es von einem Agonisten zu einem Antagonisten konvertieren. Des Weiteren wurde berichtet, dass in Studien mit dem Ziel, Rezeptorantagonisten für den CCR5, CCR8 sowie den CXCR3 Rezeptor zu entwickeln, vorrangig agonistisch wirkende Substanzen generiert wurden (88, 97). Einen sehr guten Überblick über den aktuellen Stand auf dem Gebiet der Entwicklung von Chemokinrezeptorantagonisten gibt der Artikel von Wise und Pease 2007 (114).

Die Tatsache, dass einzelne Punktmutationen sowohl Agonisten als auch Antagonisten beeinflussen können, zeigt wie ähnlich deren Wechselwirkung mit dem Rezeptor ist und ist ein Hinweis darauf, dass die Bindetaschen überlappen. Dies wiederum bietet aber auch die Möglichkeit, durch leichte strukturelle Modifikation eines agonistisch wirkenden Moleküls dieses in einen Antagonisten umzuwandeln und erhöht damit das Potential, auf dem Gebiet der CCR3 Antagonisten für die Asthmatherapie eines Tages große Erfolge zu erzielen.

6 Literatur

1. **Allen, D. B.** 1996. Growth suppression by glucocorticoid therapy. *Endocrinol Metab Clin North Am* **25**:699-717.
2. **Alouani, S.** 2000. Scintillation proximity binding assay. *Methods Mol Biol* **138**:135-41.
3. **Anderskewitz, R., R. Bauer, G. Bodenbach, D. Gester, B. Gramlich, G. Morschhauser, and F. W. Birke.** 2005. Pyrrolidinohydroquinazolines--a novel class of CCR3 modulators. *Bioorg Med Chem Lett* **15**:669-73.
4. **Arias, D. A., J. M. Navenot, W. B. Zhang, J. Broach, and S. C. Peiper.** 2003. Constitutive activation of CCR5 and CCR2 induced by conformational changes in the conserved TXP motif in transmembrane helix 2. *J Biol Chem* **278**:36513-21.
5. **Auger, G. A., J. E. Pease, X. Shen, G. Xanthou, and M. D. Barker.** 2002. Alanine scanning mutagenesis of CCR3 reveals that the three intracellular loops are essential for functional receptor expression. *Eur J Immunol* **32**:1052-8.
6. **Berkhout, T. A., F. E. Blaney, A. M. Bridges, D. G. Cooper, I. T. Forbes, A. D. Gribble, P. H. Groot, A. Hardy, R. J. Ife, R. Kaur, K. E. Moores, H. Shillito, J. Willetts, and J. Witherington.** 2003. CCR2: characterization of the antagonist binding site from a combined receptor modeling/mutagenesis approach. *J Med Chem* **46**:4070-86.
7. **Bernier, G.** 2004, posting date.
<http://www3.sympatico.ca/alexandre.blanchette/systimm.htm>. [Online.]
8. **Blaszczyk, J., E. V. Coillie, P. Proost, J. V. Damme, G. Opdenakker, G. D. Bujacz, J. M. Wang, and X. Ji.** 2000. Complete crystal structure of monocyte chemotactic protein-2, a CC chemokine that interacts with multiple receptors. *Biochemistry* **39**:14075-81.
9. **Braman, S. S.** 2006. The global burden of asthma. *Chest* **130**:4S-12S.
10. **Busse, W. W., and R. F. Lemanske, Jr.** 2001. Asthma. *N Engl J Med* **344**:350-62.
11. **Campbell, N. A.** 2003. *Biologie*. Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg-Berlin.
12. **Casarosa, P., M. Waldhoer, P. J. LiWang, H. F. Vischer, T. Kledal, H. Timmerman, T. W. Schwartz, M. J. Smit, and R. Leurs.** 2005. CC and CX3C chemokines differentially interact with the N terminus of the human cytomegalovirus-encoded US28 receptor. *J Biol Chem* **280**:3275-85.
13. **Charo, I. F., and M. B. Taubman.** 2004. Chemokines in the pathogenesis of vascular disease. *Circ Res* **95**:858-66.
14. **Chung, I. Y., Y. H. Kim, M. K. Choi, Y. J. Noh, C. S. Park, D. Y. Kwon, D. Y. Lee, Y. S. Lee, H. S. Chang, and K. S. Kim.** 2004. Eotaxin and monocyte chemotactic protein-3 use different modes of action. *Biochem Biophys Res Commun* **314**:646-53.
15. **Claing, A., S. A. Laporte, M. G. Caron, and R. J. Lefkowitz.** 2002. Endocytosis of G protein-coupled receptors: roles of G protein-coupled receptor kinases and beta-arrestin proteins. *Prog Neurobiol* **66**:61-79.

16. **Cookson, W.** 1999. The alliance of genes and environment in asthma and allergy. *Nature* **402**:B5-11.
17. **Crump, M. P., K. Rajarathnam, K. S. Kim, I. Clark-Lewis, and B. D. Sykes.** 1998. Solution structure of eotaxin, a chemokine that selectively recruits eosinophils in allergic inflammation. *J Biol Chem* **273**:22471-9.
18. **Crump, M. P., L. Spyropoulos, P. Lavigne, K. S. Kim, I. Clark-Lewis, and B. D. Sykes.** 1999. Backbone dynamics of the human CC chemokine eotaxin: fast motions, slow motions, and implications for receptor binding. *Protein Sci* **8**:2041-54.
19. **Dahinden, C. A., T. Geiser, T. Brunner, V. von Tscharner, D. Caput, P. Ferrara, A. Minty, and M. Baggiolini.** 1994. Monocyte chemotactic protein 3 is a most effective basophil- and eosinophil-activating chemokine. *J Exp Med* **179**:751-6.
20. **Dairaghi, D. J., E. R. Oldham, K. B. Bacon, and T. J. Schall.** 1997. Chemokine receptor CCR3 function is highly dependent on local pH and ionic strength. *J Biol Chem* **272**:28206-9.
21. **Dean, P. N., R. A. Hoffmann, and c. J. Wiley.** 2007. Overview of Flow Cytometry Instrumentation, *Current Protocols in Cytometry*.
22. **Doranz, B. J., K. Grovit-Ferbas, M. P. Sharron, S. H. Mao, M. B. Goetz, E. S. Daar, R. W. Doms, and W. A. O'Brien.** 1997. A small-molecule inhibitor directed against the chemokine receptor CXCR4 prevents its use as an HIV-1 coreceptor. *J Exp Med* **186**:1395-400.
23. **Dorr, P., M. Westby, S. Dobbs, P. Griffin, B. Irvine, M. Macartney, J. Mori, G. Rickett, C. Smith-Burchnell, C. Napier, R. Webster, D. Armour, D. Price, B. Stammen, A. Wood, and M. Perros.** 2005. Maraviroc (UK-427,857), a potent, orally bioavailable, and selective small-molecule inhibitor of chemokine receptor CCR5 with broad-spectrum anti-human immunodeficiency virus type 1 activity. *Antimicrob Agents Chemother* **49**:4721-32.
24. **Drake, M. T., S. K. Shenoy, and R. J. Lefkowitz.** 2006. Trafficking of G protein-coupled receptors. *Circ Res* **99**:570-82.
25. **Drews, J.** 2000. Drug discovery: a historical perspective. *Science* **287**:1960-4.
26. **Duchesnes, C. E., P. M. Murphy, T. J. Williams, and J. E. Pease.** 2006. Alanine scanning mutagenesis of the chemokine receptor CCR3 reveals distinct extracellular residues involved in recognition of the eotaxin family of chemokines. *Mol Immunol* **43**:1221-31.
27. **Eder, W., M. J. Ege, and E. von Mutius.** 2006. The asthma epidemic. *N Engl J Med* **355**:2226-35.
28. **Erin, E. M., T. J. Williams, P. J. Barnes, and T. T. Hansel.** 2002. Eotaxin receptor (CCR3) antagonism in asthma and allergic disease. *Curr Drug Targets Inflamm Allergy* **1**:201-14.
29. **(ERS), E. R. S. a. t. E. L. F.** 2003. European Lung White Book, Brussels.
30. **Fadel, H., and Z. Temesgen.** 2007. Maraviroc. *Drugs Today (Barc)* **43**:749-58.

31. **Forssmann, U., M. Uguccioni, P. Loetscher, C. A. Dahinden, H. Langen, M. Thelen, and M. Baggiolini.** 1997. Eotaxin-2, a novel CC chemokine that is selective for the chemokine receptor CCR3, and acts like eotaxin on human eosinophil and basophil leukocytes. *J Exp Med* **185**:2171-6.
32. **Forsythe, P., and A. D. Befus.** 2003. CCR3: a key to mast cell phenotypic and functional diversity? *Am J Respir Cell Mol Biol* **28**:405-9.
33. **Garcia-Zepeda, E. A., M. E. Rothenberg, R. T. Ownbey, J. Celestin, P. Leder, and A. D. Luster.** 1996. Human eotaxin is a specific chemoattractant for eosinophil cells and provides a new mechanism to explain tissue eosinophilia. *Nat Med* **2**:449-56.
34. **Gavrilin, M. A., I. V. Gulina, T. Kawano, S. Dragan, L. Chakravarti, and P. E. Kolattukudy.** 2005. Site-directed mutagenesis of CCR2 identified amino acid residues in transmembrane helices 1, 2, and 7 important for MCP-1 binding and biological functions. *Biochem Biophys Res Commun* **327**:533-40.
35. **Gong, J. H., M. Uguccioni, B. Dewald, M. Baggiolini, and I. Clark-Lewis.** 1996. RANTES and MCP-3 antagonists bind multiple chemokine receptors. *J Biol Chem* **271**:10521-7.
36. **Govaerts, C., A. Bondue, J. Y. Springael, M. Olivella, X. Deupi, E. Le Poul, S. J. Wodak, M. Parmentier, L. Pardo, and C. Blanpain.** 2003. Activation of CCR5 by chemokines involves an aromatic cluster between transmembrane helices 2 and 3. *J Biol Chem* **278**:1892-903.
37. **Greening, A. P., P. W. Ind, M. Northfield, and G. Shaw.** 1994. Added salmeterol versus higher-dose corticosteroid in asthma patients with symptoms on existing inhaled corticosteroid. Allen & Hanburys Limited UK Study Group. *Lancet* **344**:219-24.
38. **Grimaldi, J. C., N. X. Yu, G. Grunig, B. W. Seymour, F. Cottrez, D. S. Robinson, N. Hosken, W. G. Ferlin, X. Wu, H. Soto, A. O'Garra, M. C. Howard, and R. L. Coffman.** 1999. Depletion of eosinophils in mice through the use of antibodies specific for C-C chemokine receptor 3 (CCR3). *J Leukoc Biol* **65**:846-53.
39. **Haasen, D., S. Merk, P. Seither, D. Martyres, S. Hobbie, and R. Heilker.** 2008. Pharmacological profiling of chemokine receptor-directed compounds using high-content screening. *J Biomol Screen* **13**:40-53.
40. **Haasen, D., A. Schnapp, M. J. Valler, and R. Heilker.** 2006. G protein-coupled receptor internalization assays in the high-content screening format. *Methods Enzymol* **414**:121-39.
41. **Hamid, Q. A., and E. M. Minshall.** 2000. Molecular pathology of allergic disease: I: lower airway disease. *J Allergy Clin Immunol* **105**:20-36.
42. **Harrison, C., and J. R. Traynor.** 2003. The [³⁵S]GTPγS binding assay: approaches and applications in pharmacology. *Life Sci* **74**:489-508.
43. **Heath, H., S. Qin, P. Rao, L. Wu, G. LaRosa, N. Kassam, P. D. Ponath, and C. R. Mackay.** 1997. Chemokine receptor usage by human eosinophils. The importance of CCR3 demonstrated using an antagonistic monoclonal antibody. *J Clin Invest* **99**:178-84.
44. **Heilker, R.** 2006. High content screening to monitor G protein-coupled receptor internalisation. *Ernst Schering Found Symp Proc* **2**:229-47.

45. **Heilker, R., U. Manning-Krieg, J. F. Zuber, and M. Spiess.** 1996. In vitro binding of clathrin adaptors to sorting signals correlates with endocytosis and basolateral sorting. *Embo J* **15**:2893-9.
46. **Hemmerich, S., C. Paavola, A. Bloom, S. Bhakta, R. Freedman, D. Grunberger, J. Krstenansky, S. Lee, D. McCarley, M. Mulkins, B. Wong, J. Pease, L. Mizoue, T. Mirzadegan, I. Polsky, K. Thompson, T. M. Handel, and K. Jarnagin.** 1999. Identification of residues in the monocyte chemotactic protein-1 that contact the MCP-1 receptor, CCR2. *Biochemistry* **38**:13013-25.
47. **Ho, P. T., B. E. Teal, and T. M. Ross.** 2004. Multiple residues in the extracellular domains of CCR3 are critical for coreceptor activity. *Virology* **329**:109-18.
48. **Invitrogen.** Flp-In T-REx Core Kit For generating stable, inducible mammalian expression cell lines by Flp-recombinase-mediated integration, Version C, Katalog Nr: K6500-01.
49. **Invitrogen.** pOG44 Flp-recombinase expression vector designed for use with the Flp-In System, Version B, Katalog Nr: V60005-20.
50. **Ji, T. H., M. Grossmann, and I. Ji.** 1998. G protein-coupled receptors. I. Diversity of receptor-ligand interactions. *J Biol Chem* **273**:17299-302.
51. **Jose, P. J., D. A. Griffiths-Johnson, P. D. Collins, D. T. Walsh, R. Moqbel, N. F. Totty, O. Truong, J. J. Hsuan, and T. J. Williams.** 1994. Eotaxin: a potent eosinophil chemoattractant cytokine detected in a guinea pig model of allergic airways inflammation. *J Exp Med* **179**:881-7.
52. **Kraft, K., H. Olbrich, I. Majoul, M. Mack, A. Proudfoot, and M. Oppermann.** 2001. Characterization of sequence determinants within the carboxyl-terminal domain of chemokine receptor CCR5 that regulate signaling and receptor internalization. *J Biol Chem* **276**:34408-18.
53. **Kunkel, S. L., and N. Godessart.** 2002. Chemokines in autoimmunity: from pathology to therapeutics. *Autoimmun Rev* **1**:313-20.
54. **Lio, P., and M. Vannucci.** 2003. Investigating the evolution and structure of chemokine receptors. *Gene* **317**:29-37.
55. **Lodish, H., Berk A. et al.** 2001. *Molekulare Zellbiologie.* Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg-Berlin.
56. **Loetscher, P., A. Pellegrino, J. H. Gong, I. Mattioli, M. Loetscher, G. Bardi, M. Baggiolini, and I. Clark-Lewis.** 2001. The ligands of CXC chemokine receptor 3, I-TAC, Mig, and IP10, are natural antagonists for CCR3. *J Biol Chem* **276**:2986-91.
57. **Loetscher, P., M. Seitz, I. Clark-Lewis, M. Baggiolini, and B. Moser.** 1994. Monocyte chemotactic proteins MCP-1, MCP-2, and MCP-3 are major attractants for human CD4⁺ and CD8⁺ T lymphocytes. *Faseb J* **8**:1055-60.
58. **Luster, A. D.** 1998. Chemokines--chemotactic cytokines that mediate inflammation. *N Engl J Med* **338**:436-45.
59. **Ma, W., P. J. Bryce, A. A. Humbles, D. Laouini, A. Yalcindag, H. Alenius, D. S. Friend, H. C. Oettgen, C. Gerard, and R. S. Geha.** 2002. CCR3 is essential for skin eosinophilia and airway hyperresponsiveness in a murine model of allergic skin inflammation. *J Clin Invest* **109**:621-8.

60. **Mack, M., B. Luckow, P. J. Nelson, J. Cihak, G. Simmons, P. R. Clapham, N. Signoret, M. Marsh, M. Stangassinger, F. Borlat, T. N. Wells, D. Schlondorff, and A. E. Proudfoot.** 1998. Aminooxypentane-RANTES induces CCR5 internalization but inhibits recycling: a novel inhibitory mechanism of HIV infectivity. *J Exp Med* **187**:1215-24.
61. **Maeda, K., D. Das, H. Ogata-Aoki, H. Nakata, T. Miyakawa, Y. Tojo, R. Norman, Y. Takaoka, J. Ding, G. F. Arnold, E. Arnold, and H. Mitsuya.** 2006. Structural and molecular interactions of CCR5 inhibitors with CCR5. *J Biol Chem* **281**:12688-98.
62. **Mattoli, S., M. A. Stacey, G. Sun, A. Bellini, and M. Marini.** 1997. Eotaxin expression and eosinophilic inflammation in asthma. *Biochem Biophys Res Commun* **236**:299-301.
63. **Mayer, M. R., and M. J. Stone.** 2001. Identification of receptor binding and activation determinants in the N-terminal and N-loop regions of the CC chemokine eotaxin. *J Biol Chem* **276**:13911-6.
64. **Menzies-Gow, A., S. Ying, I. Sabroe, V. L. Stubbs, D. Soler, T. J. Williams, and A. B. Kay.** 2002. Eotaxin (CCL11) and eotaxin-2 (CCL24) induce recruitment of eosinophils, basophils, neutrophils, and macrophages as well as features of early- and late-phase allergic reactions following cutaneous injection in human atopic and nonatopic volunteers. *J Immunol* **169**:2712-8.
65. **Montecclaro, F. S., and I. F. Charo.** 1996. The amino-terminal extracellular domain of the MCP-1 receptor, but not the RANTES/MIP-1alpha receptor, confers chemokine selectivity. Evidence for a two-step mechanism for MCP-1 receptor activation. *J Biol Chem* **271**:19084-92.
66. **Morokata, T., K. Suzuki, Y. Masunaga, K. Taguchi, K. Morihira, I. Sato, M. Fujii, S. Takizawa, Y. Torii, N. Yamamoto, M. Kaneko, T. Yamada, K. Takahashi, and Y. Shimizu.** 2006. A novel, selective, and orally available antagonist for CC chemokine receptor 3. *J Pharmacol Exp Ther* **317**:244-50.
67. **Moser, B., B. Dewald, L. Barella, C. Schumacher, M. Baggiolini, and I. Clark-Lewis.** 1993. Interleukin-8 antagonists generated by N-terminal modification. *J Biol Chem* **268**:7125-8.
68. **Murakami, T., T. Nakajima, Y. Koyanagi, K. Tachibana, N. Fujii, H. Tamamura, N. Yoshida, M. Waki, A. Matsumoto, O. Yoshie, T. Kishimoto, N. Yamamoto, and T. Nagasawa.** 1997. A small molecule CXCR4 inhibitor that blocks T cell line-tropic HIV-1 infection. *J Exp Med* **186**:1389-93.
69. **Neel, N. F., E. Schutyser, J. Sai, G. H. Fan, and A. Richmond.** 2005. Chemokine receptor internalization and intracellular trafficking. *Cytokine Growth Factor Rev* **16**:637-58.
70. **Nelson, N.** 1987. A novel method for the detection of receptors and membrane proteins by scintillation proximity radioassay. *Anal Biochem* **165**:287-93.
71. **New, D. C., and Y. H. Wong.** 2003. CC chemokine receptor-coupled signalling pathways. *Sheng Wu Hua Xue Yu Sheng Wu Wu Li Xue Bao (Shanghai)* **35**:779-88.
72. **Nickel, R., L. A. Beck, C. Stellato, and R. P. Schleimer.** 1999. Chemokines and allergic disease. *J Allergy Clin Immunol* **104**:723-42.

73. **Ogilvie, P., G. Bardi, I. Clark-Lewis, M. Baggiolini, and M. Uguccioni.** 2001. Eotaxin is a natural antagonist for CCR2 and an agonist for CCR5. *Blood* **97**:1920-4.
74. **Osmond, R. I., A. Sheehan, R. Borowicz, E. Barnett, G. Harvey, C. Turner, A. Brown, M. F. Crouch, and A. R. Dyer.** 2005. GPCR screening via ERK 1/2: a novel platform for screening G protein-coupled receptors. *J Biomol Screen* **10**:730-7.
75. **Palczewski, K., T. Kumasaka, T. Hori, C. A. Behnke, H. Motoshima, B. A. Fox, I. Le Trong, D. C. Teller, T. Okada, R. E. Stenkamp, M. Yamamoto, and M. Miyano.** 2000. Crystal structure of rhodopsin: A G protein-coupled receptor. *Science* **289**:739-45.
76. **Pauwels, R. A., C. G. Lofdahl, D. S. Postma, A. E. Tattersfield, P. O'Byrne, P. J. Barnes, and A. Ullman.** 1997. Effect of inhaled formoterol and budesonide on exacerbations of asthma. Formoterol and Corticosteroids Establishing Therapy (FACET) International Study Group. *N Engl J Med* **337**:1405-11.
77. **Pease, J. E., J. Wang, P. D. Ponath, and P. M. Murphy.** 1998. The N-terminal extracellular segments of the chemokine receptors CCR1 and CCR3 are determinants for MIP-1alpha and eotaxin binding, respectively, but a second domain is essential for efficient receptor activation. *J Biol Chem* **273**:19972-6.
78. **Ponath, P. D., S. Qin, D. J. Ringler, I. Clark-Lewis, J. Wang, N. Kassam, H. Smith, X. Shi, J. A. Gonzalo, W. Newman, J. C. Gutierrez-Ramos, and C. R. Mackay.** 1996. Cloning of the human eosinophil chemoattractant, eotaxin. Expression, receptor binding, and functional properties suggest a mechanism for the selective recruitment of eosinophils. *J Clin Invest* **97**:604-12.
79. **Preininger, A. M., and H. E. Hamm.** 2004. G protein signaling: insights from new structures. *Sci STKE* **2004**:re3.
80. **Price, K. S., D. S. Friend, E. A. Mellor, N. De Jesus, G. F. Watts, and J. A. Boyce.** 2003. CC chemokine receptor 3 mobilizes to the surface of human mast cells and potentiates immunoglobulin E-dependent generation of interleukin 13. *Am J Respir Cell Mol Biol* **28**:420-7.
81. **Proudfoot, A. E. I., Wells, Timothy N.C., Power, Christine A.** 2000. *Methods in Molecular Biology*TM, vol. 138. Humana Press, Totowa, New Jersey.
82. **Rabe, K. F., and D. T. Schmidt.** 2001. Pharmacological treatment of asthma today. *Eur Respir J Suppl* **34**:34s-40s.
83. **Rasmussen, S. G., H. J. Choi, D. M. Rosenbaum, T. S. Kobilka, F. S. Thian, P. C. Edwards, M. Burghammer, V. R. Ratnala, R. Sanishvili, R. F. Fischetti, G. F. Schertler, W. I. Weis, and B. K. Kobilka.** 2007. Crystal structure of the human beta2 adrenergic G-protein-coupled receptor. *Nature* **450**:383-7.
84. **Rothenberg, M. E., A. D. Luster, and P. Leder.** 1995. Murine eotaxin: an eosinophil chemoattractant inducible in endothelial cells and in interleukin 4-induced tumor suppression. *Proc Natl Acad Sci U S A* **92**:8960-4.
85. **Sabroe, I., A. Jorritsma, V. E. Stubbs, G. Xanthou, L. A. Jopling, P. D. Ponath, T. J. Williams, P. M. Murphy, and J. E. Pease.** 2005. The carboxyl terminus of the chemokine receptor CCR3 contains distinct domains which regulate chemotactic signaling and receptor down-regulation in a ligand-dependent manner. *Eur J Immunol* **35**:1301-10.

86. **Sabroe, I., M. J. Peck, B. J. Van Keulen, A. Jorritsma, G. Simmons, P. R. Clapham, T. J. Williams, and J. E. Pease.** 2000. A small molecule antagonist of chemokine receptors CCR1 and CCR3. Potent inhibition of eosinophil function and CCR3-mediated HIV-1 entry. *J Biol Chem* **275**:25985-92.
87. **Saeki, T., K. Ohwaki, A. Naya, K. Kobayashi, M. Ishikawa, N. Ohtake, and K. Noguchi.** 2001. Identification of a potent and nonpeptidyl ccr3 antagonist. *Biochem Biophys Res Commun* **281**:779-82.
88. **Saita, Y., E. Kodama, M. Orita, M. Kondo, T. Miyazaki, K. Sudo, K. Kajiwara, M. Matsuoka, and Y. Shimizu.** 2006. Structural basis for the interaction of CCR5 with a small molecule, functionally selective CCR5 agonist. *J Immunol* **177**:3116-22.
89. **Sallusto, F., D. Lenig, C. R. Mackay, and A. Lanzavecchia.** 1998. Flexible programs of chemokine receptor expression on human polarized T helper 1 and 2 lymphocytes. *J Exp Med* **187**:875-83.
90. **Sallusto, F., C. R. Mackay, and A. Lanzavecchia.** 1997. Selective expression of the eotaxin receptor CCR3 by human T helper 2 cells. *Science* **277**:2005-7.
91. **Shinkai, A., M. Komuta-Kunitomo, N. Sato-Nakamura, and H. Anazawa.** 2002. N-terminal domain of eotaxin-3 is important for activation of CC chemokine receptor 3. *Protein Eng* **15**:923-9.
92. **Shinkai, A., H. Yoshisue, M. Koike, E. Shoji, S. Nakagawa, A. Saito, T. Takeda, S. Imabeppu, Y. Kato, N. Hanai, H. Anazawa, T. Kuga, and T. Nishi.** 1999. A novel human CC chemokine, eotaxin-3, which is expressed in IL-4-stimulated vascular endothelial cells, exhibits potent activity toward eosinophils. *J Immunol* **163**:1602-10.
93. **Signoret, N., L. Hewlett, S. Wavre, A. Pelchen-Matthews, M. Oppermann, and M. Marsh.** 2005. Agonist-induced endocytosis of CC chemokine receptor 5 is clathrin dependent. *Mol Biol Cell* **16**:902-17.
94. **Simmons, G., P. R. Clapham, L. Picard, R. E. Offord, M. M. Rosenkilde, T. W. Schwartz, R. Buser, T. N. Wells, and A. E. Proudfoot.** 1997. Potent inhibition of HIV-1 infectivity in macrophages and lymphocytes by a novel CCR5 antagonist. *Science* **276**:276-9.
95. **Stenkamp, R. E., D. C. Teller, and K. Palczewski.** 2002. Crystal structure of rhodopsin: a G-protein-coupled receptor. *ChemBiochem* **3**:963-7.
96. **Stovel, R., and c. J. Wiley.** 1997. Fluidics, *Current Protocols in Cytometry*.
97. **Stroke, I. L., A. G. Cole, S. Simhadri, M. R. Brescia, M. Desai, J. J. Zhang, J. R. Merritt, K. C. Appell, I. Henderson, and M. L. Webb.** 2006. Identification of CXCR3 receptor agonists in combinatorial small-molecule libraries. *Biochem Biophys Res Commun* **349**:221-8.
98. **Surgand, J. S., J. Rodrigo, E. Kellenberger, and D. Rognan.** 2006. A chemogenomic analysis of the transmembrane binding cavity of human G-protein-coupled receptors. *Proteins* **62**:509-38.
99. **Suzuki, K., T. Morokata, K. Morihira, I. Sato, S. Takizawa, M. Kaneko, K. Takahashi, and Y. Shimizu.** 2006. In vitro and in vivo characterization of a novel CCR3 antagonist, YM-344031. *Biochem Biophys Res Commun* **339**:1217-23.

100. **Tang, M. L., J. W. Wilson, A. G. Stewart, and S. G. Royce.** 2006. Airway remodelling in asthma: current understanding and implications for future therapies. *Pharmacol Ther* **112**:474-88.
101. **Taub, D. D., P. Proost, W. J. Murphy, M. Anver, D. L. Longo, J. van Damme, and J. J. Oppenheim.** 1995. Monocyte chemotactic protein-1 (MCP-1), -2, and -3 are chemotactic for human T lymphocytes. *J Clin Invest* **95**:1370-6.
102. **Udenfriend, S., L. D. Gerber, L. Brink, and S. Spector.** 1985. Scintillation proximity radioimmunoassay utilizing 125I-labeled ligands. *Proc Natl Acad Sci U S A* **82**:8672-6.
103. **Uguccioni, M., C. R. Mackay, B. Ochensberger, P. Loetscher, S. Rhis, G. J. LaRosa, P. Rao, P. D. Ponath, M. Baggiolini, and C. A. Dahinden.** 1997. High expression of the chemokine receptor CCR3 in human blood basophils. Role in activation by eotaxin, MCP-4, and other chemokines. *J Clin Invest* **100**:1137-43.
104. **Vaidehi, N., S. Schlyer, R. J. Trabanino, W. B. Floriano, R. Abrol, S. Sharma, M. Kochanny, S. Koovakat, L. Dunning, M. Liang, J. M. Fox, F. L. de Mendonca, J. E. Pease, W. A. Goddard, 3rd, and R. Horuk.** 2006. Predictions of CCR1 chemokine receptor structure and BX 471 antagonist binding followed by experimental validation. *J Biol Chem* **281**:27613-20.
105. **Van Damme, J., P. Proost, J. P. Lenaerts, and G. Opdenakker.** 1992. Structural and functional identification of two human, tumor-derived monocyte chemotactic proteins (MCP-2 and MCP-3) belonging to the chemokine family. *J Exp Med* **176**:59-65.
106. **van Staa, T. P.** 2006. The pathogenesis, epidemiology and management of glucocorticoid-induced osteoporosis. *Calcif Tissue Int* **79**:129-37.
107. **Vu, T. K., V. I. Wheaton, D. T. Hung, I. Charo, and S. R. Coughlin.** 1991. Domains specifying thrombin-receptor interaction. *Nature* **353**:674-7.
108. **Wan, Y., J. P. Jakway, H. Qiu, H. Shah, C. G. Garlisi, F. Tian, P. Ting, D. Hesk, R. W. Egan, M. M. Billah, and S. P. Umland.** 2002. Identification of full, partial and inverse CC chemokine receptor 3 agonists using [³⁵S]GTPgammaS binding. *Eur J Pharmacol* **456**:1-10.
109. **Weber, M., M. Uguccioni, B. Ochensberger, M. Baggiolini, I. Clark-Lewis, and C. A. Dahinden.** 1995. Monocyte chemotactic protein MCP-2 activates human basophil and eosinophil leukocytes similar to MCP-3. *J Immunol* **154**:4166-72.
110. **White, J. R., C. Imburgia, E. Dul, E. Appelbaum, K. O'Donnell, D. J. O'Shannessy, M. Brawner, J. Fornwald, J. Adamou, N. A. Elshourbagy, K. Kaiser, J. J. Foley, D. B. Schmidt, K. Johanson, C. Macphee, K. Moores, D. McNulty, G. F. Scott, R. P. Schleimer, and H. M. Sarau.** 1997. Cloning and functional characterization of a novel human CC chemokine that binds to the CCR3 receptor and activates human eosinophils. *J Leukoc Biol* **62**:667-75.
111. **White, J. R., J. M. Lee, K. Dede, C. S. Imburgia, A. J. Jurewicz, G. Chan, J. A. Fornwald, D. Dhanak, L. T. Christmann, M. G. Darcy, K. L. Widdowson, J. J. Foley, D. B. Schmidt, and H. M. Sarau.** 2000. Identification of potent, selective non-peptide CC chemokine receptor-3 antagonist that inhibits eotaxin-, eotaxin-2-, and monocyte chemotactic protein-4-induced eosinophil migration. *J Biol Chem* **275**:36626-31.

112. **WHO** 2006, posting date. Asthma (Fact Sheet No.307)
<http://www.who.int/mediacentre/factcheets/fs307/en>. [Online.]
113. **Williams, C. M., D. J. Newton, S. A. Wilson, T. J. Williams, J. W. Coleman, and B. F. Flanagan.** 1998. Conserved structure and tissue expression of rat eotaxin. *Immunogenetics* **47**:178-80.
114. **Wise, E., and J. E. Pease.** 2007. Unravelling the mechanisms underpinning chemokine receptor activation and blockade by small molecules: a fine line between agonism and antagonism? *Biochem Soc Trans* **35**:755-9.
115. **Wise, E. L., C. Duchesnes, P. C. da Fonseca, R. A. Allen, T. J. Williams, and J. E. Pease.** 2007. Small molecule receptor agonists and antagonists of CCR3 provide insight into mechanisms of chemokine receptor activation. *J Biol Chem* **282**:27935-43.
116. **Wu, L., G. LaRosa, N. Kassam, C. J. Gordon, H. Heath, N. Ruffing, H. Chen, J. Humblias, M. Samson, M. Parmentier, J. P. Moore, and C. R. Mackay.** 1997. Interaction of chemokine receptor CCR5 with its ligands: multiple domains for HIV-1 gp120 binding and a single domain for chemokine binding. *J Exp Med* **186**:1373-81.
117. **Ying, S., Q. Meng, K. Zeibecoglou, D. S. Robinson, A. Macfarlane, M. Humbert, and A. B. Kay.** 1999. Eosinophil chemotactic chemokines (eotaxin, eotaxin-2, RANTES, monocyte chemoattractant protein-3 (MCP-3), and MCP-4), and C-C chemokine receptor 3 expression in bronchial biopsies from atopic and nonatopic (Intrinsic) asthmatics. *J Immunol* **163**:6321-9.
118. **Zeibecoglou, K., A. J. Macfarlane, S. Ying, Q. Meng, I. Pavord, N. C. Barnes, D. S. Robinson, and A. B. Kay.** 1999. Increases in eotaxin-positive cells in induced sputum from atopic asthmatic subjects after inhalational allergen challenge. *Allergy* **54**:730-5.
119. **Zimmermann, N., J. J. Conkright, and M. E. Rothenberg.** 1999. CC chemokine receptor-3 undergoes prolonged ligand-induced internalization. *J Biol Chem* **274**:12611-8.
120. **Zimmermann, N., and M. E. Rothenberg.** 2003. Receptor internalization is required for eotaxin-induced responses in human eosinophils. *J Allergy Clin Immunol* **111**:97-105.
121. **Zlotnik, A., and O. Yoshie.** 2000. Chemokines: a new classification system and their role in immunity. *Immunity* **12**:121-7.