

**A_{2B}-Adenosin-Rezeptor-
Homo- und Heterodimere
Biolumineszenz-Resonanz-Energie-Transfer-
Studien und pharmakologische
Charakterisierung**

Dissertation

zur

Erlangung des Doktorgrades (Dr. rer. nat.)

der

Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät

der

Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn

vorgelegt von

Apotheker Dipl.-Pharm. Benjamin F. Seibt

aus

Frechen

Bonn, Oktober 2012

Angefertigt mit Genehmigung der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät der
Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn

Promotionskommission

- | | |
|--------------------------|---|
| 1. Gutachterin: | Frau Prof. Dr. Christa E. Müller |
| 2. Gutachter: | Herr Prof. Dr. Ivar von Kügelgen |
| 3. Fachnahes Mitglied: | Herr Prof. Dr. Klaus Mohr |
| 4. Fachfremdes Mitglied: | Frau PD. Dr. Gerhild van Echten-Deckert |

Tag der Promotion: 03.12.2012

Erscheinungsjahr: 2012

Diese Dissertation ist auf dem Hochschulserver der ULB Bonn
(http://hss.ulb.uni-bonn.de/diss_online) elektronisch publiziert.

Die vorliegende Arbeit wurde in der Zeit von August 2009 bis Oktober 2012 am Pharmazeutischen Institut der Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn unter der Leitung von Frau Prof. Dr. Christa E. Müller angefertigt.

Mein besonderer Dank gebührt Frau Prof. Dr. Christa E. Müller für die Überlassung des interessanten Themas, die fachliche Unterstützung, für die vielen wertvollen Anregungen und Diskussionen, sowie die konstruktive Kritik beim Erstellen dieser Arbeit. Herrn Prof. Dr. Ivar von Kügelgen danke ich für die freundliche Übernahme des Koreferats. Für die Mitwirkung in meiner Prüfungskommission bedanke ich mich bei Herrn Prof. Dr. Klaus Mohr und Frau PD. Dr. Gerhild van Echten-Deckert.

Herrn Prof. Dr. Rafael Franco von der Universität Barcelona und Frau PD. Dr. Annette Nicke vom Max-Planck-Institut in Göttingen möchte ich herzlich für die Einarbeitung in neue Techniken in Ihren Laboratorien danken. Ich danke dem Graduiertenkolleg GRK 804 für die ideelle und finanzielle Unterstützung in Form eines dreijährigen Doktorandenstipendiums, sowie die Kostenübernahme bei allen Kongress- und Dienstreisen. Außerdem möchte ich dem Bonn International Graduate School of Drug Sciences (BIGS DrugS) für den interdisziplinären Austausch danken.

Meiner Familie
&
meinen Freunden

*„Was wir wissen, ist ein Tropfen.
Was wir nicht wissen – ein Ozean.“*

Isaac Newton

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung.....	1
1.1	G-Protein-gekoppelte Rezeptoren	3
	1.1.1 Klassifizierung und Struktur von G-Protein-gekoppelten Rezeptoren	6
	1.1.2 Purinerge Rezeptoren.....	12
	1.1.3 Pharmazeutische Bedeutung von G-Protein-gekoppelten Rezeptoren ..	14
	1.1.4 Di- und Oligomerisierung von G-Protein-gekoppelten Rezeptoren	15
1.2	Adenosin-Rezeptoren.....	25
	1.2.1 Physiologische Funktionen von Adenosin-Rezeptoren	25
	1.2.2 Pharmazeutische Bedeutung von Adenosin-Rezeptoren	30
	1.2.3 Liganden und Ligandenbindungsstellen der Adenosin-A _{2A} -	
	und -A _{2B} -Rezeptoren.....	34
	1.2.4 Di- und Oligomerisierung von Adenosin-Rezeptoren	41
1.3	Ziele der Arbeit	47

2	Methoden.....	49
2.1	Charakterisierung der zweiten extrazellulären Schleife des humanen.....	
	Adenosin-A_{2B}-Rezeptors	51
2.1.1	Austausch der zweiten extrazellulären Schleife des humanen.....	
	Adenosin-A _{2B} -Rezeptors und Expression in CHO-Zellen	53
2.1.2	Kompetitionsexperimente	57
2.1.3	Funktionelle Experimente: cAMP-Akkumulation	59
2.1.4	Computermodell der hA _{2B} (EL2-hA _{2A})-Rezeptor-Mutante	60
2.2	Homodimerisierung von humanen Adenosin-A_{2B}-Rezeptoren	61
2.2.1	Biolumineszenz-Resonanz-Energie-Transfer.....	61
2.2.2	Verdrängungsexperimente	69
2.2.3	Einfluss von Liganden auf die Homodimerisierung	70
2.2.4	Einfluss der M198A-Mutation auf die Adenosin-A _{2B} -	
	Homodimerisierung	70
2.2.5	Computermodell des Adenosin-A _{2B} -Rezeptor-Homodimers.....	70
2.3	Heterodimerisierung von humanen Adenosin-A_{2A}- und	
	-A_{2B}-Rezeptoren.....	71
2.3.1	Biolumineszenz-Resonanz-Energie-Transfer.....	71
2.3.2	Verdrängungsexperimente	71
2.3.3	Einfluss von Liganden auf die Heterodimerisierung.....	71
2.3.4	Konfokale Mikroskopie.....	71
2.3.5	Computermodell des Adenosin-A _{2A} -A _{2B} -Rezeptor Heterodimers.....	71
2.4	Oligomerisierung von Adenosin-Rezeptoren:	
	Elektrophorese-Experimente	72
2.4.1	Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese.....	75
2.4.2	Blaue Native-Polyacrylamid-Gelelektrophorese.....	76

3	Ergebnisse.....	79
3.1	Charakterisierung der zweiten extrazellulären Schleife des humanen Adenosin-A_{2B}-Rezeptors.....	81
3.1.1	Austausch der zweiten extrazellulären Schleife des humanen Adenosin-A _{2B} -Rezeptors und Expression in CHO-Zellen.....	81
3.1.2	Kompetitionsexperimente	84
3.1.3	Funktionelle Experimente: cAMP-Akkumulation.....	89
3.1.4	Computermodell der hA _{2B} (EL2-hA _{2A})-Rezeptor-Mutante	94
3.2	Homodimerisierung von humanen Adenosin-A_{2B}-Rezeptoren.....	96
3.2.1	Biolumineszenz-Resonanz-Energie-Transfer	96
3.2.2	Verdrängungsexperimente	100
3.2.3	Einfluss von Liganden auf die Homodimerisierung	102
3.2.4	Einfluss der M198A-Mutation auf die Adenosin-A _{2B} -Homodimerisierung	103
3.2.5	Computermodell des Adenosin-A _{2B} -Rezeptor-Homodimers	104
3.3	Heterodimerisierung von humanen Adenosin-A_{2A}- und -A_{2B}-Rezeptoren	106
3.3.1	Biolumineszenz-Resonanz-Energie-Transfer	106
3.3.2	Verdrängungsexperimente	107
3.3.3	Einfluss von Liganden auf die Heterodimerisierung	109
3.3.4	Konfokale Mikroskopie	110
3.3.5	Computermodell des Adenosin-A _{2A} -A _{2B} -Rezeptor Heterodimers	111
3.4	Oligomerisierung von Adenosin-Rezeptoren: Elektrophorese-Experimente.....	113
3.4.1	Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese	113
3.4.2	Blaue Native-Polyacrylamid-Gelelektrophorese	117

4	Diskussion	119
4.1	Charakterisierung der zweiten extrazellulären Schleife des humanen.....	
	Adenosin-A_{2B}-Rezeptors	121
4.1.1	Austausch der zweiten extrazellulären Schleife des humanen.....	
	Adenosin-A _{2B} -Rezeptors und Expression in CHO-Zellen	121
4.1.2	Kompetitionsexperimente	121
4.1.3	Funktionelle Experimente: cAMP-Akkumulation	123
4.1.4	Computermodell der hA _{2B} (EL2-hA _{2A})-Rezeptor-Mutante	124
4.1.5	Zusammenfassende Diskussion.....	125
4.2	Homodimerisierung von humanen Adenosin-A_{2B}-Rezeptoren	127
4.2.1	Biolumineszenz-Resonanz-Energie-Transfer.....	127
4.2.2	Verdrängungsexperimente	129
4.2.3	Einfluss von Liganden auf die Homodimerisierung	130
4.2.4	Einfluss der M198A-Mutation auf die Adenosin-A _{2B} -	
	Homodimerisierung.....	131
4.2.5	Computermodell des Adenosin-A _{2B} -Rezeptor-Homodimers.....	132
4.2.6	Zusammenfassende Diskussion.....	133
4.3	Heterodimerisierung von humanen Adenosin-A_{2A}- und	
	-A_{2B}-Rezeptoren.....	134
4.3.1	Biolumineszenz-Resonanz-Energie-Transfer.....	134
4.3.2	Verdrängungsexperimente	135
4.3.3	Einfluss von Liganden auf die Heterodimerisierung.....	135
4.3.4	Konfokale Mikroskopie.....	136
4.3.5	Computermodell des Adenosin-A _{2A} -A _{2B} -Rezeptor Heterodimers.....	136
4.3.6	Zusammenfassende Diskussion.....	137
4.4	Oligomerisierung von Adenosin-Rezeptoren:	
	Elektrophorese-Experimente	138
4.4.1	Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese.....	138
4.4.2	Blaue Native-Polyacrylamid-Gelelektrophorese.....	139
4.4.3	Zusammenfassende Diskussion.....	140

5	Zusammenfassung und Ausblick.....	141
6	Experimenteller Teil	147
6.1	Allgemeine Angaben	149
	6.1.1 Geräte und Materialien	149
	6.1.2 Chemikalien	153
	6.1.3 Kits.....	156
	6.1.4 Radioliganden	156
	6.1.5 Antikörper	156
	6.1.6 Zelllinien.....	157
6.2	Puffer und Lösungen	157
	6.2.1 Lösungen für die Molekularbiologie	157
	6.2.2 Lösungen für die Zellkultur	158
	6.2.3 Lösungen für die Membranpräparation	159
	6.2.4 Lösungen für die Proteinbestimmung.....	159
	6.2.5 Puffer für Radioligand-Bindungsstudien	160
	6.2.6 Puffer für funktionelle cAMP-Experimente	161
	6.2.7 Puffer für Biolumineszenz-Resonanz-Energie-Transfer- Experimente	161
	6.2.8 Puffer und Lösungen für die Immunzytochemie	162
	6.2.9 Puffer und Lösungen für die Oozyten.....	163
	6.2.10 Puffer und Lösungen für	
	Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese	165
	6.2.11 Puffer und Lösungen für die Blaue Native	
	Polyacrylamid-Gelelektrophorese	165
	6.2.12 Puffer und Lösungen für den Western Blot.....	166
6.3	Molekularbiologische Experimente.....	167
	6.3.1 Vektorkarten	167
	6.3.2 cDNA	168
	6.3.3 Primer.....	169
	6.3.4 Sequenzierungsprimer	171
	6.3.5 Enzyme	172

6.3.6	Polymerase-Kettenreaktion	174
6.3.7	Agarose-Gelelektrophorese für DNA.....	174
6.3.8	Extraktion von DNA aus dem Agarosegel	174
6.3.9	Restriktionsverdau.....	175
6.3.10	Restriktionsverdau methylierter DNA	175
6.3.11	Ligation mit T4-DNA-Ligase.....	176
6.3.12	Transformation in <i>Escherichia coli</i>	176
6.3.13	Retransformation	177
6.3.14	Selektion und Kultivierung von Bakterien-Monoklonen	177
6.3.15	Glycerinkulturen.....	177
6.3.16	Mini-/Midi-/Maxipräparation von DNA	177
6.3.17	Konzentrationsbestimmung von DNA	177
6.3.18	Sequenzierung	177
6.3.19	Austausch der zweiten extrazellulären Schleife des A _{2B} -Rezeptors	
	mittels Overlap-Extension.....	178
6.3.20	Klonierung von Rezeptor-DNA in einen Vektor	179
6.3.21	Mutagenese von M198A in den humanen A _{2B} -Rezeptor.....	180
6.3.22	Klonierung von Erkennungssequenzen an Rezeptor-DNA.....	181
6.3.23	Linearisierung von DNA für die RNA Synthese	182
6.3.24	RNA-Synthese.....	182
6.3.25	Agarose-Gelelektrophorese für RNA.....	183
6.3.26	Konzentrationsbestimmung von RNA	183
6.4	Zellkultur	184
6.4.1	Medien.....	184
6.4.2	Auftauen von Zellen.....	185
6.4.3	Kultivierung von Zellen	186
6.4.4	Zellzahlbestimmung	186
6.4.5	Einfrieren von Zellen	186
6.4.6	Retrovirale Transfektion	187
6.4.7	Transiente Transfektion.....	188
6.5	Membranpräparation	188
6.6	Gewinnung von cAMP-Bindeprotein	189

6.7	Proteinbestimmung	189
	6.7.1 Proteinbestimmung nach <i>Lowry</i>	189
	6.7.2 Proteinbestimmung nach <i>Bradford</i>	191
6.8	Kompetitionsexperimente	191
	6.8.1 Radioligand-Bindungsstudien an Adenosin-A _{2B} -Rezeptoren.....	191
	6.8.2 Radioligand-Bindungsstudien an Adenosin-A _{2A} -Rezeptoren	192
6.9	Funktionelle cAMP-Experimente	193
6.10	Biolumineszenz-Resonanz-Energie-Transfer	196
	6.10.1 Biolumineszenz-Resonanz-Energie-Transfer-Experimente	196
	6.10.2 Verdrängungsexperimente	197
	6.10.3 Einfluss von Liganden	198
	6.10.4 Immunzytochemie	198
6.11	Oozyten	199
	6.11.1 Gewinnung von Oozyten aus <i>Xenopus laevis</i>	199
	6.11.2 Injektion von RNA in Oozyten	200
	6.11.3 Metabolische Markierung mit [³⁵ S]Methionin	200
	6.11.4 Markierung mit Cy3 oder Cy5	200
	6.11.5 Aufbereitung der Oozyten	201
	6.11.6 Aufreinigung über His-markierte Proteine	201
6.12	Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese	202
6.13	Blaue Native Polyacrylamid-Gelelektrophorese	203
6.14	Western Blot	204
7	Abkürzungsverzeichnis	205
7.1	Allgemeine Abkürzungen	207
7.2	Abkürzungen von Aminosäuren	211
8	Literaturverzeichnis	213

1 Einleitung

1.1 G-Protein-gekoppelte Rezeptoren

Das humane Genom besteht aus 2,85 Milliarden Nukleotiden, welche im Rahmen des humanen Genom-Projektes von 1990 bis 2003 fast vollständig sequenziert werden konnte.^{1, 2} Insgesamt codieren dabei ca. 20.000 bis 25.000 Gene für verschiedene Proteine.² Davon wiederum sind zwischen 800 bis 1000 Gene bereits identifiziert, die G-Protein-gekoppelten Rezeptoren exprimieren.^{3, 4} Diese G-Protein-gekoppelten Rezeptoren (GPCRs) sind membranständige Rezeptoren, die durch einen charakteristischen Aufbau gekennzeichnet sind. Dabei bestehen diese aus sieben α -helikalen Transmembran-Domänen (TM1-TM7), die alternierend durch je drei intra- und extrazelluläre Schleifen (IL1-3 und EL1-3) miteinander verbunden sind. Außerdem besitzen GPCRs einen extrazellulären Amino- und einen intrazellulären Carboxyl-Terminus.³ An bestimmten extrazellulären Regionen des Rezeptors können Liganden binden und den Rezeptor aktivieren oder inhibieren, während bestimmte intrazelluläre Domänen eine wichtige Rolle bei der Signaltransduktion spielen.⁵ Das G-Protein ist ein membranständiger heterotrimerer Komplex bestehend aus einer α -, β -, und γ -Untereinheit, wobei die α -Untereinheit Guanin-Nukleotide binden kann.⁶ Solange ein GPCR nicht durch einen Agonisten aktiviert wird, liegt das G-Protein als nicht-kovalent verbundener Komplex aus einer GDP bindender G_{α} - und einer $G_{\beta\gamma}$ -Untereinheit vor. Abbildung 1 zeigt schematisch den Mechanismus bei der Aktivierung eines G-Protein-gekoppelten Rezeptors. Dabei bindet ein Agonist an den GPCR, der daraufhin die Rezeptorkonformation so verändert, dass er in Kontakt zu einem G-Protein tritt.⁷ Das in der G_{α} -Untereinheit gebundene GDP wird nun durch GTP ersetzt und die $G_{\beta\gamma}$ -Untereinheit dissoziiert von der G_{α} -Untereinheit. Diese wiederum aktiviert nun bestimmte Effektorproteine, die weitere intrazelluläre Signalkaskaden auslöst. Zur Beendigung des Signals wird das gebundene GTP durch die G_{α} -Untereinheit zu GDP hydrolysiert, da diese eine intrinsische GTPase-Aktivität besitzt. Anschließend assoziieren die G-Protein-Untereinheiten und der GTP-Zyklus ist beendet.⁸ Es gibt verschiedene G-Proteine, die abhängig vom Rezeptortyp und Zelltyp unterschiedliche Effektorproteine aktivieren oder inhibieren (siehe Tabelle 1). Als Effektorproteine spielen die Adenylatcyclase, die Phospholipase C, Ca^{2+} - und K^{+} -Kanäle eine Rolle, welche wiederum sekundäre Botenstoffe beeinflussen.⁶ Diese sekundären Botenstoffe können das zyklische Adenosinmonophosphat (cAMP), zyklisches Guanosinmonophosphat (cGMP), Inositol-1,4,5-triphosphat (IP_3) Diacylglycerol (DAG), Ca^{2+} oder K^{+} sein, die weitere Signalkaskaden zellspezifisch regulieren.⁹

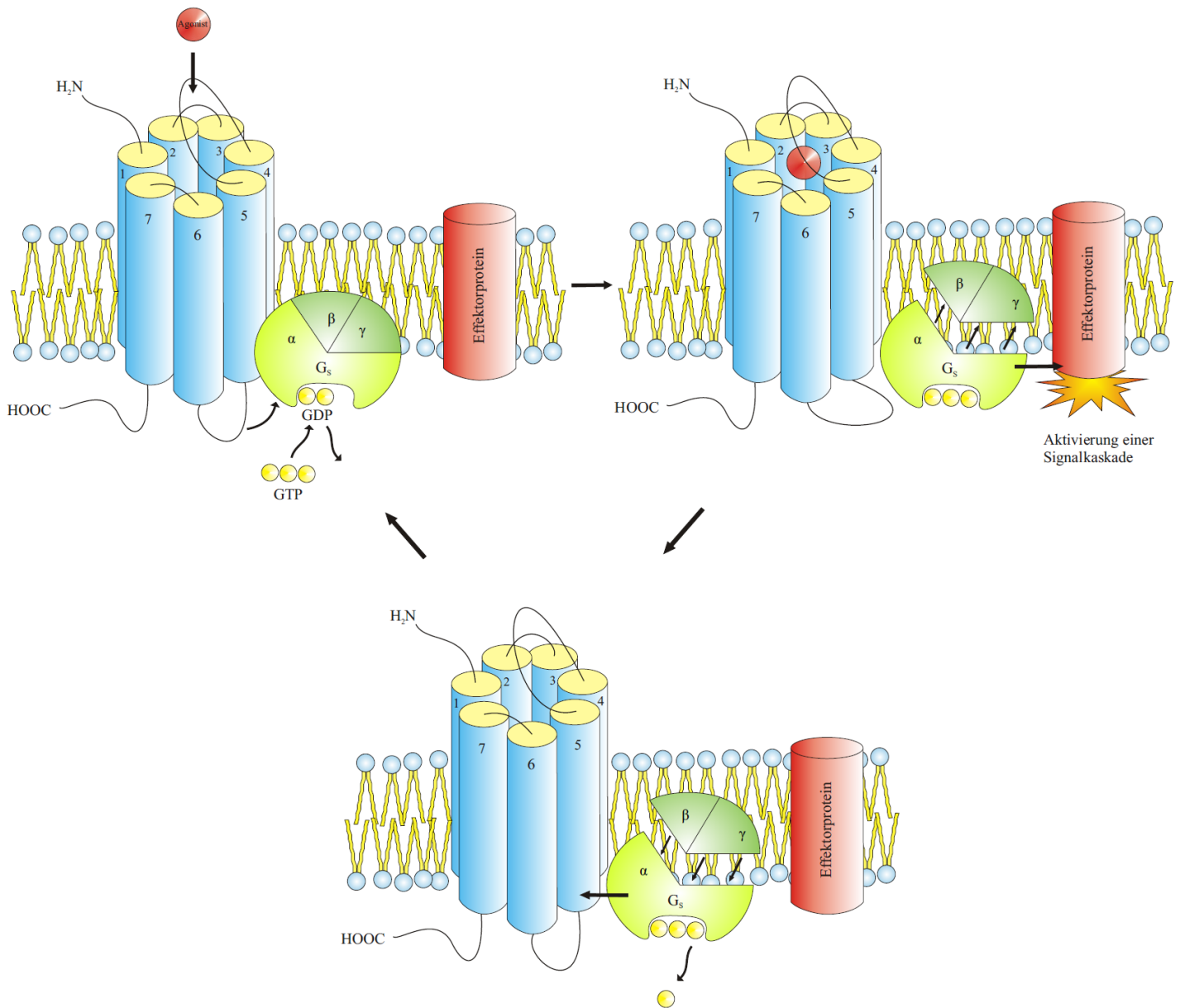


Abbildung 1. Aktivierung von G-Protein-gekoppelten Rezeptoren. Bindet ein Agonist an den Rezeptor so kommt es durch eine Konformationsänderung zur Aktivierung des G-Proteins. Das G-Protein dissoziiert und aktiviert dabei das Effektorprotein, welches intrazellulär bestimmte Signalkaskaden aktiviert.

Tabelle 1. G-Proteine und Effektorsysteme.¹⁰⁻¹³

G _α -Familie	Isoformen	Effektorprotein	Effekt
G _s	α _s	AC	cAMP ↑
	α _{olf}	AC	cAMP ↑
G _{i/0}	α _{i1/2/3}	AC	cAMP ↓
	α _{0A/B}	AC	cAMP ↓
	α _{t1/2}	AC	cAMP ↓
	α _z	AC	cAMP ↓
G _{q/11}	α _q	PLC	IP ₃ /DAG ↑
	α ₁₁	PLC	IP ₃ /DAG ↑
	α ₁₄	PLC	IP ₃ /DAG ↑
	α _{15/16}	PLC	IP ₃ /DAG ↑
G _{12/13}	α ₁₂	Rho-GEF	
	α ₁₃	Rho-GEF	

G_s: stimulierendes G-Protein; G_{i/0}: inhibierendes G-Protein; G_{q/11}: PLC stimulierendes G-Protein; G_{12/13}: Rho-Protein aktivierendes G-Protein; AC: Adenylatcyclase; PLC: Phospholipase C; Rho-GEF: Rho-Guanin-Nukleotid-Austauschfaktor; cAMP: zyklisches Adenosinmonophosphat; IP₃: Inositol-1,4,5-triphosphat; DAG: Diacylglycerol

G-Protein-gekoppelte Rezeptoren können nach der Aktivierung durch einen Liganden durch G-Protein-gekoppelte Rezeptor-Kinasen (GRK) phosphoryliert werden. Dadurch kann intrazellulär β-Arrestin an den Rezeptor binden, welches vorübergehend die Interaktionen von G-Proteinen mit dem Rezeptor sterisch verhindert. An den entstandenen Rezeptor-β-Arrestin-Komplex bindet nun Clathrin zusammen mit AP-2 (Adaptin), welches zu einer Internalisierung des Komplexes in Form von Membranvesikeln führt. Daraufhin kann der Rezeptor intrazellulär abgebaut werden oder nach einer gewissen Zeit wieder zurück an die Zelloberfläche gelangen.¹⁴

1.1.1 Klassifizierung und Struktur von G-Protein-gekoppelten Rezeptoren

G-Protein-gekoppelte Rezeptoren können nach ihrer Sequenzidentität und Funktionalität in die Klassen A-F unterteilt werden.¹⁵ Wie in Tabelle 2 gezeigt, gehören zur Familie A die Rhodopsin-Rezeptoren, Klasse B die Sekretin-Rezeptoren, Klasse C die metabotropen Glutamat-Rezeptoren, Klasse D die Pilz Pheromon-Rezeptoren, Klasse E die cAMP-Rezeptoren und zur Klasse F die Frizzled-Rezeptoren.⁹ Die Transmembran-Domänen der Rezeptoren einer Klasse sind in ihrer Aminosäuresequenz zu mindestens 25 % identisch und besitzen hochkonservierte Motive, wie z.B. die DRY-Mikrodomäne am cytoplasmatischen Ende der TM3 von Klasse A-GPCRs.^{16, 17} Fast alle humanen GPCRs gehören zu den Klassen A bis C, wobei die Klasse A die größte Klasse darstellt.¹⁸

Tabelle 2. Einteilung von G-Protein-gekoppelten Rezeptoren.⁹

Klasse	Familie
A	Rhodopsin-Rezeptoren
B	Sekretin-Rezeptoren
C	Metabotrope Glutamat-Rezeptoren
D	Pilz-Pheromon-Rezeptoren
E	cAMP-Rezeptoren
F	Frizzled-Rezeptoren

Die Röntgenkristallstrukturen von GPCRs liefern wichtige Informationen über den räumlichen Aufbau des gesamten Proteins und die Ligandenbindungstasche des Rezeptors. Die erste Kristallstruktur wurde im Jahr 2000 aufgeklärt und es war die des Rinder-Rhodopsin-Rezeptors.¹⁹ Im September 2012 sind insgesamt 73 Kristallstrukturen von 15 verschiedenen GPCRs veröffentlicht, dabei von allein sieben unterschiedlichen Rezeptoren im Jahr 2012.²⁰ In Tabelle 3 sind alle 15 GPCRs aufgelistet von denen die Kristallstrukturen publiziert sind. Wobei die Strukturen der Chemokin-CXCR4-, μ -Opioid- und δ -Opioid-Rezeptoren jeweils als Dimer/Oligomer kristallisiert wurden. Besonders interessant für diese Arbeit sind dabei die Röntgenkristallstrukturen des humanen Adenosin-A_{2A}-Rezeptors und die des μ -opioid-Rezeptor-Oligomers auf die genauer eingegangen wird.

Tabelle 3. Kristallstrukturen (Stand: September 2012).^{20, 21}

Nr.	Rezeptor	Spezies	Jahr	Literatur
1	Rhodopsin	Rind	2000	Palczewski et al. ¹⁹
2	Adrenerger- β_2 -Rezeptor	Mensch	2007	Rasmussen et al. ²²
3	Adrenerger- β_1 -Rezeptor	Truthahn	2008	Warne et al. ²³
4	Rhodopsin	Tintenfisch	2008	Shimamura et al. ²⁴
5	Adenosin- A_{2A} -Rezeptor	Mensch	2008	Jaakola et al. ²⁵
6	Chemokin-CXCR4-Rezeptor*	Mensch	2010	Wu et al. ²⁶
7	Dopamin- D_3 -Rezeptor	Mensch	2010	Chien et al. ²⁷
8	Histamin- H_1 -Rezeptor	Mensch	2011	Shimamura et al. ²⁸
9	Muskarin- M_2 -Rezeptor	Mensch	2012	Haga et al. ²⁹
10	Muskarin- M_3 -Rezeptor	Mensch	2012	Kruse et al. ³⁰
11	S1P ₁ -Sphingosin-1-Phosphat-Rezeptor	Mensch	2012	Hanson et al. ³¹
12	κ -Opioid-Rezeptor	Mensch	2012	Wu et al. ³²
13	μ -Opioid-Rezeptor*	Maus	2012	Manglik et al. ³³
14	δ -Opioid-Rezeptor*	Maus	2012	Granier et al. ³⁴
15	Nociceptin/Orphanin FQ (NOP) Rez.	Mensch	2012	Thompson et al. ³⁵

* Dimer/Oligomer

Abbildung 2 zeigt die Röntgenkristallstrukturen von sechs repräsentativen GPCRs und zwar die von Rhodopsin-, β_2 -, A_{2A} -, M_3 -, CXCR4 und S1P₁-Rezeptoren. Auffällig sind der gleiche Aufbau und die ähnliche Ausrichtung der Rezeptoren. Dabei haben sich für die Liganden-Bindungsstelle besonders die Transmembrandomänen TM2, TM3, TM5, TM6, TM7 und die zweite extrazelluläre Schleife als wichtig herausgestellt.²¹ Der A_{2A} -Rezeptor zeigt im Vergleich zu den anderen Rezeptoren in der zweiten extrazellulären Schleife weder eine α -Helix noch eine β -Faltblattstruktur.²⁵ Grundsätzlich haben die Ergebnisse von Röntgenkristallstrukturen eine hohe wissenschaftliche Aussagekraft, allerdings gibt es auch Nachteile. Für eine möglichst vollständige Strukturbestimmung wird ein Einkristall eines Proteins von hoher Qualität benötigt. Eine Kristallstruktur ist nämlich nur eine Momentaufnahme eines Rezeptors, wobei dies auch immer die Gefahr eines Artefakts birgt. Des Weiteren ist die Aussage der extrazellulären Regionen schwierig, da diese sehr flexibel sind und nicht komplett dargestellt werden können.³⁶

Rezeptoren können in zwei verschiedenen Zuständen vorliegen, entweder im aktiven Zustand (R^*) oder im inaktiven Zustand (R).³⁷ Das Gleichgewicht ist grundsätzlich eher zum inaktiven Zustand verschoben. Dabei können Agonisten theoretisch nur an Rezeptoren binden, die im aktiven Zustand vorliegen. Aufgrund des Gleichgewichtes ist es daher schwieriger Röntgenkristallstrukturen von Agonist-Rezeptor-Komplexen zu erstellen als von Antagonist-Rezeptor-Komplexen. Dennoch liefern die Kristallstrukturen wertvolle Informationen über die Ligandenbindungsstelle, welche wichtig ist für die Entwicklung potentieller neuer Liganden.

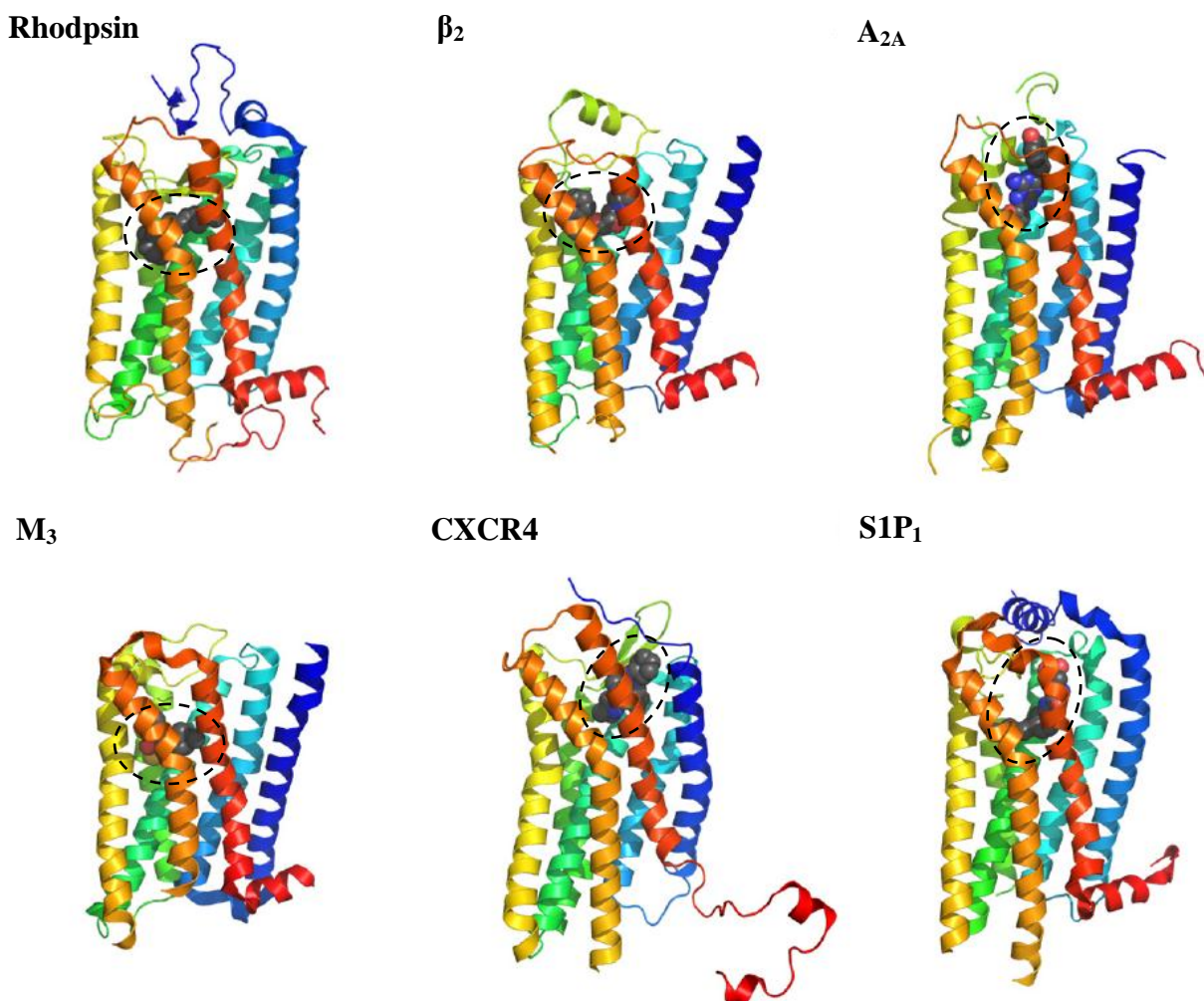


Abbildung 2. Kristallstrukturen von Rhodopsin-, β_2 -, A_{2A} -, M_3 -, CXCR4 und $S1P_1$ -Rezeptoren. Die entsprechenden Liganden Retinal, Carazolol, ZM241385, Tiotropium, IT1t und ML056 sind durch die schwarze gestrichelte Linie hervorgehoben. Der N-Terminus ist in blau und der C-Terminus in rot dargestellt. Die TM1 ist dunkelblau, TM2 hellblau, TM3 blau/grün, TM4 grün, TM5 gelb, TM6 gelb/orange und TM7 orange/rot abgebildet.²¹

Von dem Adenosin-A_{2A}-Rezeptor konnten insgesamt 11 verschiedene Kristallstrukturen mit unterschiedlichen Liganden in verschiedenen Zuständen mit differenzierten Auflösungen publiziert werden. Diese sind in Tabelle 4 aufgelistet. Wichtig ist dabei, dass es Kristallstrukturen sowohl mit gebundenen Antagonisten als auch mit Agonisten gibt, damit können sowohl die aktive (R*) als auch die inaktive (R) Form des Rezeptors charakterisiert werden. Denn die Agonisten-Bindungsstelle und die Antagonisten-Bindungsstelle können an unterschiedlichen Positionen im Rezeptor lokalisiert sein. Außerdem ist vor allem die Röntgenkristallstruktur mit dem Agonisten Adenosin interessant, weil dies der endogene Ligand des A_{2A}-Rezeptors ist. Die Bindung von Adenosin und auch NECA im A_{2A}-Rezeptor wird in Kapitel 1.2.3 genauer beschrieben.

Tabelle 4. Kristallstrukturen des Adenosin-A_{2A}-Rezeptors mit verschiedenen Liganden.²¹

Nr.	Ligand		Zustand	Auflösung	Jahr	Literatur
1	ZM241385	Antagonist	inaktiv	2,60 Å	2008	Jaakola et al. ²⁵
2	Adenosin	Agonist	aktiv	3,00 Å	2011	Lebon et al. ³⁸
3	NECA	Agonist	aktiv	2,60 Å	2011	Lebon et al. ³⁸
4	UK-432097	Agonist	aktiv	2,71 Å	2011	Xu et al. ³⁹
5	ZM241385	Antagonist	inaktiv	3,30 Å	2011	Doré et al. ⁴⁰
6	XAC	Antagonist	inaktiv	3,31 Å	2011	Doré et al. ⁴⁰
7	Coffein	Antagonist	inaktiv	3,60 Å	2011	Doré et al. ⁴⁰
8	ZM241385	Antagonist	inaktiv	2,70 Å	2012	Hino et al. ⁴¹
9	ZM241385	Antagonist	inaktiv	3,10 Å	2012	Hino et al. ⁴¹
10	1,2,4-Triazin 4e	Antagonist	inaktiv	3,27 Å	2012	Congreve et al. ⁴²
11	1,2,4-Triazin 4g	Antagonist	inaktiv	3,24 Å	2012	Congreve et al. ⁴²

Bei den Rezeptoren sind die Disulfidbrücken von Bedeutung, da diese hauptsächlich für die Tertiärstruktur des Rezeptors verantwortlich sind. Der Adenosin-A_{2A}-Rezeptor bildet vier Disulfidbrücken aus und zwar über die Cysteine Cys71 - Cys159 (EL1-2), Cys74 - Cys146 (EL1-2), Cys77 - Cys166 (TM3-EL2) und Cys259 - Cys262 (EL3-3).²⁵ Im Gegensatz dazu bildet der A_{2B}-Rezeptor lediglich zwei Disulfidbrücken aus und zwar zwischen den Cysteinen Cys72 - Cys167 (EL1-2) und Cys78 - Cys 171 (TM3-EL2). Die letzt genannte Disulfidbrücke ist außerdem essenziell für die Ligandenbindung und Rezeptoraktivierung.^{43, 44}

Abbildung 3 zeigt die Röntgenkristallstrukturen des Adenosin-A_{2A}-Rezeptors mit unterschiedlichen Liganden. Dabei interagieren die beiden Antagonist ZM241385 (A) und Coffein (C) an der gleichen Antagonisten-Bindungsstelle, die offensichtlich in der TM6 und der TM7 liegt. Dabei spielt auch die zweite extrazelluläre Schleife eine Rolle. Hervorzuheben sind die Aminosäuren Phe186 (EL2), Asn253 (TM6) und Ile274 (TM7), die wesentlich an der Bindung beteiligt sein sollen.⁴⁰ Anhand der Röntgenkristallstrukturen mit den Agonisten UK432097 (B) und Adenosin (D) wird deutlich, dass die Agonisten-Bindungsstelle mit der Antagonisten-Bindungsstelle

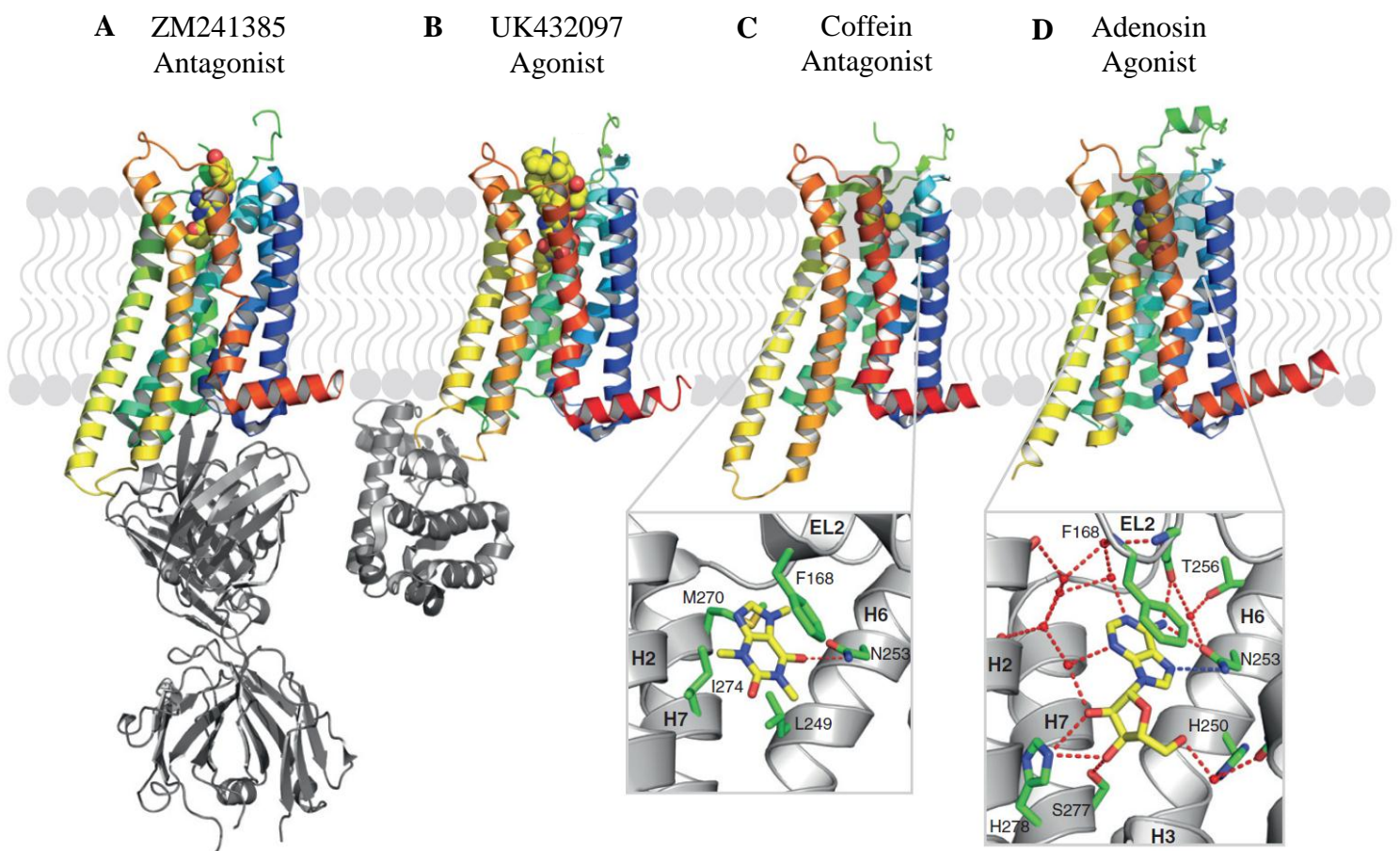


Abbildung 3. Röntgenkristallstrukturen des Adenosin-A_{2A}-Rezeptors mit verschiedenen Liganden. (A) Der Antagonist ZM241385 bindet im inaktiven Zustand (R) an den A_{2A}-Rezeptor, welcher durch ein Antikörperfragment F_{ab} (grau) stabilisiert wird. (B) zeigt die aktive Form (R*) mit dem Agonisten UK432097 stabilisiert durch ein T4 Lysozym (grau). (C) und (D) sind thermostabilisiert, wobei in (C) der Antagonist Coffein im Zustand R und in (D) der endogene Agonist Adenosin im Zustand R* an den A_{2A}-Rezeptor bindet. Zusätzlich zeigen die zwei Ausschnitte von (C) und (D) einige wichtige Aminosäuren, die an der Ligandenbindung beteiligt sind. Modifiziert nach Tate.²⁰

teilweise übereinstimmt. Denn bei der Bindung der Agonisten UK432097 und Adenosin sind die wichtigsten Aminosäuren ebenfalls Phe186 (EL2), Asn253 (TM6) und Ile274 (TM7).^{38, 39} Der Unterschied bei dem Agonisten/Antagonisten-Rezeptor-Komplex besteht in der Konformation des Rezeptors, denn hier bewegen sich die TM3, TM4, TM5 und TM7 je nach Ligand.^{38, 39}

Abbildung 4 zeigt die Röntgenkristallstruktur des μ -opioid-Rezeptors, welche die erste ist, die als ein Tetramer publiziert wurde.³³ Die vier μ -opioid-Rezeptoren sind linear angeordnet. In der Abbildung sind eindeutig die beiden Interaktionsflächen zu erkennen. Dabei bilden die TM5 und TM6 eine Kontaktfläche und eine zweite die TM1, TM2 und Helix8. Die letzte genannte Interaktionsfläche ist die schwächere der beiden, da die Kontaktfläche hier lediglich 615 \AA^2 groß ist. Die 1492 \AA^2 große Interaktionsfläche zwischen der TM5 und TM6 ist scheinbar wesentlich stärker ausgeprägt, da hier insgesamt 28 Aminosäuren miteinander interagieren.³³ Die Oligomerisierung könnte hier allerdings auch ein Artefakt darstellen.

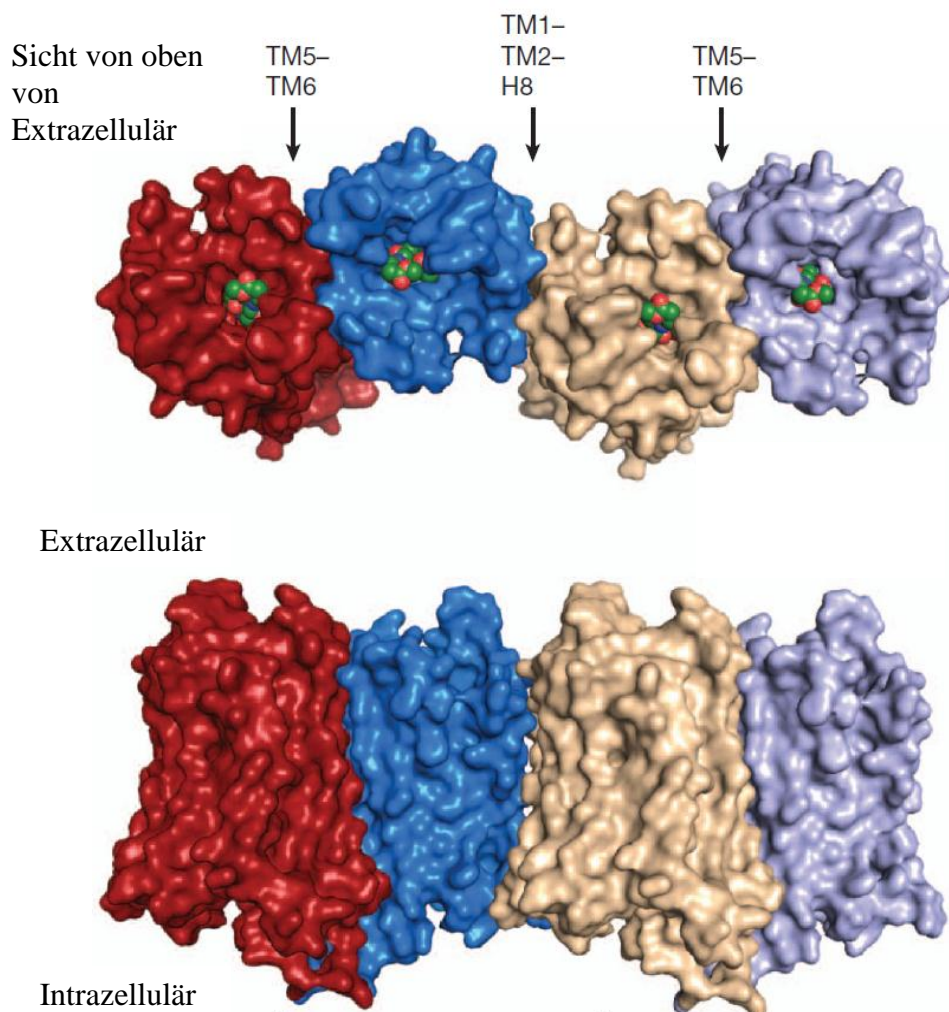


Abbildung 4. Kristallstruktur des μ -Opioid-Rezeptor-Tetramers.³³

1.1.2 Purinerge Rezeptoren

Purinerge Rezeptoren lassen sich in die drei Familien P0-, P1- und P2-Rezeptoren einteilen (siehe Abbildung 5). Die P0-Rezeptoren sind die Adenin-Rezeptoren mit dem endogenen Agonisten Adenin als Liganden. Zu dieser Familie gehören die Ade1- und Ade2-Rezeptoren.⁴⁵ Die P1-Rezeptoren haben als physiologischen Liganden das Adenosin und werden daher auch Adenosin-Rezeptoren genannt. Diese lassen sich in die vier Subtypen A₁-, A_{2A}-, A_{2B}- und A₃-Rezeptoren unterteilen.⁴⁶ Sowohl die P0- als auch die P1-Rezeptoren sind G-Protein-gekoppelte Rezeptoren. Die Familie der P2-Rezeptoren lässt sich in die zwei Subfamilien P2X- und P2Y-Rezeptoren unterteilen, wobei die P2X-Rezeptoren Ligand-gesteuerte Ionenkanäle und die P2Y-Rezeptoren GPCRs sind. Bei den P2X-Rezeptoren gibt es sieben Untergruppen und zwar P2X₁₋₇, welche durch ATP aktiviert werden und bei den P2Y-Rezeptoren sind es die acht Subtypen P2Y_{1,2,4,6,11-14} mit den Agonisten ATP, ADP, UTP, UDP.^{47, 48}

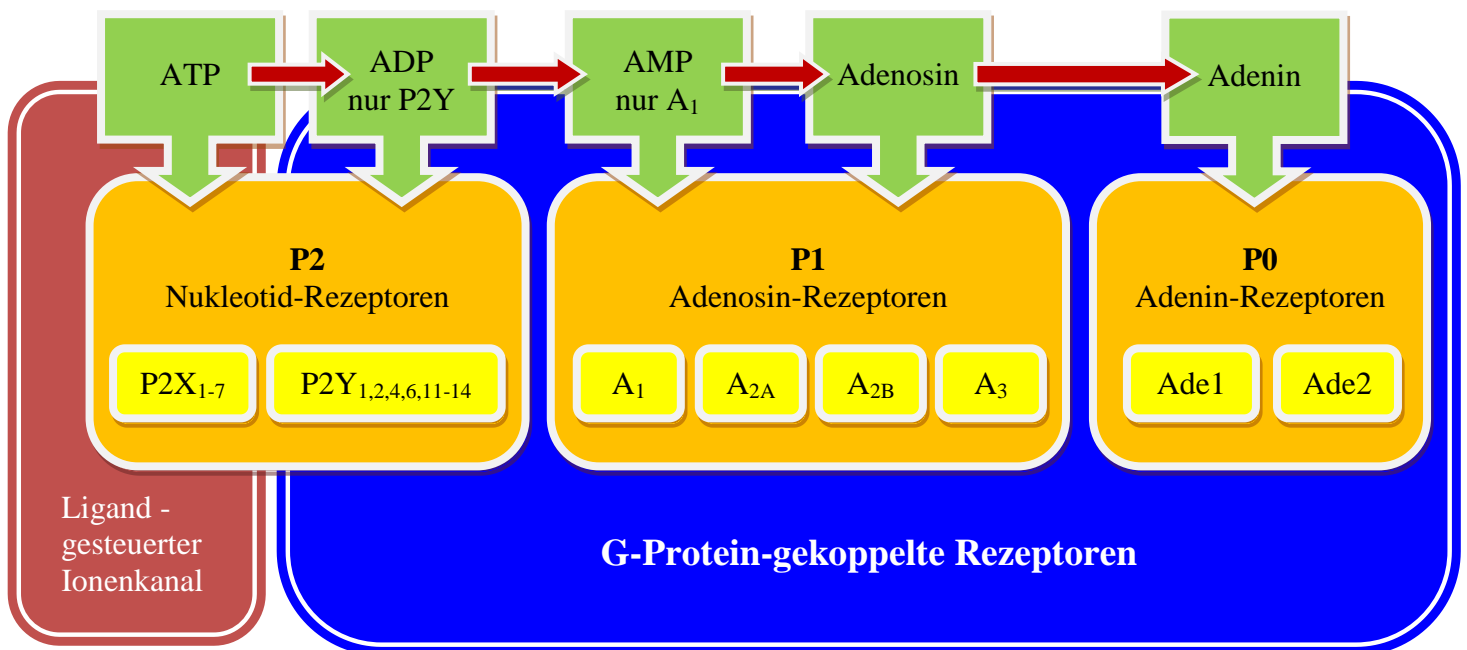


Abbildung 5. Purinerge Rezeptoren mit den physiologischen Agonisten.⁴⁵⁻⁵¹

Extrazelluläres ATP kann durch Enzyme wie die Ecto-Nucleosidtriphosphat Diphosphohydrolase (E-NTPDase) zu ADP und AMP abgebaut werden (siehe Abbildung 6). Dabei aktiviert ATP sowohl P2X- als auch P2Y-Rezeptoren. Nach der Hydrolyse von ATP durch E-NTPDase 2 (CD39L1) zu ADP kann der Ligand nur noch an P2Y-Rezeptoren binden. ADP kann wiederum durch E-NTPase 1 (CD39) zu AMP abgebaut werden.^{52, 53} Dieses AMP scheint an den A₁-Rezeptor zu binden und diesen zu aktivieren.⁵¹ Der Abbau von AMP zu Adenosin, welches an die P1-Rezeptoren bindet, wird durch die Ecto-5'-Nucleotidase (CD73) katalysiert. Eine Spaltung der nukleosidischen Bindung des Adenosins führt dann zum Adenin, welches an die P0-Rezeptoren binden kann. Adenosin kann aber auch über Transporter in den intrazellulären Bereich gelangen und dort durch Adenosin-Kinasen zu AMP phosphoryliert werden.^{52, 53}

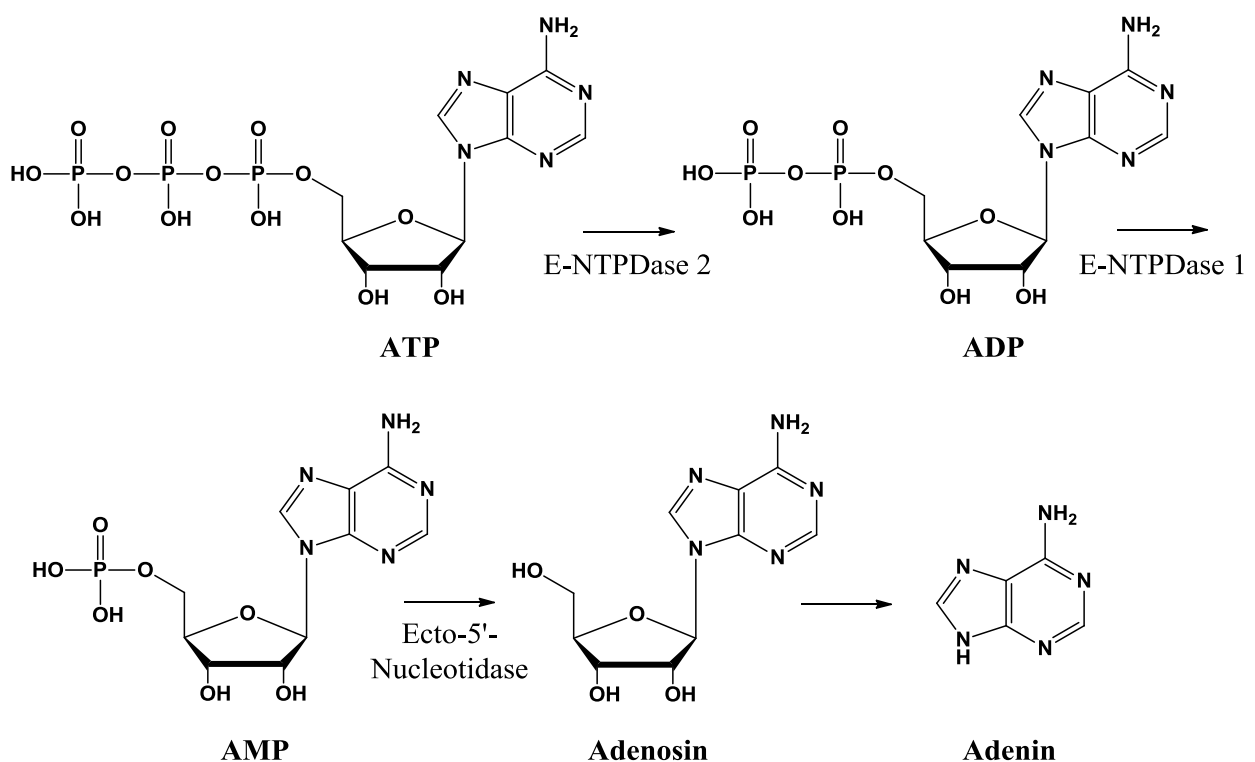


Abbildung 6. Agonisten von purinergen Rezeptoren: Abbau von ATP über ADP, AMP und Adenosin zu Adenin.

1.1.3 Pharmazeutische Bedeutung von G-Protein-gekoppelten Rezeptoren

In Deutschland sind laut der Roten Liste Online 7002 Arzneimittel mit 2277 verschiedenen Wirkstoffen auf dem Markt (Stand: August 2012).⁵⁴ Diese Wirkstoffe haben verschiedene Zielstrukturen (Targets) im menschlichen Körper, welche hauptsächlich Proteine sind. Abbildung 7 zeigt die Targets der auf dem Markt befindlichen Arzneimittel. Dabei spielen die G-Protein-gekoppelten Rezeptoren zusammen mit den Enzymen eine besonders wichtige Rolle, da diese 77 % aller Zielstrukturen für Wirkstoffe darstellen. Insgesamt wirken ca. 30 % aller Arzneimittel über GPCRs.²⁰

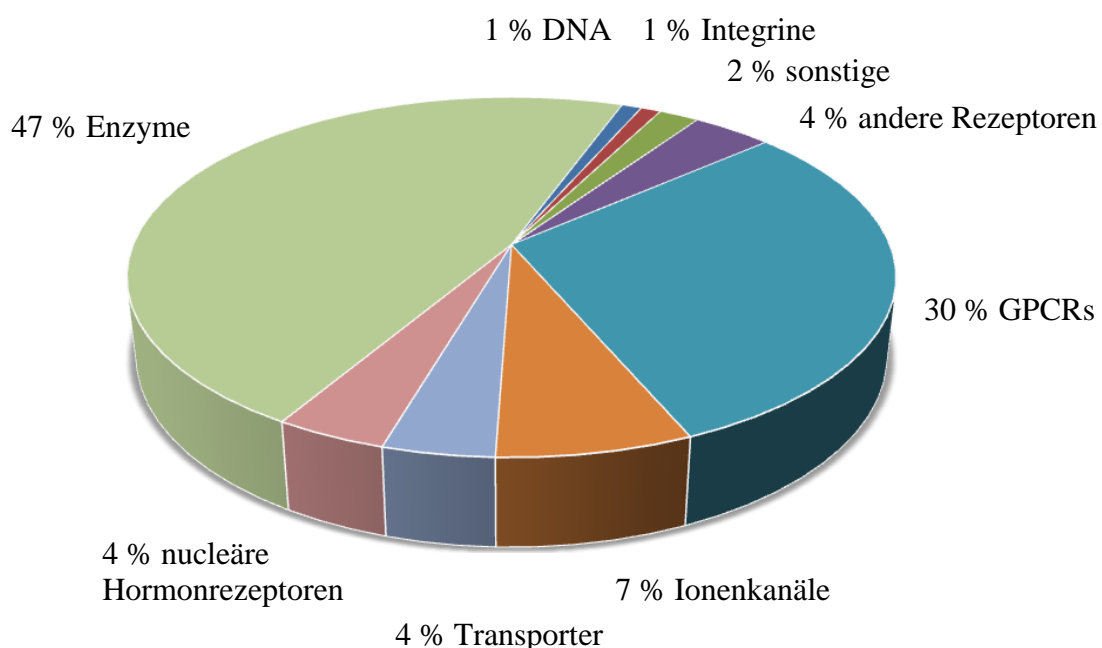


Abbildung 7. Prozentuale Verteilung der Targets für die auf dem Markt befindlichen Arzneimittel modifiziert nach Hopkins (Stand 2002).⁵⁵ Im September 2012 liegt der Anteil der Arzneistoffe mit GPCRs als Target nach Tate immer noch bei 30 %.²⁰

Die pharmazeutische Bedeutung liegt darin, dass zahlreiche Krankheiten mit Wirkstoffen behandelt werden können, die über GPCRs wirken. Die Auswahl reicht von allergischen Reaktionen, Muskelverspannungen, Hypertonie, Durchfall und Schmerzen über Asthma, Herzinsuffizienz und Migräne bis hin zu Schizophrenie, Parkinson und viele Weitere. Die Wirkstoffe binden dabei unter anderem an die GPCRs wie Histamin-Rezeptoren, GABA_B-Rezeptoren, Adrenozeptoren, Opioid-Rezeptoren, Muskarinische Acetylcholin-Rezeptoren, Adenosin-Rezeptoren, Angiotensin-Rezeptoren, Serotonin-Rezeptoren oder Dopamin-Rezeptoren.

1.1.4 Di- und Oligomerisierung von G-Protein-gekoppelten Rezeptoren

Seit wenigen Jahren rückt der Fokus der wissenschaftlichen Forschung bei G-Protein-gekoppelten Rezeptoren auf die Untersuchung von Rezeptoroligomeren. Denn GPCRs können sowohl als Monomere, Dimere, Trimere oder höhere Oligomere vorliegen.⁵⁶ Sowohl für die Grundlagenforschung als auch für die Pharmazie ist diese Erkenntnis besonders wichtig, weil die Pharmakologie gleicher Rezeptoren durch die Oligomerisierung verändert sein kann.⁵⁷ Das Wissen über Rezeptordimere eröffnet die Möglichkeit Wirkstoffe zu entwickeln, die hochspezifisch an zwei Rezeptoren gleichzeitig binden und damit das Risiko von unerwünschten Arzneimittelwirkungen stark senken.⁵⁸

Doch zunächst zu den Dimeren, denn hier wird zwischen Homo- und Heterodimeren unterschieden, also zwischen der Dimerisierung gleicher Rezeptoren und unterschiedlicher Rezeptoren.⁵⁹ Die Dimerisierung wurde grundsätzlich sowohl bei DNA bindenden Rezeptoren als auch bei den membranständigen Rezeptoren, wie bei den GPCRs, beobachtet.^{60, 61} Die Bildung dieser Rezeptor-Komplexe findet je nach Rezeptor und Gewebe entweder im endoplasmatischen Retikulum/Golgi statt oder Ligand-induziert in der Zellmembran.⁶² Bei letzt genanntem wirkt der Ligand als Initiator für die Dimerisierung, allerdings sind diese transienten Interaktionen zwischen den GPCRs weitestgehend unaufgeklärt.⁶³ Die Dimerisierung kann Einflüsse auf die Ligandenerkennung, Rezeptoraktivierung, Signaltransduktion, Rezeptorregulation (Internalisierung) und die Fluidität der Zellmembran haben.⁶³ Die Affinität eines Liganden zu einem Dimer verglichen mit einem Monomer kann sich stark unterscheiden. Zur Aktivierung der Dimere können auch Antikörper dienen, die an beiden Rezeptoren gleichzeitig binden oder Antagonisten, welche an Antikörpern gebunden sind und somit die Dimerisierung auslösen und direkt aktivieren.⁶⁴ Durch eine höhere Variation an Bindungsstellen können möglicherweise mehr und unterschiedliche Liganden binden. Im Vergleich zu einem Monomer zeigt ein Dimer veränderte Distanzen zu den einzelnen Untereinheiten, welches wiederum als Aktivierungssystem genutzt werden kann.⁶³ Durch Kreuzphosphorylierungen eines Dimers kann die Aktivierung der Rezeptoren ebenfalls beeinflusst werden.⁶⁵ In einigen GPCRs der Klasse C konnte die Dimerisierung durch kovalente Disulfidbrücken gezeigt werden.⁶⁶ Die Signaltransduktion kann durch multiple Kontaktpunkte und somit durch eine höhere Spezifität verändert werden. Unterschiedliche Aktivitäten der Dimeruntereinheiten führen zu einer Kreuzregulierung in der Signalverarbeitung. Es kommt ebenfalls zu

einer Kreuzregulierung der Internalisierung der Rezeptoren und damit der Mobilität der Zellmembran.⁶³ Bei einigen Dimeren kann ein Ligand nur an dem einen Rezeptor binden, welcher wiederum den zweiten Rezeptor aktiviert an dem das G-Protein gekoppelt ist.⁶³ Monomere und Dimere können sich zusätzlich auch noch in der Geschwindigkeit der Signalweiterleitung unterscheiden.⁶⁷ Bei der Homodimerisierung handelt es sich um ein Zusammenlagern von zwei Rezeptoren der gleichen Art, wie zum Beispiel bei den Leukotrien B₄ Rezeptorhomodimeren.⁶⁸ Heterodimere bestehen dagegen aus zwei unterschiedlichen Rezeptoren, wie die GABA_{B1} und GABA_{B2} Rezeptoren.⁶⁹ Es wird weiterhin unterschieden zwischen Rezeptorhomomeren und homomeren Rezeptoren bzw. Rezeptorheteromeren und heteromeren Rezeptoren, siehe Abbildung 8.⁷⁰ Bei den Rezeptorhomomeren/Rezeptorheteromeren sind sowohl die Monomere als auch die Dimere funktionstüchtig. Jedoch sind bei den homomeren/heteromeren Rezeptoren die Monomere nicht aktivierbar, sondern nur die Dimere.⁷⁰

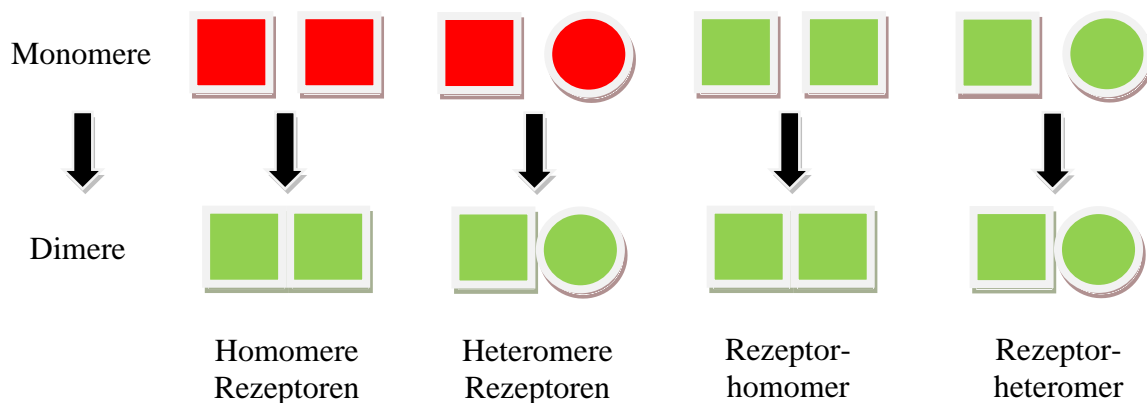


Abbildung 8. Nomenklatur der Rezeptordimere: Homomere/Heteromere Rezeptoren (Viereck/Kreis) sind Rezeptoren die keine Funktion (rot) als Monomere ausüben können, sondern nur als Dimere oder Oligomere (grün). Rezeptorhomomere/Rezeptorheteromere sind als Monomere und Di-/Oligomere funktionstüchtig. Modifiziert nach Millar und Ferre.^{70,71}

Seit 2010 gibt es eine Online-Datenbank über die Oligomerisierung von GPCRs – „The G Protein Coupled Receptor - Oligomerization Knowledge Base Project“ oder kurz GPCR-OKB auf www.gpcr-okb.org.^{72, 73} Im September 2012 sind dort 142 Oligomere gelistet. Tabelle 5 zeigt eine Auswahl über die wichtigsten erforschten GPCRs, die Homo- bzw. Heteromere bilden können.

Tabelle 5. Auswahl an GPCRs die Homo- (links) bzw. Heterooligomere (rechts) bilden können.

Rezeptor	Literatur	Rezeptor	Literatur
A ₁ Adenosin	74	A ₁ – A _{2A} Adenosin	119
A _{2A} Adenosin	75-78	A ₁ – D ₁	120
A ₃ Adenosin	79	A ₁ – mGlu ₁	121
AT ₁ Angiotensin II	80	A ₁ – P2Y ₁	122
AT ₂ Angiotensin II	81	A ₁ – P2Y ₂	123
β ₁ -Adrenoceptor	82	A _{2A} – CB ₁	124
β ₂ -Adrenoceptor	83	A _{2A} – D ₂	125
B2 Bradykinin	84	A _{2A} – D ₃	126
C5a Rezeptoren	85	A _{2A} – mGlu ₅	127
CCR2 Chemokin	86	A _{2A} – D ₂ – CB ₁	124
CCR5 Chemokin	86	A _{2A} – D ₂ – mGlu ₅	127
CXCR4 Chemokin	87	AT ₁ – AT ₂ Angiotensin	128
D ₁ Dopamin	88	AT ₁ – B ₂ Bradykinin	80
D ₂ Dopamin	89, 90	AT ₁ – CB ₁	129
D ₃ Dopamin	91	CB ₁ – D ₂	124
GABA _{B1}	92	CB ₁ – μ-Opioid	130
GABA _{B2}	92	CB ₁ – δ-Opioid	130
Gonadotropin RH	93	CB ₁ – κ-Opioid	130
Hefe α-Faktor Rezeptor	94	CB ₁ – Orexin-1	131
H ₂ Histamin	95	CCR2 – CCR5	86
H ₄ Histamin	96	CCR2 – CXCR4	132
5-HT _{1A} Serotonin	97	CCR5 – CXCR4	133
5-HT _{1B} Serotonin	98	D ₁ – D ₂	134
5-HT _{1D} Serotonin	99	D ₁ – D ₃	135
5-HT _{2A} Serotonin	100	D ₂ – D ₃	136
IgG Hepta	101	D ₂ – D ₅	137
Leukotrien B ₄	68	D ₂ – α _{1B} /β ₁ adrenerg	138
Luteinisierendes Hormon	102	D ₂ – mGlu ₅	127
MT ₁ Melatonin	103	GABA _{B1} – GABA _{B2}	63, 69, 139,
MT ₂ Melatonin	103	GABA _{B1} – mGlu ₁	141
Metabotropic mGlu ₁	104	GABA _{B2} – mGlu ₁	141
Metabotropic mGlu ₂	105	GABA _{B2} – 5-HT _{1A}	142
Metabotropic mGlu ₅	106, 107	GABA _{B2} – OT Oxitocin	143
M ₁ Muskarinischer ACh	108	GABA _{B2} – 5-HT _{1A}	142
M ₂ Muskarinischer ACh	109	5-HT _{1A} – 5-HT _{1B}	142
M ₃ Muskarinischer ACh	110, 111	5-HT _{1A} – 5-HT _{1D}	142
Neuropeptid Y ₁ Rezeptor	112	5-HT _{1B} – 5-HT _{1D}	144
δ-opioid Rezeptor	113	5-HT _{2A} – mGlu ₂	145
κ-opioid Rezeptor	114	5-HT _{2B} – mGlu ₂	146
μ-opioid Rezeptor	115	mGlu ₂ – mGlu ₅	146
SSTR _{1A} Somatostatin	116	MT ₁ – MT ₂ Melatonin	87
SSTR _{1B} Somatostatin	117	M ₂ – M ₃ muskarinisch	147
SSTR _{1C} Somatostatin	116	δ-Opioid – κ-Opioid	114
SSTR _{2A} Somatostatin	117	δ-Opioid – μ-Opioid	115
Thyrotropin	93	δ-Opioid – β ₂ -Adrenoceptor	148
V ₂ Vasopressin	118	κ-Opioid – β ₂ -Adrenoceptor	148

Das Spektrum von Mechanismen durch die Dimerbildung ist breit gefächert. Im Folgenden werden verschiedene, kurze Beispiele mit den entsprechenden unterschiedlichen Mechanismen für Homo- und Heterodimerisierungen bei GPCRs dargestellt. Tabelle 6 gibt einen Überblick über die besonderen Eigenschaften ausgewählter Dimere, die im Text genauer beschrieben werden.

Tabelle 6. Übersicht: Eigenschaften verschiedener Rezeptordimere.

Rezeptor 1	Rezeptor 2	Besonderheit	Literatur
Leukotrien B ₄	Leukotrien B ₄	Aktivierung erfolgt über asymmetrische Konformation	68, 149
mGluR ₅	mGluR ₅	symmetrische Konformation; beide Rezeptoren voll aktivierbar	106
GABA _{B1}	GABA _{B2}	Transaktivierung	63
D ₁	D ₂	Änderung des G-Proteins von Gα _s bzw. Gα _i nach Gα _q	134
D ₂	D ₂	TM4 bildet die transiente Interaktionsfläche	150
D ₄	α _{1B}	D ₄ dimerisiert und inhibiert nur am Tag (nicht in der Nacht) α _{1B} -Rez.	138
D ₄	β ₁	D ₄ dimerisiert und inhibiert nur am Tag (nicht in der Nacht) die β ₁ -Rez.	138
CB ₁	Orexin-1	CB ₁ -Ligand antagonisiert Orexin-1	131
AT ₁	AT ₂	Rezeptor als spezifischer Antagonist	128
Y ₁	Y ₁	höhere Affinität von Liganden zum Dimer als zum Monomer	112
DOR	DOR	TM4/TM5 bildet die Interaktionsfläche	151, 152
DOR	KOR	Ligandabhängige Dimere; Bivalente Liganden	113 152, 153
DOR	MOR	Änderung des G-Proteins von Gα _i nach Gα _z ; Affinitätsverlust von Agonisten	154, 155
MOR	α _{2A}	Inaktivierung des jeweilig anderen Rezeptors	156
MOR	NK1 (Substanz P Rezeptor)	Steigerung der Interaktion von MOR mit β-Arrestin	157

Rezeptor 1	Rezeptor 2	Besonderheit	Literatur
β_2	β_2	Interaktionsfläche an der TM5; Agonisten stabilisieren Dimere; Inverse Agonisten stabilisieren Monomere	83
LH	LH	Transaktivierung	71, 158
N-Formyl- Peptid- Rezeptor	N-Formyl- Peptid- Rezeptor	Zeitliche Darstellung von der Assoziation und Dissoziation von Dimeren	159
5'-HT ₄	5'-HT ₄	Dimer aktiviert G-Protein stärker als Monomer	160
M ₃	M ₃	Interaktionsfläche besteht aus TM1, 2, 4, 5 und 7	110

Die Leukotrien-B₄-Rezeptoren können Homodimere bilden, wobei die Rezeptorkonformation durch G-Proteine kontrolliert wird.¹⁴⁹ Die Aktivierung erfolgt dabei nur über die asymmetrische Rezeptorkonformation. Bei diesen Rezeptoren gibt es keine Transaktivierung, dies bedeutet keine Übertragung des Signals von dem einen Rezeptor auf den nächsten.⁶⁸ mGluR₅-Rezeptorhomodimere müssen dagegen eine symmetrische Konformation einnehmen, um ihren vollen Effekt bei Agonistbindung in beiden Bindungstaschen entfalten zu können.¹⁰⁶ GABA_B-Rezeptoren hingegen funktionieren als Heterodimere, wobei der Ligand an die GABA_{B1}-Einheit bindet und nur die GABA_{B2}-Einheit wiederum das G-Protein aktivieren kann.⁶³ Dieser Vorgang heißt Transaktivierung. Ein anderer Mechanismus ist bei den Dopamin-Rezeptoren zu beobachten. Der Dopamin D₁- bzw. D₂-Rezeptor ist als Monomer ein G α_s - bzw. G α_i -gekoppelter Rezeptor. Die Signalkaskade ändert sich jedoch stark, wenn die D₁- und D₂-Rezeptoren als Heterodimere vorliegen, denn dann sind sie G α_q -gekoppelt wie in Abbildung 9 gezeigt. Die Rezeptoren lassen sich durch den Agonisten SKF 83959 aktivieren.¹³⁴ Für Dopamin-D₂-Rezeptor-Homodimere konnte die vierte Transmembrandomäne (TM 4) als wichtige Kontaktstelle für die Dimerisierung identifiziert werden.¹⁵⁰ Dabei soll die Interaktion nur transient und recht instabil sein.¹⁶¹

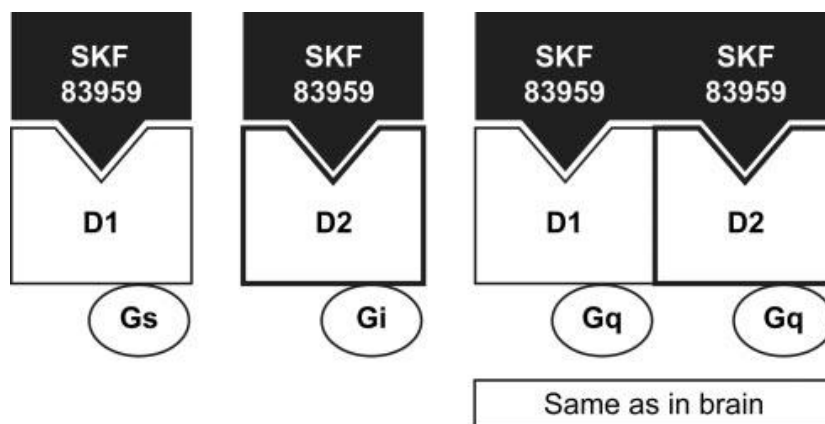


Abbildung 9. D₁- und D₂-Dopamin-Rezeptoren als Heterodimere: SKF 83959 ist ein Agonist an den dargestellten Dopamin Rezeptoren. Die Monomere D₁- bzw. D₂-Rezeptor sind G_{αs}- bzw. G_{αi}-gekoppelt. Das Heterodimer aus D₁- und D₂-Rezeptoren ist dann jedoch G_{αq}-gekoppelt.^{71, 134}

Die Zirbeldrüse ist für die Synthese und Ausschüttung von Melatonin und Serotonin, die den circadianen Rhythmus (Schlaf-Wachrhythmus) regulieren, zuständig. Auch hier spielen Heterodimere eine wichtige Rolle. Denn nachts liegen die adrenergen α_{1B} - und β_1 -Rezeptoren als Monomere vor und fördern die Synthese von Serotonin und Melatonin. Tags über, wenn die D₄-Rezeptoren in der Zirbeldrüse hochreguliert werden, bilden sich α_{1B} -D₄- und β_1 -D₄-Rezeptordimere. Bei diesen Heterodimeren inhibiert der D₄-Rezeptor den jeweiligen adrenergen Rezeptor und die Synthese wird runter reguliert wie Dr. Sergio González González dies 2012 publizierte.¹³⁸ Therapeutisch gesehen haben die Dimere ebenfalls einen Einfluss. Ein Beispiel ist Rimonabant, welches als Antagonist/inverser Agonist am Cannabinoid-1 (CB₁) Rezeptor zur Nicotin/Raucherentwöhnung eingesetzt werden sollte. Als Nebeneffekt konnte die Appetitzügelung festgestellt werden. Dies liegt daran, dass der CB₁-Rezeptor mit dem appetitstimulierenden Orexin-1-Rezeptor dimerisiert, wobei Rimonabant den Orexin-1 Rezeptor dadurch antagonisiert.¹³¹ Ein anderes Beispiel für die Vielfältigkeit von Dimeren bieten die Angiotensin-Rezeptoren. Der Vasopressor Angiotensin II aktiviert die Angiotensin-I- und -II-Rezeptoren. Der Angiotensin-II-Rezeptor kann direkt an den Angiotensin-I-Rezeptor binden und wirkt selbst als Antagonist am Angiotensin-I-Rezeptor. Damit wurde 2001 der erste Rezeptor (GPCR) identifiziert, der selbst als spezifischer Antagonist wirkt.¹²⁸ Bei manchen Dimeren wird durch die Dimerbildung die Konformation der Ligandenbindungsstelle verändert. So zum Beispiel der humane Neuropeptid Y₁ Rezeptor, welcher zu den GPCRs gehört, liegt als Homodimer vor und

weist für den Antagonisten GR231118 eine 250fach erhöhte Affinität zu dem Homodimer als zu dem Monomer auf.¹¹² Dies verdeutlicht die Relevanz von Dimeren. Eine gut untersuchte Rezeptorfamilie ist die der Opioid-Rezeptoren. Die Interaktionsfläche von δ -opioid-Rezeptorhomodimeren konnte von Johnston et al. untersucht werden.¹⁵¹ Dabei zeigten sich die TM 4 und TM5 als besonders wichtig. Hierbei konnte auch eine schnelle Assoziation und Dissoziation von Dimeren festgestellt werden. δ -opioid-Rezeptoren (DOR) können ebenfalls di- bzw. oligomerisieren. Es wurden auch Heterodimere von κ -opioid Rezeptoren (KOR) mit DOR gefunden, aber KOR und μ -opioid-Rezeptoren (MOR) dimerisieren nicht.⁶² Die Menge der Rezeptordimere ist zumindest bei den Opioid-Rezeptoren agonistenabhängig. Je höher die Konzentration an Agonisten ist, desto mehr Monomere und weniger Dimere/Oligomere liegen vor.¹¹³ In Abbildung 10 und der Bildunterschrift ist der komplexe Mechanismus von μ - δ -Rezeptorheteromeren dargestellt und erklärt.¹⁶²

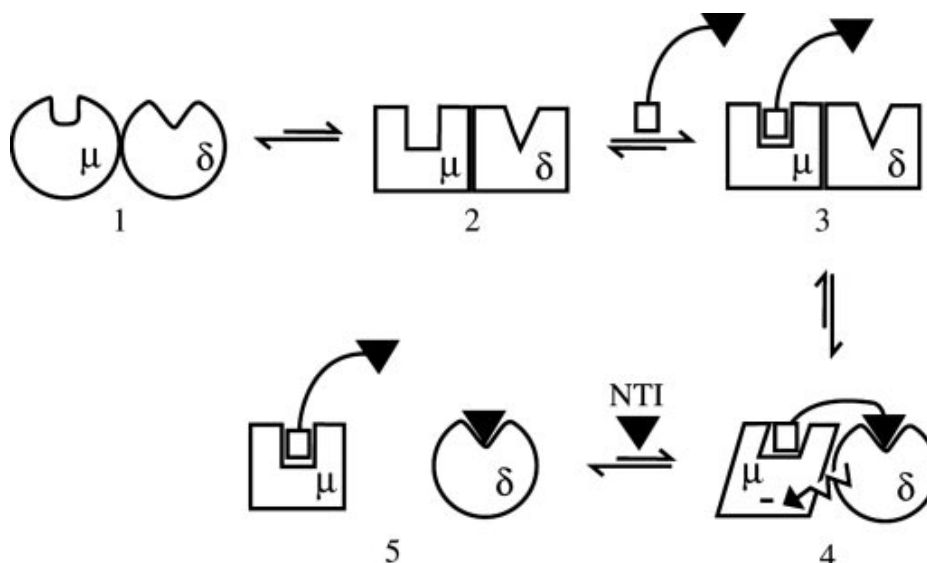


Abbildung 10. μ - δ -Rezeptor-Heterodimer: Inaktiver (1) und aktiver (2) Zustand des μ - δ -Rezeptor-Heterodimers. Ein bivalenter Ligand bindet als Agonist an den μ -Rezeptor (3) und bindet als Begleiterscheinung als Antagonist an den δ -Rezeptor, der wiederum negativ mit dem μ -Rezeptor rückkoppelt (4). Durch Verdrängung mit einem δ -Rezeptor Antagonisten (NTI = Naltrindol) dissoziiert das Rezeptorheteromer (5). Dieses Modell zeigt das Dimere nur zusammen in einer aktiven oder passiven Form vorliegen können, jedoch nicht in einer gemischten Form, es sei denn sie sind durch eine bivalente Ligandenbrücke zusammengehalten.¹⁶²

Abbildung 11 zeigt einen bivalenten Liganden, der aus dem selektiven δ -opioid-Rezeptor Antagonisten Naltrindol und dem selektiven κ -opioid-Rezeptor Antagonisten 5'-Guanidinnaltrindol besteht, welche durch einen Linker miteinander verbunden sind.^{152, 153} Dieser Ligand bindet nun spezifisch an δ - κ -opioid-Heterodimere. Die Größe des Linkers ist abhängig von der Entfernung der beiden Bindungsstellen. Bei μ - μ -bivalenten Liganden soll eine ungefähre Größe des Linkers von 22 Å einen maximalen Effekt bewirken.^{153, 163} Eine C-C-Einfachbindung ist ca. 1,5 Å lang und aufgrund der Winkelung sind ungefähr 18 Atome als Linker nötig und eine Länge von 22 Å zu erreichen. Auf dieser Grundlage wurde der Linker für den bivalenten δ - κ -Antagonisten synthetisiert. Wirkstoffe können nun noch gezielter entwickelt und unerwünschte Arzneimittelwirkungen dadurch möglicherweise reduziert werden.

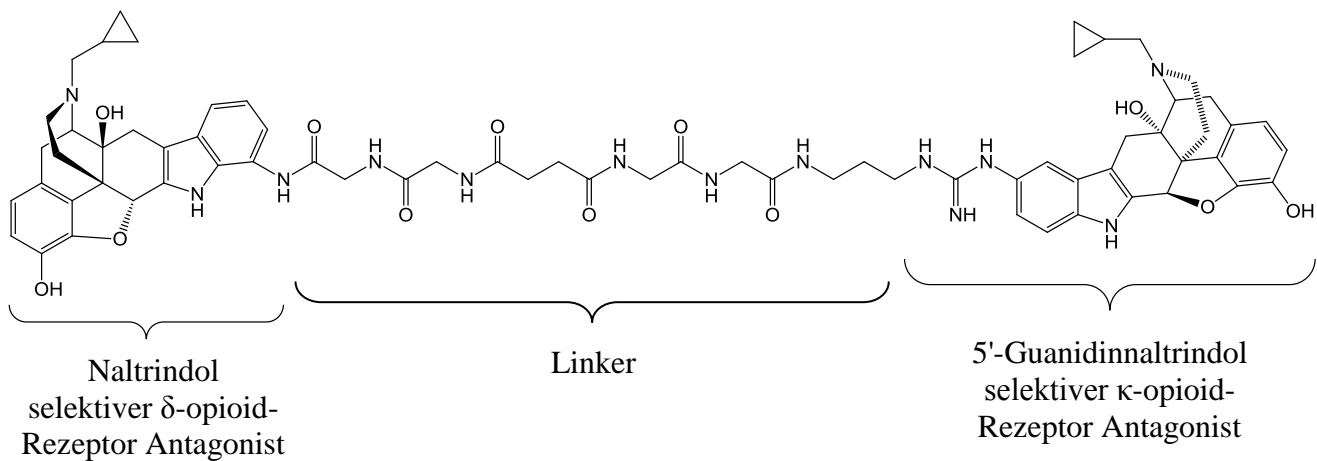


Abbildung 11. Struktur eines bivalenten Antagonisten, der an das δ - κ -opioid-Rezeptor-Heteromer bindet.

Auch die α_{2A} -adrenergen-Rezeptoren dimerisieren mit μ -opioid-Rezeptoren. Bindet Norepinephrin als Ligand an den α_{2A} -adrenergen-Rezeptor oder Morphin an den μ -opioid-Rezeptor, so kommt es in dem Heteromer zu einer Konformationsänderung, sodass der jeweils andere Rezeptor inhibiert wird und zeitweise (500 ms) nicht aktiviert werden kann.¹⁵⁶ μ -opioid-Rezeptor Monomere interagieren geringfügig mit β -Arrestin, aber werden nicht internalisiert. Der Substanz-P-Rezeptor NK1 wird als Monomer nach der Interaktion mit β -Arrestin schon internalisiert. MOR und NK1 bilden ein Heterodimer, welches nach MOR- oder NK1-Ligandenbindung, zu einer erhöhten Aktivität von MOR mit β -Arrestin und die anschließende Internalisierung des Heteromers führt.¹⁵⁷ Der Einfluss von Liganden spielt auch eine Rolle bei den adrenergen Rezeptoren. Homodimere von β_2 -adrenerge Rezeptoren sollen an der

fünften Transmembrandomäne (TM 5) dimerisieren. Ein Peptid der TM 5 soll die Dimerisierung als auch die Aktivierung verhindern. Dabei wurde erforscht, dass Agonisten die Dimere stabilisieren und inverse Agonisten Monomere bevorzugen.⁸³ Es können ebenfalls zwei defekte Rezeptoren miteinander dimerisieren und die Rezeptorfunktion wieder aufnehmen. So konnte beispielsweise ein Luteinisierender Hormon Rezeptor (LH) der zwar Liganden binden kann, aber keine Signale weiterleiten kann, mit einem zweiten LH Rezeptor dimerisieren. Dieser zweite LH Rezeptor hat allerdings keine Bindungsstelle, aber kann die Signale nach Aktivierung des ersten Rezeptors weiterleiten. Dies ist eine Transaktivierung.^{71, 158} Ein weiterer Punkt ist, dass Kasai 2011 erstmals für Rezeptoren eine Assoziation und Dissoziation von Mono- und Dimeren aufnehmen konnte. Dies hat er am Beispiel des N-Formyl-Peptid-Rezeptors, ein GPCR, gezeigt. Dabei bildeten sich alle 150 ms Dimere und alle 91 ms dissoziierten Dimere in Monomere.¹⁵⁹ Bei den von Chen durchgeführten Experimenten zeigt das β 2-adrenerge-CCK-Heterodimer eine weitestgehend vollständige Dissoziation in die Monomere nach Ligandenzugabe nach 2 bis 10 Minuten.¹⁶⁴ Besonders interessant ist der Einfluss von dem GPCR auf das G-Protein. Der Serotonin Typ 4 Rezeptor aktiviert ein G-Protein als Dimer stärker als ein Monomer, obwohl nur eine Untereinheit zur gleichen Zeit ein G-Protein aktivieren kann.¹⁶⁰ Auf dem Gebiet der Muscarin-Rezeptoren insbesondere der M_3 -Rezeptoren konnten neue Erkenntnisse über Dimere und Oligomere herausgefunden werden.¹¹⁰ Um die Interaktionsfläche des bekannten M_3 -Homodimers zu untersuchen, wurden 70 Aminosäuren einzeln in Alanin ausgetauscht und die Mutanten mit Radioligand-Bindungsstudien und funktionellen Experimenten untersucht. Zusätzlich wurde das Dimerverhalten mittels BRET erforscht. Offensichtlich ist die Dimerbildung aber unabhängig von einzelnen Strukturelementen und sogar ganzer Transmembrandomänen. Es konnten aus acht unterschiedlichen Regionen verteilt auf die TM Regionen 1, 2, 4, 5 und 7 wichtige Aminosäuren im Zusammenspiel identifiziert werden.¹¹⁰ Ein neuer wichtiger Schritt ist die computerbasierte Berechnung und damit eine Vorhersage von Oligomeren auf dem Gebiet der GPCR.¹⁶⁵ Mögliche Dimere und Interaktionsflächen könnten so zielgerichteter (als derzeit durchgeführt) mit experimentellen Methoden untersucht werden. Selbstverständlich können computerbasierte Aussagen keine Experimente ersetzen, es kann jedoch eine sehr hilfreiche Unterstützung darstellen. Ein weiterer Schritt der Dimerforschung wäre, wenn die Experimente nicht nur 'in vivo', sondern auch 'in vivo' durchgeführt werden würden.¹⁶⁶

Oligomere

Die Zusammenlagerung von mindestens zwei Rezeptoren wird als Oligomerisierung bezeichnet. Bisher konnten zwei Trimere und drei Tetramere nachgewiesen werden. Zunächst konnte die Dimerisierung zwischen dem Adenosin-A_{2A}-Rezeptor mit dem Cannabinoid-CB₁-Rezeptor festgestellt werden.¹²⁴ Getrennt davon wurde die Dimerisierung von A_{2A}- mit dem Dopamin-D₂-Rezeptor und die CB₁-D₂ Heterodimerisierung beobachtet.¹²⁵ Daraus entwickelte sich ein Experiment zur Untersuchung eines Komplexes aus den drei Rezeptoren A_{2A}-CB₁-D₂ in lebenden Zellen.¹²⁴ Die stöchiometrischen Verhältnisse bei der Oligomerisierung von Rezeptoren sind jedoch weitestgehend unbekannt. Cabello et al. konnten den Nachweis für die Oligomerisierung von Adenosin-A_{2A}-, Cannabinoid-CB₁- und metabotropen Glutamat mGlu₅-Rezeptoren erbringen.¹²⁷ Aufgrund der Rezeptorkombinationen besteht die Vermutung, dass auch die Rezeptoren A_{2A}-CB₁-D₂-mGlu₅ ein Tetramer bilden.¹⁶⁷ Die Methoden zur Erforschung von diesen Rezeptor-Komplexen begrenzt sich derzeit auf Kombinationen von Biolumineszenz-Resonanz-Energie-Transfer (BRET) und Fluoreszenz-Resonanz-Energie-Transfer (FRET).

μ-opioid Rezeptoren und δ-opioid Rezeptoren können nicht nur Dimere bilden, sondern sogar auch Tetramere, die aber ab einer gewissen Konzentration des Liganden Morphin wieder dissoziieren. Die 2011 veröffentlichte Studie konnte mittels FRET auf diese Ergebnisse schließen lassen.¹⁶⁸ Das μ-opioid-Rezeptor-Homotetramer mit der publizierten Röntgenkristallstruktur wurde bereits in Kapitel 1.1.1 beschrieben.³³

GABA_B Rezeptoren liegen als Heterodimere vor, wobei der Ligand an die GABA_{B1}-Einheit bindet und nur die GABA_{B2}-Einheit wiederum das G-Protein aktivieren kann. GABA_{B1} und GABA_{B2} liegen aber auch jeweils als Homodimere vor. Es konnte nun eine Kombination aus zwei GABA_{B1}-Rezeptoren und zwei GABA_{B2}-Rezeptoren als Tetramer identifiziert werden. Dabei sind die GABA_{B2}-Rezeptoren weiter voneinander entfernt und die GABA_{B1}-Rezeptoren liegen relativ eng zusammen. Dieses Tetramer hat einen inhibitorischen Effekt, denn wenn das Tetramer gespalten wird, so steigt die Aktivität der Rezeptoren deutlich an.^{63, 140, 169, 170}

1.2 Adenosin-Rezeptoren

Die Familie der Adenosin-Rezeptoren lässt sich in die vier Subtypen A_1 , A_{2A} , A_{2B} und A_3 einteilen. Da diese Rezeptoren zahlreiche physiologische Funktionen übernehmen, sind sie auch in verschiedenen Krankheitsbildern involviert. Daher sind Adenosin-Rezeptoren interessante Targets für die Pharmazie. Nachfolgend werden die Adenosin-Rezeptoren, insbesondere die A_{2A} - und A_{2B} -Rezeptoren, genauer charakterisiert. Bei dem Aufbau der vier Adenosin-Rezeptoren zeigen der humane A_1 - und A_3 -Rezeptor eine Sequenzhomologie von 49 % und der A_{2A} - mit dem A_{2B} -Rezeptor eine Homologie von 59 % auf.¹⁷¹ Insgesamt besteht der A_{2A} -Rezeptor aus 412 Aminosäuren mit einer molekularen Masse von 46 kDa und der A_{2B} -Rezeptor aus 332 Aminosäuren mit 36 kDa. Der endogene Agonist ist das Adenosin, welches gleichzeitig der Namensgeber für diese Rezeptorfamilie ist. Extrazelluläre basale Adenosinkonzentrationen liegen bei 30 bis 300 nM, welche bei Sauerstoffmangel, Entzündungsreaktionen, Ischämie, Nerven- oder Muskelzellaktivität höher als 10 bis 15 μ M ansteigen können.^{172, 173} Aufgrund der Fähigkeit des A_{2A} -Rezeptors im Gehirn schon bei Adenosinkonzentrationen von 0,1 bis 1 μ M die cAMP-Produktion zu stimulieren, ganz im Gegensatz zu dem A_{2B} -Rezeptor der ca. 10 bis 15 μ M Adenosin benötigt, gilt der A_{2A} -Rezeptor als hoch affiner und der A_{2B} -Rezeptor als niedrig affiner Rezeptor.^{173, 174}

1.2.1 Physiologische Funktionen von Adenosin-Rezeptoren

Die Aktivierung von Adenosin-Rezeptoren führt zu einer komplexen intrazellulären Signaltransduktion, die je nach Rezeptorsubtyp und Zelltyp unterschiedlich sein kann. Abbildung 12 und Tabelle 7 zeigen die vier Adenosin-Rezeptorsubtypen und die Signalkaskade nach deren Aktivierung. Dabei wird zunächst rezeptorspezifisch über das entsprechende G-Protein das Effektorprotein aktiviert bzw. inhibiert. Die A_1 - und A_3 -Rezeptoren inhibieren über die G_i -Proteine die Adenylatcyclase und hemmen dadurch die cAMP-Produktion. Über die G_q -Proteine aktivieren sowohl der A_1 -, A_3 - als auch der A_{2B} -Rezeptor die Phospholipase C, welches membranständiges Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat in Inositol-1,4,5-triphosphat und Diacylglycerol spaltet. Dies führt wiederum zur Erhöhung der intrazellulären Calciumkonzentration und Aktivierung weiterer Zielproteine, wie der Proteinkinase C und den MAP-Kinasen (Mitogenaktiviertes-Protein).¹⁷¹ Der A_3 -Rezeptor kann direkt über Rho A die Phospholipase D und nachfolgend die Proteinkinase C aktivieren.¹⁷⁵ Letzt endlich werden je nach Zelltyp bestimmte Gene, und damit die Transkription von Proteinen, reguliert. In

Herzmuskelzellen und Neuronen kann der A_1 -Rezeptor K^+ -Ionenkanäle aktivieren und bestimmte Ca^{2+} -Ionenkanäle inhibieren.¹⁷¹ Die A_{2A} - und A_{2B} -Rezeptoren vermitteln über G_s -Proteine die Aktivierung der Adenylatcyclase, welche darauf intrazellulär ATP zu cAMP abbaut. Der sekundäre Botenstoff cAMP kann nun die cAMP-abhängige Proteinkinase A (PKA) aktivieren. Dies führt zur Phosphorylierung von Funktionsproteinen, die je nach Zelltyp unterschiedliche Auswirkungen auf das entsprechende Organ haben können.¹⁷⁶ Alle vier Adenosin-Rezeptor-Subtypen agieren über den Mitogen-aktivierten-Proteinkinasen-Weg (MAPK), welche eine Rolle beim Zellwachstum, der Differenzierung, dem Überleben bzw. der Apoptose spielen.¹⁷¹

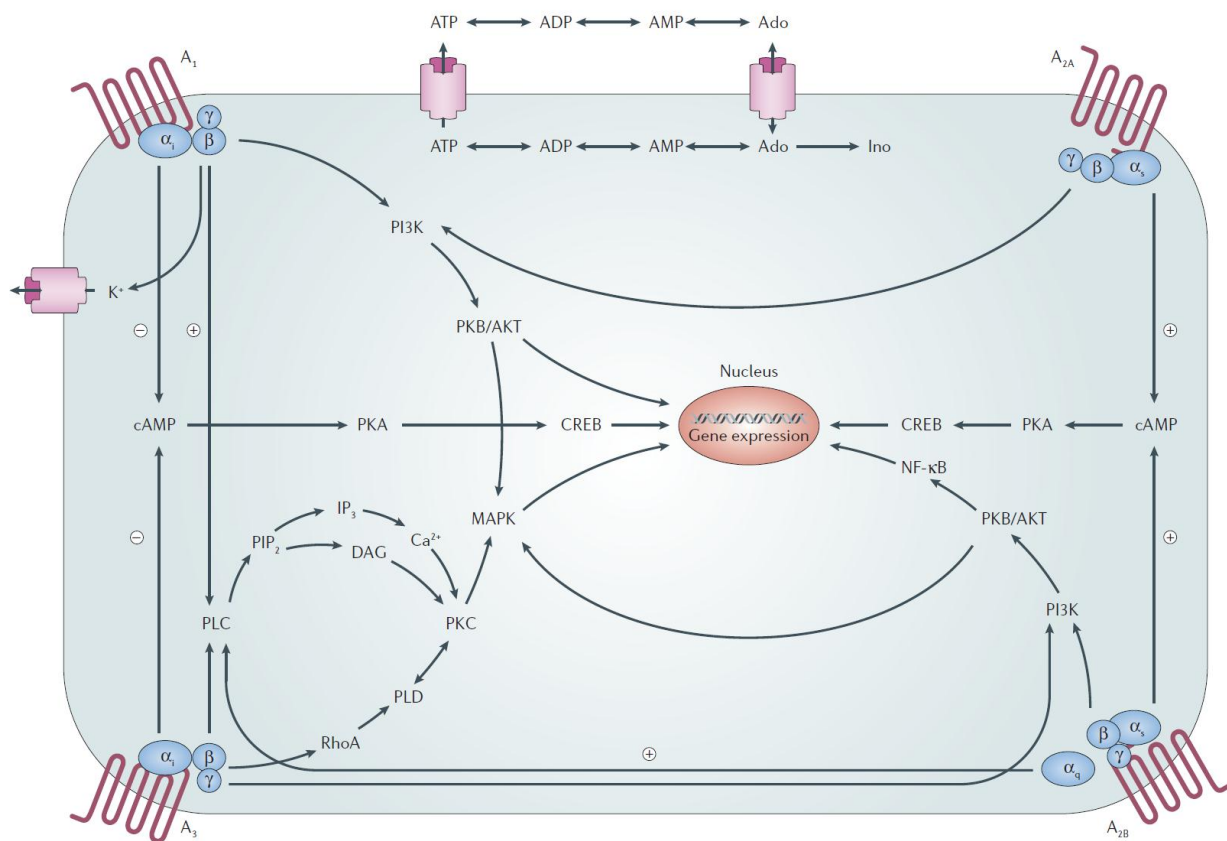


Abbildung 12. Signaltransduktion der Adenosin-Rezeptoren. Die Aktivierung von A_1 - und A_3 -Rezeptoren inhibiert die Adenylatcyclase (AC) über G_i -Proteine, welches die cAMP-Produktion hemmt. Zusätzlich wird, wie auch beim A_{2B} -Rezeptor, die Phospholipase C (PLC) über G_q -Proteine aktiviert und dies führt zu höheren Konzentrationen von Inositol-1,4,5-trisphosphat (IP_3) und Diacylglycerol (DAG). Die Aktivierung von A_{2A} - und A_{2B} -Rezeptoren führt zur gesteigerten Aktivität der AC über G_s -Proteine, welches in einer Steigerung der intrazellulären cAMP-Konzentration führt. MAPK: Mitogen-aktivierten-Proteinkinasen-Weg; CREB, cAMP Response Element Binding Protein; PI3K, Phosphatidylinositol 3-Kinase; PIP₂, Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat; PK, Proteinkinase; PLD, Phospholipase D; NF-κB, nuclear factor-κB.¹⁷¹

Tabelle 7 zeigt übersichtlich mit welchen spezifischen G-Proteinen die verschiedenen Adenosin-Rezeptor-Subtypen gekoppelt sind und über welche Effektorproteine ein Effekt vermittelt wird.

Tabelle 7. Effektorsysteme der Adenosin-Rezeptoren.^{46, 175}

Adenosin-Rezeptor	G-Protein	Effektorprotein	Effekt
A₁	G _{i1,2,3}	AC	cAMP ↓
	G _{q/11}	PLC	IP ₃ /DAG ↑
A_{2A}	G _s	AC	cAMP ↑
	G _{olf}	AC	cAMP ↑
	G _{15/16}		IP ₃ ↑
A_{2B}	G _s	AC	cAMP ↑
	G _{q/11}	PLC	IP ₃ /DAG ↑
A₃	G _{i2,3}	AC	cAMP ↓
	G _{q/11}	PLC	IP ₃ /DAG ↑
		Rho A	PLD

AC: Adenylatcyclase; PLC: Phospholipase C; cAMP: cyclisches Adenosinmonophosphat; IP₃: Inositol-1,4,5-triphosphat; DAG: Diacylglycerol; PLD: Phospholipase D

Die vier Subtypen von Adenosin-Rezeptoren sind in den verschiedenen menschlichen Zellen unterschiedlich stark exprimiert. In Tabelle 8 ist eine Übersicht über die verschiedenen Expressionslevel der Adenosin-Rezeptoren in den menschlichen Organen.⁴⁶ Die A₁-Rezeptoren sind ubiquitär vertreten. Besonders stark sind diese im Gehirn, vor allem dem Präfrontalen Cortex, Cerebellum und dem Hippocampus, sowie dem Rückenmark, Auge, Nebenniere und Vorhof exprimiert. Der A_{2A}-Rezeptor befindet sich hauptsächlich in der Milz, Thymus, Leukozyten (Lymphozyten und Granulozyten), Thrombozyten, Striatopallidale GABA-Neuronen und dem Olfaktorischen Bulbus. Der A_{2B}-Rezeptor ist lokalisiert im Cecum (Blinddarm), Colon, Harnblase, glatte Muskelzellen, Lunge, Endothelzellen sowie Macrophagen und der A₃-Rezeptor in den Testes und den Mastzellen.⁴⁶ In einigen Geweben bzw. Zelltypen, wie z.B. in der Lunge, den Blutgefäßen, dem Herzen oder dem Gehirn (Hypophyse), sind sowohl A_{2A}- als auch A_{2B}-Rezeptoren gemeinsam exprimiert. Sie sind daher interessant für diese Arbeit in Bezug auf eine mögliche Heterodimerisierung dieser beiden Adenosin-Rezeptoren. Die Expression der Rezeptoren an der Zelloberfläche ist ein

hochdynamischer Prozess, der signalabhängig durch metabolische und inflammatorische Einflüsse sowie durch Adenosin schnell hoch oder runter reguliert werden kann.¹⁷⁷ So wird die Expression der A_{2B}-Rezeptoren unter Hypoxie und bei entzündlichen Prozessen stark gesteigert.¹⁷⁸ Unter hypoxischen Bedingungen bindet der Transkriptionsfaktor HIF-1 α an die Promotorregion des A_{2B}-Rezeptor-Gens und erhöht damit die Expressionsrate des Rezeptors.¹⁷⁹ Eine gesteigerte A_{2B}-Rezeptor-Expression konnte während der Hypoxie bei dentritischen Zellen, glatten Muskelzellen und Fibroblasen ermittelt werden.¹⁷⁷ Bei erhöhter Stoffwechselaktivität, Hypoxie oder inflammatorischen Prozessen benötigen die Zellen viel Energie, die durch den Abbau von ATP über ADP und AMP zu Adenosin, bereit gestellt wird. Die so gestiegene Konzentration an Adenosin führt zur Aktivierung der Adenosin-Rezeptoren. Des Weiteren wird die Expression von A_{2B}-Rezeptoren durch inflammatorischen Faktoren wie dem bakteriellen Produkt Lipopolysaccharid, Zytokinen TNF- α , Interleukinen IL-1 β , IFN- γ oder freien Radikalen stark erhöht.¹⁷⁷

Tabelle 8. Expression der Adenosin-Rezeptoren im Menschen.^{46, 177, 178, 180}

Rezeptor Subtyp	Hohes Expressionslevel	Mittleres Expressionslevel	Geringes Expressionslevel
A ₁	Gehirn (Cortex, Cerebellum, Hippocampus), Hinterhorn des Rückenmarks, Auge, Nebenniere, Vorhof	andere Hirnregionen, Skelettmuskulatur, Leber, Niere, Fettgewebe, Speicheldrüse, Ösophagus, Colon, Antrum, Testes, Herz	Lunge, Bronchien, Pankreas
A _{2A}	Striatum, Milz, Thymus, Leukozyten (Lymphozyten und Granulozyten), Thrombozyten, Striatopallidale GABA-Neuronen, Olfaktorischer Bulbus	Herz, Lunge, Blutgefäße	andere Hirnregionen
A _{2B}	Cecum (Blinddarm), Colon, Harnblase, glatte Muskelzellen, Endothelzellen, Macrophagen	Lunge, Blutgefäße, Auge, Herzmuskelzellen, Mastzellen, Lymphozyten, Dentritische Zellen, Fibroblasten, Neutrophile Granulozyten	Fettgewebe, Nebenniere, Gehirn, Niere, Leber, Ovarien, Hypophyse, peniles Gewebe
A ₃	Testes, Mastzellen	Gehirn (Cerebellum, Hippocampus), Lunge, Zirbeldrüse	Schilddrüse, Gehirn, Nebenniere, Milz, Leber, Niere, Herz, Darm, Testes

Die Adenosin-Rezeptoren in den unterschiedlichen Organen übernehmen wichtige physiologische Funktionen. So ist der A₁-Rezeptor (Gehirn und Auge) zusammen mit dem A_{2A}-Rezeptor unter anderem zuständig für die Schlafinduktion.¹⁸¹ Im Bereich des Herzens und des Gehirns führt die Aktivierung von A₁-Rezeptoren zu antiischämischen Effekten.¹⁷¹ Der A_{2A}-Rezeptor spielt hauptsächlich bei antiinflammatorisch und immunsuppressiven Effekten, die durch Stress, Verletzung oder Infektionen herbeigeführt wurden, eine wichtige Rolle.¹⁸² Dabei kommt es durch die erhöhte Adenosinkonzentration zur Aktivierung von A_{2A}-Rezeptoren, welche über die intrazelluläre Bildung von cAMP und Phosphorylierungen bestimmter Zielstrukturen, die Gene für proinflammatorische Faktoren, wie NF-κB, supprimieren.¹⁸² A_{2A}-Rezeptoren sind außerdem auf der Oberfläche von Thrombozyten zu finden.¹⁸³ Eine Aktivierung dieser A_{2A}-Rezeptoren führt via Adenylatcyclase zur Verhinderung der Thrombozytenaggregation.^{184, 185} Zusätzlich moduliert der A_{2A}-Rezeptor cardiovaskuläre Funktionen über ERK1/2 Signale in der ventrolateralen Medulla nach einer akuten myocardialen Ischämie.¹⁸⁶ Eine besonders wichtige Funktion hat der A_{2A}-Rezeptor im Striatum, wo dieser über Dimerbildung den Dopamin-D₂-Rezeptor beeinflusst. Diese kann Auswirkungen auf bestimmte Krankheitsbilder wie Parkinson haben (siehe Kapitel 1.2.2).^{187, 188} In Abhängigkeit vom Zelltyp kann der Adenosin-A_{2B}-Rezeptor sowohl pro- als auch antiinflammatorische Effekte vermitteln.¹⁸⁹ Die durch Adenosin aktivierten A_{2B}-Rezeptoren an der Oberfläche von Mastzellen, glatten Muskelzellen, dem Lungenepithel, auf Fibroblasten, Endothelzellen und Macrophagen führen alle über eine ähnliche Signalkaskade innerhalb der Zelle zur Bildung und Ausschüttung von Interleukinen, welche proinflammatorisch wirken.¹⁹⁰ Am Beispiel der Mastzellen ist diese Signalkaskade in Abbildung 13 gezeigt. Wobei die Mastzellen bei Asthma und allergischen Reaktionen eine Rolle spielen. Nach der Bindung von Adenosin an den A_{2B}-Rezeptor wird dieser aktiviert und gibt ein Signal an die G_s- bzw. G_q-gekoppelten Proteine, welche über die Bildung von zyklischem Adenosinmonophosphat (cAMP) bzw. via Phospholipase C β (PLCβ) und Calcium (Ca²⁺) den 'nuclear factor of activated T cells' (NFAT) aktiviert. NFAT startet die Transkription von Interleukin 4 (IL-4). Der A_{2B}-Rezeptor aktiviert aber nicht nur die G-Proteine, sondern auch über die dritte intrazelluläre Schleife die MAP Kinase p38 (Mitogen aktiviertes Protein), welches direkt die Transkription von inflammatorischem Interleukin IL-8 fördert. Der A₃-Rezeptor ist ebenfalls auf Mastzellen in proinflammatorische Prozesse, wie die Förderung von Interleukinen, involviert.¹⁹¹

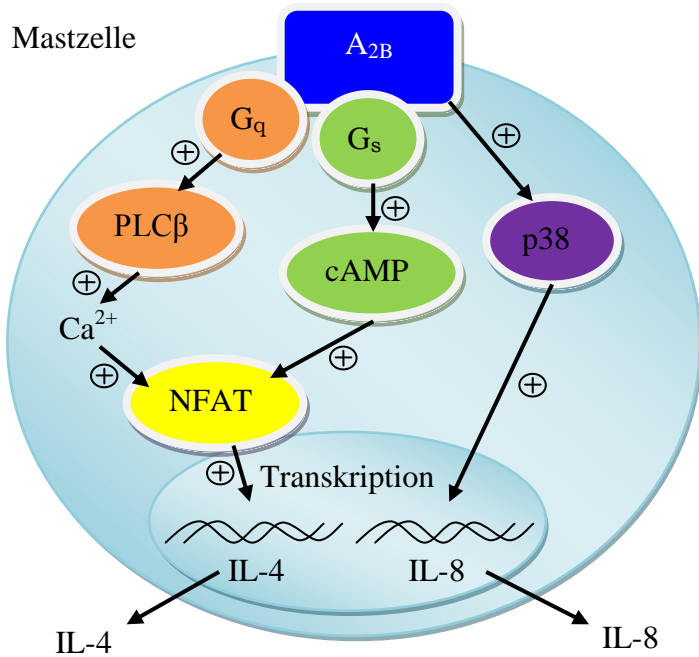


Abbildung 13. Signalkaskade bei der Aktivierung von Adenosin-A_{2B}-Rezeptoren auf Mastzellen modifiziert nach Hasko.¹⁹⁰ Der aktivierte A_{2B}-Rezeptor führt über G_s- via cAMP bzw. G_q-Protein via PLCβ (Phospholipase C β) zur Stimulation von NFAT (nuclear factor of activated T cells), welches die Transkription von Interleukin-4 fördert. Der A_{2B}-Rezeptor aktiviert die Transkription von IL-8 über die MAP-Kinase p38 (p38).

1.2.2 Pharmazeutische Bedeutung von Adenosin-Rezeptoren

Die Adenosin-Rezeptoren spielen bei vielen verschiedenen Krankheiten eine Rolle und bieten sich daher als Target für neue Wirkstoffe an. Derzeit sind vier Arzneimittel auf dem Markt, die primär über Adenosin-Rezeptoren wirken. Der endogene Agonist Adenosin ist seit 1997 auf dem deutschen Markt. Es ist ein koronarer Vasodilatator zur intravenösen Anwendung in der Myokardperfusionsszintigraphie bei Patienten, die nicht ausreichend belastungsfähig sind oder bei denen ein Belastungstest nicht angezeigt ist.^{54, 192} Außerdem wird Adenosin bei paroxysmaler supraventrikulärer Tachykardie angewendet.¹⁹³ Der in den USA 2008 eingeführte A_{2A}-Rezeptor Agonist Regadenoson (Lexiscan®) kam 2011 unter dem Namen Rapiscan® auch auf den deutschen Arzneimittelmarkt. Der Wirkstoff ist ein selektiver koronarer Vasodilatator, der in der Diagnostik eingesetzt wird.¹⁹⁴ Er wird als pharmakologischer stressauslöser bei der Myokardperfusionsszintigraphie mit Radionukliden bei Erwachsenen, die nicht ausreichend körperlich belastet werden können, eingesetzt. Regadenoson bewirkt

selektiv eine koronare Vasodilatation und einen verstärkten koronaren Blutfluss an gesunden Koronararterien (hat jedoch kaum einen Einfluss auf stenosierte Arterien) dadurch können radioaktive Arzneimittel besser vom gesunden Myokard aufgenommen werden als vom Stenosierten.¹⁹⁵ Mit Hilfe der MDCT (multidetector computed tomography) kann eine quantitative 3D-Bildanalyse zur Detektion von koronaren Herzkrankheiten unter dem Einsatz von Regadenoson durchgeführt werden.¹⁹⁶ Die beiden Wirkstoffe Coffein und Theophyllin, welche zu der Gruppe der Xanthin-Derivate gehören, sind nicht-selektive Antagonisten an den Adenosin-Rezeptoren (A_1 , A_{2A} und A_{2B}) und ebenfalls auf dem deutschen Arzneimittelmarkt erhältlich.^{193, 197} Coffein wird eingesetzt zur kurzfristigen Beseitigung von Ermüdungserscheinungen und Förderung der psychischen Leistungsbereitschaft und -fähigkeit.¹⁹² Zudem befindet es sich außerdem in den Klinischen Studien (Phase III) zur Behandlung von ischämischen Herzerkrankungen.¹⁹⁸ Während Theophyllin bei der Behandlung von Asthma bronchiale und der chronisch obstruktiven Atemwegserkrankung (COPD) eingesetzt wird. Dabei wirkt Theophyllin als Antagonist an den Adenosin-Rezeptoren und führt zur Hemmung der Synthese von Entzündungsmediatoren, sowie der Induktion der Apoptose und zur Translokation von intrazellulärem Calcium. Dadurch kommt es zu einer Relaxation der glatten Bronchialmuskulatur und der Pulmonalgefäße.¹⁹² Derzeit werden 37 Wirkstoffe, die als Agonisten oder Antagonisten an Adenosin-Rezeptoren binden und einen Effekt erzielen, in Klinischen Studien untersucht.^{193, 198} Dabei stehen hauptsächlich Krankheiten wie Asthma, Parkinson, Entzündliche Krankheiten, Diabetes, Glaukom und Rheumatoide Arthritis im Vordergrund der Untersuchungen.¹⁹³ Tabelle 9 zeigt eine kleine Auswahl der Wirkstoffe, die sich derzeit in den Klinischen Studien befindet. Interessant sind dabei vor allem Wirkstoffe, die bei Krankheiten wirken gegen die noch keine optimale Behandlung mit aktuell verfügbaren Arzneistoffen möglich ist. So wäre zum Beispiel der A_1 -/ A_3 -Agonist IB-MECA bei Glaukom, Rheumatoide Arthritis, Psoriasis und anderen entzündliche Autoimmunerkrankung einsetzbar. Auch der A_{2A} -Antagonist SYN-115 der sowohl bei der Behandlung von Parkinson als auch bei Cocainsucht eingesetzt werden kann gehört dazu. Außerdem sind die Wirkstoffe interessant, die schon relativ weit in den Klinischen Phasen sind, also Phase III, und damit kurz vor der Marktzulassung stehen. Dazu gehören der A_1 -Agonist Tecadenoson, der A_{2A} -Agonist Binodenoson sowie die A_{2A} -Antagonisten Apadenoson und Preladenant. Alle in Tabelle 9 gezeigten A_{2B} -Antagonisten wirken gegen Asthma, COPD oder andere entzündlichen Krankheiten und

Tabelle 9. Adenosin-Rezeptor-Liganden in Klinischen Studien (Stand: 2012).

Wirkstoff	Adenosin-Rezeptor-Subtyp	Ligand	Krankheit	Klinische Phase	Literatur
IB-MECA (CF101)	A ₁	Agonist	Rheumatoide Arthritis, Psoriasis, Entzündliche Autoimmunerkrankung	Phase II	193
IB-MECA (CF101)	A ₁	Agonist	Glaukom, Trockene Augen	Phase III	193, 198
Tecadenoson (CVT-510)	A ₁	Agonist	Paroxysmale supraventrikuläre Tachykardie	Phase III	193
Aminophyllin	A ₁	Antagonist	Aufhebung der Anästhesie	Phase II	193, 198
GW328267X	A _{2A}	Agonist	COPD	Phase II	199
Sonedenoson (MRE-0094)	A _{2A}	Agonist	Diabetisches Fußsyndrom, Wundheilung	Phase II	190, 198
Binodenoson (CorVue™)	A _{2A}	Agonist	Myokard-perfusions-szintigraphie	Phase IV	194
Apadenoson	A _{2A}	Agonist	Myokard-perfusions-szintigraphie	Phase III	194
Preladenant	A _{2A}	Antagonist	Parkinson	Phase III	193
SYN-115	A _{2A}	Antagonist	Parkinson, Sucht (Cocain)	Phase II	193
BAY60-6583	A _{2B}	Agonist	Atherosklerose	Präklin. Phase	193
ATL 844	A _{2B}	Antagonist	Diabetes, Asthma		193
LAS38096	A _{2B}	Antagonist	Entzündungskrankheiten	Präklin. Phase	193
LAS101057	A _{2B}	Antagonist	Asthma	Phase I	193
MRE2029-F20	A _{2B}	Antagonist	Entzündungskrankheiten	Präklin. Phase	193
OSIP339391	A _{2B}	Antagonist	Asthma	Präklin. Phase	193
GS-6201 (CVT-6883)	A _{2B}	Antagonist	COPD	Phase I	190
QAF805	A _{2B} , A ₃	Antagonist	Asthma	Phase I	193
IB-MECA (CF-101)	A ₃	Agonist	Rheumatoide Arthritis	Phase II	200
CI-IB-MECA (CF102)	A ₃	Agonist	Leberkarzinom	Phase I/II	193, 198
OT-7999	A ₃	Antagonist	Glaukom	Präklin. Phase	193

befinden sich derzeit in der präklinischen Phase oder Phase I der klinischen Studien. Der einzige A_{2B} -Rezeptor-Agonist ist BAY60-6583 (präklinische Phase) und dieser soll zur Behandlung von Arteriosklerose eingesetzt werden. Hier besteht ein großer Bedarf neue, selektive und hochpotente A_{2B} -Rezeptor-Agonisten für die Behandlung von Krankheiten zu entwickeln.

Doch die Adenosin-Rezeptoren sind nicht nur an den oben erwähnten Krankheitsbildern beteiligt, denn es gibt weitaus mehr Indikationsgebiete. Tabelle 10 zeigt die potentiellen Indikationsgebiete für neue Liganden an den verschiedenen Adenosin-Rezeptor-Subtypen. So könnten neue A_{2B} -Rezeptor-Agonisten bei Arteriosklerose, renale Ischämie oder Entzündungen eingesetzt werden während die A_{2B} -Antagonisten bei Diabetes, Priapismus, Krebs Asthma, COPD, Entzündungen, Diarrhö, Colitis oder in der Schmerztherapie eingesetzt werden.

Tabelle 10. Potentielle Indikationsgebiete für Adenosin-Rezeptor-Agonisten und –Antagonisten (Auswahl).^{46, 171, 178, 180, 201-209}

Rezeptor Subtyp	Potentielle Indikation für Agonisten	Potentielle Indikation für Antagonisten
A₁	Tachykardie, Herzflimmern, Angina pectoris, kardiale Ischämie, Arrhythmie, Diabetes Typ II, neuropathischer Schmerz, Paroxysmale supraventrikuläre Tachykardie, Entzündliche Autoimmunerkrankung, Rheumatoide Arthritis, Psoriasis, Glaukom, Trockenes Auge, Schlaganfall, Epilepsie, Migräne	Herzinsuffizienz, Nierenfunktionsstörung, kognitive Krankheiten, Ödem
A_{2A}	Diagnostik der Herzdurchblutung, COPD, Entzündungen, Diabetisches Fußsyndrom, Rheumatoide Arthritis, Myokardperfusionsszintigraphie, Schlafstörung, Ischämie (Niere), Sepsis, Wundheilung	Morbus Alzheimer, Morbus Parkinson, Ischämie im Gehirn, Rückenmarkverletzung, Restless-Legs-Syndrom, Depression, (Cocain)-Sucht, Morbus Huntington, Migräne
A_{2B}	Arteriosklerose, renale Ischämie, Entzündungen	Asthma, COPD, Diabetes, Entzündungen, Priapismus, Krebs, Diarrhö, Colitis, Schmerz
A₃	Schlaganfall, kariale Ischämie, Rheumatoide Arthritis, Krebs, Leberkarzinom, Lungenverletzung	Glaukom, Psoriasis, Asthma, Nierenfunktionsstörungen

1.2.3 Liganden und Ligandenbindungsstellen der Adenosin-A_{2A}- und -A_{2B}-Rezeptoren

In diesem Kapitel werden ausgewählte Agonisten und Antagonisten der A_{2A}- und A_{2B}-Rezeptoren vorgestellt. Der endogene Agonist aller Adenosin-Rezeptoren ist das Adenosin (6-Aminopurin-9 β -D-ribofuranosid). Von diesem leitet sich der potente aber unselektive Agonist NECA (5'-N-Ethylcarboxamidoadenosin) ab. Die Strukturen von den Agonisten Adenosin (1) und NECA (2), sowie den Antagonisten Coffein (3) und Theophyllin (4) sind in Abbildung 14 dargestellt. Anhand der K_i-Werte aus der Literatur (siehe Tabelle 11) ist abzulesen wie affin und selektiv die Liganden an den vier Adenosin-Rezeptor-Subtypen binden. Die unselektiven und mäßig potenten Antagonisten Coffein und Theophyllin sind Xanthin-Derivate, welche an alle vier Adenosin-Rezeptoren binden.

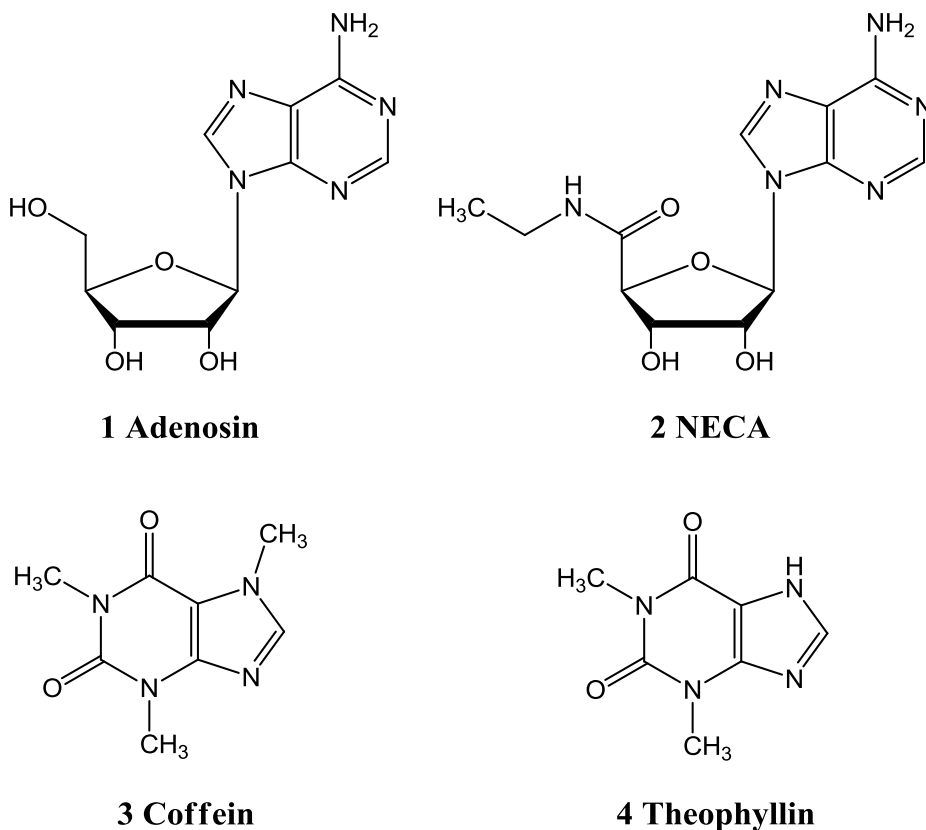


Abbildung 14. Adenosin-Rezeptor-Agonisten (1, 2) und -Antagonisten (3, 4).

Tabelle 11. Liganden mit K_i -Werten getestet an humanen Adenosin-Rezeptoren.^{172, 193, 210}

Nr.	Name	Ligand	K_i -Werte (nM)			
			A ₁	A _{2A}	A _{2B}	A ₃
1	Adenosin	Agonist	~100	310	15000	290
2	NECA	Agonist	14	20	140	25
3	Coffein	Antagonist	10700	23400	33800	13300
4	Theophyllin	Antagonist	6770	1710	9070	22300
5	CGS-21680	Agonist	289	27	>10000	67
6	Regadenoson	Agonist	>10000	290	>10000	>10000
7	MSX-2	Antagonist	2500	5,38	2900	>10000
8	ZM-241385	Antagonist	774	1,6	75	743
9	BAY60-6583	Agonist	>10000	>10000	3-10	>10000
10	PSB-603	Antagonist	>10000	>10000	0,553	>10000
11	PSB-1115	Antagonist	>10000	24000	53,4	>10000

Die selektiven und hoch potenten Agonisten und Antagonisten am A_{2A} -Rezeptor sind in Abbildung 15 dargestellt. Dies ist zum einen der Agonist CGS-21680 (5), welcher in dieser Arbeit bei Radioligand-Bindungsstudien und funktionellen cAMP-Experimenten eingesetzt wird und zum anderen der im vorherigen Kapitel beschriebene Wirkstoff Regadenoson (6), der als erster selektiver A_{2A} -Rezeptor-Agonist auf den Arzneimittelmarkt gekommen ist. Beide Agonisten leiten sich strukturell vom Adenosin ab. Außerdem sind die beiden hoch affinen und selektiven A_{2A} -Antagonisten MSX-2 (7) und ZM-241385 (8) gezeigt. Wobei MSX-2 mit Tritium markiert als Radioligand in Bindungsstudien genutzt wird und ZM-241385 bei der Erforschung der Röntgenkristallstruktur des A_{2A} -Rezeptors eine wichtige Rolle spielte.

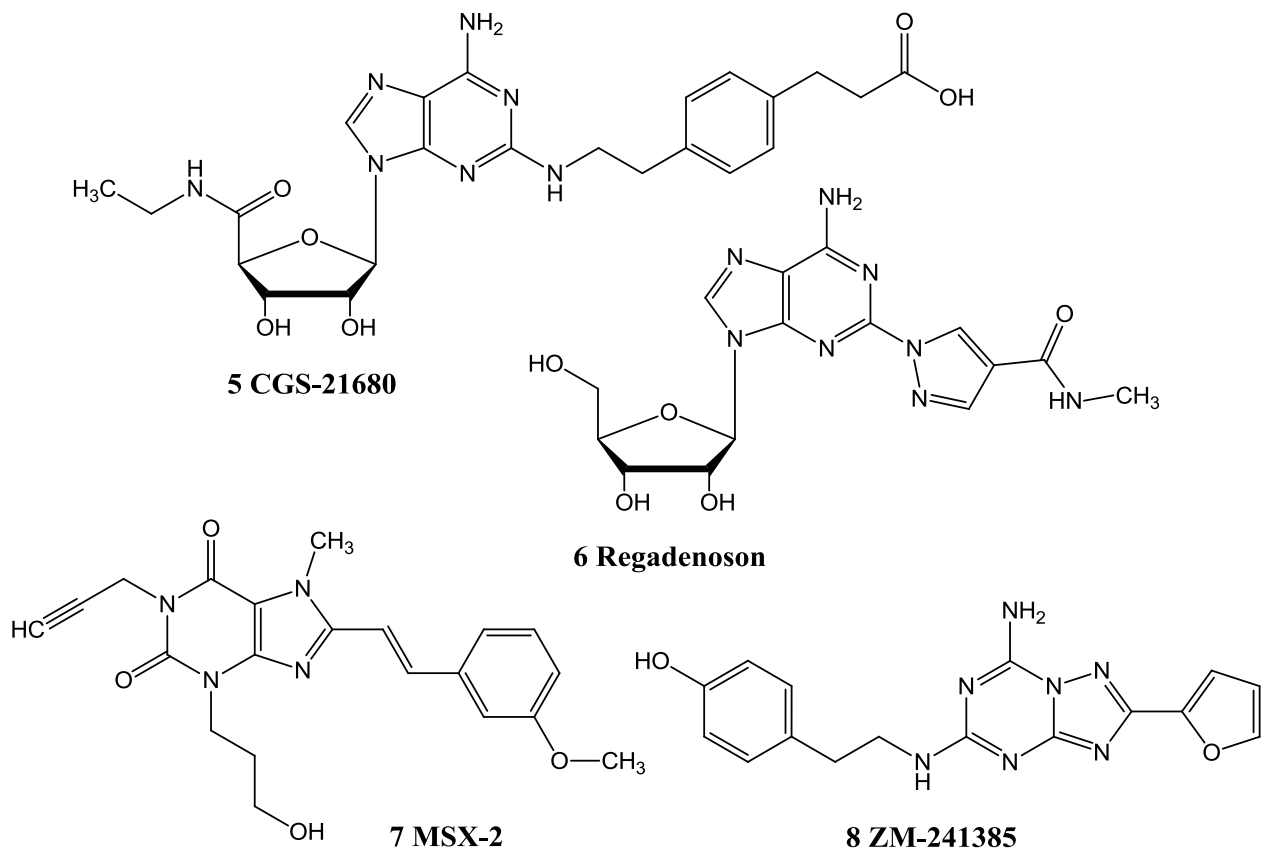


Abbildung 15. Selektive und hoch affine A_{2A} -Rezeptor-Agonisten (5, 6) und -Antagonisten (7, 8).

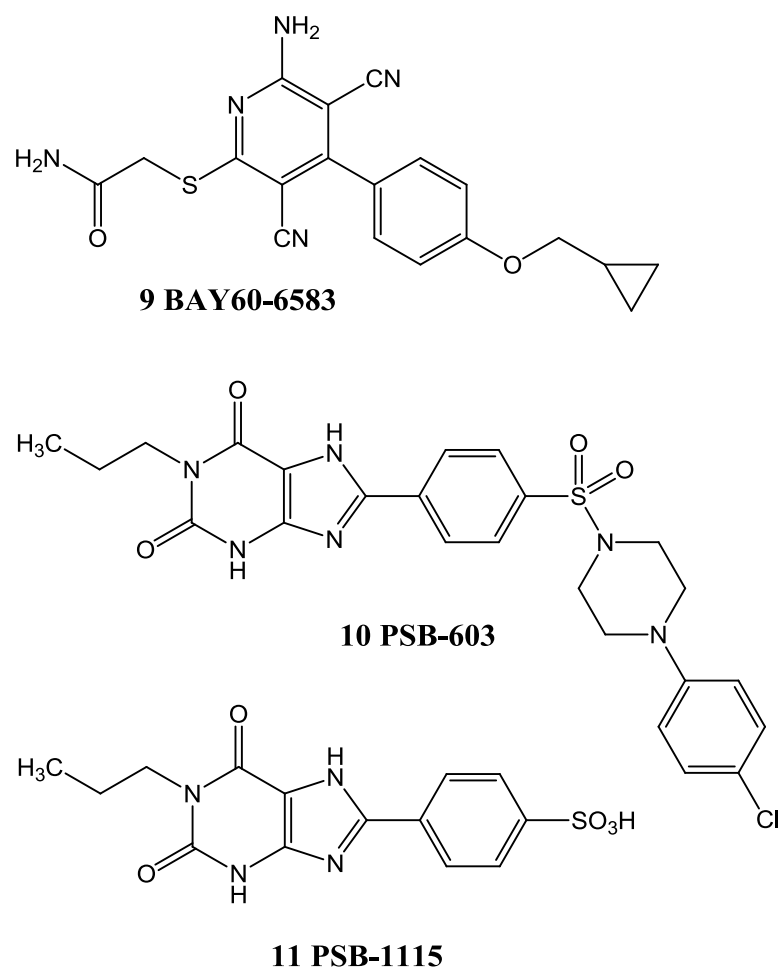


Abbildung 16. Selektive/r und hoch affine/r A_{2B}-Rezeptor-Agonist (9) und -Antagonisten (10, 11).

Abbildung 16 zeigt den selektiven und hoch affinen A_{2B}-Agonisten BAY60-6385 (9), der nach IUPAC 2-[6-Amino-3,5-dicyano-4-[4-cyclopropylmethoxy)phenyl]pyridin-2-ylsulfanyl]acetamid heißt. Dieser ist, wie bereits in Kapitel 1.2.2 beschrieben, in den vorklinischen Studien als Wirkstoff zur Behandlung von Atherosklerose.¹⁹³ Die beiden A_{2B}-Antagonisten PSB-603 (10) und PSB-1115 (11) gehören zu den Xanthin-Derivaten. Das mit Tritium markierte PSB-603 wird auch in Bindungsstudien am humanen A_{2B}-Rezeptor verwendet.

Für die gezielte Erforschung neuer, hoch affiner und selektiver Liganden sollte die Liganden-Bindungstasche des Rezeptors bekannt sein. Damit der Ligand wie ein Schlüssel perfekt in das Schloss, den Rezeptor, passt. Nachdem die Röntgenkristallstruktur des A_{2A}-Rezeptors bekannt wurde, konnte zusammen mit den Ergebnissen aus verschiedenen Mutagenesestudien, die Liganden-Bindungstasche genauer charakterisiert werden.³⁸ Abbildung 17 zeigt sowohl Adenosin als auch NECA in der Bindungstasche des humanen Adenosin-A_{2A}-Rezeptors. Zusätzlich sind polare und unpolare Bindungen dargestellt. Soweit es bekannt ist, sind auch die an der Bindung beteiligten homologen Aminosäuren der humanen A₁-, A_{2B}- und A₃-Rezeptoren eingezeichnet. Besonders hervorzuheben ist die Aminosäure Phe 168 in der zweiten extrazellulären Schleife (EL2) die über π - π -Wechselwirkungen mit dem Adenin-Grundgerüst interagiert und somit einen großen Einfluss auf die Bindung nimmt. Außerdem scheint die Aminosäure Glu 169 im EL2 ebenfalls wichtig zu sein.³⁸

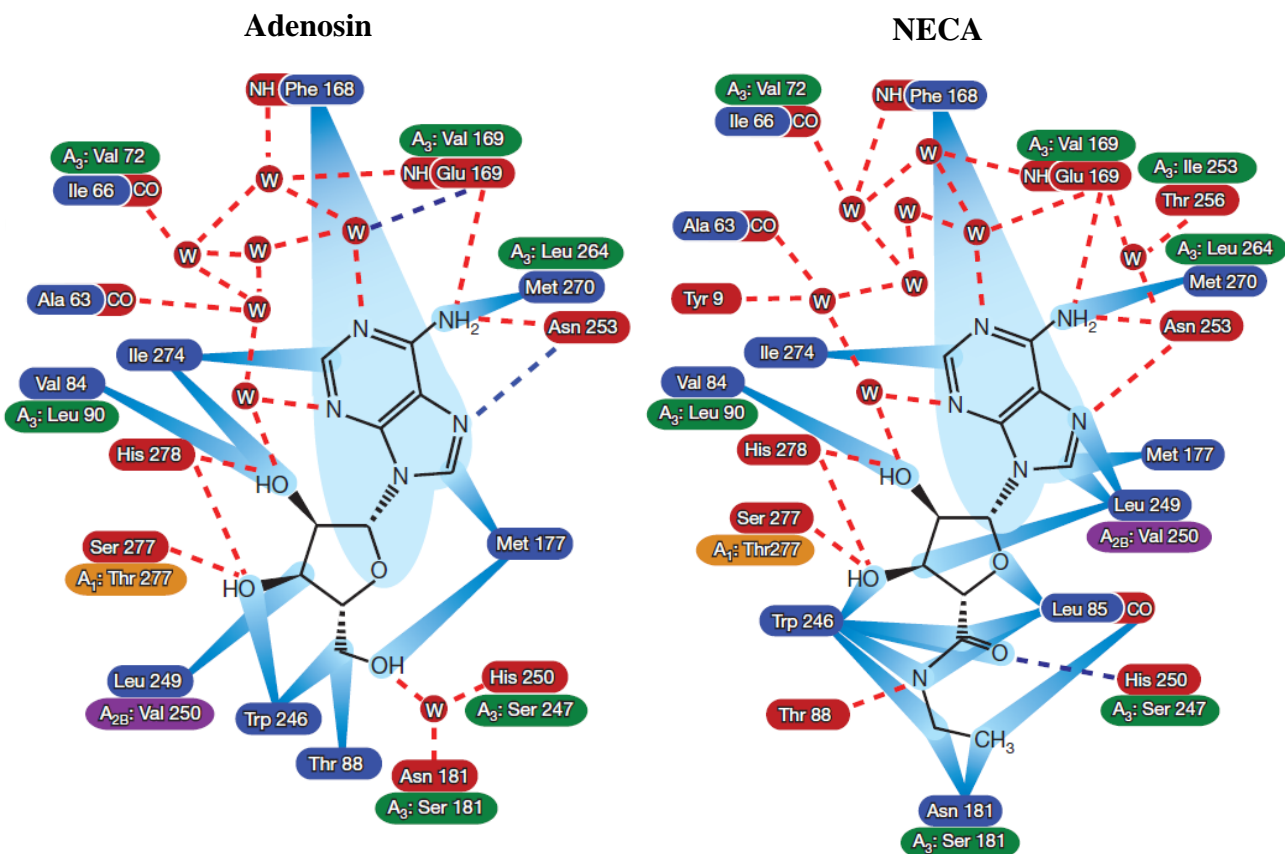


Abbildung 17. Adenosin und NECA in der Liganden-Bindungstasche des humanen Adenosin-A_{2A}-Rezeptors erstellt auf der Basis der Röntgenkristallstruktur.³⁸ Dabei sind polare und unpolare Bindungen bei der Agonistenbindung involviert. Die blau markierten Aminosäuren mit den blauen Strahlen stellen van-der-Waals-Kräfte dar. Rote Aminosäuren mit den farbig gestrichelten Linien stehen für potentielle Wasserstoffbrücken. Äquivalente Aminosäuren in den humanen A₁- (orange), A_{2B}- (lila) und A₃-Rezeptoren (grün) sind entsprechend farbig hervorgehoben.

Da es von dem Adenosin-A_{2B}-Rezeptor noch keine Röntgenkristallstruktur gibt, ist die präzise Voraussage über die Liganden-Bindungsstelle schwierig. Dennoch können die vielen durchgeführten Mutagenesestudien mit anschließenden Bindungsstudien und Homologiemodelle des A_{2B}-Rezeptors zur Aufklärung der Bindungstasche beitragen. Die Homologiemodelle basieren auf der Röntgenkristallstruktur des A_{2A}-Rezeptors, da dies der nächst verwandte Rezeptor zum A_{2B}-Rezeptor ist.²¹¹ Insbesondere die zweite extrazelluläre Schleife wird in der Literatur bei vielen verschiedenen Rezeptoren als besonders wichtig hervorgehoben.³⁶ Die zweite extrazelluläre Schleife spielt bei anderen GPCRs, wie Dopamin-Rezeptoren, eine wichtige Rolle.²¹² Banderas et al. konnten bei 5-HT_{4a}-Rezeptoren, ebenfalls GPCRs, unterschiedliche Bereiche des EL2 zeigen, die die Ligandenbindung beeinflussen.²¹³ Dabei interagieren Partialagonisten und Agonisten mit einem bestimmten Bereich des EL2, Antagonisten mit einem zweiten Bereich und inverse Agonisten mit einem dritten Bereich des EL2.²¹³ Bei dem mit dem hA_{2B}-Rezeptor nahe verwandten hA_{2A}-Rezeptor lassen die Daten von Kim et al. den Schluss zu, dass der EL2 möglicherweise direkt oder indirekt in die Ligandenbindung involviert ist.²¹⁴ Möglicherweise ist auch der EL2 des hA_{2B}-Rezeptor, wie der EL2 des Komplementfaktor-Rezeptor C5a, wie von Klco et al. postuliert wurde, für die geringere Aktivierung durch Liganden bei GPCRs verantwortlich.²¹⁵ Eventuell ist der EL2 auch an der Stabilisierung der inaktiven Rezeptorkonformation beteiligt.²¹⁵ 2008 schloss de Graaf durch ein virtuelles Screening der zweiten extrazellulären Schleifen verschiedener GPCRs darauf, dass diese lediglich die Funktion eines sterischen Filters für niedrig und hoch molekulargewichtige Liganden darstellen.²¹⁶ Der EL2 wird als Schlüssel der Selektivitätsunterschiede der Adenosin-Rezeptorsubtypen angesehen, obwohl der A_{2A}- und der A_{2B}-Rezeptor in diesem Bereich eine Homologie von 70 % (56 % identisch) aufweisen.^{211, 217} Interessant wäre daher ein Austausch der EL2 vom hoch affinen A_{2A}-Rezeptor zu dem niedrig affinen A_{2B}-Rezeptor. In der eigenen Diplomarbeit konnten einige Aminosäuren in der EL2 mutiert und untersucht werden.⁸ Dabei zeigte lediglich die Aminosäure Glu 164 einen Effekt, der weniger auf die Bindung als auf die Rezeptorkonformation zurückzuführen ist. Die Bindungsstelle des A_{2B}-Rezeptors ist zwar nicht bekannt, aber durch verschiedene Mutagenese- und Docking-Studien können auf die möglichen Interaktionen zwischen den Liganden und den Aminosäuren geschlossen werden. Diese sind in Abbildung 18 für die Agonisten NECA, BAY60-6583 und den Antagonisten PSB-603 gezeigt. Die Aminosäuren mit

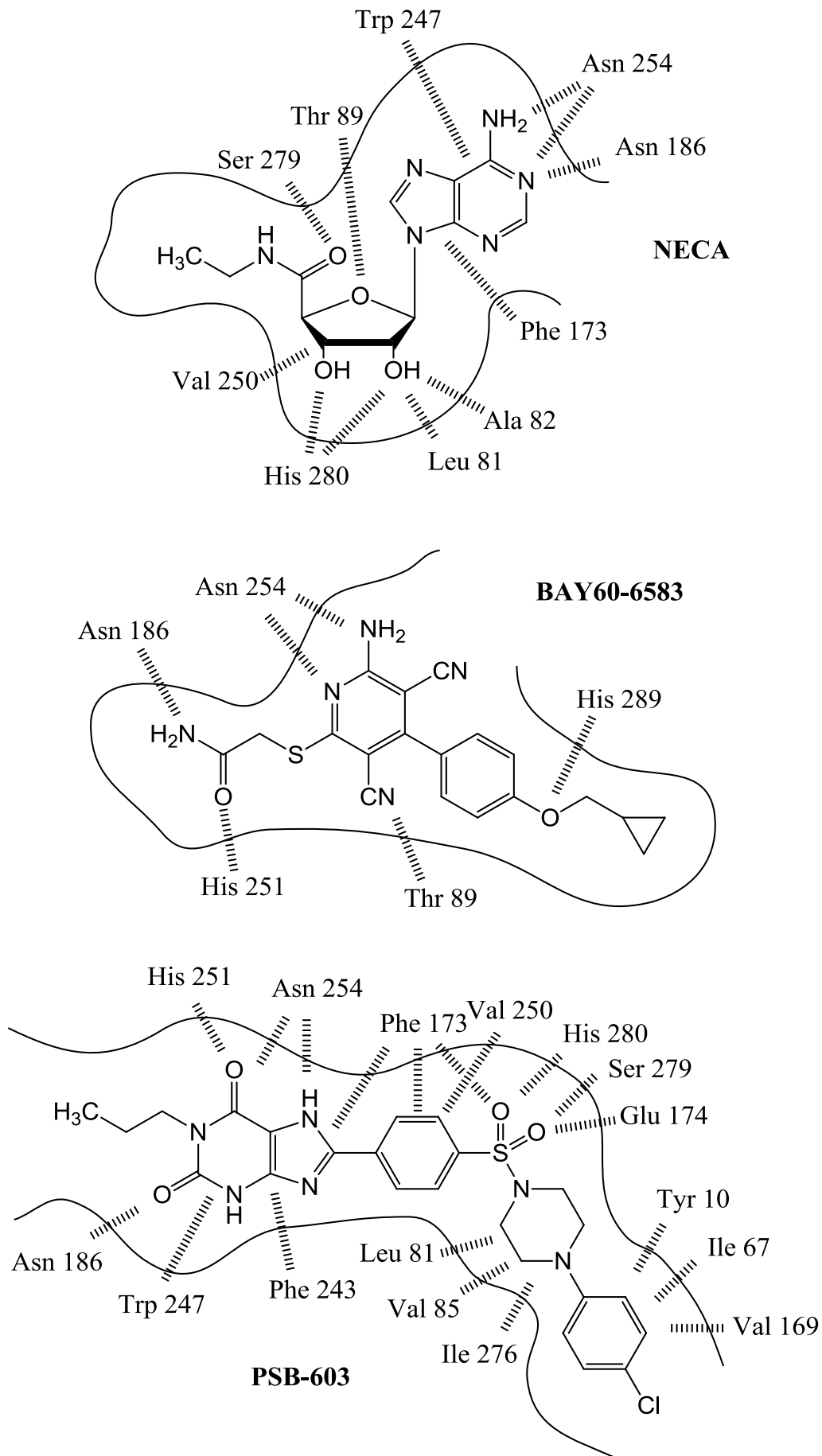


Abbildung 18. Potentielle Interaktionen zwischen den Liganden NECA, BAY60-6583 und PSB-603 mit den Aminosäuren des humanen Adenosin-A_{2B}-Rezeptors.^{8, 38, 211, 218-220}

dem größten Einfluss auf die Ligandenbindung, sowohl bei den Agonisten als auch dem Antagonisten, scheinen Asn 186 und Asn 254 zu sein. Bei den Antagonisten sollen die Aminosäuren Phe 173, Glu 174 und Phe 243 eine besondere Rolle spielen.²²⁰ Weitere Studien und die Röntgenkristallstruktur des A_{2B}-Rezeptors würden hier zur Aufklärung der exakten Bindungsstelle beitragen.

1.2.4 Di- und Oligomerisierung von Adenosin-Rezeptoren

Die Adenosin-Rezeptoren stehen im Fokus der Oligomerisierungsforschung. Derzeit liegen publizierte Daten über Adenosin-A₁-, -A_{2A}- und -A₃-Rezeptor-Homodimere vor.⁷⁴⁻⁷⁹ Die A_{2B}-Rezeptor-Homodimere und A_{2A}-A_{2B}-Heterodimere wurden bislang noch nicht publiziert und sollen daher in dieser Arbeit genau erforscht werden. Insgesamt sind elf Heterodimere bzw. Heterotrimere mit A₁- und A_{2A}-Rezeptoren publiziert worden (siehe Tabelle 5 in Kapitel 1.1.4). Sowohl der A_{2B}- als auch der A₃-Rezeptor sind diesbezüglich vollkommen unerforscht.

1.2.4.1 Adenosin-A₁-Homodimer

A₁-Rezeptoren sind in der Lage zu homodimerisieren, dabei soll die Bildung eines Dimers aus den Monomeren durch den physiologischen Liganden Adenosin herbeigeführt werden.⁷⁴ Die Dimerisierung kann aber auch durch A₁-Agonisten und A₁-Antagonisten induziert werden. Für die Protein-Protein Interaktion wird die dritte intrazelluläre Schleife verantwortlich gemacht.⁷⁴ Der Nachweis für dieses Homodimer erfolgte sowohl durch Antikörper im Westernblot im Schweine-Cortex als auch über Bimolekulare-Fluoreszenzkomplementation (BiFC).^{74, 221} Bei der Untersuchung der Interaktionsfläche wurde die Aminosäure Trp132 (W132) in der TM 4 im A₁-Rezeptor genauer erforscht. Diese ist zwar nicht für die Oligomerisierung wichtig, aber sehr wohl für die Ligandenbindung. Das Tryptophan interagiert mit Bereichen in der TM 3 und TM5 und verändert die Ligandenbindungsstelle so, dass ein absoluter Bindungsverlust beim Austausch gegen Alanin erfolgt.²²² Diese Aminosäure ist in allen Adenosinrezeptoren konserviert und entspricht im A_{2B}-Rezeptor der Aminosäure Trp120 (W120).

1.2.4.2 Adenosin-A_{2A}-Homodimer

Die Adenosin-A_{2A}-Rezeptoren liegen nicht nur als Monomere, Homo- und Heterodimere vor, sondern auch als Homo- und Hetertrimere.^{77, 124, 223} Das A_{2A}-Homodimer konnte mit Hilfe von den Methoden BRET, FRET, BiFC und deren Kombinationen nachgewiesen werden.^{75, 77, 221, 224} Noch höhere Oligomere mit dem A_{2A}-Rezeptor sind bislang noch nicht publiziert. Die A_{2A}-Rezeptor-Homodimere weisen im Vergleich zu Monomeren eine höhere Resistenz gegenüber der Temperatur und chemischer Denaturierung auf. Als wichtige Domäne für die Dimerisierung des A_{2A}-Rezeptors konnte die TM 5 identifiziert werden. Die Aminosäure Met193 ist als entscheidend wichtig für die Dimerisierung publiziert worden.²²³ Weitere Studien zur Untersuchung der Interaktionsfläche lassen darauf schließen, dass außerdem die Transmembranregionen 1, 2, 6 und 7 wichtig sein sollen.²²⁵ Das Enzym Adenosindeaminase (ADA) soll mit dem A_{2A}-Homodimer interagieren und dessen Konformation beeinflussen. Als allosterischer Modulator soll ADA die Affinität der Liganden steigern und die Rezeptorfunktion verstärken.²²⁶

1.2.4.3 Adenosin-A_{2B}-Homodimer

Aus der Familie der Adenosin-Rezeptoren ist das A_{2B}-Homodimer das einzige noch nicht publizierte Dimer. Dennoch gibt es Spekulationen auf ein mögliches Vorhandensein des A_{2B}-Homodimers.²²⁷ Das Ziel dieser Arbeit ist die mögliche Existenz von A_{2B}-Rezeptor-Homodimeren zu untersuchen. Sollten sich die Vermutungen der Dimerisierung bestätigen, dann könnte eine Mutation an der konservierten Aminosäure Met198 erforscht werden. Denn in allen Adenosinrezeptoren ist dieses Methionin in der TM 5 konserviert und könnte, wie im A_{2A}-Rezeptor bereits nachgewiesen, entscheidend zur Dimerisierung beitragen. Met193 im A_{2A}-Rezeptor ist die homologe Aminosäure zum Met198 im A_{2B}-Rezeptor. Um Heterooligomere des A_{2B}-Rezeptors zu untersuchen, ist es sinnvoll die Gewebe in denen der A_{2B}-Rezeptor erhöht exprimiert ist, genauer zu untersuchen. Dazu gehören im Menschen die glatte Muskulatur, die cardialen Myocyten (Herzmuskulatur), Bronchialepithel und bei Erkrankten das Colorectaladenocarcinom.²²⁸ Nun kann in genau diesen Geweben die quantitativ häufigsten vorkommenden Rezeptoren, die keine A_{2B}-Rezeptoren sind, auf eine Heterooligomerisierung mit dem A_{2B}-Rezeptor hin untersucht werden. Hierbei könnten möglicherweise parallelen zu dem nahe verwandten A_{2A}-Rezeptor gezogen werden.

1.2.4.4 Adenosin-A₃-Homodimer

Kim und Jacobson haben bereits 2006 per Computermodell die Homodimerisierung des Adenosin A₃-Rezeptors berechnet.²²⁹ Dabei sollen theoretisch die TM 4 und die TM 5 die Kontaktseite des Dimers darstellen. 2011 konnte Stephen J. Hill das A₃-Homodimer publizieren.⁷⁹ In dieser Publikation zeigen sie mit Hilfe von BiFC und dem Fluoreszenzmikroskop die Homodimerisierung von Adenosin-A₃-Rezeptoren exprimiert in CHO-K1-Zellen. Durch Dissoziationskinetiken mit dem fluoreszierenden Agonisten ABA-X-BY630 haben sie allosterische Interaktionen bei A₃-Rezeptoren weitergehend untersucht.⁷⁹

1.2.4.5 Adenosin-A₁-A_{2A}-Heterodimer

Die Rezeptordimerisierung von A₁- und A_{2A}-Rezeptoren konnte mit Hilfe von BRET, TR-FRET und BiFC nachgewiesen werden.^{119, 221, 230} Der Wirkungsmechanismus des Heterodimers ist in Abbildung 19 mit der entsprechenden Bildbeschreibung dargestellt. Hier wird der Mechanismus im Striatum zur Regulierung vom inhibitorischen A₁- und stimulierenden A_{2A}-Rezeptor auf die Glutamatausschüttung verdeutlicht.²³⁰

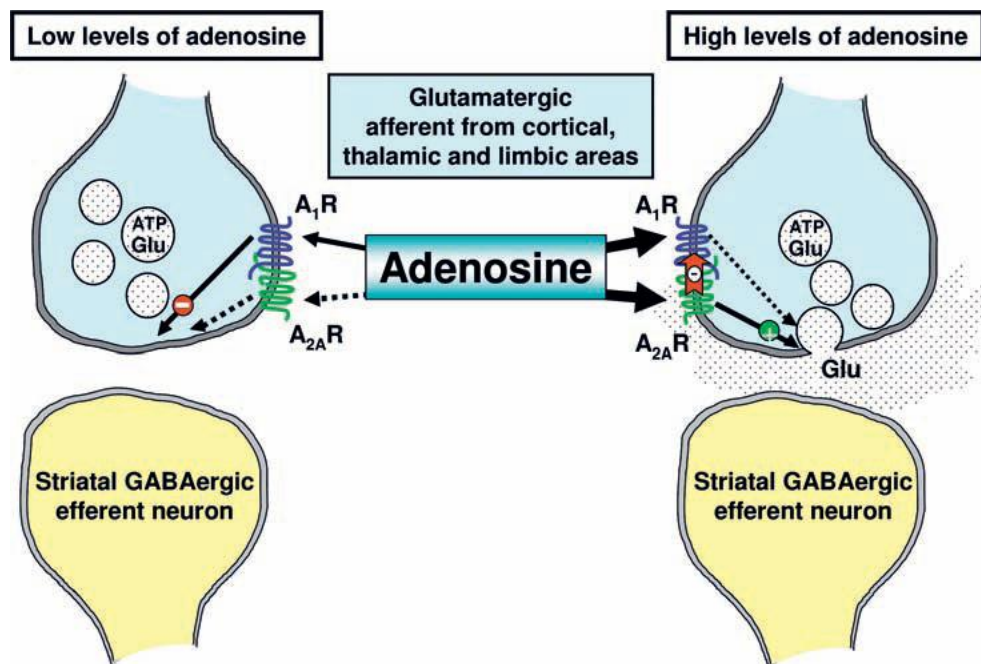


Abbildung 19. A₁-A_{2A}-Rezeptordimerisierung: Bei geringen Konzentrationen an Adenosin im Striatum wird überwiegend der A₁-Rezeptor aktiviert und somit die Glutamatausschüttung inhibiert (links). Bei hohen Konzentration an Adenosin (rechts) wird auch der A_{2A}-Rezeptor aktiviert, der wiederum durch intramembranäre Interaktion den A₁-Rezeptor inhibiert (roter Pfeil) und somit Glutamat freigesetzt wird.²³⁰

Ein Heteromer Komplex aus A_1 - und A_{2A} -Rezeptoren ist nach der Publikation von 2010 G_i gekoppelt. Bei nicht-physiologischen Liganden verringert ein A_{2A} -Rezeptor-Agonist massiv den Effekt eines A_1 -Rezeptor Agonisten.²³¹

1.2.4.6 A_1 - D_1 -Heterodimer

Bei dem A_1 - D_1 -Heterodimer beeinflusst der Adenosin- A_1 -Rezeptor den Dopamin- D_1 -Rezeptor negativ. Dies bedeutet, dass A_1 -Agonisten die Aktivität und Funktionalität des D_1 -Rezeptors stark herabsetzen. Wird allerdings ein A_1 -Rezeptor-Antagonist an dem Heterodimer getestet, so steigt die Funktionalität des D_1 -Rezeptors. D_1 -Agonisten hingegen führen zur Spaltung des Dimers in die Monomere.^{120, 232}

1.2.4.7 A_1 -mGlu $_1$ -Heterodimer

Das A_1 -mGlu $_1$ -Heterodimer ist offensichtlich ein Dimer mit einem stark ausgeprägten synergistischen Effekt. Bei der Inkubation mit dem mGlu $_1$ -Agonisten Quisqualinsäure bzw. dem A_1 -Agonisten R-PIA steigt das Calcium-Signal bei diesen Heterodimeren wesentlich stärker an als bei den Monomeren. Dieser Effekt lässt auf eine heterologe Sensibilisierung schließen.¹²¹

1.2.4.8 A_1 -P2Y $_1$ -Heterodimer

Es konnte auch die Dimerisierung zwischen P1 und P2 Rezeptoren gezeigt werden. Genauer gesagt die Heterodimerisierung von A_1 -Rezeptoren mit den P2Y $_1$ -Rezeptoren, dabei kommt es zum signifikanten Affinitätsverlust von Agonisten und Antagonisten für den Adenosin-Rezeptor. Im Gegenzug dazu ist die Affinität vom potenten P2Y $_1$ -Rezeptor Agonisten ADP β S bei dem Dimer mit dem A_1 -Rezeptor im Vergleich zum Monomer vom P2Y $_1$ -Rezeptor um den Faktor 400 signifikant erhöht.¹²²

1.2.4.9 A_1 -P2Y $_2$ -Heterodimer

Durch das A_1 -P2Y $_2$ -Heterodimer werden die G-Proteine beeinflusst und zwar wird das G_i -Protein gehemmt und das G_q -Protein gefördert. Dies konnte durch die funktionellen cAMP- und Ca^{2+} -Experimente gezeigt werden. Außerdem hemmen P2Y $_2$ -Agonisten die Bindung von A_1 -Agonisten in dem Heterodimer.^{123, 233}

1.2.4.10 Adenosin-A_{2A}-A_{2B}-Heterodimer

Dieses A_{2A}-A_{2B}-Heterodimer ist nicht publiziert und soll in dieser Arbeit genauer untersucht werden. Dennoch gibt es Spekulationen und Hinweise durch Koimmunpräzipitation auf die mögliche Existenz dieser Dimere. Außerdem wird in dem Paper aus dem Arbeitskreis von Sitkovsky über den Einfluss von A_{2A}-Rezeptoren auf die A_{2B}-Rezeptor Expression an der Zelloberfläche diskutiert.²²⁷

1.2.4.11 A_{2A}-CB₁-Heterodimer

Die Dimerisierung zwischen dem Adenosin-A_{2A}-Rezeptor mit dem Cannabinoid-CB₁-Rezeptor konnte mittels Kolokalisationsexperimenten, Koimmunpräzipitationen und BRET festgestellt werden. Damit der CB₁-Rezeptor jedoch aktiviert werden kann, muss der A_{2A}-Rezeptor zeitgleich stimuliert werden. Dies konnte in cAMP-Experimenten gezeigt werden.¹²⁴

1.2.4.12 A_{2A}-D₂-Heterodimer

A_{2A}-Rezeptoren können auch mit D₂-Rezeptoren heterodimerisieren, also Koaggregieren, aber auch Kointernalisieren und werden zusammen Kodesensitisiert.¹²⁵ Das A_{2A}-D₂-Heterodimer konnte mittels BRET, FRET und BiFC nachgewiesen werden. Die Affinität von Dopamin-Agonisten kann durch Adenosin-Agonisten stark reduziert werden. Dabei führt die Aktivierung des A_{2A}-Rezeptors zu einer verringerten und die des D₂-Rezeptors zu einer erhöhten MAP-Kinase-Aktivität. In Summe überwiegt der inhibitorische Effekt durch den Adenosin-Rezeptor. Darüber hinaus konnte mittels SRET die Interaktion von Calmodulin, welches ein Calcium-bindendes Protein ist, mit dem Heterodimer gezeigt werden.^{125, 234} Das A_{2A}-D₂-Heterodimer könnte ein Target für die Behandlung von Parkinson sein, indem A_{2A}-Antagonisten in Kombination mit D₂-Agonisten L-DOPA gegeben werden.¹⁸⁷

1.2.4.13 A_{2A}-D₃-Heterodimer

Durch Kolokalisations- und FRET-Experimente konnte das A_{2A}-D₃-Heterodimer nachgewiesen werden. Hierbei hemmt der Adenosin-A_{2A}-Rezeptor-Agonist CGS-21680 die Bindung von Dopamin zum Dopamin-D₃-Rezeptor, dadurch wird auch die hemmende Wirkung auf die Bildung von intrazellulärem cAMP aufgehoben.¹²⁶

1.2.4.14 A_{2A}-mGlu₅-Heterodimer

Der A_{2A}-Rezeptor dimerisiert auch mit dem metabotropen Glutamat-mGlu₅-Rezeptor. Dies konnte mittels Koimmunpräzipitation und Konfokaler Mikroskopie gezeigt werden. Das Dimer hat einen synergistischen Effekt auf ERK 1/2, aber keinen Effekt auf die sekundären Botenstoffe cAMP oder Calcium.^{127, 235}

1.2.4.15 A_{2A}-CB₁-D₂-Heterotrimer

Bisher wurden zwei Trimerisierungen mit Adenosin-Rezeptoren nachgewiesen. Nachdem das A_{2A}-CB₁-Heterodimer und getrennt davon das A_{2A}-D₂-Rezeptordimer erforscht wurden, entwickelte sich die Hypothese eines möglichen Trimers. Der Arbeitskreis von Prof. Dr. Rafael Franco konnte mit Hilfe von sequentiellem BRET-FRET (SRET) und BRET-BiFC dieses A_{2A}-CB₁-D₂-Heterotrimer untersuchen und bestätigen.^{124, 125}

1.2.4.16 A_{2A}-D₂-mGlu₅-Heterotrimer

Cabello et al. konnten durch Koimmunpräzipitation und SRET den Nachweis für die Oligomerisierung von Adenosin-A_{2A}- mit dem Dopamin-D₂- und dem metabotropen Glutamat-mGlu₅-Rezeptor erbringen.¹²⁷ Die genauen Wirkungsmechanismen, Interaktionsflächen und Signalkaskaden, die durch dieses Trimer beeinflusst werden, müssen allerdings noch genauer erforscht werden.

1.3 Ziele der Arbeit

Der humane Adenosin- A_{2B} -Rezeptor steht im Fokus der wissenschaftlichen Forschung, da dieser Rezeptor bei zahlreichen Krankheiten eine Rolle spielt. Aus diesem Grund ist der Rezeptor als potentiell Target für neue Arzneimittel besonders interessant. Neue hochpotente und selektive Agonisten und Antagonisten sind daher sowohl als pharmakologische Werkzeuge in der Grundlagenforschung, als auch als potentielle Arzneistoffe wichtig. Für die zielgerichtete Synthese dieser selektiven und potenten Liganden sind Erkenntnisse über die Ligandenbindungstasche sowie den Mechanismus der Aktivierung des Rezeptors von großer Bedeutung. Bei einer Reihe verschiedener GPCRs stellte sich die zweite extrazelluläre Schleife als besonders wichtig für die Ligandbindung heraus.^{25, 212-215, 236} Modelle führten zu der Annahme, dass auch bei dem humanen A_{2B} - und dem nahe verwandten A_{2A} -Rezeptor diese zweite extrazelluläre Schleife wichtig für die Ligandbindung sein könnte.²³⁶ Des Weiteren könnte der EL2 für den beobachteten Unterschied in der Affinität von Adenosin-Derivaten (Agonisten) zwischen dem niedrig affinen A_{2B} - und dem hoch affinen A_{2A} -Rezeptor (mit) verantwortlich sein. In der eigenen Diplomarbeit konnten einzelne Aminosäuren des EL2 mutiert, charakterisiert und deren Einfluss erforscht werden.⁸ Um die Bedeutung der gesamten EL2 zu erforschen, sollte im ersten Teil dieser Arbeit nun die komplette zweite extrazelluläre Schleife des A_{2B} -Rezeptors gegen die zweite extrazelluläre Schleife des A_{2A} -Rezeptors mittels 'Overlap-Extension'-Methode ausgetauscht und der Einfluss auf die Ligandbindung und die Aktivierbarkeit des Rezeptors untersucht werden. Dazu sollten mit Hilfe verschiedener A_{2B} - und A_{2A} -Liganden Radioligand-Bindungsstudien und cAMP-Akkumulationsexperimente durchgeführt werden.

Bei der Arzneimittelentwicklung ist es besonders wichtig, dass der Wirkstoff spezifisch und zielgerichtet an den Rezeptor bindet, der verantwortlich für die Krankheit ist, welche behandelt werden soll. Bindet der Wirkstoff dabei auch an andere Rezeptoren, so kann es zu unerwünschten Arzneimittelwirkungen bei dem Patienten kommen. Dies kann auch der Fall sein, wenn die Zielrezeptoren durch Dimer- oder Oligomerbildung eine veränderte Pharmakologie verglichen mit den Rezeptormonomeren aufweisen. In diesem Fall müssten Substanzen entwickelt werden, die spezifisch an Monomere oder Dimere binden und diese aktivieren oder blockieren. Durch diesen Ansatz ließen sich unerwünschte Arzneimittelwirkungen möglicherweise reduzieren. Bislang ist noch nicht bekannt, ob Adenosin- A_{2B} -Rezeptoren Rezeptor-Di- bzw. -Oligomere bilden können.

Daher beschäftigt sich der zweite Teil dieser Arbeit mit der Dimerisierung/Oligomerisierung von Adenosin- A_{2B} -Rezeptoren. Hierzu soll zunächst die Methode des Biolumineszenz-Resonanz-Energie-Transfers (BRET) zum Einsatz kommen. Des Weiteren soll ggf. der Einfluss verschiedener Liganden auf mögliche Dimere untersucht werden. Darüber hinaus wäre es von Interesse, die Interaktionsfläche zwischen den Monomeren zu identifizieren. Hierbei können zielgerichtete Mutationen und auch Computermodelle hilfreich sein.

Im dritten Teil der vorliegenden Arbeit soll die Heterodimerisierung/Oligomerisierung der nahe verwandten Adenosinrezeptor-Subtypen A_{2B} - und A_{2A} untersucht werden. Sonja Hinz hatte im Rahmen ihrer Disseration festgestellt, dass sich die Pharmakologie von gemeinsam exprimierten A_{2A} - und A_{2B} -Rezeptoren im Vergleich zu den einzeln exprimierten Rezeptoren unterscheidet.²³⁷ Ob dies tatsächlich auf die Bildung von A_{2B} - A_{2A} -Hetero(di)meren zurückzuführen ist, soll nun mittels Biolumineszenz-Resonanz-Energie-Transfer-Methode untersucht werden. Auch hier sollen im Falle des Nachweises von Dimeren der Einfluss verschiedener Liganden erforscht und Computermodellberechnungen zur Interaktionsfläche durchgeführt werden. Mit Hilfe der konfokalen Mikroskopie soll außerdem die Lokalisation der Rezeptoren untersucht werden.

Der vierte Teil der Arbeit befasst sich mit der Untersuchung der Oligomerisierung der Adenosin-Rezeptoren mit Hilfe der Elektrophorese unter Einsatz von SDS- und Blauer Nativer-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (BN-PAGE).

2 Methoden

2.1 Charakterisierung der zweiten extrazellulären Schleife des humanen Adenosin-A_{2B}-Rezeptors

Das methodische Vorgehen zur Charakterisierung der zweiten extrazellulären Schleife (EL2) des humanen Adenosin-A_{2B}-Rezeptors (hA_{2B}) ist schematisch in Abbildung 20 dargestellt. Das Projekt startet mit der Klonierung des pLXSN-HA-hA_{2B}(EL2-hA_{2A}) DNA-Konstruktes mittels der "overlap extension"-Methode. Die Abkürzung hA_{2B}(EL2-hA_{2A}) steht dabei für den humanen Adenosin-A_{2B}-Rezeptor, dessen zweite extrazelluläre Schleife durch den EL2 des humanen Adenosin-A_{2A}-Rezeptors ersetzt ist. In einem zweiten Schritt folgt die retrovirale Transfektion von CHO-Zellen, welche die Rezeptormutante an der Zelloberfläche exprimieren. Nach den Membranpräparationen von diesen Zellen können ausgewählte Liganden in Radioligand-Bindungsstudien an dem hA_{2B}(EL2-hA_{2A})-Rezeptor, sowie den Wildtypen hA_{2B} und hA_{2A} auf die Bindung bzw. Affinität getestet werden. Nachfolgende cAMP-Experimente an lebenden Zellen überprüfen die Funktionalität der Rezeptoren. Letztlich folgen Computermodelle, basierend den Ergebnissen dieser Arbeit, die dieses Projekt abrunden. Alle Ergebnisse aus den Radioligand-Bindungsstudien, den cAMP-Experimenten und den Computermodellen führen nun zur Charakterisierung der Rezeptormutanten und lassen auf die Bedeutung der EL2 von Adenosin-A_{2B}-Rezeptoren schließen. Die folgenden Kapitel 2.1.1 bis 2.1.4 erläutern die Methodik detailliert.

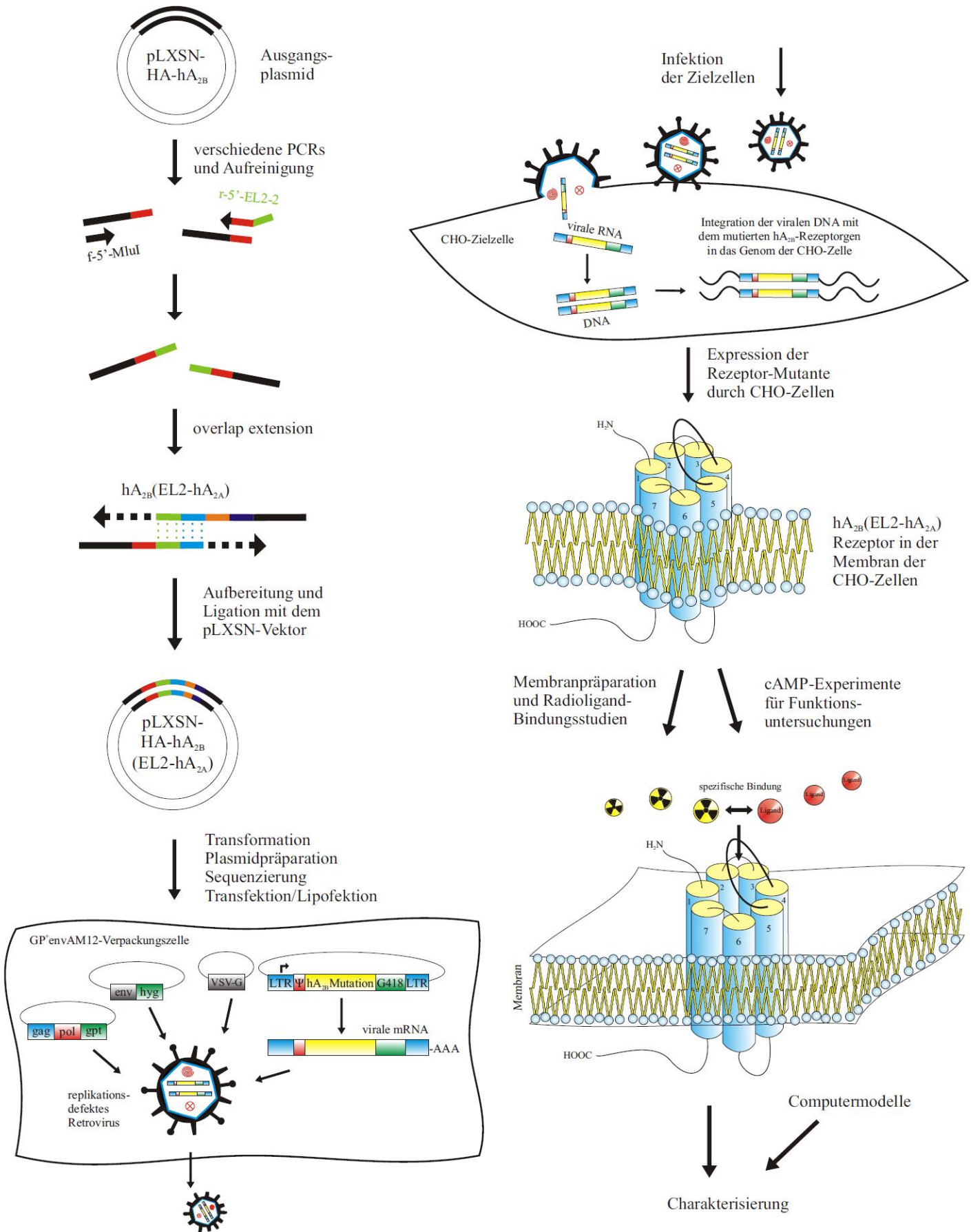


Abbildung 20. Methode zur Charakterisierung der zweiten extrazellulären Schleife des humanen Adenosin-A_{2B}-Rezeptors.

2.1.1 Austausch der zweiten extrazellulären Schleife des humanen Adenosin-A_{2B}-Rezeptors und Expression in CHO-Zellen

In diesem Kapitel wird die Klonierung und Expression des hA_{2B}(EL2-hA_{2A})-Rezeptors in CHO-Zellen beschrieben. Die Klonierung für den Austausch der gesamten EL2 des hA_{2B}-Rezeptors gegen den EL2 des A_{2A}-Rezeptors erfolgt in mehreren unterschiedlichen PCR-Zyklen mit anschließender ‚overlap extension‘. Das Verfahren ist detailliert in Abbildung 21 und Abbildung 22 dargestellt. Zwei voneinander getrennte Reaktionsansätze enthalten beide das Ausgangsplasmid pLXSN-HA-hA_{2B}, welches die Gensequenz für den hA_{2B}-Rezeptor mit einer vorgeschalteten Hämagglutinin-Erkennungssequenz (HA) enthält. Der pLXSN-Vektor ist wichtig für die retrovirale Transfektion, damit später eine stabile Zelllinie mit dem hA_{2B}(EL2-hA_{2A})-Rezeptor hergestellt werden kann. Für die Klonierung werden insgesamt neun verschiedene Primer benötigt, die in Tabelle 32 aufgelistet sind. Die in der ersten Runde eingesetzten Primer sind so konzipiert, dass 20 bis 21 Basen komplementär zu dem Plasmid sind. Die restlichen 16 bis 18 Basen hybridisieren nicht mit dem Plasmid; Sie kodieren für einen Teil der EL2 vom hA_{2A}-Rezeptor. Der überhängende Teil wird bei einem folgenden Zyklus durch den entgegengesetzten Primer (f-5'-MluI oder r-5'-BamHI) mit amplifiziert. Nach jeder PCR-Runde folgt die elektrophoretische Auftrennung im Agarose-Gel. Die entsprechende Bande wird ausgeschnitten, gereinigt und dient als Matrize für die nächste PCR-Runde. Die Primer der zweiten Runde hybridisieren ca. zu 50 % mit der überhängenden DNA der Vorrunde. Die restlichen 50 % beinhalten weitere Basen des hA_{2A}-Rezeptors für die Verlängerung des EL2. Diese Schritte wiederholen sich ein drittes und viertes Mal. Die in den beiden Reaktionsansätzen enthaltenen DNA-Fragmente überlappen um 30 Basen. Die aufgereinigten Produkte aus den Reaktionsansätzen I und II werden durch das ‚overlap extension‘ Verfahren miteinander verbunden. Durch das Überlappen des komplementären Abschnitts der beiden DNA-Produkte verbinden sich diese und werden entsprechend in 3'-Richtung verlängert. Der Ansatz erfolgt ohne Primerzusatz in 5 PCR-Zyklen. Ohne das neue Produkt aufzureinigen, werden in einem Schritt direkt die beiden endständigen Primer zugegeben und das Produkt amplifiziert (one-step overlap extension).²³⁸ Zum Schluss erfolgt die Klonierung des neuen Konstruktes in den pLXSN-Vektor. Die ersten drei PCR-Runden sind bereits in der eigenen Diplomarbeit beschrieben.⁸

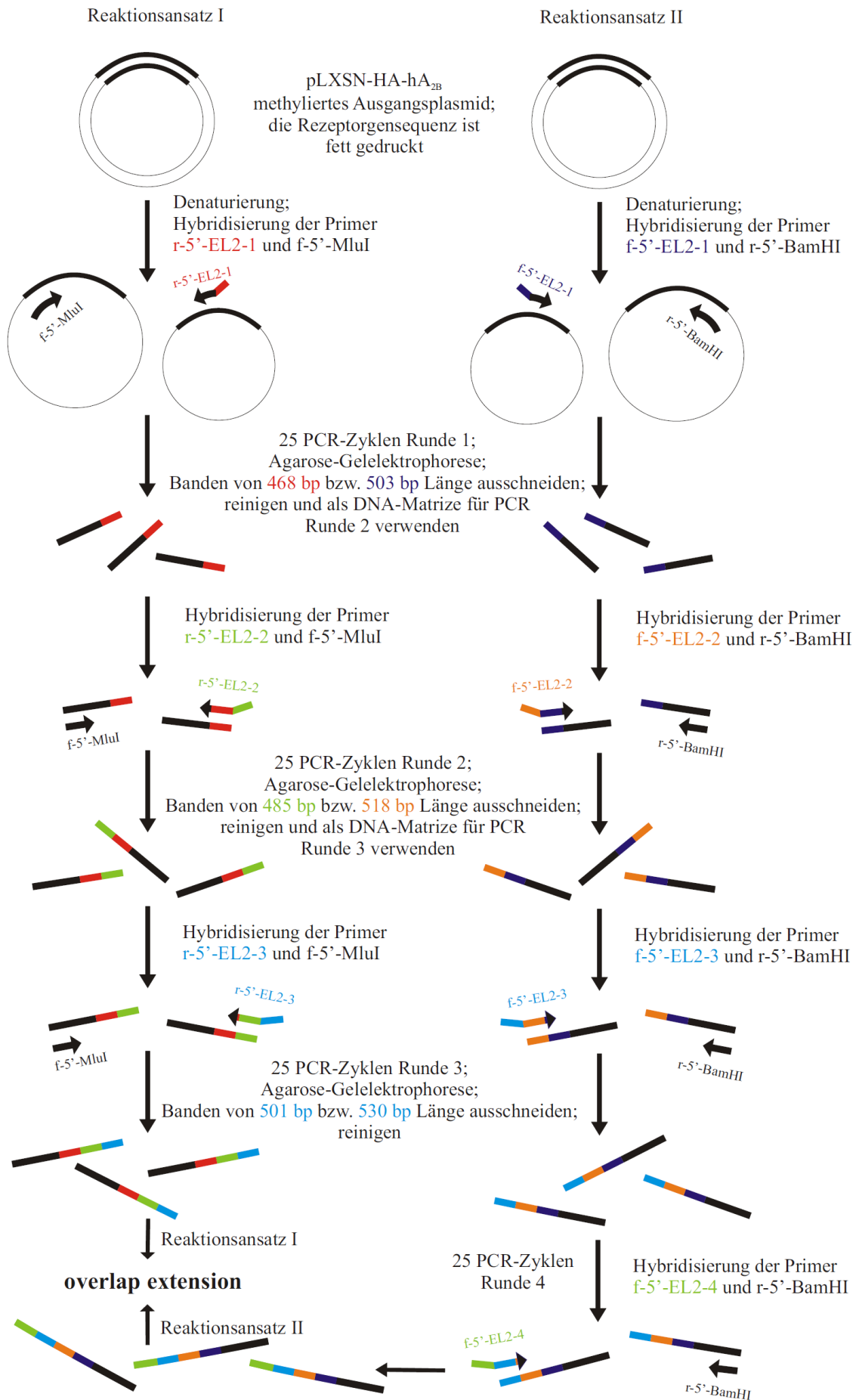


Abbildung 21. Klonierung Teil 1: Austausch der zweiten extrazellulären Schleife des hA_{2B}-Rezeptors gegen die zweite extrazellulären Schleife des hA_{2A}-Rezeptors.

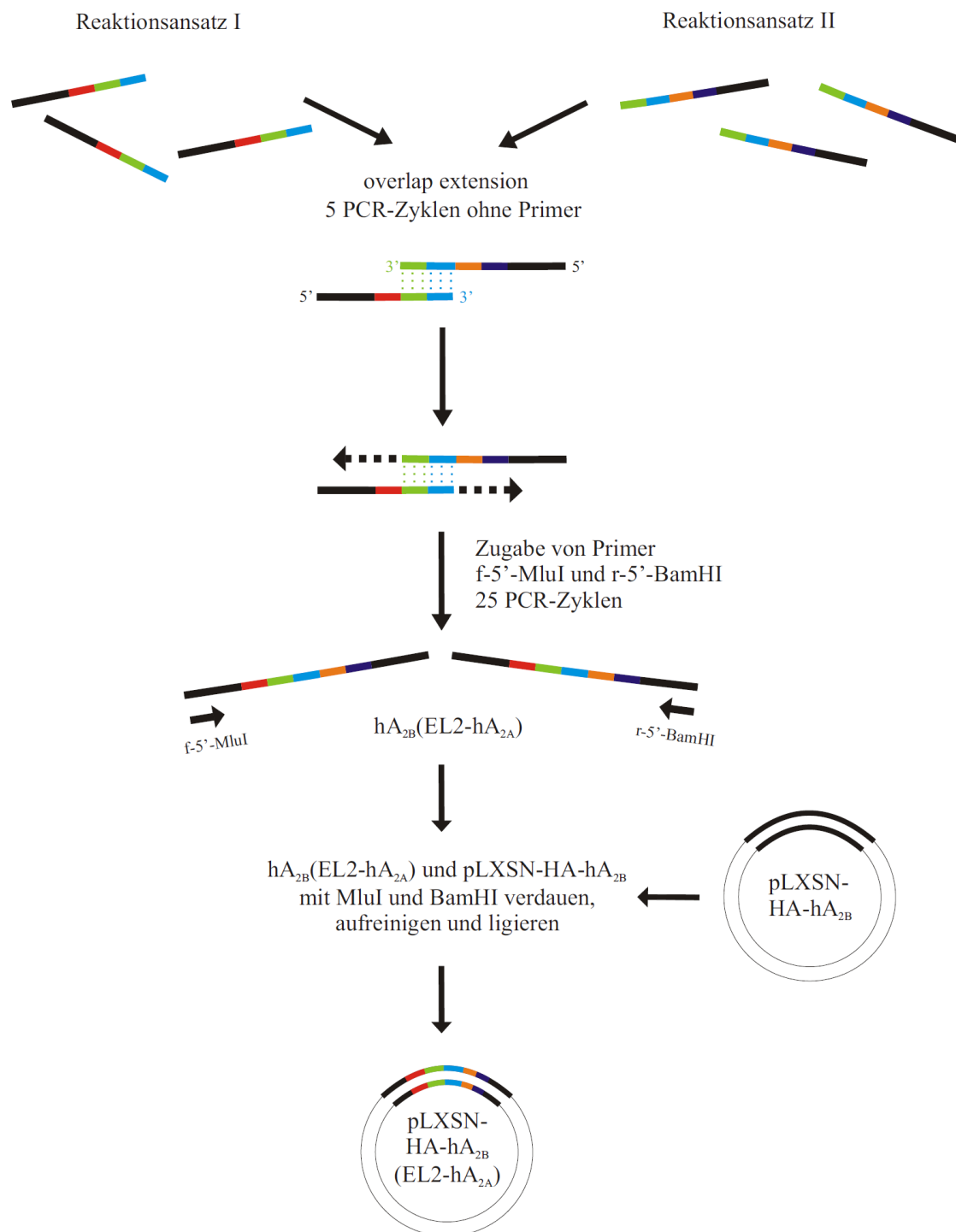


Abbildung 22. Klonierung Teil 2: "Overlap Extension"-Methode.

Nach der Klonierung des Plasmids pLXSN-HA-hA_{2B}(EL2-hA_{2A}) folgt die retrovirale Transfektion. Dabei wird ein retroviraler Vektor (pLXSN), der das mutierte Gen enthält, in eine Verpackungszelle (GP⁺envAM12) eingebracht und dort in Virushüllproteine verpackt. Die Verpackungszelle setzt diese Viren frei. Nach einer Reinigung werden damit die Zielzellen (CHO-Zellen) infiziert. Die schematische Darstellung für den beschriebenen Vorgang findet sich in Abbildung 20 unten links

bzw. oben rechts. Die Durchführung aller Experimente erfolgt zum Vergleich parallel mit den Wildtyp-A_{2B}- und -A_{2A}-Rezeptoren. Eine stabile CHO-HA-hA_{2B}-Zelllinie konnte im Rahmen der eigenen Diplomarbeit etabliert und für diese Experimente genutzt werden. Die stabile und getestete CHO-hA_{2A}-Zelllinie war bereits im Arbeitskreis von Frau Prof. Dr. Christa E. Müller vorhanden und wurde ebenfalls benutzt.

Expression in CHO-Zellen

Die Expressionsrate der Rezeptoren ist wichtig für die Interpretation und Diskussion der später folgenden Ergebnisse aus den Radioligand-Bindungsstudien und funktionellen cAMP-Experimenten. Die Bestimmung der Expressionsrate der Rezeptoren erfolgt über den B_{max}-Wert, welcher die maximale Anzahl der spezifischen Bindungsstellen an einem Protein in [fmol/mg Protein] angibt. Die Berechnung des B_{max}-Wertes erfolgt experimentell über die homologe Konkurrenz mit [³H]MSX-2 für hA_{2A} bzw. mit [³H]PSB-603 für hA_{2B} und hA_{2B}(EL2-hA_{2A}). Die Durchführung der homologen Konkurrenz ist im nachfolgenden Kapitel 2.1.2 erläutert. Für die Expressionsbestimmung sind folgende Parameter und Formeln wichtig:

B_{max} = maximale Anzahl der spezifischen Bindungsstellen an einem Protein

IC₅₀-Wert = Substanzkonzentration, die 50 % der Radioligand-Bindung inhibiert

RL = Konzentration des Radioliganden

cpm = Zerfälle pro Minute (counts per minute)

Effizienz = Countereffizienz in Prozent

spez. Akt. = spezifische Aktivität des Radioliganden in [Ci/mmol]

Der IC₅₀-Wert stammt aus den Experimenten der homologen Konkurrenz. Die dazu eingesetzte Radioligandenkonzentration und die erhaltende spezifische Bindung fließen in der nachfolgenden Formel für die Berechnung des B_{max}-Wertes in [cpm] ein.

$$B_{\max} [\text{cpm}] = \frac{\text{spezifische Bindung}[\text{cpm}] \times \text{IC}_{50} [\text{nM}]}{\text{RL} [\text{nM}]}$$

Unter Einbeziehung der Counter-Effizienz, des Umrechnungsfaktors von cpm in Bq, der spezifischen Aktivität des eingesetzten Radioliganden, sowie der

Proteinkonzentration kann der in [cpm] angegebene B_{\max} -Wert mit Hilfe der nachstehenden Formel in [fmol/mg Protein] umgerechnet werden.^{239, 240}

$$B_{\max} [\text{fmol/mg Protein}] = \frac{B_{\max} [\text{cpm}] \times 100}{\text{Effizienz} \times 2,2 \times \text{spez. Akt. [Ci/mmol]} \times \text{Protein [mg]}}$$

2.1.2 Konkurrenzexperimente

Als geeignete Methode für die Charakterisierung von Rezeptoren bieten sich die Konkurrenzexperimente an, welche zu den Radioligand-Bindungsstudien gehören. Hierbei konkurriert ein nicht-radioaktiver Ligand (Kaltligand) mit einem Radioliganden um eine Rezeptorbindungsstelle (siehe Abbildung 23). Ist dabei der nicht-radioaktive Ligand chemisch gleich dem Radioliganden so lautet die Bezeichnung für das Experiment "Homologe Konkurrenz". Bei chemisch ungleichen Liganden handelt es sich um eine "Heterologe Konkurrenz". Ziel dieser Experimente ist es, die Bindung und damit die Affinität von unterschiedlichen hA_{2B} - und hA_{2A} -Rezeptorliganden an der hA_{2B} (EL2- hA_{2A})-Rezeptormutante zu untersuchen. Hieraus lassen sich Informationen zur Rolle des EL2 ableiten, indem die Mutante mit den beiden Wildtyprezeptoren verglichen wird.

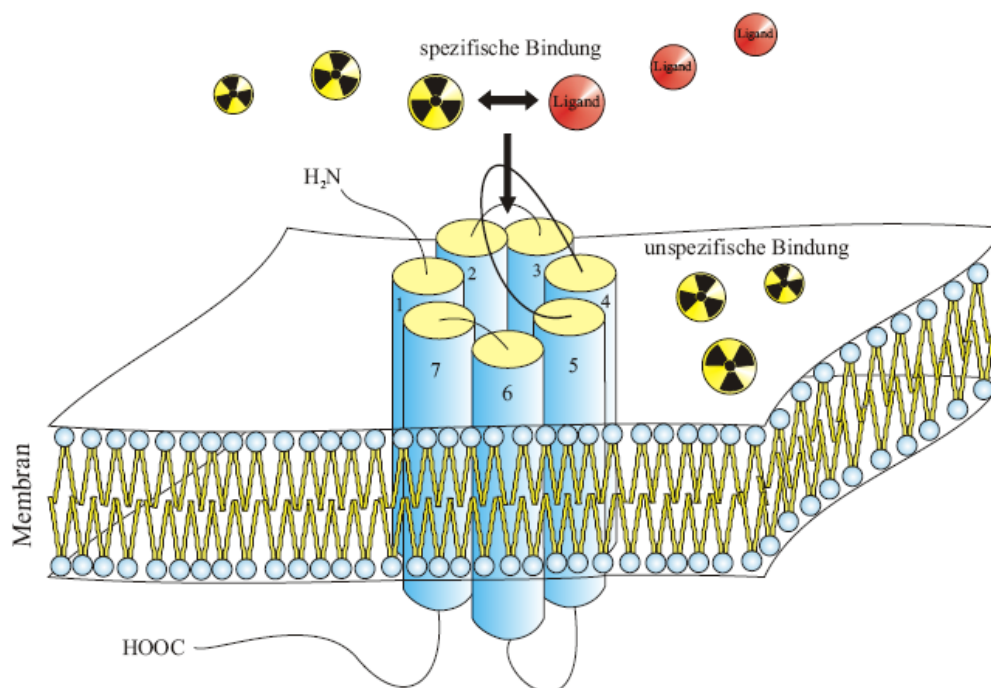


Abbildung 23. Konkurrenzexperimente: Radioliganden konkurrieren mit unmarkierten Liganden um die Rezeptorbindungsstelle.

Für die Konkurrenzexperimente werden zunächst die zu untersuchenden Rezeptoren aus den Zellen mittels Membranpräparation (siehe Kapitel 6.5) gewonnen. Bei der Inkubation der Rezeptoren mit einer konstanten Konzentration des Radioliganden und variablen Konzentrationen des Kaltliganden kommt es zur Rezeptor-Ligand-Komplexbildung. Hat sich ein Gleichgewicht dieser Reaktion eingestellt, werden freie Radioliganden und nicht gebundene Kaltliganden über einen Glasfaserfilter von Rezeptor-Ligand-Komplexen getrennt. Dies geschieht schnell mit Hilfe einer Vakuumpumpe. Im nächsten Schritt wird die ionisierende Strahlung der gebundenen Radioliganden auf dem Filter quantifiziert. Allerdings kann diese Menge an Radioligand nicht mit der tatsächlich, spezifisch an den Rezeptor gebundene Menge gleichgesetzt werden, da der Ligand auch unspezifisch an die Membranpräparation sowie das Filtermaterial bindet. Zur Berechnung der spezifischen Bindung, kann von der Gesamtbindung die unspezifische Bindung subtrahiert werden. Zur Ermittlung der unspezifischen Bindung wird zum Versuchsansatz zusätzlich ein nicht-radioaktiver, spezifischer Ligand in sehr hohen Konzentrationen zugesetzt. Der Radioligand wird dadurch vollständig vom Rezeptor verdrängt.²⁴⁰⁻²⁴² Eine Radioligand-Rezeptor-Bindungsstudie gilt als ausreichend, wenn 50 % der Gesamtbindung spezifisch ist, als gut, wenn die spezifische Bindung 70 % beträgt und sehr gut bei 90 %.²⁴² Häufig handelt es sich bei dem eingesetzten Radioliganden um einen Antagonisten. Der Vorteil liegt in der ähnlich hohen Affinität vom Liganden zur aktiven, wie zu inaktiven Rezeptorkonformation. Dies steht im Gegensatz zu Agonisten mit hoch- und niedrigaffinen Bindungsstellen. Als Radioliganden finden der A_{2B}-Rezeptor-Antagonist [³H]PSB-603, sowie der A_{2A}-Rezeptor-Antagonist [³H]MSX-2 und der A_{2A}-Rezeptor-Agonist [³H]CGS-21680 ihren Einsatz. Damit der Radioligand chemisch möglichst wenig verändert wird, erfolgt die Markierung mit Tritium, welches ein oder mehrere Wasserstoffatome ersetzt. Nach der Durchführung können nun in einem Graphen logarithmisch die Konzentrationen des unmarkierten Liganden gegen die prozentuale spezifische Bindung des Radioliganden aufgetragen werden. Als Resultat ergibt sich eine sigmoidale Kurve an der der IC₅₀-Wert abgelesen werden kann. Der IC₅₀-Wert ist die Konzentration des unmarkierten Liganden die benötigt wird, um 50 % des Radioliganden vom Rezeptor zu verdrängen.^{240, 243} Der K_D-Wert dagegen ist eine Dissoziationskonstante, die sich aus dem Massenwirkungsgesetz ableitet und die Konzentration angibt, bei der 50 % der Rezeptoren von einem Radioliganden besetzt sind.²⁴⁰ Je kleiner der K_D-Wert ist, desto höher ist die Konzentration an Ligand-

Rezeptor-Komplexen. Aus der homologen Konkurrenz leitet sich dann der K_D -Wert folgendermaßen ab:

$$K_D = IC_{50} - RL \text{ (gilt nur für homologe Konkurrenz)}$$

K_D -Wert = Konzentration, bei der 50 % der Rezeptoren von einem Radioliganden besetzt sind; Dissoziationskonstante

IC_{50} = Substanzkonzentration, die 50% der Radioligandenbindung inhibiert

RL = Konzentration des Radioliganden

K_i -Wert = Dissoziationskonstante des Inhibitors

Da der IC_{50} -Wert abhängig von den experimentellen Bedingungen ist, ist der experimentell unabhängige K_i -Wert von Vorteil. Dieser ist die Dissoziationskonstante des Inhibitors. Je kleiner der K_i -Wert ist, desto stärker bindet der Ligand an den Rezeptor. Mittels Cheng-Prusoff-Gleichung berechnet sich der K_i -Wert folgendermaßen:²⁴⁴

$$K_i = \frac{IC_{50}}{1 + \frac{RL}{K_D}}$$

2.1.3 Funktionelle Experimente: cAMP-Akkumulation

Zur Untersuchung der Funktionalität der Rezeptoren werden cAMP-Akkumulationsexperimente durchgeführt. Im ersten Schritt findet die Inkubation der lebenden Zellen, die die rekombinant überexprimierten Rezeptoren enthalten, mit einem Agonisten statt. Dabei kommt es in der Zelle über eine Signalkaskade zur Bildung von cAMP. Anschließend erfolgt die Lyse der Zellen und damit die Freisetzung des gebildeten cAMP. Im folgenden Schritt konkurriert dieses gebildete nicht-radioaktiv markierte cAMP mit radioaktivem [³H]cAMP um ein spezifisches cAMP-Bindeprotein. Mit steigender Menge an cAMP, sinkt die spezifische Bindung des Radioliganden an das Bindeprotein. Die von den Zellen tatsächlich gebildete Menge an cAMP kann anhand einer cAMP-Standardgeraden bestimmt werden. Diese Ergebnisse werden auf die cAMP-Konzentration nach Stimulation von 100 µM Forskolin als 100 %-Wert bezogen. Forskolin ist ein Diterpen, welches die Adenylatcyclase direkt stimuliert. Die Bildung des cAMPs über diesen Weg erfolgt also rezeptorunabhängig. Die erhaltenen

Werte können gegen die logarithmierten Agonistenkonzentrationen aufgetragen werden und man erhält eine sigmoidale Kurve. Daraus lässt sich der EC_{50} -Wert ablesen. Der EC_{50} -Wert ist die Konzentration des Agonisten, bei der ein halbmaximaler Effekt beobachtet wird.

2.1.4 Computermodell der hA_{2B} (EL2- hA_{2A})-Rezeptor-Mutante

Für diese Arbeit hat Frau Dr. Anke Schiedel ein Computermodell von der hA_{2B} (EL2- hA_{2A})-Rezeptor-Mutante, sowie dem hA_{2A} -Rezeptor mit dem Agonisten CGS-21680 mit dem Programm MOE 2008 erstellt. Das Modell basiert auf der Röntgenkristall-Struktur des A_{2A} -Rezeptors von Xu et al.³⁹ und dem Homologiemodell des hA_{2B} -Rezeptors von Sherbiny et al.²¹¹

2.2 Homodimerisierung von humanen Adenosin-A_{2B}-Rezeptoren

Für die Untersuchung von humanen Adenosin-A_{2B}-Rezeptoren auf das Homodimerisierungsverhalten wird die Biolumineszenz-Resonanz-Energie-Transfer Methode verwendet. Die Klonierung der dafür benötigten DNA-Konstrukte hA_{2B}-Rluc, hA_{2B}-YFP, hA_{2A}-Rluc, hA_{2A}-YFP, D₂-Rluc, GABA-YFP, Rluc-YFP, hA_{2B}-M198A-Rluc und hA_{2B}-M198A-YFP erfolgt wie in Kapitel 6.3.20 und 6.3.21 beschrieben.

2.2.1 Biolumineszenz-Resonanz-Energie-Transfer

Der Biolumineszenz-Resonanz-Energie-Transfer, kurz BRET, ist eine in der Natur vorkommende Erscheinung, wie z.B. bei der Seefedernart *Renilla reniformis* oder der Qualle *Aequorea victoria*, welche Biolumineszenz aufweisen.^{245, 246} Dabei beruht BRET auf einem strahlungslosen Energietransfer zwischen einem biolumineszierenden Enzym-Substrat-Komplex als Donor und einem Fluoreszenzprotein als Akzeptor. In der wissenschaftlichen Forschung ist BRET eine geeignete Methode, um Protein-Protein Interaktionen in lebenden Zellen zu detektieren.²⁴⁷ Aufgrund von unterschiedlichen Donoren und Akzeptoren wird zwischen BRET¹ (= BRET), BRET², enhanced BRET² (eBRET), BRET³ und QD-BRET differenziert.²⁴⁸ In dieser Arbeit liegt der Fokus ausschließlich auf BRET. Eine Grundvoraussetzung dafür ist der oben erwähnte Enzym-Substrat-Komplex, welcher die Biolumineszenz erzeugt. Als Enzym findet die *Renilla* luciferase (Rluc) und als Substrat das Coelenterazin seinen Einsatz. Rluc stammt ursprünglich aus *Renilla reniformis* und besteht aus 311 Aminosäuren mit insgesamt 35 kDa.²⁴⁹ In der Literatur finden sich zahlreiche diskutierte Vorschläge, wie genau das Coelenterazin durch Rluc zu Coelenteramid umgesetzt wird.²⁴⁹⁻²⁵³ Aufgrund einer Kristallstruktur²⁵⁴ des mutierten Enzyms Rluc8 und ein darauf basierendes Homologiemodell²⁵⁵ von Rluc scheinen ebenfalls noch nicht die eindeutige Lösung zu bieten. Abbildung 24 zeigt eine eigene Variante des Reaktionsmechanismus basierend auf der zuvor genannten Literatur. Rluc benötigt im Gegensatz zu Aequorin übrigens kein Calcium zur Konformationsänderung des Enzyms.²⁵⁵ Das Substrat Coelenterazin ist ein Imidazolpyrazin, welches ideal in das aktive Zentrum des Rlucs hinein passt. Durch die Hydroxygruppen des Coelenterazins kommt es zur Interaktion mit den Aminosäuren D120 und E144 und möglicherweise auch zur Bindung mit T184 von Rluc. Durch H285 kommt es zur Deprotonierung des Coelenterazins und es entsteht als Intermediat ein

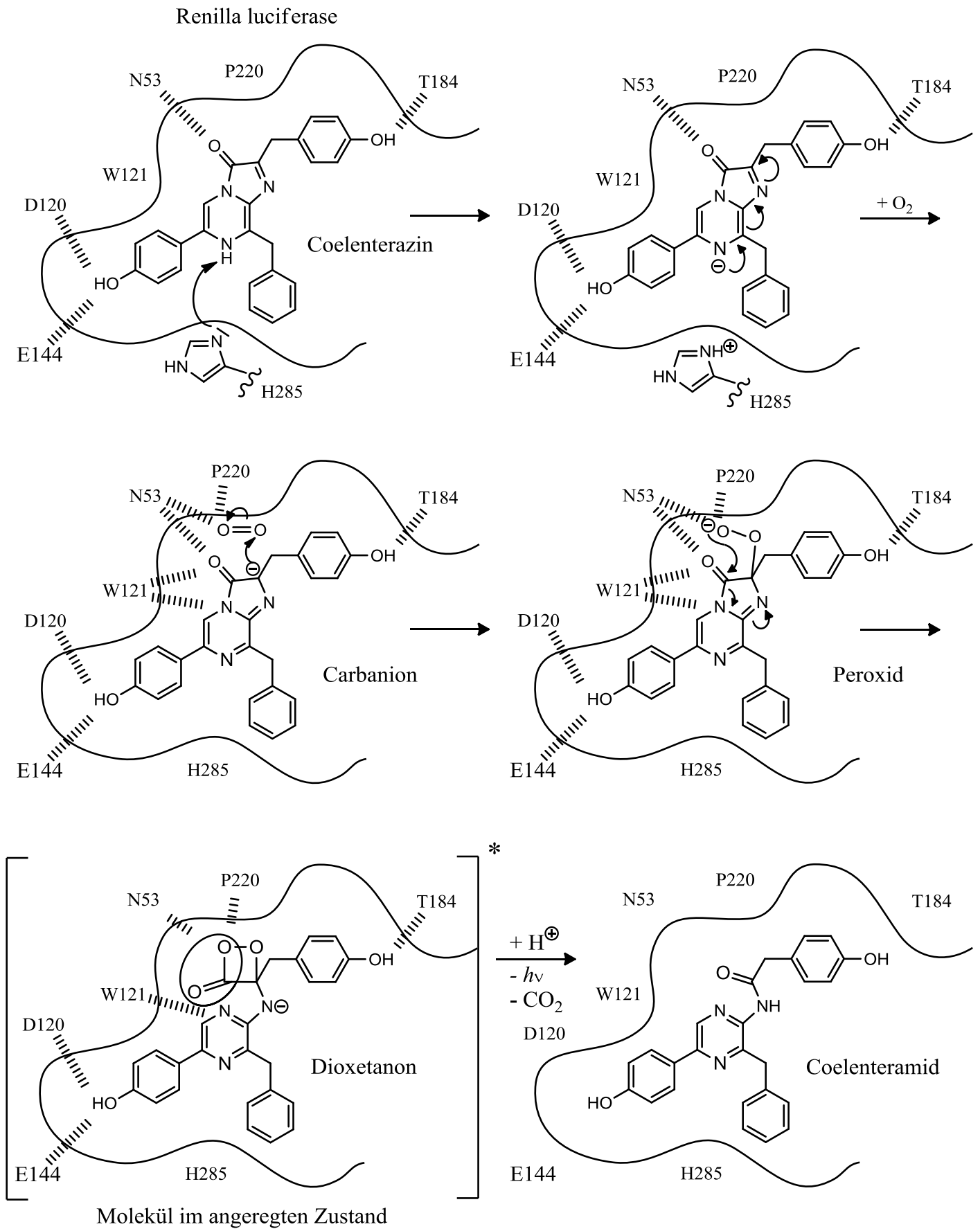


Abbildung 24. Enzym-Substrat-Komplex: Umsetzung vom Coelenterazin zu Coelenteramid durch die Renilla Luciferase unter Freisetzung von Biolumineszenz. (Beschreibung siehe Text)

Carbanion. Als katalytische Triade fungieren nun die Aminosäuren N53, W121 und P220. Unter Einbindung von Sauerstoff bildet sich zunächst ein Peroxid und daraufhin ein Dioxetanon. Dieses instabile Dioxetanon zerfällt in CO_2 und ein Keton, welches das Molekül in einen elektronisch angeregten Zustand versetzt. Unter Emission von blauem Licht ($\lambda = 480 \text{ nm}$), der sogenannten Biolumineszenz, gelangt das Molekül zurück in den Grundzustand. Nach der Protonierung entsteht das Coelenteramid, welches erst jetzt durch das Enzym freigesetzt wird. Die Übertragung der so entstandenen Biolumineszenz auf ein Fluoreszenzprotein erfolgt nur unter bestimmten Voraussetzungen. Eine davon ist, dass das Emissionsspektrum des Donors mit dem Absorptionsspektrum des Akzeptors, wie in Abbildung 25 gezeigt, überlappen muss.

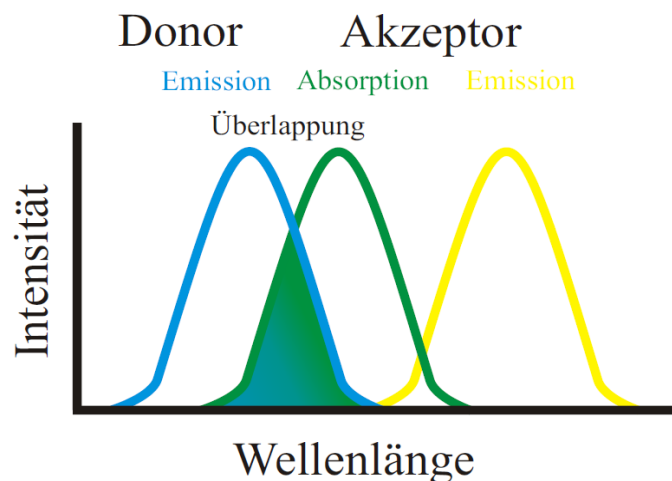


Abbildung 25. Energietransfer: Durch den Donor kommt es zur Emission der Biolumineszenz. Überlappt das **Emissionsspektrum des Donors** mit dem **Absorptionsspektrum des Akzeptors** (blau-grüne Fläche) so kommt es bei einer höheren Wellenlänge zur **Emission des Akzeptors**.

Des Weiteren erfolgt die Übertragung der Biolumineszenz vom Donor auf den Akzeptor nur, wenn diese nicht weiter als 10 nm voneinander entfernt sind. Hierbei gilt: Je kürzer die Distanz, desto höher ist der Übertrag. Die räumliche Ausrichtung/Orientierung der beiden Partner haben ebenfalls einen Einfluss auf die Energieübertragung vom Donor auf den Akzeptor.²⁴⁸

Akzeptoren können verschiedene Fluoreszenzproteine sein, wie zum Beispiel das Grüne oder Gelbe Fluoreszierende Protein, abgekürzt als GFP und YFP (*Green/Yellow Fluorescent Protein*). Der heutige Nobelpreisträger Shimomura publizierte 1962 ein Biolumineszenz-System und das GFP in der Qualle *Aequoria victoria*.²⁵⁶ In dieser Qualle besteht der Enzym-Substrat-Komplex aus Aequorin (+Ca²⁺) und Coelenterazin, welcher als Donor fungiert.²⁵⁷ Die daraus resultierende Biolumineszenz wird auf das GFP übertragen und in Form von Fluoreszenz freigesetzt. Auch heute ist das GFP und vor allem seine weiterentwickelten Varianten von großer Bedeutung, daher ist es in Abbildung 26 schematisch dargestellt.^{258, 259} Das 238 Aminosäuren lange GFP hat eine Molekülmasse von 26,9 kDa und besitzt im Zentrum ein Chromophor, welches sich autokatalytisch aus den drei Aminosäuren Ser65–Tyr66–Gly67 bildet. Dabei besitzt das GFP zwei Anregungsmaxima und zwar bei 395 nm sowie 475 nm und ein Emissionsmaximum bei 508 nm.^{259, 260}

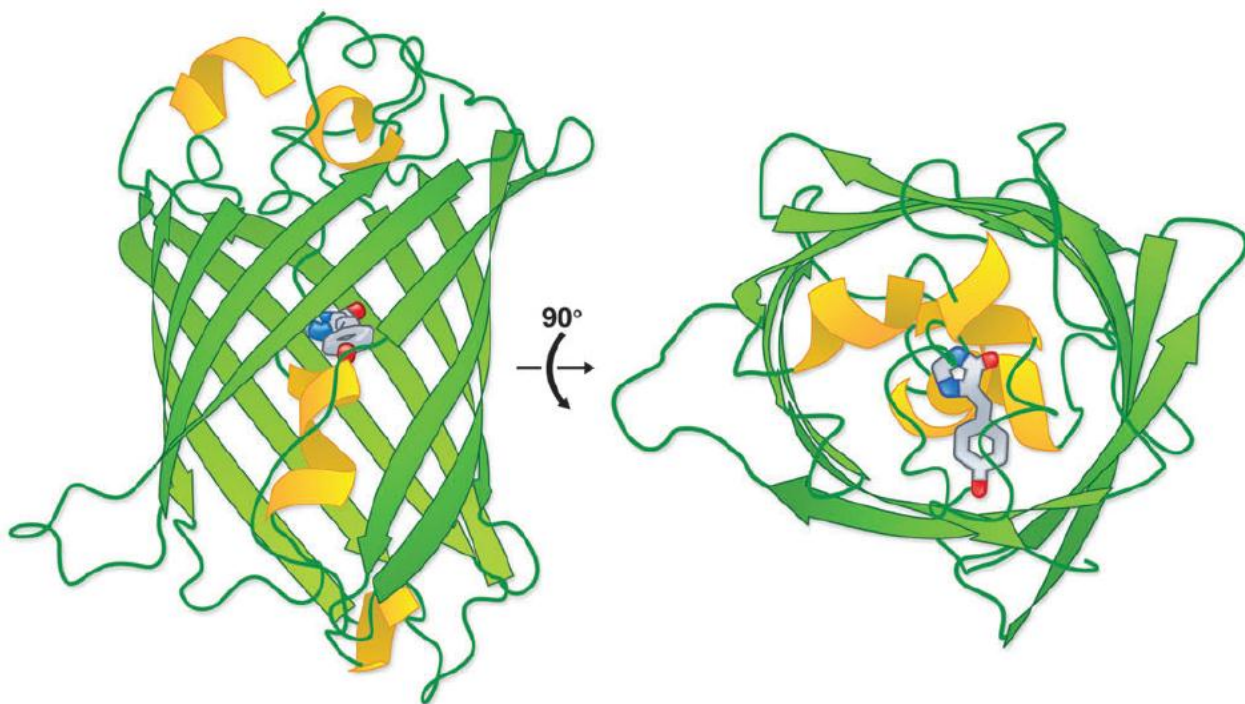


Abbildung 26. Darstellung des GFP aus der Seitenansicht (links) und von oben (rechts) jeweils mit dem Chromophor in der Mitte (nach Frommer).²⁵⁸

Verschiedene Mutationen des GFPs führen zu einer Weiterentwicklung bei veränderten Wellenlängen mit einer höheren Fluoreszenzintensität. Dazu gehört auch das gelb-fluoreszierende Protein, eYFP (*enhanced Yellow-Fluorescent-Protein*). Das eYFP besteht aus 239 Aminosäuren mit einer Molekülmasse von ebenfalls 26,9 kDa. Wobei das Absorptionsmaximum bei 514 nm liegt und das Emissionsmaximum bei 527 nm.²⁶¹ Das wichtige Chromophor befindet sich im Zentrum des Proteins, ist allerdings im Gegensatz zum GFP mutiert. Bei dem eYFP entsteht das Chromophor autokatalytisch aus den drei Aminosäuren Gly65–Tyr66–Gly67. Abbildung 27 zeigt diese autokatalytische Synthese des Chromophors, welche für das eYFP in der Literatur bislang noch nicht so dargestellt ist. Es leitet sich aber von den Publikationen zur Synthese des Chromophors des GFPs ab.^{258, 262, 263} Abbildung 27 zeigt den Ausschnitt des eYFPs von den Aminosäuren Gly65 (rot), Tyr66 (lila) und Gly67 (blau), welche später das Chromophor bilden. Zunächst reagieren die beiden Amid-Gruppen der Glycine 65 und 67 indem sie zyklisieren und unter Dehydrierung zu einem Imidazolinon reagieren. Durch die Oxidation der α - β -Bindung des Tyrosins entsteht das Chromophor (grün). Es ist charakterisiert durch ein konjugiertes Elektronensystem. Wie das Chromophor genau bei der Anregung bzw. nach der Relaxation reagiert, ist in Abbildung 28 dargestellt.

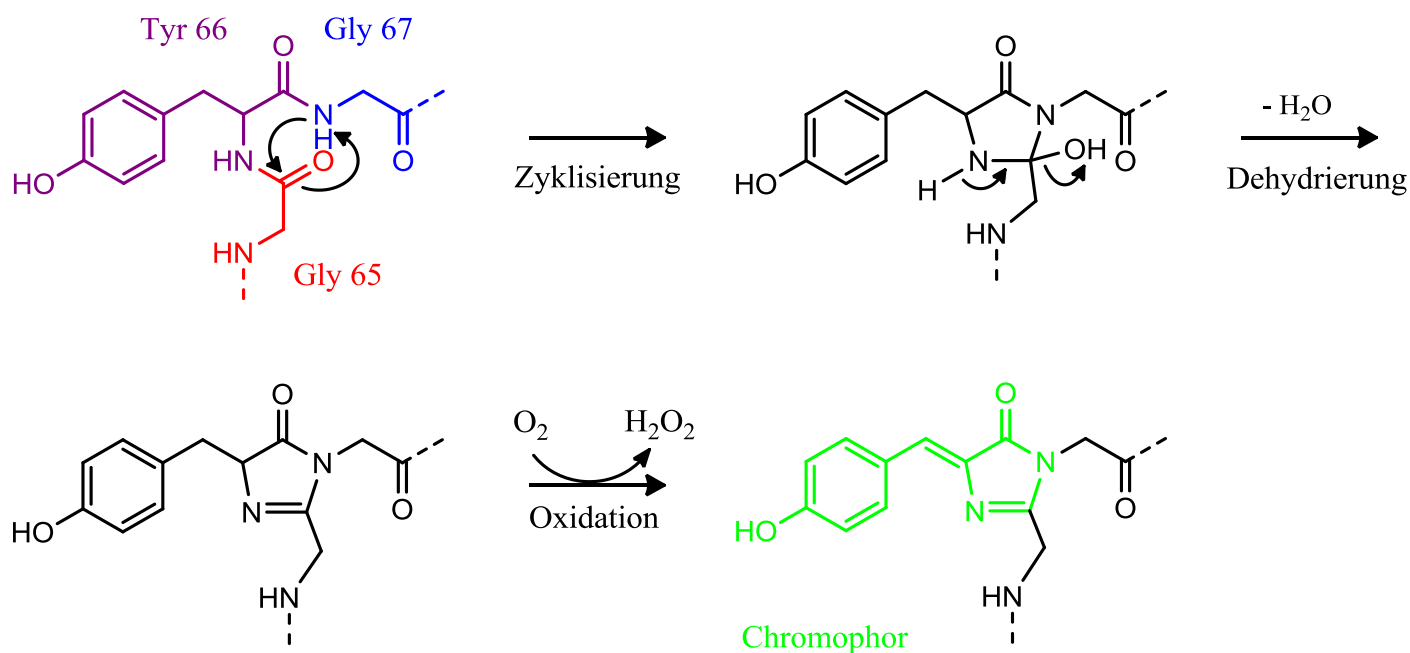


Abbildung 27. Autokatalytische Synthese des Chromophors von eYFP. (Beschreibung siehe Text)

Das Tyrosin 66, also ein Teil des Chromophors, liegt im Protein zunächst in der phenolischen-Form vor. Nach der Anregung des Chromophors, durch z.B. Biolumineszenz, bei einer Wellenlänge von 514 nm steigt auch der Säure-Charakter des Tyrosins 66. Damit kommt es zur Deprotonierung und das angeregte Phenolat entsteht. Nur diese angeregte Phenolat-Form (Abbildung 28, unten rechts) emittiert Licht bei einer Wellenlänge von 527 nm, welches detektiert werden kann. Dabei gelangt das Molekül zurück in den Grundzustand und wird wieder protoniert.

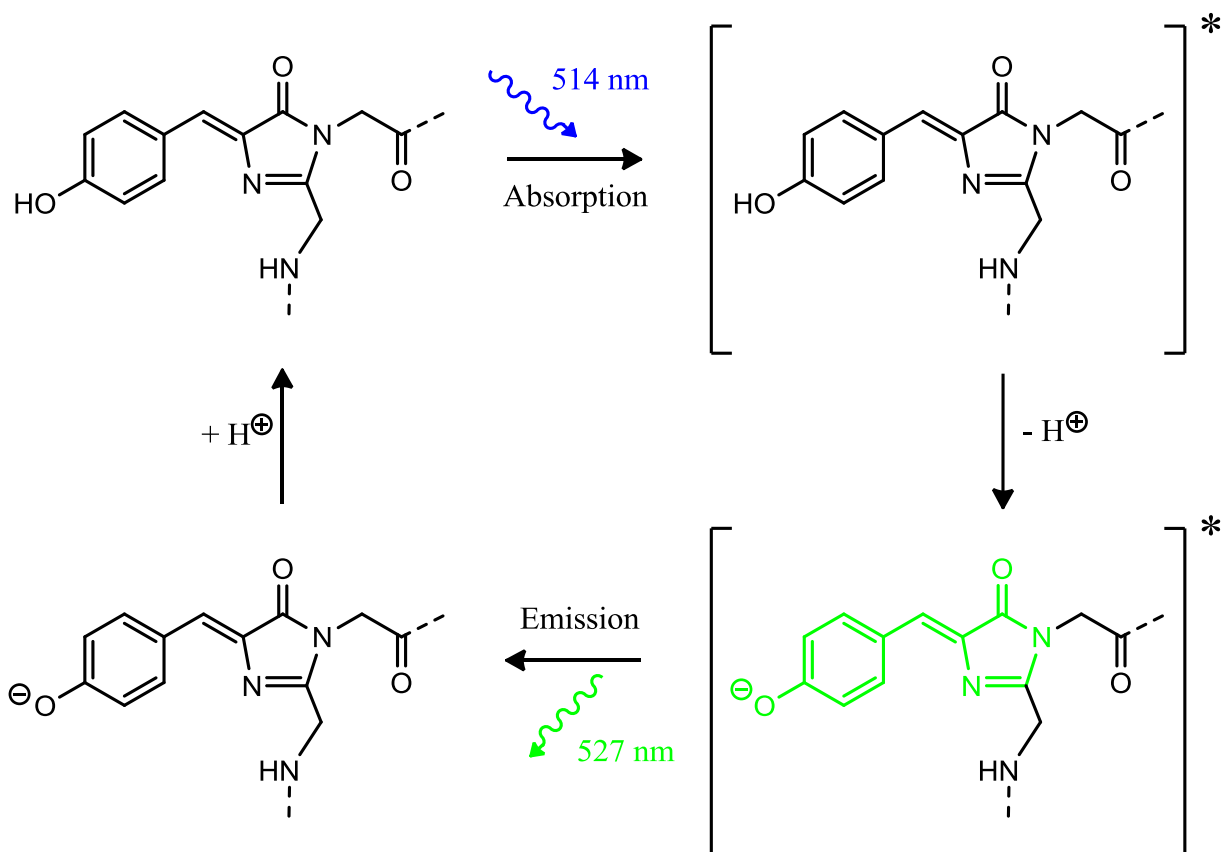


Abbildung 28. Chromophor des eYFP bei der Absorption (514 nm) der Biolumineszenz und Emission (527 nm) der Fluoreszenz. (Beschreibung siehe Text)

Nach der ausführlichen Erklärung der Grundlagen für den Biolumineszenz-Resonanz-Energie-Transfer folgt nun die Darstellung der BRET-Methode zum Nachweis von Protein-Protein-Interaktionen. Zu diesen Protein-Protein-Interaktionen gehören unter anderem die Dimerisierung bzw. Oligomerisierung von Rezeptoren. Im Jahr 1999 publizierte Xu erstmals die BRET-Methode.²⁶⁴ Um dabei die Interaktion zweier Rezeptoren zu überprüfen, wird zunächst ein Rezeptor mit Rluc (Donor) gekoppelt und der zweite Rezeptor mit eYFP (Akzeptor). Abbildung 29 zeigt diese BRET-Methode.

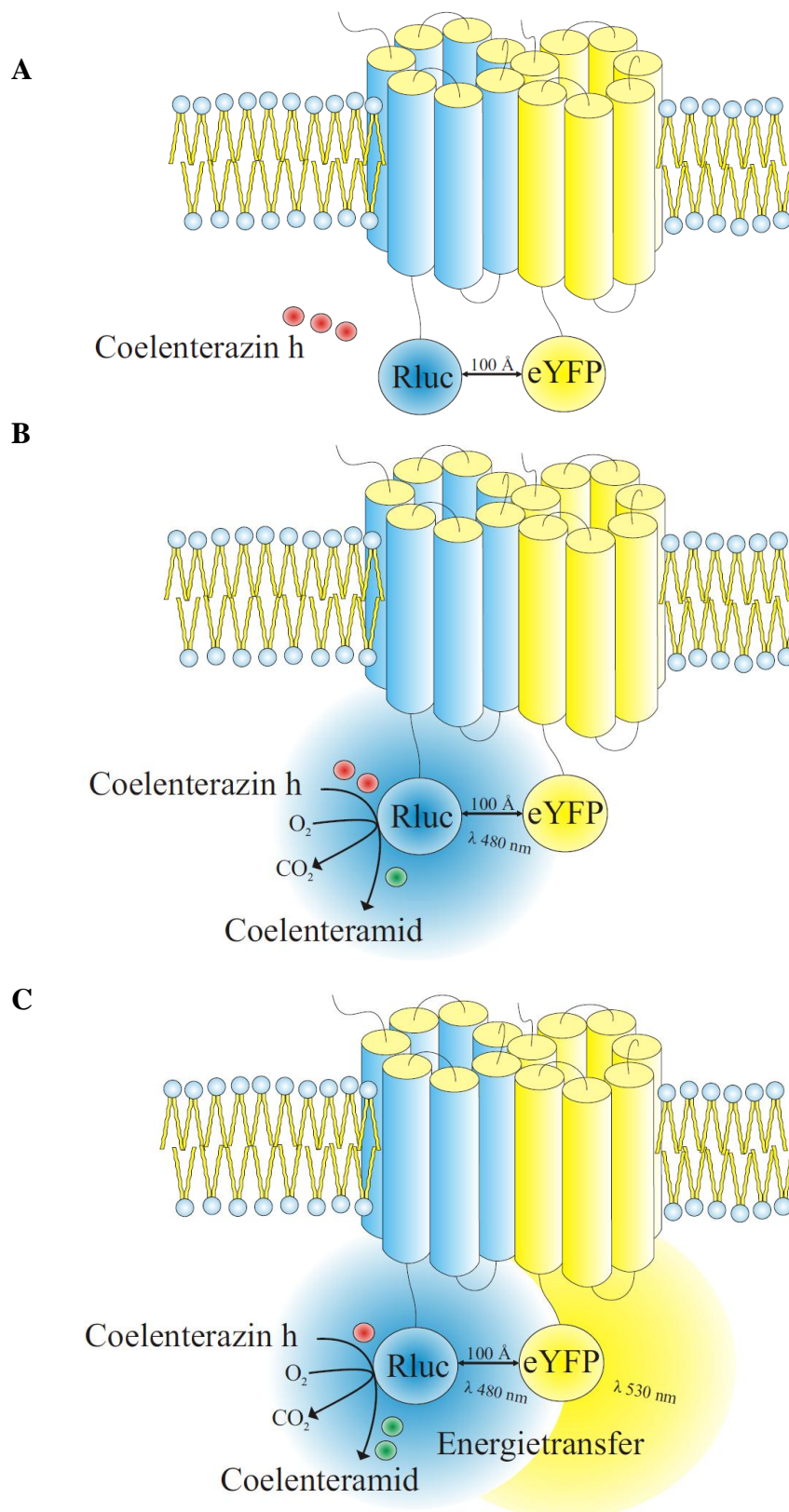


Abbildung 29. BRET-Methode: Schematische Darstellung der Interaktion zweier Rezeptoren.

(A) Dimerisieren zwei Rezeptoren, die mit einer Renilla Luciferase (Rluc) bzw. dem gelb fluoreszierende Protein (eYFP) gekoppelt sind, so sind die beiden letzt genannten Proteine nicht weiter als $100 \text{ \AA} = 10 \text{ nm}$ voneinander entfernt. Es folgt die Zugabe von Coelenterazin h zu den Zellen. (B) Coelenterazin wird in Anwesenheit von Sauerstoff durch Rluc zu Coelenteramid umgesetzt, dabei entsteht Biolumineszenz ($\lambda 480 \text{ nm}$). (C) Nach der Übertragung dieser Biolumineszenz auf den Akzeptor eYFP, kann die Emission des Akzeptors bei 530 nm gemessen werden.

Wird zu den Zellen das Substrat Coelenterazin gegeben und sofort die Emission bei 530 nm gemessen, so kann auf eine bzw. keine Interaktion der Rezeptoren zurück geschlossen werden. Ausschlaggebend für den Energietransfer ist hier die Distanz zwischen Rluc und eYFP. Ist diese kleiner als 10 nm, so kommt es zum Energietransfer und die entsprechend zu untersuchenden Rezeptoren, die an den Donor und Akzeptor gekoppelt sind, liegen räumlich in der Zelle auch hinreichend nahe zusammen, sodass von einer Dimerisierung ausgegangen werden kann.

Für dieses BRET-Experiment werden konstante Konzentrationen der Rezeptor-Rluc DNA und steigende Konzentrationen der Rezeptor-eYFP DNA in CHO-Zellen transfiziert. Nach der Expression der Rezeptoren, der Aufarbeitung und der Zugabe von Coelenterazin, folgt die Messung der Biolumineszenz sowie der Fluoreszenz. In Abbildung 30 ist das BRET-Prinzip gezeigt. Dabei ist zwischen einem unspezifischen und einem spezifischen Signal zu unterscheiden. Die daraus resultierende graphische Auswertung der Signale ist sowohl für die spezifische als auch unspezifische Interaktion in Abbildung 31 dargestellt.

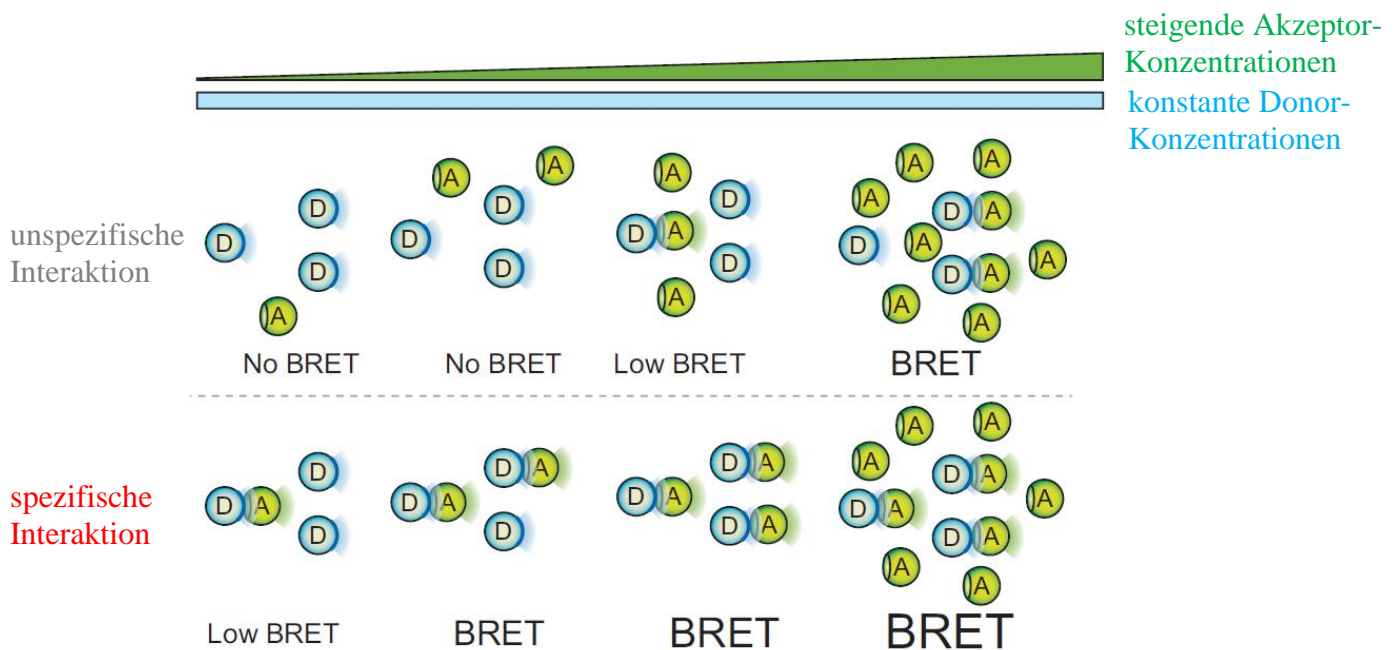


Abbildung 30. BRET-Prinzip: Bei konstanten Konzentrationen des Donors (D) und geringen Konzentrationen des Akzeptors (A) ist bei einer unspezifischen Interaktion zunächst kein Energieübertrag auf den Akzeptor zu messen und bei sehr hohen Konzentrationen des Akzeptors ein geringes Fluoreszenzsignal durch zufälliges Aufeinandertreffen von Donor und Akzeptor in der Zelle. Bei einer spezifischen Interaktion ist auch schon bei geringen Akzeptorkonzentrationen ein moderates BRET-Signal zu detektieren. Dieses steigt stark mit steigender Akzeptormenge an. Die Abbildung ist modifiziert nach Barcat.²⁴⁸

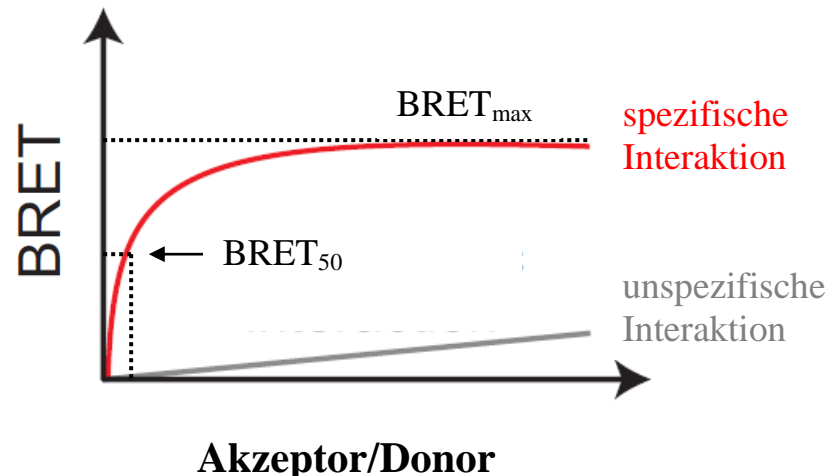


Abbildung 31. Graphische Auswertung der BRET-Signale modifiziert nach Barcat und Ayoub.²⁴⁸
²⁶⁵ Bei der Auftragung vom Akzeptor/Donor-Signal gegen das BRET-Signal ist bei einer unspezifischen Interaktion (grau) das Resultat eine flach ansteigende Gerade. Bei einer spezifischen Interaktion (rot) ist das Ergebnis eine Hyperbel, wobei der maximal Wert als $BRET_{max}$ bezeichnet wird und die Höhe des maximal gemessenen Energieübertrags (mBU) angibt. Der $BRET_{50}$ -Wert wird über den $BRET_{max}$ -Wert bestimmt und gilt als Maß für die relative Affinität von Rezeptoren zueinander.²⁶⁶

Kontrollen

Es gibt insgesamt zwei unterschiedliche Arten von Kontrollen, für sowohl die Positiv- als auch für die Negativkontrolle. Zum einen können für die Dimeruntersuchungen, je ein bereits bekanntes Dimer bzw. ein Rezeptorpaar welches garantiert kein Dimer bildet, benutzt werden. Als Positivkontrolle wird in dieser Arbeit das von Canals et al. publizierte Dimer D_2 -Rluc und A_{2A} -YFP eingesetzt und als Negativkontrolle die Rezeptoren A_{2A} -Rluc und GABA-YFP.²⁶⁷ Zum anderen können Rluc und YFP als direkt verknüpfte Proteine als Positivkontrolle bzw. als getrennte Proteine als Negativkontrolle fungieren.

2.2.2 Verdrängungsexperimente

Bei dem Verdrängungsexperiment handelt es sich um einen BRET-Versuch, bei dem ein Rezeptor aus einem möglichen Dimer durch Zugabe von unmarkiertem Rezeptor verdrängt wird. Es wird zeitgleich eine transiente Dreifachtransfektion durchgeführt, bei der ein Rezeptor mit Rluc, ein anderer mit YFP in je gleichen DNA-Konzentrationen, und ein dritter Rezeptor ohne Tag in steigenden Mengen transfiziert werden. Der Rezeptor ohne Tag bildet nun, je höher die eingesetzte Konzentration ist, mehr Dimere

mit je einem der beiden markierten Rezeptoren. Da nur ein BRET-Signal gemessen werden kann, welches zwischen Rluc und YFP übertragen wird, muss das BRET-Signal sinken. Ist kein Dimer vorhanden, dann kann auch kein markierter Rezeptor verdrängt werden und es gibt keinen Unterschied im BRET-Signal.

2.2.3 Einfluss von Liganden auf die Homodimerisierung

Es ist wichtig herauszufinden, welchen Einfluss verschiedene Liganden auf das Dimerisierungsverhalten haben, denn dies kann bei der Findung neuer Wirkstoffe hilfreich sein. Zudem können Monomere und Dimere verschiedene pharmakologische Wirkungsmechanismen aktivieren. Es gibt drei Möglichkeiten, wie die Rezeptordimere im BRET-Experiment über den zeitlichen Verlauf hinweg auf die Agonisten- oder Antagonisten-Zugabe reagieren können.¹⁶⁴ Das BRET-Signal könnte nach Zugabe des Liganden ansteigen, welches auf die Bildung von mehr Dimeren schließen lassen könnte. Sollte das BRET-Signal sinken, dann zerstört der Ligand sogar das Dimer und es entstehen möglicherweise wieder Monomere. Die dritte Möglichkeit wäre, dass es keinen messbaren Unterschied gibt und dann deutet das auf sehr stabile Dimere hin, die sich nicht durch Liganden beeinflussen lassen.

2.2.4 Einfluss der M198A-Mutation auf die Adenosin-A_{2B}-Homodimerisierung

Bei dem nahe verwandten Adenosin-A_{2A}-Rezeptor-Homodimer konnten Thévenin et al. durch Untersuchungen der A_{2A}-M193A-Mutante die Aminosäure Met193, als besonders wichtig für die Interaktionsfläche zwischen dem Homodimer identifizieren.²²³ Die analoge Aminosäure im A_{2B}-Rezeptor, M198A, welche ebenfalls bei einem möglichen Dimer an der Interaktionsfläche beteiligt sein könnte, wird in diesem BRET-Experiment untersucht. Die Klonierung der benötigten DNA-Konstrukte hA_{2B}-M198A-Rluc und hA_{2B}-M198A-YFP erfolgt wie in Kapitel 6.3.21 beschrieben. Anschließend folgt die Durchführung eines normalen BRET-Experimentes.

2.2.5 Computermodell des Adenosin-A_{2B}-Rezeptor-Homodimers

Dr. Farag Sherbiny hat für diese Arbeit ein Computermodell des Adenosin-A_{2B}-Rezeptor Homodimers erstellt. Aus diesem Modell können neue Hypothesen über das Homodimer und die mögliche Interaktionsfläche entstehen. Da es sich um ein grobes Modell handelt, sind die Vorhersagen nicht hochpräzise und der Umgang mit den Ergebnissen sollte dem entsprechend vorsichtig ausfallen.

2.3 Heterodimerisierung von humanen Adenosin-A_{2A}- und -A_{2B}-Rezeptoren

2.3.1 Biolumineszenz-Resonanz-Energie-Transfer

Die BRET-Methode ist ausführlich in Kapitel 2.2.1 beschrieben. Da es sich hier um die Untersuchung des Heterodimers handelt, erfolgt die Umsetzung mit den hA_{2B}-Rluc- und hA_{2A}-YFP-Konstrukten.

2.3.2 Verdrängungsexperimente

Die Methode der Verdrängungsversuche ist in Kapitel 2.2.2 vollständig erläutert. Der Unterschied ist jedoch, dass zu Verdrängung der A_{2B}-Rezeptor bei dem zu untersuchenden Dimer aus A_{2B}-Rluc mit A_{2A}-YFP eingesetzt wird.

2.3.3 Einfluss von Liganden auf die Heterodimerisierung

Für die Beschreibung der Experimente, um den Einfluss der Liganden auf ein Heterodimer zu erforschen, siehe in Kapitel 2.2.3. Hierbei sind nicht nur A_{2B}-Liganden, sondern auch A_{2A}-Liganden wichtig.

2.3.4 Konfokale Mikroskopie

Das konfokale Mikroskop ist genauer gesagt ein konfokales Laser-Rastermikroskop, welches im Gegensatz zu den normalen Lichtmikroskopen scharfe Bilder sowohl in der Fokalebene als auch in der Tiefenebene liefert. Hierbei regt ein Laser bei der Absorptionswellenlänge die Fluorophore der Fluoreszenzproteine an, wobei das im Detektor ankommende Licht nur bei der Emissionswellenlänge der Fluoreszenzproteine detektiert wird. Somit sind optische Anregung und optische Detektion voneinander entkoppelt. Soll ein Protein wie Rluc (ohne Fluorophor) sichtbar gemacht werden, dann muss zuvor mittels Immunzytochemie ein Antikörper mit Fluorophor an der Zielstruktur binden.

2.3.5 Computermodell des Adenosin-A_{2A}-A_{2B}-Rezeptor Heterodimers

Wie in Kapitel 2.2.5 dargestellt, hat auch hier Dr. Farag Sherbiny ein Modell für das Adenosin-A_{2A}-A_{2B}-Rezeptor Heterodimer erstellt.

2.4 Oligomerisierung von Adenosin-Rezeptoren: Elektrophorese-Experimente

In diesem Kapitel ist die potentielle Oligomerisierung von Adenosin-A_{2B}-Homooligomeren und Adenosin-A_{2A}-A_{2B}-Oligomeren mittels Blauer Nativer-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (BN-PAGE) beschrieben. Diese Methode ist nicht für GPCRs etabliert und erfordert Vorversuche mit der Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE). Der Überblick über die methodische Vorgehensweise ist in Abbildung 32 schematisch dargestellt. Der erste Schritt ist die Klonierung der benötigten Rezeptor-DNA in den psGem-Vektor. Dabei werden die Rezeptoren mit Erkennungssequenzen, der His- bzw. Strep-Sequenz markiert. Für die spätere, bessere Aufreinigung der Rezeptoren werden sieben, statt der üblichen sechs Histidine hinein kloniert. Als Verbindungssequenz/Linker zwischen dem Rezeptor und dem His-Tag fungieren zwei Glycine und bei dem Strep sind es die Aminosäuren Serin und Alanin. Die klonierten Konstrukte wurden wie folgt benannt: psGem-hA_{2B}-His, psGem-hA_{2B}-Strep, psGem-hA_{2A}-His, psGem-hA_{2A}-Strep, psGem-hA_{2A}-eYFP, psGem-GABA_{B2}-His und psGem-GABA_{B2}-Strep. Nach der Linearisierung der DNA erfolgt die RNA-Synthese und die Injektion dieser RNA in die frisch gewonnenen und aufbereiteten Oozyten. Bei Bedarf können die Rezeptoren während der Expression metabolisch mit [³⁵S]-Methionin markiert werden. In der Regel folgt aber die Markierung der exprimierten Rezeptoren an ganzen intakten Oozyten mit Cy3, damit sind ausschließlich die Rezeptoren an der Oberfläche der Oozyten markiert. Nun folgt die Homogenisierung der Oozyten und zeitgleich die schonende Solubilisierung der Rezeptoren mit Hilfe des Detergenzes Dodecyl- β -maltosid oder Digitonin. Anschließend kann mittels Cy5 erneut eine Markierung der Rezeptoren erfolgen, dabei werden nun alle Rezeptoren markiert, also sowohl die ursprünglich im Zellinneren als auch anfänglich membranständigen Rezeptoren. Die Selektion der His-markierten Rezeptoren und den daran gebundenen Rezeptoren (Oligomere) erfolgt mit Hilfe von NTA-Ni²⁺-Agarose. Dies ist Agarose verbunden mit Nitrilotriessigsäure (engl. *Nitrilotriacetic acid*) und Nickel, welches im wässrigen stabile Komplexe bildet. Abbildung 33 zeigt chemisch die Bindung der Histidin-Erkennungssequenz mit der NTA-Ni²⁺-Agarose. Durch den anschließenden Waschvorgang gehen alle nicht markierten Rezeptoren verloren. Nach der Elution liegen die His-markierten Rezeptoren und deren Oligomere frei vor, also ohne NTA-Ni²⁺-Agarose. Nun folgt die eigentliche

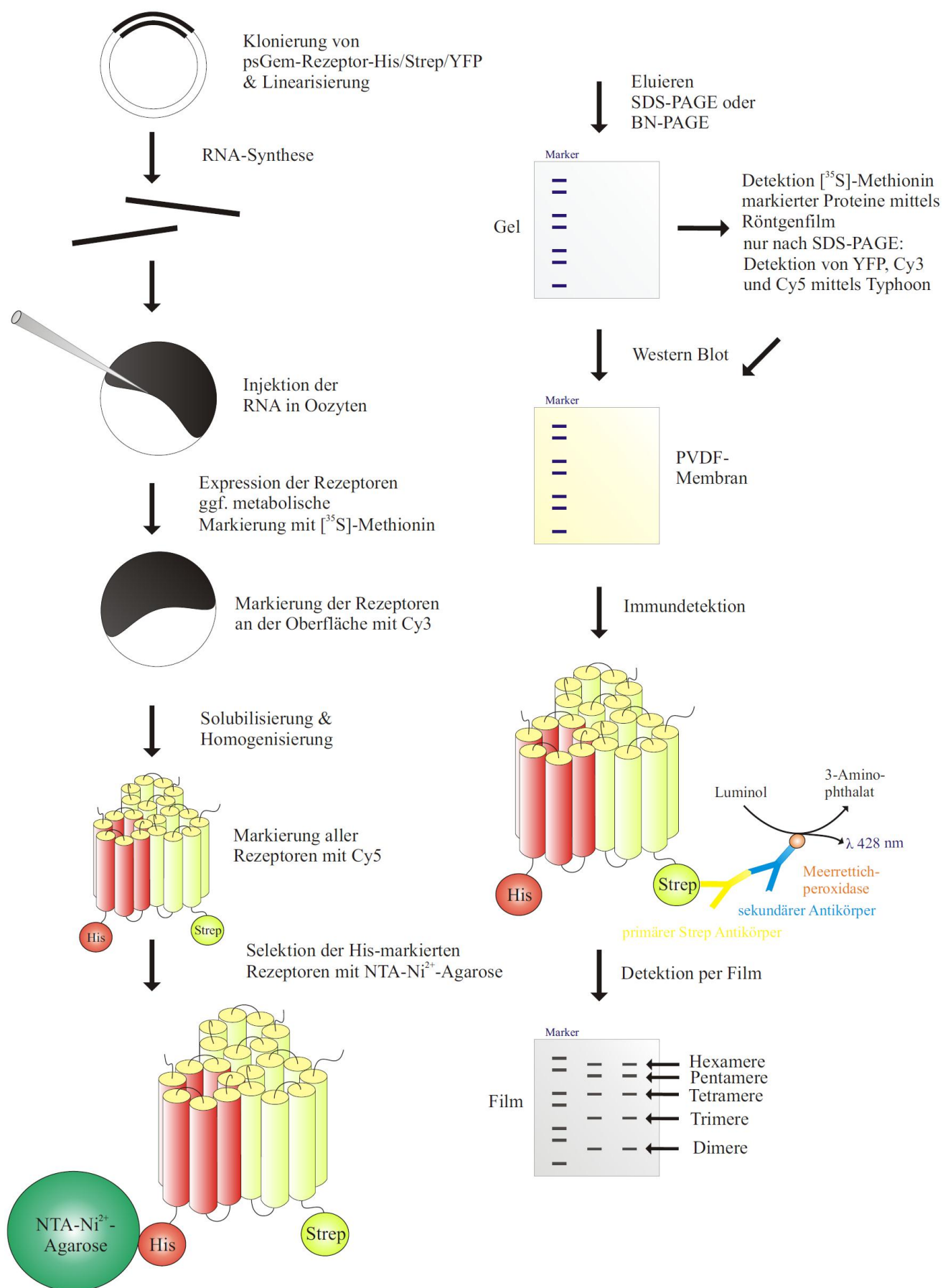


Abbildung 32. Methodisches Vorgehen zur Untersuchung von Rezeptor-Oligomeren mittels SDS- und BN-PAGE. (Die Beschreibung der Methode befindet sich im Text)

Auftrennung der Proteine unter denaturierenden Bedingungen mittels SDS-PAGE bzw. unter nativen Bedingungen mit der BN-PAGE. Die Methoden SDS-PAGE bzw. BN-PAGE sind in den nachfolgenden Kapiteln 2.4.1 und 2.4.2 erläutert. In Abbildung 32 ist das weitere Vorgehen nach den Gelelektrophorese-Schritten schematisch dargestellt. Die Detektion der metabolisch mit [35 S]Methionin markierten Proteine erfolgt direkt mittels Röntgenfilm. Die mit eYFP, Cy3 bzw. Cy5 markierten Rezeptoren können nach der SDS-PAGE direkt im Gel mit Hilfe des Typhoon, einem Fluoreszenz Scanner, detektiert werden. Bei der BN-PAGE ist dies aufgrund des blau gefärbten Gels nicht möglich. Anschließend erfolgt sofort der Western Blot auf eine PVDF-Membran (Polyvinylidenfluorid). Letztlich folgt die Immundetektion der Strep-markierten Rezeptoren mit Hilfe von spezifischen Strep-Antikörpern. Der zweite Antikörper, welcher mit dem Enzym Meerrettich-Peroxidase (HRP=*horseradish peroxidase*) verbunden ist, bindet an den ersten Antikörper. Nach Zugabe von Luminol kommt es durch die Meerrettich-Peroxidase zur Umsetzung zum 3-Aminophthalat, wobei Biolumineszenz bei einer Wellenlänge von 428 nm entsteht. Diese Reaktion ist in Abbildung 34 dargestellt. Ein Röntgenfilm dient für die Detektion der Signale. Hierbei können nur Dimere und höhere Oligomere detektiert werden, da mindestens ein His-markierter Rezeptor und ein Strep-markierter Rezeptor für ein Signal vorhanden sein müssen. Ohne His wären die Rezeptoren bei der Aufreinigung mit der NTA-Ni $^{2+}$ -Agarose weg gewaschen worden und ohne Strep wäre es zu keinem Signal nach der beschriebenen Reaktion gekommen. Aufgrund der Proteingröße lässt sich auf dem Film die Rezeptorzahl bei Oligomeren bestimmen.

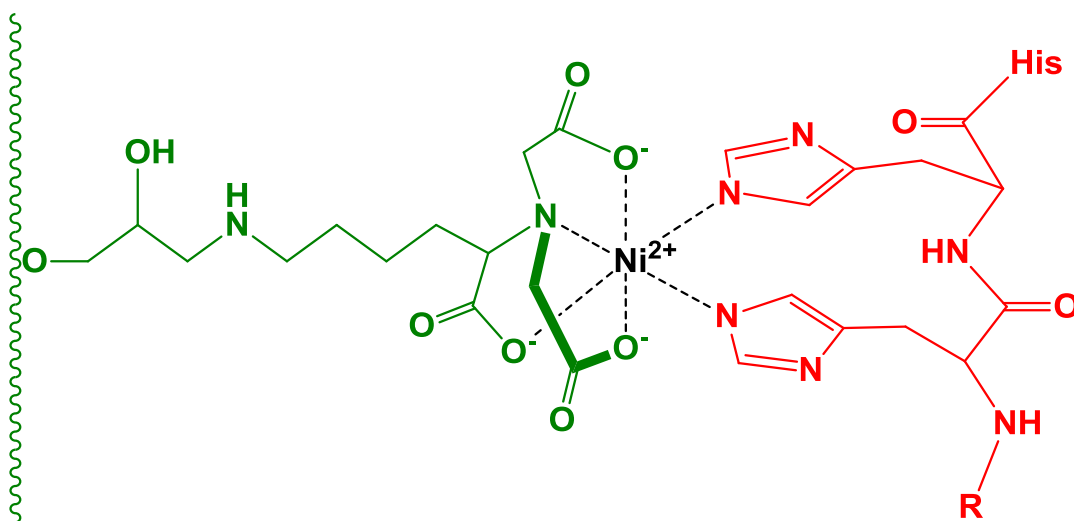


Abbildung 33. Bindung der His-Sequenz (rot) über NTA-Ni $^{2+}$ -Agarose (grün). Im Protein dienen Histidine als Erkennungssequenz. Diese Abbildung ist modifiziert nach Knecht.²⁶⁸

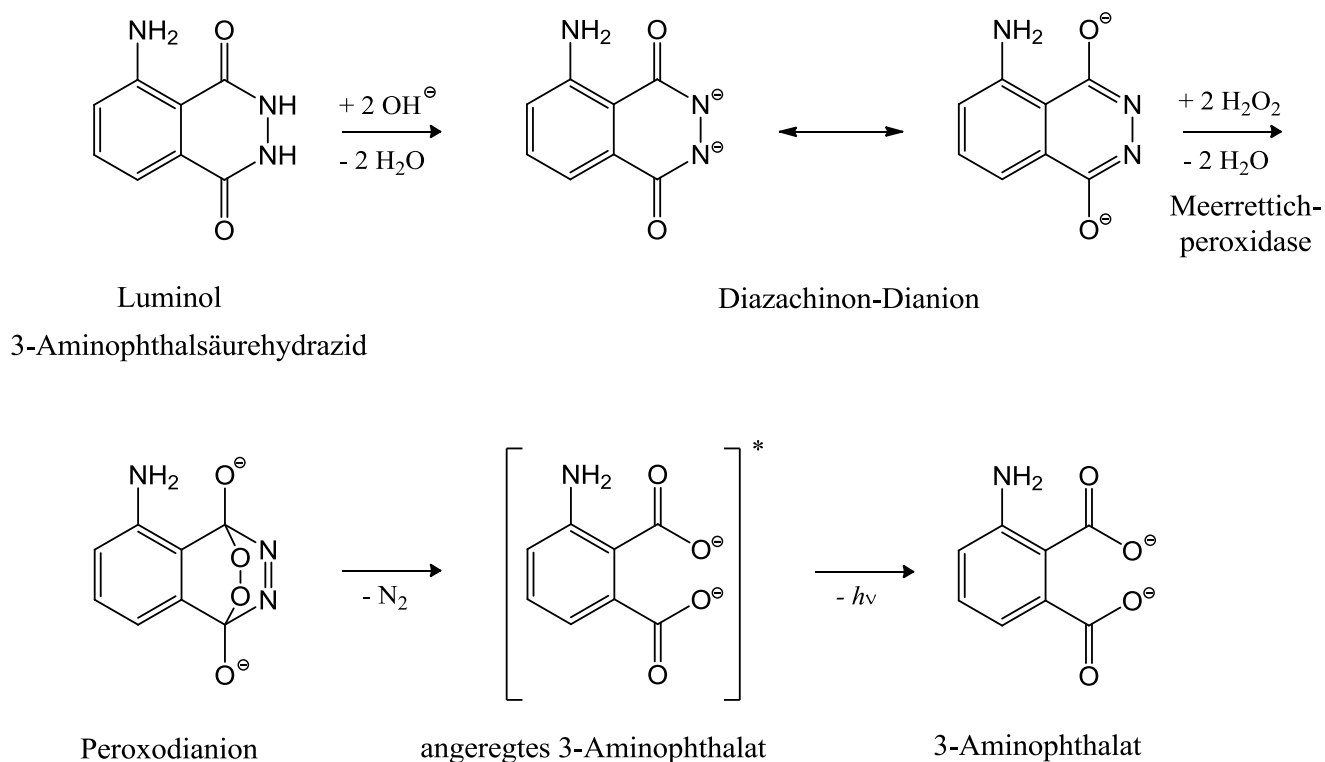


Abbildung 34. Reaktion von Luminol zu 3-Aminophthalat unter Entstehung von Chemilumineszenz bei der Wellenlänge von 428 nm modifiziert nach Marquette.²⁶⁹ Durch Zugabe von Lauge zu Luminol kommt es zur Deprotonierung des Moleküls und es entsteht ein Diazachinon-Dianion. Die an dem Antikörper gekoppelte Meerrettichperoxidase lässt das Molekül nun zum Peroxodianion reagieren. Unter Abspaltung von N_2 entsteht das angeregte 3-Aminophthalat welches, unter Emission von Lumineszenz, zurück in den Grundzustand fällt.

2.4.1 Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Die Natriumdodecylsulfat Polyacrylamid-Gelelektrophorese oder kurz auch SDS-PAGE genannt (engl. *sodium dodecylsulfate-polyacrylamide gel electrophoresis*), ist eine seit langem etablierte und bewährte Methode, Proteine mit einem Molekulargewicht von 1–500 kDa über ein polymerisiertes Acrylamidgel mit entsprechender Porengröße aufzutrennen. Die zu untersuchenden Proteine werden mit Hilfe des anionischen Detergenzes SDS denaturiert, dabei bilden diese Komplexe, die nun im elektrischen Feld über ein einheitliches Verhältnis von Ladung zu Masse aufgetrennt werden.²⁷⁰ Grundsätzlich wird bei diesem Schritt bereits die Quartärstruktur des Proteins zerstört, anders als bei der Blauen Nativen-PAGE. Die Zugabe von Dithiotreitol (DTT) führt zur Reduktion und damit zur Spaltung von Disulfidbrücken. Damit führen SDS und DTT zur Denaturierung, also zur Auflösung der Sekundär-, Tertiär und Quartärstruktur des Proteins. Möglicherweise führt dies aber auch zur Spaltung von Di- oder Oligomeren.

2.4.2 Blaue Native-Polyacrylamid-Gelelektrophorese

BN-PAGE ist die Abkürzung für Blaue Native-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (engl. *Blue Native-polyacrylamide gel electrophoresis*) und diese Methode führt zur elektrophoretischen Auftrennung von Proteinen im nativen Zustand, also ohne Denaturierung und somit unter Erhalt der Quartärstruktur des Proteins im Gegensatz zur SDS-PAGE. Diese Methode ist daher insbesondere für die Identifizierung von Rezeptoroligomeren wichtig. 1991 haben Schägger und von Jagow die BN-PAGE etabliert und heute bildet sie die biologische und biochemische Grundlage zur Untersuchung von Membranproteinkomplexen.^{271, 272} Das zu untersuchende Protein soll möglichst schonend aus der Membran herausgelöst und in einem reinen Zustand, demnach ohne andere störende Proteine oder Membranfragmente, vorliegen. Für die Solubilisierung bei der BN-PAGE eignen sich vor allem neutrale, milde, nicht-ionische Detergenzien mit einer niedrigen kritischen Mizellenkonzentration (CMC), wie zum Beispiel Dodecyl- β -maltosid oder Digitonin. Dabei ist Digitonin ein noch milderes Detergenz als Dodecyl- β -maltosid und somit optimal für die Isolierung von labilen Komplexen geeignet. Diese Detergenzien binden mit ihrem unpolaren Teil an die hydrophoben Membranproteine und überführen mit dem hydrophilen Teil die Proteine in die wässrige Phase und lösen sie somit aus der Membran heraus.²⁷³ Die solubilisierten und über NTA-Ni²⁺-Agarose aufgereinigten Rezeptoren erfahren nun eine unspezifische Blaufärbung nach Zugabe von Coomassie Brilliant-Blau R-250 und eine Ladungsumverteilung. Coomassie ist ein Triphenylmethanfarbstoff, der sich an basische Aminosäuren anlagert und eine Beladung mit Anionen bewirkt. Dies führt

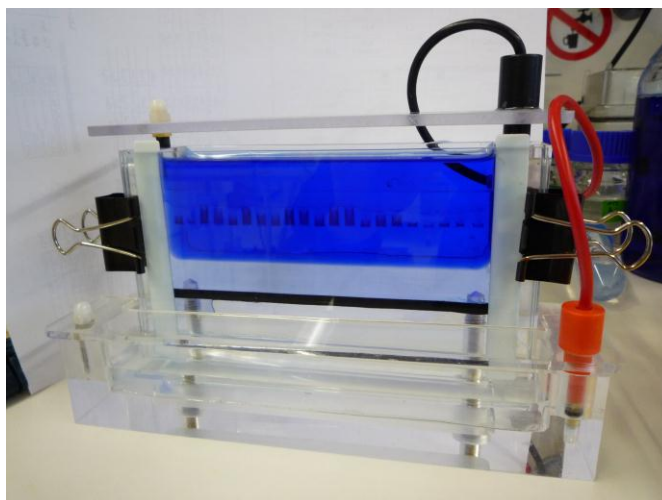


Abbildung 35. BN-PAGE. Gelelektrophoresekammer mit Coomassie im Kathodenpuffer.

dazu, dass sich basische Proteine selbst bei dem pH 7,5, der während der Elektrophorese herrscht, zur Anode hin bewegen.²⁷⁴ Hydrophobe Proteine mit vielen gebundenen Coomassiemolekülen sind dadurch weitestgehend gegen Aggregation geschützt. Der Zusatz von Coomassie zum Kathodenpuffer führt zu einem Farbstoffüberschuss und soll damit die konstante Bindung von Coomassie an die Proteine garantieren.²⁷³ Die Auftrennung der Proteine erfolgt nun elektrophoretisch über ein frisch hergestelltes Gradientengel von 4-16% (siehe Abbildung 35), welches für Proteine von 10 kDa bis 1 MDa geeignet ist. Aufgrund der unterschiedlichen Porengröße des Gels und der konstanten Spannung, wandern die Proteine entsprechend ihrer Größe bis sie bei der limitierenden Porengröße hängen bleiben. Dabei bleiben die Proteinkomplexe im intakten Zustand. Ist die Proteinkonzentration entsprechend hoch, so sind sie gleichzeitig als blaue Banden sichtbar.

3 Ergebnisse

3.1 Charakterisierung der zweiten extrazellulären Schleife des humanen Adenosin-A_{2B}-Rezeptors

3.1.1 Austausch der zweiten extrazellulären Schleife des humanen Adenosin-A_{2B}-Rezeptors und Expression in CHO-Zellen

Der Austausch der zweiten extrazellulären Schleife des humanen Adenosin-A_{2B}-Rezeptors gegen die zweite extrazelluläre Schleife des Adenosin-A_{2A}-Rezeptors resultiert in der Rezeptormutante hA_{2B}(EL2-A_{2A}), die in Abbildung 36 dargestellt ist. Sowohl der Wildtyp-hA_{2B}-Rezeptor als auch die Rezeptormutante besitzen am N-Terminus ein HA-Tag (Hämagglutinin), welches nach den Untersuchungen von Sonja Hinz keinen Einfluss auf die Bindung oder die Funktionalität der Rezeptoren hat.²⁷⁵

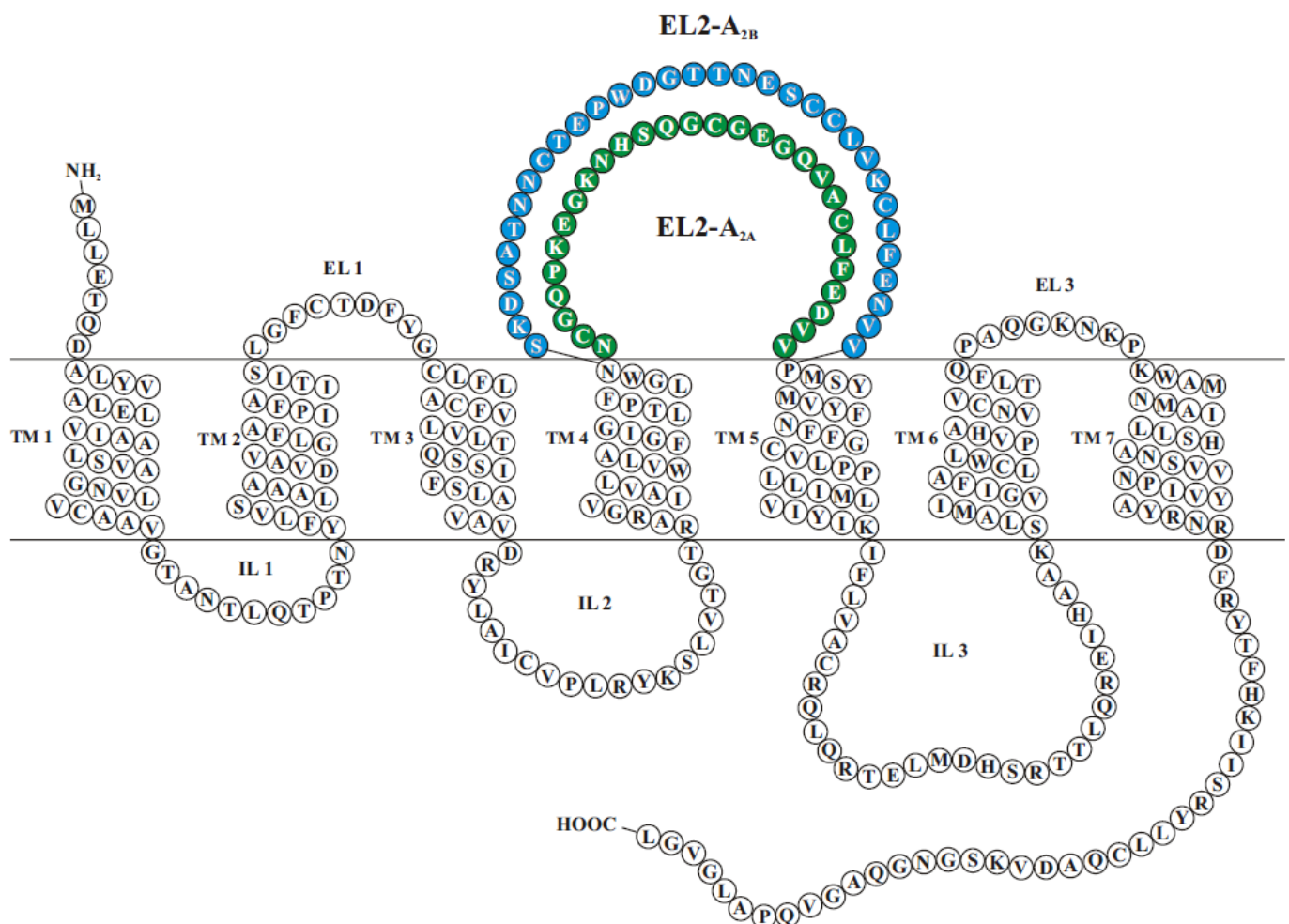


Abbildung 36. "Snake-Plot"-Darstellung des humanen Adenosin-A_{2B}-Rezeptors mit der zweiten extrazellulären Schleife des A_{2B}- (blau) und A_{2A}-Rezeptors (grün).

Abbildung 37 zeigt einen Vergleich der Aminosäuresequenz des humanen Adenosin- A_{2A} - mit dem $-A_{2B}$ -Rezeptor. Farblich hervorgehoben ist die Sequenz der zweiten extrazellulären Schleife, die bei dem A_{2B} -Rezeptor um vier Aminosäuren länger ist als bei dem A_{2A} -Rezeptor.

	N-Term	TM1	IL1	TM2	
hA2AR	1	-MPIMGSSVYITVELAIAVLAILGNVLCWAVWLNSNLQNVNTNYFVVS	LAAADI		53
hA2BR	1	MLETQDALYVALELVIAALSVAGNVLVCAAVGTANTLQTPTNYFLV	S	LAAADV	54
		TM2	EL1	TM3	IL2
hA2AR		AVGVLAIPFAITISTGFCAACHGCLFIACFVLVLTQSSIFSLLAIAIDRYIAIRIP			109
hA2BR		AVGLFAIPFAITISLGFCTDFYGCFLFACFVLVLTQSSIFSLLAIVAVDRYLAICVP			110
		IL2	TM4	EL2	
hA2AR		LRYNGLVTGTRAKGIIAICWVLSFAIGLTPMLGWN-----NCGQPKGKNSQ			158
hA2BR		LRYKSLVTGTRARGVIAVLWVLAFGIGLTPFLGWN	SKDSATNNCTEPWDGTTNESC		166
		EL2	TM5	IL3	
hA2AR		CGEGQVACLFEDVV	PMNYMVYFNFFACVLVPLLLMLGVYLRIFLAARRQLKQMESQ		214
hA2BR		C---LVKCLFENVV	PMSYMVYFNFFGCVLPLLLIMLVIIYIKIFLVACRQLQRT	ELM	219
		IL3	TM6	EL3	TM7
hA2AR		PLPGERARSTLQKEVHAAKSLAIIVGLFALCWLPLHIINCFTFFCPD-CSHAPLWL			269
hA2BR		DHS----RTTLQREIHAAKSLAMIVGIFALCWLPHAVNCVTLFQPAQGKPKWA			271
		TM7	C-Terminus		
hA2AR		MYLAIVLSHTNSVNPFIYAYRIREFRQTFRKIIRSHVLRQQEPPFKAAGTSARVLA			325
hA2BR		MNMAILLSHANSVNPFIYAYRNRDFRYTFHKKISRYLLCQADVKSNGQAGVQPA			327
hA2AR		AHGSDGEQ-----			333
hA2BR		LGVGL-----			332

Abbildung 37. Vergleich der Aminosäuresequenzen von humanen Adenosin- A_{2A} - und $-A_{2B}$ -Rezeptoren. Die Sequenz der zweiten extrazellulären Schleife des A_{2A} -Rezeptors ist grün und die des A_{2B} -Rezeptors blau dargestellt. TM: Transmembrandomäne; IL: Intrazelluläre Schleife; EL: Extrazelluläre Schleife.

Die Expression der Wildtyp-hA_{2B} und -hA_{2A}-Rezeptoren und der Rezeptormutante hA_{2B}(EL2-A_{2A}) konnte über eine homologe Kompetition bestimmt werden und es ließ sich der entsprechende B_{max}-Wert berechnen. Die Ergebnisse befinden sich in Tabelle 12. Daraus ergeben sich keine signifikanten Unterschiede bei der Expression der Wildtyp-Rezeptoren und der Rezeptormutanten. Allerdings ist die Expression der hA_{2B}(EL2-A_{2A})-Rezeptormutanten um den Faktor 4 geringer als die des hA_{2B}-Wildtyp-Rezeptors.

Tabelle 12. Expression der Rezeptoren: B_{max}-Werte berechnet aus der Homologen Kompetition.^a

Rezeptoren	B_{max} ± SEM [fmol/mg Protein]	n
wt hA _{2B}	271 ± 85	8
hA _{2B} (EL2-A _{2A})	65 ± 12 ^{ns}	5
wt hA _{2A}	390 ± 167 ^{ns}	3

^a Ergebnisse des zweiseitigen t-Testes bezogen auf den Wildtyp hA_{2B}-Rezeptors: ^{ns} nicht signifikant

3.1.2 Konkurrenzexperimente

Die für die Konkurrenzexperimente hergestellten Membranpräparationen mit hA_{2B} -Rezeptoren und den $hA_{2B}(EL2-A_{2A})$ -Rezeptormutanten weisen beide eine ausreichende spezifische Bindung für den A_{2B} -Antagonist-Radioliganden [3H]PSB-603 auf. Dies gilt nicht für die Membranpräparation des hA_{2A} -Rezeptors, daher ist die Durchführung der Radioligand-Bindungsstudien mit [3H]PSB-603 nicht möglich und für diese Experimente wird der A_{2A} -Antagonist-Radioligand [3H]MSX-2 verwendet. In Abbildung 38 sind die Inhibitionskurven der Konkurrenzexperimente mit [3H]PSB-603 gegen die Liganden (A) PSB-603, (B) NECA, (C) BAY60-6583 und (D) CGS-21680 dargestellt. Die entsprechenden IC_{50} -, K_D - und K_i -Werte sind in Tabelle 13 aufgelistet. Zur Überprüfung, ob die ermittelten Werte eine signifikante Abweichung von dem des Wildtyps aufweisen, wird bei allen Ergebnissen ein zweiseitiger t-Test durchgeführt. Graph (A) zeigt die homologe Konkurrenz mit PSB-603, wobei diese Daten die Grundlage für die Berechnung des B_{max} -Wertes aus dem vorhergehenden Kapitel 3.1.1 bilden. Zwischen dem A_{2B} -Rezeptor und der $A_{2B}(EL2-A_{2A})$ -Rezeptormutante gibt es jedoch bezüglich der Bindung von PSB-603 (A) und NECA (B) keine signifikanten Unterschiede. Die Bindung des selektiven A_{2B} -Rezeptor-Agonisten BAY60-6583 (C) ist bei der Rezeptormutante signifikant, um den Faktor 8, höher als beim Wildtyp. Die Bindung des A_{2A} -Rezeptor-Agonisten CGS-21680 (D) an die $A_{2B}(EL2-A_{2A})$ -Rezeptormutante ist um den Faktor 124 höher als zum A_{2B} -Rezeptor und diese Differenz ist hoch signifikant. Die Werte am A_{2B} -Rezeptor in Graph (D) sind bis 250 μM CGS-21680 gemessen und aufgrund von Löslichkeitsproblemen extrapoliert worden. Die berechneten K_D -Werte für den hA_{2B} - und den $hA_{2B}(EL2-A_{2A})$ -Rezeptor stammen aus einer homologen Konkurrenz mit PSB-603. Diese K_D -Werte stellen auch die Grundlage zur Berechnung der K_i -Werte dar, welche in Tabelle 13 zusammengefasst sind.

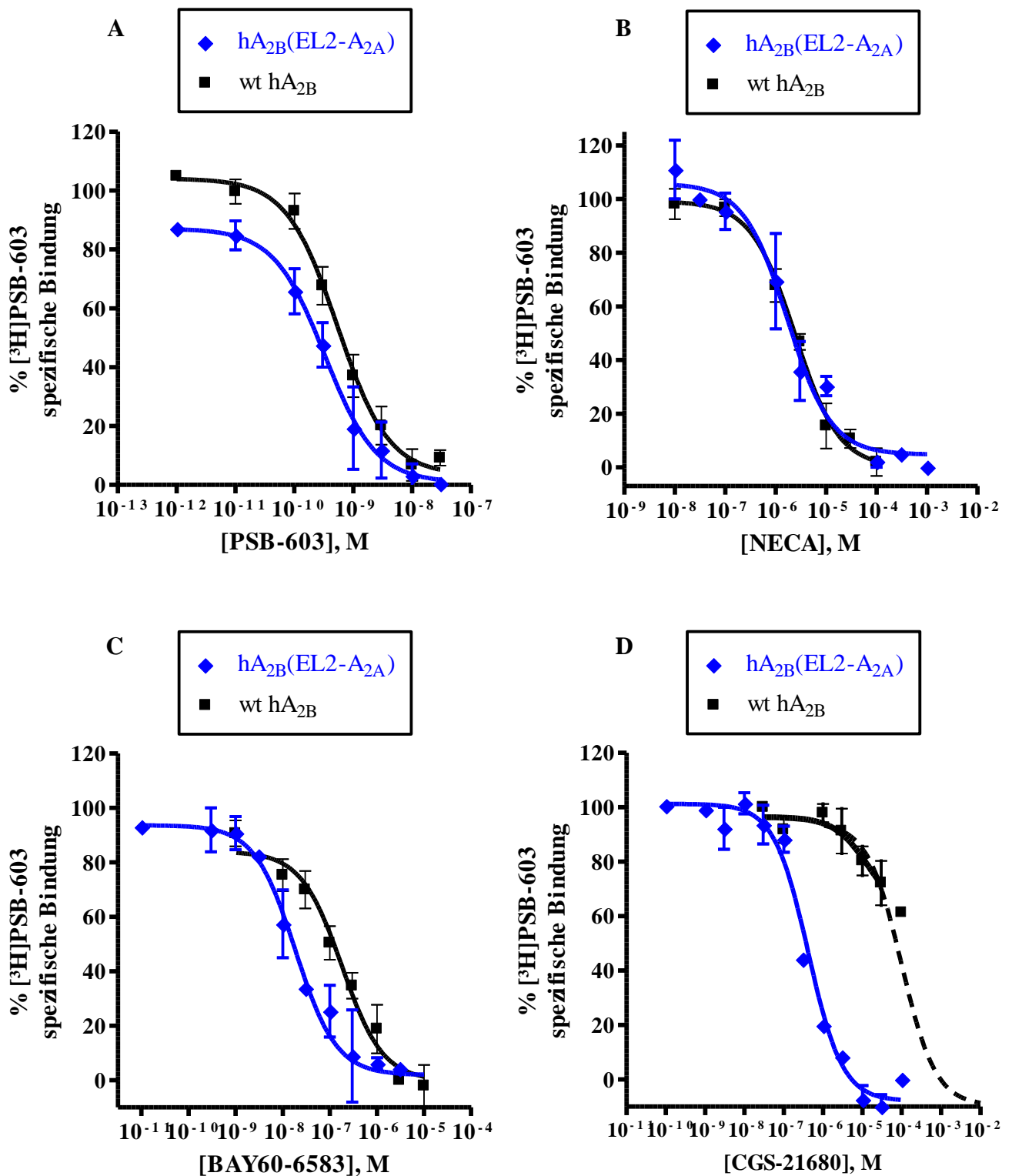


Abbildung 38. Kompetitionsexperimente am Wildtyp des humanen Adenosin-A_{2B}-Rezeptors und der Rezeptormutante hA_{2B}(EL2-A_{2A}) gegen $[^3\text{H}]$ PSB-603 (0,3 nM) mit (A) PSB-603, (B) NECA, (C) BAY60-6583 und (D) CGS-21680. In Graph D ist beim Wildtyp eine durchgehende Kurve, welche bis 250 μM CGS-21680 gemessen wurde dargestellt. Die gestrichelte Linie ist eine Extrapolation, da CGS-21680 bei diesen Konzentrationen nicht mehr löslich ist. Die IC₅₀-, K_D- und K_I-Werte sind in Tabelle 13 dargestellt.

Tabelle 13. Konkurrenzexperimente am Wildtyp des humanen Adenosin-A_{2B}-Rezeptors und der Rezeptormutante hA_{2B}(EL2-A_{2A}) gegen [³H]PSB-603 (0,3 nM) mit den Kompetitoren PSB-603, NECA, BAY60-6583 und CGS-21680: Ermittelte IC₅₀-, K_D- und K_i-Werte.^a

IC ₅₀ -, K _D - und K _i -Werte ± SEM (nM)					
Kompetitor	Werte	wt hA _{2B}	n	hA _{2B} (EL2-A _{2A})	n
PSB-603	IC ₅₀	0,639 ± 0,132	8	0,366 ± 0,033 ^{ns}	5
PSB-603	K _D	0,306 ± 0,117	8	0,127 ± 0,043 ^{ns}	5
PSB-603	K _i	0,370 ± 0,076	8	0,115 ± 0,021 ^{ns}	5
NECA	IC ₅₀	2370 ± 210	6	2710 ± 860 ^{ns}	4
NECA	K _i	1240 ± 110	6	854 ± 271 ^{ns}	4
BAY60-6583	IC ₅₀	217 ± 68	5	28,3 ± 11,8 [*]	4
BAY60-6583	K _i	114 ± 36	5	8,93 ± 3,70 [*]	4
CGS-21680	IC ₅₀	187000 ± 9000 ^b	5	1510 ± 850 ^{***}	5
CGS-21680	K _i	98200 ± 4600 ^b	5	476 ± 268 ^{***}	5

^a Ergebnisse des zweiseitigen t-Testes bezogen auf den Wildtyp hA_{2B}: ^{ns} nicht signifikant;

* p < 0,05; *** p < 0,001

^b berechnet durch Extrapolation der Kurve

Für den im Kapitel 3.1.1 benötigten B_{\max} -Wert des hA_{2A} -Rezeptors wird eine homologe Kompetition von $[^3H]$ MSX-2 gegen MSX-2 an hA_{2A} -Rezeptoren durchgeführt. Daraus ergeben sich die IC_{50} -, K_D - und K_i -Werte. Diese Ergebnisse sind in Abbildung 39 und Tabelle 14 zusammengefasst und stellen die Grundlage zur Berechnung des B_{\max} -Wertes dar (Tabelle 12).

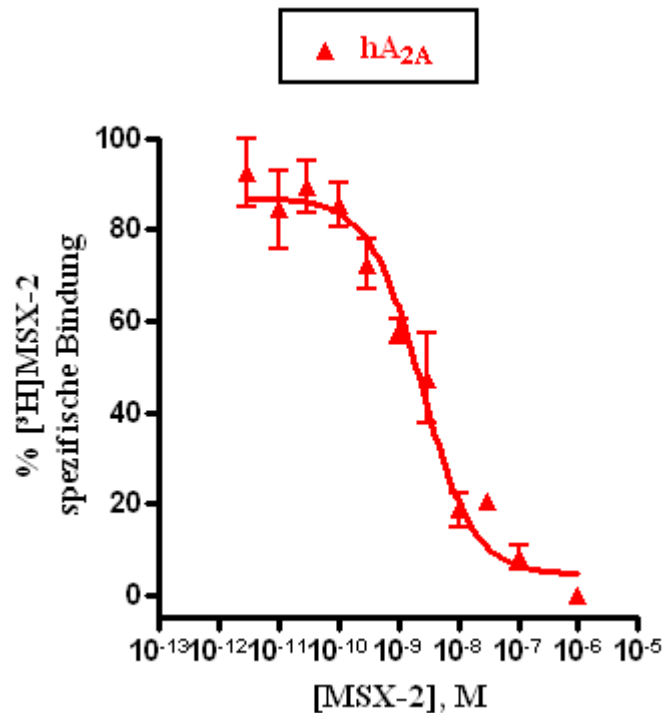


Abbildung 39. Homologes Kompetitionsexperiment an humanen Adenosin- A_{2A} -Rezeptoren mit $[^3H]$ MSX-2 (1 nM) gegen MSX-2 (Triplikate, $n=3$).

Tabelle 14. Homologe Kompetitionsexperimente an humanen A_{2A} -Rezeptoren mit $[^3H]$ MSX-2.

	hA_{2A}	n
IC_{50} -Wert \pm SEM (nM)	$2,78 \pm 0,99$	3
K_D -Wert \pm SEM (nM)	$2,03 \pm 1,05$	3
K_i -Wert \pm SEM (nM)	$2,04 \pm 0,73$	3

Die homologe Konkurrenz mit dem spezifischen A_{2A}-Rezeptor Agonisten CGS-21680 und dem Antagonisten MSX-2 gegen die entsprechenden Radioliganden [³H]CGS-21680 und [³H]MSX-2 zeigen aufgrund der nicht ausreichenden Bindung zum hA_{2B}- und hA_{2B}(EL2-A_{2A})-Rezeptor, kein Ergebnis bis 250 µM für CGS-21680 bzw. bis 300 µM für MSX-2. Alle Radioligand-Bindungsstudien gegen [³H]PSB-603 mit dem Liganden PSB-603, NECA, BAY-60-6583 und CGS-21680 an hA_{2A}-Rezeptoren zeigen keine spezifische Bindung. Der K_i-Wert von CGS-21680 gegen [³H]CGS-21680 an A_{2A}-Rezeptoren ist in der Literatur mit 27 nM angegeben.²⁷⁶ In Tabelle 15 sind die Ergebnisse aller Radioligand-Bindungsstudien mit den K_i-Werten noch einmal zusammengefasst.

Tabelle 15. Übersicht über alle Konkurrenzexperimente: K_i-Werte.^a

K _i -Werte ± SEM (nM)							
Radioligand	Kaltligand	wt hA _{2B}	n	hA _{2B} (EL2-A _{2A})	n	hA _{2A}	n
[³ H]PSB-603	PSB-603	0,370 ± 0,076	8	0,115 ± 0,021 ^{ns}	5	n.b. ^b	
[³ H]PSB-603	NECA	1240 ± 110	6	854 ± 271 ^{ns}	4	n.b.	2
[³ H]PSB-603	BAY60-6583	114 ± 36	5	8,93 ± 3,70 [*]	4	n.b. ^c	
[³ H]PSB-603	CGS-21680	98200 ± 4600	5	476 ± 268 ^{***}	5	n.b.	2
[³ H]CGS-21680	CGS-21680	n.b.	2	n.b.	2	27 (12-59) ^d	
[³ H]MSX-2	MSX-2	n.b.	2	n.b.	2	2,04 ± 0,73	3

^a Ergebnisse des zweiseitigen t-Testes bezogen auf den Wildtyp hA_{2B}:^{ns} nicht signifikant;

* p < 0,05; *** p < 0,001

^b Borrmann et al., 2009²⁷⁷

^c Fredholm et al., 2011¹⁷²

^d K_i-Wert (nM) mit 95% Konfidenzintervall, Klotz et al., 1998²⁷⁶

n.b. nicht bestimmbar

3.1.3 Funktionelle Experimente: cAMP-Akkumulation

Im Folgenden sind die Ergebnisse der funktionellen cAMP-Akkumulationsexperimente von hA_{2B}- und hA_{2A}-Rezeptors, sowie der Rezeptormutante hA_{2B}(EL2-A_{2A}) in lebenden CHO-Zellen dargestellt. In Abbildung 40 sind die sigmoidalen Kurven (Triplikate, n = 3-7) der jeweiligen Rezeptoren nach Stimulation mit den Agonisten (A) Adenosin, (B) NECA, (C) BAY60-6583 und (D) CGS-21680 gezeigt, wobei alle Graphen auf den den Effekt von 100 µM Forskolin normalisiert sind, der gleich 100 % gesetzt wurde. Die ermittelten EC₅₀-Werte und die dazugehörigen Maximaleffekte sind in Tabelle 16 zusammengefasst. Des Weiteren erfolgt der zweiseitige t-Test, der Aufschluss darüber gibt, ob sich die erhaltenen EC₅₀-Werte bzw. Maximaleffekte signifikant von den Werten am Wildtyp unterscheiden. Nach Stimulation mit dem endogenen Liganden Adenosin (Abbildung 40A) liegt der EC₅₀-Wert der hA_{2B}(EL2-A_{2A})-Rezeptormutante zwischen dem EC₅₀-Wert des hA_{2B}- und des hA_{2A}-Rezeptors, der Unterschied erreicht jedoch keine Signifikanz zum hA_{2B}-Rezeptor. Allerdings ist der Maximaleffekt bei der Rezeptormutante signifikant höher als bei den beiden Wildtyp-Rezeptoren. Die Rezeptormutante hA_{2B}(EL2-A_{2A}) weist nach Stimulation mit dem unselektiven Agonisten NECA (Abbildung 40B) keinen signifikanten Unterschied hinsichtlich des EC₅₀-Wertes im Vergleich zum Wildtyp-hA_{2B}-Rezeptor auf. Auffällig ist auch hier der signifikant höhere Maximaleffekt der Mutante verglichen mit den beiden Wildtypen. Die Ergebnisse der cAMP-Experimente mit dem nicht-nukleosidischen selektiven A_{2B}-Rezeptor-Agonisten BAY60-6583 (Abbildung 40C) zeigen auch hier bei dem EC₅₀-Wert zwischen dem Wildtyp hA_{2B}- und der hA_{2B}(EL2-A_{2A})-Rezeptormutante keine deutliche Differenz, aber der Maximaleffekt ist hier fast doppelt so hoch verglichen mit dem Wildtyp. Der hA_{2A}-Rezeptor zeigt kein cAMP-Signal nach der Inkubation mit BAY60-6583. Besonders interessant sind die Ergebnisse mit dem nukleosidischen selektiven A_{2A}-Rezeptor-Agonisten CGS-21680 (Abbildung 40D), da er die hA_{2B}(EL2-A_{2A})-Rezeptormutante ebenfalls zur cAMP-Produktion stimuliert, ganz im Gegensatz zu dem hA_{2B}-Rezeptor-Wildtyp. Der EC₅₀-Wert ist allerdings signifikant höher (Faktor ~1300) als am hA_{2A}-Rezeptor. Wie auch bei den anderen Agonisten ist hier der maximale Effekt bei der Mutante signifikant höher als bei den Wildtyp-Rezeptoren.

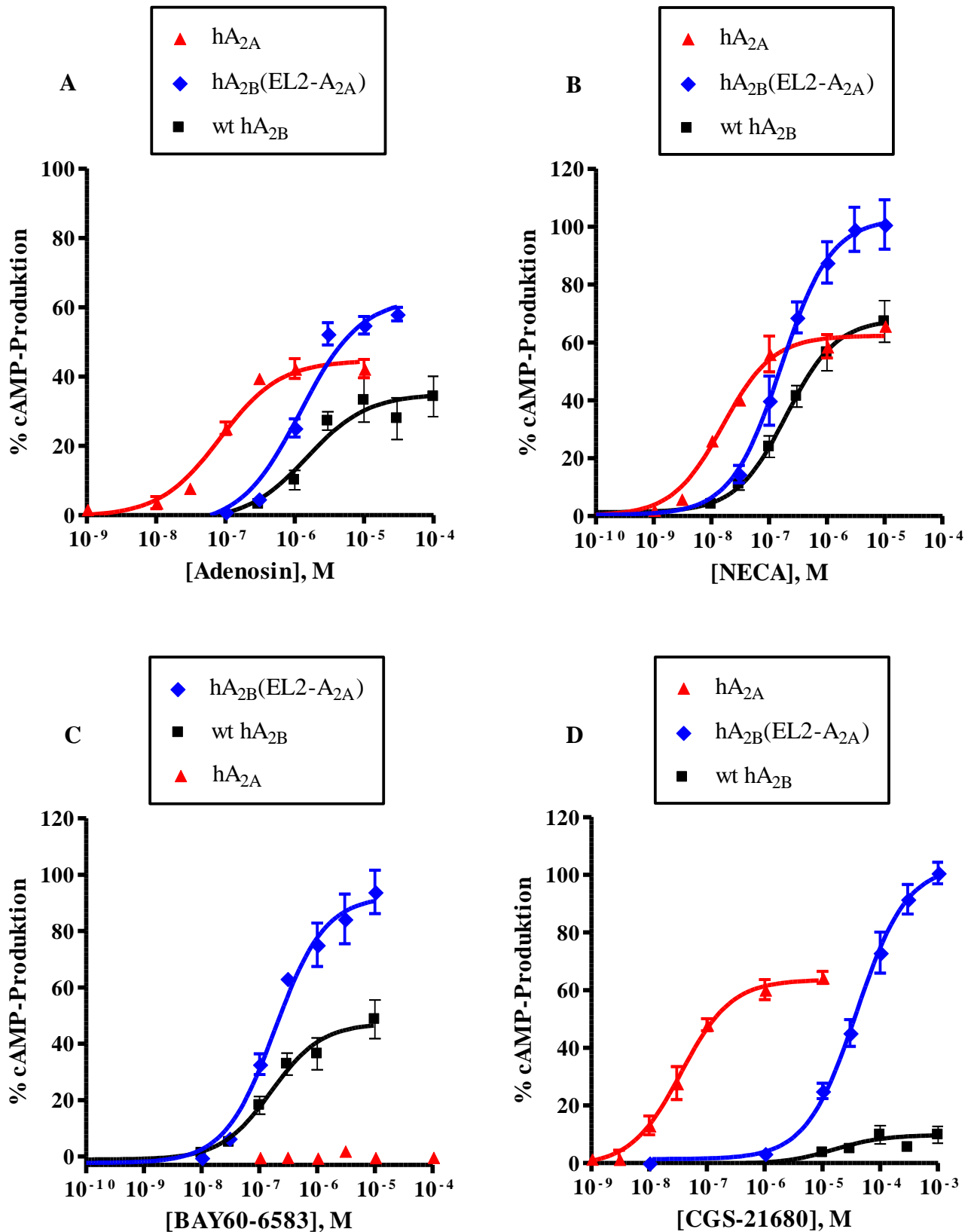


Abbildung 40. cAMP-Akkumulationsexperimente: Prozentuale cAMP-Produktion von CHO-Zellen mit stabil exprimierten hA_{2B}-, hA_{2A}- oder hA_{2B}(EL2-A_{2A})-Rezeptoren nach Stimulation mit den Agonisten (A) Adenosin, (B) NECA, (C) BAY60-6583 bzw. (D) CGS-21680. Die Daten sind normalisiert auf den Effekt von Forskolin (100 μ M Forskolin = 100 %-Wert). Die EC₅₀-Werte und die Maximaleffekte sind in Tabelle 16 dargestellt.

Tabelle 16. cAMP-Akkumulationsexperimente: Ermittelte EC₅₀-Werte und Maximaleffekte der Rezeptoren nach Stimulation mit den Agonisten. Die Daten sind bezogen auf 100 µM Forskolin = 100%.^a

Agonisten	Werte	EC ₅₀ -Werte ± SEM (nM)/				Maximaleffekte (Max.) bezogen auf 100 µM Forskolin = 100 %-Werte ± SEM (%)	
		wt hA _{2B}	n	hA _{2B} (EL2-A _{2A})	n	hA _{2A}	n
Adenosin	EC ₅₀	4550 ± 2730	3	1170 ± 120 ^{ns}	3	83,3 ± 12,5 ^{***}	3
Adenosin	Max.	34 ± 6	3	58 ± 2 [*]	3	42 ± 3 ^{ns}	3
NECA	EC ₅₀	230 ± 45	7	199 ± 53 ^{ns}	3	15,0 ± 2,2 [*]	3
NECA	Max.	67 ± 7	7	101 ± 9 [*]	3	66 ± 0 ^{ns}	1
BAY60-6583	EC ₅₀	165 ± 36	6	264 ± 64 ^{ns}	3	> 100000 ^{***}	4
BAY60-6583	Max.	49 ± 7	6	94 ± 8 ^{**}	3	2 ± 0 ^{***}	1
CGS-21680	EC ₅₀	> 1000000	4	47000 ± 7700 ^{***}	6	34,7 ± 7,9 ^{***}	4
CGS-21680	Max.	10 ± 3	4	101 ± 4 ^{***}	6	64 ± 2 ^{***}	2

^a Ergebnisse des zweiseitigen t-Testes bezogen auf den Wildtyp hA_{2B}: ^{ns} nicht signifikant;

* p < 0,05; *** p < 0,001

Nach den Ergebnissen des A_{2B} -Rezeptors in den oben aufgeführten cAMP-Experimenten wird dieser Rezeptor genauer untersucht und mit unterschiedlichen NECA- und CGS-21680-Konzentrationen in Kombination getestet. Abbildung 41 und Tabelle 17 zeigen die Ergebnisse der Maximaleffekte der cAMP-Produktion bezogen auf 100 μ M Forskolin als 100 %-Wert. Bei den A_{2B} -Wildtyp-Rezeptoren zeigt sich ein signifikanter Unterschied bei der Stimulation mit 10 μ M und 100 μ M CGS-21680. In Kombination mit 0,1 μ M NECA und 10 μ M bzw. 100 μ M CGS-21680 addiert sich die cAMP-Konzentration und die Differenz der akkumulierten cAMP-Menge bleibt gleich. Ein hoch signifikanter Unterschied bei der cAMP-Produktion entsteht bei der Kombination aus 1 μ M NECA mit 10 μ M und 100 μ M CGS-21680.

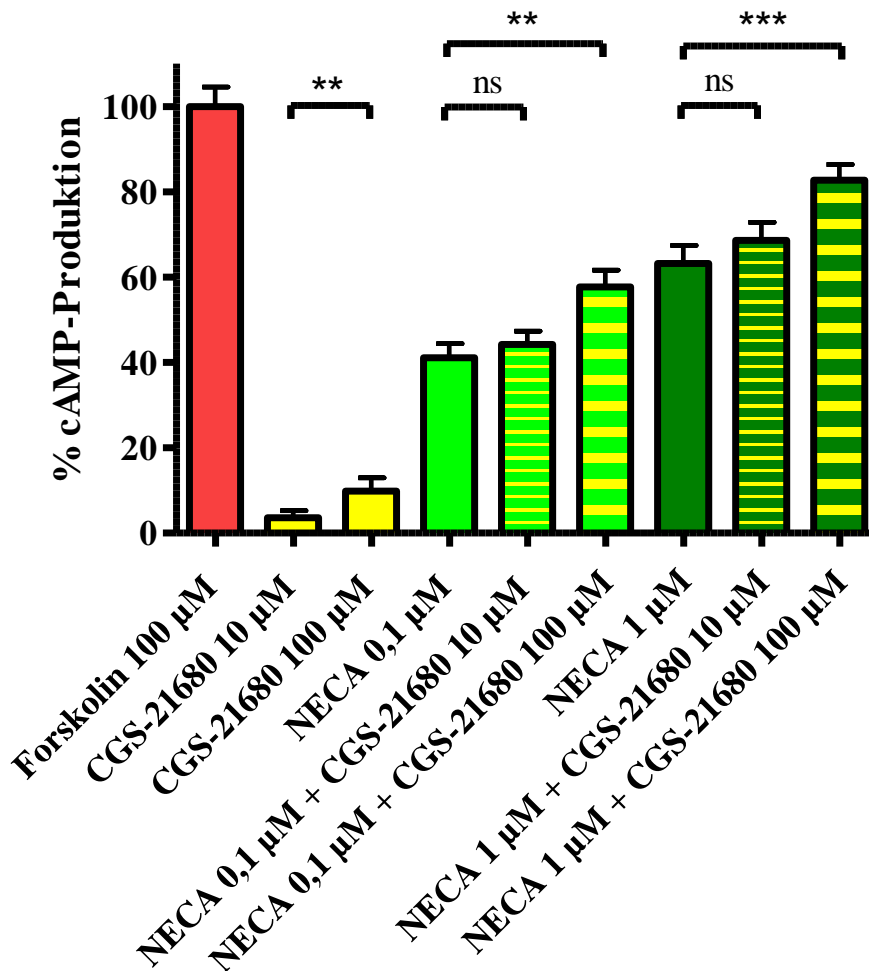


Abbildung 41. Prozentuale cAMP-Produktion von CHO-h A_{2B} -Zellen nach Stimulation mit unterschiedlichen NECA- und CGS-21680 Konzentrationen in Kombination (Triplikate, n=3). Für die Werte siehe in Tabelle 17. Ergebnisse des zweiseitigen t-Testes bezogen auf NECA 0,1 μ M bzw. NECA 1 μ M: ^{ns} nicht signifikant; ** p < 0,01; *** p < 0,001

Tabelle 17. Agonisten-induzierte cAMP-Akkumulation an CHO-hA_{2B}-Zellen. Die dargestellten Maximaleffekte sind bezogen auf 100 μ M Forskolin = 100%.^a

Maximaleffekte bezogen auf 100 μ M Forskolin \pm SEM (%)			
Agonisten		wt hA _{2B}	n
Forskolin 100 μ M		100 \pm 4	3
CGS-21680	10 μ M	4 \pm 2	3
CGS-21680	100 μ M	10 \pm 3 ^{**}	3
NECA	0,1 μ M	41 \pm 3	3
NECA	0,1 μ M + CGS-21680 10 μ M	44 \pm 3 ^{ns}	3
NECA	0,1 μ M + CGS-21680 100 μ M	58 \pm 4 ^{**}	3
NECA	1 μ M	60 \pm 3	3
NECA	1 μ M + CGS-21680 10 μ M	69 \pm 4 ^{ns}	3
NECA	1 μ M + CGS-21680 100 μ M	83 \pm 4 ^{***}	3

^a Ergebnisse des zweiseitigen t-Testes bezogen auf CGS-21680 10 μ M, NECA 0,1 μ M bzw. NECA 1 μ M: ^{ns} nicht signifikant; ** p < 0,01; *** p < 0,001

3.1.4 Computermodell der hA_{2B} (EL2- hA_{2A})-Rezeptor-Mutante

Die von Dr. Anke Schiedel und Dr. Farag Sherbiny erstellten Modelle der Wildtyp- hA_{2B} - und - hA_{2A} -Rezeptoren, sowie der hA_{2B} (EL2- hA_{2A})-Rezeptormutante ist in Abbildung 42 gezeigt. Besonders interessant ist hierbei die zweite extrazelluläre Schleife, die im A_{2B} -Rezeptor blau und im A_{2A} -Rezeptor grün dargestellt ist. Zusätzlich sind hier noch die β -Faltblatt-Strukturen und die konservierte Disulfidbrücke gezeigt. Da die Vorhersagen aus dem Modell besonders im Bereich der Schleifen aufgrund der Datenlage schwierig sind, kann bei dem Austausch der Schleife bei der hA_{2B} (EL2- hA_{2A})-Rezeptormutante nicht wirklich garantiert werden, ob und wie sich eine kurze Helix im Schleifenbereich ausbildet oder verändert. In der Abbildung ist nämlich bei dem A_{2A} -Rezeptor eine längere Helix in der EL2 zu erkennen als bei der Rezeptormutante, obwohl es sich hierbei um die gleiche EL2 handelt. Wichtig ist, dass in allen Modellen die β -Faltblatt-Strukturen erhalten sind und die Disulfidbrücken konserviert sind.

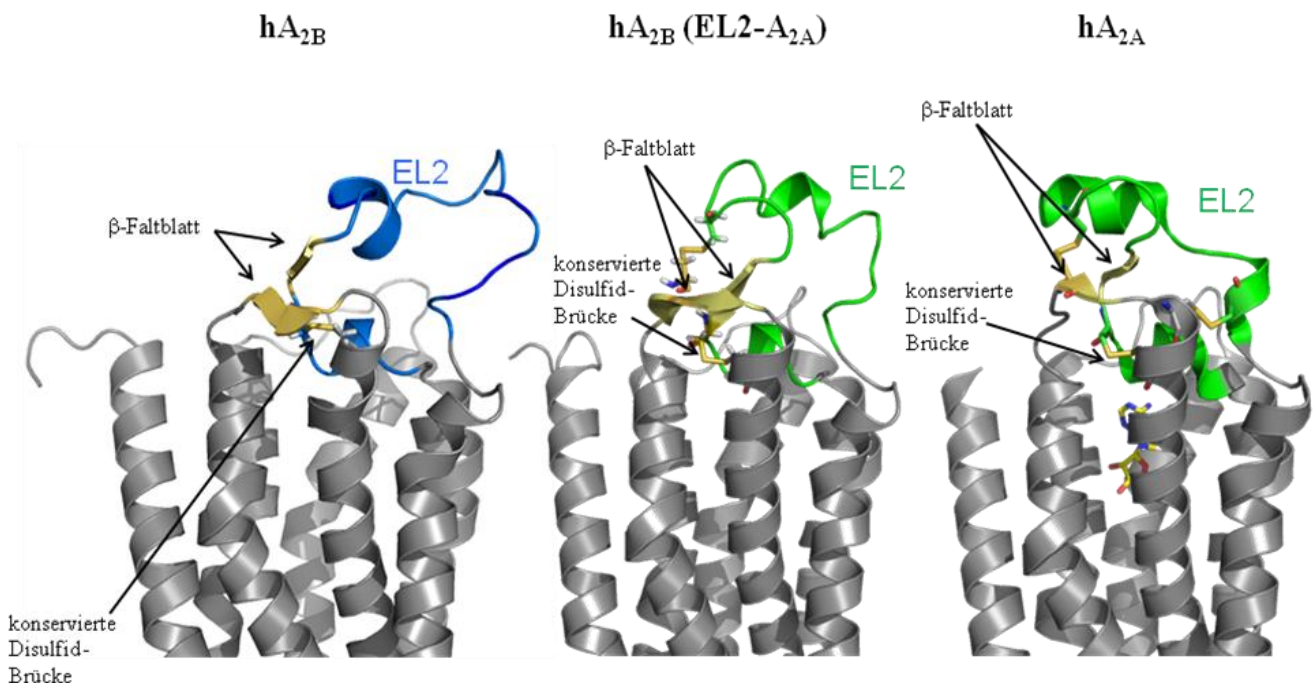


Abbildung 42. Modelle der hA_{2B} - (links), hA_{2B} (EL2- A_{2A})- (Mitte) und hA_{2A} -Rezeptors (rechts). Die zweite extrazelluläre Schleife des A_{2B} -Rezeptors ist in blau und die des A_{2A} -Rezeptors in grün dargestellt. In grau sind die Transmembranmembranen gezeigt.

Abbildung 43 zeigt die 2D-Ligand-Rezeptor-Interaktion des Computermodells, bei dem CGS-21680 in die hA_{2B}(EL2-A_{2A})-Rezeptormutante gedockt ist. Die potentiell wichtigen Aminosäuren aus der Rezeptormutante sind mit den möglichen Wechselwirkungen zu CGS-21680 gezeigt. Eine zentrale Rolle scheint dabei die Aminosäuren Phe 169 zu spielen, die sich im EL2 des A_{2A}-Rezeptors befindet. Allerdings existiert im A_{2B}-Rezeptor die dazu homologe Aminosäure Phe 173. Alle anderen dargestellten Aminosäuren befinden sich auch im Wildtyp-A_{2B}-Rezeptor, an den das CGS-21680 nicht bindet. Damit dürften diese Bindungen nur eine untergeordnete Rolle spielen.

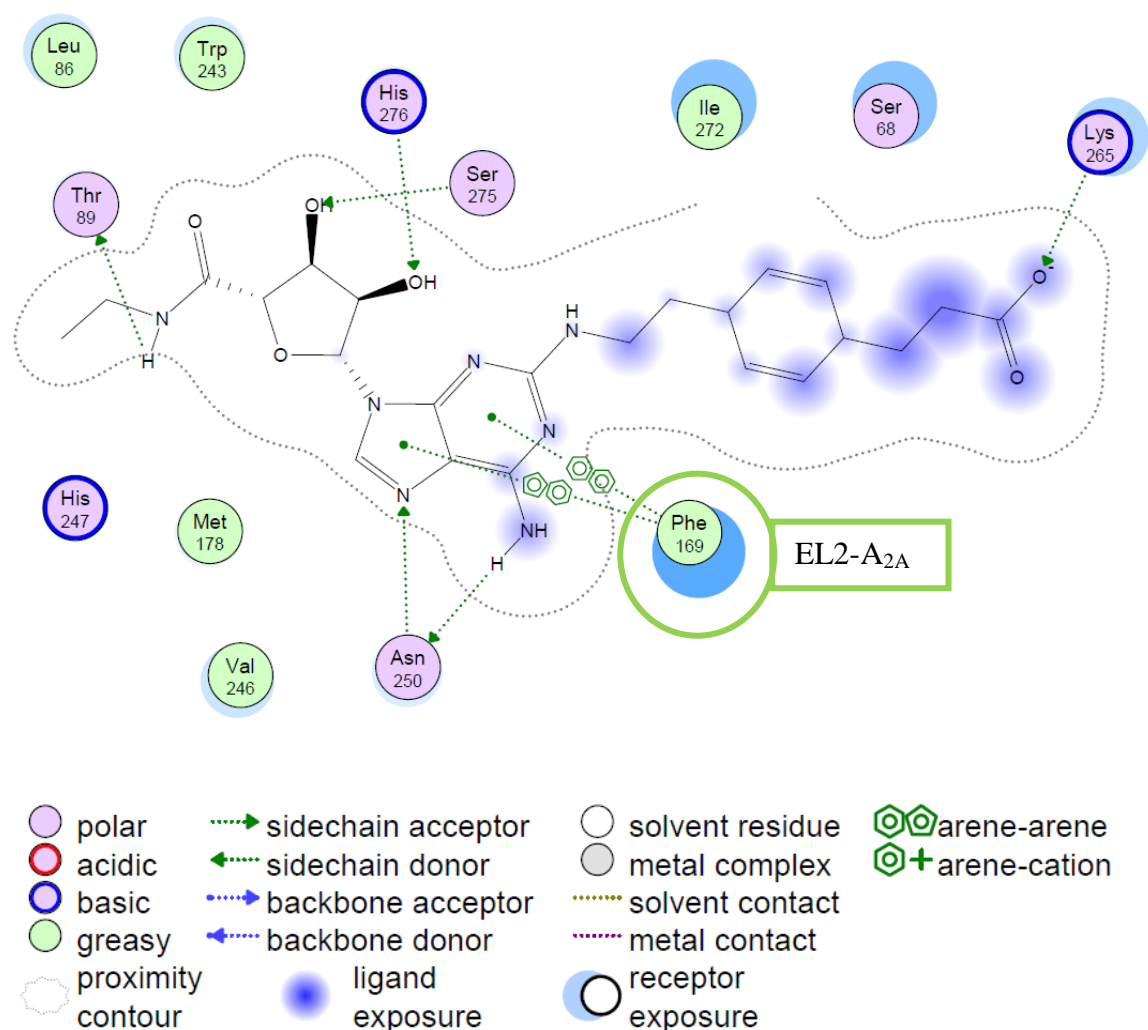


Abbildung 43. 2D-Ligand-Rezeptor-Interaktionen von CGS-21680 mit der hA_{2B}(EL2-A_{2A})-Rezeptormutante. Von den dargestellten Aminosäuren befinden sich alle im A_{2B}-Rezeptor mit Ausnahme der grün markierten Aminosäure Phe 169, welche in der zweiten extrazellulären Schleife des A_{2A}-Rezeptors ist.

3.2 Homodimerisierung von humanen Adenosin-A_{2B}-Rezeptoren

3.2.1 Biolumineszenz-Resonanz-Energie-Transfer

Für die Untersuchung von Adenosin-A_{2B}-Homodimeren mittels BRET bilden zunächst die Kontrollen eine wichtige Grundlage. Bei jedem BRET-Experiment ist somit die Durchführung von mindestens einer Positiv- und einer Negativkontrolle unerlässlich. Als Positivkontrolle dient ein Heterodimer, welches bereits publiziert ist, bestehend aus dem Dopamin-D₂- und dem Adenosin-A_{2A}-Rezeptor.²⁶⁷ Die Negativkontrolle bilden der Adenosin-A_{2A}- und der GABA_{B2}-Rezeptor, da sie kein Dimer bilden.²⁶⁷ Abbildung 44 zeigt die genannte Positivkontrolle (grün) bestehend aus einer Hyperbel mit einem BRET_{max}-Wert von 144 ± 6 mBU und einem BRET₅₀-Wert von 239 ± 40 , dabei erfolgte das Experiment in Duplikaten mit n=15. Die Hyperbel bedeutet, wie in Kapitel 2.2.1 in Abbildung 31 beschrieben, eine spezifische Interaktion und damit die Bildung eines Dimers. Die Negativkontrolle hingegen steht für eine unspezifische Interaktion und bildet in der Graphik daher eine leicht ansteigende Gerade (Duplikate, n=13), für die keine BRET_{max}- bzw. BRET₅₀-Werte bestimmbar sind.

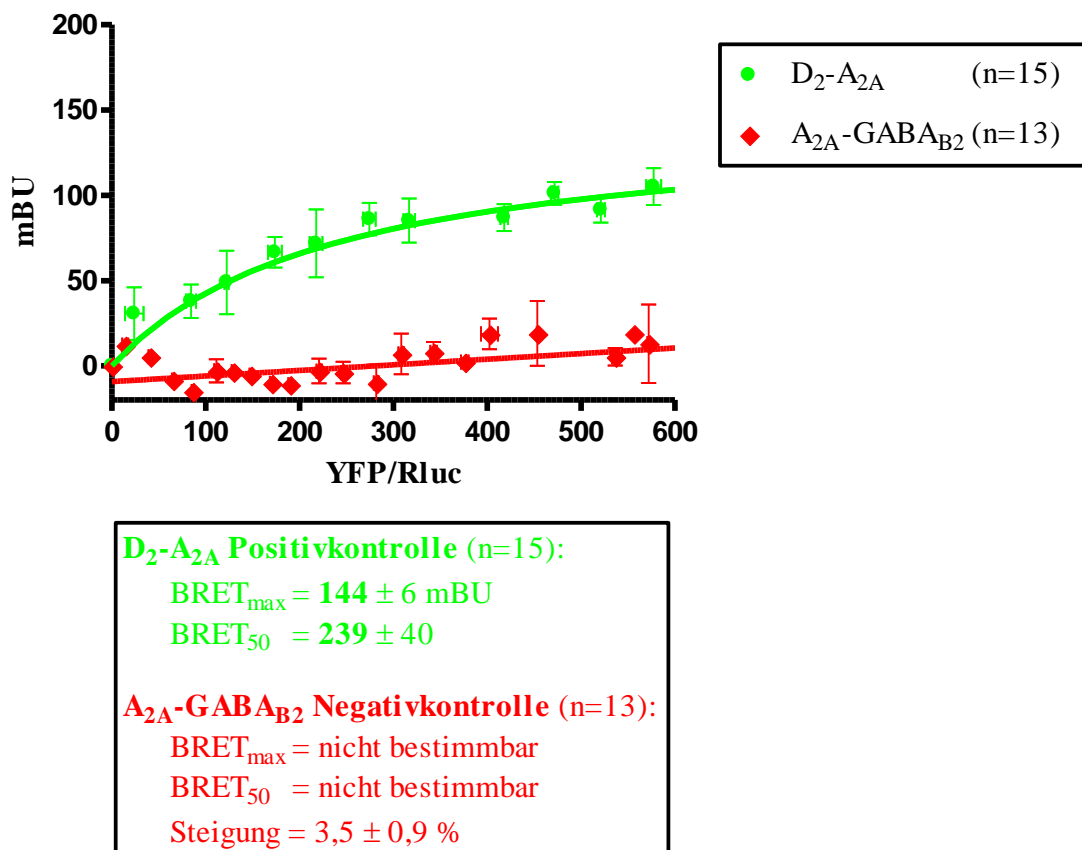


Abbildung 44. BRET Kontrollen: Die grün dargestellte Positivkontrolle (n=15) besteht aus dem D₂-Rluc und A_{2A}-YFP-Dimer. A_{2A}-Rluc und GABA_{B2}-YFP bilden die Negativkontrolle (rot) mit n=13.

Alle nachfolgenden BRET-Experimente beziehen sich auf diese Kontrollen, d.h. wenn der $BRET_{max}$ -Wert der zu untersuchenden Proteine gleich oder größer dem $BRET_{max}$ -Wert der Positivkontrolle ist, dann liefert das Experiment den Nachweis für ein vorhandenes Dimer. Sollten die zu untersuchenden Proteine im BRET-Graphen eine Gerade aufweisen, ähnlich der Negativkontrolle, dann liegen keine Dimere vor. Sollte die Höhe des $BRET_{max}$ -Wertes des zu untersuchenden Proteins signifikant oberhalb des $BRET_{max}$ -Wertes der Positivkontrolle liegen, dann könnte dies nach Mercier auf die Bildung von Trimeren oder höheren Oligomeren zurückzuführen sein.⁸² Der $BRET_{50}$ -Wert hingegen ist ein Maß für die Affinität der Proteine zueinander, was bedeutet: je kleiner der $BRET_{50}$ -Wert, desto stärker ist die Affinität der Proteine.

Alternativ zu den oben genannten Kontrollen, können als interne Kontrolle auch Rluc und YFP als Fusionsprotein exprimiert werden. Räumlich sind Rluc und YFP in der Zelle nicht weiter als 10 nm voneinander entfernt und so kommt ein hoher Energietransfer zustande (siehe grüne Balken in Abbildung 45 bzw. die Ergebnisse in Tabelle 18). Werden Rluc und YFP auf getrennten Plasmiden in die Zelle transfiziert, dann sind die beiden einzeln exprimierten Proteine in der Zelle, aufgrund der fehlenden Affinität zueinander, auch entsprechend weiter als 10 nm voneinander entfernt und kein oder nur ein geringer unspezifischer Energietransfer findet statt (kleine, rote Balken in Abbildung 45). Alle Massenangaben beziehen sich auf die Masse an transfizierter DNA. Bei den Kontrollen entspricht Rluc-YFP mit 1 μ g transfizierter DNA als Positivkontrolle, etwa 0,5 μ g Rluc und 0,5 μ g YFP als Negativkontrolle. Die BRET-Experimente können ausgewertet werden, wenn die $BRET_{max}$ -Werte der Positivkontrolle deutlich höher sind als die $BRET_{max}$ -Werte der Negativkontrolle (siehe Tabelle 18).

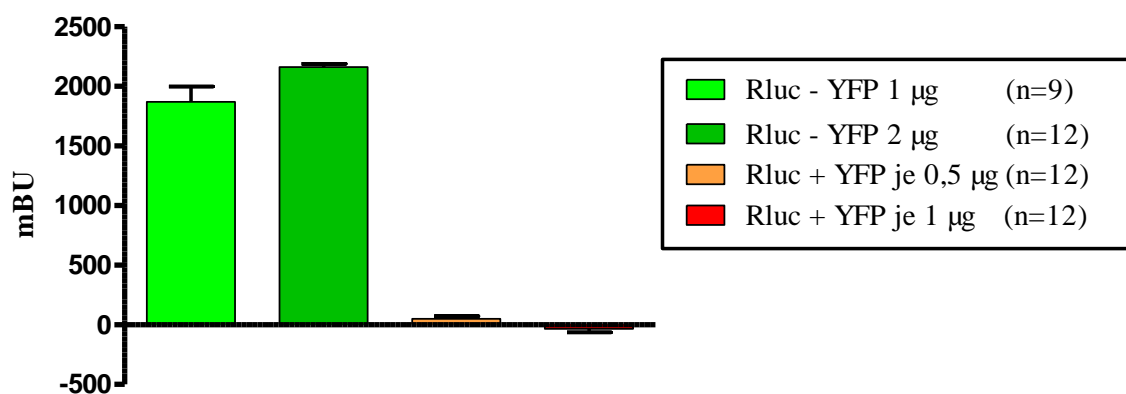


Abbildung 45. Positivkontrollen (grün): Rluc und YFP wurden als Fusionsprotein exprimiert. Negativkontrollen (orange + rot): Rluc und YFP liegen in der Zelle als zwei getrennte Proteine vor.

Tabelle 18. BRET_{max}-Werte der Positiv- (Rluc-YFP) und Negativkontrollen (Rluc+YFP).

Proteine	BRET _{max} ± SEM [mBU]	n
Rluc-YFP 1 µg	1830 ± 220	9
Rluc-YFP 2 µg	2170 ± 40	12
Rluc+YFP je 0,5 µg	47,3 ± 37,2	12
Rluc+YFP je 1 µg	-28 ± 39	12

Die Expressionskontrolle für jede einzelne Probe (zuvor auf 0,2 mg/ml Protein eingestellt) erfolgt über die Messung der Biolumineszenz für den Rezeptor, der an Rluc gebunden ist, um ähnliche Expressionsraten zu garantieren. Die Messung der Fluoreszenz für den YFP markierten Rezeptor zeigt für jede Probe mit steigender YFP-Konzentration auch ansteigende Expressionsraten. Da dies ein interner Standard ist, kann nicht über die Biolumineszenz oder Fluoreszenz auf die Rezeptorzahl oder die Konzentration der Rezeptoren in der Zelle zurück geschlossen werden.

In Abbildung 46 ist das Ergebnis der Adenosin-A_{2B}-Homodimeruntersuchung jeweils mit den Kontrollen dargestellt. Zusätzlich sind die BRET_{max} und BRET₅₀-Werte in Tabelle 19 angegeben. Die A_{2B}-A_{2B} BRET-Hyperbel weist einen signifikant höheren BRET_{max}-Wert und einen signifikant kleineren BRET₅₀-Wert als die Positivkontrolle auf. Der BRET₅₀-Wert ist bei den A_{2B}-A_{2B}-Rezeptoren sogar um den Faktor 10 niedriger als bei der Positivkontrolle.

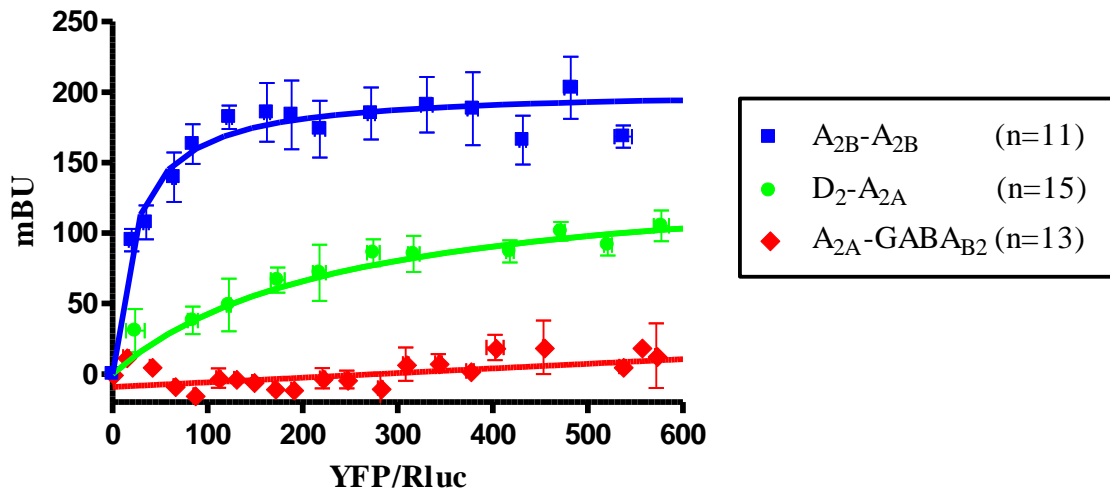


Abbildung 46. BRET-Experiment zur Untersuchung von Adenosin-A_{2B}-Rezeptor-Homodimeren (blaue Hyperbel) im Vergleich mit der grünen D₂-A_{2A}-Positivkontrolle und der roten A_{2A}-GABA_{B2} Negativkontrolle.

Tabelle 19. Ergebnis des BRET-Experimentes zur Adenosin-A_{2B}-Homodimeruntersuchung.^a

Rezeptoren	BRET _{max} ± SEM [mBU]	BRET ₅₀ ± SEM	n
A _{2B} -A _{2B}	202 ± 7 ***	23,0 ± 6,3 ***	11
D ₂ -A _{2A}	144 ± 6	239 ± 40	15

^a Ergebnisse des zweiseitigen t-Testes bezogen auf die Positivkontrolle D₂-A_{2A}: *** p < 0,001

3.2.2 Verdrängungsexperimente

Abbildung 47 zeigt das BRET-Verdrängungsexperiment zum Nachweis von A_{2B} -Homodimeren mit A_{2B} -Rluc, A_{2B} -YFP und A_{2B} ohne Fusionsprotein. Der erste Balken zeigt keinen Energietransfer, da kein YFP vorhanden ist. Die zweite Säule (grün) weist den höchsten Energietransfer auf, da kein A_{2B} ohne Fusionsprotein vorhanden ist, welches ein mögliches Dimer beeinflussen könnte. Die folgenden gelb markierten BRET-Signale in der Abbildung zeigen eine Abnahme des Energietransfers mit steigenden Mengen an unmarkiertem A_{2B} -Rezeptor. Ab einer DNA-Menge von 4,5 μg A_{2B} ist dieser Unterschied verglichen mit dem Maximum (grüne Säule) sogar signifikant. Die entsprechenden Werte sind in Tabelle 20 dargestellt. Damit beeinflusst der unmarkierte A_{2B} -Rezeptor eindeutig die BRET-Signale von A_{2B} -Rluc und A_{2B} -YFP.

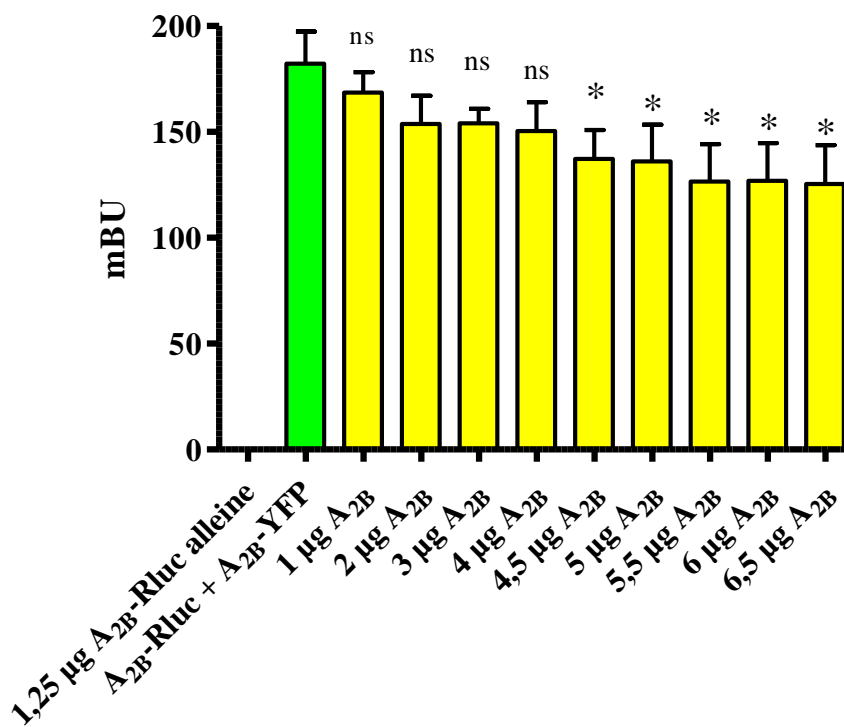


Abbildung 47. BRET-Verdrängungsexperiment zur Untersuchung von A_{2B} -Rezeptordimeren mit A_{2B} -Rluc, A_{2B} -YFP und A_{2B} ohne Fusionsprotein (n=4). Die Säulen zeigen das BRET-Signal nach der transienten Transfektion der CHO-Zellen mit 1,25 μg A_{2B} -Rluc, 2,5 μg A_{2B} -YFP und der angegebenen Menge an A_{2B} ohne Fusionsprotein. Säule 1 dient als Negativkontrolle, da kein Energietransfer ohne YFP stattfindet und Säule 2 zeigt als Positivkontrolle das BRET-Signal ohne unmarkierte A_{2B} -Rezeptoren. Über den Säulen sind die Ergebnisse des zweiseitigen t-Testes bezogen auf die Positivkontrolle (grün) angegeben: ^{ns} nicht signifikant; * $p < 0,05$.

Tabelle 20. Ergebnisse des BRET-Verdrängungsexperimentes.^a

Rezeptoren	BRET _{max} ± SEM [mBU]	n
A _{2B} -Rluc+A _{2B} -YFP	182 ± 15	4
1,0 µg A _{2B}	169 ± 10 ^{ns}	4
2,0 µg A _{2B}	154 ± 13 ^{ns}	4
3,0 µg A _{2B}	154 ± 7 ^{ns}	4
4,0 µg A _{2B}	150 ± 14 ^{ns}	4
4,5 µg A _{2B}	137 ± 14 [*]	4
5,0 µg A _{2B}	136 ± 18 [*]	4
5,5 µg A _{2B}	127 ± 18 [*]	4
6,0 µg A _{2B}	127 ± 18 [*]	4
6,5 µg A _{2B}	125 ± 18 [*]	4

^a Ergebnisse des zweiseitigen t-Testes bezogen auf A_{2B}-Rluc+A_{2B}-YFP: ^{ns} nicht signifikant; * p < 0,05

3.2.3 Einfluss von Liganden auf die Homodimerisierung

Die Zugabe der am A_{2B} -Homodimer getesteten Agonisten Adenosin (100 μ M), NECA (100 μ M) und BAY60-6583 (10 μ M), sowie des Antagonisten PSB-603 (500 nM) zeigten über eine Stunde hinweg keinen signifikanten Unterschied zur Kontrolle (siehe Abbildung 48). Die Messungen erfolgen nach 0 min, 5 min, 10 min, 20 min, 30 min und 60 min. Dabei sind die Konzentrationen der Liganden sehr hoch gewählt (fast in Sättigungsbereich). Lediglich nach der Zugabe von Adenosin zeigt der Graph nach 5 min einen signifikanten Abfall des mBU Signals, welches spätestens nach weiteren 5 min nicht mehr signifikant ist. Grundsätzlich zeigen alle Graphen (außer Adenosin) nach 5 min zunächst einen Anstieg und dann sinken alle BRET-Signale, auch die der Kontrolle, nach 1 h auf das gleiche Niveau ab. Da die Liganden in DMSO gelöst sind, wird eine einheitliche Konzentration von 2,5 % DMSO im Assay eingestellt.

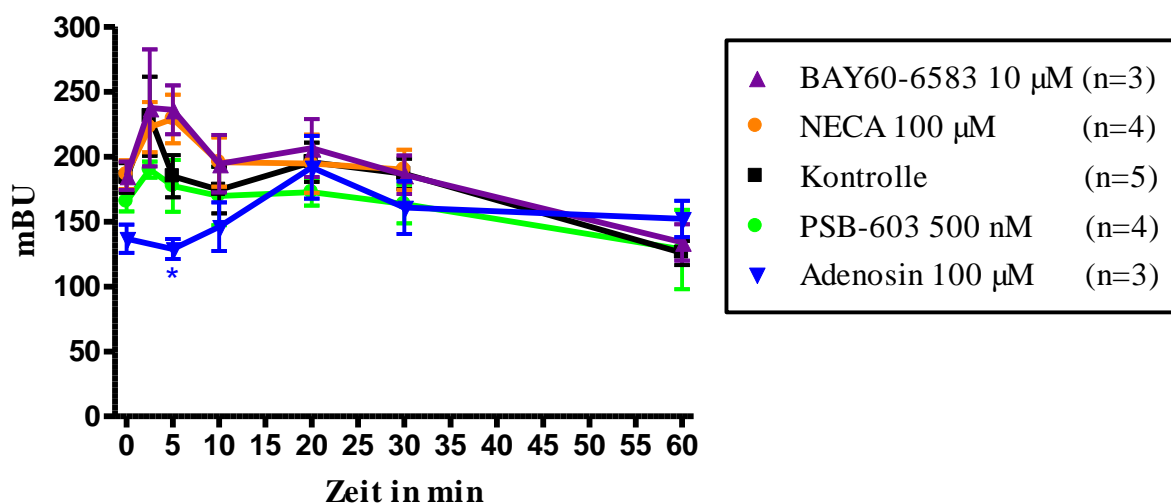


Abbildung 48. Zeitliche Veränderung des BRET-Signals bei A_{2B} - A_{2B} -Homodimeren nach Zugabe der Liganden Adenosin, NECA, PSB-603 und BAY60-6583 (n=3-5). Die Transfektion aller CHO-Zellen erfolgt mit 1,25 μ g A_{2B} -Rluc und 2,5 μ g A_{2B} -YFP bei einem DMSO-Gehalt von 2,5 % im Assay. Ergebnis des zweiseitigen t-Testes beim 5 min Wert bezogen auf die Kontrolle: * p < 0,05. Alle nicht markierten Ergebnisse liefern keinen signifikanten Unterschied.

3.2.4 Einfluss der M198A-Mutation auf die Adenosin-A_{2B}-Homodimerisierung

Zunächst ist in Abbildung 49 ein Vergleich der beiden Proteinsequenzen der humanen Adenosin-A_{2A}- und -A_{2B}-Rezeptoren im Bereich des letzten Abschnittes der fünften Transmembrandomäne (TM5) und dem Anfang der dritten intrazellulären Schleife (IL3) dargestellt. Das Ergebnis zeigt, dass die Aminosäure Methionin an der Position 193 (Met193) im A_{2A}-Rezeptor analog zu der Aminosäure Met198 im A_{2B}-Rezeptor ist.

		TM5	IL3
hA _{2A}	Met193	181 NFFACVLVPLLLMLGV-YLRIFLAA	204
		
hA _{2B}	Met198	186 NFFGCVLPPLLIIML-VIYIKIFLVA	209

Abbildung 49. Alignment: Ausschnitt der Proteinsequenz der fünften Transmembrandomäne (TM5) und der dritten intrazellulären Schleife (IL3) der hA_{2A}- und hA_{2B}-Rezeptoren. Dabei entspricht Met193 aus dem hA_{2A}-Rezeptor dem Met198 des hA_{2B}-Rezeptors.

Nach dem Austausch der Aminosäure Met198 im A_{2B}-Rezeptor gegen Alanin entsteht die Rezeptormutante A_{2B}-M198A. Es folgt die Klonierung des Konstruktes in den Rluc- bzw. YFP-Vektor mit der daraus resultierenden DNA A_{2B}-M198A-Rluc und A_{2B}-M198A-YFP. Das Ergebnis des BRET-Versuches mit diesen Konstrukten ist in Abbildung 50 und Tabelle 21 gezeigt.

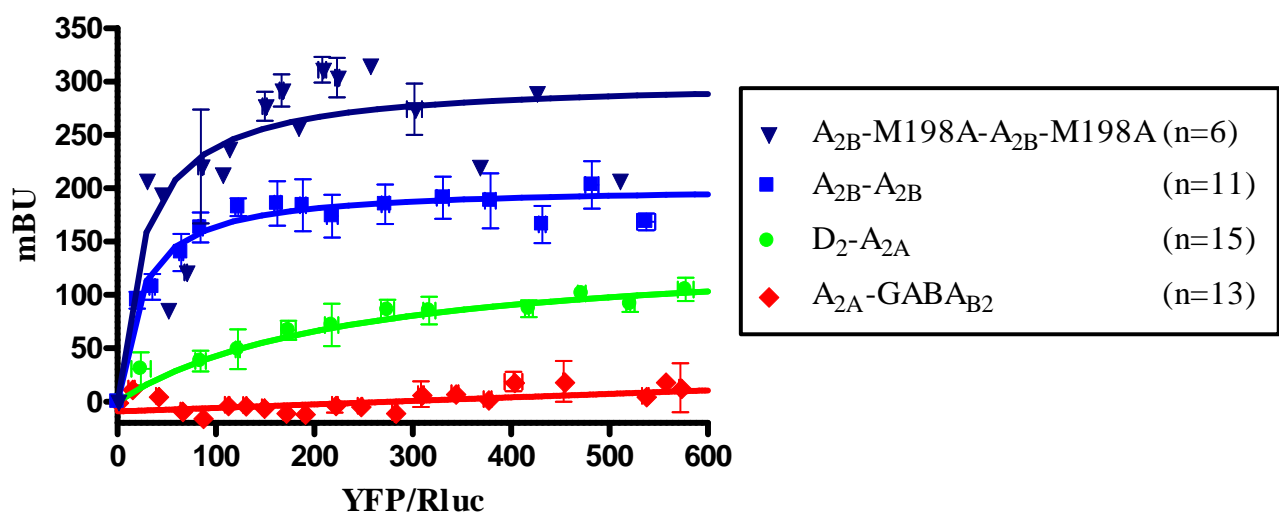


Abbildung 50. Einfluss der Mutation M198A im A_{2B}-Rezeptor auf die Bildung von Adenosin-A_{2B}-Rezeptor-Homodimeren (dunkelblaue Hyperbel mit A_{2B}-M198A-Rluc und A_{2B}-M198A-YFP) verglichen mit dem A_{2B}-Homodimeren (blaue Hyperbel) und den Kontrollen (grün und rot).

Abbildung 50 zeigt die A_{2B} -M198A- A_{2B} -M198A Hyperbel, die mit einem $BRET_{max}$ -Wert von 301 ± 12 mBU einen wesentlich höheren $BRET_{max}$ -Wert als das A_{2B} -Homodimer mit 202 ± 7 mBU aufweist. Die $BRET_{50}$ -Werte der beiden genannten Rezeptorpaare sind jedoch etwa ähnlich hoch. Die M198A-Mutante weist einen um den Faktor 9 geringeren $BRET_{50}$ -Wert verglichen mit dem publizierten D_2 - A_{2A} -Dimer auf, zeitgleich ist der $BRET_{max}$ -Wert der Mutante fast doppelt so hoch, wie der von der Positivkontrolle. Beide Werte unterscheiden sich damit signifikant voneinander.

Tabelle 21. Ergebnis des BRET-Experimentes zur Untersuchung der M198A-Mutation auf das A_{2B} -Homodimer.^a

Rezeptoren	$BRET_{max} \pm SEM$ [mBU]	$BRET_{50} \pm SEM$	n
A_{2B} -M198A- A_{2B} -M198A	301 ± 12 ***	$26,4 \pm 8,0$ **	6
A_{2B} - A_{2B}	202 ± 7 ***	$23,0 \pm 6,3$ ***	11
D_2 - A_{2A}	144 ± 6	239 ± 40	15

^a Ergebnisse des zweiseitigen t-Testes bezogen auf die Positivkontrolle D_2 - A_{2A} : ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$

3.2.5 Computermodell des Adenosin- A_{2B} -Rezeptor-Homodimers

Das von Dr. Farag Sherbiny erstellte Computermodell ist in Abbildung 51 dargestellt. Den Berechnungen in Tabelle 22 zufolge, zeigen die an TM2 und TM6 zusammengelagerten Dimere die niedrigste kinetische Energie und damit die energetisch günstigste Rezeptorkonformation als Dimer. Auch an TM7 und TM1 zusammengelagerte Dimere weisen eine besonders niedrige kinetische Energie auf. Beide Domänen könnten den Berechnungen nach die Interaktionsfläche zwischen den A_{2B} -Rezeptor-Monomeren unter Ausbildung von Dimeren wichtig sein. In TM6 rücken nun nach dem Modell insbesondere die Aminosäuren Met238, Leu245, Leu248, Ala252, Val256 und Val588, sowie in TM2 die Aminosäuren Tyr44, Val47, Val54, Ala55, Leu58, Phe59 und Phe63 in den Fokus. Bei der TM7 scheinen die Aminosäuren Tyr270, Met274, Leu278, Ala281, Val284, Val285, Ile288 und bei der TM1 Leu9, Ala12, Leu13, Val16, Leu20, Ala23 und Leu27 potentiell von Bedeutung zu sein. Eine weitere Kontaktregion könnte nach Sherbiny bei dem A_{2B} -Homodimer auch der C-Terminus darstellen.

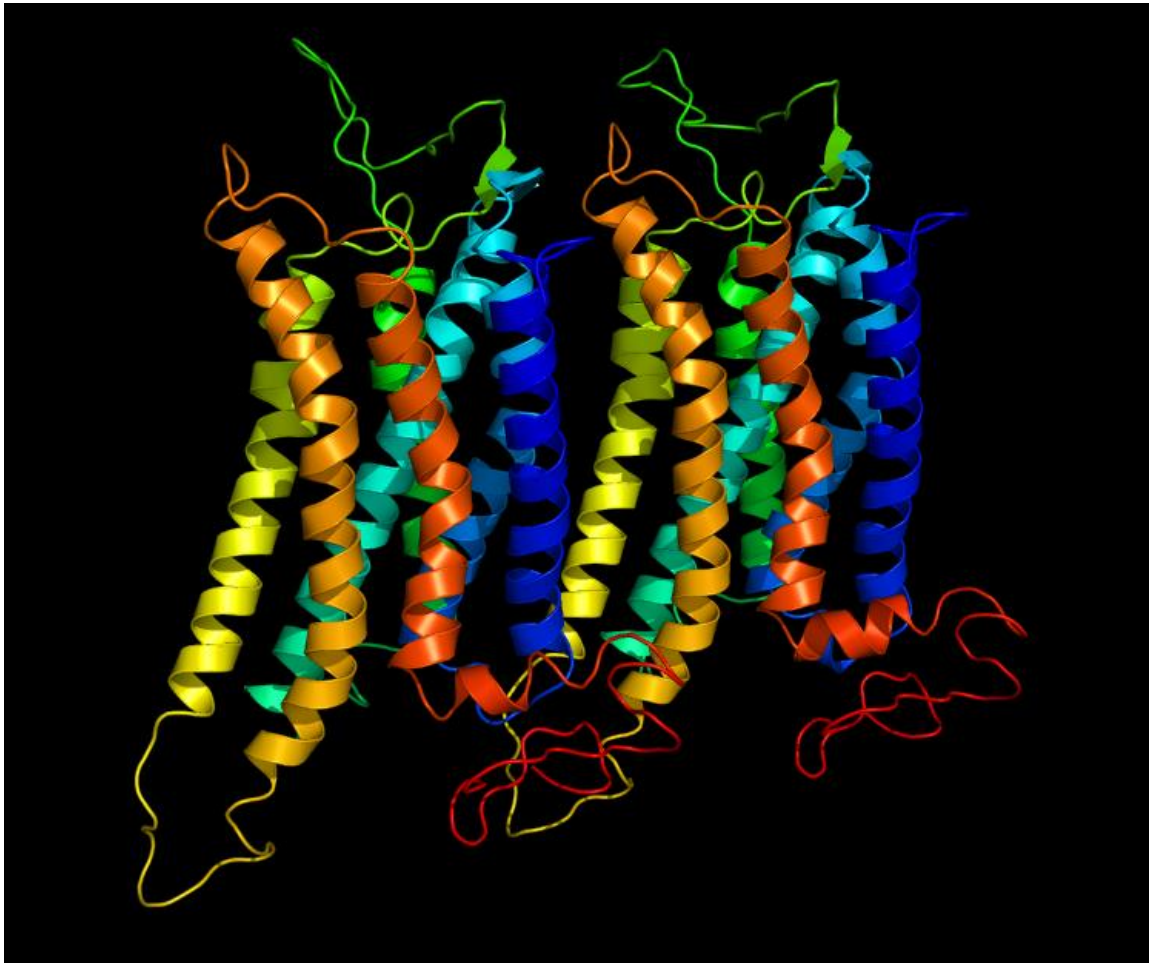


Abbildung 51. Computermodell des Adenosin- A_{2B} -Homodimers. Hier bildet die TM2 (blau) mit der TM6 (orange) die Interaktionsfläche.

Tabelle 22. Computerberechnung für die Interaktionsfläche des A_{2B} -Homodimers.

	TM (A_{2B} - A_{2B})	Kinetische Energie
1.	TM4 - TM5	-1,40106
2.	TM5 - TM4	-1,55278
3.	TM2 - TM6	-1,56425
4.	TM7 - TM1	-1,56096

3.3 Heterodimerisierung von humanen Adenosin-A_{2A}- und -A_{2B}-Rezeptoren

3.3.1 Biolumineszenz-Resonanz-Energie-Transfer

Das Ergebnis der Adenosin-A_{2A}-A_{2B}-Heterodimeruntersuchung ist zusammen mit den Kontrollen in der Abbildung 52 gezeigt. In Tabelle 23 sind die dazugehörigen BRET_{max} und BRET₅₀-Werte angegeben. Sowohl A_{2A}-A_{2B} als auch die Positivkontrolle D₂-A_{2A} zeigen eine Hyperbel im BRET-Graphen und keine flach verlaufende Gerade, wie bei der Negativkontrolle. Dabei gibt es keinen signifikanten Unterschied bei den BRET_{max}- und BRET₅₀-Werten zwischen A_{2A}-A_{2B} und der Positivkontrolle. Dabei ist jedoch der BRET₅₀-Wert bei den A_{2A}-A_{2B}-Rezeptoren um die Hälfte kleiner als bei der Positivkontrolle.

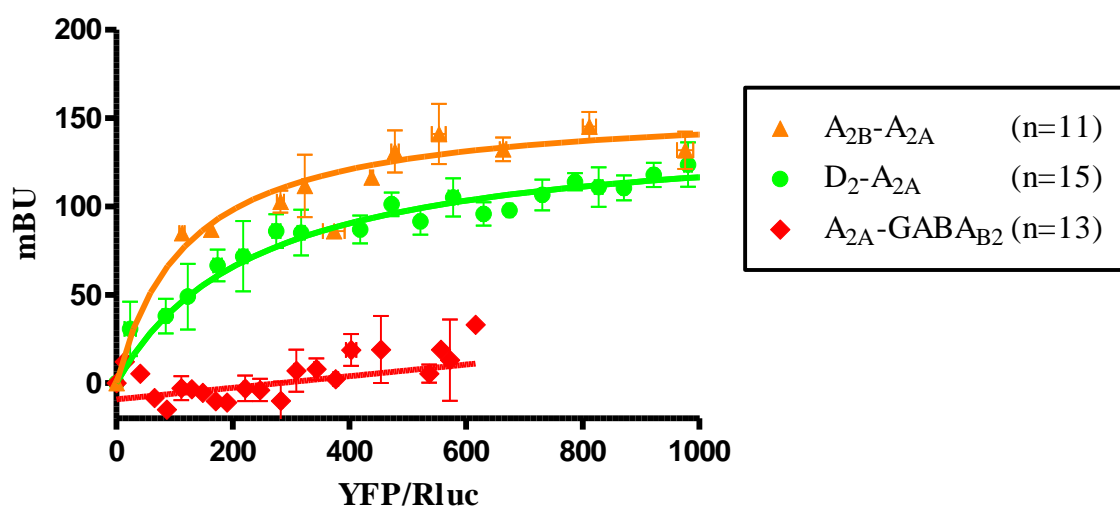


Abbildung 52. Heterodimeruntersuchungen von humanen Adenosin A_{2A}-A_{2B}-Rezeptoren (n=11) (orange Hyperbel) verglichen mit den Kontrollen (grün und rot).

Tabelle 23. Ergebnis des BRET-Experimentes zur Adenosin-A_{2B}-Homodimeruntersuchung.^a

Rezeptoren	BRET _{max} ± SEM [mBU]	BRET ₅₀ ± SEM	n
A _{2A} -A _{2B}	158 ± 10 ^{ns}	122 ± 58 ^{ns}	11
D ₂ -A _{2A}	144 ± 6	239 ± 40	15

^a Ergebnisse des zweiseitigen t-Testes bezogen auf die Positivkontrolle D₂-A_{2A}: ^{ns} nicht signifikant

3.3.2 Verdrängungsexperimente

Das BRET-Verdrängungsexperiment von A_{2B} -Rluc, A_{2A} -YFP und A_{2B} ohne Fusionsprotein ist in Abbildung 53, und die zugehörigen Werte sind in Tabelle 24 dargestellt. Wenn A_{2B} -Rluc alleine exprimiert wird, dann ist kein Energietransfer messbar (erste Position Abbildung 53). Die grüne Säule repräsentiert den höchsten Energietransfer, da dort nur A_{2B} -Rluc und A_{2A} -YFP und kein A_{2B} ohne Fusionsprotein exprimiert wurden. Die folgenden gelb markierten BRET-Signale zeigen eine starke Abnahme des Energietransfers mit steigenden Mengen an unmarkiertem A_{2B} -Rezeptor. Ab einer DNA Menge von 4 μg A_{2B} ist dieser Unterschied verglichen mit dem Maximum signifikant und ab einer Menge von 5 μg sogar hochsignifikant. Die Verdrängung von A_{2B} -Rluc bzw. A_{2A} -YFP durch den A_{2B} -Rezeptor ist damit deutlich an der Abnahme des BRET-Signales zu erkennen.

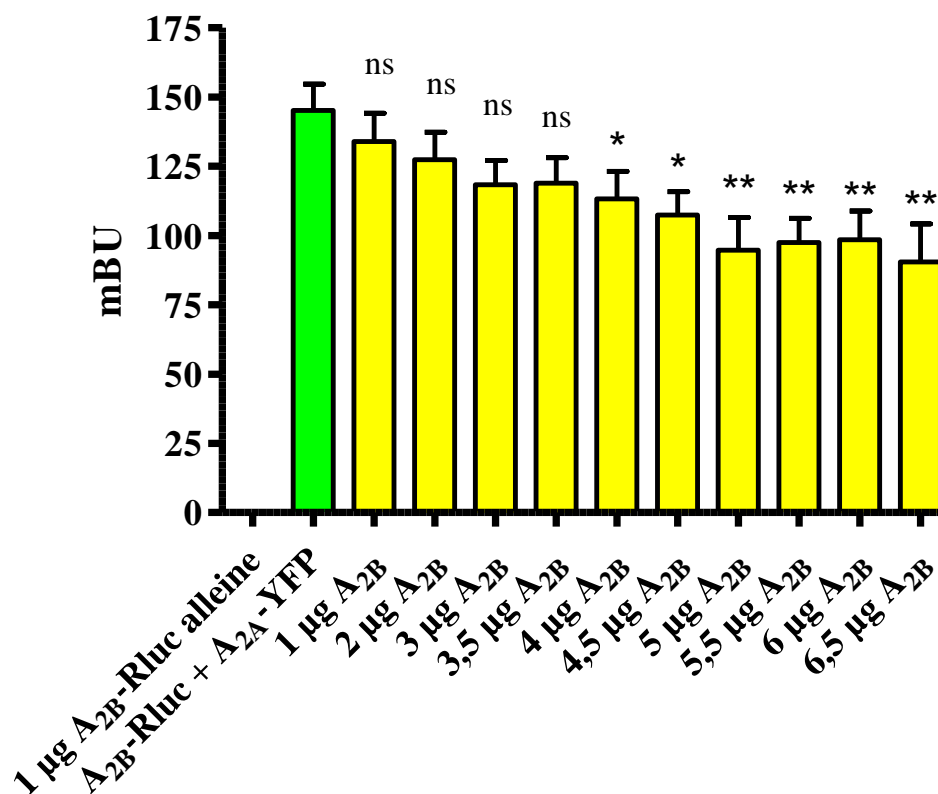


Abbildung 53. BRET-Verdrängungsexperiment zur Untersuchung von A_{2A} - A_{2B} -Rezeptordimeren mit A_{2B} -Rluc, A_{2A} -YFP und A_{2B} ohne Fusionsprotein (Triplikate, $n=4$). Die Säulen zeigen das BRET-Signal nach der transienten Transfektion der CHO-Zellen mit 1 μg A_{2B} -Rluc, 2 μg A_{2B} -YFP und der angegebenen Menge an A_{2B} ohne Fusionsprotein. Säule 1 repräsentiert die Negativkontrolle, da kein Energietransfer ohne YFP stattfindet und Säule 2 zeigt als Positivkontrolle das BRET-Signal ohne unmarkierte A_{2B} -Rezeptoren. Über den Säulen sind die Ergebnisse des zweiseitigen t-Testes bezogen auf die Positivkontrolle (grün) angegeben: ^{ns} nicht signifikant; * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$.

Tabelle 24. Ergebnisse des BRET-Verdrängungsexperimentes.^a

Rezeptoren	BRET _{max} ± SEM [mBU]	n
A _{2B} -Rluc+A _{2A} -YFP	145 ± 9	4
1,0 µg A _{2B}	134 ± 10 ^{ns}	4
2,0 µg A _{2B}	127 ± 10 ^{ns}	4
3,0 µg A _{2B}	118 ± 9 ^{ns}	4
3,5 µg A _{2B}	119 ± 9 ^{ns}	4
4,0 µg A _{2B}	113 ± 10 [*]	4
4,5 µg A _{2B}	107 ± 8 [*]	4
5,0 µg A _{2B}	94,8 ± 11,8 ^{**}	4
5,5 µg A _{2B}	97,5 ± 8,7 ^{**}	4
6,0 µg A _{2B}	98,5 ± 10,3 ^{**}	4
6,5 µg A _{2B}	90,4 ± 13,8 ^{**}	4

^a Ergebnisse des zweiseitigen t-Testes bezogen auf A_{2B}-Rluc+A_{2A}-YFP: ^{ns} nicht signifikant;

* p < 0,05; ** p < 0,01

3.3.3 Einfluss von Liganden auf die Heterodimerisierung

Die Änderung des BRET-Signals von A_{2A} - A_{2B} -Heterodimeren nach Zugabe von Liganden, gemessen über eine Stunde hinweg, ist in Abbildung 54 dargestellt. Sowohl die Agonisten Adenosin (100 μ M), NECA (100 μ M), CGS-21680 (10 μ M, A_{2A} -Agonist) und BAY60-6583 (10 μ M, A_{2B} -Agonist), als auch der A_{2B} -Antagonist PSB-603 (500 nM) zeigen im Vergleich zur Kontrolle keine signifikanten Unterschiede. Alle Liganden sind in hohen Konzentrationen eingesetzt und getestet worden. Insgesamt sinkt das Niveau aller Graphen inkl. der Kontrolle über 60 min leicht ab.

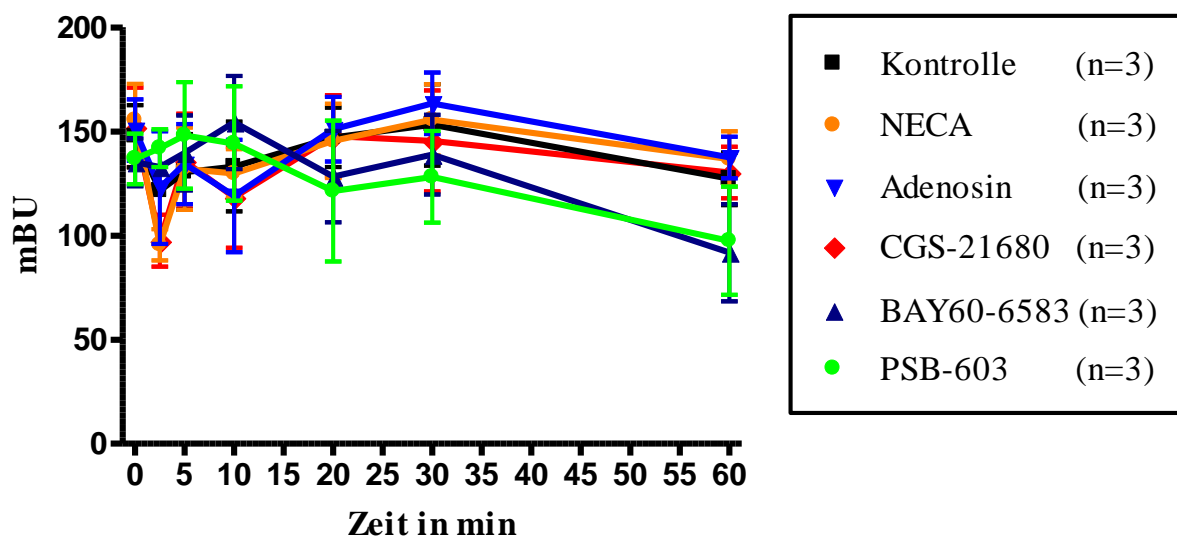


Abbildung 54. Zeitliche Veränderung des BRET-Signals bei A_{2A} - A_{2B} -Heterodimeren nach Zugabe von den Liganden NECA (100 μ M), Adenosin (100 μ M), CGS-21680 (10 μ M), PSB-603 (500 nM) und BAY60-6583 (10 μ M) (n=3). Die Transfektion aller CHO-Zellen erfolgt mit 2 μ g A_{2B} -Rluc und 3 μ g A_{2A} -YFP. Im Assay beträgt der DMSO Gehalt 2,5 %. Das Ergebnis des zweiseitigen t-Testes bezogen auf die Kontrolle ergibt keine signifikanten Unterschiede.

3.3.4 Konfokale Mikroskopie

Die konfokale Mikroskopie dient der Überprüfung der Lokalisierung der Rezeptoren. Abbildung 55 zeigt eine CHO-Zelle mit exprimiertem A_{2A} -Rluc und A_{2B} -YFP unter dem konfokalen Mikroskop während der Anregung des YFPs und Cy3s, welches über Antikörper an Rluc gebunden ist. Dabei sind die Rezeptorexpression und die Verteilung in der Zelle gut zu erkennen. Optimal ist für die BRET-Experimente eine gleichmäßige Verteilung der A_{2A} - und A_{2B} Rezeptoren, damit die Voraussetzungen für eine Untersuchung von Dimeren überhaupt gegeben ist. Das Bild zeigt die Zelle sowohl im Quer- als auch Längsschnitt (siehe unterer bzw. rechter Rand). Es zeigt, dass die Rezeptoren nicht intrazellulär, sondern in der Plasmamembran lokalisiert sind.

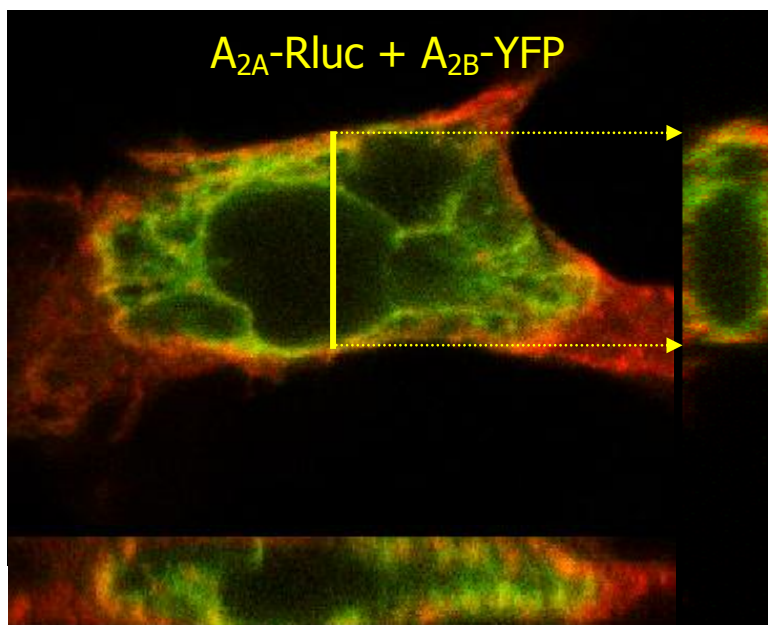


Abbildung 55. Konfokale Mikroskopie: CHO-Zellen mit A_{2A} -Rluc und A_{2B} -YFP. Grün angefärbte Zellkompartimente exprimieren überwiegend den A_{2B} -Rezeptor mit dem YFP. Rote Zellkompartimente exprimierten größtenteils A_{2A} -Rezeptoren mit Rluc. Sind ungefähr gleiche Mengen an A_{2A} -Rluc und A_{2B} -YFP vorhanden, so erscheint es in dem Bild als gelb. Rluc selbst wurde hier über einen Antikörper gegen Rluc, an dem ein zweiter Antikörper mit einem Fluorophor Cy³ gebunden hat, sichtbar gemacht. Die Zelle konnte scheinbar von oben nach unten gescannt werden und ein virtueller vertikaler Schnitt durch die Zelle erzeugt werden. Die Zelle am rechten Rand ist ein vertikaler Blick in die Zelle von der Seite (an der gelben Linie). Analog dazu ist der Schnitt der Zelle am unteren Rand.

3.3.5 Computermodell des Adenosin-A_{2A}-A_{2B}-Rezeptor Heterodimers

Abbildung 56 zeigt das Computermodell des Adenosin-A_{2A}-A_{2B}-Rezeptor Heterodimers welches Dr. Farag Sherbiny erstellte. Die Ergebnisse der Berechnungen sind in Tabelle 25 dargestellt, wobei die Zusammenlagerung TM4 und TM5 die niedrigste kinetische Energie ergibt. Demnach scheinen diese beiden Domänen die Interaktionsfläche im A_{2A}-A_{2B}-Heteromer zu bilden. Interessant für Mutationsstudien sind nach diesem Modell die Aminosäuren des A_{2B}-Rezeptors Val125, Val128, Phe134 und Leu142 aus der TM4, sowie aus der TM5 des A_{2A}-Rezeptors die Aminosäuren Tyr184, Ile197, Met198 und Ile201.

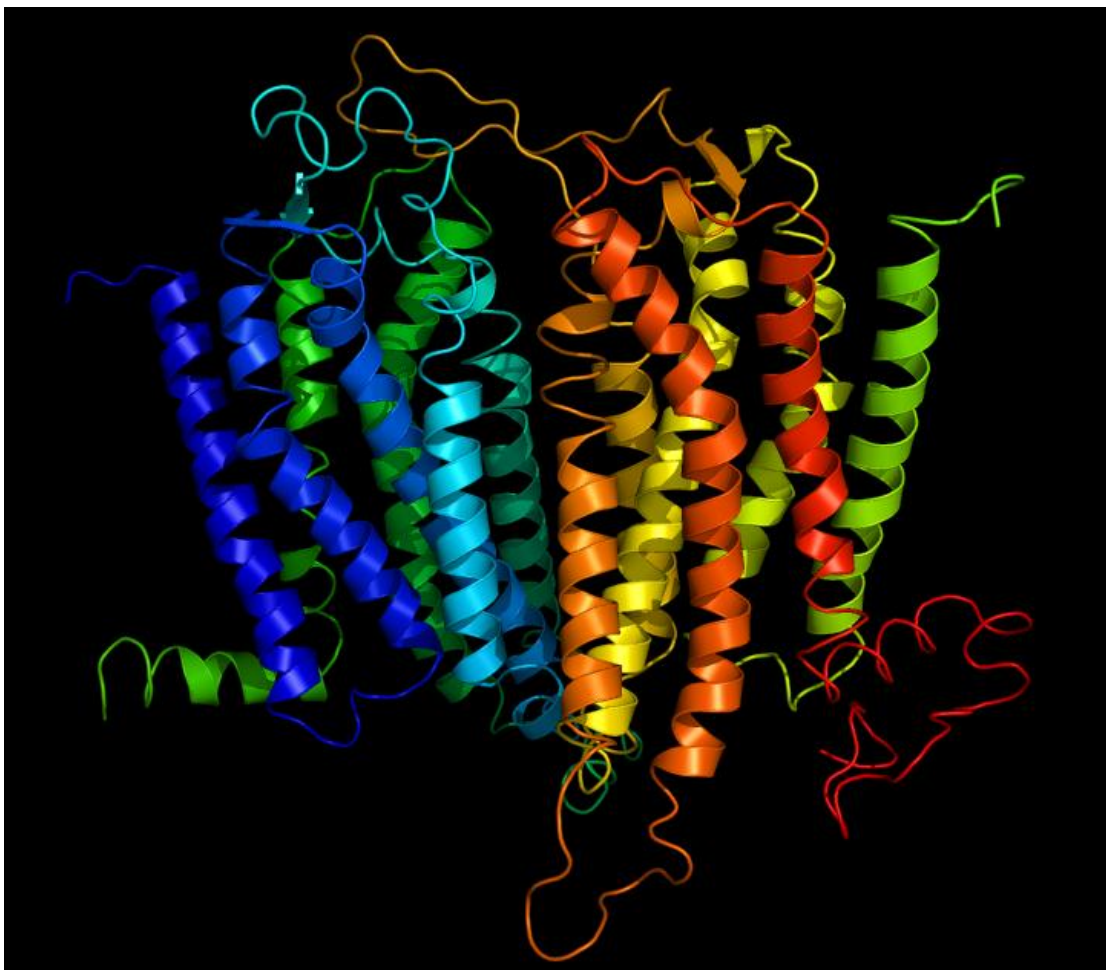


Abbildung 56. Computermodell des Adenosin-A_{2A}-A_{2B}-Heterodimers. Hier bildet die vierte Transmembrandomäne (TM4 - cyan) des A_{2A}-Rezeptors (links) mit der fünften Transmembrandomäne (TM5 - orange) des A_{2B}-Rezeptors (rechts) die Interaktionsfläche (nach F. Sherbiny, unpublizierte Ergebnisse).

Tabelle 25. Computerberechnung für die Interaktionsfläche des A_{2A} - A_{2B} -Heterodimers.

	TM (A_{2B}-A_{2A})	Kinetische Energie
1.	TM4 - TM5	-2,10335
2.	TM5 - TM4	-1,96114
3.	TM2 - TM6	-2,01906
4.	TM7 - TM1	-2,08237

3.4 Oligomerisierung von Adenosin-Rezeptoren: Elektrophorese-Experimente

3.4.1 Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Vorab sind in Tabelle 26 die markierten Rezeptoren mit dem dazugehörigen Molekulargewicht dargestellt.

Tabelle 26. Proteingrößen der Rezeptoren

Rezeptor	Größe [kDa]
A _{2A} -His	46,2
A _{2A} -Strep	46,2
A _{2A} -YFP	72,3
A _{2B} -His	36,6
A _{2B} -Strep	36,6

Zunächst wurden SDS-Gele mit den [³⁵S]-Methionin-markierten Proteinen hergestellt. Dabei konnte lediglich der A_{2A}-Rezeptor (His/Strep) mit einem sehr schwachen Signal auf dem Film detektiert werden. Die Auswertung der Proben mittels Counter ergab auch ein geringes messbares Signal für den A_{2B}-Rezeptor, allerdings kann hiermit kein Dimer in einem Gel nachgewiesen werden; daher sind die Ergebnisse hier nicht gezeigt. Die Kontrollen, also die untransfizierten Oozyten, zeigten hierbei nur ein Signal in Höhe der Hintergrundstrahlung.

Die mittels Typhoon detektierten SDS-Gele zeigen die Cy3-, Cy5- und die YFP-markierten Rezeptoren. Abbildung 57 und Tabelle 27 zeigen die Ergebnisse. Dabei sind im Teil a) die Cy5-markierten Rezeptoren, die in der gesamten Zelle vorkommen, nach der Aufreinigung mit NTA-Ni²⁺-Agarose zu erkennen. Hierbei können theoretisch nur Rezeptoren vorhanden sein, die mit einem His-Tag versehen sind oder zwei nebeneinanderliegende Histidine in ihrer Rezeptorsequenz aufweisen. Somit müssten die Rezeptoren A_{2B}-His (1a) und A_{2A}-His (3a-5a) durch die Cy5 Markierung erkennbar sein. Jedoch ist lediglich sehr schwach A_{2A}-His-A_{2A}-YFP (fungiert hier als Positivkontrolle) zu erkennen. Die anderen Rezeptoren scheinen kaum exprimiert zu sein, da im Vergleich zu der Kontrolle (7a) nicht mehr Banden zu erkennen sind. Alternativ könnte auch die Anfärbung mit Cy5 bzw. Cy3 nicht optimal verlaufen sein, sodass die Rezeptoren zwar exprimiert sind, jedoch nicht vollständig detektiert werden. Der zweite Teil b) zeigt die Cy3-markierten Rezeptoren, also die, die in der

Plasmamembran vorkommen. Da hier die Extrakte der Rezeptoren vor der Aufreinigung mit der NTA-Ni²⁺-Agarose aufgetragen wurden, sind sie unabhängig vom His-Tag. Eindeutig ist A_{2A}-YFP (2b) durch die roten Banden zu erkennen. Dies ist der einzige Rezeptor in Teil b), der unabhängig von Cy3 im Gel zu erkennen ist. In Teil a)

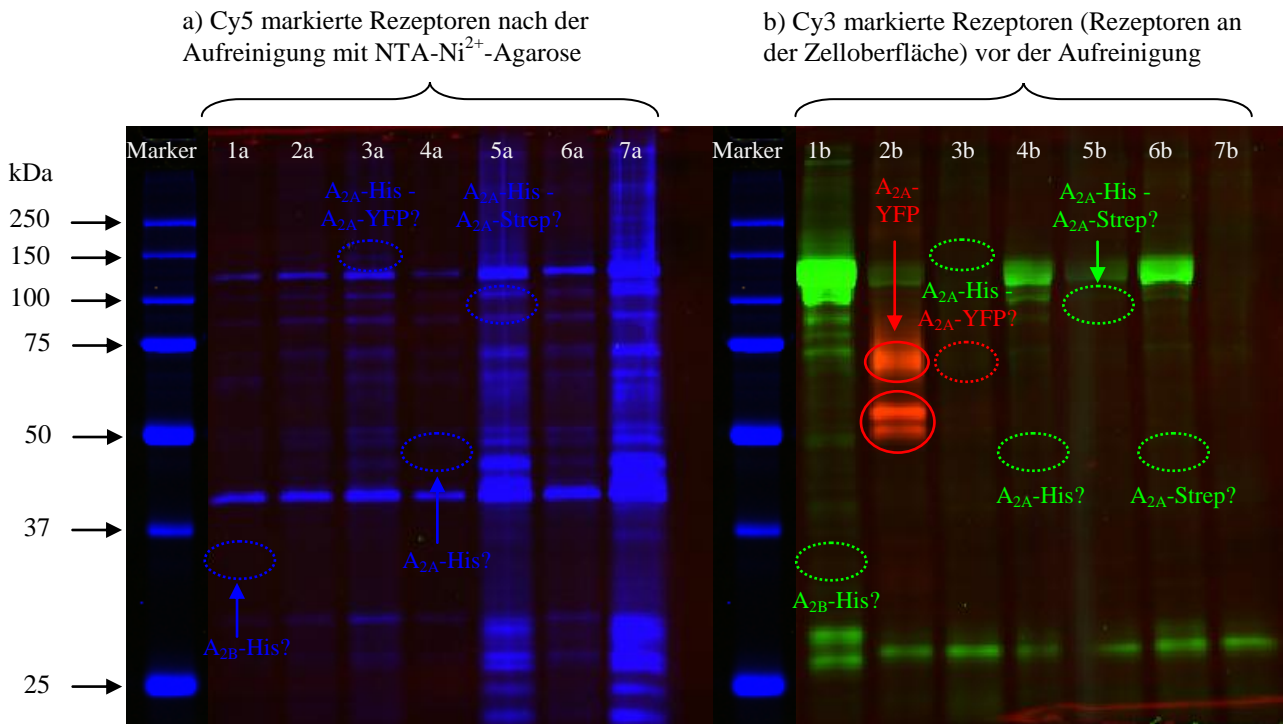


Abbildung 57. Detektion des SDS-Gels mittels Typhoon. Die blauen Banden sind die mit Cy5 markierten Rezeptoren und sie befinden sich sowohl in der Zelle als auch in der Plasmamembran. Die grünen Banden stellen die Cy3 markierten Rezeptoren da, welche sich in der Plasmamembran der Oozyten befanden. Das YFP-Konstrukt ist hier rot dargestellt. Die gestrichelten Kreise deuten die erwarteten Bandengrößen an. Die beiden blauen Marker wurden nachträglich eingefügt.

Tabelle 27. Erklärung zur Abbildung 57.

Position	Rezeptor	Größe [kDa]
1 a/b	A _{2B} -His	36,6
2 a/b	A _{2A} -YFP	72,3
3 a/b	A _{2A} -His + A _{2A} -YFP	118,5
4 a/b	A _{2A} -His	46,2
5 a/b	A _{2A} -His + A _{2A} -Strep	92,4
6 a/b	A _{2A} -Strep	46,2
7 a/b	Kontrolle	---

konnte das YFP nicht detektiert werden, weil nach der Aufreinigung über das His-Tag, A_{2A}-YFP weggewaschen wurde. Bei der Koexpression von A_{2A}-His mit A_{2A}-YFP (3b) ist allerdings keine Bande zu sehen, genau wie bei dem A_{2A}-His zusammen mit dem A_{2A}-Strep-Konstrukt (5b). Auch die einzeln exprimierten Rezeptoren, wie A_{2B}-His (1b), A_{2A}-His (4b) und A_{2A}-Strep (6b) können nicht in der Zellmembran nachgewiesen werden.

Abbildung 58 und Tabelle 28 zeigen die Ergebnisse eines SDS-Gels nach einem Western Blot und der Detektion mittels Strep-Antikörpern nach der Umsetzung von Luminol. In Teil a) der Abbildung müssten alle Strep-markierten Rezeptoren A_{2A}-Strep (2a, 4a, 6a) und A_{2B}-Strep (3a, 5a, 7a) zu detektieren sein, da dies der Zustand vor der Aufreinigung über das His-Tag ist. Alle Konstrukte sind deutlich zu erkennen bis auf A_{2B}-Strep alleine (3a), da hier offensichtlich die Expression sehr gering ist. Dies scheint grundsätzlich bei allen A_{2B}-Strep-Konstrukten der Fall zu sein. Dennoch sind A_{2A}-Strep (2a) und A_{2B}-Strep (3a) im Teil a) eine Positivkontrolle und im Teil b) eine Negativkontrolle, da im rechten Teil der Abbildung nach der Aufreinigung nur noch Konstrukte detektiert werden können, die sowohl ein His- als auch ein Strep-Tag aufweisen. Die Kontrolle (1a/b) besteht aus untransfizierten Oozyten, die kein Signal bei der Detektion zeigen. A_{2A}-His und A_{2A}-Strep (4a/b) sind am stärksten exprimiert und zeigen sowohl Dimerbildung als auch eine mögliche Tetramerbildung (4b). Eine genauere Differenzierung zwischen Tetrameren und noch höheren Oligomeren ist aufgrund des schwachen Signals nur schwer möglich. Ein Trimer scheint sich hier aber nicht zu bilden, da dies bei ca. 140 kDa erscheinen müsste. Bei 4b und 6b sind eindeutig Monomere zu erkennen. Dies müssen zuvor Oligomere gewesen sein, die nach der Aufreinigung durch die anschließende Denaturierung mit SDS und DTT zu Monomeren abgebaut wurden. 5a/b und 6a/b zeigen jeweils vor und nach der Aufreinigung eine schwache Bande an der erwarteten Position. Dies lässt auf das A_{2A}-A_{2B}-Heterdimer schließen. Hier sind keine höheren Oligomere zu erkennen. Bei dem A_{2B}-His und A_{2B}-Strep ist kaum ein Signal zu erkennen, da vermutlich die Expression viel zu gering war. Daher kann hier keine Aussage zu Di-, Tri- oder Tetrameren gemacht werden.

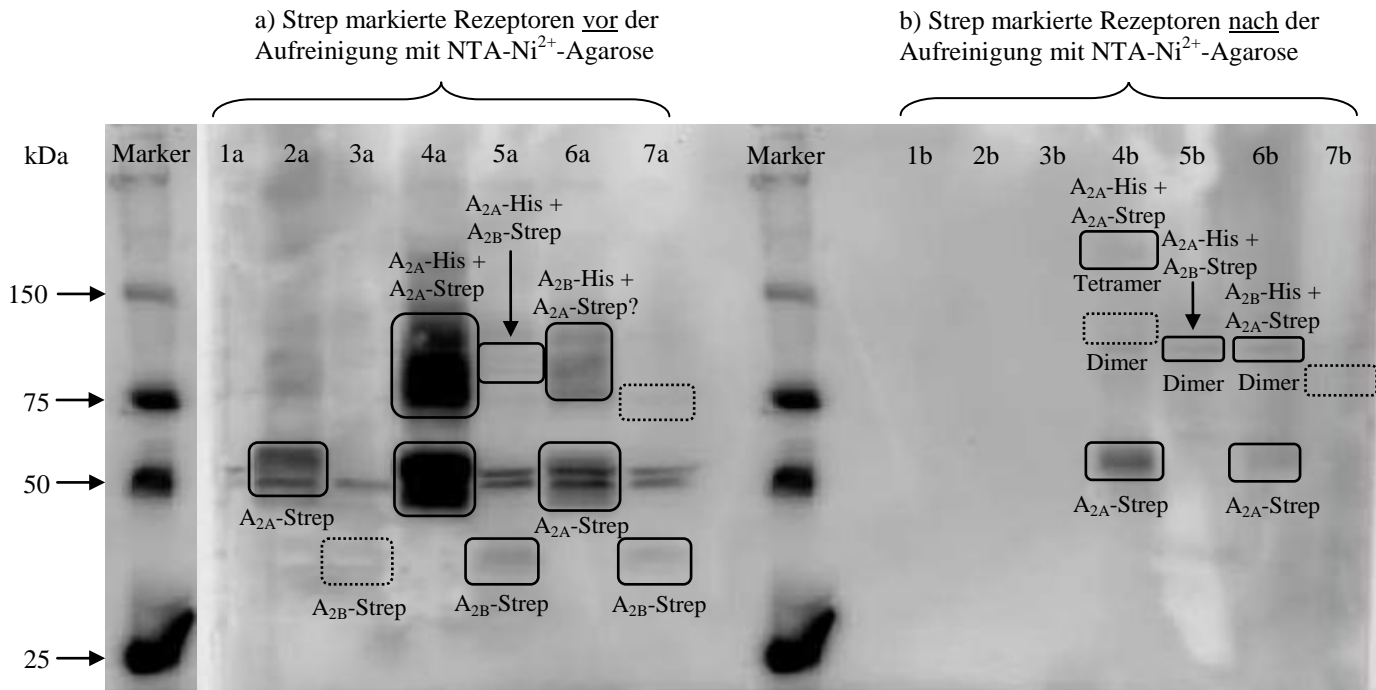


Abbildung 58. Detektion nach dem Western Blot eines SDS-Gels mit Hilfe von Strep-Antikörpern. Im Teil a) befinden sich die Rezeptoren vor und im Teil b) nach der NTA-Ni²⁺-Agarose Aufreinigung. Links sind somit alle Rezeptoren mit einem Strep-Tag detektierbar, während im rechten Teil der Abbildung theoretisch nur Rezeptoren mit His- und Strep-Tag zusammen (Oligomere) detektiert werden können. Der Marker in der Mitte wurde kopiert und links von der Abbildung mit dem Größenstandard dargestellt.

Tabelle 28. Erklärung zu Abbildung 58.

Position	Rezeptor	Größe [kDa]
1 a/b	Kontrolle	---
2 a/b	A _{2A} -Strep	46,2
3 a/b	A _{2B} -Strep	36,6
4 a/b	A _{2A} -His + A _{2A} -Strep	92,4
5 a/b	A _{2A} -His + A _{2B} -Strep	82,8
6 a/b	A _{2B} -His + A _{2A} -Strep	82,8
7 a/b	A _{2B} -His + A _{2B} -Strep	72,2

3.4.2 Blaue Native-Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Bei der BN-PAGE waren zunächst im Gel optisch eine Vielzahl an blauen Banden vorhanden, allerdings konnte nach dem Western Blot, der Inkubation mit den spezifischen Antikörpern und der anschließenden Detektion, kein Signal erfasst werden. Für die BN-PAGE ist eine sehr hohe Rezeptorexpression wichtig, die allerdings bei Adenosin-Rezeptoren in Oozyten bisher nicht erreicht werden konnte. Die Detektion mittels Typhoon ist bei der BN-Page nicht möglich, da die blaue Farbe im Gel die Wellenlängen beeinflusst.

4 Diskussion

4.1 Charakterisierung der zweiten extrazellulären Schleife des humanen Adenosin-A_{2B}-Rezeptors

4.1.1 Austausch der zweiten extrazellulären Schleife des humanen Adenosin-A_{2B}-Rezeptors und Expression in CHO-Zellen

Der zu Beginn mittels 'Overlap-Extension'-Methode durchgeführte Austausch der zweiten extrazellulären Schleife des humanen Adenosin-A_{2B}-Rezeptors gegen den EL2 des Adenosin-A_{2A}-Rezeptors resultiert in der Rezeptormutante hA_{2B}(EL2-A_{2A}). Die Bestimmung des B_{max}-Wertes über die homologe Konkurrenz weist keinen signifikanten Unterschied bei der Expression der Rezeptormutante verglichen mit dem Wildtyp auf. Damit können alle Ergebnisse ohne die besondere Berücksichtigung auf die Expression der Rezeptoren diskutiert werden.

4.1.2 Konkurrenzexperimente

Die Inhibitionskurven der Konkurrenzexperimente mit [³H]PSB-603 gegen den A_{2B}-Antagonisten PSB-603 und den Agonisten NECA an der Rezeptormutanten A_{2B}(EL2-A_{2A}) führen zu keinen signifikanten Unterschieden der IC₅₀-Werte verglichen mit dem A_{2B}-Rezeptor Wildtyp. Sowohl die Bindung des Antagonisten PSB-603 als auch die des Agonisten NECA wird also nicht oder nur unwesentlich durch die zweite extrazelluläre Schleife des A_{2B}-Rezeptors beeinflusst. Ganz im Gegensatz dazu verhält sich der selektive A_{2B}-Rezeptor-Agonist BAY60-6583, der eine um den Faktor 8 stärkere Bindung zu der Rezeptormutante aufweist, als zum Wildtyp. Dieses Ergebnis ist beachtlich, da BAY60-6583 nicht an den A_{2A}-Rezeptor bindet und diesen auch gar nicht aktiviert. Das nicht-nukleosidische BAY60-6583 bindet somit entweder besser an bestimmte Aminosäuren der zweiten extrazellulären Schleife des A_{2A}-Rezeptors oder die zweite extrazelluläre Schleife erleichtert BAY60-6583 das Erreichen der Bindungsstelle. Möglicherweise ist die längere zweite extrazelluläre Schleife des A_{2B}-Rezeptors so kompakt gefaltet, dass BAY60-6583 durch sterische Hinderung der EL2 nur erswert die Bindungstasche erreichen kann. Gegebenenfalls könnte die zweite extrazelluläre Schleife des A_{2B}-Rezeptors auch dafür verantwortlich sein, dass eine große Anzahl an A_{2B}-Rezeptoren im inaktiven Zustand vorliegt und nur ein kleiner Teil in der für Agonisten hochaffinen Konformation, je nachdem wie die Schleife gerade ausgerichtet ist. Eventuell könnte der EL2 häufiger eine Konformation einnehmen, bei der die Rezeptoren im inaktiven Zustand vorliegen. Die Bindung des A_{2A}-Rezeptor-

Agonisten CGS-21680 ist an der A_{2B} (EL2- A_{2A})-Rezeptormutanten um den Faktor 124 höher als bei dem A_{2B} -Rezeptor. Auch dieses Ergebnis ist bedeutend, da dieser Ligand weder an den A_{2B} -Rezeptor-Wildtyp bindet, noch diesen aktiviert. Somit interagiert CGS-21680 offensichtlich mit der zweiten extrazellulären Schleife des A_{2A} -Rezeptors und dies führt zu einer Erhöhung der Affinität. Bei M2-Acetylcholin-Rezeptoren ist bekannt, dass über Bereiche nahe der allosterischen Bindungsstelle die Rezeptorbewegung und die Kopplung der G-Proteine reguliert werden kann.²⁷⁸ Eventuell ist auch bei den Adenosin-Rezeptoren durch diese Konformationsänderung und die Kontrolle der G-Proteine möglich. Die Bereiche könnten hier beispielsweise in der zweiten extrazellulären Schleife liegen, da diese besonders groß und flexibel ist. Möglicherweise bindet aber auch ein Ligand mit einem großen voluminösen Rest besser, da dieser aus der Bindungstasche herausragt und durch die Schleife des A_{2A} -Rezeptors stabilisiert wird. Die Bindung ist vermutlich im A_{2A} -Rezeptor auch wichtig, aber sicherlich nicht alleine für die starke Bindung zwischen CGS-21680 und dem A_{2A} -Rezeptor verantwortlich, da die Affinität von CGS-21680 an den A_{2A} -Rezeptor wesentlich höher ist als zur A_{2B} (EL2- A_{2A})-Mutante. Damit sind weitere Aminosäuren aus anderen Teilen des Rezeptors wichtig für diese Bindung. Alle Ergebnisse mit [³H]PSB-603 können nur in Bezug auf die Antagonist-Bindungsstelle und nicht auf die Agonist-Bindungsstelle diskutiert werden, da bislang noch kein Experiment mit einem radioaktiv markierten A_{2B} -Agonisten etabliert ist. Die Glykosylierung kann ebenfalls einen Einfluss auf die Bindung haben. Allerdings spielt dieser Effekt, wenn überhaupt, beim A_{2B} -Rezeptor nur eine untergeordnete Rolle, da bereits in der eigenen Diplomarbeit die A_{2B} -Rezeptormutante S165A generiert und untersucht wurde, bei der eine der beiden Glykosylierungsstellen des A_{2B} -Rezeptors eliminiert ist. Dennoch zeigte diese Rezeptormutante keine Änderung der Bindung oder der Funktionalität des Rezeptors. Die Ergebnisse lassen darauf schließen, dass die zweite extrazelluläre Schleife für die hA_{2A} - und hA_{2B} -Rezeptorsubtypenselektivität wichtig ist, da der EL2 sowohl einen Einfluss auf die Bindung des A_{2B} -spezifischen Liganden BAY60-6583 als auch des A_{2A} -spezifischen Agonisten CGS-21680 hat. Allerdings ist damit die Affinitätsdifferenz zwischen diesen Subtypen nicht vollkommen erklärbar. Es gibt sicherlich noch weitere Faktoren oder Aminosäuren außerhalb dieser Schleife, die zur Affinitätsdifferenz beitragen. Die Ergebnisse am A_{2A} -Rezeptor zeigen deutlich, dass alle Bindungsstudien mit [³H]PSB-603 keine genügende spezifische Bindung zum A_{2A} -Rezeptor aufweisen und nur die A_{2A} -Rezeptor-Liganden CGS-21680 und MSX-2 dort

spezifisch binden. Interessant wäre nun eine Rezeptormutante, bei der im A_{2A} -Rezeptor die zweite extrazelluläre Schleife gegen die des A_{2B} -Rezeptors ausgetauscht wird, also die Rezeptormutante $hA_{2A}(EL2-A_{2B})$. Theoretisch müsste hier ein deutlicher Verlust der Bindungsstärke von CGS-21680 verglichen mit dem Wildtyp- A_{2A} -Rezeptor zu messen sein. BAY60-6583 dürfte keine Bindung zu dieser Mutante zeigen. Interessant dürfte dann besonders das Ergebnis von MSX-2, PSB-603 und NECA sein, wobei hier eine Prognose schwierig ist. Bei diesen Experimenten kann sowohl die Agonist- als auch die Antagonist-Bindungsstelle des A_{2A} -Rezeptors noch genauer untersucht werden. Die Ergebnisse können zur Entwicklung selektiver Wirkstoffe beitragen und darüber hinaus Erkenntnisse zur Rolle des EL2 liefern.

4.1.3 Funktionelle Experimente: cAMP-Akkumulation

Die Agonisten Adenosin, NECA und BAY60-6583 zeigen keinen oder nur einen geringen Einfluss auf die EC_{50} -Werte bei der $hA_{2B}(EL2-A_{2A})$ -Rezeptormutante verglichen mit dem A_{2B} -Wildtyp. Hierbei scheint die zweite extrazelluläre Schleife in Bezug auf die Potenz der Verbindung zunächst nur eine untergeordnete Rolle zu spielen. Allerdings ist auffallend, dass bei der Rezeptormutante $hA_{2B}(EL2-A_{2A})$ im Gegensatz zu den Wildtypen hA_{2B} und hA_{2A} hochsignifikante Differenzen bei der intrinsischen Aktivität (Maximaleffekt, Efficacy) nach Stimulierung mit unterschiedlichen Agonisten beobachtet wird. Die Efficacy ist sowohl bei dem endogenen Agonisten Adenosin und dem unselektiven, nukleosidischen Agonisten NECA, als auch bei dem selektiven, nicht-nukleosidischen Agonisten BAY60-6385 und dem selektiven, nukleosidischen Agonisten CGS-21680 in der Loop-Mutante signifikant erhöht im Vergleich zum A_{2B} -Wildtyp-Rezeptor. Da sich die EC_{50} -Werte (wie oben beschrieben) bei den funktionellen Experimenten bei NECA, Adenosin und BAY-606583 bei Rezeptormutante und Wildtyp nicht signifikant unterscheiden, scheint die veränderte Rezeptorkonformation sich hauptsächlich auf den Aktivierungsmechanismus auszuwirken. Durch die ausgetauschte Schleife verändert worden. Diese Veränderung führt offensichtlich zu einer höheren Efficacy nach Stimulation mit einem Agonisten. Möglicherweise ist mit dem Austausch der zweiten extrazellulären Schleife die verknüpfte fünfte Transmembrandomäne (TM5) und die daran hängende dritte intrazelluläre Schleife (IL3) so in der Konformation verändert, dass die Aktivierung des G-Proteins durch den IL3 nach Stimulation mit einem Agonisten wesentlich erleichtert ist. Die zweite extrazelluläre Schleife des hA_{2A} -

Rezeptors spielt eine Rolle bei der Aktivierbarkeit ganz bestimmter Agonisten, wie dem spezifischen A_{2A} -Rezeptor-Agonisten CGS-21680. Dieser Agonist aktiviert nun die A_{2B} -Rezeptor-Mutante mit der zweiten extrazellulären Schleife des A_{2A} -Rezeptors. Die Rezeptormutante ist im Gegensatz zum A_{2B} -Rezeptor leicht aktivierbar, jedoch unterscheidet sich der EC_{50} -Wert noch deutlich von dem des A_{2A} -Rezeptors, zu dem die Verbindung viel affiner ist. Damit ist die zweite extrazelluläre Schleife des A_{2A} -Rezeptors nicht nur wichtig bei der Bindung des Liganden CGS-21680, sondern auch für die Aktivierbarkeit und Efficacy des Rezeptors.

Bei den cAMP-Akkumulationsexperimenten mit A_{2B} -Wildtyp-Rezeptoren mit NECA in Kombination mit CGS-21680 in verschiedenen Konzentrationen, zeigt sich kein deutlicher Unterschied, der auf die Modulation von A_{2B} -Rezeptoren durch CGS-21680 schließen lässt. Es besteht zwar ein signifikanter Unterschied bei der cAMP-Akkumulation zwischen 10 μ M und 100 μ M CGS-21680 in Kombination mit 0,1 μ M NECA, allerdings besteht diese Differenz auch in der Abwesenheit von NECA. Hierbei ist kein besonderer Einfluss von CGS-21680 auf den A_{2B} -Rezeptor festzustellen. Wird unter gleichen Bedingungen das Experiment mit 1 μ M NECA durchgeführt, dann ergibt sich eine signifikante Steigerung der cAMP-Akkumulation. Möglicherweise überführen hohe Konzentrationen von CGS-21680 den A_{2B} -Rezeptor von der inaktiven Form in die aktive Form und bewirkt dadurch eine höhere cAMP-Ausschüttung nach Agonistzugabe. Allerdings spielt dieser Effekt nur eine untergeordnete Rolle.

4.1.4 Computermodell der hA_{2B} (EL2- hA_{2A})-Rezeptor-Mutante

Die Computermodelle der hA_{2B} - und hA_{2A} -Rezeptoren, sowie der hA_{2B} (EL2- hA_{2A})-Rezeptormutante zeigen alle jeweils eine unterschiedliche Konformation der zweiten extrazellulären Schleife. Da genau dieser Bereich besonders flexibel ist, könnte der EL2 des A_{2A} -Rezeptors auch im A_{2B} -Rezeptor eine andere Konformation einnehmen als im Wildtyp. In dem Modell der Rezeptormutanten sind zwei Disulfidbrücken berechnet worden, und zwar zum einen die hochkonservierte zwischen Cys78 in TM3 und Cys167 im EL2, sowie eine weitere zwischen Cys72 (EL1) und Cys160 (EL2). Des Weiteren wurden die zwei β -Faltblatt-Strukturen im EL1 und EL2 vorhergesagt, die in den Kristallstrukturen des A_{2A} -Rezeptors gefunden wurden und durch die Disulfidbrücken stabilisiert werden. Für den A_{2B} -Rezeptor konnte experimentell nur eine essentielle Disulfidbrücke gefunden werden.⁴⁴

Aus dem Homologiemodell und der daraus resultierenden 2D-Ligand-Rezeptor-Interaktion ergibt sich, dass der voluminöse Rest in 2'-Position des Agonisten CGS-21680 sterisch aus der Bindungstasche herausragt. Wichtig für die Bindung des Liganden scheint nach den Berechnungen die Aminosäure Phe169 im EL2 des A_{2A}-Rezeptors zu sein, die mit dem Xanthingrundgerüst des Agonisten über π - π -Wechselwirkungen interagiert. Allerdings existiert im A_{2B}-Rezeptor die homologe Aminosäure Phe173. Daher dürfte diese Aminosäure keinen großen Einfluss auf die Bindung von CGS-21680 haben. Alle anderen dargestellten Bindungen dürften nur eine untergeordnete Rolle spielen, da sie auch im A_{2B}-Rezeptor vorhanden sind und dort CGS-21680 nicht binden. Dennoch könnte man die Bedeutung dieser Aminosäure überprüfen, indem CGS-21680 an der Rezeptormutante A_{2B}(EL2-A_{2A}-F169A) in Radioligand-Bindungsstudien und cAMP-Experimenten untersucht werden würde. Sollte hierbei jeweils ein signifikanter Unterschied zum Wildtyp gemessen werden, dann wäre die Bedeutung der Aminosäure bestätigt.

4.1.5 Zusammenfassende Diskussion

Das interessanteste Ergebnis aus den Radioligand-Bindungsstudien und den cAMP-Akkumulationsexperimenten ist, dass der selektive A_{2A}-Agonist CGS-21680 an die A_{2B}-Rezeptor-Mutante mit der ausgetauschten zweiten extrazellulären Schleife des A_{2A}-Rezeptors binden und diese aktivieren kann. Dies soll nach dem Computermodell an der Aminosäure Phe169 in der ausgetauschten zweiten extrazellulären Schleife des A_{2A}-Rezeptors liegen. Des Weiteren soll der große voluminöse Rest in 2'-Position von CGS-21680 aus der Bindungstasche herausragen. Die zweite extrazelluläre Schleife hat zwar keinen Einfluss auf die Bindung von PSB-603 und NECA, jedoch auf die Bindung von BAY60-6583 und CGS-21680, wobei die Bindung stärker wird. Bei der A_{2B}(EL2-A_{2A})-Rezeptormutante ist die maximale cAMP-Ausschüttung nach der Zugabe aller getesteten Agonisten Adenosin, NECA, CGS-21680 und BAY60-6583, stark erhöht verglichen mit den Wildtypen. Dies liegt offensichtlich daran, dass die zweite extrazelluläre Schleife die Rezeptor-Konformation verändert, insbesondere die fünfte Transmembrandomäne und die daran hängende dritte intrazelluläre Schleife. Dies führt möglicherweise zu einer leichteren Aktivierbarkeit, d.h. zu einem erleichtertem „Umkippen“ oder „Shiften“ in die aktive Konformation.^{36, 279} Dadurch kann das G-Protein besser bzw. leichter aktiviert werden. Des Weiteren hat der EL2 auch einen Einfluss auf die Subtypselektivität von Liganden, insbesondere für Liganden mit einem

großen Rest, welcher in die zweite extrazelluläre Schleife hineinragt, wie CGS-21680 oder PSB-603.^{36, 39, 280} Die cAMP-Akkumulationsexperimenten mit A_{2B}-Wildtyp-Rezeptoren mit NECA in Kombination mit CGS-21680 in verschiedenen Konzentrationen, zeigen keinen Einfluss CGS-21680 auf A_{2B}-Rezeptoren.

Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass die zweite extrazelluläre Schleife nicht nur einen großen Einfluss auf die Liganderkennung, sondern auch auf die Konformation und die Aktivierung des Rezeptors hat.

4.2 Homodimerisierung von humanen Adenosin-A_{2B}-Rezeptoren

4.2.1 Biolumineszenz-Resonanz-Energie-Transfer

Die BRET-Methode wird in der Wissenschaft teilweise immer noch kontrovers diskutiert, da diese Methode die Dimere nicht direkt, sondern indirekt nachweist. Bis heute ist keine Methode gefunden, die absolut eindeutig und direkt die Dimer- oder Oligomerbildung beweist. Dennoch sind BRET und auch die BN-PAGE aktuell die wissenschaftlich anerkannten Methoden zur Dimeruntersuchung.^{152, 274} Durch eine Vielzahl an verschiedenen zusätzlichen Experimenten, wie Verdrängungsexperimenten, Testung von Liganden an Dimeren oder Mutationen kann ein Dimer dennoch mit einer relativ hohen Sicherheit nachgewiesen werden. Bei der BRET-Methode stimmen in einem Punkt verschiedene Meinungen überein: Wird nach Zugabe des Substrates Coelenterazin h zu dem Enzym Renilla luciferase (Rluc) Biolumineszenz gemessen und diese auf das Fluoreszenzprotein YFP übertragen und auch dessen Emission gemessen, dann sind Rluc und YFP nicht weiter als 10 nm in der Zelle voneinander entfernt. Die kontroverse Diskussion beginnt in der hierauf basierenden Annahme, dass somit auch die Rezeptoren, die mit Rluc und YFP verbunden sind, ebenfalls maximal 10 nm voneinander entfernt liegen. Aufgrund der räumlichen Nähe der Rezeptoren in der Zelle wird nun auf Rezeptordimere oder Rezeptoroligomere geschlossen. Dies gilt auch für die Positivkontrolle bei dem publizierten und allgemein akzeptierten D₂-A_{2A}-Rezeptordimer.²⁶⁷ Bei der Negativkontrolle mit dem A_{2A}- und GABA_{B2}-Rezeptor ist das ähnlich. Hier findet allerdings kein Energietransfer statt und somit sind auch die Rezeptoren weiter als 10 nm in der Zelle voneinander entfernt. Hier ist eine Dimerisierung sehr unwahrscheinlich. Die Rluc-YFP-Fusionsproteine als Positivkontrolle und Rluc sowie YFP als einzeln exprimierte Proteine in der Zelle dienen als interner Standard für die Experimente. Insbesondere die Negativkontrolle beweist, dass keine Interaktion zwischen Rluc und YFP in der Zelle stattfindet. Durch insgesamt relativ hohe und vor allem spezifische Signale bei der BRET-Methode, sowie die signifikanten Unterschiede zwischen Positiv- und Negativkontrolle, kann die BRET-Methode trotz der genannten Nachteile, als relativ sicherer Nachweis von Dimeren herangezogen werden.

Ein Vergleich des Expressionslevels kann bei dem Rezeptor-Rluc-Fusionsprotein über die Höhe des Donorsignals ermittelt werden. Bei dem Rezeptor-YFP-Fusionsprotein erfolgt die Expressionskontrolle über die Messung der Fluoreszenz. Dabei gilt: Je höher

die Fluoreszenz, desto höher ist auch die Rezeptorexpression. Dabei ist die Bestimmung eines konkreten B_{\max} -Wertes allerdings nicht möglich, da die Biolumineszenz und die Fluoreszenz jeweils relative Einheiten besitzen. Bei den BRET-Experimenten erfolgt die Biolumineszenz- und Fluoreszenzmessung aller in der Zelle markierten Rezeptoren, das heißt, sowohl der Rezeptoren in der Zellmembran, als auch der intrazellulär lokalisierten. Somit können theoretisch auch gemeinsam internalisierte Rezeptordimere oder Dimere im Golgi oder ER detektiert werden.

Die Ergebnisse zur Untersuchung von Adenosin- A_{2B} -Homodimeren lassen deutlich auf die Dimerisierung der Rezeptoren schließen. Zunächst zeigt der Graph der A_{2B} - A_{2B} -Rezeptoren im BRET-Experiment eine Hyperbel, ähnlich der Positivkontrolle, also keine Gerade wie bei der Negativkontrolle. Des Weiteren weisen die A_{2B} -Rezeptoren einen signifikant höheren $BRET_{\max}$ -Wert und einen signifikant kleineren $BRET_{50}$ -Wert als die Positivkontrolle auf. Der hohe $BRET_{\max}$ -Wert bedeutet, dass sich zunächst Dimere gebildet haben, und da das Signal zusätzlich noch signifikant höher ist, dass es wahrscheinlich ist, dass sich Trimere oder höhere Oligomere gebildet haben (nach Mercier).⁸² Aufgrund dieser Ergebnisse erfolgten weiterführende Untersuchungen der A_{2B} -Rezeptor-Oligomerbildung mit Hilfe der Blue Native-PAGE (siehe Kapitel 2.4), die aber bisher aufgrund technischer Probleme (zu geringe Expression) nicht erfolgreich waren. Der $BRET_{50}$ -Wert bei den A_{2B} - A_{2B} -Rezeptoren ist sogar um den Faktor 10 kleiner als bei der Positivkontrolle. Dies könnte eine um den Faktor 10 höhere Affinität von A_{2B} - A_{2B} -Rezeptordimeren zueinander bedeuten, als A_{2A} zu D_2 im A_{2A} - D_2 -Heterodimer aufweisen. Die Affinität zwischen den Rezeptoren in einem Dimer ist individuell verschieden bei jedem Rezeptordimer. Dies liegt an der Anzahl und den unterschiedlichen Arten von Bindungen, die zwischen den Rezeptoren bestehen. Es gibt keine Regel, dass Homodimere grundsätzlich eine höhere Affinität zueinander aufweisen, als es bei Heterodimeren der Fall ist.^{265, 281} Die Bestimmung der Anzahl und der Art der Bindungen zwischen Dimeren muss über die Identifizierung der Interaktionsfläche geschehen. Dabei kann die Interaktionsfläche durch den Austausch einzelner Aminosäuren mit anschließender Testung auf die Affinität im BRET-Experiment erfolgen. So wie bei dem Beispiel der M198A Mutation im A_{2B} -Rezeptor, welche in Kapitel 4.2.4 diskutiert wird.

Weitere Hinweise zur Existenz von A_{2B} -Homodimeren liefern die nachfolgenden Verdrängungsexperimente, Versuche mit der Zugabe von Liganden und der Herstellung der Mutante M198A.

4.2.2 Verdrängungsexperimente

Die Ergebnisse der vorhergehenden BRET-Experimente deuten bereits auf die Existenz von A_{2B} -Homodimeren hin, aber weitere unabhängige Versuche zur Bestätigung sind unerlässlich, daher sind diese Verdrängungsexperimente wichtig. Das Ergebnis bekräftigt deutlich die Existenz von A_{2B} -Homodimeren. Das hohe BRET-Signal zwischen A_{2B} -Rluc und A_{2B} -YFP lässt bereits auf ein Dimer schließen. Sollte dieses hohe BRET-Signal dennoch von keinem A_{2B} -Dimer stammen, dann dürfte die Zugabe von unmarkiertem A_{2B} -Rezeptor auch keinen Einfluss auf den Energieübertrag haben. Das deutliche Absinken des Energieübertragungssignals (mBU) nach Zugabe von A_{2B} -Rezeptor ohne Tag ist klar erkennbar und ab einer DNA-Menge von 4,5 μ g signifikant. Dies kommt dadurch zustande, dass sich mehr A_{2B} - A_{2B} -Rluc und A_{2B} - A_{2B} -YFP zusammenlagern, die kein messbares Signal mehr übertragen können. Infolge dessen entsteht weniger A_{2B} -Rluc- A_{2B} -YFP, welches in diesem Versuch als einziges Konstrukt mittels BRET detektiert werden kann. Die eingesetzte A_{2B} -Rezeptor-DNA-Konzentration ist relativ hoch, damit eine Verdrängung nachgewiesen werden kann. Dies liegt unter anderem an zusätzlichen, nicht messbaren A_{2B} -Rluc- A_{2B} -Rluc und A_{2B} -YFP- A_{2B} -YFP Dimeren, die auch hier durch den ungetaggen A_{2B} -Rezeptor verdrängt werden. Möglich wäre auch die Entstehung von Trimeren, also dem A_{2B} -Rluc- A_{2B} -YFP- A_{2B} -Rezeptortrimer, welches ein Signal überträgt. Obwohl alle diese Konstrukte entstehen können, ist eine deutliche Verdrängung nachweisbar. Dies belegt das Vorhandensein von humanen Adenosin- A_{2B} -Rezeptorhomodimeren bzw. -Oligomeren.

4.2.3 Einfluss von Liganden auf die Homodimerisierung

Nachdem die BRET- einschließlich Verdrängungsexperimente die Existenz von Adenosin- A_{2B} -Homodimeren bestätigen, ist des Weiteren der Einfluss von potenten und selektiven A_{2B} -Liganden auf das Dimerverhalten von Interesse. In der Literatur sind bereits einige Dimere publiziert, die ligandeninduziert dissoziieren oder assoziieren.^{164, 282} Dennoch haben die am A_{2B} -Homodimer getesteten Liganden wie NECA, PSB-603 und BAY60-6583 selbst in hohen Konzentrationen keinen Einfluss auf die Bildung oder den Zerfall der Dimeren. Zunächst scheint bis zu 5 min nach der Ligandzugabe eine geringe, vermehrte Dimerbildung einzutreten, aber da dieser Effekt auch bei der Kontrolle auftritt, stellt es keine ligandenabhängige Reaktion dar, sondern möglicherweise eine Stressreaktion der Zelle. Der signifikante Unterschied nach 5-minütiger Inkubation mit Adenosin deutet auf einen kurzzeitigen Zerfall der A_{2B} - A_{2B} -Dimere hin. Hierbei wäre es möglich, dass bei hoher Konzentration an Adenosin die Rezeptoren internalisieren und sich zeitgleich räumlich voneinander trennen. Adenosin kann grundsätzlich schnell abgebaut werden und ist vielleicht nach kurzer Zeit nur noch in geringen Konzentrationen im Assay vorhanden. Durch den nun gering konzentrierten Agonisten könnte nach 5 weiteren Minuten die Bildung von Dimeren wieder gefördert werden. Möglicherweise ist der kurzzeitige signifikante Unterschied bei Adenosin auch nur eine statistische Schwankung (da nur $n=3$) und damit die Signifikanz dieser Aussage eher gering einzuschätzen. Über eine Stunde hinweg sinkt der Energietransfer, wie in allen Graphen zu erkennen ist (inkl. Kontrolle). Zum einen könnten die Zellen nach einer Stunde mehr gestresst sein, zum anderen könnte der Grund in der Inkubation mit leicht zytotoxischem DMSO (geringe Menge, 2,5%) liegen. Dadurch könnte ein Sterben von einigen Zellen bedingt sein und somit die Abnahme des mBU Signals erklärt werden. Das A_{2B} - A_{2B} Dimer scheint somit ein sehr stabiles Dimer zu sein, welches nicht durch Zugabe von Agonisten oder Antagonisten zerstört werden kann. Durch Zugabe von Liganden werden auch keine neuen Dimere gebildet. Von daher ist es sehr wahrscheinlich, dass starke Bindungen das Dimerkonstrukt zusammenhalten.

4.2.4 Einfluss der M198A-Mutation auf die Adenosin-A_{2B}-Homodimerisierung

Der A_{2B}-Rezeptor ist zu 56 % identisch mit dem A_{2A}-Rezeptor und damit gleichzeitig der am nächsten verwandte Rezeptor.²¹¹ Bereits 2004 konnte die Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Rafael Franco aus Barcelona die Bildung von A_{2A}-Homodimeren publizieren.²²⁴ Knapp ein Jahr später postulieren Thevenin et al., dass die Aminosäure M193 (zu Alanin getauscht) in der TM 5 des A_{2A}-Rezeptors besonders wichtig für die Interaktionsfläche bei der A_{2A}-Dimerisierung ist.²²³ Das in Abbildung 49 gezeigte Alignment zwischen dem A_{2A}- und dem A_{2B}-Rezeptor zeigt eindeutig, dass die Aminosäure Met193 im A_{2A}-Rezeptor homolog zu der Aminosäure M198 des A_{2B}-Rezeptors ist. Alle diese Fakten zusammen lassen nun die Hypothese zu, dass auch die Aminosäure Met198 im A_{2B}-Rezeptor eine wichtige Funktion bei der Interaktionsfläche des schon nachgewiesenen A_{2B}-Homodimers übernimmt. Das Ergebnis aus dem BRET-Experiment beweist durch den signifikant hohen BRET_{max}-Wert der A_{2B}-M198A-Rezeptoren verglichen mit der Positivkontrolle die Existenz von A_{2B}-M198A-Homodimeren. Dabei ist die Höhe des BRET_{max}-Signals bei der M198A-Mutante um das Doppelte im Vergleich zur Positivkontrolle und um die Hälfte, verglichen mit dem A_{2B}-Homodimer, gestiegen. Nach Mercier bedeutet ein starker Anstieg des BRET_{max}-Signals eine Tri-, Tetra- oder höhere Oligomerisierung der Rezeptoren.⁸² Der geringfügig höhere BRET₅₀-Wert von A_{2B}-M198A verglichen mit dem A_{2B}-Homodimer, bedeutet eine etwas geringere Affinität der Rezeptoren zueinander und damit einen geringfügigen Verlust der Bindungsstärke durch Alanin. Dies lässt auf einen allenfalls sehr schwachen Effekt der M198A-Mutation in Bezug auf die Interaktionsfläche schließen, da dieser Unterschied nicht signifikant ist. Zusammengefasst bedeutet dies nun, dass das Methionin 198 im A_{2B}-Rezeptor lediglich einen geringen Einfluss auf die Steigerung der Bindungsstärke zwischen den A_{2B}-Homodimeren aufweist, jedoch deutlich höhere Oligomerisierungsformen negativ beeinflusst. Also könnte dies wiederum bedeuten, dass M198 zu weniger Tri- und Tetrameren führt, zugunsten von mehr Dimeren, die aber dafür eine geringfügig höhere Affinität zueinander aufweisen. Dominik Thimm untersuchte die Mutante M198A im A_{2B}-Rezeptor auf Funktionalität und Bindung.²⁸³ Dabei zeigte sich in funktionellen Experimenten mit NECA eine signifikante 1,7 fache geringere Potenz verglichen mit dem Wildtyp, welche er auf eine mögliche Dimerisierung zurückführte. In den Bindungsstudien mit einem Agonist-Radioliganden konnte er allerdings keinen Unterschied finden.²⁸³ Thimms Beobachtungen können nun folgendermaßen erklärt

werden: Nach den Ergebnissen dieser Arbeit kann die Dimerisierung dieser Mutante bestätigt werden. Durch Methionin 198 dürften also geringfügig mehr Dimere statt Trimere vorliegen (vgl. mit Alanin 198) und NECA aktiviert die Dimere möglicherweise besser als die Trimere oder höheren Oligomere. Das wiederum könnte einen ersten Hinweis auf funktionsuntüchtige(re) höhere Oligomere und funktionstüchtige(re) Mono- und Dimere liefern. NECA selbst fördert oder zerstört jedoch nicht die Bildung dieser Dimere, wie im Ligandenexperiment eindeutig gezeigt werden konnte.

4.2.5 Computermodell des Adenosin-A_{2B}-Rezeptor-Homodimers

Nach der Erstellung des Computermodells des A_{2B}-Homodimers sollen entweder TM2 und TM6 oder TM7 und TM1 als Interaktionsfläche zwischen den Rezeptoren dienen (Abbildung 51). Da dies nur Berechnungen eines ersten Computermodells sind, müssen die Ergebnisse entsprechend vorsichtig betrachtet werden. Dennoch sind die genannten Interaktionsflächen durchaus möglich und sollten zukünftig durch Mutagenesestudien mit anschließenden BRET-Experimenten überprüft werden. Als besonders interessant gelten in den genannten Transmembrandomänen die aufgelisteten Aminosäuren TM1 (Leu9, Ala12, Leu13, Val16, Leu20, Ala23, Leu27), TM2 (Tyr44, Val47, Val54, Ala55, Leu58, Phe59, Phe63), TM6 (Met238, Leu245, Leu248, Ala252, Val256, Val288), TM7 (Tyr270, Met274, Leu278, Ala281, Val284, Val285, Ile288). Die meisten Aminosäuren sind lipophil (Ala, Ile, Leu, Met, Val) und befinden sich deshalb in den Transmembrandomänen. Im Falle einer tatsächlichen Interaktion über diese Aminosäuren entstehen dann schwache hydrophobe, nicht-kovalente Wechselwirkungen, also Van-der-Waals-Wechselwirkungen. Je mehr Aminosäuren beteiligt sind, desto stärker müsste die Interaktion zwischen den Rezeptoren werden. Diese Bindungen würden dafür sprechen, dass Dimere potentiell leicht in Monomere zerfallen könnten. Als weitere Kontaktregion sollte nach dem Computermodell der C-Terminus wichtig sein. Allerdings hat Sonja Hinz in Ihrer Doktorarbeit genau diesen C-Terminus mutiert und überprüft. Daraus geht eindeutig hervor, dass ein Fehlen des C-Terminus keinen Einfluss auf die Dimerbildung hat. Grundsätzlich sollten auch die intra- und extrazellulären Schleifen der Rezeptoren als mögliche Interaktionsflächen untersucht werden, da diese im A_{2B}-Rezeptor besonders flexibel sind und daher möglicherweise einen Auf- oder Abbau von Oligomeren schnell fördern könnten.

4.2.6 Zusammenfassende Diskussion

Humane Adenosin- A_{2B} -Rezeptoren bilden nach den Ergebnissen dieser Arbeit zumindest Homodimere, wenn nicht sogar Trimere oder höhere Oligomere. Dabei scheinen die A_{2B} - A_{2B} -Homodimere sehr stabile Dimere zu bilden, welche nicht durch Zugabe von Agonisten oder Antagonisten zu Monomeren zerfallen können. Die Affinität der A_{2B} -Rezeptoren in den Homodimeren ist um den Faktor fünf höher als bei den A_{2A} - A_{2B} -Heterodimeren und sogar um den Faktor 10 höher als bei den D_2 - A_{2A} -Heterodimeren. Dies könnte an der Interaktionsfläche zwischen den Rezeptoren liegen. Eine mögliche, an der Interaktionsfläche liegende Aminosäure, Methionin 198 im A_{2B} -Rezeptor, zeigt lediglich einen geringen Einfluss auf die Steigerung der Bindungsstärke zwischen den A_{2B} -Homodimeren, jedoch beeinflusst es höhere Oligomerisierungsformen negativ. Somit führt M198 zu weniger Tri- und Tetrameren, zugunsten von mehr Dimeren, die aber dafür eine geringfügig höhere Affinität zueinander aufweisen. Das erstellte Computermodell sagt TM2 und TM6 oder TM7 und TM1 des A_{2B} -Homodimers als Interaktionsfläche zwischen den Rezeptoren voraus. Dies gilt es in zukünftigen Experimenten zu bestätigen.

4.3 Heterodimerisierung von humanen Adenosin-A_{2A}- und -A_{2B}-Rezeptoren

4.3.1 Biolumineszenz-Resonanz-Energie-Transfer

Die Adenosin-A_{2A}-A_{2B}-Rezeptoren bilden nach den BRET-Ergebnissen eindeutig Heterodimere. Der hyperbelförmige Kurvenverlauf, sowie der nicht-signifikante Unterschied zwischen BRET_{max}-Werten bei den A_{2A}-A_{2B}-Rezeptoren und der Positivkontrolle, bestätigen die Bildung von Heterodimeren. Dabei kann von Dimeren ausgegangen werden und die Wahrscheinlichkeit, dass Tri- oder höhere Oligomere gebildet werden, ist aufgrund der Höhe des BRET_{max}-Wertes eher geringer. Um hier aber eine eindeutige Aussage über die Bildung von Oligomeren treffen zu können, müssen BN-PAGE-Experimente durchgeführt werden. Da der BRET₅₀-Wert bei den A_{2A}-A_{2B}-Rezeptoren nur halb so hoch ist wie bei der Positivkontrolle, erscheint die Affinität zwischen dem Adenosin-A_{2A}-A_{2B}-Heterodimer um das doppelte höher als bei dem D₂-A_{2A}-Heterodimer. Dieser Unterschied ist allerdings nicht signifikant. Vermutlich sind daher an der Interaktionsfläche der Adenosinrezeptoren mehr bzw. stärkere Kräfte beteiligt oder wegen der Länge, als bei der Positivkontrolle. Durch den gezielten Austausch von Aminosäuren können nun Untersuchungen zur Interaktionsfläche zwischen den Rezeptoren erfolgen. Dabei können die Ergebnisse des Computermodells helfen. Die folgenden Verdrängungsexperimente können die Existenz von A_{2A}-A_{2B}-Heterodimeren bekräftigen.

Sitkovsky vertritt die Hypothese, dass A_{2A}- und A_{2B}-Rezeptoren Heterodimere bilden und diese eine bessere Funktionalität aufweisen. Zusätzlich sollen die A_{2A}-Rezeptoren die Expression der A_{2B}-Rezeptoren an der Zelloberfläche hochregulieren.²²⁷ Die erste Hypothese zur Existenz von A_{2A}-A_{2B}-Heterodimeren kann durch diese Arbeit bestätigt werden. Ob die Dimere verglichen mit dem Monomeren allerdings eine bessere Funktionalität aufweisen, muss in cAMP-Experimenten nachgewiesen werden. Die dritte Hypothese von Sitovsky muss jedoch genauer hinterfragt werden, da Teng et al. in A_{2A}-Knock-Out-Mäusen eine Hochregulation der A_{2B}-Rezeptoren feststellten und somit A_{2B}-Rezeptoren in Abwesenheit von A_{2A}-Rezeptoren hochreguliert werden und nicht in deren Anwesenheit.²⁸⁴ Dies gilt es weiter zu untersuchen, da sich hieraus noch weitere Hypothesen zur Entstehung und Funktion von Mono- und Dimeren ableiten lassen.

4.3.2 Verdrängungsexperimente

Die Verdrängungsexperimente bestätigen die Existenz von Adenosin- A_{2A} - A_{2B} -Heterodimeren. Dabei ist das hohe BRET-Signal zwischen A_{2B} -Rluc und A_{2A} -YFP schon ein Zeichen für ein A_{2A} - A_{2B} -Heterodimer. Die Erhöhung von Wildtyp A_{2B} -Rezeptoren und ein sich dadurch ergebendes signifikant sinkendes BRET-Signal bestätigen diese Aussage, da die Senkung des Signals auch spezifisch ist. Ab einer DNA-Menge von 4 μ g A_{2B} -Rezeptor ist dieser Unterschied, verglichen mit dem Maximum, signifikant, und ab einer Menge von 5 μ g sogar hochsignifikant. Infolge von mehr A_{2B} - A_{2B} -Rluc- und A_{2B} - A_{2A} -YFP-Zusammenlagerungen, kann kein messbares Signal übertragen werden. Dadurch entsteht weniger A_{2B} -Rluc- A_{2A} -YFP, welches als einziges Konstrukt durch BRET detektiert werden kann. Bei den A_{2A} - A_{2B} -Heterodimeren müssen höhere Konzentrationen an unmarkiertem A_{2B} -Rezeptor als bei den A_{2B} -Homodimeren zugefügt werden, um den gleichen Effekt zu erzielen. Dies bedeutet, dass A_{2A} -Rezeptoren im A_{2A} - A_{2B} -Heterodimer sich durch A_{2B} -Rezeptoren leichter verdrängen lassen als markierte A_{2B} -Rezeptoren im A_{2B} -Homodimer. Dies liegt offensichtlich an der fünffach höheren Affinität zwischen A_{2B} - A_{2B} -Rezeptoren, wie anhand des $BRET_{50}$ -Wertes zu erkennen ist. Daher wirken an der Interaktionsfläche zwischen den A_{2B} -Homodimeren stärkere Kräfte/Bindungen als zwischen dem A_{2A} - A_{2B} -Heterodimer. Das folgende Kapitel zeigt wie stabil die Heterodimere unter dem Einfluss von verschiedenen Liganden sind.

4.3.3 Einfluss von Liganden auf die Heterodimerisierung

A_{2B} - und A_{2A} -Rezeptoren scheinen sehr stabile Dimere zu bilden, da keiner der getesteten Liganden, Agonisten oder Antagonisten, sowohl A_{2B} -, als auch A_{2A} -Liganden, auch nur ansatzweise einen Einfluss auf das BRET Signal haben. Dabei sind die Konzentrationen von Adenosin, NECA, CGS-21680, BAY60-6583 und PSB-603 sehr hoch gewählt (fast im Sättigungsbereich). Die Internalisierung der Rezeptoren könnte grundsätzlich möglich sein, allerdings ist durch die konfokale Mikroskopie sichtbar, dass der größte Teil der Rezeptoren in der Zellmembran lokalisiert ist. Das Ergebnis lässt die Vermutung zu, dass die Dimere bereits im Endoplasmatischen Retikulum gebildet und dann zur Membran transportiert werden. In der Membran ist dann offensichtlich keine Bildung von höheren Oligomeren oder ein Zerfall in Monomere durch die Liganden möglich. Dies würde auch für eine sehr starke Bindung zwischen dem Dimer sprechen. Das Absinken des BRET-Signals bei allen

Versuchsansätzen inklusive Kontrolle ist, wie bei der Diskussion der Homodimere bereits erwähnt, durch DMSO und somit ein geringes Absterben der Zellen zu erklären.

4.3.4 Konfokale Mikroskopie

Die konfokale Mikroskopie bestätigt die Expression der A_{2A}- und A_{2B}-Rezeptoren in der Zellmembran. Intrazellulär befinden sich nur wenige Rezeptoren. Die konfokale Mikroskopie zeigt eine weitestgehend gleichmäßige Verteilung der A_{2A}- und A_{2B}-Rezeptoren innerhalb der Zellmembran. Dies ist auch wichtig damit bei den BRET-Experimenten ausreichend hohe Signale detektiert werden können. Dabei wird deutlich, dass die Rezeptoren sowohl kolokalisiert sind, aber in wenigen Bereichen der Zellmembran auch entweder überwiegend A_{2A}- oder vornehmlich A_{2B}-Rezeptoren exprimiert sind. Dies ist eine Voraussetzung für die Existenz von Mono- und Dimeren.

4.3.5 Computermodell des Adenosin-A_{2A}-A_{2B}-Rezeptor Heterodimers

Die Interaktionsfläche des A_{2A}-A_{2B}-Heterodimers soll nach den Voraussagen des Computermodells durch die TM4 des A_{2B}-Rezeptors und die TM5 des A_{2A}-Rezeptors gebildet werden. Die TM5 im A_{2A}-Rezeptor ist bereits beim A_{2A}-Homodimer als Interaktionsfläche bekannt und könnte somit auch beim A_{2A}-A_{2B}-Heterodimer eine wichtige Rolle spielen. Dies ist durchaus möglich und müsste daher durch Mutagenesestudien mit anschließenden BRET-Experimenten überprüft werden. Als besonders interessant gelten in den genannten Transmembrandomänen die aufgelisteten Aminosäuren der TM4 (Val125, Val128, Phe134 und Leu142) und der TM5 (Tyr184, Ile197, Met198 und Ile201). Die überwiegend lipophilen Aminosäuren (Ile, Leu, Met, Phe, Val) könnten dabei schwache, hydrophobe Van-der-Waals-Kräfte ausbilden. Durch diese schwachen Bindungen ist die Wahrscheinlichkeit erhöht, dass die Dimere potentiell leicht in Monomere zerfallen könnten oder relativ schnell höhere Oligomere bilden könnten. Intra- und extrazellulären Schleifen der Rezeptoren können aufgrund der Flexibilität bei den Computermodellen nur schwer analysiert werden, daher ist eine Untersuchung dieser Regionen auf das Oligomerverhalten ebenfalls wichtig.

4.3.6 Zusammenfassende Diskussion

Die Adenosin- A_{2A} - und - A_{2B} -Rezeptoren bilden nach den BRET-Ergebnissen und den Verdrängungsexperimenten dieser Arbeit eindeutig Heterodimere. Trimere oder höhere Oligomere sind aufgrund der Versuche zwar möglich, aber eher unwahrscheinlich. Durch die konfokale Mikroskopie wird deutlich, dass die A_{2A} - und A_{2B} -Rezeptoren hauptsächlich in der Zellmembran kolokalisiert sind. Des Weiteren scheinen A_{2A} - A_{2B} -Heterodimere ligandenunabhängig sehr stabile Dimere zu bilden. Dabei ist die Bindung bzw. Affinität zwischen den A_{2A} - A_{2B} -Rezeptoren stärker als beim D_2 - A_{2A} -Heterodimer, aber schwächer als beim A_{2B} -Homodimer. Diese Interaktion könnte aufgrund von Wechselwirkungen der hydrophoben Aminosäuren zwischen der vierten Transmembrandomäne des A_{2B} -Rezeptors und der fünften Transmembrandomäne des A_{2A} -Rezeptors zustande kommen.

4.4 Oligomerisierung von Adenosin-Rezeptoren: Elektrophorese-Experimente

4.4.1 Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Aufgrund der SDS-PAGE kann das A_{2A} -Homodimer bestätigt werden. Das Gel zeigt bei den A_{2A} -Rezeptoren eine Bande in der Größe eines Monomers. Diese kommt dadurch zustande, dass die Rezeptor-Oligomere zunächst über das His-Tag aufgereinigt, dann durch die Denaturierung mit SDS und DTT zu Monomeren abgebaut und anschließend über den Strep-Antikörper detektiert wurden. Ein Trimer ist nach diesen Ergebnissen zwar nicht zu detektieren, aber dennoch möglich. Aber dafür scheinen die A_{2A} -Rezeptoren sehr stabile A_{2A} -Homotetramere zu bilden, die sich nicht durch SDS und DTT denaturieren lassen. Hierbei wäre es interessant zu wissen, welche Funktion diese möglichen Tetramere in der Zelle erfüllen. Zu untersuchen wäre, welche Unterschiede zwischen Mono-, Di- und Tetrameren pharmakologisch bestehen, und ob unterschiedliche Liganden nur an bestimmten Oligomeren binden oder sie aktivieren. Doch zunächst müssten weitere Studien zur Bestätigung von A_{2A} -Tetrameren folgen. Des Weiteren ist nun nach den Interaktionsflächen für Tetramere zu suchen. Es stellt sich auch die Frage der Anordnung der Tetramere, d.h. ob sie in einer Reihe nebeneinander miteinander verbunden sind, oder im Dreieck mit einem angehängten Rezeptor, oder als Viereck. Interessant wäre dann auch zu wissen, ob alle Rezeptoren in der aktiven oder inaktiven Form vorliegen und wie sie sich bei Ligandzugabe verhalten. Diese Experimente bestätigen ebenfalls die Existenz von A_{2A} - A_{2B} -Heterodimeren. Es konnten allerdings keine höheren Oligomere identifiziert werden. Dies unterstützt auch die BRET-Ergebnisse, die auf keine höheren Oligomere schließen lassen. Die Funktion und Bindung der A_{2A} - A_{2B} -Heterodimere hat Sonja Hinz in ihrer Doktorarbeit (2012) untersucht. Dabei war die Expression von A_{2B} -Rezeptoren verglichen mit A_{2A} - A_{2B} -Rezeptoren in CHO-Zellen vergleichbar hoch. Dabei ist die Bindung von NECA zum A_{2B} -Rezeptor dreifach höher als beim A_{2A} - A_{2B} -Heterodimer. Jedoch ist die Bindung von BAY60-6583 und PSB-603 an das A_{2A} - A_{2B} -Heterodimer signifikant höher als zu den A_{2B} -Rezeptoren. Die Potenz, welche Sonja Hinz in cAMP-Experimenten getestet hat, war bei den getesteten Liganden (Adenosin, NECA, BAY60-6583) bei den A_{2B} -Rezeptoren deutlich besser als bei den Heterodimeren. Alle diese Daten lassen darauf schließen, dass sich A_{2A} - A_{2B} -Heterodimere bilden, wobei sich die Bindung der Liganden zwischen Monomeren und Dimeren unterscheidet, aber die Funktionalität der

Dimere verglichen mit den Monomeren sinkt. Der Sinn könnte darin bestehen, dass bei einer bestimmten Konzentration an Adenosin zunächst die Monomere aktiviert werden und bei einer ständigen Stimulation die Rezeptoren nicht nur internalisiert werden, sondern auch Heterodimere mit A_{2A} -Rezeptoren bilden. Durch weiter steigende Konzentrationen von Adenosin in der Zelle findet nun auch die Aktivierung der Dimere statt. Diese Heterodimere weisen nun eine veränderte Pharmakologie auf und die Aktivierung verschiedene Signalkaskaden beginnen in der Zelle.

Aufgrund der geringen Expression konnte keine Identifikation von A_{2B} -Homodimeren oder A_{2B} -Oligomeren mittels SDS-PAGE stattfinden. Die Steigerung der Expression von A_{2B} -Rezeptoren ist grundsätzlich in vielen Zelllinien schwierig, besonders in *Xenopus* Oozyten. Die Oozyten sind jedoch optimal für die BN-PAGE geeignet. Die Optimierungsmöglichkeiten sind im nachfolgenden Kapitel genauer diskutiert.

4.4.2 Blaue Native-Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Mit Hilfe der BN-PAGE konnten keine GPCR-Oligomere nachgewiesen werden. Dabei ist BN-PAGE zwar für ligandgesteuerte Ionenkanäle zum Nachweis von Oligomeren längst etabliert, allerdings gelang dies noch nicht für GPCRs. Möglicherweise liegt dies an den G-Proteinen, die eine Auftrennung hierbei erschweren. Für die BN-PAGE ist vor allem eine sehr hohe Rezeptorexpression wichtig, die allerdings bei Adenosin-Rezeptoren in Oozyten nicht erreicht werden konnte. Die Optimierung der Expression der Adenosin-Rezeptoren könnte bei Oozyten durch eine chemisch induzierte Hypoxie erhöht werden, da sich auf DNA-Ebene ein "Hypoxie induzierender Faktor" (HIF-Promotor) unmittelbar vor der A_{2B} -Rezeptor-Gensequenz befindet und die Expression reguliert. Als Alternative könnte eine andere Zelllinie dienen, welche nativ kaum Adenosin-Rezeptoren exprimiert, aber diese nach der transienten Transfektion deutlich exprimiert. Bei dem Experiment besteht Optimierungsbedarf durch die Wahl und Konzentration des Detergenzes (Digitonin, Dodecylmaltosid) zum Solubilisieren und die Imidazolkonzentrationen, welche die unspezifische Bindung vermindert. Eine Optimierung der Detektion ist allerdings schwieriger. Die Detektion mittels Typhoon ist bei der BN-Page nicht möglich, da die blaue Farbe im Gel die Wellenlängen beeinflusst. Das Fazit ist also ein erhöhter Optimierungsbedarf, damit GPCRs, insbesondere Adenosin-Rezeptoren, als Oligomere eindeutig mittels BN-PAGE nachgewiesen werden können.

4.4.3 Zusammenfassende Diskussion

Fazit der Versuche zur Oligomerisierung von Adenosin-Rezeptoren ist, dass A_{2A} -Rezeptoren Homodimere und eventuell auch Homotetramere bilden können. A_{2A} - A_{2B} -Rezeptoren bilden nur Heterodimere und keine höheren Oligomere. Für den Nachweis von A_{2B} -Homooligomeren reichte die Expression der Rezeptoren in Oozyten nicht aus. BN-PAGE ist für GPCRs noch optimierungsbedürftig.

5 Zusammenfassung und Ausblick

Die Adenosin-Rezeptoren, welche zur Superfamilie der G-Protein-gekoppelten Rezeptoren (GPCR) gehören, werden in die vier Subtypen, A₁, A_{2A}, A_{2B} und A₃ unterteilt. Aufgrund der ubiquitären Expression der Adenosin-Rezeptoren und deren vielfältigen physiologischen Funktionen im menschlichen Körper, sind sie als **Targets für die pharmazeutische Wirkstoffentwicklung** besonders interessant. Der A_{2A}- und der A_{2B}-Rezeptor sind aufgrund der Homologie in der Aminosäuresequenz nahe verwandte Rezeptoren, die sich jedoch in der Affinität zum endogenen Agonisten Adenosin stark unterscheiden. Während von dem für Adenosin "hoch affinen" A_{2A}-Rezeptor bereits die Röntgenkristallstruktur publiziert wurde, ist der "niedrig affine" A_{2B}-Rezeptor der bisher am wenigsten erforschte Adenosinrezeptor-Subtyp. Weder die **Ligand-Bindungsstelle** ist genau bekannt, noch gibt es Informationen darüber, ob der Rezeptor als **Monomer, Dimer oder Oligomer** existiert. Basierend auf einem detaillierten Wissen über die Ligand-Bindungsstelle und die Interaktionen von Liganden mit dem Rezeptor könnten **neue, spezifische und hoch potente Liganden** für den Adenosin-A_{2B}-Rezeptor gezielt entwickelt werden. Diese A_{2B}-Rezeptor-Liganden könnten möglicherweise zur Behandlung von **inflammatorischen Erkrankungen, Asthma, Diabetes und Krebs** eingesetzt werden. Im Falle einer Existenz von Dimeren könnten z.B. **bivalente Liganden** synthetisiert werden, die spezifisch an Dimere binden und somit ein geringeres Potential an unerwünschten Arzneimittelwirkungen mit sich bringen. Allerdings besitzen solche Verbindungen eine hohe Molmasse, was ihre Bioverfügbarkeit einschränkt. Eine andere Möglichkeit wäre die Hemmung der Dimerisierung durch Inhibition der Protein-Interaktion. Des Weiteren ist es denkbar und sogar wahrscheinlich, dass A_{2B}-Homomere eine andere Pharmakologie besitzen als z.B. A_{2A}-A_{2B}-Heteromere, und diese Unterschiede ließen sich möglicherweise in der Arzneistoffentwicklung nutzen, um spezifischere Wirkungen zu erzielen und Nebenwirkungen zu reduzieren.

Im ersten Teil der Arbeit wurde die Rolle der **zweiten extrazellulären Schleife (EL2)** des **Adenosin-A_{2B}-Rezeptors** genauer erforscht. Diese könnte, wie bei einigen anderen GPCRs, an der Liganden-Bindung beteiligt sein. Der EL2 des A_{2B}-Rezeptors wurde mittels 'Overlap-Extension'-Methode durch den EL2 des A_{2A}-Rezeptors ersetzt. Die daraus resultierende A_{2B}(EL2-A_{2A})-Rezeptormutante wurde stabil in CHO-Zellen exprimiert und sowohl in **Radioligand-Bindungsstudien** als auch in **funktionellen cAMP-Akkumulationsexperimenten** untersucht. Die Ergebnisse der an der A_{2B}(EL2-

A_{2A})-Rezeptormutante untersuchten Agonisten (Adenosin, NECA, BAY60-6583, CGS-21680) zeigt im Vergleich zum Wildtypen **stark angestiegene Maximaleffekte (Efficacy)**. Außerdem **bindet der selektive A_{2A}-Agonist CGS-21680 an die A_{2B}(EL2-A_{2A})-Rezeptormutante und aktiviert** diese, während der A_{2B}-Rezeptor-Wildtyp nicht mit CGS-21680 interagiert. Alle Ergebnisse zusammengefasst zeigen die wichtige Rolle der zweiten extrazellulären Schleife bei der **Liganderkennung/Ligandbindung** und zusätzlich einen **starken Einfluss auf die Aktivierung** des Rezeptors. Höchstwahrscheinlich fördert oder stabilisiert der EL2 die **Konformation des Rezeptors**, bei der das G_s-Protein an den Rezeptor bindet. Außerdem scheint der EL2 auch an der **Affinitätsdifferenz** von Adenosin-Derivaten zwischen dem A_{2A}- und dem A_{2B}-Rezeptor beteiligt zu sein. In Zukunft wäre es von Interesse, zusätzlich – komplementär - die A_{2A}(EL2-A_{2B})-Rezeptormutante zu generieren und zu untersuchen. Interessant wäre hierbei insbesondere das Verhalten des selektiven A_{2A}-Agonisten CGS-21680 und des A_{2B}-Agonisten BAY60-6583. Hierbei können weitere Informationen zur Rolle des EL2 gewonnen werden.

Der zweite Teil dieser Arbeit befasst sich mit der Untersuchung der **Homodimerisierung von Adenosin-A_{2B}-Rezeptoren** mittels **Biolumineszenz-Resonanz-Energie-Transfer (BRET)**. Die Ergebnisse aus den BRET-Studien sowie **Verdrängungsexperimenten** belegen die Existenz von A_{2B}-Homodimeren. Darüber hinaus scheinen sich, betrachtet man die Signalhöhe, auch **Trimere** und/oder **höhere Oligomere** zu bilden. Die Affinität der A_{2B}-Rezeptoren zueinander ist um den Faktor 10 höher als die des D₂-A_{2A}-Heterodimers (Positivkontrolle). Die A_{2B}-Homodimere bilden **sehr stabile Dimere**, welche weder durch Zugabe von **Agonisten** noch durch **Antagonisten** zu Monomeren zerfallen. Es wird vermutet, dass die Dimere bereits im Endoplasmatischen Retikulum gebildet und dann zur Membran transportiert werden, und sich nicht Ligand-induziert in der Membran bilden. Alles deutet auf eine **starke und große Interaktionsfläche** zwischen den Rezeptoren hin. In einer früheren Arbeit wurde beim A_{2A}-Rezeptor die Aminosäure Methionin 193 als wichtig für die Protein-Protein-Interaktion postuliert. Die homologe Aminosäure im A_{2B}-Rezeptor, **Methionin 198**, zeigt jedoch lediglich einen geringen Einfluss auf die Bindungsstärke zwischen den A_{2B}-Homodimeren, jedoch beeinflusst es höhere Oligomerisierungsformen negativ, wie durch Untersuchung der Met198Ala-Mutante mittels BRET gezeigt werden konnte. Somit führt Met198 möglicherweise zu weniger Tri- bzw. Tetrameren, zugunsten von

mehr Dimeren, die aber dafür eine geringfügig höhere Affinität zwischen den Proteinen aufzuweisen scheinen. Das erstellte **Computermmodell** schlägt **TM2 und TM6 oder TM7 und TM1** des A_{2B}-Homodimers **als Interaktionsfläche** zwischen den Rezeptoren vor. Zukünftig sollte die Interaktionsfläche durch Mutagenesestudien genauer eingegrenzt werden. Entsprechende Mutanten könnten mit BRET, FRET sowie der Röntgenkristallstrukturanalyse untersucht werden. Die Frage, welches Verhältnis von A_{2B}-Monomeren zu A_{2B}-Homodimeren innerhalb der Zelle vorliegt wäre ein interessanter Forschungsgegenstand, um zu erkennen welche Form den Grundzustand darstellt. Die Signalwege müssten genau untersucht werden, da Monomere und Dimere häufig **unterschiedliche Signalkaskaden** durch verschiedene G-Proteine in der Zelle beeinflussen. Von großem Interesse ist die Frage, ob der A_{2B}-Rezeptor auch mit anderen Rezeptoren Dimere bilden kann.

Dies wurde im dritten Teil der vorliegenden Arbeit untersucht, in dem die Existenz von **A_{2A}-A_{2B}-Heterodimeren** nachgewiesen werden konnte. Sowohl **BRET-Experimente** als auch **Verdrängungsexperimente** belegen deutlich die Existenz von Adenosin-A_{2A}-A_{2B}-Heterodimeren. Aufgrund der Höhe des Signals erscheinen höhere Oligomere eher unwahrscheinlich. Die Affinität des A_{2A}-Rezeptors zum A_{2B}-Rezeptor erscheint zwar doppelt so hoch zu sein wie beim A_{2A}-D₂-Heterodimer, aber um den Faktor 5 geringer als beim A_{2B}-Homodimer. Auch das A_{2A}-A_{2B}-Heterodimer ist **sehr stabil** und ließ sich durch keinen der getesteten **Liganden** beeinflussen. Mit Hilfe der **Konfokalen Mikroskopie** konnten die Rezeptoren in der **Zellmembran lokalisiert** werden. Nach den Voraussagen des Computermodells soll die **Interaktionsfläche** des A_{2A}-A_{2B}-Heterodimers am wahrscheinlichsten durch die **TM4** des A_{2B}-Rezeptors und die **TM5** des A_{2A}-Rezeptors gebildet werden. Zukünftig könnten, neben den oben erwähnten Forschungsansätzen, die Gewebe bzw. Zelltypen (Lunge, Blutgefäße, Herz, Gehirn) in denen sowohl der A_{2A}- als auch der A_{2B}-Rezeptor gemeinsam exprimiert sind, auf Heteromere hin untersucht werden, um deren **biologische Relevanz** zu klären. Möglicherweise beeinflusst ein Rezeptor den anderen positiv oder negativ in Bezug auf die Ligandbindung und/oder die Funktionalität.

Der vierte Teil dieser Arbeit befasst sich mit der Untersuchung der **Oligomerisierung der Adenosin-Rezeptoren** in Oozyten mit Hilfe der **SDS-** und der **Blauen Native-PAGE-Methode**. Das Ergebnis zeigt, dass **A_{2A}-A_{2B}-Rezeptoren** nur Dimere und **keine**

höheren Oligomere bilden. Für den Nachweis von A_{2B} -Homooligomeren reichte die Expression der Rezeptoren in den Oozyten nicht aus. Zukünftig könnte versucht werden, entweder die Expression der A_{2B} -Rezeptoren durch Zugabe geeigneter Substanzen zu erhöhen, oder es könnte eine andere, höher exprimierende Zelllinie für die A_{2B} -Rezeptor-Expression genutzt werden. Bei den Oligomeren sollte weiter untersucht werden, wie viele G-Proteine an den Rezeptorkomplex assoziiert sind, und welche Signalwege nachfolgend aktiviert werden.

6 Experimenteller Teil

6.1 Allgemeine Angaben

6.1.1 Geräte und Materialien

Alle verwendeten Geräte und Materialien wurden in den Laboren in Deutschland (Bonn - BN, Göttingen - Gö) oder Spanien (Barcelona - BCN) verwendet.

Accu Jet	Brand
Analysenwaage	Sartorius CP225D
Analysenwaage (BCN)	Salter-AND ER-120A – 0,1 mg Salter-AND FX-200 – 1 mg Salter-AND EW-300A – 0,1 g
Autoklav	Varioklav®, Dampfsterilisator 75T, H+P 3850 ELV, Systec
Autoklav (BCN)	Autestar-G, P Selecta
Autoklavierbeutel	Sarstedt, 861200
Autoklavierbeutel	Sterilin
Bakterienschüttler	Innova 4200 Incubator shaker, New Brunswick Scientific, US
Bakterienschüttler	Minitron Infors
Bakterienkulturröhrchen	Sarstedt, 62515006
Brutschränke	Jouan IG 650, HERAcell®, Heraeus
Brutschränke (BCN)	Thermo Scientific Hepa Class 100 ENO 55 nüve incubator
Developer, Replenisher: GBX reagents (Gö)	Eastman Kodak, Rochester, New York
Dispenserspitzen	1,0 ml, 2,5 ml, 5 ml, 10 ml, Ritips professional Labomedic
Drigalski-Spatel	Roth, T724
Duranflaschen	500 ml, 250 ml, 50 ml, Roth
Einmalspritzen	20 ml, 5 ml, Braun
Einmalspritzen (BCN)	20 ml, 5 ml Penta Ferte
Elektrophoresekammer	Schütt Labortechnik
Elektrophoresenetzgerät	Power Pac 300, ELITE 300 Plus, Schütt Labortechnik
Eppendorf Tubo (BCN, BN, Gö)	Eppendorf

Falcon-Tubes	15 ml, 50 ml, Sarstedt
Falcon-Tubes (gelb) (BCN)	15 ml TPP 91015 , 50 ml TPP 91050
Fastpetten (BCN)	Labnet F
FluoStar Optima (BCN)	BMG
Freezing Container	NALGENE™ Cryo, 5100-0001
Gelfotodokumentator (BN, Gö)	Universal Hood II Geldoc, BioRad
Gelelektrophoresekammer (Gö)	Göttingen
Glasfaserfilter GF/B Glass fibre cuts	Ref. No. 10428183, Whatman
Hamiltonspritze	10 µl, Syringes 705, Roth
Harvester Brandel M24	Gaithersburs, MD, USA
Harvester Brandel M48	Gaithersburs, MD, USA
Heizblock	Thermomixer comfort, Eppendorf
Homogenisator	RW 16 basic, IKA Labortechnik
Impen Nanophotometer (Gö)	Impen
Kryovials, steril	Sarstedt, 72380
Laminar-Airflow-Werkbänke	NUNC® Save flow 1.2 NUNC® BIOFLOW
Laminar-Airflow-Werkbänke (BCN)	Bio 60 Faster
Leica TCS SPE (Leica DM 2500) (BCN)	LEICA, Confokales Mikroskop
LSC TRICARB®	2900TR, Packard/Perkin-Elmer
LSC-Meßflasche	4 ml/20 ml, Roth
Magnetrührer und Heizplatte	RCT Basic, IKA Labortechnik
Maxivials	20 ml, Roth
Mikroskop	Axiovert 25, Zeiss
Mikroskop (BCN)	Olympus
Mikroskop für Injektion von RNA (Gö)	Nikon SMZ645
Mikrotiterplatten, 24 Well	Sarstedt
Minivials	4 ml, Roth
Mikrowelle	Microwave 800, Severin
Mithras LB 940 (BCN, BN)	Berthold Technologies, BRET-Gerät
Multipette	Multipette Plus, Eppendorf
Multipette (BCN)	Finnpipette
Multiskan Ascent (BCN)	Thermo Labsystem
Mikrotiterplatten, 96-Well	(schwarz mit durchsichtigem Boden)

	Krystal Microplate Porvair Cat. No 215003, Lot No 000151
Mikrotiterplatten, 96-Well	(weiß mit weißem Boden)
	Porvair Cat. No 204003, Lot No 250473
Mikrotiterplatten, 96-Well	(durchsichtig mit durchsichtigem Boden)
	RBL Rubilabor 94759
NanoDrop	Thermo Scientific
ND-1000 Spectrophotometer (BCN)	Nano Drop
Neubauer Zählkammer	Marienfeld Germany
Nitrilhandschuhe	Universität Bonn, Abteilung 4.2
Objektträger (BCN)	Thermo Scientific
PCR	Biometra
pH-Meter	691 pH Meter, Metrohm
Photometer	DU® 530, Beckman
Pipettus Accu	Eppendorf
Pipetten	0,5-10 µl, 2-20 µl, 20-200 µl, 100-1000 µl, 1000-5000 µl, Eppendorf
Pipetten (BCN)	0,5-20 µl, 20-200 µl, 100-1000 µl Gilson
Pipettenspitzen	Sarstedt
Pipettenspitzen (BCN)	Tip One
PVDF-Membran	GE-Heathcare
Reaktionsgefäße	1,5 ml/2,0 ml Safe-Lock, Sarstedt 4,0 ml, PE-Vials, Roth
Röhrchen	15 ml/50 ml, Sarstedt
Röntgenfilme für ECL und [³⁵ S]	Kodak
Serologische Einmalpipetten	5 ml, 10 ml, 25 ml, 50 ml, steril, Sarstedt
Serologische Einmalpipetten (BCN)	5 ml, 10 ml, 25 ml, 50 ml, steril, TPP
Software	Chromas 1.45, Conor McCarthy DNAtrans 2.0, Dr. A. Schiedel/J. Bosmann EMBOSS, European Bioinformatics Institut Excel 2010, Microsoft® Isis™/Draw 2.5, MDL Information System Leica Application Suite, LAS AF (BCN) Nano Drop 3.1.0 (BCN)

	Prism® 5.0, GraphPad
	Word 2010, Microsoft®
Sterilfilter	Filtropur 0,22 µm, Sarstedt, 831826001
Sterilfilter (BCN)	Filtropur 0,2 µm, Whatman® 6780-2502
Thermocycler	Px2 Thermal Cycler, Thermo Scientific
Thermolyne (BCN)	Eurocomercial
Tischzentrifuge	Beckman Allerga® 2IR
Typhoon TRIO (Gö)	Amersham Bioscience
Ultraturrax	IKA Labortechnik T25 basic
Vortexer	MS2 Minishaker, IKA Labortechnik
Vortexer (BCN)	Heidalph
Waage	Scaltec SBC42
Wägeschalen	Roth
Wasserbad mit Schüttler	1083, GFL®
Wasserbad (BCN)	Köttermann Labortechnik
Zentrifugen	Beckman Avanti™, J-20XP
	Beckman Avanti™, J-20I
Zentrifugen (BCN)	Beckman Avanti™, J-25
	Eppendorf Cenfuge 5424
	Heraeus Instruments Megafuge 2.0 R
Zentrifugenröhrchen	Beckman, Ultra-Clear® Tubes
Zellschaber (BCN)	24 cm, TPP
Zellstoff	LAME691001, Labormedic
Zellkulturflaschen	25 cm ² , 75 cm ² , 175 cm ² , steril, Sarstedt
Zellkulturflaschen (BCN)	25 cm ² , steril, TPP 90026
Zellkulturschalen	175 cm ² , steril, Sarstedt
Zellkulturschalen (BCN)	150 x 22 mm, steril, TPP 93150
Zellkultur Testplatte 6 (BCN)	zellkulturbehandelt, TPP Switzerland 92006

6.1.2 Chemikalien

Acrylamid/bis-Acrylamid (29:1) (Gö)	BioRad
Agar	Labomedic, A0949,0500
Agarose	Roth, 2267.2
6-Aminocaprinsäure (Gö)	AppliChem
Ampicillin-Natriumsalz	AppliChem, A0839
Amoniumpersulfat (APS) (Gö)	Sigma-Aldrich, Steinheim
BAY60-6583	Firma Bayer
Benzyl-Coelenterazin h (1 mg) (BCN, BN)	PJK, aus Deutschland CAS 50909-86-9 Mw = 407,464 g/mol
Bradford Bio-Rad Protein Assay (BCN)	Bio Rad Laboratories GmbH Lot 108889
BSA/Albumin Fraktion V	AppliChem, A1391
BSA/Albumin Fraktion V (BCN)	Sigma-Aldrich Lot 029K1549
Bromphenolblau	AppliChem, 3640
Calciumchlorid Dihydrat	Fluka, 21097
cAMP	Amersham Bioscience, TRK 432
Calciumchlorid Dihydrat (BCN)	Panreac Quimica SA
Coomassie Brilliant Blau R-250 (Gö)	Serva, Heidelberg
Cy3 und Cy5-Mono-NHS-Ester (Gö)	Jackson Immunoresearch
Deep Blue C (= Coelenterazin 400a) (BCN)	Biotium, Inc Cat 10125-2, Lot 6C1003 Mw = 391,46 g/mol, 250 µg
Digitonin (Gö)	Serva, Heidelberg
Dithiothreitol (Gö)	Stratagene, Heidelberg
DMSO	AppliChem, A3608
DMSO für die Zellkultur	AppliChem, A3672
DNA Clean & Concentrator™	Zymo™
Dodecyl-β-D-maltosid (Gö)	Biomol, Hamburg
DPCPX	Sigma, C-101
EDTA	Roth, 8040.3
Ethanol p.a.	ZVE Universität Bonn, 123974
Ethidiumbromidlösung, 1%	AppliChem, A1152
Folin-Reagenz	Sigma, F-9252
Forskolin	AppliChem, A2165
G418	Merck, 345810

D-(+)-Glucose	Sigma, G-7021
D-(+)-Glucose p.a. (BCN)	Panreac Quimica SA; Mw = 180,16 g/mol
Glycin (BCN)	Panreac Quimica SA; Mw = 75,07 g/mol
Glycerin	AppliChem, A1123,1000
Hefeextrakt	AppliChem, A3732,01
HEPES	Sigma, H-3375
Hypoxanthin	AppliChem, A0700,0005
Isopropanol	ZVE Universität Bonn, 123903
Kaliumchlorid	Fluka, 60128
Kaliumchlorid(BCN)	Panreac Quimica SA
Kaliumhydrogenphosphat	Sigma, P-9791
Kaliumhydrogenphosphat (BCN)	Panreac Quimica SA
Kupfersulfat Pentahydrat	AppliChem, A1034
Ladepuffer (6 x Loading Dye Solution)	Fermentas, R0611
LB-Agar	Invitrogen, 22700-041
LB-Agar (BCN)	Panreac Quimica SA
LB-Pulvermedium	AppliChem, A0954,901
LB-Pulvermedium (BCN)	Panreac Quimica SA
Lipofectamin™ 2000 Reagent (BCN, BN)	Invitrogen, 11668019
LSC-Cocktail	Ready Save, Beckmann
Magnesiumchlorid	Sigma, M-8266
Magnesiumchlorid (BCN)	Panreac Quimica SA
Magnesiumsulfat	Sigma, M-2634
Magnesiumsulfat (BCN)	Panreac Quimica SA
Mineralöl für PCR	Labomedic, LAME110177
Mycophenolsäure	Tocris, 1505
NativeMark™ ProteinStandard (Gö)	Invitrogen, Lot 652014
Natriumacetat	AppliChem, 4555,025
Natriumacetat (BCN)	Panreac Quimica SA
Natriumbutyrat	Fluka, 19364
Di-Natriumcarbonat	AppliChem, A1881
Di-Natriumcarbonat (BCN)	Panreac Quimica SA
Natriumchlorid	Sigma, P-9541
Natriumchlorid (BCN)	Panreac Quimica SA; Mw = 58,44 g/mol

Natriumhydrogencarbonat	Sigma, S-5761
Natriumhydrogencarbonat (BCN)	Panreac Quimica SA
Di-Natriumhydrogenphosphat	AppliChem, A1646
Di-Natriumhydrogenphosphat (BCN)	Panreac Quimica SA
Natriumhydroxid	Fluka, 71689
Natriumhydroxid (BCN)	Panreac Quimica SA
Di-Natriumtartrat Dihydrat	AppliChem, 3813,025
Di-Natriumtartrat Dihydrat (BCN)	Panreac Quimica SA
NECA	Sigma, E-2387
Ni ²⁺ -NTA Agarose (Gö)	Qiagen, Hilden
n-Octyl-β-D-Glucopyranose (Gö)	Biomol, Hamburg
Pefabloc (Gö)	Göttingen
Plasmocin	Invitrogen, ant_npt
Polybren	Aldrich, 10,768-9
Polyethylenimin (PEI, hochmolekular, wasserfrei) (BCN)	Aldrich CAS 9002-98-6
PSB-603	Thomas Borrmann, AK Prof. Dr. Müller
Ro20-1724	Hoffmann La Rock
Salzsäure, 37 %	AppliChem, A0659
Sodiumdodecylsulfat SDS (Gö)	Biorad, München
Sterilium	Labormedic, E10601
TEMED N,N,N',N'-Tetramethylethyldiamin (Gö)	Merck, Darmstadt
Tetramethylrhodamin-methylester (TMRM)(Gö)	Göttingen
TRIS (TRIZMA® Base)	Roth, AE15.3
Triton X-100 (BCN, BN)	Sigma, X-100
Trypton	AppliChem, 1553,01
Xanthin	AppliChem, 6665,001

Alle nicht aufgeführten Chemikalien wurden von AppliChem, Sigma, Aldrich oder Panreac Quimica SA bezogen.

6.1.3 Kits

DNA clean and Concentrator Kit™	Zymo™
mMessage mMachine® Kit (High Yield Capped RNA Transcription Kit SP6)	Ambion
Qiagen Plasmid Mini/Midi/Maxi Kit	Qiagen
Zymoclean™ Gel DNA Recovery Kit	Zymo™
Zymo™ Plasmid Miniprep/Midiprep/Maxiprep Kit	Zymo™

6.1.4 Radioliganden

Tabelle 29 zeigt die verwendeten Radioliganden. Die Vorstufe des Radioliganden [³H]PSB-603 wurde von Dr. Thomas Borrmann synthetisiert, die Vorstufe von [³H]MSX-2 von Dr. Jörg Hockemeyer bzw. Dr. Younis Baqi. Die Tritiiierung erfolgte durch Amersham Bioscience.

Tabelle 29. Radioliganden

Radioligand	Spezifische Aktivität	Hersteller
[³ H]cAMP	23 Ci/mmol	Amersham
[³ H]CGS-21680	42,6 Ci/mmol	Amersham
[³ H]MSX-2	84 Ci/mmol	Amersham
[³ H]PSB-603	73 Ci/mmol	Amersham
L-[³⁵ S]Methionin	1000 Ci/mmol	Amersham

6.1.5 Antikörper

Antikörper Cy ³ γ mouse (BCN)	Jackson Immuno Reseach 715-166-150
Antikörper ECL mouse (Gö)	Antikörper-online GmbH, ABIN412580
Antikörper GFP (Gö)	Covance, MMS-118P
Antikörper HA (BN, Gö)	Covance, MMS-101P
Antikörper Penta His (Gö)	Quiagen, Conjugate Kit 34460
Antikörper Rluc (BCN)	Chemicon Ms X Renilla Luciferase Lot LV 1450129
Antikörper Strep (Gö)	Quiagen, Cat. no. 34850

6.1.6 Zelllinien

In dieser Arbeit kommen CHO-Zellen (Chinesische Hamster Ovarien), HEK-293T Zellen (Human Embryonic Kidney), GP⁺env AM12 Zellen (Verpackungszellen) und Oozyten vom *Xenopus laevis* zum Einsatz. Sie sind in Tabelle 30 aufgelistet.

Tabelle 30. Original und stabil transfizierte Zelllinien und deren Herkunft.

Zelllinie	Spezies	Organ	Hersteller
CHO-K1	Hamster	Ovarien	ATCC® Nummer CCL-61
CHO-hA _{2A}	Hamster	Ovarien	S. Hinz, AK Prof. Müller
CHO-HA-hA _{2B}	Hamster	Ovarien	S. Hinz, AK Prof. Müller
CHO-HA-hA _{2B} (EL2-A _{2A})	Hamster	Ovarien	B.F. Seibt, AK Prof. Müller
GP ⁺ env AM12	Maus	Embryo-Fibroblasen	AK Prof. Kolanus, Uni Bonn
HEK-293T	Mensch	Niere	AK Prof. Franco, Uni Barcelona
Oozyten	Frosch	Ovarien	AK PD. Dr. Nicke, MPI Göttingen

6.2 Puffer und Lösungen

6.2.1 Lösungen für die Molekularbiologie

a) 50 x TAE (Tris-Acetat-EDTA) Puffer für die Gelelektrophorese

Für den 50fach konzentrierten TAE-Puffer werden 2 M Tris, 50 mM EDTA und 1 M Essigsäure benötigt und mit deionisiertem Wasser aufgefüllt und der pH 8,0 eingestellt. Vor der Benutzung muss der TAE-Puffer 1:50 verdünnt werden.

b) Herstellung von SOC-Medium

2,0 g Trypton, 0,5 g Hefeextrakt, 0,05 g Natriumchlorid, 18,6 mg Kaliumchlorid und 0,5 ml einer 2 M Magnesiumchloridlösung werden gemischt und bis auf 100 ml mit deionisiertem Wasser aufgefüllt. Das Medium wird durch das Autoklavieren sterilisiert. Nach der Zugabe von 2 ml sterilfiltrierter 1 M Glukoselösung wird das SOC-Medium bei -20°C gelagert.

c) Herstellung von LB-Medium

25 g LB-Medium (bestehend aus Trypton, Hefeextrakt und Natriumchlorid) werden nach Herstellerangaben in 1,0 l deionisiertem Wasser gelöst. Anschließend wird die Lösung autoklaviert und bei 4 °C gelagert. Die Herstellung von LB-Ampicillin-Medium erfolgt analog. Zusätzlich wird dem Medium 100 µl Ampicillin pro ml zugesetzt. Für LB-Kanamycin-Medium wird eine Konzentration von 50 µl/ml und für LB-Zeocin eine Konzentration von 25 µl/ml eingestellt.

d) Herstellung von LB-Agar-Platten

In 1,0 l deionisiertem Wasser werden 32 g LB-Agar gemäß Herstellerangaben gelöst und autoklaviert. Nach dem Abkühlen auf 50 °C erfolgt die Zugabe des Antibiotikums. Wegen der thermischen Instabilität des Antibiotikums sollte es nicht bei höheren Temperaturen zugegeben werden. Es werden direkt je 20 ml des LB-Agars in Petrischalen mit 10 cm Durchmesser gegossen. Die Agarplatten werden nach dem Erstarren bei 4 °C gelagert.

6.2.2 Lösungen für die Zellkultur

a) G418-Lösung (50 mg/ml)

Um 80 ml G418-Lösung herzustellen, wird eine dem Wirkstoffgehalt des G418-Pulvers entsprechende Menge der Substanz eingewogen, in deionisiertem Wasser gelöst, die Lösung sterilfiltriert, aliquotiert und bei -20 °C gelagert.

b) Hypoxanthinlösung (10 mg/ml)

100 mg Hypoxanthin werden mit 8 ml Wasser versetzt und bis zur vollständigen Lösung der Substanz mit 1 N NaOH-Lösung zugetropft. Anschließend wird ad 10 ml mit Wasser aufgefüllt, sterilfiltriert und bei -20 °C gelagert.

c) Mycophenolsäurelösung (10 mg/ml)

100 mg Mycophenolsäure werden mit 8 ml Wasser versetzt. Bis zur vollständigen Lösung der Substanz wird 1 N NaOH-Lösung zugetropft. Anschließend wird ad 10 ml mit Wasser aufgefüllt, sterilfiltriert und bei -20 °C gelagert. Da die Mycophenolsäurelösung lichtempfindlich ist, wird das entsprechende Gefäß mit Aluminiumfolie ummantelt.

d) Natriumbutyratlösung (500 mM)

Zur Herstellung von 1 ml Natriumbutyratlösung werden 55,05 mg Natriumbutyrat in dem genannten Volumen deionisierten Wassers gelöst. Die sterilfiltrierte Lösung wird bei 4°C gelagert.

e) 1x PBS-Puffer

Für einen Liter 1x PBS-Puffer werden 8,0 g NaCl (150 mM), 0,2 g KCl (2,5 mM), 1,3 g Na₂HPO₄ (7,5 mM) und 0,2 g KH₂PO₄ (1,5 mM) in 1 l deionisiertem Wasser gelöst. Der pH wird auf 7,4 eingestellt. Anschließend wird der Puffer sterilisiert und bei Raumtemperatur gelagert. Für 10x PBS-Puffer wird die 10fache Menge der Salze eingewogen und auf einen Liter mit deionisiertem Wasser aufgefüllt. Die weitere Aufbereitung ist analog zum 1x PBS-Puffer.

f) Trypsin/EDTA-Lösung

0,6 ml einer 0,5 M EDTA-Stammlösung (0,6 mM) werden mit 500 ml 1x PBS aufgefüllt und autoklaviert. Nach dem Abkühlen werden unter der Sterilbank 10 ml steriles Trypsin (2,5 %) und 1,5 ml steriles Phenolrot (0,5 %) dazu gegeben. Die Lösung wird in 100 ml Portionen aliquotiert und bis zur Verwendung bei 4°C gelagert.

Xanthinlösung (10 mg/ml)

Um 50 ml Lösung herzustellen, werden 500 mg Xanthin in 40 ml Wasser gegeben. Es wird tropfenweise 1 N Natronlauge zugegeben, bis die Substanz gelöst ist. Die Lösung wird mit Wasser ad 50 ml aufgefüllt, sterilfiltriert und bei -20°C gelagert.⁸

6.2.3 Lösungen für die Membranpräparation**5 mM Tris/2 mM EDTA-Puffer für die Membranpräparationen**

0,303 g TRIZMA® Base (5 mM) und 0,372 g EDTA (2 mM) werden in 500 ml deionisiertem Wasser gelöst. Mit konzentrierter Salzsäure wird der pH-Wert auf 7,4 eingestellt, der dann bei 4 °C gelagert wird.

6.2.4 Lösungen für die Proteinbestimmung**a) nach Lowry:****Reagenz A**

10 g di-Natriumcarbonat (2 %) werden mit 0,1 N Natronlauge auf 500 ml aufgefüllt und gelöst.

Reagenz B

Für Reagenz B werden 0,25 g Kupfersulfat Pentahydrat (0,5 %) in 20 ml Wasser gelöst. In weiteren 20 ml Wasser werden 0,5 g di-Natriumtartrat Dihydrat (1 %) gelöst. Anschließend werden die Lösungen vereinigt und mit Wasser auf 50 ml aufgefüllt.

Reagenz C

Kurz vor Bedarf wird Reagenz C frisch aus Reagenz A und Reagenz B im Verhältnis von 50:1 hergestellt.

Reagenz D

Zur Herstellung von Reagenz D werden 18 ml Folin-Reagenz auf 90 ml mit deionisiertem Wasser aufgefüllt. Die Lösung wird lichtgeschützt aufbewahrt.⁸

b) nach *Bradford*

1 Teil Bradford (original) + 4 Teile H₂O (dest.)

Gut mischen, filtrieren und im Kühlschrank lichtgeschützt lagern.

6.2.5 Puffer für Radioligand-Bindungsstudien

a) 50 mM Tris-Puffer

30,25 g TRIZMA® Base (50 mM) werden in 5,0 l deionisiertem Wasser gelöst. Mit konzentrierter Salzsäure wird der pH-Wert des Puffers auf 7,4 eingestellt, der dann bei 4 °C gelagert wird.

b) Waschpuffer für humane Adenosin-A_{2A}-Rezeptor-Bindungsstudien

6,05 g TRIZMA® Base (50 mM) werden in 1,0 l deionisiertem Wasser gelöst und der pH-Wert auf 7,4 eingestellt. Es folgt die Lagerung bei 4°C.

c) Waschpuffer für humane Adenosin-A_{2B}-Rezeptor-Bindungsstudien

6,05 g TRIZMA® Base (50 mM) und 1 g BSA (0,1 %) werden in 1,0 l deionisiertem Wasser gelöst. Mit konzentrierter Salzsäure wird der pH-Wert auf 7,4 eingestellt. Es folgt die Lagerung bei 4°C.⁸

6.2.6 Puffer für funktionelle cAMP-Experimente

a) HBSS-Puffer

Für einen Liter HBSS-Puffer:

8 g	NaCl	13 mM
4,77 g	HEPES	20 mM
1 g	Glukose	5,5 mM
0,4 g	KCl	5,4 mM
0,35 g	NaHCO ₃	4,2 mM
0,185 g	CaCl ₂ x 2 H ₂ O	1,25 mM
0,1 g	MgSO ₄	0,8 mM
0,1 g	MgCl ₂	1 mM
0,06 g	KHPO ₄	0,44 mM
0,048 g	Na ₂ HPO ₄	0,34 mM

ad 1 l deionisiertes, autoklaviertes Wasser

Der pH-Wert wird auf 7,3 eingestellt und die Lagerung erfolgt bis zur Verwendung bei 4 °C.

b) Lysepuffer für funktionelle cAMP-Experimente

1,48 g EDTA (4 mM) werden zusammen mit 100 µl Triton X-100 (0,01 %) in 1,0 l deionisiertem, autoklaviertem Wasser gelöst. Es folgt die Einstellung des pH-Wertes auf 7,3. Der Lysepuffer wird bei 4°C gelagert.⁸

6.2.7 Puffer für Biolumineszenz-Resonanz-Energie-Transfer-Experimente

HBSS-Puffer

Der HBSS-Puffer wird exakt so hergestellt, wie in Kapitel 6.2.6 beschrieben.

Kurz vor der Benutzung des Puffers werden 0,1 % Glucose zugefügt:

100 ml HBSS-Puffer + 0,100 g Glucose

6.2.8 Puffer und Lösungen für die Immunzytochemie

a) PBS 10 x für die Immunzytochemie (2 l H₂O)

4 g KH₂PO₄

57,8 g Na₂HPO₄ · 2 H₂O

160 g NaCl

4 g KCl

pH auf 7,2 einstellen

b) PBS 1 x für die Immunzytochemie

1 Teil PBS 10 x

9 Teile H₂O

c) PBS/Glycin 20 mM für die Immunzytochemie

100 ml PBS 1 x

0,15 g Glycin (Feststoff)

d) PBS/Glycin 20 mM/Triton X-100 0,05 % für die Immunzytochemie

100 ml PBS 1 x

0,15 g Glycin

50 µl Triton X-100

e) PBS/Glycin 20 mM/BSA 1% für die Immunzytochemie

200 ml PBS 1 x

0,3 g Glycin

2 g BSA

f) Paraformaldehyd 4 % für die Immunzytochemie

2,5 ml PBS 10 x

10 ml Paraformaldehyd 10 %

12,5 ml H₂O

g) Erster Antikörper Rluc Chemicon gegen Rluc für die Immunzytochemie

1 : 100 verdünnen

10 µl Antikörper Rluc Chemicon

990 µl PBS/Glycin/BSA

→ auf Eis und lichtgeschützt lagern

h) zweiter Antikörper Cy³γ mouse gegen ersten Antikörper für Immunzytochemie

1 : 200 verdünnen

5 µl Antikörper Rluc Chemicon

995 µl PBS/Glycin/BSA

6.2.9 Puffer und Lösungen für die Oozyten**a) Betäubungsmittel für *Xenopus laevis* (Tricain)**

1,25 g Tricain (=Ethyl-3-Aminobenzoat-Methansulfonsäure)

50 ml NaHCO₃ 0,5 Mad 1 l H₂O**b) Barth-Medium ohne Calcium**

5,143 g NaCl 88 mM

1 ml KCl 1 mM

0,202 g NaHCO₃ 2,4 mM0,202 g MgSO₄ 0,82 mM

1,182 g Tris HCl 7,5 mM

ad 1 l H₂O mit NaOH auf pH7,4 einstellen**c) Barth-Medium mit Calcium**

5,143 g NaCl 88 mM

1 ml KCl 1 mM

0,202 g NaHCO₃ 2,4 mM0,202 g MgSO₄ 0,82 mM0,078 g Ca(NO₃)₂ 0,33 mM410 µl CaCl₂ 0,41 mM

1,182 g Tris HCl 7,5 mM

ad 1 l H₂O mit NaOH auf pH7,4 einstellen

d) ND-96 Medium 10x für *Xenopus laevis* Oozyten

112,2 g NaCl
2,98 g KCl
4,07 g MgCl₂
2,22 g CaCl₂/2,94 g CaCl₂ x 2H₂O
23,8 g Hepes
ad 2 l H₂O auf pH 7,4 einstellen

+ 1 ml Penicillin/Streptomycin

+ 1 ml Cefuroxim

auf 100 ml Medium

oder 1 ml Gentamycin

auf 100 ml Medium

e) 0,1 M Phosphatpuffer pH 8

46,6 ml 1M Na₂HPO₄ (93,2 mM)

3,4 ml 1M NaH₂PO₄ (6,8 mM)

500 ml H₂O

f) Homogenisierungspuffer

10 ml Phosphatpuffer

10 µl Pefabloc 1000x Stock

1 Tablette Pefabloc (Proteaseinhibitor, verhindert den Abbau der Proteine)

0,5% Dodecyl-β-maltosid (DM) (50 mg) **oder**

0,5% Digitonin (Solubilisiert die Rezeptoren aus der Membran)

g) Waschpuffer

1 Teil Homogenisierungspuffer

4 Teile Phosphatpuffer inkl. Dodecyl-β-maltosid oder Digitonin

30 mM Imidazol

h) Elutionspuffer

20 mM Tris/HCl pH 7,4

100 mM Imidazol

10 mM EDTA

6.2.10 Puffer und Lösungen für Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese

a) Laufpuffer für SDS

20 ml SDS-Buffer 10x

180 ml H₂O

b) 5x SDS-Sample Buffer (SaBu)

0,3 mM Tris-HCl, pH 6,8

5 % SDS

50 % Glycerol

1 % Bromphenolblau

100 mM DTT (Dithiothreitol)

6.2.11 Puffer und Lösungen für die Blaue Native Polyacrylamid-Gelelektrophorese

a) Kathodenpuffer für BN-PAGE

8,96 g Tricine 50 mM

3,14 g Bistris 15 mM

ad 1 l H₂O pH 7,0 (autoklavieren)

vor Gebrauch 0,005% (w/v) Serva Blue G zugeben

b) Anodenpuffer für BN-PAGE (unten)

10,46 g Bistris 50 mM

ad 1 l H₂O pH 7,0 (autoklavieren)

c) Schägger-Puffer

4,62 g 6-Aminocapronsäure 750 mM

0,523 g Bistris 50 mM

ad 50 ml H₂O pH 7,0 steril filtrieren

d) 5x BN-Sample-Buffer

5 % Coomassie-Brillant-Blau G-250 (w/v)

20 µl 6-Aminocapronsäure 500 mM

100 µl Glycerol 50%

6.2.12 Puffer und Lösungen für den Western Blot

a) Phosphatpuffer 0,1 M pH 8

46,6 ml $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times 2 \text{H}_2\text{O}$ 1M

3,4 ml NaH_2PO_4 1M

ad 500 ml H_2O pH 8 einstellen

b) Blot-Puffer

14,4 g Glycin

3,0 g Tris

800 ml H_2O

Kurz vorher 20 % MeOH zugeben

c) Milchlösung

10 ml TBS 10x

5 ml Goat Serum

5 g Instant-Magermilch

100 μl Tween

ad 100 ml H_2O

6.3 Molekularbiologische Experimente

6.3.1 Vektorkarten

In Abbildung 59 sind alle verwendeten Vektoren dargestellt.

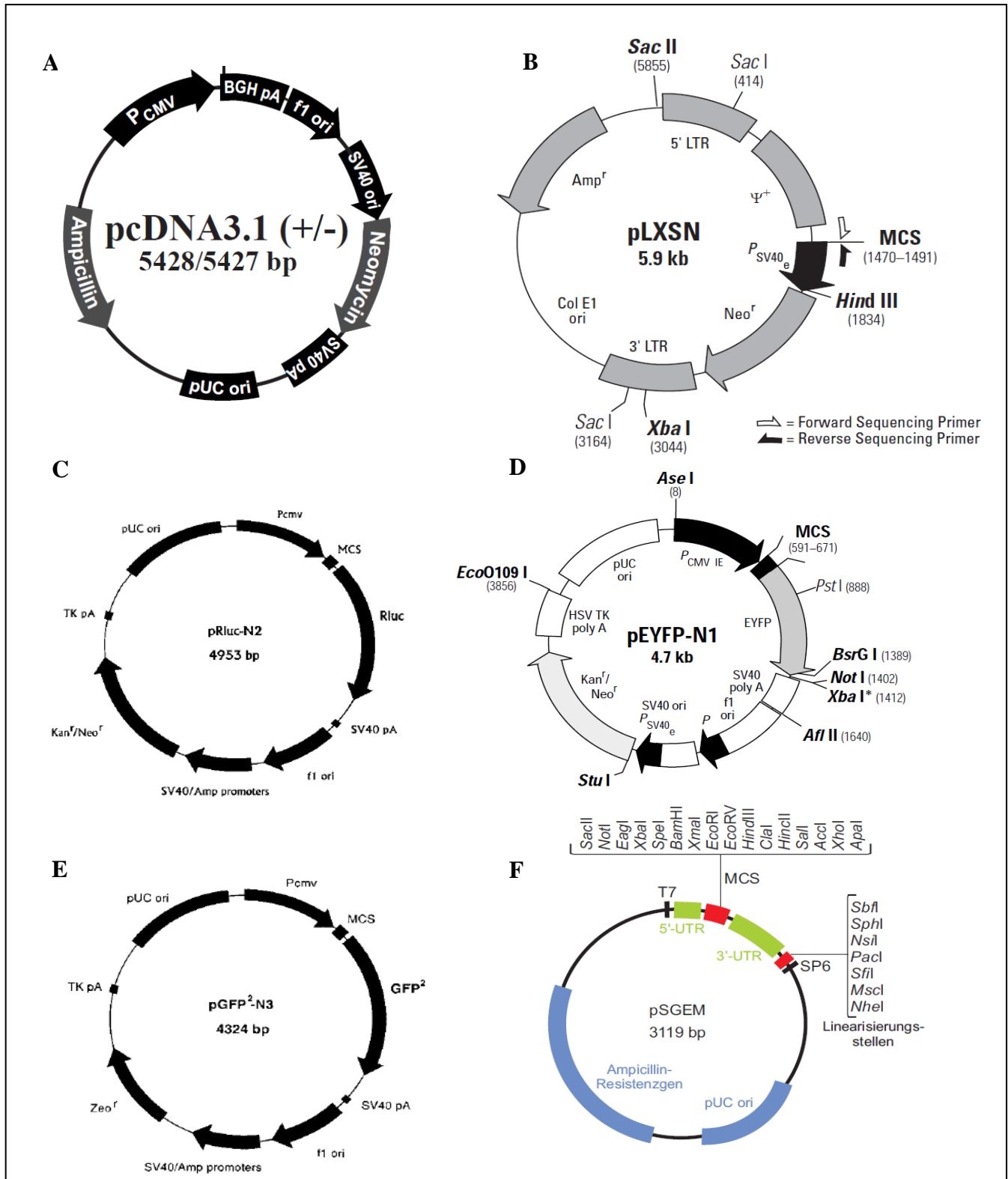


Abbildung 59. Vektorkarten von (A) pcDNA3.1(+)²⁸⁵, (B) pLXSN²⁸⁶, (C) pRluc-N2²⁸⁷, (D) pEYFP-N1²⁸⁶, (E) pGFP²-N3²⁸⁷ und (F) psGem²⁸⁸.

6.3.2 cDNA

Nachfolgend in Tabelle 31 sind die verwendeten cDNA-Konstrukte, die entsprechenden Vektoren, die Resistenzgene für Pro- und Eukaryoten und die Primer aufgelistet. Die mit einem Sternchen* gekennzeichneten Konstrukte stammen aus dem Arbeitskreis von Herrn Prof. Dr. Rafael Franco von der Universität Barcelona, Spanien.

Tabelle 31. cDNA

cDNA	Vektor	Resistenz Prokaryoten (Bakterien)	Primer
A _{2A}	pcDNA3.1	Ampicillin	pcDNA 3.1 - FP T6
A _{2A} pLXSN	pLXSN	Ampicillin	T7
A _{2A} Rluc	pRluc-N2	Kanamycin	M13 - FP
A _{2A} YFP	pEYFP-N1	Kanamycin	CMV - F
A _{2A} GFP ²	pGFP ² -N3	Zeocin	CMV - F
A _{2A} His	psGem	Ampicillin	T7, SP6
A _{2A} Strep	psGem	Ampicillin	T7, SP6
A _{2A} YFP psGem	psGem	Ampicillin	T7, SP6
A _{2B}	pcDNA3.1	Ampicillin	pcDNA 3.1 - FP
A _{2B} pLXSN	pLXSN	Ampicillin	T7
A _{2B} (EL2-A _{2A})	pLXSN	Ampicillin	T7
A _{2B} Rluc	pRluc-N2	Kanamycin	M13 - FP
A _{2B} pEYFP	pEYFP-N1	Kanamycin	CMV - F
A _{2B} M198A Rluc	pRluc-N2	Kanamycin	M13 - FP
A _{2B} M198A pEYFP	pEYFP-N1	Kanamycin	CMV - F
A _{2B} pGFP ²	pGFP ² -N3	Zeocin	CMV - F
A _{2B} His	psGem	Ampicillin	T7, SP6
A _{2B} Strep	psGem	Ampicillin	T7, SP6
D ₂ Rluc*	pRluc-N2	Kanamycin	M13 - FP
D ₂ pEYFP	pEYFP-N1	Kanamycin	CMV - F
D ₂ pGFP ² *	pGFP ² -N3	Zeocin	CMV - F
GABA _{B2}	pEYFP-N1	Ampicillin	T6 (f) und SP5 (r)
GABA _{B2} His	psGem	Ampicillin	T7, SP6
GABA _{B2} Strep	psGem	Ampicillin	T7, SP6
pcDNA 3.1 (+)	pcDNA 3.1 (+)	Ampicillin	pcDNA 3.1 - FP
Rluc*	pRluc-N2	Kanamycin	M13 - FP
YFP*	pEYFP-N1	Kanamycin	CMV - F
GFP ² *	pGFP ² -N3	Zeocin	CMV - F
YFP+GFP*	pEYFP-N1	Kanamycin	CMV - F
Rluc+GFP+YFP*	pcDNA 3.1	Ampicillin	T6 (f) und SP5 (r)
5HT 2B+YFP*	pEYFP-N1	Kanamycin	CMV - F
YFP-Rluc	pRluc-N2	Kanamycin	M13 - FP

6.3.3 Primer

a) hA_{2B}(EL2-A_{2A})

Für den Austausch der zweiten extrazellulären Schleife des humanen A_{2B}-Rezeptors gegen die des humanen A_{2A} Rezeptors wurden die in Tabelle 32 aufgelisteten Primer benutzt.

Tabelle 32. Primer für die Klonierung von hA_{2B}(EL2-A_{2A}). Schwarze Buchstaben stehen für Basen, die sich das ursprüngliche Konstrukt anlagern. Farbig markierte Basen weisen auf die Sequenz hin, die für den EL2 codieren. Gleiche Farben bei unterschiedlichen Primern bedeuten Überlappungen. Türkis gekennzeichnete Buchstaben entsprechen der Überlappung für ‚overlap extension‘.

Eppendorf	Runde	Name	Primer
I	1.	EL2-1	r-5'- CTTTGGCTGACCGCAGTTGTTCCACCCAGGAATGGAG -3'
		MluI	f-5'- CGAGACGACGCGTTGATGCTGCTGGAGACACAGGAC -3'
	2.	EL2-2	r-5'- GAGTGGTTCTTGCCCTCCTTTGGCTGACCGCAGTTGTC -3'
		MluI	f-5'- CGAGACGACGCGTTGATGCTGCTGGAGACACAGGAC -3'
	3.	EL2-3	r-5'- CTCCCCGCAGCCCTGGGAGTGGTTCTTGCCCTCCTTTG -3'
		MluI	f-5'- CGAGACGACGCGTTGATGCTGCTGGAGACACAGGAC -3'
II	1.	EL2-1	f-5'- CTGTCTCTTTGAGGATGTGGTCCCATGAGCTACATG -3'
		BamHI	r-5'- CTTACTAGGATCCTCATAGGCCACACCGAG -3'
	2.	EL2-2	f-5'- GGAGGGCCAAGTGGCTGTCTCTTTGAGGATGTGGTCC -3'
		BamHI	r-5'- CTTACTAGGATCCTCATAGGCCACACCGAG -3'
	3.	EL2-3	f-5'- CCAGGGCTGCGGGGAGGGCCAAGTGGCCTG -3'
		BamHI	r-5'- CTTACTAGGATCCTCATAGGCCACACCGAG -3'
	4.	EL2-4	f-5'- GCAAGAACCCTCCAGGGCTGCGGGGAGG -3'
		BamHI	r-5'- CTTACTAGGATCCTCATAGGCCACACCGAG -3'
I + II	5.	MluI	f-5'- CGAGACGACGCGTTGATGCTGCTGGAGACACAGGAC -3'
		BamHI	r-5'- CTTACTAGGATCCTCATAGGCCACACCGAG -3'

b) Rluc, eYFP und GFP²

Ein Teil der in Tabelle 31 aufgelisteten Rluc, eYFP und GFP² Konstrukte wurde freundlicherweise aus dem Arbeitskreis Prof. Dr. Rafael Franco aus Barcelona/Pamplona zur Verfügung gestellt und dienten teilweise als Ausgangskonstrukt für die Klonierung mit den in Tabelle 33 benutzten Primer. Die Klonierungen von A_{2B}-Rluc, A_{2B}-YFP, A_{2B}-GFP², A_{2A}-YFP, A_{2A}-GFP² und GABA_{B2}-YFP wurden freundlicherweise von Sonja Hinz durchgeführt.

Tabelle 33. Primer für Rluc, eYFP und GFP² Konstrukte.

Ziel	Name	Primer
hA _{2B} Rluc	f-hA _{2B} -EcoRI	5'- GAGACGGAATTCATGCTGCTGGAGACACAGGAC -3'
	r-hA _{2B} -BamHI ohne Stopp	5'- CTTACTAGGATCCGCTAGGCCACACCGAGAGC AG -3'
hA _{2B} YFP	f-hA _{2B} -EcoRI	5'- GAGACGGAATTCATGCTGCTGGAGACACAGGAC -3'
	r-hA _{2B} -BamHI ohne Stopp	5'- CTTACTAGGATCCGCTAGGCCACACCGAGAGC AG -3'
hA _{2B} GFP ²	f-hA _{2B} -EcoRI	5'- GAGACGGAATTCATGCTGCTGGAGACACAGGAC -3'
	r-hA _{2B} -AgeI ohne Stopp	5'- CTTACTAACCGGTGCTAGGCCACACCGAGAGC AG -3'
hA _{2A} Rluc	f-hA _{2A} -EcoRI	5'- GAGACGGAATTCATGCCATCATGGGCTCCTCG -3'
	r-hA _{2A} -BamHI ohne Stopp	5'- CTTACTAGGATCCGTGGACTCCTGCTCCATCC -3'
hA _{2A} YFP	f-hA _{2A} -EcoRI	5'- GAGACGGAATTCATGCCATCATGGGCTCCTCG -3'
	r-hA _{2A} -BamHI ohne Stopp	5'- CTTACTAGGATCCGTGGACTCCTGCTCCATCC -3'
hA _{2A} GFP ²	f-hA _{2A} -EcoRI	5'- GAGACGGAATTCATGCCATCATGGGCTCCTCG -3'
	r-hA _{2A} -AgeI ohne Stopp	5'- CTTACTAACCGGTGCGGACTCCTGCTCCATCC TG -3'
D ₂ YFP	f-D ₂ -NotI	5'- GTGACAGCGGCCGCATGGATCCACTGAATCTGT CCTG -3'
	r-D ₂ -AgeI ohne Stopp	5'- CTTACTAACCGGTGCGCAGTGGAGGATCTTCAG GAAG -3'
GABA _{B2} YFP	f-GABA _{B2} R-NotI	5'- GTGACAGCGGCCGCATGGCTTCCCCGCGGAGCT C -3'
	r-GABA _{B2} R-AgeI ohne Stopp	5'- CTTACTAACCGGTCAGGCCCGAGACCATGACTC -3'
Rluc- YFP	f-YFP-EcoRI	5'- GAGACTGAATTCATGGTGAGCAAGGGCGAGGA G -3'
	r-YFP-BamHI ohne Stopp	5'- CTTACTAGGATCCGTCTTGTACAGCTCGTCCATG CC -3'
hA _{2B} M198A	f-hA _{2B} -M198A	5'- CCCCCACTGCTTATAGCGCTGGTGATCTACATTA AG -3'
	r-hA _{2B} -M198A	5'- CTTAATGTAGATCACCAGCGCTATAAGCAGTGG GGG -3'

c) psGEM

Für die Klonierung von psGEM-A_{2B}-His, psGEM-A_{2B}-Strep, psGEM-A_{2A}-His, psGEM-A_{2A}-Strep, psGEM-A_{2A}-eYFP, psGEM-GABA_{B2}-His und psGEM-GABA_{B2}-Strep wurden die Primer aus Tabelle 34 benutzt. Das His-Konstrukt besteht aus 7 Histidinen (HHHHHHH) mit einem vorgeschalteten GG-Linker und das Strep-Konstrukt aus den acht Aminosäuren WSHPQFEK mit einem vorgeschalteten SA-Linker.

Tabelle 34. Primer für die Klonierung von psGEM-Konstrukten.

Ziel	Name	Primer
hA _{2B}	f-BamHI-hA _{2B}	5'- GGTGCAGGATCCATGCTGCTGGAGACACAGGAC -3'
	r-EcoRI-hA _{2B} -ohne Stopp	5'- TGCACCGAATTCTAGGCCACACCGAGAGCAG -3'
hA _{2A}	f-BamHI-hA _{2A}	5'- GGTGCAGGATCCATGCCATCATGGGCTCCTC -3'
	r-EcoRI-hA _{2A} -ohne Stopp	5'- TGCACCGAATTCGGACACTCCTGCTCCATCC -3'
Strep	f-EcoRI-SA-Strep-Stopp-HindIII	5'- AATTCTCTGCCTGGTCGCACCCGCAGTTCGAGA AGTGAA -3'
	r-EcoRI-SA-Strep-Stopp-HindIII	5'- AGCTTTCAC TTCTCGAACTGCGGGTGCGACCAAG GCAGAG -3'
His	f-EcoRI-GG-His-Stopp-HindIII	5'- AATTCGGAGGTCATCATCACCATCACCACCATT GAA -3'
	r-EcoRI-GG-His-Stopp-HindIII	5'- AGCTTTCAAATGGTGGTGATGGTGATGATGGGCA GAG -3'
GABA _{B2}	f-GABA _{B2} -NotI	5'- GTGACAGCGGCCGCATGGCTTCCCCGCGGAGCT C -3'
	r-GABA _{B2} -EcoRI	5'- CTTACTAGAATTCCAGGCCCGAGACCATGACTC -3'

6.3.4 Sequenzierungsprimer

Die folgenden Sequenzierungsprimer werden für die unterschiedlichen Plasmide benutzt:

für pcDNA 3.1:

f-pcDNA 3.1 5'-CTCTGGCTAACTAGAGAAC-3'

r-pcDNA 3.1 5'-CAAACAACAGATGGCTGGC-3'

für Rluc:

f-M13 5'-TGTAACGACGGCCAGT-3'

r-M13 5'-CAGGAAACAGCTATGACC-3'

für pLXSN:

f-S1 5'-CCCTTGAACCTCCTCGTTCGACC-3'

r-S5 5'-CCACACCTGGTTGCTGACTA-3'

für YFP und GFP²:

f-CMV 5'-CGCAAATGGGCGGTAGGCGTG-3'

für psGem:

f-T7 5'-TAATACGACTCACTATAGGG-3'

r-SP6 5'-ATTTAGGTGACACTATAGAA-3'

für A_{2B}-Mitte:

f- A_{2B}-Mitte 5'-GCTACACTTTTCACAAAATTATCT-3'

für A_{2A}-Mitte:

f- A_{2A}-Mitte 5'-CCTTTCAAGGCAGCTGGCAC- 3'

6.3.5 Enzyme

Tabelle 35 zeigt alle verwendeten Restriktionsenzyme sowie deren 10x konzentrierten Puffer bzw. 100x konzentriertes BSA, welches von den Firmen mitgeliefert wurde. Die Schnittstellen der Enzyme sind farblich voneinander differenziert. Die Puffer können jedoch variieren, je nach Kombination der Restriktionsenzyme. Teilweise wurden auch die High-Fidelity (HD) Enzyme oder die Fast-Digest (FD) Enzyme von Fermentas benutzt. Alle allgemeinen Enzyme sind in Tabelle 36 aufgelistet.

Tabelle 35. Restriktionsenzyme

Enzym	Schnittstelle	Puffer	Bedingung	Hersteller
AgeI	5'-ACCGGT-3' 3'-TGGCCA-5'	NEBuffer 1	37°C	NEB, R0552S
BamHI	5'-GGATCC-3' 3'-CCTAGG-5'	NEBuffer 3	37°C, BSA	NEB, R0136S
DpnI	5'-GA ^(CH₃) TC-3' 3'-CTA _(CH₃) G-5'	NEBuffer 4	37°C	NEB, R0176S
EcoRI	5'-GAATTC-3' 3'-CTTAAG-5'	NEBuffer 4	37°C	NEB, R0101S
HindIII	5'-AAGCTT-3' 3'-TTCGAA-5'	NEBuffer 2	37°C	NEB, R0104S
MluI	5'-ACGCGT-3' 3'-TGCACA-5'	NEBuffer 3	37°C	NEB, R0198S
NotI	5'-GCGGCCGC-3' 3'-CGCCGGCG-5'	NEBuffer 1	37°C, BSA	NEB, R0189S
PacI	5'-TTAATTAA-3' 3'-AATTAATT-5'	NEBuffer 1	37°C, BSA	NEB, R0547S
XhoI	5'-CTCGAG-3' 3'-GAGCTC-5'	NEBuffer 4	37°C, BSA	NEB, R0146S

Tabelle 36. Allgemeine Enzyme

Enzym	Puffer	Hersteller
Adensindeaminase	-	Fluka, 01898
Antarctic Phosphatase	Antarctic Phosphatase Puffer	BioLabs 1-800-632-7799
DNase	Reaktionspuffer	Ambion
EndoH	Probenpuffer	NEB, P0702S
KOD Hot Start DNA Polymerase	KOD Puffer	Novagen, No. 71086-5
PNGase F	Probenpuffer	NEB,
PyroBest-DNA-Polymerase	PyroBest Puffer	TaKaRa, R005A
RNA-Polymerase	Reaktionspuffer	Ambion
T4-DNA-Ligase	Ligationspuffer	NEB, M0202S
Trypsin	-	Lonza, 17-160
VentR®-DNA-Polymerase	Thermopol-Puffer	NEB, M0254S

6.3.6 Polymerase-Kettenreaktion

Die Polymerase-Kettenreaktion (PCR) wird mit unterschiedlichen Polymerase, wie der KOD Hot Start DNA Polymerase, PyroBest-DNA-Polymerase oder der VentR®-DNA-Polymerase nach Angaben des Herstellers durchgeführt. Die Reaktionsbedingungen hängen stark von der Klonierungstechnik ab und sind von Kapitel 6.3.19 bis 6.3.22 detailliert beschrieben.

6.3.7 Agarose-Gelelektrophorese für DNA

Die elektrophoretische Auftrennung von DNA erfolgt über ein 1%iges Gel für das 0,25 g Agarose in 25 ml 1 x TAE-Puffer unter Erwärmen gelöst wird. Nach dem Abkühlen, bevor das Gel erstarrt folgt der Zusatz von 1,25 µl GelRed und die Lösung wird in einen Gelschlitten mit Kamm gegossen. Für ein großes Gel werden jeweils die doppelten Substanzmengen verwendet. Nach Aushärtung des Gels wird der Kamm entfernt und der Gelschlitten in die mit 1 x TAE Puffer gefüllte Elektrophoresekammer gegeben. In die Geltaschen werden ein Marker (je nach erwarteter Größe der DNA-Fragmente λ - oder Φ -Marker) sowie die mit 6x Ladepuffer (Loading Dye) versetzten Proben einpipettiert und bei 100 Volt elektrophoretisch aufgetrennt. Die Auswertung erfolgt unter UV-Licht mit Hilfe eines Geldokumentationssystems.

6.3.8 Extraktion von DNA aus dem Agarosegel

Unter UV-Licht wird die mit Ethidiumbromid bzw. GelRed markierte DNA im Agarosegel mit Hilfe eines Skalpellens herausgeschnitten. Es folgt die Extraktion der DNA mittels Zymoclean Gel DNA Recovery Kit von der Firma Zymo Research nach Anweisung des Herstellers. Die Elution der DNA erfolgt in 6-10 µl sterilem Wasser.

6.3.9 Restriktionsverdau

Der Restriktionsverdau erfolgt in der Regel mit zwei unterschiedlichen Restriktionsenzymen und einem Puffer der für beide Restriktionsenzyme möglichst optimal ist.

Restriktionsverdauansatz:

200 ng Mutierte DNA

1 µl Restriktionsenzym 1 5 U

1 µl Restriktionsenzym 1 5 U

2 µl NEB-Puffer X 10 x

ad 20 µl steriles PCR-H₂O

Dieses Gemisch wird bei 37 °C eine Stunde lang inkubiert. Anschließend wird der genannte Ansatz in einem 1%igen Agarose-Gel per Gelelektrophorese aufgetrennt. Das Insert und der Vektor sollten nun als zwei deutlich differenzierte Banden zu erkennen sein.

6.3.10 Restriktionsverdau methylierter DNA

Nach einer Mutagenese-PCR wird zur Entfernung des methylierten Ursprungsplasmids das aufgereinigte PCR-Produkt mit dem Enzym DpnI verdaut.

Restriktionsansatz:

x µl aufgereinigtes PCR-Produkt

1 µl DpnI 20 U

2 µl NEB-Puffer 4 10x

ad 20 µl steriles PCR-H₂O

Der Restriktionsansatz wird für zwei Stunden bei 37 °C inkubiert. Anschließend folgt die Hitzeinaktivierung des Enzyms bei 80 °C für 20 Minuten. In dem Ansatz ist nur noch das neu synthetisierte, mutierte Plasmid, welches nun in Bakterien transformiert werden kann.

6.3.11 Ligation mit T4-DNA-Ligase

Die aufgereinigte Gelbande der Rezeptor-DNA (Insert) wird mit dem aufgereinigten Vektor im Verhältnis 3:1 (Insert : Vektor) ligiert. Der folgende Ligationsansatz wird 20 min bei Raumtemperatur inkubiert.

Ligationsansatz:

x µl Inserts ~ 150 ng

y µl Vektor ~ 50 ng

1 µl T4-DNA-Ligase 200 U

2 µl Ligasepuffer 10 x

2 µl ATP 10 x

ad 20 µl mit sterilem PCR-Wasser

Das ligierte Insert-Vektor-Konstrukt mit dem mutierten/getaggten Rezeptor-Gen kann nun durch die in Kapitel 6.3.12 beschriebene Transformation in *E.coli* eingebracht werden.

6.3.12 Transformation in *Escherichia coli*

50 µl der kommerziell erhältlichen chemisch kompetenten *DH5α* oder *TOP 10* bzw. 100 µl der in dem Arbeitskreis hergestellten chemokompetenten *E.coli*-Bakterien werden auf Eis langsam aufgetaut und mit 10-50 ng der DNA versetzt und 30 Minuten auf Eis inkubiert. Durch einen Hitzeschock von 40 Sekunden bei 42 °C und anschließender Kühlung für 2 min auf Eis, wird das Plasmid von den *E.coli*-Bakterien aufgenommen. 250 µl ampicillinfreies SOC-Medium bzw. LB-Medium werden zugesetzt und bei 37 °C für eine Stunde bei 300 rpm inkubiert. Hierbei entstehen durch die Transkription und Translation entsprechende Proteine, die eine Resistenz gegenüber Ampicillin, Kanamycin oder Zeocin vermitteln (je nach eingeführter Resistenzkassette). Anschließend wird die Bakteriensuspension auf antibiotikahaltigem Agar mit Hilfe eines Drigalski-Spatels ausplattiert und über Nacht bei 37 °C inkubiert. Nur die erfolgreich transformierten Bakterien können wegen des mit dem Plasmid aufgenommenen Resistenz-Gens auf dem Nährmedium anwachsen. Am folgenden Tag sind Bakterienkolonien auf der Platte zu erkennen.

6.3.13 Retransformation

Für eine Retransformation werden 20 µl *E.coli* Bakterien direkt mit 1 µl der verdünnten DNA (50 ng) gemischt, 5 min auf Eis stehen gelassen und dann sofort auf die angewärmte antibiotikahaltige Agarplatte (50-100 mg/l) ausgestrichen. Die Platte wird über Nacht bei 37°C inkubiert.

6.3.14 Selektion und Kultivierung von Bakterien-Monoklonen

Die über Nacht gewachsenen Bakterienkolonien von der Transformation bzw. Retransformation werden einzeln mit jeweils sterilen Pipettenspitzen isoliert in 4 ml LB-Antibiotika-Medium gegeben und 4 h, bei 37°C und 200 rpm inkubiert.

6.3.15 Glycerinkulturen

Von der Bakterienkultur in Kapitel 6.3.14 wird 1 ml mit 4 ml LB-Ampicillin-Medium für 2 Stunden bei 37 °C und 200 rpm im Brutschrank geschüttelt. 800 µl dieser Bakteriensuspension werden mit 200 µl Glycerol versetzt, gevortext und direkt bei – 80 °C eingefroren.

6.3.16 Mini-/Midi-/Maxipräparation von DNA

Für eine Mini-, Midi- oder Maxipräparation werden jeweils die entsprechenden Kits von Invitrogen, Qiagen oder Zymo benutzt und entsprechend der Angaben des Herstellers durchgeführt. Anschließend folgt die Konzentrationsbestimmung der DNA.

6.3.17 Konzentrationsbestimmung von DNA

2 µl DNA werden mit 998 µl VE-Wasser (Verhältnis 1:500) gemischt. Die Lösung wird unter Berücksichtigung des Verdünnungsfaktors photometrisch mit dem Photometer DU® 530 von Beckman bei einer Absorption 260 nm und 280 nm vermessen. Die ermittelte Konzentration bezieht sich auf den Nullwert von Wasser. Alternativ wurde die DNA Konzentration in 1 µl DNA mit dem NanoDrop (Universität Barcelona) oder dem Nanophotometer Implen (Max-Planck-Institut) gemessen.

6.3.18 Sequenzierung

Die Sequenzierung der Plasmid-DNA wird von der Firma GATC-Biotech durchgeführt.²⁸⁹ Dafür wird 1 µg DNA in Wasser gelöst und eingeschickt. Die entsprechenden Sequenzierungsprimer sind in Kapitel 6.3.4 aufgelistet.

6.3.19 Austausch der zweiten extrazellulären Schleife des A_{2B}-Rezeptors mittels Overlap-Extension

Das Ziel der Overlap-Extension Methode ist das DNA-Konstrukt pLXSN-HA-hA_{2B}(EL2-hA_{2A}). Der Austausch des EL2 erfolgt über fünf PCR-Runden, wobei die ersten drei bereits in der eigenen Diplomarbeit⁸ erfolgreich durchgeführt wurden, aber die Methode musste verbessert und erweitert werden, damit das Verfahren der Overlap Extension in dieser Arbeit erfolgreich ist. Alle benutzten Primer für dieses Verfahren sind in Kapitel 6.3.3, Tabelle 32 aufgelistet.

25 µl-PCR-Ansatz für Runde 1-4:

1 µl	pLXSN-HA-hA _{2B} bzw. DNA aus der vorhergehenden Runde	20 ng
3 µl	f-hA _{2B} -EL2-X-Primer/BamHI	15 pmol
3 µl	r-hA _{2B} -EL2-X-Primer/MluI	15 pmol
0,5 µl	dNTPs	10 mM
0,5 µl	KOD Hot Start Polymerase	1 U
2,5 µl	KOD Puffer	10 x
1,5 µl	MgSO ₄	25 mmol
13 µl	steriles Wasser	

PCR-Programm Runde 1-4

1. 94°C - 4 min
 2. 94°C - 45 s
 3. 64°C - 30 s
 4. 72°C - 30 s
 5. 72°C - 10 min
 6. 4°C - ∞
- } 25 x

25 µl-PCR-Ansatz für Runde 5a (Overlap extension):

2 µl	DNA aus I Eppendorf 4 Runde	20 ng
2 µl	DNA aus II Eppendorf 4 Runde	20 ng
0,5 µl	dNTPs	10 mM
0,5 µl	KOD Hot Start Polymerase	1 U
2,5 µl	KOD Puffer	10 x
1,5 µl	MgSO ₄	25 mmol
14 µl	steriles Wasser	

Für Overlap extension werden keine Primer benötigt.

PCR-Programm Runde 5a Overlap extension

1. 94°C - 4 min
 2. 94°C - 45 s
 3. 55°C - 45 s
 4. 72°C - 1 min
 5. 72°C - 4 min
 6. 4°C - 5 min
- } 5 x

25 µl-PCR-Ansatz für Runde 5b:

Zu dem Ansatz 5a werden nun

- | | | |
|------|-----------------------------|---------|
| 1 µl | r-hA _{2B} -BamHI | 15 pmol |
| 1 µl | f-HA-hA _{2B} -MluI | 15 pmol |

zugefügt.

PCR-Runde 5b

1. 94°C - 4 min
 2. 94°C - 1 min
 3. 68°C - 1 min
 4. 72°C - 1 min
 5. 72°C - 10 min
 6. 4°C - 5 min
- } 25 x

6.3.20 Klonierung von Rezeptor-DNA in einen Vektor

Für die Klonierung von der Rezeptor-DNA von hA_{2A}, hA_{2B}, D₂, GABA_{B2} und hA_{2B}-M198A in den Rluc-, YFP-, GFP²- oder psGEM-Vektor ist der erste Schritt eine PCR mit der Rezeptor-DNA und den entsprechenden Primern (siehe Tabelle 33 und Tabelle 34), um entsprechende Enzymschnittstellen unmittelbar vor und nach der Rezeptorsequenz einzuführen. Als Polymerase kommt hier häufig die Pyrobest-Polymerase zum Einsatz, aber gelegentlich auch die KOD Hot Start Polymerase. Nachfolgend ist ein Ansatz und das dazugehörige PCR-Programm beschrieben. Nach erfolgter PCR kann mit den neu eingefügten Enzymschnittstellen (siehe Name des jeweiligen Primers) sowohl die Rezeptor-DNA als auch der Vektor verdaut werden und nach der Aufreinigung mit der Ligation gestartet werden.

50 µl-PCR-Ansatz:

1 µl	Rezeptor-DNA	20 ng
3 µl	f-Primer mit Enzymschnittstelle	15 pmol
3 µl	r-Primer mit Enzymschnittstelle	15 pmol
4 µl	dNTPs	10 mM
0,5 µl	Pyrobest-Polymerase	1 U
5 µl	Pyrobest Puffer	10 x
33,5 µl	steriles Wasser	

PCR-Programm

1. 98°C - 10 sec	}	30 x
2. 66°C - 30 sec		
3. 72°C - 60 sec		
4. 4°C - ∞		

6.3.21 Mutagenese von M198A in den humanen A_{2B}-Rezeptor

Für die Mutagenese vom M198A dient das Plasmid pLXSN-HA-hA_{2B} als Matrize. Das Plasmid enthält das Wildtyp-Gen des humanen A_{2B}-Rezeptors mit einem vorgeschaltetem HA-Tag. Aufgrund der Komplementarität der Primer und der daraus resultierenden Heterodimerisierung, wird von den Primern, im Gegensatz zu einer gewöhnlichen PCR, die dreifache Konzentration eingesetzt. Die Durchführung der Mutagenese-PCR erfolgt mittels Vent-Polymerase, da sie über 3'-5'-Exonuclease-Aktivität verfügt. Dadurch verringert sich die Zahl an ungewollten Mutationen.

25 µl-PCR-Ansatz:

1 µl	pLXSN-HA-hA _{2B} (Matrize)	20 ng
3 µl	f-hA _{2B} -M198A-Primer	15 pmol
3 µl	r-hA _{2B} - M198A-Primer	15 pmol
0,5 µl	dNTPs	10 mM
0,5 µl	Vent-DNA-Polymerase	1 U
2,5 µl	Thermopol-Puffer	10 x
14,5 µl	steriles Wasser	

PCR-Programm

- | | | | | |
|----|------|---|--------|--------|
| 1. | 94°C | - | 4 min | |
| 2. | 94°C | - | 1 min | } 20 x |
| 3. | 66°C | - | 1 min | |
| 4. | 72°C | - | 10 min | |
| 5. | 72°C | - | 10 min | |
| 6. | 4°C | - | ∞ | |

Nach der erfolgreichen Mutation, der Aufarbeitung bis hin zur Sequenzierung folgt die Umklonierung von hA_{2B}-M198A in den Rluc- bzw. den YFP-Vektor, wie in 6.3.20 beschrieben.

6.3.22 Klonierung von Erkennungssequenzen an Rezeptor-DNA

Für die Klonierung von His- und Strep-Erkennungssequenzen in den psGEM-hA_{2A}, psGEM-A_{2B} und psGEM-GABA_{B2} werden komplementäre Primer mit Hilfe der PCR hergestellt, die mittig das His- bzw. Strep-tag tragen und an den Enden insgesamt zwei unterschiedliche Restriktionsenzymstellen imitieren. Das ursprüngliche Plasmid kann nun mit den beiden unterschiedlichen Restriktionsenzymen geschnitten werden und nach der Aufreinigung mit den komplementären Primern als Insert ligiert werden. Dabei werden für die Ligation 50 ng des geschnittenen Vektors und der komplette komplementäre Primeransatz benutzt.

Komplementäre Primer

10 µl komplementäre Primer 10 µg

10 µl komplementäre Primer 10 µg

mischen

PCR-Programm

1. 94 °C 4 min
2. 55 °C 2 min
3. direkt auf Eis

6.3.23 Linearisierung von DNA für die RNA Synthese

Für die Linearisierung von DNA wird der folgende Ansatz pipettiert:

Linearisierungsansatz:

10 µg DNA

1 µl PacI (Restriktionsenzym)

1 µl NEB Puffer 1 (10x)

1 µl BSA (10x)

ad 10 µl steriles PCR-H₂O

Über Nacht wird der Ansatz bei 4°C verdaut und anschließend für 2 h bei 37°C inkubiert. Die Hitzeinaktivierung erfolgt 20 min bei 65°C. Das nun vollständig linearisierte Produkt wird mittels Agarose-Gel kontrolliert und über eine Säule aufgereinigt.

6.3.24 RNA-Synthese

Das Edukt ist die DNA (hier: psGem-A_{2A}-His, psGem-A_{2A}-Strep, psGem-A_{2B}-His, psGem-A_{2B}-Strep, psGem-GABABR2-His, psGem-GABABR2-Strep) welche aus einer Midipräparation erhalten und mit dem Restriktionsenzym PacI linearisiert und über eine Säule gereinigt wurde. Im Kontrollgel ist das linearisierte Produkt durch eine deutliche Bande zu erkennen. Anschließend erfolgt eine Konzentrationsbestimmung und die Verdünnung auf 500 ng/µl mit einem benötigten Endvolumen von 10 µl (5 µg). Anschließend wird das mMessage mMachine® Kit (High Yield Capped RNA Transcription Kit SP6) von Ambion benutzt:

5 µl NTP/CAP 2x (stabilisiert die RNA)

3 µl DNA (z.B. psGem-A_{2A}-His)

1 µl Enzymmix (RNA Polymerase, die DNA in RNA transkribiert, RNase Inhibitor)

1 µl Reaction Buffer 10x (mit Spermidin, bindet und präzipitiert DNA auf Eis)

10 µl Ansatz

Den Ansatz 2 h bei 37°C inkubieren. Mit diesem Kit ist eine Transkription von 300 bis 5000 bp möglich. Nach 1 h Inkubation wird eine 80 % Ausbeute erreicht. Hier wird 2 h inkubiert, um eine vollständige Transkription zu erlangen. 1 µl DNase zufügen und

15 min bei 37°C inkubieren, damit die noch vorhandene DNA verdaut wird und nur noch RNA vorliegt. 15 µl LiCl für die Präzipitation zugeben und 2 h bei -80°C inkubieren. Direkt danach 20 min bei 4°C und 15000 g zentrifugieren. 900 µl 70% EtOH zugeben, damit die RNA gefällt wird und bei 15000 g, 10 min bei 4°C zentrifugieren. EtOH vorsichtig abnehmen und verwerfen und das RNA Pellet an der Luft in der RNA-Box trocknen. Das Pellet wird nun in 11 µl H₂O aufgenommen und gelöst. Da die Nucleotide und andere Bestandteile nicht präzipitiert werden, sind keine störenden Bestandteile mehr in dem RNA-Reaktionsgefäß. Nach diesem Schritt folgt die Kontrolle per Gel und die Konzentrationsbestimmung per Nano Photometer (Implen) (siehe Kapitel 6.3.26).

6.3.25 Agarose-Gelelektrophorese für RNA

Für ein 1%iges Gel werden 0,5 g Agarose in 50 ml 1 x TAE-Puffer unter Erwärmen in der Mikrowelle gelöst. Nach dem Abkühlen, aber noch vor dem Erstarren wird 1 µl Ethidiumbromid zugesetzt und das Gel in einer Gelschlitten mit Kamm für RNA gegossen. Nach Erhärten des Gels wird der Kamm entfernt und der Gelschlitten mit dem Gel in die mit 1 x TAE Puffer gefüllte RNA-Elektrophoresekammer eingelassen. In die Geltaschen werden der RNA-Marker, sowie die mit 5x Ladepuffer versetzten Proben einpipettiert und bei 100 Volt elektrophoretisch aufgetrennt. Die Auswertung erfolgt unter UV-Licht mit Hilfe eines Geldokumentationssystems der Firma BioRadTM.

6.3.26 Konzentrationsbestimmung von RNA

1 µl RNA wird auf das Nanophotometer Implen (Max-Planck-Institut) auftragen und bei 260 nm und 280 nm photometrisch vermessen. Zur Kontrolle kann ebenfalls ein RNA-Gel zum optischen Vergleich herangezogen werden (siehe Kapitel 6.3.25). Um optimale Voraussetzungen für die Injektion von RNA in Oozyten zu haben, muss die RNA auf 500 ng/µl mit DEPC-Wasser (Diethylpyrocarbonat) verdünnt werden.

6.4 Zellkultur

Alle Arbeitsschritte in der Zellkultur finden unter sterilen Bedingungen in einer Zellkulturwerkbank statt.

6.4.1 Medien

a) Das HXM-Medium für die GP⁺envAm12-Verpackungszellen besteht aus:

	DMEM
10 %	FCS
200 µg/ml	Hygromycin B
15 µg/ml	Hypoxanthin
25 µg/ml	Mycophenolsäure
100 U/ml	Penicillin
100 µg/ml	Streptomycin
1 %	Ultraglutamin
250 µg/ml	Xanthin

b) für CHO-K1-Zellen für retroviral, stabil transfizierte CHO-Zellen

<i>Kulturmedium</i>	<i>Selektionsmedium</i>	<i>Kulturmedium</i>
DMEM-F12	DMEM-F12	DMEM-F12
10 % FCS	10 % FCS	10 % FCS
100 U/ml Penicillin	100 U/ml Penicillin	100 U/ml Penicillin
100 µg/ml Streptomycin	100 µg/ml Streptomycin	100 µg/ml Streptomycin
1 % Ultraglutamin	1 % Ultraglutamin	1 % Ultraglutamin
	800 µg/ml G418	200 µg/ml G418

c) für transient transfizierte CHO-Zellen

<i>24 h vor der Transfektion</i>	<i>während der Transfektion</i>	<i>nach der Transfektion</i>
DMEM-F12	Opti-MEM	DMEM-F12
10 % FCS		10 % FCS
		100 U/ml Penicillin
		100 µg/ml Streptomycin

d) für transient transfizierte HEK-Zellen*Kulturmedium mit Zusätzen**während der Transfektion mit PEI*

DMEM (auf 500 ml DMEM)

DMEM

5 % (V/V) FCS (25 ml)

2 mM L-Glutamin (5 ml)

100 µg/ml Penicillin (5 ml)

100 U/ml Streptomycin (5 ml)

1 mM Natrium Pyruvat (5 ml)

5 ml AS (MEM Non-Essential Aminoacids)

e) für Oozyten**ND-96 Medium 10x für *Xenopus laevis* Oozyten**

112,2 g NaCl

2,98 g KCl

4,07 g MgCl₂2,22 g CaCl₂/2,94 g CaCl₂ x 2H₂O

23,8 g Hepes

ad 2 l H₂O auf pH 7,4 einstellen

+ 1 ml Penicillin/Streptomycin

+ 1 ml Cefuroxim

auf 100 ml Medium

oder 1 ml Gentamycin

auf 100 ml Medium

6.4.2 Auftauen von Zellen

Die bei -196 °C gelagerten Zellen werden schnell im Wasserbad bei 37 °C aufgetaut. Direkt nach dem Auftauen folgt das Überführen der Zellsuspension in eine 75 cm² Kulturflasche mit vorgewärmtem Medium. Die Kultivierung der Zellen erfolgt bei 37 °C und 5 % CO₂ im Inkubator.

6.4.3 Kultivierung von Zellen

Die CHO- und HEK-Zellen wachsen in Zellkulturflaschen unter den Standardbedingungen (37 °C und 5 % CO₂) im Inkubator. Erreichen die Zellen in einer 175 cm² Kulturflasche eine Konfluenz von ca. 80 %, werden sie passagiert. Dafür wird das verbrauchte Medium abgenommen und die Zellen mit 10 ml PBS-Puffer gewaschen. Zum Ablösen der Zellen werden 2 ml vorgewärmte 0,05%ige Trypsin/0,6 mM EDTA-Lösung auf die Zellen gegeben und wenige Minuten inkubiert. Die Zugabe von 8 ml Medium stoppt diese Reaktion. Mehrmaliges Auf- und Abpipettieren führt zum Vereinzeln der Zellen. Aus dieser Zellsuspension wird ein Teil der Zellen für Experimente verwendet und ein Teil in einer neuen Zellkulturflasche mit frischem, warmem Medium bei oben genannten Standardbedingungen weiter kultiviert.⁸

Die Oozyten werden bei 18°C im entsprechenden ND-96 Medium im Inkubator gehalten.

6.4.4 Zellzahlbestimmung

Für die Zellzahlbestimmung werden 10 µl Zellsuspension auf die Neubauer-Zählkammer pipettiert. Mit Hilfe des Mikroskopes werden drei Großquadrate, die jeweils aus 16 Kleinquadraten bestehen, ausgezählt und der Mittelwert berechnet. Wird die Anzahl der gezählten Zellen mit dem Faktor 10.000 multipliziert, ergibt sich die Zellzahl pro ml Zellsuspension:

$$(\text{gezählte Zellen} \times 10.000) = \text{Zellen pro ml Zellsuspension}$$

6.4.5 Einfrieren von Zellen

Wie im Kapitel 6.4.3 beschrieben wird eine konfluente 175 cm² Zellkulturflasche behandelt. Nach dem Vereinzeln der Zellen wird bei 200 g und 4 °C für 5 min zentrifugiert. Das Medium wird verworfen und das Zellpellet in 5 ml einer Mischung aus 90 % Kulturmedium oder 90 % FCS und 10 % sterilem DMSO resuspendiert. Je 1 ml entstandene Zellsuspension wird pro Kryovial aliquotiert. Die Mischungen werden langsam mit Hilfe des Freezing Containers, welcher 1 °C pro Stunde abkühlt, auf –80 °C eingefroren. Die Langzeitlagerung der Zellen erfolgt in flüssigem Stickstoff bei –196 °C.

6.4.6 Retrovirale Transfektion

24 Stunden vor der Transfektion werden pro Transfektionsansatz 1,5 Millionen GP⁺envAm12-Zellen (Verpackungszellen) auf eine 25 cm² Zellkulturflasche mit Medium (DMEM, FCS, Ultraglutamin, P/S) ohne Hypoxanthin, Xanthin und Mycophenolsäure ausgesät. Einige Stunden vor der Transfektion erfolgt ein Mediumaustausch gegen 6,25 ml Medium (DMEM, FCS, Ultraglutamin) ohne die Antibiotika Penicillin und Streptomycin. Für einen Transfektionsansatz werden 10 µg DNA benötigt. Diese setzen sich zusammen aus 3,75 µg pLXSN mit VSV-G-Gen und 6,25 µg des pLXSN-Vektors mit dem mutierten hA_{2B}-Gen. Die errechneten DNA-Mengen der Plasmide werden mit DMEM-Medium ohne Zusätze auf 625 µl aufgefüllt. In einem davon getrennten Ansatz werden 25 µl Lipofectamin 2000 und 600 µl DMEM (ohne Zusätze) bei RT für 5 min inkubiert. Anschließend wird diese Mischung zu dem 625 µl DNA-Ansatz gegeben und für 20 min bei RT inkubiert. Das Gemisch wird nun zu den Verpackungszellen gegeben. Nach 12-15 h bei 37 °C und 5 % CO₂ im Brutschrank erfolgt ein Mediumwechsel mit 3 ml DMEM, FCS, Ultraglutamin, Penicillin und Streptomycin. Die Zugabe von 30 µl Natriumbutyrat-Lösung (500 mM in Wasser, sterilfiltriert) bewirkt die Förderung der Virenproduktion. Die Kultivierung der Zellen erfolgt 48 Stunden bei 32 °C. Einen Tag vor der Infektion werden 400.000 CHO-K1 Zellen pro 25 cm² Zellkulturflasche ausgesät. Am Tag der Infektion wird das Medium der CHO-K1 Zellen abgenommen und durch das virenhaltige, sterilfiltrierte Medium der Verpackungszellen ersetzt. Zusätzlich werden dem Medium 6 µl Polybren-Lösung (4 mg/ml in Wasser, sterilfiltriert) zugegeben. Nach 2,5 h bei 37 °C wird das virenhaltige Medium entfernt und durch DMEM-F12-Medium mit FCS, PS und Ultraglutamin ersetzt. 48 Stunden später erhalten die Zellen das Selektionsmedium (DMEM-F12, FCS, PS, Ultraglutamin und 800 µl G418). Eine Woche lang wird alle zwei Tage das Medium gewechselt. Nach dieser Selektionsphase wird dauerhaft das Kulturmedium mit einer geringeren Konzentration von G418 benutzt.⁸

6.4.7 Transiente Transfektion

Für die transiente Transfektion mit Lipofectamin 2000 werden in getrennte Eppendorfgläser die entsprechenden DNA- und Lipofektaminmengen pipettiert. Je 500 µl Opti-MEM kommen hinzu und das Lipofektamin 2000 wird 5 Minuten inkubiert. Anschließend wird das Gemisch aus Lipofectamin 2000 und Opti-MEM mit dem DNA-Opti-MEM-Gemisch vereinigt und 20 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. In der Zeit wird von den vorbereiteten Zellen auf der 6-Well-Platte das Medium entfernt und mit 2 ml PBS gewaschen. Es folgt die Zugabe des DNA-Lipofektamin-Gemisches und die Inkubation bei 37°C, 5% CO₂ über 4 Stunden hinweg. Danach wird die Lösung vorsichtig abgesaugt und je Well 2 ml DMEM-F12 + FCS und Penicillin/Streptomycin gegeben und 24 h bei 37°C und 5 % CO₂ inkubiert.

6.5 Membranpräparation

Um eine entsprechend hohe Rezeptorausbeute zu bekommen, werden für die Membranpräparation pro Mutante und Wildtyp jeweils 40 konfluente 175 cm² Zellkulturschalen benötigt. Zunächst werden zwei 175 cm² Zellkulturflaschen mit einer Konfluenz von 80 % im Verhältnis 1:20 auf 40 Zellkulturschalen verteilt. Wenn die Schalen ebenfalls zu 80 % bewachsen sind, wird jeweils mit 5 ml PBS-Puffer gewaschen. Damit die Rezeptoren nicht internalisiert oder abgebaut werden, folgt das Einfrieren der Zellen bei -80 °C. Zur Weiterbearbeitung werden die Zellkulturschalen kurz angetaut und mit 1 ml 5 mM Tris-/2 mM EDTA-Puffer versetzt. Mit einem Gummischaber werden die Zellen abgelöst und auf Eis vereinigt. Dann wird die Zellsuspension mit dem Ultraturrax 1 min bei maximaler Stufe zerkleinert und anschließend mit dem Dounce-Homogenisator homogenisiert. Damit größere Zellorganellen und Zellkerne entfernt werden, erfolgt die Zentrifugation für 10 min bei 1000 g und 4 °C. Das Pellet wird verworfen und der Überstand für 1 h bei 48400 g und 4 °C erneut zentrifugiert. Dieses Mal wird der Überstand verworfen und das Pellet, welches Membranfragmente samt Rezeptoren enthält, mit 10 ml 50 mM Tris-Puffer (pH 7,4) resuspendiert. Unter letztgenannten Bedingungen wird erneut zentrifugiert (1 h, 48400 g, 4 °C). Der Überstand wird verworfen und das Pellet in 3 ml 50 mM Tris-Puffer aufgenommen und resuspendiert. Die Suspension wird mit dem Ultraturrax bearbeitet und homogenisiert. Das Protein wird in 1 ml Portionen aliquotiert und bei -80 °C gelagert. Die Proteinbestimmung wird nach Lowry durchgeführt.^{8, 290}

6.6 Gewinnung von cAMP-Bindeprotein

Für die funktionellen cAMP-Experimente wird cAMP-Bindeprotein benötigt, um dessen Bindungsstelle radioaktiv markiertes cAMP und nicht-radioaktiv markiertes cAMP konkurrieren kann. Da in frischer Kalbsnebennierenrinde die Konzentration an cAMP-Bindeprotein besonders hoch ist, werden die Kalbsnebennieren von frisch geschlachteten Kälbern entfernt und präparativ aufbereitet. Mit Hilfe eines Skalpells kann von 20 Nebennieren auf Eis das umliegende Fettgewebe beseitigt werden. Die Nebennierenrinde wird vorsichtig vom Nebennierenmark getrennt und in einen eiskalten Puffer aus 100 mM Tris/HCl, pH7,4, 250 mM NaCl, 10 mM EDTA, 0,1 % 2-Mercaptoethanol und 0,25 M Saccharose gegeben. Diese Suspension mit der Nebennierenrinde wird im Ultraturrax zerkleinert, homogenisiert und über eine Mullbinde filtriert. Die Mullbinde hält größere Fettpartikel durch die Filterwirkung zurück und adsorbiert kleinere Fetteilchen, die nicht benötigt werden. Anschließend wird die Lösung bei 30000 g, 4°C, 60 min lang zentrifugiert. Das entstandene Pellet sowie eventuelle Fettabscheidungen werden verworfen. Die Lösung enthält das cAMP-Bindeprotein, welches in je 1 ml Portionen aliquotiert wird und bei -20°C gelagert wird.²⁹¹ Zur Bestimmung der Proteinkonzentration wird die Proteinbestimmung nach Lowry (s. Kapitel 6.7.1) herangezogen.

6.7 Proteinbestimmung

6.7.1 Proteinbestimmung nach Lowry

Die Proteinbestimmung der Membranpräparation wurde nach der Methode von Lowry et al. durchgeführt.²⁹⁰ Das Prinzip beruht auf der Eigenschaft der Peptidbindung von Proteinen in alkalischer Lösung mit Cu^{2+} -Ionen Komplexe zu bilden. Außerdem werden die im Folin-Reagenz enthaltene Polymolybdat- und Polywolframatophosphorsäuren durch einige Aminosäuren reduziert und somit die Blaufärbung beeinflusst.

Für die Standardgerade wird eine 1 mg/ml BSA-Stammlösung in deionisiertem Wasser bei einer Absorption von 280 nm vermessen. Eine solche Stammlösung hat einen Sollwert der OD (optische Dichte) von 0,66. Zwischen der OD und der BSA-Proteinkonzentration besteht ein linearer Zusammenhang. So kann bei einer Abweichung vom Sollwert die wahre Konzentration der BSA-Stammlösung berechnet werden. Die Verdünnungsreihe wurde in Tabelle 37 aufgelistet, allerdings müssen die tatsächlichen Werte der Proteinkonzentration jeweils berechnet werden.

Tabelle 37. Verdünnungsschema der BSA-Standardgerade.

c Protein [$\mu\text{g/ml}$]	1 mg/ml BSA-Stammlösung [μl]	50 mM Tris-Puffer, pH 7,4 [μl]	Verdünnungsfaktor
50	10	190	1:20
100	20	180	1:10
200	40	160	1:5
300	60	140	1:3,3
400	80	120	1:2,5
500	100	100	1:2

Die Proteinproben werden als Duplikate, wie in Tabelle 38 dargestellt, mit 50 mM Tris-Puffer jeweils 1:10, 1:20 und 1:50 verdünnt. Als Nullwert werden 200 μl 50 mM Tris-Puffer verwendet.

Tabelle 38. Pipettierschema.

	Nullwert	Verdünnungsschema der Proben			BSA-Standardgerade
		1:10	1:20	1:50	
Tris 50 mM	200 μl	180 μl	190 μl	196 μl	-
		+	+	+	
Probe	-	20 μl	10 μl	4 μl	-
Standard	-	-	-	-	200 μl (s.o.)
Reagenz C	je 1000 μl , dann vortexen				
Inkubation	20 min bei RT				
Reagenz D	je 100 μl , dann vortexen				
Inkubation	30 min bei RT				
Photometer	Absorption bei 500 nm messen				

Die nun benötigten Reagenzien werden in Kapitel 6.2.4 beschrieben. Der Nullwert, die verschiedenen Verdünnungen der Proben und die Lösungen für die BSA-Standardgerade werden mit je 1000 μl Reagenz C versetzt, gevortext und 20 min bei RT inkubiert. Es folgt die Zugabe von Reagenz D mit anschließendem Vortexen und einer Inkubationszeit von 30 min bei RT. Die Proben werden in eine Küvette überführt und bei 500 nm im Photometer vermessen.

Die Absorptionswerte des BSA-Standards werden graphisch gegen die Proteinkonzentration aufgetragen. Mit Hilfe dieser Standardgeraden kann unter Berücksichtigung des Verdünnungsfaktors der Proteingehalt der Proben bestimmt werden.^{8, 290}

6.7.2 Proteinbestimmung nach *Bradford*

Für die Proteinbestimmung bei den BRET-Experimenten wurde die Methode nach Bradford verwendet.²⁹² 10 µl Protein bzw. 10 µl des BSA-Standards (0; 0,1 - 0,5 µg/µl) wurden für 5 min bei Raumtemperatur nach Angaben des Herstellers von BioRad mit 200 µl Bradford-Reagenz inkubiert und anschließend bei 600 nm die Absorption mit dem Multiskan- (Barcelona) oder BRET-Mithras-Gerät (Bonn) vermessen.

6.8 Wettbewerbsexperimente

6.8.1 Radioligand-Bindungsstudien an Adenosin-A_{2B}-Rezeptoren

Für die Wettbewerbsexperimente an Membranpräparationen mit humanen A_{2B}-Rezeptor-Mutanten wird der Radioligand [³H]PSB-603 eingesetzt. Dieser hat eine spezifische Aktivität von 73 Ci/mmol und weist einen K_D-Wert von 0,41 nM auf (0,58 nM für die hier eingesetzten CHO-HA-hA_{2B}-Zellmembranen).

An allen Rezeptormutanten und dem Wildtyp werden verschiedene Verbindungen getestet. Die Einzelkurven werden in Duplikaten und die Gesamtkurve mindestens im Triplikat durchgeführt. Bei den Verbindungen handelt es sich für die homologe Wettbewerb um den selektiven Antagonisten PSB-603 als Kaltsubstanz, und für die heterologe Wettbewerb um die Agonisten NECA und BAY60-6583, sowie den A_{2A} selektiven Agonisten CGS-21680. Zur Bestimmung der unspezifischen Bindung wird der unselektive Antagonist DPCPX benutzt. Folgendes Pipettierschema wird benutzt:

500 µl Ansatz:

- 25 µl 1. Testsubstanzen in verschiedenen Konzentrationen in
50 % DMSO / 50 % 50 mM Tris-Puffer, pH 7,4 oder
- 2. 50 % DMSO / 50 % 50 mM Tris-Puffer, pH 7,4 für die Gesamtbindung oder
- 3. 200 µM DPCPX (Endkonzentration 10 µM) in 50 % DMSO / 50 % 50 mM
Tris-Puffer, pH 7,4, für die unspezifische Bindung
- 275 µl 50 mM Tris-Puffer, pH 7,4
- 100 µl [³H]PSB-603 (Endkonzentration 0,3 nM) in 50 mM Tris-Puffer, pH 7,4
- 100 µl Membranpräparation in 50 mM Tris-Puffer (30 µg Protein pro Vial)

Die Verdünnung im Assay beträgt 1:20 und der DMSO-Gehalt 2,5 %. Die Testsubstanzen werden unter Berücksichtigung dieser Angaben für den entsprechenden Konzentrationsbereich hergestellt. 25 µl der Testsubstanzen, der Puffer für die

Gesamtbindung und DPCPX für die unspezifische Bindung werden in 4 ml Reaktionsgefäße vorgelegt und mit 275 µl Tris-Puffer aufgefüllt. Es erfolgt die Zugabe des Radioliganden [³H]PSB-603 mit der Endkonzentration von 0,3 nM. Die Membranpräparation wird aufgetaut und kurz mit dem Ultraturrax durchmischt. Anschließend wird so verdünnt, dass pro Vial 30 µg Protein eingesetzt werden können. Zur Zerstörung des endogenen Adenosins werden pro ml angesetzter Proteinsuspension 2 U ADA zugesetzt und für 20 min inkubiert. 100 µl dieser Mischung werden dann dem Reaktionsansatz zugegeben und 75 min bei RT inkubiert. Anschließend erfolgt die Trennung von gebundenem und ungebundenem Radioliganden durch Filtration über einen GF/B-Filter. Nach dem Absaugen wird vier Mal mit je 2 ml eiskaltem 50 mM Tris- /0,1 % BSA-Puffer, pH 7,4 gewaschen. Die Filterscheiben werden ausgestanzt, mit 2,5 ml Szintillationscocktail versetzt und nach 6 h Inkubation im LSC-Counter vermessen.

Die Auswertung der Ergebnisse erfolgt mit dem Programm GraphPad Prism 5. Zunächst wird durch das Subtrahieren der unspezifischen Bindung (cpm vom DPCPX-Ansatz) von der Gesamtbindung (cpm des Pufferansatzes) die spezifische Bindung berechnet. Bei der Auswertung werden dann die prozentuale spezifische Bindung des Radioliganden [³H]PSB-603 gegen die eingesetzte logarithmische Konzentration des unmarkierten Liganden aufgetragen. Das Programm berechnet eine sigmoidale Inhibitionskurve („One site competition“) mit der die IC₅₀- bzw. die K_i-Werte der Verbindungen bestimmt werden können. Durch die ermittelten IC₅₀-Werte und die tatsächlich eingesetzte Radioligandkonzentration kann der K_D- und B_{max}-Wert berechnet werden.^{8, 275}

6.8.2 Radioligand-Bindungsstudien an Adenosin-A_{2A}-Rezeptoren

Für die Kompetitionsexperimente an den Membranpräparationen von humanen A_{2A}-Rezeptoren wird der Radioligand [³H]MSX-2 (1 nM Endkonzentration) eingesetzt. Die Einzelkurven werden in Triplikaten und die Gesamtkurve ebenfalls als Triplikat durchgeführt. Zur Bestimmung der unspezifischen Bindung wird der unselektive Ligand CGS-15943 benutzt. Folgendes Pipettierschema wird benutzt:

400 µl Ansatz:

- 10 µl 1. Testsubstanzen in verschiedenen Konzentrationen in 100 % DMSO
- 2. 100 % DMSO für die Gesamtbindung
- 3. CGS-15943 (Endkonzentration 10 µM) in 100 % DMSO unspez. Bindung
- 190 µl 50 mM Tris-Puffer, pH 7,4
- 100 µl [³H]MSX-2 (Endkonzentration 1 nM) in 50 mM Tris-Puffer, pH 7,4
- 100 µl Membranpräparation in 50 mM Tris-Puffer (125 µg Protein pro Vial)

Die Verdünnung im Assay beträgt 1:40 und der DMSO-Gehalt 2,5 %. Die Testsubstanzen werden unter Berücksichtigung dieser Angaben für den entsprechenden Konzentrationsbereich hergestellt. 10 µl der Testsubstanzen, der Puffer für die Gesamtbindung und CGS-15943 für die unspezifische Bindung werden in 4 ml Reaktionsgefäße vorgelegt und mit 190 µl Tris-Puffer aufgefüllt. Es erfolgt die Zugabe des Radioliganden. Die Membranpräparation wird aufgetaut und kurz durchmischt. Anschließend wird so verdünnt, dass pro Vial 125 µg Protein eingesetzt werden können. Zur Zerstörung des endogenen Adenosins werden pro ml angesetzter Proteinsuspension 2 U ADA zugesetzt und für 20 min inkubiert. 100 µl dieser Mischung werden dann dem Reaktionsansatz zugegeben und 30 min bei RT inkubiert. Anschließend erfolgt die Trennung von gebundenem und ungebundenem Radioliganden durch Filtration über einen GF/B-Filter. Diese müssen zuvor 30 min in 0,3 %iger PEI-Lösung inkubiert werden. Nach dem Absaugen wird vier Mal mit je 2 ml eiskaltem 50 mM Tris-Puffer, pH 7,4 gewaschen. Die Filterscheiben werden ausgestanzt, mit 2,5 ml Szintillationscocktail versetzt und nach 6 h Inkubation im LSC-Counter vermessen. Die Auswertung erfolgt genau so wie in Kapitel 6.8.1 beschrieben.

6.9 Funktionelle cAMP-Experimente

220.000 Zellen pro Well werden 24 Stunden vor dem Versuch in eine 24-Well-Platte ausgesät. Dieses Experiment wird in Triplikaten durchgeführt und als Standard sowie 100 %-Wert wird 100 µM Forskolin eingesetzt. Am Versuchstag wird mit einer Pumpe das Medium vorsichtig abgesaugt und zwei Mal für je 10 min mit 500 µl 37 °C warmem HBSS-Puffer, welcher 1 U/ml Adenosindesaminase (ADA) enthält, gewaschen. ADA bewirkt den Abbau von Adenosin, welches von gestressten Zellen ausgeschüttet wird. Danach verbleiben 300 µl HBSS-Puffer für 2 h auf den Zellen bei 37 °C im Brutschank. Während der Inkubationszeit können die Phosphodiesterase-Inhibitorlösung und die

Substanzverdünnungen hergestellt und im Wasserbad bei 37 °C erwärmt werden. 10 min vor Ende der Inkubationszeit werden die Zellen in ein 37 °C vorgewärmtes Wasserbad überführt. Es erfolgt die Zugabe von 100 µl des Phosphodiesteraseinhibitors Ro20-1724 (200 µM in 2 % DMSO/98 % HBSS-Puffer; Endkonzentration 40 µM) mit einer Inkubationszeit von 15 min. Dies verhindert den Abbau des gebildeten cAMPs. Die zu testenden Agonisten Adenosin, NECA, BAY60-6583 und CGS-21680, welche in 100% DMSO gelöst sind, werden mit HBSS-Puffer zu den gewünschten Konzentrationen verdünnt. Bei der Testung des Agonisten Adenosin wird kein ADA benutzt. Die DMSO-Konzentration sollte den Wert von 2 % nicht überschreiten. Da die Verdünnung im Assay 1:5 beträgt, wurden die einzusetzenden Konzentrationen in einer Mischung von 5 % DMSO/95 % HBSS-Puffer (1 % DMSO im Assay), sowie 5fach höher angesetzt. Dann werden 100 µl der jeweiligen Agonisten-Konzentration zu den Zellen gegeben und 15 min inkubiert. Für die Negativkontrolle werden ebenfalls als Triplikate 100 µl 5 % DMSO/95 % HBSS-Puffer und für den Standard 100 µl Forskolin (100 µM) auf die Zellen gegeben. Nach der Inkubation wird die Lösung mit einer Pumpe abgesaugt. Durch die Zugabe von 500 µl 90 °C heißem Lysepuffer (4 mM EDTA/ 0,01 % Triton) setzen die Zellen intrazelluläres cAMP frei. Nach Abkühlen auf Raumtemperatur kann zum mechanischen Lösen der Zellfragmente und Freisetzen von gebildetem cAMP aus nicht lysierten Zellen, werden mit Hilfe einer Pipettenspitze die Zellen vom Boden eines jeden Wells abgekratzt. Die Lösung wird gut durchmischt und wie im unten stehenden Pipettierschema verwendet.

Für die cAMP-Gehaltsbestimmung wird eine cAMP-Standardverdünnungsreihe hergestellt. Die Stammlösung weist eine Konzentration von 1600 pmol/ 5 ml auf. 50 µl à 16 pmol wurden aliquotiert und bei -20 °C gelagert. Aus diesen Aliquots werden durch Verdünnung mit 4 mM EDTA/0,01 % Triton sechs verschiedene Konzentrationen von 8 pmol bis 0,25 pmol cAMP hergestellt.

Das cAMP-Experiment wurde als Triplikat auf Eis nach folgendem Pipettierschema durchgeführt:

120 µl Pipettierschema:

- 50 µl 1. Zelllysat mit enthaltenem cAMP oder
- 2. cAMP-Standardverdünnung oder
- 3. Lysepuffer (4 mM EDTA/0,01 % Triton) für die Gesamtbindung
- 30 µl [³H]cAMP (Endkonzentration 3 nm in Wasser)
- 40 µl cAMP-Bindeprotein in Lysepuffer (50 µg pro Reagenzglas)

Für die Hintergrundkontrolle werden 90 µl Lysepuffer und 30 µl [³H]cAMP ohne Bindeprotein eingesetzt. Nach Zugabe von 40 µl Bindeprotein wird der Ansatz 1 h auf Eis inkubiert. Anschließend erfolgt die Trennung von gebundenem und ungebundenem Radioliganden mit Hilfe des Harvesters über GF/B-Filter. Es wird 3 x mit 2 ml eiskaltem 50 mM Tris-Puffer pH 7,4 gewaschen. Die Filterscheiben werden ausgestanzt und in Szintillationsvials überführt. Dann werden 2,5 ml Szintillationscocktail zugegeben und die Proben nach 6 h im LSC-Counter vermessen.

Die Auswertung der Experimente erfolgt mit den Programmen Microsoft Excel und GraphPad Prism 5. Die gezählten radioaktiven Zerfälle pro Minute (cpm) von der Gesamtbindung und der Hintergrundkontrolle werden gemittelt und voneinander subtrahiert. Das Ergebnis in cpm ist die Radioaktivität des [³H]cAMP-Bindeprotein-Komplexes in Abwesenheit von unmarkiertem cAMP (C_0). Ebenfalls werden von allen erhaltenen cpm-Werten des Standards und der Proben die Mittelwerte gebildet und der Hintergrundwert subtrahiert. Die erhaltenen Werte (cpm) entsprechen der Radioaktivität des [³H]cAMP-Bindeprotein-Komplexes in Anwesenheit von unmarkiertem cAMP mit bekannter Konzentration als Standard und von den unbekanntenen Proben (C_X). Für die Standardgerade wird der Quotient C_0/C_X gebildet und gegen den bekannten cAMP-Wert vom Standard in pmol aufgetragen. Bei dem Experiment wurde nur ein Zehntel des cAMP-haltigen Lysepuffers pro Well eingesetzt (von 500 µl Lysepuffer wurden nur 50 µl überführt), daher wird an dieser Stelle der Konzentrationsbereich der Standardgerade um das Zehnfache erhöht. Anhand der ermittelten Standardgeradengleichung kann der cAMP-Gehalt der Proben in pmol berechnet werden. Die erhaltenen Werte werden in dem Programm GraphPad Prism 5 auf den 100%-Wert von 100 µM Forskolin bezogen. Da Forskolin die Adenylatcyclase direkt aktiviert, ohne vorher in Kontakt mit dem Rezeptor zu kommen, wird Forskolin als 100%-Wert angesehen. Die Konzentration von 100 µM Forskolin hat sich in einem Vorversuch mit einer entsprechende Kurve als vorteilhaft erwiesen, obwohl das Plateau der sigmoidalen Kurve nicht ganz erreicht. Bei höheren Konzentrationen fällt diese Substanz allerdings aus.

In GraphPad Prism wird die jeweilige Konzentration des Agonisten NECA, CGS-21680 bzw. BAY60-6583 halblogarithmisch gegen den cAMP-Gehalt in Prozent (bezogen auf 100 µM Forskolin) aufgetragen. Das Programm errechnet eine sigmoidale Dosis-Wirkungs-Kurve anhand derer der EC_{50} -Wert der Agonisten ermittelt werden kann.^{8, 275}

6.10 Biolumineszenz-Resonanz-Energie-Transfer

6.10.1 Biolumineszenz-Resonanz-Energie-Transfer-Experimente

Die Durchführung der BRET-Experimente erfolgt in vier Schritten, die hier der Vollständigkeit halber komplett dargestellt werden:

a) Splitten von CHO-K1 Zellen auf 6-Well-Platten

Am ersten Versuchstag werden die CHO-K1 Zellen mit 10 ml PBS gewaschen und mit 2 ml Trypsin/EDTA gelöst. Die Reaktion kann mit 8 ml Medium DMEM-F12 + FCS ohne Antibiotika gestoppt werden. Anschließend werden die Zellen in der Neubauer-Zählkammer gezählt und 850.000 Zellen pro Well ausgesät. 2 ml DMEM-F12 + FCS ohne Antibiotika kommen hinzu und werden bis zum nächsten Tag bei 37°C, 5% CO₂ inkubiert. Ein Teil der Zellen werden für weitere Versuche auf eine große Flasche gesplittet, wobei hier dann DMEM-F12 + FCS + Penicillin und Streptomycin benutzt wird.

b) Transfektion

Nach der Erstellung eines Pipettierschemas werden die entsprechenden DNA- und Lipofektaminmengen in getrennte Eppendorfgefäße pipettiert. Für die Standard BRET-Experimenten bedeutet dies eine konstante Konzentration von Rezeptor-Rluc-DNA und steigende Konzentrationen von Rezeptor-YFP-DNA. Je 500 µl Opti-MEM kommen hinzu und das Lipofektamin 2000 wird 5 Minuten inkubiert. Anschließend wird das Lipofektamin-2000-Opti-MEM-Gemisch mit dem DNA-Opti-MEM-Gemisch vereinigt und 20 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. In der Zeit wird von den Zellen auf der 6-Well-Platte (vom Vortag) das Medium entfernt und mit 2 ml PBS gewaschen. Es folgt die Zugabe des DNA-Lipofektamin-Gemisches und die Inkubation bei 37°C, 5% CO₂ über 4 Stunden hinweg. Danach wird die Lösung vorsichtig abgesaugt und je Well 2 ml DMEM-F12 + FCS und Penicillin/Streptomycin gegeben und 24 h bei 37°C und 5 % CO₂ inkubiert.

c) BRET-Messung

Am dritten Versuchstag findet die eigentliche BRET-Messung statt. Die Zellen werden an dem Tag der Messung immer lichtgeschützt und soweit es möglich ist bei 37°C aufbewahrt. Das Medium wird von den Zellen entfernt und zwei Mal mit 37°C warmen

500 μl HBSS-Puffer/Glucose (0,1 g Glucose auf 100 ml HBSS) gewaschen und 410 μl HBSS-Puffer/Glucose auf den Zellen belassen. Nach dem sanften Ablösen der Zellen mit Hilfe eines Zellschabers kann die Zellsuspension in Eppendorffgefäße überführt werden. Für die Proteinbestimmung kommen 10 μl Zellen und 10 μl BSA-Standard (0,1; 0,2; 0,3; 0,4; 0,5 mg/ml) in eine durchsichtige 96-Well-Platte. Nach Zugabe von 190 μl Bradford wird 5 min inkubiert und die Absorption bei einer Wellenlänge von 600 nm gemessen. Unter Verwendung von Prism 5 wird berechnet, wie viel HBSS-Puffer/Glucose zu jedem Well zugefügt werden muss, damit die Zellkonzentration überall auf 0,2 mg/ml beträgt. Die Fluoreszenz (YFP) wird in einer schwarzen 96-Well-Platte bei 530 nm gemessen, die pro Well 100 μl Zellen enthält. Die Messungen erfolgen in Duplikaten. Die Biolumineszenz wird in einer weißen 96-Well-Platte gemessen, in der pro Well 90 μl Zellen enthalten sind und 10 μl Coelenterazin h (5 μM Endkonzentration) zu pipettiert werden. Coelenterazin h muss kühl (auf Eis) gelagert und vor Licht geschützt (mit Folie abgedeckt) werden. Nach dessen Zugabe muss nach 1 min (mBU) und nach 10 min (Rluc) bei 530 nm bzw. 480 nm gemessen werden.

d) Auswertung

Alle wichtigen Werte von der ‚Fluoreszenz YFP‘, über die ‚BRET Ratio‘ bis hin zu ‚Rluc nach 10 min‘ wird je der Mittelwert gebildet und der Hintergrund subtrahiert. Für die Graphen wird folgendes benötigt:

X-Achse: (Fluoreszenz YFP/Rluc nach 10 min) x 1000

→ Einheit: Fluoreszenzeinheiten (willkürlich)

Y-Achse: BRET Ratio x 1000

→ Einheit: mBU (milli BRET Unit)

Die graphische Darstellung erfolgt mittels GraphPad Prism 5, welches auch den BRET_{50} und den BRET_{max} -Wert (per Michaelis-Menten) berechnet.

6.10.2 Verdrängungsexperimente

Die BRET-Verdrängungsexperimente werde analog zu den in Kapitel 6.10.1 beschriebenen Standard BRET-Experimenten durchgeführt. Hierbei werden allerdings gleich drei unterschiedliche DNA-Konstrukte zeitgleich in die Zellen transfiziert. Ausgehend von einem nachgewiesenen Dimer, werden DNA Konzentrationen von den beiden Rezeptoren mit entweder Rluc oder YFP so gewählt, dass ein hohes, aber nicht das maximale mBU Signal erreicht wird. Die Mengen werden konstant gehalten und

eine weitere Rezeptor-DNA ohne Fusionsprotein wird in steigenden Konzentrationen hinzugegeben. Dieses verdrängt einen Rezeptor aus dem Dimer und das mBU Signal sinkt. Ist kein Dimer vorhanden, dann kann auch kein Rezeptor verdrängt werden und das Signal kann nicht sinken.

6.10.3 Einfluss von Liganden

Dieses Experiment wird bei A_{2B} - A_{2A} und A_{2B} - A_{2B} durchgeführt, um den zeitlichen Einfluss von Agonisten und Antagonisten auf das Dimerisierungsverhalten zu beobachten. Die Liganden sind Adenosin, NECA, CGS-21680, BAY60-6583 und PSB-603. Es wird immer die gleiche Menge an DNA transfiziert und alle Zellen eines Dimerpaars vereinigt und in eine weiße 96-Well-Platte (90 μ l) pipettiert. Die Zugabe von den Liganden (10 μ l) erfolgt zu unterschiedlichen Zeiten ($t = 0$ min, 2,5 min, 5 min, 10 min, 20 min, 30 min, 60 min). Nach Ablauf der Zeit wird mit Coelenterazin h inkubiert und 1 min und 10 min später gemessen. Die Auswertung erfolgt wie in Kapitel 6.10.1 d).

6.10.4 Immunzytochemie

Um Rluc, welches selbst nicht fluoresziert, unter dem konfokalen Mikroskop sichtbar zu machen, wird mittels Immunzytochemie Rluc spezifisch über den ersten Antikörper markiert und mit dem zweiten Antikörper, der mit Cy³ γ gekoppelt ist, detektiert. Dadurch scheinen die Zellen mit Rluc rot. YFP ist grün zu sehen und ein ausgeglichenes Verhältnis von Rluc und YFP lässt die Zellen gelb erscheinen.

Beginnend mit dem Waschen der Zellen in PBS folgt für 15 min bei RT die Inkubation mit 1 ml 4 %iger Paraformaldehydlösung. Nach dem Waschen mit PBS/Glycin 20 mM für 10 min wird in 5 min die Membran durch PBS/Glycin 20 mM/Triton X-100 0,05 % permeabilisiert. Anschließend folgt zweimaliges Waschen mit PBS/Glycin 20 mM und zum Blocken der Reaktion eine 1 h Inkubation mit PBS/Glycin 20 mM/BSA 1%. Der erste Antikörper gegen Rluc wird 1:100 in PBS/Glycin/BSA verdünnt und 1 h inkubiert. Es folgt erneut ein 3 maliges Waschen mit PBS/Glycin/BSA und die Zugabe des zweiten Antikörpers Cy³ γ für 1 h (1:200 in PBS/Glycin/BSA verdünnt). Nach 3 maligem Waschen mit PBS/Glycin/BSA, wird einmal mit PBS/Glycin gewaschen und anschließend sind die Zellen fertig für die Betrachtung unter dem konfokalen Mikroskop.

6.11 Oozyten

6.11.1 Gewinnung von Oozyten aus *Xenopus laevis*

Xenopus laevis ist der afrikanische Krallenfrosch, der auch Apothekerfrosch genannt wird. Dessen Oozyten eignen sich hervorragend für die Forschung, da sie nur eine geringe Anzahl an Rezeptoren an ihrer Oberfläche aufweisen. Nachfolgend wird die Gewinnung der Oozyten aus dem lebenden *Xenopus* dargestellt. Jeder Frosch wird zwei Mal im Jahr operiert und das über 3 Jahre hinweg. Dies bedeutet, dass die Frösche nach jeder Operation weiterleben. Alle benutzten Medien sind mit ihren Bestandteilen in Kapitel 6.4.1 aufgeführt. Zunächst wird einer der weiblichen Frösche ausgewählt und für 20 Minuten in ein Bad mit dem Lokalanästhetikum Tricain überführt. Tricain (=Ethyl-3-Aminobenzoat-Methansulfonsäure) wirkt bei *Xenopus laevis* als Betäubungsmittel. Während der Frosch betäubt ist, wird er auf Eis gelegt und operiert. Ein Tuch in Tricain getränkt und über den Kopf gelegt verhindert ein Erwachen des Frosches während der Operation. Des Weiteren muss der Frosch ständig mit Barth-Medium ohne Calcium feucht gehalten werden, um ihn vor der Austrocknung zu schützen. Zunächst werden die Hautschichten und dann die Fettschichten durchgeschnitten. Es folgt die Entnahme einiger Oozyten. Anschließend wird mit 2-3 Stichen das Fettgewebe und dann die Hautschichten wieder zusammengenäht. Der Frosch ist nach der OP im Aufwachbecken, welches aus normalem Leitungswasser besteht. Er sollte zu 90% im Wasser liegen, allerdings muss die Nase an der Luft liegen, um ein Ersticken zu vermeiden. Die Oozyten werden durch Follikelsäcke umgeben. Diese werden aufgeschnitten und die Oozyten grob vereinzelt. 14 mg Collagenase (Protease) werden in 10 ml steril filtriertem Barth-Medium ohne Ca^{2+} gelöst und die Oozyten 2 h bei 18°C darin inkubiert. Anschließend erfolgt die Zugabe von Calciumhaltigem Barth-Medium, um die Collagenase durch das Ca^{2+} zu inaktivieren. Nach der Sortierung der Oozyten erfolgt die Lagerung im ND-96-Medium bei 18°C bis zur Injektion der RNA.

6.11.2 Injektion von RNA in Oozyten

Die Oozyten von *Xenopus laevis* sind kleine, kugelförmige, halb weiß und halb schwarz gefärbte Oozyten, die aus einem frisch operierten Frosch stammen. Hinter der schwarzen Hälfte verbirgt sich der Zellkern, in die die RNA nicht injiziert werden soll. 1 µl RNA wird auf einen Deckel eines Eppendorfgefäßes pipettiert. Bei Doppel-RNA-Injektionen werden je 0,5 µl RNA gut gemischt. Mit einer selbst gezogenen Kapillare welche mit Öl gefüllt ist, wird 1 µl RNA (500 ng) aufgezogen. Pro Oozyte werden 50 nl RNA direkt am Äquator, also direkt beim Übergang zwischen der schwarzen und der weißen Hälfte, in das Cytosol injiziert. Anschließend erfolgt die Inkubation über 48 h im ND96-Medium bei 18°C. In dieser Zeit erfolgt die Translation und die gebildeten Rezeptoren werden an der Oberfläche der Oozyten exprimiert.

6.11.3 Metabolische Markierung mit [³⁵S]Methionin

Sollte eine metabolische Markierung mit L-[³⁵S]Methionin durchgeführt werden, so werden die Oozyten unmittelbar nach der Injektion in ND-96-Medium mit [³⁵S]Methionin ~ 100 MBq/ml und damit ~ 0,2 MBq/Oozyte für 24 h inkubiert. Anschließend erfolgt die normale Aufbereitung, Aufreinigung und die PAGE, sowie die Detektion mittels Film.

6.11.4 Markierung mit Cy3 oder Cy5

Bevor die Aufarbeitung der Oozyten durchgeführt werden, können die Oozyten im unversehrten Zustand entweder mit Cy3 oder Cy5 markiert werden, damit die Expression der Proteine an der Oberfläche nach der Auftrennung per PAGE mittels Typhoon überprüft und detektiert werden kann. Dafür wird ND-96-Medium ohne Zusätze auf einen pH von 8-8,5 eingestellt und Cy3 oder Cy5 gelöst. Nun folgt eine 30 minütige Inkubation der Oozyten in diesem Medium auf Eis mit gelegentlichem Schütteln. Nach dreimaligem Waschen in Phosphatpuffer mit 30 µM Imidazol kann mit der Aufbereitung begonnen werden.

6.11.5 Aufbereitung der Oozyten

Die Oozyten werden nun homogenisiert und die Rezeptoren solubilisiert. Dazu werden 10 Oozyten mit 200 µl Homogenisierungspuffer versetzen und durch auf und ab pipettieren homogenisiert. Der Homogenisierungspuffer besteht aus 10 ml 0,1 M Phosphatpuffer, 10 µl Pefabloc 1000x Stock, 1 Tablette Pefabloc (Proteaseinhibitor, verhindert den Abbau der Proteine), 50 mg Dodecyl-β-maltosid (DM) 0,5% oder Digitonin 0,5% (Solubilisiert die Rezeptoren aus der Membran). Anschließend folgt die Zentrifugation für 10 min bei 15.000 rpm und 4°C. Die Rezeptoren sind in der löslichen Phase. Diese wird nun abpipettieren und in ein neues Eppendorfgefäß geben und nachfolgend als 'Extrakte' bezeichnet. Das Pellet mit den Membranen und den sonstigen Oozytenüberresten wird verworfen. Ein Teil des Überstandes mit den Rezeptoren kann nun über die His-markierten Proteinen aufgereinigt werden.

6.11.6 Aufreinigung über His-markierte Proteine

100 µl Überstand mit den solubilisierten Rezeptoren (aus Kapitel 6.11.5) werden mit 400 µl Homogenisierungspuffer, 5 µl Imidazol 1M (Endkonzentration 10 mM) pH 8 (reduziert unspezifische Bindung) und 30 µl Ni²⁺-NTA-Agarose für 30 min bei 4°C rotiert. Anschließend wird für 1 min bei 13.000 rpm zentrifugiert, der Überstand vorsichtig abgesaugt, verworfen und das Pellet mit je 1 ml eisgekühltem Waschpuffer (bestehend aus 1 Teil Homogenisierungspuffer, 4 Teilen Phosphatpuffer inkl. Dodecyl-β-maltosid oder Digitonin und 30 mM Imidazol) vier Mal gewaschen, wobei nach jeden Waschschrift erneut für eine 1 min zentrifugiert wird. Nun folgt wahlweise die Markierung mit Cy3 oder Cy5 (je nachdem, welche Markierung noch nicht durchgeführt wurde, siehe Kapitel 6.11.4) und vier Waschschriften mit Waschpuffer inkl. Imidazol. Um die Proteine nun von der Ni²⁺-NTA-Agarose zu lösen, folgt die Elution zwei Mal mit je 50 µl Elutionspuffer (mit 100 mM Imidazol und 10 mM EDTA) für je 5 min schüttelnd bei RT. Das eluierte Protein wird bei 0°C aufbewahrt. Es folgt die Auftrennung der Proteine über SDS- bzw. BN-PAGE.

6.12 Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Alle Gele sind frisch gegossen und bestehen aus einem 4%igen Sammelgel und einem 10%igen Trenngel. Zunächst wird die Gelkammer bestehend aus zwei Glasplatten (vorher mit 70%igem EtOH säubern) und den entsprechenden Abstandshaltern mit Klemmen zusammengebaut. Das Trenngel wird wie unten beschrieben hergestellt, in die Kammer gegossen und direkt mit Wasser überschichtet. Nach mindestens 30 min sollte die Polymerisierung beendet sein, sodass das 4%ige Sammelgel folgen kann. Direkt nach Befüllung der Kammer muss der Kamm für die Proben eingeführt werden und es folgt die Polymerisierung.

Trenngel 10%ig für SDS

4,45 ml Bidest H₂O

2,25 ml 4x Puffer (1,5 Tris/HCl pH 8,8/0,4% Li-SDS)

2,25 ml 40% Acrylamid (AA)/bis-Acrylamid (bis-AA) (29:1), BioRad

4,5 µl TEMED 100% (N,N,N',N'-Tetramethylethyldiamin)

gut durchmischen, möglichst entgasen

45 µl APS 10% (frisch!) dazu geben

Sammelgel 4%ig für SDS

3,18 ml Bidest H₂O

1,26 ml 4x Puffer (0,5 Tris/HCl pH 6,8/0,4% Li-SDS)

0,5 ml 40% AA/bis-AA (29:1), BioRad

5 µl TEMED 100%, dann gut durchmischen, möglichst entgasen

25 µl APS 10% (frisch!) dazu geben

Das frische SDS-Gel wird in die Kammer gegeben und mit dem Laufpuffer befüllt. Die Proben bestehen aus 20 µl der solubilisierten Rezeptoren und 5 µl 5x Sample Buffer und DTT (Dithiothreitol), welche Disulfidbrücken durch Reduktion spalten. Die Proben werden vor dem Auftragen 5 min bei 37°C erwärmt. Das Gel wird mit den Proben und den Markern (All Blue, BioRad) geladen und mit 125 Volt durch das Trenngel laufen gelassen und dann mit 100 Volt durch das Sammelgel laufen gelassen, solange bis die blaue Front komplett raus gelaufen ist. Das Gel wird dann in der Mitte der Marker durchgeschnitten. Anschließend erfolgt die Detektion der Cy3, Cy5 und TMRM gefärbten Proben sowie die Konstrukte, die ein YFP enthalten mit Hilfe des Typhoon fluorimetrisch. Für alle Proben folgt der Western Blot.

6.13 Blaue Native Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Wie auch bei der SDS-PAGE sind alle Gele für die Blaue Native Polyacrylamid-Gelelektrophorese BN-PAGE frisch hergestellt. Das Gel besteht aus dem Gradientengel I (16%ig), II (4%ig) und einem überschichteten Sammelgel. Die Lösungen für das Gradientengel I und II werden zeitgleich unter rühren in die Gelkammer gegeben. Erst wenn dies auspolymerisiert ist folgt das Sammelgel mit dem Kamm.

Gradientengel I 16%ig für BN-PAGE

1,9 ml Gelpuffer nativ 3x
3,1 ml Acrylamid (30% AA/0,8% bis-AA)
1,0 ml Glycerin
4 µl TEMED 100%
→ mischen
20 µl APS 10% (frisch!)

Gradientengel II 4%ig für BN-PAGE

1,9 ml Gelpuffer nativ 3x
0,8 ml Acrylamid (30% AA/0,8% bis-AA)
3,2 ml Glycerin
4 µl TEMED 100%
→ mischen
20 µl APS 10% (frisch!)

Sammelgel 4%ig für BN-PAGE

1,67 ml Gelpuffer
0,667 ml AA
2,64 ml H₂O
4 µl TEMED
20 µl APS 10%

Die Kammer wird nun vollständig zusammen gebaut und der Kathodenpuffer in die obere Kammer gegeben sowie der Anodenpuffer in die untere Kammer. Von den solubilisierten Rezeptoren werden die Proben folgendermaßen vorbereitet:

BN-Proben

15 µl solubilisierte Rezeptoren

15 µl Schägger-Buffer

8 µl Blue Native Sample-Buffer 5x

2 µl H₂O

Das Gel wird mit den Proben und den Markern geladen und mit 100 Volt durch das Sammelgel und dann mit 125 Volt durch das Gradientengel laufen gelassen, solange bis die blaue Front komplett raus gelaufen ist. Es folgt der Western Blot.

6.14 Western Blot

Nach der Auftrennung der Proteine über das SDS- oder BN-Gel folgt der Western Blot. Dafür wird eine PVDF-Membran und 6 Filter entsprechend der Größe des Gels zurecht geschnitten. Die Membran wird zunächst in 100% MeOH eingelegt und dann in 40 ml Blot-Puffer + 10 ml MeOH, damit lipophile Proteine an die Membran binden können. Die Filter werden direkt in BN-Puffer eingelegt. Drei Filter, die Membran, das Gel und erneut drei Filter werden übereinander gestapelt und ein senkrechtes elektrisches Feld mit 25 Volt angelegt. Dabei diffundieren die Proteine aus dem Gel auf die Membran. Anschließend werden die unspezifischen Bindungsstellen auf der Membran mit Milchlosung mindestens 2 h oder über Nacht bei 4°C geblockt. Der erste Antikörper (AK) gegen die entsprechende Markierung (Strep oder His) wird 1:1000 in Milchlosung verdünnt und 1,5-2 h in eingeschweiten Folien schüttelnd inkubiert. Dann wird 4 x mit Milchlosung für je 5 min gewaschen und dann mit dem zweiten Antikörper ECL (mit Meerrettichperoxidase) für 1 h bei RT mit 70 rpm inkubiert. Anschließend erfolgt erneut 4 x waschen je 5 min mit der Milchlosung und 1 x mit TBS. Das Immobilon Western Kit von Millipore wird nun benutzt. Dabei werden 2 ml HRP Substrate Peroxidase Solution und 2 ml HRP Substrate Luminol Solution gemischt, auf die Membran gegeben und 5 min bei RT inkubiert. Dabei wird durch die Meerrettichperoxidase am zweiten Antikörper das zugefügte Substrat Luminol unter Chemilumineszenzfreisetzung umgesetzt. Dieses Chemilumineszenzsignal kann nun entweder mittels Detektor (BioRad) oder per Auflegen eines Röntgenfilms mit anschließender Entwicklung detektiert werden.

7 Abkürzungsverzeichnis

7.1 Allgemeine Abkürzungen

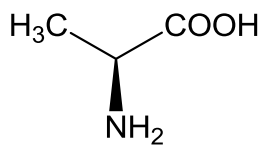
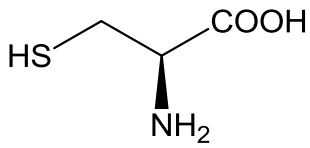
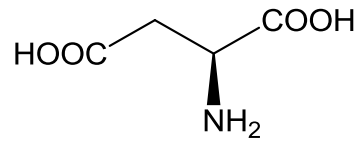
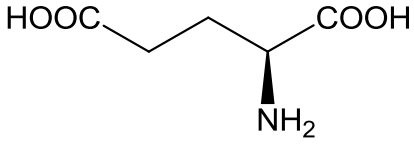
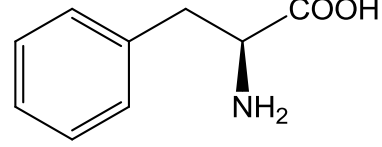
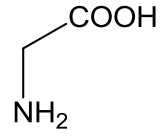
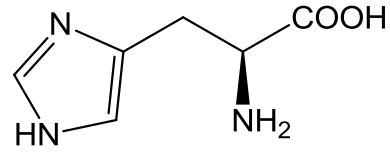
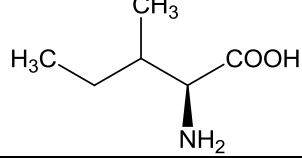
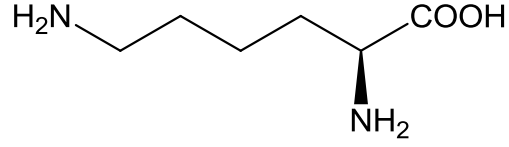
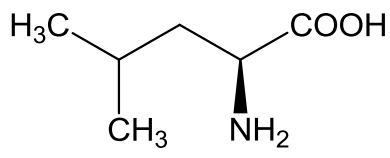
Ψ	Retrovirales Verpackungssignal
AA	Acrylamid
A _{2A}	Adenosin-A _{2A} -Rezeptor
A _{2B}	Adenosin-A _{2B} -Rezeptor
AC	Adenylatcyclase
ADA	Adenosindesaminase
AMP	Adenosinmonophosphat
APS	Amoniumpersulfat
ATP	Adenosintriphosphat
BAY60-6583	2-[6-Amino-3,5-dicyano-4-[4-(cyclopropylmethoxy)phenyl]pyridin-2-ylsulfanyl]acetamid
BCN	Barcelona (Labor von Prof. Dr. Rafael Franco)
bis-AA	bis-Acrylamid
B _{max}	Maximale Bindungsstellen
BN	Bonn
bp	Basenpaar(e)
Bq	Bequerel (Zerfälle pro Sekunde)
BRET	Biolumineszenz Resonanz Energie Transfer
BRET ₅₀	
BRET _{Max}	
BSA	Bovines Serum-Albumin
CADO	2-Chloradenosin
cAMP	cyclisches Adenosin-3',5'-monophosphat
CHO	Chinesische Hamster Ovarien
Ci	Curie (1 Ci = 37 GBq)
CNG-Kanal	cyclisches Nucleotid-gesteuerter Ionenkanal
cpm	counts per minute gezählte radioaktive Zerfälle pro Minute
DAG	Diacylglycerol
DMEM	Dulbecco's modified Eagle Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonucleinsäure

dNTP	Desoxy-Nucleotide
DOR	δ -opioid-Rezeptor
DPCPX	8-Cyclopentyl-1,3-dipropylxanthin
DEPC	Diethylpyrocarbonat
DPM	Zahl der Zerfälle pro Minute
DTT	Dithiothreitol
<i>E.coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EC ₅₀	Halbmaximale effektive Konzentration
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EL 1-3/IL 1-3	Extra- /Intrazelluläre Schleife 1-3
EL 2	zweite extrazelluläre Schleife
ELISA	Enzym-linked Immunosorbent Assay
ER	Endoplasmatisches Retikulum
ERK1/2	Extrazelluläre signal-regulierende Kinase
f	Forward (vorwärts)
FCS	Fötales Kälberserum
FDA	US Food and Drug Administration
FRET	Fluoreszenz-Resonanz-Energie-Transfer
g	Erdbeschleunigung
G418	Geneticinsulfat
GABA	γ -Aminobuttersäure
GDP	Guanosindiphosphat
GF/B	Glasfaserfilter vom Typ B
GFP ²	Green Fluorescent Protein
Gö	Göttingen (Labor von PD. Dr. Annette Nicke)
GPCR	G-Protein-gekoppelter Rezeptor
GRK2/3	G-Protein-gekoppelte Rezeptorkinase 2/3
GTP	Guanosintriphosphat
h	human oder Stunde
HA	Hämagglutinin
HEPES	2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)- ethansulfonsäure
HIF	Hypoxie-induzierbarer Faktor

[³ H]PSB-603	[³ H]8-(4-(4-(4-Chlorphenyl)piperazin-1-sulfonyl)phenyl)-1-propylxanthin
HXM	Hypoxanthin, Xanthin, Mycophenolsäure
IC ₅₀	Halbmaximale Inhibitionskonzentration
IL	Interleukin
IP3	Inositol-3,4,5-trisphosphat
k ₋₁ , k ₊₁	Geschwindigkeitskonstanten bei Reaktionen
K _D	Dissoziationskonstante
kDa	Kilodalton
K _i	Inhibitionskonstante
KO	Knock out
KOR	κ-opioid-Rezeptor
L	Ligand
LB-Medium	Lennox-Broth-Medium
LB _{amp}	LB-Medium mit Ampicillin
LR	Komplex aus Ligand und Rezeptor
LSC	Flüssigszintillations-Zähler
m-/μ-/nM	milli-/mikro-/nanomolar
MAP	Mitogen aktiviertes Protein
min	Minute
MOR	μ-opioid-Rezeptor
mRNA	Messenger Ribonucleinsäure
n	Anzahl der durchgeführten Versuche
n.b.	Nicht bestimmbar
NEB	New England BioLabs
NECA	5'-N-Ethylcarboxamidoadenosin
Ni ²⁺ -NTA-Agarose	Nickel-Nitrilotriaceticacid-Agarose
ns	Nicht signifikant
OD	Optische Dichte
OG	Octylglycosid
PBS	Phosphate Buffered Saline Phosphat gepufferte isotonische Kochsalzlösung
PCR	Polymerase Kettenreaktion
PKA/PKB/PKC	Proteinkinase A, B, C

PLC	Phospholipase C
PS	Penicillin/Streptomycin
PSB-1115	1-Propyl-8-p-sulfophenylxanthin
PSB-603	8-(4(4(4-Chlorphenyl)piperazin-1-sulfonyl)phenyl)-1-propylxanthin
PVDF-Membran	Polyvinylidenfluorid
r	Reverse (rückwärts)
R	Rezeptor in der inaktiven Konformation
R*	Rezeptor in der aktiven Konformation
Rluc	Renilla luciferase
RNA	Ribonucleinsäure
rpm	Umdrehungen pro Minute
RT	Raumtemperatur bzw. Reverse Transkriptase
s	Sekunde
SEM	Standardfehler des Mittelwertes
SOC	Super Optimal Broth mit Glukose
t	Zeit
TAE	TRIS-Acetat-EDTA
T _m	Schmelztemperatur
TM1-7	Transmembrandomäne 1-7
TMRM	Tetramethylrhodaminmethylester
TRIS	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
U	Unit (Einheit)
UV	Ultraviolett
VSV-G	Vesikulären Stomatitis-Virus-G-Protein
Wt	Wildtyp
YFP	Yellow Fluorescent Protein

7.2 Abkürzungen von Aminosäuren

Einbuchstabencode	Abkürzung	Aminosäure	Struktur
A	Ala	Alanin	
C	Cys	Cystein	
D	Asp	Asparaginsäure	
E	Glu	Glutaminsäure	
F	Phe	Phenylalanin	
G	Gly	Glycin	
H	His	Histidin	
I	Ile	Isoleucin	
K	Lys	Lysin	
L	Leu	Leucin	

Einbuchstabencode	Abkürzung	Aminosäure	Struktur
M	Met	Methionin	
N	Asn	Asparagin	
P	Pro	Prolin	
Q	Gln	Glutamin	
R	Arg	Arginin	
S	Ser	Serin	
T	Thr	Threonin	
V	Val	Valin	
W	Trp	Tryptophan	
Y	Tyr	Tyrosin	

8 Literaturverzeichnis

1. Gonzaga-Jauregui, C.; Lupski, J. R.; Gibbs, R. A. Human genome sequencing in health and disease. *Annu. Rev. Med.* **2012**, *63*, 35-61.
2. International Human Genome Sequencing Consortium, I. Finishing the euchromatic sequence of the human genome. *Nature* **2004**, *431*, 931-945.
3. Magalhaes, A. C.; Dunn, H.; Ferguson, S. S. Regulation of GPCR activity, trafficking and localization by GPCR-interacting proteins. *Br. J. Pharmacol.* **2012**, *165*, 1717-1736.
4. Wang, D.; Li, Y.; Zhang, Y.; Liu, Y.; Shi, G. High throughput screening (HTS) in identification new ligands and drugable targets of G protein-coupled receptors (GPCRs). *Comb. Chem. High Throughput Screen* **2012**, *15*, 232-241.
5. Jean-Alphonse, F.; Hanyaloglu, A. C. Regulation of GPCR signal networks via membrane trafficking. *Mol. Cell Endocrinol.* **2011**, *331*, 205-214.
6. Milligan, G.; Kostenis, E. Heterotrimeric G-proteins: a short history. *Br. J. Pharmacol.* **2006**, *147 Suppl. 1*, S46-55.
7. Mary, S.; Damian, M.; Louet, M.; Floquet, N.; Fehrentz, J. A.; Marie, J.; Martinez, J.; Baneres, J. L. Ligands and signaling proteins govern the conformational landscape explored by a G protein-coupled receptor. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* **2012**, *109*, 8304-8309.
8. Seibt, B. F. Charakterisierung der Adenosin-A_{2B}-Rezeptor-Ligand-Interaktion durch Mutagenesestudien und pharmakologische Experimente. Diplomarbeit, *Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität, Bonn*, **2008**.
9. Tuteja, N. Signaling through G protein coupled receptors. *Plant Signal. Behav.* **2009**, *4*, 942-947.
10. Birnbaumer, L. Expansion of signal transduction by G proteins. The second 15 years or so: from 3 to 16 alpha subunits plus betagamma dimers. *Biochim. Biophys. Acta.* **2007**, *1768*, 772-793.
11. Milligan, G. G-protein-coupled receptor heterodimers: pharmacology, function and relevance to drug discovery. *Drug Discov. Today* **2006**, *11*, 541-549.
12. Simon, M. I.; Strathmann, M. P.; Gautam, N. Diversity of G proteins in signal transduction. *Science* **1991**, *252*, 802-808.
13. Knospe, M. Molekularbiologie und Pharmakologie neuer G-Protein-gekoppelter Purin-Rezeptoren. Dissertation, *Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität, Bonn*, **2012**.

14. Pierce, K. L.; Lefkowitz, R. J. Classical and new roles of beta-arrestins in the regulation of G-protein-coupled receptors. *Nat. Rev. Neurosci.* **2001**, *2*, 727-733.
15. Krishnan, A.; Almen, M. S.; Fredriksson, R.; Schioth, H. B. The origin of GPCRs: identification of mammalian like Rhodopsin, Adhesion, Glutamate and Frizzled GPCRs in fungi. *PLoS. One* **2012**, *7*, e29817.
16. Jacoby, E.; Bouhelal, R.; Gerspacher, M.; Seuwen, K. The 7 TM G-protein-coupled receptor target family. *Chem. Med. Chem.* **2006**, *1*, 761-782.
17. Pierce, K. L.; Premont, R. T.; Lefkowitz, R. J. Seven-transmembrane receptors. *Nature Reviews. Molecular Cell Biology* **2002**, *3*, 639-650.
18. Luttrell, L. M. Transmembrane signaling by G protein-coupled receptors. *Methods Mol. Biol.* **2006**, *332*, 3-49.
19. Palczewski, K.; Kumasaka, T.; Hori, T.; Behnke, C. A.; Motoshima, H.; Fox, B. A.; Le Trong, I.; Teller, D. C.; Okada, T.; Stenkamp, R. E.; Yamamoto, M.; Miyano, M. Crystal structure of rhodopsin: A G protein-coupled receptor. *Science* **2000**, *289*, 739-745.
20. Tate, C. G. A crystal clear solution for determining G-protein-coupled receptor structures. *Trends Biochem. Sci.* **2012**, *37*, 343-352.
21. Jacobson, K. A.; Costanzi, S. New insights for drug design from the x-ray crystallographic structures of g-protein-coupled receptors. *Mol. Pharmacol.* **2012**, *82*, 361-371.
22. Rasmussen, S. G.; Choi, H. J.; Rosenbaum, D. M.; Kobilka, T. S.; Thian, F. S.; Edwards, P. C.; Burghammer, M.; Ratnala, V. R.; Sanishvili, R.; Fischetti, R. F.; Schertler, G. F.; Weis, W. I.; Kobilka, B. K. Crystal structure of the human beta2 adrenergic G-protein-coupled receptor. *Nature* **2007**, *450*, 383-387.
23. Warne, T.; Serrano-Vega, M. J.; Baker, J. G.; Moukhametzianov, R.; Edwards, P. C.; Henderson, R.; Leslie, A. G.; Tate, C. G.; Schertler, G. F. Structure of a beta1-adrenergic G-protein-coupled receptor. *Nature* **2008**, *454*, 486-491.
24. Shimamura, T.; Hiraki, K.; Takahashi, N.; Hori, T.; Ago, H.; Masuda, K.; Takio, K.; Ishiguro, M.; Miyano, M. Crystal structure of squid rhodopsin with intracellularly extended cytoplasmic region. *J. Biol. Chem.* **2008**, *283*, 17753-17756.
25. Jaakola, V. P.; Griffith, M. T.; Hanson, M. A.; Cherezov, V.; Chien, E. Y.; Lane, J. R.; Ijzerman, A. P.; Stevens, R. C. The 2.6 angstrom crystal structure of a human A_{2A} adenosine receptor bound to an antagonist. *Science* **2008**, *322*, 1211-1217.

26. Wu, B.; Chien, E. Y.; Mol, C. D.; Fenalti, G.; Liu, W.; Katritch, V.; Abagyan, R.; Brooun, A.; Wells, P.; Bi, F. C.; Hamel, D. J.; Kuhn, P.; Handel, T. M.; Cherezov, V.; Stevens, R. C. Structures of the CXCR4 chemokine GPCR with small-molecule and cyclic peptide antagonists. *Science* **2010**, *330*, 1066-1071.
27. Chien, E. Y.; Liu, W.; Zhao, Q.; Katritch, V.; Han, G. W.; Hanson, M. A.; Shi, L.; Newman, A. H.; Javitch, J. A.; Cherezov, V.; Stevens, R. C. Structure of the human dopamine D₃ receptor in complex with a D₂/D₃ selective antagonist. *Science* **2010**, *330*, 1091-1095.
28. Shimamura, T.; Shiroishi, M.; Weyand, S.; Tsujimoto, H.; Winter, G.; Katritch, V.; Abagyan, R.; Cherezov, V.; Liu, W.; Han, G. W.; Kobayashi, T.; Stevens, R. C.; Iwata, S. Structure of the human histamine H₁ receptor complex with doxepin. *Nature* **2011**, *475*, 65-70.
29. Haga, K.; Kruse, A. C.; Asada, H.; Yurugi-Kobayashi, T.; Shiroishi, M.; Zhang, C.; Weis, W. I.; Okada, T.; Kobilka, B. K.; Haga, T.; Kobayashi, T. Structure of the human M₂ muscarinic acetylcholine receptor bound to an antagonist. *Nature* **2012**, *482*, 547-551.
30. Kruse, A. C.; Hu, J.; Pan, A. C.; Arlow, D. H.; Rosenbaum, D. M.; Rosemond, E.; Green, H. F.; Liu, T.; Chae, P. S.; Dror, R. O.; Shaw, D. E.; Weis, W. I.; Wess, J.; Kobilka, B. K. Structure and dynamics of the M₃ muscarinic acetylcholine receptor. *Nature* **2012**, *482*, 552-556.
31. Hanson, M. A.; Roth, C. B.; Jo, E.; Griffith, M. T.; Scott, F. L.; Reinhart, G.; Desale, H.; Clemons, B.; Cahalan, S. M.; Schuerer, S. C.; Sanna, M. G.; Han, G. W.; Kuhn, P.; Rosen, H.; Stevens, R. C. Crystal structure of a lipid G protein-coupled receptor. *Science* **2012**, *335*, 851-855.
32. Wu, H.; Wacker, D.; Mileni, M.; Katritch, V.; Han, G. W.; Vardy, E.; Liu, W.; Thompson, A. A.; Huang, X. P.; Carroll, F. I.; Mascarella, S. W.; Westkaemper, R. B.; Mosier, P. D.; Roth, B. L.; Cherezov, V.; Stevens, R. C. Structure of the human kappa-opioid receptor in complex with JDTic. *Nature* **2012**, *485*, 327-332.
33. Manglik, A.; Kruse, A. C.; Kobilka, T. S.; Thian, F. S.; Mathiesen, J. M.; Sunahara, R. K.; Pardo, L.; Weis, W. I.; Kobilka, B. K.; Granier, S. Crystal structure of the μ -opioid receptor bound to a morphinan antagonist. *Nature* **2012**, *485*, 321-326.
34. Granier, S.; Manglik, A.; Kruse, A. C.; Kobilka, T. S.; Thian, F. S.; Weis, W. I.; Kobilka, B. K. Structure of the delta-opioid receptor bound to naltrindole. *Nature* **2012**, *485*, 400-404.
35. Thompson, A. A.; Liu, W.; Chun, E.; Katritch, V.; Wu, H.; Vardy, E.; Huang, X. P.; Trapella, C.; Guerrini, R.; Calo, G.; Roth, B. L.; Cherezov, V.; Stevens, R. C. Structure of the nociceptin/orphanin FQ receptor in complex with a peptide mimetic. *Nature* **2012**, *485*, 395-399.

36. Peeters, M. C.; van Westen, G. J.; Li, Q.; Ijzerman, A. P. Importance of the extracellular loops in G protein-coupled receptors for ligand recognition and receptor activation. *Trends Pharmacol. Sci.* **2011**, *32*, 35-42.
37. Park, P. S. Ensemble of G protein-coupled receptor active states. *Curr. Med. Chem.* **2012**, *19*, 1146-1154.
38. Lebon, G.; Warne, T.; Edwards, P. C.; Bennett, K.; Langmead, C. J.; Leslie, A. G.; Tate, C. G. Agonist-bound adenosine A_{2A} receptor structures reveal common features of GPCR activation. *Nature* **2011**, *474*, 521-525.
39. Xu, F.; Wu, H.; Katritch, V.; Han, G. W.; Jacobson, K. A.; Gao, Z. G.; Cherezov, V.; Stevens, R. C. Structure of an agonist-bound human A_{2A} adenosine receptor. *Science* **2011**, *332*, 322-327.
40. Dore, A. S.; Robertson, N.; Errey, J. C.; Ng, I.; Hollenstein, K.; Tehan, B.; Hurrell, E.; Bennett, K.; Congreve, M.; Magnani, F.; Tate, C. G.; Weir, M.; Marshall, F. H. Structure of the adenosine A_{2A} receptor in complex with ZM241385 and the xanthines XAC and caffeine. *Structure* **2011**, *19*, 1283-1293.
41. Hino, T.; Arakawa, T.; Iwanari, H.; Yurugi-Kobayashi, T.; Ikeda-Suno, C.; Nakada-Nakura, Y.; Kusano-Arai, O.; Weyand, S.; Shimamura, T.; Nomura, N.; Cameron, A. D.; Kobayashi, T.; Hamakubo, T.; Iwata, S.; Murata, T. G-protein-coupled receptor inactivation by an allosteric inverse-agonist antibody. *Nature* **2012**, *482*, 237-240.
42. Congreve, M.; Andrews, S. P.; Dore, A. S.; Hollenstein, K.; Hurrell, E.; Langmead, C. J.; Mason, J. S.; Ng, I. W.; Tehan, B.; Zhukov, A.; Weir, M.; Marshall, F. H. Discovery of 1,2,4-triazine derivatives as adenosine A_{2A} antagonists using structure based drug design. *J. Med. Chem.* **2012**, *55*, 1898-1903.
43. Peeters, M. C.; van Westen, G. J.; Guo, D.; Wisse, L. E.; Müller, C. E.; Beukers, M. W.; Ijzerman, A. P. GPCR structure and activation: an essential role for the first extracellular loop in activating the adenosine A_{2B} receptor. *Faseb J.* **2010**.
44. Schiedel, A. C.; Hinz, S.; Thimm, D.; Sherbiny, F.; Borrmann, T.; Maass, A.; Müller, C. E. The four cysteine residues in the second extracellular loop of the human adenosine A_{2B} receptor: role in ligand binding and receptor function. *Biochem. Pharmacol.* **2011**, *82*, 389-399.
45. Borrmann, T.; Abdelrahman, A.; Volpini, R.; Lambertucci, C.; Alksnis, E.; Gorzalka, S.; Knospe, M.; Schiedel, A. C.; Cristalli, G.; Müller, C. E. Structure-activity relationships of adenine and deazaadenine derivatives as ligands for adenine receptors, a new purinergic receptor family. *J. Med. Chem.* **2009**, *52*, 5974-5989.

46. Fredholm, B. B.; AP, I. J.; Jacobson, K. A.; Klotz, K. N.; Linden, J. International Union of Pharmacology. XXV. Nomenclature and classification of adenosine receptors. *Pharmacol. Rev.* **2001**, *53*, 527-552.
47. Burnstock, G.; Kennedy, C. Is there a basis for distinguishing two types of P2-purinoceptor? *Gen. Pharmacol.* **1985**, *16*, 433-440.
48. Fredholm, B. B.; Abbracchio, M. P.; Burnstock, G.; Daly, J. W.; Harden, T. K.; Jacobson, K. A.; Leff, P.; Williams, M. Nomenclature and classification of purinoceptors. *Pharmacol. Rev.* **1994**, *46*, 143-156.
49. Gorzalka, S.; Vittori, S.; Volpini, R.; Cristalli, G.; von Kugelgen, I.; Müller, C. E. Evidence for the functional expression and pharmacological characterization of adenine receptors in native cells and tissues. *Mol. Pharmacol.* **2005**, *67*, 955-964.
50. von Kugelgen, I.; Schiedel, A. C.; Hoffmann, K.; Alsdorf, B. B.; Abdelrahman, A.; Müller, C. E. Cloning and functional expression of a novel G_i protein-coupled receptor for adenine from mouse brain. *Mol. Pharmacol.* **2008**, *73*, 469-477.
51. Rittiner, J. E.; Korboukh, I.; Hull-Ryde, E. A.; Jin, J.; Janzen, W. P.; Frye, S. V.; Zylka, M. J. AMP is an adenosine A₁ receptor agonist. *J. Biol. Chem.* **2012**, *287*, 5301-5309.
52. Jacobson, K. A. Introduction to adenosine receptors as therapeutic targets. *Handb. Exp. Pharmacol.* **2009**, 1-24.
53. Rücker, B.; Almeida, M. E.; Libermann, T. A.; Zerbini, L. F.; Wink, M. R.; Sarkis, J. J. E-NTPDases and ecto-5'-nucleotidase expression profile in rat heart left ventricle and the extracellular nucleotide hydrolysis by their nerve terminal endings. *Life Sci.* **2008**, *82*, 477-486.
54. <http://www.rote-liste.de/Online>, Rote Liste Online. 15. September **2012**.
55. Hopkins, A. L.; Groom, C. R. The druggable genome. *Nat. Rev. Drug Discov.* **2002**, *1*, 727-730.
56. Bouvier, M. Oligomerization of G-protein-coupled transmitter receptors. *Nature Reviews Neuroscience* **2001**, *2*, 274-286.
57. Milligan, G. G protein-coupled receptor hetero-dimerization: contribution to pharmacology and function. *Br. J. Pharmacol.* **2009**, *158*, 5-14.
58. Berque-Bestel, I.; Lezoualc'h, F.; Jockers, R. Bivalent ligands as specific pharmacological tools for G protein-coupled receptor dimers. *Curr. Drug. Discov. Technol.* **2008**, *5*, 312-318.

59. Casado, V.; Cortes, A.; Mallol, J.; Perez-Capote, K.; Ferre, S.; Lluís, C.; Franco, R.; Canela, E. I. GPCR homomers and heteromers: a better choice as targets for drug development than GPCR monomers? *Pharmacol. Ther.* **2009**, *124*, 248-257.
60. Bain, D. L.; Heneghan, A. F.; Connaghan-Jones, K. D.; Miura, M. T. Nuclear receptor structure: implications for function. *Annu. Rev. Physiol.* **2007**, *69*, 201-220.
61. Heldin, C. H. Dimerization of cell surface receptors in signal transduction. *Cell* **1995**, *80*, 213-223.
62. Milligan, G.; Ramsay, D.; Pascal, G.; Carrillo, J. J. GPCR dimerisation. *Life Sci.* **2003**, *74*, 181-188.
63. Lohse, M. J. Dimerization in GPCR mobility and signaling. *Curr. Opin. Pharmacol.* **2009**, *10*, 53-58.
64. Conn, P. M.; Rogers, D. C.; Stewart, J. M.; Niedel, J.; Sheffield, T. Conversion of a gonadotropin-releasing hormone antagonist to an agonist. *Nature* **1982**, *296*, 653-655.
65. Adachi, T.; Alam, R. The mechanism of IL-5 signal transduction. *Am. J. Physiol.* **1998**, *275*, C623-633.
66. Gurevich, V. V.; Gurevich, E. V. How and why do GPCRs dimerize? *Trends Pharmacol. Sci.* **2008**, *29*, 234-240.
67. Ernst, O. P.; Gramse, V.; Kolbe, M.; Hofmann, K. P.; Heck, M. Monomeric G protein-coupled receptor rhodopsin in solution activates its G protein transducin at the diffusion limit. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* **2007**, *104*, 10859-10864.
68. Damian, M.; Mary, S.; Martin, A.; Pin, J. P.; Baneres, J. L. G protein activation by the leukotriene B₄ receptor dimer. Evidence for an absence of trans-activation. *J. Biol. Chem.* **2008**, *283*, 21084-21092.
69. White, J. H.; Wise, A.; Marshall, F. H. Heterodimerization of gamma-aminobutyric acid B receptor subunits as revealed by the yeast two-hybrid system. *Methods* **2002**, *27*, 301-310.
70. Ferre, S.; Baler, R.; Bouvier, M.; Caron, M. G.; Devi, L. A.; Durroux, T.; Fuxe, K.; George, S. R.; Javitch, J. A.; Lohse, M. J.; Mackie, K.; Milligan, G.; Pflieger, K. D.; Pin, J. P.; Volkow, N. D.; Waldhoer, M.; Woods, A. S.; Franco, R. Building a new conceptual framework for receptor heteromers. *Nat. Chem. Biol.* **2009**, *5*, 131-134.
71. Millar, R. P.; Newton, C. L. The year in G protein-coupled receptor research. *Mol. Endocrinol.* **2010**, *24*, 261-274.

72. Khelashvili, G.; Dorff, K.; Shan, J.; Camacho-Artacho, M.; Skrabanek, L.; Vroling, B.; Bouvier, M.; Devi, L. A.; George, S. R.; Javitch, J. A.; Lohse, M. J.; Milligan, G.; Neubig, R. R.; Palczewski, K.; Parmentier, M.; Pin, J. P.; Vriend, G.; Campagne, F.; Filizola, M. GPCR-OKB: the G Protein Coupled Receptor Oligomer Knowledge Base. *Bioinformatics* **2010**, *26*, 1804-1805.
73. Skrabanek, L.; Murcia, M.; Bouvier, M.; Devi, L.; George, S. R.; Lohse, M. J.; Milligan, G.; Neubig, R.; Palczewski, K.; Parmentier, M.; Pin, J. P.; Vriend, G.; Javitch, J. A.; Campagne, F.; Filizola, M. Requirements and ontology for a G protein-coupled receptor oligomerization knowledge base. *BMC Bioinformatics* **2007**, *8*, 177.
74. Ciruela, F.; Casado, V.; Mallol, J.; Canela, E. I.; Lluís, C.; Franco, R. Immunological identification of A₁ adenosine receptors in brain cortex. *J. Neurosci. Res.* **1995**, *42*, 818-828.
75. Gandia, J.; Galino, J.; Amaral, O. B.; Soriano, A.; Lluís, C.; Franco, R.; Ciruela, F. Detection of higher-order G protein-coupled receptor oligomers by a combined BRET-BiFC technique. *FEBS Lett.* **2008**, *582*, 2979-2984.
76. Lukaszewicz, S.; Blasiak, E.; Faron-Gorecka, A.; Polit, A.; Tworzydło, M.; Gorecki, A.; Wasylewski, Z.; Dziedzicka-Wasylewska, M. Fluorescence studies of homooligomerization of adenosine A_{2A} and serotonin 5-HT_{1A} receptors reveal the specificity of receptor interactions in the plasma membrane. *Pharmacol. Rep.* **2007**, *59*, 379-392.
77. Vidi, P. A.; Chen, J.; Irudayaraj, J. M.; Watts, V. J. Adenosine A_{2A} receptors assemble into higher-order oligomers at the plasma membrane. *FEBS Lett.* **2008**, *582*, 3985-3990.
78. Fanelli, F.; Felling, A. Dimerization and ligand binding affect the structure network of A_{2A} adenosine receptor. *Biochim. Biophys. Acta* **2010**.
79. May, L. T.; Bridge, L. J.; Stoddart, L. A.; Briddon, S. J.; Hill, S. J. Allosteric interactions across native adenosine-A₃ receptor homodimers: quantification using single-cell ligand-binding kinetics. *Faseb J.* **2011**.
80. AbdAlla, S.; Lothar, H.; Quitterer, U. AT1-receptor heterodimers show enhanced G-protein activation and altered receptor sequestration. *Nature* **2000**, *407*, 94-98.
81. Miura, S.; Karnik, S. S.; Saku, K. Constitutively active homo-oligomeric angiotensin II type 2 receptor induces cell signaling independent of receptor conformation and ligand stimulation. *J. Biol. Chem.* **2005**, *280*, 18237-18244.

82. Mercier, J. F.; Salahpour, A.; Angers, S.; Breit, A.; Bouvier, M. Quantitative assessment of beta 1- and beta 2-adrenergic receptor homo- and heterodimerization by bioluminescence resonance energy transfer. *J. Biol. Chem.* **2002**, *277*, 44925-44931.
83. Hebert, T. E.; Moffett, S.; Morello, J. P.; Loisel, T. P.; Bichet, D. G.; Barret, C.; Bouvier, M. A peptide derived from a beta2-adrenergic receptor transmembrane domain inhibits both receptor dimerization and activation. *J. Biol. Chem.* **1996**, *271*, 16384-16392.
84. AbdAlla, S.; Zaki, E.; Lothar, H.; Quitterer, U. Involvement of the amino terminus of the B₂ receptor in agonist-induced receptor dimerization. *J. Biol. Chem.* **1999**, *274*, 26079-26084.
85. Floyd, D. H.; Geva, A.; Bruinsma, S. P.; Overton, M. C.; Blumer, K. J.; Baranski, T. J. C5a receptor oligomerization. II. Fluorescence resonance energy transfer studies of a human G protein-coupled receptor expressed in yeast. *J. Biol. Chem.* **2003**, *278*, 35354-35361.
86. Mellado, M.; Rodriguez-Frade, J. M.; Vila-Coro, A. J.; Fernandez, S.; Martin de Ana, A.; Jones, D. R.; Toran, J. L.; Martinez, A. C. Chemokine receptor homo- or heterodimerization activates distinct signaling pathways. *Embo J.* **2001**, *20*, 2497-2507.
87. Vila-Coro, A. J.; Rodriguez-Frade, J. M.; Martin De Ana, A.; Moreno-Ortiz, M. C.; Martinez, A. C.; Mellado, M. The chemokine SDF-1alpha triggers CXCR4 receptor dimerization and activates the JAK/STAT pathway. *Faseb J.* **1999**, *13*, 1699-1710.
88. George, S. R.; Lee, S. P.; Varghese, G.; Zeman, P. R.; Seeman, P.; Ng, G. Y.; O'Dowd, B. F. A transmembrane domain-derived peptide inhibits D₁ dopamine receptor function without affecting receptor oligomerization. *J. Biol. Chem.* **1998**, *273*, 30244-30248.
89. Lee, S. P.; O'Dowd, B. F.; Ng, G. Y.; Varghese, G.; Akil, H.; Mansour, A.; Nguyen, T.; George, S. R. Inhibition of cell surface expression by mutant receptors demonstrates that D₂ dopamine receptors exist as oligomers in the cell. *Mol. Pharmacol.* **2000**, *58*, 120-128.
90. Armstrong, D.; Strange, P. G. Dopamine D₂ receptor dimer formation: evidence from ligand binding. *J. Biol. Chem.* **2001**, *276*, 22621-22629.
91. Nimchinsky, E. A.; Hof, P. R.; Janssen, W. G.; Morrison, J. H.; Schmauss, C. Expression of dopamine D₃ receptor dimers and tetramers in brain and in transfected cells. *J. Biol. Chem.* **1997**, *272*, 29229-29237.

92. Ng, G. Y.; Clark, J.; Coulombe, N.; Ethier, N.; Hebert, T. E.; Sullivan, R.; Kargman, S.; Chateaufneuf, A.; Tsukamoto, N.; McDonald, T.; Whiting, P.; Mezey, E.; Johnson, M. P.; Liu, Q.; Kolakowski, L. F., Jr.; Evans, J. F.; Bonner, T. I.; O'Neill, G. P. Identification of a GABAB receptor subunit, gb2, required for functional GABAB receptor activity. *J. Biol. Chem.* **1999**, *274*, 7607-7610.
93. Chazenbalk, G. D.; Kakinuma, A.; Jaume, J. C.; McLachlan, S. M.; Rapoport, B. Evidence for negative cooperativity among human thyrotropin receptors overexpressed in mammalian cells. *Endocrinology* **1996**, *137*, 4586-4591.
94. Overton, M. C.; Blumer, K. J. G-protein-coupled receptors function as oligomers in vivo. *Curr. Biol.* **2000**, *10*, 341-344.
95. Fukushima, Y.; Asano, T.; Saitoh, T.; Anai, M.; Funaki, M.; Ogihara, T.; Katagiri, H.; Matsushashi, N.; Yazaki, Y.; Sugano, K. Oligomer formation of histamine H₂ receptors expressed in Sf9 and COS7 cells. *FEBS Lett.* **1997**, *409*, 283-286.
96. Nguyen, T.; Shapiro, D. A.; George, S. R.; Setola, V.; Lee, D. K.; Cheng, R.; Rauser, L.; Lee, S. P.; Lynch, K. R.; Roth, B. L.; O'Dowd, B. F. Discovery of a novel member of the histamine receptor family. *Mol. Pharmacol.* **2001**, *59*, 427-433.
97. Paila, Y. D.; Kombrabail, M.; Krishnamoorthy, G.; Chattopadhyay, A. Oligomerization of the serotonin_{1A} receptor in live cells: a time-resolved fluorescence anisotropy approach. *J. Phys. Chem. B.* **2011**, *115*, 11439-11447.
98. Ng, G. Y.; George, S. R.; Zastawny, R. L.; Caron, M.; Bouvier, M.; Dennis, M.; O'Dowd, B. F. Human serotonin_{1B} receptor expression in Sf9 cells: phosphorylation, palmitoylation, and adenylyl cyclase inhibition. *Biochemistry* **1993**, *32*, 11727-11733.
99. Lee, S. P.; Xie, Z.; Varghese, G.; Nguyen, T.; O'Dowd, B. F.; George, S. R. Oligomerization of Dopamine and Serotonin Receptors. *Neuropsychopharmacology* **2000**, *23*, S32-S40.
100. Brea, J.; Castro, M.; Giraldo, J.; Lopez-Gimenez, J. F.; Padin, J. F.; Quintian, F.; Cadavid, M. I.; Vilaro, M. T.; Mengod, G.; Berg, K. A.; Clarke, W. P.; Vilaro, J. P.; Milligan, G.; Loza, M. I. Evidence for distinct antagonist-revealed functional states of 5-hydroxytryptamine_{2A} receptor homodimers. *Mol. Pharmacol.* **2009**, *75*, 1380-1391.
101. Abe, J.; Suzuki, H.; Notoya, M.; Yamamoto, T.; Hirose, S. Ig-hepta, a novel member of the G protein-coupled hepta-helical receptor (GPCR) family that has immunoglobulin-like repeats in a long N-terminal extracellular domain and defines a new subfamily of GPCRs. *J. Biol. Chem.* **1999**, *274*, 19957-19964.

102. Indrapichate, K.; Meehan, D.; Lane, T. A.; Chu, S. Y.; Rao, C. V.; Johnson, D.; Chen, T. T.; Wimalasena, J. Biological actions of monoclonal luteinizing hormone/human chorionic gonadotropin receptor antibodies. *Biol. Reprod.* **1992**, *46*, 265-278.
103. Ayoub, M. A.; Couturier, C.; Lucas-Meunier, E.; Angers, S.; Fossier, P.; Bouvier, M.; Jockers, R. Monitoring of ligand-independent dimerization and ligand-induced conformational changes of melatonin receptors in living cells by bioluminescence resonance energy transfer. *J. Biol. Chem.* **2002**, *277*, 21522-21528.
104. Kunishima, N.; Shimada, Y.; Tsuji, Y.; Sato, T.; Yamamoto, M.; Kumasaka, T.; Nakanishi, S.; Jingami, H.; Morikawa, K. Structural basis of glutamate recognition by a dimeric metabotropic glutamate receptor. *Nature* **2000**, *407*, 971-977.
105. Rondard, P.; Liu, J.; Huang, S.; Malhaire, F.; Vol, C.; Pinault, A.; Labesse, G.; Pin, J. P. Coupling of agonist binding to effector domain activation in metabotropic glutamate-like receptors. *J. Biol. Chem.* **2006**, *281*, 24653-24661.
106. Kniazeff, J.; Bessis, A. S.; Maurel, D.; Ansanay, H.; Prezeau, L.; Pin, J. P. Closed state of both binding domains of homodimeric mGlu receptors is required for full activity. *Nat. Struct. Mol. Biol.* **2004**, *11*, 706-713.
107. Romano, C.; Yang, W. L.; O'Malley, K. L. Metabotropic glutamate receptor 5 is a disulfide-linked dimer. *J. Biol. Chem.* **1996**, *271*, 28612-28616.
108. Hern, J. A.; Baig, A. H.; Mashanov, G. I.; Birdsall, B.; Corrie, J. E.; Lazareno, S.; Molloy, J. E.; Birdsall, N. J. Formation and dissociation of M₁ muscarinic receptor dimers seen by total internal reflection fluorescence imaging of single molecules. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* **2009**, *107*, 2693-2698.
109. Wreggett, K. A.; Wells, J. W. Cooperativity manifest in the binding properties of purified cardiac muscarinic receptors. *J. Biol. Chem.* **1995**, *270*, 22488-22499.
110. McMillin, S. M.; Heusel, M.; Liu, T.; Costanzi, S.; Wess, J. Structural basis of M₃ muscarinic receptor dimer/oligomer formation. *J. Biol. Chem.* **2011**, *286*, 28584-28598.
111. Zeng, F. Y.; Wess, J. Identification and molecular characterization of m₃ muscarinic receptor dimers. *J. Biol. Chem.* **1999**, *274*, 19487-19497.
112. Dinger, M. C.; Bader, J. E.; Kobor, A. D.; Kretschmar, A. K.; Beck-Sickinger, A. G. Homodimerization of neuropeptide y receptors investigated by fluorescence resonance energy transfer in living cells. *J. Biol. Chem.* **2003**, *278*, 10562-10571.

113. Cvejic, S.; Devi, L. A. Dimerization of the delta opioid receptor: implication for a role in receptor internalization. *J. Biol. Chem.* **1997**, *272*, 26959-26964.
114. Jordan, B. A.; Devi, L. A. G-protein-coupled receptor heterodimerization modulates receptor function. *Nature* **1999**, *399*, 697-700.
115. George, S. R.; Fan, T.; Xie, Z.; Tse, R.; Tam, V.; Varghese, G.; O'Dowd, B. F. Oligomerization of mu- and delta-opioid receptors. Generation of novel functional properties. *J. Biol. Chem.* **2000**, *275*, 26128-26135.
116. Pfeiffer, M.; Koch, T.; Schroder, H.; Klutzny, M.; Kirscht, S.; Kreienkamp, H. J.; Holtt, V.; Schulz, S. Homo- and heterodimerization of somatostatin receptor subtypes. Inactivation of sst₃ receptor function by heterodimerization with sst_{2A}. *J. Biol. Chem.* **2001**, *276*, 14027-14036.
117. Rocheville, M.; Lange, D. C.; Kumar, U.; Sasi, R.; Patel, R. C.; Patel, Y. C. Subtypes of the somatostatin receptor assemble as functional homo- and heterodimers. *J. Biol. Chem.* **2000**, *275*, 7862-7869.
118. Schulz, A.; Grosse, R.; Schultz, G.; Gudermann, T.; Schoneberg, T. Structural implication for receptor oligomerization from functional reconstitution studies of mutant V2 vasopressin receptors. *J. Biol. Chem.* **2000**, *275*, 2381-2389.
119. Ciruela, F.; Casado, V.; Rodrigues, R. J.; Lujan, R.; Burgueno, J.; Canals, M.; Borycz, J.; Rebola, N.; Goldberg, S. R.; Mallol, J.; Cortes, A.; Canela, E. I.; Lopez-Gimenez, J. F.; Milligan, G.; Lluís, C.; Cunha, R. A.; Ferre, S.; Franco, R. Presynaptic control of striatal glutamatergic neurotransmission by adenosine A₁-A_{2A} receptor heteromers. *J. Neurosci.* **2006**, *26*, 2080-2087.
120. Gines, S.; Hillion, J.; Torvinen, M.; Le Crom, S.; Casado, V.; Canela, E. I.; Rondin, S.; Lew, J. Y.; Watson, S.; Zoli, M.; Agnati, L. F.; Verniera, P.; Lluís, C.; Ferre, S.; Fuxe, K.; Franco, R. Dopamine D₁ and adenosine A₁ receptors form functionally interacting heteromeric complexes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* **2000**, *97*, 8606-8611.
121. Ciruela, F.; Escriche, M.; Burgueno, J.; Angulo, E.; Casado, V.; Soloviev, M. M.; Canela, E. I.; Mallol, J.; Chan, W. Y.; Lluís, C.; McIlhinney, R. A.; Franco, R. Metabotropic glutamate 1alpha and adenosine A₁ receptors assemble into functionally interacting complexes. *J. Biol. Chem.* **2001**, *276*, 18345-18351.
122. Yoshioka, K.; Saitoh, O.; Nakata, H. Heteromeric association creates a P2Y-like adenosine receptor. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* **2001**, *98*, 7617-7622.
123. Suzuki, T.; Namba, K.; Tsuga, H.; Nakata, H. Regulation of pharmacology by hetero-oligomerization between A₁ adenosine receptor and P2Y₂ receptor. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2006**, *351*, 559-565.

124. Navarro, G.; Carriba, P.; Gandia, J.; Ciruela, F.; Casado, V.; Cortes, A.; Mallol, J.; Canela, E. I.; Lluís, C.; Franco, R. Detection of heteromers formed by cannabinoid CB₁, dopamine D₂, and adenosine A_{2A} G-protein-coupled receptors by combining bimolecular fluorescence complementation and bioluminescence energy transfer. *ScientificWorldJournal* **2008**, *8*, 1088-1097.
125. Hillion, J.; Canals, M.; Torvinen, M.; Casado, V.; Scott, R.; Terasmaa, A.; Hansson, A.; Watson, S.; Olah, M. E.; Mallol, J.; Canela, E. I.; Zoli, M.; Agnati, L. F.; Ibanez, C. F.; Lluís, C.; Franco, R.; Ferre, S.; Fuxe, K. Coaggregation, cointernalization, and codesensitization of adenosine A_{2A} receptors and dopamine D₂ receptors. *J. Biol. Chem.* **2002**, *277*, 18091-18097.
126. Torvinen, M.; Marcellino, D.; Canals, M.; Agnati, L. F.; Lluís, C.; Franco, R.; Fuxe, K. Adenosine A_{2A} receptor and dopamine D₃ receptor interactions: evidence of functional A_{2A}/D₃ heteromeric complexes. *Mol. Pharmacol.* **2005**, *67*, 400-407.
127. Cabello, N.; Gandia, J.; Bertarelli, D. C.; Watanabe, M.; Lluís, C.; Franco, R.; Ferre, S.; Lujan, R.; Ciruela, F. Metabotropic glutamate type 5, dopamine D₂ and adenosine A_{2A} receptors form higher-order oligomers in living cells. *J. Neurochem.* **2009**, *109*, 1497-1507.
128. AbdAlla, S.; Lothar, H.; Abdel-tawab, A. M.; Quitterer, U. The angiotensin II AT₂ receptor is an AT₁ receptor antagonist. *J. Biol. Chem.* **2001**, *276*, 39721-39726.
129. Rozenfeld, R.; Gupta, A.; Gagnidze, K.; Lim, M. P.; Gomes, I.; Lee-Ramos, D.; Nieto, N.; Devi, L. A. AT₁R-CB₁R heteromerization reveals a new mechanism for the pathogenic properties of angiotensin II. *Embo J.* **2011**, *30*, 2350-2363.
130. Hudson, B. D.; Hebert, T. E.; Kelly, M. E. Ligand- and heterodimer-directed signaling of the CB₁ cannabinoid receptor. *Mol. Pharmacol.* **2010**, *77*, 1-9.
131. Ellis, J.; Pediani, J. D.; Canals, M.; Milasta, S.; Milligan, G. Orexin-1 receptor-cannabinoid CB₁ receptor heterodimerization results in both ligand-dependent and -independent coordinated alterations of receptor localization and function. *J. Biol. Chem.* **2006**, *281*, 38812-38824.
132. Sohy, D.; Parmentier, M.; Springael, J. Y. Allosteric transinhibition by specific antagonists in CCR2/CXCR4 heterodimers. *J. Biol. Chem.* **2007**, *282*, 30062-30069.
133. Isik, N.; Hereld, D.; Jin, T. Fluorescence resonance energy transfer imaging reveals that chemokine-binding modulates heterodimers of CXCR4 and CCR5 receptors. *PLoS. One* **2008**, *3*, e3424.

134. Lee, S. P.; So, C. H.; Rashid, A. J.; Varghese, G.; Cheng, R.; Lanca, A. J.; O'Dowd, B. F.; George, S. R. Dopamine D₁ and D₂ receptor Co-activation generates a novel phospholipase C-mediated calcium signal. *J. Biol. Chem.* **2004**, *279*, 35671-35678.
135. Marcellino, D.; Ferre, S.; Casado, V.; Cortes, A.; Le Foll, B.; Mazzola, C.; Drago, F.; Saur, O.; Stark, H.; Soriano, A.; Barnes, C.; Goldberg, S. R.; Lluís, C.; Fuxe, K.; Franco, R. Identification of dopamine D₁-D₃ receptor heteromers. Indications for a role of synergistic D₁-D₃ receptor interactions in the striatum. *J. Biol. Chem.* **2008**, *283*, 26016-26025.
136. Scarselli, M.; Novi, F.; Schallmach, E.; Lin, R.; Baragli, A.; Colzi, A.; Griffon, N.; Corsini, G. U.; Sokoloff, P.; Levenson, R.; Vogel, Z.; Maggio, R. D₂/D₃ dopamine receptor heterodimers exhibit unique functional properties. *J. Biol. Chem.* **2001**, *276*, 30308-30314.
137. So, C. H.; Verma, V.; Alijaniam, M.; Cheng, R.; Rashid, A. J.; O'Dowd, B. F.; George, S. R. Calcium signaling by dopamine D₅ receptor and D₅-D₂ receptor hetero-oligomers occurs by a mechanism distinct from that for dopamine D₁-D₂ receptor hetero-oligomers. *Mol. Pharmacol.* **2009**, *75*, 843-854.
138. González, S.; Moreno-Delgado, D.; Moreno, E.; Perez-Capote, K.; Franco, R.; Mallol, J.; Cortes, A.; Casado, V.; Lluís, C.; Ortiz, J.; Ferre, S.; Canela, E.; McCormick, P. J. Circadian-related heteromerization of adrenergic and dopamine D₄ receptors modulates melatonin synthesis and release in the pineal gland. *PLoS Biol.* **2012**, *10*, e1001347.
139. Kaupmann, K.; Malitschek, B.; Schuler, V.; Heid, J.; Froestl, W.; Beck, P.; Mosbacher, J.; Bischoff, S.; Kulik, A.; Shigemoto, R.; Karschin, A.; Bettler, B. GABA_B-receptor subtypes assemble into functional heteromeric complexes. *Nature* **1998**, *396*, 683-687.
140. Maurel, D.; Comps-Agrar, L.; Brock, C.; Rives, M. L.; Bourrier, E.; Ayoub, M. A.; Bazin, H.; Tinel, N.; Durroux, T.; Prezeau, L.; Trinquet, E.; Pin, J. P. Cell-surface protein-protein interaction analysis with time-resolved FRET and snap-tag technologies: application to GPCR oligomerization. *Nat. Methods* **2008**, *5*, 561-567.
141. Hlavackova, V.; Goudet, C.; Kniazeff, J.; Zikova, A.; Maurel, D.; Vol, C.; Trojanova, J.; Prezeau, L.; Pin, J. P.; Blahos, J. Evidence for a single heptahelical domain being turned on upon activation of a dimeric GPCR. *Embo J.* **2005**, *24*, 499-509.
142. Salim, K.; Fenton, T.; Bacha, J.; Urien-Rodriguez, H.; Bonnert, T.; Skynner, H. A.; Watts, E.; Kerby, J.; Heald, A.; Beer, M.; McAllister, G.; Guest, P. C. Oligomerization of G-protein-coupled receptors shown by selective co-immunoprecipitation. *J. Biol. Chem.* **2002**, *277*, 15482-15485.

143. Terrillon, S.; Durroux, T.; Mouillac, B.; Breit, A.; Ayoub, M. A.; Taulan, M.; Jockers, R.; Barberis, C.; Bouvier, M. Oxytocin and vasopressin V1a and V2 receptors form constitutive homo- and heterodimers during biosynthesis. *Mol. Endocrinol.* **2003**, *17*, 677-691.
144. Xie, Z.; Lee, S. P.; O'Dowd, B. F.; George, S. R. Serotonin 5-HT_{1B} and 5-HT_{1D} receptors form homodimers when expressed alone and heterodimers when co-expressed. *FEBS Lett.* **1999**, *456*, 63-67.
145. Gonzalez-Maeso, J.; Ang, R. L.; Yuen, T.; Chan, P.; Weisstaub, N. V.; Lopez-Gimenez, J. F.; Zhou, M.; Okawa, Y.; Callado, L. F.; Milligan, G.; Gingrich, J. A.; Filizola, M.; Meana, J. J.; Sealfon, S. C. Identification of a serotonin/glutamate receptor complex implicated in psychosis. *Nature* **2008**, *452*, 93-97.
146. Delille, H. K.; Becker, J. M.; Burkhardt, S.; Bleher, B.; Terstappen, G. C.; Schmidt, M.; Meyer, A. H.; Unger, L.; Marek, G. J.; Mezler, M. Heterocomplex formation of 5-HT_{2A}-mGlu₂ and its relevance for cellular signaling cascades. *Neuropharmacology* **2012**, *62*, 2184-2191.
147. Maggio, R.; Barbier, P.; Colelli, A.; Salvadori, F.; Demontis, G.; Corsini, G. U. G protein-linked receptors: pharmacological evidence for the formation of heterodimers. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **1999**, *291*, 251-257.
148. Jordan, B. A.; Trapaidze, N.; Gomes, I.; Nivarthi, R.; Devi, L. A. Oligomerization of opioid receptors with beta 2-adrenergic receptors: a role in trafficking and mitogen-activated protein kinase activation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* **2001**, *98*, 343-348.
149. Damian, M.; Martin, A.; Mesnier, D.; Pin, J. P.; Baneres, J. L. Asymmetric conformational changes in a GPCR dimer controlled by G-proteins. *Embo J.* **2006**, *25*, 5693-5702.
150. Guo, W.; Shi, L.; Javitch, J. A. The fourth transmembrane segment forms the interface of the dopamine D₂ receptor homodimer. *J. Biol. Chem.* **2003**, *278*, 4385-4388.
151. Johnston, J. M.; Aburi, M.; Provasi, D.; Bortolato, A.; Urizar, E.; Lambert, N. A.; Javitch, J. A.; Filizola, M. Making structural sense of dimerization interfaces of delta opioid receptor homodimers. *Biochemistry* **2011**, *50*, 1682-1690.
152. Kaczor, A. A.; Selent, J. Oligomerization of G protein-coupled receptors: biochemical and biophysical methods. *Curr. Med. Chem.* **2011**, *18*, 4606-4634.

153. Bhushan, R. G.; Sharma, S. K.; Xie, Z.; Daniels, D. J.; Portoghese, P. S. A bivalent ligand (KDN-21) reveals spinal delta and kappa opioid receptors are organized as heterodimers that give rise to delta(1) and kappa(2) phenotypes. Selective targeting of delta-kappa heterodimers. *J. Med. Chem.* **2004**, *47*, 2969-2972.
154. Hasbi, A.; Nguyen, T.; Fan, T.; Cheng, R.; Rashid, A.; Alijaniam, M.; Rasenick, M. M.; O'Dowd, B. F.; George, S. R. Trafficking of preassembled opioid mu-delta heterooligomer-Gz signaling complexes to the plasma membrane: coregulation by agonists. *Biochemistry* **2007**, *46*, 12997-13009.
155. Rozenfeld, R.; Devi, L. A. Exploring a role for heteromerization in GPCR signalling specificity. *Biochem. J.* **2011**, *433*, 11-18.
156. Vilardaga, J. P.; Nikolaev, V. O.; Lorenz, K.; Ferrandon, S.; Zhuang, Z.; Lohse, M. J. Conformational cross-talk between alpha2A-adrenergic and mu-opioid receptors controls cell signaling. *Nat. Chem. Biol.* **2008**, *4*, 126-131.
157. Pfeiffer, M.; Kirscht, S.; Stumm, R.; Koch, T.; Wu, D.; Laugsch, M.; Schroder, H.; Hollt, V.; Schulz, S. Heterodimerization of substance P and mu-opioid receptors regulates receptor trafficking and resensitization. *J. Biol. Chem.* **2003**, *278*, 51630-51637.
158. Lee, C.; Ji, I.; Ryu, K.; Song, Y.; Conn, P. M.; Ji, T. H. Two defective heterozygous luteinizing hormone receptors can rescue hormone action. *J. Biol. Chem.* **2002**, *277*, 15795-15800.
159. Kasai, R. S.; Suzuki, K. G.; Prossnitz, E. R.; Koyama-Honda, I.; Nakada, C.; Fujiwara, T. K.; Kusumi, A. Full characterization of GPCR monomer-dimer dynamic equilibrium by single molecule imaging. *J. Cell Biol.* **2011**, *192*, 463-480.
160. Pellissier, L. P.; Barthet, G.; Gaven, F.; Cassier, E.; Trinquet, E.; Pin, J. P.; Marin, P.; Dumuis, A.; Bockaert, J.; Baneres, J. L.; Claeysen, S. G protein activation by serotonin type 4 receptor dimers: evidence that turning on two protomers is more efficient. *J. Biol. Chem.* **2011**.
161. Fonseca, J. M.; Lambert, N. A. Instability of a class a G protein-coupled receptor oligomer interface. *Mol. Pharmacol.* **2009**, *75*, 1296-1299.
162. Daniels, D. J.; Lenard, N. R.; Etienne, C. L.; Law, P. Y.; Roerig, S. C.; Portoghese, P. S. Opioid-induced tolerance and dependence in mice is modulated by the distance between pharmacophores in a bivalent ligand series. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* **2005**, *102*, 19208-19213.

163. Portoghese, P. S.; Larson, D. L.; Sayre, L. M.; Yim, C. B.; Ronsisvalle, G.; Tam, S. W.; Takemori, A. E. Opioid agonist and antagonist bivalent ligands. The relationship between spacer length and selectivity at multiple opioid receptors. *J. Med. Chem.* **1986**, *29*, 1855-1861.
164. Cheng, Z. J.; Miller, L. J. Agonist-dependent dissociation of oligomeric complexes of G protein-coupled cholecystokinin receptors demonstrated in living cells using bioluminescence resonance energy transfer. *J. Biol. Chem.* **2001**, *276*, 48040-48047.
165. Kaczor, A. A.; Selent, J. Oligomerization of G Protein-Coupled Receptors: Biochemical and Biophysical Methods. *Curr Med Chem* **2011**.
166. Cottet, M.; Faklaris, O.; Maurel, D.; Scholler, P.; Doumazane, E.; Trinquet, E.; Pin, J. P.; Durroux, T. BRET and Time-resolved FRET strategy to study GPCR oligomerization: from cell lines toward native tissues. *Front. Endocrinol. (Lausanne)* **2012**, *3*, 92.
167. Agnati, L. F.; Guidolin, D.; Albertin, G.; Trivello, E.; Ciruela, F.; Genedani, S.; Tarakanov, A.; Fuxe, K. An integrated view on the role of receptor mosaics at perisynaptic level: focus on adenosine A_{2A}, dopamine D₂, cannabinoid CB₁, and metabotropic glutamate mGlu₅ receptors. *J. Recept. Signal. Transduct. Res.* **2010**, *30*, 355-369.
168. Golebiewska, U.; Johnston, J. M.; Devi, L. A.; Filizola, M.; Scarlata, S. F. Differential Response to Morphine of the Oligomeric State of mu- Opioid in the Presence of delta- Opioid Receptors. *Biochemistry* **2011**.
169. Comps-Agrar, L.; Kniazeff, J.; Norskov-Lauritsen, L.; Maurel, D.; Gassmann, M.; Gregor, N.; Prezeau, L.; Bettler, B.; Durroux, T.; Trinquet, E.; Pin, J. P. The oligomeric state sets GABA_B receptor signalling efficacy. *Embo J.* **2011**, *30*, 2336-2349.
170. Jiang, X.; Su, L.; Zhang, Q.; He, C.; Zhang, Z.; Yi, P.; Liu, J. GABA_B receptor complex as a potential target for tumor therapy. *J. Histochem. Cytochem.* **2012**, *60*, 269-279.
171. Jacobson, K. A.; Gao, Z. G. Adenosine receptors as therapeutic targets. *Nat. Rev. Drug. Discov.* **2006**, *5*, 247-264.
172. Fredholm, B. B.; Ijzerman, A. P.; Jacobson, K. A.; Linden, J.; Müller, C. E. International Union of Basic and Clinical Pharmacology. LXXXI. Nomenclature and classification of adenosine receptors--an update. *Pharmacol. Rev.* **2011**, *63*, 1-34.
173. Schulte, G.; Fredholm, B. B. Signalling from adenosine receptors to mitogen-activated protein kinases. *Cell Signal* **2003**, *15*, 813-827.

174. Cohen, M. V.; Yang, X.; Downey, J. M. A_{2B} adenosine receptors can change their spots. *Br. J. Pharmacol.* **2010**, *159*, 1595-1597.
175. Mozzicato, S.; Joshi, B. V.; Jacobson, K. A.; Liang, B. T. Role of direct RhoA-phospholipase D₁ interaction in mediating adenosine-induced protection from cardiac ischemia. *Faseb J.* **2004**, *18*, 406-408.
176. Ibrsimovic, E.; Drobny, H.; Yang, Q.; Hofer, T.; Boehm, S.; Nanoff, C.; Schicker, K. Constitutive activity of the A_{2A} adenosine receptor and compartmentalised cyclic AMP signalling fine-tune noradrenaline release. *Purinergic Signal* **2012**.
177. Hasko, G.; Csoka, B.; Nemeth, Z. H.; Vizi, E. S.; Pacher, P. A_{2B} adenosine receptors in immunity and inflammation. *Trends Immunol.* **2009**, *30*, 263-270.
178. Aherne, C. M.; Kewley, E. M.; Eltzhig, H. K. The resurgence of A_{2B} adenosine receptor signaling. *Biochim. Biophys. Acta* **2010**.
179. Kong, T.; Westerman, K. A.; Faigle, M.; Eltzhig, H. K.; Colgan, S. P. HIF-dependent induction of adenosine A_{2B} receptor in hypoxia. *Faseb J.* **2006**, *20*, 2242-2250.
180. Wen, J.; Jiang, X.; Dai, Y.; Zhang, Y.; Tang, Y.; Sun, H.; Mi, T.; Phatarpekar, P. V.; Kellems, R. E.; Blackburn, M. R.; Xia, Y. Increased adenosine contributes to penile fibrosis, a dangerous feature of priapism, via A_{2B} adenosine receptor signaling. *Faseb J.* **2010**, *24*, 740-749.
181. Huang, Z. L.; Urade, Y.; Hayaishi, O. The role of adenosine in the regulation of sleep. *Curr. Top Med. Chem.* **2011**, *11*, 1047-1057.
182. Milne, G. R.; Palmer, T. M. Anti-inflammatory and immunosuppressive effects of the A_{2A} adenosine receptor. *ScientificWorldJournal* **2011**, *11*, 320-339.
183. Martini, C.; Daniele, S.; Picchetti, M.; Panighini, A.; Carlini, M.; Trincavelli, M. L.; Cesari, D.; Da Pozzo, E.; Golia, F.; Dell'Osso, L. A_{2A} adenosine receptor binding parameters in platelets from patients affected by pathological gambling. *Neuropsychobiology* **2011**, *63*, 154-159.
184. Gessi, S.; Varani, K.; Merighi, S.; Ongini, E.; Borea, P. A. A_{2A} adenosine receptors in human peripheral blood cells. *Br. J. Pharmacol.* **2000**, *129*, 2-11.
185. Cristalli, G.; Vittori, S.; Thompson, R. D.; Padgett, W. L.; Shi, D.; Daly, J. W.; Olsson, R. A. Inhibition of platelet aggregation by adenosine receptor agonists. *Naunyn. Schmiedebergs Arch. Pharmacol.* **1994**, *349*, 644-650.

186. Jiang, M.; Zhang, C.; Wang, J.; Chen, J.; Xia, C.; Du, D.; Zhao, N.; Cao, Y.; Shen, L.; Zhu, D. Adenosine A_{2A}R modulates cardiovascular function by activating ERK1/2 signal in the rostral ventrolateral medulla of acute myocardial ischemic rats. *Life Sci.* **2011**, *89*, 182-187.
187. Armentero, M. T.; Pinna, A.; Ferre, S.; Lanciego, J. L.; Müller, C. E.; Franco, R. Past, present and future of A_{2A} adenosine receptor antagonists in the therapy of Parkinson's disease. *Pharmacol. Ther.* **2011**, *132*, 280-299.
188. Drabczynska, A.; Zygmunt, M.; Sapa, J.; Filipek, B.; Müller, C. E.; Kiec-Kononowicz, K. Antiparkinsonian effects of novel adenosine A_{2A} receptor antagonists. *Arch. Pharm. (Weinheim)* **2011**, *344*, 20-27.
189. Ham, J.; Rees, D. A. The adenosine A_{2B} receptor: its role in inflammation. *Endocr. Metab. Immune. Disord. Drug Targets* **2008**, *8*, 244-254.
190. Hasko, G.; Linden, J.; Cronstein, B.; Pacher, P. Adenosine receptors: therapeutic aspects for inflammatory and immune diseases. *Nat. Rev. Drug Discov.* **2008**, *7*, 759-770.
191. Rudich, N.; Ravid, K.; Sagi-Eisenberg, R. Mast cell adenosine receptors function: a focus on the A₃ adenosine receptor and inflammation. *Front. Immunol.* **2012**, *3*, 134.
192. <http://www.fachinfo.de>, Fachinformation. 15. September **2012**.
193. Müller, C. E.; Jacobson, K. A. Recent developments in adenosine receptor ligands and their potential as novel drugs. *Biochim. Biophys. Acta* **2011**, *1808*, 1290-1308.
194. Zoghbi, G. J.; Iskandrian, A. E. Selective adenosine agonists and myocardial perfusion imaging. *J. Nucl. Cardiol.* **2012**, *19*, 126-141.
195. Iskandrian, A. E.; Bateman, T. M.; Belardinelli, L.; Blackburn, B.; Cerqueira, M. D.; Hendel, R. C.; Lieu, H.; Mahmarian, J. J.; Olmsted, A.; Underwood, S. R.; Vitola, J.; Wang, W. Adenosine versus regadenoson comparative evaluation in myocardial perfusion imaging: results of the ADVANCE phase 3 multicenter international trial. *J. Nucl. Cardiol.* **2007**, *14*, 645-658.
196. Mor-Avi, V.; Lodato, J. A.; Kachenoura, N.; Chandra, S.; Freed, B. H.; Newby, B.; Lang, R. M.; Patel, A. R. Quantitative three-dimensional evaluation of myocardial perfusion during regadenoson stress using multidetector computed tomography. *J. Comput. Assist. Tomogr.* **2012**, *36*, 443-449.
197. Müller, C. E.; Jacobson, K. A. Xanthines as adenosine receptor antagonists. *Handb. Exp. Pharmacol.* **2011**, 151-199.

198. <http://www.clinicaltrials.gov>, Klinische Studien. 13. September **2012**.
199. Luijk, B.; van den Berge, M.; Kerstjens, H. A.; Postma, D. S.; Cass, L.; Sabin, A.; Lammers, J. W. Effect of an inhaled adenosine A_{2A} agonist on the allergen-induced late asthmatic response. *Allergy* **2008**, *63*, 75-80.
200. Silverman, M. H.; Strand, V.; Markovits, D.; Nahir, M.; Reitblat, T.; Molad, Y.; Rosner, I.; Rozenbaum, M.; Mader, R.; Adawi, M.; Caspi, D.; Tishler, M.; Langevitz, P.; Rubinow, A.; Friedman, J.; Green, L.; Tanay, A.; Ochaion, A.; Cohen, S.; Kerns, W. D.; Cohn, I.; Fishman-Furman, S.; Farbstein, M.; Yehuda, S. B.; Fishman, P. Clinical evidence for utilization of the A₃ adenosine receptor as a target to treat rheumatoid arthritis: data from a phase II clinical trial. *J. Rheumatol.* **2008**, *35*, 41-48.
201. Koscsó, B.; Csoka, B.; Pacher, P.; Haskó, G. Investigational A₃ adenosine receptor targeting agents. *Expert Opin. Investig. Drugs* **2011**, *20*, 757-768.
202. Müller, C. E.; Jacobson, K. A. Recent developments in adenosine receptor ligands and their potential as novel drugs. *Biochim. Biophys. Acta* **2010**.
203. Mi, T.; Abbasi, S.; Zhang, H.; Uray, K.; Chunn, J. L.; Xia, L. W.; Molina, J. G.; Weisbrodt, N. W.; Kellems, R. E.; Blackburn, M. R.; Xia, Y. Excess adenosine in murine penile erectile tissues contributes to priapism via A_{2B} adenosine receptor signaling. *J. Clin. Invest.* **2008**, *118*, 1491-1501.
204. Popoli, P.; Pepponi, R. Potential Therapeutic Relevance of Adenosine A_{2B} and A_{2A} Receptors in the Central Nervous System. *CNS Neurol. Disord. Drug Targets* **2012**.
205. Johnston-Cox, H.; Koupenova, M.; Yang, D.; Corkey, B.; Gokce, N.; Farb, M. G.; Lebrasseur, N.; Ravid, K. The A_{2B} adenosine receptor modulates glucose homeostasis and obesity. *PLoS. One* **2012**, *7*, e40584.
206. Cekic, C.; Sag, D.; Li, Y.; Theodorescu, D.; Strieter, R. M.; Linden, J. Adenosine A_{2B} receptor blockade slows growth of bladder and breast tumors. *J. Immunol.* **2012**, *188*, 198-205.
207. Kolachala, V. L.; Vijay-Kumar, M.; Dalmaso, G.; Yang, D.; Linden, J.; Wang, L.; Gewirtz, A.; Ravid, K.; Merlin, D.; Sitaraman, S. V. A_{2B} adenosine receptor gene deletion attenuates murine colitis. *Gastroenterology* **2008**, *135*, 861-870.
208. Wei, J.; Yu, W. Q.; Gao, Q. Z. Advances in the study of A_{2B} adenosine receptor antagonists. *Yao. Xue. Xue. Bao* **2008**, *43*, 241-246.
209. Grenz, A.; Osswald, H.; Eckle, T.; Yang, D.; Zhang, H.; Tran, Z. V.; Klingel, K.; Ravid, K.; Eltzschig, H. K. The reno-vascular A_{2B} adenosine receptor protects the kidney from ischemia. *PLoS. Med.* **2008**, *5*, e137.

210. Gütschow, M.; Schlenk, M.; Gab, J.; Paskaleva, M.; Alnouri, M. W.; Scolari, S.; Iqbal, J.; Müller, C. E. Benzothiazinones: a novel class of adenosine receptor antagonists structurally unrelated to xanthine and adenine derivatives. *J. Med. Chem.* **2012**, *55*, 3331-3341.
211. Sherbiny, F. F.; Schiedel, A. C.; Maass, A.; Müller, C. E. Homology modelling of the human adenosine A_{2B} receptor based on X-ray structures of bovine rhodopsin, the beta2-adrenergic receptor and the human adenosine A_{2A} receptor. *J. Comput. Aided Mol. Des.* **2009**, *23*, 807-828.
212. Shi, L.; Javitch, J. A. The second extracellular loop of the dopamine D₂ receptor lines the binding-site crevice. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* **2004**, *101*, 440-445.
213. Baneres, J. L.; Mesnier, D.; Martin, A.; Joubert, L.; Dumuis, A.; Bockaert, J. Molecular characterization of a purified 5-HT₄ receptor: a structural basis for drug efficacy. *J. Biol. Chem.* **2005**, *280*, 20253-20260.
214. Kim, J.; Jiang, Q.; Glashofer, M.; Yehle, S.; Wess, J.; Jacobson, K. A. Glutamate residues in the second extracellular loop of the human A_{2A} adenosine receptor are required for ligand recognition. *Mol. Pharmacol.* **1996**, *49*, 683-691.
215. Klco, J. M.; Wiegand, C. B.; Narzinski, K.; Baranski, T. J. Essential role for the second extracellular loop in C5a receptor activation. *Nat. Struct. Mol. Biol.* **2005**, *12*, 320-326.
216. de Graaf, C.; Foata, N.; Engkvist, O.; D., R. Molecular modeling of the second extracellular loop of G-protein coupled receptors and its implication on structure-based virtual screening. *Proteins* **2008**, *71*, 599-620.
217. Kim, Y. C.; de Zwart, M.; Chang, L.; Moro, S.; von Frijtag Drabbe Kunzel, J. K.; Melman, N.; AP, I. J.; Jacobson, K. A. Derivatives of the triazoloquinazoline adenosine antagonist (CGS 15943) having high potency at the human A_{2B} and A₃ receptor subtypes. *J. Med. Chem.* **1998**, *41*, 2835-2845.
218. Ivanov, A. A.; Baskin, II; Palyulin, V. A.; Piccagli, L.; Baraldi, P. G.; Zefirov, N. S. Molecular modeling and molecular dynamics simulation of the human A_{2B} adenosine receptor. The study of the possible binding modes of the A_{2B} receptor antagonists. *J. Med. Chem.* **2005**, *48*, 6813-6820.
219. Ivanov, A. A.; Wang, B.; Klutz, A. M.; Chen, V. L.; Gao, Z. G.; Jacobson, K. A. Probing distal regions of the A_{2B} adenosine receptor by quantitative structure-activity relationship modeling of known and novel agonists. *J. Med. Chem.* **2008**, *51*, 2088-2099.
220. Cheng, F.; Xu, Z.; Liu, G.; Tang, Y. Insights into binding modes of adenosine A_{2B} antagonists with ligand-based and receptor-based methods. *Eur. J. Med. Chem.* **2010**, *45*, 3459-3471.

221. Briddon, S. J.; Gandia, J.; Amaral, O. B.; Ferre, S.; Lluís, C.; Franco, R.; Hill, S. J.; Ciruela, F. Plasma membrane diffusion of G protein-coupled receptor oligomers. *Biochim. Biophys. Acta* **2008**, *1783*, 2262-2268.
222. Suzuki, T.; Namba, K.; Yamagishi, R.; Kaneko, H.; Haga, T.; Nakata, H. A highly conserved tryptophan residue in the fourth transmembrane domain of the A adenosine receptor is essential for ligand binding but not receptor homodimerization. *J. Neurochem.* **2009**, *110*, 1352-1362.
223. Thevenin, D.; Lazarova, T.; Roberts, M. F.; Robinson, C. R. Oligomerization of the fifth transmembrane domain from the adenosine A_{2A} receptor. *Protein Sci.* **2005**, *14*, 2177-2186.
224. Canals, M.; Burgueno, J.; Marcellino, D.; Cabello, N.; Canela, E. I.; Mallol, J.; Agnati, L.; Ferre, S.; Bouvier, M.; Fuxe, K.; Ciruela, F.; Lluís, C.; Franco, R. Homodimerization of adenosine A_{2A} receptors: qualitative and quantitative assessment by fluorescence and bioluminescence energy transfer. *J. Neurochem.* **2004**, *88*, 726-734.
225. Fanelli, F.; Felling, A. Dimerization and ligand binding affect the structure network of A_{2A} adenosine receptor. *Biochim. Biophys. Acta.* **2011**, *1808*, 1256-1266.
226. Gracia, E.; Perez-Capote, K.; Moreno, E.; Barkesova, J.; Mallol, J.; Lluís, C.; Franco, R.; Cortes, A.; Casado, V.; Canela, E. I. A_{2A} adenosine receptor ligand binding and signalling is allosterically modulated by adenosine deaminase. *Biochem. J.* **2011**, *435*, 701-709.
227. Moriyama, K.; Sitkovsky, M. V. Adenosine A_{2A} receptor is involved in cell surface expression of A_{2B} receptor. *J. Biol. Chem.* **2010**.
228. <http://www.biogps.org>, Expressionslevel. 22. Juli **2012**.
229. Kim, S. K.; Jacobson, K. A. Computational prediction of homodimerization of the A₃ adenosine receptor. *J. Mol. Graph Model* **2006**, *25*, 549-561.
230. Ciruela, F.; Ferre, S.; Casado, V.; Cortes, A.; Cunha, R. A.; Lluís, C.; Franco, R. Heterodimeric adenosine receptors: a device to regulate neurotransmitter release. *Cell Mol. Life Sci* **2006**, *63*, 2427-2431.
231. Casado, V.; Barrondo, S.; Spasic, M.; Callado, L. F.; Mallol, J.; Canela, E.; Lluís, C.; Meana, J.; Cortes, A.; Salles, J.; Franco, R. G_i protein coupling to adenosine A₁-A_{2A} receptor heteromers in human brain caudate nucleus. *J. Neurochem.* **2010**, *114*, 972-980.

232. Ferre, S.; Torvinen, M.; Antoniou, K.; Irenius, E.; Civelli, O.; Arenas, E.; Fredholm, B. B.; Fuxe, K. Adenosine A₁ receptor-mediated modulation of dopamine D₁ receptors in stably cotransfected fibroblast cells. *J. Biol. Chem.* **1998**, *273*, 4718-4724.
233. Namba, K.; Suzuki, T.; Nakata, H. Immunogold electron microscopic evidence of in situ formation of homo- and heteromeric purinergic adenosine A₁ and P2Y₂ receptors in rat brain. *BMC Res. Notes* **2010**, *3*, 323.
234. Ferre, S.; Woods, A. S.; Navarro, G.; Aymerich, M.; Lluís, C.; Franco, R. Calcium-mediated modulation of the quaternary structure and function of adenosine A_{2A}-dopamine D₂ receptor heteromers. *Curr. Opin. Pharmacol.* **2010**, *10*, 67-72.
235. Ferre, S.; Karcz-Kubicha, M.; Hope, B. T.; Popoli, P.; Burgueno, J.; Gutierrez, M. A.; Casado, V.; Fuxe, K.; Goldberg, S. R.; Lluís, C.; Franco, R.; Ciruela, F. Synergistic interaction between adenosine A_{2A} and glutamate mGlu₅ receptors: implications for striatal neuronal function. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* **2002**, *99*, 11940-11945.
236. de Graaf, C.; Foata, N.; Engkvist, O.; Rognan, D. Molecular modeling of the second extracellular loop of G-protein coupled receptors and its implication on structure-based virtual screening. *Proteins* **2008**, *71*, 599-620.
237. Hinz, S. Charakterisierung von Adenosin-A_{2B}-Rezeptor-Agonisten und Adenosin-Rezeptor-Heterodimeren. Dissertation, *Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität, Bonn*, **2012**.
238. Urban, A.; Neukirchen, S.; Jaeger, K. E. A rapid and efficient method for site-directed mutagenesis using one-step overlap extension PCR. *Nucleic Acids Research* **1997**, *25*, 2227-2228.
239. Lacher, S. Adenosinrezeptoren auf humanen T-Lymphozyten: Modulation durch Subtyp-selektive Rezeptor-Agonisten und -Antagonisten. Dissertation, *Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität, Bonn*, **2009**.
240. Deupree, J. D.; Bylund, D. B. Basic principles and techniques for receptor binding. *Tocris Reviews* **2002**, *18*.
241. Attie, A. D.; Raines, R. T. Analysis of receptor-ligand interactions. *Journal of Chemical Education* **1995**, *72*, 119-124.
242. Bylund, D. B.; Toews, M. L. Radioligand binding methods: Practical guide for receptor binding. *Am. J. Physiol.* **1993**, *265*, 421-429.

243. Neubig, R. R.; Spedding, M.; Kenakin, T.; Christopoulos, A. International Union of Pharmacology Committee on Receptor Nomenclature and Drug Classification. XXXVIII. Update on terms and symbols in quantitative pharmacology. *Pharmacol. Rev.* **2003**, *55*, 597-606.
244. Cheng, Y.; Prusoff, W. H. Relationship between the inhibition constant (KI) and the concentration of inhibitor which causes 50 per cent inhibition I₅₀ of an enzymatic reaction. *Biochem. Pharmacol.* **1973**, *22*, 3099-3108.
245. Pflieger, K. D.; Eidne, K. A. New technologies: bioluminescence resonance energy transfer (BRET) for the detection of real time interactions involving G-protein coupled receptors. *Pituitary* **2003**, *6*, 141-151.
246. Pflieger, K. D.; Eidne, K. A. Illuminating insights into protein-protein interactions using bioluminescence resonance energy transfer (BRET). *Nat. Methods* **2006**, *3*, 165-174.
247. Lohse, M. J.; Nuber, S.; Hoffmann, C. Fluorescence/bioluminescence resonance energy transfer techniques to study G-protein-coupled receptor activation and signaling. *Pharmacol. Rev.* **2012**, *64*, 299-336.
248. Bacart, J.; Corbel, C.; Jockers, R.; Bach, S.; Couturier, C. The BRET technology and its application to screening assays. *Biotechnol. J.* **2008**, *3*, 311-324.
249. Wilson, T.; Hastings, J. W. Bioluminescence. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* **1998**, *14*, 197-230.
250. Antipina, L.; Tomilin, F.; Vysotskii, E.; Ovchinnikov, S. A quantum chemical study of the formation of 2-hydroperoxy-coelenterazine in the Ca²⁺-regulated photoprotein obelin. *Journal of Structural Chemistry* **2011**, *52*, 870-875.
251. Head, J. F.; Inouye, S.; Teranishi, K.; Shimomura, O. The crystal structure of the photoprotein aequorin at 2.3 Å resolution. *Nature* **2000**, *405*, 372-376.
252. Inouye, S.; Hosoya, T. Reconstitution of blue fluorescent protein from recombinant apoaequorin and synthetic coelenteramide. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2009**, *386*, 617-622.
253. Inouye, S.; Sasaki, S. Imidazole-assisted catalysis of luminescence reaction in blue fluorescent protein from the photoprotein aequorin. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2007**, *354*, 650-655.
254. Loening, A. M.; Fenn, T. D.; Gambhir, S. S. Crystal structures of the luciferase and green fluorescent protein from *Renilla reniformis*. *J. Mol. Biol.* **2007**, *374*, 1017-1028.

255. Woo, J.; Howell, M. H.; von Arnim, A. G. Structure-function studies on the active site of the coelenterazine-dependent luciferase from *Renilla*. *Protein Sci.* **2008**, *17*, 725-735.
256. Shimomura, O.; Johnson, F. H.; Saiga, Y. Extraction, purification and properties of aequorin, a bioluminescent protein from the luminous hydromedusan, *Aequorea*. *J. Cell Comp. Physiol.* **1962**, *59*, 223-239.
257. Shimomura, O.; Johnson, F. H. Chemical nature of bioluminescence systems in coelenterates. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* **1975**, *72*, 1546-1549.
258. Frommer, W. B.; Davidson, M. W.; Campbell, R. E. Genetically encoded biosensors based on engineered fluorescent proteins. *Chem. Soc. Rev.* **2009**, *38*, 2833-2841.
259. Ormö, M.; Cubitt, A. B.; Kallio, K.; Gross, L. A.; Tsien, R. Y.; Remington, S. J. Crystal structure of the *Aequorea victoria* green fluorescent protein. *Science* **1996**, *273*, 1392-1395.
260. Prasher, D. C.; Eckenrode, V. K.; Ward, W. W.; Prendergast, F. G.; Cormier, M. J. Primary structure of the *Aequorea victoria* green-fluorescent protein. *Gene* **1992**, *111*, 229-233.
261. Miyawaki, A.; Griesbeck, O.; Heim, R.; Tsien, R. Y. Dynamic and quantitative Ca^{2+} measurements using improved cameleons. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* **1999**, *96*, 2135-2140.
262. Cubitt, A. B.; Heim, R.; Adams, S. R.; Boyd, A. E.; Gross, L. A.; Tsien, R. Y. Understanding, improving and using green fluorescent proteins. *Trends Biochem. Sci.* **1995**, *20*, 448-455.
263. Shaner, N. C.; Patterson, G. H.; Davidson, M. W. Advances in fluorescent protein technology. *J. Cell Sci.* **2007**, *120*, 4247-4260.
264. Xu, Y.; Piston, D. W.; Johnson, C. H. A bioluminescence resonance energy transfer (BRET) system: application to interacting circadian clock proteins. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* **1999**, *96*, 151-156.
265. Ayoub, M. A.; Pflieger, K. D. Recent advances in bioluminescence resonance energy transfer technologies to study GPCR heteromerization. *Curr. Opin. Pharmacol.* **2010**, *10*, 44-52.
266. Guan, R.; Feng, X.; Wu, X.; Zhang, M.; Zhang, X.; Hebert, T. E.; Segaloff, D. L. Bioluminescence resonance energy transfer studies reveal constitutive dimerization of the human lutropin receptor and a lack of correlation between receptor activation and the propensity for dimerization. *J. Biol. Chem.* **2009**, *284*, 7483-7494.

267. Canals, M.; Marcellino, D.; Fanelli, F.; Ciruela, F.; de Benedetti, P.; Goldberg, S. R.; Neve, K.; Fuxe, K.; Agnati, L. F.; Woods, A. S.; Ferre, S.; Lluís, C.; Bouvier, M.; Franco, R. Adenosine A_{2A}-dopamine D₂ receptor-receptor heteromerization: qualitative and quantitative assessment by fluorescence and bioluminescence energy transfer. *J. Biol. Chem.* **2003**, *278*, 46741-46749.
268. Knecht, S.; Ricklin, D.; Eberle, A. N.; Ernst, B. Oligohis-tags: mechanisms of binding to Ni²⁺-NTA surfaces. *J. Mol. Recognit* **2009**, *22*, 270-279.
269. Marquette, C. A.; Blum, L. J. Applications of the luminol chemiluminescent reaction in analytical chemistry. *Anal. Bioanal. Chem.* **2006**, *385*, 546-554.
270. Takagi, T.; Tsujii, K.; Shirahama, K. Binding isotherms of sodium dodecyl sulfate to protein polypeptides with special reference to SDS-polyacrylamide gel electrophoresis. *J. Biochem.* **1975**, *77*, 939-947.
271. Schägger, H.; von Jagow, G. Blue native electrophoresis for isolation of membrane protein complexes in enzymatically active form. *Anal. Biochem.* **1991**, *199*, 223-231.
272. Wittig, I.; Schagger, H. Features and applications of blue-native and clear-native electrophoresis. *Proteomics* **2008**, *8*, 3974-3990.
273. Reisinger, V.; Eichacker, L. A. Solubilization of membrane protein complexes for blue native PAGE. *J. Proteomics* **2008**, *71*, 277-283.
274. Wittig, I.; Braun, H. P.; Schägger, H. Blue native PAGE. *Nat. Protoc.* **2006**, *1*, 418-428.
275. Hinz, S. Bedeutung ausgewählter Aminosäuren für die Ligand-Bindung und Aktivierung des humanen Adenosin-A_{2B}-Rezeptors. Diplomarbeit, *Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität, Bonn*, **2007**.
276. Klotz, K. N.; Hessling, J.; Hegler, J.; Owman, C.; Kull, B.; Fredholm, B. B.; Lohse, M. J. Comparative pharmacology of human adenosine receptor subtypes - characterization of stably transfected receptors in CHO cells. *Naunyn Schmiedebergs Arch. Pharmacol.* **1998**, *357*, 1-9.
277. Borrmann, T.; Hinz, S.; Bertarelli, D. C.; Li, W.; Florin, N. C.; Scheiff, A. B.; Müller, C. E. 1-alkyl-8-(piperazine-1-sulfonyl)phenylxanthines: development and characterization of adenosine A_{2B} receptor antagonists and a new radioligand with subnanomolar affinity and subtype specificity. *J. Med. Chem.* **2009**, *52*, 3994-4006.

278. Bock, A.; Merten, N.; Schrage, R.; Dallanoce, C.; Batz, J.; Klockner, J.; Schmitz, J.; Matera, C.; Simon, K.; Kebig, A.; Peters, L.; Muller, A.; Schrobang-Ley, J.; Trankle, C.; Hoffmann, C.; De Amici, M.; Holzgrabe, U.; Kostenis, E.; Mohr, K. The allosteric vestibule of a seven transmembrane helical receptor controls G-protein coupling. *Nat. Commun.* **2012**, *3*, 1044.
279. Bokoch, M. P.; Zou, Y.; Rasmussen, S. G.; Liu, C. W.; Nygaard, R.; Rosenbaum, D. M.; Fung, J. J.; Choi, H. J.; Thian, F. S.; Kobilka, T. S.; Puglisi, J. D.; Weis, W. I.; Pardo, L.; Prosser, R. S.; Müller, L.; Kobilka, B. K. Ligand-specific regulation of the extracellular surface of a G-protein-coupled receptor. *Nature* **2010**, *463*, 108-112.
280. Borrmann, T.; Hinz, S.; Bertarelli, D. C.; Li, W.; Florin, N. C.; Scheiff, A. B.; Müller, C. E. 1-alkyl-8-(piperazine-1-sulfonyl)phenylxanthines: development and characterization of adenosine A_{2B} receptor antagonists and a new radioligand with subnanomolar affinity and subtype specificity. *J Med Chem* **2009**, *52*, 3994-4006.
281. Ayoub, M. A.; Levoye, A.; Delagrangé, P.; Jockers, R. Preferential formation of MT₁/MT₂ melatonin receptor heterodimers with distinct ligand interaction properties compared with MT₂ homodimers. *Mol. Pharmacol.* **2004**, *66*, 312-321.
282. Selwood, T.; Jaffe, E. K. Dynamic dissociating homo-oligomers and the control of protein function. *Arch. Biochem. Biophys.* **2012**, *519*, 131-143.
283. Thimm, D. Generierung, Expression und Charakterisierung ausgewählter Adenosin-A_{2B}-Rezeptor-Mutanten. Diplomarbeit, *Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität*, Bonn, **2008**.
284. Teng, B.; Ledent, C.; Mustafa, S. J. Up-regulation of A_{2B} adenosine receptor in A_{2A} adenosine receptor knockout mouse coronary artery. *J. Mol. Cell Cardiol.* **2008**, *44*, 905-914.
285. <http://de-de.invitrogen.com/site/de/de/home.html>, Bildnachweis. 02. August **2012**.
286. <http://www.clontech.com/>, Bildnachweis. 5. Juli **2012**.
287. <http://www.biosignal.com/>, Bildnachweis. 5. Juli **2012**.
288. Orth, A. Die delta-Unterfamilie der Glutamatrezeptoren: Identifizierung interagierender Proteine und Charakterisierung von Rezeptorchimären und -mutanten. Dissertation, *Ruhr-Universität Bochum*, Bochum, **2011**.
289. <http://www.gatc-biotech.com/de/index.php>, GATC Sequenzierung. 10. Dezember **2011**.

290. Lowry, O. H.; Rosebrough, N. J.; Farr, A. L.; Randall, R. J. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* **1951**, *193*, 265-275.
291. Nordstedt, C.; Fredholm, B. B. A modification of a protein-binding method for rapid quantification of cAMP in cell-culture supernatants and body fluid. *Anal. Biochem.* **1990**, *189*, 231-234.
292. Bradford, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* **1976**, *72*, 248-254.