

Molekularbiologie und Pharmakologie neuer G-Protein-gekoppelter Purin-Rezeptoren

Dissertation

zur

Erlangung des Doktorgrades (Dr. rer. nat.)

der

Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät

der

Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn

vorgelegt von

Melanie Knospe (geb. Hulbert)

aus Bonn

Bonn 2012

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

1. Gutachter: Prof. Dr. Christa E. Müller
2. Gutachter: Prof. Dr. Ivar von Kügelgen

Tag der Promotion: 28.03.2012

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 Juni 2008 bis Dezember 2011 am Pharmazeutischen Institut der Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn unter der Leitung von Frau Prof. Dr. Christa E. Müller durchgeführt.

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. med. Klaus Mohr und Herrn Prof. Dr. Günther Mayer.

Ich danke der NRW International Graduate Research School LIMES Chemical Biology für die finanzielle Unterstützung in Form eines Doktorandenstipendiums sowie die Kostenübernahme bei Kongressreisen.

meinem Mann Michael
und
meiner Familie

"Wichtig ist, dass man nicht aufhört, zu fragen."

Albert Einstein, 1955

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	1
1.1	G-Protein-gekoppelte Rezeptoren	1
1.1.1	Struktur	1
1.1.2	Klassifizierung der G-Protein-gekoppelten Rezeptoren	11
1.1.3	Signaltransduktion	12
1.1.4	Purinerge Rezeptoren	16
1.2	Adenin-Rezeptoren	18
1.2.1	Physiologische Funktionen von Adenin-Rezeptoren	23
1.2.2	Biosynthese und Metabolisierung von Adenin	24
2	Ziele der Arbeit	29
3	Ergebnisse und Diskussion	31
3.1	Charakterisierung der Adenin-Ligand-Bindungsstelle des Ratten-Adenin-Rezeptors	31
3.1.1	Klonierung der Ratten-Adenin-Rezeptor-cDNA	31
3.1.2	Expressionssystem	33
3.1.2.1	Baculogold TM Baculovirus-Expressionssystem	34
3.1.2.2	Bac-to-Bac-Expressionssystem	35
3.1.3	Ko-Expression mit G-Proteinen	38
3.1.4	Radioligand-Bindungsstudien	39
3.1.4.1	Sättigungsexperimente	40
3.1.4.2	Kompetitionsexperimente	41
3.1.5	Entwicklung eines spezifischen gegen den Ratten-Adenin-Rezeptor gerichteten Antikörpers	46
3.1.5.1	Antigen-Design	47
3.1.5.2	Peptid-Antigensynthese	50
3.1.5.3	Gewinnung des polyklonalen Antikörpers	50
3.1.6	Western Blotting	51

3.1.6.1	Expressionsuntersuchung mit den Serumproben.....	51
3.1.6.2	Ko-Expression mit G-Proteinen.....	59
3.1.7	Zusammenfassung und Ausblick.....	60
3.2	Mutagenese des Ratten-Adenin-Rezeptors	61
3.2.1	Klonierung	63
3.2.1.1	Klonierung von pUC-myc-rAde-Mutanten.....	64
3.2.1.2	Klonierung pFastBac-rAde-Mutanten	65
3.2.2	Expressionssystem.....	68
3.2.3	Untersuchung des verkürzten N-Terminus des rAdeR	69
3.2.4	Extrazelluläre Disulfidbrücken	75
3.2.5	Radioligand-Bindungsstudien	77
3.2.5.1	Kompetitionsexperimente.....	78
3.2.5.2	[³⁵ S]GTPγS-Bindungsstudien	82
3.2.6	Western Blotting	89
3.2.6.1	Expressionsuntersuchung.....	89
3.2.7	Zusammenfassung und Ausblick.....	91
3.3	Charakterisierung des Maus-Adenin-Rezeptors Subtyp 1	93
3.3.1	Klonierung der Maus-Adenin-Rezeptor Subtyp 1-cDNA.....	93
3.3.1.1	Klonierung der Gensequenz des Maus-Adenin-Rezeptors Subtyp 1 in die Baculovirus-Transfervektoren pVL1393 und pFastBac TM 1.....	94
3.3.1.2	Klonierung in die retroviralen Vektoren pQXCIN und pLXSN.....	96
3.3.2	Expressionssystem.....	97
3.3.3	Radioligand-Bindungsstudien	98
3.3.3.1	Sättigungsexperimente.....	99
3.3.3.2	Kompetitionsexperimente.....	99
3.3.4	Retrovirale Transfektion.....	105
3.3.4.1	Transfektion der Verpackungszellen und Infektion der Zielzelle	105
3.3.4.2	Selektion einer stabil transfizierten Zelllinie.....	107
3.3.4.3	RT-PCR.....	107

3.3.5 Funktionelle Untersuchungen.....	108
3.3.5.1 Bestimmung von cAMP.....	108
3.3.5.2 Messung der intrazellulären Calcium-Freisetzung.....	109
3.3.6 Zusammenfassung und Ausblick	110
3.4 Exkurs: Adenin-Transporter	111
3.4.1 Messung der Aufnahme des Radioliganden in die Zelle	112
3.4.2 Zusammenfassung.....	118
4 Zusammenfassung.....	121
5 Experimenteller Teil	125
5.1 Allgemeine Angaben	125
5.1.1 Geräte und Materialien.....	125
5.1.2 Chemikalien	126
5.1.2.1 Kommerziell bezogene Chemikalien.....	126
5.1.2.2 Nicht kommerziell bezogene Chemikalien und Zellkulturbedarf	128
5.1.2.3 Zellkulturbedarf und Nährmedien.....	128
5.1.3 Radioliganden	129
5.1.4 Kultivierte Zelllinien	129
5.1.5 Puffer und Lösungen.....	130
5.1.5.1 Lösungen für die Zellkultur.....	130
5.1.5.2 Lösungen für die Molekularbiologie	130
5.1.5.3 Lösungen für das Bac-to-Bac-Expressionssystem	131
5.1.5.4 Lösungen für die Proteinbestimmung nach Lowry	131
5.1.5.5 Puffer für Radioligand-Bindungsstudien	131
5.1.5.6 Lösungen für SDS-PAGE	132
5.1.5.7 Lösungen für Western Blotting.....	132
5.1.5.8 Lösungen für die intrazelluläre Calciummessung	133
5.1.5.9 Lösungen für die „uptake“-Experimente.....	133
5.2 Zellkultur	134
5.2.1 Medienzusammensetzung	134

5.2.2	Zellkultur	134
5.2.3	Einfrieren von Zellen.....	135
5.2.4	Auftauen von Zellen.....	136
5.2.5	Zellzahlbestimmung.....	136
5.2.6	Aufreinigung des Anti-c- <i>myc1</i> 9E10 monoklonalen Antikörpers	136
5.3	Molekularbiologie.....	136
5.3.1	Agarose-Gelelektrophorese.....	136
5.3.2	Extraktion von DNA aus dem Agarosegel.....	137
5.3.3	gDNA-Isolierung aus Maushirnen.....	137
5.3.4	Klonierung von Rezeptor-DNA in den Vektor	137
5.3.4.1	Vektorkarten.....	137
5.3.4.2	Primer.....	138
5.3.4.3	PCR (Polymerase-Kettenreaktion)	139
5.3.4.4	Restriktionsverdau.....	142
5.3.5	Ligation mittels T4 DNA-Ligase	143
5.3.6	Transformation von chemisch kompetenten <i>Escherichia coli</i>	143
5.3.6.1	Herstellung von Agarplatten	143
5.3.6.2	Herstellung kompetenter Bakterien	143
5.3.6.3	Durchführung der Transformation	144
5.3.7	Selektion von Bakterien-Monoklonen	144
5.3.7.1	Herstellung von LB-Medium zur Anzucht von Bakterien-Monoklonen.....	144
5.3.7.2	Durchführung der Selektion von Bakterien-Monoklonen	144
5.3.8	Einfrieren und Auftauen von <i>Escherichia coli</i>	144
5.3.9	Aufreinigung von DNA aus <i>Escherichia coli</i>	145
5.3.10	Konzentrationsbestimmung von DNA-Präparationen	145
5.3.11	Sequenzierung	145
5.3.12	Mutagenese des Ratten-Adenin-Rezeptors.....	145
5.3.12.1	Mutagenese-Primer.....	146
5.3.12.2	Mutagenese-PCR.....	147
5.3.12.3	Restriktionsverdau methylierter DNA	148
5.4	Baculovirus-Expressionssystem.....	149

5.4.1	Baculogold™ Baculovirus-Expressionssystem.....	149
5.4.1.1	Durchführung der Ko-Transfektion.....	149
5.4.1.2	Durchführung der Infektionen	150
5.4.2	Bac-to-Bac-Expressionssystem	150
5.4.2.1	Herstellung von Agarplatten zur Transformation von Bacmid-DNA	150
5.4.2.2	Herstellung von LB-Medium zur Anzucht von Bacmid-DNA-Monoklonen	150
5.4.2.3	Transformation und Selektion von Bacmid-DNA-Monoklonen	151
5.4.2.4	Kontroll-PCR.....	151
5.4.2.5	Durchführung der Transfektion	152
5.4.2.6	Infektion zur Proteinexpression.....	153
5.5	Membranpräparationen.....	153
5.6	Proteinbestimmung nach <i>Lowry</i>.....	153
5.6.1	Durchführung	154
5.7	Retrovirale Transfektion	154
5.7.1	Transfektion der Verpackungszellen	154
5.7.2	Infektion der Zielzellen	155
5.7.3	Selektion einer stabil transfizierten Zelllinie.....	155
5.7.4	RT-PCR.....	155
5.7.4.1	mRNA-Isolierung und reverse Transkription.....	156
5.7.4.2	Primer	156
5.7.4.3	Kontroll-PCR.....	157
5.8	Radioligand-Bindungsstudien.....	157
5.8.1	Sättigungsexperimente mit [³ H]Adenin.....	158
5.8.2	Kompetitionsexperimente mit [³ H]Adenin	159
5.8.3	Bestimmung von cyclischem Adenosinmonophosphat (cAMP).....	160
5.8.4	[³⁵ S]GTPγS-Bindungsstudien	161
5.9	SDS-PAGE (Polyacrylamid-Gelelektrophorese).....	162

5.10 Western Blotting	163
5.10.1 Durchführung	164
5.11 Fluorimetrische Calciummessung.....	165
5.11.1 Einstellungen am Novostar®	165
5.11.2 Messung der intrazellulären Calcium-Freisetzung	166
5.11.3 Auswertungen der Calciummessungen	166
5.12 „Uptake“-Experimente.....	167
5.12.1 Durchführung	167
5.13 Statistische Berechnungen.....	168
6 Abkürzungsverzeichnis.....	169
7 Abkürzungen für Aminosäuren	174
8 Literaturverzeichnis.....	175

1 Einleitung

1.1 G-Protein-gekoppelte Rezeptoren

Im Jahre 1990 wurde das humane Genom-Projekt (HGP) mit dem Ziel der Entschlüsselung des menschlichen Genoms initiiert und im Jahre 2001 erfolgreich als ein Meilenstein in der Medizinforschung beendet.^{1,2} Dadurch konnten 30.000-40.000 Gene identifiziert werden, die für Proteine codieren und an die Arzneimittel-Moleküle binden können.¹⁻⁴ Dabei wurde eine große Familie von 800-1000 Genen entdeckt, die für Rezeptorproteine codieren, welche eine charakteristische 7-Transmembran-Domäne (7-TM-) besitzen.⁵⁻¹⁰ Diese 7-TM-Rezeptoren werden aufgrund ihres Signaltransduktionsweges über heterotrimere G-Proteine allgemein auch G-Protein-gekoppelte Rezeptoren (GPCR) genannt.⁶ Von den auf dem Markt befindlichen Medikamenten wirken ca. 30-40 % über G-Protein-gekoppelte Rezeptoren.^{3,4,8,9,11,12} Damit stellen die GPCRs die wichtigste Klasse von Zielstrukturen für die Arzneimittelentwicklung dar.^{4,6,13} Im Körper kommen GPCRs weit verbreitet vor und spielen somit eine fundamentale Rolle in der Physiologie und Pathophysiologie.⁴ Der Wirkmechanismus von Arzneistoffen und somit der Entwurf einer Rezeptor-Theorie ist zum ersten Mal von Paul Ehrlich (1854-1915) formuliert worden. Nur Arzneimittel bzw. Moleküle, die an ihre Zielstruktur gebunden sind, können wirken („Corpora non agunt nisi fixata“).¹⁴ Dabei wirkt das Arzneimittel (Schlüssel) an den Rezeptor (Schloss) nach dem Schlüssel-Schloss-Prinzip.¹⁵

1.1.1 Struktur

GPCRs sind Einzelketten-Polypeptide, die aus ca. 300 Aminosäuren mit abwechselnden hydrophilen und hydrophoben Regionen zusammengesetzt sind.⁹ Die hydrophoben Regionen stellen die 7 transmembranären Domänen der GPCRs dar, die jeweils eine durch die Membran gespannte α -Helix bilden.^{9,16} Eine Transmembran-Region besteht aus ca. 20-35 Aminosäuren.^{16,17} Der N- und der C-Terminus sowie die extra- und intrazellulären Schleifen sind grundsätzlich eher hydrophil.¹⁶ Der N-Terminus ragt in den Extrazellular-Raum, der C-Terminus ins Zytoplasma.^{9,18} Das Strukturgerüst wird von den hydrophoben, transmembranären Regionen gebildet, um den Rezeptor in seiner Konformation zu stabilisieren. Die hydrophilen Regionen, wie die extra- und intrazellulären Schleifen sowie der C-Terminus, dienen als Kontakt für die Ligandbindung bzw. die G-Protein-Kopplung.⁹

Die GPCR-Kristallographie ermöglicht Erkenntnisse über die Struktur von GPCRs und ihrem Aktivierungsmechanismus. Eine erste große Herausforderung in der GPCR-Kristallographie war die ausreichende Proteinexpression in einem geeigneten System, wodurch native, gefaltete Membranproteine erzeugt werden konnten.¹⁹⁻²¹ GPCRs sind üblicherweise instabil in Detergentien, enthalten ungeordnete Regionen und besitzen eine spontane Änderung zwischen dem inaktiven und dem aktiven Zustand, wodurch die Stabilität des Rezeptors herabgesetzt wird.^{20,22} Damit stellen weitere Herausforderungen die Überwindung der Thermodynamik aufgrund der geringen thermischen Stabilität bzw. Flexibilität²⁰ von GPCRs und die proteolytische Proteinstabilität dar.²¹ Die Verbesserung der thermischen Stabilität konnte durch die Verwendung stabilisierender Liganden,²³⁻²⁵ durch die Kombination von stabilisierenden Mutationen,^{20,26} durch die Zugabe von Lipiden während der Aufreinigung und Kristallisierung^{23-25,27} und durch eine hohe Salzkonzentration,²⁵ erreicht werden.²¹ Methoden, um den Proteinabbau zu verhindern, sind die Kürzung ungeordneter Regionen,²³⁻²⁵ die Verknüpfung mit einer stabilen, gefalteten Domäne in der dritten intrazellulären Schleife²⁵ und die Kombination mit einem Fab-Antikörper.^{21,23,28} Jedoch ist zu bedenken, dass eine Einführung oder Modifikation der Membranproteine auch zum Verlust der nativen Eigenschaften des Rezeptors führen kann und somit ein Risiko darstellt.²¹

Im Jahre 2000 gelang die erste Kristallisation und anschließende Röntgenstrukturanalyse von **Rhodopsin** mit 11-*cis*-Retinal (inverser Agonist) im inaktiven Zustand in einer Auflösung von 2,8 Å.^{29,30} Dabei fiel vor allem die kompakte extrazelluläre Anordnung auf, mit einer kurzen β -Faltblatt-Struktur in der zweiten extrazellulären Schleife als „Deckel“ für das gebundene 11-*cis*-Retinal.^{21,30-32} Im Gegensatz dazu zeigte die cytoplasmatische Domäne keine kompakte und hoch organisierte Ordnung.^{31,33} Eine achte Helix, die amphiphilen Charakter besitzt, liegt rechtwinklig zum C-terminalen Ende von TM7.³¹ Die 7-TM-Helices enthalten bestimmte konservierte Aminosäure-Reste.³⁴ das NPxxY-Motiv in TM7, das die cytoplasmatische Domäne stabilisiert, und das E(D)RY-Motiv in TM3 (Teil des sogenannten „*ionic lock*“), das den inaktiven Zustand von Rhodopsin stabilisiert.^{30,31,33,35} 11-*cis*-Retinal bindet als Schiff'sche Base an K296 in TM7 und ist damit in der 7-TM-Helix gebunden.^{30,34} Diese protonierte Schiff'sche Base führt mit dem Gegenion E113 in TM3 zu einer elektrostatischen Wechselwirkung bzw. Salzbrücke („*ionic lock*“) und somit zur Stabilisierung des inaktiven Zustands des Rezeptors (s. Abb. 1.1).^{30,33,35} In einer weiteren Kristallstruktur mit einem photoaktivierten Zwischenprodukt von Rhodopsin wurde beobachtet, dass die Schiff'sche Base, die eine Verbindung zwischen dem Chromophor Retinal und K296 darstellt, deprotoniert wird, und Veränderungen an der cytoplasmatischen Seite zur Kopplung an das G-Protein Transducin zur Folge hat.³⁶ Um genaue Aussagen über die Konformationsänderung zum aktiven Zustand treffen zu können, werden Kristalle benötigt, die gegen-

über Licht stabil bleiben.^{29,35-37} Dies gelang im Jahre 2008 Park und Scheerer, die die Kristallstruktur des Ligand-freien nativen **Opsin** aus Rindernetzhaut-Photorezeptor-Zellen in einer Auflösung von 2,9 Å und Opsin im Komplex gebunden an ein C-terminales Peptidfragment des zugehörigen G_α-Proteins Transducin, in einer Auflösung von 3,2 Å publizierten.^{38,39} Im Jahre 2011 wurde die Kristallstruktur der konstitutiv aktiven Rhodopsin-Mutante E113Q,^{40,41} gebunden an das Peptidfragment G_αCT, in einer Auflösung von 3,0 Å erhalten.⁴² Im gleichen Jahr wurde ebenfalls die Kristallstruktur von **Metarhodopsin II** in einer Auflösung von 3,0 Å und von Metharhodopsin II an ein C-terminales Peptidfragment gebunden, abgeleitet vom G_α-Protein, in einer Auflösung von 2,8 Å veröffentlicht.⁴³ Die vorwiegend strukturellen Veränderungen sind in dem konservierten E(D)RY-Motiv in TM3, in dem NPxxY(x)_{5,6}F-Motiv in TM7, dem CWxP-Motiv in TM6 (zentrale Rolle im „toggle switch“-Modell) und in TM5 bis TM7 beobachtet worden.^{38,39,42,44,45} Die Translokation des β-Ionon-Ringes von Retinal bewegt sich um 4,3 Å in Richtung der Spalte zwischen TM5 und TM6 und führt zu einer Rotation von 6,0-7,0 Å der TM6-Helix nach außen, wohingegen die Helix von TM5 mehr gestreckt wird und näher zur TM6 rückt.^{38,39,42,43} Die Neigung der TM6-Helix resultiert in einer Bewegung zum cytoplasmatischen Ende hin und weg von TM3 sowie zu einer größeren cytoplasmatischen Spalte, die zur Aufnahme des interagierenden C-Terminus des G_α-Proteins nötig ist.^{36,43} Das Hauptmerkmal der Konformationsänderung ist die Umorganisation des Wasser vermittelten H-Brücken Netzwerks zwischen der Retinal-Bindungstasche und den drei konservierten GPCR-Sequenz-Motiven (s. Abb. 1.1).⁴² Die Aktivierung von 7-TM-Rezeptoren wurde zusammenfassend im „toggle switch“-Modell beschrieben.^{46,47} Dabei findet eine Einwärts-Bewegung des extrazellulären Teils von TM6 und TM7 statt, wodurch die Ligand-Bindungstasche geschlossen wird; daraufhin erfolgt eine Auswärts-Bewegung des intrazellulären Teils von TM6. Somit führt TM6 eine Bewegung um einen Drehpunkt aus, der in der Mitte der Membran sitzt bzw. dort wo sich konservierte Prolin-Reste^{34,48} befinden.⁴⁷ Die Aminosäure Prolin ist ein „Helix-Brecher“, da sie aufgrund der fehlenden freien α-Aminogruppe nicht an dem Wasserstoffbrücken-Netzwerk teilnimmt und somit eine Schwäche in der Helix darstellt.⁴⁶ Das konservierte CWxP-Motiv spielt dabei eine entscheidende Rolle,⁴⁸ denn die Aminosäure Tryptophan W^{6.13} (Ballesteros-Weinstein-Nomenklatur)⁴⁹ scheint die Einwärts-Bewegung des extrazellulären Teils von TM6 im inaktiven Zustand zu verhindern.⁴⁷ Die Rotation der Seitenkette von W^{6.13} weg von der Kontaktfläche zwischen TM3 und TM6 in die leere Tasche zwischen TM3 und TM5, wo sich der β-Ionon-Ring im inaktiven Zustand von Rhodopsin befunden hat, löst durch die Einwärts-Bewegung des extrazellulären Teils von TM6 und damit die Begräbigung dieser Helix die sterische Hemmung von TM6 auf.^{47,48}

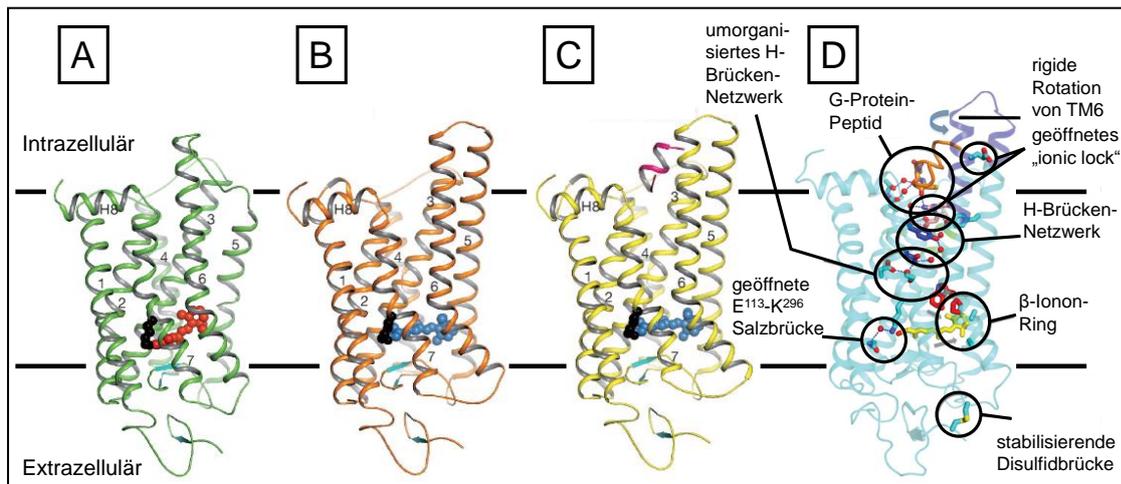


Abb. 1.1: Kristallstrukturen von Rhodopsin (A),^{30,43} dem aktiven Metarhodopsin II (B),⁴³ Metarhodopsin (C),⁴³ gebunden an ein G_α-Peptidfragment (orange), und Aktivierungsmechanismus des Rhodopsins durch den Agonisten all-trans-Retinal (D)⁴²

Schwarze Kreise in A, B, C: über eine Schiff'sche Base kovalent an K296 gebunden; rote Kreise in A: inverser Agonist 11-cis-Retinal; blaue Kreise in B, C: Agonist all-trans-Retinal; pink in C: gebundenes G_α-Peptidfragment; blau in D: NPxxY-Motiv; rot in D: CWxP-Motiv; pink in D: E(D)RY-Motiv als Teil des „ionic lock“; orange in D: gebundenes G_α-Peptidfragment; blau-lila Helix in D: Konformationsänderung in TM5 und TM6

Im Jahre 2007 wurde die Röntgenstruktur des humanen **β₂-adrenergen Rezeptors**, welcher an den partiell inversen Agonisten Carazolol sowie in der dritten intrazellulären Schleife an ein Antikörper-Fragment (Fab5)²⁸ gebunden war und in einer Lipid-Umgebung kristallisiert wurde, in einer Auflösung von 3,4/3,7 Å erhalten.²³ Im gleichen Jahr wurde eine weitere Kristallstruktur des humanen β₂-adrenergen Rezeptors, gebunden an das T4-Lysozym-Fusionsprotein (anstatt der IL3),^{50,51} mit dem partiell inversen Agonisten Carazolol in einer Auflösung von 2,4 Å publiziert (s. Abb. 1.2).²⁴ Eine weitere Kristallstruktur des thermisch stabilisierten humanen β₂-adrenergen Rezeptors wurde an Cholesterol und an den partiell inversen Agonisten Timolol gebunden in einer Auflösung von 2,8 Å erhalten.^{52,53} Auch konnte gezeigt werden, dass die Orientierung von Timolol in der Bindungstasche der von Carazolol entspricht.⁵² Aufgrund der unterschiedlichen Kristallbindungs-Wechselwirkungen konnte die spezifische Bindung von Cholesterol zwischen TM2, TM3 und TM4 bestimmt werden.⁵⁴ Diese Wechselwirkung scheint konserviert über verschiedene Vertreter der Klasse A GPCRs zu sein.^{52,54} Die Unterschiede des humanen β₂-adrenergen Rezeptors zu Rhodopsin wurden besonders in TM1, welche aufgrund des fehlenden Prolin-Knicks gerade ist, und in der zweiten extrazellulären Schleife, welche ein ungewöhnliches Paar an Disulfidbrücken (C106-C191, C184-C190) und eine Extra-Helix enthält, beobachtet.^{24,55} Der Truthahn-**β₁-adrenergen Rezeptors** im Komplex mit dem affinen Antagonisten Cyanopindolol wurde in einer Auflösung

von 2,7 Å publiziert, wobei die Thermostabilität durch eine Kombination von stabilisierenden Mutationen (β_1 AR-m23)²⁰ erreicht wurde (s. Abb. 1.2).²⁶ Die zweite extrazelluläre Schleife ist der Eintritt für die Ligand-Bindungstasche und wird stabilisiert durch zwei Disulfidbrücken und ein Natriumion, d. h. sie besitzt, wie der β_2 AR, eine α -Helix.^{21,26} Jedoch wurden Unterschiede zum β_2 AR in der zweiten intrazellulären Schleife beobachtet: Eine kurze α -Helix wird parallel zur Membranoberfläche gebildet und zeigt eine Wechselwirkung zum hochkonserviertem DRY-Motiv in TM3.^{26,56} Die Salzbrücke R-E ist sowohl im β_1 AR als auch im β_2 AR nicht vorhanden, wodurch das „*ionic lock*“ kein wesentliches Merkmal für den inaktiven Zustand zu sein scheint.²⁶ Dennoch zeigt die Struktur des β_1 AR, gebunden an Cyanopindolol, und des β_2 AR, gebunden an Carazolol, eine annähernd identische Bindungstasche.²¹ Eine weitere Kristallstruktur eines GPCRs, des humanen **Adenosin-A_{2A}-Rezeptors** (A_{2A}R), wurde, gebunden an den affinen Antagonisten ZM241385, in einer Auflösung von 2,6 Å erhalten (s. Abb. 1.2).²⁵ Dafür wurde ebenfalls die T4-Lysozym-Fusionsstrategie^{50,51} verwendet, wobei die dritte intrazelluläre Schleife durch das Lysozym von T4-Bakteriophagen ersetzt und der C-Terminus entfernt wurde, und somit die Möglichkeit der Kristallbildung gegeben war. Zu den bereits bekannten GPCR-Strukturen wurden drei unterschiedliche Merkmale beobachtet. Erstens ist die Organisation der extrazellulären Schleifen ausgesprochen unterschiedlich zu β_1 AR, β_2 AR (EL2 α -Helix) und Rhodopsin (EL2 β -Faltblatt), da beim A_{2A}R eine vorherrschende Sekundärstruktur fehlt und vielmehr vier Disulfidbrücken sowie viele polare und van-der-Waals-Wechselwirkungen zwischen den extrazellulären Schleifen vorhanden sind.^{21,32,54,55,57,58} Die extrazellulären Schleifen des A_{2A}R und der beiden $\beta_{1/2}$ AR bilden einen offenen Eintritt für die diffusionsfähigen Liganden in die Bindungstasche, wohingegen die Retinal-Bindungstasche im Rhodopsin eher geschlossen ist und somit gewissermaßen Retinal vor Lösungsmittelmolekülen schützt.^{58,59} Zweitens bindet ZM241385 in einer Konformation senkrecht zur Membranebene und kollinear mit TM7 aufgrund der Interaktion mit der zweiten und dritten extrazellulären Schleife.⁵⁹ Im Gegensatz dazu binden Rhodopsin und die beiden $\beta_{1/2}$ AR ihre Liganden eher in einer horizontalen Position in den TM-Domänen.⁵⁹ Drittens sind die helikalen Positionen und Orientierungen verschieden zu β_2 AR und Rhodopsin, wodurch die Antagonist-Bindungstasche näher bei TM6 und TM7 liegt und eine begrenzte Interaktion mit TM3 und TM5 erlaubt.^{21,25,55,60} Bei den adrenergen Rezeptoren und Rhodopsin wird hingegen die Ligandbindung an polare und hydrophobe Reste von TM3, TM5, TM6 und TM7 vermittelt.²¹ Die Kristallstruktur des Adenosin-A_{2A}-Rezeptors hat gezeigt, dass keine generelle, Familien-konservierte Rezeptor-Bindungstasche in GPCRs existiert, sondern dass vielmehr eine große Rezeptor-Diversität und Ligandselektivität möglich ist.^{25,55}

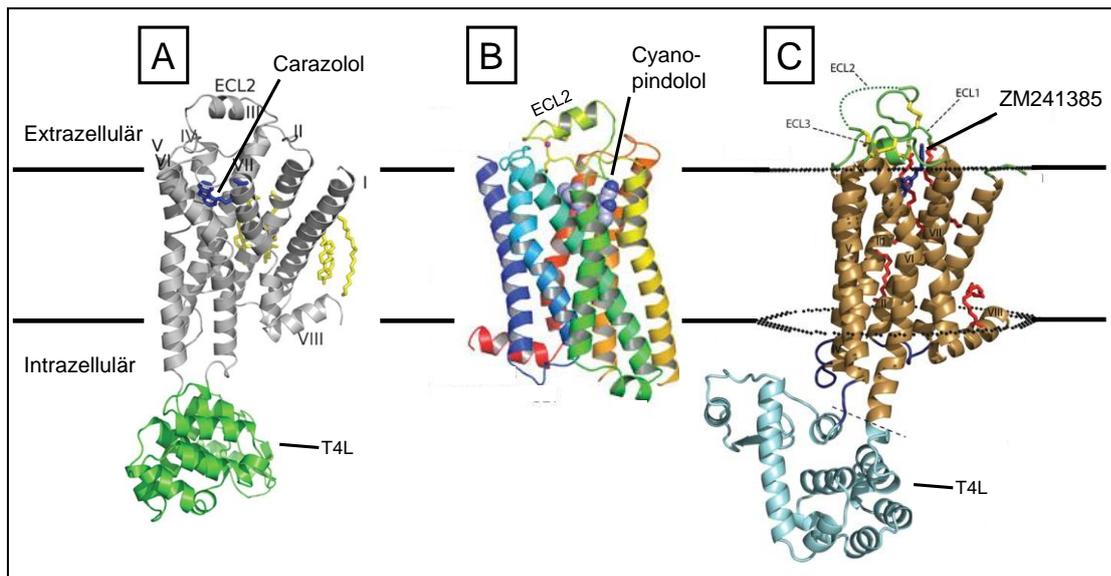


Abb. 1.2: Kristallstrukturen des humanen β_2 -adrenergen Rezeptors (A),²⁴ des Truthahn- β_1 -adrenergen Rezeptors (B)²⁶ und des humanen Adenosin- A_{2A} -Rezeptors (C)²⁵

T4L: T4-Lysozym-Fusionsprotein; ECL2: zweite extrazelluläre Schleife

Aufgrund der hohen Sequenzidentität zwischen dem Rhodopsin-Rezeptor, dem β_1 AR, dem β_2 AR und dem A_{2A} R in den TM-Domänen (20-40 %) ist die Anordnung der Domänen im Großen und Ganzen gleich.^{21,55,58,59} Am cytoplasmatischen Ende der TM7, wo sich das hoch konservierte NPxxY-Motiv befindet, führt das Prolin (P) wiederum, zu einer Verbiegung in der α -helikalen Struktur und das Tyrosin (Y) bindet dadurch in eine Tasche von TM2, TM3, TM6 und TM7.⁵⁸ Das Netzwerk aus geordneten Wassermolekülen in dieser Region hilft die helikale Deformation von TM7 zu stützen und ist mutmaßlich an der Stabilisierung des inaktiven Zustandes beteiligt.^{21,61} Auch das für den Konformationsübergang in der GPCR-Aktivierung (sogenannten „toggle switch“) entscheidende Tryptophan W^{6,48} (Ballesteros-Weinstein-Nomenklatur)⁴⁹ des konservierten CWxP-Motivs konnte in allen Kristallstrukturen (β_2 AR: W286, β_1 AR: W303, A_{2A} R: W246 und Rhodopsin: W265) gefunden werden.^{21,60} Allerdings wurde ein sehr großer Unterschied zwischen den Ligand-aktivierenden GPCRs und Rhodopsin im „ionic lock“ zwischen dem hoch konservierten E(D)RY-Motiv in TM3 und dem Glutamat-Rest in TM6, beobachtet, der nur bei Rhodopsin vorhanden ist.^{32,54,56,58,62,63} Das Fehlen des intakten „ionic locks“ kann auf zwei Arten interpretiert werden: Entweder existiert die Wechselwirkung in dem Ligand-gebundenen Zustand einfach nicht, oder die Wechselwirkung ist nur sehr schwach und kann energetisch durch verschiedene Kristallbildungskräfte nicht überwunden werden.²¹ Dies würde auch mit der Tatsache, dass die Ligand-aktivierenden GPCRs eine hohe Basal-Aktivität im Gegensatz zu Rhodopsin zeigen, zusammenpassen.²¹

Weitere Kristallstrukturen von GPCRs im inaktiven Zustand konnten für den Chemokin-CXCR4-Rezeptor im Komplex mit dem Antagonisten IT1t (Isothioharnstoff-Derivat) und dem Peptidinhibitor CVX15 sowie den humanen Dopamin D₃-Rezeptor im Komplex mit dem D₂R/D₃R-spezifischen Antagonisten Eticloprid erhalten werden.^{64,65} Beim Chemokin-CXCR4-Rezeptor war auffällig, dass die Bindungstasche im Gegensatz zu den anderen GPCRs näher zur extrazellulären Oberfläche liegt.⁶⁴

Auch für die Ligand-aktivierten GPCRs wäre die Kristallstruktur im aktiven Zustand wichtig, um Aussagen über den Aktivierungsmechanismus treffen zu können. Aufgrund der Instabilität des aktiven Zustandes in Abwesenheit eines G-Proteins, ist die Kristallisierung eines Agonist-gebundenen GPCRs relativ schwierig.⁶⁶ Die Kristallisation des humanen β_2 AR-T4L mit dem irreversibel gebundenen Agonisten FAUC50 führte ebenfalls nur zu einem inaktiven Zustand in einer Auflösung von 3,5 Å, wobei der Komplex in Anwesenheit von heterotrimeren G-Proteinen aktiviert werden kann.⁶⁷ Somit scheint die Agonist-Bindung nicht auszureichen, um die Kristallisierung einer aktiven, stabilisierten Konformation zu erreichen.⁶⁸ Ebenso wurden vom Truthahn- β_1 AR Kristallstrukturen, gebunden an Voll- und Partial-Agonisten wie Carmoterol, Isoprenalin, Dobutamin und Salbutamol, erhalten.⁶⁹ Diese Strukturen sind der Antagonist-gebundenen Struktur sehr ähnlich und die Auswärts-Bewegung des cytoplasmatischen Endes der TM6 konnte nicht beobachtet werden, wodurch es sich somit ebenfalls um einen inaktiven Zustand des Rezeptors handelt.⁶⁹ Die Voll-Agonisten binden an zwei konservierte Serin-Reste in der TM5 (S^{5.42} und S^{5.46}), wohingegen die Partial-Agonisten nur mit einem Serin-Rest S^{5.42} wechselwirken.⁶⁹ Auch vom humanen A_{2A}R wurde eine Agonist-gebundene Kristallstruktur mit UK-432097 in einer Auflösung von 2,7 Å publiziert (s. Abb. 1.3).⁷⁰ Im Gegensatz zur Antagonist-gebundenen Struktur konnte eine Neigung und Rotation des cytoplasmatischen Endes von TM6, eine Bewegung von TM5 und eine axiale Veränderung von TM3 beobachtet werden, was der aktiven Opsin-Struktur ähnelt und somit möglicherweise den aktiven Zustand des humanen A_{2A}R darstellt.⁷⁰ Weiterhin wurden zwei Kristallstrukturen des humanen A_{2A}R, gebunden an den endogenen Agonisten Adenosin und den synthetischen Agonisten NECA, in einer Übergangs-Konformation zwischen dem inaktiven und aktiven Zustand publiziert.⁷¹ Der Adenin-Substituent bindet in ähnlicher Weise wie der inverse Agonist ZM241385, wohingegen die Ribose-Gruppe tiefer in der Ligand-Bindungstasche liegt. Im Vergleich zur Agonist-gebundenen Struktur des β_2 AR scheint die Einwärts-Bewegung der Helices 3, 5 und 7 ein gemeinsames Merkmal in der Aktivierung von GPCRs zu sein.⁷¹ Außerdem wurde eine Agonist-gebundene-Kristallstruktur mit BI-167107 des humanen β_2 AR, gebunden an ein vom Kamel gebildetes Antikörper-Fragment Nb80 (*nanobody*) publiziert (s. Abb. 1.3).⁶⁶ Das Antikörper-Fragment Nb80 bindet an das cytoplasmatische Ende des β_2 AR, wodurch die G-Protein Bindung simuliert wird. Daher handelt es sich

um eine Struktur im aktiven Zustand.⁶⁶ Im Vergleich zum inaktiven Zustand wurden kleinere Veränderungen in der Bindungstasche beobachtet, die mit einer Auswärts-Bewegung des cytoplasmatischen Endes der TM6 um 11,0 Å und dadurch einer Umlagerung von TM5 und TM7 einhergehen.⁶⁶ Dies wurde ebenfalls in der aktiven Form von Rhodopsin, Opsin, gefunden.^{38,39,66} Das Konformations-Gleichgewicht von Rhodopsin und β_2 AR ist unterschiedlich aufgrund der Tatsache, dass Rhodopsin auch in Abwesenheit von G-Proteinen eine aktive Konformation annehmen kann, im Gegensatz zum β_2 AR, die das nicht kann.⁶⁶ Kürzlich wurde eine weitere Kristallstruktur des Agonist-gebundenen β_2 AR im aktiven Zustand, gebunden an ein G_s -Protein, publiziert und damit die erste Grundlage zum besseren Verständnis für die transmembranäre Signaltransduktion eines GPCRs gelegt.⁷² Dabei wurde eine 14,0 Å-Auswärts-Bewegung des cytoplasmatischen Endes von TM6 und dadurch eine α -helicale Streckung des cytoplasmatischen Endes von TM5 beobachtet.⁷²

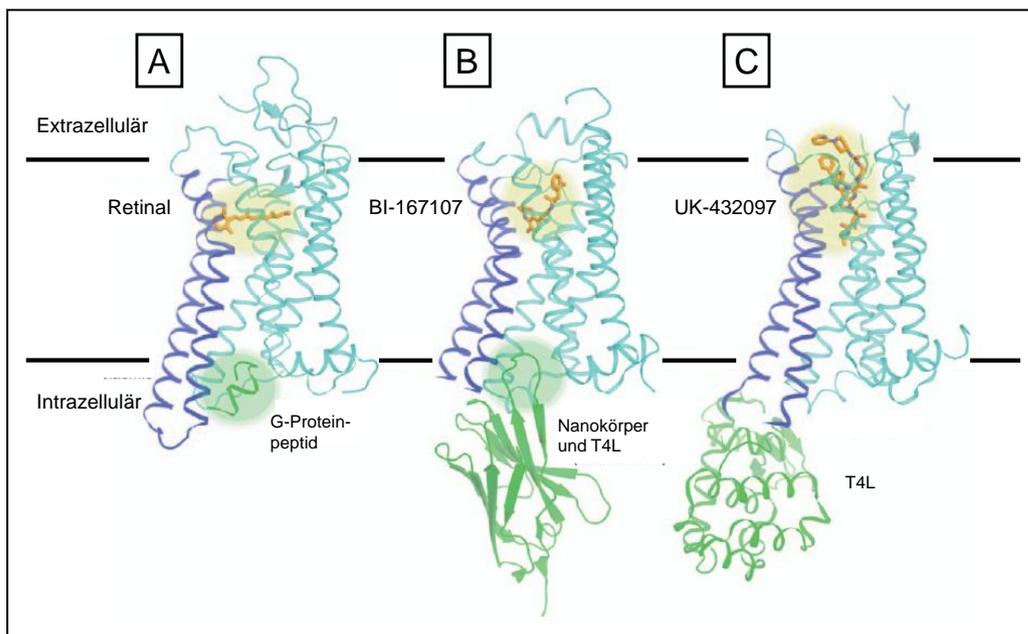


Abb. 1.3: Kristallstrukturen des Rhodopsin-Rezeptors (A), des humanen β_2 -adrenergen Rezeptors (B) und des humanen Adenosin- A_{2A} -Rezeptors (C)⁶⁸

T4L: T4-Lysozym-Fusionsprotein

Die Strukturen des aktiven β_2 AR und des A_{2A} R zeigen Agonist-induzierte Konformationsänderungen in ihrer Bindungstasche ähnlich wie Rhodopsin.⁶⁸ Die Agonist-induzierte Konformationsänderung in der Ligand-Bindungstasche ist größtenteils Rezeptor-spezifisch, bedingt durch die verschiedenen chemischen Agonist-Eigenschaften. Jedoch können einige Ähnlichkeiten beobachtet werden, wie die Umlagerung der konservierten Aminosäure-Reste W^{6.48} und F^{6.44} näher zu L^{5.51} und P^{5.50} sowie I/L^{3.40} weg von P^{5.50}, die zu einer Bewegung von TM5 und TM6 bis zur Umlagerung von TM3-TM5-TM6 führen.⁶⁸ Dies könnte möglicherweise ein gemeinsames Motiv der GPCR-Aktivierung darstellen.⁶⁸

Neue Einblicke in die Ligand-Bindungstasche des A_{2A}R sind durch die Kristallisation einer thermostabilisierten Mutante A_{2A}-StaR2 mit den inversen Agonisten ZM241385, den Xanthinen XAC (8-(4-(2-amino-ethyl)amino)-carbonyl-methoxyphenyl)-1,3-dipropylxanthin) und Coffein möglich.⁷³ Dabei handelt es sich, um die erste Struktur des A_{2A}R im inaktiven Zustand, in der das ERY-Motiv mit E288^{6,30} und R102^{3,50}, das sogenannte „*ionic lock*“ wie im inaktiven Zustand von Rhodopsin, und die gesamte dritte intrazelluläre Schleife, die an der G-Protein-Kopplung beteiligt und aus einer verlängerten TM5- und TM6-Helix zusammengesetzt ist, vorhanden sind.⁷³ Die Position von TM5 und TM6 im A_{2A}-StaR2 bildet den Startpunkt für die Konformationsänderung, wo die beiden Helices sehr nah beieinander liegen und ebenfalls durch das „*ionic lock*“ von TM3.⁷³

Die bekannten GPCR-Röntgenstrukturen sind zusammenfassend und vergleichend in Tab. 1.1 dargestellt.

Tab. 1.1: Kristallisierungseigenschaften der GPCR-Strukturen

Kristallisierter Rezeptor	Ligand		Besonderheit	Literatur
Rhodopsin-Rezeptor				
Natives Protein	Inverser Agonist	11- <i>cis</i> -Retinal	Inaktiver Zustand des GPCRs	30
Natives Protein mit und ohne synthetisches G _α CT-Peptid	Ligand-freier Rezeptor		Opsin (aktive Form von Rhodopsin)	38,39
Natives Protein mit und ohne synthetisches G _α CT-Peptid	Voll-Agonist	all- <i>trans</i> -Retinal	Meta-rhodopsin II, aktiver Zustand des GPCRs	43
E113Q-Mutante, mit synthetischem G _α CT-Peptid	Partial-Agonist	all- <i>trans</i> -Retinal	konstitutiv aktiv, Licht-aktiviert vor Kristallisierung	42
humaner β₂AR				
IL3 mit Antikörperfragment Fab5	Partiell inverser Agonist	Carazolol	Inaktiver Zustand des GPCRs	23
T4-Lysozym-Fusionsprotein, C-Terminus-Deletion (366-413)	Partiell inverser Agonist	Carazolol	Inaktiver Zustand des GPCRs	24,51

Kristallisierter Rezeptor	Ligand		Besonderheit	Literatur
T4-Lysozym-Fusionsprotein, N-Terminus-Deletion (1-23), C-Terminus-Deletion (366-413)	Irreversibler Agonist	FAUC50	Inaktiver Zustand des GPCRs	67
Antikörperfragment Nb80 (<i>nanobody</i>), T4-Lysozym-Fusionsprotein, C-Terminus-Deletion (366-413)	Agonist	BI-167107	Aktiver Zustand des GPCRs	66
Antikörperfragment Nb35 (<i>nanobody</i>), T4-Lysozym-Fusionsprotein, C-Terminus-Deletion (366-413), G _s -Protein	Agonist	BI-167107	Aktiver Zustand des GPCRs	72
Truthahn-β₁AR				
Kombination von stabilisierenden Mutationen (β ₁ AR-m23), N-Terminus-Deletion (1-19), C-Terminus-Deletion (368-413), IL3-Deletion (244-271, 277-278)	Antagonist	Cyanopindolol	Inaktiver Zustand des GPCRs	26
Kombination von stabilisierenden Mutationen (β ₁ AR-m23), N-Terminus-Deletion (1-19), C-Terminus-Deletion (368-xxx), IL3-Deletion (244-271)	Agonist	Carmoterol, Isoprenalin	Inaktiver Zustand des GPCRs	69
	Partial-Agonist	Dobutamin, Salbutamol		
Humaner Adenosin-A_{2A}R				
T4-Lysozym-Fusionsstrategie, C-Terminus-Deletion (317-412)	Antagonist	ZM241385	Inaktiver Zustand des GPCRs	25
T4-Lysozym-Fusionsstrategie, C-Terminus-Deletion (317-412)	Agonist	UK-432097	Aktiver Zustand des GPCRs	70
Kombination von stabilisierenden Mutationen (A _{2A} R-GL31), C-Terminus-Deletion (317-412)	Agonist	Adenosin, NECA	Übergangskonformation zwischen dem inaktiven und aktiven Zustand	71
Kombination von stabilisierenden Mutationen (A _{2A} -StaR2), C-Terminus-Deletion (316-412)	Inverse Agonisten	ZM241385, Xanthine (XAC, Coffein)	Inaktiver Zustand des GPCRs	73
Dopamin D₃R				
Punktmutation L119W, T4-Lysozym-Fusionsstrategie	Antagonist	Eticlopid	Inaktiver Zustand des GPCRs	65

Kristallisierter Rezeptor	Ligand		Besonderheit	Literatur
CXCR4-Chemokinrezeptor				
Mutation L125A, T4-Lysozym-Fusionsstrategie	Antagonist	IT1t	Inaktiver Zustand des GPCRs	64
	Peptid- inhibitor	CVX15		

1.1.2 Klassifizierung der G-Protein-gekoppelten Rezeptoren

Im Jahre 1994 wurden die G-Protein-gekoppelten Rezeptoren aufgrund von funktionellen und strukturellen Eigenschaften in die Klassen A-F eingeteilt.^{74,75} Dieses System wurde auch von der internationalen Union für Pharmakologie (IUPHAR-Komitee für Rezeptor-Nomenklatur und Klassifizierung) genutzt.¹⁰ Aufgrund von phylogenetischen Merkmalen wurde 2003 das GRAFS-System, Glutamat-, Rhodopsin-, Adhäsions-, Frizzled / Taste 2- und Secretin-Rezeptorfamilie, eingeführt.^{7,10} Im Folgenden werden die 5 Klassen der GRAFS-Nomenklatur unter Berücksichtigung der Kolakowski / NC-IUPHAR Nomenklatur näher beschrieben.¹⁰

Bei den **Glutamat-Rezeptoren**, entsprechen der Klasse C, sind 22 humane Proteinsequenzen bekannt.¹⁰ Aufgrund ihres langen N-Terminus binden sie ihren endogenen Liganden innerhalb der N-terminalen Region.^{10,76} Die **Rhodopsin-Rezeptoren** entsprechen der Klasse A und bilden die größte Gruppe mit 701 Vertretern, die in vier Gruppen (α , β , γ und δ) unterteilt sind.^{7,10,77} Allen gemeinsam ist ein kurzer N-Terminus und ein spezifisches Aminosäure-Motiv, z. B. DRY zwischen TM3 und IL2 und NSxxNPxxY in TM7.^{7,10,76} Im Gegensatz zu den anderen Familien wird davon ausgegangen, dass die Liganden in einer Bindungstasche zwischen den transmembranären Domänen binden.⁷⁶ Eine enorme Vielfältigkeit von Liganden, wie Peptide, Amine und Purine, binden an diese Rezeptorklasse.^{10,76,77} Die **Adhäsions-Rezeptoren** mit 33 Vertretern entsprechen der Klasse B und werden auch LNB-7TM Familie genannt.¹⁰ Dabei steht das „LN“ für einen 200-2800 Aminosäuren langen N-Terminus (*long N-Termini*) und „B“ für die Sequenzgleichartigkeit zwischen den transmembranären Regionen von Adhäsions- und Secretin-Rezeptoren (ebenfalls Klasse B).^{7,10,76,78} Der Name bezieht sich auf diesen langen N-Terminus, da die darin enthaltenen Motive wahrscheinlich an der Zelladhäsion beteiligt sind.^{7,78} Die **Frizzled / Taste 2-Rezeptoren** bestehen aus 24 Vertretern und besitzen einen sehr kurzen N-Terminus.⁷ Die zwei Rezeptorgruppen enthalten konservierte Sequenz-Motive, die in den vier anderen Klassen nicht gefunden wurden.⁷ Die **Secretin-Rezeptoren** entsprechen der Klasse B und sind eine sehr kleine Klasse mit 15 Vertretern.¹⁰ Die Familie wurde so benannt, da der Secretin-Rezeptor als Erstes innerhalb dieser Klasse kloniert wurde.⁷ Eher große Peptide, die eine

große Aminosäure-Ähnlichkeit besitzen, werden von der extrazellulären Hormon-bindenden Domäne gebunden.^{7,10} In dem 60-80 Aminosäuren langen N-Terminus sind konservierte Cysteine enthalten, die ein Netzwerk aus drei Cysteinbrücken bilden und somit wichtig für die Ligandbindung an den Rezeptor sind.^{7,10,76}

1.1.3 Signaltransduktion

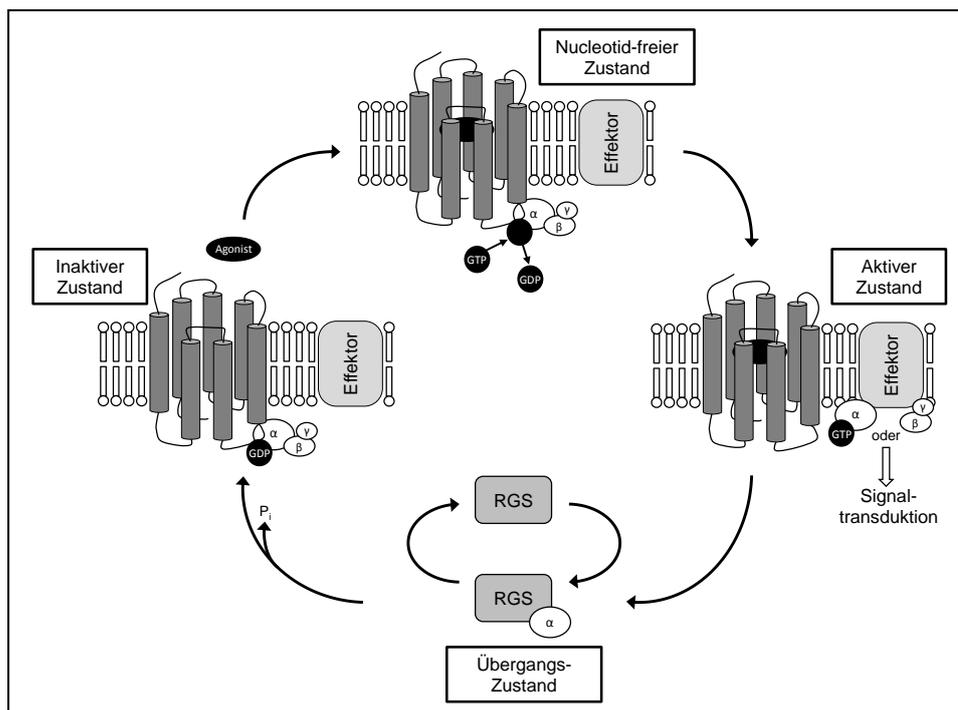


Abb. 1.4: Modell der GPCR-induzierten Aktivierung durch heterotrimere G-Proteine, modifiziert nach⁷⁹

GDP: Guanosindiphosphat; GTP: Guanosintriphosphat; RGS: Regulatoren der G-Protein-gekoppelten Signalübertragung; P_i : Phosphat

In Abb. 1.4 ist das klassische „four-state“ Modell der G-Protein-Aktivierung dargestellt.⁷⁹ Der durch Bindung des Agonisten aktivierte GPCR dient als ein Guanin-Nucleotid-Austauschfaktor (GEF) und katalysiert den GDP-/GTP-Austausch. Das dissoziierte G-Protein, bestehend aus der GTP-gebundenen G_α -Untereinheit und dem freien $G_{\beta\gamma}$ -Dimer, stellt den aktiven Zustand dar, in dem beide Untereinheiten (G_α und $G_{\beta\gamma}$) den Effektor, z. B. die Adenylatcyclase (AC) oder die Phospholipase C (PLC), inhibieren bzw. aktivieren können.⁷⁹ Die Regulatoren der G-Protein-gekoppelten Signalübertragung (RGS), die als GTPase-aktivierende Proteine fungieren, stabilisieren den Übergangszustand und forcieren dadurch die Hydrolyse des GTP durch die G_α -Untereinheit. Der inaktive, trimere Zustand der G-Proteine wird durch die Reassoziierung der GDP-gebundenen G_α -Untereinheit mit dem $G_{\beta\gamma}$ -Dimer wieder erreicht.⁷⁹

Tab. 1.2: Subtypen der G-Protein α -Untereinheit und ihre Effektorsysteme⁸⁰⁻⁸²

G $_{\alpha}$ -Familie	G _s		G _{i/0}				G _{q/11}				G _{12/13}	
Isoformen	α_s	α_{olf}	$\alpha_{i1/2/3}$	$\alpha_{0A/B}$	$\alpha_{i1/2}$	α_z	α_q	α_{11}	α_{14}	$\alpha_{15/16}$	α_{12}	α_{13}
Effektor	AC		AC				PLC				Rho-GEF	
Effekt	cAMP ↓		cAMP ↓				IP ₃ DAG [Ca ²⁺] _i ↑					

G_s: die Adenylatcyclase stimulierendes G-Protein; G_{i/0}: inhibitorisches G-Protein; G_{q/11}: die Phospholipase C stimulierendes G-Protein; G_{12/13}: die Rho-Proteine aktivierende G-Proteine; AC: Adenylatcyclase; PLC: Phospholipase C; Rho-GEF: Rho-Guanin-Nucleotid-Austauschfaktor; cAMP: cyclisches Adenosinmonophosphat; IP₃: Inositol-1,4,5-trisphosphat; DAG: Diacylglycerol; [Ca²⁺]_i: intrazelluläre Calciumkonzentration

Die an dem Effektormechanismus beteiligte G $_{\alpha}$ -Untereinheit wurde aufgrund ihrer Homologie in vier Subklassen, G_s, G_{i/0}, G_{q/11} und G_{12/13}, unterteilt (s. Tab. 1.2). Das 45 kDa große Protein wurde als α -Untereinheit des Adenylatcyclase stimulierenden G-Proteins **G_s**, und die entsprechenden 35 und 8-10 kDa großen Polypeptide der β - und γ -Untereinheiten, die gemeinsam das heterotrimere G-Protein bilden, bezeichnet.^{83,84} Durch die Aktivierung der Adenylatcyclase (AC) wird ATP unter Abspaltung von Pyrophosphat (Diphosphat) in cAMP umgewandelt, und die intrazelluläre cAMP-Konzentration steigt an (s. Abb. 1.5). Die α -Untereinheit der **G_{i/0}**-Proteine ist 41 kDa groß und führt zu einer Inhibition der Adenylatcyclase, wodurch die Bildung von intrazellulärem cAMP aus ATP gehemmt wird (s. Abb. 1.5).⁸⁴ Aber auch die Aktivierung der Phospholipase C (PLC) wird durch die $\beta\gamma$ -Untereinheit der G_{i/0}-Proteine vermittelt.⁸⁵ Das aus Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat (PIP₂) gebildete Inositol-1,4,5-trisphosphat (IP₃) führt zu einer Freisetzung von intrazellulärem Ca²⁺ aus dem endoplasmatischen Retikulum und somit zu einem intrazellulärem Ca²⁺-Anstieg. Das gebildete Diacylglycerol (DAG) führt dazu, dass die Proteinkinase C (PKC) aktiviert wird. Die Aktivierung der Phospholipase C kann auch durch das 42 kDa große Polypeptid der α -Untereinheit der **G_{q/11}**-Proteine ausgelöst werden (s. Abb. 1.5).⁸⁴ Eine weitere Subklasse bilden die **G₁₂**- und **G₁₃**-Proteine, die an der heterotrimeren G-Protein-gekoppelten Signalübertragung und der Zellantwort beteiligt sind.⁸⁴ Die Regulierung der Bildung von Actomyosin-basierenden Strukturen und damit der Kontraktilität wird durch die gesteigerte Aktivität der „kleinen“ GTPase RhoA erreicht. Die Aktivierung von RhoA wird durch eine Untergruppe der Guanin-Nucleotid-Austauschfaktoren (GEF) für Rho bewirkt (s. Abb. 1.5).⁸²

Das Effektorsystem kann nicht nur durch die GTP-gebundene G $_{\alpha}$ -Untereinheit, sondern auch über das G $_{\beta\gamma}$ -Dimer reguliert werden.⁸² Nach der Aktivierung kann das freie **G_{\beta\gamma}**-Dimer die G-Protein-gekoppelte Rezeptor-Kinase (GRK) aktivieren, diese katalysiert die Phosphorylierung von Serin- und Threonin-Resten in der dritten intrazellulären Schleife und im C-Terminus des aktivierten Rezeptors.^{86,87} Daraufhin kann β -Arrestin an den Rezeptor binden und der Rezeptor-

β -Arrestin-Komplex wird in Endosomen internalisiert. Dort kann der GPCR entweder dephosphoryliert und somit zur Zellmembran recyclet oder aber abgebaut werden.⁶ Dieser Prozess resultiert in der Abnahme des G-Protein-abhängigen Signaltransduktionsweges, auch Desensitivierung des Rezeptors genannt, da die Interaktion des Rezeptors mit G-Proteinen verhindert wird.^{86,88} Die Desensitivierung des Rezeptors kann auch durch die *second-messenger* Kinase PKC ausgelöst und somit bei der Signalübertragung von den G-Proteinen $G_{i/o}$ und $G_{q/11}$ hervorgerufen werden. Das GRK/ β -Arrestin-System ist bifunktional und kann auch eine G-Protein-unabhängige Signaltransduktion auslösen.⁸⁸⁻⁹⁰ β -Arrestin ist ein GPCR-bindendes Protein, das auch die Funktion von Mitogen-aktivierten Proteinkinasen (MAPKinasen) aktivieren kann.^{87,90,91} Die MAPKinasen, konservierte Serin-/Threonin-Kinasen, regulieren das Zellwachstum, die Zelldifferenzierung und die Apoptose, indem extrazelluläre Signal-regulierende Kinasen (ERK), C-Jun N-terminale Kinasen / Stress-aktivierte Proteinkinasen (JNK / SAPK) und p38 MAPKinasen aktiviert werden.^{89,91}

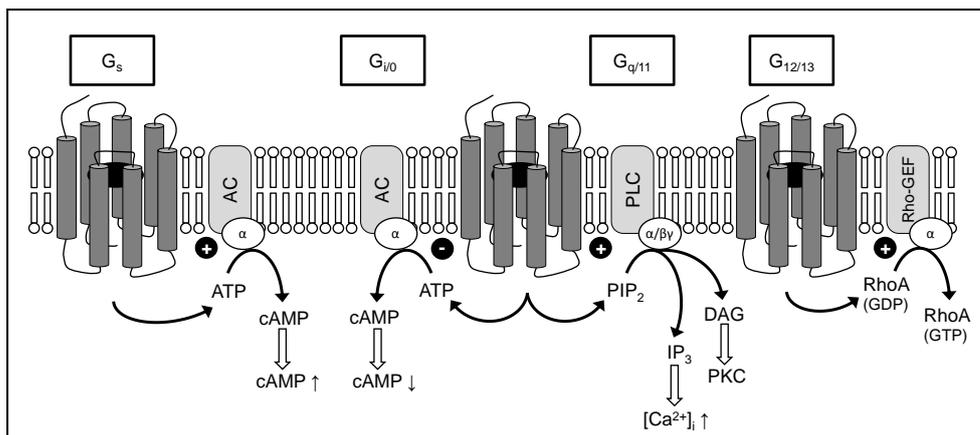


Abb. 1.5: Modell der G-Protein-Kopplung, modifiziert nach⁸⁵

G_s : die Adenylatcyclase stimulierende G-Protein; $G_{i/o}$: inhibitorisches G-Protein; $G_{q/11}$: die Phospholipase C stimulierende G-Protein; $G_{12/13}$: die Rho-Proteine aktivierende G-Proteine; AC: Adenylatcyclase; PLC: Phospholipase C; Rho-GEF: Rho-Guanin-Nucleotid-Austauschfaktor; ATP: Adenosintriphosphat; cAMP: cyclisches Adenosinmonophosphat; PIP_2 : Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat; IP_3 : Inositol-1,4,5-trisphosphat; $[Ca^{2+}]_i$: intrazelluläre Calciumkonzentration; DAG: Diacylglycerol; PKC: Proteinkinase C

Liganden, die in die G-Protein- und β -Arrestin-Signalübertragung involviert sind, besitzen eine pluridimensionale Wirksamkeit.^{92,93} Funktionell selektive Liganden können selektiv entweder die G-Proteine oder die β -Arrestin-Funktion aktivieren und besitzen somit die Fähigkeit, selektiv eine einzelne Rezeptor-Konformation, die für den selektiven Signaltransduktionsweg verantwortlich ist, zu stabilisieren.^{94,95} Dabei werden Liganden, die die Stimulation einer Rezeptor-Aktivierung ohne eine Stimulation einer anderen Rezeptor-Aktivierung bewirken, als funktionell selektive Liganden bezeichnet.⁹⁴ Die meisten Liganden sind allerdings

nur teilweise funktionell selektiv, da sie selektiv für verschiedene Signaltransduktionswege sind und somit z. B. als Vollagonist für eine Signalübertragung und als Partialagonist für eine zweite Signalübertragung durch den gleichen Rezeptor dienen.^{94,96} Dieses Phänomen besitzt in der Literatur verschiedene Namen von *stimulus trafficking* bzw. *agonist-directed trafficking* über *biased agonism* zu *functional selectivity*.^{93,96} Dies führt zu der Möglichkeit neuartige, selektive Liganden zu entdecken, die unterschiedlich eine Untergruppe von Funktionen eines einzelnen Rezeptors aktivieren und dadurch optimierte therapeutische Wirkung hervorrufen könnten.⁹⁶

Aufgrund dieser komplexeren Rezeptor-Pharmakologie ist die klassische Pharmakologie mit der Klassifizierung Agonist, Partialagonist, Antagonist, inverser Agonist und die Definition der Ligand-Protein-Interaktion, das einfache Schlüssel-Schloss-Prinzip, nicht weiter gültig bzw. nicht ausreichend. Im Folgenden wird kurz auf die klassische Pharmakologie eingegangen. Liganden besitzen zwei Basiseigenschaften: Die Affinität zum Rezeptor, ausgedrückt durch die Gleichgewichtsdissoziationskonstante des Ligand-Rezeptor-Komplexes, und die Wirksamkeit, *efficacy* am Rezeptor nach der Ligandbindung.^{97,98} Ein Agonist bindet an den Rezeptor und führt zu einer Signaltransduktion, besitzt also eine intrinsische Aktivität bzw. positive Wirksamkeit (*efficacy* = 1).^{99,100} Somit zeigt ein Agonist eine bevorzugte Affinität zum aktiven Zustand, in dem dieser stabilisiert wird.¹⁰¹ Ein Agonist, der zu einer maximalen Signalantwort führt, wird als Voll-Agonist bezeichnet, wohingegen bei einer geringeren Signalantwort bzw. Wirksamkeit (*efficacy* > 0, < 1) von einem Partial-Agonisten gesprochen wird.^{102,103} Ein Antagonist bindet sowohl an den aktiven als auch den inaktiven Zustand des Rezeptors, das heißt, er besitzt eine Affinität zum Rezeptor, löst aber keinen Effekt aus (*efficacy* = 0).⁹⁹⁻¹⁰¹ Es werden zwei Arten von neutralen Antagonisten unterschieden: kompetitive und nicht-kompetitive. Die Bindung der kompetitiven Antagonisten kann durch eine gesteigerte Dosis des Agonisten verdrängt werden, da sowohl der Agonist als auch der Antagonist an die gleiche Bindungsstelle des Rezeptors binden. Beim nicht-kompetitiven Antagonismus führt die Erhöhung der Konzentration des Agonisten nicht unbedingt zu einer Verdrängung des Antagonisten, da dieser an eine allosterische Bindungsstelle des Rezeptors bindet.^{102,103} Rezeptoren können eine basale, konstitutive Aktivität besitzen, was sich durch eine Aktivierung des Rezeptors in Abwesenheit eines Agonisten äußert. Diese konstitutive Aktivität kann durch inverse Agonisten, auch negative Antagonisten genannt, blockiert werden, in dem eine negative intrinsische Aktivität erhalten wird.^{99,103} Sowohl der Agonist als auch der inverse Agonist können durch neutrale kompetitive Antagonisten verdrängt werden.^{99,101-103} Die inversen Agonisten zeigen eine bevorzugte Bindung an den inaktiven Zustand und stabilisieren diesen.¹⁰¹ Wie auch bei den Agonisten wird bei geringerer Wirksamkeit von einem partiellen inversen Agonisten gesprochen.¹⁰¹

1.1.4 Purinerge Rezeptoren

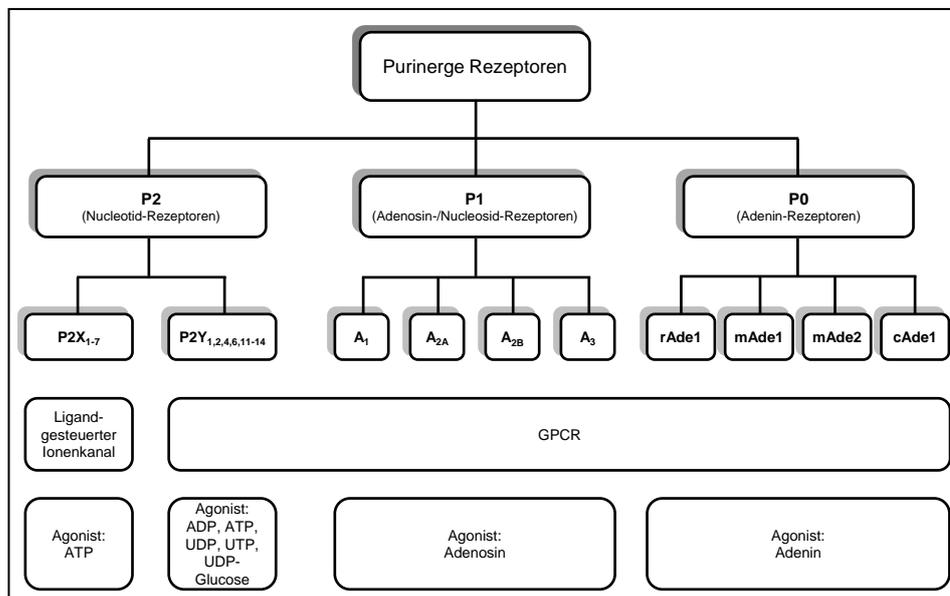


Abb. 1.6: Einteilung der purinergen Rezeptoren¹⁰⁴⁻¹⁰⁹

Zum ersten Mal wurden die Purine als extrazelluläre Signalmoleküle im Jahre 1929 beschrieben.¹¹⁰ Der erste Hinweis auf die unterschiedliche Aktivität von Adenosin und ATP und damit die Folgerung auf die Existenz verschiedener Purin-Rezeptoren wurde im Jahre 1934 formuliert.¹¹¹ Im Jahre 1976 wurde von Burnstock *et al.* der Begriff „purinerge Rezeptoren“ geprägt.¹¹² Einige Jahre später folgte die Unterscheidung in P1- (Adenosin) und P2-Rezeptoren (ATP und ADP).¹⁰⁴ Der Zusammenhang zwischen den P1- und P2-Rezeptoren wird im Folgenden kurz veranschaulicht: Das extrazelluläre ATP kann durch NTPDasen (Nucleosidtriphosphat-Diphosphohydrolasen) zu ADP und AMP hydrolysiert werden, aber auch, wie ADP, an P2-Rezeptoren binden. Durch die Ecto-5'-Nucleotidase ist die Bildung von Adenosin aus AMP möglich. Das gebildete Adenosin kann entweder über Transporter in die Zelle transportiert oder an P1-Rezeptoren gebunden werden. In der Zelle kann Adenosin durch Adenosin-kinasen zu AMP metabolisiert werden. Durch intrazelluläre 5'-Nucleotidasen kann AMP dephosphoryliert werden und dadurch wieder Adenosin entstehen. Das intrazelluläre Adenosin kann durch spezifische bi-direktionale Transporter in den extrazellulären Raum befördert werden.¹⁰⁸ Die Einteilung der purinergen Rezeptoren ist in Abb. 1.6 dargestellt.

Die **P2-Rezeptoren** wurden im Jahre 1985 aufgrund ihrer Pharmakologie in die zwei Subtypen P2X und P2Y eingeteilt.¹⁰⁵ Einige Zeit später wurde diese Einteilung bestätigt und erweitert.^{106,107}

Die **P2X-Rezeptoren** sind Ligand-gesteuerte Ionenkanäle, die Millisekunden nach ihrer Aktivierung ihre Kationen-selektiven Kanäle, die nahezu gleiche Permeabilität für Na^+ und K^+ sowie signifikante Permeabilität für Ca^{2+} besitzen, öffnen.^{106,113,114} Bisher sind sieben Subtypen bekannt: P2X_{1-7} .¹¹⁴⁻¹¹⁶ Die Topologie der membranständigen P2X-Ionenkanäle ist wie folgt: Intrazellulärer N- und C-Terminus, zwei Transmembranregionen und eine große extrazelluläre Schleife, die die Bindungsstelle für ATP und andere Modulatoren enthält und durch konservierte Cysteine über eine Reihe von Disulfidbrücken stabilisiert ist.^{114,116} Somit befindet sich das Protein größtenteils extrazellulär.^{113,114} Wie auch andere Ionenkanäle sind P2X-Rezeptoren homo- und heteromere Proteine, zusammengesetzt aus drei Untereinheiten pro funktionalem Rezeptor.^{114,117} Die Ausnahme bildet zum einen der P2X_6 -Rezeptor, der keine Homo-Oligomere bildet, und zum anderen der P2X_7 -Rezeptor, der nur als Homo-Oligomer beschrieben wurde.^{114,117} Der hetero-oligomere Aufbau der P2X-Rezeptoren erklärt einige der beobachteten funktionellen Diversitäten von ATP in den untersuchten nativen und rekombinanten Zellen.¹¹⁷

Tab. 1.3: P2Y-Rezeptoren und ihre endogenen Agonisten sowie ihre Effektorsysteme^{106,115,118}

Subtyp	P2Y ₁	P2Y ₂	P2Y ₄	P2Y ₆	P2Y ₁₁	P2Y ₁₂	P2Y ₁₃	P2Y ₁₄
Agonist	ADP	UTP, ATP	UTP	UDP	ATP	ADP	ADP	UDP-Glucose
G-Protein	G _{q/11}	G _{q/11}	G _{q/11}	G _{q/11}	G _{q/11} G _s	G _{i/o}	G _{i/o}	G _{i/o}
Effektor	PLC	PLC	PLC	PLC	PLC AC	AC	AC	AC

ADP: Adenosindiphosphat; ATP: Adenosintri-phosphat; UTP: Uridintri-phosphat; UDP: Uridindiphosphat; G_{q/11}: die Phospholipase C stimulierende G-Protein; G_s: die Adenylatcyclase stimulierende G-Protein; G_{i/o}: inhibitorisches G-Protein; PLC: Phospholipase C; AC: Adenylatcyclase

Die **P2Y-Rezeptoren** sind G-Protein-gekoppelte Rezeptoren, die ihre Aktivierung über selektive Effektorsysteme vermitteln. Die Phospholipase C (PLC), die die Bildung von Inositol-1,4,5-trisphosphat (IP₃) und Diacylglycerol (DAG) beeinflusst, kann zu einer intrazellulären Ca^{2+} -Freisetzung führen. Manche P2Y-Rezeptoren können aber auch die Adenylatcyclase (AC) aktivieren (G_s) oder inhibieren (G_i), wodurch die cAMP-Konzentration ansteigt oder vermindert wird (s. Tab. 1.3).^{106,115,118} Bisher sind acht Subtypen der P2Y-Rezeptoren bekannt: P2Y₁, P2Y₂, P2Y₄, P2Y₆, P2Y₁₁,^{115,118,119} P2Y₁₂,^{120,121} P2Y₁₃,^{122,123} P2Y₁₄.^{119,124} Die fehlenden Nummern (P2Y₃, P2Y₅, P2Y₇, P2Y₈, P2Y₉, P2Y₁₀) repräsentieren GPCRs, die zu den Wirbeltieren ortholog sind oder Rezeptoren, die eine Sequenzhomologie zu den P2Y-Rezeptoren besitzen, bei denen aber bisher der funktionelle Beweis für die Aktivierung durch Nukleotide fehlt bzw. die in zwischen anderen Rezeptorfamilien zugeordnet werden konnten.^{115,118} Die Sequenzhomologie untereinander ist nur sehr gering (19-55 %) und infolgedessen

wurden signifikante Unterschiede in ihrer Pharmakologie gezeigt. Daher wurde eine Unterteilung aufgrund des Verwandtschaftsgrades und der strukturellen Unterschiede in die P2Y_{1,2,4,6,11}- und die P2Y₁₂₋₁₄-Rezeptoren vorgeschlagen.^{116,119}

Die **P1-Rezeptoren** sind ebenfalls G-Protein-gekoppelte Rezeptoren und werden aufgrund ihres physiologischen Agonisten auch Adenosin-Rezeptoren genannt.¹⁰⁸ Aufgrund ihrer unterschiedlichen Pharmakologie sind vier Subtypen, A₁, A_{2A}, A_{2B} und A₃, bekannt (s. Tab. 1.4).¹⁰⁸ Zunächst wurden die beiden Subtypen A₁ und A₂ identifiziert, die die Adenylatcyclase entweder im nanomolaren Bereich inhibieren (A₁) oder im oberen nano- bis mikromolaren Bereich stimulieren (A₂).¹²⁵⁻¹²⁸ Weitere Studien zeigten, dass A₂-Rezeptoren weiter unterteilt werden können, nämlich in die Subtypen A_{2A} (*high affinity*) und A_{2B} (*low affinity*).^{108,129,130} Als letztes wurde der A₃-Subtyp identifiziert, der wie der A₁-Subtyp die Adenylatcyclase inhibiert.^{131,132}

Tab. 1.4: Adenosin-Rezeptoren und ihre Effektorsysteme¹⁰⁸

Subtyp	A ₁	A _{2A}	A _{2B}	A ₃
G-Protein	G _{i/o}	G _s	G _s G _{q/11}	G _{i/o} G _{q/11}
Effektor	AC	AC	AC PLC	AC PLC

G_{i/o}: inhibitorisches G-Protein; G_s: die Adenylatcyclase stimulierendes G-Protein; G_{q/11}: die Phospholipase C stimulierendes G-Protein; AC: Adenylatcyclase; PLC: Phospholipase C

Die **P0-Rezeptoren** sind auch G-Protein-gekoppelte Rezeptoren und werden aufgrund ihres physiologischen Agonisten auch Adenin-Rezeptoren genannt. Die Dephosphorylierung der Nucleotide ATP und ADP (P2-Rezeptoren) führt zu dem Nucleosid Adenosin (P1-Rezeptoren) und eine Spaltung der nucleosidischen Bindung z. B. durch Phosphorylasen führt zur Nucleobase Adenin (P0-Rezeptor).¹⁰⁹ Die Charakterisierung des Ratten- (rAdeR) und des Maus-Adenin-Rezeptors (mAde1R) war Ziel dieser Arbeit, weshalb im nachfolgenden Kapitel auf die Adenin-Rezeptoren näher eingegangen wird.

1.2 Adenin-Rezeptoren

Im Jahre 2002 identifizierten Bender *et al.* die Nucleobase Adenin als den physiologischen Agonisten eines „Orphan“-Rezeptors der Ratte (AJ311952).¹³³ Dieser **Ratten-Adenin-Rezeptor (rAdeR)** ist über ein G_i-Protein inhibitorisch an die Adenylatcyclase gekoppelt.¹³³ Die Deorphanisierung wurde mit dem Prinzip des sogenannten „reversen pharmakologischen Ansatzes“ („*reverse pharmacology approach*“) erreicht.¹³⁴⁻¹³⁷ Dabei wurde zunächst die Gensequenz des entsprechenden „Orphan“-Rezeptors rekombinant in Zellen exprimiert und durch

Extrakte, die den potentiellen Liganden enthalten, konnte die Aktivität am rekombinant exprimierten Rezeptor in funktionellen Versuchen untersucht werden. Der klonierte Ratten-Adenin-Rezeptor zeigte eine hohe Expression in den kleinen Neuronen der Rückenmarksganglien (*dorsal root ganglion*, DRG), was auf eine Beteiligung an der Schmerzweiterleitung schließen lässt, und somit auf eine Verwandtschaft zu den Mas-ähnliche Genen (*Mas-related genes*, Mrg) hindeutet.¹³³ Aufgrund der Verwandtschaft und der Einordnung zu der Mrg-Familie wurde in der Datenbank eine hohe Proteinsequenz-Identität zu rMrgA gefunden. Die Proteinsequenz des rMrgA (NP_665730) ist zu 99,4 % identisch mit dem Ratten-Adenin-Rezeptor, nur die Aminosäuren in Position 38 (Serin anstatt Glycin) und in Position 219 (Leucin anstatt Serin) sind unterschiedlich. Somit scheint es sich bei dem rMrgA um den identifizierten Ratten-Adenin-Rezeptor (rAdeR) zu handeln. Niedrige Expressionsraten des Ratten-Adenin-Rezeptors konnten in der Lunge, im Hypothalamus, im Cortex, in Leukozyten und in den Ovarien gefunden werden.¹³³

Die Identifizierung der großen Familie der GPCRs, die mit dem MAS-Onkogen in Beziehung steht, wurde 1986 als „Mas-ähnliche Gene“ bezeichnet.¹³⁸⁻¹⁴¹ Alternativ werden die Mrgs beim Menschen und in der Ratte auch als *sensory neuron-specific receptors* (SNSR)¹⁴⁰ oder *dorsal root receptors* (DRR) bezeichnet.¹⁴² Diese Gene werden vorzugweise in Spinalganglien, in denen sich afferente Neuronen bzw. Sinnesneuronen befinden, exprimiert, wobei die MrgAs und MrgDs ein unvorhergesehenes Ausmaß an molekularer Vielfalt zeigen.^{139,140,142-144} Aufgrund der Lokalisation scheinen die Gene eine Rolle in der Nozizeption bzw. Schmerz Wahrnehmung zu spielen, wobei das noch immer nicht endgültig bewiesen wurde.^{139,141,142,144,145} Auch ist die physiologische Funktion der Mrg-Rezeptoren und ihr zugrunde liegender Signaltransduktions-Mechanismus noch nicht bekannt.¹⁴⁶ Jedoch wurden verschiedenste Liganden, RF-Amid-Peptide,^{139,146} Proenkephalin A Genprodukt BAM22,^{140,146} β -Alanin,¹⁴⁷ Angiotensin (1-7),¹⁴⁸ Cortistatin¹⁴⁹ und Adenin,¹³³ für etliche Vertreter der Mrg-Familie identifiziert, was auf eine funktionelle Diversität unter den Mrg-Rezeptoren hinweist.^{143,146,150}

In unserer Arbeitsgruppe konnte zum ersten Mal gezeigt werden, dass der Adenin-Rezeptor in Membranpräparationen von nativem Gewebe und Zelllinien, wie Rattencortex, Rattenstriatum und der Mäuse-Neuroblastom x Ratten-Gliom-Hybridzelllinie NG108-15,¹⁵¹ in hoher Dichte exprimiert werden.¹⁵² An Ratten-Membranpräparationen (Cortex und Striatum) wurden Bindungsstudien mit radioaktiv markiertem [³H]Adenin etabliert. Dabei wurde festgestellt, dass das mRNA-Profil (mRNA-Expression Cortex > Striatum)¹³³ nicht zwangsläufig mit dem Proteinexpressions-Level (Proteinexpression Cortex < Striatum) korreliert.¹⁵² Auch wurde eine ungewöhnliche Kinetik gefunden, die durch eine schnelle Assoziation und eine langsame Dissoziation des Radioliganden an den

Rezeptor charakterisiert war.¹⁵² Eine mögliche Erklärung dafür wäre eine Änderung einer initialen gering affinen zu einer hoch affinen Konformation nach der Bindung von [³H]Adenin. Ebenso konnte hinsichtlich der Struktur-Wirkungs-Beziehung nur eine geringe Toleranz der Substitution des Adenin-Grundgerüsts beobachtet werden.^{152,153} An Rattencortex-Membranpräparationen werden Substitutionen in Position 8 oder 9 mit basischen Resten oder die Einführung von polaren Substituenten an der 6-Aminofunktion am besten toleriert.¹⁵³ In cAMP-Experimenten an stabil transfizierten 1321N1-Astrozytomzellen, die den RattenAdeR überexprimieren, zeigten die untersuchten Verbindungen agonistische oder partial agonistische Effekte.¹⁵³ Jedoch ist mittlerweile der erste Adenin-Rezeptor-Antagonist PSB-08162 (3-Methylamino-N(9H-purin-6-yl)propionamid) bekannt, der ein wichtiges pharmakologisches Werkzeug darstellt.¹⁵⁴⁻¹⁵⁶ Auch konnte gezeigt werden, dass Membranpräparationen von Rattenhirnen sowie Synaptosomen-reiche Fraktionen eine Bindungsstelle für [³H]Adenin besitzen.¹⁵⁷ [³H]Adenin-Bindungsaffinität wurde im Gehirn, vor allem im Cerebellum und Rückenmark, sowie im Herz, in der Niere und im Hoden gefunden.¹⁵⁷ Bindungsstudien an Membranpräparationen von Rattenhirnen zeigten jedoch auch einige widersprüchliche Beobachtungen, wie Blockade der Bindung durch Zugabe von 10 µM Hypoxanthin oder durch das Fehlen von Magnesium im verwendeten Puffer, wodurch die detektierten Bindungsstellen nicht identisch mit dem beschriebenen rAdeR zu sein scheinen.¹⁵⁸ Weiterhin wurde Bindung von [³H]Adenin an die Glasfaserfilter in Abwesenheit eines Proteins gemessen, die den Radioliganden [³H]Adenin als ungeeignet erscheinen ließen.¹⁵⁹ Jedoch konnte durch Schiedel *et al.* überzeugend gezeigt werden, dass der Radioligand durchaus für das Labelling des Adenin-Rezeptors gut geeignet ist,¹⁶⁰ denn die mikrobielle Kontamination im Puffer, die eine hochaffine bakterielle Bindungsstelle für [³H]Adenin besitzt, kann leicht durch Filtrieren (0,2 µM Filter) oder durch Erhitzen für 3 min bei 80 °C oder durch Autoklavieren des Puffers beseitigt werden.¹⁶⁰

In der Mrg-Familie befinden sich meist die selektierten Stellen des Rezeptors nahe der extrazellulären Domäne.¹⁴⁵ Die Bindung der Liganden an den GPCR findet daher wahrscheinlich in der extrazellulären Domäne und in den in Nachbarschaft liegenden oberen Teilbereichen der transmembranären Domänen statt.^{18,145} Ein vorhergesagtes Homologie-Modell des mMrgC11 (Q8CIP3),¹⁶¹ das auf der Frosch-Rhodopsin-Röntgenstruktur^{162,163} basiert, wurde als Vorlage für die 3D-Struktur des Ratten MrgA-Rezeptors (Q7TN49) verwendet (s. Abb. 1.7).¹⁶⁴ Die Sequenzidentität des rMrgA-Rezeptors zum mMrgC11 beträgt 49 %. Die Bindungstasche des Agonisten Adenin im rMrgA-Rezeptor scheint in den TM-Helices 3, 4, 5 und 6 zu liegen, wobei die Asparaginreste in TM3 und TM4 die entscheidenden Aminosäuren für die Ligandbindung darstellen. Nach dem Modell bildet die Seitenkette von Asparagin in Position 115 (TM3) zwei Wasserstoffbrücken mit N3 und N9 von Adenin, wohingegen Asparagin in Position 173

(TM4) zwei Wasserstoffbrücken zu N1 und N6 von Adenin ausbildet.¹⁶⁴ Phenylalanin 110 (TM3) und Histidin 252 (TM6) sollen zu einer π -stacking-Wechselwirkung mit dem Purin-Ring führen.¹⁶⁴

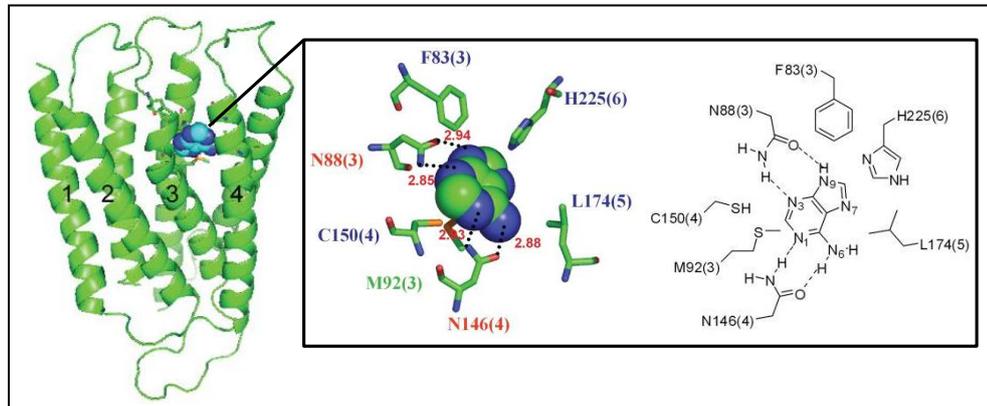


Abb. 1.7: Vorhergesagtes Homologie-Modell des rMrgA-Rezeptors mit der Adenin-Bindungstasche¹⁶⁴

Eine weitere Aminosäure Leucin 201 (TM5) bildet nach dem Modell eine hydrophobe Wechselwirkung mit Adenin aus. Durch diese fünf Aminosäuren wird Adenin nach der Vorhersage fest in der Bindungstasche gehalten (s. Abb. 1.7).¹⁶⁴ Diese vermutete Bindungsstelle stimmt weitgehend mit den empirischen Beobachtungen von Nobeli *et al.* überein.¹⁶⁵ Die aromatischen Reste im Protein stabilisieren die Umgebung, in dem sie mit dem Liganden eine π -stacking-Wechselwirkung ausbilden, wobei Histidin wohl günstig für eine Wechselwirkung mit Adenin ist. Die Aminosäure-Seitenkette von Asparagin ist befähigt eine doppelte H-Brückenbindung mit der Amidgruppe auszubilden und damit sowohl Donor (N1 oder N7) als auch Akzeptor (N6) zu sein.¹⁶⁵ Der Ratten MrgA-Rezeptor (Q7TN49)¹⁶⁴ und der identifizierte Ratten-Adenin-Rezeptor (AJ311952)¹³³ sind zu 91,2 % in ihrer Proteinsequenz identisch, wobei dem rMrgA-Rezeptor die ersten 27 Aminosäuren fehlen. Somit konnten in der Nummerierung der Aminosäuren Abweichungen festgestellt werden, die in Tab. 1.5 zusammengefasst sind. In der folgenden Arbeit wird ausschließlich die Nummerierung des Ratten-Adenin-Rezeptors verwendet.

Tab. 1.5: Aminosäure-Nummerierung des rMrgA- und rAde-Rezeptors für die vorhergesagte Adenin-Bindungsstelle

Aminosäure	F	N	N	L	H
rMrgA-Rezeptor	83	88	146	174	225
rAde-Rezeptor	110	115	173	201	252

Durch Datenbanksuche wurde die Aminosäuresequenz des Ratten-Adenin-Rezeptors mit Aminosäuresequenzen anderer Spezies verglichen. Dabei wurde eine Orthologie zur genomischen DNA der Maus gefunden, die für den

mMrgA10 „Orphan“-Rezeptor bzw. **Maus-Adenin-Rezeptor Subtyp 1, mAde1R**, codiert (XM_195647).¹³³ Dieser befindet sich auf der Chromosomregion 7B4 und 7B5.¹⁶⁶ Bis zum heutigen Zeitpunkt fehlt der Beweis, dass die Sequenz des mMrgA10 „Orphan“-Rezeptors einen Adenin-Rezeptor darstellt.^{142,145}

Im Jahre 2008 wurde ein weiterer Adenin-Rezeptor aus Gehirnen von Mäusen und aus der Mäuse-Neuroblastom x Ratten-Gliom-Hybridzelllinie NG108-15 kloniert.¹⁶⁶ Durch Expression der Gensequenz in *Sf21*-Insektenzellen und in humanen 1321N1-Astrozytomzellen konnte der neue **Maus-Adenin-Rezeptor Subtyp 2** bzw. **mAde2R** identifiziert werden (DQ386867).¹⁶⁶ Dieses neue Gen ist auf dem Mauschromosom 7B3 lokalisiert.¹⁶⁶ Gerade in der TM3 und in der dritten extrazellulären Schleife sowie in der Pharmakologie unterscheidet sich der mAde2R vom rAdeR, wodurch der mAde2R eher als ein separater Rezeptor-Subtyp als ein Spezies-Homolog angesehen wird.¹⁶⁶ Die Aktivierung des Rezeptors führt ebenfalls zu einer G_i-Protein-vermittelten Inhibition der Adenylatcyclase.^{152,166} Die Affinitäten von Adenin-Derivaten zu Membranpräparationen des nativen Rezeptors (in NG108-15-Zellen) und zu Rattencortex-Membranpräparationen waren ähnlich aber nicht identisch und folgende Reihenfolge der Wirksamkeit wurde erhalten: Adenin > 2-Fluoradenin > 7-Methyladenin > 1-Methyladenin >> N⁶-Benzyladenin = N⁶-Dimethyladenin. Die erhaltenen Unterschiede stimmen mit der Expression verschiedener Rezeptor-Subtypen in nativen NG108-15-Zellen überein, und die unterschiedlichen Umgebungen können zusätzlich zu der Abweichung durch wechselnde Rezeptorkonformationen beitragen.^{166,167} Auch hier wurde durch eine Datenbanksuche eine hohe Proteinsequenz-Identität zu mMrgA9 gefunden. Die Proteinsequenz des mMrgA9 (NP_001171037) ist zu 99,7 % identisch mit dem Maus-Adenin-Rezeptor Subtyp 2, der zusätzlich ein Serin in Position 5 besitzt. Somit scheint der mMrgA9, der gefundene Maus-Adenin-Rezeptor Subtyp 2, zu sein. Auf mRNA-Ebene konnte der mAde2R in neuronalen Geweben (hohe Expression) und der Milz (geringe Expression), nicht aber in der Leber und Niere, gefunden werden und damit zeigt dieser Rezeptor im Gegensatz zum rAdeR, der vorwiegend in DRGs vorkommt, eine breitere Expression.¹⁶⁶ In RT-PCR-Experimenten, die mit spezifischen Primern für die rAdeR-Sequenz durchgeführt wurden, konnte auf mRNA-Ebene kein Produkt erhalten werden und somit scheinen die NG108-15-Zellen nicht den bekannten rAdeR zu enthalten, wohingegen mit spezifischen Primern für das Maus-Ortholog mMrgA10 ein Produkt gefunden wurde.¹⁵²

Die Subtypen der Adenin-Rezeptoren besitzen untereinander eine hohe Sequenzhomologie (s. Abb. 1.8). Die Proteinsequenz des Ratten-Adenin-Rezeptors ist zu 75,6 % mit der Proteinsequenz von mAde1R und zu 76,3 % mit der Proteinsequenz von mAde2R identisch. Die beiden Maus-Adenin-Rezeptoren sind dagegen sogar zu 81,6 % in ihrer Proteinsequenz identisch.¹⁶⁶

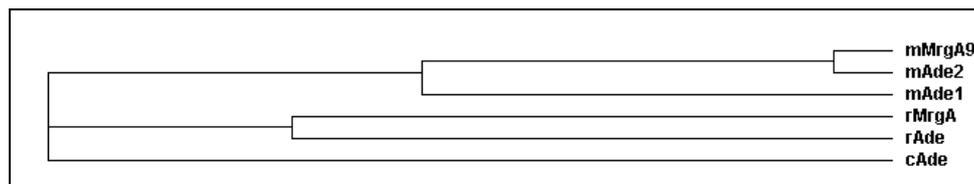


Abb. 1.8: Kladogramm der Adenin-Rezeptoren, erstellt mit ClustalW^{168,169}

In unserer Arbeitsgruppe konnte spezifische Bindung von [³H]Adenin an Membranpräparation von CHOK1-Zellen und CHO-Flp-In-Zellen¹⁶⁶ sowie von humanen Zelllinien, 1321N1-Astrozytomzellen,¹⁵² Nierencarcinomzellen HEK293¹⁵³ und Leukämiezellen Jurkat T,¹⁷⁰ gemessen werden. Aus diesem Grund wird sowohl ein Hamster- als auch ein humaner Adenin-Rezeptor vermutet.^{153,166,170} Für den **Hamster-Adenin-Rezeptor (cAdeR)** konnte bereits von Dominik Thimm die Sequenz kloniert und exprimiert werden. Dieser Rezeptor zeigt ebenfalls eine Inhibition der Adenylatcyclase über ein G_i-Protein,¹⁵⁵ allerdings konnte auch ein intrazellulärer Ca²⁺-Anstieg über ein G_q-Protein gemessen werden. Die Proteinsequenz des cAdeR ist zu 86,1 % zum rAdeR, zu 74,3 % zum mAde1R und zu 73,2 % zum mAde2R identisch. Durch Sequenzvergleich konnte kein direktes humanes Ortholog des rAdeR gefunden werden, was auf eine unterschiedliche Sequenz des **humanen Adenin-Rezeptors (hAdeR)** hindeutet.^{133,166} Jedoch konnte bis heute die Sequenz des humanen Adenin-Rezeptors nicht identifiziert werden. An HEK293-Membranpräparationen, die eine hoch affine und eine zweite, gering affine Adenin-Bindungsstelle besitzen, wurden ähnliche, aber nicht gleiche Struktur-Wirkungs-Beziehungen wie beim rAdeR beobachtet.¹⁵³ Dabei waren die beiden Verbindungen N⁶-Acetyladenin und 8-Aminoadenin an der humanen Bindungsstelle viel wirksamer als an dem Ratten-Adenin-Rezeptor.¹⁵³ In Kinetik-Experimenten konnte gezeigt werden, dass eine schnelle Assoziation und eine langsame Dissoziation des Radioliganden an den Rezeptor beobachtet wurde, so wie bereits für den rAdeR beschrieben.¹⁵⁵ In humanen 1321N1-Astrozytomzellen und in humanen HEK293-Zellen konnte eine Erhöhung der intrazellulären cAMP-Konzentration bzw. eine Stimulation der Adenylatcyclase beobachtet werden, was auf eine G_s-Protein-vermittelte Signalübertragung des hAdeR hindeutet.¹⁷⁰ Funktionelle cAMP-Experimente in HEK293-Zellen zeigten, dass zwei verschiedene Subtypen von Adenin-Rezeptoren möglicherweise in diesen Zellen existieren, da sowohl eine Inhibition der Adenylatcyclase über ein G_i-Protein als auch eine Stimulation der Adenylatcyclase über ein G_s-Protein beobachtet wurde.¹⁵⁵

1.2.1 Physiologische Funktionen von Adenin-Rezeptoren

Das Expressionsprofil des Ratten-Adenin-Rezeptors gibt Hinweise auf eine mögliche Rolle in der Schmerzweiterleitung. Diese vermutete pronozizeptive

Funktion des Adenin-Rezeptors konnte *in vivo* mittels elektrophysiologischer Studien an der Ratte bestätigt werden.¹⁷¹ Dabei erleichterte ins Rückenmark appliziertes Adenin die Schmerzweiterleitung nach elektrischer Stimulation sowohl in gesunden als auch in Ratten mit einer induzierten Entzündung.¹⁷¹ *In vitro* zeigte Adenin neurotrophe bzw. neuroprotektive Effekte auf Ratten-Purkinje-Zellen des Cerebellums, wobei relativ hohe Konzentrationen von 1-2 mM benötigt wurden.^{172,173} Die anderen auf Adenin-basierenden Purine wie Adenosin, AMP, ADP und ATP sowie Adenin-Metabolite förderten nicht das Überleben der Purkinje-Zellen, woraus geschlossen wurde, dass Adenin selbst an der Kontrolle des Zellüberlebens bzw. der Vermeidung des Zelltods beteiligt und somit möglicherweise ein neurotrophes Signalmolekül im Gehirn ist.^{172,173}

Aber auch in der menschlichen Niere wurden Effekte beobachtet, was den Hinweis auf einen humanen Adenin-Rezeptor verstärkt. Im Plasma von Patienten mit chronischer Niereninsuffizienz konnten hohe Konzentrationen von Adenin gemessen werden,¹⁷⁴ wobei Adenin als ein Indikator für den Schweregrad der chronischen Niereninsuffizienz betrachtet werden kann.¹⁷⁵ An isolierten basolateralen Membranen des proximalen Tubulus von Schweinenieren konnte spezifische Bindung von [³H]Adenin gemessen werden.¹⁷⁶ Dort inhibiert Adenin die Na⁺-ATPase-Aktivität über einen G_i-Protein-gekoppelten Rezeptor.¹⁷⁶ Adenosin verhindert ebenfalls die Enzymaktivität allerdings über den Adenosin-A₁-Rezeptor, wodurch Adenin und Adenosin unabhängig voneinander den gleichen Übertragungsweg aktivieren, wobei aber verschiedene Rezeptoren beteiligt sind.¹⁷⁶ Somit scheint Adenin eine Rolle in der renalen Ausscheidung von Na⁺-Ionen und folglich in der Nierenfunktion zu spielen.¹⁷⁶

1.2.2 Biosynthese und Metabolisierung von Adenin

Purine und Pyrimidine spielen eine wesentliche Rolle in der Nucleinsäure- und Nucleotid-Metabolisierung aller Zellen. Im Wiederverwertungs-Stoffwechselprozess (*salvage pathway*) können Nucleotide (Purine und Pyrimidine) aus Abbauprodukten, die als Zwischenprodukte entstehen, re-synthetisiert werden. Somit können Nucleobasen und Nucleoside, die beim Abbau aus RNA und DNA entstehen, wiederverwertet werden. Dieser Recycling-Prozess ist wesentlich energieeffizienter als die *de novo* Purin-Biosynthese.¹⁷⁷ Zumal diese in manchen Organen bzw. Geweben, wie im Knochenmark, in bestimmten Gehirnzellen, in der Darmmucosa, in Leukozyten und in Erythrozyten,^{175,178-180} aufgrund fehlender Enzyme nicht oder nur unzureichend möglich ist.^{177,181,182} Ebenso hat das Gehirn keine ausreichende, metabolische Leistungsfähigkeit für die *de novo* Synthese von Nucleotiden, sodass diese Moleküle von Nucleobasen aus dem Wiederverwertungs-Stoffwechsel für eine hinreichende Bereitstellung von Nucleinsäuren-Vorstufen und damit für die normale Gehirnfunktion sorgen.¹⁸³ Dabei

sind gerade Hypoxanthin und Adenin die Haupt-Nucleobasen für die Wiederverwertung in einer Vielzahl von Geweben. Diese werden in ihre korrespondierende Nucleotide, IMP bzw. AMP, durch Phosphoribosyltransferasen, wie die Hypoxanthin-Phosphoribosyltransferase HPRT (EC 2.4.2.8) und die Adenin-Phosphoribosyltransferase APRT (EC 2.4.2.7), überführt.^{183,184} Zwar können die Nucleobasen die Blut-Hirn-Schranke überwinden, jedoch ist die Transportleistung nicht ausreichend, um die für den Wiederverwertungs-Stoffwechsel im Gehirn benötigten Mengen zu liefern. Adenin wird über spezifische Nucleobase-Transporter von der apikalen Seite des Aderhaut-Epitheliums in die Gehirn-Rückenmarks-Flüssigkeit transportiert, wohingegen das akkumulierende Hypoxanthin aus der Gehirn-Rückenmarks-Flüssigkeit ins Blut abgegeben und so der Wiederverwertungs-Stoffwechsel im Gehirn ermöglicht wird.^{183,185} Wie bereits im vorherigen Abschnitt beschrieben, ist endogenes Adenin ein wichtiger Modulator für das Zellüberleben und die Leistung des zentralen Nervensystems (ZNS) in der Ratte.¹⁸⁶ Aus der extrazellulären Flüssigkeit des ZNS kann Adenin über ein Na⁺-unabhängiges, spezifisches Transportsystem in Neuronen, aber nicht in Astrozyten, aufgenommen werden. In Ratten-Neuronen konnte die Expression eines spezifischen Adenin-Transporters gezeigt werden.¹⁸⁶ Aber auch in menschlichen Erythrozyten konnten Purin-Nucleobase-Transporter (z. B. *human facilitative nucleobase transporter* hFNT1)¹⁸⁷ identifiziert werden.^{185,188-190}

Die meisten Nucleoside sind relativ hydrophil und können daher die Lipid-Doppelschicht nicht einfach durch passive Diffusion überwinden, sondern benötigen für die Permeation einen spezialisierten Nucleosid-Transporter (NT).¹⁹¹ Die Nucleosid-Transporter gehören zur Superfamilie der SLC-Transporter (*solute carrier*)¹⁹² und können in zwei Familien eingeteilt werden: die equilibrativen Nucleosid-Transporter ENT (auch bekannt als SLC29-Familie)¹⁹³ und die konzentrativen Nucleosid-Transporter CNT (auch bekannt als SLC28-Familie).^{192,194} Bei den ENTs sorgt eine erleichterte, Na⁺-unabhängige Diffusion, meist von der basolateralen Seite, für den niedrig affinen Nucleosid/ Nucleobasen-Transport.^{177,182,192,193,195} Sie kommen weit verbreitet in einer Vielzahl von Zellen vor.^{192,196} Beim Menschen sind bisher vier Isoformen, hENT1 (SLC29A1),¹⁹⁷ hENT2 (SLC29A2),^{198,199} hENT3 (SLC29A3)^{200,201} und hENT4 (SLC29A4, Plasmamembran Monoamin-Transporter PMAT),^{201,202} bekannt.¹⁹²⁻¹⁹⁴ Bevor die Gene der ENTs identifiziert wurden, erfolgte die Klassifizierung aufgrund ihrer Sensitivität gegenüber Nitrobenzylthioinosin (Nitrobenzylmercaptipurinribosid NBMPR) entweder in equilibrativ-sensitiv „es“ und somit der Möglichkeit der Inhibition des Transporters durch NBMPR, oder in equilibrativ-insensitiv „ei“.^{177,182,194} Die ENTs sind aus 11-Transmembran-Domänen mit einem cytoplasmatischen N-Terminus und einem extrazellulären C-Terminus sowie mit einer großen, glykosilierten Schleife zwischen TM1 und TM2 und mit einer großen, cytoplasmatischen Schleife zwischen TM6 und TM7 aufgebaut.^{193,194,196,200,201} Hingegen erfolgt der hochaffine Nucleosid-Transport durch

die CNTs aktiv gegen einen Konzentrationsgradienten in Abhängigkeit von Na⁺-Ionen.^{177,182,203} Eine hohe Expression konnte im Dünndarm, Placenta, Nervengeflecht der Aderhaut, Niere und Leber gefunden werden; die CNTs sind eher in der apikalen Seite lokalisiert.^{177,192-196} Beim Menschen sind bisher drei Isoformen, hCNT1 (SLC28A1),²⁰⁴ hCNT2 (SLC28A2, selektive Purin-Nucleosid-Transporter SPNT)^{191,205} und hCNT3 (SLC28A3),²⁰⁶ aufgrund ihrer Substratspezifität bekannt.^{194,203} Die CNTs sind aus 13-Transmembran-Domänen mit einem cytoplasmatischen N-Terminus und einem extrazellulären C-Terminus aufgebaut.^{195,203} Unter physiologischen Bedingungen ist nur der Einstrom von Nucleosiden unter Cotransport von Na⁺-Ionen in die Zelle möglich, wohingegen der Mechanismus der ENTs einen Ein- und Ausstrom durch die Plasmamembran erlaubt.¹⁹⁹ Die Merkmale der beiden Familien, ENT und CNT, sind in Tab. 1.6 einander gegenübergestellt.

Tab. 1.6: Merkmale der equilibrativen Nucleosid-Transporter ENT und der konzentrativen Nucleosid-Transporter CNT

Merkmale	Equilibrative Nucleosid-Transporter (ENT)	Konzentrierte Nucleosid-Transporter (CNT)
Transport	erleichterte Diffusion	aktiver Transport gegen einen Konzentrationsgradienten
Transportmechanismus	Ein- und Ausstrom möglich	nur Einstrom möglich
Na ⁺ -Abhängigkeit	Na ⁺ -unabhängig	Na ⁺ -abhängig
Isoformen	hENT1 (SLC29A1) ¹⁹⁷ (<i>es</i>) hENT2 (SLC29A2) ^{198,199} (<i>ei</i>) hENT3 (SLC29A3) ^{200,201} (<i>es</i>) hENT4 (SLC29A4) ^{201,202} (<i>ei</i>)	hCNT1 (SLC28A1) ²⁰⁴ (<i>cit</i>) hCNT2 (SLC28A2) ^{191,205} (<i>cif</i>) hCNT3 (SLC28A3) ²⁰⁶ (<i>cib</i>)
Vorkommen	weit verbreitet	hohe Expression im Dünndarm, Placenta, Nervengeflecht der Aderhaut, Niere und Leber
Lokalisation	eher basolateral	eher apikal
Aufbau	11-TM-Helices mit cytoplasmatischem N-Terminus und extrazellulärem C-Terminus	13-TM-Helices mit cytoplasmatischem N-Terminus und extrazellulärem C-Terminus
Aktivität	niedrig affines System	hoch affines System

NBMPR: Nitrobenzylthioinosin; es: equilibrativ - sensitiv gegenüber NBMPR; ei: equilibrativ - insensitiv gegenüber NBMPR; cit: konzentrativ - insensitiv gegenüber NBMPR, Thymidin-selektiv; cif: konzentrativ - insensitiv gegenüber NBMPR, Formycin B-selektiv; cib: konzentrativ - insensitiv gegenüber NBMPR, breite Substratspezifität

Die Purin-Metabolisierung und die Polyamin-Synthese sind eine Quelle für Adenin.²⁰⁷ 5-Methylthioadenosin, das als Nebenprodukt bei der Polyamin-Synthese entsteht, kann durch die Methylthioadenosin-Phosphorylase MTAP (EC 2.4.2.28) in Adenin umgewandelt werden.^{184,207}

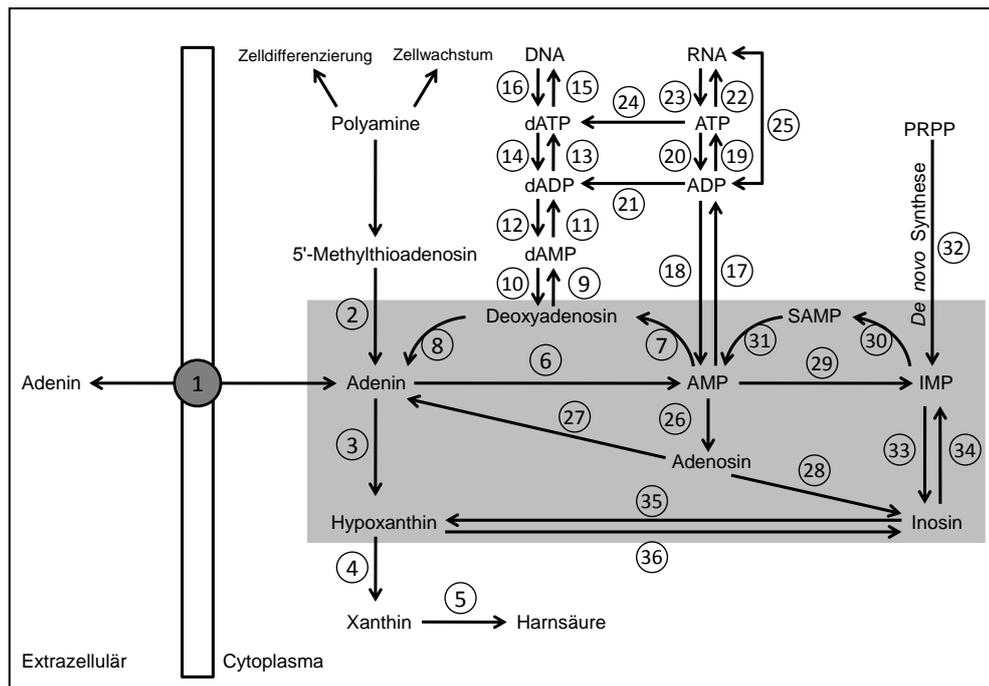


Abb. 1.9: Biosynthese und Metabolisierung von Adenin, modifiziert nach²⁰⁷⁻²¹¹

(Quelle: http://www.genome.jp/kegg-bin/show_pathway?ko00230, Verfügbarkeitsdatum: 26.08.2011)

5'-Methylthioadenosin: Nebenprodukt der Polyaminsynthese; PRPP: 5'-Phosphoribosyl-1-pyrophosphat; SAMP: S-Adenosin-5'-monophosphat; grau unterlegt: salvage pathway; 1: Adenin-Transporter; 2: Methylthioadenosin-Phosphorylase (EC 2.4.2.28); 3: Adenin-Deaminase (EC 3.5.4.2); 4/5: Xanthin-Dehydrogenase/Oxidase (EC 1.17.1.4; 1.17.3.2); 6: Adeninphosphoribosyl-Transferase (EC 2.4.2.7); 7/8/26: AMP-Nucleosidase (EC 3.2.2.4); 9: Deoxyadenosin-Kinase (EC 2.7.1.76); 10/33: 5'-Nucleotidase (EC 3.1.3.5); 11/12/17: Adenylat-Kinase (EC 2.7.4.3); 13/14/19: Pyruvat-Kinase (EC 2.7.1.40), Nucleosiddiphosphat-Kinase (EC 2.7.4.6); 15/16: DNA-Polymerase I (EC 2.7.7.7); 18: Apyrase (EC 3.6.1.5); 20: Adenosintriphosphatase (EC 3.6.1.3), ATP-Diphosphatase (EC 3.6.1.8), Nucleosidtriphosphatase (EC 3.6.1.15); 21: Ribonucleotid-Reduktase II (EC 1.17.4.1); 22/23: DNA-gerichtete RNA-Polymerase α (EC 2.7.7.6), RNA-gerichtete RNA-Polymerase (EC 2.7.7.48); 24: Ribonucleosidtriphosphat-Reduktase (EC 1.17.4.2); 25: Polyribonucleotid-Nucleotidyltransferase (EC 2.7.7.8); 27: Ribosylpyrimidin-Nucleosidase (EC 3.2.2.8); 28: Adenosin-Deaminase (EC 3.5.4.4); 29: AMP-Deaminase (EC 3.5.4.6); 30: Adenylsuccinat-Synthase (EC 6.3.4.4); 31: Adenylsuccinat-Lyase (EC 4.3.2.2); 32: 5'-Phosphoribosylglycinamid-Formyltransferase; 34: Inosin-Kinase (EC 2.7.1.73); 35: Purin-Nucleosidase (EC 3.2.2.1); 36: Purinnucleosid-Phosphorylase (EC 2.4.2.1); EC-Nummern: Enzymkommission der Internationalen Union von Biochemie und Molekular Biologie IUBMB klassifiziert Enzyme und ordnet sie Enzymkommission-Nummern zu^{212,213}

Der erste Schritt des Wiederverwertungs-Stoffwechselprozesses ist der Transport der exogenen Nucleobasen und Nucleoside durch die Plasmamembran.^{199,203} Die *de novo* Synthese des Nucleotids Inosin-5'-monophosphat (IMP) kann über einen komplexen Prozess aus den Aminosäuren Glycin, Glutamat und Asparaginsäure sowie Komponenten der Folsäure aus 5'-Phosphoribosyl-1-pyrophosphat PRPP mit dem Enzym 5'-Phosphoribosylglycinamid-Formyl-

transferase synthetisiert werden.^{184,214,215} Das gebildete IMP kann entweder über Inosin und Hypoxantin zur Harnsäure abgebaut oder über das Zwischenprodukt S-Adenosin-5'-monophosphat durch Adenylsuccinat-Synthase (EC 6.3.4.4) und weiter zu AMP durch Adenylsuccinat-Lyase (EC 4.3.2.2) gebildet werden. AMP kann jedoch auch als ein Abbauprodukt der RNA über ATP und ADP gebildet werden und weiter zur Bildung von Adenosin führen, das durch Adenosin-Deaminasen (EC 3.5.4.4) zu Inosin, danach zu Hypoxanthin und Harnsäure metabolisiert und renal ausgeschieden werden kann. Bei der Metabolisierung von DNA entsteht über dATP, dADP, dAMP, Desoxyadenosin und letztlich Adenin. Dieses kann aber auch im Polyamin-Stoffwechsel, der für die Zelldifferenzierung und für das Zellwachstum wichtig ist, als Metabolisierungsprodukt entstehen.¹⁷⁵ Adenin kann wie ATP, ADP, AMP und Adenosin sowie IMP über Hypoxanthin und weiter zur Harnsäure abgebaut werden.²¹⁶ Die Biosynthese und Metabolisierung von Adenin ist in Abb. 1.9 schematisch dargestellt.

2 Ziele der Arbeit

Der im Jahre 2002 identifizierte Ratten-Adenin-Rezeptor (rAdeR) führte zu einer Erweiterung der Superfamilie der purinergen Rezeptoren, um die Familie der P0-Rezeptoren bzw. Adenin-Rezeptoren.^{109,133} Der mMrgA10-Rezeptor scheint das Orthologe zum rAde1, also der Maus-Adenin 1-Rezeptor (mAde1R) zu sein, wobei die Bestätigung, dass es sich bei diesem Rezeptor tatsächlich um einen Adenin-Rezeptor handelt, bis heute fehlt.¹³³ Ein weiterer Adenin-Rezeptor-Subtyp wurde im Jahre 2008 bekannt, als der erste Maus-Adenin-Rezeptor, als mAde2R bezeichnet, identifiziert und charakterisiert wurde.¹⁶⁶ Die beiden identifizierten Adenin-Rezeptoren, rAdeR und mAde2R, sind über ein inhibitorisches G-Protein an die Adenylatcyclase gekoppelt.^{133,152,166} Sehr viele Hinweise, wie z. B. die spezifische Bindung des Radioliganden [³H]Adenin an Membranpräparationen humaner Zelllinien, wie 1321N1-Astrozytomzellen,¹⁵² Nierencarcinomzellen HEK293¹⁵³ und Leukämiezellen Jurkat T,¹⁷⁰ deuten auch auf die Existenz eines humanen Adenin-Rezeptors (hAdeR) hin. Die Existenz hochaffiner Bindungsstellen für [³H]Adenin in allen von uns untersuchten Zelllinien erschwerte die Suche nach einem geeigneten Expressionssystem. Für funktionelle cAMP-Experimente sind die humanen 1321N1-Astrozytomzellen hingegen geeignet, da Adenin hier keine Inhibition der zellulären cAMP-Produktion in An- oder Abwesenheit von Isoprenalin hervorruft, wodurch die Abwesenheit eines endogenen G_i-gekoppelten Rezeptors für Adenin in 1321N1-Astrozytomzellen bestätigt wird.¹⁶⁶ Für die Überexpression des rekombinanten Proteins mit dem Ziel, Radioligand-Bindungsstudien durchzuführen, sind diese Zellen jedoch nicht geeignet, da sie dennoch hochaffine Adenin-Bindungsstellen aufweisen. Insektenzellen, wie für den mAde2R bereits gezeigt, eignen sich hierfür jedoch sehr gut.¹⁶⁶ Somit ist es möglich, die Adenin-Rezeptor-Familie auch mit Hilfe von Radioligand-Bindungsstudien näher zu charakterisieren.

- Zunächst sollte das Insektenzell-Expressionssystem mit dem bereits identifizierten rAdeR etabliert werden. Allerdings sollten *Sf9*-Insektenzellen anstelle von *Sf21*-Zellen¹⁶⁶ verwendet werden, da für diese Zellen eine besonders hohe Expression rekombinanter Proteine beschrieben wurde.²¹⁷⁻²²¹
- Weiterhin sollte eine Ko-Expression mit G-Proteinen durchgeführt werden, um zu untersuchen, ob dadurch eine Änderung der Rezeptor-Konformation stattfindet und in der Folge möglicherweise eine signifikant höhere Affinität des Radioliganden zum Rezeptor beobachtet werden kann.^{219,222-226}

- Für die oben genannten Untersuchungen sollte der Rezeptor in den entsprechenden Vektor kloniert und in das etablierte Insektenzell-Expressionssystem eingebracht werden. Anschließend könnte der rAdeR in Radioligand-Bindungsstudien untersucht werden.
- Ein weiteres Ziel war die Gewinnung eines Antikörpers. Hierfür sollten Peptidfragmente bzw. Antigene gegen verschiedene Bereiche des rAdeR hergestellt und in Kaninchen injiziert werden, um polyklonale Antikörper zu erhalten. Das erhaltene Kaninchen-Antiserum sollte in Western Blot-Experimenten untersucht werden, mit dem Ziel, einen spezifischen, nur gegen rAdeR gerichteten Antikörper zu erhalten.
- Die vorhergesagte 3D-Struktur¹⁶⁴ des Ratten MrgA-Rezeptors (Q7TN49) soll als Ausgangspunkt für Mutagenese-Studien genutzt werden, die am rAdeR durchgeführt werden sollten, um genauere Informationen über die Bindungstasche der Adenin-Rezeptoren zu erhalten. Damit soll das von Heiko Meyer und Dr. Anke Schiedel in unserem Arbeitskreis erstellte Ratten-Adenin-Rezeptor-Modell validiert und optimiert werden. Das verbesserte Modell sollte Aussagen zur Optimierung potenter Rezeptorliganden ermöglichen.
- Für die Mutagenese-Studien soll das etablierte Insektenzell-Expressionssystem verwendet werden.
- Weiterhin soll die Bedeutung des um die ersten 27 Aminosäuren verkürzten N-terminalen rMrgA-Rezeptors untersucht werden.
- Ein weiteres Ziel ist die Charakterisierung des mMrgA10-Rezeptors, des putativen Maus-Adenin-Rezeptors Subtyp 1 (mAde1R), um zu untersuchen, ob es sich tatsächlich um einen Adenin-Rezeptor handelt. Wie für den rAdeR, soll hierfür das etablierte Insektenzell-Expressionssystem verwendet werden.
- Mit Hilfe von Radioligand-Bindungsstudien sollen die Struktur-Wirkungs-Beziehungen untersucht und mit denen der zwei bereits bekannten Adenin-Rezeptoren verglichen werden.
- Auch funktionelle Studien, cAMP-Experimente und die Messung der intrazellulären Calcium-Freisetzung, sollen durchgeführt werden, um eine Aussage über die Kopplung an G-Proteine treffen zu können. Dafür sollen stabil transfizierte 1321N1-Astrozytomzellen, die den mAde1R exprimieren, hergestellt werden.

3 Ergebnisse und Diskussion

Im Jahre 2002 identifizierten Bender *et al.* die Nucleobase Adenin als den physiologischen Agonisten eines „Orphan“-Rezeptors der Ratte (AJ311952).¹³³ Dieser Ratten-Adenin-Rezeptor (rAdeR) ist über ein G_i-Protein inhibitorisch an die Adenylatcyclase gekoppelt.¹³³ Die Expression des rAdeR erfolgte in CHO-Zellen,¹³³ wobei unsere Arbeitsgruppe zeigen konnte, dass diese Säugetierzellen ebenfalls einen endogenen Adenin-Rezeptor besitzen und damit für die Expression ungeeignet sind. Aber auch die Expression des rekombinanten Proteins in humanen Zelllinien ist problematisch, da eine spezifische Bindungsstelle für [³H]Adenin in humanen Zelllinien, wie 1321N1-Astrozytomzellen,¹⁵² Nierencarcinomzellen HEK293¹⁵³ und Leukämiezellen Jurkat T,¹⁷⁰ beobachtet wurde. Die Expression des mAde2R in Sf21-Insektenzellen zeigte, dass dieses System sich für die Expression von Adenin-Rezeptoren eignet.¹⁶⁶ Mit dem Insektenzell-Expressionssystem ist es möglich, rekombinante Proteine, z. B. GPCRs, in einer hohen Expressionsrate zu erhalten.²¹⁷⁻²²¹ Ein weiterer Vorteil ist, dass Insektenzellen frei von eventuell störenden 7-Transmembranären-Rezeptoren sind und somit einen Null-Hintergrund für die Untersuchung des exprimierten Rezeptors bieten.^{219,222} Ebenso konnte bei einer Ko-Expression des Rezeptors mit Säugetier-G-Proteinen die charakteristischen post-translationalen Modifikationen, wie in Säugetier-Zellen, beobachtet werden.^{217,220,222,223,227,228} Basierend darauf, wurde die Expression des rAdeR in Sf9-Insektenzellen etabliert.

3.1 Charakterisierung der Adenin-Ligand-Bindungsstelle des Ratten-Adenin-Rezeptors

3.1.1 Klonierung der Ratten-Adenin-Rezeptor-cDNA

Die Gensequenz des Ratten-Adenin-Rezeptors (rAde) wurde in den Baculovirus-Transfervektor pVL1393 und pFastBacTM1 kloniert. Für die Klonierung des Plasmids pVL-rAde wurde die kommerziell erworbene Gensequenz des Ratten-Adenin-Rezeptors, die sich im Vektor pExpress-1 befindet, zunächst in einer PCR mit den entsprechenden Primern (s. Tab. 5.1) amplifiziert. Das 1025 bp große Insert rAde enthält Schnittstellen für die Restriktionsenzyme EcoRI und BglII. Sowohl das Insert als auch der Vektor pVL wurden anschließend geschnitten, wodurch *sticky ends* als überhängende Basenpaare erhalten wurden. Das geschnittene PCR-Produkt (1006 bp) und der verdauter Vektor (9618 bp)

wurden mit dem ZR DNA Clean & Concentration Kit von der Firma Zymo Research aufgereinigt. Anschließend erfolgte die Ligation und Transformation in *E. coli*-Bakterien. Von den bebrüteten Agar-Platten wurden Bakterien-Monoklonen selektioniert und die DNA wurde aus den *E. coli*-Bakterien isoliert. Durch einen Kontrollverdau mit den Restriktionsenzymen BamHI und PstI wurde der Erfolg der Klonierung des Plasmids pVL-rAde überprüft, denn bei einem positiven Klon werden in einem Agarosegel Banden von 963 bp und 9661 bp erhalten (s. Abb. 3.1 A und D). Anschließend wurde die DNA des positiven Klons pVL-rAde3 von der Firma GATC sequenziert.

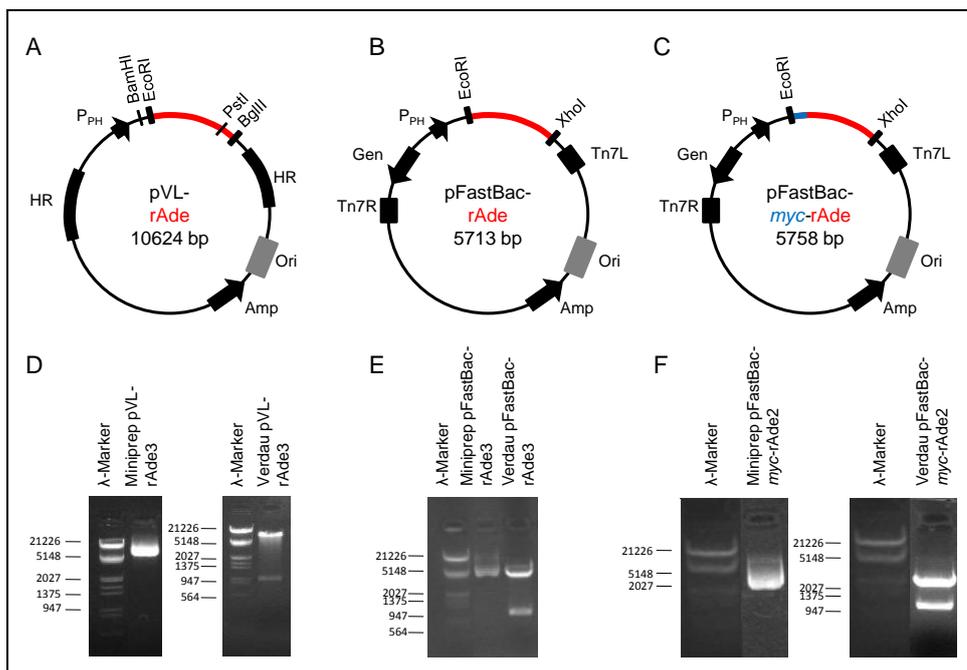


Abb. 3.1: Strategie und Verifikation der Ratten-Adenin-Rezeptor-cDNA in Baculovirus-Transfervektoren

Die Vektoren sind schematisch in Abbildung A, B und C dargestellt. Die Restriktionsenzyme EcoRI und BglII (A) sowie EcoRI und XhoI (B und C) wurden zur Klonierung des Inserts rAde in den Baculovirus-Transfervektor verwendet. Der Kontrollverdau wurden mit den Restriktionsenzymen BamHI und PstI durchgeführt (A) sowie mit den Klonierungs-Restriktionsenzymen EcoRI und XhoI (B und C). Mit der Agarose-Gelelektrophorese wurde die isolierte Plasmid-DNA pVL-rAde3 (D), pFastBac-rAde3 (E) und pFastBac-myc-rAde2 (F) analysiert und mit dem Geldoc Fotodokumentationssystem der Firma BioRad wurde das Gel ausgewertet. P_{PH}: Polyhedrin-Promotor; HR: Sequenz für homologe Rekombination; Amp: Ampicillin-Resistenzgen; Ori: Replikationsursprung (origin of replication); Gen: Gentamicin-Resistenzgen; Tn7R und Tn7L: Sequenz für Transposition des Vektors mit der Bacmid-DNA

Für die Klonierung in den pFastBac-Vektor diente das Plasmid pUC-myc-rAde als Ausgangsplasmid. Dazu wurde zunächst das Plasmid pUC-myc-hA_{2B} kloniert, so konnte das 10 Aminosäuren kleine myc-Tag in den Ausgangsvektor pUC19 integriert werden. Diese Umklonierung wurde mit den Restriktionsenzymen EcoRI und BamHI aus dem Vektor pLXSN-myc-hA_{2B}, der mir freundlicher-

weise von Dominik Thimm zur Verfügung gestellt wurde, durchgeführt. Die kommerziell erworbene Gensequenz des Ratten-Adenin-Rezeptors wurde anschließend von der Erasmusstudentin Inês Macedo in den Vektor pUC-*myc* mit den Restriktionsenzymen MluI und XbaI kloniert. In einer PCR mit den entsprechenden Primern (s. Tab. 5.1) konnten die Inserts *myc-rAde* (1066 bp) und *rAde* (1026 bp), die Schnittstellen für die Restriktionsenzyme EcoRI und XhoI besitzen, amplifiziert werden. Das weitere Vorgehen erfolgte, wie es für die Klonierung von pVL-*rAde*, oben beschrieben wurde. Der Kontrollverdau wurde mit den Klonierungs-Restriktionsenzymen EcoRI und XhoI durchgeführt, wobei Banden von 1002 bp und 4711 bp (pFastBac-*rAde*) sowie 1047 bp und 4711 bp (pFastBac-*myc-rAde*) bei einer erfolgreichen Klonierung erwartet wurden. So konnten die positiven Klone pFastBac-*rAde*3 und pFastBac-*myc-rAde*2 erhalten werden (s. Abb. 3.1 B und E sowie C und F).

3.1.2 Expressionssystem

Zunächst wurde für die Expression des *rAdeR* in *Sf9*-Insektenzellen das Baculogold™ Baculovirus-Expressionssystem BEVS verwendet. Jedoch konnten damit nur geringe Virustiter erhalten werden, weshalb ein weiteres Expressionssystem, das Bac-to-Bac-Expressionssystem, ausprobiert wurde. Für das BEVS wird als Transfervektor pVL1393 und AcNPV-DNA (*Autographa californica* nuclear polyhedrosis virus)^{229,230} verwendet.²³¹ Das Virus enthält ein doppelsträngiges, zirkuläres DNA-Genom in einer Größe von ungefähr 130 kbp.^{229,231} Mit diesen Systemen können rekombinante Proteine produziert werden, die in ihrer Struktur bzw. Faltung und Funktion ähnlich dem nativen Protein sind.^{228,232-236} Ebenso bieten diese Systeme die Möglichkeit, gleichzeitig mehrere Gene zu exprimieren, was bei der Ko-Expression des Rezeptors mit G-Proteinen genutzt wurde.²²⁸ Üblicherweise ist das rekombinante Protein in dem gleichen zellulären Kompartiment lokalisiert, wie es auch natürlich vorkommt, somit werden Membranproteine in der Zellmembran verankert.^{228,232,236} Für das Bac-to-Bac-Expressionssystem wird als Transfervektor pFastBac™1 verwendet, der um die Hälfte kleiner ist, verglichen mit dem Transfervektor pVL1393.²³⁷ Mit diesem Expressionssystem konnte die Zeit bis zur Ernte eines rekombinanten Virus mit ausreichendem Titer, verglichen mit dem BEVS, verkürzt werden.^{237,238} Diese Viren können schon nach zwei Amplifikationszyklen zur Infektion von *Sf9*-Insektenzellen genutzt werden, um rekombinante Proteine für eine Membranpräparation zu erhalten, die wiederum in Radioligand-Bindungsstudien hohe spezifische Bindung zeigten. Beim BEVS wurde zusätzlich durch Plaque-Assays versucht, das Virus aufzukonzentrieren, und erst nach mehreren Virusamplifikationen konnte ein ausreichender Virustiter erhalten werden. Zusätzlich kann beim Bac-to-Bac-Expressionssystem die Effizienz der Transposition visuell durch die Färbung der Kolonien mit dem Substrat für die β -Galactosidase, wie z. B. X-Gal,

kontrolliert werden.^{237,239} Im Folgenden wird auf die beiden Expressionssysteme näher eingegangen.

3.1.2.1 *Baculogold™ Baculovirus-Expressionssystem*

Das Baculovirus-Genom ist zu groß, um die gewünschte Gensequenz direkt *in vitro* einzufügen.^{227,228} Daher wird ein Baculovirus-Transfervektor zusammen mit einer AcNPV-DNA verwendet.^{231,240}

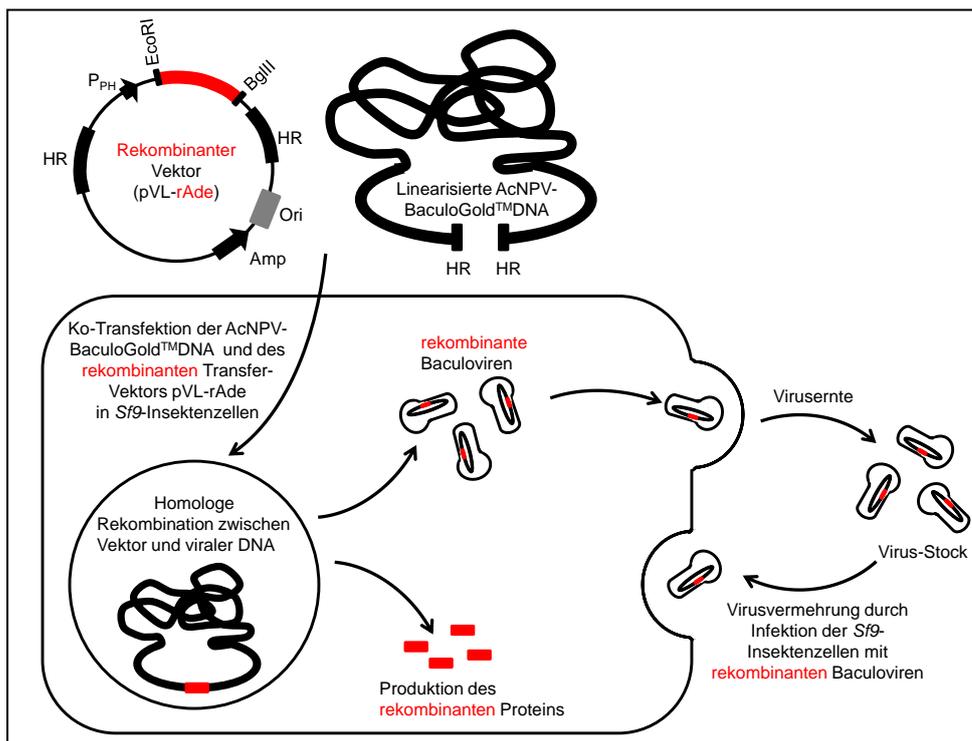


Abb. 3.2: Das Prinzip des Baculogold™ Baculovirus-Expressionssystems, modifiziert nach²⁴¹

Mit dem Baculovirus-Transfervektor, der das zu übertragende Gen enthält, und der AcNPV-Baculogold™ DNA wurden zunächst die Sf9-Insektenzellen ko-transfiziert. Diese lieferten rekombinante, überlebensfähige Baculoviren, die in den Überstand sezerniert wurden. Mit dem Virus-Überstand, wurden erneut Insektenzellen infiziert, um eine Virusvermehrung zu erreichen. Nach mehreren Zyklen der Virusamplifikation können die Viren zur Infektion mit dem Ziel der Expression rekombinanter Proteine eingesetzt werden. *P_{PH}*: Polyhedrin-Promotor; HR: Sequenz für homologe Rekombination; Amp: Ampicillin-Resistenzgen; Ori: Replikationsursprung (Origin of replication); AcNPV: *Autographa californica nuclear polyhedrosis virus*

Der Vektor enthält erstens einen Replikationsursprung (*origin of replication*, Ori), zweitens ein Ampicillin-Resistenzgen, drittens einen Polyhedrin-Promoter, viertens eine Klonierungsregion, in der die gewünschte Gensequenz eingefügt werden kann, und fünftens einen großen Teil der AcNPV Sequenz, die die Klonierungsregion umgibt, um die homologe Rekombination zu ermöglichen (s. Abb. 3.2). Die Modifikationen an der AcNPV-DNA, wie das Einfügen einer Re-

striktionsschnittstelle nach dem Polyhedrin-Promoter, führt zu einer linearisierten DNA mit verbesserter Rekombinations-Effizienz.^{242,243} In der AcNPV-BaculoGold™ DNA sind zusätzlich drei Restriktionsschnittstellen im Polyhedrin-Gen für eine weitere Verbesserung der Rekombinations-Effizienz eingefügt, die zu einer tödlichen Deletion des essentiellen Teils des Polyhedringens im Virusgenoms führen und somit für nicht replikationsfähige Viren codieren.²⁴⁴ Nach Klonierung der gewünschten Gensequenz, rAdeR, in den Baculovirus-Transfervektor pVL1393 erfolgt die Ko-Transfektion von AcNPV-Baculo Gold™ DNA mit dem rekombinanten Transfervektor in *Sf9*-Insektenzellen,^{234,241,242} was durch eine $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ -Präzipitation erreicht wird.²⁴⁵ In den Insektenzellen kommt es zur Rekombination zwischen der homologen Region im Transfervektor und der AcNPV-Baculo Gold™ DNA, wodurch die Viren replikationsfähig sind und die Gensequenz in die Baculovirus-DNA integriert wird.^{242,244} Die zirkuläre Virus-DNA kann anschließend im Nukleus abgelesen werden. Die produzierten, rekombinanten Viren können nun zur Infektion von *Sf9*-Insektenzellen verwendet werden, wodurch eine Virusvermehrung erreicht wird. Nach mehreren Zyklen der Virusamplifikation können die Viren zur Infektion mit dem Ziel der Expression rekombinanter Proteine eingesetzt werden (s. Abb. 3.2). Diese infizierten Zellen werden nach zwei Tagen zur Herstellung einer Membranpräparation verwendet.

3.1.2.2 *Bac-to-Bac-Expressionssystem*

Der Transfervektor pFastBac™1 enthält, ebenso wie der pVL1393-Vektor, einen Replikationsursprung (*origin of replication*, Ori), ein Ampicillin-Resistenzgen, einen Polyhedrin-Promoter und eine Klonierungsregion, in der die gewünschte Gensequenz eingefügt werden kann. Zusätzlich sind noch ein Gentamicin-Resistenzgen und zwei TN7-Regionen, die die Klonierungsregion umgeben, für die Transposition des Vektors mit der Bacmid-DNA enthalten (s. Abb. 3.3). Auch hier wird die gewünschte Gensequenz nicht direkt *in vivo* in das Virusgenom eingefügt, sondern basiert auf der Fähigkeit, rekombinante Virus-DNA durch ortsspezifische Transposition in speziellen *E. coli*-Bakterien zu produzieren.^{236-238,246,247} Die Transformation des rekombinanten pFastBac-Vektors in kompetente DH10Bac™ *E. coli*-Bakterien ermöglicht die Isolierung von rekombinanter Bacmid-DNA.^{236-238,246} Dies geschieht durch Transposition zwischen dem mini-Tn7 Element auf dem Transfervektor pFastBac und der mini-attTn7 Targetseite auf der Bacmid-DNA sowie durch ein Helfer-Plasmid.^{237,243,246,247} Die Einführung des mini-Tn7- an das mini-attTn7-Element führt zu einer Expressionsunterbrechung des LacZ α -Peptids.²⁴³ Aus diesem Grund erscheinen die Kolonien weiß, die das rekombinante Bacmid enthalten, im Gegensatz zu den blauen Kolonien mit der unveränderten Bacmid-DNA.^{236,239,243,246} Die Selektion der Bacmid-Monoklone und die Isolierung der

Bacmid-DNA erfolgte wie im experimentellen Teil beschrieben (s. 5.4.2.3). Die Kontrolle der gewünschten rekombinanten Bacmid-DNA wurde mit einer PCR und anschließender Agarose-Gelelektrophorese analysiert. Enthält die Bacmid-DNA das pFastBac-Konstrukt wie beim Bacmid-pFastBac-rAdeB, erscheint eine Bande bei etwa 3300 bp. Anschließend wird die rekombinante Bacmid-DNA mit dem kationischen Liposom Cellfectin®II Reagenz²⁴⁸⁻²⁵⁰ in Sf9-Insektenzellen transfiziert und rekombinante Baculovirus-DNA kann hergestellt werden, die daraufhin zur Infektion von Sf9-Insektenzellen verwendet wird (s. Abb. 3.3).²³⁸

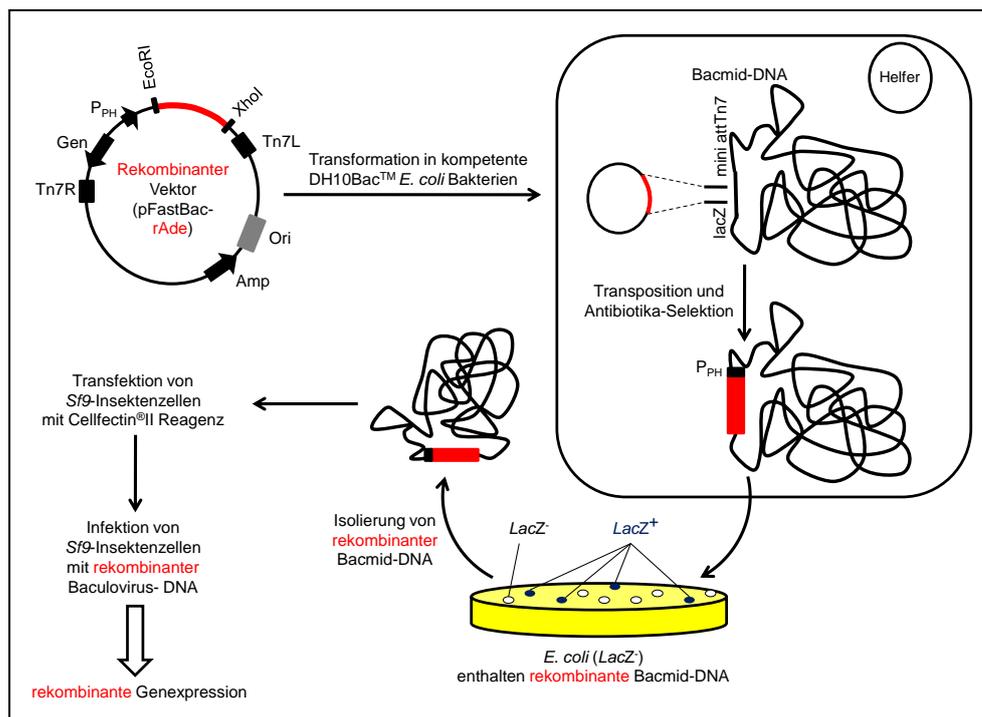


Abb. 3.3: Das Prinzip des Bac-to-Bac Expressionssystems, modifiziert nach^{243,246}

Mit dem Baculovirus-Transfervektor, der das zu übertragende Gen enthält, wurden zunächst kompetente DH10Bac™ E. coli-Bakterien transformiert, wodurch rekombinante Bacmid-DNA isoliert werden konnte. Diese wurde zur Transfektion von Sf9-Insektenzellen verwendet und rekombinante Baculovirus-DNA wurde im Überstand erhalten. Mit diesem Virus-Überstand konnten erneut Sf9-Insektenzellen infiziert werden, um eine Virusvermehrung zu erreichen. Nach mehreren Zyklen der Virusamplifikation können die Viren zur Infektion mit dem Ziel der Expression rekombinanter Proteine eingesetzt werden. P_{PH}: Polyhedrin-Promotor; Gen: Gentamicin-Resistenzgen; Tn7R und Tn7L: Sequenz für Transposition des Vektors mit der Bacmid-DNA; Amp: Ampicillin-Resistenzgen; Ori: Replikationsursprung (origin of replication); LacZ: weiße Kolonien, die das rekombinante Bacmid enthalten, aufgrund der Expressionsunterbrechung des LacZα-Peptids; LacZ⁺: blaue Kolonien, die das unveränderte Bacmid enthalten.

Nach ein bis zwei Zyklen der Virusamplifikation wurden die Viren zur Infektion mit dem Ziel der Expression rekombinanter Proteine eingesetzt. Nach einem Infektionszeitraum von drei Tagen lag üblicherweise das Optimum der Proteinexpression vor. Infizierte Zellen wurden nach diesem Zeitraum zur Herstellung

einer Membranpräparation verwendet. Die Etablierung beider Expressionssysteme erfolgte zunächst in 25 cm² kleinen Zellkulturflaschen, indem die Sf9-Insektenzellen mit verschiedenen Mengen an Virus (0,1-1,0 ml) infiziert wurden, um die optimale Expressionsbedingungen zu erhalten. Nach zwei bzw. drei Tagen wurden die infizierten Zellen von der Zellkulturflasche abgelöst und bei 200 xg für 5 min zentrifugiert. Das Zellpellet wurde in 50 mM Tris-Puffer resuspendiert und mit dem Ultraschallstab lysiert. In Radioligand-Bindungsstudien wurde anschließend die spezifische Bindung am Zelllysate bestimmt. Die Virusmenge des Zelllysats, an der die höchste spezifische Bindung gemessen werden konnte, wurde anschließend für die Produktion einer größeren Menge in eine Schüttelkultur eingesetzt. Für beide Expressionssysteme wurde eine Virusmenge von 0,4 ml pro 3 x 10⁶ Zellen verwendet. Auch der genaue Zeitraum für die optimale Proteinexpression musste erst ermittelt werden.²⁵¹ Bei ausreichendem Virustiter liegt die optimale Proteinexpression bei zwei Tagen für das BaculogoldTM Baculovirus-Expressionssystem und bei drei Tagen für das Bac-to-Bac-Expressionssystem. Zusätzlich konnte, wie bereits in der Literatur beschrieben,^{237,247} schon mit P2-Virus des Bac-to-Bac-Expressionssystems eine ausreichende Proteinexpression beobachtet werden, denn an diesen Membranpräparationen konnte in Radioligand-Bindungsstudien hohe spezifische Bindung gemessen werden.

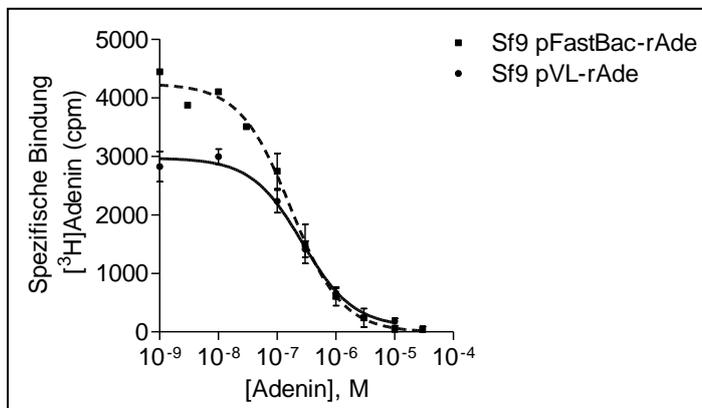


Abb. 3.4: Homologe Konkurrenzexperimente an Sf9 rAde-Membranpräparationen, die mit dem BaculogoldTM Baculovirus-Expressionssystem oder mit dem Bac-to-Bac-Expressionssystem hergestellt wurden.

IC_{50} -Wert (Sf9 pVL-rAde) = 278 ± 50 nM; B_{max} -Wert (homologe Konkurrenz) = $4,02 \pm 1,05$ pmol/mg Protein; IC_{50} -Wert (Sf9 pFastBac-rAde) = 181 ± 32 nM; B_{max} -Wert (homologe Konkurrenz) = $0,093 \pm 0,015$ pmol/mg Protein

In homologen Konkurrenzexperimenten konnte an Sf9 rAde-Membranpräparationen, die mit dem BaculogoldTM Baculovirus-Expressionssystem hergestellt wurden, ein IC_{50} -Wert von **278 ± 50 nM** (n = 4) und ein errechneter B_{max} -Wert von $4,02 \pm 1,05$ pmol/mg Protein und an solchen, die mit dem Bac-to-Bac-Expressionssystem erhalten wurden, ein IC_{50} -Wert von **181 ± 32 nM** (n = 3) und ein errechneter B_{max} -Wert von $0,093 \pm 0,015$ pmol/mg Protein gemessen wer-

den (s. Abb. 3.4). Somit konnte kein signifikanter Unterschied in den IC_{50} -Werten mit den beiden Expressionssystemen beobachtet werden und folglich spielt das Expressionssystem erwartungsgemäß keine Rolle bei der Affinität des Radioliganden an den Rezeptor. Jedoch konnte in homologen Konkurrenzexperimenten gezeigt werden, dass die Expression von Membranpräparationen, die mit dem Bac-to-Bac-Expressionssystem hergestellt wurden, scheinbar wesentlich niedriger war als an Membranpräparationen, die mit dem Baculogold™ Baculovirus-Expressionssystem erhalten wurden. Hingegen wurde der Virus, der mit dem Baculogold™ Baculovirus-Expressionssystem hergestellt wurde, aufkonzentriert und erst mit P30-Virus konnte an diesen Membranpräparationen hohe spezifische Bindung gemessen werden. Im Vergleich dazu wurde schon mit P2-Virus des Bac-to-Bac-Expressionssystems eine ausreichende Proteinexpression beobachtet und an diesen Membranpräparationen konnte hohe spezifische Bindung gemessen werden. Allerdings ist auch zu bedenken, dass die aus homologen Konkurrenzexperimenten ermittelten B_{max} -Werte sehr ungenau sind.

Die Infektion kann auch unter dem Mikroskop verfolgt werden. Normalerweise erscheinen die *Sf9*-Insektenzellen rundlich und besitzen alle die gleiche Größe (s. Abb. 3.5 A). Der kleine Zellkern enthält eine glatte Membran an der Oberfläche. Dahingegen verändern infizierte Zellen bereits nach ein bis drei Tagen ihre Zellgröße und -form. Die infizierten Zellen werden größer aufgrund eines vergrößerten Zellkerns, der eine raue Membran besitzt (s. Abb. 3.5 B).

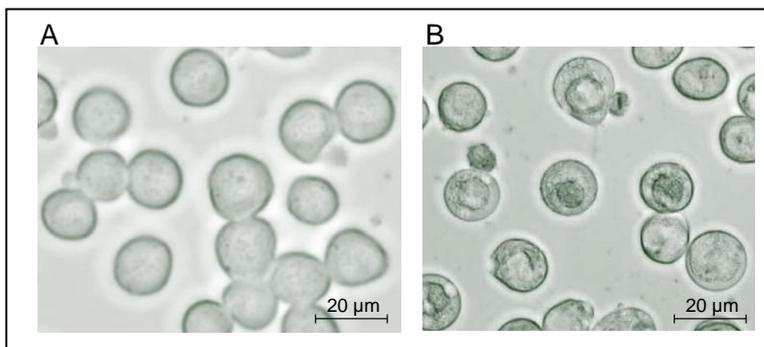


Abb. 3.5: *Sf9*-Insektenzellen (A) und infizierte *Sf9*-Insektenzellen (B) nach drei Tagen

3.1.3 Ko-Expression mit G-Proteinen

Die *Sf9*-Insektenzellen sind für die Ko-Expression von GPCRs mit G-Proteinen geeignet, wodurch eine aktive Konformation des Rezeptors induziert wird.^{217,218,222,223} Die in Insektenzellen endogen vorkommenden G-Proteine sind in einer relativ geringen Menge vorhanden.^{219,224,225,251,252} An *Sf9*-Zelllysaten konnte die Expression von allen vier Subtypen der G_{α} -Untereinheit gezeigt

werden.²⁵¹ Jedoch konnte keine funktionelle Kopplung des Ligand-aktivierten Rezeptors an die Insektenzell-G-Proteine beobachtet werden.^{217,223,251} Auch die G_{β} -Untereinheiten konnten in *Sf9*-Insektenzellen detektiert werden.²⁵¹ Allerdings exprimieren *Sf9*-Insektenzellen nicht das Säugetier-typische G_i -Protein.^{222,251-253} Daraufhin wurden GPCRs mit Säugetier-spezifischen G-Proteinuntereinheiten ko-exprimiert und eine erhöhte Affinität des Agonisten an den Rezeptor beobachtet.^{219,222-225} Denn ein Agonist bindet mit höherer Affinität an einen G-Protein-gekoppelten heptahelikalen Rezeptor als an einen ungekoppelten Rezeptor.²²⁶

Freundlicherweise wurden uns die Viren, die zur Expression der humanen $G_{\alpha 2}$ - und $G_{\beta 1\gamma 2}$ -Proteine verwendet wurden, von R. Seifert zur Verfügung gestellt.²⁵⁴ Wie im vorherigen Abschnitt beschrieben, wurden für eine Schüttelkultur 0,4 ml Virusüberstand pro 3×10^6 Zellen eingesetzt. Für die Ko-Expression wurde ein Verhältnis von 1 : 10 bis 1 : 20 des Virus der $G_{\alpha 2}$ - und $G_{\beta 1\gamma 2}$ -Untereinheit gegenüber dem Virus des Ratten-Adenin-Rezeptors verwendet. Allerdings wurden die infizierten Zellen erst nach drei Tagen geerntet. Anschließend wurde eine Membranpräparation hergestellt. Die Ergebnisse der Radioligand-Bindungsstudien mit und ohne Ko-Expression von G-Proteinen sind in Kapitel 3.1.4 einander gegenübergestellt. In Western Blot-Experimenten konnte gezeigt werden, dass die G-Proteine exprimiert wurden (s. 3.1.6.2).

3.1.4 Radioligand-Bindungsstudien

Der Ratten-Adenin-Rezeptor, exprimiert in *Sf9*-Insektenzellen, wird mit der Abkürzung *Sf9 rAde* bezeichnet. Die Zellen, die die Gensequenz des *rAdeR*, das Gen der G_{α} - und der $G_{\beta\gamma}$ -Untereinheit enthalten, werden *Sf9 rAde+G $_{\alpha}$ +G $_{\beta\gamma}$* genannt. Zunächst konnte, wie bereits in der Literatur auch beschrieben wurde, gezeigt werden, dass die *Sf9*-Insektenzellen als Expressionssystem für den *rAdeR* geeignet sind. Dazu wurden die nicht-infizierten *Sf9*-Insektenzellen lysiert und in Radioligand-Bindungsstudien untersucht, wobei kaum spezifische Bindung mit 10 nM [³H]Adenin (144 ± 18 cpm, $n = 7$) bei einer Proteinmenge von 100 μ g gemessen werden konnte (s. Abb. 3.6). Des Weiteren wurden die *Sf9*-Insektenzellen jeweils mit Viren, die zur Expression der G_{α} - und $G_{\beta\gamma}$ -Untereinheit führen, infiziert. Da auch an diesen Membranpräparationen, *Sf9 G $_{\alpha}$* und *Sf9 G $_{\beta\gamma}$* , kaum spezifische Bindung für 10 nM [³H]Adenin (222 ± 15 cpm und 188 ± 27 cpm, $n = 4$) bei einer Proteinmenge von 100 μ g bestimmt wurde, kann eine Ko-Expression mit humanen G-Proteinuntereinheiten durchgeführt werden (s. Abb. 3.6). Im Gegensatz dazu konnte an *Sf9 rAde-* und *Sf9 rAde+G $_{\alpha}$ + G $_{\beta\gamma}$* -Membranpräparationen hohe spezifische Bindung für 10 nM [³H]Adenin (**2095** \pm 67 cpm, $n = 4$ bzw. **5409** \pm 1098 cpm, $n = 7$) bei einer Proteinmenge von 100 μ g gemessen werden (s. Abb. 3.6). In einem ungepaarten *t*-Test konnte

eine signifikant höhere spezifische Bindung in Anwesenheit der beiden G-Proteinuntereinheiten bestätigt werden. Wie erwartet führte die Ko-Expression der G-Proteine zu einer höheren Affinität des Agonist-Radioliganden an den Rezeptor. Bei jedem Experiment wurde eine Kontrolle ohne Anwesenheit von Protein durchgeführt. Dadurch konnte gewährleistet werden, dass der verwendete Tris-Puffer über keine mikrobielle Kontamination¹⁶⁰ verfügt und damit konnte eine hochaffine Bindungsstelle für [³H]Adenin im verwendeten Tris-Puffer ausgeschlossen werden. Es konnte lediglich eine spezifische Bindung von 101 ± 15 cpm ($n = 7$) gemessen werden (s. Abb. 3.6). Zusätzlich konnte in Western Blot-Experimenten gezeigt werden, dass die Sf9 rAde- und Sf9 rAde+G_α+G_{βγ}-Zelllysate den rAdeR und die G_α- und G_{βγ}-Proteine exprimierten (s. 3.1.6).

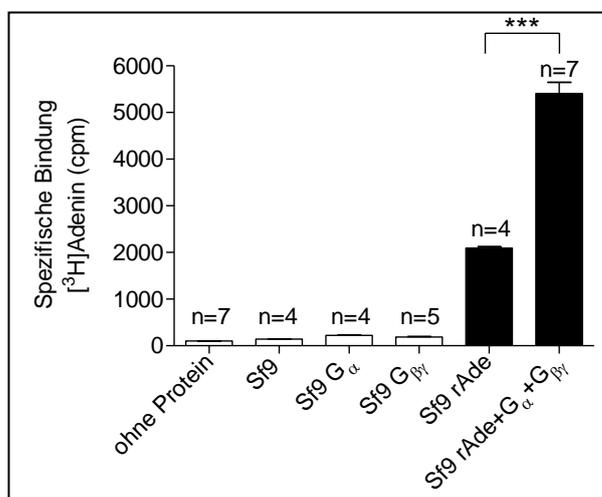


Abb. 3.6: Radioligand-Bindungsstudien an Sf9-, Sf9 G_α-, Sf9 G_{βγ}-, Sf9 rAde- und Sf9 rAde+G_α+G_{βγ}-Membranpräparationen

n: Anzahl der durchgeführten Experimente in Triplikaten; die Signifikanz wurde mit einem ungepaarten *t*-Test bestimmt; *** $P < 0,001$

3.1.4.1 Sättigungsexperimente

Mit Sättigungsexperimenten kann der Ratten-Adenin-Rezeptor näher charakterisiert und so die Gleichgewichtsdissoziationskonstante, der K_D -Wert, und die maximale Rezeptoranzahl in der Membranpräparation, der B_{max} -Wert, bestimmt werden. Dabei werden verschiedene Konzentrationen, 0,05-2000 nM, des Radioliganden [³H]Adenin verwendet. An Sf9 rAde-Membranpräparationen konnte ein K_D -Wert von 152 ± 23 nM ($n = 3$) und ein B_{max} -Wert von $7,85 \pm 1,83$ pmol/mg Protein ($n = 3$) bestimmt werden (s. Abb. 3.7). Im Vergleich dazu konnten an Sf9 rAde+G_α+G_{βγ}-Membranpräparationen ein K_D -Wert von 100 ± 15 nM ($n = 3$) und ein B_{max} -Wert von $1,41 \pm 0,08$ pmol/mg Protein ($n = 3$) ermittelt werden (s. Abb. 3.7). In einem ungepaarten *t*-Test konnte ein signifikanter Unterschied in Anwesenheit der beiden G-Proteinuntereinheiten gezeigt werden. Für die Berechnung des K_i -Wertes wurden die K_D -Werte, die in diesen Sät-

3.1 Charakterisierung der Adenin-Ligand-Bindungsstelle des Ratten-Adenin-Rezeptors 41

tigungsexperimenten bestimmt wurden, als Grundlage verwendet. Die erhaltenen B_{max} -Werte stimmen weitestgehend mit den in der Literatur beschriebenen Werten von 1-5 pmol/mg Protein überein.²⁵⁴⁻²⁵⁶ Allerdings führten die Infektionen von Sf9-Insektenzellen meist zu erheblichen Schwankungen in der Expressionsrate, was auf den Zustand der Zellen und die Passagennummer zurückzuführen war. Daher ist es von entscheidender Bedeutung, die Zellen nicht zu dicht werden zu lassen, damit sich die Zellen für die Infektion in einem guten Zustand befinden. Zusätzlich ist darauf zu achten, dass die Zellen in einem gleichmäßigen Rhythmus wachsen und bei höheren Passagennummern besser neue Zellen aufgetaut werden. Diese können dann erst nach ein bis zwei Wochen wieder für eine Infektion verwendet werden. Wenn diese Merkmale beachtet werden, können die Schwankungen gering gehalten werden.

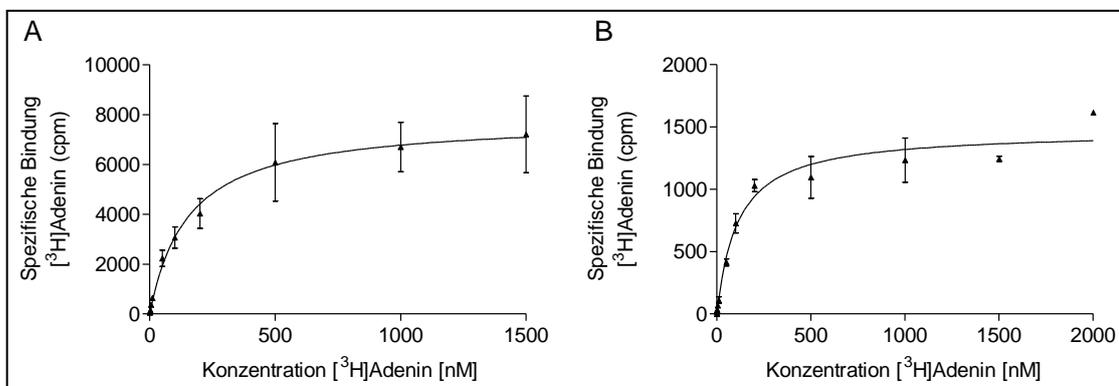


Abb. 3.7: Sättigungsexperimente an Sf9 rAde- (A) und Sf9 rAde+G α +G $\beta\gamma$ -Membranpräparationen (B)

K_D -Wert (Sf9 rAde) = 152 ± 23 nM; B_{max} -Wert = $7,85 \pm 1,83$ pmol/mg Protein; K_D -Wert (Sf9 rAde+G α +G $\beta\gamma$) = 100 ± 15 nM; B_{max} -Wert = $1,41 \pm 0,08$ pmol/mg Protein

3.1.4.2 Konkurrenzexperimente

Zur weiteren Charakterisierung des Ratten-Adenin-Rezeptors in diesem Expressionssystem wurden Konkurrenzexperimente durchgeführt, um die mittlere inhibitorische Konzentration, den IC_{50} -Wert, und die zu berechnende Gleichgewichtsinhibitionskonstante, den K_i -Wert, für Adenin gegen $[^3\text{H}]$ Adenin (10 nM) bestimmen zu können. Dazu wurden verschiedene Konzentrationen der Testverbindung verwendet. In homologen Konkurrenzexperimenten konnte an Sf9 rAde-Membranpräparationen ein IC_{50} -Wert von 278 ± 49 nM ($n=4$) und daraus resultierend ein K_i -Wert von 255 ± 43 nM ($n=4$) für Adenin ermittelt werden (s. Abb. 3.8). Ebenso kann in homologen Konkurrenzexperimenten die Gleichgewichtsdissoziationskonstante, K_D -Wert (283 ± 31 nM, $n=3$), und die maximale Rezeptoranzahl in der Membranpräparation, B_{max} -Wert ($0,093 \pm 0,015$ pmol/mg Protein, $n=3$), bestimmt werden. Allerdings sind diese Werte sehr ungenau, weshalb vorzugsweise der K_D - und B_{max} -Wert, bestimmt in Sättigungsexperimenten, verwendet wird.

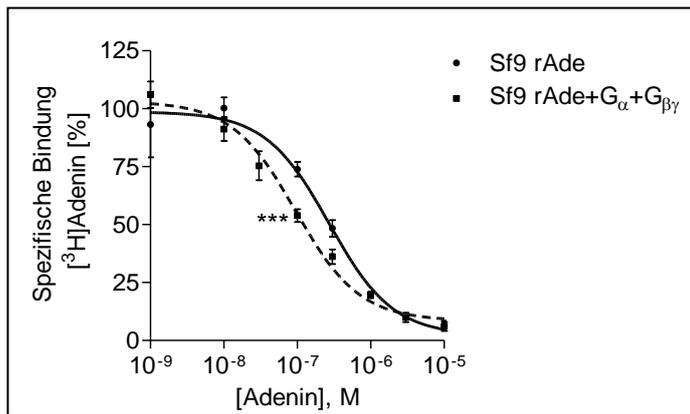


Abb. 3.8: Homologe Konkurrenzexperimente an Sf9 rAde- und Sf9 rAde+G α +G $\beta\gamma$ -Membranpräparationen

IC_{50} -Wert (Sf9 rAde) = 278 ± 49 nM; K_i -Wert = 255 ± 43 nM; IC_{50} -Wert (Sf9 rAde+G α +G $\beta\gamma$) = $95,3 \pm 17,1$ nM; K_i -Wert = $86,6 \pm 15,7$ nM; die Signifikanz wurde mit einem ungepaarten t -Test bestimmt; *** $P < 0,001$

An Sf9 rAde+G α +G $\beta\gamma$ -Membranpräparationen wurde ein IC_{50} -Wert von **95,3** \pm 17,1 nM ($n = 10$) und der daraus resultierende K_i -Wert von $86,6 \pm 15,7$ nM ($n = 10$) gemessen (s. Abb. 3.8). Auch konnte ein K_D -Wert von 105 ± 23 nM ($n = 10$) und ein B_{max} -Wert von $0,017 \pm 0,004$ pmol/mg Protein ($n = 10$) berechnet werden.

Tab. 3.1: Zusammenfassung der Ergebnisse aus Sättigungs- und homologen Konkurrenzexperimenten an Sf9 rAde- und Sf9 rAde+G α +G $\beta\gamma$ -Membranpräparationen

	Sf9 rAde	n	Sf9 rAde+G α +G $\beta\gamma$	n	P
K_D (Sättigung)	152 \pm 23 nM	3	100 \pm 15 nM	3	*
B_{max} (Sättigung)	7,85 \pm 1,83 pmol/mg Protein	3	1,41 \pm 0,08 pmol/mg Protein	3	
IC_{50}	278 \pm 49 nM	4	95,3 \pm 17,1 nM	10	***
K_i	255 \pm 43 nM	4	86,6 \pm 15,7 nM	10	***
K_D (homologe Konkurrenz)	283 \pm 31 nM	4	105 \pm 23 nM	10	***
B_{max} (homologe Konkurrenz)	0,093 \pm 0,015 pmol/mg Protein	4	0,017 \pm 0,004 pmol/mg Protein	10	

n : Anzahl der durchgeführten Experimente in Triplikaten; P : die Signifikanz wurde mit einem ungepaarten t -Test bestimmt; * $P < 0,05$; *** $P < 0,001$

In Anwesenheit der G α - und G $\beta\gamma$ -Proteine konnte ein **drei-facher Affinitätsge-winn** für den Agonist-Radioliganden [3 H]Adenin gezeigt werden, was in einer deutlichen Linksverschiebung der Konkurrenzkurve beobachtet wurde (s. Abb. 3.8). In einem ungepaarten t -Test konnte dies mit einer sehr hohen Signifikanz bestätigt werden. Somit konnte die Hypothese, dass der Agonist in Anwesenheit von G-Proteinen eine höhere Affinität an den Rezeptor zeigt, bestätigt werden.^{219,222-225} Die Ergebnisse aus Sättigungs- und homologen Konkurrenzsex-

3.1 Charakterisierung der Adenin-Ligand-Bindungsstelle des Ratten-Adenin-Rezeptors 43

perimenten sind zusammenfassend in Tab. 3.1 dargestellt. Für den Adenin-Rezeptor-Antagonisten PSB-08162¹⁵⁴ wurde hingegen in Anwesenheit der G_α - und $G_{\beta\gamma}$ -Proteine eine deutliche Rechtsverschiebung der Inhibitionskurve und ein **zweieinhalb-facher signifikanter Affinitätsverlust** beobachtet. An Sf9 rAde-Membranpräparationen konnte ein IC_{50} -Wert von 227 ± 16 nM ($n = 3$) und an Sf9 rAde+ G_α + $G_{\beta\gamma}$ -Membranpräparationen ein IC_{50} -Wert von 556 ± 67 nM ($n = 3$) gemessen werden (s. Abb. 3.9).

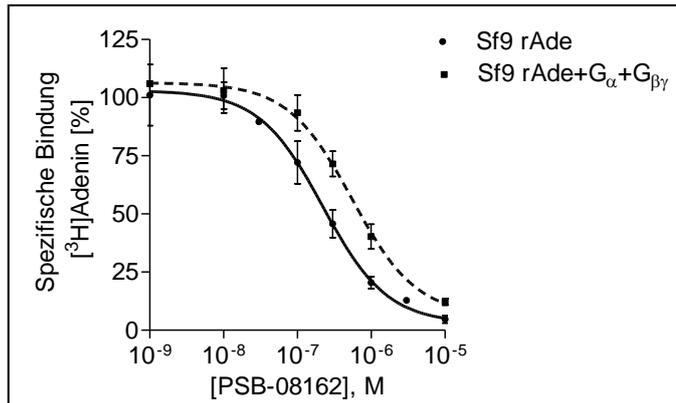


Abb. 3.9: Heterologe Konkurrenzexperimente an Sf9 rAde- und Sf9 rAde+ G_α + $G_{\beta\gamma}$ -Membranpräparationen

IC_{50} -Wert (Sf9 rAde) = 227 ± 16 nM; IC_{50} -Wert (Sf9 rAde+ G_α + $G_{\beta\gamma}$) = 556 ± 67 nM

Durch die Anwesenheit der G-Proteine wird eine aktive Konformation des Rezeptors induziert und der Agonist-Radioligand kann mit einer höheren Affinität an diese Konformation binden. Dahingegen scheint der Antagonist bevorzugt an die inaktive Konformation des Rezeptors zu binden, was den beobachteten Affinitätsverlust in Anwesenheit der G-Proteine erklären würde. Dies könnte ein Indiz dafür sein, dass es sich um einen inversen Agonisten handelt.

Des Weiteren wurden GTP-Shiftexperimente für die Untersuchung der [³H]Adenin-Bindung an Sf9 rAde+ G_α + $G_{\beta\gamma}$ -Membranpräparationen durchgeführt. Wie in der Literatur beschrieben wurde, bindet ein Agonist mit höherer Affinität an einen G-Protein-gekoppelten Rezeptor als an einen ungebundenen Rezeptor.²²⁶ GTP entkoppelt den G_i -gekoppelten Rezeptor und verschiebt das Gleichgewicht hin zur inaktiven Konformation. An Sf9 rAde-Membranpräparationen wurde für den Agonisten Adenin ein IC_{50} -Wert von 278 ± 33 nM ($n = 3$) in Abwesenheit von GTP und ein IC_{50} -Wert von 313 ± 42 nM ($n = 3$) in Anwesenheit von 100 μ M GTP ermittelt (s. Abb. 3.10 A). In einem ungepaarten t -Test konnte keine Signifikanz gezeigt werden. Dieses Ergebnis wurde vermutet, da die in den Sf9-Insektenzellen natürlich vorkommenden G-Proteine zu keiner aktiven Konformation des rAdeR führen können, was bereits auch in der Literatur für andere Rezeptoren beschrieben wurde.^{217,218,222,223}

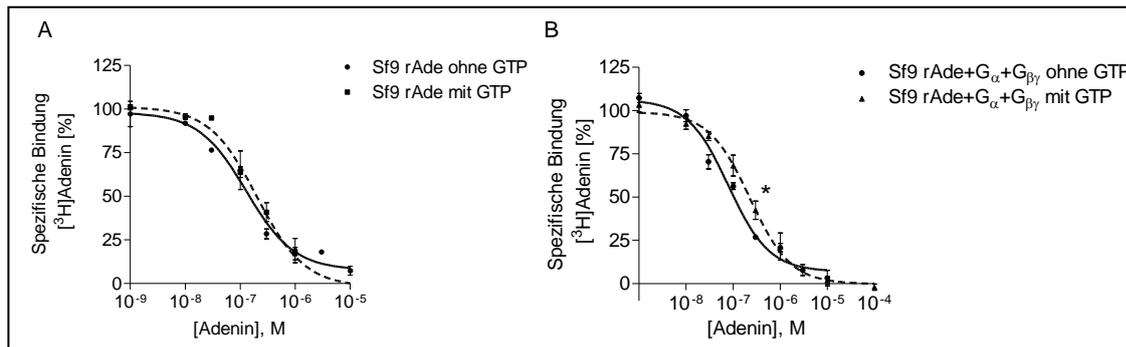


Abb. 3.10: Homologe Konkurrenzexperimente in An- und Abwesenheit von 100 µM GTP an Sf9 rAde- und Sf9 rAde+G α +G $\beta\gamma$ -Membranpräparationen

IC_{50} -Wert (Sf9 rAde ohne GTP) = 278 ± 33 nM; IC_{50} -Wert (Sf9 rAde mit GTP) = 313 ± 42 nM; IC_{50} -Wert (Sf9 rAde+G α +G $\beta\gamma$ ohne GTP) = 85 ± 3 nM; IC_{50} -Wert (Sf9 rAde+G α +G $\beta\gamma$ mit GTP) = 250 ± 55 nM; die Signifikanz wurde mit einem ungepaarten t -Test bestimmt; * $P < 0,05$

Im Gegensatz dazu konnte eine signifikante Rechtsverschiebung der Inhibitionskurve in Anwesenheit von 100 µM GTP an Sf9 rAde+G α +G $\beta\gamma$ -Membranpräparation beobachtet und ein **drei-facher Affinitätsverlust** bestimmt werden. In Abwesenheit von GTP wurde ein IC_{50} -Wert von 85 ± 3 nM ($n = 3$) ermittelt, wohingegen bei Anwesenheit von 100 µM GTP ein IC_{50} -Wert von 250 ± 55 nM ($n = 3$) gemessen wurde (s. Abb. 3.10 B). In einem ungepaarten t -Test konnte eine Signifikanz gezeigt werden. Somit befindet sich in Anwesenheit von GTP der Agonist-gebundene G-Protein-gekoppelte Rezeptor in einer inaktiven, nicht-signalisierenden Konformation und in [3 H]Adenin-Bindungsstudien wird daher eine geringere Affinität gemessen.

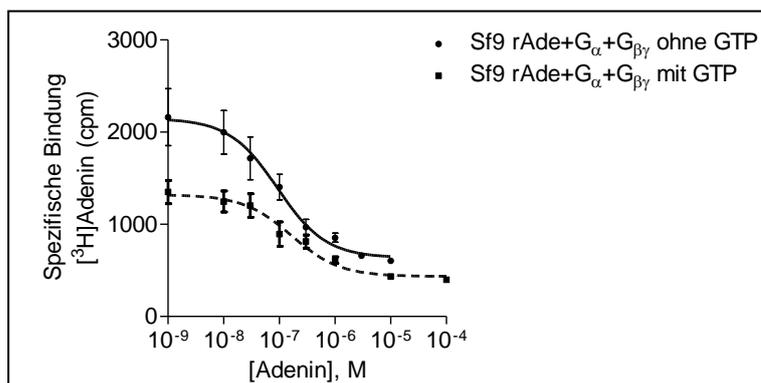


Abb. 3.11: Homologe Konkurrenzexperimente in An- und Abwesenheit von 100 µM GTP an Sf9 rAde+G α +G $\beta\gamma$ -Membranpräparationen

Hingegen kann in Abwesenheit von GTP der Agonist-Radioligand in hoher Affinität an die aktive, für Agonisten hochaffine Rezeptor-Konformation binden. Ebenso konnte ein deutlicher Unterschied in der gemessenen spezifischen Bindung beobachtet werden. In Abwesenheit von GTP wurden teilweise doppelt so viele Zerfälle pro Minute (cpm) detektiert (s. Abb. 3.11). Somit spiegelt sich

3.1 Charakterisierung der Adenin-Ligand-Bindungsstelle des Ratten-Adenin-Rezeptors 45

der Affinitätsverlust nicht nur in den erhaltenen IC_{50} -Werten, sondern auch in der gemessenen spezifischen Bindung wieder.

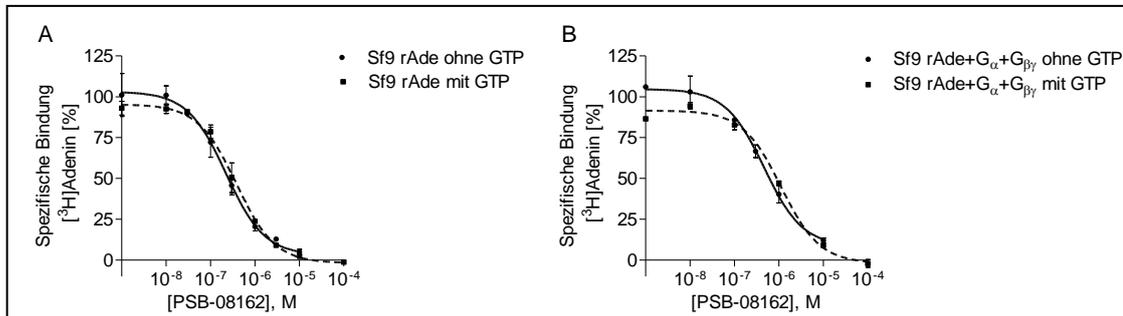


Abb. 3.12: Heterologe Konkurrenzexperimente in An- und Abwesenheit von 100 μ M GTP an Sf9 rAde- und Sf9 rAde+ G_{α} + $G_{\beta\gamma}$ -Membranpräparationen

IC_{50} -Wert (Sf9 rAde ohne GTP) = 227 ± 16 nM; IC_{50} -Wert (Sf9 rAde mit GTP) = 373 ± 30 nM; IC_{50} -Wert (Sf9 rAde+ G_{α} + $G_{\beta\gamma}$ ohne GTP) = 556 ± 67 nM; IC_{50} -Wert (Sf9 rAde+ G_{α} + $G_{\beta\gamma}$ mit GTP) = 1434 ± 174 nM

Die GTP-Shiftexperimente wurden ebenfalls mit dem Antagonisten PSB-08162 durchgeführt. An Sf9 rAde-Membranpräparationen konnte ein IC_{50} -Wert von 227 ± 16 nM ($n = 3$) in Abwesenheit von GTP und ein IC_{50} -Wert von 373 ± 30 nM ($n = 3$) in Anwesenheit von 100 μ M GTP bestimmt werden (s. Abb. 3.12 A). In einem ungepaarten t -Test konnte eine geringe Signifikanz gezeigt werden.

Tab. 3.2: Zusammenfassung der Ergebnisse aus homologen und heterologen GTP-Shiftexperimenten an Sf9 rAde- und Sf9 rAde+ G_{α} + $G_{\beta\gamma}$ -Membranpräparationen

		IC ₅₀ -Wert versus 10 nM [³ H]Adenin [nM] ($n = 3$)		
		ohne GTP	mit 100 μ M GTP	P
Adenin	Sf9 rAde	278 ± 33^a	313 ± 42	ns
	Sf9 rAde+ G_{α} + $G_{\beta\gamma}$	$85 \pm 3^{a,b}$	250 ± 55^b	*
		P	ns	
PSB-08162	Sf9 rAde	227 ± 16^c	373 ± 30	*
	Sf9 rAde+ G_{α} + $G_{\beta\gamma}$	$556 \pm 67^{c,d}$	1434 ± 174^d	**
		P	**	

P: die Signifikanz wurde mit einem ungepaarten t -Test bestimmt; ns: nicht signifikant $P > 0,05$; * $P < 0,05$; ** $P < 0,01$; ^a drei-facher Affinitätsgewinn; ^b drei-facher Affinitätsverlust; ^c und ^d zweieinhalb-facher Affinitätsverlust

An Sf9 rAde+ G_{α} + $G_{\beta\gamma}$ -Membranpräparationen wurde hingegen ein IC_{50} -Wert von 556 ± 67 nM ($n = 3$) in Abwesenheit von GTP und ein **zweieinhalb-facher Affinitätsverlust** mit einem IC_{50} -Wert von 1434 ± 174 nM ($n = 3$) in Anwesenheit von 100 μ M GTP gemessen (s. Abb. 3.12 B). In einem ungepaarten t -Test konnte eine Signifikanz bestimmt werden. Möglicherweise handelt es sich bei der Verbindung PSB-08162 um einen Partialagonisten, was die nicht erwarteten

Ergebnisse erklären könnte. Die Ergebnisse der funktionellen GTP-Shiftexperimente sind zusammenfassend in Tab. 3.2 dargestellt.

3.1.5 Entwicklung eines spezifischen gegen den Ratten-Adenin-Rezeptor gerichteten Antikörpers

Antikörper werden genutzt, um mit hoher Spezifität ein Antigen, meist Protein, zu erkennen und darüber hinaus auch sichtbar zu machen. Die Entwicklung eines spezifisch gegen den Ratten-Adenin-Rezeptor gerichteten Antikörpers wäre ein wichtiges biologisches Tool zur weiteren Charakterisierung des Rezeptors.

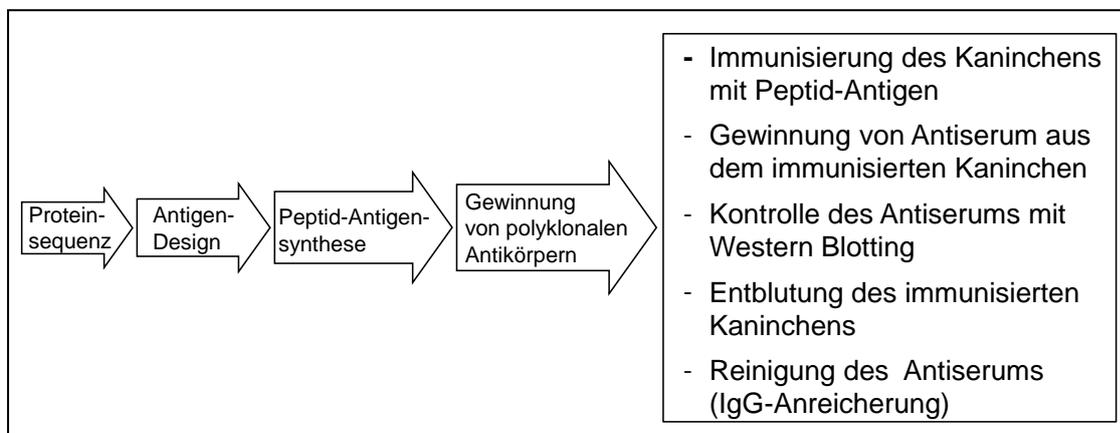


Abb. 3.13: Schema zur Gewinnung eines polyklonalen Antikörpers in Kaninchen

Dazu wird zunächst anhand der Proteinsequenz des rAdeR ein geeignetes Peptid-Antigen vorhergesagt, was extrem schwierig ist. Anschließend wird das Peptid-Antigen *in vitro* synthetisiert, um in das Kaninchen, den Antikörper-Produzenten, injizieren zu können. Das Immunsystem des Tieres bildet daraufhin Antikörper gegen das Peptid-Antigen. Dieser Vorgang wird als Immunisierung bezeichnet und mehrfach wiederholt. Nach einiger Zeit kann das polyklonale Antiserum entnommen werden. Dies wurde dann in Western Blot-Experimenten untersucht, um Informationen über die Spezifität des Antikörpers zu erhalten. Wenn der polyklonale Antikörper an dem Targetprotein die gewünschte Spezifität aufweist, wird das Kaninchen entweder erneut mit dem Peptid-Antigen immunisiert, um eine größere Menge des Antikörpers zu erhalten, oder die Entblutung des immunisierten Kaninchens erfolgt. Zum Schluss kann das gewonnene Antiserum gereinigt werden, in dem die Immunglobuline angereichert wurden. Die Gewinnung eines polyklonalen Antikörpers in Kaninchen ist schematisch in Abb. 3.13 dargestellt.

3.1.5.1 Antigen-Design

Die Proteinsequenz des Ratten-Adenin-Rezeptors wurde mit Vorhersage-Programmen hinsichtlich ihrer hydrophilen und lipophilen Eigenschaften untersucht. Einerseits kann jeder Aminosäure ein numerischer Wert (Hydrophilie) zugeordnet und dann wiederholt entlang der Peptidkette gemittelt werden, wobei der höchste gemittelte Hydrophilie-Punkt im oder angrenzend zum Epitop lokalisiert ist.²⁵⁷ Andererseits kann die hydrophile und lipophile Tendenz einer Polypeptidkette bestimmt werden. Mit dem erhaltenen Profil können die Transmembran-Domänen sowie außen- und innenliegende Regionen vorhergesagt werden.²⁵⁸ Die vorhergesagten Transmembran-Domänen des rAdeR sind: 45-67 für TM1, 74-93 für TM2, 108-130 für TM3, 156-175 für TM4, 195-217 für TM5, 237-259 für TM6 und 269-291 für TM7. Ein ideales Antigen-Epitop sollte hydrophob, Oberflächen-orientiert und beweglich sein, da in der natürlichen Umgebung hydrophile Regionen sich zu Resten der Oberflächenproteine neigen, während hydrophobe Regionen meist im Inneren des Proteins lokalisiert sind.²⁵⁹ Zudem können Antikörper nur ein Epitop, das an der Proteinoberfläche liegt, erkennen und darüber hinaus mit einer hohen Affinität daran binden, wenn sich das Epitop durch seine Flexibilität in eine zugängliche Position bewegt. Somit sind die helikalen Transmembran-Regionen als Antigen-Epitope aufgrund ihrer geringen Flexibilität und der fehlenden Oberflächen-Orientierung ungeeignet. Dagegen scheinen N- und C-Terminus sowie die extra- und intrazellulären Schleifen ein immunogenes Target zu sein.²⁵⁹

Weiterhin wird ein Programm genutzt, um die Sekundärstruktur, z. B. α -Helix und β -Faltblatt, vorherzusagen, wobei dies sehr schwierig ist und mit keiner hohen Genauigkeit erfolgt. Oberflächen- oder leicht zugängliche Regionen besitzen meist helikale oder erweiterte Sekundärstrukturen, was bei der Auswahl des Epitops beachtet werden sollte.²⁶⁰⁻²⁶² Außerdem sollten verbreitete Sequenz-Motive, wie das RGD-Motiv, Helix-Schleife-Helix-Sequenz, GTP-Bindungsstelle, Phosphorylierung der Konsensus-Sequenz und SH₂-Domänen, die Kreuz-Reaktivität hervorrufen bzw. auslösen können, vermieden werden.²⁵⁹ Auch Sequenzen, die mit biologischen Aktivitäten, wie unerwünschten post-translationalen Modifikationen, verknüpft sind, sollten nicht im Epitop enthalten sein. Ein weiterer Nachteil von kleinen Aminosäuren-Sequenzen, wie dem Peptid-Antigen, ist, dass diese Region eine Homologie zu einer Sequenz eines nicht verwandten Proteins zeigen kann und damit der gewonnenen Antikörper später zu Kreuz-Reaktionen führt.²⁵⁹ Aus diesem Grund sollte mit einer BLAST-Datenbanksuche eine Homologie zu einem anderen Protein ausgeschlossen werden. Des Weiteren sollte die Länge des ausgewählten Antigen-Peptids zwischen 10-20 Aminosäuren liegen, da dann die Synthese-Schwierigkeiten vermindert werden können aufgrund einer halbwegs guten Löslichkeit in Wasser und einem geringen Maß an Sekundärstrukturen.²⁵⁹ Bei kürzerer Sequenz

(< 9) kann zwar eine größere Spezifität erreicht werden, aber es besteht das Risiko, dass das native Protein mit einer geringeren Wahrscheinlichkeit erkannt wird. Im Gegensatz dazu können längere Sequenzen (< 20) etwas weniger spezifisch sein, da sie mehrere Epitope enthalten können. Jedoch kann das native Protein mit höherer Wahrscheinlichkeit erkannt werden. Daraufhin wurden fünf Epitope, die am N-Terminus, in der zweiten extrazellulären Schleife, in der dritten intrazellulären Schleife und am C-Terminus des rAdeR liegen, ausgewählt. Um die Wahrscheinlichkeit eines spezifischen gegen den rAdeR gerichteten Antikörpers zu erhöhen, wurden zwei Kaninchen für jedes Epitop immunisiert. Die ausgewählten Peptid-Antigene sind in Tab. 3.3 dargestellt.

Tab. 3.3: Peptid-Antigene, die zur Gewinnung eines polyklonalen Antikörpers in Kaninchen ausgewählt wurden

Antiserum	Bezeichnung	Peptidsequenz	Aminosäure
rAde_2:16 N-term 398	rAde-398	DKTIPGSFNSRTLIP	29-43
rAde_2:16 N-term 399	rAde-399	DKTIPGSFNSRTLIP	29-43
rAde_154:167 EL2 400	rAde-400	DTKYEKDNRCLASN	181-194
rAde_154:167 EL2 401	rAde-401	DTKYEKDNRCLASN	181-194
rAde_195:208 IL3 402	rAde-402	GAGRMKLTRLYATI	222-235
rAde_195:208 IL3 403	rAde-403	GAGRMKLTRLYATI	222-235
rAde_286:304 C-term 404	rAde-404	CDTPETAENTVEMSSSKVEP	313-331
rAde_286:304 C-term 405	rAde-405	CDTPETAENTVEMSSSKVEP	313-331
rAde_268:286 C-int 406	rAde-406	FRHQKHQTLKMVLQRALQD	295-313
rAde_268:286 C-int 407	rAde-407	FRHQKHQTLKMVLQRALQD	295-313

C: Cystein wurde an die rAdeR-Peptid-Sequenz hinzugefügt, da durch das Cystein die Vernetzung an ein Carrier-Molekül ermöglicht wurde und somit eine bessere Injizierbarkeit erreicht werden kann.²⁵⁹

Das in rot markierte Epitop, das am N-Terminus liegt, besteht aus 15 Aminosäuren. Fast genauso lang, mit 14 Aminosäuren, ist die Sequenz des cyan markierten Epitops, das sich in der zweiten extrazellulären Schleife befindet, und das magenta markierte Epitop, das in der dritten intrazellulären Schleife lokalisiert ist, besitzt ebenfalls eine Länge von 14 Aminosäuren. Deutlich länger ist das gelb markierte Epitop mit 20 Aminosäuren, das am Ende des C-Terminus liegt. Vor die Sequenz wurde die Aminosäure Cystein hinzugefügt, da dadurch die Vernetzung an ein Carrier-Molekül ermöglicht und so eine bessere Injizierbarkeit erreicht wird.²⁵⁹ Das grün markierte Epitop befindet sich ebenfalls am C-Terminus, ist aber direkt an der TM7-Helix gelegen und besitzt eine Länge von 19 Aminosäuren. In Abb. 3.14 B ist das mit ClustalW erhaltene Alignment des rAdeR, verglichen mit dem mAde1R und mAde2R, mit den farbig markierten Epitopen dargestellt. Die Sequenzen der magenta, grün und gelb markierten Epitope sind sich sehr ähnlich, wodurch die gewonnenen Antikörper auch den mAde1R und mAde2R erkennen könnten.

3.1 Charakterisierung der Adenin-Ligand-Bindungsstelle des Ratten-Adenin-Rezeptors 49

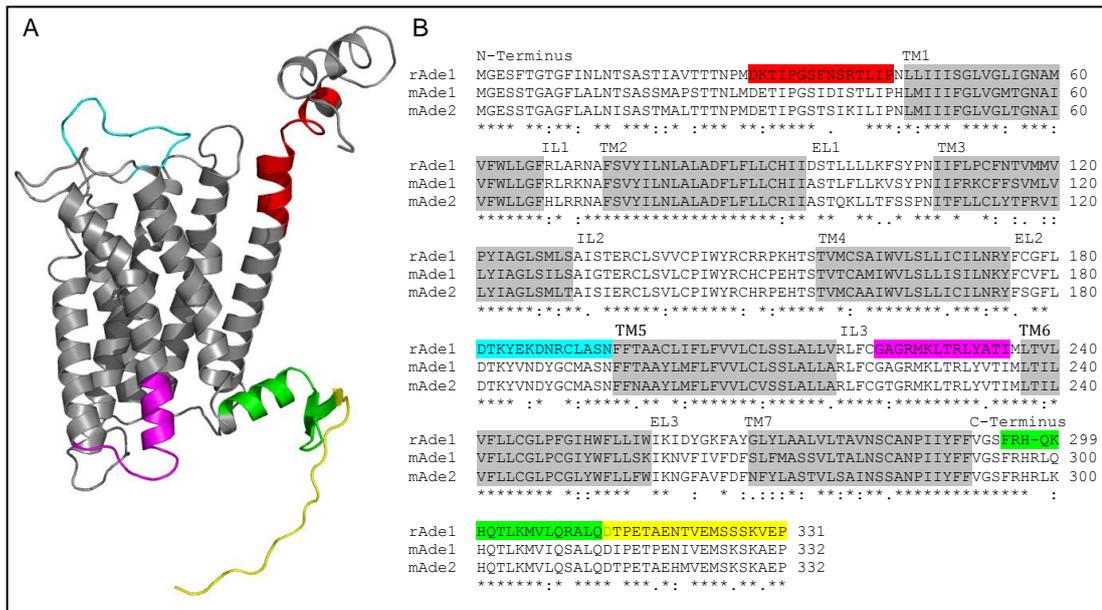


Abb. 3.14: Modell (A) und Alignment (B) des Ratten-Adenin-Rezeptors mit den fünf farbigen Epitopen, verglichen mit dem mAde1R und mAde2R

Das Multiple-Alignment der drei zu vergleichenden Sequenzen wurde mit ClustalW erstellt. Die mit einem Sternchen (*) markierte Aminosäure ist in den vergleichenden Sequenzen identisch. Wohingegen die mit einem Doppelpunkt (:) oder Punkt (.) markierten Aminosäuren nicht identisch, aber der Aminosäure-Substitution konserviert oder semi-konserviert ist. Grau markiert: Transmembran-Domänen; rot markiert: Epitop von rAde-398 und rAde-399; cyan markiert: Epitop von rAde-400 und rAde-401; magenta markiert: Epitop von rAde-402 und rAde-403; grün markiert: Epitop von rAde-406 und rAde-407; gelb markiert: Epitop von rAde-404 und rAde-405; TM: Transmembran-Domäne; EL: extrazelluläre Schleife; IL: intrazelluläre Schleife; rAde1: Proteinsequenz des Ratten-Adenin-Rezeptors; mAde1: Proteinsequenz des Maus-Adenin-Rezeptors Subtyp 1; mAde2: Proteinsequenz des Maus-Adenin-Rezeptors Subtyp 2

Das in Abb. 3.14 A gezeigte Homologie-Modell des rAdeR ist mit den farblich markierten Epitopen dargestellt. Das Modell basiert auf der Kristallstruktur des humanen β_2 -adrenergen Rezeptors und wurde mir freundlicherweise von Dr. Anke Schiedel zur Verfügung gestellt. Jedoch sind die veränderten Positionen der rot und magenta markierten Epitope auffällig. Die vorhergesagten TM-Domänen, extra- und intrazellulären Schleifen, die im Alignment markiert sind, stimmen nicht mit denen im Homologie-Modell gezeigten Domänen überein. Denn das rot markierte Epitop befindet sich anhand des Alignments im N-Terminus, wobei im Modell die rote Markierung auch in der TM1-Helix angezeigt wird. Das Gleiche gilt für das magenta markierte Epitop, das sich zusätzlich in TM6-Helix befindet. Diese Unterschiede in den TM-Domänen könnten zeigen, dass das Homologie-Modell eher den tatsächlichen Bedingungen entspricht als das Alignment, falls die gewonnenen Antikörper nicht sehr gut binden.

3.1.5.2 Peptid-Antigensynthese

Die fünf Peptid-Antigene wurden von der Firma Open Biosystems synthetisiert. Für die nachfolgende Immunisierung der Kaninchen wird eine Menge von 2-5 mg des Peptids benötigt. Der Reinheitsgrad sollte mindestens 70 % betragen, um die Produktion eines polyklonalen Antikörper während der Immunisierung zu gewährleisten. Meist wird das Peptid an ein Carrier-Molekül gekoppelt, um eine gesteigerte Immunogenität zu erreichen. Dazu kann standardmäßig der Meeresschnecken-Extrakt (*keyhole limpet Hemacyanin*, KLH) oder BSA verwendet werden.

3.1.5.3 Gewinnung des polyklonalen Antikörpers

Tab. 3.4: Immunisierungsschema für Kaninchen

Datum	Tag	Prozedur	Bemerkung
24.11.2009			Prä-Immunsersum vor der 1. Injektion (10 ml/Kaninchen)
25.11.2009	0	Primärinjektion	mit 500 µg Antigen
09.12.2009	14	1. Injektion	mit 250 µg Antigen
23.12.2009	28	2. Injektion	mit 250 µg Antigen
30.12.2009	35	1. Serumprobe	ca. 25 ml/Kaninchen
06.01.2010	42	3. Injektion	mit 250 µg Antigen
19.01.2010	56 +	2. Serumprobe	ca. 50 ml/Kaninchen
21.01.2010	58		
02.02.2010	70	Termination	von Kaninchen 398, 399, 401, 402, 404, 406 und 407
		3 weitere Injektionen	von Kaninchen 400, 403 und 405
		Serum der 1., 2. und 3. Verlängerung	von Kaninchen 400, 403 und 405 (ca. 25 ml/Kaninchen)
		finale Injektion	Entblutung von Kaninchen 400 und 403 (ca. 50 ml/Kaninchen)
		alle 3 Monate Injektion	von Kaninchen 405
25.11.2010	365	finale Injektion	Entblutung von Kaninchen 405 (ca. 50 ml/Kaninchen)

Die Gewinnung des polyklonalen Antikörpers erfolgt in weißen Neuseeland-Kaninchen. Für die Immunisierung wurde das in Tab. 3.4 gezeigte Protokoll verwendet. Einen Tag vor der Primärinjektion wird den Kaninchen Prä-Immunsersum entnommen, das zum Vergleich dient. Für die Primärinjektion werden 500 µg Peptid-Antigen verwendet, wobei in der Regel intraperitoneal, in die Bauchhöhle, oder subkutan injiziert wird. Für die weiteren Injektionen an Tag 14, 28 und 42 wird nur noch eine Antigenmenge von 250 µg gebraucht. Am 35. Tag wird die erste Serumprobe entnommen. Die Firma Open Biosystems vereint die beiden Serumproben von Tag 56 und 58, wodurch eine größere Menge an Antiserum erhalten wird. Das Antiserum von Tag 35 und 56 + 58

wurde anschließend mit dem Western Blot-Verfahren analysiert. Daraufhin erfolgte die Termination der Kaninchen 398, 399, 401, 402, 404, 406 und 407 ohne Entblutung, wohingegen die Kaninchen 400, 403 und 405 drei weitere Peptid-Injektionen erhalten haben. Das Serum der ersten, zweiten und dritten Verlängerung wurde ebenfalls mit dem Western Blot-Verfahren analysiert. Nach einer finalen Injektion erfolgte daraufhin die Termination der Kaninchen 400 und 403 mit einer Entblutung. Das Kaninchen 405 wurde ein Jahr lang weiter immunisiert, indem alle 3 Monate erneut das Peptid-Antigen injiziert wurde. Nach einer finalen Injektion erfolgte auch von diesem Kaninchen die Termination mit einer Entblutung. Dieses Antiserum wurde von der Firma Open Biosystems mit einer Affinitätschromatographie gereinigt.

3.1.6 Western Blotting

Das Western Blotting wird genutzt, um Proteine mit spezifischen Antikörpern nachzuweisen. Im Folgenden wird mit dem Western Blot-Verfahren die Proteinexpression des rAdeR in Sf9-Insektenzellen kontrolliert bzw. analysiert. Ebenso wurden die Serumproben untersucht, um Informationen über die Spezifität des gegen den Ratten-Adenin-Rezeptor gerichteten Antikörpers zu erhalten.

3.1.6.1 Expressionsuntersuchung mit den Serumproben

Mit dem Western Blot-Verfahren wurde zum einen die Expression des Ratten-Adenin-Rezeptors in Sf9-Insektenzellen überprüft und zum anderen erfolgte die Analyse der Serumproben. Dazu wurde als Sekundär-Antikörper der HRP-gekoppelte Anti-Kaninchen-Antikörper (Meerrettichperoxidase, „*horseradish-Peroxidase*“) in einer 1 : 5000 Verdünnung verwendet. Zunächst wurde das Prä-Immuns serum, die erste Serumprobe von Tag 35 und die zweite Serumprobe von Tag 56 + 58 an 30 µg Sf9 rAde-Lysaten, an denen in Radioligand-Bindungsstudien hohe spezifische Bindung gemessen wurde, untersucht. Das Antiserum wurde nach Angaben des Herstellers zunächst 1 : 500 verdünnt. Mit dem rAde-398 Antikörper wurde eine Bande bei ca. 60 kDa im Serum von Tag 35 und 56 + 58 erhalten, die im Prä-Immuns serum, Serum vor der Immunisierung des Kaninchens, nicht vorhanden ist (s. Abb. 3.15). Allerdings ist die Größe des Proteins des rAdeR mit nur 37 kDa berechnet worden. Im Western Blot mit dem rAde-399 Antikörper wurde ein anderes Bandenmuster detektiert, obwohl beide Kaninchen, 398 und 399, mit dem gleichen Peptid-Antigen immunisiert wurden. Es wurden Banden bei etwa 33 kDa, 45 kDa und 50 kDa im Serum von Tag 35 sowie 56 + 58 detektiert, die im Prä-Immuns serum fehlen (s. Abb. 3.15). Für die rAde-400, -401 und -402 Antikörper wurden gleiche Bandenmuster erhalten, wobei nur bei ca. 40 kDa eine Bande im Serum von Tag 35 und 56 + 58 erhalten wurde (s. Abb. 3.15). Allerdings konnte für den Antikörper rAde-403 eine

deutliche Bande von ca. 40 kDa erst im Serum von Tag 56 + 58 detektiert werden, die im Prä-Immunsersum und Serum von Tag 35 noch nicht vorhanden war (s. Abb. 3.15). Mit dem rAde-404 und -405 Antikörper wurde eine Bande von etwa 33 kDa und 50 kDa im Serum von Tag 35 und 56 + 58 erhalten. Eine Bande bei ca. 36 kDa wurde mit den Antikörpern rAde-406 und -407 im Serum von Tag 35 und 56 + 58 detektiert (s. Abb. 3.15). Jedoch konnte für den Antikörper rAde-406 eine dickere Bande in der 2. Serumprobe beobachtet werden. Im Gegensatz dazu zeigte sich bei allen anderen Antikörpern, dass die erhaltene Bande der ersten Serumprobe in etwa die gleiche Intensität wie die zweite Serumprobe ergab. Somit produzierten die immunisierten Kaninchen bereits nach 35. Tagen eine entsprechende Menge an Antikörper, die sich bis zum Tag 56 + 58 nicht mehr erhöht hat.

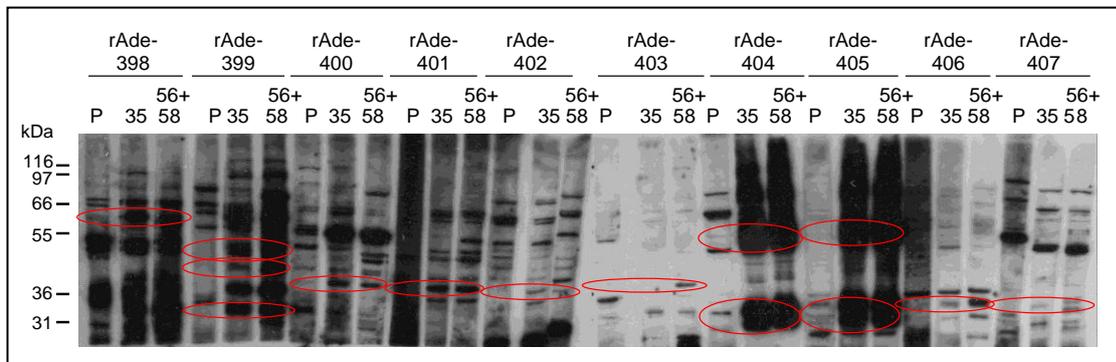


Abb. 3.15: Western Blot-Experiment mit 30 µg Sf9 rAde-Lysaten zur Untersuchung des Prä-Immunsersums sowie der ersten und zweiten Serumprobe

P: Prä-Immunsersum; 35: erste Serumprobe von Tag 35; 56 + 58: zweite Serumprobe von Tag 56 und 58; rAde-398 bis rAde-407: 1 : 500 Antikörper-Verdünnung verwendet

In dem Western Blot zeigten die 1 : 500 Antikörperverdünnungen unterschiedliche Bandenmuster, mal stärker und mal weniger stark ausgeprägt. Darauf hin wurden für den nächsten Western Blot die Antikörperverdünnungen individuell angepasst: rAde-398, -402, -403, -406 und 407 1 : 200 Verdünnung, rAde-399 1 : 400 Verdünnung, rAde-400 und -401 1 : 1000 Verdünnung, rAde-404 und -405 1 : 4000 Verdünnung. Ebenso wurde nur die zweite Serumprobe von Tag 56 + 58 mit 30 µg Sf9 rAde-Lysat, 50 µg Membranpellet aus der Rattencortex-Membranpräparation und 50 µg der cytosolischen Proteine, die im Überstand bei der Membranpräparation gewonnen werden, verwendet. In Radioligand-Bindungsstudien konnte gezeigt werden, dass nur an dem Membranpellet und nicht im Überstand, den cytosolischen Proteinen, spezifische Bindung gemessen wurde. Somit müsste ein spezifischer Antikörper auch nur das Protein des rAdeR im Membranpellet detektieren. Mit dem **Antikörper rAde-400, -403 und -405** wurde eine Bande bei ca. 40 kDa im Membranpellet, nicht aber im Überstand von Rattencortex-Membranpräparationen erhalten (s. Abb. 3.16). In Sf9 rAde-Lysaten wurde diese Bande bei etwa 36 kDa detektiert (s. Abb. 3.16).

3.1 Charakterisierung der Adenin-Ligand-Bindungsstelle des Ratten-Adenin-Rezeptors 53

Dies kann darauf zurückgeführt werden, dass der rAdeR natürlich im Rattencortex vorkommt, wohingegen er in *Sf9*-Insektenzellen überexprimiert wird. Schließlich ist der Unterschied in der Größe der erhaltenen Bande nur sehr gering. Mit den anderen Antikörpern (rAde-398, -399, -401, -402, -404, -406 und -407) wurde im Membranpellet und Überstand ein ähnliches Bandenmuster erhalten, womit diese Antikörper somit nicht sehr spezifisch sind und den natürlich vorkommenden rAdeR in Rattencortex-Membranpräparationen nicht erkennen.

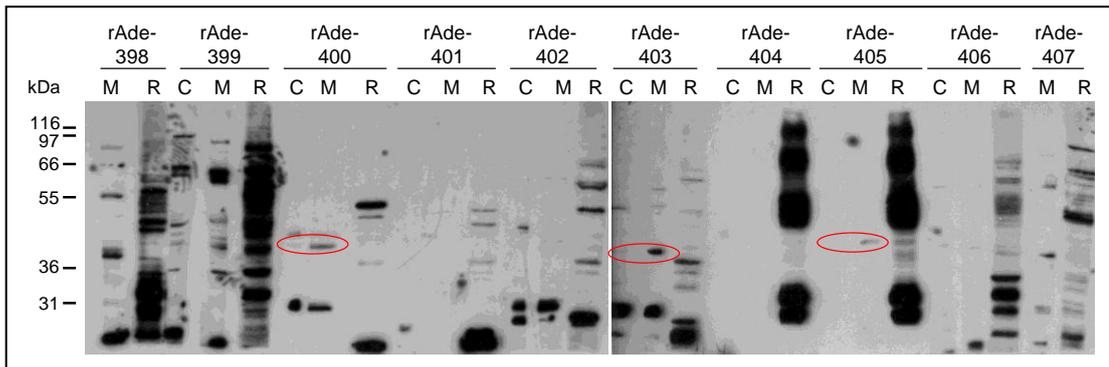


Abb. 3.16: Western Blot-Experiment mit 30 µg Sf9 rAde-Lysaten und 50 µg Membranpellet und Überstand mit cytosolischen Proteinen, die bei Rattencortex-Membranpräparationen entstehen, zur Untersuchung der zweiten Serumprobe von Tag 56 + 58

M: Membranpellet, das bei der Rattencortex-Membranpräparation entsteht; R: Sf9 rAde-Lysat; C: cytosolische Proteine, die im Überstand bei der Rattencortex-Membranpräparation gewonnen werden; rAde-398, -402, -403, -406 und -407 1 : 200 Verdünnung des Antikörpers; rAde-399: 1 : 400 Verdünnung des Antikörpers; rAde-400 und -401: 1 : 1000 Verdünnung des Antikörpers; rAde-404 und -405: 1 : 4000 Verdünnung des Antikörpers

Aufgrund der scheinbar guten Expression des rAdeR in *Sf9*-Insektenzellen, sollte nun der Unterschied zwischen dem Bandenmuster in *Sf9*-Zelllysaten und *Sf9* rAde-Lysaten mit der zweiten Serumprobe von Tag 56 + 58 untersucht werden. Mit rAde-398 und -399 wurde das gleiche Bandenmuster in *Sf9*- und *Sf9* rAde-Lysaten erhalten, wodurch sich die Vermutung eines unspezifischen Antikörpers noch mehr bestätigt (s. Abb. 3.17). Nur eine Bande bei etwa 36 kDa konnte in *Sf9* rAde-Lysaten mit dem **Antikörper rAde-400 und -401** gefunden werden, wobei die Bande nur sehr schwach ist (s. Abb. 3.17). Dahingegen kann mit dem Antikörper **rAde-402 und -403** eine stärkere Bande bei ca. 36 kDa nur in *Sf9* rAde-Lysaten detektiert werden (s. Abb. 3.17). Auch mit den **Antikörpern rAde-404 und -405** wurden dicke Banden bei 31 kDa und 50 kDa in *Sf9* rAde-Lysaten erhalten (s. Abb. 3.17). Ein völlig anderes Bandenmuster wurden mit den Antikörpern rAde-406 und -407 gefunden. Denn in *Sf9*-Zelllysaten wurden mehr Banden detektiert als in *Sf9* rAde-Lysaten, wodurch diese als spezifische gegen den rAdeR gerichteten Antikörper vollkommen ungeeignet sind (s. Abb. 3.17). Somit konnte gezeigt werden, dass mit den Antikörpern rAde-400, -401,

-402, -403, -404 und -405 die Proteinexpression des Ratten-Adenin-Rezeptors in *Sf9*-Insektenzellen kontrolliert werden kann.

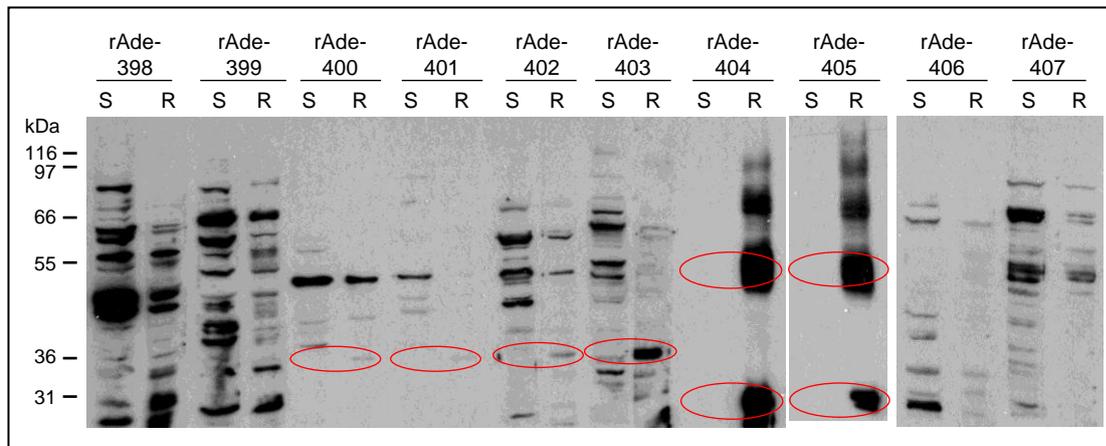


Abb. 3.17: Western Blot-Experiment mit 40 µg *Sf9*- und 30 µg *Sf9* rAde-Lysaten zur Untersuchung der zweiten Serumprobe von Tag 56 + 58

S: *Sf9*-Lysat; R: *Sf9* rAde-Lysat; rAde-398, -402, -403, -406 und -407: 1 : 200 Verdünnung des Antikörpers; rAde-399: 1 : 400 Verdünnung des Antikörpers; rAde-400 und -401: 1 : 1000 Verdünnung des Antikörpers; rAde-404 und -405: 1 : 4000 Verdünnung des Antikörpers

Weiterhin wurde in Western Blot-Experimenten erneut die Spezifität des Antikörpers in An- und Abwesenheit von 40 µg des jeweiligen Peptids untersucht. Dazu wurde das Peptid eine Stunde mit dem Antikörper bei RT vorinkubiert. Kann die Bindungsstelle durch das Peptid blockiert werden, erscheint im Western Blotting an dieser Stelle keine Bande mehr und der Antikörper scheint spezifisch gegen den Rezeptor gerichtet zu sein. Aufgrund der guten Expression des rAdeR in *Sf9*-Insektenzellen wurde für den Western Blot 30 µg *Sf9* rAde-Lysat verwendet. Mit den Antikörpern rAde-398, -401, -402, -403, -406 und -407 konnte in An- und Abwesenheit des Peptids das gleiche Bandenmuster detektiert werden (s. Abb. 3.18). Dahingegen fehlte mit dem **Antikörper rAde-399** eine Bande bei ca. 36 kDa bei Anwesenheit des Peptids. Jedoch zeigte sich mit diesem Antikörper das gleiche Bandenmuster in *Sf9*-Zelllysaten und *Sf9* rAde-Lysaten, wodurch die Expression des rAdeR mit diesem Antikörper nicht kontrolliert werden kann und somit dieser Antikörper ungeeignet ist. Auch mit dem **Antikörper rAde-400** verschwand die Bande bei etwa 40 kDa bei Anwesenheit des Peptids in der Antikörperverdünnung. Ebenso wurde keine Bande bei 31 kDa und 50 kDa mit den **Antikörpern rAde-404 und -405** detektiert, wenn die Antikörperverdünnung vorher mit 40 µg Peptid inkubiert wurde (s. Abb. 3.18). Folglich scheinen die Antikörper rAde-399, -400, -404 und -405 spezifisch zu sein, wobei der Antikörper rAde-399 aufgrund der vorherigen Ergebnisse als Antikörper gegen den rAdeR ausscheidet. In Radioligand-Bindungsstudien konnte weiterhin eine spezifische Bindungsstelle von [³H]Adenin in CHOK1-Membranpräparationen gezeigt werden. Für weitere Informationen bezüglich

3.1 Charakterisierung der Adenin-Ligand-Bindungsstelle des Ratten-Adenin-Rezeptors 55

der Spezifität der Antikörper wurden für den Western Blot 50 µg CHO-Zelllysat verwendet.

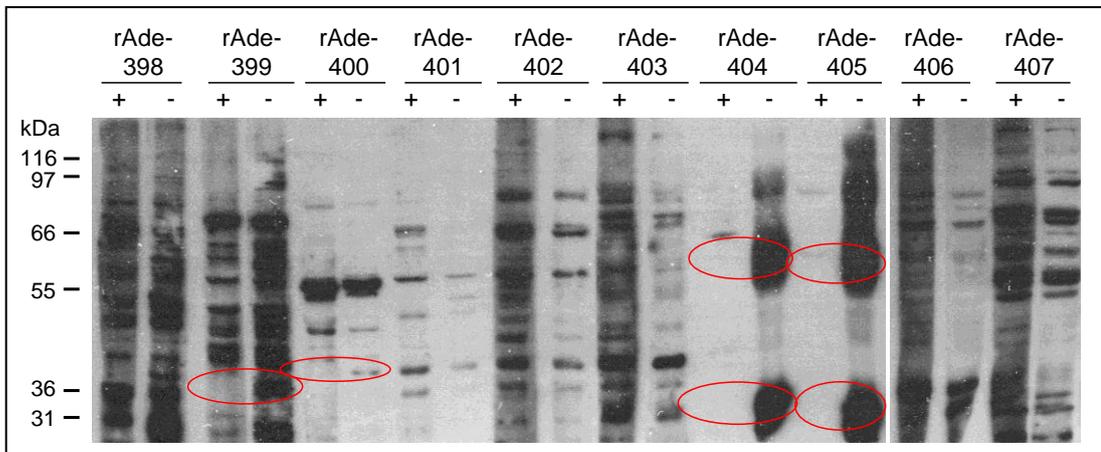


Abb. 3.18: Western Blot-Experiment mit 30 µg Sf9 rAde-Lysaten zur Untersuchung der zweiten Serumprobe von Tag 56 + 58 in An- und Abwesenheit von 40 µg Peptid in der Antikörperverdünnung

+: Antikörper wurde 1 Stunde bei RT mit dem Peptid vorinkubiert; -: in Abwesenheit des Peptids; rAde-398, -402, -403, -406 und -407: 1 : 200 Verdünnung des Antikörpers; rAde-399: 1 : 400 Verdünnung des Antikörpers; rAde-400 und -401: 1 : 1000 Verdünnung des Antikörpers; rAde-404 und -405: 1 : 4000 Verdünnung des Antikörpers

Mit dem **Antikörper rAde-405** konnte nur eine Bande bei 45 kDa detektiert werden (s. Abb. 3.19). Dies könnte auf eine **Nagetier-Spezifität** dieses Antikörpers hindeuten. Mit dem Antikörper rAde-401 konnte ebenfalls nur eine Bande bei ca. 50 kDa gefunden werden, wobei der Antikörper aufgrund der fehlenden Spezifität in Anwesenheit des Peptids schon als ungeeignet betrachtet wurde. Mit den Antikörpern rAde-398, -399, -402, -406 und -407 konnten sehr viele Banden detektiert werden (s. Abb. 3.19), was ebenfalls auf keine gute Spezifität des Antikörpers hinweist. Diese Antikörper schieden ebenfalls schon aufgrund ihrer vorherigen Ergebnisse aus. Aufgrund der in Western Blotting erhaltenen Ergebnisse sind die Antikörper rAde-398, -399, -401, -402, -404, -406 und -407 ungeeignet. Die beiden Antikörper rAde-398 und -399, die an den N-Terminus des rAdeR binden, detektieren keinen Unterschied in Sf9-Zelllysaten und Sf9 rAde-Lysaten. Weiterhin wird der natürlich vorkommende rAdeR in Rattencortex-Membranpräparationen nicht erkannt. Aus diesen Gründen scheidet diese beiden Antikörper aus, obwohl der rAde-399 spezifisch ist. Der Antikörper rAde-401, der an die zweite extrazelluläre Schleife des rAdeR bindet, ist unspezifisch und erkennt den natürlich vorkommenden rAdeR in Rattencortex-Membranpräparationen nicht, wodurch er ebenfalls als ungeeignet betrachtet wurde. Auch schied der Antikörper rAde-402, der an die dritte intrazelluläre Schleife des rAdeR bindet, aus, da er unspezifisch ist, die Expression des rAdeR in Sf9-

Insektenzellen nicht anzeigt und der rAdeR in Rattencortex-Membranpräparationen nicht erkannt werden kann.

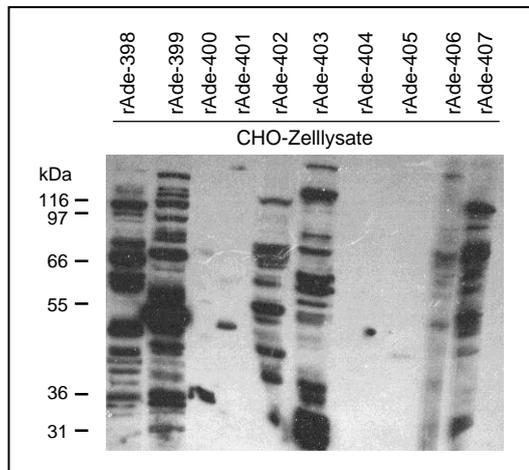


Abb. 3.19: Western Blot-Experiment mit 50 µg CHO-Zelllysate zur Untersuchung der zweiten Serumprobe von Tag 56 + 58

rAde-398, -402, -403, -406 und -407: 1:200 Verdünnung des Antikörpers; rAde-399: 1:400 Verdünnung des Antikörpers; rAde-400 und -401: 1:1000 Verdünnung des Antikörpers; rAde-404 und -405: 1:4000 Verdünnung des Antikörpers

Der Antikörper rAde-404 ist zwar wie der Antikörper rAde-405 spezifisch und kann zur Untersuchung der Expression des rAdeR in *Sf9*-Insektenzellen verwendet werden, aber er erkennt nicht den rAdeR in Rattencortex-Membranpräparationen im Gegensatz zum rAde-405 Antikörper. Aus diesem Grund wurde der Antikörper rAde-405 dem rAde-404 Antikörper vorgezogen. Die beiden Antikörper rAde-406 und -407, die an den C-Terminus des rAdeR binden, sind vollkommen ungeeignet. Denn sie sind unspezifisch, können nicht zur Untersuchung der Expression des rAdeR in *Sf9*-Insektenzellen verwendet werden und erkennen auch nicht den rAdeR in Rattencortex-Membranpräparationen. Wahrscheinlich ist das Epitop zu nah an der TM7 lokalisiert, so dass keine Zugänglichkeit für den Antikörper besteht. Diese Ergebnisse sind zusammenfassend in Tab. 3.5 dargestellt. Den drei Kaninchen 400, 403 und 405 wurde erneut Peptid-Antigen injiziert und drei weitere Serumproben konnten entnommen werden. Denn die drei Antikörper **rAde-400** (Bindung an die zweite extrazelluläre Schleife des rAdeR), **-403** (Bindung an die dritte intrazelluläre Schleife des rAdeR) und **-405** (Bindung an den C-Terminus des rAdeR) können zur Kontrolle der Expression des rAdeR in *Sf9*-Insektenzellen verwendet werden und erkennen zusätzlich den natürlich vorkommende rAdeR in Rattencortex-Membranpräparationen. Jedoch ist der Antikörper rAde-403 unspezifisch. Denn bei Anwesenheit des Peptids in der Antikörperverdünnung verschwand die Bande bei ca. 36 kDa nicht.

3.1 Charakterisierung der Adenin-Ligand-Bindungsstelle des Ratten-Adenin-Rezeptors 57

Tab. 3.5: Zusammenfassung der Ergebnisse aus den Western Blot-Experimenten

Antikörper	Untersuchung der Spezifität in Anwesenheit von 40 µg Peptid in der Antikörperversdünnung	Untersuchung der Expression des rAdeR in Sf9-Insektenzellen	Erkennung des rAdeR in Rattencortex-Membranpräparationen
rAde-398	unspezifisch	nicht möglich	nicht möglich
rAde-399	spezifisch	nicht möglich	nicht möglich
rAde-400	spezifisch	möglich	möglich
rAde-401	unspezifisch	möglich	nicht möglich
rAde-402	unspezifisch	möglich	nicht möglich
rAde-403	unspezifisch	möglich	möglich
rAde-404	spezifisch	möglich	nicht möglich
rAde-405	spezifisch	möglich	möglich
rAde-406	unspezifisch	nicht möglich	nicht möglich
rAde-407	unspezifisch	nicht möglich	nicht möglich

Die Untersuchung der Serumproben nach den drei weiteren Injektionen wurde ebenfalls in Western Blot-Experimenten untersucht. Dazu wurden 40 µg Sf9-Lysate, 30 µg Sf9 rAde-Lysate und 50 µg Membranpellet aus Rattencortex-Membranpräparationen verwendet. Der Antikörper rAde-400-3, -400-4 und -400-5 wurde 1 : 500, rAde-403-3, -403-4 und -403-5 1 : 200 und rAde-405-3, -405-4 und -405-5 1 : 5000 verdünnt. Mit allen Serumproben konnte die Expression des rAdeR in Sf9-Insektenzellen mit einer Bande bei ca. 36 kDa detektiert werden, wobei mit dem Antikörper rAde-400-3, rAde-400-4 und rAde-400-5 noch eine weitere Bande bei etwa 45 kDa gefunden wurde (s. Abb. 3.20).

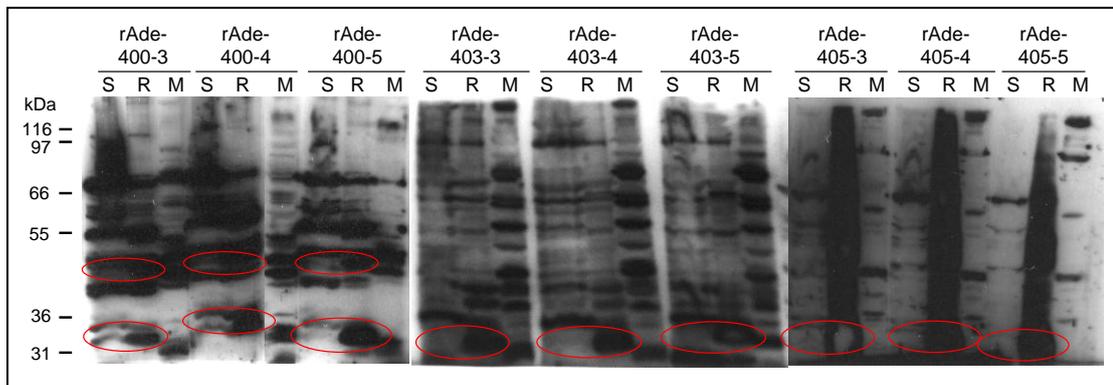


Abb. 3.20: Western Blot-Experiment mit 40 µg Sf9-, 30 µg Sf9 rAde-Lysaten und 50 µg Membranpellet aus Rattencortex-Membranpräparationen zur Untersuchung der Serumproben nach drei weiteren Injektionen (3, 4 und 5)

S: Sf9-Lysat; R: Sf9 rAde-Lysat; M: Membranpellet aus der Rattencortex-Membranpräparation; rAde-400-3, -400-4 und -400-5: 1 : 500 Verdünnung des Antikörpers; rAde-403-3, -403-4 und -403-5: 1 : 200 Verdünnung des Antikörpers; rAde-405-3, -405-4 und -405-5: 1 : 5000 Verdünnung des Antikörpers

Der rAdeR in Rattencortex-Membranpräparationen konnte ebenfalls bei einer Bande von etwa 36 kDa mit den Serumproben nach den drei weiteren Injektionen detektiert werden (s. Abb. 3.21). Wobei die Bande mit dem Antikörper

rAde-405-5 etwas schwach ist, was an der starken Antikörper-Verdünnung liegen kann. Zusätzlich wurden aufgrund der vermuteten Nagetier-Spezifität des rAde-405 Antikörper die Serumproben der dritten Verlängerung in 50 µg CHO-Zelllysaten untersucht. Eine Bande konnte bei etwa 40 kDa detektiert werden (s. Abb. 3.21). Zusätzlich wurden 50 µg der Lysate von Wildtyp 1321N1-Astrozytomzellen und stabil transfizierten 1321N1-Astrozytomzellen, die den rAdeR exprimieren, untersucht. Mit dem Antikörper rAde-405 konnte kein Unterschied im Bandenmuster festgestellt werden (s. Abb. 3.21). Möglicherweise ist die Expression des rAdeR in diesem Zellsystem zu gering und kann deswegen nicht detektiert werden.

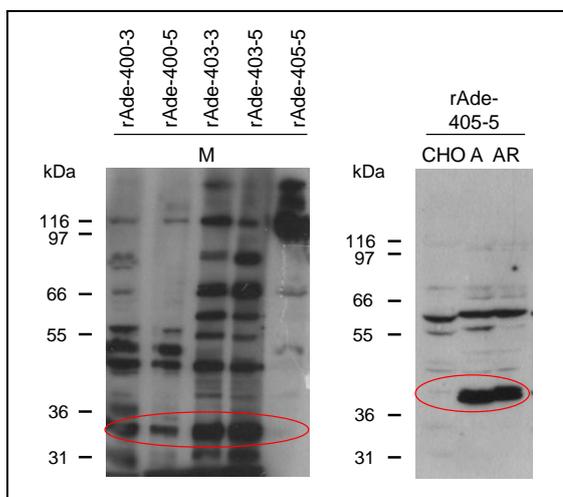


Abb. 3.21: Western Blot-Experiment mit 50 µg Membranpellet aus Rattencortex-Membranpräparationen, 50 µg CHO-Zelllysate, 50 µg 1321N1-Astrozytomzelllysate und 50 µg Zelllysate von stabil transfizierten 1321N1-Astrozytomzellen, die den rAdeR exprimieren, zur Untersuchung der Serumproben nach drei weiteren Injektionen (3, 4 und 5)

M: Membranpellet aus der Rattencortex-Membranpräparation; CHO: CHOK1-Zelllysate; A: 1321N1-Astrozytomzelllysate; AR: Zelllysate von stabil transfizierten 1321N1-Astrozytomzellen, die den rAdeR exprimieren; rAde-400-3 und -400-5: 1 : 500 Verdünnung des Antikörpers; rAde-403-3 und -403-5: 1 : 500 Verdünnung des Antikörpers; rAde-405-5: 1 : 5000 Verdünnung des Antikörpers

Es konnten drei Antikörper rAde-400, rAde-403 und rAde-405 erhalten werden, die zur Untersuchung der Expression des rAdeR in Sf9-Insektenzellen und zur Erkennung des rAdeR in Rattencortex-Membranpräparationen geeignet sind. Der rAde-400 Antikörper, der an die zweite extrazelluläre Schleife bindet, scheint spezifisch für die Ratte zu sein, wohingegen der rAde-405 Antikörper, der an das Ende des C-Terminus bindet, vermutlich Nagetier-spezifisch ist. Im Gegensatz dazu ist der rAde-403 Antikörper, der an die dritte intrazelluläre Schleife bindet, relativ unspezifisch. Denn bei Anwesenheit des Peptids in der Antikörperverdünnung verschwand die Bande bei ca. 36 kDa nicht. Ebenfalls konnten Unterschiede zwischen dem Modell und dem im Alignment vorhergesagten TM-Domänen des rAdeR beobachtet werden. Denn manche Epitope

sind im Modell nicht nur extra- oder intrazellulär gelegen, wie im Alignment, sondern ragen mit einem kleinen Teil in die TM-Helix hinein. Das könnte eine Erklärung dafür sein, dass die Bindung des Antikörpers nicht so gut und nur bei hoher Expression des Rezeptors im Western Blotting zu detektieren ist.

3.1.6.2 Ko-Expression mit G-Proteinen

Mit dem Western Blot-Verfahren wurde die Expression der G_{α} - und $G_{\beta\gamma}$ -Proteine analysiert. In Radioligand-Bindungsstudien konnte bereits gezeigt werden, dass in Anwesenheit der G-Proteine eine signifikant höhere Affinität des Agonist-Radioliganden an den Rezeptor gemessen wurde. Das Western Blot-Experiment mit den Antikörpern gegen die $G_{i\alpha1}$ - und $G_{i\alpha2}$ - (1 : 1000 Verdünnung) sowie die $G_{\gamma2}$ -Untereinheit (1 : 2000 Verdünnung) diente zur Untersuchung der Proteinexpression der beiden G-Proteine in den Membranpräparationen. Als Sekundär-Antikörper wurde ebenfalls der HRP-gekoppelter Anti-Kaninchen-Antikörper in einer 1 : 5000 Verdünnung verwendet. Die G_{α} -Untereinheit besitzt eine Größe von 40-55 kDa, wohingegen die G_{γ} -Untereinheit nur eine Größe von 6-8 kDa aufweist und zusammen mit der G_{β} -Untereinheit vermutlich eine Größe von ca. 41-48 kDa hat.²⁶³⁻²⁶⁷ In Höhe von ca. 40 kDa ist bei den Sf9 G_{α} -Lysaten (50 μ g), die als Positiv-Kontrolle dienen, und Sf9 rAde+ G_{α} + $G_{\beta\gamma}$ -Lysaten (50 μ g) jeweils eine Bande zu sehen, die bei den Sf9-Insektenzelllysaten (30 μ g) und den Sf9 rAde-Lysaten (50 μ g) fehlt (s. Abb. 3.22 A).

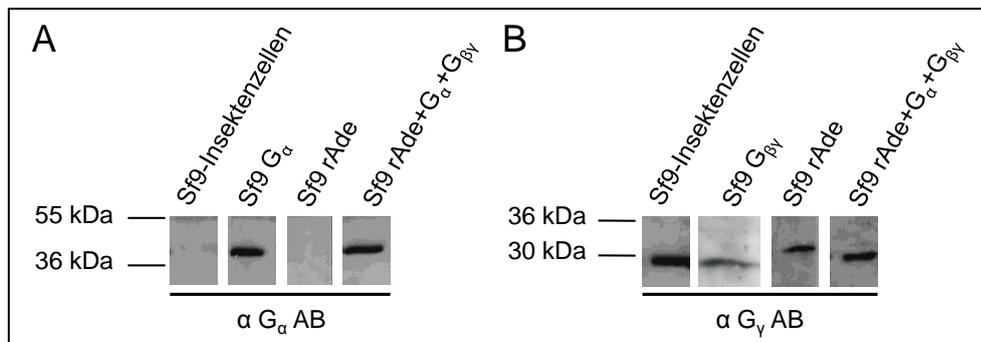


Abb. 3.22: Western Blot-Experiment zur Untersuchung der Anwesenheit von G_{α} - und $G_{\beta\gamma}$ -Proteinen in 30 μ g Sf9-Insektenzelllysaten, 50 μ g Sf9 G_{α} -, 50 μ g Sf9 $G_{\beta\gamma}$ -, 50 μ g Sf9 rAde und 50 μ g Sf9 rAde+ G_{α} + $G_{\beta\gamma}$ -Lysaten

A: Western Blot mit einem gegen die $G_{i\alpha1}$ - und $G_{i\alpha2}$ -Untereinheit gerichteten polyklonalen Antikörper; B: Western Blot mit einem gegen die $G_{\gamma2}$ -Untereinheit gerichteten polyklonalen Antikörper; αG_{α} AB: 1 : 1000 Verdünnung des Antikörpers gegen die $G_{i\alpha1}$ - und $G_{i\alpha2}$ -Untereinheit; αG_{γ} AB: 1 : 2000 Verdünnung des Antikörpers gegen die $G_{\gamma2}$ -Untereinheit

Mit der Detektion dieser Bande konnte gezeigt werden, dass die G_{α} -Proteine in den Sf9 rAde+ G_{α} + $G_{\beta\gamma}$ -Membranpräparation exprimiert wurden. Aufgrund der fehlenden Bande in Sf9-Insektenzelllysaten kann davon ausgegangen werden,

dass die endogen vorkommenden G_{α} -Proteine mit diesem Antikörper nicht detektiert werden. Jedoch konnte mit dem gegen die $G_{\gamma 2}$ -Untereinheit gerichteten polyklonalen Antikörper in Sf9-Insektenzelllysaten (30 μ g) eine Bande bei ca. 30 kDa detektiert werden, wodurch dieser Antikörper auch die natürlich vorkommende G_{γ} -Untereinheit in den Sf9-Insektenzellen erkennt. Aber auch an 50 μ g Sf9 $G_{\beta\gamma}$ - (Positiv-Kontrolle), 50 μ g Sf9 rAde- und 50 μ g Sf9 rAde+ G_{α} + $G_{\beta\gamma}$ -Lysaten konnte diese Bande gefunden werden (s. Abb. 3.22 B). Somit konnte ebenfalls gezeigt werden, dass auch die $G_{\beta\gamma}$ -Proteine in den Sf9 rAde+ G_{α} + $G_{\beta\gamma}$ -Membranpräparation exprimiert werden. Folglich kann die höhere Affinität des Agonist-Radioliganden an den Rezeptor auf die Anwesenheit der G-Proteine zurückgeführt werden.

3.1.7 Zusammenfassung und Ausblick

In Radioligand-Bindungsstudien mit [3 H]Adenin (10 nM) konnte kaum spezifische Bindung an Sf9-Zelllysaten gemessen werden. Somit konnte gezeigt werden, dass die Sf9-Insektenzellen als Expressionssystem für Adenin-Rezeptoren geeignet sind. Ebenso konnte kaum spezifische Bindung an Sf9 G_{α} - und an Sf9 $G_{\beta\gamma}$ -Membranpräparationen gemessen werden. Somit sind die Viren der beiden humanen G-Protein-Untereinheiten für die Ko-Infektion geeignet.

In Western Blot-Experimenten wurde gezeigt, dass sowohl der rAdeR als auch die beiden G-Proteinuntereinheiten exprimiert werden, und diese für den Effekt in Radioligand-Bindungsstudien verantwortlich sind.

Der Ratten-Adenin-Rezeptors konnte in sehr hoher Dichte (B_{\max} -Wert $7,85 \pm 1,83$ pmol/mg Protein) in Sf9-Insektenzellen exprimiert werden. Die Ko-Expression des rAdeR und humaner G_i -Proteinuntereinheiten in Sf9-Insektenzellen zeigte einen signifikanten Affinitätsgewinn um etwa den Faktor 3 sowohl in Sättigungs- als auch homologen Konkurrenzexperimenten. Durch die Anwesenheit der G-Proteine wird eine aktive, für Agonisten hochaffine Konformation des Rezeptors induziert und der Agonist-Radioligand kann mit einer höheren Affinität an diese Konformation binden.

In heterologen Konkurrenzexperimenten mit dem Antagonisten PSB-08162 konnte dahingegen in Anwesenheit der G-Proteine ein zweieinhalb-facher signifikanter Affinitätsverlust beobachtet werden. Somit scheint der Antagonist bevorzugt an die inaktive Konformation des Rezeptors zu binden.

In GTP-Shiftexperimenten konnte kein signifikanter Unterschied der Adenin-Bindung in An- und Abwesenheit von 100 μ M GTP an Sf9 rAde-Membranpräparationen beobachtet werden. Somit konnte gezeigt werden, dass die in den Sf9-Insektenzellen natürlich vorkommenden G-Proteine keinen Einfluss auf die Kon-

formation des Rezeptors haben, was bereits auch in der Literatur beschrieben wurde.^{217,218,222,223} Im Gegensatz dazu konnte in Anwesenheit von 100 μM GTP ein drei-facher, signifikanter Affinitätsverlust des Agonisten Adenin an Sf9 rAde+G $_{\alpha}$ +G $_{\beta\gamma}$ -Membranpräparationen beobachtet werden. In Anwesenheit von GTP befindet sich der Agonist-gebundene G-Protein-gekoppelte Rezeptor in einer inaktiven Konformation und in [^3H]Adenin-Bindungsstudien wird eine reduzierte Affinität gemessen. An Sf9 rAde-Membranpräparationen konnte in An- und Abwesenheit von 100 μM GTP ein geringfügig signifikanter Unterschied für den Antagonisten PSB-08162 bestimmt werden. Auch zeigte sich an Sf9 rAde+G $_{\alpha}$ +G $_{\beta\gamma}$ -Membranpräparationen ein signifikanter zweieinhalb-facher Affinitätsverlust in Anwesenheit von 100 μM GTP. Dies könnte ein Indiz dafür sein, dass es sich um einen Partialagonisten handelt.

Die Entwicklung eines spezifisch gegen den Ratten-Adenin-Rezeptor gerichteten Antikörpers wäre ein wichtiges Tool zur weiteren Charakterisierung des Rezeptors. Die drei Antikörper rAde-400 (Bindung an die zweite extrazelluläre Schleife des rAdeR), -403 (Bindung an die dritte intrazelluläre Schleife des rAdeR) und -405 (Bindung an den C-Terminus des rAdeR) können zur Kontrolle der Expression des rAdeR in Sf9-Insektenzellen verwendet werden und erkennen zusätzlich den natürlich vorkommenden rAdeR in Rattencortex-Membranpräparationen. Jedoch ist der Antikörper rAde-403 unspezifisch, da die Bindungsstelle nicht durch das Peptid blockiert werden konnte und im Western Blotting an dieser Stelle eine Bande detektiert wurde. Um noch genauere Aussagen über die Spezifität der drei Antikörper treffen zu können, sind weitere Western Blot-Experimente an Sf9 mAde1- und Sf9 mAde2-Lysaten notwendig. Mit dem Antikörper rAde-405 müssten dort Banden detektiert werden aufgrund der vermuteten Nagetier-Spezifität. Dominik Thimm konnte kürzlich den Hamster-Adenin-Rezeptor cAdeR klonieren und exprimieren. Ein Western Blotting an Sf9 cAde-Lysaten wäre interessant, um die Nagetier-Spezifität der Antikörper zu untersuchen. Die Expression der Rezeptoren in Sf9-Insektenzellen ist sehr hoch und, wie für den rAdeR gezeigt werden konnte, kann die Expression mit den Antikörpern hervorragend detektiert werden. Des Weiteren müsste mit den Antikörpern die Erkennung des humanen Adenin-Rezeptors untersucht werden, wobei es wichtig wäre, die Sequenz des hAdeR zu kennen.

3.2 Mutagenese des Ratten-Adenin-Rezeptors

Eine weitere Charakterisierung der Ligand-Bindungsstelle des Ratten-Adenin-Rezeptors durch Mutagenese-Studien sollte weiterführende Informationen für das Ligand-Design geben. Dadurch könnten die Aminosäuren, die an der Bindung des Liganden beteiligt sind, identifiziert und möglicherweise neue, affinere

Liganden vorgeschlagen werden. In Radioligand-Bindungsstudien konnte bisher beobachtet werden, dass das Adenin-Grundgerüst nur geringfügig verändert werden kann, ohne dass die Affinität verloren geht.^{152,153} Substitution in Position 8 oder 9 mit basischen Resten oder die Einführung von polaren Substituenten an der 6-Aminofunktion werden von Adenin-Rezeptoren in Rattencortex-Membranen am besten toleriert.¹⁵³ Erste Anhaltspunkte für die Bindungstasche wurden von dem 3D-Modell des rMrgA-Rezeptors (Q7TN49) erhalten.¹⁶⁴ Die Bindungstasche des Agonisten Adenin im rMrgA-Rezeptor scheint in den TM-Helices 3, 4, 5 und 6 zu liegen, wobei postuliert wurde, dass die Asparaginreste in TM3 und TM4 die entscheidenden Aminosäuren für die Ligandbindung darstellen. Die Seitenkette von Asparagin in Position 115 (TM3) soll zwei Wasserstoffbrückenbindungen mit N3 und N9 von Adenin eingehen und Asparagin in Position 173 (TM4) soll zwei H-Brückenbindungen zu N1 und N6 von Adenin ausbilden.¹⁶⁴ Phenylalanin 110 (TM3) und Histidin 252 (TM6) sollen eine π -stacking-Wechselwirkung mit dem Purin-Ring eingehen.¹⁶⁴ Eine weitere Aminosäure, Leucin 201 (TM5), bildet nach dem Modell eine hydrophobe Wechselwirkung mit Adenin aus. Durch diese 5 Aminosäuren wird Adenin entsprechend dem Modell in der Bindungstasche gehalten.¹⁶⁴ Die Proteinsequenz, mit der die 3D-Struktur erstellt wurde, zeigt eine um die ersten 27 Aminosäuren verkürzten N-terminalen Proteinsequenz des Ratten-Adenin-Rezeptors. Daher ist die Bedeutung der ersten 27 Aminosäuren der Proteinsequenz ebenfalls von Interesse. Basierend auf den neuen Kristallstrukturen des humanen A_{2A} -Adenosin-Rezeptors wird nunmehr vermutet, dass eine weitere Aminosäure an der Bindungstasche beteiligt sein könnte. Phenylalanin 179 (EL2) des rAdeR ist konserviert zum humanen $A_{2A}R$ (F168), welches für die π -stacking-Wechselwirkung mit dem Purin-Ring von Adenin verantwortlich ist.⁵⁹ Auch die konservierte Aminosäure-Abfolge von SNFF (193-196) in der Proteinsequenz der identifizierten Nagetier-Adenin-Rezeptoren, wie rAdeR, mAde1R, mAde2R und cAdeR, könnte eine Rolle bei der Ligandbindung spielen. Daher wurden die Aminosäuren Asparagin in Position 194 und Phenylalanin in Position 195 genauer untersucht. Dieses Motiv ist in der zweiten extrazellulären Schleife bzw. in der TM5-Helix lokalisiert und würde zu der Theorie passen, dass die Bindung der Adenins an den GPCR im oberen Drittel der transmembranären Domäne stattfindet und die zweite extrazelluläre Schleife einen Deckel über die Ligand-Bindungstasche bildet. Von Heiko Meyer wurde im Rahmen seiner Doktorarbeit ein Modell des Ratten-Adenin-Rezeptors entwickelt, das auf der Rhodopsin-Kristallstruktur basiert. Die Sequenzidentität des rAdeR zum Rhodopsin-Rezeptor beträgt gerade mal 7 %, in den TM-Domänen 19 %. Später wurde das Modell von Dr. Anke Schiedel erweitert, wobei als Grundlage der humane β_2 -adrenerge Rezeptor mit einer höheren Sequenzidentität von 17 % bzw. in den TM-Domänen von 22 % diente. In Dockingstudien an diesem Modell fiel die Aminosäure Tyrosin in Position 268 als möglicher Interaktionspartner des Liganden

Adenin ins Auge. Denn beim Docking verschiedener Adenin-Derivate befand sich diese Aminosäure immer in der Nähe des Liganden, weshalb sie ebenfalls untersucht wurde. Die neun Aminosäuren F110, N115, N173, L201, H252, F179, N194, F195 und Y268, die möglicherweise an der Ligandbindung beteiligt sind, wurden in Abb. 3.23 in einem „Snake-Plot“ dargestellt.

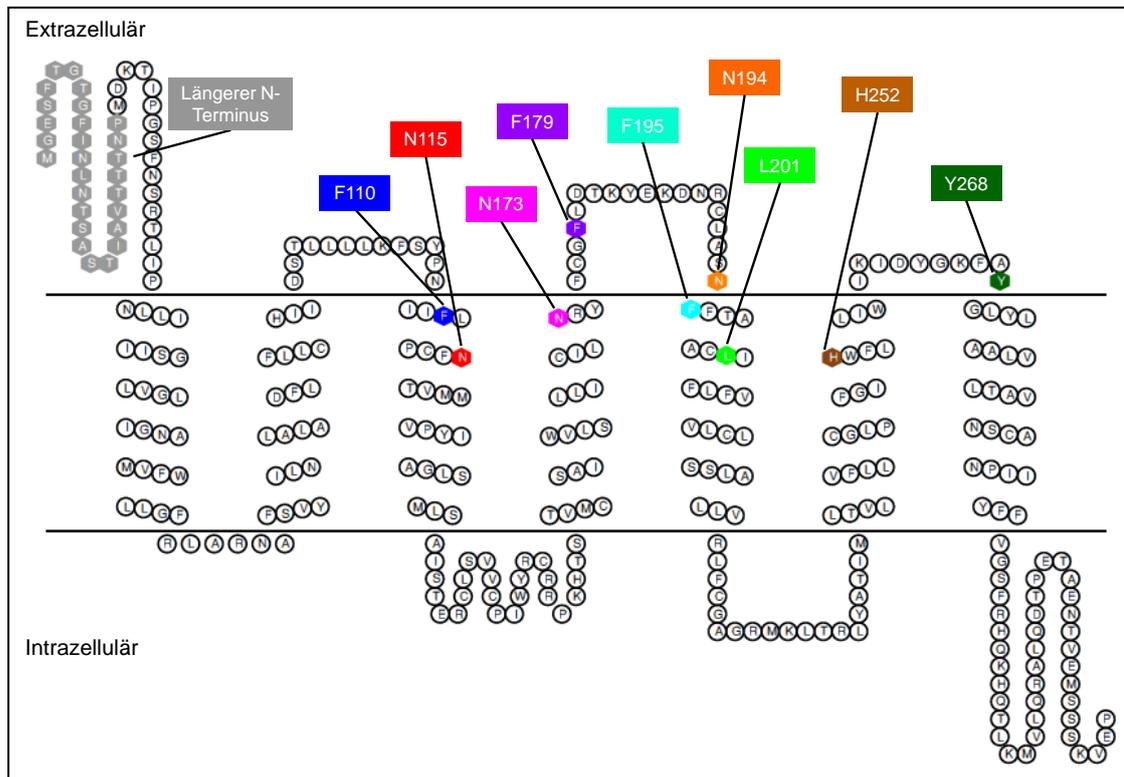


Abb. 3.23: Snake-Plot des Ratten-Adenin-Rezeptors mit den neun markierten Aminosäuren, die möglicherweise an der Ligandbindung beteiligt sind

3.2.1 Klonierung

Für die zielgerichtete Mutagenese diente das Plasmid pUC-*myc-rAde* als Ausgangsplasmid. Dazu wurde zunächst das Plasmid pUC-*myc-hA_{2B}* kloniert, und so konnte das 10 Aminosäuren kleine *myc*-Tag in den Ausgangsvektor pUC19 integriert werden. Diese Umklonierung wurde mit den Restriktionsenzymen EcoRI und BamHI aus dem Vektor pLXSN-*myc-hA_{2B}*, der mir freundlicherweise von Dominik Thimm zur Verfügung gestellt wurde, durchgeführt. Die kommerziell erworbene Gensequenz des rAdeR wurde anschließend von der Erasmusstudentin Inês Macedo in den Vektor pUC-*myc* mit den Restriktionsenzymen MluI und XbaI kloniert. Für die zielgerichtete Mutagenese wurden die Basenpaartripletts so ausgetauscht, dass diese für die einfachste chirale Aminosäure Alanin codieren. Anschließend wurde die Sequenz des mutierten Ratten-Adenin-Rezeptors in den Baculovirus-Transfervektor pFastBacTM1 kloniert.

3.2.1.1 Klonierung von pUC-myc-rAde-Mutanten

Zunächst wurde eine Mutagenese-PCR mit den entsprechenden Primern (s. Tab. 5.3) durchgeführt. Das Mutagenese-PCR-Produkt wurde mit dem ZR DNA Clean & Concentration Kit von der Firma Zymo Research aufgereinigt, um die nachfolgende Reaktion nicht durch Puffer und andere PCR-Zusätze zu stören. Mit dem gereinigten Produkt wird ein Restriktionsverdau mit DpnI, das spezifisch die methylierte DNA schneidet, durchgeführt. Dadurch wird das methylierte Ausgangsplasmid, das keine Mutation enthält, entfernt und die nicht-methylierte DNA kann in *E. coli*-Bakterien transformiert werden. Von den bebrüteten Agar-Platten wurden Bakterien-Monoklone selektioniert und die DNA wurde aus den *E. coli*-Bakterien isoliert. Anschließend wurde die DNA von der Firma GATC sequenziert, um den Erfolg der Mutagenese zu überprüfen. Folgende Mutanten wurden von der Erasmusstudentin Inês Macedo hergestellt: pUC-myc-rAdeF110A2 und pUC-myc-rAdeH252A4. Auch die anderen Mutanten, pUC-myc-rAdeN115A2, pUC-myc-rAdeN173A6 und pUC-myc-rAdeL201A3, konnten kloniert werden (s. Abb. 3.24 B, C, D). Bei der Mutante pUC-myc-rAdeN115A-P75S ist eine zusätzliche ungewollte Mutation in Position 75 aufgetreten. Daher wurde mit dieser Mutante eine erneute zielgerichtete Mutagenese-PCR mit den entsprechenden Primern durchgeführt (s. Tab. 5.3) und so zur ursprünglichen Sequenz an dieser Position zurück mutiert. Das weitere Vorgehen erfolgte wie oben beschrieben.

Des Weiteren wurde eine Mutante hergestellt, die einen um 27 Aminosäuren kürzeren N-Terminus besitzt (rAde Δ N). Die Mutagenese wurde ebenfalls zunächst im Vektor pUC19 durchgeführt. Zunächst wurde in einer PCR mit den entsprechenden Primern (s. Tab. 5.3) das Insert rAde Δ N amplifiziert. Das 942 bp große Insert rAde enthält Schnittstellen für die Restriktionsenzyme MluI und BamHI (s. Abb. 3.24 A). Sowohl das Insert als auch der Vektor pUC-myc-rAde wurden anschließend geschnitten, wodurch *sticky ends* als überhängende Basenpaare erhalten wurden. Das geschnittene PCR-Produkt (915 bp) und der verdaute Vektor (2713 bp) wurden mit dem ZR DNA Clean & Concentration Kit von der Firma Zymo Research aufgereinigt. Anschließend erfolgte die Ligation und Transformation in *E. coli*-Bakterien. Von den bebrüteten Agar-Platten wurden Bakterien-Monoklone selektioniert und die DNA wurde aus den *E. coli*-Bakterien isoliert. Durch einen Kontrollverdau mit den Restriktionsenzymen HindIII und PstI wurde der Erfolg der Klonierung des Plasmids pUC-myc-rAde Δ N (3628 bp) überprüft, denn bei einem positiven Klon werden in einem Agarosegel Banden von 84 bp und 3536 bp erhalten (s. Abb. 3.24 E). Anschließend wurde die DNA des positiven Klons pUC-myc-rAde Δ N4 von der Firma GATC sequenziert.

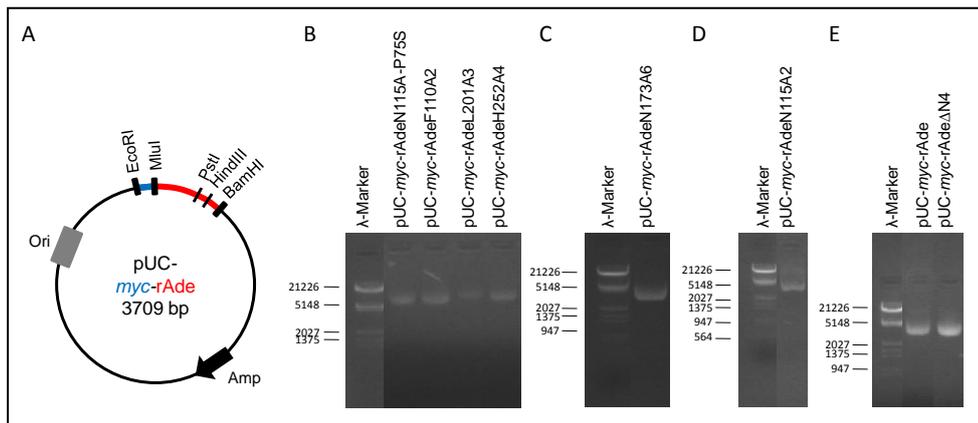


Abb. 3.24: Strategie und Verifikation der Ratten-Adenin-Rezeptor-Mutanten-cDNA in den pUC-myc-Vektor

Der Vektor ist schematisch in Abbildung A dargestellt. Die Restriktionsenzyme *MluI* und *BamHI* wurden zur Klonierung des Inserts *rAdeΔN* in den *pUC-myc*-Vektor verwendet (A und E). Der Kontrollverdau wurden mit den Restriktionsenzymen *PstI* und *HindIII* (E) durchgeführt. Mit der Agarose-Gelelektrophorese wurde die isolierte Plasmid-DNA *pUC-myc-rAdeN115A-P75S* (B), *pUC-myc-rAdeF110A2* (B), *pUC-myc-rAdeL201A3* (B), *pUC-myc-rAdeH252A4* (B), *pUC-myc-rAdeN173A6* (C), *pUC-myc-rAdeN115A2* (D) und *pUC-myc-rAdeΔN4* (E) analysiert und mit dem Gel-doc Fotodokumentationssystem der Firma BioRad wurde das Gel ausgewertet. Amp: Ampicillin-Resistenzgen; Ori: Replikationsursprung (origin of replication)

3.2.1.2 Klonierung pFastBac-rAde-Mutanten

In allen klonierten *pUC-myc*-Mutanten wurde eine weitere ungewollte Mutation in Position 326 der Sequenz des *rAdeR*, Threonin anstelle von Serin, beobachtet. Diese ist unmittelbar vor dem Stoppcodon lokalisiert. Jedoch kann mit den für die Umklonierung in den *pFastBac*^{TM1} entwickelten Primern die ungewollte Mutation zur ursprünglichen Sequenz durch eine PCR zurückmutiert werden.

Für die Klonierung des Plasmids *pFastBac-rAde*-Mutante wurde die DNA des Plasmids *pUC-myc-rAde*-Mutante zunächst in einer PCR mit den entsprechenden Primern (s. Tab. 5.3) amplifiziert. Das 1026 bp große Insert *rAde*-Mutante enthält Schnittstellen für die Restriktionsenzyme *EcoRI* und *XhoI*. Sowohl das Insert als auch der Vektor *pFastBac* wurden anschließend geschnitten, wodurch *sticky ends* als überhängende Basenpaare erhalten wurden. Das geschnittene PCR-Produkt (1005 bp) und der verdaute Vektor (4711 bp) wurden mit dem ZR DNA Clean & Concentration Kit von der Firma Zymo Research aufgereinigt. Anschließend erfolgte die Ligation und Transformation in *E. coli*-Bakterien. Von den bebrüteten Agar-Platten wurden Bakterien-Monoklone selektioniert und die DNA wurde aus den *E. coli*-Bakterien isoliert. Durch einen Kontrollverdau mit den Klonierungs-Restriktionsenzymen *EcoRI* und *XhoI* wurde der Erfolg der Klonierung des Plasmids *pFastBac-rAde*-Mutante überprüft, denn bei einem positiven Klon werden in einem Agarosegel Banden von 1005 bp und 4711 bp

erhalten (s. Abb. 3.25 A und B). Anschließend wurde die DNA der positiven Klone pFast Bac-rAdeF110A4, pFastBac-rAdeN115A2, pFastBac-rAde N173A61, pFastBac-rAdeL201A2 und pFastBac-rAdeH252A2 von der Firma GATC sequenziert (s. Abb. 3.25 C).

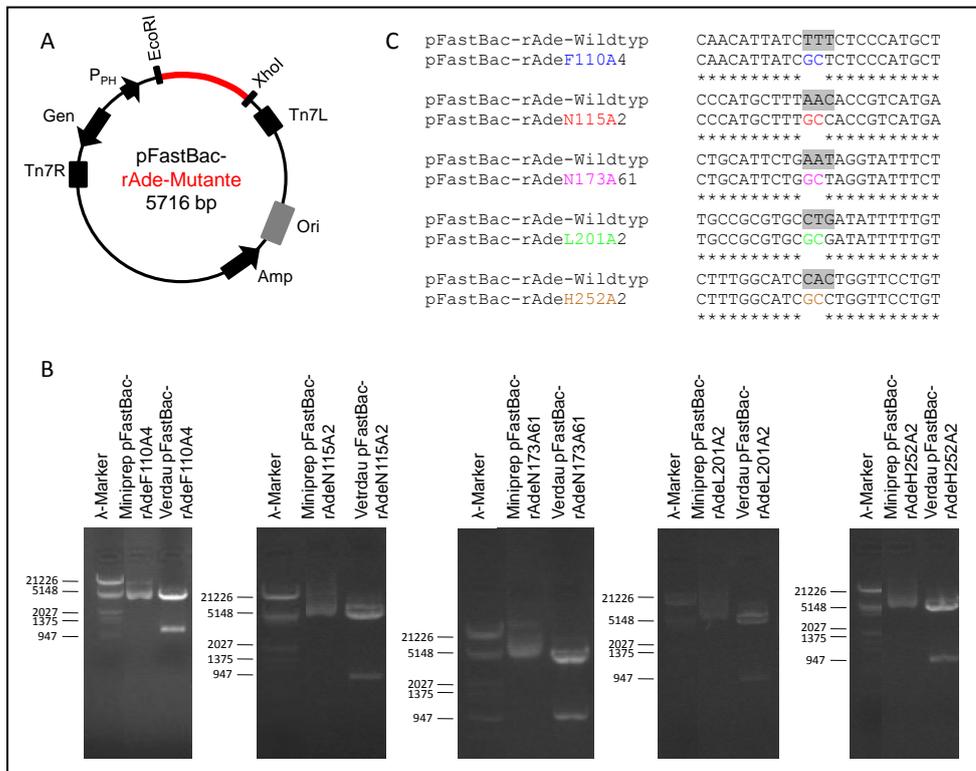


Abb. 3.25: Strategie und Verifikation der Ratten-Adenin-Rezeptor-Mutanten-cDNA in den Baculovirus-Transfervektoren pFastBac sowie ein Ausschnitt des Alignments der Ratten-Adenin-Rezeptor-Wildtyp-DNA und der mutierten Ratten-Adenin-Rezeptor-DNA

Der Vektor ist schematisch in Abbildung A dargestellt. Die Restriktionsenzyme *EcoRI* und *XhoI* (A) wurden zur Klonierung des Inserts rAde-Mutante in den Baculovirus-Transfervektor verwendet. Der Kontrollverdau wurden mit den Klonierungs-Restriktionsenzymen *EcoRI* und *XhoI* durchgeführt (A). Mit der Agarose-Gelelektrophorese wurde die isolierte Plasmid-DNA pFastBac-rAdeF110A4, pFastBac-rAdeN115A2, pFastBac-rAdeN173A61, pFastBac-rAdeL201A2 und pFastBac-rAdeH252A2 (B) analysiert und mit dem Geldoc Fotodokumentationssystem der Firma BioRad wurde das Gel ausgewertet. In Abbildung C ist ein Ausschnitt des Alignments der Ratten-Adenin-Rezeptor-Wildtyp-DNA und der mutierten Ratten-Adenin-Rezeptor-DNA, das mit ClustalW erstellt wurde, dargestellt. Die mit einem Sternchen (*) markierte Base ist in den vergleichenden Sequenzen identisch. Die Codons der auszutauschenden Basen sind grau und die Codons der ausgetauschten Basen sind farbig markiert. P_{PH}: Polyhedrin-Promotor; Amp: Ampicillin-Resistenzgen; Ori: Replikationsursprung (origin of replication); Gen: Gentamicin-Resistenzgen; Tn7R und Tn7L: Sequenz für Transposition des Vektors mit der Bacmid-DNA

Die Mutante, die einen um 27 Aminosäuren kürzeren N-Terminus besitzt (rAde Δ N), wurde ebenfalls in den Baculovirus-Transfervektor pFastBacTM1 kloniert. Es wurden 2 Varianten, mit und ohne *myc*-Tag, hergestellt. Zunächst

wurde das Insert *myc-rAdeΔN* und *rAdeΔN* in einer PCR mit den entsprechenden Primern (s. Tab. 5.3) amplifiziert. Die Klonierung erfolgte mit den beiden Restriktionsenzymen *EcoRI* und *XhoI*, wie bereits oben beschrieben wurde (s. Abb. 3.26 A).

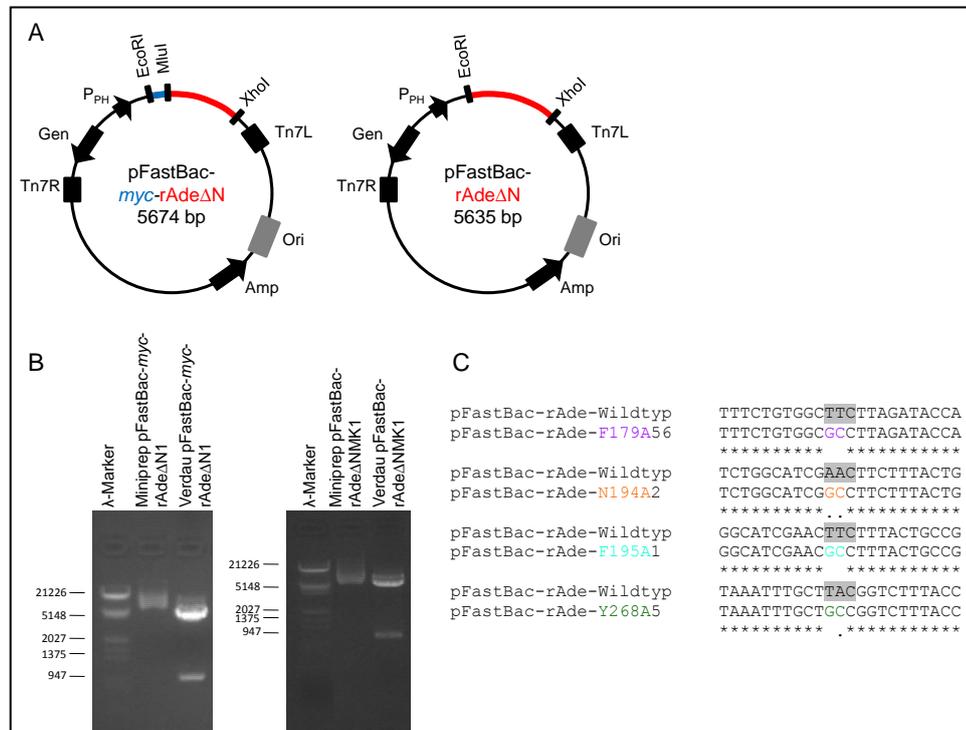


Abb. 3.26: Strategie und Verifikation der *rAdeΔN*-cDNA in den Baculovirus-Transfervektoren pFastBac mit und ohne *myc*-Tag sowie ein Ausschnitt des Alignments der Ratten-Adenin-Rezeptor-Wildtyp-DNA und der mutierten Ratten-Adenin-Rezeptor-DNA

Der Vektor ist schematisch in Abbildung A dargestellt. Die Restriktionsenzyme *EcoRI* und *XhoI* (A) wurden zur Klonierung des Inserts *myc-rAdeΔN* bzw. *rAdeΔN* in den Baculovirus-Transfervektor verwendet. Der Kontrollverdau wurden mit den Klonierungs-Restriktionsenzymen *EcoRI* und *XhoI* durchgeführt (B). Mit der Agarose-Gelelektrophorese wurde die isolierte Plasmid-DNA *pFastBac-myc-rAdeΔN1* und *pFastBac-rAdeΔN1* (B) analysiert und mit dem Geldoc Fotodokumentationssystem der Firma BioRad wurde das Gel ausgewertet. In Abbildung C ist ein Ausschnitt des Alignments der Ratten-Adenin-Rezeptor-Wildtyp-DNA und der mutierten Ratten-Adenin-Rezeptor-DNA, das mit ClustalW erstellt wurde, dargestellt. Die mit einem Sternchen (*) markierte Base ist in den vergleichenden Sequenzen identisch. Die Codons der auszutauschenden Basen sind grau und die Codons der ausgetauschten Basen sind farbig markiert. P_{PH}: Polyhedrin-Promotor; Amp: Ampicillin-Resistenzgen; Ori: Replikationsursprung (origin of replication); Gen: Gentamicin-Resistenzgen; Tn7R und Tn7L: Sequenz für Transposition des Vektors mit der Bacmid-DNA

Durch einen Kontrollverdau mit den Klonierungs-Restriktionsenzymen *EcoRI* und *XhoI* wurde der Erfolg der Klonierung des Plasmids *pFastBac-myc-rAdeΔN* und *pFastBac-rAdeΔN* überprüft, denn bei einem positiven Klon werden in einem Agarosegel Banden von 963 bp (*myc-rAdeΔN*) bzw. 924 bp (*rAdeΔN*)

und 4711 bp erhalten (s. Abb. 3.26 A und B). Anschließend wurde die DNA der positiven Klone pFastBac-*myc-rAde* Δ N1 und pFastBac-rAde Δ N1 von der Firma GATC sequenziert.

Für die Mutation von F179, N194, F195 und Y268 wurde die zielgerichtete Mutagenese direkt im Baculovirus-Transfervektor pFastBacTM1 durchgeführt und pFastBac-rAde als Ausgangsplasmid verwendet. Zunächst wurde eine Mutagenese-PCR mit den entsprechenden Primern (s. Tab. 5.3) durchgeführt. Das weitere Vorgehen erfolgte, wie in 3.2.1.1 beschrieben wurde. Die DNA wurde von der Firma GATC sequenziert, um den Erfolg der Mutagenese zu überprüfen. So konnten auch die anderen vier Mutanten, pFastBac-rAde F179A56, pFastBac-rAdeN194A2, pFastBac-rAde F195A1 und pFastBac-rAde Y268A5, kloniert werden (s. Abb. 3.26 C).

3.2.2 Expressionssystem

Mit dem Bac-to-Bac-Expressionssystem konnte die Zeit bis zur Ernte eines rekombinanten Virus mit ausreichendem Titer, verglichen mit dem BEVS, verkürzt werden. Ebenso konnte schon mit P2-Virus eine ausreichende Proteinexpression beobachtet werden, denn an diesen Membranpräparationen konnte in Radioligand-Bindungsstudien hohe spezifische Bindung gemessen werden. Aus diesen Gründen wurde für die Mutagenesestudien des rAdeR das Bac-to-Bac-Expressionssystem verwendet. Dieses System wurde bereits in 3.1.2.2 beschrieben. Die Kontrolle der rekombinanten Bacmid-DNA wurde ebenfalls mit einer PCR und anschließender Agarose-Gelelektrophorese analysiert. Enthält die Bacmid-DNA das pFastBac-Konstrukt wie bei den Bacmid-pFastBac-rAde-Mutanten, erscheint eine Bande bei etwa 3300 bp (s. Abb. 3.27).

Die Etablierung der optimalen Expressionsbedingungen erfolgte, wie in 3.1.2.2 beschrieben, zunächst in 25 cm² kleinen Zellkulturflaschen, in dem die Sf9-Insektenzellen mit verschiedenen Mengen an Virus (0,1-1,0 ml) infiziert wurden. Die optimale Proteinexpression wurde nach drei Tagen mit einer Virusmenge von 0,4 ml pro 3×10^6 Zellen erreicht. Ebenso wurde eine Ko-Expression im Verhältnis von 1 : 5 des Virus der G α i2- und G β 1 γ 2-Untereinheit gegenüber dem Virus der Ratten-Adenin-Rezeptor-Mutanten durchgeführt. Denn es konnte bereits gezeigt werden, dass die Ko-Expression zu einer aktiven Konformation des rAdeR führt (s. 3.1.3 und 3.1.4). Somit können die Rezeptor-Mutanten nicht nur in Radioligand-Bindungsstudien hinsichtlich ihrer Affinität bzw. Bindung, sondern auch in [³⁵S]GTP γ S-Bindungsstudien hinsichtlich ihrer Aktivierbarkeit untersucht werden.

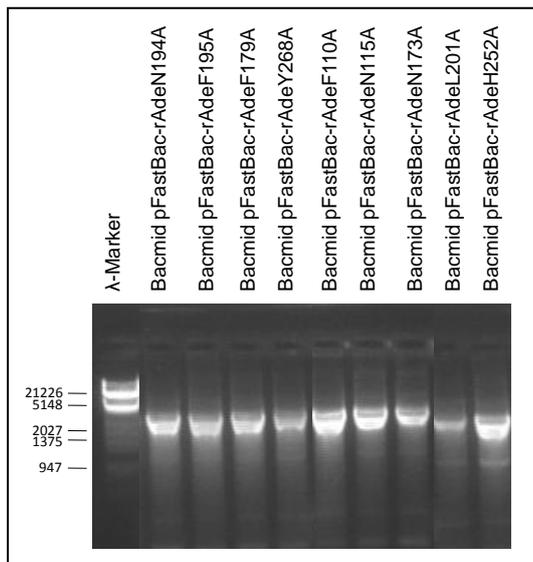


Abb. 3.27: Kontroll-Agarosegel der rekombinanten Bacmid-DNA

3.2.3 Untersuchung des verkürzten N-Terminus des rAdeR

Des Weiteren wurde eine Mutante kloniert, die einen um 27 Aminosäuren kürzeren N-Terminus besitzt (rAde Δ N). Es wurden 2 Varianten, mit und ohne *myc*-Tag, hergestellt. Dadurch besteht die Möglichkeit diese Mutante zusätzlich mit einem monoklonalen Antikörper (1 : 5000 Verdünnung), der gegen die Aminosäuresequenz der C-terminalen Domäne des *myc*-Epitops gerichtet ist, im Western Blotting zu untersuchen. Ebenso wurde mit dem Nagetier-spezifischen rAde-405 Antikörper (1 : 5000 Verdünnung), zweite Serumprobe von Tag 56 + 58, die Proteinexpression des rAdeR in den Membranpräparationen untersucht. Als Sekundär-Antikörper wurde diesmal eine 1 : 1 Mischung des HRP-gekoppelten Anti-Maus- und HRP-gekoppelte Anti-Kaninchen-Antikörpers (je 1 : 5000 Verdünnung) verwendet. Mit dem gegen den rAdeR gerichteten polyklonalen Antikörper rAde-405 konnte an 30 μ g Sf9-Insektenzelllysaten, dient als Negativ-Kontrolle, keine Bande detektiert werden. Dahingegen konnte an je 50 μ g der Sf9 *myc*-rAde-, Sf9-rAde Δ N- und Sf9 *myc*-rAde Δ N-Lysaten je eine Bande bei etwa 31 kDa detektiert werden (s. Abb. 3.28). Somit konnte gezeigt werden, dass in den Sf9-Insektenzellen der rAdeR bzw. die Mutante rAde Δ N exprimiert wurde. Mit dem gegen das *c-myc*-Epitop gerichteten Antikörper konnte keine Bande an Sf9-Insektenzelllysaten, Sf9-rAde Δ N-Lysaten, was beides als Negativ-Kontrolle diente, detektiert werden. Aber auch an Sf9 *myc*-rAde-Lysaten wurde keine Bande gefunden. Dahingegen konnte nur eine Bande bei etwa 30 kDa mit Sf9 *myc*-rAde Δ N-Lysaten gezeigt werden (s. Abb. 3.28). Der einzige Unterschied zwischen den Sf9 *myc*-rAde- und Sf9 *myc*-rAde Δ N-Lysaten liegt in der Proteinlänge, genauer in der Verkürzung des N-Terminus. Sind die ersten 27 Aminosäuren des N-Terminus vorhanden, wird keine Bande mit dem *c-myc*-

Antikörper detektiert, wohingegen die Mutante mit dem verkürzten N-Terminus eine Bande zeigt. Somit scheint es sich bei den ersten 27 Aminosäuren, um eine Signalpeptid-Sequenz zu handeln, die abgespalten wird. Dadurch wurde auch das *myc*-Tag entfernt, wodurch keine Bande erhalten wurde. An der Mutante *myc-rAde Δ N* ist diese Signalpeptid-Sequenz durch Mutagenese bereits entfernt, wodurch mit dem *c-myc*-Antikörper eine Bande detektiert wurde.

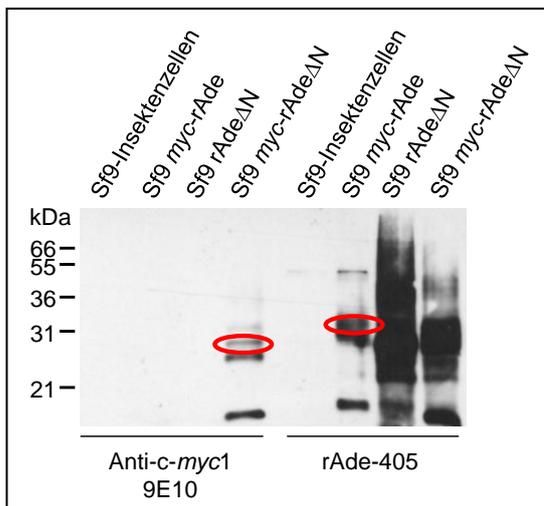


Abb. 3.28: Western Blot-Experiment mit 30 μ g Sf9-Insektenzelllysaten und je 50 μ g von Sf9 *rAde*-, Sf9 *rAde Δ N*-, Sf9 *myc-rAde Δ N*-Lysaten zur Untersuchung der Mutante, die einen um 27 Aminosäuren verkürzten N-Terminus besitzt

Anti-c-myc1 9E10: monoklonaler Antikörper, der gegen die Aminosäuresequenz der C-terminalen Domäne des *myc*-Epitops gerichtet ist, wurde in einer 1 : 5000 Verdünnung eingesetzt; *rAde-405*: 1 : 5000 Verdünnung des Antikörpers

Nur 5-10 % der GPCRs enthalten N-terminale Signalpeptide, die von Signalpeptidasen des endoplasmatischen Retikulums (ER) während der Translokation-vermittelten Einführung in die ER-Membran abgespalten werden.²⁶⁸ Die Mehrheit der GPCRs besitzt eine nicht-abspaltbare Anker-Sequenz, um die Translokation-vermittelte Einführung in die ER-Membran zu gewährleisten.²⁶⁸⁻²⁷⁰ Die Signalpeptid-Sequenz wird kurz nach ihrer Synthese von cytosolischen Ribosomen durch ein Signal-Erkennungspartikel (*signal recognition particle*, SRP) gebunden und dadurch wird die cytosolische Translation gestoppt (*elongation arrest*).^{268,269} Dieser Komplex bindet an die Membran durch die Interaktion des SRP mit dem SRP-Rezeptor, der sich an der ER-Membran befindet.²⁷¹ Dann wird das SRP abgegeben und das Ribosom bindet an das Translocon (Tunnelproteinkomplex), das durch einen Sec61-Komplex gebildet wird.^{268,269,271} So kann die N-Terminus-Sequenz in das Translocon eindringen, wodurch der Sec61-Kanal in die geöffnete Konformation wechselt.^{268,271,272} Die ribosomale Translation kann wieder starten und nur die extrazellulären Rezeptor-Domänen durchqueren das Translocon, die TM-Domänen treten seitlich heraus, wohinge-

gen die intrazellulären Domänen schließlich auf der cytosolischen Seite verbleiben.²⁶⁸ Anschließend wird die Signal-Sequenz durch Signalpeptidasen von der ER-Membran abgespalten. Somit bewirkt die Signalpeptid-Sequenz den Einbau des Rezeptors in die ER-Membran während der frühen Rezeptor-Biogenese.²⁶⁸ Typischerweise konnten Signalpeptide bei solchen GPCRs bevorzugt gezeigt werden, die einen langen N-Terminus von ca. 200 Aminosäureresten mit einem hohen Gehalt an positiv geladenen Aminosäuren besitzen.²⁷³ Denn bei diesen GPCRs ist der N-Terminus an der Ligandbindungs-Domäne beteiligt und daher wird von dieser Region eine stabil-gefaltete Domäne vorausgesetzt.²⁶⁸ Somit ist es auch nicht verwunderlich, dass in der großen Rhodopsin-Familie nur selten Signalpeptid-Sequenzen gefunden wurden. Jedoch scheint es unwahrscheinlich, dass nur die Länge des N-Terminus für die Voraussetzung eines Signalpeptids verantwortlich ist.²⁶⁹ Denn auch bei GPCRs mit kürzerem N-Terminus von ca. 40 Aminosäureresten konnten Signalpeptid-Sequenzen gefunden werden.²⁷³ Vielmehr scheinen der Gehalt an positiv geladenen Aminosäuren und die Eigenschaft einer schnellen Faltung des N-Terminus die Translokation zu verhindern.^{269,270} Daher kann ein Signalpeptid für solche GPCRs notwendig sein, bei denen die post-translationale Translokation des N-Terminus durch die Anwesenheit von stabil-gefalteten Domänen beeinträchtigt oder blockiert wird.²⁶⁹ Aber Signalpeptid-Sequenzen können auch nötig sein, um eine spezifische Expression des Rezeptors an der Zelloberfläche zu erreichen und infolgedessen einen funktionalen Rezeptor zu erhalten.²⁶⁹ Somit kann eine Modifizierung des N-Terminus, z. B. Einführung eines *myc*-Tags zur Protein-Detektion, die Proteinexpression beeinflussen. Aus diesem Grund wurden die Sf9 *myc-rAdeΔN*-Membranpräparationen in Radioligand-Bindungsstudien untersucht.

Die Signalpeptide besitzen eine dreiteilige Struktur, bestehend aus einer zentralen h-Region und den flankierenden n- sowie c-Regionen.^{268,274-277} Die n-Region enthält gewöhnlich hydrophile, basische Aminosäuren mit positiver Ladung, wie Arginin und Lysin.^{268,276} Die zentrale h-Region wird aufgrund ihrer hydrophoben Aminosäuren auch hydrophobe Kernregion genannt und ist der essentielle Teil für die Translokation-vermittelte Einführung in die ER-Membran.²⁷⁶ Die c-Region enthält eher neutrale, polare Aminosäuren im Gegensatz zur h-Region, oft mit Alanin in der letzten oder in den letzten drei Sequenz-Positionen.²⁷⁶ Aber auch Helix-brechende Aminosäuren wie Prolin sowie Glycin sowie kleine ungeladene Aminosäuren um die Spaltstelle herum kommen in dieser Region vor.^{268,275,276} Gerade in der hydrophoben Kernregion, aber auch in der gesamten dreiteiligen Struktur konnten große Variationen in der Länge und Aminosäuresequenz und damit nur eine geringe Sequenzähnlichkeit und eine fehlende Konsensus-Sequenz beobachtet werden, wodurch die Vorhersage einer Signal-Sequenz durch einen generellen Algorithmus schwierig wird.²⁷⁴⁻²⁷⁸ Mit SignalP 3.0 kann nicht nur die Existenz einer Signalpeptid-Sequenz, sondern auch die

mögliche Spaltstelle vorhergesagt werden.^{278,279} Der 43 Aminosäure lange N-Terminus des rAdeR wurde mit SignalP3.0 analysiert und keine Signal-Sequenz konnte aufgrund eines geringen S-Score von 0,216 vorhergesagt werden (s. Abb. 3.29 A). Jedoch liegt der S-Score zwischen der 11. bis 13. Aminosäure oberhalb 0,5 und zeigt, dass für einen geringen Anteil eine Signalpeptid-Sequenz vorhergesagt wird (s. Abb. 3.29 A). Zum Vergleich wurde für die Sequenz des N-Terminus des mAde2R eine Signalpeptid-Sequenz mit einem S-Score von 0,492 vorhergesagt (s. Abb. 3.29 B).

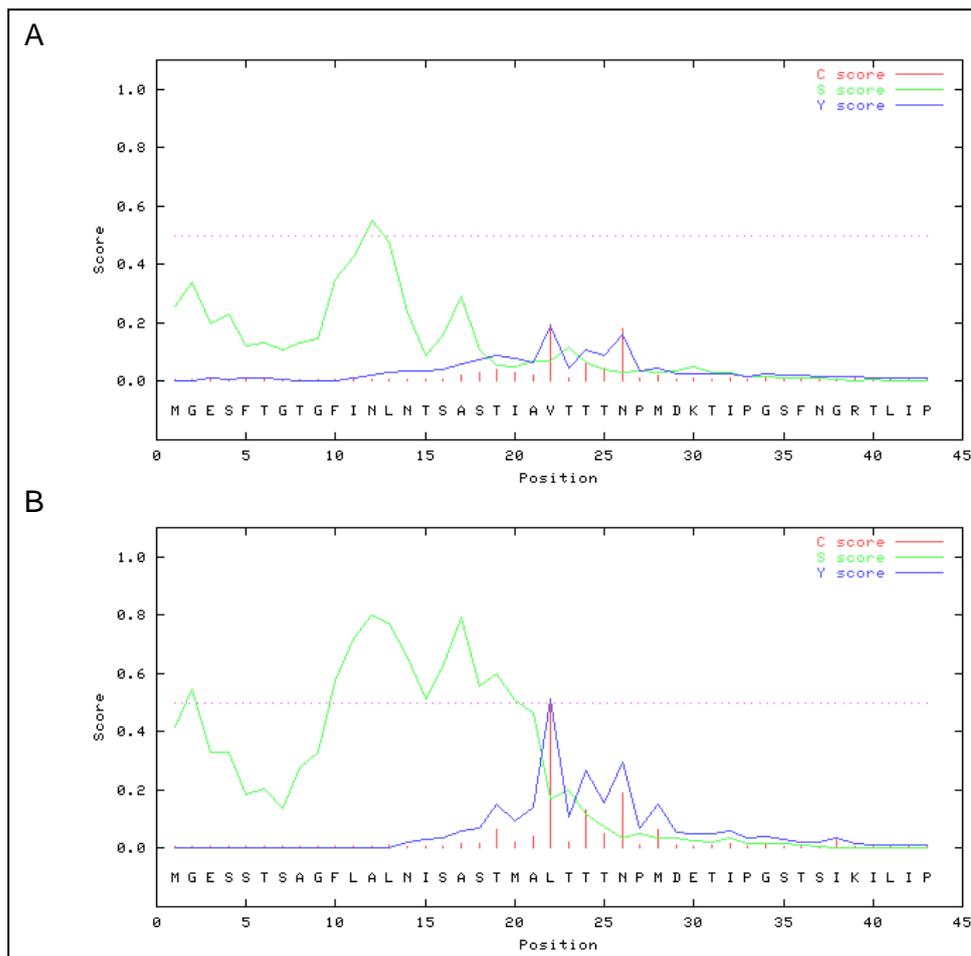


Abb. 3.29: Vorhersage mit SignalP3.0 des N-Terminus des rAdeR (A) und des mAde2R (B)^{278,279}

Der S-Score sagt die Existenz einer Signalpeptid-Sequenz vorher, wohingegen der C-Score die mögliche Spaltstelle angibt. Der Y-Score ist der Quotient aus C-Score kombiniert mit dem S-Score und resultiert in einer besser Vorhersage über die Spaltstelle als der C-Score alleine.

Die mögliche Spaltstelle ist zwischen Alanin in Position 21 und Leucin in Position 22 lokalisiert. Im rAdeR befindet sich an der Position 21 ebenfalls die Aminosäure Alanin, was eventuell die Spaltstelle für die Signalpeptidase sein könnte. Denn um die Spaltstelle befinden sich kleine, neutrale Aminosäuren wie Alanin, Serin und Threonin, so wie in der Literatur beschrieben wurde.^{274,278}

Auch die sich in letzter Sequenz-Position befindende Aminosäure Alanin ist beim rAdeR zu beobachten.²⁷⁶ Bernt Alsdorf konnte bereits in seiner Diplomarbeit zeigen, dass der mAde2R, der mit dem N-Terminus des rAdeR zu 67 % identisch ist, ebenfalls eine Signalpeptid-Sequenz besitzt. Dazu wurden Sf9 mAde2-Lysate, in denen sich vor dem N-Terminus ein GST-Tag befindet, im Western Blotting untersucht. Wenn nur das GST-Tag mit einer Bande bei etwa 22 kDa detektiert wurde, konnte an diesen Membranpräparationen spezifische Bindung des [³H]Adenin gemessen werden. Die Detektion einer ca. 60 kDa großen Bande, bestehend aus GST-Tag und mAde2R, zeigte, dass die Signalpeptid-Sequenz nicht erkannt und das Protein nicht richtig in die Membran eingebaut wurde, wodurch in Radioligand-Bindungsstudien kaum spezifische Bindung bestimmt werden konnte.

Mit dem Western Blot-Verfahren konnte gezeigt werden, dass die ersten 27 Aminosäuren aufgrund ihrer Eigenschaft als Signalpeptid-Sequenz abgespalten werden. Somit dürfte kein Unterschied in den Affinitäten an Sf9 rAde-, Sf9 myc-rAde und Sf9 rAdeΔN-Membranpräparationen in [³H]Adenin-Bindungsstudien beobachtet werden. Zunächst wurden homologe Konkurrenzexperimente mit dem Agonisten Adenin durchgeführt. Die gemessenen IC₅₀-Werte sind in Tab. 3.6 dargestellt.

Tab. 3.6: Affinität des Agonisten Adenin an Sf9 rAde-, Sf9 myc-rAde, Sf9 rAdeΔN und Sf9 myc-rAdeΔN-Membranpräparationen

	[³ H]Adenin-Bindungsstudien		
	IC ₅₀ [nM]	n	P
Sf9 rAde	236 ± 35	7	
Sf9 myc-rAde	211 ± 11	3	ns
Sf9 rAdeΔN	391 ± 100	5	ns
Sf9 myc-rAdeΔN	340 ± 60	4	ns

n: Anzahl der durchgeführten Experimente in Triplikaten; *P*: die Signifikanz wurde mit einem ungepaarten *t*-Test bestimmt; ns: nicht signifikant $P > 0,05$

An Sf9 rAde-Membranpräparationen konnte ein IC₅₀-Wert von 236 ± 35 nM ($n = 7$) und gemessen werden. Kein signifikanter Unterschied konnte an Sf9 myc-rAde-Membranpräparationen (IC₅₀-Wert 211 ± 11 nM, $n = 3$), verglichen mit Sf9 rAde-Membranpräparationen, beobachtet werden. Auch die Mutante, die einen um 27 Aminosäuren verkürzten N-Terminus besitzt, zeigte keinen signifikanten Unterschied zu Sf9 rAde-Membranpräparationen (IC₅₀-Wert 340 ± 60 nM, $n = 4$). Aufgrund der Abspaltung der Signalpeptid-Sequenz zeigen die Sf9 rAde-, Sf9 myc-rAde- und Sf9 rAde ΔN-Membranpräparationen keinen signifikanten Unterschied.

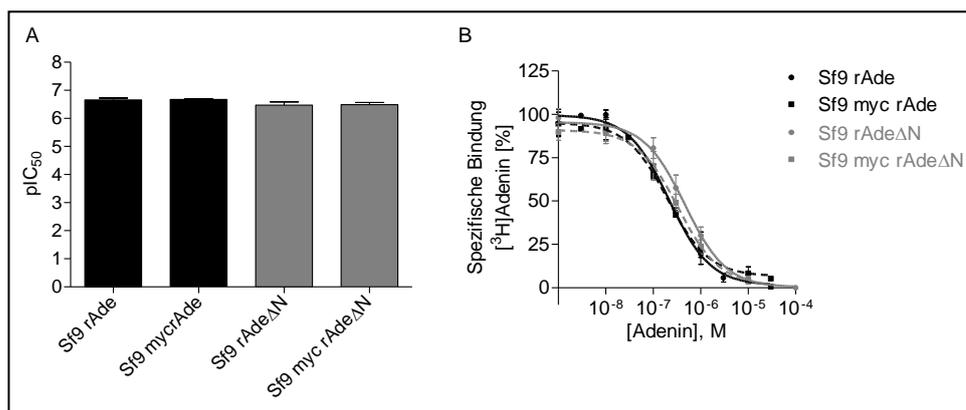


Abb. 3.30: Homologe Konkurrenzexperimente an Sf9 rAde-, Sf9 myc-rAde-, Sf9 rAdeΔN und Sf9 myc-rAdeΔN-Membranpräparationen

A: Balkendiagramm der pIC₅₀-Werte; B: Inhibitionskurven; IC₅₀-Wert (Sf9 rAde) = 236 ± 35 nM; IC₅₀-Wert (Sf9 myc-rAde) = 211 ± 11 nM; IC₅₀-Wert (Sf9 rAdeΔN) = 391 ± 100 nM; IC₅₀-Wert (Sf9 myc-rAdeΔN) = 340 ± 60 nM

Die Untersuchung des Einflusses des *myc*-Tags auf die Bindungsaffinität an Sf9 *myc-rAde*ΔN-Membranpräparationen führte ebenfalls zu keinem signifikanten Unterschied gegenüber Sf9 *rAde*-Membranpräparationen (IC₅₀-Wert 391 ± 100 nM, n = 5). Ein Balkendiagramm der pIC₅₀-Werte und die Inhibitionskurven sind in Abb. 3.30 A und B dargestellt.

Tab. 3.7: Affinität des Antagonisten PSB-08162 an Sf9 rAde-, Sf9 myc-rAde, Sf9 rAdeΔN und Sf9 myc-rAdeΔN-Membranpräparationen

	[³ H]Adenin-Bindungsstudien		
	IC ₅₀ [nM]	n	P
Sf9 rAde	227 ± 16	3	
Sf9 <i>myc-rAde</i>	287 ± 86	3	ns
Sf9 rAdeΔN	327 ± 68	4	ns
Sf9 <i>myc-rAde</i> ΔN	332 ± 62	4	ns

n: Anzahl der durchgeführten Experimente in Triplikaten; P: die Signifikanz wurde mit einem unpaarigen t-Test bestimmt; ns: nicht signifikant P > 0,05

Es wurden auch heterologe Konkurrenzexperimente mit dem Antagonisten PSB-08162 durchgeführt. Die gemessenen IC₅₀-Werte sind in Tab. 3.7 dargestellt. An Sf9 *rAde*-Membranpräparationen konnte ein IC₅₀-Wert von 227 ± 16 nM (n = 3) berechnet werden. Auch an Sf9 *myc-rAde*- (IC₅₀-Wert 287 ± 86 nM, n = 3) und Sf9 *rAde*ΔN-Membranpräparationen (IC₅₀-Wert 327 ± 68 nM, n = 4) konnte kein signifikanter Unterschied, verglichen mit Sf9 *rAde*-Membranpräparationen, beobachtet werden. Denn durch die Abspaltung der ersten 27 Aminosäuren besteht kein Unterschied zwischen den Sf9 *rAde*-, Sf9 *myc-rAde*- und Sf9 *rAde*ΔN-Membranpräparationen. Somit konnte auch mit dem Antagonisten PSB-08162 das in Western Blot-Experimenten erhaltene Ergebnis bestä-

tigt werden. Ebenso konnte an Sf9 *myc-rAde* Δ N-Membranpräparationen ein IC_{50} -Wert von 332 ± 62 nM ($n = 4$) gemessen werden und so gezeigt werden, dass kein Einfluss des *myc*-Tags auf die Affinität des Radioliganden an den Rezeptor besteht. Ein Balkendiagramm der pIC_{50} -Werte und die Inhibitionskurven sind in Abb. 3.31 A und B dargestellt.

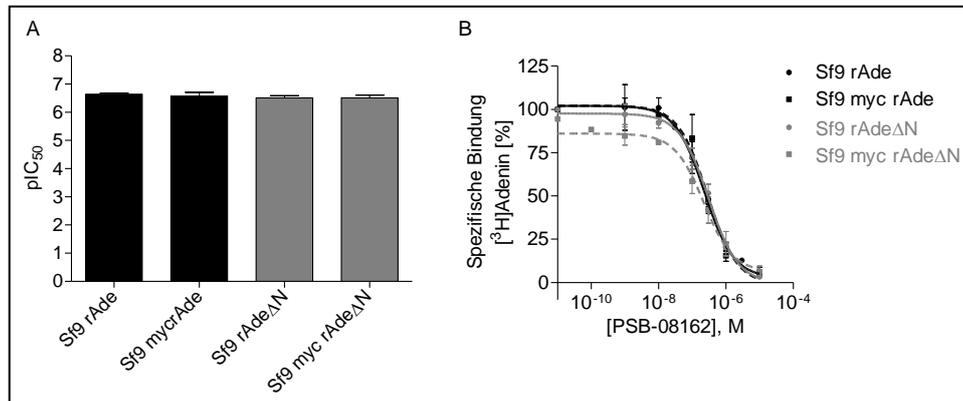


Abb. 3.31: Heterologe Konkurrenzexperimente an Sf9 rAde-, Sf9 myc-rAde-, Sf9 rAde Δ N und Sf9 myc-rAde Δ N-Membranpräparationen

A: Balkendiagramm der pIC_{50} -Werte; B: Inhibitionskurven; IC_{50} -Wert (Sf9 rAde) = 227 ± 16 nM; IC_{50} -Wert (Sf9 myc-rAde) = 287 ± 86 nM; IC_{50} -Wert (Sf9 rAde Δ N) = 327 ± 68 nM; IC_{50} -Wert (Sf9 myc-rAde Δ N) = 332 ± 62 nM

3.2.4 Extrazelluläre Disulfidbrücken

In dem entwickelten rAdeR-Modell wurden keine extrazellulären Disulfidbrücken zwischen Cysteinresten, die für die Stabilisierung des Rezeptors sorgen, vorhergesagt. Um das Modell weiterhin verbessern zu können, sollte die Anwesenheit von extrazellulären Disulfidbrücken experimentell untersucht werden. In der Kristallstruktur des humanen Adenosin- A_{2A} -Rezeptors wurde eine hochkonservierte Disulfidbrücke zwischen dem Cystein 77 der TM3-Helix und dem Cystein 166 der zweiten extrazellulären Schleife beobachtet.²⁵ In der Kristallstruktur des humanen β_2 -adrenergen Rezeptor wurde eine hochkonservierte Disulfidbrücke zwischen dem Cystein 106 der TM3-Helix und dem Cystein 191 der zweiten extrazellulären Schleife gefunden, die die zweite extrazelluläre Schleife mit dem Transmembran-Kern verankert.²⁴ In dem rAdeR befindet sich ein Cystein in Position 113 in der TM3-Helix, wobei sie sehr tief in der Membran liegt und somit eine Ausbildung einer extrazellulären Disulfidbrücke mit dem Cystein 190 der zweiten extrazellulären Schleife eher unwahrscheinlich ist (s. Abb. 3.32). Allerdings konnte im β_2 AR eine weitere Disulfidbrücke in der zweiten extrazellulären Schleife zwischen C184 und C190 beobachtet werden, die der Stabilisierung dieser Schleife dient.²⁴ Im rAdeR wäre diese Disulfidbrücke zwischen dem Cystein in Position 177 und in 190 möglich (s. Abb. 3.32). Allerdings ist das Cystein

177 sehr nah an der TM4-Helix lokalisiert und somit eher schlecht zugänglich für die Ausbildung einer Disulfidbrücke in der zweiten extrazellulären Schleife.

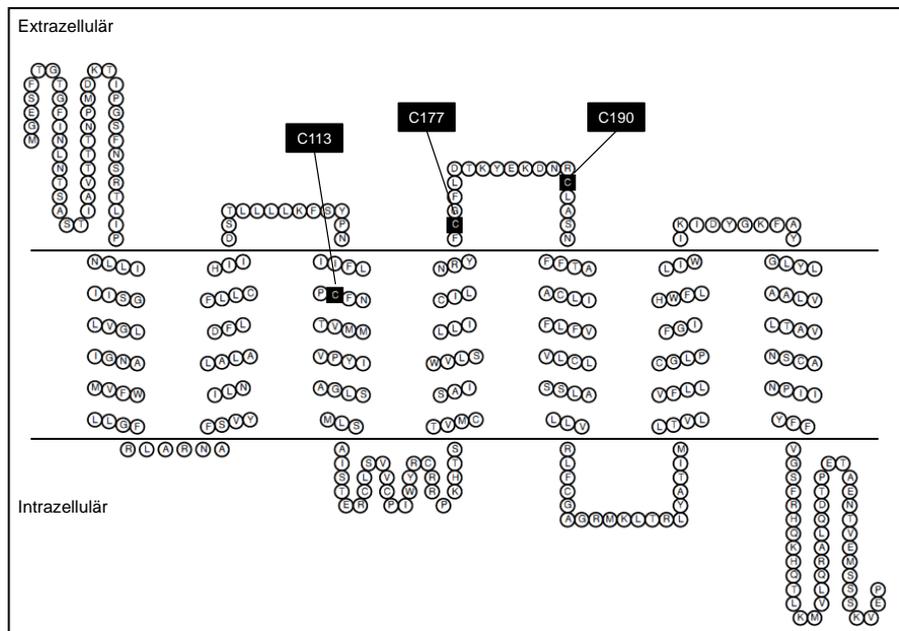


Abb. 3.32: Snake-Plot des rAdeR mit den konservierten Cysteinen, die möglicherweise eine extrazelluläre Disulfidbrücke ausbilden können.

Die Untersuchung der extrazellulären Disulfidbrücken kann in homologen Kompetitionsexperimenten an Sf9 rAde-Membranpräparationen in An- und Abwesenheit von 10 mM Dithiothreitol (DTT) durchgeführt werden. Die zur Stabilisierung der Proteinstruktur ausgebildeten Disulfidbrücken können durch die Zugabe von DTT reduziert und somit zerstört werden, wodurch eine veränderte Affinität von [³H]Adenin an den Rezeptor beobachtet wurde. An Sf9 rAde-Membranpräparationen konnte ein IC₅₀-Wert von 173 ± 34 nM (n = 4) und ein K_i-Wert von 162 ± 32 nM in Abwesenheit von DTT bestimmt werden. Auch in Anwesenheit von 10 mM DTT konnte kein signifikanter Unterschied im IC₅₀-Wert (158 ± 16 nM, n = 4) bzw. K_i-Wert (148 ± 15 nM) gemessen werden (s. Abb. 3.33 A). Somit sind im rAdeR entweder keine extrazellulären Disulfidbrücken zur Stabilisierung der Proteinstruktur vorhanden, wie im rAdeR-Modell vorhergesagt wurde, oder die möglicherweise vorhandenen extrazellulären Disulfidbrücken spielen bei der Bindung des Agonisten keine Rolle. Zur weiteren Untersuchung wurden funktionelle cAMP-Experimente an stabil transfizierten 1321N1-Astrozytomzellen, die den rAdeR exprimieren, durchgeführt. Diese Zelllinie wurde mir freundlicherweise von Dr. Aliaa Abdelrahman zur Verfügung gestellt. Auch in funktionellen cAMP-Experimenten konnte in Abwesenheit von DTT (EC₅₀-Wert 13,3 ± 1,8 nM, n = 4) und Anwesenheit von 10 mM DTT (EC₅₀-Wert 18,0 ± 1,5, n = 4) kein signifikanter Unterschied in den EC₅₀-Werten beobachtet werden (s. Abb. 3.33 B).

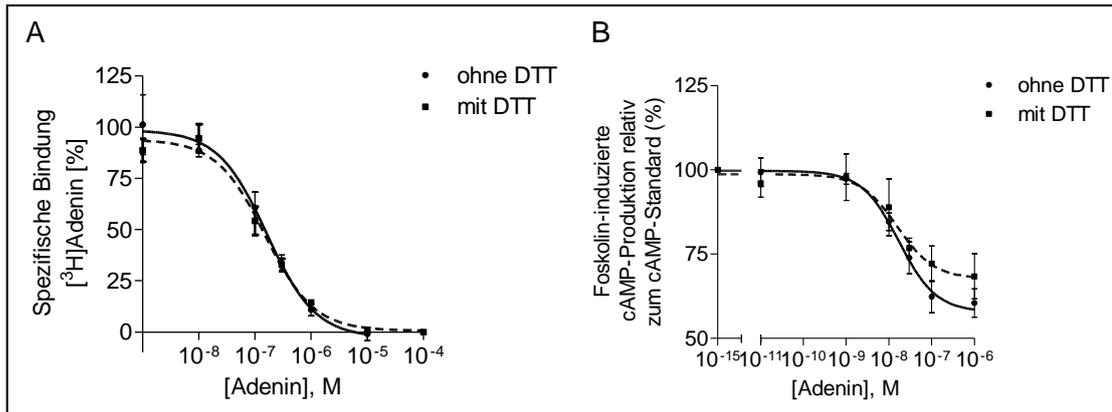


Abb. 3.33: [³H]Adenin-Bindungsstudien an Sf9 rAde-Membranpräparationen (A) und funktionelle cAMP-Experimente an stabil transfizierten 1321N1-Astrozytomzellen, die den rAdeR exprimieren (B), in An- und Abwesenheit von 10 mM DTT

IC_{50} -Wert (Sf9 rAde ohne DTT) = 173 ± 34 nM; K_i = 162 ± 32 nM; IC_{50} -Wert (Sf9 rAde mit DTT) = 158 ± 16 nM; K_i = 148 ± 15 nM; EC_{50} -Wert (ohne DTT) = $13,3 \pm 1,8$ nM; EC_{50} -Wert (mit DTT) = $18,0 \pm 1,5$ nM

Somit konnte weder eine Beeinflussung sowohl der Affinität als auch der Aktivierbarkeit des Rezeptors gezeigt werden, woraus geschlossen wurde, dass keine essentiellen extrazellulären Disulfidbrücken im rAdeR existieren und die Vorhersage des rAdeR-Modells bestätigt werden konnte. Die Ergebnisse aus [³H]Adenin-Bindungsstudien und funktionellen cAMP-Experimenten ist zusammenfassend in Tab. 3.8 dargestellt.

Tab. 3.8: Affinität und Aktivierbarkeit des Agonisten Adenin an Sf9 rAde-Membranpräparationen bzw. stabil transfizierte 1321N1-Astrozytomzellen, die den rAdeR exprimieren, in An- und Abwesenheit von 10 mM DTT

	[³ H]Adenin-Bindungsstudien an Sf9 rAde-Membranpräparationen				cAMP-Experimente an stabil transfizierten 1321N1-Astrozytomzellen, die den rAdeR exprimieren		
	IC_{50} [nM]	K_i [nM]	n	P	EC_{50} [nM]	n	P
ohne DTT	173 ± 34	162 ± 32	4		13,3 ± 1,8	4	
mit 10 mM DTT	158 ± 16	148 ± 15	4	ns	18,0 ± 1,5	4	ns

n: Anzahl der durchgeführten Experimente in Triplikaten; P: die Signifikanz wurde mit einem ungepaarten t-Test bestimmt; ns: nicht signifikant $P > 0,05$

3.2.5 Radioligand-Bindungsstudien

Die Rezeptor-Mutanten wurden zunächst in Radioligand-Bindungsstudien hinsichtlich ihrer Affinität untersucht. Als Testverbindungen wurde zum einen der Agonist Adenin für homologe Konkurrenzexperimente und zum anderen der Antagonist PSB-08162 für heterologe Konkurrenzexperimente verwendet (s.

Abb. 3.34). Weiterhin wurden die Rezeptor-Mutanten in [^{35}S]GTP γ S-Bindungsstudien hinsichtlich ihrer Aktivierbarkeit untersucht. In 3.1.4.2 konnte gezeigt werden, dass die in den Sf9-Insektenzellen natürlich vorkommenden G-Proteine zu keiner aktiven Konformation des rAdeR führen, weshalb für die [^{35}S]GTP γ S-Bindungsstudien Sf9 rAde-Mutanten+G $_{\alpha}$ +G $_{\beta\gamma}$ -Membranpräparationen benötigt wurden. Für die Untersuchung der Ratten-Adenin-Rezeptor-Mutanten wurde die Abkürzung Sf9 rAde-Mutante verwendet. Die Ko-Infektion mit Viren, die die Gensequenz der rAdeR-Mutante, das Gen der G $_{\alpha}$ - und G $_{\beta\gamma}$ -Untereinheit enthalten, werden als Sf9 rAde-Mutante+G $_{\alpha}$ +G $_{\beta\gamma}$ abgekürzt.

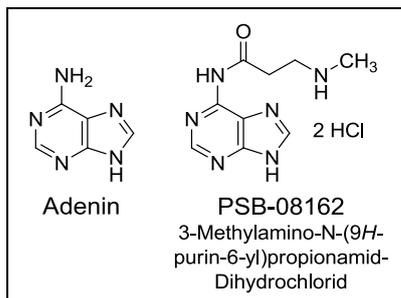


Abb. 3.34: Struktur des Agonisten Adenin und des Antagonisten PSB-08162

3.2.5.1 *Kompetitionsexperimente*

Zur Untersuchung der Rezeptor-Mutanten wurden homologe Kompetitionsexperimente durchgeführt, um die mittlere inhibitorische Konzentration, den IC $_{50}$ -Wert, bestimmen zu können. Ebenso kann daraus der pIC $_{50}$ -Wert, der negativ dekadische Logarithmus des IC $_{50}$ -wertes, berechnet werden, um die Bindungsaffinität einer Testverbindung anzugeben. Je größer der Wert, desto affiner bindet der Ligand an den Rezeptor. An allen Sf9 rAde-Mutanten-Membranpräparationen wurde die spezifische Bindung des Radioliganden [^3H]Adenin gemessen. In keinem Fall wurde ein starker Affinitätsverlust beobachtet. Kein signifikanter Unterschied zum Wildtyp-rAdeR konnte an den Mutanten F110A, F179A, N194 und L201A beobachtet werden. Somit scheint die von Heo *et al.* vorhergesagte Aminosäure F110 nicht für die π -stacking-Wechselwirkung mit dem Purin-Ring von Adenin verantwortlich zu sein.¹⁶⁴ Auch die Ausbildung einer hydrophoben Wechselwirkung zwischen Adenin und der Aminosäure L201 konnte nicht bestätigt werden. Die konservierte Aminosäure F179, die im humanen Adenosin-A $_{2A}$ -Rezeptor eine π -stacking-Wechselwirkung mit dem Purin-Ring von Adenin ausbildet, scheint im rAdeR eher keine Rolle zu spielen. Auch die Mutante N194A zeigte keinen Affinitätsunterschied, verglichen mit dem Wildtyp-rAdeR. Somit scheint die Aminosäure Asparagin, die in dem SNFF-Motiv (193-196) aller Nagetier-Adenin-Rezeptoren vorkommt, keinen Einfluss auf die Bindung des Agonisten Adenin zu zeigen. Dahingegen konnte an Sf9 rAdeF195A-Membranpräparationen eine sehr geringe signifikante Abweichung (reduzierte Affini-

tät) zum Wildtyp-rAdeR beobachtet werden. Diese Mutante F195A befindet sich ebenfalls in dem konservierten SNFF-Motiv (193-196). Vielleicht ist diese Aminosäure indirekt für die π -stacking-Wechselwirkung mit dem Purin-Ring von Adenin verantwortlich. Ebenso konnte ein sehr geringer signifikanter Unterschied an Sf9 rAdeY268A-Membranpräparationen, verglichen mit Sf9 rAde-Membranpräparationen, gezeigt werden. In Dockingstudien am entwickelten rAdeR-Modell war die Aminosäure Y268 in unmittelbarer Nähe ($< 3 \text{ \AA}$) der Adenin-Derivate lokalisiert. Die experimentellen [^3H]Adenin-Bindungsstudien haben gezeigt, dass diese Aminosäure eine indirekt Rolle bei der Bindung von Adenin zu spielen scheint. In der humanen $\beta_2\text{AR}$ -Kristallstrukturen, die von den vorhandenen Strukturen dem rAdeR am ähnlichsten ist und daher als Grundlage für das rAdeR-Modell verwendet wurde, zeigt die analoge Aminosäure Y316 in TM7 eine polare Wechselwirkung mit dem Alkylamin in Carazolol und BI-167107.⁶⁶ Somit könnte die Aminosäure Y268 vielleicht eine H-Brückenbindung mit der Aminstruktur in Position 6 ausbilden oder eine π -stacking-Wechselwirkung mit dem Purin-Ring von Adenin. Allerdings erscheint der Effekt der Mutation dafür zu gering. Ebenfalls konnte eine Rechtsverschiebung der Inhibitionskurve, die mit einem geringem zweieinhalb-fachen Affinitätsverlust einhergeht, an Sf9 rAdeH252A-Membranpräparationen gegenüber dem Wildtyp-rAdeR beobachtet werden. Diese Aminosäure könnte zusammen mit der Aminosäure F195 und eventuell auch Y268 für die π -stacking-Wechselwirkung mit dem Purin-Ring verantwortlich sein. Somit sind eventuell mehrere Aminosäuren an der π -stacking-Wechselwirkung mit dem Purin-Ring von Adenin beteiligt. Für die Ligandbindung entscheidenden Aminosäuren N115 und N173, die H-Brückenbindung zu N1 und N6 bzw. N3 und N9 von Adenin ausbilden könnten, wurde ebenfalls ein Affinitätsverlust gegenüber dem Wildtyp-rAdeR beobachtet (s. Abb. 3.35 B).¹⁶⁴ Somit scheinen diese beiden Aminosäuren N115 und N173, die in der 3D-Struktur des rMrgA-Rezeptors als an der Ligandbindung beteiligt vorhergesagt wurden, möglicherweise eine Rolle für die Bindung des Liganden zu spielen. Jedoch sind die beobachteten Affinitätsverluste bei den Mutanten nur sehr gering ausgeprägt. Somit führt die Mutation der Aminosäuren **F195, Y268, N173, H252 und N115** zu einer reduzierten Affinität für Adenin und könnte indirekt an der Ligandbindung beteiligt sein. Die erhaltenen IC_{50} -Werte der Rezeptor-Mutanten sind in Tab. 3.9 dargestellt. Anhand der aus den homologen Konkurrenzexperimenten errechneten B_{max} -Werte scheint die Expression der jeweiligen Mutanten ähnlich zu sein. Nur die Mutanten F179A und L201A scheinen höher exprimiert zu werden, was sich allerdings nicht auf den IC_{50} -Wert auswirkt. Ein Balkendiagramm der pIC_{50} -Werte und die Inhibitionskurven der Sf9 rAde-Rezeptor-Mutanten, für die eine signifikante Rechtsverschiebung, verglichen zu Sf9 rAde-Membranpräparationen, beobachtet wurde, sind in Abb. 3.35 A und B dargestellt.

Tab. 3.9: Affinität des Agonisten Adenin und des Antagonisten PSB-08162 an Sf9 rAde-Mutanten-Membranpräparationen im Vergleich zu Sf9 rAde-Membranpräparationen

	³ H]Adenin-Bindungsstudien						
	Adenin			B _{max}	PSB-08162		
	IC ₅₀ [nM]	n	P	[pmol/mg Protein]	IC ₅₀ [nM]	n	P
Sf9 rAde	236 ± 35	7		~ 0,093	227 ± 16	3	
Sf9 rAdeF110A	218 ± 53	3	ns	~ 0,089	263 ± 134	4	ns
Sf9 rAdeN115A	689 ± 96	4	***	~ 0,073	344 ± 43	4	**
Sf9 rAdeN173A	397 ± 66	4	***	~ 0,083	316 ± 40	4	*
Sf9 rAdeF179A	270 ± 48	4	ns	~ 2,97	767 ± 83	3	***
Sf9 rAdeN194A	186 ± 19	4	ns	~ 0,092	786 ± 48	3	***
Sf9 rAdeF195A	292 ± 31	4	*	~ 0,088	1384 ± 218	4	***
Sf9 rAdeL201A	206 ± 49	4	ns	~ 2,18	193 ± 24	3	ns
Sf9 rAdeH252A	583 ± 94	4	***	~ 0,075	612 ± 70	3	***
Sf9 rAdeY268A	302 ± 33	4	*	~ 0,087	472 ± 39	5	***

n: Anzahl der durchgeführten Experimente in Triplikaten; *P*: die Signifikanz wurde mit einem ungepaarten *t*-Test bestimmt; *ns*: nicht signifikant $P > 0,05$; * $P < 0,05$; ** $P < 0,01$; *** $P < 0,001$

Die Rezeptor-Mutanten wurden auch in heterologen Konkurrenzexperimenten mit dem Antagonisten PSB-08162 untersucht. Die erhaltenen IC₅₀-Werte der Rezeptor-Mutanten sind in Tab. 3.9 dargestellt. Ebenso wie in homologen Konkurrenzexperimenten konnte kein signifikanter Unterschied der Mutanten F110A und L201A zum Wildtyp-rAdeR beobachtet werden. Diese in der vorhergesagten 3D-Struktur¹⁶⁴ beteiligten Aminosäuren scheinen nicht an der Ligandbindung beteiligt zu sein. Die in der 3D-Struktur¹⁶⁴ vorhergesagten Aminosäuren N115 und N173 sind bei der Antagonist-Bindung ebenfalls nur von geringer Bedeutung. Die vermutete Ausbildung von H-Brückenbindungen zu N1 und N6 bzw. N3 und N9 von Adenin wären zumindest teilweise zu dem Antagonisten PSB-08162 (N115 zu N3 und N9) möglich. Doch aufgrund des geringen Einflusses dieser Mutanten sowohl mit dem Agonisten Adenin als auch mit dem Antagonisten PSB-08162 konnte die Hypothese, die anhand der 3D-Struktur des rMrgA-Rezeptors vorhergesagt wurde, nicht in Radioligand-Bindungsstudien bestätigt werden. An der Mutante Y268A konnte ein zwei-facher Affinitätsverlust, verglichen mit dem Wildtyp-rAdeR, beobachtet werden, was eine weitere Übereinstimmung mit dem entwickelten rAdeR-Modell zeigt. Auch die Aminosäure H252, die in der 3D-Struktur des rMrgA-Rezeptors für die π -stacking-Wechselwirkung mit dem Purin-Ring von Adenin verantwortlich gemacht wird, führt zu einem zweieinhalb-fachen Affinitätsverlust gegenüber dem Wildtyp-rAdeR. Die zum humanen Adenosin-A_{2A}-Rezeptor konservierte Aminosäure F179, für die die gleiche Wechselwirkung beschrieben wurde, zeigt einen signifikant drei-fach geringeren IC₅₀-Wert. Das konservierte SNFF-Motiv (193-196), das sich in allen Nagetier-Adenin-Rezeptoren befindet, führt bei der Bindung des Antagonisten PSB-08162 zu einem geringem Affinitätsverlust. Für die Mutante N194A wurde ein dreieinhalb-facher Affinitätsverlust beobachtet, vergli-

chen mit dem Wildtyp-rAdeR. An Sf9 rAdeF195A-Membranpräparationen konnte sogar ein um das sechs-fache geringerer IC₅₀-Wert von nur 1384 ± 218 nM gemessen werden im Gegensatz zu Sf9 rAde-Membranpräparationen.

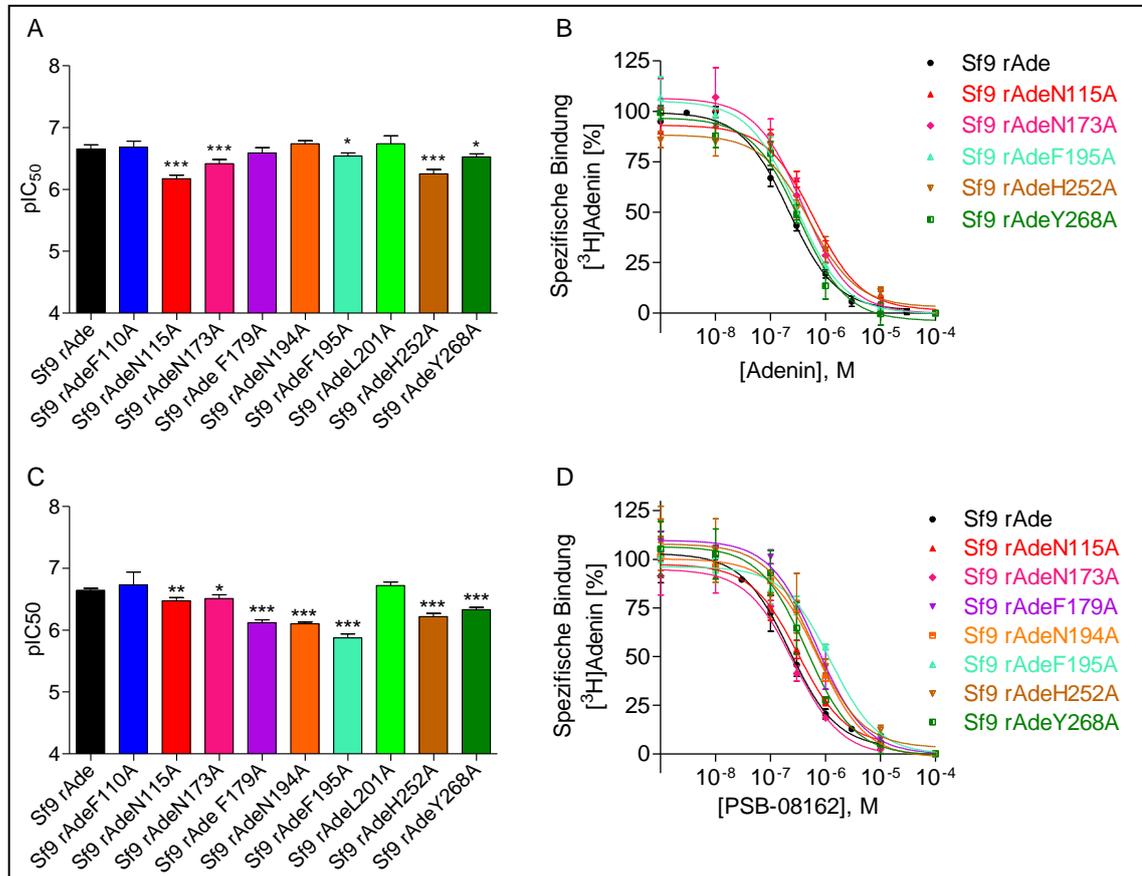


Abb. 3.35: Homologe und heterologe Konkurrenzexperimente an Sf9 rAde- und Sf9 rAde-Mutanten-Membranpräparationen

A und C: Balkendiagramm der pIC₅₀-Werte; B und D: Inhibitionskurven der Sf9 rAde-Mutanten, für die eine signifikante Rechtsverschiebung, verglichen zu Sf9 rAde-Membranpräparationen, beobachtet wurde; die Signifikanz wurde mit einem ungepaarten t-Test bestimmt; * P < 0,05; ** P < 0,01; *** P < 0,001

Somit scheint sich die Rezeptorkonformation des rAdeR bei der Bindung eines Antagonisten zu verändern. Denn es konnten mehr Aminosäuren, **N173**, **N115**, **Y268**, **H252**, **F179**, **N194** und **F195**, im Vergleich zum Agonisten Adenin (F195, Y268, N173, H252 und N115 s. Abb. 3.36) nachgewiesen werden, die einen gewissen Affinitätsverlust zeigen. Aber auch, wie mit dem Agonisten Adenin beobachtet, scheinen sich die Aminosäuren in indirekter Nähe der Bindungstasche zu befinden und üben nicht den Effekt eines drastischen Affinitätsverlustes aus. Ein Balkendiagramm der pIC₅₀-Werte und die Inhibitionskurven der Sf9 rAde-Rezeptor-Mutanten, für die eine signifikante Rechtsverschiebung verglichen zu Sf9 rAde-Membranpräparationen beobachtet wurde, sind in Abb. 3.35 C und D dargestellt.

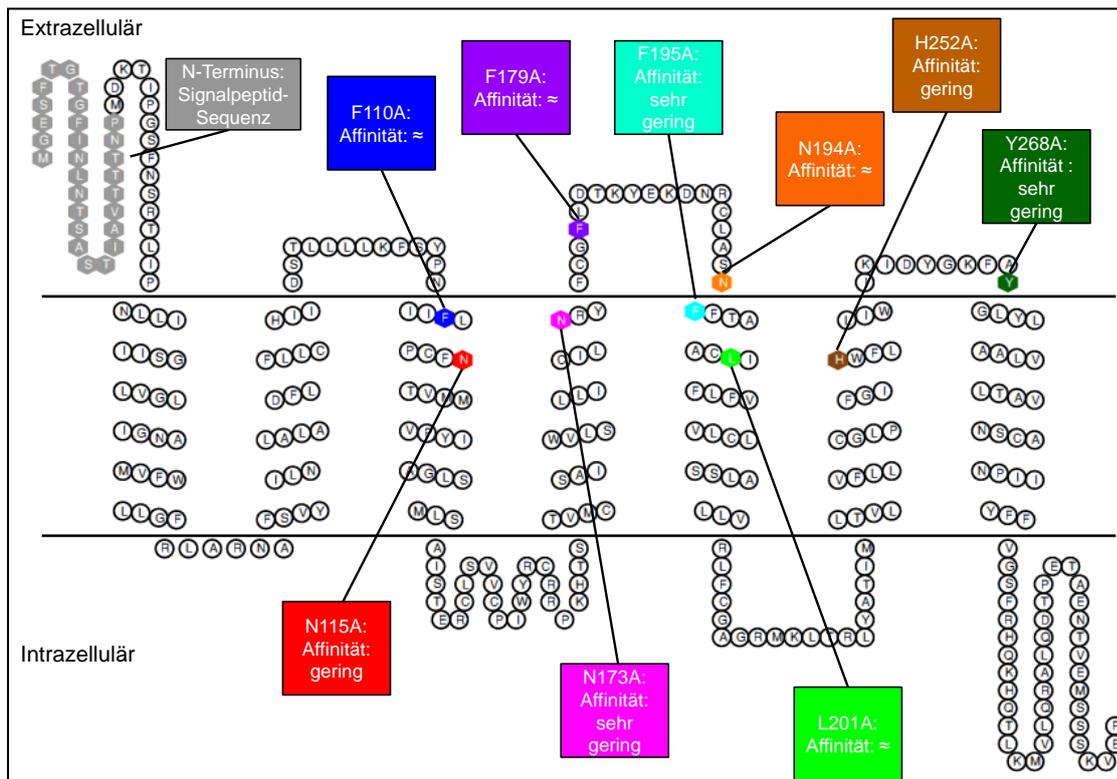


Abb. 3.36: Snake-Plot des rAdeR mit den in Mutagenesestudien erhaltenen Ergebnissen für den Agonisten Adenin

Affinität: ≈: kein signifikanter Unterschied zum Wildtyp-rAdeR; sehr gering: der IC_{50} -Wert wurde um den Faktor 1,2-1,6 erhöht; gering: der IC_{50} -Wert wurde um den Faktor 2,5-3 erhöht

3.2.5.2 $[^{35}\text{S}]\text{GTP}\gamma\text{S}$ -Bindungsstudien

In $[^3\text{H}]\text{Adenin}$ -Bindungsstudien wurde bereits die Affinität der beiden Liganden, Adenin und PSB-08162, an Sf9 rAde-Mutanten-Membranpräparationen untersucht. Aber auch die Möglichkeit der Aktivierbarkeit des rAdeR durch den Liganden Adenin wurde mit $[^{35}\text{S}]\text{GTP}\gamma\text{S}$ -Bindungsstudien überprüft. Dazu wurden Sf9-Insektenzellen mit Viren der rAdeR-Mutante, der $G_{\alpha i2}$ - und $G_{\beta 1\gamma 2}$ -Untereinheit ko-exprimiert und die Sf9 rAde-Mutanten+ G_{α} + $G_{\beta\gamma}$ -Membranpräparationen wurden für $[^{35}\text{S}]\text{GTP}\gamma\text{S}$ -Bindungsstudien verwendet. Denn mit dieser Methode kann die Aktivierbarkeit eines Agonist-gebundenen GPCRs durch die Bindung des nicht-hydrolysierbaren $[^{35}\text{S}]\text{GTP}\gamma\text{S}$ -Analoges an die G_{α} -Untereinheit bestimmt werden.²⁸⁰ Dadurch wird die Untersuchung der G-Protein-Aktivierung ermöglicht, welche der initiale Schritt in der Signaltransduktion ist und das extrazelluläre Signal in eine intrazelluläre Antwort umwandelt.²⁸¹ So können die pharmakologischen Parameter wie die mittlere effektive Konzentration, der EC_{50} -Wert, und der maximale Effekt bzw. die intrinsische Aktivität, der E_{max} -Wert, gemessen werden.²⁸² Nach Austausch von GDP gegen $[^{35}\text{S}]\text{GTP}\gamma\text{S}$ kommt es zur Aktivierung des Rezeptors. Jedoch kann das an die G_{α} -gebundene $[^{35}\text{S}]\text{GTP}\gamma\text{S}$

nicht von der GTPase-Aktivität der G_{α} -Untereinheit hydrolysiert werden, wodurch das G_{α} -gebundene $[^{35}\text{S}]\text{GTP}\gamma\text{S}$ während der Bindungsstudie akkumuliert.²⁸²⁻²⁸⁴ Dadurch verbleibt das G_{α} -gebundene $[^{35}\text{S}]\text{GTP}\gamma\text{S}$ an der Membran und durch Filtration kann die zurückgehaltene Radioaktivität auf den Glasfaserfiltern gemessen werden.^{282,285} Die Zugabe von exogenen GDP zum Inkubationspuffer ist notwendig, um eine optimale Agonist-stimulierende $[^{35}\text{S}]\text{GTP}\gamma\text{S}$ -Bindung zu erhalten. Dadurch können die Nucleotid-ungebundenen Bindungsstellen der G_{α} -Untereinheit mit GDP aufgefüllt und so das Basallevel der $[^{35}\text{S}]\text{GTP}\gamma\text{S}$ -Bindung reduziert werden.²⁸² Auch der Zusatz von Mg^{2+} -Ionen zum Inkubationspuffer ist notwendig, um eine Agonist-stimulierte $[^{35}\text{S}]\text{GTP}\gamma\text{S}$ -Bindung an den GPCR zu beobachten.^{282,286}

An Sf9 rAde-Membranpräparationen konnte keine Aktivierung des rAdeR beobachtet werden (s. Abb. 3.37 A). Dies bestätigt erneut, dass die natürlich in den Sf9-Insektenzellen vorkommenden G-Proteine zu keiner aktiven Rezeptorkonformation führen. Jedoch konnte an Sf9 rAde+ G_{α} + $G_{\beta\gamma}$ -Membranpräparationen für den Agonisten Adenin ein EC_{50} -Wert von 605 ± 79 nM ($n = 5$) in $[^{35}\text{S}]\text{GTP}\gamma\text{S}$ -Bindungsstudien bestimmt werden (s. Abb. 3.37 A).

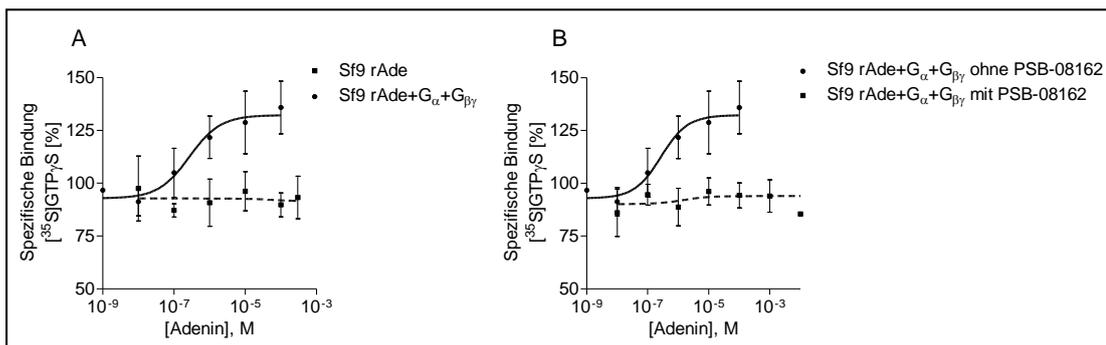


Abb. 3.37: $[^{35}\text{S}]\text{GTP}\gamma\text{S}$ -Bindungsstudien des Agonisten Adenin an Sf9 rAde- und Sf9 rAde+ G_{α} + $G_{\beta\gamma}$ -Membranpräparationen (A) in An- und Abwesenheit von 10 μM PSB-08162 (B)

EC_{50} -Wert (Sf9 rAde+ G_{α} + $G_{\beta\gamma}$) = 605 ± 79 nM

Der erhaltene EC_{50} -Wert weicht um das 10-fache von dem in der Literatur beschriebenen Wert von 62 nM ab.¹³³ Allerdings wurde für die Expression des rAdeR eine andere Zelllinie, CHOK1-Zellen, verwendet. Zum einen kann die Faltung und Modifikation des rAdeR in diesem Zellsystem anders als in den Sf9-Insektenzellen sein und zum anderen konnte in unserer Arbeitsgruppe ein Hamster-Adenin-Rezeptor in CHOK1-Zellen identifiziert werden, wodurch die große Abweichung des EC_{50} -Wertes erklärt werden könnte. In unserer Arbeitsgruppe wurden von Dr. Andrea Behrenswerth $[^{35}\text{S}]\text{GTP}\gamma\text{S}$ -Bindungsstudien mit dem Agonist Adenin an Rattencortex-Membranpräparationen durchgeführt und ein EC_{50} -Wert von 123 ± 12 μM ($n = 3$) bestimmt.²⁸⁷ Diese ebenfalls starke Abweichung könnte daran liegen, dass für die $[^{35}\text{S}]\text{GTP}\gamma\text{S}$ -Bindungsstudien nati-

ves Gewebe verwendet wurde. Zum einen könnten fehlende G-Proteine zur verminderten Aktivierbarkeit des Rezeptors geführt haben oder zum anderen ist die Expression des nativen rAdeR nur gering, gegenüber der hohen Expression des rAdeR in Sf9-Insektenzellen. Ebenfalls wurde der Einfluss des Antagonisten PSB-08162 in [³⁵S]GTPγS-Bindungsstudien untersucht. Dazu wurde der Antagonist in einer Konzentration von 10 μM mit dem Protein, Sf9 rAde+G_α+G_{βγ}-Membranpräparationen, eine Stunde vorinkubiert und anschließend in den Assay eingesetzt. In Anwesenheit des Antagonisten ist keine Aktivierung des rAdeR mehr möglich (s. Abb. 3.37 B). Wie zu erwarten, kann PSB-08162 als Antagonist zwar an den Rezeptor binden, aber keinen Effekt auslösen.

Bei der Untersuchung des Agonisten Adenin an den Sf9 rAde-Mutanten+G_α+G_{βγ}-Membranpräparationen konnten EC₅₀-Werte und der maximale Effekt der spezifischen Bindung von [³⁵S]GTPγS relativ zum Basalwert (= 100 %) bestimmt werden (s. Tab. 3.10). Die aus den homologen [³⁵S]GTPγS-Kompetitions-experimenten errechneten B_{max}-Werte zeigen eine weitestgehende Abhängigkeit mit den EC₅₀-Werten. Es konnte eine gleichwertige Expression der jeweiligen Mutanten beobachtet werden, wie es auch in homologen Konkurrenzexperimenten aus [³H]Adenin-Bindungsstudien gezeigt wurde (s. Tab. 3.9).

Tab. 3.10: Wirksamkeit des Agonisten Adenin an Sf9 rAde-Mutanten+G_α+G_{βγ}-Membranpräparationen im Vergleich zu Sf9 rAde+G_α+G_{βγ}-Membranpräparationen

	[³⁵ S]GTPγS-Bindungsstudien					
	EC ₅₀ [nM]	n	P	B _{max} [pmol/mg Protein]	E _{max} -Wert [% ± SEM]	P
Sf9 rAde+G _α +G _{βγ}	605 ± 79	5		~ 0,251	136 ± 12	
Sf9 rAdeF110A+G _α +G _{βγ}	44 ± 8	3	**	~ 0,075	129 ± 9	ns
Sf9 rAdeN115A+G _α +G _{βγ}	166 ± 52	4	**	~ 0,099	124 ± 11	ns
Sf9 rAdeN173A+G _α +G _{βγ}	131 ± 2	3	**	~ 0,629	146 ± 8	ns
Sf9 rAdeF179A+G _α +G _{βγ}	82 ± 15	3	**	~ 0,083	141 ± 6	ns
Sf9 rAdeN194A+G _α +G _{βγ}					101 ± 2	*
Sf9 rAdeF195A+G _α +G _{βγ}	107 ± 10	3	**	~ 0,087	174 ± 12	ns
Sf9 rAdeL201A+G _α +G _{βγ}					89 ± 5	*
Sf9 rAdeH252A+G _α +G _{βγ}	718 ± 132	3	ns	~ 0,189	146 ± 15	ns
Sf9 rAdeY268A+G _α +G _{βγ}	7082 ± 1220	4	***	~ 2,49	229 ± 20	*

n: Anzahl der durchgeführten Experimente in Triplikaten; P: die Signifikanz wurde mit einem un-gepaarten t-Test bestimmt; ns: nicht signifikant P > 0,05; * P < 0,05; ** P < 0,01; *** P < 0,001; E_{max}-Wert: maximaler Effekt der spezifischen Bindung von [³⁵S]GTPγS relativ zum Basalwert (=100 %)

Die Mutanten **N194A** und **L201A** zeigen keine Rezeptor-Aktivierung mehr (s. Abb. 3.38 D). Der gemessene maximale Effekt der spezifischen Bindung von [³⁵S]GTPγS entspricht daher etwa dem Basalwert (s. Abb. 3.38 C). Die Mutation der Aminosäure N194 und L201 bewirken eine Inaktivierung, zwar kann der

Ligand binden, löst aber keinen Effekt aus. Durch die Identifizierung einiger GPCR-Kristallstrukturen wird für die Rezeptor-Aktivierung eine Auswärts-Bewegung von TM6 und dadurch eine Streckung von TM5 vermutet.^{66,72} Die Aminosäuren sind am Übergang von der zweiten extrazellulären Schleife zur TM5-Helix (N194) und in der oberen Hälfte von TM5 (L201) lokalisiert und scheinen einen Einfluss auf die Konformationsänderung zum aktiven Zustand zu besitzen. Jedoch haben die beiden Mutanten N194A und L201A in [³H]Adenin-Bindungsstudien mit dem Agonisten Adenin keinen Affinitätsunterschied gezeigt, wodurch die Bindung des Liganden von den Mutanten nicht beeinflusst wird. Die Rezeptor-Mutante H252A, die in [³H]Adenin-Bindungsstudien einen geringen Affinitätsverlust, verglichen mit dem Wildtyp-rAdeR gezeigt hat, besitzt hingegen keinen Einfluss auf die Aktivierbarkeit des Rezeptors. Somit kann für die Aminosäure H252 lediglich ein geringer Einfluss in der Affinität beobachtet werden. An Sf9 rAdeY268A+G_α+G_{βγ}-Membranpräparationen konnte ein 11-facher Verlust der Aktivierbarkeit (7082 ± 1220 nM, n = 4) mit einer deutlichen Rechtsverschiebung der Kurve gezeigt werden (s. Abb. 3.38 B). Auch konnte für diese Mutante die höchste Expression beobachtet werden. Es konnte auch ein höherer maximaler Effekt der spezifischen Bindung von [³⁵S]GTPγS gefunden werden (s. Abb. 3.38 C). In [³H]Adenin-Bindungsstudien konnte ein sehr geringer Affinitätsverlust beobachtet werden. Somit scheint diese Mutante **Y268A** nicht nur einen indirekten Einfluss auf die Affinität, sondern auch auf die Aktivierbarkeit des rAdeR einen Einfluss zu nehmen, was ebenfalls durch Dockingstudien an dem rAdeR-Modell bereits vermutet worden war. Die Aminosäure ist in der dritten extrazellulären Schleife nahe der TM7 lokalisiert. Im Gegensatz dazu konnte ein geringerer EC₅₀-Wert mit den Rezeptor-Mutanten **F110A**, **N115A**, **N173A**, **F179A** und **F195A** bestimmt werden, was in einer deutlichen Linksverschiebung der Kurve beobachtet wurde (s. Abb. 3.38 B). Die Mutante F110A zeigte in [³H]Adenin-Bindungsstudien keinen Einfluss auf die Affinität und damit konnte keine Beteiligung an der Ligandbindung gefunden werden. Jedoch führt die Mutation zu einem 13-fach geringeren EC₅₀-Wert und somit scheint diese Mutante F110A an der Konformationsänderung beteiligt zu sein. An den anderen Rezeptor-Mutanten N115A, N173A und F195A konnte hingegen ein geringer Affinitätsverlust in [³H]Adenin-Bindungsstudien gezeigt werden. Somit sind diese Aminosäuren im indirekten Maße an der Ligandbindung beteiligt und führen wie F110 zu einem geringeren EC₅₀-Wert. Ein vier- bzw. fünf-fach geringerer EC₅₀-Wert konnte für die beiden Asparaginreste in Position 115 und 173 gemessen werden (s. Abb. 3.38 A und B). Aber auch die Mutante F179A zeigt einen siebeneinhalb-fachen geringeren EC₅₀-Wert im Gegensatz zum Wildtyp-rAdeR. Ebenso wurde für die Mutante F195A ein um das sechsfach geringerer EC₅₀-Wert gemessen. Ein Balkendiagramm der pIC₅₀-Werte und die Kurven der Sf9 rAde-Rezeptor-Mutanten, für die eine signifikante Links- bzw. Rechtsverschiebung verglichen zu Sf9 rAde+G_α+G_{βγ}-Membranpräpara-

tionen beobachtet wurde, sind in Abb. 3.38 A und B dargestellt. Zusätzlich ist ein Balkendiagramm mit dem maximalen Effekt der spezifischen [35 S]GTP γ S-Bindung abgebildet (s. Abb. 3.38 C).

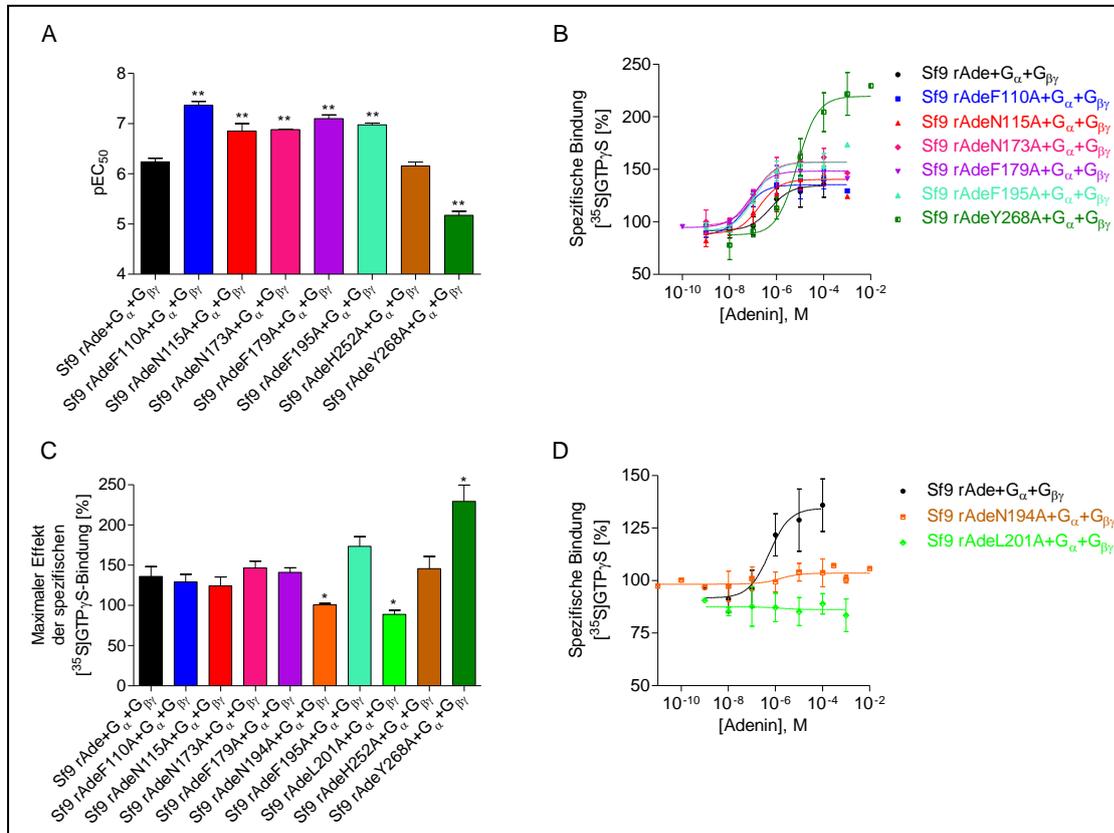


Abb. 3.38: [35 S]GTP γ S-Bindungsstudien des Agonisten Adenin an Sf9 rAde-Mutanten+G α +G $\beta\gamma$ -Membranpräparationen

A: Balkendiagramm der pIC₅₀-Werte; B: Wirksamkeitskurven an Sf9 rAde-Mutanten+G α +G $\beta\gamma$ -Membranpräparationen, für die eine signifikante Rechts- bzw. Linksverschiebung verglichen mit Sf9 rAde+G α +G $\beta\gamma$ -Membranpräparationen beobachtet wurde; C: Balkendiagramm des maximalen Effekts der spezifischen Bindung von [35 S]GTP γ S relativ zum Basalwert (=100 %); D: keine Aktivierung der Sf9 rAde N194A+G α +G $\beta\gamma$ - und Sf9 rAdeL201A+G α +G $\beta\gamma$ -Membranpräparationen, verglichen mit Sf9 rAde+G α +G $\beta\gamma$ -Membranpräparationen; die Signifikanz wurde mit einem ungepaarten t-Test bestimmt; * P < 0,05; ** P < 0,01; *** P < 0,001

Damit konnte experimentell die Beteiligung der in der 3D-Struktur von Heo *et al.* vorhergesagten Aminosäuren, die für die Bindung von Adenin von Bedeutung sein sollen, zum Teil widerlegt werden.¹⁶⁴ Denn die Aminosäure F110 besitzt keine Beteiligung an der Bindung, sondern zeigt vielmehr einen Effekt auf die Aktivierbarkeit des Rezeptors. Für die beiden Asparaginreste in Position 115 und 173 konnten lediglich geringe Affinitätsverluste gefunden werden. Auch die Aminosäure L201 zeigt keine Beteiligung an der Bindung, sondern führte zu einem Verlust der Aktivierbarkeit des Rezeptors und spielt somit in der Konformationsänderung hin zum aktiven Zustand eine Rolle. Die Aminosäure H252 scheint vielmehr indirekt an der Ligandbindung beteiligt und zeigt keinen Unter-

schied in der Aktivierbarkeit des Rezeptors im Vergleich zum Wildtyp-rAdeR. Für diese Aminosäure wurde zusammen mit F110 eine π -stacking-Wechselwirkung mit dem Purin-Ring von Adenin postuliert, was jedoch nicht bestätigt werden konnte.¹⁶⁴ Allerdings kann festgestellt werden, dass die vorhergesagte Bindungstasche der 3D-Struktur des rMrgA-Rezeptors¹⁶⁴ nicht mit der des rAdeR übereinstimmt. Ein Homologie-Modell des mMrgC11-Rezeptors wurde als Vorlage zur Erstellung der 3D-Struktur des rMrgA-Rezeptors verwendet. Dafür diente die Kristallstruktur des Frosch-Rhodopsin-Rezeptors als Grundlage. Jedoch ist die Sequenzidentität des rMrgA-Rezeptors zum mMrgC11 gerade mal 49 %, was die experimentellen Abweichungen zu der Vorhersage erklären könnte. Das in unserer Arbeitsgruppe entwickelte rAdeR-Modell hat eine Beteiligung der Aminosäure Y268 vorhergesagt, was auch experimentell mit einer möglicherweise indirekten Beteiligung an der Ligandbindung und in einem Verlust der Aktivierbarkeit des Rezeptors beobachtet werden konnte. Das rAdeR-Modell basiert auf der Grundlage des humanen β_2 AR, für den mittlerweile auch eine aktive Konformation beschrieben wurde.^{66,72} Somit besteht die Möglichkeit, ein Modell der aktiven Konformation des rAdeR zu erstellen.

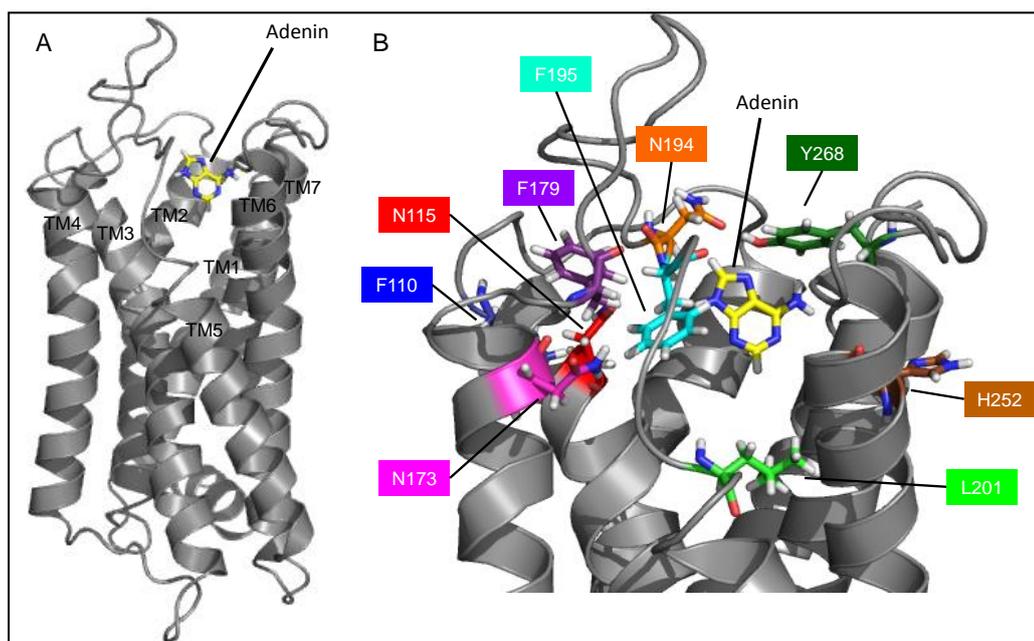


Abb. 3.39: Modell des rAdeR, das mit freundlicherweise von Dr. Anke Schiedel zur Verfügung gestellt wurde

A: Modell des rAdeR mit dem Agonisten Adenin; B: Ausschnitt der putativen Adenin-Bindungstasche; blau markiert: Stickstoffatom; rot markiert: Sauerstoffatom; weiß markiert: Wasserstoffatom

Das rAdeR-Modell des inaktiven Zustands ist in Abb. 3.39 mit einem Ausschnitt der putativen Adenin-Bindungstasche dargestellt. Nach dem Modell sind die Aminosäuren F110, N173, F179 und L201 nicht direkt an der Ligandbindung beteiligt. Die für die Aktivierbarkeit des Rezeptors verantwortliche Aminosäure

L201 zeigt wahrscheinlich keine direkte Interaktion aufgrund der extrem kurzen TM5-Helix. Dahingegen befindet sich die ebenfalls zu einem kompletten Verlust der Aktivierbarkeit führende Aminosäure N194 in der zweiten extrazellulären Schleife nahe der TM5-Helix und könnte eine H-Brücke mit z. B. N7 von Adenin ausbilden. Auch die vorhergesagte H-Brücke von N115 zu N3 und N9 von Adenin wird mit dem rAdeR-Modell vorhergesagt. Der Rest der Aminosäure H252 steht nach außen und im Modell müsste die TM6-Helix eigentlich gedreht sein, um den geringen Affinitätsverlust erklären zu können. Die Aminosäure F195 und Y268 könnten nach dem Modell eine H-Brücke zu Adenin oder eine π -stacking-Wechselwirkung mit dem Purin-Ring ausbilden.

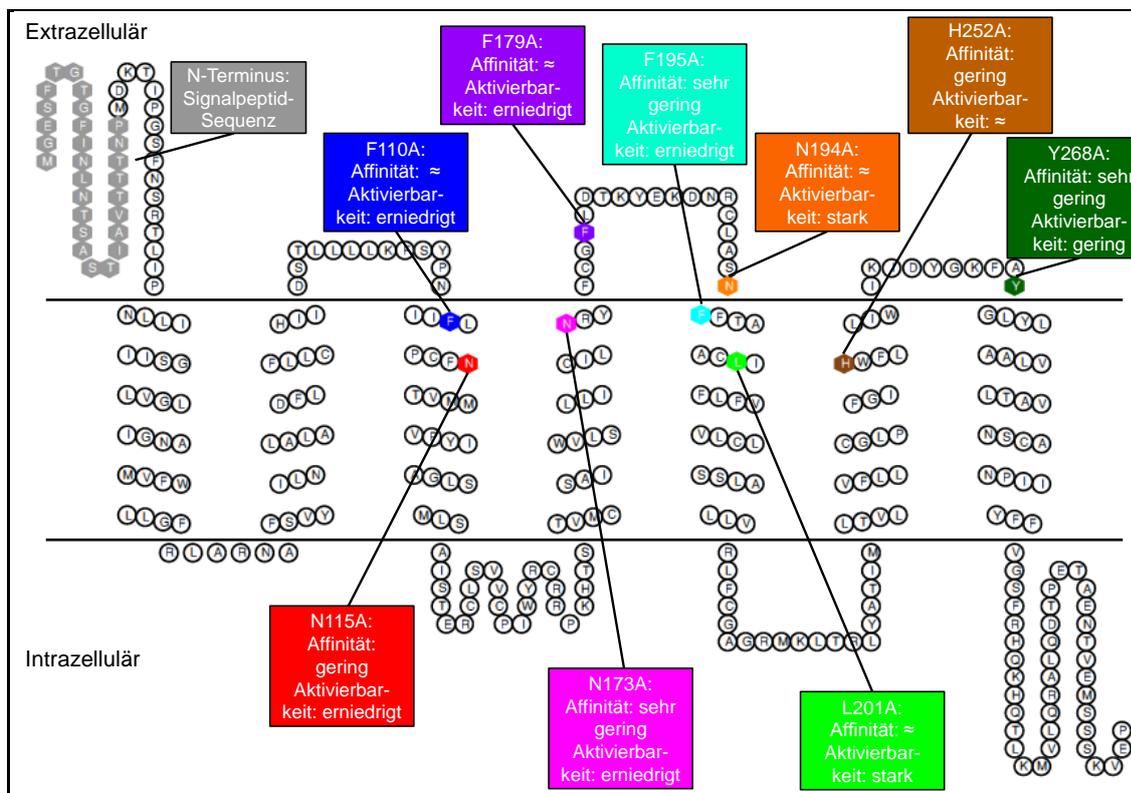


Abb. 3.40: Snake-Plot des rAdeR mit den in Mutagenesestudien erhaltenen Ergebnissen für den Agonisten Adenin

Affinität: \approx : kein signifikanter Unterschied zum Wildtyp-rAdeR; sehr gering: der IC_{50} -Wert wurde um den Faktor 1,2-1,6 erhöht; gering: der IC_{50} -Wert wurde um den Faktor 2,5-3 erhöht;

Aktivierbarkeit: \approx : kein signifikanter Unterschied zum Wildtyp-rAdeR; gering: der EC_{50} -Wert wurde um den Faktor 11 erhöht; stark: keine Aktivierbarkeit mehr; erniedrigt: der EC_{50} -Wert wurde um den Faktor 3-13 erniedrigt

Somit liefern die erhaltenen Ergebnisse, die in Abb. 3.40 dargestellt sind, interessante Einblicke für den rAdeR und können genutzt werden, um das rAdeR-Modell weiterführend zu optimieren. Denn es wird auch weiterhin äußerst schwierig sein anhand eines Modells die Ligand-Bindungstasche eines solch kleinen Moleküls wie Adenin vorherzusagen.

3.2.6 Western Blotting

Das Western Blot-Verfahren konnte bereits genutzt werden, um die Proteinexpression des rAdeR und die Expression der G_{α} - sowie $G_{\beta\gamma}$ -Proteine in Sf9-Insektenzellen zu analysieren (s. 3.1.6).

3.2.6.1 Expressionsuntersuchung

In 3.1.4.2 konnte gezeigt werden, dass die in den Sf9-Insektenzellen natürlich vorkommenden G-Proteine zu keiner aktiven Konformation des rAdeR führten, weshalb für die [35 S]GTP γ S-Bindungsstudien Sf9 rAde-Mutanten+ G_{α} + $G_{\beta\gamma}$ -Membranpräparationen benötigt wurden. Dazu wurden Sf9-Insektenzellen mit Viren der rAdeR-Mutante, der $G_{\alpha i2}$ - und $G_{\beta 1\gamma 2}$ -Untereinheit ko-exprimiert. Zum einen soll daher durch Western Blotting die Proteinexpression der rAdeR-Mutante und zum anderen die Expression der G_{α} - und $G_{\beta\gamma}$ -Proteine untersucht werden. Ein Western Blot-Experiment mit dem Nagetier-spezifischen rAde-405 Antikörper (1 : 5000 Verdünnung), der gegen das Ende des C-Terminus des rAdeR gerichtet ist, diente zur Untersuchung der Proteinexpression der rAdeR-Mutanten in den Membranpräparationen (s. 3.1.6.1). Als Sekundär-Antikörper wurde der HRP-gekoppelte Anti-Kaninchen-Antikörper in einer 1 : 5000 Verdünnung verwendet.

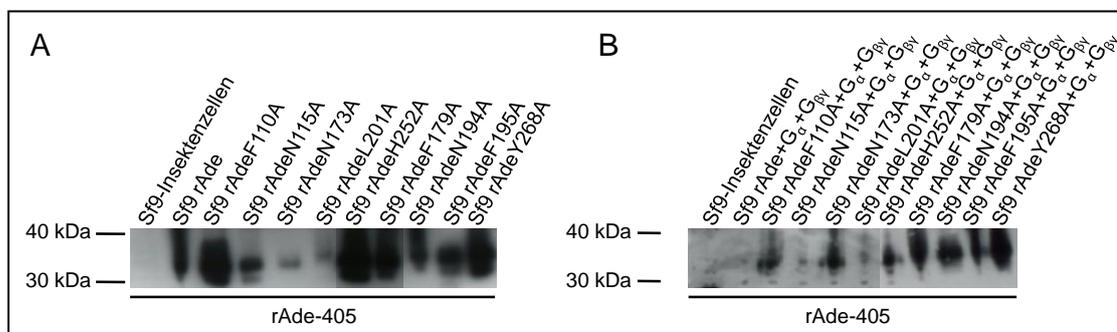


Abb. 3.41: Western Blot-Experiment zur Untersuchung der Proteinexpression der rAdeR-Mutanten (je 30 μ g) in Sf9-Insektenzellen mit dem Nagetier-spezifischen rAde-405 Antikörper

A: Western Blot an Sf9 rAde und Sf9 rAde-Mutanten-Membranpräparationen; B: Western Blot an Sf9 rAde+ G_{α} + $G_{\beta\gamma}$ - und Sf9 rAde-Mutanten+ G_{α} + $G_{\beta\gamma}$ -Membranpräparationen; rAde-405: 1 : 5000 Verdünnung des Antikörpers

An Sf9-Zelllysaten (30 μ g) konnte keine Bande detektiert werden. Im Gegensatz dazu konnte an Sf9 rAde-, Sf9 rAde-Mutanten-, Sf9 rAde+ G_{α} + $G_{\beta\gamma}$ - und Sf9 rAde Mutanten+ G_{α} + $G_{\beta\gamma}$ -Membranpräparationen (je 30 μ g) eine Bande bei etwa 36 kDa detektiert werden (s. Abb. 3.41). Somit konnte die Expression der rAdeR-Mutanten, die in den [3 H]Adenin- und [35 S]GTP γ S-Bindungsstudien verwendet wurden, nachgewiesen und die erhaltenen Ergebnisse können auf die

Mutation im rAdeR zurück geführt werden. An Sf9 rAdeN173A- und Sf9 rAdeL201A-Lysaten wurde eine schwächere Intensität der Banden beobachtet, was eventuell auf eine geringere Expression der Mutante schließen lässt. Jedoch könnte dies anhand der aus homologen Konkurrenzexperimenten ermittelten B_{\max} -Werte nicht für die Mutante N173A, aber für die Mutante L201A zutreffen (s. Tab. 3.9). Die Mutanten N115A und L201A wurden in Anwesenheit der G-Proteine scheinbar ebenfalls etwas geringer exprimiert aufgrund der schwächeren Intensität der Bande. Jedoch bestätigten die aus den homologen Konkurrenzexperimenten erhaltenen B_{\max} -Werte diese Vermutung nicht (s. Tab. 3.10).

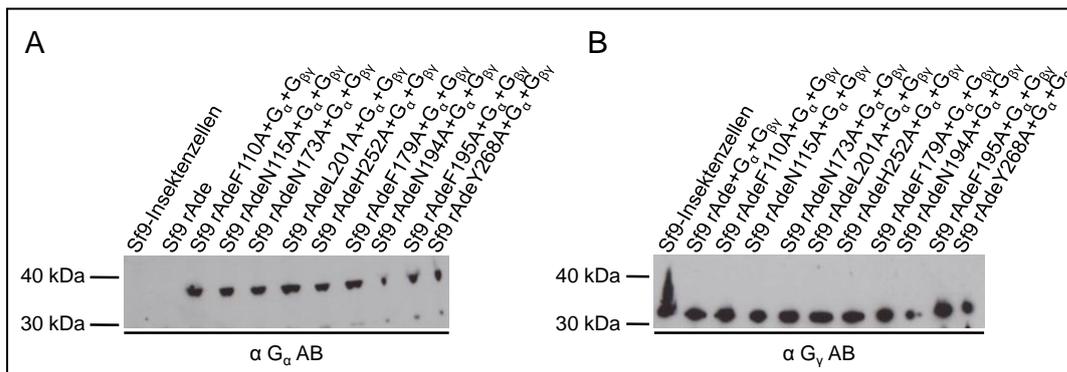


Abb. 3.42: Western Blot-Experiment zur Untersuchung der Anwesenheit von G_{α} - und $G_{\beta\gamma}$ -Proteinen in $30 \mu\text{g}$ Sf9-Insektzelllysaten, $50 \mu\text{g}$ Sf9 rAde- und $50 \mu\text{g}$ Sf9 rAde-Mutanten+ G_{α} + $G_{\beta\gamma}$ -Lysaten

A: Western Blot mit einem gegen die $G_{\alpha 1}$ - und $G_{\alpha 2}$ -Untereinheit gerichteten polyklonalen Antikörper; B: Western Blot mit einem gegen die $G_{\gamma 2}$ -Untereinheit gerichteten polyklonalen Antikörper; αG_{α} AB: 1 : 1000 Verdünnung des Antikörpers gegen die $G_{\alpha 1}$ - und $G_{\alpha 2}$ -Untereinheit; αG_{γ} AB: 1 : 2000 Verdünnung des Antikörpers gegen die $G_{\gamma 2}$ -Untereinheit

Mit dem Western Blot-Verfahren kann ebenfalls die Expression der G_{α} - und $G_{\beta\gamma}$ -Proteine analysiert werden (s. 3.1.6.2). Ein Western Blot-Experiment mit den Antikörpern gegen die $G_{\alpha 1}$ - und $G_{\alpha 2}$ - (1 : 1000 Verdünnung) sowie die $G_{\gamma 2}$ -Untereinheit (1 : 2000 Verdünnung) diente zur Untersuchung der Proteinexpression der beiden G-Proteine in den Membranpräparationen. Als Sekundär-Antikörper wurde ebenfalls der HRP-gekoppelter Anti-Kaninchen-Antikörper in einer 1 : 5000 Verdünnung verwendet. Mit den gegen die $G_{\alpha 1}$ - und $G_{\alpha 2}$ -Untereinheit gerichteten polyklonalen Antikörpern konnte in Sf9-Insektzelllysaten ($30 \mu\text{g}$) und Sf9 rAde-Lysaten ($50 \mu\text{g}$), die als Positiv-Kontrolle dienten, keine Banden detektiert werden. Jedoch zeigten sich mit den Sf9 rAde-Mutanten+ G_{α} + $G_{\beta\gamma}$ -Membranpräparationen ($50 \mu\text{g}$) eine Bande bei ca. 36 kDa, wodurch die Expression der G_{α} -Untereinheit nachgewiesen werden konnte (s. Abb. 3.42 A). Mit dem gegen die $G_{\gamma 2}$ -Untereinheit gerichteten polyklonalen Antikörper konnten in Sf9-Insektzelllysaten ($30 \mu\text{g}$) eine Bande bei ca. 30 kDa detektiert werden, wodurch dieser Antikörper auch die natürlich vorkommende G_{γ} -Unterein-

heit in den Sf9-Insektenzellen erkennt (s. 3.1.6.2). Aber auch an 50 µg Sf9 rAde+G_α+G_{βγ}- und 50 µg Sf9 rAde-Mutanten+G_α+G_{βγ}-Membranpräparationen konnte diese Bande gefunden werden (s. Abb. 3.42 B). Somit konnte ebenfalls die Expression der G-Proteine, die eine Aktivierung des rAdeR ermöglichen, nachgewiesen und die erhaltenen Ergebnisse der [³⁵S]GTPγS-Bindungsstudien können auf die Mutation im rAdeR zurück geführt werden.

3.2.7 Zusammenfassung und Ausblick

Die folgenden neun Mutationen des rAdeR wurden hergestellt: F110A, N115A, N173A, L201A, H252A, F179A, N194A, F195A und Y268A. In Western Blot-Experimenten konnte gezeigt werden, dass sowohl der Ratten-Adenin-Rezeptor als auch die G-Proteine in den untersuchten Membranpräparationen exprimiert wurden und somit die erhaltenen Ergebnisse auf die Mutationen zurück zu führen sind. Zur Charakterisierung der rAdeR-Mutanten wurden [³H]Adenin- und [³⁵S]GTPγS-Bindungsstudien durchgeführt. Diese Ergebnisse sind zusammenfassend in Tab. 3.11 dargestellt.

Tab. 3.11: Zusammenfassung der Ergebnisse aus [³H]Adenin- und [³⁵S]GTPγS-Bindungsstudien zur Charakterisierung der rAdeR-Mutanten

	[³ H]Adenin-Bindungsstudien				[³⁵ S]GTPγS-Bindungsstudien			
	Adenin IC ₅₀ [nM]	P	PSB-08162 IC ₅₀ [nM]	P	Adenin EC ₅₀ [nM]	P	E _{max} -Wert [% ± SEM]	P
Wildtyp	236 ± 35		227 ± 16		605 ± 79		136 ± 12	
F110A	218 ± 53	ns	263 ± 134	ns	44 ± 8	**	129 ± 9	ns
N115A	689 ± 96	***	344 ± 43	**	166 ± 52	**	124 ± 11	ns
N173A	397 ± 66	***	316 ± 40	*	131 ± 2	**	146 ± 8	ns
F179A	270 ± 48	ns	767 ± 83	***	82 ± 15	**	141 ± 6	ns
N194A	186 ± 19	ns	786 ± 48	***			101 ± 2	*
F195A	292 ± 31	*	1384 ± 218	***	107 ± 10	**	174 ± 12	ns
L201A	206 ± 49	ns	193 ± 24	ns			89 ± 5	*
H252A	583 ± 94	***	612 ± 70	***	718 ± 132	ns	146 ± 15	ns
Y268A	302 ± 33	*	472 ± 39	***	7082 ± 1220	***	229 ± 20	*

P: die Signifikanz wurde mit einem ungepaarten *t*-Test bestimmt; ns: nicht signifikant $P > 0,05$; * $P < 0,05$; ** $P < 0,01$; *** $P < 0,001$; E_{max}-Wert: maximaler Effekt der spezifischen Bindung von [³⁵S]GTPγS relativ zum Basalwert (= 100 %)

In [³H]Adenin-Bindungsstudien mit dem Agonisten Adenin zeigten die Mutanten F195A, Y268A und N173A nur einen sehr geringen, die Mutanten H252A und N115A einen geringen signifikanten Unterschied in der Affinität des Radioliganden an die jeweilige rAdeR-Mutante im Gegensatz zum Wildtyp-rAdeR. Jedoch scheinen die Aminosäuren nicht direkt an der Bindung beteiligt zu sein, da sie

keinen drastischen Affinitätsverlust bewirken. Die postulierten Modelle zur Bindung des Adenins im Rezeptor konnten nicht bestätigt werden.

In [³⁵S]GTPγS-Bindungsstudien zeigten die Mutanten N194A und L201A keine Aktivierbarkeit des Rezeptors mehr. Diese Aminosäuren sind in der oberen Hälfte von TM5 bzw. am Übergang vom EL2 zu TM5 lokalisiert. Sie scheinen eine wichtige Rolle bei der Konformationsänderung zu spielen, die zur Aktivierung des Rezeptors führt. An Sf9 rAdeY268A+G_α+G_{βγ}-Membranpräparationen konnte ein 11-fach höherer EC₅₀-Wert im Vergleich zum Wildtyp-rAdeR nachgewiesen werden. Zusätzlich wurde ein höherer maximaler Effekt der spezifischen Bindung von [³⁵S]GTPγS gefunden. Somit scheint die Mutante Y268A nicht nur indirekt an der Affinität, sondern auch an der Aktivierbarkeit des rAdeR beteiligt, was durch Dockingstudien an dem rAdeR-Modell bestätigt wurde. Die Rezeptor-Mutanten F110A, N115A, N173A, F179A und F195A zeigten einen geringeren EC₅₀-Wert und scheinen daher entscheidend für die Konformationsänderung hin zum aktiven Zustand verantwortlich zu sein. Durch weitere Mutagenese-Studien könnte der Rezeptor hinsichtlich der Bindungstasche sowie der Konformationsänderung weiter charakterisiert werden, um so das rAdeR-Modell weiter validieren und optimieren zu können. Für die Aktivierung des humanen β₂ARs wurde eine Umlagerung der konservierten Aminosäuren W^{6.48} und F^{6.44} in Richtung zu L^{5.51} und P^{5.50} sowie I/L^{3.40} weg von P^{5.50} beschrieben, was zu einer Umlagerung von TM3, TM5 und TM6 führt.⁶⁸ Nach einem Vergleich dieser Aminosäuren mit dem rAdeR wäre die Mutation folgender Aminosäuren äußerst interessant: V118 und V120 in TM3, V206 und L208 in TM5, F249 und W253 in TM6.

In [³H]Adenin-Bindungsstudien mit dem Antagonisten PSB-08162 zeigten die Mutanten N173A, N115A, Y268A, H252A, F179A, N194A und N195A einen signifikanten Unterschied in der Affinität des Radioliganden an die rAdeR-Mutanten im Gegensatz zum Wildtyp-rAdeR. Somit scheint sich die Rezeptorkonformation des rAdeR bei der Bindung des Antagonisten zu verändern. Denn es konnten mehr Aminosäuren, N173, N115, Y268, H252, F179, N194 und F195, im Gegensatz zum Agonisten Adenin (F195, Y268, N173, H252 und N115) nachgewiesen werden, die einen gewissen Affinitätsverlust zeigen.

Darüber hinaus konnte durch Western Blot-Experimente gezeigt werden, dass die ersten 27 Aminosäuren des N-Terminus eine Signalpeptid-Sequenz darstellen und durch Signalpeptidasen im endoplasmatischen Retikulum abgespalten werden. Es könnte auf regulatorischer Ebene wichtig sein, wobei weitere Experimente nötig sind, um zu untersuchen, wozu das Signalpeptid wichtig ist, und ob ein Effekt auf die Aktivierbarkeit besteht.

Der rAdeR enthält, wie im Modell vorhergesagt wurde, keine essentiellen extrazellulären Disulfidbrücken. Sowohl bezüglich der Affinität für [³H]Adenin, als

auch in der Aktivierbarkeit des Rezeptors konnte kein signifikanter Unterschied in An- und Abwesenheit des Disulfid-reduzierenden Reagenzes Dithiothreitol (10 mM) beobachtet werden.

3.3 Charakterisierung des Maus-Adenin-Rezeptors Subtyp 1

Durch Datenbanksuche wurde die Aminosäuresequenz des Ratten-Adenin-Rezeptors mit Aminosäuresequenzen anderer Spezies verglichen. Dabei wurde eine Orthologie zur genomischen DNA der Maus gefunden, die für den mMrgA10 „Orphan“-Rezeptor bzw. Maus-Adenin-Rezeptor Subtyp 1, mAde1R, kodiert (XM_195647).¹³³ Dieser befindet sich auf der Chromosomregion 7B4 und 7B5.¹⁶⁶ Bis zum heutigen Zeitpunkt fehlt der Beweis, dass die Sequenz des mMrgA10 „Orphan“-Rezeptors einen Adenin-Rezeptor darstellt.^{142,145} Die Subtypen der Adenin-Rezeptoren besitzen untereinander eine hohe Sequenzhomologie. Die Proteinsequenz des Maus-Adenin-Rezeptors Subtyp 1 ist zu 75,6 % mit der Proteinsequenz des rAdeR identisch. Die beiden Maus-Adenin-Rezeptoren sind sogar zu 81,6 % in ihrer Proteinsequenz identisch.¹⁶⁶ Der vermutete mAde1R (mMrgA10) wurde im Rahmen dieser Arbeit charakterisiert, um zu beweisen, dass es sich tatsächlich um einen Adenin-Rezeptor handelt. Wie für den rAdeR, wurde das etablierte Insektenzell-Expressionssystem verwendet.

3.3.1 Klonierung der Maus-Adenin-Rezeptor Subtyp 1-cDNA

In einer PCR mit den ATG- und TGA-Primern (s. Tab. 5.1) konnte in der verwendeten cDNA, die aus Gehirnen von Mäusen isoliert wurden, lediglich die Sequenz des Maus-Adenin-Rezeptors Subtyp 2 nachgewiesen werden.¹⁶⁶ Zunächst wurde genomische DNA aus Mauscortex und –striatum isoliert. Die Praktikantin Linda Hammerich konnte anschließend zeigen, dass in der gDNA mit den Primern (5'-gaagtattgacatcagcaccctg-3' und 5'-gacacttgatgccataaaaagac-3') der mittlere Teil der Sequenz des mAde1R (728 bp) vorhanden ist (s. Abb. 3.43 A). Aber auch in der cDNA aus ganzen Maushirnen konnte mit den Primern ATG und mMrgA10 sowie mMrgA10 und TGA (s. Tab. 5.1) die Gensequenz des mAde1R nachgewiesen werden (s. Abb. 3.43 B). Aufgrund dessen konnte gezeigt werden, dass der mAde1R im Gehirn von Mäusen exprimiert wird, wobei nur die Sequenz des mAde2R mit den ATG- und TGA-Primern erhalten wird. Daher waren mehrere PCRs mit der gDNA von Mauscortex und –striatum nötig, um die komplette Gensequenz des mAde1R zu finden. Die dafür verwendeten Primer sind in Tab. 5.1 dargestellt. Dazu wurde zunächst mit einer PCR das Fragment 1 des Exons2 und mit einer weiteren PCR das Fragment 2 des Exons2 erhalten. Anschließend wurde das Exon2 vervollständigt, in dem beide hergestellten Fragmente jeweils als Superprimer für 5 PCR-Zyklen dien-

ten. Danach erfolgte die Zugabe der Primer Exon2 und TGA, um das komplette Exon2 zu amplifizieren. Zum Schluss wurden noch die ersten neun codierenden Basen eingeführt, die sich auf dem Exon1 befinden. Dazu wurden die Primer ATG und TGA verwendet. So wurde das PCR-Produkt der kompletten Gensequenz des mAde1R erhalten. Dieses PCR-Produkt wurde von Bernt Alsdorf hergestellt und mir freundlicherweise für die Klonierung zur Verfügung gestellt.

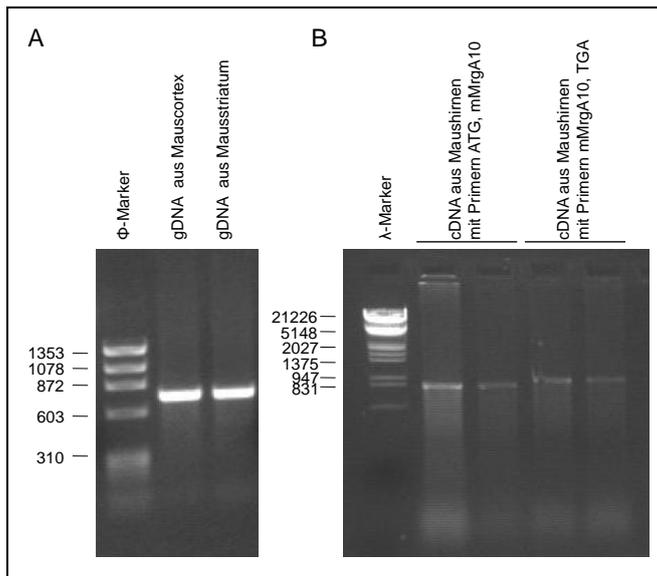


Abb. 3.43: Agarose-Gelelektrophorese von gDNA (A) und mRNA (B), isoliert aus dem Gehirn der Maus

3.3.1.1 Klonierung der Gensequenz des Maus-Adenin-Rezeptors Subtyp 1 in die Baculovirus-Transfervektoren pVL1393 und pFastBacTM1

Die Gensequenz des Maus-Adenin-Rezeptors Subtyp 1 wurde sowohl in den Baculovirus-Transfervektor pVL1393 als auch in den pFastBacTM1 kloniert. Für die Klonierung des Plasmids pVL-mAde1 wurde das PCR-Produkt der kompletten Gensequenz des mAde1R zunächst in einer PCR mit den entsprechenden Primern (s. Tab. 5.1) amplifiziert. Das 1027 bp große Insert mAde1 enthält Schnittstellen für die Restriktionsenzyme BamHI und XbaI. Sowohl das Insert als auch der Vektor pVL wurden anschließend geschnitten, wodurch *sticky ends* als überhängende Basenpaare erhalten wurden. Das geschnittene PCR-Produkt (1008 bp) und der verdauten Vektor (9624 bp) wurden mit dem ZR DNA Clean & Concentration Kit von der Firma Zymo Research aufgereinigt. Anschließend erfolgte die Ligation und Transformation in *E. coli*-Bakterien. Von den bebrüteten Agar-Platten wurden Bakterien-Monoklone selektioniert und die DNA wurde aus den *E. coli*-Bakterien isoliert. Durch einen Kontrollverdau mit den Restriktionsenzymen EcoRV und PstI wurde der Erfolg der Klonierung des Plasmids pVL-mAde1 überprüft, denn bei einem positiven Klon werden in einem Agarosegel Banden von 1075 bp und 9470 bp erhalten (s. Abb. 3.44 A und D).

Anschließend wurde die DNA des positiven Klon pVL-mAde1 von der Firma GATC sequenziert.

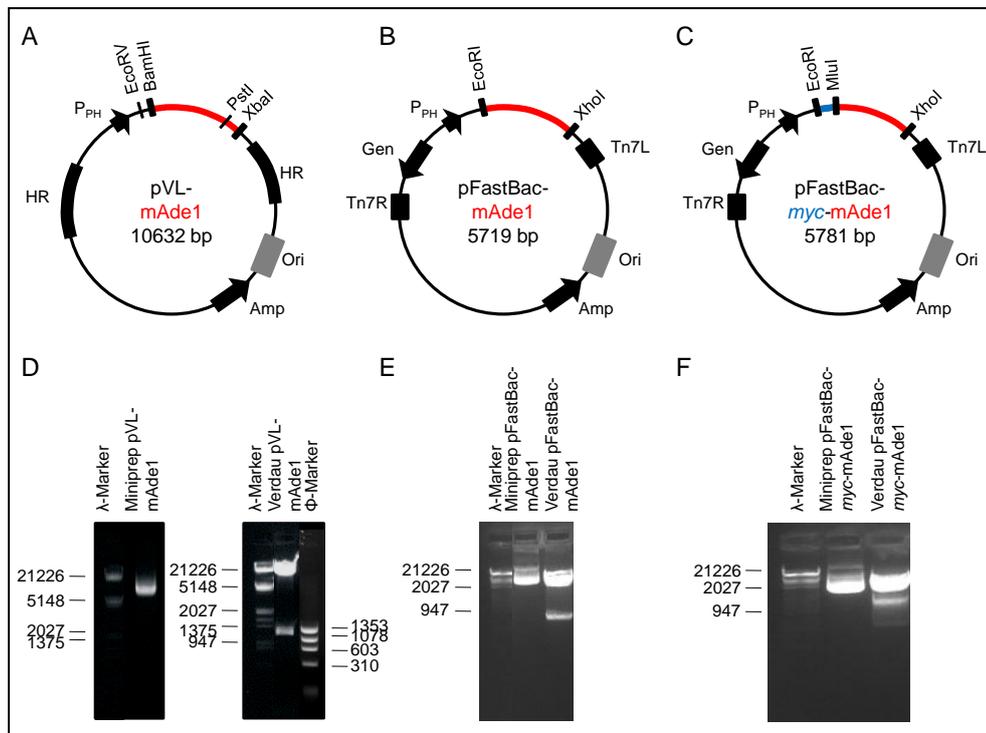


Abb. 3.44: Strategie und Verifikation der Maus-Adenin-Rezeptor Subtyp 1-cDNA in Baculovirus-Transfervektoren

Die Vektoren sind schematisch in Abbildung A, B und C dargestellt. Die Restriktionsenzyme *Bam*HI und *Xba*I (A) sowie *Eco*RI und *Xho*I (B) und *Mlu*I und *Xho*I (C) wurden zur Klonierung des Inserts *mAde1* in den Baculovirus-Transfervektor verwendet. Der Kontrollverdau wurde mit den Restriktionsenzymen *Eco*RV und *Pst*I (A) sowie *Eco*RI und *Xho*I (B und C) durchgeführt. Mit der Agarose-Gelelektrophorese wurde die isolierte Plasmid-DNA *pVL-mAde1* (D), *pFastBac-mAde1* (E) und *pFastBac-myc-mAde1* (F) analysiert und mit dem Geldoc Fotodokumentationssystem der Firma BioRad wurde das Gel ausgewertet. *P_{PH}*: Polyhedrin-Promotor; HR: Sequenz für homologe Rekombination; Amp: Ampicillin-Resistenzgen; Ori: Replikationsursprung (origin of replication); Gen: Gentamicin-Resistenzgen; Tn7R und Tn7L: Sequenz für Transposition des Vektors mit der Bacmid-DNA

Für die Klonierung in den *pFastBac*-Vektor konnte in einer PCR mit den entsprechenden Primern (s. Tab. 5.1) das Insert *mAde1* (1027 bp), die Schnittstellen für die Restriktionsenzyme *Eco*RI und *Xho*I besitzen, amplifiziert werden. Das weitere Vorgehen erfolgte, wie für die Klonierung von *pVL-mAde1* oben beschrieben wurde. Der Kontrollverdau wurde mit den Klonierungs-Restriktionsenzymen *Eco*RI und *Xho*I durchgeführt, wodurch Banden von 1008 bp und 4711 bp bei einer erfolgreichen Klonierung erwartet wurden. So konnte der positive Klon *pFastBac-mAde1* erhalten werden (s. Abb. 3.44 B und E). Die Klonierung des Plasmids *pFastBac-myc-mAde1* erfolgte mit den Restriktionsenzymen *Mlu*I und *Xho*I. Als Ausgangsplasmid diente *pFastBac-myc-rAde*. Der Kontrollverdau wurde mit den Restriktionsenzymen *Eco*RI und *Xho*I durchge-

führt, wodurch Banden von 1070 bp und 4711 bp bei einer erfolgreichen Klonierung erwartet wurden. So konnte der positive Klon pFastBac-myc-mAde1 erhalten werden (s. Abb. 3.44 C und F).

3.3.1.2 Klonierung in die retroviralen Vektoren pQXCIN und pLXSN

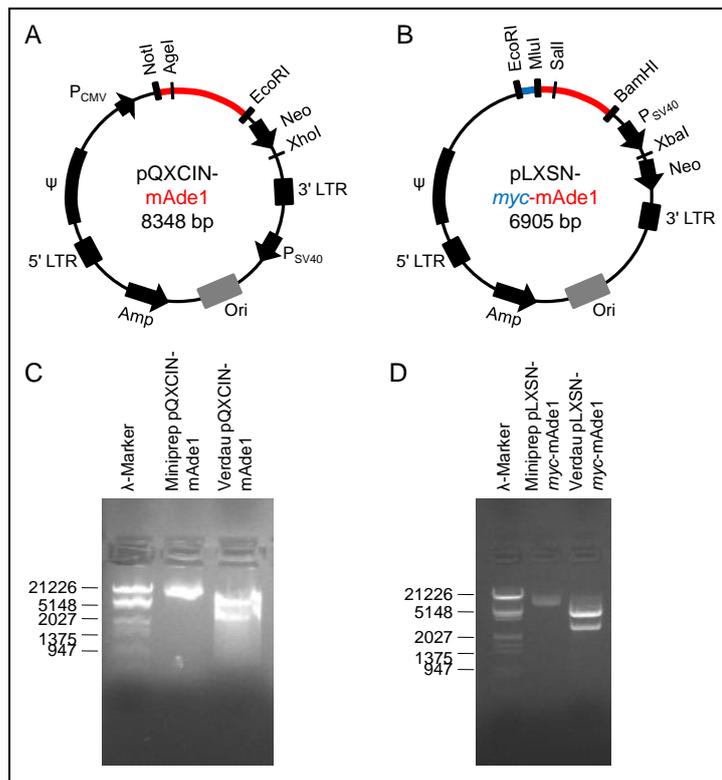


Abb. 3.45: Strategie und Verifikation der Maus-Adenin-Rezeptor Subtyp 1-cDNA in retroviralen Vektoren

Die Vektoren sind schematisch in Abbildung A und B dargestellt. Die Restriktionsenzyme *NotI* und *EcoRI* (A) sowie *MluI* und *BamHI* (B) wurden zur Klonierung des Inserts *mAde1* in die retrovirale Vektoren verwendet. Der Kontrollverdau wurde mit den Restriktionsenzymen *AgeI* und *XhoI* (A) sowie *Sall* und *XbaI* (B) durchgeführt. Mit der Agarose-Gelelektrophorese wurden die isolierte Plasmid-DNA pQXCIN-mAde1 (C) und pLXSN-myc-mAde1 (D) analysiert und mit dem Geldoc Fotodokumentationssystem der Firma BioRad wurde das Gel ausgewertet. *P_{CMV}*: Cytomegalovirus-Promotor; ψ : Verpackungssignal; 5' LTR und 3' LTR: long terminal repeats; *Amp*: Ampicillin-Resistenzgen; *Ori*: Replikationsursprung (origin of replication); *P_{SV40}*: SV40-Promoter; *Neo*: Neomycin-Resistenzgen

Für die Klonierung des Plasmids pQXCIN-mAde1 wurden als Restriktionsenzyme *NotI* und *EcoRI* verwendet. Das weitere Vorgehen erfolgte, wie für die Klonierung pVL-mAde1, oben beschrieben wurde. Der Kontrollverdau wurde mit den Restriktionsenzymen *AgeI* und *XhoI* durchgeführt, wodurch Banden von 2536 bp und 5812 bp bei einer erfolgreichen Klonierung erwartet wurden. So konnte der positive Klon pQXCIN-mAde1 erhalten werden (s. Abb. 3.45 A und C).

Für die Klonierung des Plasmids pLXSN-*myc-mAde1* diente der Vektor pLXSN-*myc-hA_{2B}*, der mir freundlicherweise von Dominik Thimm zur Verfügung gestellt wurde, als Ausgangsplasmid. Als Klonierungs-Restriktionsenzyme wurde MluI und BamHI verwendet. Das weitere Vorgehen erfolgte wie es für die Klonierung von pVL-*mAde1* oben beschrieben wurde. Der Kontrollverdau wurde mit den Restriktionsenzymen Sall und XbaI durchgeführt, wodurch Banden von 2491 bp und 4414 bp bei einer erfolgreichen Klonierung erwartet wurden. So konnte der positive Klon pLXSN-*myc-mAde1* erhalten werden (s. Abb. 3.45 B und D).

3.3.2 Expressionssystem

Für die Expression des *mAde1R* in *Sf9*-Insektenzellen wurde sowohl das BaculogoldTM Baculovirus-Expressionssystem (BEVS) als auch das Bac-to-Bac-Expressionssystem benutzt. Als Transfervektor für das BEVS diente pVL1393, wohingegen für das Bac-to-Bac-Expressionssystem als Transfervektor der um die Hälfte kleinere pFastBacTM1 verwendet wurde. Jedoch wurden mit dem BEVS nur geringe Virustiter erhalten. Im Gegensatz dazu konnte mit dem Bac-to-Bac-Expressionssystem die Zeit bis zur Ernte eines rekombinanten Virus mit ausreichendem Titer verkürzt werden. In *Sf9*-Insektenzellen, die mit P2-Viren infiziert wurden, konnte schon eine ausreichende Proteinexpression beobachtet werden, denn an diesen Membranpräparationen konnte in Radioligand-Bindungsstudien hohe spezifische Bindung gemessen werden.

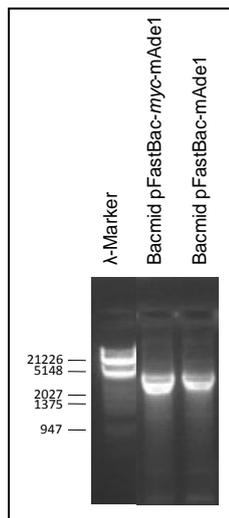


Abb. 3.46: Kontroll-Agarosegel der rekombinanten Bacmid-DNA

Die Kontrolle der rekombinanten Bacmid-DNA wurde ebenfalls mit einer PCR und anschließender Agarose-Gelelektrophorese analysiert. Enthält die Bacmid-DNA das pFastBac-Konstrukt wie bei den Bacmid-pFastBac-*myc-mAde1* und pFastBac-*mAde1*, erscheint eine Bande bei etwa 3300 bp (s. Abb. 3.46). Die

Etablierung der optimalen Expressionsbedingungen erfolgte, wie in 3.1.2.2 beschrieben, zunächst in 25 cm² kleinen Zellkulturflaschen, in dem die *Sf9*-Insektenzellen mit verschiedenen Mengen an Virus (0,1-1,0 ml) infiziert wurden. Die optimale Proteinexpression wurde nach 3 Tagen mit einer Virusmenge von 0,25 ml pro 3 x 10⁶ Zellen erreicht. Ebenso wurde eine Ko-Expression im Verhältnis von 1 : 10 der Viren der G_{αi2}- und G_{β1γ2}-Untereinheit gegenüber den Viren des Maus-Adenin-Rezeptors Subtyp 1 durchgeführt.

3.3.3 Radioligand-Bindungsstudien

Für die Untersuchung der Expression des Maus-Adenin-Rezeptors Subtyp 1 in *Sf9*-Insektenzellen wurde die Abkürzung Sf9 mAde1 verwendet. Die rekombinanten Zellen, die durch Ko-Infektion mit Viren, die die Gensequenz des mAde1R und das Gen der G_α- und der G_{βγ}-Untereinheit enthalten, werden als Sf9 mAde1+G_α+G_{βγ} abgekürzt. Zunächst konnte, wie bereits in 3.1.4 beschrieben wurde, gezeigt werden, dass die nicht-infizierten *Sf9*-Insektenzellen als Expressionssystem geeignet sind.

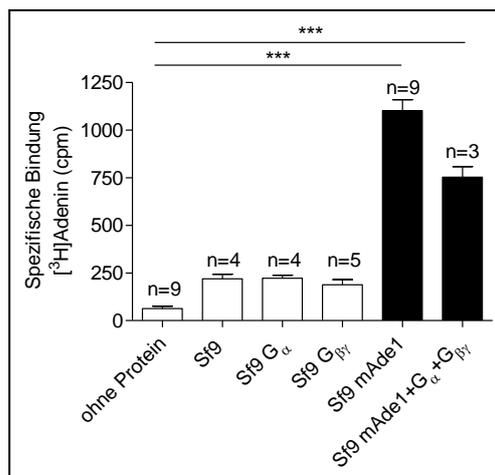


Abb. 3.47: Radioligand-Bindungsstudien an Sf9-, Sf9 G_α-, Sf9 G_{βγ}-, Sf9 mAde1- und Sf9 mAde1+G_α+G_{βγ}-Membranpräparationen

n: Anzahl der durchgeführten Experimente in Triplikaten; *P*: die Signifikanz wurde mit einem ungepaarten *t*-Test bestimmt; *** *P* < 0,001

Bei einer Proteinmenge von 100 µg konnte kaum spezifische Bindung an Sf9- (219 ± 23 cpm, *n* = 4), Sf9 G_α- (222 ± 15 cpm, *n* = 4) und Sf9 G_{βγ}-Membranpräparationen (188 ± 27 cpm, *n* = 4) gemessen werden. Auch in Abwesenheit des Proteins konnte keine mikrobielle Kontamination des verwendeten Tris-Puffer festgestellt werden, da lediglich eine spezifische Bindung von 63 ± 13 cpm (*n* = 7) bestimmt wurde. Dahingegen konnte eine spezifische Bindung an Sf9 mAde1- (1101 ± 58 cpm, *n* = 7) und Sf9 mAde1+G_α+G_{βγ}-Membranpräparationen (752 ± 56 cpm, *n* = 3) gemessen werden (s. Abb. 3.47). In einem unge-

paarten *t*-Test konnte eine signifikant höhere spezifische Bindung in Anwesenheit des mAde1R, verglichen mit den nicht-infizierten *Sf9*-Insektenzellen, berechnet werden. Jedoch konnte keine signifikant höhere spezifische Bindung in Anwesenheit der beiden G-Proteinuntereinheiten gezeigt werden. Somit wird vermutet, dass an *Sf9* mAde1+G $_{\alpha}$ +G $_{\beta\gamma}$ -Membranpräparationen keine höhere Affinität des Radioliganden an den Rezeptor gemessen werden kann. Dies wurde ebenfalls in homologen Konkurrenzexperimenten untersucht.

3.3.3.1 Sättigungsexperimente

Der mAde1R wurde anschließend in Sättigungsexperimenten untersucht, um die Gleichgewichtsdissoziationskonstante, den K_D -Wert, und die maximale Rezeptoranzahl in der Membranpräparation, den B_{max} -Wert, bestimmen zu können. Dabei werden verschiedene Konzentrationen, 0,05-1500 nM, des Radioliganden [3 H]Adenin verwendet. An *Sf9* mAde1-Membranpräparationen wurde ein K_D -Wert von 286 ± 55 nM ($n=3$) und ein B_{max} -Wert von $1,18 \pm 0,03$ pmol/mg Protein ($n=3$) bestimmt (s. Abb. 3.48). Für die Berechnung des K_i -Wertes wurde der K_D -Wert als Grundlage verwendet. Der erhaltene B_{max} -Wert stimmt mit den in der Literatur beschriebenen Werten von 1-5 pmol/mg Protein überein.²⁵⁴⁻²⁵⁶

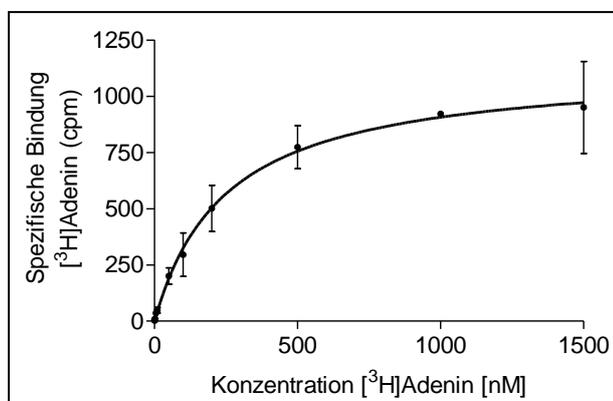


Abb. 3.48: Sättigungsexperimente an *Sf9* mAde1-Membranpräparationen

K_D -Wert = 286 ± 55 nM; B_{max} -Wert = $1,18 \pm 0,03$ pmol/mg Protein

3.3.3.2 Konkurrenzexperimente

Zur weiteren Charakterisierung des mAde1R wurden Konkurrenzexperimente durchgeführt, um die mittlere inhibitorische Konzentration, IC_{50} -Wert, und die zu berechnende Gleichgewichtsinhibitionskonstante, K_i -Wert, bestimmen zu können. So konnten in [3 H]Adenin-Bindungsstudien die Struktur-Wirkungs-Beziehungen untersucht und mit den bekannten Adenin-Rezeptoren, rAdeR und mAde2R, verglichen werden. An *Sf9* mAde1-Membranpräparationen konnte ein

IC₅₀-Wert von 195 ± 32 nM ($n = 9$) und ein K_i-Wert von 189 ± 31 nM bestimmt werden (s. Abb. 3.49). Somit konnte die Vermutung, dass es sich bei dem mMrgA10-Rezeptor bzw. mAde1R aufgrund der Orthologie zum rAdeR tatsächlich um einen Adenin-Rezeptor handelt, bestätigt werden. An Sf9 mAde1+G_α+G_{βγ}-Membranpräparationen konnte ein IC₅₀-Wert von 246 ± 17 nM ($n = 3$) bestimmt werden (s. Abb. 3.49). Die leichte, signifikante (** P < 0,01) Rechtsverschiebung der Inhibitionskurve, verglichen mit Sf9 mAde1-Membranpräparationen, wurde bereits aufgrund der geringeren spezifischen Bindung vermutet. Somit konnte in Anwesenheit der humanen G_i-Proteinuntereinheiten keine verbesserte Affinität des Radioliganden an den Rezeptor beobachtet werden, im Gegensatz zum rAdeR.

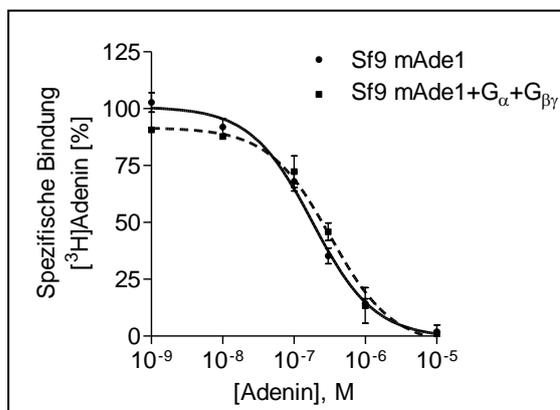
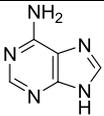
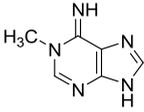
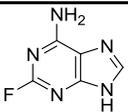
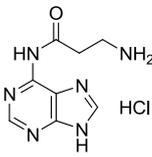
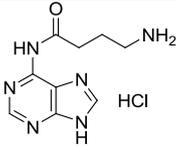
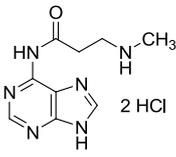
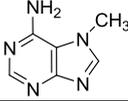
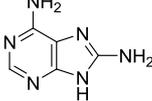
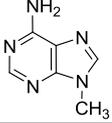
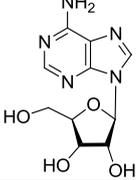
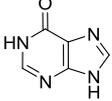


Abb. 3.49: Homologe Konkurrenzexperimente an Sf9 mAde1- und Sf9 mAde1+G_α+G_{βγ}-Membranpräparationen

IC₅₀-Wert (Sf9 mAde1) = 195 ± 32 nM; K_i-Wert = 189 ± 31 nM; IC₅₀-Wert (Sf9 mAde1+G_α+G_{βγ}) = 246 ± 17 nM

Zur Charakterisierung der Struktur-Wirkungs-Beziehungen des mAde1R wurden eine Serie von Adenin-Derivaten getestet. Die erhaltenen IC₅₀-Werte und daraus resultierenden K_i-Werte sind in Tab. 3.12 dargestellt. Die höchste Affinität konnte für den Agonisten Adenin gemessen werden. Nur ein geringer Affinitätsverlust wurde für den Antagonisten PSB-08162 (IC₅₀-Wert von $0,405 \pm 0,110$ μM, $n = 5$) beobachtet. Ebenfalls nur einen zwei-fach geringeren IC₅₀-Wert ($0,462 \pm 0,037$ μM, $n = 3$) wurde für die Verbindung 2-Fluoradenin, im Vergleich zu Adenin, bestimmt. Auch nur einen geringen Affinitätsverlust (IC₅₀-Wert von $0,461 \pm 0,065$ μM, $n = 5$) zeigte das Adenin-Derivat PSB-09097. Für die Verbindung 7-Methyladenin konnte ein IC₅₀-Wert von $0,609 \pm 0,157$ μM ($n = 4$) gemessen werden, der nur um das drei-fache geringer ist als der erhaltene IC₅₀-Wert von Adenin. Für das Adenin-Derivat PSB-09032 konnte nur noch ein IC₅₀-Wert von $3,89 \pm 1,49$ μM ($n = 4$) bestimmt werden. Für die Verbindungen 1-Methyladenin und PSB-09073 wurden im gleichen Bereich IC₅₀-Werte von $4,77 \pm 0,63$ μM ($n = 3$) und $6,14 \pm 2,25$ μM ($n = 5$) erhalten.

Tab. 3.12: Affinitäten der getesteten Verbindungen an Sf9 mAde1-Membranpräparationen

Verbindung	Struktur	IC ₅₀ [μM] (Inhibition bei 100 μM in %)	K _i [μM]*	n
Adenin		0,195 ± 0,032	0,189 ± 0,031	9
1-Methyladenin		4,77 ± 0,63	4,60 ± 0,60	3
2-Fluoradenin		0,462 ± 0,037	0,431 ± 0,036	3
PSB-09073 3-Amino-N-(9H- purin-6-yl) propionamid- HCl		6,14 ± 2,25	5,94 ± 2,17	5
PSB-09097 4-Amino-N-(9H- purin-6-yl) butyramid-HCl		0,461 ± 0,065	0,445 ± 0,062	5
PSB-08162 3-Methylamino- N(9H-purin-6- yl)propionamid- Dihydrochlorid		0,405 ± 0,110	0,391 ± 0,106	5
7-Methyladenin		0,609 ± 0,157	0,564 ± 0,156	4
PSB-09032 8-Aminoadenin		3,89 ± 1,49	3,76 ± 1,44	4
9-Methyladenin		≈ 100 (54 ± 6)	≈ 100 (54 ± 5)	4
Adenosin		> 100 (29 ± 6)	> 100 (29 ± 6)	3
Hypoxanthin		≈ 100 (43 ± 9)	≈ 100 (43 ± 9)	6

n: Anzahl der durchgeführten Experimente in Triplikaten; * für die Berechnung des K_i-Wertes wurde der K_D-Wert von 286 nM, der in Sättigungsexperimenten bestimmt wurde, als Grundlage verwendet.

Für die Verbindungen 9-Methyladenin, Adenosin und Hypoxanthin wurde im Vergleich zu Adenin ein fast kompletter Affinitätsverlust beobachtet. Daraus ergibt sich folgende Reihenfolge der Affinitäten: Adenin > PSB-08162 (3-Methylamino-N(9H-purin-6-yl)propionamid) > 2-Fluoradenin > PSB-09097 (4-Amino-N(9H-purin-6-yl)butyramid) > 7-Methyladenin > PSB-09032 (8-Aminoadenin) > 1-Methyladenin > PSB-09073 (3-Amino-N(9H-purin-6-yl)propionamid). Ein Balkendiagramm der pIC_{50} -Werte und die Inhibitionskurven der getesteten Verbindungen, die an Sf9 mAde1-Membranpräparationen erhalten wurden, sind in Abb. 3.50 A und B dargestellt.

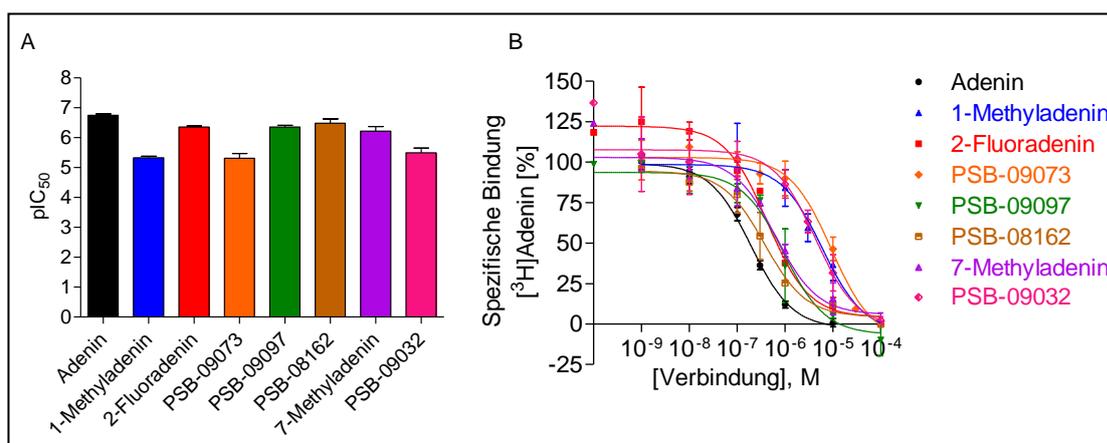


Abb. 3.50: Heterologe Konkurrenzexperimente an Sf9 mAde1-Membranpräparationen

A: Balkendiagramm der pIC_{50} -Werte; B: Inhibitionskurven der getesteten Verbindungen

An Rattencortex-Membranpräparationen konnte nur eine geringe Toleranz gegenüber einer Substitution des Adenin-Grundgerüsts beobachtet werden.^{152,153}

Die Substitution in Position 8 oder 9 mit basischen Resten oder die Einführung von polaren Substituenten an der 6-Aminofunktion werden am besten toleriert.¹⁵³ Die erhaltenen Struktur-Wirkungs-Beziehungen des mAde1R sind in Abb. 3.51 zusammengefasst. Die Einführung einer Methylgruppe in Position 1 führt zu einem 20-fachen Affinitätsverlust. Daher scheint diese Position für die Interaktion mit dem Rezeptor, als Akzeptor für eine Wasserstoffbrückenbindung, entscheidend zu sein und sollte daher besser unsubstituiert vorliegen. Auch die anderen Adenin-Rezeptoren, mAde2R, rAdeR und cAdeR, tolerieren an dieser Position keine Methylgruppe (s. Tab. 3.13). Dahingegen führte die Einführung eines Fluor-Atoms in Position 2 nur zu einem geringen Affinitätsverlust und wird somit vom mAde1R, wie auch von den anderen Adenin-Rezeptoren gut toleriert (s. Tab. 3.13). Somit sind an dieser Position Substitutionen mit kleinen Resten möglich. Ein starker Affinitätsverlust konnte durch Einführung einer 3-Aminopropionamidgruppe beobachtet werden, was auch an mAde2-Rezeptoren beobachtet wurde. Jedoch zeigte die entsprechende Verbindung

(PSB-09073) an den anderen Rezeptor-Subtypen, rAdeR, nativen HEK293-Membranpräparationen und cAdeR, eine hohe Affinität (s. Tab. 3.13). Somit konnte eine geringe Affinität nur für die beiden Subtypen der Maus-Adenin-Rezeptoren gezeigt werden. Hingegen konnte für die anderen in Position 6 substituierten Verbindungen, PSB-09097 und PSB-08162, nur ein geringer Affinitätsverlust am mAde1-Rezeptor gefunden werden. Somit scheint eine Substitution in dieser Position generell vom mAde1R toleriert zu werden. Jedoch sollte eine entsprechende Kettenlänge von mehr als drei C-Atomen, wie in PSB-09097, oder ein entsprechend großer Rest z. B. eine Methylgruppe, wie in PSB-08162, vorhanden sein. Dahingegen wurde ein fast kompletter Affinitätsverlust beobachtet, wenn in Position 6 die Aminogruppe durch eine Ketogruppe ausgetauscht wurde, wie es im Hypoxanthin der Fall ist. Somit scheint die Aminofunktion in Position 6 für die Interaktion mit dem Rezeptor wichtig zu sein, was auch für die anderen Adenin-Rezeptoren gilt (s. Tab. 3.13).

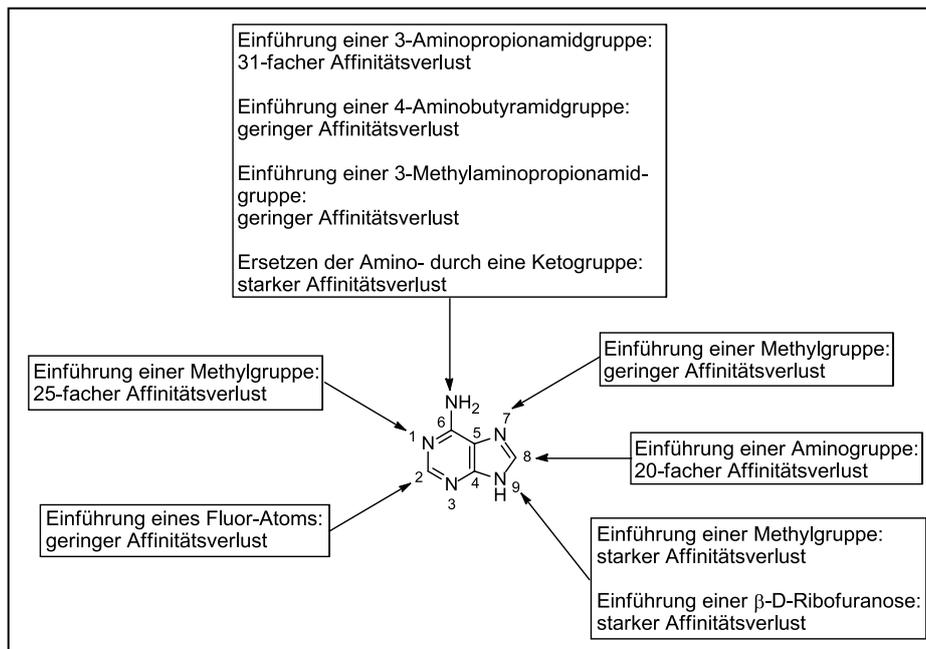


Abb. 3.51: Struktur-Wirkungs-Beziehungen des mAde1R

Die Einführung einer Methylgruppe in Position 7 zeigte nur einen geringen Affinitätsverlust und wird vom mAde1R gut toleriert. Allerdings konnte festgestellt werden, dass eine Methylgruppe in Position 7 zu einem starken Affinitätsverlust an den anderen Adenin-Rezeptoren führte (s. Tab. 3.13). Somit scheint die Substitution dieser Position nur vom mAde1R toleriert zu werden. Eine Einführung einer Aminofunktion in Position 8 wird vom mAde1R nicht toleriert. Hingegen konnte an nativen HEK293-Membranpräparationen mit dieser Verbindung die höchste Affinität gemessen werden (s. Tab. 3.13). Aber auch für den rAdeR und cAdeR konnte ein starker Affinitätsverlust beobachtet werden.

Tab. 3.13: Affinitäten der getesteten Verbindungen an Sf9 mAde1-Membranpräparationen verglichen mit Sf21 mAde2-, Rattencortex-, HEK293- und Sf9 cAde-Membranpräparationen

Verbindung	IC ₅₀ - oder K _i -Werte ± SEM [µM] versus 10 nM [³ H]Adenin (Inhibition bei 100 µM in %) ^a				
	mAde1R	mAde2R	rAdeR	nativ HEK293	cAdeR
Adenin	0,189 ± 0,031 ^b	0,0695 ± 0,0098 ^{f,h}	0,0299 ± 0,0034 ^l	0,0471 ± 0,0037 ^m	0,0711 ± 0,0049 ^o
1-Methyladenin	4,60 ± 0,60	~ 100 (62 ± 7) ^h	29,3 ± 9,3 (39 ± 3) ^{j,k}	n.b.	10,8 ± 0,9 ^o
2-Fluoradenin	0,431 ± 0,036	1,47 ± 0,14 ^{g,h}	0,622 ± 0,144 (93 ± 2) ^{j,k}	0,94 ± 0,24 ^k	0,0489 ± 0,0049 ^o
PSB-09073	5,94 ± 2,17 ^c	3,51 ± 1,39 ⁱ	0,0215 ± 0,0056 ^l	0,0447 ± 0,0034 ^l	0,347 ± 0,035 ^o
PSB-09097	0,445 ± 0,062 ^c	0,375 ± 0,128 ⁱ	0,0805 ± 0,0030 ^l	0,149 ± 0,045 ^l	0,399 ± 0,042 ^o
PSB-08162	0,391 ± 0,106 ^c	n.b.	0,292 ± 0,056 ^l	1,83 ± 0,09 ^l	0,452 ± 0,051 ^o
7-Methyladenin	0,564 ± 0,156 ^d	5,76 ± 1,02 ^{g,h}	4,13 ± 1,08 (95 ± 1) ^{j,k}	2,30 ± 0,93 ^k	3,89 ± 0,61 ^o
PSB-09032	3,76 ± 1,44 ^d	n.b.	6,51 ± 1,92 (100 ± 7) ^k	0,0341 ± 0,0088 ^m	4,92 ± 0,01 ^o
9-Methyladenin	≈ 100 (54 ± 6) ^d	n.b.	17,5 ± 3,0 ^{j,k}	≈ 100 (44 ± 7) ⁿ	≈ 100 (57 ± 2) ^o
Adenosin	> 100 (29 ± 6)	n.b.	~ 100 (46 ± 2) ^{j,k}	n.b.	> 100 (11 ± 4) ^o
Hypoxanthin	≈ 100 (43 ± 9) ^e	> 100 (26 ± 10) ⁱ	45,0 ± 19,4 (62 ± 2) ^k	n.b.	> 100 (19 ± 2) ^o

mAde1R: rekombinant exprimiert in Sf9-Insektenzellen; mAde2R: rekombinant exprimiert in Sf21-Insektenzellen; rAdeR: Rattencortex-Membranpräparationen; nativ HEK293: Membranpräparationen von nativen HEK293-Zellen; cAdeR: rekombinant exprimiert in Sf9-Insektenzellen; n.b.: nicht bestimmt; ^a Ergebnisse von drei unabhängig voneinander durchgeführten Experimenten in Triplikaten; ^b Ergebnisse von neun unabhängig voneinander durchgeführten Experimenten in Triplikaten; ^c Ergebnisse von fünf unabhängig voneinander durchgeführten Experimenten in Triplikaten; ^d Ergebnisse von vier unabhängig voneinander durchgeführten Experimenten in Triplikaten; ^e Ergebnisse von sechs unabhängig voneinander durchgeführten Experimenten in Triplikaten; ^f Ergebnisse von fünf unabhängig voneinander durchgeführten Experimenten in Duplikaten; ^g Ergebnisse von zwei unabhängig voneinander durchgeführten Experimenten in Duplikaten; ^h IC₅₀-Werte publiziert von Kügelgen et al.¹⁶⁶; ⁱ IC₅₀-Werte von Bernt Alsdorf²⁸⁸; ^j K_i-Werte publiziert von Gorzalka et al.¹⁵²; ^k Werte von Simone Gorzalka¹⁷⁰; ^l K_i-Werte publiziert von Müller et al.¹⁵⁶; ^m K_i-Werte publiziert von Borrmann et al.¹⁵³; ⁿ K_i-Werte von Aliaa Abdelrahman¹⁵⁵; ^o IC₅₀-Werte von Dominik Thimm

Somit ist die Substitution in Position 8 spezifisch für einen in nativen humanen HEK293-Zellen exprimierten Rezeptor. Ein fast kompletter Affinitätsverlust konnte beobachtet werden, wenn in Position 9 ein Methyl- oder eine β-D-Ribofuranosylrest vorhanden war, da wahrscheinlich der Stickstoff in dieser Position

als Donor für eine H-Brückenbindung dient und somit unsubstituiert vorliegen sollte. An den anderen Adenin-Rezeptoren konnte dieser Affinitätsverlust ebenfalls beobachtet werden. Somit ist eine Substitution in Position 2, 7 und bedingt in Position 6, sofern die Aminofunktion erhalten bleibt, möglich. Hingegen wird eine Substitution in Position 1 und 9 nicht vom mAde1R toleriert, denn das Stickstoff-Atom in Position 1, 6 und 9 scheint für die Interaktion mit dem Rezeptor von Bedeutung zu sein. Aus den erhaltenen IC_{50} -Werten der Adenin-Rezeptoren konnten die pIC_{50} -Werte, der negativ dekadische Logarithmus der IC_{50} -Werte, berechnet und graphisch miteinander verglichen werden. Die größte Korrelation konnte zwischen dem cAdeR und dem mAde1R mit einem Korrelations-Koeffizienten von 0,9790 beobachtet werden. Aber es konnte auch eine hohe Korrelation zwischen dem mAde1R und den Bindungsdaten aus nativen HEK293-Membranpräparationen berechnet werden (Korrelations-Koeffizient 0,8781). Die Korrelation zwischen dem mAde1R und mAde2R bzw. rAdeR ist mit einem Korrelations-Koeffizienten von 0,5176 bzw. 0,4838 deutlich niedriger. Allerdings ist zu bedenken, dass lediglich eine geringe Auswahl an Verbindungen miteinander verglichen wurde, und daher die Korrelationen nur mit 7-10 Werten durchgeführt werden konnte. Um eine genauere Aussage bezüglich der Korrelation treffen zu können, müssten wesentlich mehr Affinitätsdaten von Verbindungen miteinander verglichen werden.

3.3.4 Retrovirale Transfektion

Sehr viele Hinweise, wie z. B. die spezifische Bindung des Radioliganden [3H]Adenin an Membranpräparationen humaner Zelllinien, 1321N1-Astrozytomzellen,¹⁵² Nierencarcinomzellen HEK293¹⁵³ und Leukämiezellen Jurkat T,¹⁷⁰ deuten auf die Existenz eines humanen Adenin-Rezeptors hin. Für funktionelle cAMP-Experimente sind die humanen 1321N1-Astrozytomzellen allerdings geeignet, da Adenin keine Inhibition der zellulären cAMP-Produktion in An- und Abwesenheit von Isoprenalin hervorruft.¹⁶⁶ Das Fehlen eines Effektes bestätigt die Abwesenheit eines endogenen inhibitorischen Rezeptors für Adenin in 1321N1-Astrozytomzellen.¹⁶⁶ Daher wurden stabil transfizierte 1321N1-Astrozytomzellen, die den mAde1R exprimieren, für die Untersuchung der G-Protein-Kopplung verwendet.

3.3.4.1 *Transfektion der Verpackungszellen und Infektion der Zielzelle*

Zur Herstellung von rekombinanten Retroviren wurden ein retroviraler Vektor und eine Verpackungszelllinie verwendet.²⁸⁹ Der retrovirale Vektor enthält das essentielle Verpackungssignal ψ , ein Antibiotika-Resistenzgen zur Selektion sowie die retroviralen 5'- bzw. 3'-LTRs (*long terminal repeats*).²⁹⁰ Dies sind repetitive Sequenzen, die an beiden Termini des Inserts vorkommen und Promotoren

sowie Enhancer enthalten, wodurch die Initiation der Transkription ermöglicht wird. Allerdings können die Gensequenzen des Vektors nicht für retrovirale Proteine codieren, dafür stehen die Verpackungszellen zur Verfügung.²⁸⁹ Diese enthalten die Gensequenzen für die Proteine *gag*, *pol* und *env*, die für die Verpackung der RNA und damit für die Erzeugung retroviraler Partikel benötigt werden.²⁸⁹⁻²⁹¹ Das Gruppen-spezifische Antigen *gag* (Gruppen-spezifisches Antigen, *group-specific-antigene*) kodiert für das Kapsidprotein des Virus. Mit dem Kürzel *pol* (*polymerase*) wird das Gen für die reverse Transkriptase bezeichnet, die die genomische virale RNA in zelluläre DNA umschreibt.²⁹⁰ Das als „*envelope*“ (*env*) bezeichnete Hüllprotein ist wichtig für die Rezeptorerkennung des Virus und wird auf seiner Virushülle exprimiert.

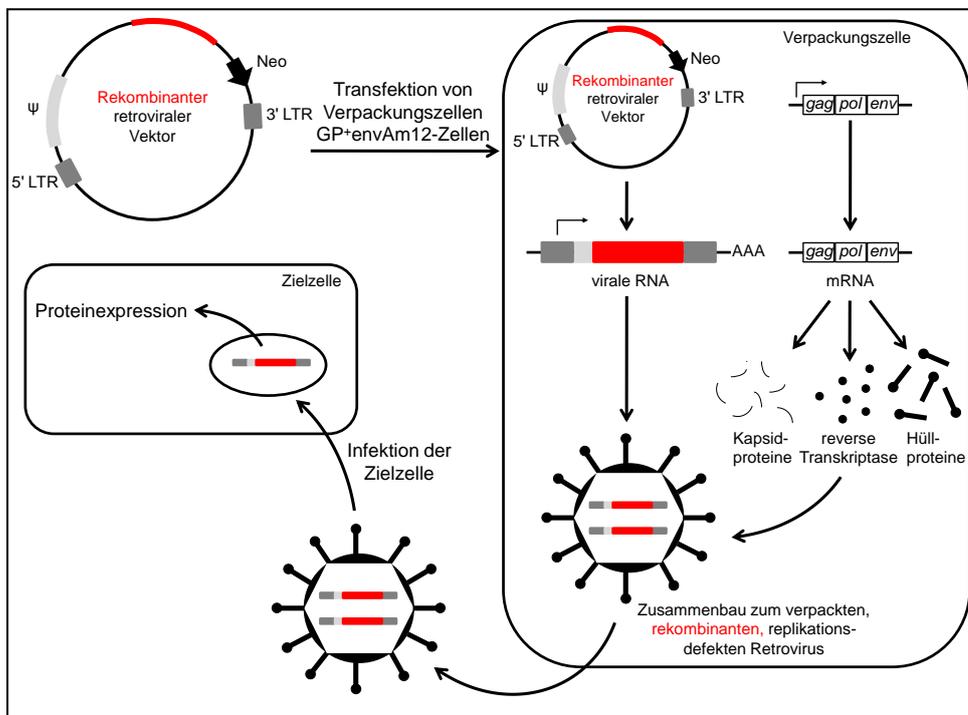


Abb. 3.52: Das Prinzip der retroviralen Transfektion, modifiziert nach^{290,292}

Mit dem retroviralen Vektor, der das zu übertragende Gen enthält, wurden zunächst die Verpackungszellen transfiziert. Diese lieferten verpackte, rekombinante, replikationsdefekte Retroviren, die in den Überstand sezerniert wurden. Mit dem steril filtrierten Überstand, der die Viren enthält, wurden die Zielzellen infiziert. Dunkelgraue Rechtecke: LTR beinhalten repetitive Sequenzen, die an beiden Termini des DNA-Genoms vorkommen (long terminal repeats); hellgraues Rechteck: Verpackungssignal ψ ; rotes Rechteck: zu übertragene Gensequenz; Neo: Neomycin-Resistenzgen; weiße Rechtecke mit schwarzer Umrandung: Gensequenzen für die Proteine *gag* (Gruppen-spezifisches Antigen, *group-specific-antigene*), *pol* (*Polymerase*: reverse Transkriptase und *Integrase*) und *env* (Hüllproteine, *envelope*)

Für die Transfektion wurden amphotrope GP⁺envAm12-Zellen, die von Maus-Fibroblasten-Zellen abstammen, verwendet.²⁸⁹ Amphotrope murine Retroviren besitzen einen breiten Wirtsbereich von murinen bis zu nicht-murinen, auch humanen, Zellen.²⁸⁹ Die Hüllproteine der murinen Retroviren wurden weiter modifi-

ziert oder ausgetauscht, um einen noch breiteren Wirtsbereich zu erhalten (Pseudotypisierung).²⁹³ Dies wurde mit dem G-Glykoprotein (VSV-G) des vesikulären Stomatitis Virus (VSV) erreicht, wodurch eine Infektion nahezu aller Zelltypen ermöglicht wurde.^{294,295} Die Glykoproteine der umhüllten Viruspartikel binden an spezifische Rezeptoren der Zelloberfläche und initiieren eine Membranfusion. Die VSV-G-Pseudotyp-Retroviren besitzen eine höhere Partikelstabilität, wodurch eine Ultrazentrifugation zur Konzentrierung der infektiösen Viruspartikel möglich ist.²⁹⁵ Zunächst wird der retrovirale Vektor, der das zu übertragende Gen enthält, in die Verpackungszellen mit der Lipofektions-Methode transfiziert.²⁹² Bei der Lipofektion wird die rekombinante DNA mit einem Gemisch aus kationischen und ungeladenen Lipiden versetzt.²⁹⁶ Es bilden sich spontan Lipid-DNA-Komplexe, sogenannte DNA-gefüllte Liposomen, die mit der Zellmembran verschmelzen und so die DNA in die Zelle einbringen können.²⁹⁶ Die Verpackungszellen exprimieren die retroviralen Strukturproteine und durch Transkription der DNA des retroviralen Vektors wird RNA hergestellt, die mit den Strukturproteinen zu einem verpackten, rekombinanten, replikationsdefekten Retrovirus zusammengebaut werden. Daraufhin sezernieren die rekombinanten Retroviren, die virale Promotoren und das zu übertragene Gen, jedoch keine *gag*, *pol* und *env*-Gene enthalten, in den Überstand und können zur Infektion der Zielzelle verwendet werden.²⁹² In Abb. 3.52 wird das Prinzip der retroviralen Transfektion dargestellt.

3.3.4.2 Selektion einer stabil transfizierten Zelllinie

Die infizierten Zellen besitzen ein Neomycin-Resistenzgen und daher kann Genticin G418, ein Neomycinderivat, zur Selektion verwendet werden. Die nicht-infizierten Zellen sterben aufgrund des fehlenden Neomycin-Resistenzgens ab. An den stabil transfizierten 1321N1-Astrozytomzellen, die den Maus-Adenin-Rezeptor Subtyp 1 exprimieren, wurde schon nach wenigen Passagen der Verlust des rekombinant exprimierten Proteins beobachtet. Aus diesem Grund wurden viele Aliquots von niedrig passagierten Zellen eingefroren und ab einer Passagennummer von acht wurden bereits wieder neue Zellen aufgetaut.

3.3.4.3 RT-PCR

Die Expression der Gensequenz des mAde1R wurde auf mRNA-Ebene untersucht. Dazu wurde aus den stabil transfizierten 1321N1-Astrozytomzellen mRNA isoliert und anschließend in cDNA umgeschrieben. Zunächst wurde die Isolierung der mRNA mit Primern, die an das humane „housekeeping Gen“ β -Aktin (NM_001101)^{297,298} binden, kontrolliert. In einer Agarose-Gelelektrophorese wurde eine Bande bei ca. 257 bp erhalten, was die erfolgreiche Isolierung der RNA und deren Umschreibung in cDNA bestätigt (s. Abb. 3.53). Anschlie-

ßend wurde überprüft, ob die gewünschte Gensequenz des mAde1R auf RNA-Ebene vorhanden war. Dazu wurden die bereits vorhandenen Klonierungs-Primer verwendet (s. Tab. 5.7). Es konnte eine Bande von ca. 1000 bp erhalten werden, wodurch die Expression der Gensequenz des mAde1R auf mRNA-Ebene bestätigt werden konnte (s. Abb. 3.53).

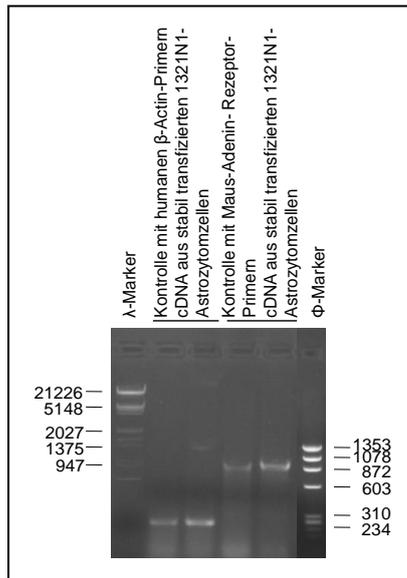


Abb. 3.53: Kontroll-Agarosegel der isolierten cDNA aus stabil transfizierten 1321N1-Astrozytomzellen zur Untersuchung der Expression des mAde1R auf mRNA-Ebene

3.3.5 Funktionelle Untersuchungen

Mit den stabil transfizierten 1321N1-Astrozytomzellen, die den mAde1R exprimieren, wurden zum einen funktionelle cAMP-Experimente und zum anderen Messungen zur Bestimmung der intrazellulären Ca^{2+} -Freisetzung durchgeführt, um eine Aussage über die Kopplung an G-Proteine treffen zu können.

3.3.5.1 Bestimmung von cAMP

In cAMP-Akkumulationsexperimenten konnte gezeigt werden, dass der mAde1R, wie auch der rAdeR und der mAde2R, die Adenylatcyclase (AC) inhibiert und somit über ein G_i -Protein an die AC gekoppelt ist. Die maximale cAMP-Stimulation wurde mit 3 nM Isoprenalin erreicht. Es konnte ein EC_{50} -Wert von $9,97 \pm 1,77$ nM ($n = 3$) für Adenin bestimmt werden. In Anwesenheit von 10 μM des Antagonisten PSB-08162 (3-Methylamino-N(9H-purin-6-yl)propionamid) konnte für Adenin ein vier-fach geringerer EC_{50} -Wert von $37,9 \pm 3,34$ nM ($n = 3$) bestimmt werden und eine deutliche Rechtsverschiebung der Kurve beobachtet werden (s. Abb. 3.54). In einem ungepaarten t -Test konnte ein signifi-

kanter Unterschied berechnet und somit bestätigt werden, dass die Verbindung PSB-08162, wie auch am mAde2R, am mAde1R ebenfalls einen antagonistischen Effekt besitzt. Ein K_b -Wert von $3,473 \mu\text{M}$ konnte berechnet werden und zeigt eine 10-fache Abweichung zum ermittelten K_i -Wert ($0,391 \mu\text{M}$).

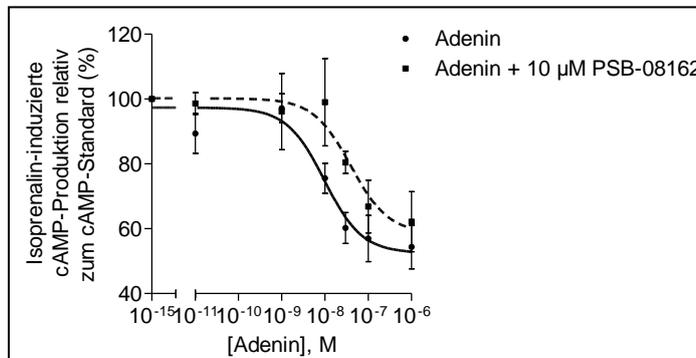


Abb. 3.54: Funktionelle cAMP-Experimente mit dem Agonisten Adenin an stabil transfizierten 1321N1-Astrozytomzellen, die den mAde1R exprimieren, in An- und Abwesenheit von $10 \mu\text{M}$ PSB-08162

EC_{50} -Wert (Adenin) = $9,97 \pm 1,77 \text{ nM}$; EC_{50} -Wert (Adenin mit $10 \mu\text{M}$ PSB-08162) = $37,9 \pm 3,34 \text{ nM}$

3.3.5.2 Messung der intrazellulären Calcium-Freisetzung

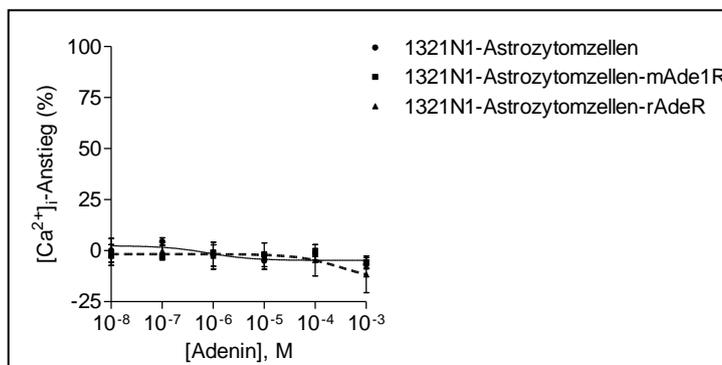


Abb. 3.55: Messung des intrazellulären Ca^{2+} -Anstiegs in 1321N1-Astrozytomzellen, untransfiziert und stabil transfiziert mit dem mAde1R bzw. rAdeR

Eine mögliche G_q -Kopplung und damit die Aktivierung der Phospholipase C (PLC) kann durch Messung der intrazellulären Ca^{2+} -Freisetzung überprüft werden. Dazu wurde der calciumsensitive Farbstoff Oregon Green BAPTA1 / AM verwendet. Sowohl an 1321N1-Astrozytomzellen als auch an stabil transfizierten 1321N1-Astrozytomzellen, die den mAde1R bzw. den rAdeR exprimieren, konnte keine Freisetzung von Calcium aus dem endoplasmatischen Retikulum durch Stimulation des Rezeptors beobachtet werden (s. Abb. 3.55). Somit konnte keine G_q -Protein-gekoppelte Aktivierung der PLC für den mAde1R gezeigt werden.

3.3.6 Zusammenfassung und Ausblick

Die Sequenz des mAde1R konnte in der cDNA, die aus Gehirnen von Mäusen isoliert wurde, nachgewiesen werden. Der mAde1R konnte in *Sf9*-Insektenzellen in ausreichend hoher Dichte exprimiert werden (B_{\max} -Wert $1,18 \pm 0,03$ pmol/mg Protein). In homologen Konkurrenzexperimenten wurde ein IC_{50} -Wert von 195 ± 32 nM für Adenin bestimmt. Somit konnte die Vermutung bestätigt werden, dass es sich bei dem mMrgA10-Rezeptor tatsächlich um einen Adenin-Rezeptor handelt. Die Sequenz des mAde1R wurde bereits in die Genbank eingestellt und ist unter der Gen-Bank-Nummer JN662396 zu finden.

In cAMP-Akkumulationsexperimenten an stabil mit dem mAde1R transfizierten 1321N1-Astrozytomzellen konnte gezeigt werden, dass der mAde1R, wie auch der rAdeR und der mAde2R, die Adenylatcyclase inhibiert und somit über ein G_i -Protein-gekoppelt ist. Dahingegen konnte keine G_q -gekoppelte Aktivierung der PLC für den mAde1R beobachtet werden.

Zur Charakterisierung der Struktur-Wirkungs-Beziehungen des mAde1R wurde eine Serie von Adenin-Derivaten getestet. Die höchste Affinität konnte für den Agonisten Adenin gemessen werden. Es ergibt sich folgende Reihenfolge der Affinitäten für den mAde1R: Adenin > PSB-08162 (3-Methylamino-N(9*H*-purin-6-yl)propionamid) > 2-Fluoradenin > PSB-09097 (4-Amino-N-(9*H*-purin-6-yl)butyramid) > 7-Methyladenin > PSB-09032 (8-Aminoadenin) > 1-Methyladenin > PSB-09073 (3-Amino-N-(9*H*-purin-6-yl)propionamid). In Position 1 wird die Einführung einer Methylgruppe nicht toleriert, da wahrscheinlich an dieser Position eine Interaktion mit dem Rezeptor, eine H-Brückenbindung, stattfindet. Die Einführung eines Fluor-Atoms in Position 2 wird hingegen gut toleriert. Eine Substitution in Position 6 wird generell vom mAde1R toleriert, aber nur wenn eine ausreichende Kettenlänge (> 3) oder ein entsprechend großer Rest z. B. eine Methylgruppe vorhanden ist. Jedoch scheint die Aminofunktion in dieser Position für die Interaktion mit dem Rezeptor wichtig zu sein, denn der Austausch der Aminogruppe durch eine Ketogruppe führt zu einem starken Affinitätsverlust. Die Substitution einer Methylgruppe in Position 7 wird vom mAde1R toleriert, wohingegen eine Einführung einer Aminofunktion in Position 8 nicht toleriert wird. Ein fast kompletter Affinitätsverlust konnte beobachtet werden, wenn in Position 9 eine Methyl- oder β -D-Ribofuranosylrest vorhanden war, da wahrscheinlich der Stickstoff als Donor für eine H-Brückenbindung dient. Somit ist eine Substitution in Position 2, 7 und bedingt in Position 6, wenn die Aminofunktion erhalten bleibt, möglich. Dahingegen wird eine Substitution in Position 1, 8 und 9 vom mAde1R nicht toleriert.

3.4 Exkurs: Adenin-Transporter

Purine und Pyrimidine spielen eine wesentliche Rolle in der Nucleinsäure- und Nucleotid-Metabolisierung aller Zellen. Im Wiederverwertungs-Stoffwechselprozess (*salvage pathway*) können Nucleotide (Purine und Pyrimidine) aus Abbauprodukten, die als Zwischenprodukte entstehen, re-synthetisiert werden. Somit können Nucleobasen und Nucleoside, die beim Abbau aus RNA und DNA entstehen, wiederverwertet werden. Der erste Schritt des Wiederverwertungs-Stoffwechselprozesses ist der Transport der exogenen Nucleobasen und Nucleoside durch die Plasmamembran.^{199,203} Da die meisten Nucleoside relativ hydrophil sind, können sie die Lipid-Doppelschicht nicht einfach durch passive Diffusion überwinden, sondern benötigen für die Permeation einen spezialisierten Nucleosid- bzw. Nucleobasen-Transporter.¹⁹¹ Die Nucleosid-Transporter gehören zur Superfamilie der SLC-Transporter (*solute carrier*)¹⁹² und können in zwei Familien eingeteilt werden: die equilibrativen Nucleosid-Transporter ENT (auch bekannt als SLC29-Familie)¹⁹³ und die konzentrativen Nucleosid-Transporter CNT (auch bekannt als SLC28-Familie).^{192,194} Bei den ENTs sorgt eine erleichterte, Na⁺-unabhängige Diffusion, meist von der basolateralen Seite, für den niedrig affinen Nucleosid/Nucleobasen-Transport.^{177,182,192,193,195} Hingegen erfolgt der hochaffine Nucleosid-Transport durch die CNTs aktiv gegen einen Konzentrationsgradienten in Abhängigkeit von Na⁺-Ionen.^{177,182,203} Unter physiologischen Bedingungen ist nur der Einstrom von Nucleosiden unter Cotransport von Na⁺-Ionen in die Zelle möglich, wohingegen der Mechanismus der ENTs einen Ein- und Ausstrom durch die Plasmamembran erlaubt.¹⁹⁹

Für die Nucleobase Adenin konnte ein sättigbares Transportsystem in der basolateralen Membran des Aderhaut-Epitheliums nachgewiesen werden, mit dem Adenin in die Gehirn-Rückenmarks-Flüssigkeit transportiert wird und so der Wiederverwertungs-Stoffwechselprozess im Gehirn möglich ist.¹⁸³ Endogenes Adenin ist aber auch ein wichtiger Modulator für das Zellüberleben und die Leistung des zentralen Nervensystems (ZNS) in der Ratte.¹⁸⁶ Aus der extrazellulären Flüssigkeit des ZNS kann Adenin über ein Na⁺-unabhängiges, spezifisches Transportsystem in Neuronen, aber nicht in Astrozyten, aufgenommen werden. Somit konnte in Ratten-Neuronen die Expression eines spezifischen Adenin-Transporters nachgewiesen werden.¹⁸⁶ Durch die Entfernung von Adenin aus der extrazellulären Flüssigkeit über Adenin-Transporter könnte auch die Dauer der Aktivierung von Adenin-Rezeptoren beschränkt werden.¹⁸⁶ Daher wurden die humanen Zelllinien, 1321N1-Astrozytomzellen und HEK293-Zellen, sowie die NG108-15-Zellen hinsichtlich eines Adenin-Aufnahme-Mechanismus untersucht. Auch die stabil transfizierten 1321N1-Astrozytomzellen, die den rAdeR exprimieren, wurden mir freundlicherweise von Dr. Aliaa Abdelrahman für diese Experimente zur Verfügung gestellt. Dazu wurde ein „uptake“-Assay etabliert, um die Aufnahme des Radioliganden [³H]Adenin in die Zelle messen

zu können. Dies ermöglicht eine Aussage über einen Adenin-Transporter in den entsprechenden Zelllinien. Des Weiteren wurde mit selektiven Adenin-Rezeptor-Liganden die Inhibition der [^3H]Adenin-Aufnahme untersucht. Denn der vorhandene Transport-Mechanismus kann mit funktionellen Testsystemen, wie cAMP-Experimenten, interferieren. Daher ist diese Information wichtig für Liganden, die als pharmakologische Tools in lebenden Systemen genutzt werden.¹⁵³

3.4.1 Messung der Aufnahme des Radioliganden in die Zelle

Zunächst wurde die [^3H]Adenin-Aufnahme in den 1321N1-Astrozytomzellen, HEK293- sowie NG108-15-Zellen über einen Zeitraum von 5 min gemessen. Dabei konnte beobachtet werden, dass in den HEK293- und NG108-15-Zellen keine [^3H]Adenin-Aufnahme gemessen wurde (s. Abb. 3.56 A). Somit scheint in diesen Zellen kein Adenin-Transporter exprimiert zu werden. Im Gegensatz dazu konnte ein Anstieg in der [^3H]Adenin-Aufnahme über einen Zeitraum von 5 min in Wildtyp-1321N1-Astrozytomzellen beobachtet werden (s. Abb. 3.56 A).

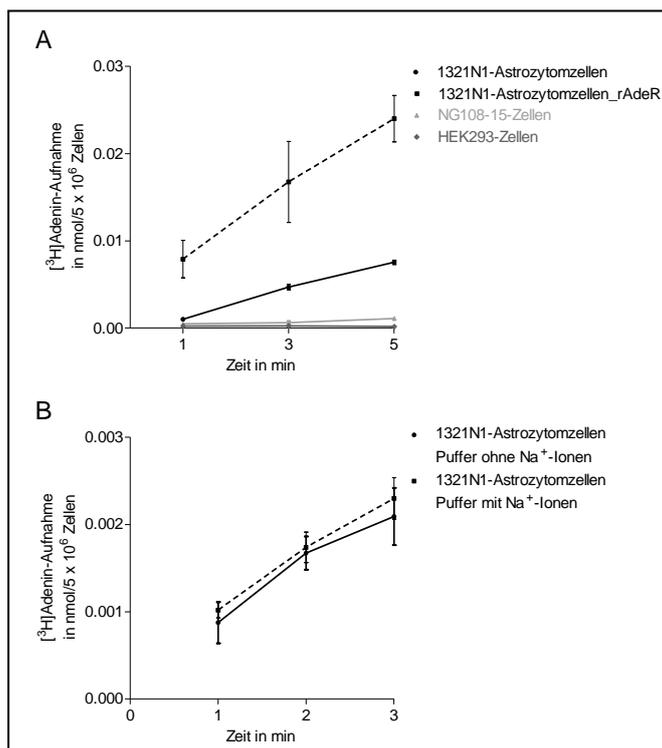


Abb. 3.56: (A) [^3H]Adenin-Aufnahme in Wildtyp- und stabil transfizierten 1321N1-Astrozytomzellen, die den rAdeR exprimieren, NG108-15- und HEK 293-Zellen. (B) Untersuchung des Einflusses von Na⁺-Ionen auf die [^3H]Adenin-Aufnahme

Allerdings ist die [^3H]Adenin-Aufnahme in den stabil transfizierten 1321N1-Astrozytomzellen, die den rAdeR enthalten, zwei-fach höher als bei den Wildtyp-1321N1-Astrozytomzellen. Eine mögliche Ursache könnte sein, dass in An-

wesenheit des Adenin-Rezeptors mehr Transporter exprimiert werden. Auch kann eine Bindung von [^3H]Adenin an den Rezeptor nicht ausgeschlossen werden. Deshalb wurden nur kurze Inkubationszeiten von max. 5 min für die Versuche angesetzt. Der Einfluss von Na^+ -Ionen im verwendeten Puffer wurde untersucht, in dem NaCl durch Cholinchlorid ausgetauscht wurde. Allerdings konnte in 1321N1-Astrozytomzellen kein Unterschied in der [^3H]Adenin-Aufnahme in An- und Abwesenheit von Na^+ -Ionen gemessen werden (s. Abb. 3.56 B). Daraus kann geschlossen werden, dass der Adenin-Transporter Na^+ -unabhängig ist und es sich somit wahrscheinlich um einen equilibrativen Nucleosid-Transporter in 1321N1-Astrozytomzellen handelt.

Anschließend wurden Kinetikexperimente durchgeführt, um die Geschwindigkeit der [^3H]Adenin-Aufnahme in die Zellen zu beobachten. Dabei wurde eine sehr schnelle Kinetik sowohl in den Wildtyp-1321N1-Astrozytomzellen ($n = 2$) als auch in den stabil transfizierten 1321N1-Astrozytomzellen ($n = 1$) festgestellt (s. Abb. 3.57). Auch hier wurde wieder eine zwei-fach höhere [^3H]Adenin-Aufnahme in stabil transfizierten 1321N1-Astrozytomzellen verglichen mit Wildtyp-1321N1-Astrozytomzellen beobachtet. Aufgrund der schnellen Kinetik wurden die weiteren „uptake“-Experimente bei einer Inkubationszeit von 30 s durchgeführt, um die Messung der [^3H]Adenin-Aufnahme im linearen Bereich zu gewährleisten.

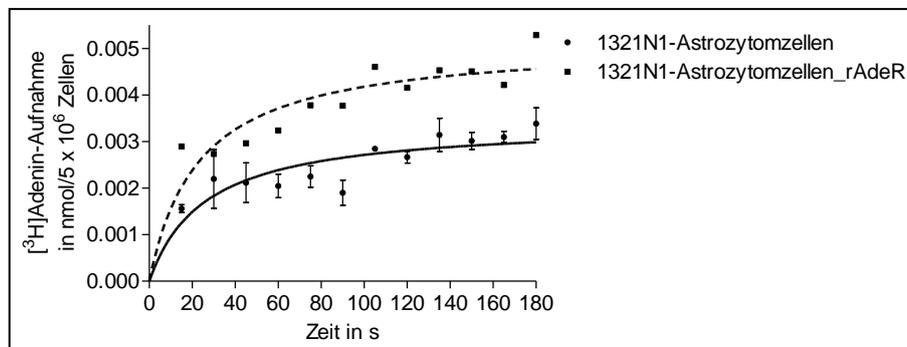


Abb. 3.57: Geschwindigkeit der [^3H]Adenin-Aufnahme an Wildtyp- und stabil transfizierten 1321N1-Astrozytomzellen, die den rAdeR exprimieren

In homologen Konkurrenzexperimenten wurde ein IC_{50} -Wert von $0,233 \mu\text{M}$ ($n = 1$), ein K_m -Wert von $0,232 \mu\text{M}$ und ein V_{max} -Wert von $0,269 \text{ fmol/mg Protein}$ in Wildtyp-1321N1-Astrozytomzellen bestimmt (s. Abb. 3.58). An stabil transfizierten 1321N1-Astrozytomzellen, die den rAdeR exprimieren, konnte ein IC_{50} -Wert von $0,392 \mu\text{M}$ ($n = 1$), ein K_m -Wert von $0,389 \mu\text{M}$ und ein V_{max} -Wert von $0,460 \text{ fmol/mg Protein}$ ermittelt werden (s. Abb. 3.58). Auch hier wurde wieder eine höhere [^3H]Adenin-Aufnahme in Anwesenheit des rAdeR gegenüber den Wildtyp-1321N1-Astrozytomzellen beobachtet.

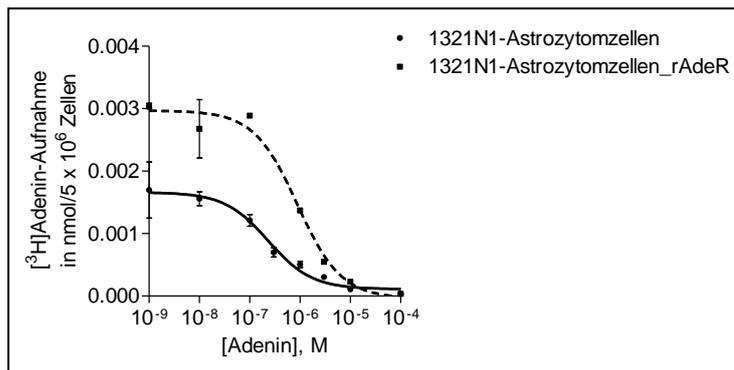


Abb. 3.58: Homologe Konkurrenzexperimente an Wildtyp- und stabil transfizierten 1321N1-Astrozytomzellen, die den rAdeR enthalten.

IC_{50} -Wert (1321N1-Astrozytomzellen) = 0,233 μ M; IC_{50} -Wert (1321N1-Astrozytomzellen mit rAdeR) = 0,392 μ M

Ebenfalls wurde der Einfluss der Temperatur untersucht, indem die Zellen 30 min vor und während der Durchführung des Experimentes auf Eis inkubiert wurden. Wie bei einem Transporter zu erwarten, wurde die $[^3\text{H}]$ Adenin-Aufnahme um $95,2 \pm 0,5\%$ inhibiert (s. Abb. 3.59). Aufgrund der schnellen Kinetik und der Inhibition des Adenin-Transporters bei 0°C wurden die weiteren „uptake“-Experimente bei einer Inkubationszeit von 30 s durchgeführt, um die Messung der $[^3\text{H}]$ Adenin-Aufnahme im linearen Bereich zu gewährleisten.

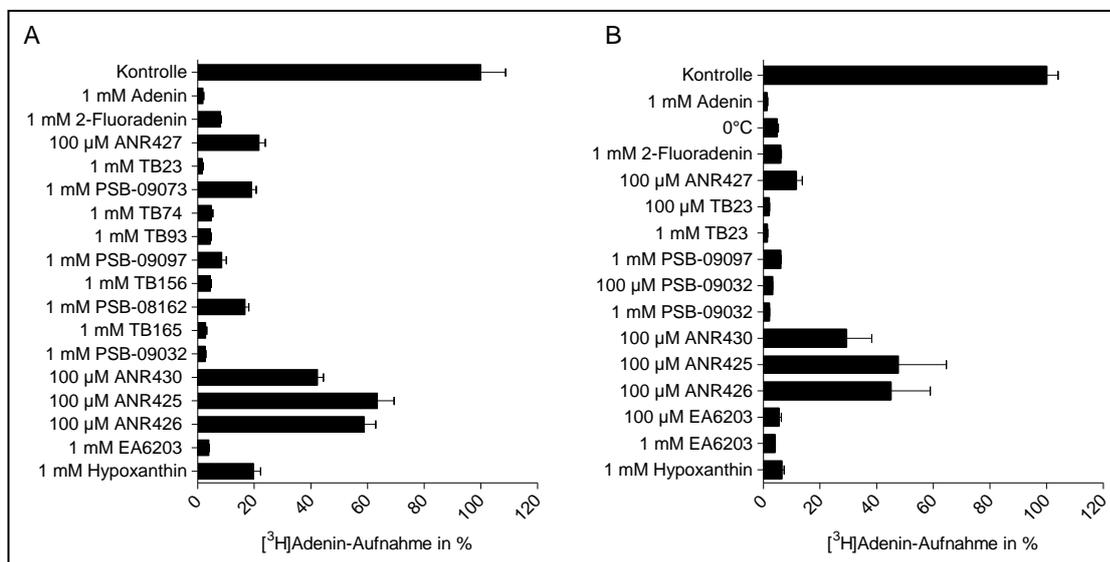
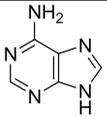
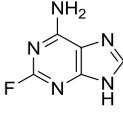
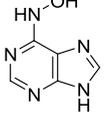
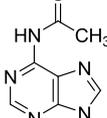
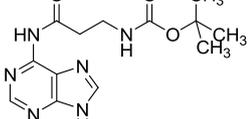
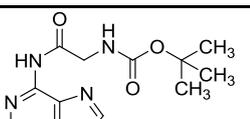
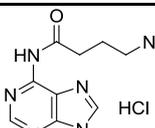
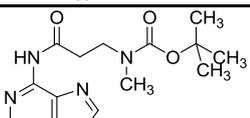


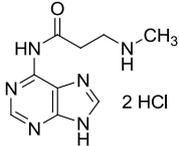
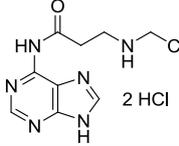
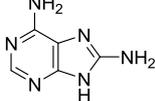
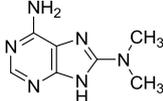
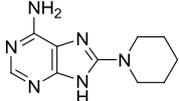
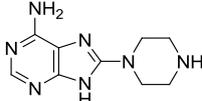
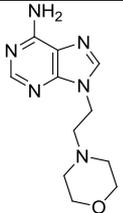
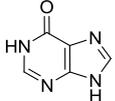
Abb. 3.59: Inhibition der $[^3\text{H}]$ Adenin-Aufnahme von selektiven Adenin-Rezeptor-Liganden (A) in Wildtyp- und (B) in stabil transfizierten 1321N1-Astrozytomzellen (B), die den rAdeR exprimieren

Ebenfalls wurde die Inhibition der $[^3\text{H}]$ Adenin-Aufnahme einiger selektiver Adenin-Rezeptor-Liganden in einer Konzentration von 1 mM und 100 μ M untersucht. Die Testverbindungen ANR425, ANR426, ANR427 und ANR430 konnten

nur bei einer Konzentration von 100 μM untersucht werden, da nicht mehr genügend Substanz vorhanden war. Als Kontrolle dienten die Wildtyp- bzw. stabil transfizierten 1321N1-Astrozytomzellen ohne Anwesenheit der Testverbindung; dieser Wert wurde als 100 % definiert. Zum Teil wurden nur ein oder auch zwei voneinander unabhängige „uptake“-Experimente in Triplikaten durchgeführt, wodurch die erhaltenen Inhibitionswerte mit Vorsicht betrachtet werden müssen (s. Tab. 3.14). Alle getesteten Verbindungen zeigen eine mehr oder weniger starke Inhibition der [^3H]Adenin-Aufnahme (s. Abb. 3.59). Eine fast vollständige Inhibition wurde für Adenin in einer Konzentration von 1 mM beobachtet, was bestätigt, dass es sich um einen aktiven Transport handelt. In den Wildtyp-1321N1-Astrozytomzellen und den stabil transfizierten 1321N1-Astrozytomzellen konnte kein signifikanter Unterschied in der Inhibition der [^3H]Adenin-Aufnahme bestimmt werden. Ebenfalls eine fast vollständige Inhibition bei einer Konzentration von 1 mM konnte mit den folgenden Verbindungen gefunden werden: 2-Fluoradenin, TB23 (N-(9H-Purin-6-yl)acetamid), TB74 (*tert*-Butyl 3-(9H-purin-6-ylamino)-3-oxo-propylcarbammat), TB93 (*tert*-Butyl 2-(9H-purin-6-ylamino)-2-oxo-ethylcarbammat), PSB-09097 (4-Amino-N-(9H-purin-6-yl)butyramid), TB156 (*tert*-Butyl 3-(9H-purin-6-ylamino)-3-oxo-propyl(methyl)carbammat), TB165 (3-(Ethylamino)-N-(9H-purin-6-yl)propionamid), PSB-09032 (8-Amino-adenin) und EA6203 (9-(2-Morpholinoethyl)-9H-purin-6-amin) (s. Abb. 3.59). Somit scheint der Adenin-Transporter eine Substitution in Position 2 mit einem Fluor-Atom, und in Position 9 mit einem Morpholinoethylgruppe, zu tolerieren. Auch stören ein kleiner Acetamid- und große voluminöse *tert*-Butyl-carbammat-Substituenten unterschiedlicher Kettenlänge in Position 6 nicht. Jedoch zeigte eine 3-Methylaminopropionamidgruppe (PSB-08162) in dieser Position eine etwas geringere Inhibition von $83,2 \pm 1,3\%$ als die um ein C-Atom längere 3-Ethylaminopropionamidgruppe (TB165) mit $97,2 \pm 0,4\%$. Auch für die Verbindung PSB-09073 mit einer 3-Aminopropionamidgruppe konnte nur eine Inhibition der [^3H]Adenin-Aufnahme von $80,9 \pm 1,6\%$ beobachtet werden, was die Vermutung weiter bestätigt. Auch ein sehr kleiner Hydroxylamin-Rest in Position 6 (ANR427) zeigt ebenfalls keine vollständige Inhibition ($78,3 \pm 2,3\%$) des Adenin-Transporters mehr. Durch die Substitution einer Ketogruppe (Hypoxanthin) anstelle der Aminogruppe in Position 6 wurde keine vollständige Inhibition ($80,3 \pm 2,4\%$) in Wildtyp-1321N1-Astrozytomzellen beobachtet. Jedoch konnte eine fast vollständige Inhibition für Hypoxanthin in stabil transfizierten 1321N1-Astrozytomzellen, die den rAdeR exprimieren, gefunden werden. Für diese Verbindung konnte ein signifikanter Unterschied in den Inhibitionswerten gezeigt werden (s. Tab. 3.14).

Tab. 3.14: Inhibition der [³H]Adenin-Aufnahme der selektiven Adenin-Rezeptor-Liganden in Wildtyp- und stabil transfizierten 1321N1-Astrozytomzellen, die den rAdeR exprimieren

Verbindung	Struktur	Inhibition bei 1 mM der [³ H]Adenin-Aufnahme			
		Wildtyp-1321N1-Astrozytomzellen	n	1321N1-Astrozytomzellen_rAdeR	n P
Adenin		98,1 ± 0,3	2	98,7 ± 0,2	2 ns
2-Fluoradenin		91,9 ± 0,3	1	93,9 ± 0,3	1 *
ANR427 N-(9H-Purin-6-yl)hydroxylamin		78,3 ± 2,3^a	2	88,5 ± 2,2	2 *
TB23 N-(9H-Purin-6-yl)acetamid		98,4 ± 0,3	2	98,7 ± 0,2	2 ns
PSB-09073 3-Amino-N-(9H-purin-6-yl)propionamid-HCl		80,9 ± 1,6	1	n.b.	
TB74 <i>tert</i> -Butyl 3-(9H-purin-6-ylamino)-3-oxopropylcarbammat		95 ± 0,5	1	n.b.	
TB93 <i>tert</i> -Butyl 2-(9H-purin-6-ylamino)-2-oxoethylcarbammat		95,6 ± 0,3	1	n.b.	
PSB-09097 4-Amino-N-(9H-purin-6-yl)butyramid-HCl		91,5 ± 1,6	1	93,9 ± 0,2	1 ns
TB156 <i>tert</i> -Butyl 3-(9H-purin-6-ylamino)-3-oxopropyl(methyl)carbammat		95,5 ± 0,4	1	n.b.	

Verbindung	Struktur	Inhibition bei 1 mM der [³ H]Adenin-Aufnahme			
		Wildtyp-1321N1-Astrozytomzellen	n	1321N1-Astrozytomzellen_rAdeR	n P
PSB-08162 3-Methylamino-N(9H-purin-6-yl)propionamid-Dihydrochlorid		83,2 ± 1,3	1	n.b.	
TB165 3-(Ethylamino)-N-(9H-purin-6-yl)propionamid-Dihydrochlorid		97,2 ± 0,4	1	n.b.	
PSB-09032 8-Aminoadenin		97,3 ± 0,2	2	97,9 ± 0,1	2 ns
ANR430 8-Dimethylamino-9H-purin-6,8-diamin		57,7 ± 2,1^a	2	70,8 ± 9,0^a	2 ns
ANR425 8-(Piperidin-1-yl)-9H-purin-6-amin		36,5 ± 5,9^a	2	52,4 ± 16,9^a	2 ns
ANR426 8-(Piperazin-1-yl)-9H-purin-6-amin		41,2 ± 4,1^a	2	55,0 ± 13,9^a	2 ns
EA6203 9-(2-Morpholinoethyl)-9H-purin-6-amin		96,0 ± 0,2	2	95,9 ± 0,1	2 ns
Hypoxanthin		80,3 ± 2,4	1	93,5 ± 0,9	2 ***

1321N1-Astrozytomzellen_rAdeR: stabil transfizierte 1321N1-Astrozytomzellen, die den rAdeR exprimieren; n: Anzahl der durchgeführten Experimente in Triplikaten; n.b. nicht bestimmt; P: die Signifikanz wurde mit einem ungepaarten t-Test bestimmt; ns: nicht signifikant $P > 0,05$; * $P < 0,05$; *** $P < 0,001$; ^a Inhibition bei 100 μM

In Position 8 zeigt die Verbindung PSB-09032 mit einer kleinen Aminogruppe eine fast vollständige Inhibition, wohingegen eine Einführung einer Dimethylgruppe (ANR 430) vom Adenin-Transporter nur wenig toleriert wird. Dahingegen führt die Substitution eines Piperazin- (ANR426) oder Piperidinrestes (ANR425) in Position 8 zu noch geringeren Inhibitionen. Somit wurde in Position 8, im Gegensatz zu Position 6, beobachtet, dass größere Substituenten eine geringere Inhibition zeigen. Die selektiven Adenin-Rezeptor-Liganden, die in

cAMP-Experimenten getestet wurden, inhibieren auch die [³H]Adenin-Aufnahme (s. Tab. 3.15). Jedoch wurden andere Struktur-Wirkungs-Beziehungen beobachtet.¹⁵³ Die Verbindungen ANR427, ANR430, ANR425 und ANR426 zeigen am rAdeR hohe Inhibitionen, wohingegen die [³H]Adenin-Aufnahme am Adenin-Transporter wesentlich niedriger war.

Tab. 3.15: Inhibition der [³H]Adenin-Aufnahme der selektiven Adenin-Rezeptor-Liganden in Wildtyp- und stabil transfizierten 1321N1-Astrozytomzellen, die den rAdeR exprimieren, verglichen mit den Ergebnissen aus [³H]Adenin-Bindungsstudien an Rattencortex- und HEK293-Membranpräparationen

Verbindung	Inhibition bei 100 µM der [³ H]Adenin-Aufnahme (%) (n = 2)	Inhibition bei 100 µM vs. 10 nM [³ H]Adenin (%) (n = 3)	
		rAdeR	nativ HEK293
Adenin	97,1 ± 0,2	95 ± 4 ^a	83 ± 2 ^a
ANR427	88,5 ± 2,2	97 ± 3 ^a	92 ± 3 ^a
TB23	97,9 ± 0,2	119 ± 6 ^b	88 ± 2 ^a
PSB-09032	96,9 ± 0,1	100 ± 7 ^b	78 ± 4 ^a
ANR430	70,8 ± 9,0	92 ± 1 ^a	70 ± 3 ^a
ANR425	52,4 ± 16,9	88 ± 1 ^a	42 ± 2 ^a
ANR426	55,0 ± 13,9	94 ± 1 ^a	61 ± 2 ^a
EA6203	94,6 ± 0,9	97 ± 0 ^b	79 ± 2 ^a

1321N1-Astrozytomzellen_rAdeR: stabil transfizierte 1321N1-Astrozytomzellen, die den rAdeR exprimieren; rAdeR: Rattencortex-Membranpräparationen; nativ HEK293: Membranpräparationen von nativen HEK293-Zellen; ^a Daten von Aliaa Abdelrahman; ^b Daten von Simone Gorzalka

3.4.2 Zusammenfassung

In Ratten-Neuronen konnte die Expression eines spezifischen Adenin-Transporters gezeigt werden.¹⁸⁶ Da die *in vivo*-Wirkung von Adenin und Derivaten durch Adenin-Transporter beeinflusst werden kann, wurde untersucht, ob die von uns verwendeten 1321N1-Astrozytomzellen, sowie die häufig für die Rezeptor-Expression eingesetzten HEK293-Zellen, und die als Modelle für neuronale Zellen verwendeten NG108-15-Zellen Adenin-Transporter besitzen. Hierzu wurde ein „uptake“-Assay etabliert, um die Aufnahme des Radioligand [³H]Adenin in die Zelle messen zu können. Des Weiteren wurde die Inhibition der [³H]Adenin-Aufnahme durch verschiedene Adenin-Derivate untersucht.

Ein aktiver, Na⁺-unabhängiger Adenin-Transporter konnte in Wildtyp-1321N1-Astrozytomzellen (sowie solchen, die den rAdeR exprimieren) nachgewiesen werden. Hingegen scheinen die HEK293-Zellen und NG108-15-Zellen keinen Adenin-Transporter zu exprimieren.

In Kinetikexperimenten konnte eine sehr schnelle Kinetik in den 1321N1-Astrozytomzellen beobachtet werden. Aufgrund der schnellen Kinetik und der Inhibition des Adenin-Transporters bei 0 °C wurden die weiteren „uptake“-Experimente bei einer Inkubationszeit von 30 s durchgeführt, um die Messung der [³H]Adenin-Aufnahme im linearen Bereich zu gewährleisten.

Einige Adenin-Derivate, die den rAdeR bzw. Adenin-Rezeptoren in nativen HEK293-Zellen aktivieren, hemmen auch den Adenin-Transporter, wobei sich die erhaltenen Struktur-Wirkungs-Beziehungen jedoch unterscheiden. Allerdings sind noch mehr „uptake“-Experimente notwendig, um den Adenin-Transporter weiter charakterisieren zu können.

4 Zusammenfassung

Im Jahre 2002 identifizierten Bender *et al.* die Nucleobase Adenin als den physiologischen Agonisten eines G-Protein-gekoppelten „Orphan“-Rezeptors der Ratte, der mit nanomolarer Affinität an den Rezeptor bindet. Dieser Ratten-Adenin-Rezeptor (rAdeR) ist über ein G_i -Protein inhibitorisch an die Adenylatcyclase gekoppelt.¹³³ Da [³H]Adenin in hoher Affinität an alle von uns bisher untersuchten permanenten Säugetierzelllinien bindet, sind diese Zelllinien als Expressionssysteme für Adeninrezeptoren ungeeignet. Die Expression des Maus-Adenin-Rezeptors Subtyp 2 (mAde2R) erfolgte daher in Sf21-Insektenzellen als geeignetem Expressionssystem.¹⁶⁶ Basierend darauf wurde in der vorliegenden Arbeit die **Expression des rAdeR in Sf9-Insektenzellen etabliert**, um eine genauere Charakterisierung dieses Rezeptors zu ermöglichen.

- Der rAdeR konnte in sehr hoher Dichte in Sf9-Zellen exprimiert werden (B_{max} -Wert $7,85 \pm 1,83$ pmol/mg Protein).
- Die Ko-Expression des rAdeR und humaner G_i -Proteinuntereinheiten in Sf9-Insektenzellen ergab eine signifikante Erhöhung der [³H]Adenin-Affinität um etwa den Faktor 3, was sowohl in Sättigungsexperimenten, als auch in homologen Kompetitionsexperimenten gezeigt werden konnte.
- Es gelang, Antikörper zu designen und zu entwickeln, welche zur Kontrolle der Expression des rAdeR in Sf9-Insektenzellen verwendet werden können, und die auch den natürlich vorkommenden rAdeR in Rattencortex-Membranpräparationen in Western Blot-Experimenten detektieren.

Um die Bindungsstelle für das Adenin im Rezeptor genauer einzugrenzen, wurden **Mutagenese-Studien** durchgeführt basierend auf dem publizierten 3D-Modell des rMrgA-Rezeptors (Q7TN49)¹⁶⁴ sowie auf einem von Heiko Meyer und Dr. Anke Schiedel im Arbeitskreis Müller auf der Basis kürzlich publizierter GPCR-Röntgenstrukturen weiterentwickelten Rezeptormodells. Die neun Aminosäuren F110, N115, N173, L201, H252, F179, N194, F195 und Y268 wurden gegen Alanin ausgetauscht und die erhaltenen Mutanten wurden in Radioligand-Bindungsstudien hinsichtlich ihrer Affinität (Sf9 rAde-Mutanten) und Aktivierbarkeit (Sf9 rAde-Mutanten+ G_α + $G_{\beta\gamma}$) untersucht.

- Ein sehr geringer bzw. geringer Affinitätsverlust konnte für folgende Mutanten in [³H]Adenin-Bindungsstudien beobachtet werden: F195A, Y268A, N173A bzw. H252A und N115A (s. Abb. 4.1). Jedoch scheinen die Aminosäuren nicht direkt an der Bindung beteiligt zu sein, da sie keinen drastischen Affinitätsverlust bewirken. **Die postulierten Modelle**

zur Bindung des Adenins im Rezeptor konnten nicht bestätigt werden.

- In [³⁵S]GTPγS-Bindungsstudien zeigten die Mutanten N194A und L201A keine Aktivierbarkeit des Rezeptors mehr (s. Abb. 4.1). Diese beiden Aminosäuren sind in der oberen Hälfte von TM5 bzw. am Übergang vom EL2 zur TM5 lokalisiert. Sie scheinen eine wichtige Rolle bei der Konformationsänderung zu spielen, die zur Aktivierung des Rezeptors führt.

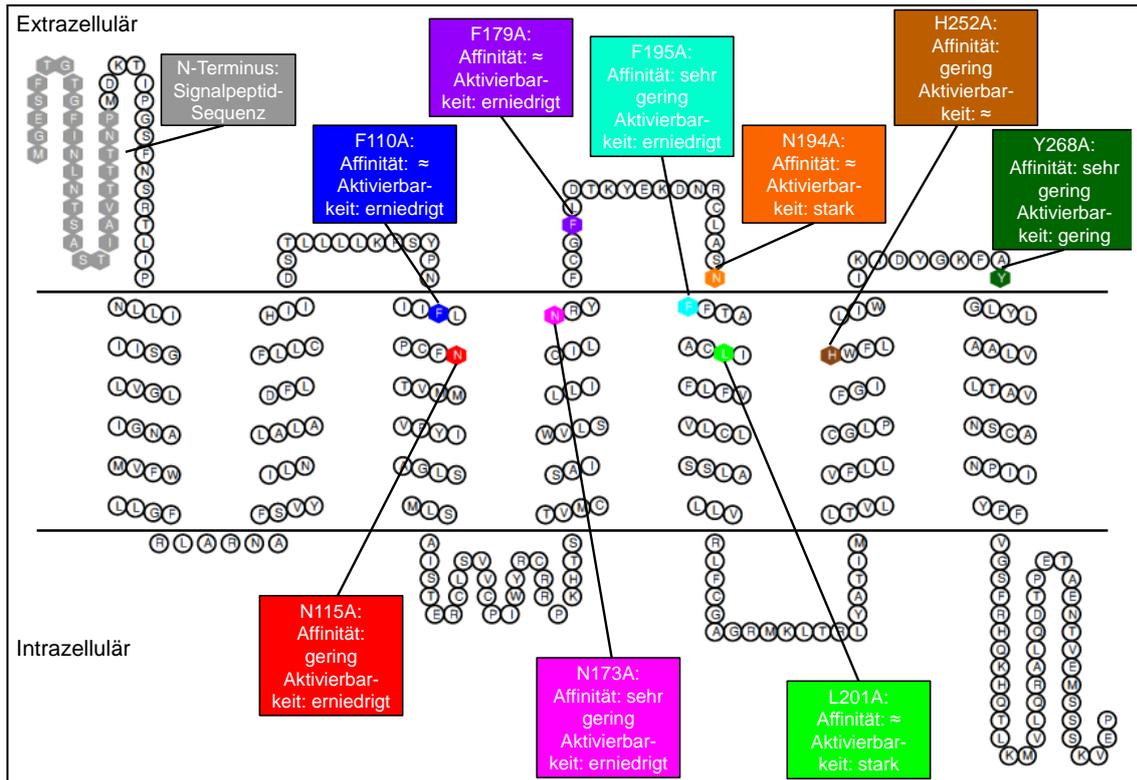


Abb. 4.1: Snake-Plot des rAdeR mit den in Mutagenesestudien erhaltenen Ergebnissen für den Agonisten Adenin

Affinität: ≈: kein signifikanter Unterschied zum Wildtyp-rAdeR; sehr gering: der IC_{50} -Wert wurde um den Faktor 1,2-1,6 erhöht; gering: der IC_{50} -Wert wurde um den Faktor 2,5-3 erhöht

Aktivierbarkeit: ≈: kein signifikanter Unterschied zum Wildtyp-rAdeR; gering: der EC_{50} -Wert wurde um den Faktor 11 erhöht; stark: keine Aktivierbarkeit mehr; erniedrigt: der EC_{50} -Wert wurde um den Faktor 3-13 erniedrigt

- Darüber hinaus konnte durch Western Blot-Experimente gezeigt werden, dass die ersten 27 Aminosäuren des N-Terminus eine Signalpeptid-Sequenz darstellen und durch Signalpeptidasen im endoplasmatischen Retikulum abgespalten werden.
- Der rAdeR enthält, wie im rAdeR-Modell vorhergesagt, keine essentiellen extrazellulären Disulfidbrücken. Sowohl bezüglich der Affinität für [³H]Adenin, als auch in der Aktivierbarkeit des Rezeptors konnte kein sig-

nifikanter Unterschied in An- und Abwesenheit des Disulfid-reduzierenden Reagenzes Dithiothreitol (10 mM) beobachtet werden.

Der Maus-„Orphan-Rezeptor“ mMrgA10 stellt nach bioinformatischer Analyse das Maus-Orthologe des rAdeR dar, codiert also vermutlich für den **Maus-Adenin-Rezeptor Subtyp 1, mAde1R** (XM_195647).¹³³ Bisher fehlte jedoch der Nachweis, dass die Sequenz des mMrgA10-Rezeptors tatsächlich ein Adenin-Rezeptor ist.^{142,145} Im Rahmen dieser Arbeit wurde der mMrgA10-Rezeptor umfassend charakterisiert unter Einsatz des bereits für den rAdeR und den mAde2R etablierten Insektenzell-Expressionssystems.

- Der mAde1R konnte in *Sf9*-Insektenzellen in ausreichend hoher Dichte exprimiert werden (B_{\max} -Wert $1,18 \pm 0,03$ pmol/mg Protein). In homologen Konkurrenzexperimenten wurde ein IC_{50} -Wert von 195 ± 32 nM für Adenin bestimmt. Somit konnte die Vermutung bestätigt werden, dass es sich bei dem mMrgA10-Rezeptor tatsächlich um einen Adenin-Rezeptor handelt. Die Sequenz des mAde1R wurde bereits in die Genbank eingestellt und ist unter der Gen-Bank-Nummer JN662396 zu finden.
- In cAMP-Akkumulationsexperimenten an stabil mit dem mAde1R transfizierten 1321N1-Astrozytomzellen konnte gezeigt werden, dass der mAde1R, wie auch der rAdeR und der mAde2R, die Adenylatcyclase inhibiert und somit über ein G_i -Protein gekoppelt ist.

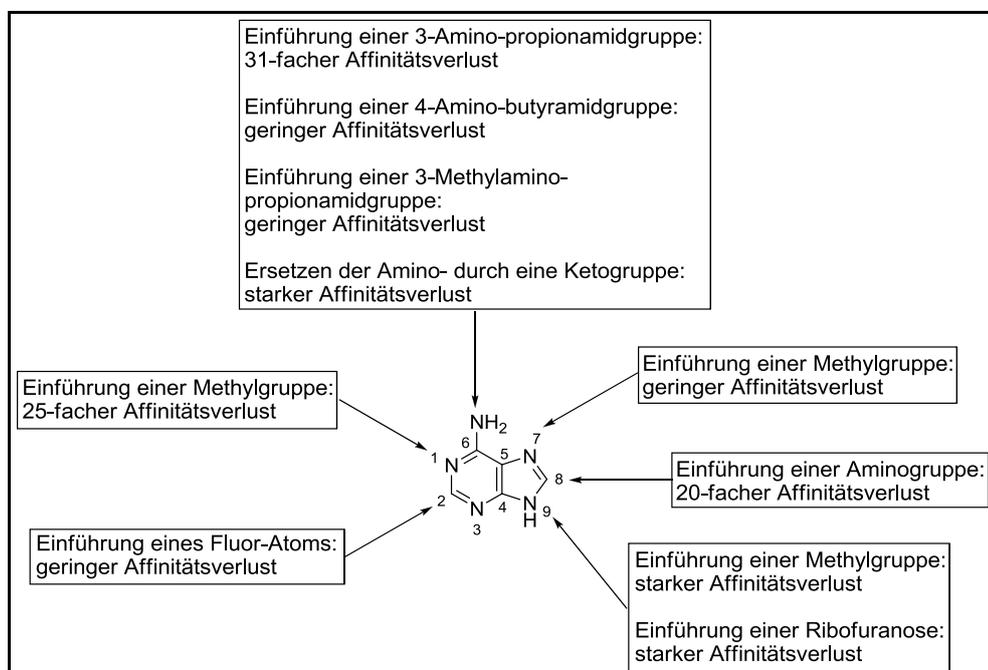


Abb. 4.2: Struktur-Wirkungs-Beziehungen des mAde1R

- Zur Charakterisierung der Struktur-Wirkungs-Beziehungen des mAde1R wurde eine Serie von Adenin-Derivaten getestet (s. Abb. 4.2). Es ergibt

sich folgende Reihenfolge der Affinitäten für den mAde1R: Adenin > PSB-08162 (3-Methylamino-N(9*H*-purin-6-yl)propionamid) > 2-Fluoradenin > PSB-09097 (4-Amino-N-(9*H*-purin-6-yl)butyramid) > 7-Methyladenin > PSB-09032 (8-Aminoadenin) > 1-Methyladenin > PSB-09073 (3-Amino-N-(9*H*-purin-6-yl)propionamid).

Da die *in vivo*-Wirkung von Adenin und Derivaten durch **Adenin-Transporter** beeinflusst werden kann, wurde untersucht, ob die von uns verwendeten 1321N1-Astrozytomzellen, sowie die häufig für die Rezeptor-Expression eingesetzten HEK293-Zellen, und die als Modelle für neuronale Zellen verwendeten NG108-15-Zellen Adenin-Transporter besitzen. Hierzu wurde ein „uptake“-Assay etabliert, bei dem die Aufnahme des Radioliganden [³H]Adenin in die Zellen gemessen wurde. Des Weiteren wurde die Inhibition der [³H]Adenin-Aufnahme durch verschiedene Adenin-Derivate untersucht.

- Ein aktiver, Na⁺-unabhängiger Adenin-Transporter konnte in Wildtyp-1321N1-Astrozytomzellen (sowie solchen, die den rAdeR rekombinant exprimieren), nachgewiesen werden. Hingegen scheinen die HEK293-Zellen und NG105-15-Zellen keinen Adenin-Transporter zu exprimieren.
- Der Adenin-Transporter in den Astrozytomzellen besitzt eine sehr schnelle Kinetik.
- Einige Adenin-Derivate, die den rAdeR bzw. Adenin-Rezeptoren in nativen HEK293-Zellen aktivieren, hemmen auch den Adenin-Transporter, wobei sich die erhaltenen Struktur-Wirkungs-Beziehungen jedoch unterscheiden.

Die vorliegende Arbeit liefert damit wichtige Beiträge zur Charakterisierung der neu entdeckten Familie der G-Protein-gekoppelten Adenin-Rezeptoren sowie erste Informationen über Adenin-Transporter, die vermutlich eine wichtige Rolle bei der Regulation der extrazellulären Adenin-Konzentration spielen. Die Ergebnisse der molekularbiologischen, pharmakologischen und medizinisch chemischen Untersuchungen der Adenin-Rezeptoren können als Grundlage dienen, um weitergehende Einblicke in die Ligand-Bindungstasche und die Rezeptor-Aktivierung der Rezeptoren zu erlangen.

5 Experimenteller Teil

5.1 Allgemeine Angaben

5.1.1 Geräte und Materialien

Analysenwaage	CP225D, Sartorius
Autoklav	Varioklav [®] Dampfsterilisator, H+P
Bakterienschüttler	Innova 4200 Incubator Shaker, New Brunswick Scientific (USA)
Brutschränke	IG 650, Jouan HERAcell [®] 240, Heraeus
Brutschrank für Insektenzellen	SHKE6000, Thermo Scientific
Elektrophorese-Kammer, horizontal	Schütt Labortechnik
Elektrophorese-Kammer, vertikal	Mini Protean II [™] , BioRad
Fluorimeter	Novostar [®] , bmg Labtech
Fotodokumentationssystem	Geldoc, BioRad
Glasfaserfilter	GF/B Glass fibre cuts, Ref. No. 10428183, Whatman
Hamiltonspritze	Syringes 705 (10 µl), Roth
Harvester	Brandell M24 Gaithersburg, MD, USA Brandell M48 Gaithersburg, MD, USA
Heizblock	Thermomixer comfort, Eppendorf
Homogenisator	RW 16 basic, IKA Labortechnik
Laminar-Airflow-Werkbänke	Nunc [®] Bioflow Nunc [®] Safe flow 1.2
LSC	TRICARB [®] 2900TR, Packard / Perkin-Elmer
Magnetrührer und Heizplatte	RCT Basic, IKA Labortechnik
Mikroskop	Axiovert 25, Zeiss
Mikrotiterplatten	6 Well- und 24 Well-Zellkultur-Platten, Sarstedt 96 Mikrotiter-Platte clear schwarz transparenter Boden (655096), Labomedic 96 Mikrotiter-Platte durchsichtig V-Boden (9292.1), Roth
Mikrowelle	Microwave 800, Severin
Multipette	Multipette Plus, Eppendorf
Neubauer Zählkammer	Marienfeld Germany
pH-Meter	691 pH Meter, Metrohm S20-Seven Easy [™] , Mettler Toledo
Photometer	DU [®] 530, Beckmann
Pipetten	Eppendorf research (0,5-10 µl, 10-100 µl, 20-200 µl, 100-1000 µl)
Pipettenspitzen	Greiner Plastibrand [®] , Brand Biosphere [®] Filterspitzen, Sarstedt
Pipettierhilfen	Pipettus Akku, Eppendorf Accu Jet, Brand

Safe-Lock Reaktionsgefäße	Eppendorf
Schüttelwasserbad	GFL [®] 1083
Software	ChemBioDraw Ultra 11.0, Cambridge Soft
	Chromas 1.45, Conor McCarthy
	Clone Manager 9, Sci-Ed
	ClustalW2, European Bioinformatics Institute
	DNAtrans 2.0, Dr. A. Schiedel / J. Bosmann
	Excel 2007, Microsoft [®]
	OligoAnalyzer 3.1, IDT Scitools
	Prism [®] 4.0, GraphPad, San Diego, CA, USA
	TOPO2, http://plato.sacs.ucsf.edu/cgi-bin/open-topo2.py
	Word 2007, Microsoft [®]
	ZADAS, Matthias Zepper
Spannungsgerät (Elektrophorese)	Power Pac [®] 3000, BioRad
Sterilfilter	Filtropur 0,22 µm, Sarstedt, 831826001
Thermocycler	Px2 Thermal Cycler, Thermo Scientific
	T Personal, Biometra
Tischzentrifugen	Allegra [®] 21R, Beckman
Ultraturrax	T25 basic, IKA Labortechnik
Ultraschallbad	SONOREX RK 52H, Bandelin
Ultraschallstab	HD2070 Sonoplus, Bandelin
Vortexer	Minishaker MS1, IKA Labortechnik
Waage	SBC 42, SCALTEC
Wasserbad mit Schüttler	1083, GFL [®]
Zentrifugen	Avanti [™] J-201, Beckman
	BIOFUGE pico, Heraeus
	BIOFUGE primo R, Heraeus
	Rotofix 32, Hettich
Zentrifugenröhrchen	Ultra-Clear [®] Tubes, Beckman
Zellkulturflaschen	175 cm ² , 75 cm ² , 25 cm ² , steril, Sarstedt
Zellkulturschalen	175 cm ² , steril, Sarstedt

5.1.2 Chemikalien

5.1.2.1 Kommerziell bezogene Chemikalien

Acrylamid	Acros, 164859000
Adeninsulfat	AppliChem, A596
Adenosin	Sigma, A9251
Agarose	AppliChem, A2118
Ammoniumperoxodisulfat	Acros, 401165000
Ampicillin-Natriumsalz	AppliChem, A0839
BioMix [™] Red	Bioline, Bio25005
Bromphenolblau-Natriumsalz	AppliChem, A3640
BSA	Sigma, A7906
CaCl ₂ x 2 H ₂ O	Fluka, 21097
cAMP-Standard, 2000 pmol/ml	Biomol, 80-0056
CuSO ₄ x 5 H ₂ O	AppliChem, A1034
Diethylpyrocarbonat	AppliChem, A0881
DMSO	Acros Organics A015959701

DMSO, steril	AppliChem, A3672
dNTPs 10 mM	Invitrogen, 18427-013
DTT	AppliChem, A1101
EDTA, Dinatriumsalz	Sigma, E5134
Eisessig	Merck, 100631011
Ethanol absolut zur Analyse	Merck, 100983
Ethidiumbromid-Lösung	AppliChem, A1152
EUROMED Entwickler für Entwicklungsmaschine	Christiansen, E1000
EUROMED Fixierer für Entwicklungsmaschine	Christiansen, F1000
2-Fluoradenin	Sigma, 535087
Folin's reagent	Sigma, F9252
Forskolin	Applichem, 66575-29-9
GDP, Lithiumsalz	Applichem, A3767
GDP, Natriumsalz	Sigma, G7127
Gel Red Nucleic Acid Stain, 10000 x in water	Biotrend, 41003
D-(+)-Glucose, wasserfrei	Sigma, G7021
Glycerol	Acros, 158920010
Glycin	Riedel-de-Haen, 33226
GTP, Natriumsalz	AppliChem, A1803
GTPyS, Tetralithiumsalz	Sigma, G8634
Hefeextrakt	AppliChem, A3732
HEPES	Sigma, H3375
Isoprenalin-HCl	Fluka, 59650
Isopropanol	Merck, 109634
KCl	AppliChem, A2939
K ₂ HPO ₄	AppliChem, A1363
KH ₂ PO ₄	Sigma, P9791
6 x Ladepuffer	Fermentas, R0611
Lambda DNA / EcoRI+HindIII Marker	Fermentas, SM0191
LB-Agar	Invitrogen, 22700-041
LB-Pulver-Medium	AppliChem, A0954
Luma Safe Szintillationscocktail	Perkin Elmer, 3087
Mark12™ Unstained Standard	Invitrogen, LC5677
MAX Efficiency® DH10Bac™ <i>E. coli</i>	Invitrogen, 10361-012
2-Mercaptoethanol	Sigma, M6250
Methanol	ProLab, 20847307
1-Methyladenin	Acros Organics, 20131
7-Methyladenin	Acros Organics, 36540
9-Methyladenin	Acros Organics, 325871000
MgCl ₂	Fluka Biochemika, 63068; Sigma, M8266
MgSO ₄ x 7 H ₂ O	Sigma, M2643
Milchpulver	Roth, T145.2
NaCl	Sigma, P9541
Na ₂ CO ₃	AppliChem, A1881
NaHCO ₃	AppliChem, A3590
Na ₂ HPO ₄	Sigma, S3264
NaH ₂ PO ₄	AppliChem, A4732
NaOH	Fluka, 71689
Novex® Sharp Pre-stained Protein Standard	Invitrogen, LC5800
Omniscript RT Kit	Quiagen, 205111

Oligo-dt Primer	Quiagen, 79237
Oregon Green 488 BAPTA-1/AM	Invitrogen, O6807
Phi-Marker	Biolabs, 142940
Pluronic [®] F-127	Sigma, P2443
PonceauS	Roth, 5938.1
Primer	Synthese durch Invitrogen
Pure Link genomic DNA Kit	Invitrogen, K182001
Pure Link Midipräp Kit	Invitrogen, K210015
Restriktionsenzyme (BamHI, BgIII, EcoRI, MluI, NotI, XbaI, XhoI)	New England Biolabs und Fermentas
RNase (Ribonuklease A)	Sigma, R4875
RNase Exitus	AppliChem
Salzsäure 37 %	AppliChem, A0659
SDS	Acros, 419531000
SDS, 20 % Lösung	ZVE, Uni Bonn
SuperSignal WestPico	Fisher Scientific, 34077
Chemiluminescent Substrat	
T4 DNA-Ligase	New England BioLabs, M0202S
TEMED	Acros, 420580500
Trichloressigsäure, 20 % Lösung	AppliChem, 5900
Tricin	Sigma, T5816
Tris-HCl (TRIZMA [®] Base)	Sigma, T223271
Triton [®] X-100	AppliChem, A13388
TRIzol Reagenz	Invitrogen, 15596-018
Trypton	Roth, 8952.1
Tween [®] 20	AppliChem, 1389
VentR [®] -Polymerase	New England BioLabs, M0254S
Zymoclean Gel DNA Recovery Kit	ZymoResearch, D4002
ZR BAC DNA Miniprep Kit	ZymoResearch, D4049
ZR DNA Clean & Concentration Kit	ZymoResearch, D4033
ZR Plasmid Miniprep Kit Classic	ZymoResearch, D4054

Alle nicht aufgeführten Chemikalien wurden von AppliChem oder Sigma bezogen.

5.1.2.2 Nicht kommerziell bezogene Chemikalien und Zellkulturbedarf

ANR-Verbindungen	AK G. Cristalli, Chemisches Institut der Universität Camerino, Italien
Cholinchlorid	AK D. Gündisch, UH Hilo College of Pharmacy, Hawaii
EA-Verbindungen	AK E. Alksnis, Latvian Institute of Organic Synthesis, Lettland
PSB-Verbindungen	AK C. E. Müller, Pharmazeutisches Institut, Bonn
Humaner Virus von G _α - und G _{βγ} -Proteinen	AK R. Seifert, Institut für Pharmazie, Regensburg

5.1.2.3 Zellkulturbedarf und Nährmedien

Amicon Ultra 30.000 kDa, 15 ml	Faust, UFC903008
--------------------------------	------------------

Baculo Gold DNA	BD Bioscience, 554739
BD BaculoGold™ Transfection Buffer A & B Set	BD Bioscience, 554806
Cellfectin® II Reagent	Invitrogen, 10362-100
DMEM (Dulbecco's modified Eagle Medium)	Gibco, 41966-029; Cambrex, BE12-604F
Einmalspritzen, steril	Braun
Falcon Tubes	Greiner bio-one, 188271; Sarstedt, 62.547.254
Fötale Kälberserum	Sigma, F0804
G418	Calbiochem, 34510
Gentamycinsulfat	Roth, 0233.1
Gewebekulturflaschen, steril	Greiner bio-one; Sarstedt
HAT-Supplement (50 x)	Invitrogen, 21060-017
Hygromycin B	Calbiochem, 40052
Hypoxanthin	AppliChem, A0700
Insect-Xpress	Lonza, US 12-730F
IPTG	Roth, CN08.1
Kanamycinsulfat	Roth, T832.1
Kryovials, steril	Greiner bio-one; Sarstedt
Lipofectamin™ 2000	Invitrogen, 11668-027
Mycophenolsäure	Applichem, A38010100
Natriumbutyrat	Sigma, 19364
Penicillin-Streptomycin-Lösung	Cambrex, DE17-602E
Phenolrot-Lösung	Sigma, P0290
Polybren	Aldrich, 107689
Rotilabo®-Spritzenfilter, steril, 0.22 µm	Roth, P644.1
RPMI Medium 1640	Invitrogen, 22400-089
Serologische Einmalpipetten, steril	Sarstedt, costar® Stripette
Tetracyclin-HCl	Roth, HP63.1
Trypsin-Lösung 2,5 %	Labomedic, 17-160
Ultraglutamin	Cambrex, BE17-605E/U1
Xanthin	Sigma, X-7375
X-Gal	VWR, 437132J

5.1.3 Radioliganden

Radioligand	Spezifische Aktivität [Ci/mmol]	Firma
[2,8- ³ H]Adenin	27,2	Perkin Elmer, NET063005
[2,8- ³ H]Adenosin 3',5'-cyclisches phosphat, Ammoniumsalz	34	Perkin Elmer, NET275001
[³⁵ S]Guanosin 5'-(γ-thio)triphosphat	1250	Perkin Elmer, NEG030H

5.1.4 Kultivierte Zelllinien

Zelllinie	Spezies	Organ / Zelltyp	Bezugsquelle
1321N1-Astrozytomzellen	Human	Hirn	Sigma-Aldrich, 86030402
9E10- <i>myc</i> -monoklonale Antikörper Zellen	Maus	Hybridomzellen, B-Lymphozyten	ATCC™, CRL-1729

Zelllinie	Spezies	Organ / Zelltyp	Bezugsquelle
GP+envAM12-Zellen	Maus	Embryo-Fibroblasten	ATCC TM , CRL-9641
HEK293-Zellen	Human	Niere	AK M. Gütschow, Pharmazeutisches Institut, Bonn
NG108-15-Zellen	Maus / Ratte	Gehirn (Mäuse-Neuroblastom x Ratten-Gliom-Hybridzellen)	AK I. von Kügelgen, Pharmakologisches Institut, Bonn
Sf9-Insektenzellen	Insekten	Ovarien	AK M. Wiese, Pharmazeutisches Institut, Bonn

5.1.5 Puffer und Lösungen

5.1.5.1 Lösungen für die Zellkultur

Lösungen	Komponente	Mw [g/mol]	Molarität	Einwaage
PBS-Puffer zum Waschen der Zellen	NaCl	58,5	137 mM	8,00 g
	KCl	74,6	2,7 mM	0,20 g
	Na ₂ HPO ₄ x 2 H ₂ O	178,0	4,3 mM	0,77 g
	KH ₂ PO ₄	136,1	1,47 mM	0,20 g
	→ ad 1,0 l Aqua dest., mit HCl (37 %) auf pH 7,4, autoklavieren, Lagerung bei RT			
EDTA-Stammlösung	EDTA	372,2	0,1 M	37,22 mg
→ ad 1,0 l Aqua dest., mit NaOH auf pH 7,6, Lagerung bei RT				
0,05 % Trypsin / 0,6 mM EDTA-Lösung zum Ablösen der Zellen	EDTA-Stammlösung		0,1 M	6 ml
	→ ad 1,0 l PBS-Puffer, autoklavieren			
	Trypsin-Lösung		2,5 %igen	20 ml
	Phenolrot-Lösung		0,5 %igen	750 µl
→ steril Filtration unter der sterilen Werkbank, Lagerung bei 4 °C				
Natriumbutyrat-Lösung	Natriumbutyrat	110,1	500 mM	0,55 g
→ ad 10 ml Aqua dest., steril Filtration, Lagerung bei -20 °C				

5.1.5.2 Lösungen für die Molekularbiologie

Lösungen	Komponente	Mw [g/mol]	Molarität	Einwaage
50 x TAE-Puffer für die Agarosegel-elektrophorese	Tris-HCl	121,1	2 M	0,24 g
	EDTA	372,2	50 mM	18,61 g
	Eisessig			57,1 ml
→ ad 1,0 l Aqua dest., autoklavieren, Lagerung bei RT, vor dem Gebrauch 1 : 50 verdünnen				
6 x Ladepuffer für die Agarosegel-elektrophorese	Bromphenolblau		0,25 %	25 mg
	Glycin			5 ml
	Aqua dest.			5 ml
→ Lagerung bei 4 °C				

SOC-Medium zur Trans- formation	Trypton			2,00 g
	Hefeextrakt			0,50 g
	NaCl	58,5	8,55 mM	0,05 g
	KCl	74,6	2,5 mM	18,65 mg
	MgCl ₂ -Stamm- lösung	95,2	2 M	0,5 ml
	Glucose-Stamm- lösung	180,2	1 M	2 ml
→ ad 100 ml Aqua dest., autoklavieren → steril Filtration der Glucoselösung, mit NaOH auf pH 7,0; Lagerung bei -20 °C				
DEPC-Wasser für die mRNA- Isolierung	Diethylpyrocarbonat			10 µl
	→ ad 100 ml Aqua dest., über Nacht rühren, autoklavieren, Lagerung bei RT			

5.1.5.3 Lösungen für das Bac-to-Bac-Expressionssystem

Kanamycinsulfat	10 mg ad 1 ml Aqua bidest.	→ steril Filtration, Lagerung bei -20 °C
Gentamycinsulfat	7 mg ad 1 ml Aqua bidest.	→ steril Filtration, Lagerung bei -20 °C
Tetracyclin-HCl	10 mg ad 1 ml Ethanol 100 %	→ steril Filtration, Lagerung bei -20 °C unter Lichtausschluss
X-Gal	20 mg ad 1 ml DMSO	→ Lagerung bei -20 °C unter Lichtausschluss
IPTG	40 mg ad 1 ml Aqua bidest.	→ steril Filtration, Lagerung bei -20 °C

5.1.5.4 Lösungen für die Proteinbestimmung nach Lowry

A	Na ₂ CO ₃	2 %	10,00 g	
	NaOH	0,1 N	ad 500 ml	
B	CuSO ₄ x 5 H ₂ O	0,5 %	0,25 g	→ CuSO ₄ und Na-tartrat getrennt lösen und anschließend vereinen.
	Na-tartrat	1 %	0,50 g	
	Aqua bidest.		ad 50 ml	
C	Reagenz A		50 Teile z. B. 25 ml	→ Lösung unmittelbar vor Gebrauch herstellen.
	Reagenz B		1 Teil z. B. 0,5 ml	
D	Folin-Reagenz		18 ml	→ Lösung unter Lichtausschluss bei RT lagern.
	Aqua bidest.		90 ml	

5.1.5.5 Puffer für Radioligand-Bindungsstudien

Puffer	Komponente	Mw [g/mol]	Molarität	Einwaage
Tris-Puffer zur Inkubation und zum Waschen	Tris-HCl	121,1	50 mM	6,06 g
	→ ad 1,0 l Aqua bidest., mit HCl (37 %) auf pH 7,4, autoklavieren, Lagerung bei 4 °C			
HBSS-Puffer zum Waschen der Zellen	NaCl	58,5	13 mM	0,76 g
	HEPES	238,3	20 mM	4,77 g
	Glucose	180,2	5,5 mM	1,00 g
	KCl	74,6	5,4 mM	0,40 g

Puffer	Komponente	Mw [g/mol]	Molarität	Einwaage
	NaHCO ₃	84,0	4,2 mM	0,35 g
	CaCl ₂ x 2 H ₂ O	147,0	1,25 mM	0,18 g
	MgSO ₄	120,4	0,8 mM	0,10 g
	MgCl ₂	95,2	1 mM	0,10 g
	KH ₂ PO ₄	136,1	0,44 mM	0,06 g
	Na ₂ HPO ₄	142,0	0,34 mM	0,05 g
	→ ad 1,0 l autoklaviertes Aqua bidest., pH auf 7,4, Lagerung bei 4 °C			
Lysepuffer zur Lyse der Zellen	EDTA	372,2	4 mM	1,49 g
	Triton® X-100		0,01 %	100 µl
	→ ad 1,0 l autoklaviertes Aqua bidest., pH auf 7,4, Lagerung bei 4 °C			
Tricin / DTT-Lösung zum Verdünnen des [³⁵ S]GTPγS- Radioligands	Tricin	179,2	10 mM	89,60 mg
	DTT	154,2	10 mM	77,13 mg
	→ ad 50 ml Aqua dest., mit NaOH auf pH 7,6, autoklavieren, Lagerung bei 4 °C			

5.1.5.6 Lösungen für SDS-PAGE

Trenngel	Acrylamid	5,0 ml
	1 mM Tris-HCl (pH 8,8)	7,50 ml
	20 % SDS	75,20 µl
	TEMED	12,00 µl
	10 % Ammoniumperoxodisulfat	106,00 µl
	Aqua dest.	2,50 ml
Sammelgel	Acrylamid	1,67 ml
	1 M Tris-HCl (pH 6,8)	1,25 ml
	20 % SDS	50,00 µl
	10 % Ammoniumperoxodisulfat	50,00 µl
	TEMED	50,00 µl
	Aqua dest.	7,03 ml
2 x Proben- puffer	Glycin	20,0 ml
	20 % SDS	15,0 ml
	1 M Tris-HCl (pH 6,8)	5,0 ml
	1 % Bromphenolblau	0,5 ml
	→ unmittelbar vor Gebrauch wird 5 % 2-Mercaptoethanol zugesetzt	
10 x Laufpuffer	Tris-HCl	60,6 g
	Glycin	288,2 g
	Aqua dest.	ad 2 l
	→ pH auf 8,6 einstellen, unmittelbar vor Gebrauch 100 ml Puffer mit 900 ml Aqua dest. verdünnen und 5 ml 20 % SDS zugeben	

5.1.5.7 Lösungen für Western Blotting

Blot-Puffer	10 x Laufpuffer (5.1.5.6)	100 ml
	Methanol	200 ml
	Aqua dest.	700 ml
PonceauS- Lösung	PonceauS	2 %
	Trichloressigsäure	20 %
	→ vor Gebrauch wird die Lösung 1 : 10 mit Aqua dest. verdünnt	

PBS / Tween-Lösung	Tween® 20 PBS-Puffer (5.1.5.1) → Lösung unmittelbar vor Gebrauch herstellen	1 ml 1 l
Milchpulver-Lösung	Milchpulver PBS / Tween-Lösung → auf Magnetrührer etwa eine halbe Stunde suspendiert, Lagerung bei 4 °C für einige Tage	2,5 g 50 ml

5.1.5.8 Lösungen für die intrazelluläre Calciummessung

Puffer	Komponente	Mw [g/mol]	Molarität	Einwaage
5 x KHP (Krebs-HEPES-Puffer)	NaCl	58,5	118,6 mM (1 x)	16,85 mg
	KCl	74,6	4,7 mM (1 x)	875,00 mg
	KH ₂ PO ₄	136,1	1,2 mM (1 x)	400,00 mg
	NaHCO ₃	84,0	4,2 mM (1 x)	875,00 mg
	Glucose	180,2	11,7 mM (1 x)	5,25 g
	HEPES	238,3	10 mM (1 x)	5,95 g
	→ + 450 ml Aqua dest., mit NaOH auf pH 7,4 → ad 500 ml Aqua dest., aliquotieren à 100 ml, Lagerung bei -20 °C			
Stammlösungen MgSO ₄ und CaCl ₂	MgSO ₄ x 7 H ₂ O	246,5	1 M	2,47 mg
	CaCl ₂ x 2 H ₂ O	147,0	1 M	1,47 mg
	→ ad 10 ml Aqua bidest. → ad 10 ml Aqua bidest.			
1 x KHP	→ 100 ml 5 x KHP + 650 µl CaCl ₂ -Stammlösung + 600 µl MgSO ₄ -Stammlösung → ad 500 ml Aqua dest.			
Oregon Green-Stammlösung	Oregon Green	1258	1 mM	50,0 µg
	DMSO			39,7 µl
	→ unter Lichtausschluss lösen, aliquotieren à 3 µl, Lagerung bei -20 °C			
Pluronic® F127-Stammlösung	Pluronic® F-127			200,0 mg
	DMSO			800,0 µl
	→ Lagerung bei RT			

5.1.5.9 Lösungen für die „uptake“-Experimente

Lösungen	Komponente	Mw [g/mol]	Molarität	Einwaage
HEPES-Puffer-Ringer-Lösung	NaCl	58,5	135 mM	3,94 g
	KCl	74,6	5 mM	0,19 g
	NaH ₂ PO ₄	138,0	3,33 mM	0,23 g
	Na ₂ HPO ₄	142,0	0,83 mM	0,06 g
	CaCl ₂ x 2 H ₂ O	147,0	1,0 mM	0,07 g
	MgCl ₂ x 6 H ₂ O	203,3	1,0 mM	0,10 g
	Glucose	180,2	10 mM	0,90 g
	HEPES	238,3	5 mM	0,60 g
	→ ad 500 ml autoklaviertes Aqua bidest., mit NaOH auf pH 7,4, Lagerung bei 4 °C			
Na-freie HEPES-Puffer-Ringer-Lösung	Cholinchlorid	139,6	135 mM	9,40 g
	KH ₂ PO ₄	136,1	3,33 mM	0,30 g
	CaCl ₂ x 2 H ₂ O	147	1,0 mM	0,07 g
	MgCl ₂ x 6 H ₂ O	203,3	1,0 mM	0,10 g

Lösungen	Komponente	Mw [g/mol]	Molarität	Einwaage
	Glucose	180,2	10 mM	0,90 g
	HEPES	238,3	5 mM	0,60 g
	→ ad 500 ml autoklaviertes Aqua bidest., mit KOH auf pH 7,4, Lagerung bei 4 °C			
Triton® X-100 5 % Lösung	Triton® X-100		5 %	2,5 ml
	→ ad 500 ml autoklaviertes Aqua bidest., mit NaOH auf pH 7,4, Lagerung bei 4 °C			

5.2 Zellkultur

5.2.1 Medienzusammensetzung

Zelllinie	Nährmedium	Zusätze
1321N1-Astrozytomzellen	DMEM	10 % FCS 100 U/ml Penicillin G 100 µg/ml Streptomycin
stabil transfizierte 1321N1-Astrozytomzellen	DMEM	10 % FCS 100 U/ml Penicillin G 100 µg/ml Streptomycin 800 µg/ml G418
9E10- <i>myc</i> -monoklonale Antikörper Zellen	RPMI 1640	10 % FCS 100 U/ml Penicillin G 100 µg/ml Streptomycin
GP+envAM12-Zellen	HXM-Medium: DMEM	10% FCS 100 U/ml Penicillin G 100 µg/ml Streptomycin 1 % Ultraglutamin 15 µg/ml Hypoxanthin 250 µg/ml Xanthin 25 µg/ml Mycophenolsäure 200 µg/ml Hygromycin B
HEK293-Zellen	DMEM	10 % FCS 100 U/ml Penicillin G 100 µg/ml Streptomycin
NG108-15-Zellen	DMEM	10 % FCS 100 U/ml Penicillin G 100 µg/ml Streptomycin 2 % HAT-Supplement (enthält 5 mM Hypoxanthin, 20 µM Aminopterin und 0,8 mM Thymidin)
<i>Sf9</i> -Insektenzellen	Insect-Xpress	0,05 mg/ml Gentamycinsulfat

5.2.2 Zellkultur

Die *Sf9*-Insektenzellen wurden bei 27 °C im Brutschrank inkubiert und können sowohl adhärent als auch in Suspension kultiviert werden. Bei einer Konfluenz

von 90 % wurde von den adhären wachsenden Zellen das Medium entfernt und frisches Medium hinzugegeben. Durch Klopfen wurden die Zellen abgelöst und durch mehrfaches Auf- und Abpipettieren wird die Zellsuspension vereinzelt. In eine Zellkulturflasche wurde Medium vorgelegt und eine entsprechende Menge Zellsuspension, die sich nach dem Splitverhältnis (maximal 1 : 4) richtet, hinzugegeben. Die in Suspensionskultur wachsenden Zellen wurden bei 200 xg für 5 min zentrifugiert und das Pellet wurde in frischem Medium aufgenommen. In einem Kolben wird Medium vorgelegt und die entsprechende Menge Zellsuspension, die sich nach dem Splitverhältnis (minimal 1 Mio. Zellen/ml) richtet, hinzugegeben. Die Zellen sollten bei einer Konfluenz von 9 Mio. Zellen/ml gesplittet werden.

Die adhären wachsenden Zelllinien (1321N1-Astrozytomzellen, stabil transgenierte 1321N1-Astrozytomzellen, 9E10-*myc*-monoklonale Antikörper Zellen, GP+envAM12-Zellen, HEK293-Zellen und NG108-15-Zellen) wurden bei 37 °C und 5 % CO₂ im Brutschrank kultiviert. Bei einer Konfluenz von 80-90 % wurde das Medium abgenommen und die Zellen wurden mit 10 ml PBS-Puffer gewaschen. Nach Zugabe von 1-3 ml Trypsin / EDTA-Lösung, je nach Größe der Zellkulturflasche, wurden die Zellen für einige Minuten inkubiert, damit sich die Zellen von der Flasche ablösen. Nach Zugabe von frischem Medium wurden die Zellen durch mehrfaches Auf- und Abpipettieren vereinzelt. In eine Zellkulturflasche wurde Medium vorgelegt und die entsprechende Menge Zellsuspension, die sich nach dem Splitverhältnis richtet, hinzugegeben. Die 9E10-*myc*-monoklonalen Antikörper Zellen und GP+envAM12-Zellen wurden maximal im Verhältnis 1 : 8 gesplittet, wohingegen bei den HEK293-Zellen und NG108-15-Zellen auch ein Splitverhältnis von 1 : 10 und bei den 1321N1-Astrozytomzellen sogar ein Splitverhältnis von 1 : 20 möglich war.

5.2.3 Einfrieren von Zellen

Von den *Sf9*-Insektenzellen wurde zunächst das Medium entfernt und durch frisches Medium ersetzt. Durch Klopfen wurden die *Sf9*-Insektenzellen von der Zellkulturflasche abgelöst und die Zellsuspension wurde in eine Falcon überführt. Nach Zentrifugation von 200 xg für 5 min wurde das Zellpellet in 90 % FCS und 10 % sterilem DMSO resuspendiert. Es wurde 1 ml der Zellsuspension in eine Kryovial überführt und bei -80 °C in einer speziellen Box eingefroren. Am nächsten Tag wurden die Backups in den Stickstofftank überführt.

Die adhären wachsenden Zelllinien wurden zunächst mit PBS-Puffer gewaschen und anschließend mit Trypsin / EDTA-Lösung abgelöst. Die entstandene Zellsuspension wurde in ein Falcon überführt. Das weitere Vorgehen erfolgte wie oben beschrieben.

5.2.4 Auftauen von Zellen

Ein Aliquot der entsprechenden Zelllinie wird möglichst schnell aufgetaut und in ein Falcon, das 10 ml Medium enthielt, überführt. Nach einer Zentrifugation bei 200 x g für 5 min wurde das Pellet in 10 ml Medium aufgenommen und durch Auf- und Abpipettieren wurde die Zellsuspension vereinzelt. In eine Zellkulturflasche wurde Medium vorgelegt und die vereinzelt Zellsuspension hinzugegeben. Eventuell muss nach einigen Stunden das Medium gewechselt werden.

5.2.5 Zellzahlbestimmung

Die Bestimmung der Zellzahl wurde mit der Neubauer-Zählkammer durchgeführt. Die beiden Stege der Zählkammer wurden mit je einem Tropfen Isoopropanol angefeuchtet, damit das Deckgläschen auf der Kammer befestigt werden konnte. Eine kleine Menge der gut vereinzelt Zellsuspension wurde zwischen das Deckgläschen und die Kammer pipettiert. Durch Kapillarwirkung wurde die Lösung in die Kammer gezogen. Unter dem Mikroskop wurden die vier Großquadrate, die aus 16 Kleinquadraten bestehen, ausgezählt. Der Mittelwert entspricht der Zellzahl pro Großquadrat. Durch Multiplikation mit 10^4 wurde die Zellzahl/ml Zellsuspension berechnet.

5.2.6 Aufreinigung des Anti-c-myc1 9E10 monoklonalen Antikörpers

Die 9E10-myc-monoklonalen Antikörper Zellen wurden in einer 175 cm² Zellkulturflasche kultiviert. Bei einer Konfluenz von 90 % wurde der Überstand abgenommen und auf unter 1 ml mit Amicon Ultra 30.000 kDa eingeeengt. Bis zum Gebrauch wurde die Antikörper-Lösung bei 4 °C gelagert.

5.3 Molekularbiologie

5.3.1 Agarose-Gelelektrophorese

Eine 1 %ige Agarose-Lösung wurde in 1 x TAE-Puffer unter Erhitzen in der Mikrowelle gelöst. Nach Zugabe von Ethidiumbromid-Lösung oder GelRedTM im Verhältnis 1 : 1000 wurde das Gel in eine Kammer, in der sich ein Kamm zum Formen der Geltaschen befand, gegossen. Nach Erkalten des Gels wurde der Kamm vorsichtig entfernt. Das Gel wurde in eine mit 1 x TAE-Puffer befüllte horizontale Elektrophoresekammer gelegt. Die Proben wurden mit einem 6 x Ladepuffer gemischt und mit Wasser verdünnt. Die Taschen wurden mit den Proben befüllt und eine Elektrophorese bei 100 Volt wurde durchgeführt. An-

schließlich wurde das Gel mit dem Geldoc Fotodokumentationssystem von der Firma BioRad ausgewertet.

5.3.2 Extraktion von DNA aus dem Agarosegel

Das Gel wurde mit dem Geldoc Fotodokumentationssystem kurzzeitig UV-Licht ausgesetzt, um die gelaufenen Banden sichtbar zu machen. Dadurch war es möglich, das gewünschte DNA-Fragment auszuschneiden und in ein Eppendorfgefäß zu überführen. Mit dem Zymoclean Gel DNA Recovery Kit von der Firma Zymo Research erfolgte die Extraktion der DNA nach dem Protokoll des Herstellers.

5.3.3 gDNA-Isolierung aus Maushirnen

Zunächst wurden Cortex und Striatum des Mausgehirns präpariert und nach Schockfrost mit flüssigem Stickstoff mit Mörser und Pistill zermahlen. Mit dem Pure Link genomic DNA Kit von der Firma Invitrogen erfolgte die Isolation der genomischen DNA nach dem Protokoll des Herstellers.

5.3.4 Klonierung von Rezeptor-DNA in den Vektor

Die Gensequenz des Ratten-Adenin-Rezeptors wurde in die Baculovirus-Transfervektoren pVL1393 und pFastBacTM1 kloniert. Zunächst wurde das Plasmid pUC-*myc-hA_{2B}* aus pLXSN-*myc-hA_{2B}*, das mir freundlicherweise von Dominik Thimm zur Verfügung gestellt wurde, kloniert. Für die Klonierung von pUC-*myc-rAde* diente die kommerziell erworbene Gensequenz des Ratten-Adenin-Rezeptors, die im Vektor pExpress-1 vorlag, als Template. Diese Klonierung wurde von der Erasmusstudentin Inês Macedo durchgeführt. Das Plasmid pUC-*myc-rAde* wurde als Ausgangsplasmid für alle weiteren Klonierungen verwendet (s. 5.3.4.2 und 5.3.12).

Die Gensequenz des Maus-Adenin-Rezeptors Subtyp 1 wurde durch PCR in genomischer DNA des Cortex und Striatums von Mäusen nachgewiesen und sowohl in die Baculovirus-Transfervektoren pVL 1393 und pFastBacTM1 als auch in die retroviralen Vektoren pQXCIN und pLXSN kloniert.

5.3.4.1 Vektorkarten

Die Vektorkarten der verwendeten Plasmide ist in Abb. 5.1 dargestellt.

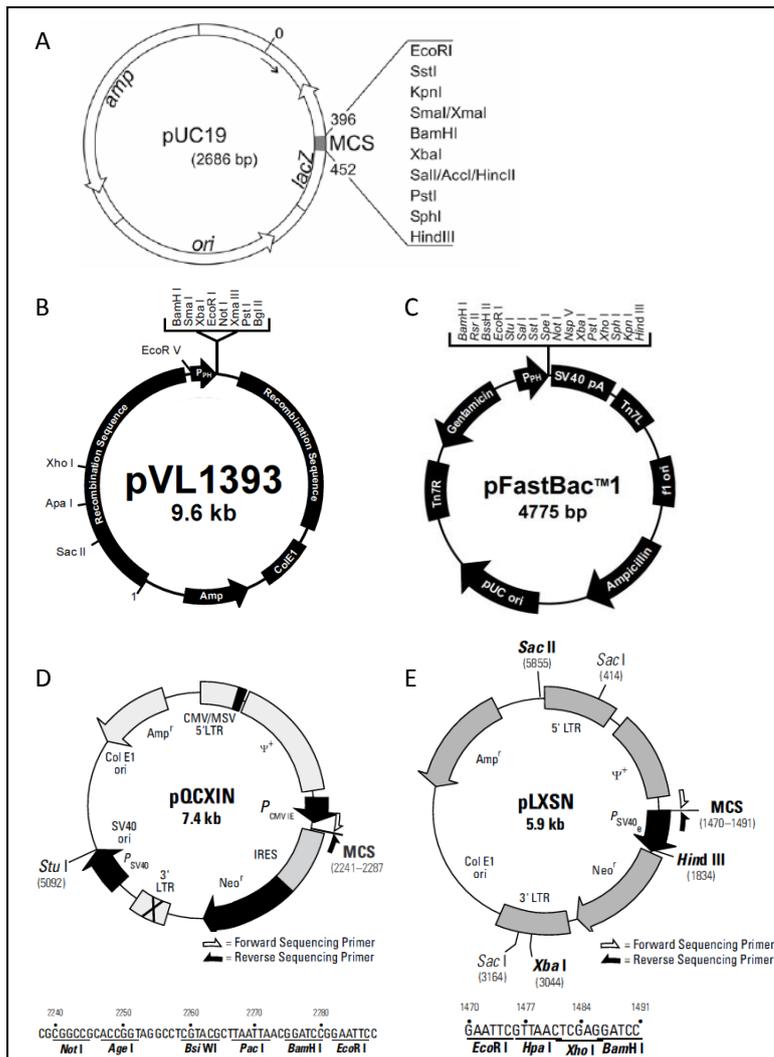


Abb. 5.1: Vektorkarten

Die Plasmidkarten des Vektors pUC19 (A), der Baculovirus-Transfervektoren pVL1393 (B) und pFastBac™1 (C) sowie der retroviralen Vektoren pQXCIN (D) und pLXSN (E) sind mit der MCS (Multiple cloning site) dargestellt

5.3.4.2 Primer

Die Primer enthielten am 5'- und 3'-Ende die Schnittstelle für die verwendeten Restriktionsenzyme. Zusätzlich wurden Basen als nicht Hybrid-Anteil hinzugefügt, um das Schneiden des Enzyms zu ermöglichen. Bei manchen Primern wurden zwischen die Schnittstelle und die Sequenz einige Basen eingefügt, um das Leseraster zu erhalten. Das Einfügen eines *myc*-Tags vor die Gensequenz des Vektors ermöglichte später die Untersuchung der Expression in Western Blot-Experimenten.

Die Schmelztemperatur des hybridisierten Anteils wurde mit folgender Formel abgeschätzt: $T_m = 4 \cdot n(G,C) + 2 \cdot n(A,T)$.

Die verwendeten Primer sind in Tab. 5.1 dargestellt.

Tab. 5.1: Primer für die Klonierung der Gensequenz des Ratten-Adenin-Rezeptors und des Maus-Adenin-Rezeptors Subtyp 1 in die Vektoren

Klonierung von	Interne Bezeichnung	Primersequenz 5' - 3'	Restriktionsenzym	T _m (°C)
pUC- <i>myc</i> -hA _{2B}	<i>myc</i> -EcoRI hA _{2B} -BamHI	for: gagacggaattcaaaATGgaacaaaaactcatctcagaag	EcoRI	68
		rev: ctactaggatccTCATaggcccacaccgagagcag	BamHI	74
pUC- <i>myc</i> -rAde	rAde-MluI rAde-XbaI	for: gagacgacgctcaATGggggaaagcttcaccgg	MluI	64
		rev: gcatatttctagaTCACggctccaccttgetgc	XbaI	66
pVL1393-rAde	rAde-EcoRI rAde-BglII	for: gagacggaattcaaccATGggggaaagcttcaccgg	EcoRI	66
		rev: gcatatttagatctTCACggctccaccttgetgc	BglII	66
pFastBac-rAde	rAde-EcoRI rAde-XhoI	for: gagacggaattcaaccATGggggaaagcttcaccgg	EcoRI	66
		rev: gcatatttctcagTCACggctccaccttgetgc	XhoI	66
pFastBac- <i>myc</i> -rAde	<i>myc</i> -EcoRI rAde-XhoI	for: gagacggaattcaaaATGgaacaaaaactcatctcagaag	EcoRI	68
		rev: gcatatttctcagTCACggctccaccttgetgc	XhoI	66
mAde1 Fragment 1 Exon2	Exon2 mMrgA10	for: cagcaccggtgcagggtttc		66
		rev: gacacttgatgccataaaaagac		64
mAde1 Fragment 2 Exon2	mMrgA10 TGA	for: gaagtattgacatcagcaccctg		68
		rev: caTCATggctctgctttgctttttg		66
mAde1 Exon2	Exon2 TGA	for: cagcaccggtgcagggtttc		66
		rev: caTCATggctctgctttgctttttg		66
mAde1 Exon 1 + 2	ATG TGA	for: ATGggggaaagcagcaccggtgcagg		86
		rev: caTCATggctctgctttgctttttg		66
pVL1393-mAde1	mAde1-BamHI mAde1-XbaI	for: gagacgggatccagaATGggggaaagcagcaccggtg	BamHI	66
		rev: gcatatttctagaTCATggctctgctttgctttttgac	XbaI	66
pFastBac-mAde1	mAde1-EcoRI mAde1-XhoI	for: gagacggaattcaaccATGggggaaagcagcaccgg	EcoRI	66
		rev: gcatatttctcagTCATggctctgctttgctttttg	XhoI	66
pFastBac- <i>myc</i> -mAde1	mAde1-MluI mAde1-XhoI	for: gagacgacgctcaATGggggaaagcagcaccgg	MluI	66
		rev: gcatatttctcagTCATggctctgctttgctttttg	XhoI	66
pQXCIN-mAde1	mAde1-NotI mAde1-EcoRI	for: gagacggcgccgaccATGggggaaagcagcaccgg	NotI	66
		rev: gcatattgaattcTCATggctctgctttgctttttg	EcoRI	66
pLXSN- <i>myc</i> -mAde1	mAde1-MluI mAde1-BamHI	for: gagacgacgctcaATGggggaaagcagcaccgg	MluI	66
		rev: gcatattggatccTCATggctctgctttgctttttg	BamHI	66

grau: nicht Hybrid-Anteil; grau unterlegt: Schnittstelle für das Restriktionsenzym; schwarz: Sequenz; T_m: Schmelztemperatur des hybridisierten Anteils

5.3.4.3 PCR (Polymerase-Kettenreaktion)

Der PCR-Ansatz wurde immer nach dem gleichen Prinzip pipettiert.^{299, 300} Es wurde eine Polymerase mit dem entsprechenden Puffer und ein Primer Mix, der aus 1 µl for- und 1 µl rev-Primer in einer Konzentration von 5 pmol/µl besteht, benötigt.

Die Gensequenz des Maus-Adenin-Adenin-Rezeptors Subtyp 1 wurde aus der genomischen DNA aus Mauscortex und –striatum gewonnen. Zunächst wurde eine PCR durchgeführt, um das Fragment 1 des Exons2 und das Fragment 2 des Exons2 zu erhalten. Die PCR wurde mit BioMix™ Red, das ein gebrauchsfertiger Mastermix aus Polymerase, dNTP`s, Reaktionspuffer und DNA-Ladepuffer für die spätere Gelelektrophorese ist, durchgeführt und wie folgt pipettiert:

2 µl gDNA
 1 µl for-Primer (5 pmol/µl) Exon2 bzw. mMrgA10
 1 µl rev-Primer (5 pmol/µl) mMrgA10 bzw. TGA
 12,5 µl BioMix™ Red
 ad 25 µl PCR-H₂O

Für das Fragment 1 des Exons2 wurde folgendes PCR-Programm verwendet:

Initiale Denaturierung	94 °C	4 min	25 Zyklen
Denaturierung	94 °C	1 min	
Primerhybridisierung	62 °C	1 min	
Elongation	72 °C	2 min	
Terminale Elongation	72 °C	10 min	

Für das Fragment 2 des Exons2 wurde das gleiche PCR-Programm verwendet, nur wurde die Primerhybridisierung bei 66 °C durchgeführt.

Anschließend wurde das Exon2 vervollständigt, in dem beide hergestellten Fragmente als Superprimer für 5 PCR-Zyklen dienen. Danach erfolgte die Zugabe der Primer (Exon2 und TGA), um das komplette Exon2 zu amplifizieren. Die PCR wurde wie folgt pipettiert:

1 µl mAde1 Fragment 1 Exon2
 1 µl mAde1 Fragment 2 Exon2
 12,5 µl BioMix™ Red
 ad 25 µl PCR-H₂O

Initiale Denaturierung	94 °C	4 min	5 Zyklen
Denaturierung	94 °C	1 min	
Primerhybridisierung	68 °C	1 min	
Elongation	72 °C	2 min	
Terminale Elongation	72 °C	10 min	

Primerzugabe:

1 µl for-Primer (5 pmol/µl) Exon2
 1 µl rev-Primer (5 pmol/µl) TGA

Initiale Denaturierung	94 °C	4 min	25 Zyklen
Denaturierung	94 °C	1 min	
Primerhybridisierung	68 °C	1 min	
Elongation	72 °C	2 min	
Terminale Elongation	72 °C	10 min	

Zum Schluss erfolgte noch die Einführung der ersten 9 codierenden Basen, die sich auf dem Exon1 befinden.

1 µl	mAde1 Exon2
1 µl	for-Primer (5 pmol/µl) ATG
1 µl	rev-Primer (5 pmol/µl) TGA
12,5 µl	BioMix™ Red
ad 25 µl	PCR-H ₂ O

Initiale Denaturierung	94 °C	4 min	25 Zyklen
Denaturierung	94 °C	1 min	
Primerhybridisierung	68 °C	1 min	
Elongation	72 °C	2 min	
Terminale Elongation	72 °C	10 min	

Für die Klonierung der Gensequenz des Ratten-Adenin-Rezeptors und der Gensequenz des Maus-Adenin-Rezeptors Subtyp 1 in den Baculovirus-Transfervektor pVL1393 wurde die PCR mit der VentR®-Polymerase, die über eine Lesekontrolle verfügt, durchgeführt. Die PCR wurde wie folgt angesetzt:

x µl	DNA-Template (~ 20 ng)
1 µl	for-Primer (5 pmol/µl)
1 µl	rev-Primer (5 pmol/µl)
0,5 µl	VentR®-Polymerase
2,5 µl	Thermo Pol Puffer (10 x)
0,5 µl	dNTP`s 10 mM
ad 25 µl	PCR-H ₂ O

Initiale Denaturierung	94 °C	4 min	25 Zyklen
Denaturierung	94 °C	1 min	
Primerhybridisierung	66 °C	1 min	
Elongation	72 °C	2 min	
Terminale Elongation	72 °C	10 min	

Für die Klonierungen in den Baculovirus-Transfervektor pFastBac™1 und in die retroviralen Vektoren pQXCIN und pLXSN wurde die PCR mit BioMix™ Red, durchgeführt. Die PCR wurde wie folgt angesetzt:

x µl	DNA-Template (~ 20 ng)
1 µl	for-Primer (5 pmol/µl)
1 µl	rev-Primer (5 pmol/µl)
12,5 µl	BioMix™ Red
ad 25 µl	PCR-H ₂ O

Initiale Denaturierung	94 °C	4 min	30 Zyklen
Denaturierung	94 °C	1 min	
Primerhybridisierung	64 °C	1 min	
Elongation	72 °C	2 min	
Terminale Elongation	72 °C	10 min	

Die PCR-Produkte wurden auf ein Agarosegel aufgetragen (s. 5.3.1) und mit dem Zymoclean Gel DNA Recovery Kit von der Firma Zymo Research erfolgte die Extraktion des PCR-Produktes (s. 5.3.2). Das aufgereinigte PCR-Produkt wurde bis zur Weiterverarbeitung bei -20 °C gelagert.

5.3.4.4 Restriktionsverdau

Die aufgereinigten PCR-Produkte, die als Überhänge Schnittstellen für die Restriktionsenzyme enthalten, und der Vektor wurden mit den entsprechenden Restriktionsenzymen geschnitten. Ein Restriktionsverdau wurde wie folgt angesetzt:

x µl	DNA (~ 200 ng)
1 µl	jedes Restriktionsenzym / FastDigest® Restriktionsenzym
2 µl	Puffer (10 x)
ggf.	BSA (100 µg/ml)
ad 20 µl	PCR-H ₂ O

Die Zugabe von BSA hängt von der Restriktionsendonuclease ab. Ebenso wurde der Puffer so gewählt, dass die verwendeten Enzyme mit einer hohen Effizienz schneiden können. Der Ansatz wurde auf Eis pipettiert. Die anschließende Inkubation erfolgte auf einem Thermomixer bei 37 °C für 1 Stunde (Restriktionsenzymen) bzw. für 30 min (FastDigest® Restriktionsenzymen). Bei Bedarf konnten die Restriktionsenzyme bei 80 °C für 20 min hitzeinaktiviert werden.

Das geschnittene PCR-Produkt und der verdaute Vektor wurden mit dem ZR DNA Clean & Concentration Kit von der Firma Zymo Research aufgereinigt. Anschließend erfolgte eine Ligation (s. 5.3.5) und Transformation in *E. coli*-Bakterien (s. 5.3.6).

5.3.5 Ligation mittels T4 DNA-Ligase

Die Ligation³⁰¹ ist die enzymkatalysierte Verknüpfung des geschnittenen und gereinigten PCR-Produktes, auch genannt Insert, mit dem verdauten, aufgereinigtem Vektor. Dabei wurde das Insert in einem drei-fachen Überschuss zum Vektor eingesetzt. Der Ligationsansatz wurde wie folgt angesetzt:

x µl	50 ng Vektor DNA, verdaut und aufgereinigt
x µl	150 ng Insert DNA, geschnitten und gereinigt
1 µl	T4 DNA-Ligase
2 µl	Ligase Puffer (10 x)
2 µl	ATP 10 mM
ad 20 µl	PCR-H ₂ O

Der Ansatz wurde auf Eis pipettiert und für 1 Stunde bei RT bzw. 16 °C inkubiert. Die Hitzeinaktivierung des Enzyms erfolgte für 10 min bei 65 °C. Die Ligations-Lösung wurde bis zur Weiterverarbeitung bei -20 °C gelagert.

5.3.6 Transformation von chemisch kompetenten *Escherichia coli*

5.3.6.1 Herstellung von Agarplatten

32 g LB-Agar wurde in 1 l Wasser suspendiert und autoklaviert. Der Agar wurde bis zu einer Temperatur von etwa 40 °C erkalten gelassen. Nach Bedarf wurde Ampicillin in einer Endkonzentration von 100 µg/ml zugegeben und je 20 ml LB-Amp-Agar-Lösung in Petrischalen gegossen. Die erkalteten Agarplatten wurden mit der Oberseite nach unten bei 4 °C gelagert.

5.3.6.2 Herstellung kompetenter Bakterien

Eine Glycerinkultur nicht transformierter *E. coli* Top10-Bakterien wurde mit 4 ml ampicillinfreiem LB-Medium angeimpft und über Nacht bei 37 °C und 220 rpm geschüttelt. Am darauffolgendem Tag wurde die Bakteriensuspension in 40 ml ampicillinfreies LB-Medium überführt und bei 37 °C und 220 rpm solange inkubiert, bis die Bakteriensuspension eine optische Dichte von 0,5 bei einer Wellenlänge von 550 nm erreicht hatte. Nach einer Zentrifugation von 1700 x g für 20 min bei 4 °C wurde das Bakterienpellet in 20 ml einer kalten 0,1 M CaCl₂-Lösung³⁰² resuspendiert. Anschließend erfolgte eine 30-minütige Inkubation auf Eis und eine Zentrifugation von 1700 x g für 20 min bei 4 °C. Das Bakterienpellet wurde in 2 ml kalter 0,1 M CaCl₂-Lösung resuspendiert und nach der Zugabe von 500 µl Glycerin wurde die Bakteriensuspension zu je 100 µl aliquotiert. Die kompetenten Bakterien wurden bis zum Gebrauch bei -80 °C gelagert.

5.3.6.3 Durchführung der Transformation

Die kompetenten *E. coli* Top10-Bakterien wurden für 30 min auf Eis aufgetaut. Nach Zugabe der Ligations-Lösung (s. 5.3.5) erfolgte eine Inkubation von 30 min auf Eis. Der Hitzeschock wurde für 2 min bei 37 °C im Wasserbad durchgeführt. Anschließend erfolgte eine weitere zwei-minütige Inkubation auf Eis, bevor 200 µl SOC-Medium hinzugegeben wurden. Nach einer ein-stündigen Inkubation bei 37 °C und 700 rpm wurde die Bakteriensuspension gleichmäßig auf Agar-Platten, die das geeignete Resistenz-Antibiotikum enthalten und vorher auf RT erwärmt wurden, ausgestrichen. Die Platten wurden mit der Oberseite nach unten über Nacht bei 37 °C und 220 rpm bebrütet.

5.3.7 Selektion von Bakterien-Monoklonen

5.3.7.1 Herstellung von LB-Medium zur Anzucht von Bakterien-Monoklonen

25 g LB-Pulver-Medium wurde in 1 l Wasser gelöst und autoklaviert. Das Medium wurde bei 4 °C gelagert. Vor Gebrauch wird nach Bedarf Ampicillin in einer Endkonzentration von 100 µg/ml zugefügt (LB-Amp-Medium).

5.3.7.2 Durchführung der Selektion von Bakterien-Monoklonen

Auf den bebrüteten Agar-Platten sind weiße Bakterienkolonien gewachsen. Die Platten wurden mit Parafilm umschlossen und können mit der Oberseite nach unten bei 4 °C gelagert werden. Zur Isolierung von Monoklonen wurde mit einer gelben Pipettenspitze eine einzelne Kolonie berührt, die zum Animpfen von 4 ml LB-Amp-Medium, das Ampicillin in einer Konzentration von 100 µg/ml enthält, benutzt wurde. Die Flüssigkultur wurde über Nacht bei 37 °C und 220 rpm inkubiert.

5.3.8 Einfrieren und Auftauen von *Escherichia coli*

Von den positiven Bakterien-Monoklonen wurde eine Glycerinkultur hergestellt. Dazu wurde 1 ml LB-Amp-Medium mit 1 ml der Bakterienkultur (s. 5.3.7) angeimpft und für 1 Stunde bei 37 °C und 220 rpm inkubiert. 800 µl Bakteriensuspension wurden mit 200 µl Glycerol in einem Kryovial gemischt und bei -80 °C gelagert. Ebenfalls kann eine Glycerinkultur in einem Eppendorfgefäß bei -20 °C gelagert werden.

Zum Auftauen wurden 4 ml LB-Amp-Medium mit 50 µl der Glycerinkultur angeimpft und über Nacht bei 37 °C und 220 rpm inkubiert.

5.3.9 Aufreinigung von DNA aus *Escherichia coli*

Minipräparation mit ZR Plasmid Miniprep Kit Classic

Die Aufreinigung erfolgte nach dem Protokoll des Herstellers.

Midipräparation mit Pure Link Midipröp Kit

Die Aufreinigung erfolgte nach dem Protokoll des Herstellers.

5.3.10 Konzentrationsbestimmung von DNA-Präparationen

Die Konzentrationsbestimmung von DNA-Präparationen erfolgte photometrisch. Dazu wurde eine 1 : 500 Verdünnung hergestellt, in dem 2 µl DNA in 998 µl Wasser gegeben wurden. Als Nullwert diente Wasser. Die Absorption wurde bei 260 nm bestimmt.

5.3.11 Sequenzierung

Die Sequenzierung wurde von der Firma GATC in Konstanz durchgeführt. Die Auswertung erfolgte mit Hilfe von Chromas 1.45 (Conor McCarthy) und ClustalW2 (European Bioinformatics Institute). Die Primer, die für die Sequenzierung der Firma GATC verwendet wurden, sind in Tab. 5.2 dargestellt.

Tab. 5.2: Sequenzierungs-Primer für den Vektor pUC19, die Baculovirus-Transfervektoren pVL1393 und pFastBacTM1 sowie die retroviralen Vektoren pQXCIN und pLXSN

Sequenzierungs-Primer für den Vektor	Primersequenz 5' - 3'
pUC19	for: tgtaaaacgacggccagt rev: ggcatagctgtttcctg
pVL1393	for: gacgcacaaactaatatcac rev: gggtttaacattacggatttc
pFastBac TM 1	for: taaaatgataaccatctcgc rev: gaatgcaattggttggttaacttg
pQXCIN	for: acgcatccacgctgttttgacct rev: taacgttactggccgaagccgctt
pLXSN	for: cccttgaacctcctcgttcgacc rev: ccacacctggttgctgacta

schwarz: hybridisierter Anteil; T_m: Schmelztemperatur des hybridisierten Anteils

5.3.12 Mutagenese des Ratten-Adenin-Rezeptors

Die Gensequenz des Ratten-Adenin-Rezeptors wurde zunächst in den Vektor pUC19 kloniert (s. 5.3.4), um so die entsprechenden Mutationen einzufügen.

Dabei wurden die Basenpaartripletts so ausgetauscht, dass diese für die einfachste chirale Aminosäure Alanin codieren. Anschließend wurde die Sequenz des mutierten Ratten-Adenin-Rezeptors in den Baculovirus-Transfervektor pFastBacTM1 kloniert. Dieses Vorgehen wurde für den Austausch der Aminosäure Phenylalanin in Position 110, Asparagin in Position 115 und 173, Leucin in Position 201 und Histidin in Position 252 durchgeführt. Für die Mutationen von Phenylalanin in Position 179 und 195, Asparagin in Position 194 und Tyrosin in Position 268 wurde die zielgerichtete Mutation direkt im Baculovirus-Transfervektor pFastBacTM1 eingefügt.

Des Weiteren wurde eine Mutante hergestellt, die eine um 27 Aminosäuren kürzeren N-Terminus hat (rAde Δ N). Die Mutagenese wurde ebenfalls zunächst im Vektor pUC19 durchgeführt. Es wurden 2 Varianten, mit und ohne *myc*-Tag, hergestellt. Anschließend wurde die mutierte Gensequenz in den Baculovirus-Transfervektor pFastBacTM1 gebracht.

5.3.12.1 Mutagenese-Primer

Bei der zielgerichteten Mutagenese wurde das „whole plasmid recombination PCR“-Prinzip durchgeführt.³⁰³⁻³⁰⁵ Die Primer binden an komplementären Stellen der Gensequenz des Ratten-Adenin-Rezeptors und enthalten möglichst mittig die ausgetauschten Basen, wobei darauf geachtet wird, das möglichst wenig Basen verändert wurden. Die verwendeten Primer sind in Tab. 5.3 dargestellt.

Tab. 5.3: Primer für die zielgerichtete Mutagenese der Sequenz des Ratten-Adenin-Rezeptors

Klonierung von	Interne Bezeichnung	Primersequenz 5' - 3'	Restriktionsenzym	T _m (°C)
pUC- <i>myc</i> -rAde Δ N	rAde Δ N	for: gagacgacg cgct caATGgacaaaaccatacctggaag	MluI	66
	rAde-BamHI	rev: gcatattg gatc TCAcggctccaccttgctgc	BamHI	66
pFastBac- <i>myc</i> -rAde Δ N	rAde Δ N	for: gagacggaatt caaa ATGgaacaaaaactcatctcagaag	EcoRI	68
	rAde-XhoI	rev: gcatatt ctcgag TCAcggctccaccttgctgc	XhoI	66
pFastBac-rAde Δ N	rAde Δ N	for: gagacggaatt cca ATGgacaaaaccatacctggaag	EcoRI	66
	rAde-XhoI	rev: gcatatt ctcgag TCAcggctccaccttgctgc	XhoI	66
pUC- <i>myc</i> -rAdeF110A	F110A	for: cctacccaacattatc gct ctcccatgctttaacaccg		110
		rev: cgggtgtaaaagcatgggagag c gataatgttgggtagg		110
pUC- <i>myc</i> -rAdeN115A	N115A	for: ctttctcccatagctttg cc aaccgcatgatgggtcccctacatcgc		132
		rev: gcgatgtaggggaccatcatgacggtg g caagcatgggagaaag		132
pUC- <i>myc</i> -rAdeN115A P75S	P75S	for: ccgcttagccaggaatgcctt c cagctetacatcctaaac		118
		rev: gtttaggatgtagactg a gaaggcattcctggctaagcgg		118

Klonierung von	Interne Bezeichnung	Primersequenz 5' - 3'	Restriktionsenzym	T _m (°C)
pUC- <i>myc</i> -rAdeN173A	N173A	for: gttgatctgcattctggctaggtatctgtggcttc rev: gaagccacagaaatacctagccagaatgcagatcaac		100 100
pUC- <i>myc</i> -rAdeL201A	L201A	for: ctttactgccgcgtgcccgatattttgtttgtagtcc tctgtctg rev: cagacagaggactacaaacaaaaatatcgcgcacgcgg cagtaaag		128 128
pUC- <i>myc</i> -rAdeH252A	H252A	for: gcggggtgccctttggcatcgcctggttcctgtaatc tgg rev: ccagattaacaggaaccaggcgcgatgccaagggaacc cgc		132 132
pFastBac-rAde-Mutanten	rAde-EcoRI rAde-XhoI	for: gagacggaattcaccATGggggaagcttcaccggg rev: gcatattctcgagTCACggctccaccttgetgc	EcoRI XhoI	66 66
pFastBac-rAdeF179A	F179A	for: ggtatctctgtggcgccttagataccaaatac rev: cgtatctgtatctaaggcgcacagaaatac		88 88
pFastBac-rAdeN194A	N194A	for: gtgtctggcatcgccttctttactgccgcgtg rev: cacgcggcagtaaagaaggcgcgatgccagac		98 98
pFastBac-rAdeF195A	F195A	for: gtgtctggcatcgaacgcctttactgccgcgtg rev: cacgcggcagtaaaggcgttcgatgccagac		98 98
pFastBac-rAdeY268A	Y268A	for: ggtaaatttgcctgcggctttacctggcggcac rev: gtgccgccaggtaaagaccggcagcaaatttacc		98 98

Reduktion des N-Terminus: grau: nicht Hybrid-Anteil; grau unterlegt: Schnittstelle für das Restriktionsenzym; schwarz: Sequenz; T_m: Schmelztemperatur des hybridisierten Anteils; Zielgerichtete Mutagenese: grau: Basenpaare, die für die gewünschte Mutation codieren; unterstrichen: ausgetauschte Basenpaare für die gewünschte Mutation; schwarz: Sequenz; T_m: Schmelztemperatur des hybridisierten Anteils

5.3.12.2 Mutagenese-PCR

Für die zielgerichtete Mutagenese des Ratten-Adenin-Rezeptors wurde eine PCR mit der VentR[®]-Polymerase, die über eine Lesekontrolle verfügt, durchgeführt. Aufgrund der Komplementarität der Primer wurde die Konzentration auf 15 pmol/μl im Gegensatz zur herkömmlichen PCR erhöht. Im Temperaturprogramm wurde die Elongationsphase auf 10 min verlängert, da das Produkt von etwa 4000 bp (pUC-*myc*-rAde) bzw. etwa 6000 bp (pFastBac-rAde) in dieser Zeit komplett synthetisiert wurde. Die PCR wurde wie folgt angesetzt:

x μl	DNA-Template (~ 20 ng)
1 μl	for-Primer (15 pmol/μl)
1 μl	rev-Primer (15 pmol/μl)
0,5 μl	VentR [®] -Polymerase
2,5 μl	Thermo Pol Puffer (10 x)
0,5 μl	dNTP`s 10 mM
ad 25 μl	PCR-H ₂ O

Initiale Denaturierung	94 °C	4 min	20 Zyklen
Denaturierung	94 °C	1 min	
Primerhybridisierung	66 °C	1 min	
Elongation	72 °C	10 min	
Terminale Elongation	72 °C	10 min	

Die PCR-Produkte wurden mit dem Zymoclean DNA Clean & Concentration Kit von der Firma Zymo Research nach dem Protokoll des Herstellers aufgereinigt.

Für die Umklonierungen aller Mutanten, auch der rAdeΔN-Mutante, in den Baculovirus-Transfervektor pFastBacTM1 wurde eine PCR mit BioMixTM Red durchgeführt. Die PCR wurde wie folgt angesetzt:

x µl	DNA-Templat (~ 20 ng)
1 µl	for-Primer (5 pmol/µl)
1 µl	rev-Primer (5 pmol/µl)
12,5 µl	BioMix TM Red
ad 25 µl	PCR-H ₂ O

Initiale Denaturierung	94 °C	4 min	30 Zyklen
Denaturierung	94 °C	1 min	
Primerhybridisierung	64 °C	1 min	
Elongation	72 °C	2 min	
Terminale Elongation	72 °C	10 min	

Die PCR-Produkte wurden auf ein Agarosegel aufgetragen und mit dem Zymoclean Gel DNA Recovery Kit von der Firma Zymo Research erfolgte die Extraktion des PCR-Produktes. Von den aufgereinigten PCR-Produkten (rAde-Mutanten und rAdeΔN für die Klonierung in den Baculovirus-Transfervektor pFastBacTM1) wurden anschließend Restriktionsverdau, wie unter 5.3.4.4 beschrieben, durchgeführt. Die darauffolgende Ligation und Transformation in *E. coli*-Bakterien wurde bereits unter 5.3.5 und 5.3.6.3 beschrieben.

5.3.12.3 Restriktionsverdau methylierter DNA

Die aufgereinigten Mutagenese PCR-Produkte wurden mit dem Restriktionsenzym DpnI verdaut. Dadurch wurde das methylierte Ausgangs-Plasmid, das keine Mutation enthält, verdaut, da das Enzym spezifisch methylierte und hemimethylierte DNA schneidet. Der Restriktionsverdau wurde wie folgt angesetzt:

x µl	DNA (~ 100 ng)
1 µl	DpnI
2 µl	NEBuffer 4 (10 x)

ad 20 µl PCR-H₂O

Der Ansatz wurde auf Eis pipettiert. Die anschließende Inkubation erfolgt auf einem Thermomixer bei 37 °C für 2 Stunden. Im Anschluss wurde das Restriktionsenzym bei 80 °C für 20 min hitzeinaktiviert.

Das geschnittene Mutagenese PCR-Produkt wurde mit dem ZR DNA Clean & Concentration Kit von der Firma Zymo Research nach dem Protokoll des Herstellers aufgereinigt. Somit wurde nur die nicht-methylierte DNA in *E. coli*-Bakterien transformiert. Das weitere Vorgehen wurde bereits in 5.3.6.3, 5.3.7.2 und 5.3.11 ausführlich beschrieben.

5.4 Baculovirus-Expressionssystem

Die Gensequenzen des Ratten-Adenin-Rezeptors und des Maus-Adenin-Rezeptors Subtyp 1 wurden in die Baculovirus-Transfervektoren pVL1393 und pFastBacTM1 kloniert (s. 5.3.4).

Mit dem BaculogoldTM Baculovirus-Expressionssystem wurde der Transfevektor pVL1393 in die *Sf9*-Insektenzellen eingebracht (siehe 5.4.1). Das Bac-to-Bac-Expressionssystem, das für den Transfervektor pFastBacTM1 verwendet wurde, ist in 5.4.2 beschrieben.

5.4.1 BaculogoldTM Baculovirus-Expressionssystem

5.4.1.1 Durchführung der Ko-Transfektion

Die zu transfizierenden *Sf9*-Insektenzellen wurden in einer Dichte von $2,5 \times 10^6$ Zellen/ml in eine 25 cm² Zellkulturflasche ausgesät. Nach etwa 30 min wurde von den adhärennten Zellen das Medium vorsichtig abgenommen und durch 1 ml Transfektionspuffer A ersetzt. In ein Eppendorfgefäß wurden 2 µg des rekombinanten Plasmids mit 0,5 µg BaculoGoldTM DNA vermischt und für 5 min inkubiert. Nach Zugabe von 1 ml Transfektionspuffer B wurde die Mischung unter Schwenken auf die Zellen getropft, wodurch ein milchiges Präzipitat entstanden ist. Die Zellen wurden für 4 Stunden bei 27 °C inkubiert. Anschließend wurde der Überstand abgenommen und durch 3 ml frisches Medium ersetzt. Nach fünf Tagen bei 27 °C wurde der Überstand P1 geerntet und durch Zentrifugation bei 200 x g für 5 min von den toten Zellen entfernt. Der Virenüberstand P1 wurde bis zur Infektion von *Sf9*-Insektenzellen bei 4 °C gelagert.

5.4.1.2 Durchführung der Infektionen

Zunächst wurden die P1-Viren in den Sf9-Insektenzellen infiziert. Die entsprechende Zellzahl, die in Tab. 5.4 angegeben ist, wurde ausgesät. Nach etwa 30 min waren die Zellen adhärent und das Medium wurde vorsichtig abgenommen. Die entsprechende Virusmenge (s. Tab. 5.4) wurde hinzugegeben und für 1,5 Stunden bei gelegentlichem Schwenken bei RT inkubiert. Anschließend wurde mit Medium bis zum Gesamtvolumen aufgefüllt und für 5-6 Tage bei 27 °C inkubiert. Der Virusüberstand P2 wurde bei 200 x g für 5 min zentrifugiert, um tote Zellen zu entfernen. Diese Viren wurden für weitere Infektionen verwendet und bis zum Gebrauch bei 4 °C gelagert.

Tab. 5.4: Infektionen von Sf9-Insektenzellen

	Sf9-Insektenzellen	max. Virusvolumen	Gesamtvolumen
25 cm ² Zellkulturflasche	3 x 10 ⁶ Zellen	1 ml	5 ml
75 cm ² Zellkulturflasche	9 x 10 ⁶ Zellen	2 ml	10 ml
175 cm ² Zellkulturflasche	18 x 10 ⁶ Zellen	4 ml	20 ml
Schüttelkultur	3 x 10 ⁶ Zellen/ml Schüttelkultur	0,3-0,4 ml/ml Schüttelkultur	

5.4.2 Bac-to-Bac-Expressionssystem

5.4.2.1 Herstellung von Agarplatten zur Transformation von Bacmid-DNA

Der LB-Agar wurde hergestellt, wie in 5.3.6.1 beschrieben. Die Zugabe von 50 µg/ml Kanamycinsulfat, 7 µg/ml Gentamycinsulfat, 10 µg/ml Tetracyclin-HCl, 100 µg/ml X-Gal und 40 µg/ml IPTG erfolgte unmittelbar vor dem Gießen. Die erkalteten Agarplatten wurden mit der Oberseite nach unten unter Lichtabschluss bei 4 °C gelagert.

5.4.2.2 Herstellung von LB-Medium zur Anzucht von Bacmid-DNA-Monoklonen

Das LB-Medium wurde hergestellt, wie in 5.3.7.1 beschrieben. Vor Gebrauch wurden 50 µg/ml Kanamycinsulfat, 7 µg/ml Gentamycinsulfat und 10 µg/ml Tetracyclin-HCl zugefügt.

5.4.2.3 Transformation und Selektion von Bacmid-DNA-Monoklonen

Die DH10Bac™ kompetenten *E. coli*-Bakterien wurden für 30 min auf Eis aufgetaut. 100 µl der kompetenten Bakterien werden in ein Bakterienröhrchen überführt und 1 ng DNA des pFastBac-Mutanten-Konstruktes (s. 5.3.12) wurde hinzugegeben. Nach einer 30-minütigen Inkubation auf Eis wurde der Hitzeschock für 45 s bei 42 °C im Wasserbad durchgeführt. Anschließend erfolgte eine weitere zwei-minütige Inkubation auf Eis, bevor 900 µl SOC-Medium hinzugegeben wurden. Die Bakteriensuspension wurde für 4 Stunden bei 37 °C und 220 rpm geschüttelt. Die Agar-Platten, die die entsprechenden Resistenz-Antibiotika, wie in 5.1.5.3 beschrieben, enthalten, wurden vorher auf RT gebracht. Die Bakteriensuspension (10^0) wurde 1 : 10 verdünnt, in dem 100 µl mit 900 µl SOC-Medium vermischt wurden und so eine 10^{-1} Verdünnung entstand. Diese wurde wiederum 1 : 10 verdünnt (10^{-2}) und nochmals 1 : 10 verdünnt (10^{-3}). Je 100 µl der 10^{-1} , 10^{-2} und 10^{-3} Verdünnung wurden auf je eine Agar-Platte ausgestrichen und mit der Oberseite nach unten für 48 Stunden bei 37 °C und 220 rpm bebrütet.

Auf den bebrüteten Agar-Platten waren weiße Kolonien, die das rekombinante Bacmid enthalten, und blaue Bakterienkolonien gewachsen. Die Platten wurden mit Parafilm umschlossen und konnten dann mit der Oberseite nach unten bei 4 °C gelagert werden. Zur Isolierung von Bacmid-DNA-Monoklonen wurden 4 ml LB-Medium, das Kanamycinsulfat (50 µg/ml), Gentamycinsulfat (7 µg/ml) und Tetracyclin-HCl (10 µg/ml) enthält, mit einer einzelnen weißen Kolonie, die mit einer gelben Pipettenspitze berührt wurde, angeimpft. Die Flüssigkultur wurde über Nacht bei 37 °C und 220 rpm inkubiert. Die Isolierung der Bacmid-DNA erfolgte mit dem ZR BAC DNA Miniprep Kit von der Firma Zymo Research nach dem Protokoll des Herstellers.

5.4.2.4 Kontroll-PCR

Tab. 5.5: Primer für die Kontroll-PCR zur Überprüfung der isolierten Bacmid-DNA, ob die gewünschte Gensequenz enthalten ist.

Primersequenz 5' - 3'	T_m (°C)
for: cccagtcacgacgttgtaaaacg	70
rev: agcggataacaatttcacacagg	66

schwarz: hybridisierter Anteil; T_m : Schmelztemperatur des hybridisierten Anteils

Die rekombinante Bacmid-DNA ist größer als 135 kbp und daher wurde eine Kontroll-PCR zur Überprüfung, ob sich die gewünschte Gensequenz in der rekombinanten Bacmid-DNA befindet, durchgeführt. Die dafür verwendeten

Primer hybridisieren an die mini-attTn7 Targetseite in der LacZ α komplementären Region. Die verwendeten Primer sind in Tab. 5.5 dargestellt.

Die PCR wurde wie folgt angesetzt:

x μ l	DNA-Template (~ 20 ng)
1 μ l	for-Primer (5 pmol/ μ l)
1 μ l	rev-Primer (5 pmol/ μ l)
12,5 μ l	BioMix TM Red
ad 25 μ l	PCR-H ₂ O

Initiale Denaturierung	94 °C	4 min	30 Zyklen
Denaturierung	94 °C	1 min	
Primerhybridisierung	64 °C	1 min	
Elongation	72 °C	2 min	
Terminale Elongation	72 °C	10 min	

Anschließend wurde das PCR-Produkt mit einer Agarose-Gelelektrophorese analysiert und mit dem Geldoc Fotodokumentationssystem von der Firma BioRad wurde das Gel ausgewertet. Liegt nur die Bacmid-DNA alleine vor, wird eine Bande von etwa 300 bp erhalten. Enthält die Bacmid-DNA jedoch das pFastBac-Mutanten-Konstrukt erscheint eine Bande bei etwa 3300 bp.

5.4.2.5 Durchführung der Transfektion

Die zu transfizierenden *Sf9*-Insektenzellen wurden in einer 6 Well-Zellkultur-Platte in einer Dichte von $0,8 \times 10^6$ Zellen/Well ausgesät, wobei Insect-Xpress Medium ohne Antibiotikazusatz verwendet wurde. Nach etwa 30 min wurde von den adhären Zellen das Medium vorsichtig abgenommen. In der Zwischenzeit wurde eine Mischung aus 8 μ l Cellfectin[®] II Reagent und 100 μ l Medium ohne Antibiotikazusatz in einem Eppendorfgefäß hergestellt. In einem weiteren Eppendorfgefäß wurden 1 μ g Bacmid-DNA in 600 μ l Medium ohne Antibiotikazusatz vermischt. Anschließend wurden beide Mischungen vereint und für 20 min bei RT inkubiert. Diese Lösung wurde unter Schwenken auf die Zellen getropft. Die *Sf9*-Insektenzellen wurden für 4 Stunden bei 27 °C inkubiert. Anschließend wurde der Überstand abgenommen und durch 2 ml frisches Medium ersetzt. Nach fünf Tagen bei 27 °C wurde der Überstand P1 geerntet und durch Zentrifugation bei 200 x g für 5 min von den toten Zellen entfernt. Der Virenüberstand P1 wurde bis zur Infektion von *Sf9*-Insektenzellen bei 4 °C gelagert.

5.4.2.6 *Infektion zur Proteinexpression*

Die Infektion von *Sf9*-Insektenzellen wurde, wie unter 5.4.1.2 beschrieben, durchgeführt. Allerdings war die Inkubationsdauer nur 3 Tage bei 27 °C.

5.5 Membranpräparationen

Infizierte Zellen wurden nach 2-3 Tagen zur Herstellung einer Membranpräparation verwendet. Die Membranpräparation wurde auf Eis durchgeführt. Zunächst wurden die infizierten Zellen bei 200 x g für 5 min zentrifugiert und das Pellet wurde mit eiskaltem PBS-Puffer gewaschen. Nach einer erneuten Zentrifugation bei 200 x g für 5 min wurde das Zellpellet in eiskaltem 50 mM Tris-Puffer resuspendiert. Die Zellsuspension wurde mit dem Glas-Teflon-Homogenisator homogenisiert (20 *strokes*) und anschließend bei 200 x g für 5 min zentrifugiert, um den Zellkern zu entfernen. Der Überstand wurde für 1 Stunde bei 48.000 x g und 4 °C zentrifugiert. Die löslichen Proteine wurden dekantiert und verworfen. Das Pellet, das die Membranproteine enthält, wurde in einer entsprechenden Menge an eiskaltem 50 mM Tris-Puffer resuspendiert, homogenisiert und in Eppendorfgefäße aliquotiert. Die Aliquots wurden bis zum Gebrauch bei -80 °C gelagert.

5.6 Proteinbestimmung nach Lowry

Die Methode zur Proteinbestimmung nach Lowry³⁰⁶ ist ein kolorimetrisches Verfahren, wodurch die Konzentration sowohl löslicher als auch unlöslicher Proteine bestimmt werden kann. Dafür sind zwei Reaktionen verantwortlich. Zum einen die Biuret-Reaktion durch Bildung eines blau-violetten Komplexes zwischen den Peptidbindungen und den Cu^{2+} -Ionen in alkalischer Lösung. Zum anderen die Reduktion des zugesetzten Phosphomolybdat-Phosphowolframsäure-Reagenzes durch den Kupfer-Protein-Komplex, wobei eine intensive Blaufärbung auftritt, die zur quantitativen Bestimmung der Proteinkonzentration genutzt wurde. Eine Standardgerade wurde mit mehreren Proben bekannter Proteinkonzentration aufgenommen, in dem die Absorption des blauen Farbkomplexes gemessen und nach dem Lambert-Beerschen Gesetz graphisch dargestellt wurde. Mithilfe der Geradengleichung wurde anschließend die Konzentration einer Proteinprobe bestimmt.

5.6.1 Durchführung

Die verwendeten Lösungen wurden in 5.1.5.4 beschrieben. Zunächst wurde eine BSA-Stammlösung (1 mg/ml) hergestellt, die einen OD₂₈₀-Wert von 0,66 haben sollte. Aufgrund der Linearität der optischen Dichte und der BSA-Proteinkonzentration wurden die tatsächliche Proteinkonzentration der Stammlösung und die daraus hergestellten Verdünnungen errechnet. Für den Proteinstandard wurde eine Verdünnungsreihe mit BSA in einer Konzentration von 50-500 µg/ml hergestellt (s. Tab. 5.6). Das zu bestimmende Protein wird so verdünnt (1 : 10, 1 : 20, 1 : 50), dass die zu erwartende Proteinkonzentration bzw. die gemessene Absorption im Bereich der Standardgerade liegt.

200 µl des Proteinstandards, 200 µl der Proteinprobe und 200 µl Tris-Puffer (Nullwert) wurden mit 1000 µl Reagenz C gut vermischt und für 20 min bei RT inkubiert. Anschließend wurde Reagenz D hinzugegeben und ebenfalls gut vermischt. Nach einer Inkubation von 30 min bei RT wurde die Absorption bei 500 nm der 1 ml blau gefärbten Lösung in einer Einmal-Küvette gegen den Nullwert gemessen.

Tab. 5.6: Verdünnungsschema des Proteins-Standards mit BSA

Proteinkonzentration [µg/ml]	BSA-Stammlösung (1 mg/ml) [µl]	Tris-Puffer [µl]
50	10	190
100	20	180
200	40	160
300	60	140
400	80	120
500	100	100

5.7 Retrovirale Transfektion

5.7.1 Transfektion der Verpackungszellen

24 Stunden vor der Transfektion wurden $1,5 \times 10^6$ Verpackungszellen, GP+envAM12-Zellen, in 25 cm² Zellkulturflaschen mit 3 ml Medium (DMEM, 10% FCS, 100 U/ml Penicillin G, 100 µg/ml Streptomycin) ausgesät. Einige Stunden vor der Transfektion wurde ein Mediumwechsel (6,25 ml Medium DMEM, 10% FCS) durchgeführt. In einem sterilen Eppendorfgefäß wurden 6,25 µg des rekombinanten Plasmids und 3,75 µg pLXSN-VSV-G-Plasmids auf 625 µl mit DMEM-Medium aufgefüllt. In einem zweiten sterilen Eppendorfgefäß wurden 25 µl LipofectaminTM 2000 und 600 µl DMEM-Medium vermischt und für 5 min inkubiert. Anschließend wurden beide Ansätze vereinigt und für 20 min

inkubiert, bevor dann der gesamte Ansatz zu den konfluenten Verpackungszellen pipettiert wurde. Nach 12-15 Stunden wurde ein Mediumwechsel (3 ml Medium DMEM, 10% FCS, 100 U/ml Penicillin G, 100 µg/ml Streptomycin) durchgeführt und zur Förderung der Virenproduktion wurden 30 µl 500 mM Natriumbutyrat-Lösung zugegeben. Die weitere Kultivierung der Verpackungszellen erfolgte für 48 Stunden bei 32 °C. Die Verpackungszellen entlassen nun rekombinante, replikationsdefekte Retroviren, die das Verpackungssignal ψ , virale Promotoren und das zu übertragene Gen enthalten, jedoch keine *gag*, *pol* und *env*-Gene.

5.7.2 Infektion der Zielzellen

24 Stunden vor der Infektion wurden $0,5 \times 10^6$ Zielzellen, 1321N1-Astrozytomzellen, in eine 25 cm² Zellkulturflasche mit 5 ml Grund-Medium ausgesät. Am Tag der Infektion wurde das Medium der 1321N1-Astrozytomzellen abgenommen und durch 2 ml des steril filtrierten, virenhaltigen Medienüberstands der Verpackungszellen ersetzt. Um die Infektionseffizienz zu erhöhen, wurden dem Infektionsmedium 6 µl Polybren-Lösung (4 mg/ml in H₂O) zugefügt. Polybren ist ein positiv geladenes Polymer, dessen kleine Moleküle an die Oberfläche von Zellen binden und deren Oberflächenspannung neutralisieren. Virale Glykoproteine können daraufhin effektiver an ihre Rezeptoren binden. Die Kultivierung der 1321N1-Astrozytomzellen erfolgte für 2 ½ Stunden bei 32 °C. Anschließend wurde das Medium erneut gewechselt und die Zellen wurden bei 37 °C kultiviert.

5.7.3 Selektion einer stabil transfizierten Zelllinie

48 Stunden nach der Infektion der Zielzellen wurde die Selektion mit 800 µg/ml G418 (Geneticin, Neomycinderivat) gestartet. Die infizierten Zellen besitzen ein Neomycin-Resistenzgen und überleben daher in diesem Medium. Wohingegen die nicht infizierten Zellen in den nächsten Tagen absterben. In dieser Zeit wurde das Medium alle 48 Stunden gewechselt. Nach einer Woche wurde die G418-Konzentration auf 200 µg/ml im Medium reduziert.

5.7.4 RT-PCR

Zur Untersuchung der Expression des gewünschten Gens auf RNA-Ebene wurde aus den stabil transfizierten 1321N1-Astrozytomzellen mRNA isoliert und in cDNA mit reverser Transkriptase umgeschrieben.

5.7.4.1 *mRNA-Isolierung und reverse Transkription*

Die stabil transfizierten 1321N1-Astrozytomzellen, die die Gensequenz des Maus-Adenin-Rezeptors mAdel enthalten, wurden in einer 75 cm² Zellkulturflasche kultiviert. Bei einer 80 %igen Konfluenz wurden die Zellen mit PBS-Puffer gewaschen. Nach Zugabe von 2-3 ml TRIzol Reagenz wurden die Zellen für 10 min bei RT inkubiert. In ein steriles, RNase-freies Eppendorfgefäß wurde je 1 ml Zellsuspension überführt. Nach Zugabe von 200 µl Chloroform und 15 s Schütteln erfolgte eine erneute Inkubation für 10 min bei RT. Anschließend wurde bei 12.000 xg und 4 °C für 10 min zentrifugiert. Die obere, wässrige, klare Phase wurde in ein neues, steriles, RNase-freies Eppendorfgefäß überführt. Nach Zugabe von 500 µl eiskaltem Isopropanol wurde erneut 10 min bei RT inkubiert. Eine Zentrifugation von 12.000 xg und 4 °C für 10 min erfolgte. Der Überstand wurde entfernt und mit 1000 µl eiskaltem Ethanol 70 % wurde das Pellet gewaschen. Eine letzte Zentrifugation von 7.500 xg und 4 °C für 5 min wurde durchgeführt. Der Überstand wurde abgenommen und das Pellet wurde getrocknet, bis kein Ethanolgeruch mehr wahrnehmbar war. Das Pellet wurde in 30 µl DEPC-Wasser resuspendiert.

Die Umschreibung der isolierten RNA zur cDNA erfolgte mit dem Omniscript RT Kit von der Firma Qiagen. Der Ansatz wurde wie folgt pipettiert:

6 µl	RNA
1 µl	Oligo-dT Primer (0,4 µg/µl)
1 µl	dNTP`s Mix (10 mM)
1 µl	RT Puffer (10 x)
0,5 µl	RNase Inhibitor
0,5 µl	Reverse Transkriptase

Die Umschreibung zur cDNA erfolgte bei 37 °C für eine Stunde.

5.7.4.2 *Primer*

Zunächst wurde eine Positivkontrolle mit Primern, die an das humane „housekeeping Gen“ β-Aktin (NM_001101)^{297,298} binden, durchgeführt, um die erfolgreiche Isolierung der RNA und anschließende Umschreibung in cDNA zu überprüfen. In einer Agarose-Gelelektrophorese wird eine Bande bei 257 bp erwartet. Anschließend wurde überprüft, ob die gewünschte Gensequenz des Maus-Adenin-Rezeptors Subtyp 1 auf RNA-Ebene vorhanden war. Dazu wurden die bereits vorhandenen Klonierungs-Primer verwendet. Es wird eine Bande von ca. 1000 bp erwartet. Die verwendeten Primer sind in Tab. 5.7 dargestellt.

Tab. 5.7: Primer für die Kontroll-PCR zur Untersuchung der Expression auf RNA-Ebene

Primer	Primersequenz 5' - 3'	T _m (°C)
humanes β-Aktin	for: ggctcgctgtccaccttc rev: tgtcaccttcaccgttccagttttt	68 72
mAde1	for: gagacggaattcaccATGgggaaagcagcaccgg rev: gcatattctcgagTCAtggctctgctttgctttttg	66 66

grau: nicht Hybrid-Anteil; grau unterlegt: Schnittstelle für das Restriktionsenzym; schwarz: Sequenz; T_m: Schmelztemperatur des hybridisierten Anteils

5.7.4.3 Kontroll-PCR

Die PCR wurde wie folgt angesetzt:

x µl	DNA-Template (~ 20 ng)
1 µl	for-Primer (5 pmol/µl)
1 µl	rev-Primer (5 pmol/µl)
12,5 µl	BioMix™ Red
ad 25 µl	PCR-H ₂ O

Initiale Denaturierung	94 °C	4 min	30 Zyklen
Denaturierung	94 °C	1 min	
Primerhybridisierung	64 °C	1 min	
Elongation	72 °C	2 min	
Terminale Elongation	72 °C	10 min	

Anschließend wurde das PCR-Produkt mit einer Agarose-Gelelektrophorese analysiert und mit dem Geldoc Fotodokumentationssystem von der Firma BioRad ausgewertet.

5.8 Radioligand-Bindungsstudien

Das Prinzip der Radioligand-Bindungsstudien beruht auf der Bildung eines Ligand-Rezeptor-Komplexes. Im Gleichgewichtszustand zwischen dem gebundenen und freien Radioligand wird der gebundene Radioligand vom Freien durch Filtration abgetrennt. Die Radioaktivität des auf dem Filter gebundenen Radioligand kann durch einen Flüssigkeits-Szintillationszähler gemessen werden.

5.8.1 Sättigungsexperimente mit [³H]Adenin

Bei einem Sättigungsexperiment wurden verschiedene Konzentrationen von 0,05-2000 nM für den Radioliganden [³H]Adenin verwendet. Normalerweise wurden die Radioligand-Bindungsstudien in einem 400 µl Assay-Volumen durchgeführt. Bei einem 400 µl Assay-Volumen würde eine zu große Menge an Radioligand benötigt werden, weshalb die Sättigungsexperimente in einem 200 µl Assay-Volumen durchgeführt wurden. Zusätzlich wurde der Radioligand mit dem unmarkierten Liganden Adenin verschnitten. Jedes Sättigungsexperiment wurde dreimal in Duplikaten durchgeführt.

Pipettierschema:

50 µl	50 mM Tris-Puffer / DMSO 90 : 10 (Gesamtbindung) oder Adenin 100 µM (unspezifische Bindung)
50 µl	Radioligand [³ H]Adenin (Endkonzentration: verschiedene 0,05-2000 nM) in 50 mM Tris-Puffer (pH 7,4)
100 µl	Proteinsuspension in 50 mM Tris-Puffer (pH 7,4)
Σ 200 µl	Assay-Volumen

Inkubationszeit: 1 Stunde bei RT

Das „Verschneiden“ des Radioliganden [³H]Adenin mit „kaltem“ Adenin wurde wie folgt berechnet.

Benötigte Radioligandmenge:

$\frac{\text{spez. Aktivität (Ci/mmol)} \times \text{Konzentration des Radioliganden (nM)} \times \text{Volumen (ml)}}{\text{Konzentration (mCi/ml)}}$
--

$$\frac{27,2 \text{ Ci/mmol} \times 1500 \text{ nM} \times 1,5 \text{ ml}}{\text{mmol} \times 1000 \text{ ml} \times 1 \mu\text{Ci}} = 245 \mu\text{l } [^3\text{H}]\text{Adenin}$$

Jedoch wurden von den 245 µCi nur 20% und somit 49 µCi eingesetzt. Mithilfe der folgenden Gleichung kann berechnet werden, mit wie viel an „kalten“ Liganden der „heiße“ Ligand verschnitten wird.

$$W = M \times {}^0a \times \left(\frac{1}{A'} - \frac{1}{A} \right)$$

W = Kaltligand [mg]

M = Molekulargewicht des „kalten“ Liganden [g/mol]

⁰a = eingesetzte Aktivität [Ci]

A' = spez. Aktivität des Radioliganden (Soll) [Ci/mol]

A = spez. Aktivität des Radioliganden (Ist) [Ci/mol]

$$W_{[\text{Adenin}]} = \frac{135 \text{ g/mol} \times 49 \text{ Ci} \times \left(\frac{1}{27,2 \text{ Ci/mmol}} - \frac{1}{5,44 \text{ Ci/mmol}} \right)}{1000} = 0,97 \text{ } \mu\text{g}$$

Es wurde eine Stammlösung (0,1 mg Adenin / 1 ml Wasser / Ethanol 2 %) hergestellt. 9,7 μl der Stammlösung wurden eingesetzt, um 0,97 μg „kalten“ Liganden zu erhalten. Daraus ergab sich folgendes Gesamtvolumen von 58,72 μl für [^3H]Adenin (49 μl) und „kaltes“ Adenin (9,72 μl), das mit 1441 μl 50 mM Tris-Puffer (pH 7,4) aufgefüllt wurde, um ein Gesamtvolumen von 1,5 ml zu erhalten.

Zunächst wurden 50 μl 50 mM Tris-Puffer / DMSO 90 : 10 zur Bestimmung der Gesamtbindung oder Adenin in einer Konzentration von 100 μM zur Bestimmung der unspezifischen Bindung vorgelegt. Nach Zugabe der verschiedenen Radioligandverdünnungen wurde die Proteinlösung hinzupipettiert. Nach einer Inkubation von 1 Stunde bei RT erfolgte die Filtration über einen GF/B-Glasfaserfilter, wobei der gebundene Radioligand vom Freien getrennt wurde. Nach Zugabe von 2,5 ml Szintillationscocktail auf die Filterstückchen wurde zunächst für 6 Stunden inkubiert, bevor die Vermessung der Proben erfolgte. Die erhaltenen Daten wurden mit dem Programm Graph Pad Prism[®] 4.0 ausgewertet. Dazu wurde zunächst die spezifische Bindung errechnet, indem die cpm-Werte der unspezifischen Bindung von der Gesamtbindung subtrahiert wurden. Die verschiedenen Radioligand-Konzentrationen wurden gegen die cpm-Werte der spezifischen Bindung des Radioligand unter Erhaltung einer hyperbolen Sättigungskurve aufgetragen. Die Gleichgewichtsdissoziationskonstante (K_D -Wert) und die maximale Rezeptoranzahl in der Membranpräparation (B_{max} -Wert) konnten so errechnet werden.

5.8.2 Konkurrenzexperimente mit [^3H]Adenin

In Konkurrenzexperimenten wurde eine konstante Konzentration von 10 nM des Radioliganden [^3H]Adenin und verschiedene Konzentrationen der Testverbindungen verwendet. Die unspezifische Bindung wurde mit kaltem Adenin in einer Konzentration von 100 μM bestimmt. Jedes Konkurrenzexperiment wurde dreimal in Triplikaten durchgeführt.

Pipettierschema:

10 μl	DMSO (Gesamtbindung) oder Adenin 100 μM (unspezifische Bindung) oder Testverbindung in DMSO
190 μl	50 mM Tris-Puffer (pH 7,4)
100 μl	Radioligand [^3H]Adenin (Endkonzentration: 10 nM) in 50 mM Tris-

Puffer (pH 7,4)
 100 μ l Proteinsuspension in 50 mM Tris-Puffer (pH 7,4)
 Σ 400 μ l Assay-Volumen
 Inkubationszeit: 1 Stunde bei RT

Pipettierschema für GTP-Shift-Experimente:

10 μ l DMSO (Gesamtbindung) oder
 Adenin 100 μ M (unspezifische Bindung) oder
 Testverbindung in DMSO
 90 μ l 50 mM Tris-Puffer (pH 7,4)
 100 μ l 1 mM GTP in 50 mM Tris-Puffer (pH 7,4)
 100 μ l Radioligand [3 H]Adenin (Endkonzentration: 10 nM) in 50 mM Tris-
 Puffer (pH 7,4)
 100 μ l Proteinsuspension in 50 mM Tris-Puffer (pH 7,4)
 Σ 400 μ l Assay-Volumen
 Inkubationszeit: 1 Stunde bei RT

Aufgrund einer 1 : 40 Verdünnung der Testverbindung im Konkurrenzexperiment wurde eine 40-fach höhere Lösung der Testverbindung hergestellt, um im Assay-Volumen die gewünschte Endkonzentration zu erhalten. Zunächst wurden 190 μ l 50 mM Tris-Puffer (pH 7,4) und 10 μ l der Testverbindung, des DMSO zur Bestimmung der Gesamtbindung oder des Adenins in einer Konzentration von 100 μ M vorgelegt. Nach Zugabe der Radioligandverdünnung wurde die Proteinlösung hinzupipettiert. Nach einer Inkubation von 1 Stunde bei RT erfolgte die Filtration über einen GF/B-Glasfaserfilter, wobei der gebundene Radioligand vom Freien getrennt wurde. Nach Zugabe von 2,5 ml Szintillationscocktail auf die Filterstückchen wurde zunächst für 6 Stunden inkubiert, bevor die Vermessung der Proben erfolgte. Die erhaltenen Daten wurden mit dem Programm GraphPad Prism[®] 4.0 ausgewertet. Dazu wurde zunächst die spezifische Bindung errechnet, in dem die cpm-Werte der unspezifischen Bindung von der Gesamtbindung subtrahiert wurden. Die logarithmierten Konzentrationen der Testverbindung wurden gegen den prozentualen Anteil der spezifischen Bindung des Radioligands unter Erhaltung einer sigmoidalen Inhibitionskurve aufgetragen. Die mittlere inhibitorische Konzentration IC_{50} -Wert konnte so errechnet werden.

5.8.3 Bestimmung von cyclischem Adenosinmonophosphat (cAMP)

24 Stunden vor Durchführung des cAMP-Experimentes wurden $0,2 \times 10^6$ Zellen/Well in 24 Well-Platten mit Grundmedium ausgesät. Am Tag des cAMP-Experimentes wurden die Zellen zunächst mit 500 μ l 37 °C warmem HBSS-Puffer gewaschen. Danach erfolgte eine zwei-stündige Inkubation bei 37 °C in

400 µl HBSS-Puffer. In dieser Zeit wurden die Verdünnungsreihe der Testverbindung und die Lösung zur Stimulation der cAMP-Produktion (z. B. Isoprenalin 3 nM oder Forskolin 10 µM) hergestellt. Anschließend wurden 50 µl der Testverbindung und 50 µl der Lösung, die zur maximalen Stimulation der cAMP-Produktion führt, zügig pipettiert und für 10 min bei 37 °C inkubiert. Durch Entfernen des 500 µl Volumens wurde die Reaktion gestoppt und die Zellmembran wurde durch 500 µl Lysepuffer aufgelöst. Nach einer ein-stündigen Inkubation auf Eis wurden 50 µl in Radioligand-Bindungsstudien eingesetzt. Jedes cAMP-Experiment wurde dreimal in Triplikaten durchgeführt, wobei pro 24 Well-Platte sechs verschiedene Konzentrationen einer Testverbindung, HBSS-Puffer als Negativkontrolle und die maximale Stimulation der cAMP-Produktion als Positivkontrolle durchgeführt wurden.

Pipettierschema:

50 µl	Zelllysate, das cAMP enthält, oder cAMP-Standard-Verdünnungen in Lysepuffer oder Lysepuffer (Gesamtbindung)
30 µl	Radioligand [³ H]cAMP (Endkonzentration: 3 nM) in Lysepuffer
40 µl	Bindeprotein ³⁰⁷ in Lysepuffer (100 µg/vial)
Σ 120 µl	Assay-Volumen

Inkubationszeit: 1 Stunde auf Eis

Das weitere Vorgehen erfolgte, wie bereits für die Konkurrenzexperimente (s. 5.8.2) beschrieben.

Die erhaltenen Daten wurden ebenfalls mit dem Programm GraphPad Prism[®] 4.0 ausgewertet. Die cpm-Werte der Gesamtbindung (c_0) wurden durch die einzelnen cpm-Werte der Testverbindung (c_x) dividiert. Anhand der Geradengleichung aus der cAMP-Standard-Verdünnung wurden die cAMP-Menge der einzelnen cpm-Werte (c_0/c_x) errechnet. Die logarithmierten Konzentrationen der Testverbindung wurden gegen den prozentualen Anteil der cAMP-Menge unter Erhaltung einer sigmoidalen Dosis-Wirkungs-Kurve aufgetragen. Die mittlere effektive Konzentration EC_{50} -Wert konnte so errechnet werden.

5.8.4 [³⁵S]GTPγS-Bindungsstudien

Der Radioligand [³⁵S]GTPγS wurde zunächst 1 : 1000 mit 10 mM Tricin / 10 mM DTT Puffer verdünnt und bis zum Gebrauch bei -20 °C gelagert.

In GTPγS-Bindungsstudien wurde eine konstante Konzentration von 0,5 nM des Radioliganden [³⁵S]GTPγS und verschiedene Konzentrationen der Testverbindung verwendet. Die unspezifische Bindung wurde mit kaltem GTPγS in einer

Konzentration von 10 μM bestimmt. Jede GTP γ S-Bindungsstudie wurde dreimal in Triplikaten durchgeführt.

Pipettierschema:

300 μl	Bindungspuffer mit 0,05 % BSA
50 μl	10 μM GDP in Bindungspuffer
50 μl	50 mM Tris-Puffer / DMSO 90 : 10 (Gesamtbindung) oder 10 μM GTP γ S in 50 mM Tris-Puffer / DMSO 90 : 10 (unspezifische Bindung) oder Testsubstanz in 50 mM Tris-Puffer / DMSO 90 : 10
50 μl	Radioligand [^{35}S]GTP γ S (Endkonzentration: 0,5 nM) in Bindungspuffer
50 μl	Proteinsuspension in Bindungspuffer
Σ 500 μl	Assay-Volumen

Inkubationszeit: 1 Stunde bei RT

Aufgrund einer 1 : 10 Verdünnung der Testverbindung wurde eine 10-fach höhere Lösung der Testverbindung hergestellt, um im Assay-Volumen die gewünschte Endkonzentration zu erhalten. Das weitere Vorgehen erfolgte, wie bereits für die Konkurrenzexperimente (s. 5.8.2) beschrieben.

Die erhaltenen Daten wurden mit dem Programm GraphPad Prism[®] 4.0 ausgewertet. Dazu wurde zunächst die spezifische Bindung errechnet, in dem die cpm-Werte der unspezifischen Bindung von der Gesamtbindung subtrahiert wurden. Die logarithmierten Konzentrationen der Testverbindung wurden gegen den prozentualen Anteil der spezifischen Bindung des Radioliganden unter Erhaltung einer sigmoidalen Dosis-Wirkungs-Kurve aufgetragen. Die mittlere effektive Konzentration EC_{50} -Wert konnte so errechnet werden.

Normalerweise wird aufgrund der kurzen Halbwertszeit des Radionuklids Schwefel-35 (87,5 Tage) die entsprechende spezifische Aktivität für den Versuchstag berechnet. An dem Kalibrierdatum besitzt der Radioligand genau eine spezifische Aktivität von 1250 Ci/mmol und eine Konzentration von 12,5 mCi/ml. Der Radioligand wurde nach Ablauf des Kalibrierdatums nicht mehr verwendet und somit war der Unterschied in der Radioligandmenge nur sehr minimal. Daher wurden für die [^{35}S]GTP γ S-Bindungsstudien keine Berechnungen der entsprechenden spezifischen Aktivität vorgenommen.

5.9 SDS-PAGE (Polyacrylamid-Gelelektrophorese)

Zunächst wurden für die SDS-PAGE („sodium dodecylsulfate polyacrylamide gel electrophoresis“) je ein Trenn- und ein Sammelgel angefertigt (s. 5.1.5.6).³⁰⁸

Zwei Gasplatten werden in den Gießstand von der Firma BioRad eingespannt und mit der Lösung für das Trenngel ca. 5 cm hoch befüllt. Im direkten Anschluss wurde eine Schicht Isopropanol darauf pipettiert, um eine glatte Oberfläche zu erhalten. Nach Polymerisation des Trenngels wurde die Isopropanolschicht mit Wasser entfernt. Auf das Trenngel wurde die Lösung des Sammelgels gegeben und durch Einsetzen eines Kammes wurden die Geltaschen geformt. Nach Polymerisation des Sammelgels wurde das Gel, das sich zwischen den zwei Gasplatten befindet, in die vertikale Gelkammer von der Firma BioRad eingespannt. Die Kammer wurde luftblasenfrei mit Laufpuffer befüllt.

Die Proben wurden wie folgt vorbereitet: Die Proteinlösung wurde mit dem Ultraschallstab homogenisiert und anschließend mit einem Proben-Puffer versetzt. Die Proteine binden das SDS (*sodium dodecylsulfat*) und es entstehen negativ geladene SDS-Protein-Komplexe mit konstantem Ladungs- zu Masse-Verhältnis. Zusätzlich wurden die Proteine durch SDS denaturiert und dadurch konnte die Ausbildung von Protein-Protein-Wechselwirkungen (Quartärstrukturen) verhindert werden. Anschließend wurden die Proben für 3-4 min bei 80 °C erhitzt, um die Sekundär- und Tertiärstrukturen der Proteine aufzubrechen, in dem Wasserstoffbrückenbindungen getrennt und die Moleküle entfaltet wurden. Zur Auftrennung wurden die denaturierten Proben auf ein Gel geladen, das in geeigneten Elektrolyten eingelegt war. Zusätzlich zu den Proben wurde ein Größenmarker auf das Gel aufgetragen, der aus Proteinen von bekannter Größe besteht. Dadurch wurde die Abschätzung der Größe der Proteine in den eigentlichen Proben ermöglicht. Danach wurde eine elektrische Spannung von 200 Volt angelegt, die eine Migration der negativ geladenen SDS-Protein-Komplexe im elektrischen Feld zum Plus-Pol bewirkte. Das Gel besitzt dabei einen Effekt wie ein Molekularsieb, in dem kleine Proteine relativ leicht durch die Maschen des Gels wanderten und große Proteine hingegen eher zurückgehalten wurden und sich dadurch langsamer durch das Gel bewegten. Dadurch wurden die Proteine entsprechend ihrer Größe aufgetrennt und im nachfolgenden mithilfe des Western Blottings, im speziellen einer Immundetektion (Antigen-Antikörper-Bindungsprinzip), sichtbar gemacht wurden.

5.10 Western Blotting

Mit Western Blotting können Proteine durch markierte Antikörper nachgewiesen werden. Die verwendeten Antikörper sind in Tab. 5.8 aufgelistet.

Tab. 5.8: Antikörper für das Western Blotting

Antikörper	Klon	Bezugsquelle	Verdünnung
Anti-c-myc1 9E10 ^a	Monoklonal IgG ₁	AK M. Gütschow, Bonn	1 : 5000
Anti-G _i α-1 and G _i α-2-Subunits, C-Terminal (345-354 and 346-355) ^b	Polyklonal IgG, Säugetier	Calbiochem, 371723	1 : 1000
Anti-G _y -2-Subunit ^c	Polyklonal IgG, menschlich	Calbiochem, 371847	1 : 2000
Anti-rAde	Polyklonal	Thermo Scientific	
rAde_2:16 N-term 398	rAde-398		1 : 200
rAde_2:16 N-term 399	rAde-399		1 : 400
rAde_154:167 EL2 400	rAde-400		1 : 500
rAde_154:167 EL2 401	rAde-401		1 : 1000
rAde_195:208 IL3 402	rAde-402		1 : 200
rAde_195:208 IL3 403	rAde-403		1 : 200
rAde_286:304 C-term 404	rAde-404		1 : 4000
rAde_286:304 C-term 405	rAde-405		1 : 5000
rAde_268:286 C-int 406	rAde-406		1 : 200
rAde_268:286 C-int 407	rAde-407		1 : 200
Anti-HRP-gekoppelter-Anti-Maus Antikörper	Sekundär-Antikörper gegen Monoklonale, IgG	Jackson Immuno Research 115- 035-003	1 : 5000
Anti-HRP-gekoppelter Anti-Kaninchen Antikörper	Sekundär-Antikörper gegen Polyklonale, IgG	Jackson Immuno Research 111- 035-003	1 : 5000

^a Epitop der Aminosäuresequenz der C terminalen Domäne des menschlichen c-Myc,³⁰⁹ Antikörper gegen die 10 Aminosäuren des myc-Epitops (Gen ID 17869); ^b synthetisches Peptid [(C)KNNLKDCGLF] der Aminosäuresequenz des C-Terminus von Säugetier G_iα-1 und G_iα-2; ^c rekombinant, menschliche, Retina G_y-2-Untereinheit

5.10.1 Durchführung

Die in der SDS-PAGE aufgetrennten Proteine wurden im Western Blotting auf eine Nitrocellulose-Membran transferiert. Dazu wurde ein senkrecht zum Polyacrylamid-Gel gerichtetes elektrisches Feld von 100 Volt angelegt, wodurch die Proteine aus dem Gel auf eine Nitrocellulose-Membran wandern und an der Membranoberfläche durch hydrophobe Wechselwirkungen haften bleiben. Um die Proteinbindungsstellen der Nitrocellulose-Membran zu aktivieren, wurde dem Blot-Puffer Methanol zugesetzt. Vor der Reaktion mit Antikörpern wurden die restlichen Proteinbindungsstellen der Nitrocellulose-Membran mit Milchpulver-Lösung abgesättigt, um das Anheften der Antikörper an die freien Bindungsstellen zu verhindern. Die Membran wurde dann mit einer verdünnten anti-Antigen-Antikörper-Lösung (Primär-Antikörper) inkubiert, wobei der Antikörper möglichst spezifisch gegen das Protein auf der Membran gerichtet war. Durch einige

Waschschritte wurde der schwächer haftende, unspezifisch gebundene Antikörper von der Membran entfernt. Eine zweite Antikörperlösung, die den sogenannten Sekundär-Antikörper enthält, der an das Enzym Meerrettich-Peroxidase gekoppelt ist, wurde auf die Membran gegeben. Der Sekundär-Antikörper ist spezifisch gegen den Fc-Bereich des ersten Antikörpers gerichtet und bindet an diesen. Nach weiteren Waschschritten erfolgte die Detektion mithilfe einer enzymatischen ECL-Reaktion („Enhanced Chemilumineszenz“-Reaktion).³¹⁰ Unter alkalischen Bedingungen kommt es zur Peroxidase/H₂O₂-katalysierten Oxidation des zyklischen Diacylhydrazids Luminol, das sich kurzzeitig in einem angeregten Zustand befindet. Durch Anwesenheit von chemischen Verstärkern wird unter Emission von Lichtquanten dieser Zustand wieder verlassen. Durch Auflegen eines Röntgenfilms auf den behandelten Blot wurden die entsprechenden Stellen geschwärzt.

5.11 Fluorimetrische Calciummessung

5.11.1 Einstellungen am Novostar®

Tab. 5.9: Messparameter am Novostar® für den Farbstoff Oregon Green 488 BAPTA-1/AM

Messparameter	Oregon Green 488 BAPTA-1/AM
Anregungswellenlänge	485 nm, Bandbreite 25 nm
Emmissionswellenlänge	520 nm, Bandbreite 20 nm
Anzahl der Blitze (Validierung)	10 (20)
Gain	variabel
Zeitfenster 1 (2)	0 - 4 s (11,6 - 35,6 s)
Intervallanzahl (Validierung)	60 (1)
Intervallzeit	0,4 s
Injektionszeitpunkt	11,6 s
Injektionsgeschwindigkeit	65 µl/s
Positionsverzögerung	0,2 s
Temperatur	28 °C
Spülschritte nach jeder Injektion	2
Spülsystem-Lösung	demineralisiertes Wasser

Die Einstellungen am Novostar® für den Farbstoff Oregon Green 488 BAPTA-1/AM sind in Tab. 5.9 dargestellt.

5.11.2 Messung der intrazellulären Calcium-Freisetzung

Die Messung der intrazellulären Calcium-Freisetzung wurde wie folgt durchgeführt.³¹¹ Die stabil transfizierten 1321N1-Astrozytomzellen, die die Gensequenz des Maus-Adenin-Rezeptors mAde1 enthalten, wurden in zwei 175 cm² Zellkulturflaschen kultiviert. Bei einer 80 %igen Konfluenz wurden die Zellen mit PBS-Puffer gewaschen und mit Trypsin / EDTA-Lösung abgelöst. Die Zellsuspension wurde mit 20 ml Medium in einem nur leicht zugeordneten Falcon für 45 min bei 37 °C im Brutschrank inkubiert. Anschließend wurde bei 200 x g für 5 min zentrifugiert. Das Zellpellet wurde in 994 µl KHP resuspendiert. In ein Eppendorfgefäß wurden 3 µl des Farbstoffes Oregon Green 488 BAPTA-1/AM und 3 µl Pluronic[®] F127-Stammlösung vorgelegt und anschließend die Zellsuspension hinzugegeben. Nach einer ein-stündigen Inkubation bei RT unter Lichtausschluss und 10 U/min wurde das Eppendorfgefäß bei 2,7 x g für 12 s zentrifugiert. Das Pellet wurde zweimal mit 994 µl KHP gewaschen. In der Inkubationszeit wurde die Agonist-Verdünnungsreihe hergestellt und 35 µl Agonist-Lösung in eine klare V-bodenförmige 96 Mikrotiter-Platte pipettiert. Als Kontrolle wurde Carbachol in einer Konzentration von 100 µM verwendet. Die Zellsuspension mit dem aufgenommenen Farbstoff wurde in 20 ml KHP unter ständigem Schwenken gleichmäßig verteilt und 180 µl in die schwarze 96 Mikrotiter-Platte mit transparentem Boden pipettiert. Die Platte wurde für 20 min bei 28 °C im Novostar[®] inkubiert, um das gleichmäßige Absinken der Zellen zu erreichen. In dieser Zeit wurde das Pumpsystem mit Wasser durchgespült, um vorhandene Luftblasen zu entfernen. Danach wurde der benötigte Gain (Lichtverstärkung) ermittelt und eine Grundfluoreszenz von 42.000 Fluoreszenzeinheiten sollte erreicht werden. Der Injektor pipettiert dann 20 µl des Agonisten aus einem Well in die Messplatte und nimmt die Fluoreszenzintensität für 60 Intervalle à 0,4 s auf.

5.11.3 Auswertungen der Calciummessungen

Die Auswertung erfolgte zunächst mit dem Programm ZADAS, das in unserem Arbeitskreis von Matthias Zepper entwickelt wurde, und eine sehr schnelle Analyse der Daten ermöglichte. Als Kontrolle bzw. Nullwert diente der gemessene Fluoreszenz-Wert, der durch die Injektion von 20 µl KHP zu den Zellen, bestimmt wurde und von dem Mittelwert eines Messintervalls abgezogen wurde. Die erhaltenen Daten wurden mit dem Programm GraphPad Prism[®] 4.0 ausgewertet. Die logarithmierten Konzentrationen des Agonisten Adenin wurden gegen den prozentualen Anteil der intrazellulären Calcium-Freisetzung bezogen auf 100 µM Carbachol unter Erhaltung einer sigmoidalen Dosis-Wirkungs-Kurve aufgetragen.

5.12 „Uptake“-Experimente

In einem „uptake“-Experiment wird die Aufnahme einer radioaktiv markierten Verbindung in die Zelle gemessen. In den durchgeführten Experimenten wurde der Radioligand [³H]Adenin verwendet. Die „uptake“-Experimente ermöglichten eine Aussage über einen möglichen Adenin-Transporter in der entsprechenden Zelllinie.^{185,186,312}

Folgende Zelllinien wurden für die „uptake“-Experimente verwendet: NG108-15-Zellen, HEK293-Zellen, Wildtyp und stabil transfizierte 1321N1-Astrozytomzellen, die den Ratten-Adenin-Rezeptor exprimieren.

5.12.1 Durchführung

24 Stunden vor Durchführung des „uptake“-Experimentes wurden $0,2 \times 10^6$ Zellen/Well in 24 Well-Platten mit Grundmedium ausgesät. Am Tag des Versuches wurden die Zellen zunächst mit HEPES-Puffer-Ringer-Lösung oder Na-freier HEPES-Puffer-Ringer-Lösung gewaschen und 30 min auf Eis inkubiert. Anschließend wurde der Radioligand [³H]Adenin in einer Konzentration von 30 nM zusammen mit der Testverbindung für 1 min auf Eis inkubiert. Die Reaktion wurde gestoppt mit eiskaltem PBS-Puffer, der 5 mM Adenin enthält. Anschließend wurden die Zellen mit Triton[®] X-100 5 % lysiert. Nach Zugabe von 2,5 ml Szintillationscocktail und einer sechs-stündigen Inkubationszeit wurde die Radioaktivität in einem Flüssig-Szintillationszähler gemessen.

Alle „uptake“-Experimente wurden in Triplikaten in einem Assay-Volumen von 250 µl durchgeführt. Als Kontrolle diente die [³H]Adenin-Aufnahme ohne Anwesenheit der Testverbindung. Die erhaltenen cpm-Werte wurden zunächst in nmol/5 x 10⁶ Zellen des aufgenommenen [³H]Adenin mit dem Programm Excel 2007 umgerechnet und anschließend mit GraphPad Prism[®] 4.0 ausgewertet. Für die Darstellung der Kinetik-Experimente wurde die Zeit gegen die [³H]Adenin-Aufnahme in nmol/5 x 10⁶ Zellen unter Erhaltung eines hyperbolen Kurvenverlaufes aufgetragen. In homologen Konkurrenzexperimenten wurde die logarithmierten Konzentrationen der Testverbindung gegen die [³H]Adenin-Aufnahme in nmol/5 x 10⁶ Zellen unter Erhaltung einer sigmoidalen Inhibitionskurve aufgetragen. Die mittlere inhibitorische Konzentration IC₅₀-Wert, die Michaelis-konstante K_m-Wert und die maximale Geschwindigkeit V_{max}-Wert konnten so errechnet werden.

5.13 Statistische Berechnungen

Zur Berechnung der statistischen Signifikanz wurde ein ungepaarter *two-tailed t*-Test durchgeführt. Die Symbole besitzen dabei folgende Bedeutungen: ns = nicht signifikant ($P > 0,05$), * = signifikant ($P < 0,05$), ** = sehr signifikant, ($P < 0,01$) und *** = äußerst signifikant ($P < 0,001$).

6 Abkürzungsverzeichnis

A	Adenin
Å	Angström
A _{2A} R	Adenosin-A _{2A} -Rezeptor
Abb.	Abbildung
AC	Adenylatcyclase
AcNPV	<i>Autographa californica</i> nuclear polyhedrosis virus
ADP	Adenosin-5'-diphosphat
Ak	Arbeitskreis
Amp	Ampicillin
AMP	Adenosin-5'-monophosphat
ATP	Adenosin-5'-triphosphat
β _{1/2} AR	β _{1/2} -adrenerge Rezeptor
bp	Basenpaare
BEVS	Baculogold™ Baculovirus-Expressionssystem
B _{max}	Maximale Anzahl der (spezifischen) Bindungsstellen
Bq	Becquerel (Anzahl der Atome, die pro Sekunde zerfallen, 1 Bq = 1/s)
BSA	Bovines Serum-Albumin
C	Cytosin
°C	Grad Celsius
[Ca ²⁺] _i	Intrazelluläre Calciumkonzentration
cAdeR	Hamster-Adenin-Rezeptor
cAMP	Cyclisches Adenosin-5'-monophosphat
cDNA	„complementary“ Desoxyribonukleinsäure, zur mRNA komplementäre DNA
Ci	Curie (1 Ci = 3,7 x 10 ¹⁰ Bq = 37 GBq)
CNT	Konzentrierte Nucleosid-Transporter
cpm	Gezählte Zerfälle pro Minute (<i>counts per minute</i>)
Da	Dalton (1 Da = 1,6601 x 10 ²⁷ kg)
DAG	Diacylglycerol
DEPC	Diethylpyrocarbonat
DMEM	Dulbecco's modified Eagle Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxynukleotidtriphosphat

DRG	Rückenmarksganglien (<i>dorsal root ganglion</i>)
DTT	Dithiothreitol
EC	Enzymkommission der Internationalen Union von Biochemie und Molekular Biologie (IUBMB)
EC ₅₀	Mittlere effektive Konzentration (<i>effective concentration</i>)
ECL	Enhanced Chemilumineszenz
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EL	Extrazellulärer Loop
ENT	Equilibrative Nucleosid-Transporter
FCS	Fötale Kälberserum (<i>fetal calf serum</i>)
for	forward
g	Erdbeschleunigung
g	Gramm
G	Guanin
G418	Geneticinsulfat
gDNA	genomic DNA
GDP	Guanosin-5'-diphosphat
GEF	Guanin-Nucleotid-Austauschfaktor (<i>guanine nucleotide exchange factor</i>)
GF/B	Glasfaserfilter Typ B
GPCR	G-Protein-gekoppelter Rezeptor
G-Protein	Guaninnucleotid-bindendes Protein
GRK	G-Protein-gekoppelte Rezeptor-Kinase
GTP	Guanosin-5'-triphosphat
GTP _γ S	Guanosin-5'-(γ-thio)triphosphat
h	Human
hAdeR	Humaner Adenin-Rezeptor
HBSS	Hanks' balanced salt solution
HEK293	Humane embryonische Nierenzelllinie (<i>human embryonic kidney</i>)
HEPES	2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure
HRP	Meerrettichperoxidase (<i>horseradish-Peroxidase</i>)
IC ₅₀	Mittlere inhibitorische Konzentration (<i>inhibitory concentration</i>)
IL	Intrazellulärer Loop
IMP	Inosin-5'-monophosphat
IP ₃	Inositol-1,4,5-triphosphat

IPTG	Isopropyl- β -D-thiogalactopyranosid
JNK	c-Jun-N-terminale Kinase
K _D	Gleichgewichtdissoziationskonstante
k	Kilo
kDA	Kilo Dalton
KHP	Krebs-HEPES-Puffer
K _i	Gleichgewichtsinhibitionskonstante
K _m	Michaeliskonstante
l	Liter
LB	Lysogeny broth, lysogenisierende Fleischbrühe, auch: Luria broth, Lennox broth, Luria bertani
LSC	Flüssig-Szintillationszähler (<i>liquid scintillation counting</i>)
LTR	<i>long terminal repeats</i>
m	Maus
M	Molar, mol/l
M _w	Molekulargewicht (<i>molecular weight</i>)
mAde1R	Maus-Adenin-Rezeptor Subtyp 1
mAde2R	Maus-Adenin-Rezeptor Subtyp 2
MAPK	Mitogen-aktivierte Proteinkinase
min	Minute
mM	Millimolar, millimol/Liter
μ M	Mikromolar, mikromol/Liter
Mrg	„Mas-ähnliche Gene“ (<i>Mas-related genes</i>)
mRNA	„messenger“ Ribonukleinsäure
n	Anzahl der durchgeführten Versuche
NBMPR	Nitrobenzylmercaptapurinribosid (Nitrobenzylthioinosin)
n.b.	nicht bestimmt
nm	Nanometer
nM	Nanomolar, nanomol/Liter
NT	Nucleosid-Transporter
OD	Optische Dichte
OG	Oregon Green BAPTA1/AM
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PBS	Phosphatgepufferte-isotone Kochsalzlösung (<i>Phosphate Buffered Saline</i>)

PCR	Polymerase-Kettenreaktion (<i>polymerase chain reaction</i>)
PIP ₂	Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate
PKC	Proteinkinase C
PLC	Phospholipase C
PRPP	5'-Phosphoribosyl-1-pyrophosphat
PSB	Pharmaceutical Sciences Bonn
r	Ratte
rAdeR	Ratten-Adenin-Rezeptor
rev	reverse
RGS	Regulatoren der G-Protein-gekoppelten Signalübertragung (<i>regulators of G protein signaling</i>)
RNA	Ribonukleinsäure
RNase	Ribonuklease
rpm	Umdrehungen pro Minute (<i>revolutions / rotations per minute</i>)
RPMI	Roswell Park Memorial Institute
RT	Raumtemperatur
RT-PCR	Reverse-Transkriptase Polymerase-Kettenreaktion
s	Sekunde
SEM	Standardfehler (<i>standard error of the mean</i>)
SDS	Natriumdodecylsulfat
<i>Sf9</i>	<i>Spodoptera frugiperda</i> , <i>Sf9</i> -Insektenzellen
SNSR	<i>sensory neuron-specific receptors</i>
SOC	Komplexes Nährmedium (<i>Super Optimal Broth</i> mit Glucose)
SRP	Signal-Erkennungspartikel (<i>signal recognition particle</i>)
Tab.	Tabelle
TAE	Tris-Acetat-Essigsäure
TEMED	Tetramethylethylendiamin
T _m	Schmelztemperatur des hybridisierten Anteils
TM	Transmembranäre Helix
Tris	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
U	Einheit (<i>unit</i>)
UDP	Uridindiphosphat
UTP	Uridintriphosphat
V _{max}	Maximale Geschwindigkeit
vs.	gegen (<i>versus</i>)
VSV-G	Glykoprotein des vesikulären Stomatitis Virus

WT Wildtyp

Die in dieser Arbeit verwendeten Einheiten entsprechen dem internationalen Einheitensystem SI.

7 Abkürzungen für Aminosäuren

Internationaler Ein-Buchstaben-Code für Aminosäuren

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
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
X		beliebige Aminosäure
Y	Tyr	Tyrosin

8 Literaturverzeichnis

1. Venter, J. C.; Adams, M. D.; Myers, E. W.; Li, P. W.; Mural, R. J.; Sutton, G. G.; Smith, H. O.; Yandell, M.; Evans, C. A.; Holt, R. A., et al. The sequence of the human genome. *Science* **2001**, 291, 1304-1351.
2. Lander, E. S.; Linton, L. M.; Birren, B.; Nusbaum, C.; Zody, M. C.; Baldwin, J.; Devon, K.; Dewar, K.; Doyle, M.; FitzHugh, W., et al. Initial sequencing and analysis of the human genome. *Nature* **2001**, 409, 860-921.
3. Hopkins, A. L.; Groom, C. R. The druggable genome. *Nat. Rev. Drug Discov.* **2002**, 1, 727-730.
4. Wise, A.; Gearing, K.; Rees, S. Target validation of G-protein coupled receptors. *Drug Discov. Today* **2002**, 7, 235-246.
5. Wess, J. Molecular basis of receptor/G-protein-coupling selectivity. *Pharmacol. Ther.* **1998**, 80, 231-264.
6. Pierce, K. L.; Premont, R. T.; Lefkowitz, R. J. Seven-transmembrane receptors. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **2002**, 3, 639-650.
7. Fredriksson, R.; Lagerström, M. C.; Lundin, L. G.; Schiöth, H. B. The G-protein-coupled receptors in the human genome form five main families. Phylogenetic analysis, paralogon groups, and fingerprints. *Mol. Pharmacol.* **2003**, 63, 1256-1272.
8. Vassilatis, D. K.; Hohmann, J. G.; Zeng, H.; Li, F.; Ranchalis, J. E.; Mortrud, M. T.; Brown, A.; Rodriguez, S. S.; Weller, J. R.; Wright, A. C., et al. The G protein-coupled receptor repertoires of human and mouse. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2003**, 100, 4903-4908.
9. Eglén, R. M.; Bosse, R.; Reisine, T. Emerging concepts of guanine nucleotide-binding protein-coupled receptor (GPCR) function and implications for high throughput screening. *Assay Drug Dev. Technol.* **2007**, 5, 425-451.
10. Lagerström, M. C.; Schiöth, H. B. Structural diversity of G protein-coupled receptors and significance for drug discovery. *Nat. Rev. Drug Discov.* **2008**, 7, 339-357.

11. Jacoby, E.; Bouhelal, R.; Gerspacher, M.; Seuwen, K. The 7 TM G-protein-coupled receptor target family. *ChemMedChem* **2006**, 1, 761-782.
12. Fredholm, B. B.; Hokfelt, T.; Milligan, G. G-protein-coupled receptors: an update. *Acta. Physiol. (Oxf)* **2007**, 190, 3-7.
13. Ma, P.; Zimmel, R. Value of novelty? *Nat. Rev. Drug Discov.* **2002**, 1, 571-572.
14. Limbird, L. E. The receptor concept: a continuing evolution. *Mol. Interv.* **2004**, 4, 326-336.
15. Lichtenthaler, F. W. . 100 Years "Schlüssel-Schloss-Prinzip": What Made Emil Fischer Use this Analogy? *Angew. Chem. Int. Ed.* **1995**, 33, 2364-2374.
16. Jackson, T. Structure and function of G protein coupled receptors. *Pharmacol. Ther.* **1991**, 50, 425-442.
17. Strader, C. D.; Fong, T. M.; Tota, M. R.; Underwood, D.; Dixon, R. A. Structure and function of G protein-coupled receptors. *Annu. Rev. Biochem.* **1994**, 63, 101-132.
18. Bockaert, J.; Pin, J. P. Molecular tinkering of G protein-coupled receptors: an evolutionary success. *EMBO J.* **1999**, 18, 1723-1729.
19. Loll, P. J. Membrane protein structural biology: the high throughput challenge. *J. Struct. Biol.* **2003**, 142, 144-153.
20. Serrano-Vega, M. J.; Magnani, F.; Shibata, Y.; Tate, C. G. Conformational thermostabilization of the β_1 -adrenergic receptor in a detergent-resistant form. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2008**, 105, 877-882.
21. Rosenbaum, D. M.; Rasmussen, S. G.; Kobilka, B. K. The structure and function of G-protein-coupled receptors. *Nature* **2009**, 459, 356-363.
22. Gether, U.; Ballesteros, J. A.; Seifert, R.; Sanders-Bush, E.; Weinstein, H.; Kobilka, B. K. Structural instability of a constitutively active G protein-coupled receptor. Agonist-independent activation due to conformational flexibility. *J. Biol. Chem.* **1997**, 272, 2587-2590.
23. 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., et al. Crystal structure of the human β_2 adrenergic G-protein-coupled receptor. *Nature* **2007**, 450, 383-387.

24. Cherezov, V.; Rosenbaum, D. M.; Hanson, M. A.; Rasmussen, S. G.; Thian, F. S.; Kobilka, T. S.; Choi, H. J.; Kuhn, P.; Weis, W. I.; Kobilka, B. K., et al. High-resolution crystal structure of an engineered human β_2 -adrenergic G protein-coupled receptor. *Science* **2007**, 318, 1258-1265.
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 Å crystal structure of a human A_{2A} adenosine receptor bound to an antagonist. *Science* **2008**, 322, 1211-1217.
26. 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 β_1 -adrenergic G-protein-coupled receptor. *Nature* **2008**, 454, 486-491.
27. Landau, E. M.; Rosenbusch, J. P. Lipidic cubic phases: a novel concept for the crystallization of membrane proteins. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1996**, 93, 14532-14535.
28. Day, P. W.; Rasmussen, S. G.; Parnot, C.; Fung, J. J.; Masood, A.; Kobilka, T. S.; Yao, X. J.; Choi, H. J.; Weis, W. I.; Rohrer, D. K., et al. A monoclonal antibody for G protein-coupled receptor crystallography. *Nat. Methods* **2007**, 4, 927-929.
29. Okada, T.; Le Trong, I.; Fox, B. A.; Behnke, C. A.; Stenkamp, R. E.; Palczewski, K. X-Ray diffraction analysis of three-dimensional crystals of bovine rhodopsin obtained from mixed micelles. *J. Struct. Biol.* **2000**, 130, 73-80.
30. 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., et al. Crystal structure of rhodopsin: A G protein-coupled receptor. *Science* **2000**, 289, 739-745.
31. Ridge, K. D.; Palczewski, K. Visual rhodopsin sees the light: structure and mechanism of G protein signaling. *J. Biol. Chem.* **2007**, 282, 9297-9301.
32. Kobilka, B.; Schertler, G. F. New G-protein-coupled receptor crystal structures: insights and limitations. *Trends Pharmacol. Sci.* **2008**, 29, 79-83.
33. Yeagle, P. L.; Albert, A. D. G-protein coupled receptor structure. *Biochim. Biophys. Acta.* **2007**, 1768, 808-824.

34. Gether, U. Uncovering molecular mechanisms involved in activation of G protein-coupled receptors. *Endocr. Rev.* **2000**, 21, 90-113.
35. Okada, T.; Palczewski, K. Crystal structure of rhodopsin: implications for vision and beyond. *Curr. Opin. Struct. Biol.* **2001**, 11, 420-426.
36. Salom, D.; Lodowski, D. T.; Stenkamp, R. E.; Le Trong, I.; Golczak, M.; Jastrzebska, B.; Harris, T.; Ballesteros, J. A.; Palczewski, K. Crystal structure of a photoactivated deprotonated intermediate of rhodopsin. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2006**, 103, 16123-16128.
37. Salom, D.; Le Trong, I.; Pohl, E.; Ballesteros, J. A.; Stenkamp, R. E.; Palczewski, K.; Lodowski, D. T. Improvements in G protein-coupled receptor purification yield light stable rhodopsin crystals. *J. Struct. Biol.* **2006**, 156, 497-504.
38. Park, J. H.; Scheerer, P.; Hofmann, K. P.; Choe, H. W.; Ernst, O. P. Crystal structure of the ligand-free G-protein-coupled receptor opsin. *Nature* **2008**, 454, 183-187.
39. Scheerer, P.; Park, J. H.; Hildebrand, P. W.; Kim, Y. J.; Krauss, N.; Choe, H. W.; Hofmann, K. P.; Ernst, O. P. Crystal structure of opsin in its G-protein-interacting conformation. *Nature* **2008**, 455, 497-502.
40. Sakmar, T. P.; Franke, R. R.; Khorana, H. G. Glutamic acid-113 serves as the retinylidene Schiff base counterion in bovine rhodopsin. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1989**, 86, 8309-8313.
41. Robinson, P. R.; Cohen, G. B.; Zhukovsky, E. A.; Oprian, D. D. Constitutively active mutants of rhodopsin. *Neuron* **1992**, 9, 719-725.
42. Standfuss, J.; Edwards, P. C.; D'Antona, A.; Fransen, M.; Xie, G.; Oprian, D. D.; Schertler, G. F. The structural basis of agonist-induced activation in constitutively active rhodopsin. *Nature* **2011**, 471, 656-660.
43. Choe, H. W.; Kim, Y. J.; Park, J. H.; Morizumi, T.; Pai, E. F.; Krauss, N.; Hofmann, K. P.; Scheerer, P.; Ernst, O. P. Crystal structure of metarhodopsin II. *Nature* **2011**, 471, 651-655.
44. Okada, T.; Ernst, O. P.; Palczewski, K.; Hofmann, K. P. Activation of rhodopsin: new insights from structural and biochemical studies. *Trends Biochem. Sci.* **2001**, 26, 318-324.
45. Fritze, O.; Filipek, S.; Kuksa, V.; Palczewski, K.; Hofmann, K. P.; Ernst, O. P. Role of the conserved NPxxY(x)_{5,6}F motif in the rhodopsin ground state and during activation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2003**, 100, 2290-2295.

46. Elling, C. E.; Frimurer, T. M.; Gerlach, L. O.; Jorgensen, R.; Holst, B.; Schwartz, T. W. Metal ion site engineering indicates a global toggle switch model for seven-transmembrane receptor activation. *J. Biol. Chem.* **2006**, 281, 17337-17346.
47. Schwartz, T. W.; Frimurer, T. M.; Holst, B.; Rosenkilde, M. M.; Elling, C. E. Molecular mechanism of 7TM receptor activation--a global toggle switch model. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* **2006**, 46, 481-519.
48. Shi, L.; Liapakis, G.; Xu, R.; Guarnieri, F.; Ballesteros, J. A.; Javitch, J. A. β_2 adrenergic receptor activation. Modulation of the proline kink in transmembrane 6 by a rotamer toggle switch. *J. Biol. Chem.* **2002**, 277, 40989-40996.
49. Ballesteros, J. A. ; Weinstein, H. . Integrated methods for the construction of threedimensional models and computational probing of structure-function relations in G protein coupled receptors *Methods Neurosci.* **1995**, 25, 366–428.
50. Engel, C. K.; Chen, L.; Prive, G. G. Insertion of carrier proteins into hydrophilic loops of the *Escherichia coli* lactose permease. *Biochim. Biophys. Acta.* **2002**, 1564, 38-46.
51. Rosenbaum, D. M.; Cherezov, V.; Hanson, M. A.; Rasmussen, S. G.; Thian, F. S.; Kobilka, T. S.; Choi, H. J.; Yao, X. J.; Weis, W. I.; Stevens, R. C., et al. GPCR engineering yields high-resolution structural insights into β_2 -adrenergic receptor function. *Science* **2007**, 318, 1266-1273.
52. Hanson, M. A.; Cherezov, V.; Griffith, M. T.; Roth, C. B.; Jaakola, V. P.; Chien, E. Y.; Velasquez, J.; Kuhn, P.; Stevens, R. C. A specific cholesterol binding site is established by the 2.8 Å structure of the human β_2 -adrenergic receptor. *Structure* **2008**, 16, 897-905.
53. Roth, C. B.; Hanson, M. A.; Stevens, R. C. Stabilization of the human β_2 -adrenergic receptor TM4-TM3-TM5 helix interface by mutagenesis of Glu122^{3,41}, a critical residue in GPCR structure. *J. Mol. Biol.* **2008**, 376, 1305-1319.
54. Hanson, M. A.; Stevens, R. C. Discovery of new GPCR biology: one receptor structure at a time. *Structure* **2009**, 17, 8-14.
55. Mustafi, D.; Palczewski, K. Topology of class A G protein-coupled receptors: insights gained from crystal structures of rhodopsins, adrenergic and adenosine receptors. *Mol. Pharmacol.* **2009**, 75, 1-12.

56. Weis, W. I.; Kobilka, B. K. Structural insights into G-protein-coupled receptor activation. *Curr. Opin. Struct. Biol.* **2008**, 18, 734-740.
57. 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., et al. Ligand-specific regulation of the extracellular surface of a G-protein-coupled receptor. *Nature* **2010**, 463, 108-112.
58. Piirainen, H.; Ashok, Y.; Nanekar, R. T.; Jaakola, V. P. Structural features of adenosine receptors: from crystal to function. *Biochim. Biophys. Acta.* **2011**, 1808, 1233-1244.
59. Jaakola, V. P.; Ijzerman, A. P. The crystallographic structure of the human adenosine A_{2A} receptor in a high-affinity antagonist-bound state: implications for GPCR drug screening and design. *Curr. Opin. Struct. Biol.* **2010**, 20, 401-414.
60. Rodríguez, D.; Pineiro, Á.; Gutiérrez-de-Terán, H. Molecular dynamics simulations reveal insights into key structural elements of adenosine receptors. *Biochem.* **2011**, 50, 4194-4208.
61. Angel, T. E.; Chance, M. R.; Palczewski, K. Conserved waters mediate structural and functional activation of family A (rhodopsin-like) G protein-coupled receptors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2009**, 106, 8555-8560.
62. Vogel, R.; Mahalingam, M.; Ludeke, S.; Huber, T.; Siebert, F.; Sakmar, T. P. Functional role of the "ionic lock"--an interhelical hydrogen-bond network in family A heptahelical receptors. *J. Mol. Biol.* **2008**, 380, 648-655.
63. Vanni, S.; Neri, M.; Tavernelli, I.; Rothlisberger, U. Observation of "ionic lock" formation in molecular dynamics simulations of wild-type β_1 and β_2 adrenergic receptors. *Biochem.* **2009**, 48, 4789-4797.
64. Wu, B.; Chien, E. Y.; Mol, C. D.; Fenalti, G.; Liu, W.; Katritch, V.; Abagyan, R.; Brooun, A.; Wells, P.; Bi, F. C., et al. Structures of the CXCR4 chemokine GPCR with small-molecule and cyclic peptide antagonists. *Science* **2011**, 330, 1066-1071.
65. 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., et al. Structure of the human dopamine D3 receptor in complex with a D2/D3 selective antagonist. *Science* **2010**, 330, 1091-1095.
66. Rasmussen, S. G.; Choi, H. J.; Fung, J. J.; Pardon, E.; Casarosa, P.; Chae, P. S.; Devree, B. T.; Rosenbaum, D. M.; Thian, F. S.; Kobilka, T.

- S., et al. Structure of a nanobody-stabilized active state of the β_2 adrenoceptor. *Nature* **2011**, 469, 175-180.
67. Rosenbaum, D. M.; Zhang, C.; Lyons, J. A.; Holl, R.; Aragao, D.; Arlow, D. H.; Rasmussen, S. G.; Choi, H. J.; Devree, B. T.; Sunahara, R. K., et al. Structure and function of an irreversible agonist- β_2 adrenoceptor complex. *Nature* **2011**, 469, 236-240.
68. Deupi, X.; Standfuss, J. Structural insights into agonist-induced activation of G-protein-coupled receptors. *Curr. Opin. Struct. Biol.* **2011**, 21, 541-551.
69. Warne, T.; Moukhametzianov, R.; Baker, J. G.; Nehme, R.; Edwards, P. C.; Leslie, A. G.; Schertler, G. F.; Tate, C. G. The structural basis for agonist and partial agonist action on a β_1 -adrenergic receptor. *Nature* **2011**, 469, 241-244.
70. 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.
71. 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.
72. Rasmussen, S. G.; Devree, B. T.; Zou, Y.; Kruse, A. C.; Chung, K. Y.; Kobilka, T. S.; Thian, F. S.; Chae, P. S.; Pardon, E.; Calinski, D., et al. Crystal structure of the β_2 adrenergic receptor- G_s protein complex *Nature* **2011**.
73. Doré, A. S.; Robertson, N.; Errey, J. C.; Ng, I.; Hollenstein, K.; Tehan, B.; Hurrell, E.; Bennett, K.; Congreve, M.; Magnani, F., et al. Structure of the adenosine A_{2A} receptor in complex with ZM241385 and the xanthines XAC and caffeine. *Structure* **2011**, 19, 1283-1293.
74. Kolakowski, L. F., Jr. GCRDb: a G-protein-coupled receptor database. *Receptors Channels* **1994**, 2, 1-7.
75. Attwood, T. K.; Findlay, J. B. Fingerprinting G-protein-coupled receptors. *Protein Eng.* **1994**, 7, 195-203.
76. Schiöth, H. B.; Fredriksson, R. The GRAFS classification system of G-protein coupled receptors in comparative perspective. *Gen Comp. Endocrinol.* **2005**, 142, 94-101.

77. Bjarnadóttir, T. K.; Gloriam, D. E.; Hellstrand, S. H.; Kristiansson, H.; Fredriksson, R.; Schiöth, H. B. Comprehensive repertoire and phylogenetic analysis of the G protein-coupled receptors in human and mouse. *Genomics* **2006**, 88, 263-273.
78. Stacey, M.; Lin, H. H.; Gordon, S.; McKnight, A. J. LNB-TM7, a group of seven-transmembrane proteins related to family-B G-protein-coupled receptors. *Trends. Biochem. Sci.* **2000**, 25, 284-289.
79. Wieland, T.; Michel, M. C. Can a GDP-liganded G-protein be active? *Mol. Pharmacol.* **2005**, 68, 559-562.
80. Simon, M. I.; Strathmann, M. P.; Gautam, N. Diversity of G proteins in signal transduction. *Science* **1991**, 252, 802-808.
81. Milligan, G. G-protein-coupled receptor heterodimers: pharmacology, function and relevance to drug discovery. *Drug Discov. Today* **2006**, 11, 541-549.
82. Birnbaumer, L. Expansion of signal transduction by G proteins. The second 15 years or so: from 3 to 16 α subunits plus $\beta\gamma$ dimers. *Biochim. Biophys. Acta.* **2007**, 1768, 772-793.
83. Downes, G. B.; Gautam, N. The G protein subunit gene families. *Genomics* **1999**, 62, 544-552.
84. Milligan, G.; Kostenis, E. Heterotrimeric G-proteins: a short history. *Br. J. Pharmacol.* **2006**, 147 Suppl 1, 46-55.
85. Wettschureck, N.; Offermanns, S. Mammalian G proteins and their cell type specific functions. *Physiol. Rev.* **2005**, 85, 1159-1204.
86. Hall, R. A.; Premont, R. T.; Lefkowitz, R. J. Heptahelical receptor signaling: beyond the G protein paradigm. *J. Cell Biol.* **1999**, 145, 927-932.
87. Ferguson, S. S. Evolving concepts in G protein-coupled receptor endocytosis: the role in receptor desensitization and signaling. *Pharmacol. Rev.* **2001**, 53, 1-24.
88. Rajagopal, K.; Lefkowitz, R. J.; Rockman, H. A. When 7 transmembrane receptors are not G protein-coupled receptors. *J. Clin. Invest.* **2005**, 115, 2971-2974.
89. DeWire, S. M.; Ahn, S.; Lefkowitz, R. J.; Shenoy, S. K. β -arrestins and cell signaling. *Annu. Rev. Physiol.* **2007**, 69, 483-510.

90. DeFea, K. β -arrestins and heterotrimeric G-proteins: collaborators and competitors in signal transduction. *Br. J. Pharmacol.* **2008**, 153 Suppl 1, 298-309.
91. Luttrell, L. M. 'Location, location, location': activation and targeting of MAP kinases by G protein-coupled receptors. *J. Mol. Endocrinol.* **2003**, 30, 117-126.
92. Galandrin, S.; Bouvier, M. Distinct signaling profiles of β_1 and β_2 adrenergic receptor ligands toward adenylyl cyclase and mitogen-activated protein kinase reveals the pluridimensionality of efficacy. *Mol. Pharmacol.* **2006**, 70, 1575-1584.
93. Kenakin, T. P. Pharmacological onomastics: what's in a name? *Br. J. Pharmacol.* **2008**, 153, 432-438.
94. Violin, J. D.; Lefkowitz, R. J. β -arrestin-biased ligands at seven-transmembrane receptors. *Trends Pharmacol. Sci.* **2007**, 28, 416-422.
95. Kenakin, T. Functional selectivity and biased receptor signaling. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **2010**, 336, 296-302.
96. Urban, J. D.; Clarke, W. P.; von Zastrow, M.; Nichols, D. E.; Kobilka, B.; Weinstein, H.; Javitch, J. A.; Roth, B. L.; Christopoulos, A.; Sexton, P. M., et al. Functional selectivity and classical concepts of quantitative pharmacology. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **2007**, 320, 1-13.
97. Stephenson, R. P. A modification of receptor theory. *Br. J. Pharmacol. Chemother.* **1956**, 11, 379-393.
98. Kenakin, T. Inverse, protean, and ligand-selective agonism: matters of receptor conformation. *FASEB J.* **2001**, 15, 598-611.
99. Leff, P. The two-state model of receptor activation. *Trends Pharmacol. Sci.* **1995**, 16, 89-97.
100. Christopoulos, A.; El-Fakahany, E. E. Qualitative and quantitative assessment of relative agonist efficacy. *Biochem. Pharmacol.* **1999**, 58, 735-748.
101. Seifert, R.; Wenzel-Seifert, K. Constitutive activity of G-protein-coupled receptors: cause of disease and common property of wild-type receptors. *Naunyn. Schmiedebergs Arch. Pharmacol.* **2002**, 366, 381-416.
102. Jenkinson, D. H.; Barnard, E. A.; Hoyer, D.; Humphrey, P. P.; Leff, P.; Shankley, N. P. International Union of Pharmacology Committee on Receptor Nomenclature and Drug Classification. IX. Recommendations

- on terms and symbols in quantitative pharmacology. *Pharmacol. Rev.* **1995**, 47, 255-266.
103. 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.
104. Burnstock, G. A basis for distinguishing two types of purinergic receptor. *Cell Membrane Receptors for Drugs and Hormones: a Multidisciplinary Approach* **1978**, Raven Press: New York, 107-118.
105. Burnstock, G.; Kennedy, C. Is there a basis for distinguishing two types of P2-purinoceptor? *Gen Pharmacol.* **1985**, 16, 433-440.
106. Abbracchio, M. P.; Burnstock, G. Purinoceptors: are there families of P2X and P2Y purinoceptors? *Pharmacol. Ther.* **1994**, 64, 445-475.
107. 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.
108. Fredholm, B. B.; Ijzerman, A. P.; 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.
109. Brunschweiler, A.; Müller, C. E. P2 receptors activated by uracil nucleotides-an update. *Curr. Med. Chem.* **2006**, 13, 289-312.
110. Drury, A. N.; Szent-Györgyi, A. The physiological activity of adenine compounds with especial reference to their action upon the mammalian heart. *J. Physiol.* **1929**, 68, 213-237.
111. Gillespie, J. H. The biological significance of the linkages in adenosine triphosphoric acid. *J. Physiol.* **1934**, 80, 345-359.
112. Burnstock, G. Do some nerve cells release more than one transmitter? *Neuroscience* **1976**, 1, 239-248.
113. Valera, S.; Hussy, N.; Evans, R. J.; Adami, N.; North, R. A.; Surprenant, A.; Buell, G. A new class of ligand-gated ion channel defined by P2X receptor for extracellular ATP. *Nature* **1994**, 371, 516-519.
114. Khakh, B. S.; Burnstock, G.; Kennedy, C.; King, B. F.; North, R. A.; Seguela, P.; Voigt, M.; Humphrey, P. P. International union of

- pharmacology. XXIV. Current status of the nomenclature and properties of P2X receptors and their subunits. *Pharmacol. Rev.* **2001**, 53, 107-118.
115. Ralevic, V.; Burnstock, G. Receptors for purines and pyrimidines. *Pharmacol. Rev.* **1998**, 50, 413-492.
116. Burnstock, G. Introduction: P2 receptors. *Curr. Top. Med. Chem.* **2004**, 4, 793-803.
117. Torres, G. E.; Egan, T. M.; Voigt, M. M. Hetero-oligomeric assembly of P2X receptor subunits. Specificities exist with regard to possible partners. *J. Biol. Chem.* **1999**, 274, 6653-6659.
118. Abbracchio, M. P.; Burnstock, G.; Boeynaems, J. M.; Barnard, E. A.; Boyer, J. L.; Kennedy, C.; Knight, G. E.; Fumagalli, M.; Gachet, C.; Jacobson, K. A., et al. International Union of Pharmacology LVIII: update on the P2Y G protein-coupled nucleotide receptors: from molecular mechanisms and pathophysiology to therapy. *Pharmacol. Rev.* **2006**, 58, 281-341.
119. Abbracchio, M. P.; Boeynaems, J. M.; Barnard, E. A.; Boyer, J. L.; Kennedy, C.; Miras-Portugal, M. T.; King, B. F.; Gachet, C.; Jacobson, K. A.; Weisman, G. A., et al. Characterization of the UDP-glucose receptor (re-named here the P2Y₁₄ receptor) adds diversity to the P2Y receptor family. *Trends Pharmacol. Sci.* **2003**, 24, 52-55.
120. Hollopeter, G.; Jantzen, H. M.; Vincent, D.; Li, G.; England, L.; Ramakrishnan, V.; Yang, R. B.; Nurden, P.; Nurden, A.; Julius, D., et al. Identification of the platelet ADP receptor targeted by antithrombotic drugs. *Nature* **2001**, 409, 202-207.
121. Zhang, F. L.; Luo, L.; Gustafson, E.; Lachowicz, J.; Smith, M.; Qiao, X.; Liu, Y. H.; Chen, G.; Pramanik, B.; Laz, T. M., et al. ADP is the cognate ligand for the orphan G protein-coupled receptor SP1999. *J. Biol. Chem.* **2001**, 276, 8608-8615.
122. Communi, D.; Gonzalez, N. S.; Detheux, M.; Brezillon, S.; Lannoy, V.; Parmentier, M.; Boeynaems, J. M. Identification of a novel human ADP receptor coupled to G_i. *J. Biol. Chem.* **2001**, 276, 41479-41485.
123. Zhang, F. L.; Luo, L.; Gustafson, E.; Palmer, K.; Qiao, X.; Fan, X.; Yang, S.; Laz, T. M.; Bayne, M.; Monsma, F., Jr. P2Y₁₃: identification and characterization of a novel G_{ai}-coupled ADP receptor from human and mouse. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **2002**, 301, 705-713.

124. Chambers, J. K.; Macdonald, L. E.; Sarau, H. M.; Ames, R. S.; Freeman, K.; Foley, J. J.; Zhu, Y.; McLaughlin, M. M.; Murdock, P.; McMillan, L., et al. A G protein-coupled receptor for UDP-glucose. *J. Biol. Chem.* **2000**, 275, 10767-10771.
125. van Calker, D.; Müller, M.; Hamprecht, B. Adenosine regulates via two different types of receptors, the accumulation of cyclic AMP in cultured brain cells. *J. Neurochem.* **1979**, 33, 999-1005.
126. Londos, C.; Cooper, D. M.; Wolff, J. Subclasses of external adenosine receptors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1980**, 77, 2551-2554.
127. Maenhaut, C.; Van Sande, J.; Libert, F.; Abramowicz, M.; Parmentier, M.; Vanderhaegen, J. J.; Dumont, J. E.; Vassart, G.; Schiffmann, S. RDC8 codes for an adenosine A2 receptor with physiological constitutive activity. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **1990**, 173, 1169-1178.
128. Libert, F.; Schiffmann, S. N.; Lefort, A.; Parmentier, M.; Gerard, C.; Dumont, J. E.; Vanderhaeghen, J. J.; Vassart, G. The orphan receptor cDNA RDC7 encodes an A1 adenosine receptor. *Embo. J.* **1991**, 10, 1677-1682.
129. Daly, J. W.; Butts-Lamb, P.; Padgett, W. Subclasses of adenosine receptors in the central nervous system: interaction with caffeine and related methylxanthines. *Cell Mol. Neurobiol.* **1983**, 3, 69-80.
130. Bruns, R. F.; Lu, G. H.; Pugsley, T. A. Characterization of the A2 adenosine receptor labeled by [³H]NECA in rat striatal membranes. *Mol. Pharmacol.* **1986**, 29, 331-346.
131. Ribeiro, J. A.; Sebastiao, A. M. Adenosine receptors and calcium: basis for proposing a third A₃ adenosine receptor. *Prog. Neurobiol.* **1986**, 26, 179-209.
132. Zhou, Q. Y.; Li, C.; Olah, M. E.; Johnson, R. A.; Stiles, G. L.; Civelli, O. Molecular cloning and characterization of an adenosine receptor: the A₃ adenosine receptor. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1992**, 89, 7432-7436.
133. Bender, E.; Buist, A.; Jurzak, M.; Langlois, X.; Baggerman, G.; Verhasselt, P.; Ercken, M.; Guo, H. Q.; Wintmolders, C.; Van den Wyngaert, I., et al. Characterization of an orphan G protein-coupled receptor localized in the dorsal root ganglia reveals adenine as a signaling molecule. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2002**, 99, 8573-8578.
134. Civelli, O. Functional genomics: the search for novel neurotransmitters and neuropeptides. *FEBS Lett.* **1998**, 430, 55-58.

135. Civelli, O.; Nothacker, H. P.; Saito, Y.; Wang, Z.; Lin, S. H.; Reinscheid, R. K. Novel neurotransmitters as natural ligands of orphan G-protein-coupled receptors. *Trends Neurosci.* **2001**, 24, 230-237.
136. Mills, A.; Duggan, M. J. Orphan seven transmembrane domain receptors: reversing pharmacology. *Trends Pharmacol. Sci.* **1993**, 14, 394-396.
137. Civelli, O.; Saito, Y.; Wang, Z.; Nothacker, H. P.; Reinscheid, R. K. Orphan GPCRs and their ligands. *Pharmacol. Ther.* **2006**, 110, 525-532.
138. Young, D.; Waitches, G.; Birchmeier, C.; Fasano, O.; Wigler, M. Isolation and characterization of a new cellular oncogene encoding a protein with multiple potential transmembrane domains. *Cell* **1986**, 45, 711-719.
139. Dong, X.; Han, S.; Zylka, M. J.; Simon, M. I.; Anderson, D. J. A diverse family of GPCRs expressed in specific subsets of nociceptive sensory neurons. *Cell* **2001**, 106, 619-632.
140. Lembo, P. M.; Grazzini, E.; Groblewski, T.; O'Donnell, D.; Roy, M. O.; Zhang, J.; Hoffert, C.; Cao, J.; Schmidt, R.; Pelletier, M., et al. Proenkephalin A gene products activate a new family of sensory neuron-specific GPCRs. *Nat. Neurosci.* **2002**, 5, 201-209.
141. Burstein, E. S.; Ott, T. R.; Feddock, M.; Ma, J. N.; Fuhs, S.; Wong, S.; Schiffer, H. H.; Brann, M. R.; Nash, N. R. Characterization of the Mas-related gene family: structural and functional conservation of human and rhesus MrgX receptors. *Br. J. Pharmacol.* **2006**, 147, 73-82.
142. Zylka, M. J.; Dong, X.; Southwell, A. L.; Anderson, D. J. Atypical expansion in mice of the sensory neuron-specific Mrg G protein-coupled receptor family. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2003**, 100, 10043-10048.
143. Grazzini, E.; Puma, C.; Roy, M. O.; Yu, X. H.; O'Donnell, D.; Schmidt, R.; Dautrey, S.; Ducharme, J.; Perkins, M.; Panetta, R., et al. Sensory neuron-specific receptor activation elicits central and peripheral nociceptive effects in rats. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2004**, 101, 7175-7180.
144. Ndong, C.; Pradhan, A.; Puma, C.; Morello, J. P.; Hoffert, C.; Groblewski, T.; O'Donnell, D.; Laird, J. M. Role of rat sensory neuron-specific receptor (rSNSR1) in inflammatory pain: contribution of TRPV1 to SNSR signaling in the pain pathway. *Pain* **2009**, 143, 130-137.
145. Choi, S. S.; Lahn, B. T. Adaptive evolution of MRG, a neuron-specific gene family implicated in nociception. *Genome Res.* **2003**, 13, 2252-2259.

146. Han, S. K.; Dong, X.; Hwang, J. I.; Zylka, M. J.; Anderson, D. J.; Simon, M. I. Orphan G protein-coupled receptors MrgA1 and MrgC11 are distinctively activated by RF-amide-related peptides through the $G\alpha_{q/11}$ pathway. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2002**, 99, 14740-14745.
147. Shinohara, T.; Harada, M.; Ogi, K.; Maruyama, M.; Fujii, R.; Tanaka, H.; Fukusumi, S.; Komatsu, H.; Hosoya, M.; Noguchi, Y., et al. Identification of a G protein-coupled receptor specifically responsive to β -alanine. *J. Biol. Chem.* **2004**, 279, 23559-23564.
148. Santos, R. A.; Simoes e Silva, A. C.; Maric, C.; Silva, D. M.; Machado, R. P.; de Buhr, I.; Heringer-Walther, S.; Pinheiro, S. V.; Lopes, M. T.; Bader, M., et al. Angiotensin-(1-7) is an endogenous ligand for the G protein-coupled receptor Mas. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2003**, 100, 8258-8263.
149. Robas, N.; Mead, E.; Fidock, M. MrgX2 is a high potency cortistatin receptor expressed in dorsal root ganglion. *J. Biol. Chem.* **2003**, 278, 44400-44404.
150. Gustafson, E. L.; Maguire, M.; Campanella, M.; Tarozzo, G.; Jia, Y.; Dong, X. W.; Laverty, M.; Murgolo, N.; Priestley, T.; Reggiani, A., et al. Regulation of two rat *mas*-related genes in a model of neuropathic pain. *Brain Res. Mol. Brain Res.* **2005**, 142, 58-64.
151. Hamprecht, B. Structural, electrophysiological, biochemical, and pharmacological properties of neuroblastoma-glioma cell hybrids in cell culture. *Int. Rev. Cytol.* **1977**, 49, 99-170.
152. Gorzalka, S.; Vittori, S.; Volpini, R.; Cristalli, G.; von Kügelgen, 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.
153. 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.
154. Borrmann, T. Entwicklung neuer Adenin- und Adenosin-Rezeptorliganden als pharmakologische Werkzeuge und Proteomik-Methoden zur Identifizierung des humanen Adeninrezeptors. *Dissertation, Rheinische Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn* **2009**.
155. Abdelrahman, A. Development of Cell-Based Assays for Adenine Receptors and Selected Purine Receptor Subtypes: Receptor

- Characterization and Search for Novel Ligands. *Dissertation, Rheinische Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn* **2010**.
156. Müller, C.E. ; Borrmann, T.; Abdelrahman, A. Adenine Receptor Ligands. *WO Patent* **2010**, 000429.
 157. Watanabe, S.; Ikekita, M.; Nakata, H. Identification of specific [³H]adenine-binding sites in rat brain membranes. *J. Biochem.* **2005**, 137, 323-329.
 158. Alexander, SPH. Binding of [³H]adenine to rat brain membranes. *Proc. Brit. Pharmacol. Soc.* **2004**.
 159. Ye, K.; Mulder-Krieger, T.; Beukers, M.W.; Ijzerman, A.P. [³H]Adenine`s high filter binding precludes its use as a radioligand for the adenine receptor. *Purinergic. Signalling.* **2006**, 2, 71-72.
 160. Schiedel, A. C.; Meyer, H.; Alsdorf, B. B.; Gorzalka, S.; Brussel, H.; Müller, C. E. [³H]Adenine is a suitable radioligand for the labeling of G protein-coupled adenine receptors but shows high affinity to bacterial contaminations in buffer solutions. *Purinergic. Signal.* **2007**, 3, 347-358.
 161. Heo, J.; Han, S. K.; Vaidehi, N.; Wendel, J.; Kekenes-Huskey, P.; Goddard, W. A., 3rd. Prediction of the 3D structure of FMRF-amide neuropeptides bound to the mouse MrgC11 GPCR and experimental validation. *ChemBioChem* **2007**, 8, 1527-1539.
 162. Schertler, G. F.; Hargrave, P. A. Projection structure of frog rhodopsin in two crystal forms. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1995**, 92, 11578-11582.
 163. Unger, V. M.; Hargrave, P. A.; Baldwin, J. M.; Schertler, G. F. Arrangement of rhodopsin transmembrane α -helices. *Nature* **1997**, 389, 203-206.
 164. Heo, J.; Vaidehi, N.; Wendel, J.; Goddard, W. A., 3rd. Prediction of the 3D structure of rat MrgA G protein-coupled receptor and identification of its binding site. *J. Mol. Graph. Model.* **2007**, 26, 800-812.
 165. Nobeli, I.; Laskowski, R. A.; Valdar, W. S.; Thornton, J. M. On the molecular discrimination between adenine and guanine by proteins. *Nucleic. Acids Res.* **2001**, 29, 4294-4309.
 166. von Kügelgen, 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.

167. Chachisvilis, M.; Zhang, Y. L.; Frangos, J. A. G protein-coupled receptors sense fluid shear stress in endothelial cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2006**, 103, 15463-15468.
168. Thompson, J. D.; Higgins, D. G.; Gibson, T. J. CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Res.* **1994**, 22, 4673-4680.
169. Chenna, R.; Sugawara, H.; Koike, T.; Lopez, R.; Gibson, T. J.; Higgins, D. G.; Thompson, J. D. Multiple sequence alignment with the Clustal series of programs. *Nucleic Acids Res.* **2003**, 31, 3497-3500.
170. Gorzalka, S. Neuartige G-Protein-gekoppelte Purinrezeptoren: Funktionelle Charakterisierung nativer Adeninrezeptoren und Evaluation neuer Purinrezeptor-Liganden. *Dissertation, Rheinische Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn* **2006**.
171. Matthews, E. A.; Dickenson, A. H. Effects of spinally administered adenine on dorsal horn neuronal responses in a rat model of inflammation. *Neurosci. Lett.* **2004**, 356, 211-214.
172. Watanabe, S.; Yoshimi, Y.; Ikekita, M. Neuroprotective effect of adenine on purkinje cell survival in rat cerebellar primary cultures. *J. Neurosci. Res.* **2003**, 74, 754-759.
173. Yoshimi, Y.; Watanabe, S.; Shinomiya, T.; Makino, A.; Toyoda, M.; Ikekita, M. Nucleobase adenine as a trophic factor acting on Purkinje cells. *Brain Res.* **2003**, 991, 113-122.
174. Marlewski, M.; Smolenski, R. T.; Szolkiewicz, M.; Aleksandrowicz, Z.; Rutkowski, B.; Swierczynski, J. Increased rate of adenine incorporation into adenine nucleotide pool in erythrocytes of patients with chronic renal failure. *Nephron* **2000**, 86, 281-286.
175. Slominska, E. M.; Szolkiewicz, M.; Smolenski, R. T.; Rutkowski, B.; Swierczynski, J. High plasma adenine concentration in chronic renal failure and its relation to erythrocyte ATP. *Nephron* **2002**, 91, 286-291.
176. Wengert, M.; Adao-Novaes, J.; Assaife-Lopes, N.; Leao-Ferreira, L. R.; Caruso-Neves, C. Adenine-induced inhibition of Na⁺-ATPase activity: Evidence for involvement of the G_i protein-coupled receptor in the cAMP signaling pathway. *Arch. Biochem. Biophys.* **2007**, 467, 261-267.

177. Baldwin, S. A.; Mackey, J. R.; Cass, C. E.; Young, J. D. Nucleoside transporters: molecular biology and implications for therapeutic development. *Mol. Med. Today* **1999**, 5, 216-224.
178. Lowy, B. A.; Williams, M. K.; London, I. M. Enzymatic deficiencies of purine nucleotide synthesis in the human erythrocyte. *J. Biol. Chem.* **1962**, 237, 1622-1625.
179. Fontenelle, L. J.; Henderson, J. F. An enzymatic basis for the inability of erythrocytes to synthesize purine ribonucleotides *de novo*. *Biochim. Biophys. Acta* **1969**, 177, 175-176.
180. Schuster, S.; Kenanov, D. Adenine and adenosine salvage pathways in erythrocytes and the role of S-adenosylhomocysteine hydrolase. A theoretical study using elementary flux modes. *FEBS J.* **2005**, 272, 5278-5290.
181. Plagemann, P. G.; Wohlhueter, R. M.; Woffendin, C. Nucleoside and nucleobase transport in animal cells. *Biochim. Biophys. Acta* **1988**, 947, 405-443.
182. Griffith, D. A.; Jarvis, S. M. Nucleoside and nucleobase transport systems of mammalian cells. *Biochim. Biophys. Acta* **1996**, 1286, 153-181.
183. Redzic, Z. B.; Segal, M. B.; Gasic, J. M.; Markovic, I. D.; Vojvodic, V. P.; Isakovic, A.; Thomas, S. A.; Rakic, L. M. The characteristics of nucleobase transport and metabolism by the perfused sheep choroid plexus. *Brain Res.* **2001**, 888, 66-74.
184. Dudzinska, W.; Hlynczak, A. J.; Skotnicka, E.; Suska, M. The purine metabolism of human erythrocytes. *Biochem.* **2006**, 71, 467-475.
185. de Koning, H.; Diallinas, G. Nucleobase transporters. *Mol. Membr. Biol.* **2000**, 17, 75-94.
186. Nagai, K.; Nagasawa, K.; Matsunaga, R.; Yamaji, M.; Fujimoto, S. Novel Na⁺-independent and adenine-specific transport system for adenine in primary cultured rat cortical neurons. *Neurosci. Lett.* **2006**, 407, 244-248.
187. Quashie, N. B.; Ranford-Cartwright, L. C.; de Koning, H. P. Uptake of purines in *Plasmodium falciparum*-infected human erythrocytes is mostly mediated by the human equilibrative nucleoside transporter and the human facilitative nucleobase transporter. *Malar. J.* **2010**, 9, 36.

188. Domin, B. A.; Mahony, W. B.; Zimmerman, T. P. Purine nucleobase transport in human erythrocytes. Reinvestigation with a novel "inhibitor-stop" assay. *J. Biol. Chem.* **1988**, 263, 9276-9284.
189. Kraupp, M.; Marz, R.; Prager, G.; Kommer, W.; Razavi, M.; Baghestanian, M.; Chiba, P. Adenine and hypoxanthine transport in human erythrocytes: distinct substrate effects on carrier mobility. *Biochim. Biophys. Acta* **1991**, 1070, 157-162.
190. Wallace, L. J.; Candlish, D.; De Koning, H. P. Different substrate recognition motifs of human and trypanosome nucleobase transporters. Selective uptake of purine antimetabolites. *J. Biol. Chem.* **2002**, 277, 26149-26156.
191. Ritzel, M. W.; Yao, S. Y.; Ng, A. M.; Mackey, J. R.; Cass, C. E.; Young, J. D. Molecular cloning, functional expression and chromosomal localization of a cDNA encoding a human Na⁺/nucleoside cotransporter (hCNT2) selective for purine nucleosides and uridine. *Mol. Membr. Biol.* **1998**, 15, 203-211.
192. Köse, M.; Schiedel, A. C. Nucleoside/nucleobase transporters: drug targets of the future? *Future Med. Chem.* **2009**, 1, 303-326.
193. Baldwin, S. A.; Beal, P. R.; Yao, S. Y.; King, A. E.; Cass, C. E.; Young, J. D. The equilibrative nucleoside transporter family, SLC29. *Pflugers Arch.* **2004**, 447, 735-743.
194. Young, J. D.; Yao, S. Y.; Sun, L.; Cass, C. E.; Baldwin, S. A. Human equilibrative nucleoside transporter (ENT) family of nucleoside and nucleobase transporter proteins. *Xenobiotica* **2008**, 38, 995-1021.
195. King, A. E.; Ackley, M. A.; Cass, C. E.; Young, J. D.; Baldwin, S. A. Nucleoside transporters: from scavengers to novel therapeutic targets. *Trends Pharmacol. Sci.* **2006**, 27, 416-425.
196. Yao, S. Y.; Ng, A. M.; Vickers, M. F.; Sundaram, M.; Cass, C. E.; Baldwin, S. A.; Young, J. D. Functional and molecular characterization of nucleobase transport by recombinant human and rat equilibrative nucleoside transporters 1 and 2. Chimeric constructs reveal a role for the ENT2 helix 5-6 region in nucleobase translocation. *J. Biol. Chem.* **2002**, 277, 24938-24948.
197. Griffiths, M.; Beaumont, N.; Yao, S. Y.; Sundaram, M.; Boumah, C. E.; Davies, A.; Kwong, F. Y.; Coe, I.; Cass, C. E.; Young, J. D., et al. Cloning of a human nucleoside transporter implicated in the cellular uptake of adenosine and chemotherapeutic drugs. *Nat. Med.* **1997**, 3, 89-93.

198. Griffiths, M.; Yao, S. Y.; Abidi, F.; Phillips, S. E.; Cass, C. E.; Young, J. D.; Baldwin, S. A. Molecular cloning and characterization of a nitrobenzylthioinosine-insensitive (*ei*) equilibrative nucleoside transporter from human placenta. *Biochem. J.* **1997**, 328 (Pt 3), 739-743.
199. Crawford, C. R.; Patel, D. H.; Naeve, C.; Belt, J. A. Cloning of the human equilibrative, nitrobenzylmercaptapurine riboside (NBMPR)-insensitive nucleoside transporter *ei* by functional expression in a transport-deficient cell line. *J. Biol. Chem.* **1998**, 273, 5288-5293.
200. Hyde, R. J.; Cass, C. E.; Young, J. D.; Baldwin, S. A. The ENT family of eukaryote nucleoside and nucleobase transporters: recent advances in the investigation of structure/function relationships and the identification of novel isoforms. *Mol. Membr. Biol.* **2001**, 18, 53-63.
201. Baldwin, S. A.; Yao, S. Y.; Hyde, R. J.; Ng, A. M.; Foppolo, S.; Barnes, K.; Ritzel, M. W.; Cass, C. E.; Young, J. D. Functional characterization of novel human and mouse equilibrative nucleoside transporters (hENT3 and mENT3) located in intracellular membranes. *J. Biol. Chem.* **2005**, 280, 15880-15887.
202. Zhou, M.; Xia, L.; Engel, K.; Wang, J. Molecular determinants of substrate selectivity of a novel organic cation transporter (PMAT) in the SLC29 family. *J. Biol. Chem.* **2007**, 282, 3188-3195.
203. Gray, J. H.; Owen, R. P.; Giacomini, K. M. The concentrative nucleoside transporter family, SLC28. *Pflugers Arch.* **2004**, 447, 728-734.
204. Ritzel, M. W.; Yao, S. Y.; Huang, M. Y.; Elliott, J. F.; Cass, C. E.; Young, J. D. Molecular cloning and functional expression of cDNAs encoding a human Na⁺-nucleoside cotransporter (hCNT1). *Am. J. Physiol.* **1997**, 272, C707-714.
205. Wang, J.; Su, S. F.; Dresser, M. J.; Schaner, M. E.; Washington, C. B.; Giacomini, K. M. Na⁺-dependent purine nucleoside transporter from human kidney: cloning and functional characterization. *Am. J. Physiol.* **1997**, 273, F1058-1065.
206. Ritzel, M. W.; Ng, A. M.; Yao, S. Y.; Graham, K.; Loewen, S. K.; Smith, K. M.; Ritzel, R. G.; Mowles, D. A.; Carpenter, P.; Chen, X. Z., et al. Molecular identification and characterization of novel human and mouse concentrative Na⁺-nucleoside cotransporter proteins (hCNT3 and mCNT3) broadly selective for purine and pyrimidine nucleosides (system *cib*). *J. Biol. Chem.* **2001**, 276, 2914-2927.

207. Kathiwala, M.; Affum, A. O.; Brajter-Toth, A. HPLC-UV measurements of metabolites in the supernatant of endothelial cells exposed to oxidative stress. *Anal. Bioanal. Chem.* **2010**, 396, 1763-1771.
208. Fox, I. H.; Kelley, W. N. The role of adenosine and 2'-deoxyadenosine in mammalian cells. *Annu. Rev. Biochem.* **1978**, 47, 655-686.
209. Newman, G. C.; Hospod, F. E.; Trowbridge, S. D.; Motwani, S.; Liu, Y. Restoring adenine nucleotides in a brain slice model of cerebral reperfusion. *J. Cereb. Blood Flow Metab.* **1998**, 18, 675-685.
210. Sagot, I.; Schaeffer, J.; Daignan-Fornier, B. Guanylic nucleotide starvation affects *Saccharomyces cerevisiae* mother-daughter separation and may be a signal for entry into quiescence. *BMC Cell Biol.* **2005**, 6, 24.
211. Katahira, R.; Ashihara, H. Profiles of purine biosynthesis, salvage and degradation in disks of potato (*Solanum tuberosum* L.) tubers. *Planta* **2006**, 225, 115-126.
212. Committee, Enzyme Nomenclature. Recommendations of the Nomenclature Committee of the International Union of Biochemistry and Molecular Biology on the Nomenclature and Classification of Enzymes, NC-IUBMB. *Academic Press, New York, NY* **1992**.
213. Schomburg, I.; Chang, A.; Schomburg, D. BRENDA, enzyme data and metabolic information. *Nucleic Acids Res.* **2002**, 30, 47-49.
214. Carter, C. E. Metabolism of purines and pyrimidines. *Annu. Rev. Biochem.* **1956**, 25, 123-146.
215. Moat, A. G.; Friedman, H. The biosynthesis and interconversion of purines and their derivatives. *Bacteriol. Rev.* **1960**, 24, 309-339.
216. Vogels, G. D.; Van der Drift, C. Degradation of purines and pyrimidines by microorganisms. *Bacteriol. Rev.* **1976**, 40, 403-468.
217. Parker, E. M.; Kameyama, K.; Higashijima, T.; Ross, E. M. Reconstitutively active G protein-coupled receptors purified from baculovirus-infected insect cells. *J. Biol. Chem.* **1991**, 266, 519-527.
218. Gether, U.; Lin, S.; Kobilka, B. K. Fluorescent labeling of purified β_2 adrenergic receptor. Evidence for ligand-specific conformational changes. *J. Biol. Chem.* **1995**, 270, 28268-28275.
219. Butkerait, P.; Zheng, Y.; Hallak, H.; Graham, T. E.; Miller, H. A.; Burris, K. D.; Molinoff, P. B.; Manning, D. R. Expression of the human 5-

- hydroxytryptamine_{1A} receptor in Sf9 cells. Reconstitution of a coupled phenotype by co-expression of mammalian G protein subunits. *J. Biol. Chem.* **1995**, 270, 18691-18699.
220. Marchal, I.; Jarvis, D. L.; Cacan, R.; Verbert, A. Glycoproteins from insect cells: sialylated or not? *Biol. Chem.* **2001**, 382, 151-159.
221. Seifert, R.; Wenzel-Seifert, K. The human formyl peptide receptor as model system for constitutively active G-protein-coupled receptors. *Life Sci.* **2003**, 73, 2263-2280.
222. Figler, R. A.; Graber, S. G.; Lindorfer, M. A.; Yasuda, H.; Linden, J.; Garrison, J. C. Reconstitution of recombinant bovine A₁ adenosine receptors in Sf9 cell membranes with recombinant G proteins of defined composition. *Mol. Pharmacol.* **1996**, 50, 1587-1595.
223. Grünewald, S.; Reiländer, H.; Michel, H. In vivo reconstitution of dopamine D_{2S} receptor-mediated G protein activation in baculovirus-infected insect cells: preferred coupling to G_{i1} versus G_{i2}. *Biochem.* **1996**, 35, 15162-15173.
224. Barr, A. J.; Brass, L. F.; Manning, D. R. Reconstitution of receptors and GTP-binding regulatory proteins (G proteins) in Sf9 cells. A direct evaluation of selectivity in receptor.G protein coupling. *J. Biol. Chem.* **1997**, 272, 2223-2229.
225. Seifert, R.; Lee, T. W.; Lam, V. T.; Kobilka, B. K. Reconstitution of β_2 -adrenoceptor-GTP-binding-protein interaction in Sf9 cells - High coupling efficiency in a β_2 -adrenoceptor-G_{s α} fusion protein. *Eur. J. Biochem.* **1998**, 255, 369-382.
226. Murphree, L. J.; Marshall, M. A.; Rieger, J. M.; MacDonald, T. L.; Linden, J. Human A_{2A} adenosine receptors: high-affinity agonist binding to Receptor-G protein complexes containing G β_4 . *Mol. Pharmacol.* **2002**, 61, 455-462.
227. Luckow, V. A.; Summers, M. D. Signals important for high-level expression of foreign genes in *Autographa californica* nuclear polyhedrosis virus expression vectors. *Virology* **1988**, 167, 56-71.
228. Miller, L. K. Baculoviruses as gene expression vectors. *Annu. Rev. Microbiol.* **1988**, 42, 177-199.
229. Kool, M.; Vlak, J. M. The structural and functional organization of the *Autographa californica* nuclear polyhedrosis virus genome. *Arch. Virol.* **1993**, 130, 1-16.

230. Ayres, M. D.; Howard, S. C.; Kuzio, J.; Lopez-Ferber, M.; Possee, R. D. The complete DNA sequence of *Autographa californica* nuclear polyhedrosis virus. *Virology* **1994**, 202, 586-605.
231. Smith, G. E.; Summers, M. D.; Fraser, M. J. Production of human β -interferon in insect cells infected with a baculovirus expression vector. *Mol. Cell Biol.* **1983**, 3, 2156-2165.
232. Maeda, S. Expression of foreign genes in insects using baculovirus vectors. *Annu. Rev. Entomol.* **1989**, 34, 351-372.
233. Murhammer, D. W. Review and patents and literature. The use of insect cell cultures for recombinant protein synthesis: Engineering aspects. *Appl. Biochem. Biotechnol.* **1991**, 31, 283-310.
234. Kidd, I. M.; Emery, V. C. The use of baculoviruses as expression vectors. *Appl. Biochem. Biotechnol.* **1993**, 42, 137-159.
235. Patterson, R. M.; Selkirk, J. K.; Merrick, B. A. Baculovirus and insect cell gene expression: review of baculovirus biotechnology. *Environ. Health Perspect.* **1995**, 103, 756-759.
236. Hou, L. H.; Du, G. X.; Guan, R. B.; Tong, Y. G.; Wang, H. T. In vitro assay for HCV serine proteinase expressed in insect cells. *World J. Gastroenterol.* **2003**, 9, 1629-1632.
237. Luckow, V. A.; Lee, S. C.; Barry, G. F.; Olins, P. O. Efficient generation of infectious recombinant baculoviruses by site-specific transposon-mediated insertion of foreign genes into a baculovirus genome propagated in *Escherichia coli*. *J. Virol.* **1993**, 67, 4566-4579.
238. Li, B.; Wu, H. Y.; Qian, X. P.; Li, Y.; Chen, W. F. Expression, purification and serological analysis of hepatocellular carcinoma associated antigen HCA587 in insect cells. *World J. Gastroenterol.* **2003**, 9, 678-682.
239. Vialard, J.; Lalumiere, M.; Vernet, T.; Briedis, D.; Alkhatib, G.; Henning, D.; Levin, D.; Richardson, C. Synthesis of the membrane fusion and hemagglutinin proteins of measles virus, using a novel baculovirus vector containing the β -galactosidase gene. *J. Virol.* **1990**, 64, 37-50.
240. Pennock, G. D.; Shoemaker, C.; Miller, L. K. Strong and regulated expression of *Escherichia coli* β -galactosidase in insect cells with a baculovirus vector. *Mol. Cell. Biol.* **1984**, 4, 399-406.
241. Murhammer, D.W. Baculovirus and insect cell expression protocols. *Methods Mol. Biol.* **2007**, Second Edition.

242. Kitts, P. A.; Ayres, M. D.; Possee, R. D. Linearization of baculovirus DNA enhances the recovery of recombinant virus expression vectors. *Nucleic Acids Res.* **1990**, 18, 5667-5672.
243. Trowitzsch, S.; Bieniossek, C.; Nie, Y.; Garzoni, F.; Berger, I. New baculovirus expression tools for recombinant protein complex production. *J. Struct. Biol.* **2010**, 172, 45-54.
244. Wicker-Planquart, C.; Canaan, S.; Riviere, M.; Dupuis, L.; Verger, R. Expression in insect cells and purification of a catalytically active recombinant human gastric lipase. *Protein Eng.* **1996**, 9, 1225-1232.
245. Graham, F. L.; van der Eb, A. J. A new Technique for the assay of Infectivity of Human Adenovirus 5 DNA. *Virology* **1973**, 52, 456-467.
246. Leusch, M. S.; Lee, S. C.; Olins, P. O. A novel host-vector system for direct selection of recombinant baculoviruses (bacmids) in *Escherichia coli*. *Gene* **1995**, 160, 191-194.
247. Lee, S. J.; Buhler, D. R. Functional properties of a rainbow trout CYP3A27 expressed by recombinant baculovirus in insect cells. *Drug Metab lism and Disposition: The Biological Fate of Chemicals* **2002**, 30, 1406-1412.
248. Mascarenhas, L.; Stripecke, R.; Case, S. S.; Xu, D.; Weinberg, K. I.; Kohn, D. B. Gene delivery to human B-precursor acute lymphoblastic leukemia cells. *Blood* **1998**, 92, 3537-3545.
249. Madry, H.; Trippel, S. B. Efficient lipid-mediated gene transfer to articular chondrocytes. *Gene Ther.* **2000**, 7, 286-291.
250. Oliveira, R. R.; Carvalho, D. M.; Lisauskas, S.; Mello, E.; Vianna, G. R.; Dode, M. A.; Rumpf, R.; Aragao, F. J.; Rech, E. L. Effectiveness of liposomes to transfect livestock fibroblasts. *Genet. Mol. Res.* **2005**, 4, 185-196.
251. Leopoldt, D.; Harteneck, C.; Nurnberg, B. G proteins endogenously expressed in Sf9 cells: interactions with mammalian histamine receptors. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol.* **1997**, 356, 216-224.
252. Wenzel-Seifert, K.; Hurt, C. M.; Seifert, R. High constitutive activity of the human formyl peptide receptor. *J. Biol. Chem.* **1998**, 273, 24181-24189.
253. Quehenberger, O.; Prossnitz, E. R.; Cochrane, C. G.; Ye, R. D. Absence of G_i proteins in the Sf9 insect cell. Characterization of the uncoupled recombinant N-formyl peptide receptor. *J. Biol. Chem.* **1992**, 267, 19757-19760.

254. Schneider, E. H.; Schnell, D.; Papa, D.; Seifert, R. High constitutive activity and a G-protein-independent high-affinity state of the human histamine H₄-receptor. *Biochem.* **2009**, 48, 1424-1438.
255. Wenzel-Seifert, K.; Kelley, M. T.; Buschauer, A.; Seifert, R. Similar apparent constitutive activity of human histamine H₂-receptor fused to long and short splice variants of G_{sα}. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **2001**, 299, 1013-1020.
256. Houston, C.; Wenzel-Seifert, K.; Burckstummer, T.; Seifert, R. The human histamine H₂-receptor couples more efficiently to Sf9 insect cell G_s-proteins than to insect cell G_q-proteins: limitations of Sf9 cells for the analysis of receptor/G_q-protein coupling. *J. Neurochem.* **2002**, 80, 678-696.
257. Hopp, T. P.; Woods, K. R. Prediction of protein antigenic determinants from amino acid sequences. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1981**, 78, 3824-3828.
258. Kyte, J.; Doolittle, R. F. A simple method for displaying the hydrophobic character of a protein. *J. Mol. Biol.* **1982**, 157, 105-132.
259. Angeletti, R. H. Design of useful peptide antigens. *J. Biomol. Tech.* **1999**, 10, 2-10.
260. Chou, P. Y.; Fasman, G. D. Prediction of protein conformation. *Biochem.* **1974**, 13, 222-245.
261. Chou, P. Y.; Fasman, G. D. Prediction of the secondary structure of proteins from their amino acid sequence. *Adv. Enzymol. Relat. Areas Mol. Biol.* **1978**, 47, 45-148.
262. Garnier, J.; Osguthorpe, D. J.; Robson, B. Analysis of the accuracy and implications of simple methods for predicting the secondary structure of globular proteins. *J. Mol. Biol.* **1978**, 120, 97-120.
263. Europe-Finner, G. N.; Phaneuf, S.; Mardon, H. J.; Lopez Bernal, A. Human myometrial G_{αs}-small (with serine) and G_s-large (with serine) messenger ribonucleic acid splice variants promote the increased expression of 46- and 54-kilodalton G_{αs} protein isoforms in pregnancy and their down-regulation during labor. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* **1996**, 81, 1069-1075.
264. Dieudonne, M. N.; Pecquery, R.; Dausse, J. P.; Giudicelli, Y. Regulation of white adipocyte guanine nucleotide binding proteins G_{sα} and G_{iα1-2} by

- testosterone in vivo: influence of regional fat distribution. *Biochim. Biophys. Acta* **1993**, 1176, 123-127.
265. Tedford, H. W.; Zamponi, G. W. Direct G protein modulation of Ca_v2 calcium channels. *Pharmacol. Rev.* **2006**, 58, 837-862.
266. Homburger, V.; Brabet, P.; Audigier, Y.; Pantaloni, C.; Bockaert, J.; Rouot, B. Immunological localization of the GTP-binding protein G_o in different tissues of vertebrates and invertebrates. *Mol. Pharmacol.* **1987**, 31, 313-319.
267. Marcil, J.; de Champlain, J.; Anand-Srivastava, M. B. Overexpression of G_i-proteins precedes the development of DOCA-salt-induced hypertension: relationship with adenylyl cyclase. *Cardiovasc. Res.* **1998**, 39, 492-505.
268. Schülein, R.; Westendorf, C.; Krause, G.; Rosenthal, W. Functional significance of cleavable signal peptides of G protein-coupled receptors. *Eur. J. Cell Biol.* **2011**.
269. Köchl, R.; Alken, M.; Rutz, C.; Krause, G.; Oksche, A.; Rosenthal, W.; Schülein, R. The signal peptide of the G protein-coupled human endothelin B receptor is necessary for translocation of the N-terminal tail across the endoplasmic reticulum membrane. *J. Biol. Chem.* **2002**, 277, 16131-16138.
270. Andersson, H.; D'Antona, A. M.; Kendall, D. A.; Von Heijne, G.; Chin, C. N. Membrane assembly of the cannabinoid receptor 1: impact of a long N-terminal tail. *Mol. Pharmacol.* **2003**, 64, 570-577.
271. Osborne, A. R.; Rapoport, T. A.; van den Berg, B. Protein translocation by the Sec61/SecY channel. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* **2005**, 21, 529-550.
272. Alken, M.; Schmidt, A.; Rutz, C.; Furkert, J.; Kleinau, G.; Rosenthal, W.; Schulein, R. The sequence after the signal peptide of the G protein-coupled endothelin B receptor is required for efficient translocation at the endoplasmic reticulum membrane. *Mol. Pharmacol.* **2009**, 75, 801-811.
273. Wallin, E.; von Heijne, G. Properties of N-terminal tails in G-protein coupled receptors: a statistical study. *Protein Eng.* **1995**, 8, 693-698.
274. von Heijne, G. Signal sequences. The limits of variation. *J. Mol. Biol.* **1985**, 184, 99-105.

275. Martoglio, B.; Dobberstein, B. Signal sequences: more than just greasy peptides. *Trends Cell Biol.* **1998**, 8, 410-415.
276. Chou, K. C. Prediction of protein signal sequences. *Curr. Protein Pept. Sci.* **2002**, 3, 615-622.
277. Emanuelsson, O.; Brunak, S.; von Heijne, G.; Nielsen, H. Locating proteins in the cell using TargetP, SignalP and related tools. *Nat. Protoc.* **2007**, 2, 953-971.
278. Nielsen, H.; Engelbrecht, J.; Brunak, S.; von Heijne, G. A neural network method for identification of prokaryotic and eukaryotic signal peptides and prediction of their cleavage sites. *Int. J. Neural Syst.* **1997**, 8, 581-599.
279. Bendtsen, J. D.; Nielsen, H.; von Heijne, G.; Brunak, S. Improved prediction of signal peptides: SignalP 3.0. *J. Mol. Biol.* **2004**, 340, 783-795.
280. Milligan, G. Principles: extending the utility of [³⁵S]GTPγS binding assays. *Trends Pharmacol. Sci.* **2003**, 24, 87-90.
281. Mize, A. L.; Alper, R. H. Serotonin 5-HT_{1B/1D} agonist-stimulated [³⁵S]GTPγS binding in rat and guinea pig striatal membranes. *Brain Res.* **1999**, 836, 229-236.
282. Harrison, C.; Traynor, J. R. The [³⁵S]GTPγS binding assay: approaches and applications in pharmacology. *Life Sci.* **2003**, 74, 489-508.
283. Lazareno, S. Measurement of agonist-stimulated [³⁵S]GTPγS binding to cell membranes. *Methods Mol. Biol.* **1997**, 83, 107-116.
284. Windh, R. T.; Manning, D. R. Analysis of G protein activation in Sf9 and mammalian cells by agonist-promoted [³⁵S]GTPγS binding. *Methods Enzymol.* **2002**, 344, 3-14.
285. Sovago, J.; Dupuis, D. S.; Gulyas, B.; Hall, H. An overview on functional receptor autoradiography using [³⁵S]GTPγS. *Brain Res. Brain Res. Rev.* **2001**, 38, 149-164.
286. Higashijima, T.; Ferguson, K. M.; Sternweis, P. C.; Smigel, M. D.; Gilman, A. G. Effects of Mg²⁺ and the βγ-subunit complex on the interactions of guanine nucleotides with G proteins. *J. Biol. Chem.* **1987**, 262, 762-766.
287. Behrenswerth, Andrea. Adenosin-Rezeptoren und neurodegenerative Erkrankungen: Untersuchung des Einflusses von Cholesterol und

- Evaluierung neuer funktionalisierter Liganden als pharmakologische Werkzeuge. *Dissertation, Rheinische Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn* **2008**.
288. Alsdorf, Bernt B. Heterologe Expression und Charakterisierung des Maus-Adenin-Rezeptors in Sf21-Insektenzellen und Interaktion potentieller Wirkstoffe mit Membranrezeptoren. *Diplomarbeit, Rheinische Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn* **2006**.
289. Markowitz, D.; Hesdorffer, C.; Ward, M.; Goff, S.; Bank, A. Retroviral gene transfer using safe and efficient packaging cell lines. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **1990**, 612, 407-414.
290. Palù, G.; Parolin, C.; Takeuchi, Y.; Pizzato, M. Progress with retroviral gene vectors. *Rev. Med. Virol.* **2000**, 10, 185-202.
291. Markowitz, D.; Goff, S.; Bank, A. A safe packaging line for gene transfer: separating viral genes on two different plasmids. *J. Virol.* **1988**, 62, 1120-1124.
292. Hu, W. S.; Pathak, V. K. Design of retroviral vectors and helper cells for gene therapy. *Pharmacol. Rev.* **2000**, 52, 493-511.
293. Sanders, D. A. No false start for novel pseudotyped vectors. *Curr. Opin. Biotechnol.* **2002**, 13, 437-442.
294. Emi, N.; Friedmann, T.; Yee, J. K. Pseudotype formation of murine leukemia virus with the G protein of vesicular stomatitis virus. *J. Virol.* **1991**, 65, 1202-1207.
295. Burns, J. C.; Friedmann, T.; Driever, W.; Burrascano, M.; Yee, J. K. Vesicular stomatitis virus G glycoprotein pseudotyped retroviral vectors: concentration to very high titer and efficient gene transfer into mammalian and nonmammalian cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1993**, 90, 8033-8037.
296. Felgner, P. L.; Gadek, T. R.; Holm, M.; Roman, R.; Chan, H. W.; Wenz, M.; Northrop, J. P.; Ringold, G. M.; Danielsen, M. Lipofection: a highly efficient, lipid-mediated DNA-transfection procedure. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1987**, 84, 7413-7417.
297. Vandekerckhove, J.; Weber, K. Mammalian cytoplasmic actins are the products of at least two genes and differ in primary structure in at least 25 identified positions from skeletal muscle actins. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1978**, 75, 1106-1110.

298. Smith, S. S.; Kelly, K. H.; Jockusch, B. M. Actin co-purifies with RNA polymerase II. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **1979**, 86, 161-166.
299. Kleppe, K.; Ohtsuka, E.; Kleppe, R.; Molineux, I.; Khorana, H. G. Studies on polynucleotides. XCVI. Repair replications of short synthetic DNA's as catalyzed by DNA polymerases. *J. Mol. Biol.* **1971**, 56, 341-361.
300. Mullis, K.; Faloona, F.; Scharf, S.; Saiki, R.; Horn, G.; Erlich, H. Specific enzymatic amplification of DNA in vitro: the polymerase chain reaction. *Cold Spring Harb. Symp. Quant. Biol.* **1986**, 51, 263-273.
301. Crouse, G. F.; Frischauf, A.; Lehrach, H. An integrated and simplified approach to cloning into plasmids and single-stranded phages. *Methods Enzymol.* **1983**, 101, 78-89.
302. Dagert, M.; Ehrlich, S. D. Prolonged incubation in calcium chloride improves the competence of *Escherichia coli* cells. *Gene* **1979**, 6, 23-28.
303. Reikofski, J.; Tao, B. Y. Polymerase chain reaction (PCR) techniques for site-directed mutagenesis. *Biotechnol. Adv.* **1992**, 10, 535-547.
304. Weiner, M. P.; Costa, G. L. Rapid PCR site-directed mutagenesis. *PCR Methods Appl.* **1994**, 4, S131-136.
305. Weiner, M. P.; Costa, G. L.; Schoettlin, W.; Cline, J.; Mathur, E.; Bauer, J. C. Site-directed mutagenesis of double-stranded DNA by the polymerase chain reaction. *Gene* **1994**, 151, 119-123.
306. 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.
307. 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.
308. Laemmli, U. K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **1970**, 227, 680-685.
309. Evan, G. I.; Lewis, G. K.; Ramsay, G.; Bishop, J. M. Isolation of monoclonal antibodies specific for human *c-myc* proto-oncogene product. *Mol. Cell. Biol.* **1985**, 5, 3610-3616.
310. Albrecht, S.; Brandl, H.; Adam, W. Chemilumineszenz-Reaktionen. Anwendungen in der klinischen Chemie, Biochemie und Medizin. *Chemie in unserer Zeit* **2004**, 24, 227-238.

311. Kassack, M. U.; Hofgen, B.; Lehmann, J.; Eckstein, N.; Quillan, J. M.; Sadée, W. Functional screening of G protein-coupled receptors by measuring intracellular calcium with a fluorescence microplate reader. *J. Biomol. Screen.* **2002**, 7, 233-246.
312. Hoque, K. M.; Chen, L.; Leung, G. P.; Tse, C. M. A purine-selective nucleobase/nucleoside transporter in PK15NTD cells. *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.* **2008**, 294, 1988-1995.

Publikationsverzeichnis

Publikationen

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.

Poster

Knospe, M.; Schiedel, A.C and Müller, C.E. The predicted putative agonist binding site of the rat adenine receptor investigated by mutagenesis studies. *Fourth Joint Italian-German Purine Club Meeting, Bonn (Deutschland)*, 22. bis 25. Juli 2011

Knospe, M.; Schiedel, A.C.; Alsdorf, B.B.A., Abdelrahman, A.; Seifert, R.; von Kügelgen, I. and Müller, C.E. Heterologous expression of adenine receptors in Sf9 cells. *Third Joint Italian-German Purine Club Meeting, Camerino (Italien)*, 17. bis 20. Juli 2009

Knospe, M.; Alsdorf, B.B.A.; Abdelrahman, A.; Schiedel, A.C.; von Kügelgen, I. and Müller, C.E. Heterologous expression of adenine receptors in non-mammalian cells. *DPhG Jahrestagung, Bonn (Deutschland)*, 08. bis 11. Oktober 2008

Knospe, M.; Alsdorf, B.B.A.; Abdelrahman, A.; Schiedel, A.C.; von Kügelgen, I. and Müller, C.E. Heterologous expression of adenine receptors in non-mammalian cells. *Second Joint Italian-German Purine Club Meeting, Leipzig (Deutschland)*, 12. bis 15. September 2007

Erklärung

Hiermit versichere ich, dass ich die vorliegende Arbeit selbstständig und ohne fremde Hilfe verfasst, keine anderen als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt und die den verwendeten Werken wörtlich oder inhaltlich entnommenen Stellen, als solche kenntlich gemacht habe.

Bonn,