

Medizinische Chemie und molekulare Pharmakologie
G-Protein-gekoppelter Purin- und verwandter
Waisen-Rezeptoren

Dissertation

zur

Erlangung des Doktorgrades (Dr. rer. nat.)

der

Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät

der

Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn

vorgelegt von

Dominik Tobias Thimm

aus

Münster

Bonn 2013

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

1. Gutachter: Prof. Dr. Christa E. Müller

2. Gutachter: PD Dr. Anke C. Schiedel

Tag der Promotion: 11.04.2014

Erscheinungsjahr: 2014

Die vorliegende Arbeit wurde in der Zeit von Oktober 2008 bis November 2013 am Pharmazeutischen Institut der Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn unter der Leitung von Frau Prof. Dr. Christa E. Müller durchgeführt.

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung.....	1
1.1	G-Protein-gekoppelte Rezeptoren.....	1
1.2	G-Protein-gekoppelte Purin-Rezeptoren	10
1.3	Waisen-Rezeptoren	12
1.4	Ziel der Arbeit.....	16
2	Identifizierung und Charakterisierung eines Adenin-Rezeptors im Hamster <i>Cricetulus griseus</i>	17
2.1	Einleitung	17
2.1.1	Adeninbiosynthese.....	17
2.1.2	Adenin-vermittelte Effekte	20
2.1.3	Adenin-Rezeptoren	37
2.1.3.1	Entdeckung.....	37
2.1.3.2	Rezeptor-Familie & Nomenklatur.....	41
2.1.3.3	Expression.....	42
2.1.3.4	Physiologische Bedeutung	43
2.1.3.5	Pharmakologische Charakterisierung	47
2.2	Ergebnisse & Diskussion	52
2.2.1	Klonierung der cAdeR-cDNA	53
2.2.2	Expression und [³ H]Adenin-Bindung des cAdeR.....	60
2.2.3	G-Protein-Kopplung des cAdeR.....	64
2.2.4	Struktur-Wirkungs-Beziehungen	73
2.2.5	Ausblick und Zusammenfassung	78
3	Mutagenesestudien am A_{2B}-Adenosin-Rezeptor und Evaluierung von PDE5-Inhibitoren als Adenosin-Rezeptor-Liganden.....	85
3.1	Die Rolle des Serin-279 bei der Ligandenbindung des humanen A _{2B} -Adenosin-Rezeptors	85
3.1.1	Einleitung	85
3.1.2	Ergebnisse & Diskussion	86
3.2	Evaluierung von PDE5-Inhibitoren als Adenosin-Rezeptor-Liganden.....	92
3.2.1	Einleitung	92
3.2.1.1	NO/cGMP/PKG-Signalkaskade	92
3.2.1.2	Inhibitoren der Phosphodiesterase 5	92
3.2.1.3	Überschneidungen Adenosin- und NO-vermittelter Signalkaskaden.....	94

3.2.2	Ergebnisse & Diskussion	98
4	Pharmakologische Charakterisierung der P2Y-Rezeptor-artigen Waisen-Rezeptoren GPR34 & GPR171	113
4.1	Einleitung.....	113
4.1.1	GPR34.....	113
4.1.1.1	Expression.....	114
4.1.1.2	Pharmakologie	115
4.1.1.3	(Patho)physiologie.....	118
4.1.2	GPR171	119
4.2	Ergebnisse & Diskussion	122
4.2.1	GPR34.....	122
4.2.2	GPR171	128
5	Medizinische Chemie und Pharmakologie des P2Y-Rezeptor-artigen Waisen-Rezeptors GPR35	135
5.1	Einleitung.....	135
5.1.1	Expression.....	139
5.1.2	Pharmakologie.....	140
5.1.2.1	Signalwege.....	140
5.1.2.2	Agonisten	142
5.1.2.3	Antagonisten	151
5.1.3	Mutagenese-Studien.....	153
5.1.4	(Patho)physiologie	156
5.2	Ergebnisse & Diskussion	159
5.2.1	Vortestungen	161
5.2.2	Testung einer Bibliothek von Indol-Derivaten.....	172
5.2.3	Testung von GPR55-Liganden	175
5.2.4	Testung und Optimierung von Chromenoncarbonsäure-Derivaten	181
5.2.4.1	Struktur-Wirkungs-Beziehungen am humanen GPR35	181
5.2.4.2	Inhibition der PSB-13253-vermittelten Rezeptor-Aktivierung durch bekannte Antagonisten des humanen GPR35	194
5.2.4.3	Untersuchungen am humanen GPR35b-Isotyp	197
5.2.4.4	Spezies-Selektivität	199
5.2.4.5	Rezeptor-Selektivität	205
5.2.5	Entwicklung und Charakterisierung des Radioliganden [³ H]PSB-13253	207
5.2.6	Kompetitions-Bindungsstudien am humanen GPR35	215
5.2.6.1	Testung bekannter GPR35-Liganden	215

5.2.6.2	Testung von Chromenon-Derivaten.....	221
5.2.6.3	Testung weiterer neuer Liganden des humanen GPR35 und sonstiger Verbindungen	233
5.2.6.4	Testung von Zaprinast-Derivaten und -Analoga	237
5.2.6.5	Testung von GPR55- und Cannabinoid-Rezeptor-Liganden.....	241
5.2.7	Zusammenfassung	249
6	Zusammenfassung	251
6.1	Adenin-Rezeptoren	251
6.2	Adenosin-Rezeptoren	253
6.3	P2Y-Rezeptor-artige Waisen-Rezeptoren.....	254
7	Experimenteller Teil.....	257
7.1	Material	257
7.1.1	Geräte, Instrumente, Verbrauchsmaterialien.....	257
7.1.2	Software & Onlineprogramme.....	259
7.1.3	Chemikalien	260
7.1.4	Nucleinsäuren & Nucleotide.....	264
7.1.5	Enzyme.....	265
7.1.6	Kits & Chemikalienmischungen.....	266
7.1.7	Zellkulturmedien & Medienzusätze	266
7.1.8	Zellen	267
7.1.9	Radioliganden	267
7.1.10	Lösungen, Puffer und Medien	268
7.1.10.1	Lösungen, Puffer und Medien für die Molekularbiologie	268
7.1.10.2	Lösungen für die Proteinbestimmung nach Lowry	269
7.1.10.3	Lösungen, Puffer und Medien für die Zellkultur	270
7.1.10.4	Puffer für funktionelle und Radioligandbindungs-Experimente.....	271
7.2	Molekularbiologie	273
7.2.1	Isolierung von Nucleinsäuren aus Zellen.....	273
7.2.2	Primerkonstruktion	274
7.2.3	Polymerase-Ketten-Reaktion	278
7.2.4	Agarose-Gelelektrophorese	279
7.2.5	Aufreinigung von DNA-Fragmenten	280
7.2.6	Restriktionsverdau	280
7.2.7	Ligation von DNA-Fragmenten.....	281
7.2.8	Herstellung chemisch kompetenter Bakterien	282
7.2.9	Transformation kompetenter Bakterien	283

7.2.10	Anzucht monoklonaler Bakterienkulturen.....	283
7.2.11	Isolierung von Plasmid-DNA aus Bakterien	283
7.2.12	Generierung und Isolierung von Bacmid-DNA aus Bakterien.....	284
7.2.13	Sequenzierung.....	284
7.2.14	Anlegen von Glycerinkulturen	284
7.3	Zellkultur	284
7.3.1	Auftauen von Zellen	285
7.3.2	Kultivierung von Zellen.....	285
7.3.3	Anlegen von Kryokulturen.....	286
7.3.4	Bestimmung der Zellzahl	286
7.3.5	Transfektion und Infektion von Insektenzellen	286
7.3.6	Transfektion von Säugetierzellen.....	287
7.3.7	Retrovirale Transfektion von Säugetierzellen.....	287
7.3.8	Monoklon-Selektion	288
7.3.9	Membranpräparation	289
7.3.10	Proteinbestimmung.....	289
7.4	Pharmakologische Experimente	290
7.4.1	cAMP-Experimente.....	290
7.4.1.1	[³ H]cAMP-Filtrationsexperimente.....	290
7.4.1.2	Reportergenexperimente.....	292
7.4.2	Calciumionen-Mobilisations-Experimente	293
7.4.3	β-Arrestin-Rekrutierungs-Experimente.....	294
7.4.4	Radioligand-Bindungsstudien	295
7.4.4.1	Sättigungsexperimente.....	296
7.4.4.2	Assoziations- und Dissoziations-Experimente	297
7.4.4.3	Kompetitionsexperimente	298
8	Abkürzungsverzeichnis.....	301
9	Literaturverzeichnis.....	305
	Danksagung.....	335
	Publikationsverzeichnis.....	337

1 Einleitung

1.1 G-Protein-gekoppelte Rezeptoren

Das Konzept des Rezeptors wurde zu Beginn des 20. Jahrhunderts erstmals von John Newport Langley und Paul Ehrlich vorgeschlagen.^{1,2} Rezeptoren sind zelluläre Makromoleküle oder Makromolekülkomplexe, die die Übermittlung chemischer Signale ins Zellinnere vermitteln.³ Chemische Verbindungen, die den Rezeptor aktivieren und eine solche Signaltransduktion auslösen, werden Agonisten genannt.³ Nach einem simplen Rezeptormodell kann der Rezeptor in einer aktiven oder in einer inaktiven Konformation vorliegen.^{3,4} Agonisten binden mit hoher Affinität an die aktive Rezeptorkonformation, stabilisieren diese und bewirken die Aktivierung des Rezeptors und der nachgeschalteten Signalkaskade.^{4,5} Die Bindungsstelle, an die der endogene Agonist eines Rezeptors bindet, wird als orthosterische Bindungsstelle bezeichnet.³ Daneben können die meisten Rezeptoren auch allosterische Bindungsstellen aufweisen. Hier kann die Bindung allosterischer Modulatoren erfolgen, die Einfluss auf die Bindung oder den ausgelösten Effekt der orthosterischen Liganden nehmen können.^{3,6} Neutrale (kompetitive) Antagonisten sind Verbindungen, die an den Rezeptor binden, aber kein Signal auslösen, sondern die Bindung und Wirkung eines Agonisten hemmen.³ Sie binden mit gleicher Affinität an aktive und inaktive Konformationen des Rezeptors.⁴ Inverse Agonisten stabilisieren die inaktive Konformation des Rezeptors und verschieben das Gleichgewicht zwischen den Konformationen dementsprechend.³

G-Protein-gekoppelte Rezeptoren (GPCRs) stellen im Menschen mit etwa 800 Mitgliedern die größte Familie von Rezeptoren dar.⁷ GPCRs werden von strukturell vielfältigen endogenen Verbindungen aktiviert und spielen eine entscheidende Rolle in zahlreichen (patho)physiologischen Prozessen.⁸ Deshalb gehören sie zu den wichtigsten Zielstrukturen in der Pharmakotherapie verschiedener Erkrankungen: über 30 % der zugelassenen Arzneistoffe wirken an GPCRs und viele weitere beeinflussen die Produktion, Verteilung oder Metabolisierung ihrer Liganden.⁹ Darüber hinaus befinden sich zahlreiche weitere potentielle Arzneistoffe, die ebenfalls GPCRs adressieren, in (prä)klinischen Studien.¹⁰

Erste Informationen über die Struktur von GPCRs erhielt man in den frühen 1980er Jahren: Bovines Rhodopsin wurde aufgereinigt und biochemisch untersucht.¹¹ Einige

Jahre danach gelang die Klonierung und Expression des β_2 -adrenergen Rezeptors des Goldhamsters.¹² Die Rezeptoren wiesen eine unerwartet hohe Homologie zueinander und eine ähnliche Topologie auf: Beide Proteine besitzen sieben α -helikale Transmembrandomänen (TMD1-7), die alternierend durch drei intra- (ICL1-3) und drei extrazelluläre Schleifen (ECL1-3) miteinander verbunden sind, wobei ihre N-Termini extrazellulär und ihre C-Termini intrazellulär liegen.¹¹⁻¹³ Rhodopsin und der β_2 -adrenerge Rezeptor gelten als prototypische GPCRs und es wurde im Folgenden nachgewiesen, dass die gefundene Topologie eine zentrale strukturelle Gemeinsamkeit aller Mitglieder dieser Rezeptorklasse darstellt.⁸ Deshalb werden GPCRs auch 7-Transmembran(7TM)-Rezeptoren genannt.⁸

Nicht-sensorische GPCRs können aufgrund struktureller Ähnlichkeiten, hochkonservierter Aminosäurereste und Motive sechs Klassen (A-F) oder alternativ aufgrund ihrer phylogenetischen Verwandtschaft fünf Klassen („GRAFS“-System) zugeordnet werden.^{7,14} Gemäß der klassischen Einteilung gehören nahezu alle humanen nicht-sensorischen GPCRs zur Klasse A (Rhodopsin-ähnlich), Klasse B (Sekretinrezeptor-ähnlich) oder Klasse C (metabotroper Glutamatrezeptor-ähnlich).⁵ Klasse A stellt die größte der genannten Rezeptorklassen dar.⁵

Während viele Wissenschaftler Ende der 1960er Jahre davon ausgingen, dass Rezeptoren und Effektoren identische Strukturen darstellen (z. B. Rezeptor und Adenylatzyklase), wurde diese Ansicht in den folgenden Jahren korrigiert und man identifizierte zusätzliche zwischengeschaltete Mediatoren.⁸ Im Jahr 1971 fanden Rodbell et al. erste Hinweise auf die für diese Rezeptorklasse namensgebenden GTP-bindenden oder G-Proteine, denen eine entscheidende Rolle bei der Signalübertragung von GPCRs zukommt.^{5,15} G-Proteine bilden einen heterotrimeren Komplex, der aus einer Guaninnucleotid-bindenden $G\alpha$ -Untereinheit und einer heterodimeren $G\beta\gamma$ -Untereinheit besteht.⁵ In Säugetieren konnten jeweils mehrere Gene identifiziert werden, die für Untereinheiten codieren: 16 für $G\alpha$ - (aufgrund von Spleißvarianten insgesamt 20 Proteine), 5 für $G\beta$ - und 12 für $G\gamma$ -Untereinheiten.¹⁶ Anhand von Sequenzhomologien können die $G\alpha$ -Untereinheiten in vier Familien unterteilt werden: Die $G\alpha_s$ -Familie ($G\alpha_s$ und das mit olfaktorischen Rezeptoren assoziierte $G\alpha_{olf}$), die $G\alpha_i$ -Familie ($G\alpha_{i1-3}$, die vor allem im Nervensystem exprimierten $G\alpha_{o1-2}$, die retinalen $G\alpha_{t1-2}$, das mit Geschmacksrezeptoren assoziierte $G\alpha_{gust}$ und $G\alpha_z$), die $G\alpha_q$ -Familie ($G\alpha_q$, $G\alpha_{11}$, die in hematopoietischen Zellen vorliegenden $G\alpha_{14-16}$) und die $G\alpha_{12}$ -Familie ($G\alpha_{12}$ und $G\alpha_{13}$).^{16,17} Die $G\alpha$ -Untereinheiten weisen ein oder mehrere Cysteine nahe ihrem N-Terminus auf, die mindestens zum Teil palmitoyliert werden können ($G\alpha_i$ -Proteine

können zusätzlich N-terminal myristoyliert werden).¹⁷ Dagegen werden die γ -Untereinheiten (abhängig von der Bindung an eine β -Untereinheit) an Cysteinresten nahe ihres C-Terminus isoprenyliert.¹⁷ Die angehängten Fettsäuren bzw. Terpene dienen der Verankerung der α - und der γ -Untereinheit in der Membran und sind daher von Bedeutung, um GPCRs und G-Proteine in räumliche Nähe zu bringen.¹⁷

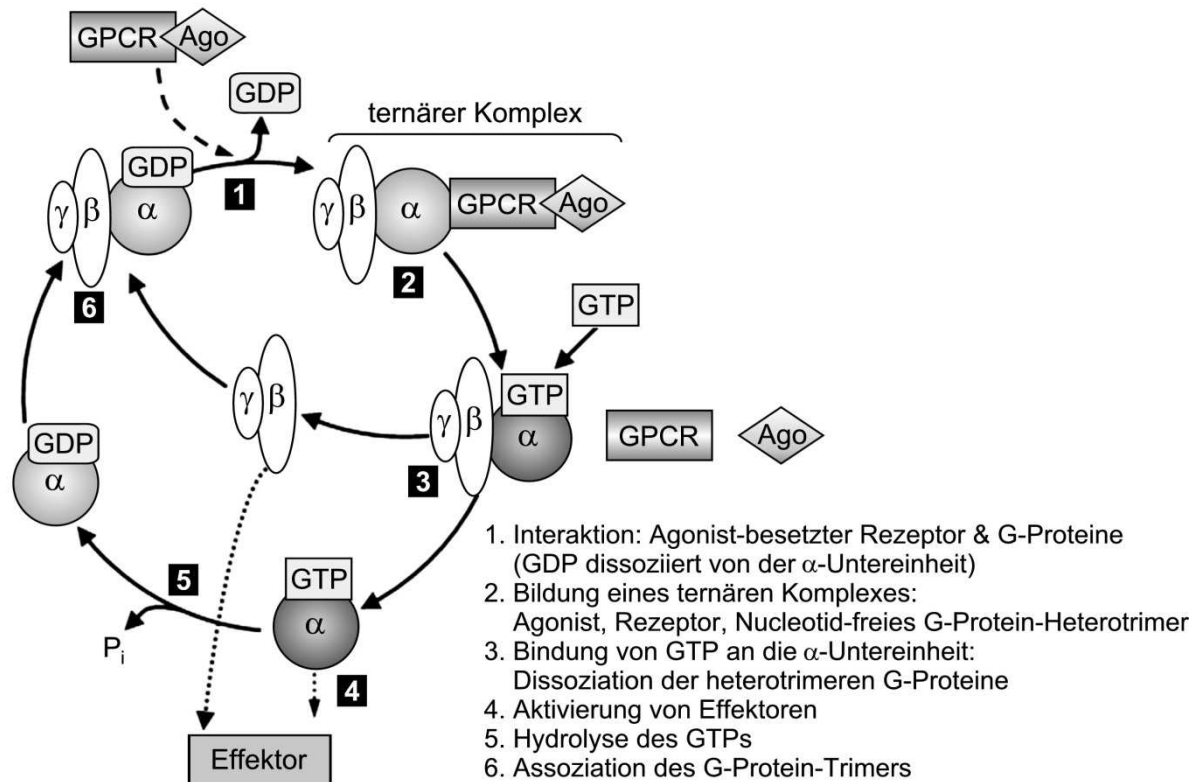


Abbildung 1.1: G-Protein-Zyklus.

Abkürzungen: Ago, Agonist; $\alpha\beta\gamma$: G-Proteine. Diese Darstellung wurde von Schneider & Seifert¹⁸ übernommen und modifiziert.

Im inaktiven Zustand liegen die G-Proteine als heterotrimerer Komplex vor, in dem die α -Untereinheit ein Molekül GDP gebunden hat (siehe Abbildung 1.1).¹⁷ Zumindest für einzelne Rezeptoren fand man Hinweise darauf, dass G-Proteine und GPCRs im inaktiven Zustand nicht gekoppelt vorliegen, sondern dass GPCRs spontan auf die G-Protein-Trimere treffen.¹⁹ Die Bindung eines Agonisten stabilisiert eine Konformation des Rezeptors, die effizient mit dem G-Protein-Komplex interagieren kann.¹⁷ Es entsteht ein sogenannter ternärer Komplex aus GPCR und G-Proteinen.²⁰ Der Rezeptor wirkt dabei wie ein Guaninnucleotid-Austausch-Faktor und induziert die Dissoziation des GDPs von der α -Untereinheit.¹⁷ Der G-Protein-Komplex wirkt dabei allosterisch auf den GPCR ein, wodurch die Affinität des Rezeptors zu Agonisten ihr Maximum erreicht.¹⁸ Die Guaninnucleotid-Bindungsstelle der α -Untereinheit wird nach der Dissoziation des

GDPs mit GTP besetzt und es kommt zu einer Konformationsänderung der Untereinheiten.¹⁷ Damit löst sich auch der ternäre Komplex aus Rezeptor und G-Proteinen auf.¹⁸ Es ist unklar, ob es zu einer physikalischen Trennung der $G\alpha$ - und der $G\beta\gamma$ -Untereinheit kommt, da zumindest für bestimmte G-Proteine (G_i) gezeigt wurde, dass sie nach dieser Konformationsänderung assoziiert bleiben.^{17,21} Beide Untereinheiten können in diesem Zustand unabhängig voneinander Effektoren aktivieren und entsprechende Signalkaskaden auslösen.⁵ Das gebundene GTP wird schließlich von der $G\alpha$ -Untereinheit zu GDP hydrolysiert.^{16,17} Diese normalerweise langsam ablaufende Hydrolyse kann durch Bindung von Modulatoren, den „regulators of G protein signaling“ (RGS), oder auch durch die Bindung an die Effektoren selbst beschleunigt werden.¹⁶ Durch die Hydrolyse des GTPs kommt es zu einer Konformationsänderung der G-Protein-Untereinheiten, wodurch sie in ihren inaktiven Ausgangszustand zurückkehren.¹⁷

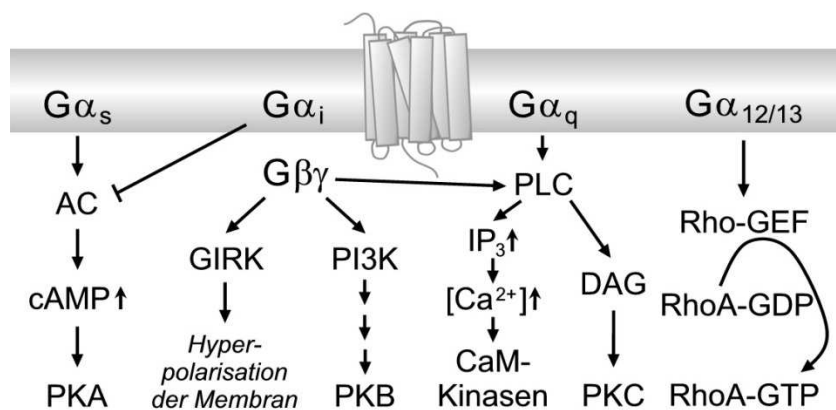


Abbildung 1.2: G-Protein-vermittelte Signalkaskaden

Dargestellt sind ausgewählte Anteile der wichtigsten G-Protein-vermittelten Signalkaskaden.^{5,15-17,22-35} Alle Abkürzungen sind im Text erklärt außer: AC, Adenylatzyklase, CaM-Kinasen: Calcium/Calmodulin-abhängige Kinasen.

Die G-Protein-vermittelten Signalwege sind besonders vom Subtyp der $G\alpha$ -Untereinheit abhängig.¹⁷ Im Folgenden sollen vornehmlich die umfassend erforschten, klassischen Signalkaskaden besprochen werden, die durch die ubiquitär exprimierten $G\alpha$ -Untereinheiten ausgelöst werden (siehe Abbildung 1.2): $G\alpha_s$ -Proteine aktivieren Adenylatzyklasen,^{15,29} die die Umwandlung von ATP in den sekundären Botenstoff cAMP katalysieren.^{16,33} Durch die erhöhte Konzentration des cAMPs wird die von diesem Botenstoff abhängige Protein-Kinase A (PKA) aktiviert.^{16,35} $G\alpha_i$ -Proteine hemmen die meisten Adenylatzyklase-Isoformen während $G\alpha_{q/11}$ -Proteine Phospholipase-C(PLC)-Isoenzyme $\beta 1-4$ aktivieren.^{16,23} PLC-Enzyme spalten Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat

(PIP₂) und produzieren Inositoltrisphosphat (IP₃) und Diacylglycerol (DAG).^{16,22} Beide Verbindungen sind sekundäre Botenstoffe: IP₃ bewirkt die Öffnung von Calcium-Ionenkanälen des endoplasmatischen Retikulums, was zu einer Freisetzung von Calciumionen und damit zu einer Erhöhung der cytoplasmatischen Calcium-Konzentration führt.²⁸ Calciumionen können sich an Calmodulin anlagern und dieser Komplex kann eine Vielzahl von Calcium-Calmodulin-abhängigen Kinasen aktivieren.³² Diacylglycerol aktiviert die Proteinkinase C (PKC).^{27,34} Gα_{12/13}-Proteine aktivieren verschiedene Subtypen von Rho-Guaninnucleotid-Austausch-Faktoren (Rho-GEF).^{24,31} Diese Rho-GEF bewirken den Austausch des an die Rho-GTPasen RhoA gebundenen GDPs gegen GTP und aktivieren sie dadurch.^{24,31} RhoA-Proteine modulieren vor allem die Cytoskelett-Architektur.^{24,31} Die Gβγ-Untereinheit kann durch Transaktivierung von Rezeptortyrosinkinasen die Phosphatidylinositol-3-Kinase(PI3K)-Signalkaskade auslösen, wodurch schließlich die Proteinkinase B (PKB oder Akt) wird.³⁰ Außerdem kann die Gβγ-Untereinheit die PLC-Isoformen β2 und β3 aktivieren und damit die oben für PLC-Enzyme beschriebene Signalkaskade auslösen.¹⁶ Die Gβγ-Untereinheit bewirkt außerdem die Öffnung einer Gruppe von Kaliumkanälen, der GIRKs, was zu einer Hyperpolarisation der Zellmembran führt.^{25,26} Darüber hinaus wurde eine Vielzahl an weiteren G-Protein-vermittelten Signalkaskaden beschrieben.¹⁷

Die durch die jeweiligen Signalwege aktivierten Kinasen stehen nicht am Ende der Signalkaskaden, sondern können zahlreiche weitere Effektoren aktivieren oder inhibieren.^{13,16} So wird durch G-Proteine die Aktivität eines breiten Spektrums an Effektoren wie Enzymen, Ionenkanälen (direkt oder indirekt) und Transkriptionsfaktoren reguliert.^{13,16,17} Teilweise können verschiedene G-Protein-Untereinheiten auch gleiche Signalkaskaden aktivieren wie z. B. den Mitogen-aktivierten Protein-(MAP-)Kinase-Signalweg.³⁰ Dieser Signalweg wird häufig durch die GTPase Ras eingeleitet und beinhaltet die sukzessive Aktivierung der Proteinkinasen Raf, MEK und schließlich der MAP-Kinasen (z. B. der „extracellular-signal regulated“-Kinasen, kurz ERK).³⁰ Die Signalkaskade kann durch die Gα_q- (PKC-vermittelt) und die Gβγ-Untereinheit (PKC-vermittelt und wahrscheinlich durch die Transaktivierung von Rezeptor-Tyrosinkinasen) aktiviert und durch die Gα_s- und Gα_i-Untereinheit (PKA-vermittelt) unter bestimmten Bedingungen ebenfalls aktiviert oder moduliert werden.^{30,36}

Neben den G-Proteinen gibt es noch eine Reihe weiterer Proteine, die mit GPCRs interagieren und dadurch weitere Effektoren aktivieren.³⁷ Diese Interaktionen wurden beispielhaft für einzelne Rezeptoren gezeigt und sind möglicherweise tatsächlich Rezeptor-spezifisch.³⁷ Interessanterweise sind häufig Modulationen zwischen diesen G-

Protein-unabhängigen und G-Protein-abhängigen Signalen zu beobachten: Beispielsweise rekrutieren AT₁-Rezeptoren nach ihrer Aktivierung einen Komplex aus der Janus-Kinase JAK2 und SHP2, was die Rekrutierung, Phosphorylierung und damit Aktivierung von Transkriptionsfaktoren der STAT-Familie zur Folge hat.^{37,38} Der gleichzeitige durch die Rezeptoraktivierung verursachte, G_q-vermittelte Anstieg der intrazellulären Calciumionen-Konzentration potenziert dieses JAK-STAT-Signal.^{37,39} Ein weiteres Beispiel ist die für viele GPCRs gefundene Calciumionen-abhängige Interaktion mit Calmodulin, die u. a. im Rahmen eines negativen Feedback-Mechanismus die G-Protein-Kopplung von G_q-gekoppelten Rezeptoren unterbrechen kann.³⁷ Wichtige Interaktionspartner von GPCRs können auch GPCRs selbst sein. So wurde für einzelne GPCRs gezeigt, dass die Bildung von Homo- oder Heterooligomeren entscheidenden Einfluss auf die Expression des Rezeptors an der Zelloberfläche (z. B. bei GABA_B-Rezeptoren), die Bindung von Liganden der Rezeptoren im Komplex (z. B. bei Dimeren aus A_{2A}-Adenosin- und D₂-Dopamin-Rezeptoren) und die G-Protein-Kopplung der Rezeptoren hat (z. B. bei D₁- und D₂-Dopaminrezeptoren und ihren Heterodimeren).^{40,41}

Die Beendigung der durch GPCRs ausgelösten Signalweiterleitung erfolgt nicht nur durch die Eliminierung des Agonisten (z. B. durch Abbau oder Umverteilung), sondern tritt auch in dauerhafter Anwesenheit eines Agonisten ein.⁴² Dieser Vorgang, bei dem der Rezeptor von den G-Proteinen entkoppelt wird, wird Desensibilisierung genannt (siehe Abbildung 1.3).⁴² Während die homologe Desensibilisierung den Agonist-induzierten Verlust der Agonistwirkung auf den aktivierten GPCR-Subtyp beschreibt, können bei der heterologen Desensibilisierung auch an anderen GPCR-Subtypen Wirkverluste beobachtet werden.⁴² Man fand heraus, dass die Rezeptordesensibilisierung maßgeblich durch die Phosphorylierung des GPCRs eingeleitet wird.^{42,43} Diese kann im Rahmen eines negativen Feedback-Mechanismus durch die von GPCRs aktivierten Proteinkinasen (wie z. B. PKA oder PKC) erfolgen.^{5,44} Allerdings sind diese nicht nur in der Lage, den aktivierten Rezeptor selbst, sondern auch andere GPCRs zu phosphorylieren, weshalb sie besonders bei der heterologen Desensibilisierung eine Rolle spielen.^{42,45} Aktivierte GPCRs können homolog desensibilisieren, indem sie (zusätzlich) von GPCR-Kinasen (GRK) phosphoryliert werden.⁴² Es gibt sieben GRK-Subtypen (GRK1-7), von denen die GRK1 (Rhodopsin-Kinase oder RK) und die GRK2 (β -adrenerger-Rezeptor-Kinase 1 oder β -ARK1) die ersten waren, die identifiziert wurden.⁴⁶⁻⁴⁹ Während die GRK-Subtypen 1, 4 und 7 gewebe-spezifisch exprimiert werden, können die Subtypen 2, 3, 5 und 6 in vielen verschiedenen Geweben nachgewiesen werden.⁴⁹ GRKs werden auf verschiedenen Wegen an die Zellmembran

rekrutiert: GRK2 und -3 können über ihre Pleckstrin-Homologie-Domäne an die G $\beta\gamma$ -Untereinheit binden (besonders nach Phosphorylierung der GRKs durch PKA oder PKC), während GRK5 und -6 durch ihre Palmitoylierung konstitutiv membranständig sind.⁵ Die GRKs können wahrscheinlich Strukturen in aktivierten GPCRs erkennen und phosphorylieren daher nur GPCRs die in einer aktiven Konformation vorliegen (homologe Desensibilisierung).^{5,50} GRKs phosphorylieren Serin- und Threonin-Reste der dritten intrazellulären Schleife und des C-Terminus von GPCRs.⁴²

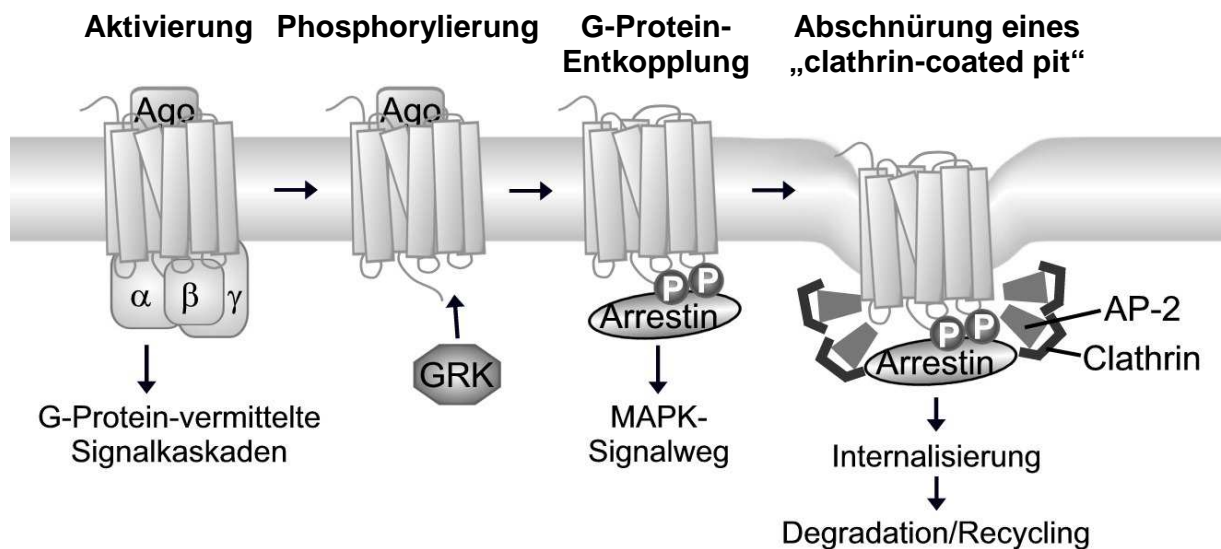


Abbildung 1.3: Schlüsselprozesse bei der Rezeptordesensibilisierung.

Die Darstellung basiert auf Abbildungen von Ferguson⁵¹ und Ritter & Hall.³⁷ Alle Abkürzungen werden im Text erklärt außer Ago: Agonist; $\alpha\beta\gamma$ steht für die entsprechenden G-Protein-Untereinheiten.

Durch diese Phosphorylierung entstehen Bindestellen für Proteine, die aufgrund ihrer desaktivierenden Wirkung auf GPCRs Arrestine genannt wurden.⁸ Es gibt vier bekannte Arrestin-Moleküle: Arrestin 1 und X-Arrestin (manchmal auch Arrestin 4 genannt), die nur in der Retina exprimiert werden, sowie die ubiquitären β -Arrestin 1 (Arrestin 2) und β -Arrestin 2 (Arrestin 3).^{16,52} Während bei einzelnen Rezeptoren die alleinige Bindung von GRKs an die G $\beta\gamma$ -Untereinheit für die Entkopplung des Rezeptors von den G-Proteinen auszureichen scheint (durch Verhinderung der Zusammenlagerung des heterotrimeren G-Protein-Komplexes), erfolgt die völlige Desensibilisierung der meisten GPCRs durch die Bindung von Arrestin-Molekülen.⁴²

Nach der Bindung von β -Arrestin-Molekülen an (nicht-retinale) GPCRs dienen spezielle Bindemotive in den C-Termini der β -Arrestine als Bindungsstelle für β 2-Adaptin (AP-2) und Clathrin.^{53,54} Es kommt zu einer Membraneinstülpung („clathrin-coated pit“) und einer

durch die GTPase Dynamin vermittelten Abschnürung eines Vesikels.⁵¹ Während dies der bekannteste Internalisierungsmechanismus für GPCRs darstellt, scheint es auch weitere, Clathrin-unabhängige Mechanismen zu geben.^{16,53} Abhängig von spezifischen Serin/Threonin-Motiven nahe des C-Terminus des Rezeptors bilden sich mehr oder weniger stabile Komplexe zwischen Rezeptor und den β -Arrestin-Molekülen.⁵⁵ Bei vielen GPCRs lösen sich die β -Arrestin-Moleküle nach der Internalisierung von den Rezeptoren, die zuerst in den Vesikeln verbleiben.^{16,51} Für den Fall des β_2 -adrenergen Rezeptors hat man gefunden, dass die Rezeptor-enthaltenden Vesikel mit sauren endosomalen Vesikeln fusionieren, die reich an membranständigen GPCR-spezifischen Protein-Phosphatasen des Subtyps 2A sind.^{16,56} Im Rahmen eines „Recycling“-Mechanismus kann der Rezeptor enzymatisch dephosphoryliert und zurück an die Zellmembran gebracht werden.^{16,56} Internalisierte GPCRs können, sofern sie ubiquitiniert sind, aber auch dem lysosomalen Abbau zugeführt werden.⁵⁵ Die Ubiquitinierung des Rezeptors wird maßgeblich durch die Art und Dauer der Assoziation zwischen Rezeptor und β -Arrestin-Molekülen beeinflusst.⁵⁵ So dient beispielsweise β -Arrestin 2 als Interaktionspartner für E3-Ubiquitin-Ligasen, die sowohl β -Arrestin 2 als auch den gebundenen Rezeptor ubiquitinieren kann.^{55,57}

Arrestine dienen aber nicht nur der Entkopplung des Rezeptors von G-Proteinen und der Internalisierung des Rezeptors, sondern auch der effizienten Beendigung einzelner G-Protein-abhängiger Signalkaskaden.¹⁶ So wurde gezeigt, dass die cAMP-spezifische Phosphodiesterase (PDE) 4 an β -Arrestin-Moleküle bindet und so nach Rezeptoraktivierung an die Membran rekrutiert werden kann.⁵⁸ Damit kann der durch die GPCR-Aktivierung produzierte sekundäre Botenstoff cAMP effizient und nahe seines Produktionsortes abgebaut werden.¹⁶ Einen ähnlichen Effekt kann man auch für den sekundären Botenstoff DAG beobachten, der durch von β -Arrestin rekrutierten DAG-Kinasen in einen inaktiven Metaboliten überführt wird.⁵⁹

Darüber hinaus können β -Arrestin-Moleküle selbst nach Bindung an GPCRs Signalkaskaden auslösen.⁵⁷ Interessanterweise wurde beschrieben, dass β -Arrestin-Moleküle ähnlich wie G-Proteine allosterisch auf GPCRs einwirken, so dass die Affinität für Agonisten gesteigert wird; es kann sich also ein alternativer ternärer Komplex bilden.⁶⁰ β -Arrestin dient als Bindemolekül für alle Elemente des MAP-Kinase-Signalweges.³⁶ Wahrscheinlich kann dieser Signalweg G-Protein-unabhängig nach Rezeptoraktivierung durch ebenfalls rekrutierte c-Src-Tyrosinkinasen direkt oder durch Transaktivierung von Rezeptor-Tyrosin-Kinasen eingeleitet werden.^{36,52,61} Weiterhin wurden auch einige andere β -Arrestin-vermittelte Signalwege beschrieben, die aber

Rezeptor-spezifisch oder GPCR-unabhängig verlaufen.^{16,52} Vergleichbar mit einem molekularen Strichcode geht man davon aus, dass die Effekte die durch β -Arrestin-Rekrutierung ausgelöst werden, von den GPCR-Phosphorylierungsmustern abhängig sind.^{50,55} So konnte beispielhaft gezeigt werden, dass die Phosphorylierung durch GRK2 und -3 besonders für die Rezeptorinternalisierung von Bedeutung ist, während die Phosphorylierung durch GRK5 und -6 für die β -Arrestin-abhängige Aktivierung der MAP-Kinasen entscheidend ist.^{55,62,63}

Während man lange Zeit davon ausging, dass die Rezeptoraktivierung zu einer ausgeglichenen Induktion aller für den Rezeptor typischen Signalwege führt, zeigte sich im Laufe der Zeit, dass unter bestimmten Bedingungen nur einzelne Signalwege eingeschaltet werden.⁴² Dies kann an der unterschiedlichen Expression der Moleküle liegen, die mit dem GPCR interagieren.⁵⁵ Allerdings ist es so, dass auch Agonist-spezifisch nur ein Teil der möglichen Signalkaskaden ausgelöst werden kann.⁴² Dieses Phänomen wird als „ligand bias“ oder funktionelle Selektivität bezeichnet.⁴² Häufig spricht man dann von funktioneller Selektivität, wenn ein Ligand entweder vornehmlich G-Protein-vermittelte Signalkaskaden oder β -Arrestin-Rekrutierung auslöst.⁵² Man kann die Bedeutung des Begriffs aber weiter ausdehnen, so dass darunter ebenfalls die selektive Induktion z. B. einzelner G-Protein-vermittelter Signalkaskaden (bei gleichzeitiger Kopplung des GPCRs an G-Proteine unterschiedlicher Familien) fällt.⁶⁴ Beispiele für Arzneistoffe mit funktioneller Selektivität sind Salmeterol und Carvedilol.⁶⁵ Salmeterol ist ein lang-wirkendes β_2 -Sympathomimetikum. Die Tatsache, dass es zwar G-Protein-abhängige Signalwege auslöst, aber keine β -Arrestin-Rekrutierung bewirkt, trägt wahrscheinlich zu der lang-andauernden Wirkung dieses Arzneistoffes bei.⁶⁵⁻⁶⁷ Carvedilol, das als unselektiver β -Adrenozeptor-Antagonist vermarktet wird, verursacht (zumindest bei dem β_2 -adrenergen Rezeptor) β -Arrestin-Rekrutierung und ist damit bezüglich der G-Protein-Kopplung nicht nur ein kompetitiver, sondern zusätzlich auch eine Art funktioneller Antagonist.⁶⁶ Funktionelle Selektivität kann also nützlich sein, um die Wirkung eines Arzneistoffes zu modulieren und möglicherweise auch unerwünschte Arzneistoffwirkungen zu verringern, weshalb man teilweise gezielt die Entwicklung von „biased“-Agonisten für den pharmakotherapeutischen Einsatz anstrebt.⁶⁸ Interessanterweise scheinen auch allosterische Modulatoren funktionelle Selektivität eines orthosterischen Agonisten herbeiführen zu können.⁶⁹ Der molekulare Mechanismus, durch den die funktionelle Selektivität von Agonisten bedingt wird, ist bislang unklar. Jedoch gibt es Hinweise darauf, dass GPCRs eine Reihe verschiedener

aktiver Konformationen einnehmen können, von denen einige lediglich einen Teil der möglichen Signalkaskaden auslösen können.^{42,64,68}

Belege über Agonist-induzierte Konformationsänderungen in GPCRs kann man vor allem durch Röntgenkristallstruktur-Analysen erhalten.⁶⁸ Diese Untersuchungsmethode lieferte bereits wertvolle Hinweise über die räumliche Struktur und die Lage der Ligandenbindungstasche von GPCRs.⁷⁰ Bovines Rhodopsin war der erste und lange Zeit einzige GPCR, dessen Struktur aufgeklärt werden konnte.⁷¹ Erst einige Jahre später gelang die Aufklärung der Struktur des humanen β_2 -adrenergen Rezeptors.^{72,73} Bis heute wurden die Strukturen einer Reihe von GPCRs beschrieben, wobei sowohl inaktive als auch aktive Konformationen der jeweiligen Rezeptoren aufgeklärt wurden, so dass man auf Konformationsänderungen während der Rezeptoraktivierung rückschließen kann: So kommt es bei der Rezeptoraktivierung zur Verformung der TMD5, zu einer Verlagerung der TMD3 und TMD7, sowie einer Verschiebung und Rotation der TMD5 und TMD6.⁷⁰ Die Kristallstrukturen können als Vorlage zur Erstellung von Homologie-Modellen für GPCRs dienen, deren Struktur bislang nicht aufgeklärt wurde, sofern ausreichend hohe Sequenzidentität zwischen Vorlage und dem zu modellierenden GPCR besteht.⁷⁰

GPCRs sind also Rezeptoren, die durch eine Vielzahl von Interaktionen mit anderen Proteinen fein abgestimmt komplexe Signalkaskaden, die häufig modulierend miteinander verbunden sind, auslösen können.

1.2 G-Protein-gekoppelte Purin-Rezeptoren

Im Jahr 1929 stellten Drury und Szent-Györgyi eine der ersten Studien vor, in der die pharmakologische Wirkung von Purin-Derivaten (Adenosin und AMP), in diesem Fall auf die Herzfunktion, beschrieben wurde.⁷⁴ In den darauffolgenden Jahrzehnten wurde von vielen weiteren purinergen Effekten berichtet.⁷⁵ Diese Effekte wurden später auf die Wirkung der untersuchten Purine an entsprechenden Rezeptoren zurückgeführt und erst in den 1970er Jahren wurde der Begriff des purinergen Rezeptors von Geoffrey Burnstock eingeführt.⁷⁶ Nach der Klonierung und gezielten Erforschung diverser purinergere Rezeptoren, schlugen Experten 1996 eine einheitliche Nomenklatur dieser Gruppe von Rezeptoren vor, der die „International Union of Basic and Clinical Pharmacology“ (IUPHAR) bis heute folgt.⁷⁷ Demnach werden die purinergen Rezeptoren

in Adenosin-Rezeptoren (AR, oder synonym P1-Rezeptoren) und in P2-Rezeptoren unterteilt.⁷⁷

Tabelle 1.1: Purinerge GPCRs^{a,78-84}

Gruppe	Subtyp	endogener Agonist	G-Protein-Kopplung
P0 ^b		Adenin	G _i
P1	A ₁	Adenosin	G _{i/o}
	A _{2A}	Adenosin	G _s
	A _{2B}	Adenosin	G _i , G _{q/11}
	A ₃	Adenosin	G _i , G _{q/11}
P2Y	P2Y ₁	ADP	G _{q/11}
	P2Y ₂	ATP = UTP > Ap ₄ A	G _{q/11} (G _i)
	P2Y ₄	UTP > ATP > Ap ₄ A	G _{q/11} (G _i)
	P2Y ₆	UDP > UTP > ATP	G _{q/11}
	P2Y ₁₁	ATP	G _{q/11}
	P2Y ₁₂	ADP > ATP	G _{i/o}
	P2Y ₁₃	ADP > ATP	G _{i/o}
	P2Y ₁₄	UDP > UDP-Glucose > UDP-Galaktose	G _{q/11}

^aalle Angaben beziehen sich auf die humanen Rezeptoren (außer ^bauf den Rezeptor der Ratte).

P1-Rezeptoren werden durch den endogenen Agonisten Adenosin aktiviert und lassen sich in vier Subtypen unterteilen: A₁, A_{2A}, A_{2B} und A₃ (G-Protein-Kopplung siehe Tabelle 1.1).^{82,85} Zu den endogenen Agonisten der P2-Rezeptoren gehören Adenosin- und Uridin-di- und -triphosphate sowie Adenindinucleotide und UDP-Zucker (siehe Tabelle 1.1).⁸¹ P2-Rezeptoren werden also neben Purin- auch (oder im Falle eines P2Y-Rezeptorsubtypen ausschließlich) von Pyrimidin-Derivaten aktiviert.⁸¹ Man kann die Gruppe der P2-Rezeptoren weiter in P2X- und P2Y-Rezeptoren unterteilen.^{75,77} Während es sich bei den Adenosin- und den P2Y-Rezeptoren um GPCRs handelt, gehören die P2X-Rezeptoren zu den Ligand-gesteuerten Ionenkanälen.^{75,77} Es sind sieben P2X-Rezeptor-Untereinheiten (P2X1-7, die einen trimeren Rezeptor bilden) und acht P2Y-Rezeptoren bekannt: P2Y₁, P2Y₂, P2Y₄, P2Y₆, P2Y₁₁, P2Y₁₂, P2Y₁₃ und P2Y₁₄ (G-Protein-Kopplung siehe Tabelle 1.1).⁸¹ Obwohl P1- und P2Y-Rezeptoren nur einen geringen Verwandtschaftsgrad aufweisen, sind sie doch funktionell miteinander verbunden.^{7,86,87} So kann der P2-Rezeptor-Agonist ATP über extrazelluläre Enzyme (nämlich Ecto-Nucleosidtriphosphat-Diphosphohydrolasen, Ecto-Nucleotid-Pyro-

phosphatasen/Phosphodiesterasen, Ecto-5'-Nucleotidase und Alkalische Phosphatasen) sequentiell oder direkt zu ADP, AMP und/oder Adenosin und damit schließlich zu P1-Rezeptor-Agonisten abgebaut werden.^{86,87}

Zu den neuesten Entdeckungen im Bereich der purinergen Rezeptoren gehört die der Existenz G-Protein-gekoppelter Adeninrezeptoren.^{78,84} Im Jahr 2002 wurde ein Adeninrezeptor in Ratten identifiziert und im Jahr 2008 ein weiterer in Mäusen.^{78,84} Auch wenn er bislang nicht identifiziert werden konnte, gibt es darüber hinaus auch Hinweise auf einen humanen Adeninrezeptor.⁸⁸ Entsprechend der bisherigen Nomenklatur für purinerge Rezeptoren wurde für die Gruppe der Adeninrezeptoren die Bezeichnung P0-Rezeptoren vorgeschlagen.⁷⁹

1.3 Waisen-Rezeptoren

In klassischen pharmakologischen Ansätzen hat man (wie oben für Adenosin beschrieben) zunächst Signalmoleküle identifiziert und ihre pharmakologischen Effekte in Versuchstieren, Geweben oder Zelllinien erforscht.⁸⁹ In den 1980er Jahren waren etwa 50 verschiedene Signalmoleküle bekannt, die potentielle GPCR-Liganden darstellten.^{90,91} Fortschritte in der Molekularbiologie in derselben Dekade erlaubten schließlich erstmals die Klonierung der kodierenden DNA (cDNA) von GPCRs.⁹⁰ Im Jahr 1986 konnte eine der ersten GPCR-cDNAs kloniert werden, nämlich die des β_2 -adrenergen Rezeptors des Goldhamsters.¹² Der Rezeptor, für den die entdeckte cDNA kodiert, konnte direkt seinem endogenen Liganden zugeordnet werden, weil die Klonierung mit Gensonden durchgeführt wurde, die anhand bekannter Sequenzen von Peptidfragmenten des Rezeptors konstruiert wurden.¹² Durch Einsatz von Gensonden/Primern, die von der β_2 -Adrenozeptor-cDNA abgeleitet wurden, konnten in den folgenden Jahren weitere cDNAs identifiziert werden, deren Genprodukte adrenerge Rezeptoren darstellten.^{8,92} Auf die gleiche Weise wurde 1987 die cDNA des Rezeptors G-21 kloniert.⁹³ Allerdings konnte dieser Rezeptor nicht durch Adrenalin/Noradrenalin aktiviert werden.⁸ Damit hatte man einen Rezeptor identifiziert, dessen endogener Ligand unbekannt war.⁸ Solche Rezeptoren werden „orphan receptors“ (im folgenden Waisen- oder Orphan-Rezeptoren) genannt.⁸ Nur ein Jahr später gelang die Deorphanisierung dieses ersten Orphan-Rezeptors, also die Zuordnung des endogenen Liganden: Serotonin; es handelte sich um den 5-HT_{1A}-Rezeptor.⁹⁴

Anhand von Gensonden, PCR-Methoden und schließlich der Sequenzierung des menschlichen Genoms wurden die heute bekannten knapp 800 Mitglieder dieser Rezeptorgruppe entdeckt.⁹⁰ Genau wie der 5-HT_{1A}-Rezeptor waren die meisten GPCRs bei ihrer Entdeckung Orphan-Rezeptoren und sind es teilweise noch heute.⁹¹ Nach der Entdeckung der Rezeptoren hat man in reversen pharmakologischen Ansätzen (also nicht ausgehend vom Signalmolekül, sondern ausgehend vom Rezeptor) häufig zuerst die bekannten Signalmoleküle, danach Gewebeextrakte und später in Hochdurchsatzverfahren große Metabolit-Bibliotheken getestet und konnte schließlich für viele Rezeptoren eine Zuordnung der jeweiligen endogenen Agonisten vornehmen.^{90,91,95} Auf diese Weise konnten auch zuvor unbekannte und unerwartete Signalmoleküle als solche identifiziert werden (wie z. B. UDP-Glucose als endogener Agonist des ehemaligen Orphan-Rezeptors KIAA0001, dem P2Y₁₄-Rezeptor).⁸⁹ Die Erkenntnis, dass GPCRs nicht nur durch die bekannten Signalmoleküle, sondern auch durch andere endogene Verbindungen aktiviert werden können, offenbart die Schwierigkeiten bei der Deorphanisierung: die Zahl der möglichen endogenen Agonisten eines Orphan-Rezeptors ist enorm hoch.⁸⁹

Trotz einer immer noch großen Zahl an Orphan-Rezeptoren (laut IUPHAR über 130 nicht-sensorische Orphan-Rezeptoren) ist die Deorphanisierungsrate in den vergangenen Jahren gesunken.⁸⁹ Dies regte viele Spekulationen über die Bedeutung und Eigenschaften dieser Orphan-Rezeptoren an. So wurde die Eignung der jeweiligen Testsysteme hinterfragt: Für immer mehr GPCRs werden z. B. G-Protein-unabhängige Signalwege beschrieben.¹⁶ Auch wenn es unwahrscheinlich ist, wäre es doch denkbar, dass einige GPCRs untypischerweise überhaupt nicht G-Protein-gekoppelt sind.^{90,95} Auch kann man hinterfragen, ob das entsprechende Expressionssystem, das für eine effiziente Signaltransduktion nötige Repertoire an mit GPCRs interagierenden Proteinen aufweist.^{90,95} Man geht momentan z. B. für den GABA_{B2}-Rezeptor davon aus, dass er nicht von einem Liganden aktiviert werden kann, sondern allein die Aufgabe eines Chaperons übernimmt und die Zelloberflächen-Expression des GABA_{B1}-Rezeptors (in einem heterodimeren Komplex) sicherstellt.^{96,97} Es wäre vorstellbar, dass einigen Orphan-Rezeptoren eine ähnliche Funktion zukommt und sie möglicherweise keinen endogenen Agonisten haben.⁹⁸ Andererseits ist es auch denkbar, dass einzelne Orphan-Rezeptoren zwar aktiviert werden können, aber nur wenn sie in einem di- oder oligomeren Komplex mit einem anderen GPCR vorliegen, was die Deorphanisierung stark erschweren würde.⁹⁸ Für den C5a₂-Komplement-Peptid-Rezeptor wurde gezeigt, dass er das Anaphylatoxin C5a und verwandte Verbindungen zwar hoch-affin bindet,

aber dass dadurch kein Signal ausgelöst wird.^{95,99,100} Es wurde daher vorgeschlagen, dass es sich bei dem Rezeptor um einen nicht-funktionalen „Ligandenfänger“ handeln könnte, was auch auf andere Orphan-Rezeptoren zutreffen könnte.⁹⁵ Neben der Tatsache, dass die Rolle des Rezeptors ohnehin kontrovers diskutiert wird, kann aber nicht ausgeschlossen werden, dass die Anaphylatoxine endogene Antagonisten sind oder untypische G-Protein-unabhängige Signale vermitteln könnten.^{95,101}

Eine Hilfe bei der Deorphanisierung kann die phylogenetische Analyse der GPCRs liefern.⁸⁹ In der Arbeitsgruppe um Helgi Schiöth wurde eine solche Analyse vorgenommen.^{7,89} Daraus ging nicht nur der Vorschlag einer neuen Klassifizierung der GPCRs hervor (GRAFS-System) sondern auch eine Unterteilung der Rhodopsin-artigen GPCRs in vier Gruppen (α - δ) und diverse Unterzweige.^{7,89} Die oben erwähnten purinergen Rezeptoren werden verschiedenen Gruppen zugeordnet: Adenosin-Rezeptoren gehören zum MECA-Zweig der α -Gruppe (MECA steht für die Mitglieder dieses Zweiges: Melanocortin-Rezeptoren, „endothelial differentiation GPCRs“, Cannabinoid- und Adenosin-Rezeptoren).^{7,89} Die P2Y-Rezeptoren befinden sich in dem Purin-Zweig der δ -Gruppe.^{7,89} In dieser Gruppe befinden sich neben den P2Y-Rezeptoren auch Rezeptoren für verschiedene lipophile Liganden (z. B. freie Fettsäuren, Cysteinyl-Leukotriene und LPA) und zahlreiche Orphan-Rezeptoren.^{7,89} Trotz des geringen phylogenetischen Verwandtschaftsgrades gibt es interessanterweise einige Ähnlichkeiten zwischen dem MECA-Zweig der α -Gruppe und dem Purin-Zweig der δ -Gruppe bezüglich der (endogenen) Liganden der Rezeptoren dieser Gruppen: In beiden Gruppen gibt es nicht nur purinerge Rezeptoren (MECA: P1, Purin: P2Y), sondern auch LPA-Rezeptoren (MECA: LPA₁₋₃R, Purin: LPA₄R) und Rezeptoren, an die Cannabinoide binden (MECA: CB1/2, Purin: GPR55/GPR18).^{7,89} Wahrscheinlich sind also aus verschiedenen Vorläufern unabhängig voneinander Rezeptor-Gruppen hervorgegangen, die teilweise Purine und teilweise stark lipophile Liganden binden können.^{7,89} Die phylogenetische Verwandtschaft zwischen Purin-Rezeptoren und P2Y-artigen Orphan-Rezeptoren ist in Abbildung 1.4 dargestellt.⁸⁹ Zwar gibt es kein direktes Ortholog der Nager-Adeninrezeptoren im Menschen, aber Mitglieder derselben Genfamilie finden sich in einem dem Purin-Zweig benachbarten Zweig der „Mas-related gene“(Mrg)-Rezeptoren, der ebenfalls zur δ -Gruppe gehört.⁸⁹

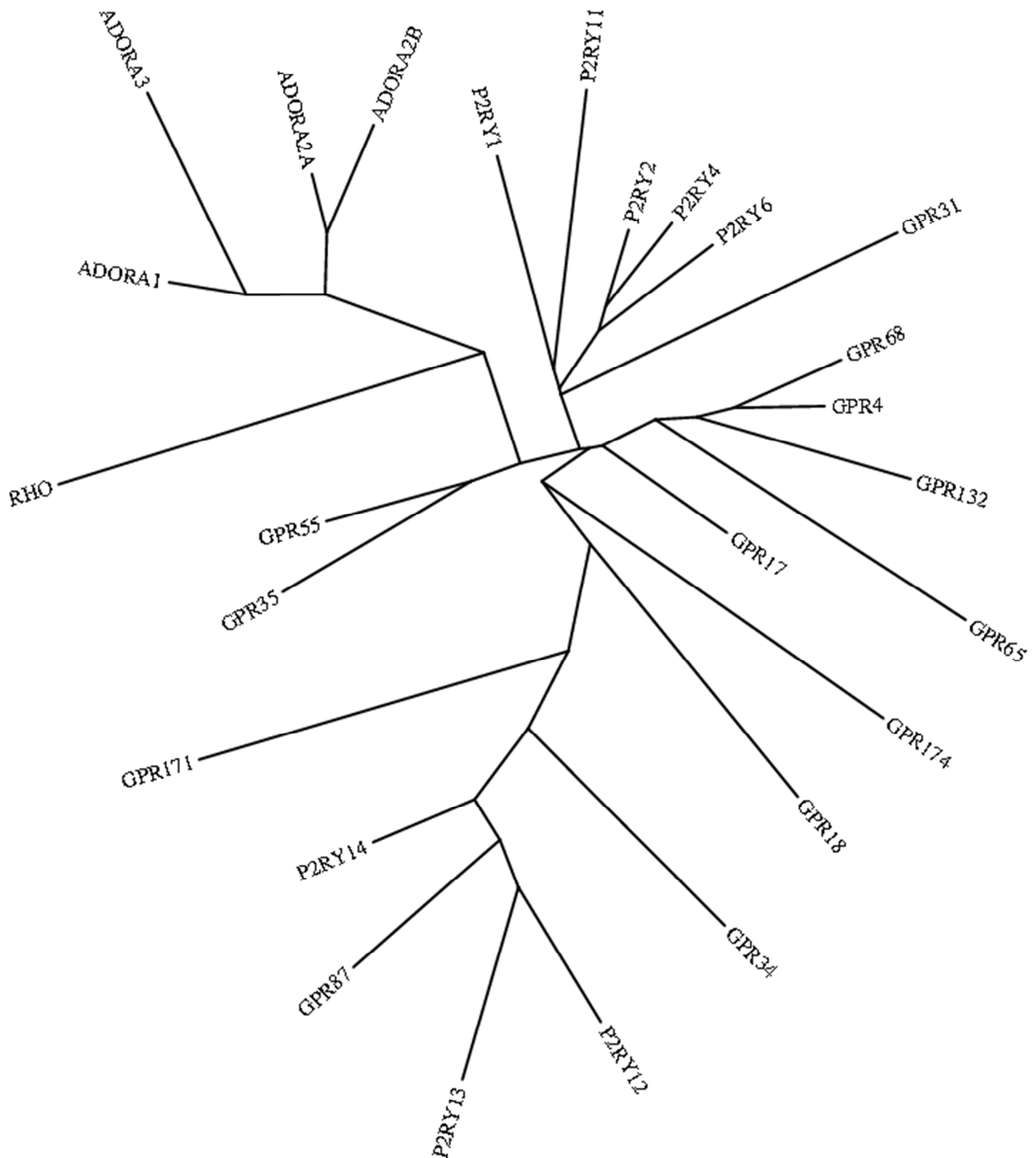


Abbildung 1.4: Phylogenetische Verwandtschaft von P2Y-Rezeptoren und P2Y-artigen Orphanrezeptoren

In die Analyse wurde eine Auswahl der gemäß Civelli et al.⁸⁹ nah mit den P2Y-Rezeptoren verwandten Orphan-Rezeptoren (GPR), die P2Y-Rezeptoren (P2RY) sowie als „Outgroup“ die P1-Rezeptoren (ADORA) und Rhodopsin (RHO) aufgenommen. Der phylogenetische Baum wurde mit dem Online-Tool der Firma Information Génomique et Structurale (Phylogeny.fr) erstellt.

GPCRs gehören zu den wichtigsten pharmakotherapeutischen Zielstrukturen.⁹ Und obwohl die momentan zugelassenen Arzneistoffe nur einen kleinen Anteil der Mitglieder dieser Rezeptorklasse adressieren, ist das Potential der GPCRs als Zielstruktur für

therapeutische Intervention sehr groß.⁸⁹ Die ersten Hinweise auf die physiologische Rolle verschiedener Orphan-Rezeptoren sind diesbezüglich ebenfalls vielversprechend: So wird beispielsweise mit MK-5046 der erste Agonist eines noch nicht deorphanisierten Rezeptors (des BB₃-Bombesin-Rezeptors) momentan in klinischen Studien zur Therapie von Adipositas evaluiert.¹⁰²

1.4 Ziel der Arbeit

Die vorliegende Arbeit befasst sich mit der Untersuchung und Charakterisierung G-Protein-gekoppelter Purin-Rezeptoren sowie verwandter Waisen-Rezeptoren.

Ziele sind insbesondere

- die Entwicklung, Optimierung und Charakterisierung potenter, selektiver Liganden, die als pharmakologische Werkzeuge benötigt werden (GPR35);
- die Charakterisierung der Bindungsstellen und Untersuchung der Rezeptor-Ligand-Interaktionen (Adenosin-Rezeptoren, speziell A_{2B}AR);
- die Charakterisierung bisher nicht oder kaum untersuchter Rezeptoren (cAdeR, GPR34, GPR35, GPR171).

2 Identifizierung und Charakterisierung eines Adenin-Rezeptors im Hamster *Cricetulus griseus*

2.1 Einleitung

2.1.1 Adeninbiosynthese

Ausgehend von 5-Phosphoribosyl-1-pyrophosphat (PRPP) werden bei der *de novo*-Purin-Synthese einfache Moleküle (z. B. Glutamin, Glycin, Tetrahydrofolat-Derivate, CO₂ und Aspartat) für den mehrstufigen, enzymatisch katalysierten Aufbau des Puringrundgerüsts genutzt.¹⁰³⁻¹⁰⁵ Dabei entstehen jedoch nicht direkt freie Purinbasen, sondern es wird Inosin-Monophosphat (IMP) gebildet, das enzymatisch in Guanin- und Adenin-Nucleotide umgewandelt werden kann.¹⁰⁴ IMP wird durch eine Adenylsuccinat-Synthetase in Adenylsuccinat und dieses durch eine Adenylsuccinat-Lyase in Adenosin-Monophosphat (AMP) umgewandelt (siehe Abbildung 2.1).¹⁰⁶ AMP kann dann enzymatisch und stufenweise in Adenosin-di-(ADP) und -triphosphat (ATP) überführt werden (s. u.).¹⁰⁵ Das *de novo* synthetisierte AMP kann über 5'-Nucleotidasen zu Adenosin abgebaut werden.⁸⁶ Purin-Nucleosid-Phosphorylasen (PNPs) und S-Adenosylhomocysteinase (bislang nur für die S-Adenosylhomocysteinase der Maus beschrieben) sind in der Lage, Adenosin weiter zu Adenin abzubauen.¹⁰⁷⁻¹⁰⁹ Allerdings weisen beide Enzyme eine geringe katalytische Effizienz für diese Reaktion auf.¹⁰⁷⁻¹⁰⁹ Aufgrund ihrer deutlich höheren katalytischen Effizienz übernehmen Adenosin-Desaminasen fast vollständig den enzymatischen Abbau des Adenosins.¹⁰⁹⁻¹¹² Daher wird Adenosin kaum zu Adenin, sondern vorwiegend zu Inosin abgebaut.¹⁰⁹⁻¹¹²

Dennoch konnten Hinweise auf eine endogene Adenin-Produktion gefunden werden und mit der ubiquitär exprimierten 5'-Methylthioadenosin-Phosphorylase (MTAP) fand man schließlich auch ein dafür verantwortliches Enzym.¹¹² MTAP spaltet 5'-Methylthioadenosin (MTA), wodurch Adenin und 5'-Methylthioribose-1-phosphat produziert werden.^{112,113} MTA selbst fällt bei der Synthese der Polyamine Spermin und Spermidin an.¹¹² Methionin und ATP werden dabei zunächst durch die Methioninadenosyltransferase zu S-Adosylmethionin (SAM) umgesetzt.¹¹⁴ Dieses wird durch die SAM-Decarboxylase in Decarboxy-SAM umgewandelt.^{114,115} Die Propylamingruppe des Decarboxy-SAMs kann dann durch die Spermidin-Synthase auf

Putrescin übertragen werden.^{112,114} Dabei entsteht MTA und Spermidin.^{112,114} Katalysiert durch die Spermin-Synthase kann es zu der Übertragung einer Propylamingruppe eines weiteren Decarboxy-SAM-Moleküls kommen, wobei Spermin und MTA produziert werden.^{112,114} Polyamine modulieren den Zellzyklus und induzieren die Zellproliferation.¹¹⁶ Daraus wurde geschlossen, dass Adenin vorwiegend von proliferierenden Zellen produziert wird.¹¹² Auch wenn dieser Schluss nachvollziehbar ist, bedarf es näherer Untersuchungen, um zu beweisen, dass die zelluläre Adeninkonzentration tatsächlich mit der Proliferationsrate der Zellen korreliert.

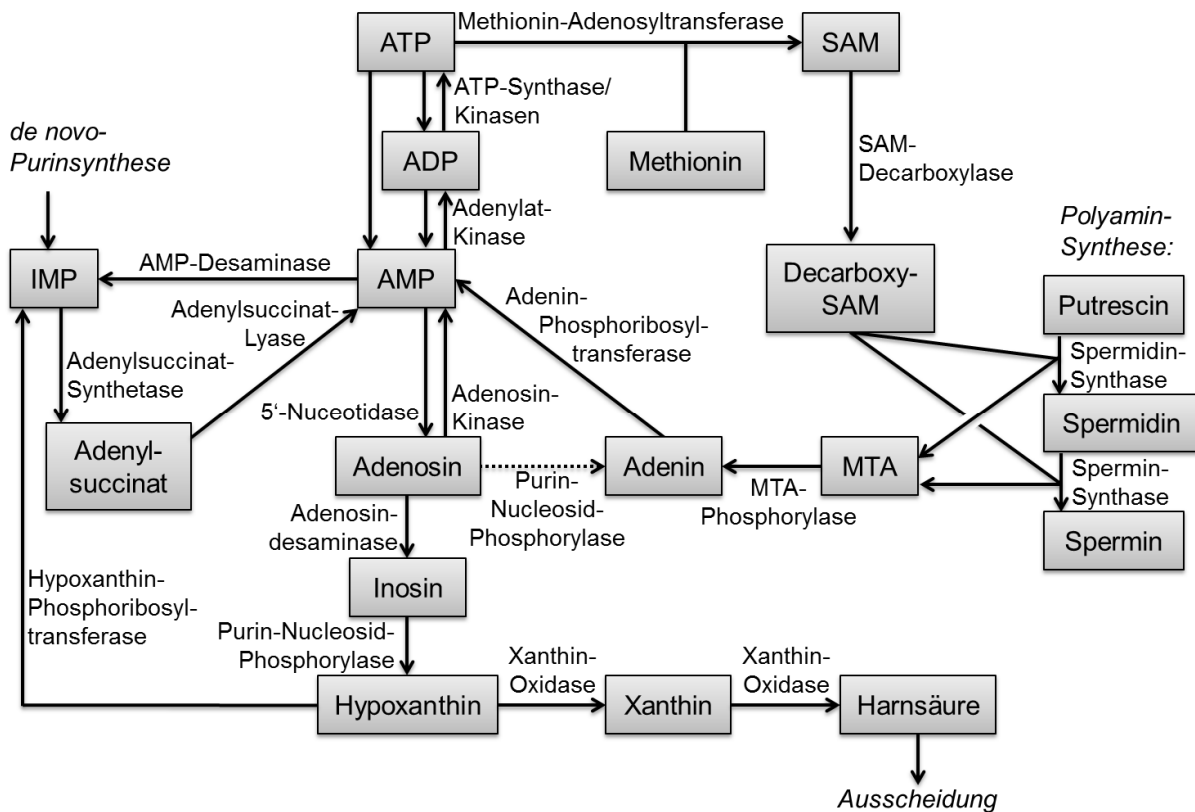


Abbildung 2.1: Schema ausgewählter enzymatischer Prozesse des Purin-Metabolismus

Diese Darstellung wurde modifiziert übernommen.^{103,110,114,117-119}

Neben der endogenen Produktion von Adenin wird es auch durch die Nahrung in den Körper aufgenommen.¹¹² Im Gegensatz zu Säugetieren sind Darmbakterien dazu in der Lage sowohl AMP (durch die bakterielle AMP-Nucleosidase) als auch Adenosin (durch die bakterielle PNP) effizient zu Adenin abzubauen.^{107,120} Dadurch kann es zu einem zusätzlichen Adenin-Eintrag kommen. Sowohl das im Darm vorliegende als auch das in Zellen produzierte Adenin kann über Transportmechanismen Zellmembranen passieren. Dieser Transport erfolgt durch die äquibrativen Nucleosid-Transporter (ENT), die die Diffusion entlang eines Konzentrationsgradienten erleichtern.¹²¹ Seit langem ist bekannt,

dass diese transmembranären Proteine den bidirektionalen Transport von Nucleosiden ermöglichen, aber ihre Fähigkeit zum Transport von Nucleobasen wie Adenin wurde erst in jüngeren Publikationen beschrieben.¹²²⁻¹²⁴ Es gibt vier ENT-Subtypen: ENT1, ENT2, ENT3 und ENT4.¹²¹ Während der ENT1 und -2 ubiquitär exprimiert werden und an der Zelloberfläche lokalisiert sind, befindet sich der ENT3 vor allem in intrazellulären Membranen.^{121,123} Der ENT4 wird gewebespezifisch exprimiert (vor allem im Herzen und Gehirn).¹²¹ Bislang wurde der Transport von Adenin für den humanen ENT1, den humanen und die murinen ENT2, den humanen ENT3, sowie den ENT4 der Maus beschrieben.^{121,123-126} Obwohl es Hinweise auf weitere äquibrative Adenin-Transportersysteme in Säugetieren gibt, konnten die dafür verantwortlichen Transporter noch nicht identifiziert werden.^{127,128} Im Gegensatz zu den ENTs vermitteln die konzentrativen Nucleosid-Transporter (CNTs) keinen Nucleobase-Transport.¹²³

Eine Alternative zur *de novo*-Purinsynthese stellt die energieeffizientere Wiederverwertung von Purin-Metaboliten dar („purine salvage“).^{103,105} Es konnte gezeigt werden, dass Adenin die Enzyme der *de novo*-Purinsynthese im Rahmen eines negativen Feedback-Mechanismus hemmt.¹²⁹ Zellen aus bestimmten Geweben produzieren Purin-Nucleoside und -Nucleotide ausschließlich oder zu einem großen Teil durch solche Wiederverwertungsmechanismen z. B. Zellen des Knochenmarks sowie Erythrozyten, Zellen der gastrointestinalen Mucosa und Zellen bestimmter Skelettmuskelfasern.^{103,130-133} Im Zuge des „purine salvage“ wird Adenin durch die Adeninphosphoribosyltransferase (APRT) in AMP umgewandelt.^{118,134} Die Wiederverwertung von Hypoxanthin verläuft ähnlich (siehe Abbildung 2.1).¹⁰⁴ Genau wie Adenin kann auch Adenosin über die Adenosin-Kinase zu AMP aufgebaut werden.¹⁰³ Das bei der *de novo*-Synthese angefallene sowie das über den „salvage“-Weg synthetisierte AMP kann dann über die Adenylatkinase in ADP überführt werden.^{103,119} Der mögliche weitere Aufbau von ADP zu ATP erfolgt entweder durch die an der Glykolyse beteiligten Enzyme Phosphoglyceratkinase und Pyruvatkinase oder durch die in den Mitochondrien lokalisierte ATP-Synthase.^{103,135,136}

Zur Ausscheidung können Purinbasen zu Harnsäure abgebaut werden.¹¹⁷ Dabei wird das durch ADA gebildete Inosin über die PNP in Hypoxanthin umgewandelt.^{109-111,117} Durch die Xanthinoxidase erfolgt dann der Abbau von Hypoxanthin zu Xanthin und von Xanthin zu Harnsäure.¹¹⁷ Die Harnsäure wird dann vorwiegend renal ausgeschieden.¹³⁷ Die hier beschriebenen, ausgewählten metabolischen Prozesse sind in Abbildung 2.1 schematisch dargestellt.

2.1.2 Adenin-vermittelte Effekte

Adenin fand den ersten (und einzigen) klinisch-therapeutischen Einsatz bereits 1928 und in den darauffolgenden Jahren zur Behandlung der Agranulozytose, einer starken Reduktion der Granulozytenzahl, die mit Fieber und Hautnekrosen einhergeht und tödlich verlaufen kann.¹³⁸⁻¹⁴⁰ Innerhalb von 24 Stunden nach Gabe von Adenin-Sulfat (meist 0.5 g) sprachen die Patienten deutlich auf die Therapie an.^{139,140} Die Genesung trat bei vielen Patienten innerhalb von 12 Stunden bis 4 Tagen ein.^{139,140} Bei unkomplizierten Verläufen der Agranulozytose konnte durch die Behandlung mit Adenin eine Genesungsrate von 73 % erzielt werden (wobei von dem Autor der Studie selbst eine Therapie-unabhängige Spontanheilung nicht ausgeschlossen wurde).^{139,140} Der Einsatz von Adenin zur Behandlung des Menschen geht auf Beobachtungen an Kaninchen zurück, bei denen die Behandlung mit „Adenin-Nucleotiden“ zu einer Erhöhung der Leukozyten-Zahl führte.¹⁴¹ Mit dem Begriff „Adenin-Nucleotid“ war in der 1928 erschienenen Studie möglicherweise aber die Nucleobase selbst gemeint, da auch in späteren Veröffentlichungen Adenin-Nucleotid als Synonym für Adenin benutzt wurde.¹³⁹ Die Tatsache, dass „Guanin-Nucleotide“ (also möglicherweise Guanin) in Kaninchen einen ähnlichen Effekt aufwiesen, könnte bedeuten, dass ein gemeinsamer Metabolit der beiden Purine für den beobachteten Effekt verantwortlich war.¹⁴¹ 1979 wurde in einer weiteren Studie zur Rolle der Purine in der Granulozytose die Hypothese aufgestellt, dass Adenin die Aktivität des „granulocyte colony stimulating factor“ (G-CSF) erhöht.¹⁴² Dies wäre insofern naheliegend, als dass die Gabe von G-CSF ebenfalls der Agranulozytose entgegen wirkt und heute zur Behandlung dieser Erkrankung genutzt wird.¹³⁸ Im Jahr 2003 fand man heraus, dass Harnsäure ein wichtiges Gefahrensignal im Körper darstellt.¹⁴³ Darüber hinaus konnte gezeigt werden, dass Mononatriumurat-Kristalle, die auch bei Zelluntergängen freierwerden, Neutrophile zur Ausschüttung u. a. von G-CSF veranlassen.¹⁴⁴ Adenin und Guanin könnten also ihre Wirkung durch Harnsäure (also durch ein gemeinsames Abbauprodukt) entfaltet haben. Allerdings wäre es überraschend, wenn ausgerechnet den Zellen, die bei der Agranulozytose betroffen sind, eine entscheidende Effektorfunktion zukäme. In der angesprochenen Studie von 1979 wurde im Widerspruch zu der vorhergehenden Studie in Kaninchen gezeigt, dass nur Adenin, nicht aber Guanin, eine Erhöhung der Neutrophilen-Zahl auslöst.¹⁴² Später wurde gezeigt, dass AMP und besonders Adenosin die Produktion von Neutrophilen stimulieren.^{145,146} Es zeigte sich, dass dieser Effekt wohl in erster Linie über Adenosin-Rezeptoren (AR), besonders den A₃AR vermittelt wird, der seinerseits die *in vivo*-Produktion von G-CSF induziert (bestimmt in Mäusen).^{147,148} Aber auch ATP kommt eine

entscheidende Rolle bei der Regulation der Hämatopoese zu.^{144,149} Letztlich kann der Wirkmechanismus von Adenin nicht eindeutig geklärt werden, aber es wäre denkbar, dass die Adeningabe zu einem verstärkten Aufbau von Adenin-Nucleotiden führt (wie es z. B. für kultivierte Erythrozyten gezeigt wurde).¹⁵⁰ Diese, genau wie ihr Abbauprodukt Adenosin, könnten dann die beobachteten Effekte vermitteln.

Heute wird Adenin im klinischen Umfeld aufgrund seiner positiven Auswirkungen auf die Konservierung von gespendetem Blut eingesetzt.^{150,151} Dieser Effekt geht wohl darauf zurück, dass seine Zugabe zur Erhaltung hoher ATP-Konzentrationen im entnommenen Blut führt.^{150,151} Erythrozyten sind auf den „purine salvage“-Weg zur Synthese von Purinderivaten angewiesen und es wurde gezeigt, dass exogen zugeführtes Adenin für den Aufbau von AMP, ADP und ATP genutzt wird.^{103,150,151} Daher bewirkt die Zugabe von Adenin eine erhöhte Überlebensrate von gelagerten Erythrozyten.^{150,151} Adenin wird Blutprodukten zugegeben, so dass milli- bis submillimolare Adenin-Konzentrationen in den Blutkonserven vorliegen.¹⁵¹

In der Forschung wird Adenin vornehmlich zur Induktion des Nierenversagens in Nagern eingesetzt, um ein Modellsystem für die Erforschung chronischer Nierenerkrankungen im Menschen zu schaffen.^{152,153} Nach mehrtägiger Fütterung mit Adenin kommt es zu Nierenschäden.¹⁵⁴ Ein solcher Effekt kann nicht durch die Fütterung mit Adenosin, Guanin, Guanosin, Hypoxanthin oder Inosin erreicht werden.¹⁵⁴ In Ratten führt die tägliche Gabe von 40 mg Adenin pro kg zu minimalen Veränderungen. Dagegen kann man ab einer täglichen Adenin-Dosis von 100 mg/kg moderate Nierenschäden auslösen, während 200-400 mg/kg schwere Nierenschäden bewirken (oraler LD₅₀ nach 36-tägiger Behandlung: 227 mg/kg in Ratten, LD₅₀ einer Einzeldosis i. p. in Ratten: 200 mg/kg sowie in Mäusen: 310-750 mg/kg).¹⁵⁵⁻¹⁵⁸ Erste Hinweise auf den Wirkmechanismus lieferten Untersuchungen mit der bovinen Xanthinoxidase. Während Hypoxanthin und Xanthin die eigentlichen Substrate dieses Enzyms sind, ist es auch in der Lage, Adenin umzusetzen, sofern es in hohen Konzentrationen vorliegt (K_m 12.1 µM).^{159,160} Adenin wird in einem ersten Schritt in 8-Hydroxyadenin und dieses weiter in 2,8-Dihydroxyadenin umgewandelt.¹⁵⁹⁻¹⁶¹ Diese schwerlösliche Verbindung reichert sich in den Nieren an, wo sie kristallin ausfällt.¹⁶²⁻¹⁶⁴ Es bilden sich intratubuläre Kristalle und Kristalleinschlüsse im Nierengewebe und es kommt zu endzündlich-fibrotischen Veränderungen der Niere.¹⁶²⁻¹⁶⁴ Der gleiche Effekt tritt nicht nur in Nagern, sondern im Falle einer APRT-Defizienz und dem daraus resultierenden Adeninüberschuss, auch im Menschen auf.¹⁶⁵ Daraus ergibt sich, dass *in vivo*-Effekte, die durch die längerfristige Gabe höherer Adenin-Dosen ausgelöst wurden, mit Vorsicht interpretiert werden

müssen. Ähnlich wie der Inhibitor Allopurinol hemmt auch Adenin die Xanthinoxidase durch seine enzymatische Umsetzung (bovine Xanthinoxidase, IC_{50} Adenin: 10.9 μ M, IC_{50} Allopurinol: 7.82 μ M).¹⁶⁶

Neben Nierenversagen konnte gezeigt werden, dass Adenin auch Pellagra in Hunden auslösen kann (40 mg/kg täglich, oral, 1-5 Wochen).¹⁶⁷ Pellagra ist eigentlich eine Niacin- (und Tryptophan-) Mangelkrankung, die mit Dermatitis, Diarrhoe und Demenz einhergeht und ohne Behandlung tödlich verläuft.^{168,169} Pellagra tritt also unter einer Mangel- oder Fehlernährung auf und ist deshalb vor allem in Entwicklungsländern anzutreffen.^{168,169} Der Mangel an Niacin (und Tryptophan) führt zu einem Mangel an NAD und NADP, die für viele enzymatische Prozesse von entscheidender Bedeutung sind.^{168,169} Es konnte festgestellt werden, dass Adenin kompetitiv die NAD-abhängige Malatdehydrogenase der Ratte hemmt (K_i 31.7 mM).¹⁷⁰ Die Autoren schlugen ähnliche Effekte für weitere NAD-abhängige Enzyme vor, was die Adenin-induzierte Pellagra erklären könnte.¹⁷⁰ Allerdings wurden die Versuche mit Leber-Homogenaten durchgeführt.¹⁷⁰ Da Leberzellen zur effizienten Purin-Wiederverwertung befähigt sind, kann nicht ausgeschlossen werden, dass das Adenin im Versuchsansatz metabolisiert wurde und das Enzym damit nicht von Adenin selbst gehemmt wird. So zeigten auch ATP und Adenosin ähnliche inhibitorische Effekte auf das untersuchte Enzym.¹⁷⁰ Besonders in Anbetracht der extrem hohen Adeninkonzentration, die für die Hemmung des Enzyms nötig ist, erscheint ein anderer Wirkmechanismus für Adenin *in vivo* wahrscheinlicher: Adenin wird durch die APRT effizient zu AMP aufgebaut.¹⁶⁰ Dabei dient PRPP als Cosubstrat.¹⁶⁰ In Geweben mit verstärkter Adenin-Wiederverwertung kommt es zu einem starken Abfall der PRPP-Konzentration.¹⁷¹ PRPP dient aber auch bei der Biosynthese von NAD als Cosubstrat, weshalb seine Depletion durch die Adenin-Wiederverwertung möglicherweise auch zu Pellagra führen kann.¹⁷¹ Möglicherweise spielt auch die Adenin-vermittelte Nierenschädigung eine Rolle bei der Pathogenese der Pellagra. Allerdings ist die Adenin-vermittelte Nierenschädigung in Hunden nicht so intensiv untersucht wie in Nagern. Diesbezüglich gibt es einige Unterschiede zwischen den Spezies: So tolerieren z. B. Schweine deutlich höhere Adenindosen als Ratten.¹⁷²

Ein Adenin-Effekt, der höchstwahrscheinlich wie bei dem Effekt auf Blutkonserven mit der Metabolisierung des Adenins im Rahmen des „purine salvage“-Wegs zusammenhängt, ist die Verbesserung der Herzfunktion nach einem Myokardial-Infarkt in Ratten. Die Behandlung mit Adenin-Sulfat (täglich 1.5-2.5 mg/kg) verbesserte die Herzleistung, verringerte die Infarkt-Größe, erhöhte die NO-Konzentration und die NOS-Aktivität in Myokard-Zellen und erhöhte die Expression der parasymphatischen

M₂-muskarinischen-Acetylcholin-Rezeptoren.¹⁷³ Abgesehen von letzterem Fund wurden alle anderen beobachteten Effekte auch für Adenosin beschrieben.¹⁷³⁻¹⁷⁵ Daher schreiben die Autoren Adenin eine Art Prodrug-Funktion zu und gehen davon aus, dass Adenin *in vivo* zu Adenosin umgewandelt wird.¹⁷³

Weiterhin wurde beschrieben, dass Adenin viele Vergiftungserscheinungen von Ethionin in Ratten sowie von Methionin in Meerschweinchen verhindert oder aufhebt. In verschiedenen Studien wurden sowohl morphologische nucleoläre Veränderungen in Hepatozyten der Ratte und des Meerschweinchens, wie auch die Ethionin-vermittelte Inhibition der Protein-Synthese in Hepatozyten der Ratte und der RNA-Synthese der Maus untersucht.¹⁷⁶⁻¹⁷⁹ Sowohl Ethionin als auch Methionin werden in Leber-Zellen anscheinend unter Verbrauch von ATP rasch in ihre S-adenosylierten Derivate überführt.¹⁷⁶⁻¹⁷⁹ Die Produktion von S-Adenosylethionin und SAM scheint dabei bei weitem ihren Verbrauch zu übertreffen, wodurch es nicht nur zur Akkumulation dieser Metabolite kommt, sondern auch zu einer Verringerung des intrazellulären ATPs und der Adenin-Derivate, die für die Purin-Wiederverwertung nutzbar sind.¹⁷⁶⁻¹⁷⁹ Ratten scheinen SAM effizienter umsetzen zu können als Meerschweinchen, da Methionin in Ratten nicht die für Ethionin beobachteten Effekte auslösen konnte.¹⁷⁶⁻¹⁷⁹ Interessanterweise kann Adenin die Ethionin-vermittelte Hemmung der Proteinsynthese (in Ratten), aber nicht die Hemmung der RNA-Synthese (in Mäusen) aufheben.^{178,179} Es ist unklar welcher Wirkungsmechanismus zugrunde liegt und ob diese Beobachtungen Spezies-spezifisch sind.^{178,179} Allerdings konnte gezeigt werden, dass die alleinige Gabe von Adenin ebenfalls die RNA-Synthese in Maus-Hepatozyten über einen ungeklärten Mechanismus (möglicherweise aber über den Adenin-vermittelten Zellzyklus-Arrest, s. u.) hemmt.¹⁷⁸ In Hühnern fand man einen ähnlichen Effekt von Adenin auf die Ethionin-Vergiftung: Methionin verringerte die Ethionin-induzierte Wachstumsdepression und Adenin verstärkte diesen Effekt.¹⁸⁰ Adenin kann also die Ethionin- und Methionin-induzierten Effekte in Nagern aufheben, reduziert aber nicht die Konzentration ihrer akkumulierten Metabolite.^{176,181} Daher geht man davon aus, dass Adenin über seinen Aufbau zu ATP in Hepatozyten wirkt.^{176,177}

Ein weiterer Effekt von Adenin ist sein positiver Einfluss auf die Teilung und das Überleben von Purkinje-Zellen aus Ratten.^{182,183} In den entsprechenden Studien wurden embryonale Zellen (Tag 18-21) des Cerebellums in Kultur genommen und mit verschiedenen Purin- und Xanthin-Derivaten inkubiert.^{182,183} Man fand, dass Adenin (und Guanin, Guanosin und seine Phosphate sowie Uracilnucleotide, nicht aber Adenosin und Adennucleotide) die Überlebensrate von Purkinje-Zellen in Kultur vergrößerte (EC₅₀ ca.

1 mM Adenin, abgeschätzt aus einer abgebildeten Kurve).¹⁸³ Die Ursache dafür könnte eine durch Adenin (aber nicht durch Adenosin oder ATP) ausgelöste 10fache Vermehrung der Purkinje-Zellen im Vergleich zur Kontrolle sein; dieser Maximaleffekt wurde bei 1 mM Adenin beobachtet.¹⁸² Obwohl in einer der beiden Studien in Anwesenheit von Adenin die Ausbildung stark verzweigter Dendriten beobachtet wurde, fand man in der anderen Studie, dass Adenin die Ausbildung von Dendriten hemmt.^{182,183} Auf andere kokultivierte Zellen wirkte Adenin sich unterschiedlich aus. So bewirkte es bei einigen anderen Zellen (z. B. Astrozyten) die verstärkte Reduktion der Zellzahl.^{182,183} Damit wirkt Adenin allenfalls selektiv neuroprotektiv. Adenin musste anscheinend von den Zellen aufgenommen werden, um seine Wirkung zu entfalten, da die Hemmung von Transportern für Adenin eine Hemmung des Adenin-Effektes zur Folge hatte.¹⁸² Daher ist davon auszugehen das Adenin eine intrazelluläre Struktur adressiert. Die Tatsache, dass 9-Ethyladenin ähnliche Effekte wie Adenin zeigte, weist darauf hin, dass Adenin nicht zu Nucleotiden oder Nucleosiden aufgebaut wird (diese Metabolisierung ist bei 9-Ethyladenin nicht möglich).¹⁸³ Auch die Inhibition der Xanthinoxidase durch Allopurinol hat keinen Einfluss auf den Adenin-Effekt weshalb Adenin wohl auch durch dieses Enzym nicht umgesetzt wurde.¹⁸³ Eine von den Autoren einer Studie vorgeschlagene intrazelluläre Zielstruktur von Adenin ist die ubiquitär exprimierte Proteinkinase N (PKN).^{182,184,185} Diese wird durch den „nerve growth factor“ aktiviert und kann durch Adenin gehemmt werden (K_i der PKN in Ratten: 2 mM).¹⁸⁴ In Anbetracht dessen, dass der Maximaleffekt des Adenins auf die Purkinje-Zellen aber bei einer Adeninkonzentration erreicht wird, die geringer als der K_i -Wert der PKN ist, spricht gegen eine entscheidende Rolle der PKN. Außerdem wurde vorgeschlagen, dass Adenin möglicherweise gar nicht auf die Purkinje-Zellen selbst, sondern auf die kokultivierten Zellen wirkte, die zu der Ausschüttung von Wachstumsfaktoren veranlasst worden sein könnten.¹⁸³ Weitere Studien müssten zur Aufklärung des exakten Wirkmechanismus durchgeführt werden. Es wäre auch interessant, zu überprüfen, ob der Adenin-Effekt auch bei adulten und nicht nur bei embryonalen Purkinje-Zellen zu beobachten ist und ob damit die adressierte Zielstruktur möglicherweise nur bei der Entwicklung eine Rolle spielt.

Darüber hinaus wurde gezeigt, dass Adenin eine Relaxation der glatten Trachea-Muskulatur in Meerschweinchen auslöst (die Kontraktion wurde zuvor elektrisch stimuliert).¹⁸⁶ Für Adenosin wurde der gleiche Effekt beschrieben, weshalb man auch hier vermuten könnte, dass Adenin in Adenosin umgewandelt wurde. Heute weiß man, dass auch die Aktivierung des G_s -gekoppelten A_{2B} -Rezeptors einen solchen Effekt

auslösen kann (und wohl den beobachteten Adenosin-Effekt vermittelt).¹⁸⁷ Es ist denkbar, dass das von den Trachea-Zellen ausgeschüttete Adenosin den A_{2B} AR aktivierte. Da Adenin ein kompetitiver Inhibitor von ADA (bovines Enzym, K_i 0.17 mM) ist, könnte es – wie in einem anderen Fall nachgewiesen – auch hier den Adenosin-Effekt verstärkt haben.^{188,189} Die Autoren fanden, dass Koffein die Tracheamusculatur zwar partiell entspannt, aber auch den Adenosin-, jedoch nicht den Adenin-vermittelten Effekt hemmte.¹⁸⁶ Daher kann man davon ausgehen, dass die Adenin-Wirkung unabhängig von AR war.¹⁸⁶ Genau wie Koffein ist Adenin in hohen Konzentrationen (Effekte treten ca. ab 0.1-1 mM auf) in der Lage, den Abbau von cAMP und damit wahrscheinlich cAMP-abbauende Phosphodiesterasen (PDE) zu inhibieren (gezeigt in verschiedenen Spezies).¹⁹⁰⁻¹⁹³ Die Autoren der Studie schlugen vor, dass die PDE-Hemmung eine Rolle bei der Adenin-vermittelten Relaxation der Trachea-Muskulatur spielt.¹⁸⁶ Dies setzt aber einen aktivierten G_s -gekoppelten GPCR unter den entsprechenden Versuchsbedingungen voraus. Mit Dipyridamol (2 μ M) wurde ein effizienter ENT-Inhibitor eingesetzt.¹⁸⁶ Adenin müsste damit über ein anderes Transportsystem in die Muskelzellen gelangt sein. In einer späteren Studie an Schweinen wurde ein ähnlicher Effekt für Adenin gezeigt (Kontraktionen wurden durch die Behandlung mit Carbachol ausgelöst).¹⁹⁴ Es wurde gezeigt, dass der relaxierende Effekt durch Adenosin und ATP innerhalb von Sekunden, während der Adenin-Effekt erst nach über 1 min auftrat (EC_{50} für Adenin: 0.21-0.33 mM).¹⁹⁴ Durch den Einsatz von [³H]Adenin konnte gezeigt werden, dass die Zellen der Trachea Adenin zu ATP aufbauten.¹⁹⁴ Da die Aktivierung von P2Y-Rezeptoren auch zu der beobachteten Relaxation führen kann, könnte der Adenin-Effekt also über ATP vermittelt sein.^{195,196} Leider wurden keine P2Y-Rezeptor-Antagonisten in der Studie untersucht. Allerdings fand man neben Adenin selbst auch keine [³H]Adenin-Metabolite im Medium.¹⁹⁴ Die Autoren der Studie führten den Adenin-Effekt (der auch in dieser Studie nicht durch einen AR-Antagonisten, nämlich Theophyllin, aufgehoben werden konnte) auf eine erhöhte intrazelluläre ATP-Konzentration zurück.¹⁹⁴ So konnte zuvor gezeigt werden, dass eine hohe intrazelluläre ATP-Konzentration zu einer Akkumulation von Calciumionen in den Mitochondrien führte.¹⁹⁴ Da Calciumionen eine entscheidende Rolle bei der Muskelkontraktion zukommt wurde geschlussfolgert, dass ihre Depletion eine Relaxation zur Folge haben könnte.¹⁹⁴ Auch für die glatte Muskulatur der Aorta in Ratten konnte eine Adenin-vermittelte Relaxation mit ähnlichem EC_{50} -Wert gefunden werden (EC_{50} 0.40 mM, die Kontraktion wurde mit Phenylephrin ausgelöst).¹⁹⁷ Auch hier konnte der Effekt nicht durch einen AR-Antagonisten aufgehoben werden.¹⁹⁷ Während N^6 -Methyladenin (EC_{50} 0.46 mM) und Benzimidazol (EC_{50} 1.4 mM) ebenfalls einen relaxierenden Effekt aufwiesen, waren 1-Methyladenin, 3-Methyladenin und

7-Methyladenin inaktiv (Relaxation bei ca. 1.5 mM <20 %, 100 % = E_{max} von Adenin).¹⁹⁷ Es wäre interessant, näher zu erforschen, ob intrazelluläres Adenin selbst einen Effekt auf die intrazelluläre Calciumionen-Mobilisation hat.

Zumindest für Skelettmuskelzellen von Kaninchen gibt es hierzu eine interessante Beobachtung: Während ATP (5 mM) einen starken Ausstrom von Calciumionen aus isolierten Vesikeln des Sarkoplasmatischen Retikulums auslöste, bewirkte auch Adenin (10 mM) einen sehr schwachen Calciumionen-Ausstrom, hemmte jedoch stark den ATP-vermittelten Calciumionen-Ausstrom.¹⁹⁸ Da mit aufgereinigten Vesikeln gearbeitet wurde, ist es unwahrscheinlich, dass das eingesetzte Adenin im Versuchsansatz metabolisiert wurde.¹⁹⁸ Es ist jedoch unklar, ob die beobachteten Effekte auch auf verwandte Calciumspeicher in anderen Zelltypen übertragbar sind. Es ist nicht trivial, diesen Effekt mit den oben genannten Effekten in Einklang zu bringen (und da verschiedene Zelltypen untersucht wurden wäre die Konstruktion eines Zusammenhangs spekulativ). Jedoch zeigen alle gemachten Beobachtungen die Komplexität der Beziehung zwischen Adenin, seinen Derivaten und der Calciumionen-Mobilisation. Adenin hat einen weiteren Effekt auf Vesikel des Sarkoplasmatischen Retikulums von Kaninchen: Es verstärkte (genau wie ATP) den Calciumionen-gesteuerten Einstrom von Cholin in die untersuchten Vesikel (EC_{50} 0.4 mM).¹⁹⁹ Der Adenin-Effekt war aber wesentlich geringer als der von ATP.¹⁹⁹ Damit korreliert die Stärke des induzierten Calcium-Ausstroms durch beide Verbindungen mit der Stärke des Effektes auf den Cholin-Einstrom.^{198,199} In beiden Fällen verhielt sich Adenin außerdem wie ein kompetitiver Inhibitor gegenüber ATP.^{198,199}

In einer anderen Studie wurde ein weiterer Effekt von Adenin auf die Calciumionen-Mobilisation beschrieben. In Patch-Clamp-Studien fand man, dass Adenin die Frequenz der ATP-induzierten Ströme eines Calciumionen-abhängigen Kaliumkanals in Megakaryozyten von Ratten erhöhte.²⁰⁰ Adenin alleine hatte keinen Effekt und erhöhte in Anwesenheit von ATP weder die Potenz von ATP noch die Amplitude der Ströme.²⁰⁰ Der Adenin-Effekt war Konzentrations-abhängig mit einem EC_{50} -Wert von ca. 100 μ M (abgeschätzt aus einer abgebildeten Kurve).²⁰⁰ Die Rolle des Adenins ist insofern schwierig zu interpretieren, als dass dem untersuchten Kaliumkanal diverse Effektoren vorgeschaltet sind. Die Frequenz der Ströme hängt mit einer Oszillation von zytoplasmatischem Calcium zusammen.²⁰⁰ Die zytoplasmatische Calciumionen-Konzentration könnte sowohl durch ATP-abhängigen Influx (P2X-Rezeptoren) als auch durch eine ATP-abhängige Calcium-Mobilisation (P2Y-Rezeptoren) erhöht worden sein.^{201,202} Außerdem ist bekannt, dass die Oszillation dadurch zustande kommt, dass Calciumionen nach ihrer Aufnahme oder Abgabe ins Zytosol rasch wieder in

intrazelluläre Kompartimente zurücktransportiert werden.^{203,204} Dieser Rücktransport kann wahrscheinlich durch cAMP (eventuell PKA-vermittelt) und PKC-vermittelt gehemmt werden.^{203,204} Somit gibt es viele mögliche Ansatzpunkte für eine Adenin-Modulation. Die Autoren schlugen einen Adeninrezeptor vor.²⁰⁰ Geht man davon aus, dass dieser ein GPCR ist, kann er aber nicht G_q-gekoppelt sein, da Adenin allein keinen Effekt auf die Ionenströme hatte.²⁰⁰ Eine G_i-Kopplung wäre wahrscheinlicher als eine G_s-Kopplung, da gezeigt wurde, dass cAMP die Kaliumströme hemmt.²⁰³ Aus demselben Grund der gegen eine G_s-Kopplung spricht, kann man auch die Adenin-vermittelte PDE-Hemmung als Erklärung für den Effekt ausschließen. Allerdings hatte die Zugabe von Forskolin keinen Einfluss auf den Adenin-Effekt, weshalb cAMP wahrscheinlich auch keine Rolle bei diesem Effekt spielt.²⁰⁰ Da Proteinkinasen bei der Oszillation von Calciumionen eine Rolle spielen, könnte Adenin wie oben beschrieben auch durch die Hemmung der PKN wirken.^{200,205} Allerdings hemmt Adenin die PKN erst bei höheren Konzentrationen.¹⁸⁵ Schließlich ist es auch möglich, dass die ATP-verbrauchende Calciumionen-Rückaufnahme in intrazelluläre Calciumpools der Prozess ist in den Adenin eingreift.²⁰⁴ So könnte der Aufbau von Adenin zu einer erhöhten intrazellulären ATP-Konzentration führen, was möglicherweise die Rückaufnahme fördert und eine erhöhte Frequenz von Calcium-Mobilisationen erlaubt. Um genaue Aussagen über den Wirkmechanismus zuzulassen, müssten aber weitere Experimente durchgeführt werden.

Weiterhin beobachtete man, dass Adenin einen positiven Effekt auf die Glucose-Freisetzung aus der Leber in Ratten hatte.²⁰⁶ Eine mögliche Erklärung dafür ist, wie bei der Granulozytose, ebenfalls eine Wirkung über Adenosinrezeptoren. So wurde beschrieben, dass die Aktivierung des A₃AR von Ratten-Hepatozyten ihre Glucose-Freisetzung zur Folge hat.^{207,208} Die hohe Expression an Enzymen des Purin-Stoffwechsels erlaubt den Hepatozyten, ähnlich wie den Erythrozyten, einen schnellen Aufbau von Adenin-Nucleotiden und ihren Abbau zu Adenosin, das wiederum ausgeschüttet werden kann.²⁰⁹ Durch die Zugabe von Adenin könnte also die Konzentration von Adenosin und seines Metaboliten Inosin erhöht worden sein, die beide den Ratten-A₃AR aktivieren können.^{210,211} Da bei den Experimenten eine einstündige Inkubation vorgenommen wurde, wäre für die Adenin-Aufnahme und entsprechende Metabolisierung auch ausreichend Zeit gewesen.²⁰⁶ Der Einsatz von selektiven AR-Antagonisten wäre hier interessant gewesen, um diese Erklärung abzusichern (wobei der A₃AR jedoch zur Zeit der Studie noch gar nicht bekannt war).

Außerdem erhöhten sich durch die Fütterung mit Adenin (100 mg/kg, täglich, 10 Tage) in Ratten die Serumkonzentrationen von Triglyceriden, Phospholipiden und HDL-Partikeln,

sowie die Konzentrationen von Phospholipiden und Cholesterol in der Leber.²¹² Man fand, dass Adenin die Aktivität der lipogenen Leber-Enzyme erhöhte und die Aktivität lipolytischer Leber-Enzyme verringerte.²¹² Wie Adenin Einfluss auf die entsprechenden Enzyme nimmt, ist unklar.

Allerdings kommt Adenin wahrscheinlich auch in Adipozyten eine Rolle bei der Lipolyse zu: Während Adenin allein kaum einen Effekt auf die Lipolyse hat, verstärkt es die Epinephrin-induzierte Lipolyse ab einer Konzentration von ca. 2 mM.²¹³ Adenosin und AMP, sowie Hypoxanthin, Xanthin, Guanin und Purin hemmen dagegen die Epinephrin-induzierte Lipolyse.²¹³ Neben Adenin zeigten auch Koffein und Theophyllin einen stimulatorischen Effekt bezüglich der induzierten Lipolyse.²¹³ Adenin ist genau wie Koffein und Theophyllin ein Adenosin-Rezeptor-Antagonist, allerdings mit sehr geringer Potenz.²¹⁴⁻²¹⁶ Zwar könnte die hier eingesetzte hohe Konzentration für die Blockade von Adenosin-Rezeptoren ausreichen, jedoch könnte dies nur den beobachteten Effekt erklären, wenn die Adenosin-Rezeptoren eine Basalaktivität aufgewiesen hätten. Es wäre interessant gewesen, welche Beobachtungen man nach der Zugabe von ADA gemacht hätte. Jahrzehnte nach dieser Studie ist heute klar, dass A₁-Adenosin-Rezeptoren eine entscheidende Rolle bei der Modulation der Lipolyse spielen.^{217,218} Adipozyten produzieren und schütten selbst Adenosin aus und es konnte gezeigt werden, dass die Blockade der A₁AR (z. B. durch 8-Cyclopentyl-1,3-dipropylxanthin) zu einer gesteigerten Epinephrin-induzierten Lipolyse führt.²¹⁸ Der K_B-Wert von Adenin an A₁-Rezeptoren (getestet gegen *R*-N⁶-(1-Methyl-2-phenylethyl)adenosin) von Adipozyten der Ratte liegt bei über 1 mM.²¹⁶ Damit ist die antagonistische Wirkung von Adenin am A₁AR die wahrscheinlichste Erklärung für den Adenin-Effekt, der ab einer Konzentration von 2 mM Adenin beobachtet wurde. Man kann sich die Frage stellen, wie es sein kann, dass Adenin im Falle der hepatischen Glucose-Freisetzung zur Produktion von Adenosin und damit zur Aktivierung (und nicht zur Inhibition) von A₃AR und in diesem Fall zur direkten Inhibition von A₁AR führen könnte. Einerseits sind strukturell eng verwandte Derivate des Adenins wie 9-Methyladenin (wahrscheinlich gilt das auch für Adenin selbst) deutlich affiner an A₁AR als an A₃AR (man muss einschränkend dazu sagen, dass menschliche und nicht Rattenrezeptoren untersucht wurden).²¹⁹ Möglicherweise wirkt Adenin also als ein A₁AR-Antagonist, hat aber kaum einen Effekt auf A₃AR, weil es nicht daran bindet. Andererseits nimmt die Leber im Gegensatz zum Fettgewebe eine zentrale Rolle bei der Purin-Produktion ein, weshalb die Expression der „purine salvage“-Enzyme dort wahrscheinlich deutlich höher ist.²⁰⁹

Ein interessanter Effekt des Adenins ist der auf den Zellzyklus. Setzt man Zellen *in vitro* ionisierender Strahlung aus, hat dies eine Inhibition der DNA-Synthese zur Folge.²²⁰⁻²²² Dies kommt wahrscheinlich durch eine Inhibition der DNA-Synthese-Initiation zustande.²²¹ Die Behandlung der Zellen verschiedener Spezies mit Adenin verringerte diesen Strahlungs-induzierten Effekt: In einer humanen Promyeloblast-Zelllinie wurde der Maximaleffekt von Adenin bei etwa 0.1 mM, in einer Epithelkarzinom-Zelllinie der Maus bei 0.1 mM, in einer Ovarialzelllinie des Chinesischen Streifenhamsters (CHO-Zellen) bei 1.0 mM und in einer Adenokarzinom-Zelllinie der Maus bei etwa 1.5 mM erreicht.²²⁰⁻²²² Die Induktion der DNA-Synthese und die gleichzeitige Verminderung des Zellwachstums zeigen, dass durch Adenin ein Zellzyklus-Arrest in der frühen S-Phase der Zellteilung stattfand.²²¹ In dieser Phase können DNA-Schäden erkannt und durch einen komplexen Apparat von Reparaturmechanismen behoben werden.^{223,224} Adenin könnte möglicherweise die DNA-Reparatur fördern, so dass die Initiation der DNA-Synthese induziert werden kann.²²¹ Interessanterweise haben Koffein und Guanin eine ähnliche Wirkung.^{221,222} Adenin wirkt wahrscheinlich weder über einen Agonismus an AR (da Koffein die gleiche Wirkung wie Adenin hat), noch über einen Antagonismus an AR oder eine PDE-Hemmung (da es dafür in zu geringen Konzentration eingesetzt wird). In *E. coli* Bakterien wurde gezeigt, dass RecA, eine Rekombinase der eine entscheidende Bedeutung bei der DNA-Reparatur zukommt, auch in Abwesenheit von Strahlungsschäden durch Adenin aktiviert wird.²²⁵ Das Säuger-Homolog des RecA ist Rad51, das eine ähnlich wichtige Aufgabe bei der DNA-Reparatur übernimmt und vor Strahlungsschäden schützt.^{226,227} Möglicherweise ist dieses Protein die Zielstruktur von Adenin. Es wäre interessant zu erforschen ob Adenin auch Rad51 aktiviert und ob die mögliche Aktivierung direkt oder indirekt erfolgt. Da Rad51 eine ATPase-Aktivität aufweist, bindet es ATP (K_D -Wert: 5 μ M).²²⁷ Eine alleinige Förderung der Rad51-Aktivität durch eine Erhöhung der intrazellulären ATP-Konzentration (mit Adenin als Edukt) wäre möglich. Adenin selbst erscheint aber insofern als geeigneterer Kandidat zur Aktivierung von Rad51, als dass es auch unter physiologischen Bedingungen bei der Zellteilung durch die synchron stattfindende Polyamin-Synthese wahrscheinlich in höheren Konzentrationen vorliegt. Zusätzlich wurde gefunden, dass Adenin schon in geringen Konzentrationen von 2 μ M zur Radioprotektion einer bestrahlten humanen Brustkrebs-Zelllinie führt.²²⁸ Während die Autoren dieser Arbeit den Adenin-Effekt auf seine mögliche Wirkung als Antioxidans zurückführten, könnte Adenin aber auch eine antiapoptotische Wirkung vermitteln.²²⁸ So wurde gezeigt, dass die Behandlung einer γ -bestrahlten B-Lymphozyten-Zelllinie mit Adenin zur Hochregulierung anti- und zur Herunterregulierung proapoptotischer Proteine führt (maximale Effekte bei 0.1 μ M).²²⁹

Zusammenfassend kann man sagen, dass Adenin einen radioprotektiven Effekt hat, der wahrscheinlich mit der Induktion der DNA-Reparatur und der Hemmung der Apoptose einhergeht.

Für Adenin wurde außerdem ein Einfluss auf die Fruchtbarkeit in Ratten gefunden. So wurden Ratten ab dem zweiten Tag nach ihrer Geburt über 16 Tage verschiedene Konzentrationen von Adenin gespritzt (50, 100 oder 200 mg).²³⁰ In allen Gruppen konnte man (anscheinend Dosis-unabhängig) häufig schon am 30., aber immer am 70. Tag nach der Geburt signifikante Konzentrations-Veränderungen der Hormone beobachten, die entscheidenden Einfluss auf die Reifung von Ei- und Samenzellen hatten: Konzentrationsreduktion des Follikelstimulierenden Hormons und des Progesterons sowie eine erhöhte Konzentration des luteinisierenden Hormons im Serum.²³⁰ Weiterhin konnte man auch eine Adenin-vermittelte Reduktion des Gewichtes der Ovarien und des ganzen Körpers beobachten.²³⁰ Die Autoren schlugen als Ursache für den Gewichtsverlust die Inhibition der Ornithin-Decarboxylase vor.²³⁰ Dieses Enzym ist entscheidend für die Polyamin-Synthese (Produktion von Putrescin).^{114,230} Es konnte gezeigt werden, dass die Ornithin-Decarboxylase-Aktivität in einer Nierenzelllinie der Ratte durch den „nerve growth factor“ aktiviert wird.²³¹ Diese Aktivierung kann durch 10 mM Adenin (und weitere Purin-Derivate, nicht aber Adenosin) gehemmt werden.²³¹ Da Adenin auf die Polyamin-Synthese folgend gebildet wird, könnte es sein, dass Adenin selbst die Ornithin-Decarboxylase inhibiert (negativer Feedback). Zumindest wurde gezeigt, dass Adenin die MTAP der Ratte inhibiert (bei 6 μ M 43 %, bei 30 μ M 74 % Inhibition) und es wäre möglich, dass die akkumulierenden Produkte vorgeschalteter Enzymreaktionen auch die jeweiligen verantwortlichen Enzyme hemmen.²³² In adulten männlichen Ratten konnte darüber hinaus gezeigt werden, dass Adenin (200 mg/kg pro Tag, 30 Tage) die Anzahl an Sexualkontakten drastisch und signifikant senkt.²³³ Auch das Gewicht der Hoden und des gesamten Körpers sowie die Spermiendichte und die Spermienbeweglichkeit wurden durch die Behandlung mit Adenin stark herabgesetzt.²³³ Darüber hinaus wurde auch eine verminderte mRNA-Expression von für die Testosteron-Produktion wichtigen Enzymen beobachtet.²³³ Als wichtigste Ursache für den Hypogonadismus wurde von den Autoren daher die verringerte Testosteronproduktion angesehen.²³³ Diese könnte zumindest in Teilen auf die Adenin-vermittelte Expressionsreduktion von Endothelin und Endothelin-Rezeptoren in den Hoden zurückgehen, weil Endothelin-Signale auch die Steroidogenese stimulieren.²³³ Man kann also zusammenfassen, dass Adenin die Fruchtbarkeit von Ratten verringert. Interessanterweise konnten alle beobachteten Adenin-Effekte durch Strontium-Fructose-

1,6-bisphosphat aufgehoben werden.²³³ Es ist nicht trivial, einen klaren Zusammenhang zwischen all diesen Effekten und der Adenin-Gabe herzustellen, da bei den hohen Adenin-Mengen, die jeweils eingesetzt wurden, davon auszugehen ist, dass die Nieren der Ratten stark geschädigt wurden (s. o.). Damit könnten die beobachteten Effekte eventuell nicht durch Adenin, sondern durch akkumulierte toxische Metabolite verursacht worden sein. In diesem Zusammenhang ist es interessant, dass Fructose-1,6-bisphosphat die Akkumulation von „advanced oxidation protein products“ (AOPP, wichtigen Entzündungsmediatoren), die auch bei Nierenversagen auftritt, verringern kann.^{234,235}

Im Gegensatz zur Spermatogenese scheint Adenin auf Spermien selbst einen positiven Effekt zu haben: Nach der Inkubation menschlicher Spermien mit 2 mM Adenin erhöhte sich ihre Motilität.²³⁶ Ein solcher Effekt ließ sich weder nach der Zugabe von Adenosin noch ATP oder anderer Nucleobasen nachweisen (je bei 1 mM).²³⁶ Obwohl man nicht ausschließen kann, dass der vermehrte Aufbau von intrazellulärem ATP (extrazellulär zugegebenes ATP wird wahrscheinlich abgebaut und nicht aufgenommen) für diesen Effekt verantwortlich war, spricht der sofortige Wirkungseintritt gegen diese Möglichkeit.²³⁶ Die Autoren schlugen daher die Wirkung über einen noch nicht identifizierten Adeninrezeptor in der Spermienmembran vor.²³⁶

Weiterhin hat Adenin embryotoxische und teratogene Effekte in Mäusen und Ratten (nach einer einmaligen Adenin-Gabe von 200-400 mg/kg Gewicht des Muttertiers in den ersten Tagen der Schwangerschaft).²³⁷⁻²⁴⁰ Die überlebenden Embryonen wiesen neben diversen Fehlbildungen auch vermindertes Wachstum auf.²³⁷⁻²⁴⁰ Die Embryotoxizität könnte möglicherweise auch mit dem (oben beschriebenen) Adenin-vermittelten Zelluntergang von Astrozyten und der gehemmten Ausbildung von Dendriten in Purkinje-Zellen zu tun haben (für diese Experimente wurden nämlich Zellen des embryonalen Cerebellums untersucht).¹⁸² Da die embryonale Entwicklung ein komplexer, multifaktorieller und unvollständig verstandener Prozess ist, bedarf es weiterer Studien, um Hypothesen über den wahrscheinlichen Wirkmechanismus von Adenin bei der Embryogenese ableiten zu können.

Darüber hinaus konnte gezeigt werden, dass Adenin in Mäusen lokomotorisch inhibierend wirkte (bei 200 mg/kg).²⁴¹ Anscheinend bewirkte die Behandlung mit Adenin eine Verringerung der Konzentration von Norepinephrin, Dopamin und Serotonin im Gehirn.²⁴¹ Der Adenin-Effekt auf die Bewegung der Mäuse konnte durch D-Amphetamin aufgehoben werden, während die eingesetzten Amphetamine keinen Einfluss auf die

verringerte Neurotransmitter-Konzentration hatten.²⁴¹ Durch den „purine salvage“-Weg könnte Adenin in Adenosin überführt worden sein, das wiederum A_{2A} -Rezeptoren aktiviert (was durch die Adenin-vermittelte ADA-Hemmung zusätzlich verstärkt werden könnte) und damit den beobachteten Effekt auf die lokomotorische Aktivität zumindest teilweise ausgeübt haben könnte.²⁴² Ein weit größerer Anteil könnte aber dem Dopamin-Mangel zukommen. Um den Adenin-Effekt auf die Neurotransmitter-Konzentrationen näher zu erforschen, wäre es interessant herauszufinden, ob sie aufgrund von mangelnder Synthese oder verstärktem Abbau verringert waren.

Es wurden einzelne Beobachtungen gemacht, die auf eine mögliche immunologische Rolle von Adenin hinweisen könnten. Beispielsweise fand man, dass die Gabe von Adenin die Reproduktionsrate von Parasiten (Trypanosomen) in Ratten erhöhen konnte.²⁴³ Dabei schien Adenin besonders einen Effekt auf das angeborene, nicht aber auf das adaptive Immunsystem zu haben.²⁴³ Für die Pellagra (die auch durch Adenin ausgelöst werden kann) konnte ebenfalls eine verringerte Immunreaktion gegen Pathogene beobachtet werden.¹⁶⁹ Es wurde spekuliert, dass es zu einer kurzzeitigen Symbiose zwischen Wirt und Pathogen kommen könnte, in dem der pathogene Organismus dem Wirt als Quelle für NAD dient.¹⁶⁹ Allerdings wurden den Ratten tagelang sehr hohe (subletale) Adeninmengen verabreicht (18 mg Adenin pro 100 g Körpergewicht).²⁴³ Daher könnte der immunsuppressive Effekt dieser hohen Adeninmengen auch auf dadurch induziertes Nierenversagen und die Akkumulation toxischer Metabolite zurückgehen.²⁴³ In einer anderen Studie konnte man nachweisen, dass die Adenin-Exkretion im Urin von Mäusen signifikant erhöht war, wenn diese 24 Stunden zuvor mit Lipopolysaccharid behandelt wurden.²⁴⁴ Ob Adenin selbst eine Rolle in inflammatorischen Prozessen zukommt oder schlicht ein Abbau- und Ausscheidungsprodukt anderer bekanntermaßen immunmodulierender Purin-Derivate ist, deren extrazelluläre Konzentrationen bei Entzündungen erhöht sind, bleibt unklar.^{244,245} Außerdem fand man, dass Adenin (im Gegensatz zu Adenosin, Adenin-Nucleotiden und anderen Nucleobasen) relativ selektiv die Apoptose in HIV-infizierten menschlichen T-Zellen bewirkt (MOLT4-Zelllinie, bei der höchsten eingesetzten Adeninkonzentration von 1 mM starben 50% der infizierten Zellen).²⁴⁶ Auf nicht-infizierte Zellen hatte Adenin keinen Effekt.²⁴⁶ Bei den infizierten Zellen konnte nach einem Tag beobachtet werden, dass sich die Virus-Produktion der Zellen verringerte und es mehrere Tage bis zum Zelltod dauerte.²⁴⁶ Es wäre von Interesse zu überprüfen, ob dieser Effekt spezifisch bei HIV-Infektionen auftritt oder auch bei Infektionen mit anderen Viren in anderen Zellen beobachtet werden kann. Die Virus-Produktion von Zellen hängt mit der durch HIV

angeregten Autophagie (dem lysosomalen Abbau von Plasmabestandteilen) zusammen.²⁴⁷ 3-Methyladenin ist ein bekannter und potenter Autophagie-Inhibitor (und wirkt über Hemmung von Phosphoinositid-3-Kinasen) und es gibt Hinweise darauf, dass auch Adenin als Autophagie-Inhibitor wirkt, wodurch es eine verringerte Virusproduktion bewirken könnte.²⁴⁸⁻²⁵⁰ Es kann allerdings auch nicht ausgeschlossen werden, dass Adenin zur Autophagie-Hemmung in 3-Methyladenin umgewandelt werden muss (eine Reaktion, deren Katalyse durch ein noch unbekanntes SAM-abhängiges Enzym aus Lungen von Kaninchen nachgewiesen wurde).²⁵¹ Die Autoren selbst schlagen die verstärkte Expression proapoptotischer Proteine vor, um den selektiv zytotoxischen Effekt von Adenin zu erklären.²⁴⁶ Interessanterweise wurde bei der Gabe geringer Konzentrationen von Adenin genau das Gegenteil gefunden (s. o.). Ob dieser Adenin-Effekt auch physiologisch, d. h. bei der durch das Immunsystem vermittelten Elimination Virus-befallener Zellen, von Bedeutung ist bleibt unklar.

Auch exogen in den Körper eingebrachte Proteine weisen Adenin-Bindung auf: Adenin ist ein Inhibitor des Toxins aus Diphtherie-Erregern.²⁵² Das Toxin wird nach seiner Aufnahme durch die Zielzelle intrazellulär gespalten.^{253,254} Das dabei entstandene Fragment A (die katalytische Domäne des Toxins) vermittelt die ADP-Ribosylierung des Elongationsfaktors EF2.^{253,254} Dadurch wird die Proteinsynthese der Zielzelle gehemmt, wodurch letztlich die Toxizität des Diphtherie-Toxins zustande kommt.^{253,254} Es wurde gezeigt, dass Adenin die ADP-Ribosylierung von EF2 durch das Fragment A hemmt (IC₅₀: 38 µM).²⁵² Auch wenn denkbar wäre, dass stark proliferierende Immunzellen eine verstärkte Adeninproduktion verursachen und es durch umliegende untergehende Zellen in entzündeten Geweben zu einer verstärkten Freisetzung von Adenin kommen könnte, ist unklar, ob dieser Effekt bedeutende protektive Auswirkungen hat. Außerdem kann Adenin an das Trichosanthin binden.²⁵⁵ Es wird in der traditionellen Chinesischen Medizin zum Schwangerschaftsabbruch eingesetzt und stammt aus der Wurzelknolle von *Trichosanthes kirilowii* Maxim.^{256,257} Nach seiner zellulären Aufnahme über den LDL-Rezeptor vermittelt das Trichosanthin zahlreiche Effekte, u. a. die Hemmung der Translation, wodurch seine zytotoxische Wirkung erklärt werden kann.^{256,257} Die Entdeckung, dass Adenin an dieses Protein bindet (K_D 210 µM), diente vornehmlich der Erforschung eines der Wirkmechanismen des Trichosanthins: Es bewirkt u. a. die Abspaltung eines Adenin-Restes der 28S rRNA, wodurch die Ribosomen und damit die Translation der Zielzelle gehemmt wird.²⁵⁵⁻²⁵⁷

In Einzelbeobachtungen konnten weitere Adenin-Effekte gezeigt werden: Adenin inhibiert über einen unbekanntes Mechanismus die Expression von Enzymen der *de novo*-

Pyrimidin-Synthese in menschlichen Lymphozyten (bei 1 mM).²⁵⁸ Diesem Effekt könnte man aber nur dann Bedeutung beimessen, wenn gleichzeitig eine Inhibition des „pyrimidine salvage“-Wegs aufträte. Adenin stimuliert außerdem den Natriumionen-Strom und erhöht die Wasserdurchlässigkeit der isolierten Blase in Kröten.²⁵⁹ Auch wenn andere Wirkmechanismen nicht ausgeschlossen werden können, gibt es überzeugende Hinweise darauf, dass dafür die Adenin-vermittelte PDE-Inhibition verantwortlich ist (es wurden 1-2 mM Adenin eingesetzt).²⁵⁹

Weiterhin moduliert Adenin auch die menschliche, zytosolische „low-molecular-weight acid phosphatase“ ACP1.²⁶⁰ Diese Phosphatase ist hochpolymorph und es existieren drei verschiedene Hauptvarianten des für das Enzym kodierenden Gens.²⁶⁰ Vermutlich aufgrund alternativer Spleißprozesse werden pro Gen zwei verschiedene Genprodukte exprimiert: ein schnelles und ein langsames Isoenzym.²⁶⁰ Es konnte gezeigt werden, dass die schnellen Isoenzyme durch Adenin gehemmt werden ($IC_{50} \sim 1.5$ mM), während die langsamen Isoenzyme durch Adenin stimuliert werden ($EC_{50} \sim 1.4$ mM).²⁶⁰ Auch diese Phosphatasen könnten eine Rolle bei den besprochenen Adenin-Effekten spielen.

Der hier gegebene Überblick über die durch Adenin vermittelten Effekte (siehe auch Tabelle 2.1 und Tabelle 2.2) zeigt nicht nur, dass Adenin ein großes Spektrum an (möglichen) Zielstrukturen hat, sondern auch, dass viele Effekte mit Vorsicht zu interpretieren sind, da sie möglicherweise nicht durch Adenin selbst, sondern durch seine Metabolite verursacht wurden. In vielen Fällen muss darüber hinaus die physiologische Relevanz der Beobachtungen hinterfragt werden, weil unphysiologisch hohe Adenin-Konzentrationen eingesetzt wurden. Die Spanne der durchschnittlichen Plasma-Konzentration von Adenin, die man in der Literatur findet, ist zwar groß (10-2000 nM in Mensch, Maus und Ratte; durchschnittlich 4400 nM im Extrazellularraum und 1500 nM in verschiedenen untersuchten Zellen und Spezies), aber es ist unwahrscheinlich, dass unter physiologischen Bedingungen millimolare Konzentrationen erreicht werden, nicht zuletzt weil dies zu starken Nierenschäden führen würde.²⁶¹⁻²⁶³

Tabelle 2.1: Adenin-vermittelte Effekte

Effekt	Spezies	Dosis / Konzentration
Erhöhung der Leukozytenzahl ^{139,140}	Mensch	bei 0.5 g (Adenin-Sulfat, i. v.) einmalig
Erhöhung der Überlebensrate gelagerter Erythrozyten ^{150,151}	Mensch	bei milli-/submillimolare Konzentrationen
Nierenschäden ¹⁵⁵⁻¹⁵⁸	Ratte	40 mg/kg/d (leicht) 100 mg/kg/d (moderat) 200-400 mg/kg/d (schwer) oraler LD ₅₀ (36d): 27 mg/kg LD ₅₀ (i. p.): 200 mg/kg, einmalig
	Maus	LD ₅₀ (i. p.): 310-750 mg/kg, einmalig
Auslösung von Niacin-Mangel (Pellagra) ¹⁶⁷	Hund	bei 40 mg/kg/d
Verbesserung der Herzfunktion nach Myokardialinfarkt ¹⁷³	Ratte	1.5-2.5 mg/kg/d
Antidot bei Methioninvergiftung ¹⁷⁶	Meerschweinchen	32 mg (Adenin-Sulfat, i. p.) einmalig
Antidot bei Ethioninvergiftung ¹⁷⁷	Ratte	32 mg (Adenin-Sulfat, i. p.) einmalig
Steigerung der Überlebensrate von Purkinje-Zellen ^{182,183}	Ratte	EC ₅₀ ca. 1 mM
Relaxation glatter Trachea-Muskulatur ^{186,194}	Meerschweinchen	bei Konzentrationen bis 30 µg/ml
	Schwein	EC ₅₀ 210-330 µM
Relaxation glatter Muskeln der Aorta ¹⁹⁷	Ratte	EC ₅₀ 400 µM
Induktion des Calciumionen-Ausstroms aus dem Sarkoplasmatischen Retikulum (SR) ¹⁹⁸	Kaninchen	bei 10 mM
Verstärkung des Calciumionen-gesteuerten Cholineinstroms in Vesikel des SRs ¹⁹⁹	Kaninchen	EC ₅₀ 0.4 mM
Erhöhung der Frequenz ATP-induzierter Ströme eines Calciumionen-abhängigen Kaliumkanals in Megakaryozyten ²⁰⁰	Ratte	EC ₅₀ ca. 100 µM
Erhöhung der Lipid-Serumkonzentration erhöhte Aktivität lipogener, verringerte Aktivität lipolytischer Leberenzyme ²¹²	Ratte	bei 100 mg/kg/d
Verstärkung der Epinephrin-induzierten Lipolyse ²¹³	Ratte	ab 2 mM
Radioprotektion (Zelllinien) ²²⁰⁻²²²	Mensch	Maximaleffekt bei 0.1 mM
	Maus	Maximaleffekt bei 0.1-1.5 mM (zelllinienabh.)
	Chin. Streifenhamster	Maximaleffekt bei 1 mM

Tabelle 2.1 (Fortsetzung)

Antiapoptotische Effekte (durch Expressionsmodulierung) ²²⁹	Mensch	Maximaleffekt bei 0.1 μ M
Reduktion der Fruchtbarkeit ²³⁰	Ratte	bei 50-200 mg/d (i. v.)
Verringerung der Sexualkontakte und Testosteron-Produktion, Inhibition der Spermatogenese ²³³	Ratte	bei 200 mg/kg/d
Erhöhung der Spermienmotilität ²³⁶	Mensch	bei 2 mM
Embryotoxizität & teratogene Effekte ²³⁷⁻²⁴⁰	Maus/Ratte	bei 200-400 mg/kg, einmalig
Inhibition der Lokomotorik ²⁴¹	Maus	200 mg/kg
Erhöhte Reproduktionsrate von Parasiten ²⁴³	Ratte	180 mg/kg/d
Förderung der Apoptose HIV-infizierter T-Zellen ²⁴⁶	Mensch	bei 1 mM
Stimulierung des Natriumionenstroms und Erhöhung der Wasserdurchlässigkeit der Blase ²⁵⁹	Kröte	bei 1-2 mM

Tabelle 2.2: Wirkung von Adenin an ausgewählten Zielstrukturen

Zielstruktur	Spezies	Wirkung	pharmakologische Parameter (μ M)
Xanthinoxidase	Rind	Substrat	K_m 12.1 ¹⁵⁹
		Inhibition	IC_{50} 10.9 ¹⁶⁶
NAD-abhängige Malatdehydrogenase	Ratte	Inhibition	IC_{50} 31700 ¹⁷⁰
Proteinkinase N	Ratte	Inhibition	K_i 2000 ¹⁸⁴
Adenosindesaminase	Rind	Inhibition	K_i 170 ¹⁸⁸
Phosphodiesterase	Hund	Inhibition	IC_{50} 600 ¹⁹³
	Kröte	Inhibition	Effekte bei 2500 ¹⁹¹
	Ratte	Inhibition	Effekte ab 1000 ¹⁹²
	Rind	Inhibition	Effekte ab 1000 ¹⁹⁰
A_1 -Adenosin-Rezeptor	Ratte	Bindung	K_i >100 (28 %) ²¹⁶
		Antagonismus	K_B >1000 ²¹⁶
A_2 -Adenosin-Rezeptor	Mensch	Antagonismus	K_B 760 ²¹⁶
	Ratte	Antagonismus	K_B 570 ²¹⁶
5'-Methylthioadenosin-Phosphorylase	Ratte	Inhibition	IC_{50} etwa 10 ²³²
Fragment A des Diphtherie-Toxins		Inhibition	IC_{50} 38 ²⁵²
schnelle ACP1-Isoenzyme	Mensch	Inhibition	IC_{50} ~ 1.5 mM ²⁶⁰
langsame ACP1-Isoenzyme	Mensch	Stimulation	EC_{50} ~ 1.4 mM ²⁶⁰

2.1.3 Adenin-Rezeptoren

2.1.3.1 Entdeckung

Schon in den 1970er Jahren gab es Hinweise auf einen 1-Methyladenin-Rezeptor in Seesternen.^{264,265} 1-Methyladenin (nicht aber Adenin) vermittelt über diesen Rezeptor die Reifung der Seestern-Oozyten (K_D -Wert: $0.3 \mu\text{M}$).²⁶⁴⁻²⁶⁶ Obwohl seine Sequenz unbekannt ist, wurde seine Pharmakologie schon umfassend untersucht und man weiß, dass es sich bei diesem Rezeptor um einen G_i -Protein-gekoppelten Rezeptor handelt.²⁶⁴ In einzelnen Studien zu Adenin-vermittelten Effekten wurde zwar ebenfalls ein Adenin-Rezeptor in Säugetieren vorgeschlagen, aber es war dennoch überraschend als 2001 tatsächlich der erste G-Protein-gekoppelte Adenin-Rezeptor (in Ratten) identifiziert wurde.^{78,267}

In einem revers-pharmakologischen Ansatz hat man zuerst die cDNA des neuen Rezeptors identifiziert und kloniert (rMrgA-Rezeptor).⁷⁸ Der Rezeptor wurde danach (zusammen mit chimären G-Proteinen) in HEK293-Zellen zur Expression gebracht.⁷⁸ Anhand eines Calcium-Mobilisations-Assays wurden fraktionierte Gehirn-Extrakte von Schweinen auf ihre Fähigkeit untersucht, den Rezeptor zu aktivieren, wodurch schließlich Adenin als hochpotenter endogener Agonist dieses Rezeptors identifiziert wurde (EC_{50} -Werte siehe Tabelle 2.3).⁷⁸ Für den Ratten-Adenin-Rezeptor konnte eine G_i -Kopplung (in transfizierten CHO-Zellen mit Forskolin-stimulierter cAMP-Produktion, EC_{50} 2.88 nM) gezeigt werden, während anscheinend keine G_q -Kopplung (in transfizierten HEK293-Zellen) gefunden werden konnte, da von den Autoren der Studie angegeben wurde, dass Calcium-Signale abhängig von der Koexpression chimärer G-Proteine waren.⁷⁸ Adenin konnte neben cAMP-Experimenten und Calcium-Mobilisations-Experimenten auch in GTP γ S-Bindungsexperimenten als Agonist des Rezeptors bestätigt werden (Membranen von transfizierten CHO-Zellen, EC_{50} 61.7 nM). Anhand von Radioligand-Bindungsstudien konnte zudem eine hohe Affinität von Adenin an den Ratten-Adenin-Rezeptor gezeigt werden (Membranen transfizierter CHO-Zellen, K_D von Adenin 24 nM, siehe auch Tabelle 2.3).⁷⁸

Tabelle 2.3: Wirksamkeit und Affinität von Adenin an Adenin-Rezeptoren

Rezeptor	EC ₅₀ / K _D / K _i / IC ₅₀ , nM	Assay	Expressionssystem	
rAdeR	EC ₅₀	2.88 ⁷⁸	cAMP (G _i , Forskolin, intakte Zellen)	transf. CHO-Zellen
		8.29 ⁸⁸	cAMP (G _i , Isoprenalin, intakte Zellen)	transf. Astrozytomzellen
		13.3 ²⁶⁸	cAMP (G _i , Isoprenalin, intakte Zellen)	transf. Astrozytomzellen
		61.7 ⁷⁸	GTPγS	transf. CHO-Zellen
	K _D	605 ²⁶⁸	GTPγS	infizierte Sf9-Insektenzellen
		24 ^{78,267}	RL-Bindung (B _{max} 18.9 pmol/mg)	transf. CHO-Zellen
		152 ²⁶⁸	RL-Bindung (B _{max} 7.85 pmol/mg)	infizierte Sf9-Insektenzellen
		100 ²⁶⁸	RL-Bindung (B _{max} 1.41 pmol/mg)	infizierte Sf9-Insektenzellen (G-Protein-Koexpression)
		27.2 ²⁶⁹	RL-Bindung (B _{max} 2.28 pmol/mg)	Hirncortex (endogen)
		72.4 ²⁶⁹	RL-Bindung (B _{max} 8.23 pmol/mg)	Striatum (endogen)
		157 ²⁷⁰	RL-Bindung (B _{max} 16.3 pmol/mg) ^a	Hirn (endogen)
		207 ²⁷⁰	RL-Bindung (B _{max} 83.2 pmol/mg) ^a	Hirn, Synaptosomen-reiche Membranfraktion (endogen)
		181 ²⁷⁰	RL-Bindung (B _{max} 19.9 pmol/mg) ^a	Kleinhirn (endogen)
		142 ²⁷⁰	RL-Bindung (B _{max} 6.8 pmol/mg) ^a	Cerebrum (endogen)
		212 ²⁷⁰	RL-Bindung (B _{max} 14.8 pmol/mg) ^a	Hirnstamm (endogen)
		211 ²⁷⁰	RL-Bindung (B _{max} 23.6 pmol/mg) ^a	Rückenmark (endogen)
		142 ²⁷⁰	RL-Bindung (B _{max} 1.7 pmol/mg) ^a	Herz (endogen)
		192 ²⁷⁰	RL-Bindung (B _{max} 3.5 pmol/mg) ^a	Niere (endogen)
		164 ²⁷⁰	RL-Bindung (B _{max} 2.3 pmol/mg) ^a	Hoden (endogen)
		K _i	18 ⁷⁸	RL-Bindung (15 nM [³ H]Adenin)
29.9 ²⁶⁹	RL-Bindung (10 nM [³ H]Adenin)		Hirncortex (endogen)	
120 ²⁷⁰	RL-Bindung (100 nM [³ H]Adenin) ^a		Hirn (endogen)	
29.2 ⁸⁸	RL-Bindung (10 nM [³ H]Adenin)		Hirncortex (endogen)	
IC ₅₀	236 ²⁶⁸	RL-Bindung (10 nM [³ H]Adenin)	infizierte Sf9-Insektenzellen	
mAde1R	EC ₅₀	9.77 ²⁷¹	cAMP (G _i , Isoprenalin, intakte Zellen)	transf. Astrozytomzellen
	K _D	286 ²⁷¹	RL-Bindung (B _{max} 1.18 pmol/mg)	infizierte Sf9-Insektenzellen
	K _i	189 ²⁷¹	RL-Bindung (10 nM [³ H]Adenin)	infizierte Sf9-Insektenzellen
mAde2R	EC ₅₀	8 ⁸⁴	cAMP (G _i , Isoprenalin, intakte Zellen)	transf. Astrozytomzellen
	K _D	113 ⁸⁴	RL-Bindung (B _{max} 1.98 pmol/mg)	infizierte Sf21-Insektenzellen
	IC ₅₀	68.5 ⁸⁴	RL-Bindung (10 nM [³ H]Adenin)	infizierte Sf21-Insektenzellen

Tabelle 2.3 (Fortsetzung)

rAdeR/ mAdeR	EC ₅₀	21 ²⁶⁹	cAMP (G _i , Forskolin, Membranen)	NG108-15-Zellen (endogen)
		2540 ²⁶⁹	cAMP (G _i , Forskolin, intakte Zellen)	NG108-15-Zellen (endogen)
	IC ₅₀	154 ²⁶⁹	RL-Bindung (10 nM [³ H]Adenin)	NG108-15-Zellen (endogen)
		54.9 ⁸⁴	RL-Bindung (10 nM [³ H]Adenin)	NG108-15-Zellen (endogen)
(pAdeR) ^b	K _D	242.6 ²⁷²	RL-Bindung (Bmax 2.75 pmol/mg)	Nierencortex (endogen)
(hAdeR) ^b	K _i	47.1 ⁸⁸	RL-Bindung (10 nM [³ H]Adenin)	HEK293-Zellen (endogen)

^aReaktionsansätze der Radioligandbindungsstudien wurden bei 37 °C inkubiert.

^bwurde noch nicht kloniert

Ergebnisse an endogen exprimierten Rezeptoren/Bindungsstellen sind in grau dargestellt

Später wurde auch der endogen exprimierte Rezeptor (in Membranpräparationen des Ratten-Hirncortex) in Bindungsstudien nachgewiesen und untersucht.²⁶⁹ Die zuvor gemachten Beobachtungen an heterolog exprimierten Rezeptoren konnten größtenteils bestätigt werden: Adenin bindet hochpotent (K_D 27.2 nM) an diesen Rezeptor und die Affinität von Adenin kann durch die Zugabe des stabilen GTP-Analogs GppNHp (100 µM) leicht verringert werden (ein Effekt der durch die GTP- bzw. GppNHp-vermittelte Auflösung des ternären Komplexes zwischen Rezeptor und G-Proteinen zustande kommt).^{267,269} Darüber hinaus konnte eine außergewöhnlich schnelle Assoziation (t_{1/2} < 30 s) und eine sehr langsame Dissoziation von Adenin am endogen exprimierten Ratten-Adenin-Rezeptor beobachtet werden (t_{1/2} ca. 60 min, 15 nM [³H]Adenin, Raumtemperatur).²⁶⁹ Im Gegensatz dazu fand eine andere Arbeitsgruppe einen etwas höheren K_D-Wert (157 nM), eine deutlich langsamere Assoziation (t_{1/2} ca. 30 min) und eine schnelle (t_{1/2} ca. 8 min), aber unvollständige Dissoziation von Adenin an Rattenhirn-Membranen (100 nM [³H]Adenin, 37 °C).²⁷⁰ Auch an Membranen vieler weiterer Gewebe konnte eine affine Adeninbindung festgestellt werden (K_D-Werte siehe Tabelle 2.3).²⁷⁰ Obwohl die Experimente der beiden Gruppen bei unterschiedlichen Bedingungen durchgeführt wurden, ist besonders der große Unterschied in der Bindungskinetik überraschend. Weiterhin wurde gezeigt, dass die Affinität des Agonisten Adenin im Gegensatz zu Agonisten an vielen anderen GPCRs nicht durch NaCl (100 mM) verringert werden kann.²⁶⁹

Unter Einsatz der murinen Hybridzelllinie NG108-15 wurde in cAMP-Akkumulationsexperimenten gezeigt, dass Adenin endogene G_i-gekoppelte Rezeptoren aktiviert (Forskolin-stimulierte cAMP-Produktion, EC₅₀ von Adenin: in ganzen Zellen: 2.54 µM, an Membranen: 21 nM; die Vorinkubation mit Pertussis-Toxin (PTX) bewirkte

eine komplette Hemmung des Adenin-Effektes; der große Unterschied zwischen beiden Werten wurde auf die effiziente zelluläre Aufnahme von Adenin zurückgeführt).²⁶⁹ Die Autoren der Studie, die den Ratten-Adenin-Rezeptor entdeckten, benannten ein direktes Ortholog des Ratten-Adenin-Rezeptors in Mäusen.⁷⁸ Es ist davon auszugehen, dass neben dem Adeninrezeptor der Ratte auch das Ortholog in der Maus in den Experimenten an der Hybrid-Zelllinie erfasst wurde.²⁶⁹ So konnte über eine Reverse-Transkriptase-PCR (RT-PCR) die Expression des Adeninrezeptor-Orthologs der Maus nachgewiesen werden.²⁶⁹

Bei dem Versuch die kodierende DNA des genannten potentiellen Maus-Adenin-Rezeptors zu klonieren, erhielt man eine andere, aber ähnliche DNA-Sequenz (mMrgA9-Rezeptor).^{84,271} In cAMP-Akkumulationsexperimenten konnte gezeigt werden, dass es sich bei diesem Rezeptor ebenfalls um einen G_i-gekoppelten Adeninrezeptor handelte (EC₅₀ 8 nM, transfizierte 1321N1-Astrozytomzellen, Isoprenalin-stimulierte cAMP-Produktion).⁸⁴ Der Adenin-Effekt war auch hier durch eine Vorbehandlung der Zellen mit PTX komplett hemmbar.⁸⁴ Auch für diesen Rezeptor konnte in Bindungsstudien eine hohe Affinität für Adenin gezeigt werden (Membranen infizierter Sf21-Insektenzellen, Adenin: K_D 113 nM, IC₅₀ in Konkurrenz mit 10 nM [³H]Adenin 68.5 nM).⁸⁴

Schließlich wurde auch der als direktes Ortholog des Ratten-Adenin-Rezeptors vorgeschlagene Rezeptor der Maus, der mMrgA10, kloniert und untersucht.²⁷¹ Auch dieser Rezeptor wies eine affine [³H]Adenin-Bindung (K_D 286 nM) auf und konnte in cAMP-Akkumulationsexperimenten durch Adenin aktiviert werden (G_i-Kopplung, EC₅₀ 9.77 nM in transfizierten 1321N1-Astrozytom-Zellen).²⁷¹

Weiterhin wurde auch ein Adenin-Rezeptor in Schweinen identifiziert.²⁷² Man konnte diesen Rezeptor sowohl in Bindungsstudien (K_D 243 nM) als auch in funktionellen GTPγS-Experimenten (Maximaleffekt bei 100 nM Adenin) sowie aufgrund seiner funktionellen, inhibitorischen Kopplung an eine Na⁺-ATPase in Basolateralmembranen der Nieren nachweisen (Maximaleffekt bei 100 nM Adenin; diese Kopplung kann durch PTX aufgehoben werden, ist also G_i-Protein-abhängig; eine A₁AR-Vermittlung dieser Kopplung, die für Adenosin beobachtet wurde, konnte für Adenin durch den Einsatz selektiver Inhibitoren ausgeschlossen werden).²⁷² Allerdings ist dieser Rezeptor noch nicht kloniert worden und konnte daher noch nicht in einem Hintergrund-freien System untersucht werden.

Außerdem gibt es auch Hinweise auf einen menschlichen Adenin-Rezeptor: Für verschiedene menschliche Zelllinien und Zellen des menschlichen postmortalen Hirncortex konnte eine spezifische, hochaffine Adeninbindung gezeigt werden, während sich in menschlichen 1321N1-Astrozytomzellen und HEK293-Zellen eine Adenin-vermittelte Steigerung der intrazellulären cAMP-Menge nachweisen ließ (Teile der Bindungsdaten sowie alle funktionellen Studien wurden bislang nur in Dissertationen und noch nicht in Fachartikeln veröffentlicht).^{84,88,269,273,274} Damit scheint einer der menschlichen Adeninrezeptoren im Gegensatz zu den anderen bekannten Adeninrezeptoren G_s-gekoppelt zu sein.

2.1.3.2 Rezeptor-Familie & Nomenklatur

Bender et al. fanden, dass der Ratten-Adenin-Rezeptor der Gruppe der „MAS-related gene“- (Mrg-)Rezeptoren bzw. „sensory neuron-specific receptors“ (SNSR, auch bekannt als die MrgX-Rezeptoren) zuzuordnen ist.^{78,275,276} Bei dem Ratten-Adenin-Rezeptor handelt es sich um den MrgA-Rezeptor der Ratte (rMrgA). Bei den beiden Maus-Adenin-Rezeptoren handelt es sich ebenfalls um Rezeptoren der MrgA-Untergruppe, nämlich um den mMrgA10 und den zufällig als Adenin-Rezeptor entdeckten mMrgA9.^{78,84,271}

Die Mrg-Rezeptor-Familie gehört zu den Klasse-A-GPCRs, weist aber einen relativ geringen phylogenetischen Verwandtschaftsgrad zu den anderen GPCRs dieser Klasse auf.^{7,89} Zu den Mrg-Rezeptoren gehören in Ratten und Mäusen ein oder mehrere Mitglieder der Subtypen MrgA-H.^{275,277} Im menschlichen Genom fehlen Mitglieder der Subtypen MrgA-C sowie MrgH.^{275,277} Stattdessen besitzen Menschen vier Mitglieder des in Nagern nicht konservierten MrgX-Rezeptor-Subtyps.²⁷⁷ Die MrgA-Untergruppe ist interessant, weil sie in Mäusen 22 Mitglieder (momentan sind beim „National Center for Biotechnology Information“, kurz NCBI, Bethesda, USA, allerdings nur 10 Mitglieder annotiert), in Ratten und Rennmäusen aber nur je ein Mitglied aufweisen.²⁷⁷ Man geht davon aus, dass eine Expansion der MrgA-Untergruppe kurz nach oder während der evolutionären Arten-Aufspaltung der Nager und damit spezies-spezifisch nur in Mäusen auftrat.²⁷⁷ Dieses Phänomen erklärt die Existenz zweier Adenin-Rezeptoren in Mäusen und nur eines bislang bekannten Adenin-Rezeptors in Ratten. Da alle bekannten Adenin-Rezeptoren zu der MrgA-Untergruppe gehören, existiert in Menschen durch das Fehlen von Mitgliedern dieser Untergruppe kein direktes Adenin-Rezeptor-Ortholog.^{78,277} Weiterhin sind auch nicht alle Mitglieder der MrgA-Untergruppe in Mäusen Adenin-

Rezeptoren. So konnte beispielsweise für den mMrgA4 keine Aktivierung durch Adenin nachgewiesen werden.⁷⁸

Interessanterweise gibt es in der Nucleotid-Datenbank des NCBI folgende synonyme Annotation der Mrg-Rezeptoren: man findet einen rMrgX1 (NM_172158, synonym für eine Variante des rMrgC), einen rMrgX2 (NM_001002280, synonym für rMrgB1) und einen rMrgX3 (NM_145787, synonym für eine Variante des rMrgA, dem Ratten-Adenin-Rezeptor). Außerdem findet man einen mMrgX1 (NM_207540, synonym für mMrgC11) und einen mMrgX2 (NM_001034868, synonym für mMrgB10). Es ist schwer nachvollziehbar, wie es zu dieser alternativen Nomenklatur kam, aber wahrscheinlich geht sie auf Forschergruppen zurück, die vornehmlich die MrgX-Rezeptoren (früher ausschließlich als SNSR bezeichnet) untersuchten und Orthologe in Maus und Ratte suchten.²⁷⁶ Während eine phylogenetische Gesamtanalyse aller Mrg-Rezeptoren in Mensch, Maus und Ratte offenbart, dass MrgX-Rezeptoren keine direkten Orthologen in der Gruppe der MrgA-, MrgB- und MrgC-Rezeptoren aufweisen, hat die Betrachtung von Einzelsequenzen dieser Rezeptorgruppen dazu verleitet, vermeintliche Orthologien zu erkennen.^{277,278} Für den hMrgX3, der NCBI-Annotation zufolge ein Ortholog des Ratten-Adenin-Rezeptors, konnte jedoch genau wie für die anderen humanen MrgX-Rezeptoren keine Aktivierung durch Adenin gezeigt werden.⁷⁸ Die Identität des humanen Adenin-Rezeptors, für dessen Existenz es mehrere Hinweise gibt, ist damit noch immer unklar.

Der IUPHAR-Empfehlung für die Benennung neuer Rezeptoren folgend, wurde für die Gruppe der durch Adenin (als endogener Agonist) aktivierten GPCRs der Name Adenin-Rezeptor (AdeR) und für den rMrgA der Name rAdeR vorgeschlagen.^{88,279} Der von Bender et al. als direktes Ortholog zum Ratten-AdeR benannte mMrgA10 wurde mAde1R genannt.^{78,88} Für den mMrgA9 (der eigentlich vor dem mAde1R als solcher identifiziert wurde), wurde der Name mAde2R vorgeschlagen.^{84,88,277} In Anlehnung an die Bezeichnung P1-Rezeptoren (als Synonym für Adenosin-Rezeptoren) und P2-Rezeptoren (für die Nucleotid-Rezeptoren) wurde als Synonym für Adenin-Rezeptoren darüber hinaus die Bezeichnung „P0-Rezeptoren“ vorgeschlagen.⁷⁹ Diese Nomenklatur wurde bislang noch nicht von der IUPHAR übernommen.

2.1.3.3 Expression

Anhand quantitativer Real-time-PCR(qPCR)-Untersuchungen konnte bestimmt werden, dass die höchste mRNA-Expression des rAdeR in Dorsalganglien (dort in der Gruppe

der kleinen Neuronen) vorliegt, während moderate Expression in der Lunge, Hypothalamus, peripheren Leukozyten und Ovarien gefunden werden konnte.⁷⁸

Durch *in situ*-Hybridisationsexperimente ließ sich die Expression in Dorsalganglien bestätigen.⁷⁸ Weiterhin konnte über qPCR auch in Rattennieren die rAdeR-mRNA-Expression nachgewiesen werden, mit der höchsten Expression im Nierencortex und der äußeren Medulla.²⁸⁰ Die Expression des rAdeR in der Niere ließ sich auf Proteinebene über Western-Blots und Immunfluoreszenz-Untersuchungen bestätigen.²⁸⁰ Auch in vielen Zelllinien findet man hochaffine [³H]Adenin-Bindung (mit B_{max}-Werten im Bereich von 168-839 fmol/mg Protein).²⁶⁷ Daher können auch Radioligand-Bindungsexperimente mit Membranen von Zellen verschiedener Gewebe Hinweise auf die AdeR-Expression auf Proteinebene liefern. Anhand von Radioligand-Bindungsstudien fand man eine hohe Expression von Adenin-Bindungsstellen im gesamten Hirn, Kleinhirn, Hirnstamm und Rückenmark, sowie moderate Expression im Cortex, Striatum, Cerebrum sowie im Herzen, in Nieren und Hoden von Ratten (siehe Tabelle 2.3).^{269,270} Jedoch muss man diese Daten mit Vorsicht interpretieren, da nicht klar ist, ob [³H]Adenin nur AdeR oder auch andere potentielle Adenin-bindende Strukturen markiert.

In RT-PCR-Ansätzen konnte die mAde2R-mRNA-Expression mit einem starken Signal im Gehirn und einem schwachen Signal in der Milz nachgewiesen werden, während keine mRNA-Expression in Leber oder Niere gezeigt werden konnte.⁸⁴ In bislang nicht publizierten RT-PCR-Untersuchungen, die in unserem Arbeitskreis von Beate Sepanski und Dr. Anke Schiedel durchgeführt wurden, konnte gezeigt werden, dass die mRNA des mAde1R, nicht aber die des mAde2R von Kardiomyozyten exprimiert wird. Bei den Kardiomyozyten handelte es sich um D3-Stammzellen, die im AK Prof. Dr. Fleischmann (Universität Bonn) zu Kardiomyozyten ausdifferenziert wurden. Man konnte beobachten, dass Zellen, die am Anfang der Differenzierung standen eine etwas höhere mAde1R-Expression aufwiesen als solche Zellen, die komplett ausdifferenziert waren.

Weiterhin konnte durch Bindungsstudien die Expression einer endogenen Adeninbindungsstelle (möglicherweise dem pAdeR) in der Niere von Schweinen nachgewiesen werden (siehe Tabelle 2.3).²⁷²

2.1.3.4 Physiologische Bedeutung

Aufgrund der starken Expression in Dorsalganglien, die die Wahrnehmung von (thermalen, mechanischen, chemischen wie auch neuropathischen) Schmerzen

vermitteln, kann man die Hypothese aufstellen, dass auch die AdeR für die Nozizeption eine Rolle spielen.⁷⁸ Allerdings hatte die intrathekale Injektion von Adenin keinen Einfluss auf das Schmerzempfinden von Ratten in einem „tail withdrawal“-Test.⁷⁸ Auf der anderen Seite konnte gezeigt werden, dass Adenin nach Applikation auf das Rückenmark in Ratten eine erhöhte Erregbarkeit der Nerven des Hinterhorns verursachte.²⁸¹ Diese erhöhte Erregbarkeit konnte nicht weiter durch einen inflammatorischen Schmerzstimulus verstärkt werden.²⁸¹ Adenin scheint also tatsächlich Einfluss auf die Schmerzweiterleitung zu nehmen.²⁸¹ Der Nachweis, dass der Effekt über AdeR vermittelt wird, muss allerdings noch erbracht werden. Aufgrund der hohen Expression des Rezeptors in diesem Gewebe ist es aber nicht unwahrscheinlich, dass AdeR für diesen Effekt verantwortlich sind. Die Autoren der letztgenannten Studie geben als Grund für den Unterschied zur Studie des „tail withdrawal“-Tests die höhere Sensitivität ihrer Untersuchungen an.^{280,281}

Da sowohl in Ratten als auch in Schweinen über Bindungsstudien eine Expression von Adeninbindungsstellen und damit möglichen AdeR nachgewiesen wurde, könnten AdeR auch modulierend auf die Nierenfunktion einwirken.^{270,272} In funktionellen Studien wurde gezeigt, dass der vorgeschlagene AdeR in Schweinen funktionell und inhibitorisch an eine Na⁺-ATPase gekoppelt ist.²⁷² Dem AdeR könnte damit eine Rolle bei der Modulation der Natrium-Reabsorption im proximalen Tubulus der Niere zukommen.²⁷²

Durch einen Knock-Down-Ansatz (siRNA) konnte gezeigt werden, dass die Aktivierung des rAdeR morphologische Veränderungen und damit die Aktivierung der Sternzellen der Ratten-Leber auslöst (sowohl in primären Zellen als in der Zelllinie T-6 HSC, 500 µM Adenin).²⁸² Überraschenderweise scheint der Adenin-Effekt aber teilweise abhängig von der PKA-Aktivität zu sein.²⁸² Die Autoren der Studie sind nicht näher auf diesen unerwarteten Fund eingegangen. Der rAdeR wurde bislang nur als G_i- und nicht als G_s-gekoppelt beschrieben, weshalb man keine Rezeptor-vermittelte Aktivierung der PKA erwarten würde. Da bekannt ist, dass GPCR-vermittelte Effekte auch abhängig von der Agonisten-Konzentration sind, wäre denkbar, dass die mehrere Zehnerpotenzen über dem K_D-Wert liegende, eingesetzte Adeninkonzentration eine untypische G_s-Kopplung des Rezeptors auslöst.²⁸³ Eine andere Möglichkeit ist, dass der Rezeptor selbst ein Substrat der PKA ist und durch Phosphorylierungen moduliert wird.²⁸² Ähnlich wurde für den β₂-Adrenozeptor gezeigt, dass eine PKA-vermittelte Rezeptorphosphorylierung notwendig ist, um eine G_i-Kopplung des Rezeptors herbeizuführen.²⁸⁴ Der Effekt ist darüber hinaus zu einem ähnlichen Anteil wie von der PKA auch von der Rho-GTPase Rac abhängig, die der Rezeptor möglicherweise aktiviert.²⁸² PKA und Rac modulieren

sich gegenseitig und Rac kann die inaktive PKA binden.²⁸⁵ Die Bindung eines PKA-Inhibitors (wie er in dieser Studie eingesetzt wurde) könnte auch die Zusammenlagerung von Rac und PKA verhindern und damit möglicherweise den Rac-Effekt hemmen. Diese Erklärungsansätze bleiben jedoch spekulativ.

Ein anderer ungewöhnlicher Fund dieser Studie ist die angeblich rAdeR-vermittelte Inhibition der intrazellulären Calciumionen-Mobilisation (letztere wurde durch exogenes IP₃ induziert).²⁸² Leider wurden bei diesen Versuchen keine Knock-Down-Studien durchgeführt, so dass unklar ist, ob dieser Effekt tatsächlich durch AdeR verursacht wurde (auch die eingesetzte Adenin-Konzentration wurde nicht angegeben).²⁸² Die Autoren schlagen als Erklärung für diesen Effekt die Aktivierung einer Proteinkinase im Zuge einer Rezeptor-vermittelten Signalkaskade vor.²⁸² Die Proteinkinase könnte dann IP₃-Rezeptoren des Endoplasmatischen Retikulums phosphorylieren und dadurch hemmen.²⁸² Weitere Versuche müssen zeigen, ob diese Hypothese bestätigt werden kann.

Für Adenin (500 µM) wurde weiterhin eine rAdeR-vermittelte Hemmung der Chemotaxis der hepatischen Sternzelllinie beobachtet (die Chemotaxis wurde durch den „platelet-derived growth factor“, PDGF und CXCL4 vermittelt und die Adenin-vermittelte Hemmung konnte durch Behandlung mit siRNA aufgehoben werden).²⁸² Adenin könnte demnach als Stoppsignal bei der Chemotaxis hepatischer Sternzellen dienen.²⁸² Man geht davon aus, dass Adenin insbesondere bei Zelluntergängen frei wird. Gewebe-Regionen, die verstärkte Zelluntergänge aufweisen, könnten auf diese Art hepatische Sternzellen rekrutieren.²⁸² Außerdem wurde gezeigt, dass Adenin rAdeR-vermittelt die mRNA-Expression von Collagen I steigert.²⁸² Adenin kann so die Ablagerung von Matrix-Komponenten in Regionen mit Gewebeverletzungen steigern und somit die auf eine Verletzung folgenden fibrotischen Veränderungen des Gewebes herbeiführen.²⁸² Adenin setzt darüber hinaus auch die Endothelin-1-vermittelte Kontraktionsfähigkeit der hepatischen Sternzellen herab (es wurden keine Knock-down-Versuche durchgeführt).²⁸²

Insbesondere in Anlehnung an die letztgenannte Studie kann man sich die Frage stellen, ob die durch Adenin vermittelten Effekte (Kapitel 2.1.2) zumindest teilweise auch AdeR-vermittelt sind: Es wurde gezeigt, dass Adenin die Relaxation der glatten Muskulatur der Trachea und der Aorta auslöst.^{186,194,197} Eine AdeR-vermittelte Hemmung der intrazellulären Calciumionen-Mobilisation könnte dazu beitragen. Weiterhin konnte in Ratten gezeigt werden, dass die Fruchtbarkeit durch Adenin wahrscheinlich teilweise durch die Hemmung von Endothelin-Signalen herabgesetzt werden kann.²³³ Adenin

sorgte dabei für eine Verminderung der Expression von Endothelin und der Endothelinrezeptoren.²³³ Genau wie in der Leber von Ratten könnte der AdeR eine entscheidende Rolle bei diesem funktionellen Antagonismus zwischen Endothelin und Adenin spielen. Außerdem fand man, dass die Beweglichkeit humaner Spermien positiv durch Adenin beeinflusst wird.²³⁶ Als Grund dafür wurde von den Autoren selbst ein AdeR vorgeschlagen.²³⁶ Adenin könnte wie bei den hepatischen Sternzellen eine Rolle bei der Chemotaxis übernehmen und vermittelt durch den AdeR als chemotaktischer Reiz hin zum Uterus (einem Gewebe mit starker Zellproliferation und damit möglicherweise hohen Adenin-Konzentrationen) dienen.

Darüber hinaus sind besonders solche Adenin-Effekte bezüglich einer möglichen AdeR-Vermittlung interessant, die auch bei geringen Adenin-Konzentrationen beobachtet wurden. Dazu gehört die antiapoptotische Wirkung des Adenins auf Zellen nach γ -Bestrahlung, die durch eine Modulation der Expression pro- und antiapoptotischer Proteine zustande kommt.²²⁹ Damit hätten AdeR-Antagonisten möglicherweise Potential bei der Unterstützung der Strahlentherapie bei Krebs.

Aber auch bei solchen Effekten, die nur durch sehr hohe Adeninkonzentrationen hervorgerufen wurden, kann von einer Aktivierung der AdeR ausgegangen werden. In diesem Zusammenhang wäre es interessant, ob es bei hohen Adenin-Konzentrationen tatsächlich zur Auslösung untypischer Signalkaskaden kommt, wie es oben vorgeschlagen wurde. Auch wenn die durch hohe Adeninkonzentrationen ausgelösten Effekte wahrscheinlich durch eine Wirkungs-Überlagerung von Adenin an verschiedenen Zielstrukturen zustande kommen, könnten zumindest Teileffekte auf die Wirkung an AdeR zurückgehen. Besonders aufgrund seiner hohen Expression in der Niere könnte dem AdeR z. B. eine Rolle bei der Adenin-induzierten Nierenschädigung zukommen.²⁸⁰ So könnte Adenin selbst (und möglicherweise nicht 2,8-Dihydroxyadenin) in der Niere bei dem Adenin-induzierten Nierenversagen die fibrotischen Veränderungen Rezeptor-vermittelt vorantreiben, wie es auch für die Leber beschrieben wurde. Außerdem konnte gezeigt werden, dass die eigentlich intratubulär anfallenden 2,8-Dihydroxyadenin-Kristalle, die sich bei hohen Adeninkonzentrationen in der Niere bilden, NF- κ B-vermittelt ins Interstitium der Niere verlagert werden.¹⁶² Möglicherweise kommt es durch die AdeR zu einer Modulation von NF- κ B, wie sie auch für andere GPCRs gezeigt wurde.²⁸⁶ Um einen tieferen Einblick in die physiologische Rolle der AdeR zu erhalten, könnte es also sinnvoll sein ihre Rolle für die zahlreichen bereits bekannten Adenin-vermittelten Effekten näher zu erforschen.

Eine weitere interessante Beobachtung zu AdeR wurde in Studien mit spezifischen Antikörpern gegen den rAdeR gemacht: Es konnte gezeigt werden, dass ein Teil des N-Terminus des Rezeptors unter physiologischen Bedingungen abgespalten wird.²⁶⁸ Es wurde vorgeschlagen, dass dem dabei entstehenden Peptid Signalwirkung zukommen könnte, wie es für einzelne andere GPCRs beobachtet werden kann.^{268,287} Es wäre daher interessant zu erforschen, ob und welche physiologische Relevanz dieses hypothetische Signalpeptid für den Rezeptor hat.

2.1.3.5 Pharmakologische Charakterisierung

Die Eignung von [³H]Adenin zur pharmakologischen Charakterisierung der AdeR wurde infrage gestellt, da der Radioligand scheinbar spezifische Bindung an das Filtermaterial aufwies.²⁸⁸ Allerdings konnte gezeigt werden, dass gelegentliche Unregelmäßigkeiten in den Bindungsstudien nicht durch die spezifische Bindung des Radioliganden an Glasfaser-Filter, sondern durch die spezifische und hochaffine Bindung an Bakterien im Inkubations-/Wasch-Puffer zustande kamen (*Achromobacter xylosoxidans*, K_D 5.84 nM, B_{max} 266 pmol/mg).²⁸⁹ Die Arbeit mit sterilen Lösungen erlaubt daher die reproduzierbare Durchführung von Bindungsstudien mit [³H]Adenin.²⁸⁹ Teilweise kann man auch die Eignung einzelner Zelllinien als Expressionssystem für AdeR hinterfragen. So konnten zwar in vielen der untersuchten Zelllinien keine Adenin-induzierten G-Protein-vermittelten Signale detektiert werden, aber alle Säugetier-Zelllinien wiesen endogene, spezifische Adeninbindung auf.^{78,84,267,269} Da Insektenzellen keine endogene Adeninbindungsstelle besitzen, erscheinen sie als das am besten geeignete Expressionssystem für AdeR.^{84,271} Allerdings exprimieren Insektenzellen endogen keine für die Signalweiterleitung geeigneten G-Proteine.^{268,271} Für funktionelle Studien können daher solche Säugetier-Zelllinien als heterologes Expressionssystem dienen, in denen (zumindest bei geringen Konzentrationen) keine endogenen Signale auf Adenin detektierbar sind und die keine hocheffiziente Aufnahme von Adenin aufweisen, z. B. 1321N1-Astrozytom-Zellen.^{84,88} In funktionellen Experimenten wie auch in Bindungsstudien konnte durch den Einsatz verschiedener Antagonisten oder Inhibitoren ausgeschlossen werden, dass Adenin seine Effekte über P1- oder P2Y-Rezeptoren vermittelte, oder [³H]Adenin an diese Rezeptoren oder Adenin-Transporter band (siehe auch Tabelle 2.4, S. 49).^{84,269,270}

Der Ratten-AdeR ist pharmakologisch am besten erforscht. Dabei wurde sowohl der rekombinant als auch der endogen (in Zellen des Hirncortex) exprimierte Rezeptor untersucht.^{78,88,269} Allerdings wurde von einer Arbeitsgruppe vorgeschlagen, dass es sich

bei der Adenin-Bindungsstelle in Membranen vom Rattenhirn nicht um den zuvor identifizierten rAdeR handelt, weil beide Proteine unterschiedliche Struktur-Wirkungs-Beziehungen aufwiesen.²⁷⁰ Tatsächlich kann nicht ausgeschlossen werden, dass es in Ratten mehrere AdeR gibt (obwohl in Ratten nur ein Mitglied der MrgA-Rezeptor Familie vorliegt).^{78,277} Allerdings kann in der Sättigung kein biphasischer Verlauf erkannt werden, obwohl neben der vorgeschlagenen alternativen Bindungsstelle auch der rAdeR nachweislich in mehreren Regionen des Rattenhirns exprimiert ist.²⁷⁰ Leicht unterschiedliche Struktur-Wirkungs-Beziehungen können auch durch Unterschiede in den Inkubationspuffern, -bedingungen und eingesetzten Radioligand-Konzentrationen hervorgerufen worden sein (während 1-Methyladenin 15 nM [³H]Adenin mit geringer Affinität aus der Bindung an den heterolog exprimierten rAdeR verdrängte, ist es nachvollziehbar, dass es kaum in der Lage ist, 100 nM [³H]Adenin von seiner Bindungsstelle in Rattenhirn-Membranen zu verdrängen). Obwohl die Daten von endogen exprimierten Adenin-Bindungsstellen also mit Vorsicht interpretiert werden sollten, findet man in den meisten Fällen eine gute Korrelation in den Struktur-Wirkungs-Beziehungen zwischen rekombinant und endogen exprimierten AdeR.²⁶⁹

In Tabelle 2.4 sind ausgewählte Ergebnisse aus funktionellen und Radioligand-Bindungsexperimenten angegeben. Es wird deutlich, dass schon kleine Veränderungen des Adenin-Moleküls meist eine drastische Reduktion der Affinität und Wirksamkeit der entsprechenden Verbindungen zur Folge haben. Adenin ist damit der potenteste Ligand an den AdeR.

Interessanterweise konnte man für die Adenin-Bindungsstelle in menschlichen HEK293-Zellen ähnliche Struktur-Wirkungs-Beziehungen finden, wie für die murinen AdeR.⁸⁸ Es gibt aber auch Unterschiede, z. B. ist 8-Aminoadenin an der humanen Adenin-Bindungsstelle deutlich affiner (K_i 34.1 nM) als am rAdeR und sogar etwas affiner als Adenin selbst (K_i 47.1 nM).⁸⁸ Neben zahlreichen Adenin-Derivaten und den oben genannten Liganden anderer puriniger Zielstrukturen wurden auch einige Analgetika und Antidepressiva, die wirksam bei der Behandlung von neuropathischem Schmerz waren, in Bindungsstudien am Ratten-AdeR untersucht. Jedoch zeigten sie keine Affinität am rAdeR.²⁶⁹

Tabelle 2.4: Wirksamkeit und Affinität ausgewählter Verbindungen an Adenin-Rezeptoren

Verbindung	rAdeR ^a		mAde1R		mAde2R	
	Wirksamkeit EC ₅₀ , nM	Affinität K _i , nM (Inhibition bei 100 µM)	Wirksamkeit EC ₅₀ , nM	Affinität K _i , nM	Wirksamkeit EC ₅₀ , nM	Affinität IC ₅₀ , nM (Inhibition bei 100 µM)
1, Adenin	2.88 ^{78, b, *} 61.7 ^{78, c, *} 8.29 ^{88, d}	18 ^{78, e} 29.9 ^{269, f} 120 ^{270, g}	9.77 ^{271, d}	189 ^{271, h}	8 ^{84, d}	68.5 ^{84, i}
2, 1-Methyladenin	15100 ^{78, c, *}	4390 ^{78, e} 29300 ^{269, f} inakt. ^{270, g}	-	4600 ^{271, h}	-	(62 %) ^{84, i}
3, 2-Aminoadenin	-	45100 ^{270, g} 4950 ^{289, f}	-	-	-	-
4, 2-Fluoradenin	-	620 ^{269, f}	-	431 ^{271, h}	15 ^{84, d}	1470 ^{84, i}
5, 3-Methyladenin	-	(5 %) ^{269, f} inakt. ^{270, g}	-	-	-	-
6, N ⁶ -Methyladenin	-	3640 ^{269, f}	-	-	-	-
7, N ⁶ -Dimethyladenin	-	(11 %) ^{269, f} inakt. ^{270, g}	-	-	-	(0 %) ^{84, i}
8, N ⁶ -Benzyladenin	inakt. ^{78, c, *}	58300 ^{78, e} (30 %) ^{269, f}	-	-	-	(12 %) ^{84, i}
9, 7-Methyladenin	-	4130 ^{269, f}	-	564 ^{271, h}	-	5760 ^{84, i}
10, 8-Aminoadenin	-	6510 ^{88, f}	-	3760 ^{271, h}	-	-
11, 9-Methyladenin	-	17500 ^{269, f}	-	(54 %) ^{271, h}	-	-
12, Hypoxanthin	-	inakt. ^{78, e} inakt. ^{270, g} 45000 ^{289, f}	-	(43 %) ^{271, h}	-	-
13, Guanin	-	inakt. ^{78, e} inakt. ^{270, g}	-	-	-	-
14, Koffein	-	(2 %) ^{269, f} inakt. ^{270, g}	-	-	-	(1 %) ^{84, i}
15, DPCPX	-	(4 %) ^{269, f} inakt. ^{270, g, j}	-	-	inakt. ^{84, d}	-
16, Adenosin	-	inakt. ^{78, e} 19400 ^{269, f} 15300 ^{270, g}	-	(29 %) ^{271, h}	-	-
17, NECA	-	(10 %) ^{269, f} inakt. ^{270, g}	-	-	-	(28 %) ^{84, i}
18, AMP	44700 ^{78, c, *}	24500 ^{78, e} (47 %) ^{269, f} 8520 ^{270, g}	-	-	-	-

Tabelle 2.4 (Fortsetzung)

19, ADP	-	inakt. ^{78, e} (51 %) ^{269, f} 11100 ^{270, g}	-	-	-	(28 %) ^{84, i}
20, ATP	-	52800 ^{78, e} (39 %) ^{269, f} 11600 ^{270, g}	-	-	-	(14 %) ^{84, i}
21, Suramin	-	inakt. ^{270, g}	-	-	inakt. ^{84, d}	-
22, Papaverin	-	inakt. ^{270, g}	-	-	-	-
23, NBTI	-	inakt. ^{270, g}	-	-	-	-
24, Dipyridamol	-	inakt. ^{270, g}	-	-	-	-

^aDiese Tabelle enthält nur eine Auswahl der an den Adenin-Rezeptoren getesteten Verbindungen. Zahlreiche weitere Verbindungen wurden am rAde1R getestet.^{88,269,270,289} Ergebnisse an endogen exprimierten Rezeptoren/Bindungsstellen sind in grau dargestellt.

*aus pEC₅₀-Wert errechnet

^bcAMP-Assay (G_i / Forskolin): CHO-Zellen + AdeR

^cGTPγS-Assay: Membranen von CHO-Zellen + AdeR

^dcAMP-Assay (G_i / Isoprenalin): 1321N1-Astrozytom-Zellen + AdeR

^eBindungsassay (15 nM [³H]Adenin): Membranen von CHO-Zellen + AdeR

^fBindungsassay (10 nM [³H]Adenin): Membranen des Ratten-Hirncortex

^gBindungsassay (100 nM [³H]Adenin, 37 °C): Membranen des Ratten-Hirns

^hBindungsassay (10 nM [³H]Adenin): Membranen von Sf9-Insektenzellen + AdeR

ⁱBindungsassay (10 nM [³H]Adenin): Membranen von Sf21-Insektenzellen + AdeR

^jgetestet bei einer Konzentration von 50 μM

Ein interessanter Fund ist, dass Adenosin nicht in der Lage war, [³H]Adenin komplett aus seiner Bindung an Rattenhirn-Membranen zu verdrängen (die maximale Inhibition betrug 61 %).²⁷⁰ Die Testung verschiedener Desoxyadenosin-Derivate an Rattenhirn-Membranen lieferte interessante Ergebnisse: Während die 5'-Hydroxygruppe des Adenosins die Affinität der Verbindung an den Rezeptor stark herabsetzt, sind die 2'- und 3'-Hydroxygruppen gleichermaßen ursächlich für die nur partielle Verdrängung von [³H]Adenin durch Adenosin.²⁷⁰ Die Autoren der Studie nennen keine Erklärungsvorschläge für diese partielle Verdrängung des Radioliganden. Möglicherweise handelt es sich um einen allosterischen Effekt. Es wäre vorstellbar, dass dabei Hetero-Di- oder Oligomere aus Adenin- und Adenosin-Rezeptoren (die bereits vorgeschlagen wurden) eine Rolle spielen.²⁹⁰ Da Adenin-Nucleotide [³H]Adenin nach ADA-Zugabe nicht mehr aus der Bindung an Rattenhirn-Membranen verdrängen konnten, kann man davon ausgehen, dass sie rasch zu Adenosin abgebaut wurden und ihre inhibitorische Wirkung damit durch diesen Metaboliten hervorgerufen wurde.²⁷⁰

Bislang wurden in wissenschaftlichen Artikeln nur ein AdeR-Antagonist beschrieben: Das Adenin-Derivat 3-Methylamino-N(9*H*-purin-6-yl)propionamid (PSB-08162, Antagonismus wurde am rAdeR gezeigt, Strukturformel siehe Tabelle 2.8, S. 75).²⁸⁰ Darüber hinaus konnte für einige Verbindungen ein scheinbarer Partialagonismus an Adenin-Rezeptoren gezeigt werden: Man gab aber an, dass sich AMP und 1-Methyladenin in GTPγS-Experimenten (Membranen von CHO-Zellen, die rAdeR überexprimieren) partialagonistisch verhielten.⁷⁸ Dies kann jedoch hinterfragt werden, da zumindest in den abgebildeten Kurven dieser beiden Verbindungen das obere Plateau nicht erreicht wurde. Weiterhin fand man in cAMP-Akkumulationsexperimenten (mit Membranen der murinen Hybridzelllinie NG108-15) Hinweise auf eine partialagonistische Wirkung aller getesteten Adenin-Derivate im Vergleich zum Effekt von Adenin selbst (u. a. für 1-Methyladenin, 2-Fluoradenin, *N*⁶-Benzyladenin, 7-Methyladenin und 9-Methyladenin).²⁶⁹ In cAMP-Akkumulationsexperimenten zur Untersuchung des rAdeR (transfizierte 1321N1-Astrozytomzellen) konnte dagegen gezeigt werden, dass es sich u. a. bei 8-Aminoadenin um einen Vollagonisten handelt (im Vergleich zu Adenin selbst).⁸⁸ 8-Dimethylaminoadenin wies sogar eine signifikant höhere Efficacy als Adenin auf.⁸⁸

Um die Identifikation von nicht von Adenin abgeleiteten AdeR-Liganden zu erleichtern, könnte ein Homologie-Modell der AdeR nützlich sein. Ein solches Modell wurde für den rAdeR vorgestellt.²⁹¹ Es basiert auf Modellen des MrgC11 und des MrgA1 der Maus.²⁹² Anhand des Modells wurde vorhergesagt, dass hauptsächlich die Aminosäuren Phe3.24, Asn3.29, Asn4.60, Leu5.47 und His6.54 mit Adenin interagieren.^{268,291} Die Autoren des Modells liefern dazu allerdings keine experimentellen Belege.²⁹¹ In einer später erschienen Studie wurde ein weiteres Homologie-Modell des rAdeR konstruiert.²⁶⁸ Dieses basierte nicht auf einem Homologie-Modell eines nah verwandten Rezeptors, sondern auf der Röntgenkristallstruktur des humanen β_2 -Adrenozeptors.²⁶⁸ Diese Vorlage wies unter den bis dahin beschriebenen Kristallstrukturen die höchste Homologie zum rAdeR auf.²⁶⁸ Die Vorhersagen, die anhand dieses und des zuvor publizierten Modells gemacht worden waren, wurden durch Mutagenese-Untersuchungen überprüft.²⁶⁸ Diese Mutagenese-Studie ist die erste und bislang einzige Studie solcher Art an einem AdeR. Allerdings wies keine der generierten Alanin-Mutanten einen starken Affinitätsverlust für Adenin auf.²⁶⁸ Lediglich zwei der neun untersuchten Aminosäuren schienen eine Bedeutung für die Rezeptor-Aktivierung durch, aber nicht für die Bindung von Adenin zu haben (Asn5.40 und Leu5.47).²⁶⁸ Dies zeigt die Grenzen beider Modelle auf. Das erste Modell basierte nicht auf einer Kristallstruktur,

sondern auf anderen Modellen. Obwohl die Aussagen (nur) eines der beiden Vorlage-Modelle durch Mutagenese-Studien gestützt wurden, war die Auswahl von nur drei untersuchten Aminosäuren möglicherweise zu gering, um gesicherte Aussagen über die Genauigkeit dieses Vorlage-Modells zu machen.²⁹² Das zweite Modell des rAdeR basierte in Ermangelung einer besseren Vorlage auf einer Rezeptorstruktur mit geringer Homologie zu rAdeR (< 30%).²⁶⁸ Beide Modelle waren nicht ausreichend genau, um die Bindungstasche des sehr kleinen Agonisten Adenin vorherzusagen.²⁶⁸ Daher ist bislang nicht klar, welche Aminosäuren die Bindungstasche des Rezeptors bilden.

Zusammenfassend kann man sagen, dass Adenin den bislang potentesten AdeR-Agonist darstellt und dass die meisten Modifikationen des Moleküls nicht toleriert werden. Jedoch stellt Adenin selbst kein gutes pharmakologisches Werkzeug zur weiteren Erforschung der AdeR dar, da es nicht nur zahlreiche Zielstrukturen (wenn auch mit niedriger Potenz) adressiert und eine Vielzahl von Effekten auslöst, sondern *in vivo* auch rasch metabolisiert wird. Neben der Entwicklung potenter Liganden ist auch die Entdeckung und Erforschung weiterer AdeR von Bedeutung und kann wichtige Informationen über diese neue Klasse von Rezeptoren liefern.

2.2 Ergebnisse & Diskussion

Genau wie für viele andere Zelllinien konnte auch für Zellen einer Ovarialzelllinie des Chinesischen Streifenhamsters (CHO-Zellen) gezeigt werden, dass sie [³H]Adenin binden.²⁶⁷ Außerdem wurde beschrieben, dass Adenin die cAMP-Akkumulation in untransfizierten CHO-Zellen moduliert.⁸⁴ Aus diesem Grund kann man die Hypothese aufstellen, dass es sich bei der Adenin-Bindungsstelle der CHO-Zellen um einen G-Protein-gekoppelten AdeR handelt. Um diese Hypothese zu bestätigen, sollte die kodierende DNA dieses Rezeptors identifiziert und kloniert werden. CHO-Zellen stellen ein wichtiges und in der Forschung intensiv genutztes Expressions-System dar. Ihre Nutzung für die Expression von AdeR wird natürlich dadurch eingeschränkt, dass sie selbst einen solchen Rezeptor endogen exprimieren könnten. Ein weiterer denkbarer Schritt wäre daher die Durchführung eines zellulären Knock-Outs dieses hypothetischen AdeR.^{293,294} Damit könnte erstmals ein Säugetier-Zellsystem geschaffen werden, das möglicherweise keine endogene Adenin-Bindung aufweist. Da es sich bei CHO-Zellen um eine außergewöhnlich robuste Zelllinie handelt, wäre sie für einen solchen zellulären Knock-Out-Ansatz sehr gut geeignet.^{293,294} Die Arbeiten an diesem Projekt wurde von

uns bereits größtenteils publiziert,^{268,271} darunter auch die im Folgenden vorgestellten Ergebnisse und ihre Diskussion.²⁷¹

2.2.1 Klonierung der cAdeR-cDNA

In einem ersten Schritt sollte die kodierende DNA eines möglichen AdeR in CHO-Zellen identifiziert werden. Allerdings wurde dies massiv durch die Tatsache erschwert, dass die genomischen DNA-Sequenzen dieser Zelllinie bzw. des Chinesischen Streifenhamsters zu Beginn dieser Arbeit nicht vorlagen. Daher war es weder möglich zu prüfen, ob im Genom dieses Nagers überhaupt ein Gen für einen möglichen AdeR vorhanden ist, noch konnten gezielt Primer gegen diese DNA-Sequenz konstruiert werden. Jedoch war klar, dass alle bekannten AdeR phylogenetisch eng verwandt sind (alle AdeR von Nagern gehören zu der Gruppe von MrgA-Rezeptoren).^{78,84,295} Da besonders der DNA-Bereich nach dem Startcodon zwischen den bekannten AdeR relativ konserviert ist, wurden anfangs verschiedene Primer in PCR-Ansätzen kombiniert, die basierend auf der DNA-Sequenz des rAdeR, mAde1R oder mAde2R konstruiert wurden und bereits vorlagen. Als Matrize für die PCR diente umgeschriebene mRNA. Dafür wurde zuerst die Gesamt-RNA aus CHO-Zellen extrahiert und unter Einsatz von Poly-T-Primern mit einer Reversen Transkriptase in cDNA umgeschrieben. In einzelnen Fällen wurden PCR-Produkte erhalten. Da die DNA-Menge für die Klonierung zu gering war, wurden Reamplifikations-Reaktionen durchgeführt. Nach der erfolgreichen Klonierung der reamplifizierten DNA-Fragmente (Insertion in den Vektor pcDNA3.1), konnten die Fragmente sequenziert werden. Jedoch wies keines dieser DNA-Fragmente Ähnlichkeiten zu den Sequenzen der bekannten AdeR auf. Somit konnte mit keiner der diversen Kombinationen aus Primern, die jeweils spezifisch für einen der bekannten AdeR waren, ein passendes PCR-Produkt generiert werden. Daraus konnte jedoch nicht geschlossen werden, dass es keinen AdeR des Chinesischen Streifenhamsters gibt, sondern lediglich, dass die DNA-Sequenz dieses Rezeptors nach dem Start- und/oder vor dem Stopp-Codon nicht identisch mit den entsprechenden Sequenzen der anderen Nagetier-AdeR ist.

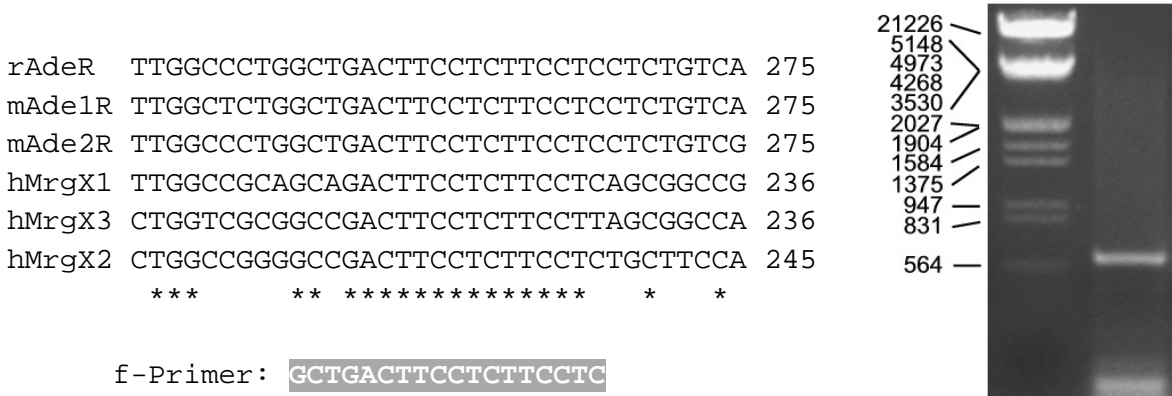


Abbildung 2.2: Primer-Konstruktion und erstes Fragment der cAdeR-cDNA.

Primer wurden so konstruiert, dass sie an hochkonservierte Regionen der MrgR-Gene binden. Diese konnten durch ein DNA-Sequenz-Alignment identifiziert werden. Dargestellt ist der Ausschnitt eines solchen Alignments und darunter die Primersequenz des Primers f-AdeR-249. Das Foto zeigt das elektrophoretisch aufgetrennte PCR-Produkt (rechte Bahn), in dem das erste Fragment der cAdeR-cDNA reamplifiziert werden konnte. Die neben dem Foto angegebenen Zahlen beschreiben die Größen (in bp) der DNA-Fragmente des in der linken Bahn aufgetragenen Markers (Lambda DNA/EcoRI+HindIII). Die Bande von der erwarteten Größe (608 bp, rechte Bahn) wurde ausgeschnitten und in den Vektor pJet1.2 eingebracht.

In einem zweiten Schritt wurden Primer konstruiert, die gegen hochkonservierte Regionen aller AdeR gerichtet sind. Um diese Regionen zu identifizieren, wurden die DNA-Sequenzen der bekannten AdeR miteinander verglichen. Um die Wahrscheinlichkeit zu erhöhen, dass die Primer tatsächlich binden, wurden in einem Alignment neben den AdeR-DNA-Sequenzen zusätzlich die DNA-Sequenzen der menschlichen Rezeptoren MrgX1-3 aufgenommen. Es konnten kaum Bereiche identifiziert werden, die bei allen DNA-Sequenzen identisch und ausreichend lang waren um für Primer als Bindungsstelle zu dienen. Jedoch gab es Bereiche, die eine hohe Dichte identischer Basen aufwiesen. Dabei waren besonders solche Regionen interessant, in denen die wenigen nicht-identischen Basen zumindest in allen Nager-AdeR konserviert waren. Zwei dieser Bereiche wurden ausgewählt, um auf Basis dieser Sequenzen Primer zu konstruieren. Bei fehlender punktueller Übereinstimmung wurde für die Primer die Base berücksichtigt, die in allen drei Nager-AdeR an dieser Position vorlag (Beispiel siehe Abbildung 2.2). Der Einsatz dieses Primerpaars müsste die Vervielfältigung eines DNA-Fragmentes jedes bekannten AdeR und nah verwandter Rezeptoren erlauben. In einem Kontrollversuch konnte gezeigt werden, dass es sich eignete um ein 610 bp großes Fragment des rAdeR zu amplifizieren, das von Base 249 bis Base 857 reicht. Ein Fragment ähnlicher Größe konnte auch mit der umgeschriebenen mRNA aus CHO-Zellen als Vorlage generiert werden. Allerdings war die DNA-Bande extrem schwach, so dass erst durch eine wiederholte PCR-Reaktion

genug DNA für die Klonierung zur Verfügung stand (siehe Abbildung 2.2). Dieses und alle weiteren DNA-Fragmente wurden in den pJet1.2-Vektor eingebracht (Clonejet PCR Cloning Kit, Thermo Scientific, Waltham, USA). Die Sequenzierung mehrere Klone zeigte, dass ein für alle Klone identisches DNA-Fragment amplifiziert werden konnte. Dieses DNA-Fragment wies je 83 % Identität zu der DNA-Sequenz der beiden Maus-AdeR sowie 90 % Identität zur DNA-Sequenz des rAdeR auf. Daher konnte man begründet davon ausgehen, dass das Genprodukt dieser DNA-Sequenz ein AdeR-Ortholog des Chinesischen Streifenhamsters darstellen könnte. Obwohl nicht klar war, ob Adenin diesen möglicherweise orthologen Rezeptor tatsächlich aktiviert, wurde er vorläufig cAdeR genannt. Der Buchstabe c soll die Spezies beschreiben (*Cricetulus griseus*).

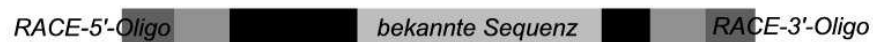
Wie schematisch in Abbildung 2.3 dargestellt, war nun die Sequenz eines aus der Mitte der kompletten cAdeR-cDNA stammenden Fragmentes bekannt. Um auch die Sequenzen der beiden Enden der cDNA zu erhalten, wurde ein in solchen Fällen üblicher „rapid amplification of cDNA ends“(RACE)-Ansatz geplant (GeneRacer[®]-Kit, Life Technologies, Darmstadt, Deutschland). Dieser basiert darauf, dass die isolierte mRNA vor dem Umschreiben vorbehandelt wird. Dabei werden der mRNA sowohl an ihrem 5'- wie auch an ihrem 3'-Ende Oligonucleotide angehängt, die nach dem Umschreiben der mRNA als Bindestelle für Primer dienen. In Kombination mit einem Primer der sich gegen die bereits bekannte Sequenz richtet, können die beiden cDNA-Enden so einzeln amplifiziert werden. Obwohl PCR-Produkte generiert werden konnten, entsprach keines dieser Produkte einem der Enden der cAdeR-cDNA. Dies war überraschend, insbesondere da der RACE-Ansatz relativ sensitiv ist. Schon vor diesen Experimenten wurde die für den RACE-Ansatz präparierte cDNA kontrolliert: In qualitativen PCR-Untersuchungen konnte anhand eines amplifizierten Fragmentes des β -Aktin-Gens nachgewiesen werden, dass es sich bei der eingesetzten Matrize tatsächlich um cDNA handelte. Um einen Durchführungsfehler gänzlich auszuschließen, wurde eine Kontroll-PCR mit dem Primer-Paar durchgeführt, mit dem die Amplifikation des ersten DNA-Fragmentes gelang. Dabei konnte kein PCR-Produkt generiert werden. Somit konnte ein Durchführungsfehler ausgeschlossen werden. Es ist also davon auszugehen, dass die cAdeR-mRNA in den präparierten Zellen nicht exprimiert war.

PCR-Vorlage: umgeschriebene mRNA



1. spezifische mAdeR/rAdeR-Primer ► kein passendes PCR-Produkt ◄
2. Primer gegen hochkonservierte Regionen ► ◄

PCR-Vorlage: für "RACE" vorbehandelte, umgeschriebene mRNA



3. RACE-Primer ► ◄ kein passendes PCR-Produkt ◄

PCR-Vorlage: genomische DNA



4. Primer gegen hochkonservierte genomische Regionen ► ◄



Abbildung 2.3: Schema zur schrittweisen Identifikation der kompletten cDNA des cAdeR

Dreiecke repräsentieren Primer, ihre Position unter den entsprechenden PCR-Vorlagen deutet die Region der DNA-Sequenz an, an die sie binden. Durch Dreiecke eingefasste Balken symbolisieren die anhand der Vorlage erfolgreich generierten PCR-Produkte.

Auch anhand der in erneuten Versuchen umgeschriebenen mRNA ließ sich das ursprünglich generierte DNA-Fragment des cAdeR nicht erneut amplifizieren. Aus diesem Grund wurde davon ausgegangen, dass die cAdeR-cDNA nur unter bestimmten, aber unbekanntem Bedingungen in CHO-Zellen exprimiert wird. Daher wurde die mRNA von CHO-Zellen extrahiert, die unter verschiedenen Bedingungen kultiviert wurden: verschiedene Temperaturen (27 °C oder 37 °C), verschiedene pH-Werte im Medium (5 % CO₂ oder 10 % CO₂), verschiedene Medien (DMEM/F-12 oder F-12) und unterschiedlich hohe Passagenzahlen. Um die Expression der Zellen epigenetisch zu modulieren, wurde zwei Tage vor der mRNA-Extraktion außerdem die Histon-Desacetylase-Inhibitoren Natriumbutyrat (Endkonzentration 2 mM) oder Natriumvalproat

(500 μ M) zugegeben.²⁹⁶ Jedoch gelang es unter Einsatz der umgeschriebenen RNA dieser unterschiedlich behandelten Zellen nicht, erneut das bereits bekannte cAdeR-cDNA-Fragment zu amplifizieren. Zwar war dies mit der ursprünglich hergestellten umgeschriebenen mRNA immer noch möglich, allerdings konnte diese aufgrund der nötigen - aber in diesem Fall zuvor nicht durchgeführten - Vorbehandlung der mRNA nicht für einen RACE-Ansatz eingesetzt werden.

Da Chinesische Streifenhamster kaum noch als Versuchstiere eingesetzt werden, war es nicht möglich, primäre neuronale Zellen, in denen der cAdeR möglicherweise exprimiert ist, für eine mRNA-Extraktion einzusetzen. Stattdessen wurde eine RNA-Extraktion aus Haarfollikeln (als einzig mögliche Primärquelle) und aus der Zelllinie NCB-20 vorgenommen. Die NCB-20-Zellen wurden freundlicherweise von Prof. Dr. Ki-Wug Sung (Katholische Universität von Korea, Seoul, Südkorea) mit der Genehmigung von Prof. Dr. David M. Lovinger (National Institute on Alcohol Abuse and Alcoholism, Bethesda, USA) zur Verfügung gestellt. Bei der NCB-20-Zelllinie handelt es sich um Hybridom-Zellen aus der Maus-Neuroblastom-Zelllinie N18TG2 und embryonaler Hirnzellen (Tag 18) des Chinesischen Streifenhamsters.^{297,298} Auch unter Einsatz der umgeschriebenen mRNA aus diesen Zellen konnte das bekannte cDNA-Fragment des cAdeR nicht amplifiziert werden. Da bekannt ist, dass AdeR in Neuronen exprimiert werden und Valproat die neuronale Differenzierung von Stammzellen herbeiführen kann, wurden auch die NCB-20-Zellen mit Valproat behandelt.^{78,299,300} Doch auch diese Maßnahme führte nicht zum Erfolg. Neben der schon genannten Möglichkeit, dass CHO-Zellen die cAdeR-mRNA nur unter bestimmten Bedingungen exprimieren, wäre es möglich, dass die cAdeR-mRNA sehr instabil ist und in der Zeit zwischen Extraktion und der Reverse-Transkriptase-Reaktion abgebaut wurde. Obwohl die eingesetzte Methode die Extraktion reiner RNA erlaubt, konnte nicht gänzlich ausgeschlossen werden, dass die zuerst extrahierte RNA mit genomischer DNA verunreinigt war. Aufgrund des Mangels an einer geeigneten Quelle für cAdeR-mRNA, die speziell für diesen Ansatz hätte vorbereitet werden können, war es unmöglich, die Sequenzen der cDNA-Enden über einen RACE-Ansatz zu bestimmen.

Um die fehlenden Sequenzen der cAdeR-cDNA zu bestimmen, wurde in einem neuen Ansatz genomische DNA (gDNA) als Matrize für PCR-Reaktionen genutzt. Die gDNA wurde aus CHO-Zellen extrahiert (PureLink[®] Genomic DNA Kit, Life Technologies, Darmstadt, Deutschland). Erneut wurden Primer konstruiert, die sich gegen hochkonservierte Regionen von AdeR-Genen richteten. Dazu wurden die genomischen Sequenzen der Maus und der Ratte abgeglichen, die die beiden Exons der AdeR-Gene

flankieren. Das Exon 1 sollte in einem PCR-Ansatz amplifiziert werden, in dem Primer eingesetzt wurden, die an nicht-kodierende Sequenzen vor und hinter dem Exon banden (siehe Abbildung 2.3). Das Exon 2 sollte in zwei Teilen amplifiziert werden: Ein 5'-Fragment des Exons und ein 3'-Fragment des Exons, die sich in einem großen Anteil überschneiden. Dafür wurde je ein Primer eingesetzt, der in einem nicht-kodierenden Bereich des Gens band, sowie ein Primer, der an einen Teil der bereits bekannten Sequenz innerhalb des Exons band. Es konnten drei PCR-Produkte erwarteter Größe amplifiziert werden. Diese drei Fragmente enthielten die komplette kodierende DNA des cAdeR.

Aufgrund der entdeckten Sequenzen konnten Primer konstruiert werden, die mit beiden Enden der cAdeR-cDNA hybridisierten. Allerdings wurden durch den Einsatz dieses Primerpaars neben dem gewünschten auch mehrere unspezifische PCR-Produkte generiert. Aus diesem Grund wurde, um die Klonierung zu erleichtern, zunächst einer dieser Primer mit einem der Primer kombiniert, die gegen hochkonservierte Regionen in der Mitte der kodierenden DNA gerichtet waren. Als Matrize dienten sowohl die im ersten Schritt generierte umgeschriebene RNA wie auch genomische DNA aus CHO-Zellen. Alle erhaltenen DNA-Fragmente waren (bei Überschneidungen) identisch zueinander. Die cAdeR-cDNA wurde also in mehreren unabhängigen PCR-Reaktionen aufgrund unterschiedlicher Matrizen-DNA amplifiziert. Die Tatsache, dass sich überschneidende Fragmente identisch waren, deutet darauf hin, dass im Rahmen der PCR keine Punktmutationen in die Sequenz eingebracht wurden. Einige Zeit nach Abschluss dieses Projektes wurde das Genom von CHO-Zellen schließlich sequenziert (NCBI Referenz-Nummer: NW_003614690.1). Eine Suche der im Rahmen dieser Arbeit bestimmten Sequenzen des cAdeR mit dem Programm BLAST[®] zeigt, dass diese Sequenzen komplett identisch zu den bestimmten genomischen Sequenzen sind.

Tabelle 2.5: Homologie zwischen den Adenin-Rezeptor-Orthologen bzw. -Subtypen^a

	mAde1R	mAde2R	cAdeR
rAdeR	76 % (85 %)	76 % (84 %)	86 % (91 %)
mAde1R	-	81 % (89 %)	74 % (84 %)
mAde2R		-	73 % (82 %)

^aAngegeben sind die Identitäten (bzw. Ähnlichkeiten) zwischen den entsprechenden Proteinsequenzen, die über das Alignment-Online-Programm EMBOSS Needle bestimmt wurden (www.ebi.ac.uk/Tools/psa/emboss_needle).

auf.^{301,302} Ein Alignment des cAdeR mit allen bekannten Adenin-Rezeptoren zeigt, dass der cAdeR im Gegensatz zu allen anderen Rezeptoren eine sieben Aminosäuren umfassende Insertion in seiner C-terminalen Domäne aufweist (Abbildung 2.4).

Schließlich wurde auch die komplette cAdeR-cDNA kloniert. Um die Klonierung zu erleichtern, wurde genomische DNA als Matrize genutzt (der Einsatz von umgeschriebener mRNA hätte aufgrund sehr geringer Ausbeuten Reamplifikationsreaktionen erfordert). Das nur neun Basenpaare umfassende Exon 1 wurde anhand von Primern an die Sequenz des Exon 2 angehängt. Die cAdeR-cDNA wurde für die spätere Expression in Insektenzellen in den Vektor pFastBacTM1 sowie für die Expression in CHO-Zellen in den Vektor pLXSN eingebracht.

2.2.2 Expression und [³H]Adenin-Bindung des cAdeR

Wie schon für Sf21-Insektenzellen beschrieben, konnte auch für Sf9-Insektenzellen gezeigt werden, dass sie eine vernachlässigbar geringe spezifische [³H]Adenin-Bindung aufweisen.^{84,271} Daher stellen Insektenzellen ein geeignetes, weil hintergrundfreies Expressionssystem für AdeR dar. Nach der Übertragung der cAdeR-cDNA aus dem pFastBacTM1-Vektor in ein Bacmid wurde dieses genutzt, um Sf9-Insektenzellen damit zu transfizieren. Die wenige Tage nach der Transfektion im Zellüberstand befindlichen Baculoviren konnten dann für die Infektion weiterer Sf9-Insektenzellen genutzt werden. Von diesen infizierten Sf9-Zellen wurde schließlich eine Membranpräparation angefertigt. Es konnte gezeigt werden, dass die Membranen von Sf9-Zellen, in denen der cAdeR zur Expression gebracht wurde, sehr hohe spezifische [³H]Adenin-Bindung aufwiesen (Abbildung 2.5). Der bis hierhin nur vorläufig als Adenin-Rezeptor bezeichnete cAdeR weist demnach also signifikante Adenin-Bindung auf.

Außerdem wurde der Rezeptor über ein retrovirales Transfektionssystem auch in CHO-Zellen exprimiert. Diese wurden als homologes Expressionssystem ausgewählt. Zwar weisen CHO-Zellen selbst Adenin-Bindung auf, jedoch ist es möglich, dass diese von dem endogen exprimierten cAdeR vermittelt wird. Somit würden alle Beobachtungen auf denselben Rezeptor zurückgehen. Tatsächlich konnte in vorläufigen homologen Kompetitionsexperimenten gezeigt werden, dass Adenin an Membranen von untransfizierten CHO-Zellen eine ähnliche Affinität aufwies wie an Membranen von transfizierten CHO-Zellen (Abbildung 2.6). Auffällig war jedoch auch, dass die

spezifische Bindung im Falle der transfizierten CHO-Zellen deutlich höher war, was auf eine höhere Bindungsstellen-Dichte in den transfizierten Zellen hindeutete.

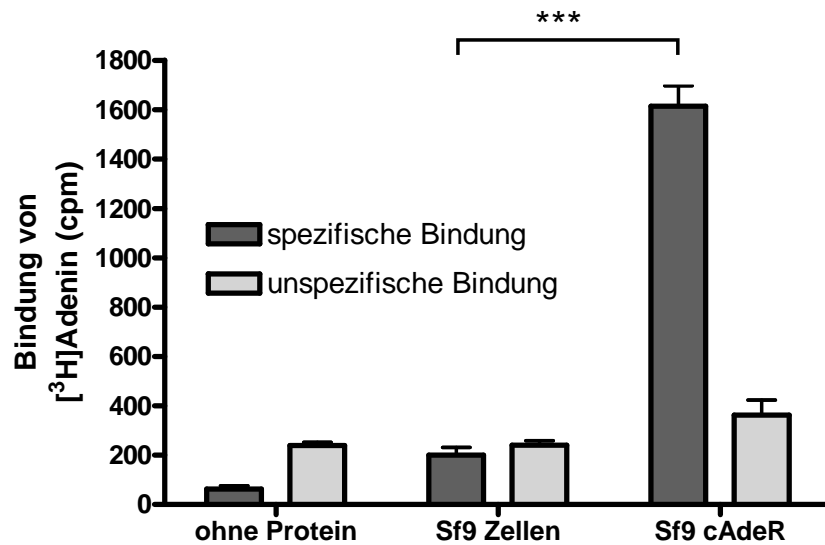


Abbildung 2.5: [³H]Adenin-Bindung an Membranpräparationen von Sf9-Insektenzellen

In Bindungsstudien wurden 10 nM des Radioliganden und folgende Proteinmengen eingesetzt: 100 µg der Membranen untransfizierter Sf9-Zellen und 25 µg der Membranen von Sf9-Zellen, die den cAdeR exprimieren. Die Daten stellen Mittelwerte ± Standardfehler von drei bis neun unabhängigen Experimenten dar, die in Triplikaten oder im Falle des cAdeR in Duplikaten durchgeführt wurden.²⁷¹ Ergebnisse eines zweiseitigen t-Tests: *** signifikanter Unterschied, $p < 0.0001$.

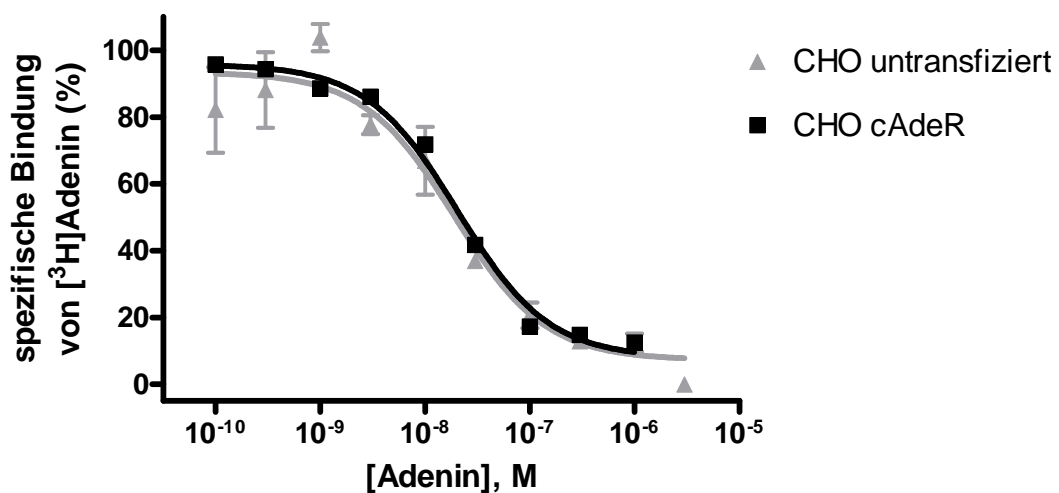


Abbildung 2.6: Homologe Konkurrenzexperimente mit [³H]Adenin gegen Adenin

Für diese Experimente wurden Membranen von untransfizierten CHO-Zellen (100 µg pro Ansatz) und Membranen von CHO-Zellen, in denen der cAdeR zur Expression gebracht wurde (50 µg pro Ansatz) eingesetzt. Dargestellt sind die Mittelwerte ± Standardfehler von drei unabhängigen Experimenten, die in Duplikaten durchgeführt wurden. CHO untransfiziert: $IC_{50} 19.2 \pm 4.6$ nM, CHO cAdeR: $IC_{50} 20.5 \pm 1.0$ nM.

Um die Affinität und die Rezeptordichte in beiden Expressionssystemen genauer zu bestimmen, wurden Sättigungsexperimente durchgeführt (Abbildung 2.7). An Membranen von Insektenzellen wies [³H]Adenin einen K_D -Wert von 301 nM und einen sehr hohen B_{max} -Wert von 17.7 pmol/mg Protein auf (siehe auch Tabelle 2.6). Damit ist die Affinität von Adenin an den cAdeR vergleichbar mit den anderen in Insektenzellen exprimierten Adeninrezeptoren (K_D : mAde1R in Sf9-Zellen 286 nM, mAde2R in Sf21-Zellen 113 nM).^{84,271} Der K_D -Wert des Radioliganden an Membranen von CHO-Zellen, in denen der cAdeR überexprimiert wurde, lag bei 79.9 nM. Dieser moderate Unterschied zwischen beiden K_D -Werten geht wahrscheinlich auf die jeweiligen Expressionssysteme zurück: Im Gegensatz zu Säugetierzellen liegen in Insektenzellen keine geeigneten G-Proteine vor, die mit GPCRs einen ternären Komplex bilden können.¹⁸ An die Konformation, die der Rezeptor im ternären Komplex einnimmt, binden Agonisten jedoch mit maximaler Affinität.¹⁸ Geht man davon aus, dass Adenin ein Agonist am cAdeR darstellt, war zu erwarten, dass [³H]Adenin mit höherer Affinität an den in CHO-Zellen durch die G-Protein-Kopplung positiv allosterisch modulierten cAdeR bindet.

Tabelle 2.6: Ergebnisse aus Sättigungsexperimenten mit [³H]Adenin^a

	$K_D \pm \text{SEM}$ (nM)	$B_{max} \pm \text{SEM}$ (pmol/mg Protein)
cAdeR in Sf9-Insektenzellen	301 \pm 25	17.7 \pm 0.7
cAdeR in CHO-Zellen	79.9 \pm 8.0	5.62 \pm 0.36
untransfizierte CHO-Zellen ^b	151	1.58

^aFür Sättigungsexperimente wurden Membranpräparationen der angegebenen Zelllinien mit verschiedenen [³H]Adenin-Konzentrationen inkubiert (siehe auch Abbildung 2.7). Die Daten stellen Mittelwerte \pm Standardfehler von drei unabhängigen Experimenten dar, die in Duplikaten durchgeführt wurden. ^bMittelwerte \pm Standardfehler aus zwei unabhängigen Experimenten, die von Aliaa Abdelrahman durchgeführt wurden.^{271,273}

Der bereits publizierte K_D -Wert, der in Sättigungsexperimenten an Membranen untransfizierter CHO-Zellen bestimmt wurde, lag bei 151 nM.^{273,295} Damit ist die Affinität der Adenin-Bindungsstellen in untransfizierten und in den mit dem cAdeR-Konstrukt transfizierten CHO-Zellen ähnlich hoch (wie zuvor schon in Kompetitions-Experimenten nachgewiesen). Gleichzeitig ist der B_{max} -Wert von Membranen untransfizierter CHO-Zellen deutlich geringer (1.58 pmol/mg Protein) als der transfizierter CHO-Zellen (5.62 pmol/mg Protein).²⁷¹ Dadurch kann ausgeschlossen werden, dass im Falle der transfizierten Zellen lediglich die Affinität der endogen exprimierten Adenin-

Bindungsstelle gemessen wurde. Aufgrund der vergleichbaren Affinität der endogenen Adenin-Bindungsstelle von CHO-Zellen und des cAdeR könnte man daher davon ausgehen, dass es sich bei beiden um dieselbe Struktur handelt. Obwohl dementsprechend auch kein biphasischer Verlauf der Sättigungskurve von Membranen transfizierter CHO-Zellen zu beobachten war, wurden die Daten dennoch erneut anhand von Gleichungen ausgewertet, die einen solchen Kurvenverlauf voraussetzen. Die Ergebnisse der einzelnen Einzelkurven wichen allerdings stark voneinander ab, weshalb die Daten am besten durch einen monophasischen Kurvenverlauf beschrieben werden konnten.

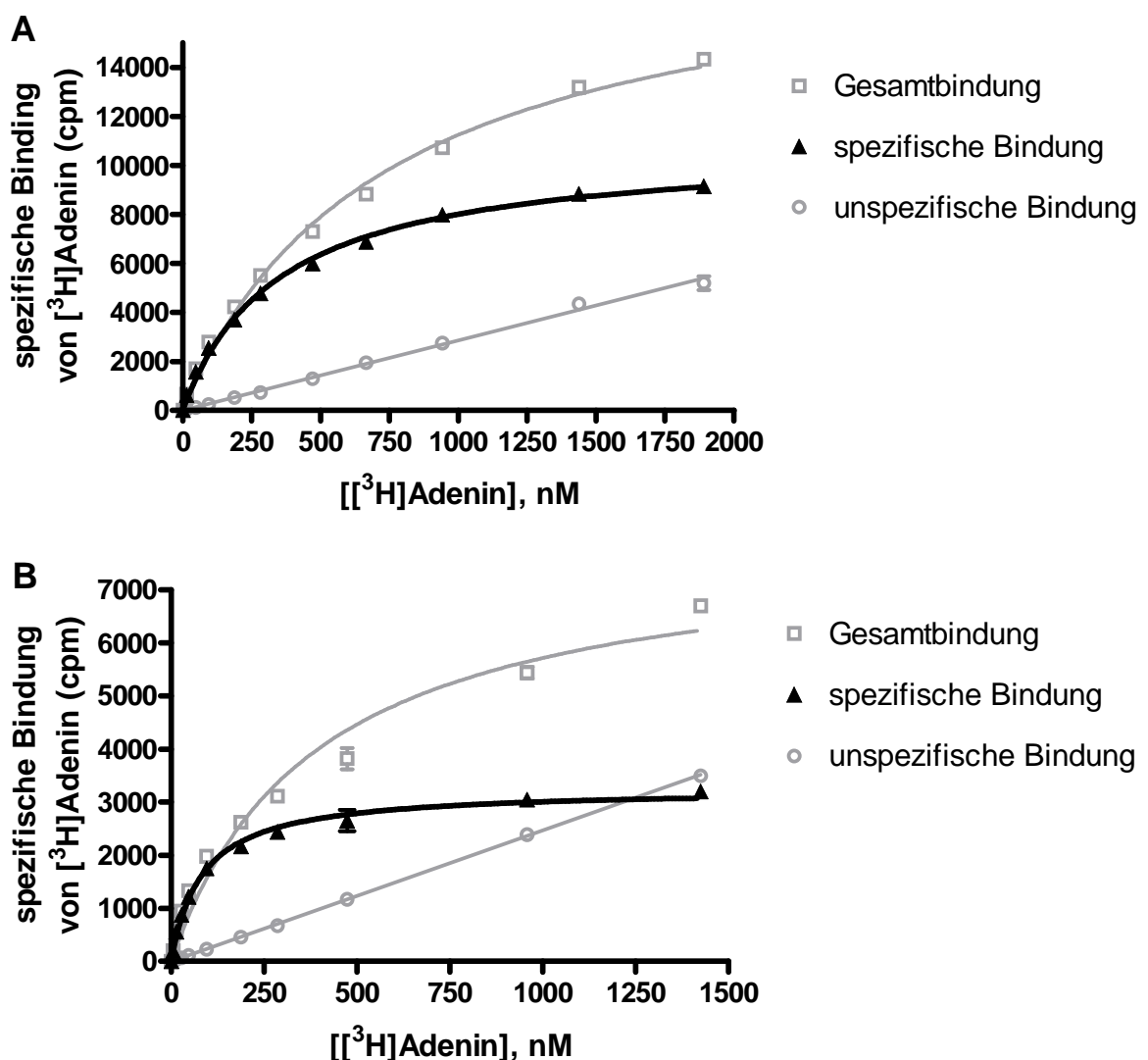


Abbildung 2.7: cAdeR: Sättigungs-Experimente mit $[^3\text{H}]$ Adenin

$[^3\text{H}]$ Adenin-Bindung an (A) Membranpräparationen von Sf9-Insekten-Zellen, in denen der cAdeR zur Expression gebracht wurde (30 μg Protein pro Ansatz) oder (B) Membranpräparationen von CHO-Zellen, in denen der cAdeR zur Expression gebracht wurde (70 μg Protein pro Ansatz). Dargestellt sind die Mittelwerte \pm Standardfehler eines typischen Experimentes, das in Duplikaten durchgeführt wurde. Die bestimmten K_D - und B_{max} -Werte sind in Tabelle 2.6 angegeben.

2.2.3 G-Protein-Kopplung des cAdeR

Um zu überprüfen, ob Adenin den cAdeR aktiviert, wurden funktionelle Experimente durchgeführt. In cAMP-Experimenten mit nicht-transfizierten und transfizierten CHO-Zellen konnte gezeigt werden, dass weder 10 noch 100 μM Adenin die Produktion von cAMP auslösten. Dagegen war Adenin in der Lage, die Forskolin-induzierte Produktion in CHO-Zellen, in denen der cAdeR überexprimiert wurde, zu hemmen (EC_{50} 51.6 nM, Abbildung 2.8, Tabelle 2.7). Dies war der Beleg dafür, dass es sich bei diesem neuen Rezeptor tatsächlich um einen AdeR handelte. Darüber hinaus konnte damit auch nachgewiesen werden, dass der cAdeR nicht G_s -, sondern wie die anderen bekannten Nager-AdeR G_i -gekoppelt ist.

Bemerkenswert ist allerdings die Tatsache, dass Adenin in untransfizierten CHO-Zellen keine verminderte cAMP-Produktion auslöste (bis zu einer Konzentration von 10 μM Adenin). Obwohl eine Beeinflussung der intrazellulären cAMP-Produktion durch Adenin in untransfizierten CHO-Zellen beschrieben wurde, konnte eine andere Arbeitsgruppe ebenfalls keine funktionelle Antwort auf die Behandlung mit Adenin in CHO-Zellen nachweisen (weder in cAMP-Akkumulations-, noch in $\text{GTP}\gamma\text{S}$ -Bindungs-Experimenten).^{78,267} Daher ist davon auszugehen, dass der cAdeR in CHO-Zellen nicht oder kaum funktionell exprimiert wird. Diese Schlussfolgerung wird durch die anscheinend sehr geringen Expressionsgrad der cAdeR-mRNA in CHO-Zellen gestützt. Diese Beobachtungen sprechen weiterhin dafür, dass der cAdeR nicht identisch zur endogen exprimierten Adenin-Bindungsstelle von CHO-Zellen ist. Publierte Ergebnisse aus [^3H]Adenin-Bindungs-Experimenten unter Einsatz des GTP-Analogons Gpp-NHp legen nahe, dass es sich bei der Adenin-Bindungsstelle in untransfizierten CHO-Zellen nicht um einen GPCR handelt (es ließ sich keine Verringerung der Affinität beobachten).²⁶⁷ Es bleibt daher unklar, wodurch die Adenin-Bindung in untransfizierten CHO-Zellen vermittelt wird. Wie in Kapitel 2.1.2 erwähnt, existieren viele (teilweise aber unbekannte) zelluläre Zielstrukturen von Adenin. Daher kann man nicht mit Gewissheit sagen, welche Zielstruktur die hoch-affine Adenin-Bindung in untransfizierten CHO-Zellen vermittelt. Klar ist jedoch, dass diese Bindungsstelle nicht im Zytoplasma lokalisiert sein kann, sondern in der Zellmembran verankert sein muss, da aufgereinigte Membranen in den Bindungsstudien untersucht wurden. Der zunächst erwogene zelluläre Knock-Out-Ansatz des cAdeR erscheint aufgrund dieser Schlussfolgerungen nicht mehr sinnvoll: Einerseits kann die endogene Adenin-Bindungsstelle dadurch nicht eliminiert werden, andererseits sind CHO-Zellen in funktionellen Experimenten ohnehin hintergrundfrei (siehe auch unten).

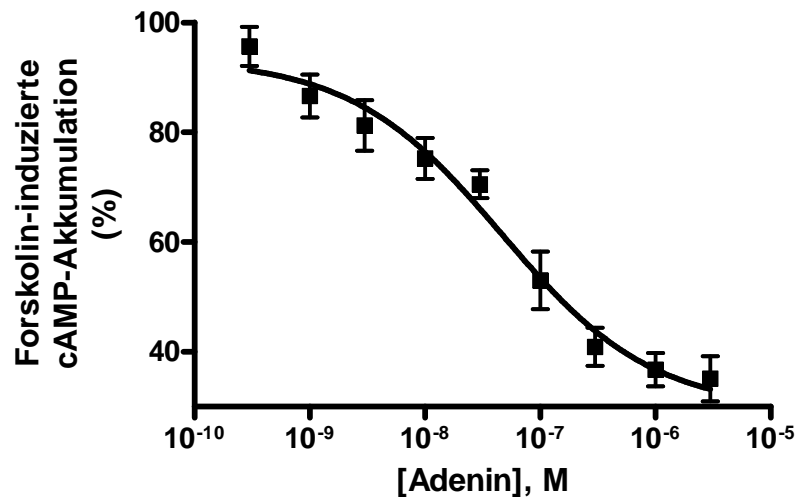


Abbildung 2.8: cAMP-Akkumulations-Experimente am cAdeR

Für die Bestimmung einer Konzentrations-Wirkungskurve von Adenin wurden CHO-Zellen genutzt, in denen der cAdeR zur Expression gebracht wurde. Angegeben ist die prozentuale Forskolin-induzierte cAMP-Produktion (10 μ M Forskolin) nach Rezeptoraktivierung durch Adenin. Die Datenpunkte stellen Mittelwerte \pm Standardfehler aus vier unabhängigen Experimenten dar, die in Duplikaten bestimmt wurden (gemäß einem F- und einem AIC-Test werden die Daten korrekt von einer Gleichung beschrieben, die einen mono- statt einen biphasischen Kurvenverlauf annimmt).

Interessanterweise konnte für den cAdeR auch eine G_q -Kopplung gefunden werden: Adenin bewirkte den Anstieg der intrazellulären Calciumionen-Konzentration in transfizierten CHO-Zellen mit einem EC_{50} -Wert von 6.24 nM (für die Experimente wurde der Calciumionen-sensitive Fluoreszenzfarbstoff Oregon Green[®] BAPTA-1/AM verwendet). Adenin löste jedoch in untransfizierten CHO-Zellen genauso wie bei cAMP-Akkumulationsexperimenten kein Signal in Calciumionen-Mobilisations-Experimenten aus (bis zu einer Adenin-Konzentration von 10 μ M). Eine G_q -Kopplung wurde bislang für keinen der anderen AdeR beschrieben. Zwar geht aus den entsprechenden Publikationen über die verschiedenen AdeR nicht klar hervor, ob eine mögliche G_q -Kopplung der Rezeptoren überprüft wurde, aber unveröffentlichte Daten unserer Gruppe zeigen, dass weder der mAde1R noch der rAdeR G_q -gekoppelt sind (die Rezeptoren wurden in 1321N1-Astrozytom-Zellen zur Expression gebracht; es wurden Konzentrationen bis zu 1 mM Adenin eingesetzt).

Tabelle 2.7: Wirksamkeit von Adenin am cAdeR und der Mutante cAdeR- Δ 321-327

Experiment	EC ₅₀ ± SEM (nM) ^a	
	cAdeR	cAdeR- Δ 321-327
cAMP-Akkumulations-Experimente	51.6 ± 8.6	n. b.
Calciumionen-Mobilisations-Experimente	6.24 ± 1.01	6.55 ± 0.88 ^{ns}
+ PTX	128 ± 11	150 ± 20 ^{ns}
ohne extrazelluläres Calcium	35.9 ± 15.1 ^{ns}	n. b.

^aZur Bestimmung der Wirksamkeit in verschiedenen funktionellen Experimenten wurden CHO-Zellen genutzt, in denen der cAdeR bzw. die Mutante cAdeR- Δ 321-327 zur Expression gebracht wurde. In cAMP-Akkumulations-Experimenten wurde die Adenin-vermittelte Hemmung der durch 10 μ M Forskolin induzierten cAMP-Produktion untersucht. In Calciumionen-Mobilisations-Experimenten wurden Adenin-vermittelte Anstiege der intrazellulären Calciumionen-Konzentration untersucht. Teilweise wurden die Zellen mit PTX (50 ng/ml) vorbehandelt, teilweise wurden die Experimente in Calcium-freiem Puffer durchgeführt (Calciumionen wurden durch Magnesiumionen ersetzt und es wurde 100 μ M EGTA zugegeben). Ergebnisse eines zweiseitigen t-Test: ^{ns}EC₅₀-Werte sind nicht signifikant unterschiedlich zu denen am cAdeR bzw. nicht signifikant unterschiedlich zum EC₅₀-Wert, der in Anwesenheit extrazellulären Calciums bestimmt wurde.

Bei genauer Betrachtung der Konzentrations-Wirkungskurve von Adenin in Calciumionen-Mobilisations-Experimenten am cAdeR fällt ein Versatz der Kurve bei etwa 100 nM Adenin auf (siehe Abbildung 2.9A, S. 68). Daher wurde die Hypothese aufgestellt, dass die Calciumionen-Mobilisation möglicherweise nicht nur durch eine Signalkaskade vermittelt wird. So ist bekannt, dass neben der G_q α - auch die G_i $\beta\gamma$ -Untereinheit die PLC aktivieren und damit eine Calciumionen-Mobilisation auslösen kann.³⁰³ Da zuvor gezeigt werden konnte, dass der Rezeptor G_i-Proteine aktiviert, wurde überprüft, ob diese auch zur Induktion der Calcium-Signale beitragen. Dazu wurden die Zellen 18 h vor der Durchführung des Calciumionen-Mobilisations-Experimentes mit PTX behandelt (50 ng/ml Medium). PTX hemmt G_i-Proteine, indem es ihre ADP-Ribosylierung katalysiert.³⁰⁴ Die mit den PTX-behandelten Zellen erhaltene Konzentrations-Wirkungskurve von Adenin wies eine deutliche Rechtsverschiebung auf (EC₅₀ ohne PTX: 6.24 nM, EC₅₀ mit PTX: 128 nM, siehe Abbildung 2.9A und Tabelle 2.7). Damit konnte gezeigt werden, dass sich das cAdeR-vermittelte Calcium-Signal aus einer G_i- und einer G_q-Komponente zusammensetzt. Der EC₅₀-Wert der Kurve, die nach Vorbehandlung mit PTX bestimmt wurde, beschreibt die Wirksamkeit von Adenin mit der die G_q-Komponente des Calciumsignals ausgelöst wird. Dieser Wert entspricht etwa der Konzentration der Kurve ohne PTX-Behandlung an der der beschriebene Versatz beobachtet werden konnte. Ohne PTX-Behandlung tritt eine Überlagerung beider Effekte auf. Die Tatsache,

dass der beschriebene Versatz der Kurve moderat ausfällt, weist aber darauf hin, dass die Efficacy des Gesamt-Calcium-Signals durch den G_q -Anteil nur minimal erhöht wird. Das bedeutet, dass der EC_{50} -Wert, der ohne die Vorbehandlung mit PTX bestimmt wurde, zwar nicht exakt, aber näherungsweise die Wirksamkeit beschreibt, mit der Adenin die G_i -Komponente des Calciumsignals auslöst.

Um zu bestimmen, ob beide an der Calcium-Mobilisation beteiligten Komponenten in die gleiche Signalkaskade münden, wurden die Zellen in einigen Experimenten kurz vor der Durchführung mit dem PLC-Inhibitor U73122 behandelt (5 μ M Endkonzentration). Da U73122 auch das zur Normalisierung genutzte ATP-Signal komplett hemmt, wurde das ATP-Signal in Abwesenheit von U73122 bestimmt. Es zeigte sich, dass U73122 das Adenin-vermittelte Calcium-Signal komplett hemmen konnte (Abbildung 2.9B). Dadurch konnte belegt werden, dass in diesem Falle den Erwartungen entsprechend nicht nur die G_q -, sondern auch die G_i -Komponente des Calcium-Signals durch die PLC vermittelt wurde. Um den unwahrscheinlichen Fall auszuschließen, dass es sich bei U73122 schlicht um einen cAdeR-Antagonisten handelte, wurde neben U73122 auch sein bezüglich der PLC-Hemmung inaktives Derivat U73343 untersucht (je 5 μ M Endkonzentration, Strukturformeln siehe Abbildung 2.9). Während U73122 das Calcium-Signal von 1 μ M Adenin nahezu komplett hemmt, führt U73343 keine Änderung des Adenin-vermittelten Calcium-Signals herbei (Abbildung 2.9C). Dies kann als wichtiger Hinweis dafür gewertet werden, dass auch U73122 das Adenin-vermittelte Signal nicht kompetitiv hemmt und die oben genannte Interpretation der Daten berechtigt ist.

Um zu bestimmen, aus welcher Quelle die Calciumionen stammen, die sich Adenin-induziert im Zytosol der Zelle anreichern, wurden einige Calciumionen-Mobilisationsexperimente in Abwesenheit von extrazellulärem Calcium durchgeführt. Dazu wurden Calciumionen im Puffer durch Magnesiumionen ersetzt. Um von den Zellen abgegebene Calciumionen zu komplexieren, wurde dem Puffer außerdem 100 μ M EGTA zugegeben.

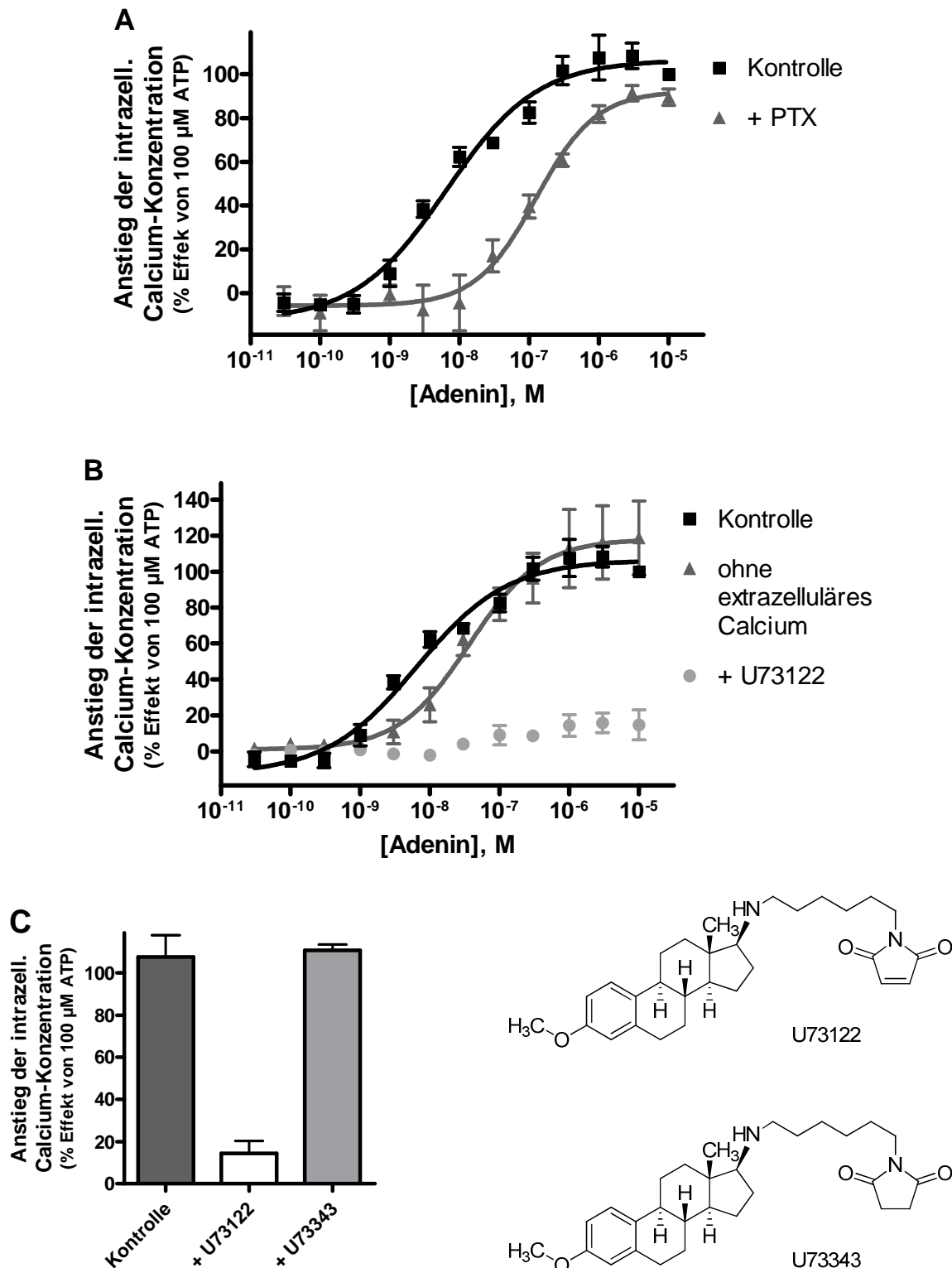


Abbildung 2.9: Calcium-Mobilisations-Experimente am cAdeR

Für die Bestimmung der Konzentrations-Wirkungskurven von Adenin wurden CHO-Zellen genutzt, in denen der cAdeR zur Expression gebracht wurde. Angegeben sind die prozentualen Anstiege der Calcium-Ionen-Konzentration (normalisiert auf den Effekt bei 100 μM ATP). Einfluss (A) von PTX (50 ng/ml, Zugabe zu den Zellen 18 h vor dem Assay), (B) fehlenden extrazellulären Calciums und des PLC-Inhibitors U73122 (5 μM , Zugabe kurz vor dem Assay) sowie (C) des PLC-Inhibitors U73122 und seines inaktiven Derivates U73343 (je 5 μM , Zugabe kurz vor dem Assay) auf das durch 1 μM Adenin ausgelösten Calcium-Signal.

Die Konzentrations-Wirkungskurve von Adenin in Abwesenheit extrazellulären Calciums war im Vergleich zu der Kurve unter Kontrollbedingungen leicht rechtsverschoben (EC_{50} -Wert 35.9 nM). Wäre die Efficacy der Kurve in Abwesenheit extrazellulären Calciums verringert, könnte man daraus schlussfolgern, dass Teile des mobilisierten Calciums aus dem Extrazellularraum stammen. Dies ist allerdings nicht der Fall. Die Tatsache, dass die Wirksamkeit von Adenin verringert ist, könnte bedeuten, dass Adenin in geringen Konzentrationen G_i -vermittelt keine Calcium-Freisetzung aus intrazellulären Calciumspeichern bewirkt, sondern einen Calcium-Influx. Interessanterweise muss dieser Calcium-Influx zudem PLC-vermittelt sein, da durch den eingesetzten PLC-Inhibitor die komplette Calcium-Mobilisation also auch dieser Influx gehemmt wurde. Der Calcium-Influx muss damit über einen Calcium-Kanal vermittelt werden, der von dem Rezeptor PLC-vermittelt gesteuert wird. Ein solcher Calcium-Kanal ist der „transient receptor potential vanilloid 4“(TRPV4)-Kanal. So konnte gezeigt werden, dass dieser Kanal durch einen GPCR PKC-abhängig gesteuert wurde.³⁰⁵ Möglicherweise ist die Kopplung von AdeR an TRPV-Kanäle sogar physiologisch relevant. So sind einzelne TRPV-Subtypen in denselben Geweben exprimiert wie AdeR, z. B. in der Niere.³⁰⁶ Weiterhin könnte man die Hypothese aufstellen, dass die proanalgetische Wirkung von Adenin durch die AdeR-abhängige Steuerung des ebenfalls proanalgetisch wirkenden TRPV1-Kanals vermittelt wird, der auch in Dorsalganglien exprimiert wird.^{281,307} Es wäre interessant zu überprüfen, ob AdeR tatsächlich mit diesen Ionenkanälen interagieren. Man muss allerdings einschränkend dazu sagen, dass die Expression von MrgA-Rezeptoren der Maus genauer untersucht wurde und diese ausschließlich in TRPV1-negativen Neuronen der Dorsalganglien exprimiert werden.²⁷⁵ Jedoch wurde nicht die Lokalisation der mAdeR-Subtypen (MrgA9 und MrgA10), sondern die anderer MrgA-Rezeptor-Subtypen untersucht.²⁷⁵ Zudem unterschied sich die Expression der untersuchten MrgA-Rezeptoren teilweise deutlich zwischen den verschiedenen Neuronen-Subpopulationen.²⁷⁵ Daher kann nicht ausgeschlossen werden, dass AdeR und TRPV1-Kanäle in derselben Neuronen-Subpopulation koexprimiert werden.

Letztlich kann der Calciumionen-Influx allerdings nicht durch den gleichen Mechanismus wie beim TRPV4 erklärt werden: Der TRPV4 wurde durch die PKC aktiviert. Die Aktivierung dieser Proteinkinase ist allerdings der Calciumionen-Mobilisation nachgeschaltet. Damit kann über Kanäle wie den TRPV4 ein Calcium-induzierter Calcium-Influx erfolgen. Da der Influx aber anscheinend schon durch sehr geringe Adenin-Konzentrationen ausgelöst wird – also bei solchen, bei denen gemäß den Daten noch keine Freisetzung von Calcium aus intrazellulären Speichern erfolgt – kann es sich

in dem untersuchten Fall nicht um einen Calcium-induzierten Calcium-Influx handeln. Darüber hinaus muss man sagen, dass der EC_{50} -Wert bei fehlendem extrazellulärem Calcium im Vergleich zur Kontrolle zwar um den Faktor 6 erhöht ist, diese Erhöhung aber nicht statistisch signifikant ausfällt. Dies liegt in erster Linie an dem großen Standardfehler des EC_{50} -Wertes der bei Experimenten mit Calcium-freiem Puffer bestimmt wurde. Dieser große Standardfehler wiederum könnte ein Anzeichen dafür sein, dass die Zellen durch das Fehlen extrazellulären Calciums geschädigt werden. Dieser Zustand bedeutet großen Stress für die Zellen und führt bei längerer Inkubation zum ihrem Absterben. Sowohl die schlechte Reproduzierbarkeit der Experimente als auch der verringerte EC_{50} -Wert von Adenin könnte auf eine Schädigung der Zellen z. B. durch die Veränderung des Membranpotentials zurückgehen. In weiteren Untersuchungen könnte unter Einsatz diverser Inhibitoren die Quelle der mobilisierten Calciumionen genauer untersucht werden. Da Adenin jedoch auch bei Experimenten mit Calcium-freiem Puffer hochwirksam und potent den Anstieg der intrazellulären Calcium-Konzentration ausgelöst hat, kann man davon ausgehen, dass der größte Anteil des durch Adenin mobilisierten Calciums aus intrazellulären Speichern stammt.

Bei den vorgestellten funktionellen Experimenten mit Adenin muss berücksichtigt werden, dass mit intakten Zellen gearbeitet wurde. Diese Zellen können Adenin aufnehmen, wodurch die extrazelluläre Konzentration dieses Agonisten herabgesetzt worden sein könnte. Man muss sich also die Frage stellen, ob die Wirksamkeit von Adenin unterschätzt wurde. Tatsächlich konnte gezeigt werden, dass CHO-Zellen Transportsysteme zur Aufnahme von Adenin besitzen.³⁰⁸ Mit einem K_m -Wert von 2.11-2.55 mM ist allerdings zu erwarten, dass Adenin bei für die funktionellen Assays eingesetzten Konzentrationen von maximal 10 μ M nur sehr langsam in die Zelle transportiert wird.³⁰⁸ Besonders für Calciumionen-Mobilisations-Experimente, bei denen Signale ausgewertet werden, die Nanosekunden nach Zugabe des Agonisten erhalten wurden, spielt die langsame Aufnahme von Adenin in die Zelle wahrscheinlich keine Rolle. In der 15-minütigen Inkubation des Agonisten mit den Zellen, die beim cAMP-Akkumulations-Experiment vorgenommen wurde, kann nicht ausgeschlossen werden, dass ein nicht vernachlässigbarer Anteil von Adenin in die Zelle aufgenommen wurde. Bislang sind allerdings vornehmlich äquilibriative Transport-Systeme für Adenin bekannt. Da das intrazelluläre Volumen der Zellen im Vergleich zum Gesamtvolumen des Ansatzes in dem das Experiment durchgeführt wurde vernachlässigbar gering ist, würde man bei einer äquilibrativen Verteilung von Adenin keine massive Aufnahme von Adenin erwarten. Deshalb würde die extrazelluläre Konzentration von Adenin auch kaum

abnehmen. Allerdings ist nicht bekannt, wie effizient das „purine salvage“ in CHO-Zellen abläuft, das bei äquibrativen Prozessen eine treibende Kraft für die massive Aufnahme von Adenin in die Zelle sein könnte. Obwohl man die unterschiedlichen funktionellen Experimente nur bedingt vergleichen kann, könnte es sein, dass der in cAMP-Akkumulations-Experimenten bestimmte EC_{50} -Wert (51.6 nM) auch deshalb geringer ist als der in Calciumionen-Mobilisations-Experimenten bestimmte Wert (6.24 nM), weil die zelluläre Aufnahme von Adenin im Falle der cAMP-Akkumulations-Experimente möglicherweise größer ausfällt (beide EC_{50} -Werte beschreiben die Wirksamkeit von Adenin ein G_i -vermitteltes Signal des Rezeptors auszulösen). Man kann also zusammenfassen, dass durch die Aufnahme von Adenin in die Zellen die Wirksamkeit von Adenin möglicherweise unterschätzt wurde. Wahrscheinlich ist die sich daraus ergebende Abweichung aber vernachlässigbar gering.

Eine G_q -Kopplung wurde bislang für keinen anderen AdeR beschrieben. Diese Eigenschaft ist also einzigartig für den cAdeR. Weiterhin ist für den cAdeR auch eine sieben Aminosäuren umfassende Insertion in seiner C-terminalen Domäne einzigartig (siehe Abbildung 2.4, S. 59). Man kann sich die Frage stellen ob diese beiden Besonderheiten zusammenhängen: Möglicherweise wird die G_q -Kopplung des cAdeR zumindest teilweise durch diese zusätzlichen Aminosäuren vermittelt. Um diese Hypothese zu überprüfen wurde eine Deletionsmutante generiert, der die genannten zusätzlichen Aminosäuren fehlen: cAdeR- Δ 321-327. Diese Deletionsmutante wurde in CHO-Zellen zur Expression gebracht und in Calciumionen-Mobilisations-Experimenten untersucht. In Abwesenheit von PTX bewirkte Adenin hochwirksam den Anstieg der intrazellulären Calciumionen-Konzentration (EC_{50} 6.55 nM, siehe auch Tabelle 2.7 und Abbildung 2.10). Nach Behandlung der Zellen mit PTX konnte eine Rechtsverschiebung der Konzentrations-Wirkungskurve beobachtet werden (EC_{50} 150 nM). Die untersuchten pharmakologischen Eigenschaften dieser Deletionsmutante sind damit praktisch identisch mit denen, die für den Wildtyp-Rezeptor bestimmt wurden (vergleiche Abbildung 2.9A mit Abbildung 2.10, EC_{50} -Werte sind nicht signifikant unterschiedlich, siehe auch Tabelle 2.7). Die anscheinend einzigartige G_q -Kopplung des cAdeR kann also nicht so einfach erklärt werden, wie zunächst angenommen. Andere als dieser offensichtliche Sequenzunterschied im Vergleich zu den AdeR von Maus und Ratte könnten für die G_q -Kopplung des cAdeR verantwortlich sein.

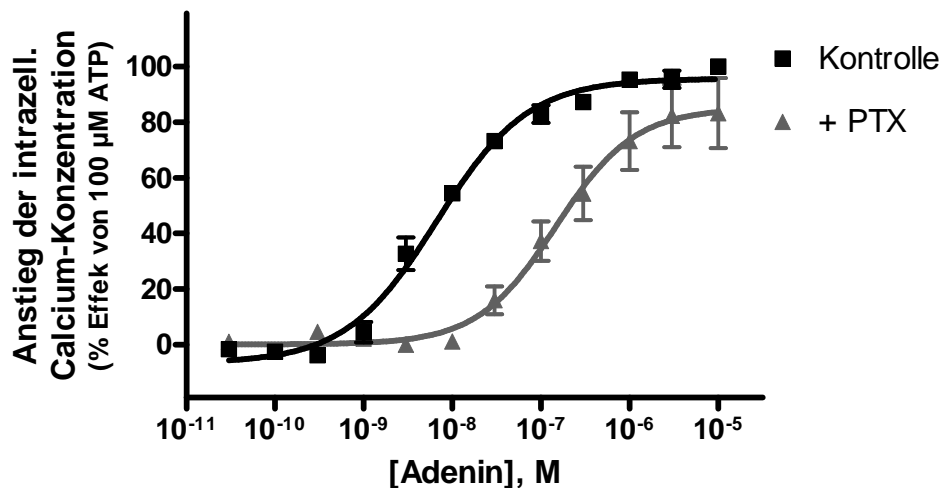


Abbildung 2.10: Calcium-Mobilisations-Experimente an der cAdeR-Mutante $\Delta 321-327$

Für die Bestimmung der Konzentrations-Wirkungskurven von Adenin wurden CHO-Zellen genutzt, in denen die cAdeR-Mutante zur Expression gebracht wurde. Angegeben sind die prozentualen Anstiege der Calcium-Ionen-Konzentration (normalisiert auf den Effekt bei 100 μ M ATP). Angegeben ist außerdem der Einfluss von PTX (50 ng/ml, Zugabe zu den Zellen 18 h vor dem Assay) auf die Adenin-induzierten Calcium-Signale.

Doch auch andere Erklärungen sind denkbar: Mit dem verwendeten Transfektionssystem können sehr hohe Rezeptordichten erreicht werden. Es ist bekannt, dass GPCRs bei sehr hoher Expression neben dem für den Rezeptor üblichen Signalweg auch andere unübliche Signalwege auslösen können.⁸⁹ Allerdings wurden die in unserer Arbeitsgruppe untersuchten rAdeR und mAde1R ebenfalls unter Einsatz des hier eingesetzten retroviralen Transfektionssystems zur Expression gebracht. Sie weisen jedoch trotz vermutlich hoher Expressionslevel keine G_q -Kopplung auf.^{271,309} Man muss einschränkend dazu sagen, dass diese beiden Rezeptoren im Gegensatz zum cAdeR in 1321N1-Astrozytom-Zellen zur Expression gebracht wurden. Dies könnte einen Einfluss auf die erreichte Rezeptordichte haben. Allerdings ist der Grad der erreichbaren Rezeptordichte nur eine nachrangige von vielen Eigenschaften in denen sich beide Expressionssysteme potentiell unterscheiden. Es konnte gezeigt werden, dass die allosterische Modulation von GPCRs Einfluss auf die Art der Signalweiterleitung des Rezeptors nehmen kann.³¹⁰ Es ist anzunehmen, dass sich das Set an akzessorischen Proteinen, die modulierend auf GPCRs einwirken können, in beiden Expressionssystemen unterscheidet, besonders da beide Zelllinien aus ganz unterschiedlichen Ursprungsgeweben abgeleitet wurden.¹⁶ Daher wäre es interessant zu überprüfen, ob andere AdeR in CHO-Zellen ebenfalls G_q -gekoppelt sind. Eine ungewöhnliche G_q -Kopplung in CHO-Zellen konnte auch schon für andere GPCRs

gefunden werden, z. B. für den M_2 -Acetylcholin-Rezeptor, der in der Regel G_i -gekoppelt ist.^{311,312} Interessant ist in diesem Zusammenhang aber auch eine Beobachtung, die für den rAdeR gemacht wurde: Man konnte zeigen, dass die Aktivierung des endogen exprimierten rAdeR in einer Zelllinie, die sich von hepatischen Sternzellen ableitet, den Anstieg der intrazellulären Calciumionen-Konzentration vermindert.²⁸² Dies ist ein für GPCRs ungewöhnlicher Effekt. Möglicherweise könnte also auch der rAdeR G_q -gekoppelt sein, aber die der Rezeptoraktivierung folgende Inhibition des Anstiegs der intrazellulären Calciumionen-Konzentration könnte den G_q -Effekt aufheben. Man könnte sogar weiter spekulieren, dass diese paradoxen Signale auch physiologisch relevant sein könnten: Möglicherweise überwiegt gewebespezifisch eines der beiden Signale, wodurch eine Zelltyp-abhängige Kopplung des Rezeptors erreicht werden könnte. Auch wenn man diese Möglichkeit nicht ausschließen kann, erscheint sie doch unwahrscheinlich. Man kann darüber hinaus auch hinterfragen, ob die Verringerung der intrazellulären Calciumionen-Konzentration wirklich auf den rAdeR zurückgeht. Da bis vor kurzem keine Antagonisten der AdeR bekannt waren, konnte ein solcher zwar nicht eingesetzt werden, doch hätte man auch in diesen Experimenten siRNA-Ansätze durchführen können, mit denen auch viele weitere Aussagen derselben Studie gestützt wurden.²⁸² Es erscheint am wahrscheinlichsten, dass die G_q -Kopplung von AdeR entweder Ortholog-spezifisch ist oder vom Expressionssystem abhängt. Für den Fall, dass man diesen Aspekt der Pharmakologie von AdeR weiter erforschen wollte, wäre ein nächster möglicher Schritt die Expression von rAdeR in CHO-Zellen, um diesen Rezeptor dann in Calcium-Mobilisations-Experimenten zu untersuchen.

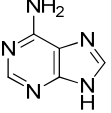
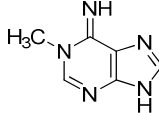
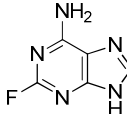
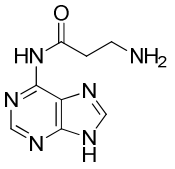
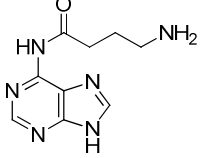
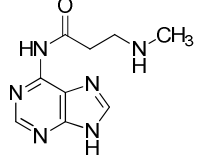
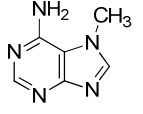
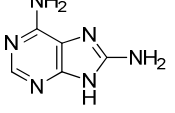
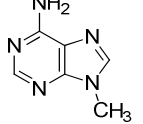
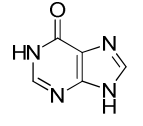
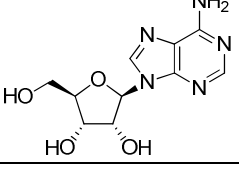
2.2.4 Struktur-Wirkungs-Beziehungen

Einerseits stellen CHO-Zellen ein für funktionelle Studien geeignetes Expressionssystem für AdeR dar, da sie selbst keine funktionalen AdeR exprimieren. Andererseits konnte in dieser Studie festgestellt werden, dass CHO-Zellen sehr wohl eine endogene Adenin-Bindungsstelle exprimieren. Diese Tatsache lässt diese Zelllinie als ungeeignet erscheinen wenn es darum geht, ein Expressionssystem für AdeR zu finden, um die Rezeptoren in Bindungsstudien untersuchen zu können. Aus diesem Grund wurden für Bindungsstudien am cAdeR Membranen infizierter Sf9-Insektenzellen (und damit ein hintergrundfreies Expressionssystem) genutzt. In Bindungsstudien mit [3 H]Adenin wurde die Affinität einer Reihe ausgewählter Adenin-Derivate am cAdeR bestimmt (siehe Tabelle 2.8 und Abbildung 2.11). Von der höchsten zur niedrigsten Affinität ergab sich

folgende Reihenfolge der getesteten Verbindungen: 2-Fluoradenin \geq Adenin $>$ PSB-09073 \approx PSB-09097 \approx PSB08162 $>$ 7-Methyladenin \approx 8-Aminoadenin $>$ 1-Methyladenin $>$ 9-Methyladenin $>$ Hypoxanthin, Adenosin.

Sowohl Adenosin wie auch Hypoxanthin banden nicht an den cAdeR. Dies macht deutlich, dass es sich bei der untersuchten Bindungsstelle nicht um bereits bekannte Bindungsstellen für Purine handelt wie Adenosin-Rezeptoren und Nucleobase- oder Nucleosid-Transporter.^{121,123,124,289} Es ist nicht überraschend, dass der große Ribosyl-Rest des Adenosins zu einer deutlichen Verringerung der Affinität im Vergleich zu Adenin führt. Jedoch bewirken auch kleine Substituenten wie eine Methylgruppe in 9-Position des Adenin-Moleküls eine stark verringerte Affinität. Dies weist darauf hin, dass Substituenten in 9-Position grundsätzlich nicht vom cAdeR toleriert werden. Auch das Einführen einer Methylgruppe in 1-Position führt zu einer deutlichen Reduktion der Affinität im Vergleich zu Adenin um den Faktor 151 (K_i 10400 nM). Dies könnte daran liegen, dass die Methylgruppe die Bindung des Liganden stört, da der Ligand mit einem Substituenten in dieser Position nicht mehr in die Bindungstasche des Rezeptors passen könnte. Möglicherweise dient das unsubstituierte N1 bei der Interaktion zwischen Ligand und Rezeptor auch als Wasserstoffbrücken-Akzeptor, der sterisch durch den Methylsubstituenten des 1-Methyladenins nicht mehr zugänglich ist. Wenn man die Ergebnisse von Adenin und Hypoxanthin miteinander vergleicht, wird deutlich, dass die Aminogruppe in 6-Position des Adenins essentiell für die Bindung von Adenin ist. Damit kann man vermuten, dass diese Aminogruppe durch ihre Funktion als Wasserstoffbrücken-Donator entscheidend für die hochaffine Bindung des Adenins ist. Für den Fall des 1-Methyladenins könnte es somit auch sein, dass der Verlust eines Wasserstoffatoms beim Imin im Vergleich zum Amin in 6-Position zu dem Wegfall einer möglichen Wasserstoffbrücke zwischen Ligand und Rezeptor führt. Obwohl Adenin-Derivate mit N⁶-Substituenten eine moderate, etwa 5fache Affinitäts-Reduktion aufwiesen, wird deutlich, dass in dieser Position im Gegensatz zu fast allen anderen Positionen auch größere Substituenten relativ gut toleriert werden (K_i : PSB-09073, 335 nM; PSB-09097, 386 nM; PSB-08162, 389 nM).

Tabelle 2.8: Affinitäten ausgewählter Adenin-Derivate am cAdeR

Verbindung	Struktur	$K_i \pm \text{SEM}$ (nM) ^a (% Inhibition \pm SEM) ^b
1, Adenin		68.8 \pm 4.8
2, 1-Methyladenin		10400 \pm 800
4, 2-Fluoradenin		47.4 \pm 4.6
25, PSB-09073		335 \pm 34
26, PSB-09097		386 \pm 40
27, PSB-08162		389 \pm 11
9, 7-Methyladenin		3760 \pm 590
10, 8-Aminoadenin (PSB-09032)		4760 \pm 10
11, 9-Methyladenin		~ 100000 (57 \pm 2)
12, Hypoxanthin		> 100000 (19 \pm 2)
16, Adenosin		> 100000 (11 \pm 4)

^aIn Bindungsstudien mit 10 nM [³H]Adenin wurden Membranen von Sf9-Zellen eingesetzt, in denen der cAdeR zur Expression gebracht wurde. Angegeben sind Mittelwerte \pm Standardfehler aus drei bis vier unabhängigen Experimenten, die in Duplikaten durchgeführt wurden.

^bVortestungen wurden bei einer Konzentration von 100000 nM durchgeführt.

Die Einführung einer Aminogruppe in 8-Position führte zu einer deutlichen Verringerung der Affinität um den Faktor 69 (K_i 4760 nM). Ein ähnliches Bild ergibt sich nach dem Einführen eines Methylsubstituenten in 7-Position (K_i 3760 nM). In beiden Fällen könnte dies auf eine sterische Blockade der Bindung zurückzuführen sein, weil der Ligand durch die räumliche Erweiterung in diesen benachbarten Positionen möglicherweise nicht mehr in die Bindungstasche des Rezeptors passt. Für 7-Methyladenin ergibt sich durch den Substituenten auch der Verlust eines Wasserstoffbrücken-Donators in 9-Position. Die gleiche Erklärung könnte genauso für den starken Affinitätsverlust des 9-Methyladenins gelten. Grundsätzlich kann also festgehalten werden, dass nahezu alle strukturellen Veränderungen des Adenin-Moleküls zu einer deutlichen Verringerung der Affinität der entsprechenden Verbindungen führt.

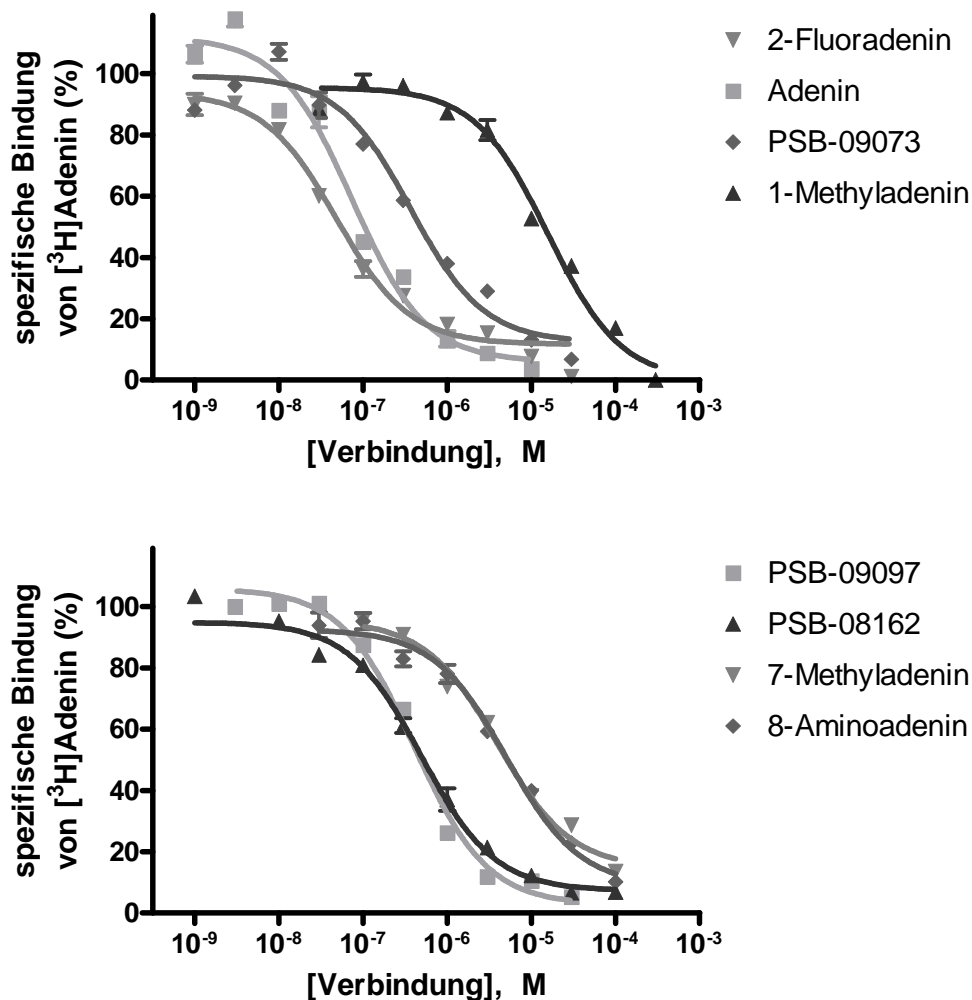


Abbildung 2.11: Kompetitions-Experimente am cAdeR

In Bindungsstudien mit 10 nM [³H]Adenin wurden Membranen von Sf9-Zellen eingesetzt, in denen der cAdeR zur Expression gebracht wurde. Dargestellt sind Mittelwerte \pm Standardfehler aus drei bis vier unabhängigen Experimenten, die in Duplikaten durchgeführt wurden. Die bestimmten K_i -Werte sind in Tabelle 2.8 angegeben.

Lediglich 2-Fluoradenin weist mit einem K_i -Wert von 47.4 nM ähnliche bzw. minimal höhere Affinität zum cAdeR im Vergleich zu Adenin auf. Das Fluoratom besitzt einen ähnlichen Radius wie das beim Adenin in dieser Position vorliegende Wasserstoffatom, weist jedoch eine deutlich höhere Elektronegativität auf, die vom cAdeR gut toleriert zu werden scheint. Im Gegensatz dazu kann an den anderen AdeR eine verringerte Affinität von 2-Fluoradenin beobachtet werden (rAdeR: 20fach, mAde1R 2fach, mAde2R 21fach geringere Affinität als Adenin).

Vergleicht man die Affinität dieser ausgewählten Adenin-Derivate am cAdeR mit denen an den anderen AdeR fällt auf, dass Adenin stets den bzw. einen der potentesten Liganden aller AdeR darstellt (siehe Tabelle 2.9). Deutliche Spezies-Unterschiede gibt es im Falle von 2-Fluoradenin und der N⁶-substituierten Adenin-Derivate: Während ein Fluoratom in 2-Position am cAdeR eine leicht erhöhte Affinität bewirkt, führt es bei den murinen AdeR zu einer deutlichen Affinitätsverringering. Während sich bei der 2-Fluor-Substitution nur der cAdeR anders verhält, sind bei den N⁶-substituierten Adenin-Derivaten für jede der drei Spezies unterschiedliche Struktur-Wirkungs-Beziehungen zu beobachten: Während am cAdeR die Kettenlänge der N⁶-Substitution unwichtig erscheint, ist am rAdeR eine kürzere Kettenlänge vorteilhaft. Genau das Gegenteil ist bei den beiden AdeR-Subtypen der Maus der Fall (vgl. PSB-09073 und PSB-09097). Ein entscheidender Unterschied in den Struktur-Wirkungs-Beziehungen zwischen den AdeR und einer humanen Adenin-Bindungsstelle, die endogen von HEK293-Zellen exprimiert wird, lässt sich besonders für 8-Aminoadenin feststellen: Während die Verbindung an allen Nager-AdeR eine im Vergleich zu Adenin drastisch reduzierte Affinität aufweist, ist sie an der humanen Bindungsstelle sogar etwas affiner als Adenin (K_i : Adenin, 47.1 nM; 8-Aminoadenin, 34.1 nM).⁸⁸ Solche deutlichen Unterschiede besonders zwischen einem möglichen humanen AdeR und den Nager-AdeR sind zu erwarten, da der hAdeR wahrscheinlich einen weit geringeren Grad an Homologie zu den Nager-AdeR aufweist als diese untereinander. Schließlich ist die Familie der MrgA-Rezeptoren, aus der alle Nager-AdeR stammen, nicht im Menschen konserviert.^{275,277} Grundsätzlich kann man jedoch sagen, dass sich zwar nicht identische aber doch ähnliche Tendenzen in den Struktur-Wirkungs-Beziehungen zwischen den vier bekannten Adenin-Rezeptoren sowie der noch unbekannt humanen Adenin-Bindungsstelle feststellen lassen.^{84,88,271}

Tabelle 2.9: Affinitäten ausgewählter Adenin-Derivate an Nager-Adenin-Rezeptoren

Verbindung	K_i oder $IC_{50} \pm SEM$ (nM), (% Inhibition $\pm SEM$) ^a			
	cAdeR ^b	rAdeR ^c	mAde1R ^d	mAde2R ^e
1 , Adenin	68.8 \pm 4.8	29.9 ^f	189 ^j	68.5 ^l
2 , 1-Methyladenin	10400 \pm 800	29300 ^f	4600 ^j	~100000 ^l
4 , 2-Fluoradenin	47.4 \pm 4.6	622 ^f	431 ^j	1470 ^l
25 , PSB-09073	335 \pm 34	21.5 ^g	5940 ^k	3510 ^m
26 , PSB-09097	386 \pm 40	80.5 ^g	445 ^k	375 ^m
27 , PSB-08162	389 \pm 11	292 ^g	391 ^k	n. b.
9 , 7-Methyladenin	3760 \pm 590	4130 ^f	564 ^j	5760 ^l
10 , 8-Aminoadenin	4760 \pm 10	6510 ^h	3760 ^j	n. b.
11 , 9-Methyladenin	~ 100000 (57 \pm 2)	17500 ^f	~100000 ^j	n. b.
12 , Hypoxanthin	> 100000 (19 \pm 2)	45000 ⁱ	>100000 ^j	>100000 ^l
16 , Adenosin	> 100000 (11 \pm 4)	>100000 ^f	>100000 ^j	n. b.

^aAngegeben sind die Mittelwerte \pm Standardfehler aus drei bis neun unabhängigen Experimenten. Screenings wurde bei einer Konzentration von 100000 nM durchgeführt (die prozentuale Inhibition der Radioligand-Bindung bei dieser Konzentration ist in Klammern angegeben); n. b. = nicht bestimmt

^bZur Bestimmung der Affinität am cAdeR wurden in Bindungsstudien Membranen von Sf9-Zellen eingesetzt, in denen der cAdeR zur Expression gebracht wurde. Diese Werte wurden im Rahmen dieser Doktorarbeit erhoben; alle anderen Werte stammen aus den angegebenen Quellen.

^cZur Bestimmung der Affinität am rAdeR wurden in Bindungsstudien Membranen des Rattenhirn-Cortex verwendet.

^dZur Bestimmung der Affinität am mAde1R wurden in Bindungsstudien Membranen von Sf9-Zellen eingesetzt, in denen der mAde1R zur Expression gebracht wurde.

^eZur Bestimmung der Affinität am mAde2R wurden in Bindungsstudien Membranen von Sf21-Zellen eingesetzt, in denen der mAde2R zur Expression gebracht wurde.

^f K_i -Werte stammen aus einer Publikation von Gorzalka et al.²⁶⁹

^g K_i -Werte stammen aus einem Patent von Müller et al.³¹³

^h K_i -Werte stammen aus einer Publikation von Borrmann et al.⁸⁸

ⁱ K_i -Wert stammt aus einer Publikation von Schiedel et al.²⁸⁹

^j K_i -Werte stammen aus einer Publikation von Thimm et al.²⁷¹

^k K_i -Werte wurden der Dissertation von Melanie Knospe entnommen³⁰⁹

^l IC_{50} -Werte (versus 10 nM [³H]Adenin) stammen aus einer Publikation von von Kügelgen et al.⁸⁴

^m IC_{50} -Werte (versus 10 nM [³H]Adenin) wurden der Diplomarbeit von Bernt Alsdorf entnommen.³¹⁴

2.2.5 Ausblick und Zusammenfassung

Die hier vorgestellte Entdeckung eines neuen AdeR des Chinesischen Streifenhamsters kann nützliche Informationen liefern, um die Erforschung der gesamten Rezeptorklasse weiter voranzutreiben. Noch gibt es neben Adenin kaum hochaffine Liganden und mit PSB-08162 ist bislang nur ein Antagonist für diesen Rezeptor beschrieben worden.²⁸⁰

Bei dem rationalen Design neuer hochaffiner Liganden könnte ein gutes Homologie-Modell von Nutzen sein. Es konnte allerdings gezeigt werden, dass die in der Vergangenheit entwickelten Modelle die Lokalisation der Liganden-Bindungstasche nicht vorauszusagen vermochten.^{268,291} Um trotz des Mangels an einer gut geeigneten Struktur-Vorlage bestehende Homologie-Modelle entscheidend zu verbessern, wären Mutagenese-Studien hilfreich. Für den P2Y₁₂-Rezeptor konnte in einer umfassenden Studie gezeigt werden, dass die für den Rezeptor bedeutsamsten Aminosäuren meist in orthologen Sequenzen hochkonserviert sind.³¹⁵ Auf Basis dieser Annahme kann der Vergleich aller AdeR-Sequenzen bei der Identifizierung der möglichen Liganden-Bindungstasche helfen. Jedoch war die Anzahl hochkonservierter Aminosäuren zwischen den Nager-AdeR relativ hoch. Natürlich können nicht alle diese hochkonservierten Aminosäuren an der Liganden-Bindung beteiligt sein. Um wirklich auf die für die Liganden-Bindung-verantwortlichen Aminosäuren zu fokussieren, wurde ein zweiter Schritt durchgeführt: Der Abgleich der Sequenzen von AdeR mit nahe verwandten Rezeptoren die nicht durch Adenin aktiviert werden. Zuerst erfolgte der Abgleich mit der Sequenz des mMrgA2.⁷⁸ Die Aminosäuren, die nur in den AdeR, nicht aber im mMrgA2 hochkonserviert sind, könnten potentiell an der Bindung von Adenin beteiligt sein. Um die Zahl der interessanten Aminosäuren noch weiter einzugrenzen, erfolgte ein weiterer Abgleich der AdeR-Sequenzen mit den humanen MrgX1-4-Rezeptor-Sequenzen. Es konnte gezeigt werden, dass diese Rezeptoren ebenfalls nicht durch Adenin aktiviert werden.⁷⁸ Bezieht man alle Aminosäuren in die Überlegung zu einer potentiellen Beteiligung an der Ligandenbindung ein, die in allen AdeR, aber nicht im mMrgA2 und auch nicht in den human MrgX-Rezeptoren konserviert sind und die zusätzlich in Domänen des Rezeptors liegen, die für Liganden zugänglich sind, erhält man eine überschaubare Anzahl von nur 9 Aminosäuren (siehe Abbildung 2.12). Aminosäuren des äußeren N-Terminus, auf die die genannten Kriterien zutreffen, wurden nicht berücksichtigt, da zumindest für den rAdeR gezeigt wurde, dass Teile der N-terminalen Domäne des Rezeptors abgespalten werden und somit nicht an der Ligandenbindung beteiligt sein können.²⁶⁸

Bei den genannten neun Aminosäuren handelt es sich um Cys91 (TMD2), Pro106 (ECL1), Ala124 (TMD3), Asp181 (ECL2), Lys183 (ECL2), Ser193 (ECL2), Phe205 (TMD5), Trp253 (TMD6) und Phe254 (ECL3, die Nummerierung der Aminosäuren richtet sich nach der Sequenz des für diese Rezeptorklasse prototypischen rAdeR). Keine dieser Aminosäuren wurden in der bislang einzigen Mutagenese-Studie an AdeR untersucht.²⁶⁸

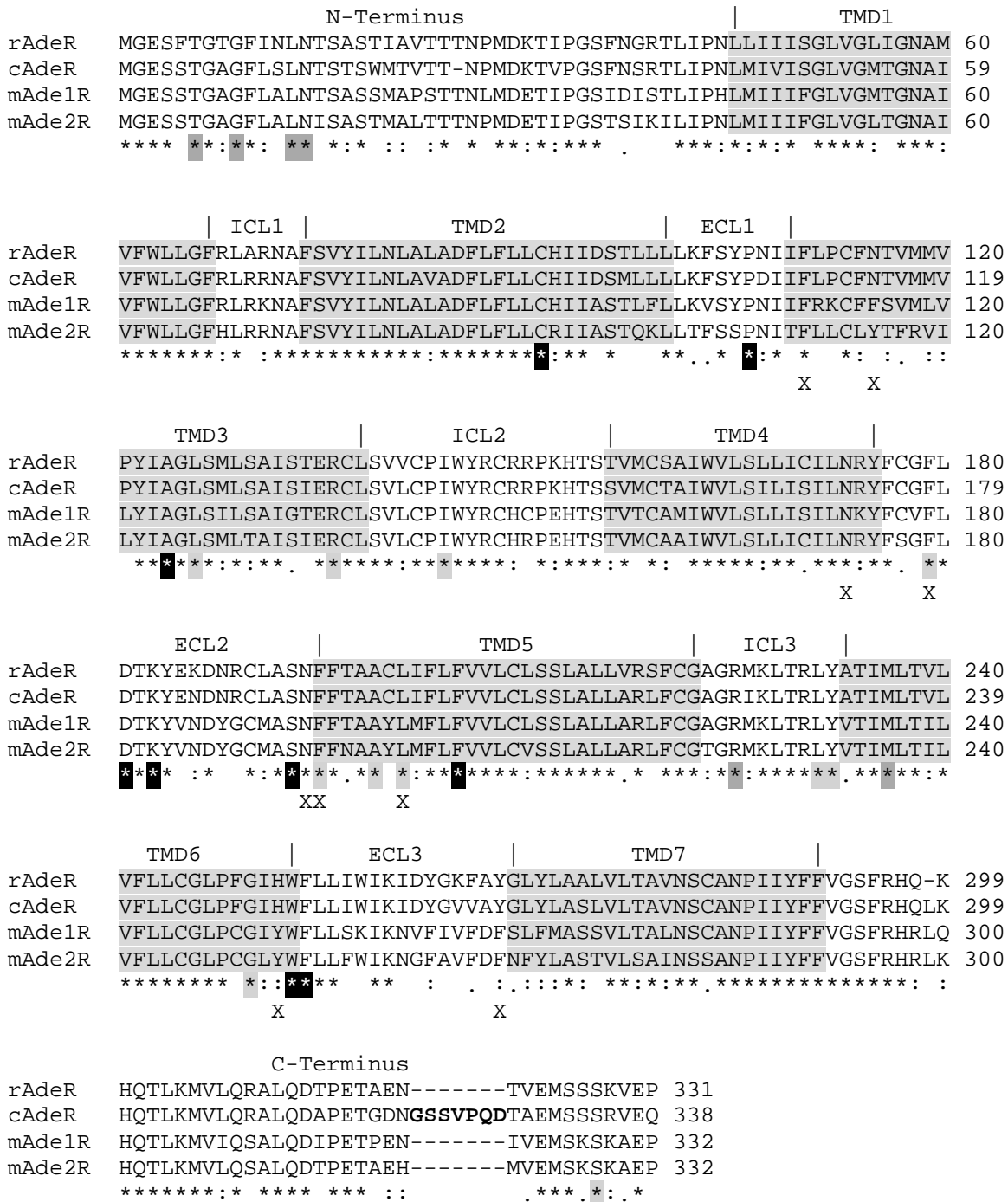


Abbildung 2.12: Potentiell zur AdeR-Liganden-Bindungstasche gehörige Aminosäuren

Aminosäuren wurden im Einbuchstaben-Code angegeben. Aminosäuren der Transmembrandomänen wurden hellgrau unterlegt. Bedeutung der Symbole: Sternchen = identische Aminosäuren, Doppelpunkt = konservierter Aminosäuren-Austausch, Punkt = semi-konservierter Aminosäuren-Austausch, X = Aminosäure, die in Mutagenese-Studien am rAdeR ausgetauscht wurde,²⁶⁸ hellgrau unterlegte Sternchen: Aminosäuren, die nicht im mMrgA2 (NP_694741.2) aber in allen humanen MrgX-Rezeptoren konserviert sind; dunkelgrau unterlegte Sternchen: Aminosäuren, die nicht im mMrgA2 und nicht in den humanen MrgX-Rezeptoren konserviert sind; schwarz unterlegte Sternchen: Aminosäuren, die in die vorherige Kategorie fallen und darüber hinaus aufgrund ihrer Position im Protein an der Ligandenbindung beteiligt sein könnten. Das Alignment wurde mit dem Online-Alignment-Programm ClustalW2 erstellt (www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalw2).

Bei der Besprechung der Struktur-Wirkungs-Beziehungen wurde klar, dass das Vorliegen von Wasserstoffbrücken-Donatoren von Bedeutung für die Affinität der Verbindung sein könnte. Damit wären besonders Wasserstoffbrücken-akzeptierende Aminosäuren des Rezeptors für eine solche Interaktion interessant, also Asp181 und Ser193. Pro106 und/oder Lys183 könnten an einer potentiellen Wasserstoffbrücke mit einem der möglicherweise als Wasserstoffbrückenakzeptor agierenden Heteroatome des Purinrings beteiligt sein. Phe205, Trp253 und Phe254 könnten dagegen über die Wechselwirkungen zwischen den π -Elektronen ihrer aromatischen Systeme mit denen der aromatischen Kernstruktur des Adenins interagieren. Natürlich sind diese vorgeschlagenen Interaktionen hochspekulativ. Dennoch kann diese Analyse begründete Anhaltspunkte für eine neue Mutagenesestudie an AdeR liefern.

Man könnte in Screening-Kampagnen eine Reihe von Verbindungen testen, die nicht von Adenin abgeleitet wurden. Insbesondere wäre die Entdeckung weiterer hochaffiner AdeR-Antagonisten von großem Nutzen. Da AdeR keine räumliche Ausdehnung durch entsprechende Substitutionen am Adenin-Molekül tolerieren, wäre es verlockend anzunehmen, dass D-Amphetamin aufgrund seiner Größe und einer gewissen strukturellen Ähnlichkeit zu Adenin nicht nur ein funktioneller Antagonist von Adenin ist, sondern auch an den AdeR bindet (D-Amphetamin hebt den inhibierenden Effekt von Adenin auf die lokomotorische Aktivität von Mäusen auf).²⁴¹ Allerdings ist es fraglich, ob der AdeR die Adenin-Effekte auf die Lokomotion vermittelt. Zudem konnte durch die Testung von Desaza-Adenin-Derivaten gezeigt werden, dass die Heteroatome im aromatischen Ringsystem des Adenins, die das D-Amphetamin nicht aufweist, entscheidend für die Affinität der Verbindung sind.⁸⁸ Damit ist es eher unwahrscheinlich, dass D-Amphetamin wirklich einen AdeR-Antagonisten darstellt.

Von besonderem Interesse wäre die Identifizierung des humanen Adenin-Rezeptors für dessen Existenz es bereits einzelne Hinweise gibt.^{84,88,269,273,274} Da kein direktes menschliches Ortholog der Nager-AdeR existiert, gestaltet sich die Suche nach dem humanen AdeR allerdings schwierig.^{275,277} Die Tatsache, dass der menschliche AdeR wahrscheinlich G_s - statt G_i -gekoppelt ist, macht weiter deutlich, dass sich dieser Rezeptor deutlich von den Nager-AdeR unterscheiden könnte.²⁷³

Neben dem menschlichen Rezeptor wäre es auch interessant, weitere Rezeptoren für Adenin bzw. Adenin-Derivate zu identifizieren. Es wurde bereits ein G-Protein-gekoppelter 1-Methyladenin-Rezeptor in Seestern-Oozyten entdeckt und ein N^6 -Benzyladenin-Rezeptor in *Arabidopsis thaliana* vorgeschlagen.^{264-266,316} Später wurde allerdings

infrage gestellt, ob die Effekte von N⁶-Benzyladenin tatsächlich über das vorgeschlagene sieben-transmembranäre Rezeptorprotein der Pflanze vermittelt werden.³¹⁷ Interessanterweise wurde beschrieben, dass 3-Methyladenin (3-MA) die Lipolyse in einer Maus-Adipozyten-Zelllinie fördert. 3-MA ist ein bekannter Autophagie-Inhibitor.³¹⁸ Allerdings kann der lipolytische Effekt von 3-MA nicht durch Wortmannin, einen anderen Autophagie-Inhibitoren, ausgelöst werden.³¹⁸ Daraus schlossen die Autoren der Studie, dass 3-MA nicht über eine Autophagie-Inhibition wirkt.³¹⁸ Stattdessen konnte gezeigt werden, dass 3-MA über die verstärkte Produktion oder den verminderten Abbau von cAMP die PKA aktiviert und so den lipolytischen Effekt vermittelt (für die genannten Experimente wurden 3-MA-Konzentrationen ab 625 µM eingesetzt; bei 625 µM 3-MA waren bereits deutliche Effekt sichtbar).³¹⁸

In isolierten Inselzellen von Ratten konnte außerdem gezeigt werden, dass 3-MA die Glucose-induzierte Insulin-Sekretion potenzierte (bei 250 µM 3-MA).³¹⁹ Weiterhin bewirkte die Behandlung mit 3-MA eine Verstärkung der Glucose-induzierten β-Zell-Replikation und den Schutz von β-Zellen vor Zytokin-induzierter Apoptose aufgrund einer verminderten Expression proapoptotischer Genprodukte.³¹⁹ In diesen Zellen konnte ebenfalls ein 3-MA-vermittelter Anstieg der intrazellulären cAMP-Konzentration detektiert werden.³¹⁹

Ein Anstieg der intrazellulären cAMP-Konzentration könnte auf drei denkbaren Mechanismen basieren: Die Aktivierung eines G_s-gekoppelten GPCRs, die positive allosterische Modulation eines G_s-gekoppelten GPCRs oder die Inhibition von PDEs. Bei den letzten beiden Möglichkeiten muss ein Stimulus für die cAMP-Produktion vorliegen, um einen Effekt beobachten zu können. Obwohl es verlockend wäre anzunehmen, dass ein G_s-Protein-gekoppelter 3-MA-Rezeptor existiert, bedarf es weiterer Untersuchungen, um die beiden anderen Möglichkeiten auszuschließen. Auch wenn es wenig wahrscheinlich erscheint, ist es möglich, dass 3-MA ein funktionell selektiver AdeR-Agonist ist, der statt des üblichen G_i-Signalweges den G_s-Signalweg auslöst. Allerdings konnte zumindest für den rAdeR gezeigt werden, dass 3-MA in Bindungsstudien bei 100 µM inaktiv ist.^{269,270} Adenin selbst wurde nicht in cAMP-Experimenten an Inselzellen der Ratte untersucht.³¹⁹ Jedoch war es im Gegensatz zu 3-MA (je bei einer Konzentration von 250 µM) nicht in der Lage die Glucose-induzierte Insulin-Produktion von isolierten Inselzellen der Ratte zu steigern.³¹⁹ Inaktiv waren ebenfalls 1-Methyladenin, 7-Methyladenin, Adenosin, Cytosin, Guanin und Thymin.³¹⁹ Ein ähnlicher Effekt wie für 3-MA konnte dagegen für N⁶-Methyladenin und 9-Methyladenin beobachtet werden (je bei 250 µM).³¹⁹ Für die Zielstruktur in Inselzellen der Ratte konnten also

deutlich andere Struktur-Wirkungs-Beziehungen gefunden werden als für den rAdeR (siehe Kapitel 2.1.3.5, Tabelle 2.4). Damit kann man ausschließen, dass AdeR die Zielstruktur des 3-MA darstellen.

Es wäre spannend zu ergründen, ob Mäuse und Ratten tatsächlich einen G_s -gekoppelten 3-MA-Rezeptor exprimieren. Falls dies der Fall ist, könnte man weiter spekulieren, dass es sich bei dem menschlichen Ortholog dieses Rezeptors möglicherweise um den ebenfalls G_s -gekoppelten hAdeR handeln könnte. Zwar wird der hypothetische Ratten-3-MA-Rezeptor anscheinend nicht durch Adenin aktiviert, aber sein humanes Ortholog könnte sich zu einem Adenin-Rezeptor entwickelt haben, um den Mangel eines Adenin-Rezeptors aus der Gruppe der MrgA-Rezeptoren zu kompensieren. Diese Überlegungen basieren auf weitreichenden Spekulationen und zugegebenermaßen gibt es einige Punkte, die die Existenz eines 3-MA-Rezeptors unwahrscheinlich erscheinen lassen. Abgesehen davon, dass unklar ist, ob die Effekte überhaupt über einen GPCR vermittelt werden, sind die in den Experimenten eingesetzten 3-MA-Konzentrationen sehr hoch. Es wäre sehr interessant, in weiteren Experimenten einen EC_{50} -Wert zu bestimmen, um Gewissheit über die Wirksamkeitsgrad von 3-MA zu erhalten. Andererseits ist es aber nicht unmöglich, dass 3-MA tatsächlich als endogenes Signalmolekül wirkt, da für ein unbekanntes Enzym in der Lunge von Kaninchen nachgewiesen wurde, dass es Adenin in 3-MA umwandeln kann.²⁵¹ Trotz der Tatsache, dass an dieser Stelle nur spekuliert werden kann, wäre es sehr interessant, weitere Experimente durchzuführen, um die vorgestellten Hypothesen zu bestätigen oder zu widerlegen.

Zusammenfassend kann man sagen, dass mit dem cAdeR ein weiteres Mitglied der neuen Gruppe von AdeR identifiziert werden konnte.²⁷¹ Nach der Sequenz-Bestimmung seiner kodierenden DNA konnte der Rezeptor in CHO-Zellen zur Expression gebracht werden. In funktionellen Experimenten konnte gezeigt werden, dass der cAdeR durch Adenin aktiviert wird. Neben der für AdeR üblichen G_i -Kopplung, konnte auch die G_q -Kopplung des cAdeR nachgewiesen werden. Außerdem zeigte sich, dass die Struktur-Wirkungs-Beziehungen ausgewählter Adenin-Derivate zwar nicht identisch waren, aber ähnliche Tendenzen im Vergleich zu denen der anderen Nager-AdeR aufwiesen: Schon kleine Änderungen des Adenin-Moleküls bewirkten in der Regel eine deutliche Affinitätsverringering der entsprechenden Verbindung am cAdeR. Die neuen Erkenntnisse über diesen neuen Rezeptor können wichtige Impulse für die weitere Erforschung der bislang wenig erforschten Gruppe von P0-Rezeptoren liefern, z. B. bei der Identifikation der an der Liganden-Bindungstasche beteiligten Aminosäuren.

3 Mutagenesestudien am A_{2B}-Adenosin-Rezeptor und Evaluierung von PDE5-Inhibitoren als Adenosin-Rezeptor-Liganden

3.1 Die Rolle des Serin-279 bei der Ligandenbindung des humanen A_{2B}-Adenosin-Rezeptors

3.1.1 Einleitung

Wie in Kapitel 1.2 erwähnt, ist der A_{2B}-Adenosin-Rezeptor (AR) einer von vier AR-Subtypen (A₁AR, A_{2A}AR, A_{2B}AR, A₃AR).^{82,85} Die kodierende DNA des humanen A_{2B}AR wurde 1992 identifiziert und kloniert.³²⁰ Der Rezeptor weist eine ubiquitäre Expression auf und ist G_s- und G_q-gekoppelt.^{82,321} Adenosin aktiviert den A_{2B}AR im Vergleich zu den anderen AR-Subtypen mit geringerer Potenz (in funktionellen Experimenten nach Expression in CHO-Zellen).²¹⁵ Daher wird dieser Rezeptor wahrscheinlich vornehmlich dann aktiviert, wenn außergewöhnlich hohe Adenosin-Konzentrationen vorliegen (z. B. unter hypoxischen Bedingungen).

Der A_{2B}AR spielt in zahlreichen physiologischen Prozessen eine Rolle, z. B. bei der Modulation/Regulation des Blutdrucks, von Darmbewegungen, männlicher Fruchtbarkeit und Erektion des Penis, Glucose-Homöostase und der Wahrnehmung süßen Geschmacks.³²²⁻³²⁷ Auch für die therapeutische Intervention zur Behandlung verschiedener Erkrankungen erscheint der A_{2B}AR als vielversprechende Zielstruktur.

Da die Aktivierung des A_{2B}AR proinflammatorische Effekte in der Lunge vermittelt, könnten A_{2B}AR-Antagonisten zur Behandlung von Asthma und chronisch obstruktiven Lungen-Erkrankungen (COPD) nützlich sein.^{328,329} Mit 3-Ethyl-1-propyl-8-[1-[3-(trifluormethyl)benzyl]-1*H*-pyrazol-4-yl]-1*H*-purin-2,6-(3*H*,8*H*)-dion (GS 6201) wurde der erste A_{2B}AR-Antagonist für diese Indikation in klinischen Studien untersucht.³³⁰ Da gezeigt wurde, dass die Aktivität des A_{2B}AR gleichermaßen Tumorwachstum, -Metastasierung, -Vaskularisierung und -Immunevasion positiv beeinflusst, ist die antineoplastische Chemotherapie ein weiteres mögliches Einsatzgebiet für A_{2B}AR-Antagonisten.³³¹⁻³³⁵ A_{2B}AR-Antagonisten haben darüber hinaus Potential für die Behandlung von Schmerzen, Priapismus und Diabetes Typ 2, während sich A_{2B}AR-Agonisten zur Behandlung der Sepsis sowie aufgrund ihrer protektiven Wirkung auf

Lunge, Herz und das kardiovaskuläre System als therapeutisch nützlich erweisen könnten.³³⁶⁻³⁴⁴

Lange Zeit waren nur A_{2B}AR-Agonisten und -Antagonisten mit moderater Wirksamkeit bzw. Affinität verfügbar.³⁴⁵ Dies hat die Erforschung des Rezeptors erschwert. Auch heute gibt es nur wenige potente und selektive Agonisten.³⁴⁵ Die meisten A_{2B}AR-Agonisten sind Adenosin-Derivate und weisen häufig nur eine begrenzte Selektivität für den Rezeptor auf.³⁴⁵ Der nicht-nucleosidische Agonist BAY60-6583 gehört zu den wenigen bekannten, hoch-selektiven A_{2B}AR-Agonisten.^{345,346} Die meisten A_{2B}AR-Antagonisten sind Xanthin-Derivate mit großen Substituenten in 8-Position.³⁴⁵ PSB-603 ist eine solche Verbindung und gehört zu den potentesten bekannten A_{2B}AR-Antagonisten.³⁴⁷ Um die rationale Entwicklung weiterer hoch-potenter und hoch-selektiver A_{2B}AR-Agonisten und Antagonisten zu erleichtern, wäre es nützlich, die für die Bindung und Aktivierung wichtigen Interaktionen zwischen Rezeptor und Liganden aufzuklären. Allerdings gibt es momentan noch keine Röntgen-Kristallstrukturen des A_{2B}AR, die darüber Auskunft geben könnten.

3.1.2 Ergebnisse & Diskussion

Durch Mutagenese-Studien am humanen A_{2B}AR sollten für die Liganden-Bindung wichtige Interaktionen zwischen Agonisten bzw. Antagonisten und dem Rezeptor aufgedeckt werden. Zu diesem Zweck wurden anhand der Vorhersagen, die mithilfe eines Homologie-Modells des Rezeptors gemacht wurden, 13 Aminosäuren ausgewählt, die potentiell eine Rolle bei der Liganden-Bindung übernehmen könnten.^{295,348} Über einen gerichteten Mutagenese-Ansatz wurden 12 Rezeptor-Mutanten generiert (11 Einzelaminosäure-Austausche und ein Doppelaminosäure-Austausch). Die molekularbiologischen Arbeiten, sowie die Expression, die Bestimmung der Stärke der Expression über ELISA sowie ein Teil der pharmakologischen Charakterisierung der Mutanten wurde nicht im Rahmen der vorliegenden Doktorarbeit durchgeführt. Im Rahmen dieser Doktorarbeit wurden die begonnenen pharmakologischen Experimente zur Charakterisierung komplettiert, und insbesondere Liganden wie BAY60-6583 und Adenosin an den Rezeptor-Mutanten untersucht. Um eine umfassende Interpretation der Ergebnisse zu ermöglichen, werden hier auch zuvor generierte Ergebnisse dargestellt und diskutiert. Beispielfhaft soll aber nur eine der 12 Rezeptor-Mutanten besprochen werden: Die S279A^{7,42}-Mutante des A_{2B}AR. Die hier dargestellten Ergebnisse und ihre

Diskussion²⁹⁵ sowie weitere aus dem beschriebenen Mutagenese-Projekt hervorgegangenen Erkenntnisse wurden bereits von uns publiziert.^{295,349,350}

In funktionellen cAMP-Akkumulations-Experimenten wurde die Wirksamkeit der nucleosidischen A_{2B}AR-Agonisten Adenosin, NECA und des nicht-nucleosidischen BAY60-6583 an der S279A-Mutante und dem Wildtyp-Rezeptor (wt) untersucht. Dazu wurden CHO-Zellen genutzt, in denen die Rezeptoren über ein retrovirales Transfektionssystem zur Expression gebracht wurden. Durch die Aktivierung des G_s-gekoppelten A_{2B}AR wurde die cAMP-Produktion stimuliert. Durch die Hemmung seines Abbaus mit dem PDE-Inhibitor Ro20-1724 kam es zu einer cAMP-Akkumulation. Für Radioligand-Bindungsstudien wurden Membranpräparationen der genannten Zellen hergestellt. Die Affinitäten des Xanthin-Derivats PSB-603 sowie der Agonisten NECA und BAY60-6583 wurden in Konkurrenzexperimenten gegen den Radioliganden [³H]PSB-603 bestimmt (die Strukturen der untersuchten Liganden sind in Abbildung 3.1 angegeben). Die Ergebnisse der pharmakologischen Charakterisierung der Rezeptor-Mutante und des Wildtyp-Rezeptors sind in Tabelle 3.1 angegeben sowie in Abbildung 3.2 dargestellt.

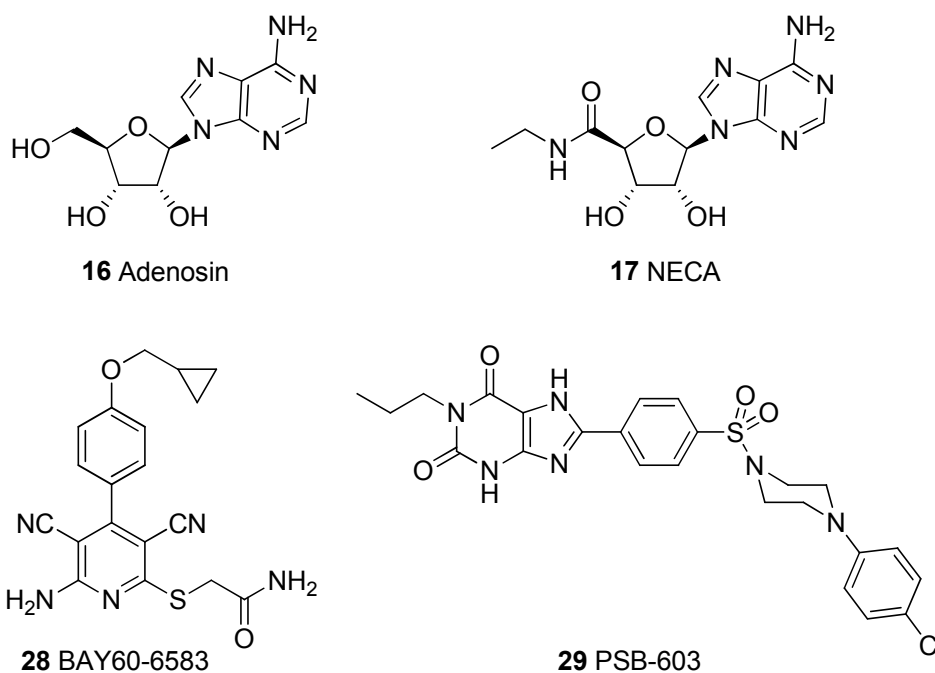


Abbildung 3.1: Zur pharmakol. Charakterisierung der A_{2B}AR-Mutante eingesetzte Liganden.

Es wird deutlich, dass bei der S279A-Mutante eine drastisch reduzierte Wirksamkeit von Adenosin und NECA zu finden ist. So war es nicht möglich, eine komplette Konzentrations-Wirkungskurve für die beiden Verbindungen aufzunehmen. Für NECA

konnte man in Bindungsstudien auch einen entsprechend hohen Affinitätsverlust nachweisen: Es ließ sich aufgrund der geringen Affinität von NECA keine Kompetitionskurve aufnehmen (siehe Tabelle 3.1). Adenosin konnte in Bindungsstudien nicht getestet werden, da diese Experimente in Anwesenheit von ADA durchgeführt werden. Allerdings kann man aufgrund der Daten aus funktionellen Experimenten davon ausgehen, dass auch Adenosin eine drastisch reduzierte Affinität an dieser Mutante besitzt. Diese Daten zeigen, dass Serin-279 entscheidend an der Bindung von NECA und Adenosin beteiligt ist.

Tabelle 3.1: Wirksamkeit von Agonisten und Affinität von Liganden an der S279A-Mutante

Experiment	Verbindung	EC ₅₀ oder K _i ± SEM (nM) ^a		„Shift“
		Wildtyp	S279A	
cAMP-Assays	16 , Adenosin ^b	806 ± 36	> 5000000 ^{***}	> 6200
	17 , NECA	83.5 ± 5.8	> 100000 ^{**}	> 1000
	28 , BAY60-6583	80.2 ± 11.9	12.1 ± 1.2 ^{**}	0.2
Bindungsstudien	29 , PSB-603	3.59 ± 0.59	6.35 ± 0.28 [*]	2
	17 , NECA	5850 ± 888	(9 ± 2 %) ^c	
	28 , BAY60-6583	548 ± 35	436 ± 27 ^{ns}	0.8

^acAMP-Akkumulations-Experimente wurden mit CHO-Zellen durchgeführt, in denen der hA_{2B}AR bzw. die hA_{2B}AR-Mutante S279A zur Expression gebracht wurde. Bindungsstudien wurden mit Membranpräparationen dieser Zellen und mit dem Radioliganden [³H]PSB-603 durchgeführt. Angegeben wurden die Mittelwerte aus drei bis vier unabhängigen Experimenten ± Standardfehler. Ergebnisse eines zweiseitigen t-Tests: ^{ns}nicht signifikant unterschiedlich zum Wildtyp, ^{*}p<0.05, ^{**}p<0.01, ^{***}p<0.001. ^bExperimente wurden in Abwesenheit von ADA durchgeführt. ^cProzentuale Inhibition der Radioligand-Bindung bei 100 µM NECA.

Im Gegensatz zu den nucleosidischen Agonisten führte der Aminosäureaustausch nicht zu einer veränderten Affinität von BAY60-6583. Damit kann davon ausgegangen werden, dass Serin-279 keine Rolle bei der Bindung von BAY60-6583 spielt. Überraschenderweise ließ sich hingegen eine signifikant erhöhte Wirksamkeit von BAY60-6583 in cAMP-Akkumulations-Experimenten nachweisen (EC₅₀ wt: 80.2 nM, S279A: 12.1 nM). Dies lässt sich wahrscheinlich mit der stark erhöhten Expression der Rezeptor-Mutante erklären (186 % im Vergleich zum Wildtyp, bestimmt über einen Zelloberflächen-ELISA). Eine massive Steigerung der Expression kann eine Linksverschiebung der Konzentrations-Wirkungskurve hervorrufen, hat aber keinen Einfluss auf die in Bindungsstudien bestimmte Affinität. Eine Erklärung für die deutlich erhöhte Expression könnte ein Wegfall der Agonist-induzierten Rezeptor-

Desensibilisierung sein. Das im Medium enthaltene und teilweise von Zellen ausgeschüttete Adenosin kann keine Desensibilisierung und Internalisierung der S279A-Mutante bewirken, da Adenosin wahrscheinlich nicht an diese Mutante bindet. Zwar weist PSB-603 eine statistisch signifikante Affinitätsreduktion an der S279A-Mutante auf, jedoch ist die Affinität nur moderat um den Faktor 2 verringert. Daher kann davon ausgegangen werden, dass Serin-279 auch keine wichtige Rolle bei der Bindung von Xanthin-Antagonisten wie PSB-603 spielt.

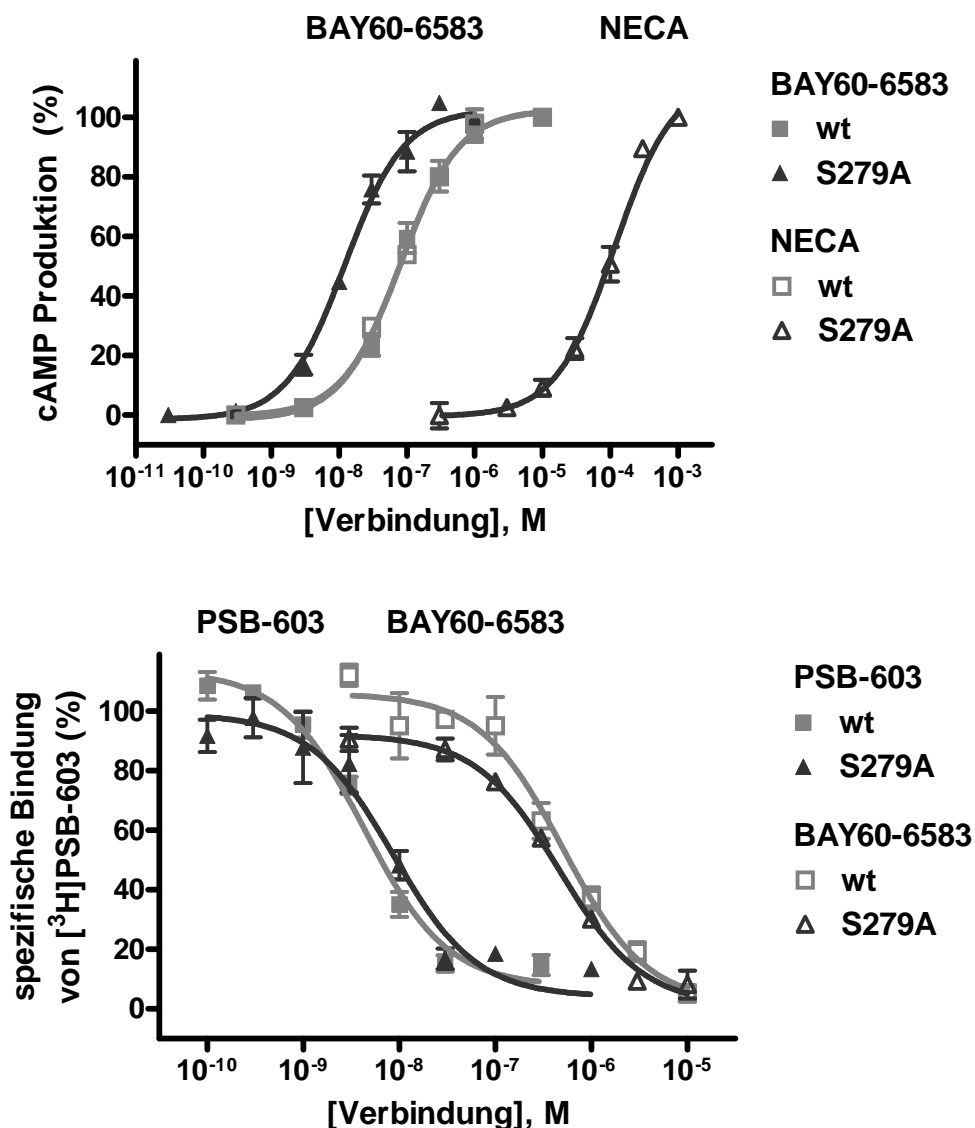


Abbildung 3.2: Pharmakol. Charakterisierung der A_{2B}-Adenosin-Rezeptor-Mutante S279A

Die oben abgebildeten Konzentrations-Wirkungskurven zeigen die gemittelte cAMP-Produktion in retroviral-transfizierten CHO-Zellen nach Aktivierung des A_{2B}AR (normalisiert auf die jeweils maximal produzierte cAMP-Menge, angegeben wurden Mittelwerte ± Standardfehler). Die unten abgebildeten Kurven zeigen die Konkurrenz von [³H]PSB-603 versus PSB-603 bzw. BAY60-6583. Die dargestellten Mittelwerte ± Standardfehler wurden in Radioligand-Bindungsstudien mit Membranen der retroviral transfizierten CHO-Zellen bestimmt.

Anhand des Homologie-Modells des A_{2B}AR können Vorhersagen über die Interaktionen zwischen den untersuchten Liganden und Serin-279 getroffen werden. Den experimentellen Daten entsprechend wurden für BAY60-6583 und PSB-603 keine direkten Interaktionen vorhergesagt (siehe Abbildung 3.3).

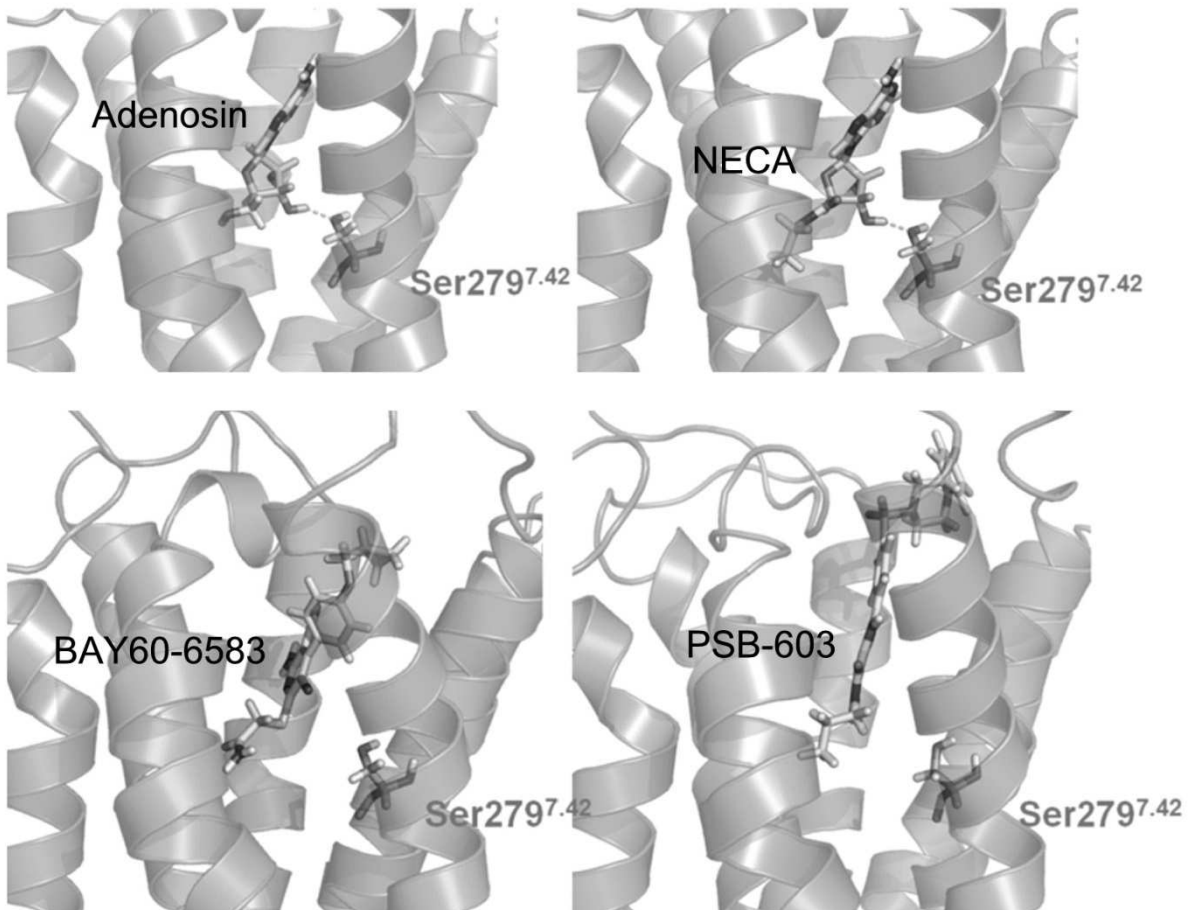


Abbildung 3.3: Homologie-Modell des humanen A_{2B}AR

Dargestellt sind die vorhergesagten Interaktionen zwischen Serin-279 des A_{2B}AR und den untersuchten Liganden.

Für Adenosin und NECA wurde dagegen eine Wasserstoffbrücke postuliert, an der die Hydroxy-Gruppe der Serin-Seitenkette und die 3'-Hydroxygruppe der Ribose beider Agonisten beteiligt sind. Eine ähnliche Interaktion wurde auch zwischen nucleosidischen Agonisten und Threonin-277 der homologen Aminosäure des A₁AR vorgeschlagen.³⁵¹

Weitere Arbeitsgruppen konnten für Mutanten homologer Aminosäuren anderer AR-Subtypen ähnliche Effekte beobachten wie für die S279A-Mutante des A_{2B}AR: An der T277A-Mutante des A₁AR konnte ebenfalls ein drastischer Affinitätsverlust von nucleosidischen Agonisten wie NECA gefunden werden, während sich die Affinität des antagonistischen Xanthin-Derivates DPCPX aufgrund des Aminosäureaustausches nicht

veränderte.^{351,352} Vergleichbare Beobachtungen konnten auch für die S277A-Mutante des A_{2A}AR gemacht werden.³⁵³ Zusammen mit den hier vorgestellten Ergebnissen zeigt sich, dass die konservierte Hydroxy-Funktion an dieser Position bei der gesamten Klasse der AR essentiell für die Bindung nucleosidischer Agonisten, nicht aber für Antagonisten ist.

Eine weitere interessante Beobachtung kann man im Fall von BAY60-6583 in Bindungsstudien am Wildtyp-Rezeptor machen: Während der nicht-nucleosidische A_{2B}AR-Agonist eine ähnlich hohe Wirksamkeit wie NECA in funktionellen Experimenten aufweist, ist er in Bindungsstudien deutlich potenter als NECA. Dies kann ein Hinweis darauf sein, dass es sich bei BAY60-6583 um einen Partialagonisten am A_{2B}AR handelt. Während der antagonistische Radioligand [³H]PSB-603 die Gesamtpopulation der Rezeptoren markiert, binden Agonisten nur hochaffin an die Subpopulation der Rezeptoren, die in einer aktiven Konformation vorliegen. Daher erscheinen Agonisten in Bindungsstudien gegen antagonistische Radioliganden weniger affin. Da der Agonist BAY60-6583 den Radioliganden deutlich potenter verdrängte als der Agonist NECA, kann man davon ausgehen, dass BAY60-6583 auch hochaffin an die inaktive Rezeptorkonformation binden kann – ein Merkmal eines Partialagonisten (die Tatsache, dass in cAMP-Akkumulationsexperimenten für BAY60-6583 eine ähnliche Efficacy wie für NECA beobachtet werden konnte hängt wahrscheinlich mit der sehr hohen Rezeptorexpression zusammen). Darüber hinaus gibt es zusätzliche noch nicht publizierte Hinweise auf einen Partialagonismus dieses Liganden. Anhand der hier vorgestellten Daten könnte man vermuten, dass ein Agonist nur dann ein Vollagonist ist, wenn er mit Serin-279 interagiert. Ein solcher kausaler Zusammenhang ist jedoch spekulativ.

Zusammenfassend konnte gezeigt werden, dass Serin-279 essentiell für die Bindung nucleosidischer Agonisten, nicht aber von nicht-nucleosidischen Agonisten und von Antagonisten ist. Aufgrund der in den Mutagenese-Studien gewonnenen Erkenntnisse, kann das Homologie-Modell des A_{2B}AR angepasst werden, wodurch das rationale Design neuer hochpotenter Agonisten wie auch Antagonisten erleichtert werden könnte.

3.2 Evaluierung von PDE5-Inhibitoren als Adenosin-Rezeptor-Liganden

3.2.1 Einleitung

3.2.1.1 NO/cGMP/PKG-Signalkaskade

Stickstoffmonoxid (NO) gehört zu den kleinsten Signalmolekülen im Körper.³⁵⁴ Die NO-Synthese erfolgt ausgehend von L-Arginin und wird durch NO-Synthasen (NOS) katalysiert.³⁵⁵ NO wirkt hauptsächlich über die Aktivierung der löslichen Guanylatzyklase (sGC).³⁵⁶ Es wurden aber auch andere, Guanylatzyklase-unabhängige Wirkungen, wie z. B. die S-Nitrosylierung anderer Zielproteine, beschrieben.³⁵⁶ Nach Aktivierung der im Zytoplasma lokalisierten sGC bewirkt diese die Umwandlung von GTP zu cGMP.³⁵⁵ Die Aktivität der sGC wird unter anderem durch intrazelluläres ATP beeinflusst: ATP ist ein negativer allosterischer Modulator.³⁵⁶ Das durch die sGC gebildete cGMP kann verschiedene Effektoren aktivieren. Zu den wichtigsten Effektoren zählen neben der Proteinkinase G (PKG), die durch zyklische Nucleotide gesteuerten Ionenkanäle und die Phosphodiesterasen (z. B. PDE2).³⁵⁵ Die PKG wiederum kann durch Phosphorylierungen die Aktivität vieler weiterer Effektoren regulieren. Im Rahmen eines negativen Feedbacks phosphoryliert die PKG beispielsweise die sGC und hemmt diese dadurch.³⁵⁵ Zu den bedeutsamsten und am besten erforschten Effekten dieser Signalkaskade gehört die Vasodilatation.³⁵⁵ Die Verminderung der Kontraktion glatter Gefäßmuskeln geht im Wesentlichen auf die zahlreichen durch PKG modulierten Effektoren zurück.³⁵⁵ Ein für die Muskelkontraktion wichtiges Phänomen ist die Phosphorylierung der leichten Kette von Myosinmolekülen.³⁵⁷ Die PKG erhöht (indirekt) die Aktivität der Myosin-leichte-Ketten-Phosphatase und bewirkt so die Dephosphorylierung der leichten Kette des Myosins.^{355,358,359} Einer der weiteren durch PKG vermittelten Effekte ist die verringerte Mobilisation von Calciumionen, die für die Kontraktion von entscheidender Bedeutung sind: Beispielsweise hemmt die PKG durch Phosphorylierung die GPCR-aktivierte PLC.^{355,360} Das cGMP-Signal kann schließlich einerseits durch den cGMP-Efflux, andererseits durch den Abbau des cGMPs durch entsprechende PDEs beendet werden.^{355,361,362}

3.2.1.2 Inhibitoren der Phosphodiesterase 5

Die NO/cGMP/PKG-Signalkaskade beinhaltet interessante Zielstrukturen für die pharmakotherapeutische Intervention: Seit dem 19. Jahrhundert werden NO-Donatoren

für die Behandlung der Angina pectoris eingesetzt.³⁶³ Von Bedeutung sind außerdem die therapeutisch eingesetzten PDE5-Inhibitoren. Das Azapurinon-Derivat Zaprinast, ehemals M&B22,948, wurde von May & Baker eigentlich als Antiallergikum entwickelt (und war tatsächlich potenter als Cromoglicinsäure).³⁶⁴ Später stellte man fest, dass Zaprinast ein Inhibitor für cGMP-spezifische PDEs, besonders PDE5 und PDE6, ist.^{365,366} Während Zaprinast nie als Arzneistoff eingesetzt wurde, konnte der davon abgeleitete, deutlich potentere PDE5-Inhibitor Sildenafil mit großem finanziellen Erfolg vermarktet werden (IC₅₀-Werte siehe Tabelle 3.2).³⁶⁷ Ursprünglich wurde Sildenafil ähnlich wie die NO-Donatoren zur Behandlung kardiovaskulärer Erkrankungen entwickelt.^{366,368} Zufällig wurde sein Potential zur Behandlung einer anderen Erkrankung entdeckt, für die es heute therapeutisch eingesetzt wird, nämlich der erektilen Dysfunktion.^{366,368,369}

Aufgrund der hohen Expression der PDE5 in vaskulären glatten Muskelzellen, bewirken PDE5-Inhibitoren infolge von NO-Signalen eine verstärkte Vasodilatation.³⁷⁰ Sexuelle Stimulation bewirkt die neuronale NO-Freisetzung im Corpus cavernosum des Penis, wo ebenfalls ein vasodilatierender Effekt auftritt.³⁷⁰ Dies hat den verstärkten Einstrom von Blut in den Sinusoidalraum des Corpus cavernosum und des Corpus spongiosum zur Folge, was gleichzeitig zu einer mechanischen Hemmung des venösen Blutabflusses und damit zu einer Erektion des Penis führt.³⁷⁰ Die PDE5-Inhibitoren verstärken also diesen physiologischen Vorgang.

Neben Sildenafil (vermarktet als Viagra[®]; zudem gibt es diverse Generika) sind in Deutschland Vardenafil (Levitra[®]) und Tadalafil (Cialis[®]) zur Behandlung der erektilen Dysfunktion zugelassen und stellen die erste Generation von therapeutisch eingesetzten PDE5-Inhibitoren dar (Informationen wurden aus der PharmNet.Bund-Datenbank des Deutschen Instituts für Medizinische Dokumentation und Information entnommen).^{371,372} Gemäß der „European Medicines Agency“ wurde 2013 zusätzlich Avanafil (Spedra[®]) EU-weit für diese Indikation zugelassen.³⁷¹ Weitere neue PDE5-Inhibitoren, die in einigen Ländern Südamerikas und Asiens zur Behandlung der erektilen Dysfunktion zugelassen wurden, sind Lodenafil-Carbonat (Helleva[®]), Mirodenafil (Mvix[®]) und Udenafil (Zydena[®]).³⁷³⁻³⁷⁵ Bei dem erstgenannten Arzneistoff handelt es sich um ein Prodrug, ein Dimer, das im Körper gespalten wird (Lodenafil ist der aktive Metabolit, Strukturformeln siehe Kapitel 3.2.2, Abbildung 3.4).³⁷⁵ Darüber hinaus werden Sildenafil (unter dem Handelsnamen Revatio) und Tadalafil (Adcirca) zur Behandlung der pulmonalen Hypertonie eingesetzt.^{369,376} Weiterhin wurde der PDE5-Inhibitor Gisadenafil in klinischen Studien zur Therapie von Symptomen der benignen Prostatahyperplasie evaluiert, hat aber bislang keine Zulassung.³⁷⁷

Tabelle 3.2: Inhibitorische Potenz ausgewählter PDE5-Inhibitoren

Verbindung	Inhibition der humanen PDE5 (IC ₅₀ , nM)
30 , Zaprinast	856-3200 ^{365,378}
31 , Sildenafil	3.5-6.6 ^{365,379,380}
32 , Vardenafil	0.1-0.7 ^{380,381}
33 , Tadalafil	0.94-6.7 ^{372,381}
34 , Avanafil	5.2 ³⁸²
35 , Lodenafil	22.0 ³⁸³
36 , Mirodenafil	0.338 ³⁸⁴
37 , Udenafil	8.2 ³⁸⁵
38 , Gisadenafil	1.23 ³⁸⁶

3.2.1.3 Überschneidungen Adenosin- und NO-vermittelter Signalkaskaden

Es sind einige Ähnlichkeiten und Überschneidungen von Adenosin- und NO-vermittelten Signalkaskaden bekannt. Zu den Ähnlichkeiten gehören, dass beide Signalmoleküle die Konzentration intrazellulärer zyklischer Nucleotide beeinflussen und eine Vasodilatation auslösen können.³⁴² So kommt beiden Signalmolekülen z. B. eine entscheidende Bedeutung bei der hypoxischen Vasodilatation von Koronararterien zu.³⁸⁷ Es konnte außerdem gezeigt werden, dass Adenosin genau wie NO eine entscheidende Rolle bei der erektilen Funktion des Penis spielt (was wahrscheinlich auch auf vasodilatatorische Effekte beider Signalmoleküle zurückzuführen ist): Die intracavernöse Gabe von Adenosin beim Menschen (wie auch in Tiermodellen) führte zum verstärkten Einstrom von Blut in das Corpus cavernosum und in hohen Dosen zu Erektionen des Penis.³⁸⁸⁻³⁹⁰ Darüber hinaus konnte gezeigt werden, dass es bei hohen Adenosin-Konzentrationen in Mäusen A_{2B}AR-vermittelt nicht nur zu Erektionen, sondern zu Priapismen, also unnatürlich langanhaltenden Erektionen mit Schädigungen des erektilen Gewebes, kommen kann.³⁴²

Abgesehen von den Ähnlichkeiten gibt es verschiedene Hinweise auf positiv modulierende Effekte zwischen den Adenosin- und NO-vermittelten Signalkaskaden. Es wurde beispielsweise beschrieben, dass NO-Donatoren NF-κB-vermittelt die A₁AR-Expression in einer neuronalen Rattenzelllinie erhöhen.³⁹¹ In einem Schmerzmodell in Ratten konnte außerdem gezeigt werden, dass entzündungsbedingte Schmerzen durch die Aktivierung peripherer A₁AR reduziert werden können.³⁹² Dieser Effekt ist allerdings

abhängig vom NO/cGMP/PKG-System.³⁹² Da der Schmerztest erst mehrere Stunden nach Applikation der Entzündungs-induzierenden Verbindung durchgeführt wurde, könnte auch hier eine NO-vermittelte Hochregulierung von A₁AR in peripheren Neuronen stattgefunden haben.³⁹² Jedoch kann auch eine dem A₁AR nachgeschaltete Aktivierung der NO/cGMP/PKG-Signalkaskade nicht ausgeschlossen werden.³⁹² Außerdem wurde aufgrund von Infarkt-Studien an isolierten Kaninchen-Herzen die Hypothese aufgestellt, dass die cGMP-abhängige Aktivierung der PKG zur Aktivierung der PKC führt.³⁹³ Die PKC wiederum soll infolge dessen den A_{2B}AR sensibilisieren.³⁹³

Neben diesen positiv-modulierenden Effekten, sind jedoch auch negativ-modulierende Effekte zwischen beiden Signalkaskaden beschrieben worden: In isolierten Rattenneuronen konnte gezeigt werden, dass Adenosin A₁AR-vermittelt die NO-induzierte Neurotransmitter-Freisetzung hemmt.³⁹⁴ Außerdem fand man in Mäusen, dass der durch A₁AR-vermittelte antikonvulsive Effekt von Adenosin durch NO-vermittelte Signale, z. B. durch den Einsatz von NO-Donatoren oder Sildenafil, aufgehoben werden konnte.³⁹⁵ Die Gründe für diese Beobachtungen sind unklar.

Über die gegenseitige Modulation der beiden Signalkaskaden hinausgehend, gibt es auch Hinweise darauf, dass eine Signalkaskade in die andere münden kann. Es wurde beispielsweise gezeigt, dass NO die Adenosin-Ausschüttung im Gehirn von Ratten steigert.³⁹⁶ Schon früh konnte auch eine Adenosin-vermittelte cGMP-Produktion in Zellen der Zirbeldrüse von Ratten nachgewiesen werden.³⁹⁷ Dies geht wahrscheinlich auf eine verstärkte NO-Produktion zurück, die durch Adenosin ausgelöst wurde. In unterschiedlichen Geweben wurde gezeigt, dass alle vier Adenosin-Rezeptor-Subtypen eine verstärkte NO-Produktion herbeiführen können: Man fand, dass die Aktivierung des A₁AR über einen ungeklärten Mechanismus die Expression der induzierbaren NO-Synthase in einem Herzinfarkt-Mausmodell erhöht.³⁹⁸ Die Aktivierung des A₁AR bewirkt dadurch einen Anstieg der NO-Produktion.³⁹⁸ Es gibt Hinweise darauf, dass die kardioprotektive Wirkung von A₁AR-Agonisten von dieser NO-Produktion abhängig ist.³⁹⁸

In IL-1 β -stimulierten Kardiomyozyten der Ratte kam es A_{2A}AR-, nicht aber A₁AR-vermittelt zur verstärkten NO-Synthese.³⁹⁹ Ähnlich führte auch die Aktivierung von A_{2A}AR und A_{2B}AR in einer Studie an isolierten Koronar-Arterien von Schweinen zu einer erhöhten NO-Produktion.^{400,401} Es konnte darüber hinaus gezeigt werden, dass Adenosin und NO daraufhin synergistisch die Entspannung der arteriellen Gefäßmuskulatur bewirkten.⁴⁰⁰ Die Adenosin-vermittelte NO-Produktion scheint aber Zelltyp-spezifisch zu sein: Sie scheint nur im Endothel, nicht aber in Zellen der koronararteriellen glatten

Muskulatur von Schwein und Rind aufzutreten.^{400,402} Dies trifft möglicherweise aber nicht auf alle Spezies zu oder könnte von der Lokalisation der glatten Gefäß-Muskulatur abhängen: Man fand nämlich in Zellen der glatten Aorta-Muskulatur von Ratten ebenfalls eine A_{2A}AR-vermittelte Erhöhung der NO-Produktion.⁴⁰³

Neben der Produktion von cAMP bewirkt die Aktivierung von A_{2B}AR im Gewebe des Corpus cavernosum von Mäusen auch die Produktion von cGMP, die durch NO-Synthase-Inhibitoren komplett gehemmt werden kann.³⁴² Der molekulare Wirkmechanismus für die A₂AR-Subtypen-vermittelte Erhöhung der NO-Produktion ist unklar. Es konnte gezeigt werden, dass cAMP (möglicherweise PKA-vermittelt) die Zytokin-vermittelte NO-Produktions-Steigerung in Zellen der vaskulären glatten Muskulatur von Ratten weiter potenzierte.⁴⁰⁴ Möglicherweise wird also über die beiden G_s-gekoppelten AR-Subtypen eine auf einem anderen Weg induzierte NO-Produktion verstärkt. Wie für jeden anderen G_s-gekoppelten GPCR könnte die erhöhte cAMP-Konzentration außerdem zu einem verminderten Abbau des cGMPs führen und einen NO-Effekt dadurch verstärken. So stellt cAMP für unselektive PDEs ein alternatives Substrat zu cGMP dar.³⁵⁵ Außerdem kann die PKG bei hohen Konzentrationen auch durch cAMP aktiviert werden.³⁵⁵

Weiterhin fand man, dass der A₃AR eine Verstärkung der Serotonin-Aufnahme von Zellen der Basophilen-Leukämie-Zelllinie 2H3 (Ratte) vermittelt.^{405,406} Durch die Vorbehandlung der Zellen mit Sildenafil konnte dieser Effekt weiter verstärkt werden, während er durch PLC-, sowie durch NO-Synthase-, Guanylatzyklase- und PKG-Inhibitoren gehemmt wurde.^{405,406} Damit scheint der A₃AR durch die Mobilisation von Calciumionen Calciumionen-abhängige NO-Synthasen zu aktivieren, die die NO/cGMP/PKA-Signalkaskade auslösen.⁴⁰⁵ Ein ähnlicher Mechanismus wäre auch für den ebenfalls G_q-gekoppelten A_{2B}AR denkbar.

Obwohl es zahlreiche Einzelbeobachtungen zu Überschneidungen von adenosinergen und NO-vermittelten Signalkaskaden gibt, bedarf es weiterer Untersuchungen, um zu zeigen, ob die genannten Effekte Spezies- oder Zelltyp-spezifisch sind. Außerdem sind in den meisten Fällen die zugrunde liegenden Wirkmechanismen unklar und müssen noch aufgeklärt werden.

In einzelnen Fällen wurde statt dem Effekt von NO-Signalen, der alleinige Effekt von PDE5-Inhibitoren auf AR-Signale untersucht. Nach der Behandlung mit PDE5-Inhibitoren kann man in einigen Fällen ähnliche Beobachtungen machen, wie nach der Aktivierung

von AR z. B. kardioprotektive Wirkungen oder die Induktion von Ionenströmen über den „cystic fibrosis transmembrane conductance regulator“. ⁴⁰⁷⁻⁴⁰⁹ Allerdings wurde meist nicht untersucht, ob es einen Zusammenhang zwischen der Wirkung der PDE5-Inhibitoren und der AR-Aktivierung gibt. In wenigen Fällen wurde allerdings ein solcher Zusammenhang untersucht und aufgezeigt:

Für Sildenafil konnte gezeigt werden, dass es kardioprotektiv gegen Ischämie/Reperfusionsschädigung in Mäusen wirkt. ⁴¹⁰ Sowohl nach der Behandlung mit einem A₁AR-Antagonisten wie auch in A₁AR-KO-Mäusen konnten keine kardioprotektiven Effekte durch Sildenafil mehr beobachtet werden. ⁴¹⁰ Die Autoren der Studie schlagen eine Sildenafil-bedingte Hochregulierung der A₁AR-Expression oder eine Sildenafil-vermittelte vermehrte Adenosin-Ausschüttung zur Erklärung des Phänomens vor. ⁴¹⁰

Außerdem wurde in einem Schmerzmodell in Ratten (Formalin-Test) gezeigt, dass die intrathekale Gabe von Sildenafil antinozizeptiv wirkt. ⁴¹¹ Diese Wirkung scheint zumindest teilweise über AR vermittelt zu sein, da die Gabe eines unspezifischen AR-Antagonisten zu einer Verminderung dieses Sildenafil-Effektes führte, während der Antagonist alleine keinen Einfluss auf die Nozizeption hatte. ⁴¹¹ Die Autoren schlagen vor, dass das akkumulierende cGMP AR aktiviert. ⁴¹¹ Wahrscheinlicher wäre aber eine direkte oder indirekte PKG-abhängige Wirkung auf Adenosin-Rezeptoren (z. B. die Modulation der Expression oder der Rezeptorsensitivität wie oben beschrieben). Die Ergebnisse einer Folgestudie der Autoren zeigen, dass alle einzeln eingesetzten Subtyp-spezifischen AR-Antagonisten gleichermaßen eine Reduktion der Sildenafil-induzierten Antinozizeption zur Folge hatten. ⁴¹² Daher scheinen überraschenderweise alle AR-Subtypen für die durch Sildenafil ausgelöste Analgesie wichtig zu sein. ⁴¹²

In Blutproben von Hunden wurde gezeigt, dass die Blutplättchen-Aggregation durch die Aktivierung des A_{2A}AR um etwa 25 % reduziert werden kann. ⁴¹³ Sildenafil, das alleine keine Änderung der Plättchen-Aggregation bewirkt, inhibiert den A_{2A}AR-vermittelten Effekt. ⁴¹³ Die Autoren schlagen einen Sildenafil-Effekt auf der Ebene der sekundären Botenstoffe vor. ⁴¹³ Zwar ist cGMP in der Lage, allosterisch an die PDE2 zu binden und damit einen verstärkten Abbau von cAMP zu bewirken, aber es ist nicht klar, ob in den Blutproben überhaupt NO-Signale vorlagen, die Sildenafil hätte potenzieren können. ³⁵⁵

Da Sildenafil in der Forschung häufig zum Einsatz kommt, wäre es interessant, nähere Informationen darüber zu erhalten, welche Effekte diese Verbindung auf die PDE5-

Inhibitor folgend oder möglicherweise unabhängig davon auslöst. Da Überschneidungen zwischen NO- und Adenosin-Signalkaskaden gefunden wurden, wäre es interessant, die molekularen Wirkmechanismen aufzuklären, durch die es zur Beeinflussung der Adenosin-Signale durch PDE5-Inhibitoren kommt.

3.2.2 Ergebnisse & Diskussion

Im Jahr 2008 wurde publiziert, dass der hA_{2B}AR bei der erektilen Funktion des Penis eine Rolle spielt.³⁴² Da das in der Pharmakotherapie der erektilen Dysfunktion eingesetzte Sildenafil darüber hinaus gewisse strukturelle Ähnlichkeiten zu dem hochaffinen A_{2B}AR-Liganden PSB-603 aufweist (vergleiche Abbildung 3.4 mit Abbildung 3.1, S. 87), wurde die Hypothese aufgestellt, dass Sildenafil möglicherweise an den A_{2B}AR bindet. Außerdem wurden, wie in der Einleitung beschrieben, Zusammenhänge zwischen der Wirkung des Sildenafils und adenosinergen Signalkaskaden gefunden. Aus diesem Grund wurde in Bindungsstudien untersucht, ob bekannte und teilweise therapeutisch eingesetzte PDE5-Inhibitoren an humane Adenosin-Rezeptoren binden: In Bindungsstudien wurden Zaprinast, Sildenafil, Vardenafil, Tadalafil, Avanafil, Lodenafil, Mirodenafil, Udenafil und Gisadenafil getestet.

Tabelle 3.3: Affinität ausgewählter PDE5-Inhibitoren an humanen AR-Subtypen

Verbindung	K _i ± SEM (nM), (% Inhibition ± SEM)			
	hA ₁ AR (vs. [³ H]CCPA)	hA _{2A} AR (vs. [³ H]MSX-2)	hA _{2B} AR (vs. [³ H]PSB-603)	hA ₃ AR (vs. [³ H]PSB-11)
30 , Zaprinast	>10000 (2 ± 6)	>10000 (6 ± 5)	>10000 (11 ± 1)	>10000 (10 ± 3)
31 , Sildenafil	317 ± 22	72.7 ± 6.2	504 ± 59	≥10000 (44 ± 3)
32 , Vardenafil	1150 ± 60	80.3 ± 14.8	2110 ± 130	4330 ± 100
33 , Tadalafil	>10000 (16 ± 2)	>10000 (35 ± 3)	>10000 (6 ± 2)	>10000 (13 ± 2)
34 , Avanafil	>10000 (22 ± 3)	>10000 (31 ± 3)	>10000 (16 ± 3)	>10000 (37 ± 6)
35 , Lodenafil	415 ± 44	227 ± 30	6250 ± 1730	>10000 (18 ± 4)
36 , Mirodenafil	>10000 (1 ± 1)	>10000 (2 ± 2)	>10000 (5 ± 4)	>10000 (-1 ± 3)
37 , Udenafil	148 ± 21	95.8 ± 11.3	5920 ± 570	>10000 (26 ± 1)
38 , Gisadenafil	>10000 (1 ± 0)	>10000 (14 ± 3)	>10000 (3 ± 1)	>10000 (8 ± 3)

^aBindungsstudien wurden mit Membranpräparationen von CHO-Zellen durchgeführt, in denen der entsprechende Rezeptor zur Expression gebracht wurde. Die angegebenen Daten sind Mittelwerte ± Standardfehler aus drei bis vier unabhängigen Experimenten. Angegebene Inhibitionswerte wurden bei einer Konzentration von 10 µM bestimmt.

Die Bindungsstudien wurden mit Membranpräparationen von CHO-Zellen durchgeführt, in denen jeweils einer der vier humanen AR-Subtypen zur Expression gebracht wurde. Für die Bindungsstudien am A₁AR wurde der agonistische Radioligand [³H]CCPA, am A_{2A}AR der antagonistische Radioligand [³H]MSX-2, am A_{2B}AR der antagonistische Radioligand [³H]PSB-603 und am A₃AR der antagonistische Radioligand [³H]PSB-11 eingesetzt. Die Ergebnisse der Bindungsstudien sind in Tabelle 3.3 zusammengefasst (Strukturformeln der getesteten PDE5-Inhibitoren sind in Abbildung 3.4 angegeben).

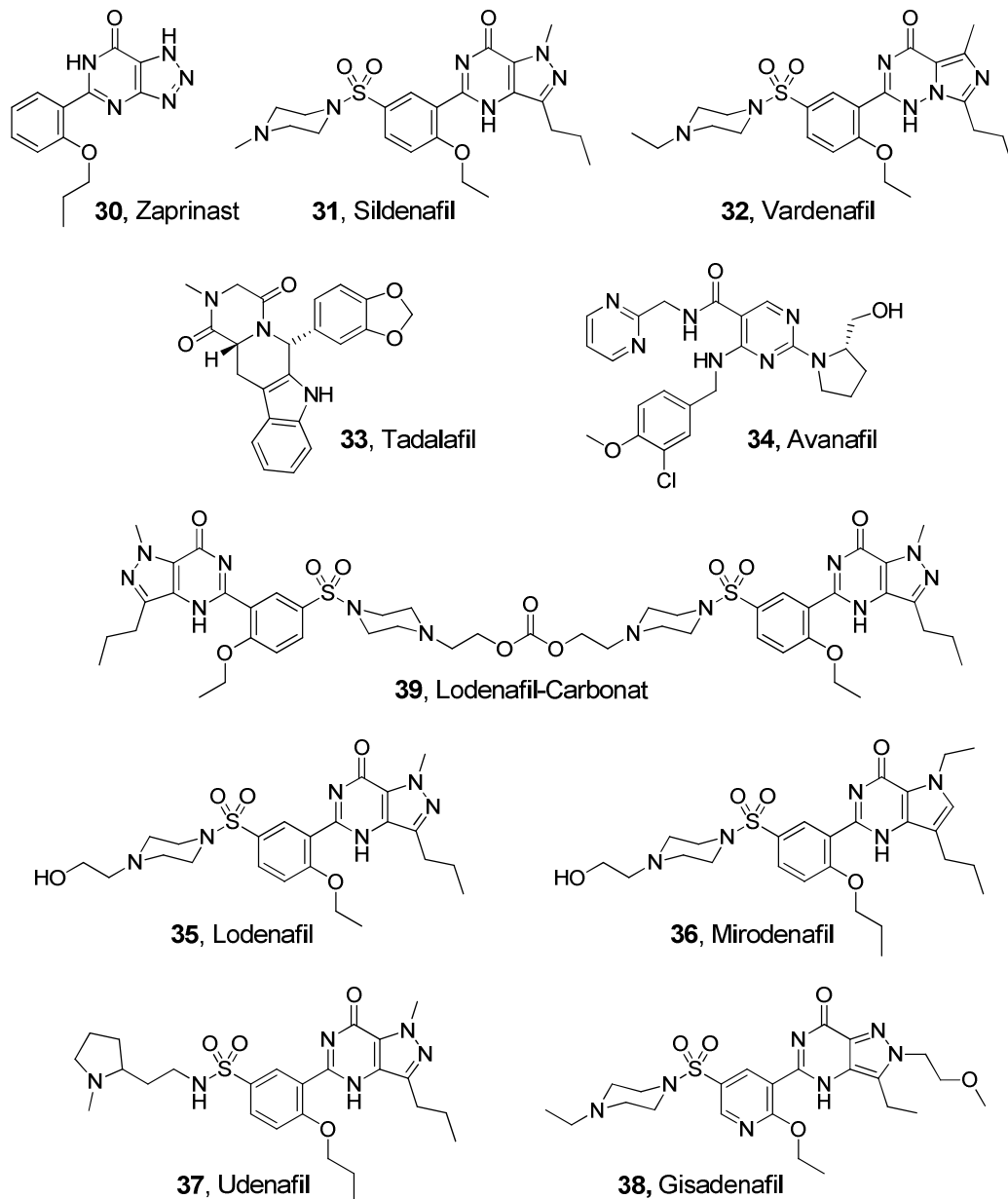
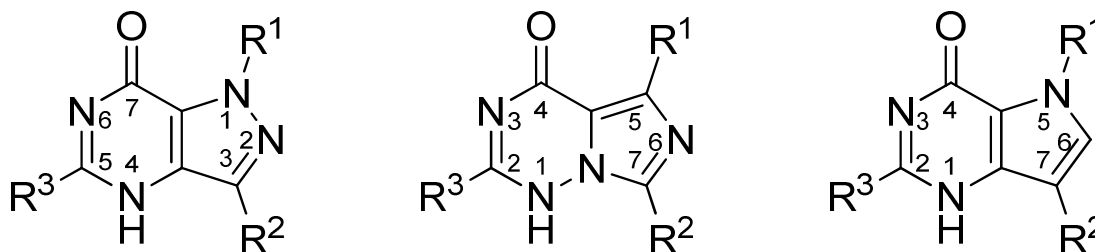


Abbildung 3.4: Ausgewählte PDE5-Inhibitoren

Es konnte gezeigt werden, dass einzelne PDE5-Inhibitoren mit mittlerer bis hoher Affinität an AR-Subtypen binden: Sildenafil und strukturell ähnliche PDE5-Inhibitoren konnten damit als AR-Liganden identifiziert werden. Ausnahmen davon sind Zaprinast und Gisadenafil. Außerdem binden auch Tadalafil und Avanafil, die beide nicht zur gleichen Strukturklasse wie Sildenafil gehören, anscheinend nur mit niedriger Affinität an die AR-Subtypen. Obwohl es also Gemeinsamkeiten in den Interaktionen zwischen Ligand und Protein bei AR-Subtypen und der PDE5 zu geben scheint, gibt es erwartungsgemäß auch Unterschiede. Interessanterweise fand eine andere Arbeitsgruppe parallel im Rahmen einer großen Screening-Kampagne ebenfalls, dass Sildenafil mit submikromolarer Affinität an den A_{2A}AR bindet (weitere PDE5-Inhibitoren an weiteren AR-Subtypen wurden nicht untersucht).⁴¹⁴ Die Autoren verglichen Röntgenkristallstrukturen des A_{2A}AR (cokristallisiert mit dem Antagonisten ZM241385) und der PDE5 (cokristallisiert mit Sildenafil).⁴¹⁴ Sie fanden, dass die Liganden-Bindung in beiden Bindungstaschen durch ähnliche Interaktionen vermittelt wurde.⁴¹⁴

Für die folgenden Überlegungen werden nur die strukturell eng verwandten PDE5-Inhibitoren besprochen (und Tadalafil und Avanafil ausgeklammert): Es ist nicht einfach die unterschiedlichen Affinitäten der verschiedenen PDE5-Inhibitoren auf bestimmte Strukturelemente zurückzuführen, da sich die verschiedenen Verbindungen zwar minimal, aber immer in mehr als einem Struktur-Merkmal unterscheiden. Die geringe Affinität von Zaprinast an den AR-Subtypen geht möglicherweise auf den größten strukturellen Unterschied zwischen dieser Verbindung und den anderen untersuchten PDE5-Inhibitoren zurück: Dem fehlenden Piperazin-1-yl-sulfonyl-Rest. Allerdings könnte auch oder zusätzlich die unterschiedliche Anzahl und Position von Heteroatomen oder die fehlende Alkylierung in Position 1 und 3 der bicyklischen Kernstruktur ursächlich für die geringe Affinität z. B. im Vergleich zu Sildenafil sein (Positionen siehe Abbildung 3.5). Die für alle Subtypen zu beobachtende kaum vorhandene Affinität von Mirodenafil geht wahrscheinlich auf die längere Alkylkette in 5-Position und/oder auf das Fehlen eines Stickstoff-Atoms in 6-Position zurück, da es sich nur an diesen Stellen von den anderen Verbindungen unterscheidet. Interessanterweise findet sich auch für Gisadenafil der wesentliche Unterschied zu den anderen PDE5-Inhibitoren in der 2-Position (diese ist der 6-Position des Mirodenafil analog, siehe Abbildung 3.5). Bei Mirodenafil ist das Heteroatom Stickstoff in dieser Position nicht vorhanden, während es bei Gisadenafil durch einen Substituenten an der gleichen Position weniger gut zugänglich ist. Damit könnte ein Wasserstoffbrücken-Akzeptor in der 2-Position von Sildenafil, Lodenafil und Udenafil sowie der analogen 6-Position von Vardenafil eine entscheidende Rolle für die

Bindung an die Rezeptoren spielen. Es ist allerdings auch nicht auszuschließen, dass die Bindungstasche des Rezeptors eine im Vergleich zu den anderen Verbindungen größere räumliche Ausdehnung des Mirodenafilis in der 5-Position und des Gisadenafilis in der 2-Position nicht erlaubt.



Sildenafil, Lodenafil, Udenafil
(bei Zaprinast und
Gisadenafil analog)

Vardenafil

Mirodenafil

Abbildung 3.5: Nummerierung der bicyklischen Kernstrukturen untersuchter PDE5-Inhibitoren

Während sich die Ergebnisse für Zaprinast, Tadalafil, Avanafil, Mirodenafil und Gisadenafil aufgrund der geringen Affinität an allen AR-Subtypen schlecht deuten lassen, kann man bei den anderen Verbindungen kleinere Unterschiede zwischen den Subtypen feststellen. Die Verbindung mit der höchsten Affinität am A₁AR ist Udenafil (K_i 148 nM). Möglicherweise liegt dies an dem auffälligsten Unterschied zwischen Udenafil und den anderen aktiven Verbindungen, dem Rest am Sulfonsäureamid der Verbindung. Möglicherweise ist damit ein längerer Linker zwischen der Kernstruktur und dem distalen, unter physiologischen Bedingungen positiv geladenen Stickstoff des 1-Methylpyrrolidin-2-yl-Restes für eine höhere Affinität am A₁AR von Bedeutung. Bei allen anderen Verbindungen ist die Distanz zwischen der positiven Ladung des protonierten distalen Stickstoffatoms des Piperazinyl-Restes und der Kernstruktur etwas geringer. Jedoch ist es auch möglich, dass der Propoxy-Rest an dem Phenylring der Verbindung für eine höhere Affinität ursächlich ist, da die anderen aktiven Verbindungen hier einen kürzeren Ethoxy-Rest aufweisen. Jedoch könnte man in diesem Fall einen höheren Inhibitionswert für Mirodenafil am A₁AR im Vergleich zu den andern AR-Subtypen erwarten, da Mirodenafil diese potentiell günstige Struktur auch aufweist. Die Tatsache, dass Sildenafil (K_i 317 nM) und Lodenafil (K_i 415 nM) ähnlich hohe Affinitäten zum A₁AR aufweisen, macht deutlich, dass der für diese beiden Verbindungen unterschiedliche Rest distal der Piperazin-Struktur nicht entscheidend für die Bindung an den A₁AR ist. Das bedeutet gleichzeitig, dass die andere Anordnung der Heteroatome und damit der möglichen Wasserstoffbrücken-Akzeptoren in der bicyklischen

Kernstruktur des Vardenafil im Vergleich zu Sildenafil wahrscheinlich entscheidend für die etwas geringere Affinität des Vardenafil ist (K_i 1150 nM).

Am A_{2A}AR zeigen alle aktiven Verbindungen ähnliche Affinitäten (K_i , Sildenafil: 72.7 nM, Vardenafil: 80.3 nM, Udenafil: 95.8 nM). Lediglich Lodenafil hat eine minimal geringere Affinität an diesem Subtyp (K_i 227 nM). Daher scheinen in erster Linie die Anteile der Verbindungen mit dem Rezeptor zu interagieren, die allen Verbindungen gemein sind. Weiterhin ist auffällig, dass alle getesteten Verbindungen mit der höchsten Affinität an den A_{2A}AR binden. Am A_{2B}AR ist Sildenafil die Verbindung mit der höchsten Affinität (K_i 504 nM). Auch wenn es weitere Unterschiede zwischen Sildenafil und den anderen aktiven PDE5-Inhibitoren gibt, ist die räumliche Ausdehnung des Restes distal des Sulfonsäureamides die wahrscheinlichste Erklärung für die Affinitätsreduktion der aktiven PDE5-Inhibitoren: So scheint die Länge dieses Restes negativ mit der Affinität der entsprechenden Verbindung zu korrelieren: Sildenafil (K_i 504 nM) < Vardenafil (K_i 2110 nM) < Lodenafil (K_i 6250 nM) \approx Udenafil (K_i 5920 nM).

Der A₃AR weist von allen AR-Subtypen die geringste Affinität für die untersuchten PDE5-Inhibitoren auf. Im Gegensatz zu den anderen AR-Subtypen besitzt Vardenafil an diesem Rezeptor eine höhere Affinität als Sildenafil. Vardenafil ist die einzige Verbindung die einen geringeren K_i -Wert als 10 μ M zeigt (K_i 4330 nM). Damit scheint die Anordnung der Heteroatome des bicyklischen Ringsystems bedeutend für die Bindung an diesem Rezeptorsubtyp zu sein, die sich im Fall von Vardenafil von den anderen PDE5-Inhibitoren unterscheidet. Ergebnisse mit ähnlichen Verbindungen (2-Phenylpyrazolo[4,3-*d*]pyrimidin-7-on-Derivate) am humanen A₃AR, die von einer anderen Gruppe publiziert wurden, weisen darauf hin, dass der Phenylring in 5-Position des Sildenafil ungünstig für die Affinität am A₃AR sein könnten.⁴¹⁵ Allerdings muss man dazu sagen, dass die Verbindungen nur bedingt mit Sildenafil verglichen werden können, da sie in 2-Position einen Phenylring aufwiesen und aufgrund dessen möglicherweise anders in der Bindungstasche des Rezeptors liegen.

Die eingangs aufgestellte Hypothese, dass es sich bei PDE5-Inhibitoren um Adenosin-Rezeptor-Liganden handelt, konnte damit bestätigt werden. Unabhängig konnte dies für Sildenafil am A_{2A}AR parallel auch von einer Arbeitsgruppe nachgewiesen werden.⁴¹⁴ Außerdem wurde publiziert, dass strukturell ähnliche Verbindungen ebenfalls an Adenosin-Rezeptoren binden, z. B. verschiedene Pyrazolo[4,3-*d*]pyrimidin-7-on-Derivate als Liganden von A₁AR, A_{2A}AR und A₃AR.⁴¹⁵⁻⁴¹⁷

Da Sildenafil, Vardenafil, Lodenafil und Udenafil am A_{2A}AR die im Vergleich zu den anderen AR-Subtypen höchste Affinität aufwiesen, wurde im nächsten Schritt die intrinsische Aktivität der Verbindungen an diesem Rezeptor-Subtyp bestimmt. Dazu wurden cAMP-Akkumulations-Experimente mit CHO-Zellen durchgeführt, in denen der humane A_{2A}AR zur Expression gebracht wurde. Der G_s-gekoppelte A_{2A}AR bewirkt nach seiner Aktivierung einen Anstieg der intrazellulären cAMP-Produktion. Durch Zugabe des PDE4-selektiven Phosphodiesterase-Inhibitors Ro20-1724 kann der Abbau des gebildeten cAMPs gehemmt werden. Die Agonist-induzierte cAMP-Produktion wurde auf die cAMP-Produktion normalisiert, die durch die Zugabe des Adenylatzyklase-Aktivators Forskolin (Endkonzentration 100 µM) ausgelöst wurde. Bei 10 µM der vier genannten PDE5-Inhibitoren konnte keine cAMP-Produktion nachgewiesen werden. Daher kann ausgeschlossen werden, dass es sich bei den untersuchten PDE5-Inhibitoren um A_{2A}AR-Agonisten handelt.

In weiteren Experimenten wurde untersucht, ob Sildenafil, Vardenafil, Lodenafil und Udenafil A_{2A}AR-Antagonisten sind. Dazu wurden Kurven mit dem A_{2A}AR-Agonisten NECA aufgenommen und es wurde untersucht, ob die Zugabe zweier konstanter Konzentrationen von PDE5-Inhibitoren je eine Verschiebung der Agonisten-Kurve auslöste. Die PDE5-Inhibitor-Konzentrationen wurde so gewählt, dass sie jeweils einem Vielfachen des in Bindungsstudien bestimmten K_i-Wertes entsprechen (10 x K_i und 100 x K_i, zur Berechnung diente der gerundete K_i-Wert der Verbindungen, nämlich 73 nM für Sildenafil, 80 nM für Vardenafil, 230 nM für Lodenafil und 96 nM für Udenafil). In Tabelle 3.4 sind die Ergebnisse dieser Experimente zusammengefasst.

Es wird deutlich, dass alle vier untersuchten PDE5-Inhibitoren in der Lage sind, die Konzentrations-Wirkungskurve von NECA nach rechts zu verschieben. Bei einer Konzentration, die dem zehnfachen K_i-Wert der PDE5-Inhibitoren entspricht, findet man für die vier untersuchten PDE5-Inhibitoren eine Verschiebung der NECA-Kurve um etwa den Faktor 5. Bei einer zehnfach höheren Konzentration verschiebt sich die Agonisten-Kurve um Faktoren zwischen 37 und 59. Damit handelt es sich bei Sildenafil, Vardenafil, Lodenafil und Udenafil um A_{2A}AR-Antagonisten. Aufgrund ihrer Struktur und der antagonistischen Aktivität verwandter Verbindungen an allen untersuchten AR-Subtypen war dies auch das erwartete Ergebnis.⁴¹⁵⁻⁴¹⁸

Tabelle 3.4: Verschiebung der Konzentrations-Wirkungskurven von NECA am humanen A_{2A}AR durch ausgewählte PDE5-Inhibitoren

Verbindung	EC ₅₀ ± SEM (nM) ^a				pA ₂ ^b	
	ohne PDE5-Inhibitor	+ PDE5-Inhibitor ^c c = 10 x K _i	„Shift“ ^d	+ PDE5-Inhibitor ^c c = 100 x K _i		„Shift“ ^d
31 , Sildenafil		215 ± 11	5	2550 ± 560	53	6.68
32 , Vardenafil	47.8 ± 3.5	242 ± 8	5	2800 ± 270	59	6.66
35 , Lodenafil		275 ± 11	6	2530 ± 210	53	6.35
37 , Udenafil		169 ± 4	4	1760 ± 530	37	6.46

^acAMP-Akkumulations-Experimente wurden mit CHO-Zellen durchgeführt, in denen der hA_{2A}AR zur Expression gebracht wurde. ^bDer pA₂-Wert wurde auf der Basis des Schild-Modells bestimmt. ^cDie für die Verschiebung der Agonist-Kurve eingesetzte Konzentration richtete sich nach dem in Bindungsstudien bestimmten K_i-Wert (s.o., Sildenafil: 73 nM, Vardenafil: 80 nM, Lodenafil: 230 nM, Udenafil: 96 nM). ^dDer „Shift“ beschreibt die Verschiebung der Agonist-Kurve und ist der Quotient aus EC₅₀ in Anwesenheit des PDE5-Inhibitors und EC₅₀ in Abwesenheit des PDE5-Inhibitors.

Betrachtet man jedoch die entsprechenden Konzentrations-Wirkungskurven stellt man überraschenderweise fest, dass die Efficacy von NECA durch die Zugabe von Sildenafil und Vardenafil, sowie hoher Konzentrationen von Lodenafil und Udenafil teilweise signifikant erhöht ist (Abbildung 3.6 und Abbildung 3.7). Die offensichtlichste Erklärung für diesen Effekt wäre, dass die Verbindungen der PDE-Hemmung eine verstärkte Akkumulation des cAMPs bewirken. Zwar wurde mit Ro20-1724 ein PDE-Inhibitor eingesetzt, der eine Akkumulation des cAMPs bewirkt, allerdings handelt es sich dabei um einen selektiven PDE4-Inhibitor, der andere cAMP-abbauende PDEs in der eingesetzten Konzentration nur teilweise oder überhaupt nicht hemmt, z. B. die cAMP-spezifischen PDE7B oder PDE8 der Maus.^{419,420} Gerade die erstgenannte PDE wird bei der eingesetzten Konzentration überhaupt nicht von Ro20-1724, aber schon durch die geringere der beiden eingesetzten Sildenafil-Konzentrationen fast vollständig inhibiert.⁴¹⁹ Geht man davon aus, dass diese Daten des Maus-Enzyms auf die Enzyme des Chinesischen Streifenhamsters übertragbar sind (beide Enzyme der Maus sind auch in den Ovarien exprimiert),^{419,420} könnte dies eine Erklärung für eine erhöhte cAMP-Akkumulation in Gegenwart von PDE5-Inhibitoren wie Sildenafil sein.

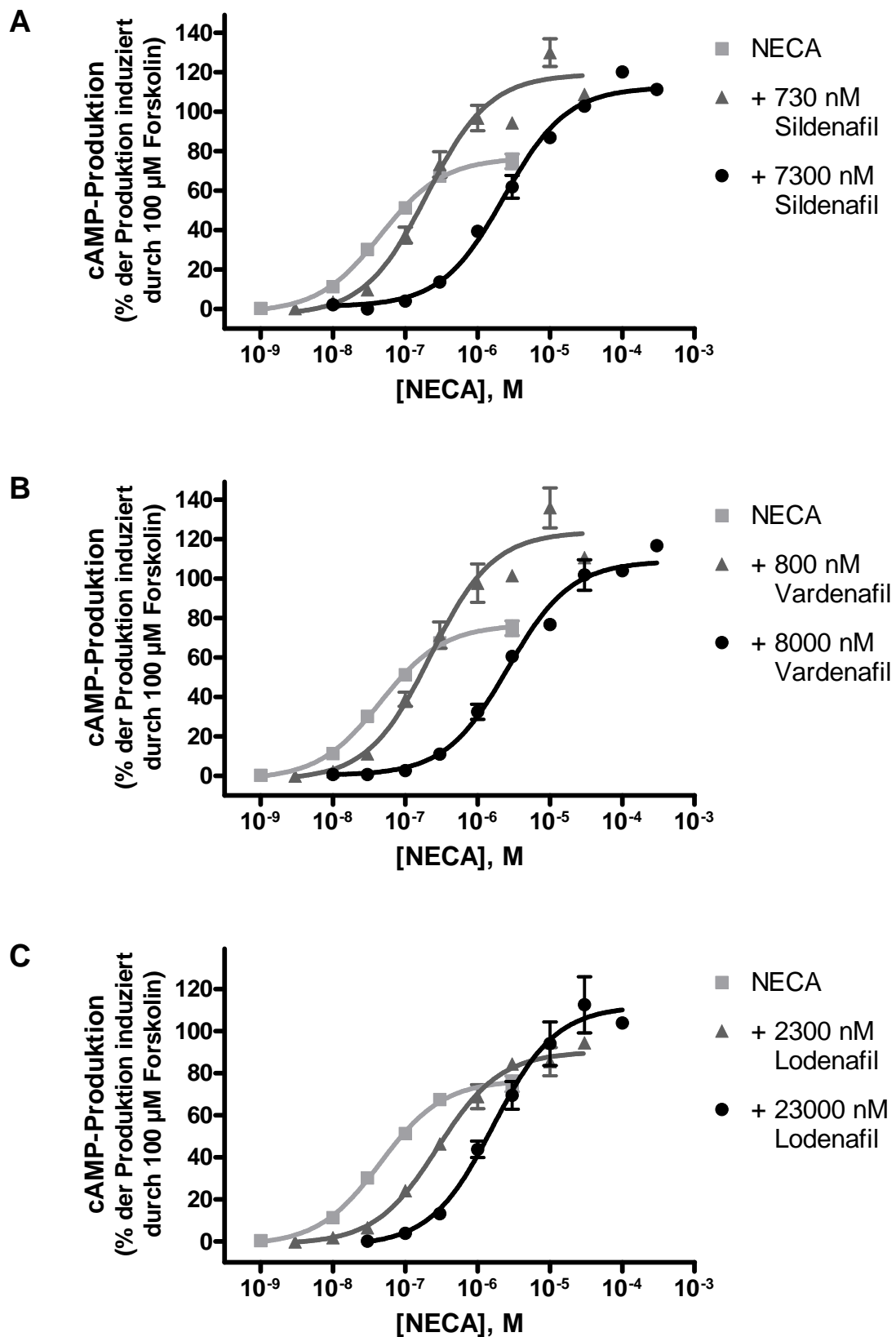


Abbildung 3.6: Verschiebung der Konzentrations-Wirkungskurven von NECA am humanen A_{2A}AR durch (A) Sildenafil, (B) Vardenafil und (C) Lodenafil

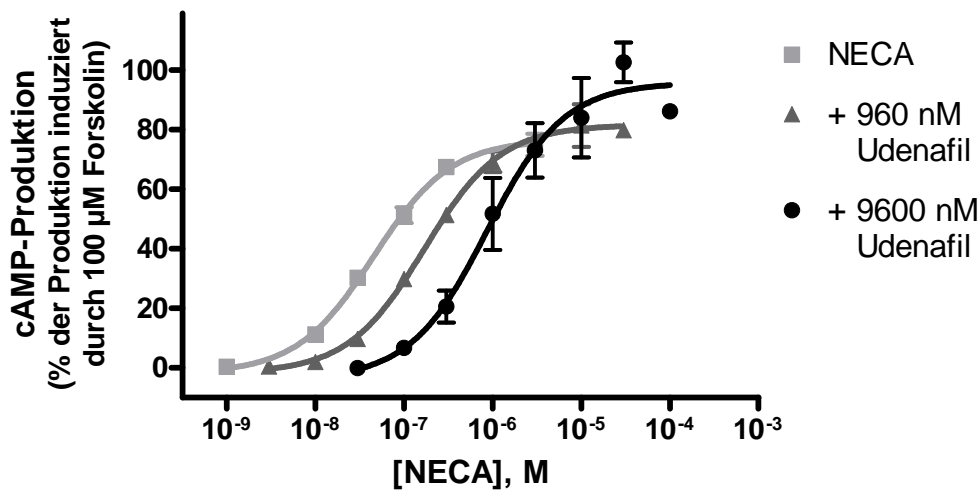


Abbildung 3.7: Verschiebung der Konzentrations-Wirkungskurven von NECA am humanen A_{2A}AR durch Udenafil

Neben dem Abbau stellt auch der Efflux von cAMP eine Möglichkeit dar, die intrazelluläre cAMP-Konzentration zu senken. Es konnte gezeigt werden, dass die Aktivierung von A₂AR diesen Efflux steigert (wahrscheinlich nicht nur äquibrativ über die cAMP-Produktion sondern über einen ungeklärten Mechanismus auch direkt).⁴²¹ Sildenafil ist in der Lage, in den eingesetzten Konzentrationen einen für den cAMP-Efflux verantwortlichen Transporter zu hemmen („multidrug resistance protein“, K_i-Wert 267 nM).³⁶¹ Allerdings bewirkt auch Ro20-1724 bei der eingesetzten Konzentration eine Hemmung des cAMP-Effluxes.⁴²¹ Darüber hinaus spielt der cAMP-Efflux bei der Elimination des cAMPs eine vergleichsweise geringe Rolle.⁴²¹ Durch die Behandlung mit Sildenafil könnte theoretisch eine cGMP-Akkumulation stattgefunden haben. cGMP ist in der Lage, die cAMP-selektive PDE3 zu hemmen, was zu einem verringerten Abbau des cAMP geführt haben könnte.⁴²² Allerdings kann cGMP genauso die cAMP-selektive PDE2 stimulieren und so einen verstärkten cAMP-Abbau bedingen.³⁵⁵ Außerdem ist es unwahrscheinlich, dass unter den Versuchsbedingungen Reize zur cGMP-Produktion vorlagen.

Bei genauerer Betrachtung kann weder die verstärkte Hemmung des cAMP-Abbaus noch der verringerte cAMP-Efflux die Erhöhung der Efficacy erklären, da die in Abbildung 3.6 und Abbildung 3.7 angegebenen Kurven normalisiert wurden. Auch in den zur Normalisierung genutzten Ansätzen mit Forskolin lagen die PDE5-Inhibitoren in der entsprechenden Konzentration vor. Es ist davon auszugehen, dass die oben genannten PDE5-Inhibitor-Effekte durch die Normalisierung relativiert werden. Daher muss es einen

anderen Grund für die erhöhte Efficacy geben. Es ist nicht auszuschließen, dass die PDE5-Inhibitoren positive allosterische Modulatoren des A_{2A}AR darstellen. Man könnte die Ergebnisse dadurch erklären, dass die PDE5-Inhibitoren allein an eine allosterische Bindungsstelle binden. Die Bindung müsste dann aber dazu führen, dass sowohl Antagonisten ([³H]MSX-2) als auch Agonisten (NECA in cAMP-Experimenten) aus der orthosterischen Bindungstasche verdrängt werden. Dies erscheint zwar unwahrscheinlich, aber mit SCH-202676 konnte scheinbar ein ähnlich ungewöhnlicher allosterischer Modulator gefunden werden, der u. a. am A_{2A}AR gleichermaßen die Bindung von Antagonisten und Agonisten verringert.⁴²³ Später konnte allerdings gezeigt werden, dass SCH-202676 wahrscheinlich nicht an allosterische Bindungsstellen, sondern über seine Thiol-Gruppen unspezifisch an Proteine bindet.⁴²⁴ Es erscheint wahrscheinlich, dass die PDE5-Inhibitoren, die strukturelle Ähnlichkeit zu orthosterisch bindenden Xanthin-Derivaten aufweisen, nicht ausschließlich mit einer allosterischen Bindungsstelle des A_{2A}AR interagieren. Dies würde bedeuten, dass die PDE5-Inhibitoren gleichzeitig orthosterische Antagonisten und positive allosterische Modulatoren des A_{2A}AR sein müssten. Obwohl es nicht sinnvoll erscheint, kann man diese Kombination anhand der vorliegenden Daten zunächst nicht ausschließen.

Da diese ungewöhnliche Kombination fragwürdig erschien, wurden die Daten eingehend geprüft und es fiel auf, dass sich die Forskolin-induzierte cAMP-Menge in Ab- und Anwesenheit der PDE5-Inhibitoren unterschied. Bei den am gleichen Tag durchgeführten Experimenten wurde die Forskolin-induzierte cAMP-Produktion in Anwesenheit eines PDE5-Inhibitors auf die Forskolin-induzierte cAMP-Produktion in Abwesenheit dieser Verbindung normalisiert und die Ergebnisse gemittelt (Abbildung 3.8). Es wird deutlich, dass besonders Vardenafil und Sildenafil eine deutliche Verringerung der Forskolin-induzierten cAMP-Produktion herbeiführen. Dies belegt möglicherweise einen bislang noch nicht publizierten Effekt der PDE5-Inhibitoren: Den Antagonismus von Forskolin an der Adenylatzyklase. Daher kann die in Abbildung 3.6 und Abbildung 3.7 beobachtete erhöhte Efficacy am besten durch die Normalisierung auf das Forskolin-Signal erklärt werden. Die Efficacy ist also nur scheinbar erhöht, weil die Bezugsgröße durch die PDE5-Inhibitoren verringert wurde. Der Grad der verringerten Forskolin-Antwort korreliert tatsächlich auch mit der scheinbar erhöhten Efficacy: Vardenafil und Sildenafil bewirken einen scheinbar starken Anstieg der Efficacy wegen ihrer relativ starken Effekte auf die Forskolin-induzierte cAMP-Produktion. Bei Lodenafil und Udenafil sind beide Effekte geringer (vgl. Abbildung 3.6, Abbildung 3.7 und Abbildung 3.8). Tatsächlich wurde auch schon im Ergebnisteil einer Publikation eine, wenn auch moderate, Sildenafil-vermittelte

Verringerung der Forskolin-induzierten cAMP-Produktion (bei niedrigen Sildenafil-Konzentrationen) dargestellt (dabei wurden isolierte glatte Muskelzellen des humanen Corpus cavernosum untersucht).⁴²² Allerdings wurde diesem Effekt keine Bedeutung beigemessen. Interessant ist auch, dass es sich bei Sildenafil nicht um einen Antagonisten handeln kann, der an die gleiche Bindungsstelle wie Forskolin bindet, da Sildenafil zwar bei geringen Konzentrationen das Forskolin-Signal hemmt, bei hohen Konzentrationen aber massiv potenziert.⁴²² Bindungsstudien mit [³H]Sildenafil an Fraktionen von Zelllysaten der humanen Lunge zeigten, dass nur die Fraktionen, die die PDE5 enthielten, eine signifikante Bindung von Sildenafil aufwiesen.⁴²⁵ Allerdings wurden die Membranen und damit auch die daran assoziierte Adenylatzyklase vor der Fraktionierung abgetrennt.⁴²⁵ In Folgeexperimenten (z. B. Bindungsstudien mit [³H]Forskolin) wäre es interessant zu untersuchen, ob die PDE5-Inhibitoren tatsächlich direkt an die Adenylatzyklase binden, wie die scheinbar paradoxe Modulation des Forskolin-Effekts zustande kommt und welche funktionelle Relevanz diese Entdeckung hat.

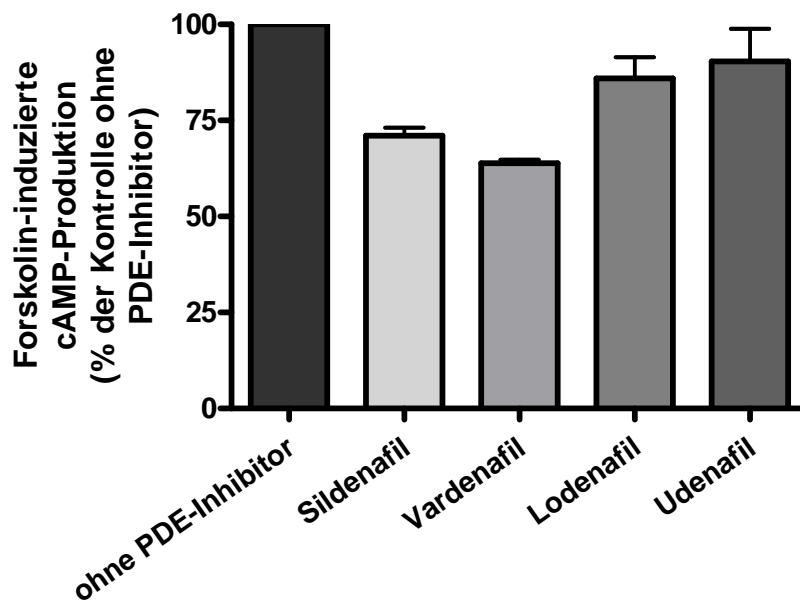


Abbildung 3.8: Verringerung Forskolin-induzierter cAMP-Produktion durch PDE5-Inhibitoren
Konzentration (10 x K_i): Sildenafil 730 nM, Vardenafil 800 nM, Lodenafil 2300 nM, Udenafil 960 nM).

Das Forskolin-Signal erscheint damit als ungünstige Bezugsgröße für diese Experimente. Dagegen erscheint das Signal eines Liganden, der einen endogenen G_s-gekoppelten GPCR aktiviert als geeignet. Jedoch sind die meisten der bekannten endogen exprimierten GPCRs in CHO-Zellen G_i- oder G_q-gekoppelt. Die wenigen endogen exprimierten G_s-gekoppelten GPCRs scheinen eine so geringe Expression aufzuweisen, dass zumindest in unseren Händen kein ausreichend hohes cAMP-Signal generiert werden konnte (z. B. mit Prostaglandin E₂).⁴²⁶ Daher erschien Forskolin trotz unbefriedigender Eignung als die einzige Verbindung, deren Signal als Bezugsgröße genutzt werden konnte.

Es kann hervorgehoben werden, dass sich an den bestimmten EC₅₀-Werten und den Kurvenverschiebungen, trotz der beschriebenen, wahrscheinlich fehlerbehafteten Normalisierung, nichts ändert. Da davon ausgegangen werden kann, dass die PDE5-Inhibitoren wahrscheinlich keinen Einfluss auf die Efficacy von A_{2A}AR nehmen, können die Daten klar dahingehend gedeutet werden, dass es bei den PDE5-Inhibitoren wahrscheinlich um kompetitive A_{2A}AR-Antagonisten handelt. Aus diesem Grund ist es zulässig, die Daten anhand des Schild-Modells zu untersuchen und pA₂-Werte zu berechnen (siehe Tabelle 3.4, zum Zweck der Schild-Analyse wurden die Kurven nicht auf Forskolin, sondern auf den jeweiligen E_{max}-Wert von NECA normalisiert). Der pA₂-Wert ist der negativ dekadische Logarithmus der Antagonisten-Konzentration, die eine Erhöhung des EC₅₀-wertes um den Faktor 2 bewirkt. Die Höhe des pA₂-wertes jedes PDE5-Inhibitors korreliert relativ gut mit der Höhe seiner in Bindungsstudien bestimmten Affinität: Sildenafil (K_i 72.7 nM, pA₂ 6.68) > Vardenafil (K_i 80.3 nM, pA₂ 6.66) > Udenafil (K_i 95.8, pA₂ 6.46) > Lodenafil (K_i 227 nM, pA₂ 6.35).

Die vier als Antagonisten identifizierten PDE5-Inhibitoren entsprechend in einigen wichtigen Punkten den von Müller und Ferré vorgeschlagenen Pharmakophor-Modellen für A_{2A}AR-Antagonisten:⁴²⁷ In ihrer bizyklischen Kernstruktur besitzen die PDE5-Inhibitoren wie die Adenin-abgeleiteten Antagonisten sowohl Wasserstoffbrücken-Donatoren und -Akzeptoren. Weiterhin kann der Alkoxy-substituierte Phenylrest eine vorgeschlagene lipophile Tasche des Rezeptors ausfüllen.⁴²⁷

Man kann sich die Frage stellen, ob der Antagonismus der PDE5-Inhibitoren relevante Auswirkungen auf die Therapie mit diesen Verbindungen hat. Es ist unwahrscheinlich, dass die Wirkung über die AR auch zum proerektile Effekt der PDE5-Inhibitoren beiträgt, da nicht die Blockade sondern vielmehr die Aktivierung vornehmlich des A_{2B}AR proerektile Wirkung hat. Zwar wurde es hier nicht nachgewiesen, aber es ist aufgrund

der Struktur der PDE5-Inhibitoren unwahrscheinlich, dass sie agonistisch an den anderen AR-Subtypen wirken. Um einen Hinweis darauf zu erhalten, ob die PDE5-Inhibitoren AR-vermittelte unerwünschte Arzneimittelwirkungen auslösen, wurden die Nebenwirkungsprofile von Sildenafil, Vardenafil und Tadalafil verglichen (Daten stammen aus dem Mircomedex, Truven Health Analytics). Es wurde nach unerwünschten Arzneimittelwirkungen gesucht, die nur bei der Behandlung mit Sildenafil und Vardenafil, aber nicht oder mit geringerer Häufigkeit bei Tadalafil auftreten. Leider ist keine solche unerwünschte Arzneimittelwirkung aufgefallen, die sich eindeutig mit einer antagonistischen Wirkung an AR erklären ließe. Es wäre aber verlockend anzunehmen, dass die potentiell antagonistische Wirkung der PDE5-Inhibitoren am A_{2B}AR Priapismen verhindern. So wurde gezeigt, dass die Aktivierung dieses AR-Subtyps zu der Pathogenese von Priapismen entscheidend beiträgt.³⁴² Allerdings müssten dann bei der Behandlung mit Tadalafil deutlich häufiger Priapismen auftreten, als bei der Behandlung mit Sildenafil oder Vardenafil. Dies ist allerdings wohl nicht der Fall.

Das Ausbleiben drastischer AR-vermittelter unerwünschter Arzneimittelwirkungen hängt wahrscheinlich mit der Pharmakokinetik der PDE5-Inhibitoren zusammen: Für Sildenafil wurde gezeigt, dass ca. 30 min nach oraler Gabe des Arzneistoffes eine maximale Plasmakonzentration von etwa 1 µM (bei einer Dosis von 100 mg) bzw. etwa 600 nM (bei einer Dosis von 50 mg) erreicht wird.⁴²⁸ Nach weiteren 2.5 h hat sich die Konzentration halbiert und nach einigen weiteren Stunden sind nur noch sehr geringe Konzentrationen im Plasma vorhanden.⁴²⁸ Aufgrund der hohen Protein-Bindung von Sildenafil von ca. 96 % ist es fraglich, ob es *in vivo* überhaupt zu einer Blockade der A_{2A}AR kommt.³⁸¹ Es ist daher davon auszugehen, dass eine mögliche A_{2A}AR-Blockade, wenn überhaupt, nur kurzzeitig und aufgrund der Indikation des Arzneistoffes ohnehin unregelmäßig erfolgt. Ähnlich dem Koffein-vermittelten Antagonismus an den Rezeptoren, verursacht eine solche kurzzeitige Blockade von A_{2A}AR keine drastischen Effekte.

Die hier beschriebenen Entdeckungen sind also vermutlich nicht von entscheidender Bedeutung für den therapeutischen Einsatz der PDE5-Inhibitoren. Allerdings kann die Kenntnis dieses neuen Wirkmechanismus von PDE5-Inhibitoren dabei helfen, Forschungsergebnisse die unter Einsatz von Sildenafil generiert wurden, korrekt zu interpretieren. Wie in Kapitel 3.2.1.3 beschrieben, fand man zum Beispiel einen antagonistischen Effekt von Sildenafil auf die A_{2A}AR-vermittelte verminderte Blutplättchen-Aggregation.⁴¹³ Während die Autoren diese Wirkung des Sildenafil auf eine Interaktion zwischen den sekundären Botenstoffen cAMP und cGMP zurückführten,

kann aufgrund der hier vorgestellten Ergebnisse klar von einem direkten Antagonismus am A_{2A}AR ausgegangen werden.⁴¹³ Genau wie in diesem Fall könnte es sinnvoll sein, auch andere Sildenafil-Effekte genauer zu betrachten. Selbst solche Effekte, bei denen bislang überhaupt nicht von einer Beteiligung von AR ausgegangen wurde, könnten neu geprüft und ggf. neu evaluiert werden.

Zusammenfassend kann man sagen, dass anhand der vorliegenden Ergebnisse gezeigt werden konnte, dass die meisten von Sildenafil abgeleiteten PDE5-Inhibitoren mit größtenteils submikromolarer Affinität an einzelne AR-Subtypen binden. Die höchste Affinität wiesen sie am A_{2A}AR auf, weshalb ihre intrinsische Aktivität an diesem Rezeptorsubtyp bestimmt wurde. Es konnte gezeigt werden, dass Sildenafil, Vardenafil, Lodenafil und Udenafil A_{2A}AR-Antagonisten sind. Daneben konnten auch Hinweise darauf erhalten werden, dass besonders Sildenafil und Vardenafil möglicherweise zusätzlich über einen unbekanntem Wirkmechanismus modulierend auf die Adenylatzyklase einwirken. Da besonders Sildenafil verstärkt in der Forschung Einsatz findet, können diese Erkenntnisse bei der Interpretation der durch Sildenafil induzierten Effekte nützlich sein.

4 Pharmakologische Charakterisierung der P2Y-Rezeptor-artigen Waisen-Rezeptoren GPR34 & GPR171

4.1 Einleitung

4.1.1 GPR34

Die Klonierung der kodierenden DNA des humanen GPR34 wurde erstmals 1999 beschrieben.⁴²⁹ Aufgrund alternativer im Leseraster befindlicher Startcodons und seltener alternativer Spleiß-Prozesse wurden mehrere Varianten des Rezeptors beschrieben.^{429,430} Die Hauptvariante des Rezeptors wird von einer 1146 bp langen Sequenz kodiert.⁴³⁰ Das Gen des Rezeptors befindet sich auf dem X-Chromosom in der Region p11.3-p11.4.^{429,431} Das GPR34-Gen besteht aus drei Exons; die komplette kodierende DNA des Rezeptors liegt auf Exon 3.⁴³⁰ Interessanterweise befindet sich die kodierende DNA des GPR34 in einem Intron des CASK-Gens (in entgegengesetzter Richtung), das für eine Calcium/Calmodulin-abhängige Serin-Protein-Kinase kodiert.⁴³²

Phylogenetisch kann der zur Klasse A gehörende GPR34 der δ -Gruppe und darin der Purin-Untergruppe zugeordnet werden.^{7,89} Zu den phylogenetisch engsten Verwandten des GPR34 zählt der GPR171.^{7,89} Der GPR34 weist die höchste Homologie zu Subtypen der P2Y-Rezeptoren (z. B. P2Y₁₄R, 31 % Identität), der LPA-Rezeptoren (z. B. LPA₆R, 24 %) sowie anderer Orphan-Rezeptoren (z. B. GPR17, 26 % und GPR171, 25 %) auf (Identitäten wurden anhand des Online-Programms ClustalW2 bestimmt, www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalw2).

Der GPR34 enthält zwar eine für P2Y-Rezeptoren typische HXXR-Sequenz innerhalb der Transmembrandomäne (TMD) 6, ihm fehlt aber eine für die Aktivierung von P2Y-Rezeptoren wichtige basische Aminosäure in der TMD7.⁴²⁹ Aus diesem Grund hielten es die Entdecker des GPR34 für unwahrscheinlich, dass es sich bei dem GPR34 um einen P2Y-Rezeptor-Subtypen handelt.⁴²⁹ Der GPR34 ist in jedem der zahlreichen untersuchten Wirbeltiere konserviert und damit ein evolutionsgeschichtlich alter Rezeptor (über 450 Millionen Jahre alt).⁴³³ Allerdings sind nur 17 % der Aminosäuren dieses Rezeptors in Fischen und Säugtieren konserviert (für Rhodopsin: 43 %).⁴³³

Man fand drei potentielle N-Glycosylierungsstellen in der Nähe des N-Terminus und je eine weitere im extrazellulären „loop“ (ECL) 2 und im ECL3.⁴²⁹ Außerdem fand man auch mögliche PKA- und PKC-Phosphorylierungsstellen im intrazellulären „loop“ (ICL) 3 und der C-terminalen Domäne, wo sich auch eine mögliche Palmitoylierungsstelle befindet.^{429,431} In Western-Blot-Untersuchungen konnte der Rezeptor in Proteinbanden zwischen 75 und 90 kDa nachgewiesen werden, was auf einen hohen Grad an posttranslationaler Modifikation oder Rezeptor-Oligomerisierung hindeuten könnte.⁴³¹

In Immunofluoreszenz-Experimenten sowie anhand der Untersuchung von Fusionsproteinen von Rezeptor und GFP konnte gezeigt werden, dass der Rezeptor vornehmlich an der Zellmembran, sowie im Endoplasmatischen Retikulum und Golgi-Apparat lokalisiert ist.^{430,431}

4.1.1.1 Expression

Aufgrund des Vorhandenseins der cDNA des GPR34 in den cDNA-Bibliotheken der folgenden Gewebe kann für diese die Expression der GPR34-mRNA angenommen werden: weißes Fettgewebe, Plazenta, Uterus, B-Zellen, fötales Gehirn, Leber und Milz sowie Retina.^{429,431} Über Northern-Blot-Analysen fand man eine nahezu ubiquitäre mRNA-Expression des GPR34 im Gehirn von Ratten und Menschen.⁴²⁹ Mit der gleichen Methode fand man auch eine relativ gleichmäßige, ubiquitäre mRNA-Expression in zahlreichen peripheren Organen und Geweben, mit hoher Expression in lymphatischen Geweben.^{429,431}

Durch *in situ*-Hybridisations-Experimente (Ratten- und Maushirn), Reverse-Transkriptase-PCR-Untersuchungen (RT-PCR, verschiedene Organe von Mensch und Maus) und quantitative Real-Time-Experimente (qPCR, verschiedene Organe der Maus) konnte die ubiquitäre Expression der GPR34-mRNA bestätigt werden.^{429,430,434,435} In qPCR-Ansätzen fand man die höchste mRNA-Expression im Gehirn und der Milz von Mäusen.⁴³⁰ In einer anderen Studie ließen sich anhand von qPCR die höchsten Expressionen der murinen und humanen GPR34-Rezeptoren jedoch in Mastzellen und anderen Lymphozyten nachweisen.⁴³⁶

In Gen-Array-Untersuchungen konnte gezeigt werden, dass die Expression des GPR34 in Gewebe aus Magentumoren hochreguliert war.⁴³⁷ Allerdings ließ sich diese Beobachtung nicht durch qPCR-Untersuchungen bestätigen.⁴³⁷ Außerdem konnte über

qPCR die verstärkte Expression des GPR34 in Melanomen und Lymphomen nachgewiesen werden.⁴³⁸⁻⁴⁴⁰

4.1.1.2 Pharmakologie

4.1.1.2.1 Signalwege

Erste Hinweise auf einen G-Protein-vermittelten Signalweg des GPR34 erhielt man nach Überexpression des Rezeptors in COS-7-Zellen.⁴³³ Genau wie nach Überexpression des G_i-gekoppelten P2Y₁₂-Rezeptors fand man für den humanen und den Maus-GPR34 eine im Vergleich zu Kontrollen verringerte Forskolin-induzierte cAMP-Produktion.⁴³³ Damit konnte man einerseits zeigen, dass der Rezeptor wahrscheinlich G_i-gekoppelt ist und darüber hinaus möglicherweise auch basale Aktivität aufweist (oder ein Agonist im Assay-Medium enthalten ist).⁴³³ Asn3.35 ist in allen GPR34 verschiedener Spezies konserviert.⁴³³ In Mutagenese-Studien zeigte man, dass die Alanin-Mutante von Asn3.35 des Rezeptors eine noch höhere Basalaktivität aufwies als der Wildtyp-Rezeptor, was so auch für weitere GPCRs gefunden wurde, in denen die Aminosäure ebenfalls konserviert ist.⁴³³ Dieser Aminosäure könnte daher eine Rolle bei der Stabilisierung des Rezeptors in seiner inaktiven Konformation zukommen.⁴³³

Durch die Identifizierung des ersten GPR34-Agonisten (s. u.) konnte die vermutete G_i-Kopplung schließlich nachgewiesen werden.⁴³⁶ Außerdem fand man eine Agonist-induzierte, Rezeptor-vermittelte ERK-Aktivierung, die sich genau wie die Signale in cAMP-Akkumulations-Experimenten, durch Pertussis-Toxin (PTX) hemmen ließ.⁴³⁶

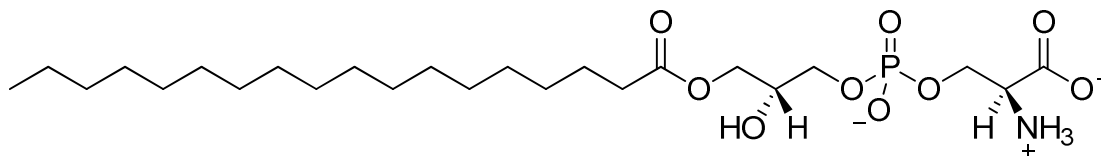
4.1.1.2.2 Endogener Ligand

Wie schon von den Entdeckern des GPR34 angenommen, konnte später gezeigt werden, dass sich der Rezeptor nicht durch Nucleotide (ADP und UTP) aktivieren lässt (transfizierte COS-7-Zellen, cAMP- und IP-Akkumulations-Experimente).⁴³¹ Auch andere Verbindungen wie Phospholipide, Leukotriene, Hydroxy-Eicosatetraensäuren und Pankreastatin konnten den Rezeptor nicht aktivieren (transfizierte COS-7-Zellen, cAMP- und IP-Akkumulations-Experimente).⁴³¹

Im Jahr 2006 wurde schließlich der erste Agonist des Rezeptors (Mensch, Maus und Meerschweinchen) veröffentlicht: Lysophosphatidyl-L-Serin (Lyso-PS, siehe Abbildung 4.1), das auch den potentiellen endogenen Agonisten des GPR34 darstellt.⁴³⁶ Dies konnte für den humanen Rezeptor in verschiedenen funktionellen Experimenten bestätigt werden (siehe Tabelle 4.1) und später auch für den Ratten-GPR34 gezeigt werden.⁴⁴¹

Lyso-PS kann ausgehend von Phosphatidylserin (PS) durch das sekretorische Enzym Phospholipase A₁ (PLA₁) produziert werden.^{441,442} PLA₁ zeigt eine geringe Basalexpression, wird aber aufgrund inflammatorischer Reize stark hochreguliert.⁴⁴² Das als Substrat dienende PS befindet sich normalerweise auf der intrazellulären Seite der Zellmembran, wird aber aufgrund apoptotischer Zelluntergänge für die extrazelluläre PLA₁ zugänglich.⁴⁴²

Die Testung verschiedener Lyso-PS-Spezies zeigte, dass für die Wirksamkeit am GPR34 in *sn*-2-Position des Moleküls eine Fettsäure mit einer Kette von mindestens 14 C-Atomen vorliegen sollte.⁴³⁶ Es konnte weiterhin gezeigt werden, dass schon kleine Veränderungen des Lyso-PS-Moleküls zu einer drastischen Verringerung der Wirksamkeit der entsprechenden Verbindungen führte.⁴³⁶ So waren beispielsweise Lysophosphatidyl-D-Serin, -Threonin, -Ethanolamin (cAMP-Akkumulations-Experimente, transfizierte CHO-Zellen) und Lysophosphatidyl-Inositol, -Cholin, -Glycerol sowie Lysophosphatidsäure inaktiv am hGPR34 (TGF α -„shedding“-Experimente, transfizierte HEK293-Zellen).^{436,441,443}



40, Stearoyl-Lyso-PS (18:0)

Abbildung 4.1: Struktur eines potentiellen endogenen GPR34-Agonisten

Tabelle 4.1: Wirksamkeit von Lyso-PS am humanen GPR34

Assay	EC ₅₀ (nM)	Lyso-PS-Spezies	Expressionssystem
cAMP (G _i)	270 ⁴³⁶	Palmitoyl-Lyso-PS (16:0)	transf. CHO-Zellen
	inaktiv ⁴⁴⁴	Palmitoyl-Lyso-PS (16:0)	transf. COS-7-Zellen
GTP γ S-Bindung	5890 ⁴³⁶	Lauroyl-Lyso-PS (12:0)	transf. CHO-Zellen
	423 ⁴³⁶	Myristoyl-Lyso-PS (14:0)	transf. CHO-Zellen
	453 ⁴³⁶	Palmitoyl-Lyso-PS (16:0)	transf. CHO-Zellen
TGF α „shedding“	ca. 100 ⁴⁴¹	(nicht genannt)	transf. HEK293-Zellen
Migrationsassay	129 ⁴⁴¹	(nicht genannt)	transf. CHO-Zellen

Obwohl zwei unabhängige Arbeitsgruppen Lyso-PS als GPR34-Agonisten bestätigen konnten, fand eine weitere Gruppe um Torsten Schöneberg, dass der humane und der Maus-GPR34 nicht durch Palmitoyl- oder Stearoyl-Lyso-PS aktiviert werden konnten (cAMP-Akkumulations-Experimente mit transfizierten COS-7-Zellen und Calcium-Mobilisations-Experimente unter Koexpression eines chimären G-Proteins sowie dynamische Massenumverteilungs-Experimente mit nicht näher beschriebenen transfizierten Säugetier-Zellen).^{436,441,443,444} Der Grund für diese unterschiedlichen Beobachtungen ist unklar, könnte gemäß den Autoren aber in unterschiedlichen experimentellen Bedingungen oder der chemischen Reinheit des verwendeten Lyso-PS zu suchen sein.⁴⁴⁴ Eine andere Gruppe führt die Unterschiede in erste Linie auf verschiedene Expressionssysteme zurück.⁴⁴¹ Schöneberg und Kollegen fanden weiterhin, dass im Gegensatz zu dem GPR34 von Mensch und Maus, der des Karpfen durch verschiedene Lyso-PS-Spezies aktiviert werden konnte (Fische sind die einzigen Spezies in denen mehrere GPR34-Subtypen bekannt sind; Karpfen weisen drei Subtypen – 1, 2a und 2b – auf, die alle mit unterschiedlicher Potenz durch Lyso-PS aktiviert werden).⁴⁴⁴ Falls Lyso-PS wie von den beiden anderen Gruppen nachgewiesen doch ein Agonist an GPR34 von Säugetieren ist, kann man in Anbetracht der sehr geringen Homologie zwischen den Rezeptor-Orthologen davon ausgehen, dass viele der hoch-konservierten Aminosäuren eine wichtige Rolle bei der Ligandenbindung spielen könnten (Beispiel für die geringe Homologie: nur ca. 36 % Identität zwischen humanem GPR34 und den einzelnen Subtypen des Karpfen; Ergebnis eines Proteinsequenz-Alignments durchgeführt mit dem Online-Programm ClustalW2, www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalw2).

Um zu erforschen, welche Anteile des Rezeptors dafür verantwortlich sind, dass der GPR34 des Karpfen (insbesondere der Subtyp 2a), nicht aber der des Menschen, in den Händen der Schöneberg-Gruppe von Lyso-PS aktiviert wird, wurden verschiedene chimäre Rezeptoren generiert.⁴⁴⁵ Dabei konnte gezeigt werden, dass besonders der mittlere Teil der TMD5 und Anteile des ECL2 für die Aktivierung der Rezeptoren durch Lyso-PS wichtig sind.⁴⁴⁵

Trotz widersprüchlicher Ergebnisse am humanen GPR34 wurde basierend auf dem potentiellen Agonisten Lyso-PS der Name „LPS₁-Rezeptor“ für diesen Rezeptor vorgeschlagen.⁴⁴⁶ Neben Lyso-PS ist bislang kein weiterer Ligand des humanen oder der murinen GPR34 bekannt. Für die Karpfen-GPR34-Subtypen 2a und 2b wurde 2'-/3'-O-(2-Aminoethyl-carbamoyl)-ATP als erster Antagonist mit geringer Potenz beschrieben.⁴⁴⁵

4.1.1.3 (Patho)physiologie

Aufgrund der Lokalisation des GPR34-Gens wurde angenommen, dass der Rezeptor eine Rolle bei der X-chromosomalen kongenitalen stationären Nachtblindheit spielen könnte.⁴⁴⁷ Da sich bei Patienten mit diesem Phänotyp keine Veränderung des GPR34-Gens nachweisen ließ, konnte diese Hypothese aber nicht bestätigt werden.⁴⁴⁷ Basierend auf der erhöhten Expression des GPR34 in Zellen neoplastischer Gewebe, ist denkbar, dass der Rezeptor bei der Krebs-Pathogenese eine Rolle spielen könnte.⁴³⁸⁻⁴⁴⁰ Möglicherweise moduliert der GPR34 die Proliferation von (Tumor-)Zellen, da gezeigt wurde, dass die Überexpression des Rezeptors zu einer verstärkten Proliferation von HeLa-Zellen führt.⁴⁴⁰

Es gibt einige Hinweise darauf, dass der GPR34 eine Rolle bei Immun- und Entzündungsreaktionen spielen könnte, allein durch die Tatsache, dass der endogene Agonist Lyso-PS in entzündeten und teilweise apoptotischen Geweben wahrscheinlich verstärkt produziert wird.⁴⁴² Da der GPR34 von aktivierten Microglia-Zellen in Mäusen hochreguliert wurde, könnte er eine Rolle bei neuroinflammatorischen Prozessen spielen.^{434,442} Lyso-PS verstärkt weiterhin u. a. (PTX-sensitiv) die Mastzell-Degranulation, weshalb auch aufgrund der Expression des GPR34 auf Mastzellen davon ausgegangen wurde, dass dieser Prozess über den GPR34 vermittelt wird.⁴³⁶ Diese Annahme wurde zudem dadurch gestützt, dass die verstärkte Mastzell-Degranulation genau wie die Aktivierung des GPR34 nur durch Lyso-PS und nicht durch strukturell nah verwandte Verbindungen ausgelöst werden konnte.^{442,443} Als Ausnahme davon bewirkt auch Lysophosphatidylthreonin eine verstärkte Mastzell-Degranulation, aktiviert jedoch nicht den GPR34.⁴⁴³ Darüber hinaus verursacht Lyso-PS diesen Effekt auch in Mastzellen von GPR34-KO-Mäusen, weshalb eine Beteiligung des GPR34 an diesem Prozess ausgeschlossen werden kann.⁴⁴⁴ Möglicherweise spielen andere kürzlich identifizierte Rezeptoren für Lyso-PS (wie der P2Y₁₀-Rezeptor oder der GPR174) eine Rolle bei diesem Prozess.⁴⁴⁸ In GPR34-KO-Mäusen, die grundsätzlich phänotypisch unauffällig waren, fand man weiterhin eine erhöhte Mobilität von Mastzellen, eine gestörte osmotische Homöostase in retinalen Gliazellen, sowie eine erhöhte Erregerlast zwei Monate nach einer Pilzinfektion.⁴⁴⁴ Diese Funde könnten auf eine immunmodulatorische Rolle des GPR34 hinweisen.⁴⁴⁴

Ob der GPR34 einige der zahlreichen weiteren Lyso-PS-Effekte (z. B. die Migration verschiedener Zelltypen oder die Proliferationshemmung von T-Zellen) vermitteln könnte, muss in zukünftigen Untersuchungen geklärt werden.^{441,442} Erste Hinweise auf eine Rolle

des GPR34 für die Zellmigration erhielt man, als man zeigte, dass Lyso-PS in CHO-Zellen nur nach rekombinanter Expression des GPR34 Migrations-stimulierend wirkte.⁴⁴¹

4.1.2 GPR171

Die kodierende DNA des humanen GPR171 wurde erstmals 1997 beschrieben.⁴⁴⁹ Zu diesem Zeitpunkt wurde der Rezeptor aufgrund des Namens des entsprechenden cDNA-Klons H963 genannt.⁴⁴⁹ Das Gen des Rezeptors liegt auf Chromosom 3q24.⁴⁵⁰ Die kodierende DNA des Rezeptors umfasst 960 bp und wird in ein Rezeptorprotein übersetzt, das aus 320 Aminosäuren besteht (Daten stammen aus der Nucleotid-Datenbank des NCBI, NM_013308). Der GPR171 ist genau wie einer seiner nächsten phylogenetischen Verwandten, der GPR34, ein P2Y₁₂-artiger Orphan-GPCR.^{432,451} Die GPR171-mRNA ist in Mäusen vor allem in der Milz, im Thymus und im Knochenmark exprimiert (bestimmt über qPCR).⁴⁵² Im Menschen konnte man über qPCR auch die mRNA-Expression des GPR171 in T-Lymphozyten und natürlichen Killerzellen nachweisen.⁴⁵³

Bis zum Abschluss der Experimente, die in der vorliegenden Arbeit beschrieben wurden, war kein Ligand des GPR171 beschrieben worden, weshalb auch nur sehr wenig über die (patho)physiologische Rolle des Rezeptors bekannt ist. Man fand bei einer Gen-Array-Untersuchung eine erhöhte Expression des GPR171 in Magenkarzinom-Zellen, konnte diesen Fund aber in qPCR-Untersuchungen nicht bestätigen.⁴³⁷ Aufgrund der Lokalisation des GPR171-Gens hätten Varianten des Rezeptors ursächlich für das Auftreten des Usher-Syndroms Typ 3 (Hauptsymptom: progressiver Verlust des Gehörs) sein können.⁴⁵⁴ Allerdings konnte mit der Identifizierung des USH3-Gens, das in der Nähe des GPR171-Gens lokalisiert ist, das tatsächlich für diese Krankheit verantwortliche Protein identifiziert werden.⁴⁵⁴

Außerdem konnte man zeigen, dass Patienten mit einem moderaten Methylierungsgrad des GPR171-Gens in Zellen der Lunge eine höhere Überlebensrate nach der chirurgischen Entfernung eines Lungentumors hatten als Patienten mit einem hohen Methylierungsgrad des Gens.⁴⁵⁵ Die epigenetische Regulation des GPR171-Gens kann damit als Biomarker für die Prognose bei Lungenkrebs dienen.⁴⁵⁵ Außerdem wurde für einen Patienten gezeigt, dass die GPR171-Expression in Lungentumor-Zellen reduziert ist.⁴⁵⁶ Darüber hinaus konnte auch in Lymphomen in Mäusen eine verringerte mRNA-

Expression des GPR171 nachgewiesen werden.⁴⁵⁷ Dem GPR171 kommt also möglicherweise eine antionkogene Wirkung zu.

Nach Kontakt von Maus-Mastzellen mit Bakterien konnte über eine Microarray-Analyse gezeigt werden, dass die mRNA-Expression des GPR171 hochreguliert wurde.⁴⁵⁸ Außerdem wurde gezeigt, dass in den in die Lunge einwandernden menschlichen Neutrophilen eine erhöhte GPR171-Expression vorliegt.⁴⁵⁹ Damit könnte der GPR171 möglicherweise immunmodulierende Funktion haben. Weiterhin konnte man durch qPCR-Untersuchungen zeigen, dass die Expression des GPR171 aufgrund einer Virusinfektion in einer menschlichen Harnblasen-Karzinom-Zelllinie fünf Tage nach der Infektion hochreguliert wurde.⁴⁶⁰ Weitere Studien müssen zeigen, ob dies Virus-gesteuert dem Befall der Zelle oder Wirts-gesteuert seiner Abwehr dient.

Außerdem fand man Hinweise darauf, dass der GPR171 bei arteriosklerotischen Prozessen eine Rolle spielt, da seine Expression in einem In-vitro-Modell (humane Zelllinie) durch die Induktion einer Arteriosklerose-artigen Transformation hochreguliert war.⁴⁶¹

In einer umfassenden Studie zur physiologischen Rolle des GPR171 konnte man Hinweise dafür finden, dass der Rezeptor bei der Differenzierung hämatopoietischer Progenitorzellen eine Rolle spielt.⁴⁶² Es konnte für Mäuse gezeigt werden, dass der GPR171 in hämatopoietischen Stammzellen und Progenitorzellen, sowie ausdifferenzierten lymphoiden, nicht aber myeloiden Zellen exprimiert war (im genauen Gegensatz zu den verwandten P2Y₁₂₋₁₄-Rezeptoren).⁴⁶² In In-vitro-Versuchen konnte darüber hinaus gezeigt werden, dass die Überexpression des Rezeptors die myeloide Differenzierung einer Knochenmarks-Zelllinie der Maus unterdrückte, während der „knock down“ des GPR171 in der gleichen Zelllinie zu einer verstärkten myeloiden Differenzierung führte.⁴⁶² Der erste Fund konnte nach der Transplantation genetisch veränderten Knochenmarks *in vivo* bestätigt werden.⁴⁶²

Im Oktober 2013 wurde der erste - und zudem wahrscheinlich physiologische - Agonist für die murinen GPR171-Orthologe publiziert: Das Neuropeptid BigLEN (LENSSPQAPARLLPP).⁴⁶³ Es wird von hypothalamischen Neuronen freigesetzt und gilt als mögliches Signalmolekül zur Regulierung des Körpergewichtes.⁴⁶³ Anhand des Radioliganden [¹²⁵I]Tyr-BigLEN konnte zudem auch die Affinität dieses neuen Liganden an Membranpräparationen von primären Zellen des Ratten-Hypothalamus bestimmt werden: Der Radioligand und BigLEN selbst binden mit sehr hoher Affinität an die

Membranen (K_D 0.5 nM, IC_{50} -Wert von BigLEN 7.9 nM).⁴⁶³ In funktionellen GTP γ S-Bindungsexperimenten mit denselben Membranen konnte für BigLEN außerdem ein EC_{50} -Wert von 1.6 nM bestimmt werden.⁴⁶³ Die Signale konnten durch PTX-Behandlung aufgehoben werden.⁴⁶³ Darüber hinaus konnte die G_i -Kopplung des Rezeptors auch in cAMP-Experimenten nachgewiesen werden (EC_{50} 1.6 nM).⁴⁶³ Nach der heterologen Expression des GPR171 der Ratte in CHO-Zellen konnte endgültig bestätigt werden, dass es sich bei dem G-Protein-gekoppelten BigLEN-Rezeptor um den GPR171 handelt: In Calciumexperimenten unter Koexpression promiskuitiver G-Proteine konnte mit BigLEN ein Calcium-Signal erhalten werden.⁴⁶³ Überraschenderweise wurden weder Bindungsstudien noch GTP γ S- oder cAMP-Experimenten an Rezeptoren durchgeführt, die in CHO-Zellen zur Expression gebracht wurden. Die Spezifität der Ergebnisse aus Bindungsstudien und funktionellen Experimenten zur ERK1/2-Phosphorylierung an Membranen von Zellen aus dem Hypothalamus der Ratte konnten jedoch über siRNA-Versuche belegt werden.⁴⁶³ Durch ähnliche Versuche konnte außerdem gezeigt werden, dass die Hemmung der cAMP-Produktion sowie die Ausbildung von Neuriten aufgrund der Behandlung mit BigLEN in einer neuronalen Maus-Zelllinie ebenfalls über den GPR171 vermittelt wird.⁴⁶³

Weiterhin konnte gezeigt werden, dass ein Spaltprodukt von BigLEN, das Tetrapeptid LLPP ebenfalls an den Ratten-GPR171 bindet (IC_{50} 76 nM) und den Rezeptor der Ratte und der Maus aktiviert (rGPR171 EC_{50} : GTP γ S-Experimente 17 nM, cAMP-Experimente 36 nM, Experimente wurden mit Membranen hypothalamischer Membranen der Ratte und mit einer neuronalen Zelllinie der Maus durchgeführt).⁴⁶³ Allerdings ist LLPP weniger potent als BigLEN und zudem ein Partialagonist. Das Tripeptid LPP ist dagegen am GPR171 der Ratte inaktiv.⁴⁶³

Nach Knock-down des Rezeptors in Mäusen konnte gezeigt werden, dass die Tiere nachts größere Nahrungs- und Wassermengen aufnahmen.⁴⁶³ Daraus wurde geschlossen, dass der Rezeptor modulierend auf die Nahrungsaufnahme einwirkt.⁴⁶³ Jedoch konnte auch eine erhöhte Aktivität der Tiere nachgewiesen werden.⁴⁶³ Möglicherweise ist die erhöhte Nahrungs- und Wasseraufnahme lediglich eine Folge der erhöhten Aktivität der Tiere. So konnte auch keine Gewichtszunahme der Tiere beobachtet werden.⁴⁶³

Die Identifizierung des ersten GPR171-Agonisten war ein entscheidender Schritt, um die Erforschung des Rezeptors wesentlich voranzutreiben. So konnte beispielweise erstmals die G_i -Protein-Kopplung des Rezeptors nachgewiesen werden. Jedoch könnten weitere

synthetische (und damit potentiell metabolisch stabilere) Agonisten helfen die wenigen Erkenntnisse über die (patho)physiologische Rolle des Rezeptors, die meist allein aufgrund seines Expressionsprofils abgeleitet wurden, zu bestätigen.

4.2 Ergebnisse & Diskussion

4.2.1 GPR34

Ziel des Projektes war es, ein experimentelles System zu generieren, das die pharmakologische Erforschung des humanen GPR34 (hGPR34) erlauben sollte. Zunächst galt es zu überprüfen, ob Lysophosphatidylserin (Lyso-PS), dessen Rolle als möglicher Agonist des GPR34 kontrovers diskutiert wird, den Rezeptor tatsächlich aktiviert.⁴⁴⁴ Darüber hinaus wurde die Testung von Substanzbibliotheken angestrebt, um weitere Liganden dieses wenig erforschten Orphan-Rezeptors zu identifizieren.

Die Arbeiten wurden mit der Klonierung der Rezeptor-cDNA begonnen. Dabei wurde die cDNA des Rezeptors in das für retrovirale Transfektionen verwendete Plasmid pLXSN eingeführt. In der Literatur wurde beschrieben, dass CHO-Zellen ein geeignetes Expressionssystem für den hGPR34 darstellen.⁴³⁶ Daher wurde dieses Expressionssystem auch für die Arbeit an diesem Projekt ausgewählt: Mithilfe eines retroviralen Transfektionssystems wurde der hGPR34 in CHO-Zellen zur Expression gebracht. In einem vorläufigen Test wurde in cAMP-Akkumulations-Experimenten überprüft, ob Lyso-PS eine Verringerung der Forskolin-induzierten cAMP-Akkumulation bewirkt (siehe Abbildung 4.2). Es konnte gezeigt werden, dass Lyso-PS keinen Einfluss auf die akkumulierte cAMP-Menge in untransfizierten CHO-Zellen hat. In Zellen, die rekombinant den hGPR34 exprimieren, verursachte Lyso-PS dagegen eine Konzentrations-abhängige Verringerung der Forskolin-induzierten cAMP-Akkumulation. Dies bedeutet einerseits, dass CHO-Zellen ein geeignetes, weil Hintergrund-freies Expressionssystem für den hGPR34 darstellen. Andererseits geben diese Experimente den ersten Hinweis darauf, dass es sich - entgegen der Funde einer anderen Gruppe⁴⁴⁴ - bei Lyso-PS um einen hGPR34-Agonisten handelt.

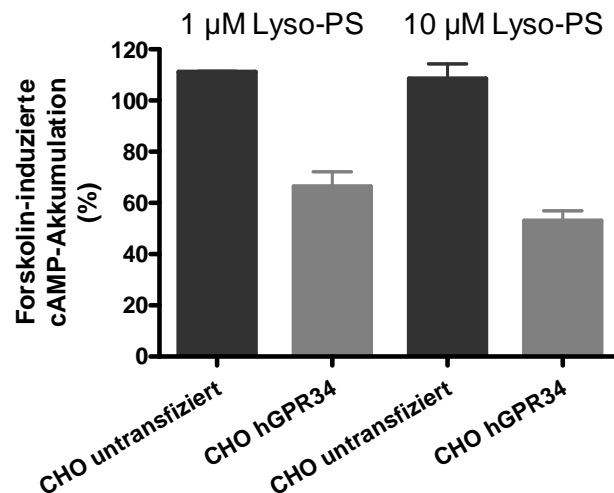


Abbildung 4.2: cAMP-Akkumulations-Experimente am hGPR34: Vortest

Die Experimente wurden mit untransfizierten CHO-Zellen und mit CHO-Zellen in denen der hGPR34 zur Expression gebracht wurde, durchgeführt (n = 2).

Dies konnte in weiteren Experimenten bestätigt werden: Stearoyl-Lyso-PS aktivierte den hGPR34 mit einem EC_{50} -Wert von 341 nM (siehe Tabelle 4.2 und Abbildung 4.3A). Dieser Wert liegt in einer vergleichbaren Größenordnung wie der Wert, der für ein ähnliches Lyso-PS-Derivat von einer anderen Arbeitsgruppe gefunden werden konnte.⁴³⁶ Obwohl es nicht überraschend war, da bereits Lyso-PS-Spezies mit kürzeren Fettsäureresten als GPR34 beschrieben wurden, konnte hier zum ersten Mal gezeigt werden, dass auch Stearoyl-Lyso-PS ein GPR34-Agonist ist. Da verschiedene experimentelle Systeme bei der Testung von Lyso-PS-Derivaten mit unterschiedlich langen Fettsäureresten verwendet wurden (siehe Tabelle 4.1, S. 116), ist ein direkter Vergleich nicht möglich. Jedoch ergibt sich der Eindruck, dass Fettsäure-Reste ab einer Kettenlänge von 14 Kohlenstoffatomen die höchste Wirksamkeit aufweisen, während längere Fettsäurereste (wie Stearoyl-, 18:0) gut toleriert werden.

Tabelle 4.2: Wirksamkeit von Stearoyl-Lyso-PS am humanen GPR34

Bestimmung der cAMP-Menge	Zelllinie	$EC_{50} \pm SEM$ (μM) ^a
[³ H]cAMP-Filtrationsexperimente	polyklonal	0.341 ± 0.116^b
	monoklonal	0.219 ± 0.062^c
Reporter-Experimente (Lumineszenz-Messung)	monoklonal	2.58 ± 0.52^b

^aAngegeben sind die Mittelwerte \pm SEM aus zwei bis drei unabhängigen Experimenten, die in

^bTriplikaten oder ^cDuplikaten durchgeführt wurden.

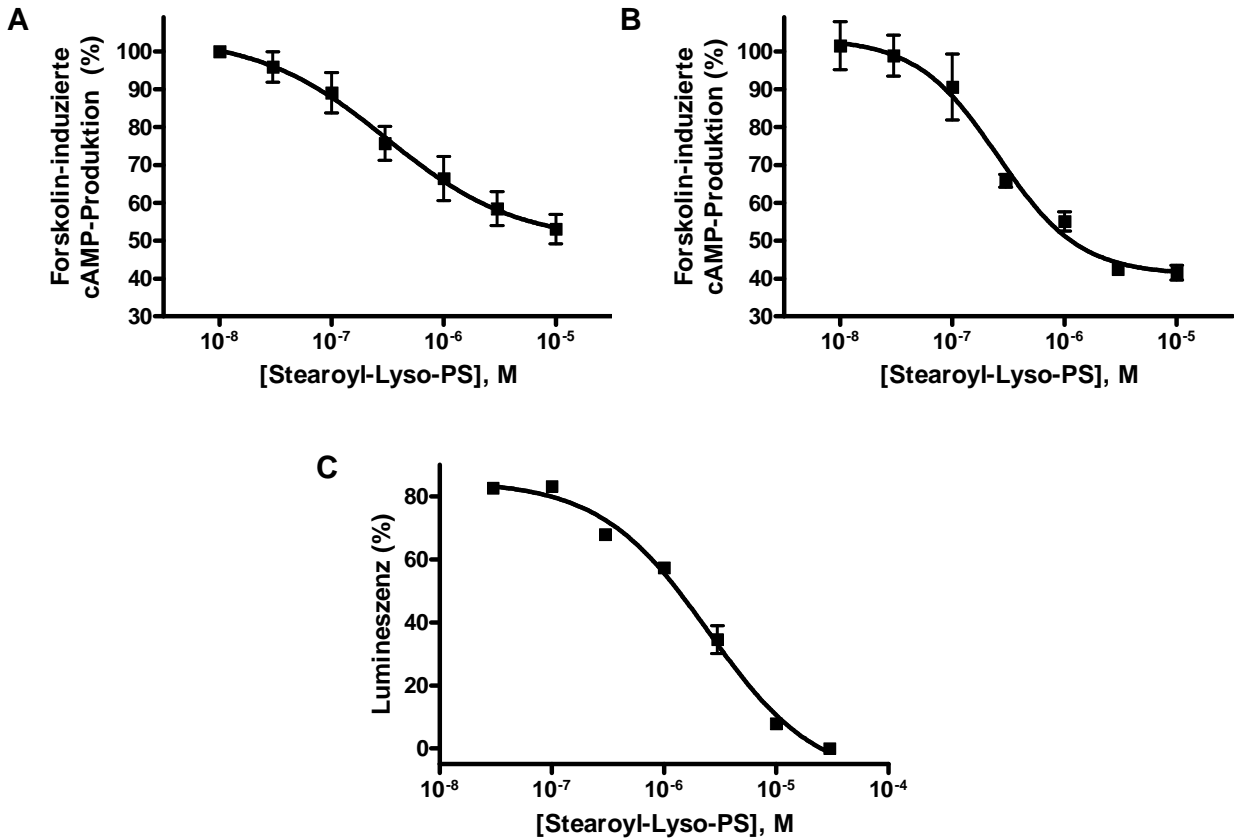


Abbildung 4.3: cAMP-Akkumulations-Experimente am hGPR34

Konzentrations-Wirkungskurven von Stearoyl-Lyso-PS am humanen GPR34. Für die Experimente wurden CHO-Zellen verwendet, die den GPR34 heterolog exprimieren. Dabei handelte es sich um (A) polyklonale oder (B, C) monoklonale Zellen. Der cAMP-Gehalt wurde durch (A, B) [³H]cAMP-Filtrationsexperimente oder (C) durch Reportergergen-Experimente (Lumineszenz-Messung) bestimmt. Dargestellt sind Mittelwerte ± SEM aus zwei bis drei unabhängigen Experimenten, die in (A,C) Triplikaten oder (B) Duplikaten durchgeführt wurden. Die zugehörigen EC₅₀-Werte sind in Tabelle 4.2 angegeben.

In weiteren Experimenten wurde damit begonnen, ausgewählte Verbindungen in cAMP-Akkumulations-Experimenten auf ihre Fähigkeit hin zu untersuchen den Rezeptor zu aktivieren. Da keine großen Mengen des Standardagonisten Lyso-PS zur Verfügung standen und das experimentelle Format ohnehin nur einen geringen Durchsatz zulässt (24-Well-Format), wurde in diesen ersten Testungen darauf verzichtet, den Standard-Agonist grundsätzlich als Kontrolle mitzutesten. Dies stellte sich als Fehler heraus, da bei späteren Experimenten festgestellt wurde, dass Lyso-PS keine Signale mehr auszulösen vermochte.

Daher wurde die Hypothese aufgestellt, dass es im Laufe der Kultivierung der Zellen zu einer drastischen Reduktion der Rezeptor-Expression gekommen war. Tatsächlich konnte in Experimenten mit Zellen, die kurz nach der Transfektion eingefroren wurden,

ein Lyso-PS-Signal gefunden werden. Jedoch wurde für Zellen, die nur wenige Tage in Kultur waren, bereits ein verringertes Signal beobachtet. Schon nach etwa 10 Tagen war das Signal:Hintergrund-Verhältnis so schlecht, dass keine Auswertung der Daten mehr möglich war. Die Daten der begonnenen Screening-Kampagne erschienen damit wertlos, weil davon auszugehen war, dass keine Rezeptoraktivierung mehr hätte detektiert werden können.

Die anfänglichen Experimente wurden mit einer heterogenen, polyklonalen Zellpopulation durchgeführt. Auch wenn in anderen Projekten (wie dem cAdeR-Projekt, siehe Kapitel 2) keine Signalverringering im Laufe der Kultivierung einer heterogenen Zellpopulation beobachtet wurde, ist es möglich, dass solche Zellen der Gesamtpopulation, die eine sehr geringe Rezeptorexpression aufweisen, wesentlich schneller wachsen als die Zellen mit einer hohen Rezeptorexpression. Besonders in diesem Fall kann es sinnvoll sein, eine monoklonale Zelllinie für die Untersuchungen zu nutzen. Daher wurden Zellen in einem nächsten Schritt kurz nach der retroviralen Transfektion mit einem hGPR34-DNA-Konstrukt vereinzelt und kultiviert, um monoklonale Zellpopulationen zu erhalten. Auf diese Weise wurden mehrere monoklonale Zelllinien generiert und in cAMP-Akkumulations-Experimenten getestet. Die Zelllinie mit dem besten Signal:Hintergrund-Verhältnis (10 μ M Stearoyl-Lyso-PS versus Puffer) wurde für weitere Untersuchungen ausgewählt. In Abbildung 4.3B ist eine Konzentrations-Wirkungskurve dargestellt, die anhand dieser Zelllinie generiert wurde. Mit einem EC₅₀-Wert von 219 nM hat sich die Wirksamkeit von Lyso-PS im Vergleich zu dem Wert der polyklonalen Zelllinie kaum verändert (siehe Tabelle 4.2). Jedoch wies die monoklonale Zelllinie ein deutlich besseres Signal:Hintergrund-Verhältnis als die polyklonale Zelllinie auf.

Besonders bei Orphan-Rezeptoren ist die Möglichkeit eines mittleren bis hohen Durchsatzes bei der Testung erstrebenswert, um eine große Anzahl an potentiellen Leitstrukturen in kurzer Zeit zu testen. Mit dem angewandten experimentellen System war dies - wie bereits beschreiben - allerdings nicht möglich. Daher wurden mit der optimierten Zelllinie weitere pharmakologische Experimente durchgeführt, die einen höheren Durchsatz erlauben: Calcium-Mobilisations-Experimente sowie Reporter-Experimente in denen die ERK-Phosphorylierung sowie die cAMP-Akkumulation untersucht wurden. Um mit β -Arrestin-Experimenten ein weiteres System zu testen, das einen mittelhohen Durchsatz von Testverbindungen erlaubt, wurden weitere neue Zelllinien generiert. Dazu wurde die kodierende DNA des GPR34 in vier Plasmide (pCMV-PK, pCMV-PK2, pCMV-ARMS1-PK2, pCMV-ARMS2-PK2) eingeführt, die Teil

eines offenen Systems sind, das die Herstellung von Zelllinien für β -Arrestin-Rekrutierungs-Experimente erlaubt (PathHunter[®], DiscoverX).

Parallel zu den Experimenten mit diesen neuen Testsystemen wurden klassische cAMP-Akkumulations-Experimente durchgeführt (mit der Bestimmung der cAMP-Menge über [³H]cAMP-Filtrationsexperimente), um sicher zu stellen, dass in den Zellen grundsätzlich eine Rezeptor-Aktivierung detektiert werden kann. Von den vier beschriebenen experimentellen Formaten lieferten nur die Reporter-gen-cAMP-Akkumulations-Experimente auswertbare Daten (siehe Abbildung 4.3C). Mit einem EC₅₀-Wert von 2.58 μ M weist Stearoyl-Lyso-PS in diesen Experimenten eine 10fach geringere Wirksamkeit im Vergleich zu klassischen cAMP-Akkumulations-Experimenten auf. Eine solch deutliche Abweichung ist überraschend, weil nicht nur der gleiche Signalweg beobachtet, sondern auch der gleiche sekundäre Botenstoff detektiert wurde. Der Grund für diese Abweichung muss daher in dem experimentellen Aufbau beider Systeme liegen: Während bei den klassischen cAMP-Akkumulations-Experimenten direkt die Menge des gebildeten cAMPs bestimmt wird, wird bei den Reporter-gen-Experimenten indirekt von dem Substratumsatz eines Enzyms (dessen Expression cAMP-abhängig ist) auf die gebildete cAMP-Menge rückgeschlossen. Außerdem wurde im Gegensatz zu den [³H]cAMP-Filtrationsexperimenten bei den Reporter-gen-Experimenten kein PDE-Inhibitor eingesetzt. Denkbar ist auch, dass Lyso-PS einen unspezifischen Einfluss auf die Reporter-gen-Experimente nimmt.

Leider wurde im Verlauf der Untersuchungen festgestellt, dass sich das Signal:Hintergrund-Verhältnis der monoklonalen Zelllinie nach kurzer Zeit in Kultur ebenfalls stark verschlechterte. Der Grund für diese Beobachtung ist unklar. Es ist denkbar, dass die Zellen die Rezeptorexpression über einen unbekanntes Mechanismus aktiv herabsetzen. Möglich ist auch, dass in CHO-Zellen benötigte akzessorische Proteine fehlen, die die Oberflächen-Expression des Rezeptors dauerhaft sichern. Nicht auszuschließen ist außerdem, dass Lyso-PS lediglich ein Partialagonist des Rezeptors ist. So können Partialagonisten bei sehr hoher Expression eine ähnliche Efficacy wie Vollagonisten aufweisen.⁴⁶⁴ Sinkt die Expression kann dies auch eine deutlich verminderte Efficacy des Partialagonisten zur Folge haben.⁴⁶⁴ Man könnte außerdem hinterfragen, ob es sich wirklich um eine monoklonale Zelllinie handelte. So ist nicht auszuschließen, dass die einzelne zu beobachtende Zellkolonie aus zwei oder mehr Zellen hervorgegangen ist, die sich zufälligerweise in unmittelbarer Nähe zueinander abgesetzt hatten. Der extrem schnelle Verlust des Signales (innerhalb weniger Tage in Kultur) spricht allerdings dagegen: Zellen, die den Rezeptor exprimieren müssten extrem

langsam wachsen, während Zellen, die den Rezeptor nicht exprimieren sehr schnell wachsen. Da die Gesamtkolonie aber aus nur einer oder ggf. zwei Zellen hervorgegangen ist, liegen zum Zeitpunkt der Experimente bereits diverse Generationen der Zellen vor. Damit müssten die potentiell schneller wachsenden Zellen die anderen Zellen zum Zeitpunkt des Experimentes bereits „überwuchert“ haben.

Obwohl eine verringerte Rezeptorexpression die wahrscheinlichste Erklärung für die Verschlechterung des Signal:Hintergrund-Verhältnisses ist, ist dies nicht sicher. Wenn auch unwahrscheinlich könnte auch genau das Gegenteil der Fall sein: in einem anderen Projekt (cAdeR, Kapitel 2) konnte beobachtet werden, dass pharmakologische Experimente erst etwa 10 Tage nach der Beendigung der retroviralen Transfektion möglich waren. Es schien, als wenn sich die Rezeptorexpression in dieser Zeitspanne deutlich steigerte. Außerdem ist bekannt, dass eine starke Überexpression von GPCRs zur konstitutiven Aktivität der Rezeptoren führt.^{431,465} Es wäre also denkbar, dass wenige Tage nach der Transfektion eine niedrige Rezeptorexpression vorliegt, die in einer geringen konstitutiven Aktivität des Rezeptors resultiert. Im Zuge des bei dieser Transfektionsmethode möglicherweise ansteigenden Expressionslevels könnte es zu einer ebenfalls steigenden konstitutiven Aktivität des Rezeptors kommen. Auch hierdurch ließe sich das verschlechterte Signal:Hintergrund-Verhältnis erklären, das sich einige Tage nach der Transfektion beobachten lässt. Allerdings bleiben diese Überlegungen spekulativ. In diesem Zusammenhang wäre es interessant, zum Beispiel über Zelloberflächen-ELISA- oder qPCR-Untersuchungen zu überprüfen, ob und wie das Signal:Hintergrund-Verhältnis der generierten monoklonalen Zelllinien mit der Rezeptorexpression korreliert. Möglicherweise könnte ein anderes Expressionssystem günstig sein (wobei z. B. für COS7-Zellen gezeigt wurde, dass das Signal:Hintergrund-Verhältnis auch sehr ungünstig ist).⁴⁴⁵ Sollte tatsächlich eine zu hohe Expression und damit eine zu hohe konstitutive Aktivität ursächlich für die beobachtete Problematik sein, könnte es sinnvoll sein, ein induzierbares System zu nutzen bei dem man das Expressionsniveau optimal einstellen kann.

Da das bestehende Testsystem nur mit unmittelbar zuvor transfizierten Zellen auswertbare Ergebnisse liefert, ist es leider kaum für die angestrebte Screening-Kampagne geeignet. Die beschriebenen weiterführenden Experimente und die Etablierung neuer Expressionssysteme wären sinnvoll, aber auch zeitintensiv. Aufgrund der vielversprechenden Fortschritte im parallel bearbeiteten GPR35-Projekt (Kapitel 5) wurden die Arbeiten am GPR34 zugunsten der Arbeit am GPR35 im Rahmen dieser Doktorarbeit zurückgestellt.

Obwohl dieses Projekt nur wenige Ergebnisse lieferte, so hat es doch interessante Fragen aufgeworfen. Es wäre beispielsweise interessant weiter zu erforschen, wodurch die Rezeptorexpression reguliert wird und warum die Aktivierbarkeit des Rezeptors abhängig vom Expressionssystem zu sein scheint. Außerdem konnte Lyso-PS als Agonist für den hGPR34 bestätigt werden. Da Lyso-PS jedoch nicht selektiv für den GPR34 zu sein scheint, bleibt die Identifikation weiterer und potenterer Liganden für diesen Rezeptor ein wichtiger Schritt bei der tiefergehenden Erforschung des GPR34.

4.2.2 GPR171

Zu Beginn dieses Projektes war kein Ligand des humanen GPR171 (hGPR171) bekannt. Aus diesem Grund wurde die Identifizierung eines solchen Liganden angestrebt. Da die G-Protein-Kopplung des hGPR171 unbekannt war, wurden β -Arrestin-Rekrutierungs-Experimente als Testsystem ausgewählt. Eine entsprechende Zelllinie wurde käuflich erworben (PathHunter[®], DiscoverX). Um mit den möglicherweise identifizierten Liganden später die G-Protein-Kopplung des Rezeptors aufzuklären, wurde die cDNA des Rezeptors in den für retrovirale Transfektionen eingesetzten Vektor pLXSN eingebracht. Dem Startcodon der Rezeptor-DNA wurde außerdem eine Sequenz vorgeschaltet, die für ein myc-„Tag“ kodiert. Diese Markierung diente späteren Western-Blot-Untersuchungen. Der N-terminal markierte Rezeptor wurde dann über ein retrovirales Transfektionssystem in CHO-Zellen zur Expression gebracht. Aufgrund der Erfahrungen am hGPR34 wurde direkt nach der Transfektion eine monoklonale Selektion vorgenommen. Über qPCR- und Western-Blot-Untersuchungen wurde die Rezeptorexpression der monoklonalen Zelllinien bestimmt und es wurde eine Zelllinie ausgewählt, die in beiden Experimenten eine relativ hohe Rezeptorexpression aufwies. Von den generierten Zelllinien wurden kurz nach der Selektion zahlreiche Kryokulturen angelegt. Auch wegen der (ungewöhnlichen) Beobachtungen am hGPR34 wurden alle Experimente mit Zellen durchgeführt, die nur kurze Zeit kultiviert wurden.

Um ein gezielteres Vorgehen bei der Testung von Verbindungen am hGPR171 zu ermöglichen, wurden in einem chemogenomischen Ansatz durch Gerard van Westen (Arbeitsgruppe Prof. A. IJzerman, Universität Leiden, Niederlande) Vorhersagen zu potentiellen Liganden des hGPR171 gemacht.⁴⁶⁶ Zwar wurde für keine dieser Liganden eine hohe Affinität vorhergesagt, aber die Identifizierung einer Leitstruktur hätte einen wichtigen ersten Anhaltspunkt ergeben können. 27 strukturell vielfältige Verbindungen, für die die höchste Affinität am hGPR171 vorhergesagt wurde, wurden in β -Arrestin-Experimenten untersucht (siehe Tabelle 4.3). Alle Verbindungen wurden bei einer

Konzentration von 10 μM getestet. Nur eine der Verbindungen wies einen deutlich über 1 liegendes Signal:Hintergrund-Verhältnis auf: **47** mit einem Wert von 1.56 (zum Vergleich: bei maximaler Aktivierung des hGPR35 liegt dieser Quotient bei etwa 1.9). Aufgrund der anscheinend geringen Wirksamkeit und der mangelhaften Löslichkeit der Verbindung bei hohen Konzentrationen war es nicht möglich eine vollständige Konzentrations-Wirkungskurve dieser Verbindung aufzunehmen (siehe Abbildung 4.4). Auch die Extrapolation der Kurve ist nicht möglich, weil es durch den Mangel eines Vergleichs-Agonisten unmöglich ist zu sagen, auf welchen Wert ein maximales Signal ansteigen würde (abgesehen davon, dass zudem nicht klar ist, ob es sich bei der Verbindung um einen Vollagonisten handelt). Um auszuschließen, dass das beobachtete Signal unspezifisch ist, wurde die Verbindung in dem gleichen experimentellen System am humanen GPR35 getestet. Es konnte gezeigt werden, dass **47** in diesen Experimenten kein Signal auslöste (Effekt von $-6 \pm 3 \%$, normalisiert auf den Effekt von 30 μM Zaprinast). Dies spricht dafür, dass es sich bei dem beobachteten Signal am hGPR171 um ein spezifisches Signal handelte.

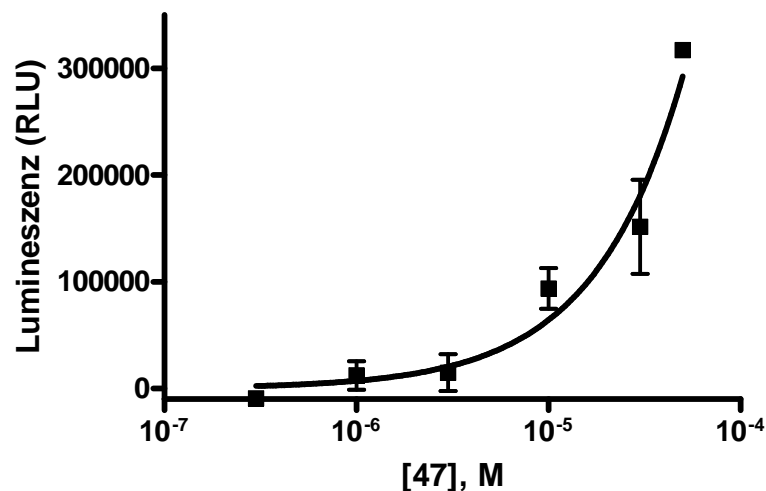


Abbildung 4.4: Konzentrations-Wirkungskurve am humanen GPR171

Dargestellt sind die Mittelwerte \pm Standardfehler aus zwei unabhängigen β -Arrestin-Rekrutierungs-Experimenten, die in Duplikaten durchgeführt wurden.

Tabelle 4.3: Testung vorhergesagter Liganden für den hGPR171^a

	Verbindung	Signal: Hintergrund ^b	Verbindung	Signal: Hintergrund ^b	
41		1.02	55		0.98
42		1.00	56		0.91
43		0.86	57		1.06
44		1.02	58		1.01
45		1.01	59		0.94
46		1.02	60		1.10
47		1.56	61		1.04
48		0.91	62		1.05

Tabelle 4.3 (Fortsetzung)

49		0.95	63		0.98
50		1.03	64		0.99
51		1.08	65		1.01
52		1.06	66		1.02
53		1.05	67		1.01
54		1.07			

^aTestung der Verbindungen in β -Arrestin-Rekrutierungs-Experimenten: Endkonzentration 10 μ M, Einzelmessung in Duplikaten. ^bSignal:Hintergrund = Quotient des Lumineszenz-Wertes, der bei der jeweiligen Verbindung gemessen wurde durch den Wert bei alleiniger Pufferzugabe.

Die meisten Verbindungen weisen in β -Arrestin-Rekrutierungs-Experimenten eine deutlich geringere Wirksamkeit als in anderen funktionellen Experimenten auf (siehe Tabelle 5.3, Kapitel 5.1.2.2). Daher wurde in cAMP-Akkumulations- und Calciumionen-Mobilisations-Experimenten untersucht, ob **47** GPR171-vermittelt eine der klassischen G-Protein-vermittelten Signalwege (G_s , G_i oder G_q) auslöst. Allerdings konnte bei Konzentrationen von bis zu 30 μ M kein entsprechendes Signal beobachtet werden. Damit scheint es sich bei **47** um einen funktionell selektiven Agonisten zu handeln, der

ausschließlich β -Arrestin-Rekrutierung, nicht aber die G-Protein-vermittelte Signalwege aktiviert. Zwar blieben die Ergebnisse dieser chemogenomischen Herangehensweise hinter den Erwartungen zurück, jedoch muss man einschränkend dazu sagen, dass mit diesem Ansatz keine Funktionalitäten vorhergesagt werden können. Es ist daher nicht auszuschließen, dass sich unter diesen Verbindungen auch ein möglicherweise potenter Antagonist befindet, der aufgrund des Mangels eines Agonisten schlicht nicht als solcher identifiziert werden konnte. Bei Verbindung **43** könnte es sich zum Beispiel um einen Antagonisten oder inversen Agonisten handeln, da das bei der Testung dieser Verbindung erhaltene Signal deutlicher unter dem Hintergrundsignal liegt (Signal:Hintergrund-Verhältnis 0.86).

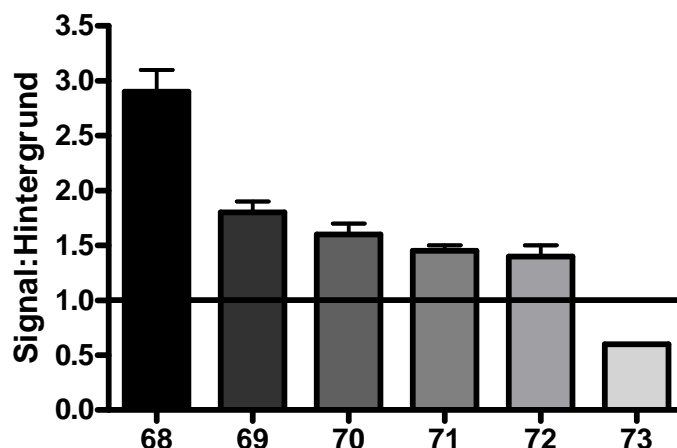
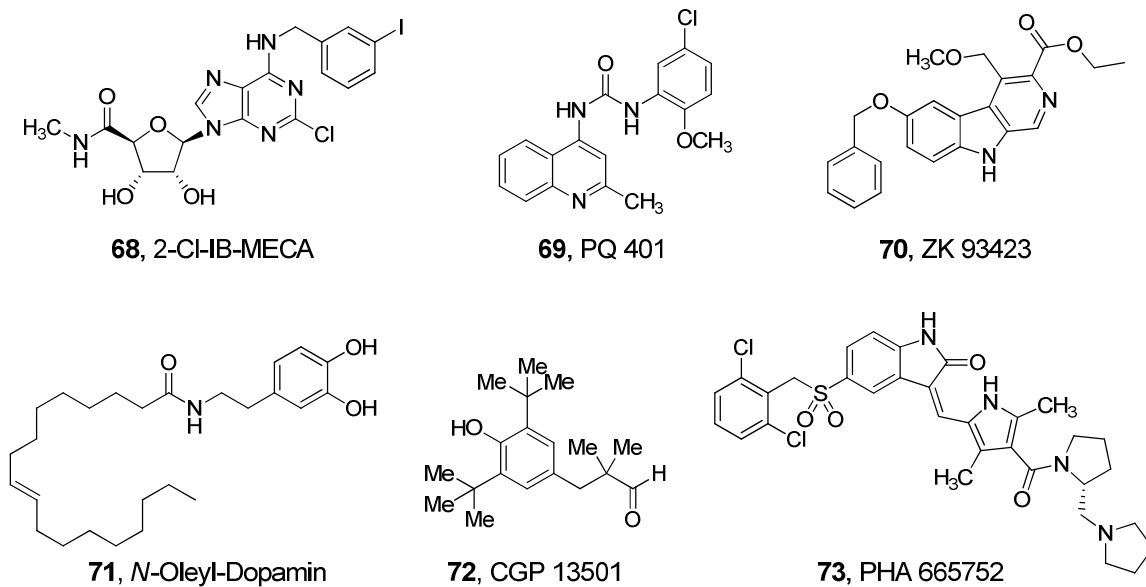


Abbildung 4.5: Screening-Hits am humanen GPR171.

In β -Arrestin-Rekrutierungs-Experimenten wurde eine 1120 Verbindungen umfassende Substanzbibliothek am hGPR171 getestet. Dargestellt sind die Mittelwerte \pm Standardfehler aus zwei unabhängigen Einzelmessungen.

Neben den durch den chemogenomischen Ansatz vorgeschlagenen Verbindungen wurde außerdem eine 1120 Verbindungen umfassende Substanzbibliothek (Tocriscreen Mini-Substanzbibliothek, Tocris) am hGPR171 getestet. Dabei handelt es sich um bekannterweise biologisch aktive Verbindungen, die in Einzeltestungen untersucht wurden. Bei einem Signal:Hintergrund-Verhältnis ab 1.4 bzw. ab 0.6 wurden die Verbindungen erneut getestet. Konnten Treffer verifiziert werden, wurden die Ergebnisse zur Prüfung der Spezifität mit den Ergebnissen am humanen GPR143 verglichen. An diesem Rezeptor wurde die gleiche Substanzbibliothek von Elisabetta de Filippo und Azeem Danish ebenfalls in β -Arrestin-Rekrutierungsexperimenten untersucht. Spezifische Signale konnten nach dieser Überprüfung für 6 der 1120 Verbindungen gefunden werden. Fünf Verbindungen bewirkten eine Erhöhung des Signal:Hintergrund-Quotienten auf über 1.4, eine Verbindung eine Verringerung des Quotienten auf 0.6 (siehe auch Abbildung 4.5). Mit 2-Cl-IB-MECA (**68**) konnte scheinbar ein Agonist mit mindestens moderater Wirksamkeit am hGPR171 identifiziert werden. Allerdings konnte dieser Treffer in Folgeexperimenten nicht bestätigt werden. Man muss dazu sagen, dass die Verdünnung, die für die Screenings eingesetzt wurde, in zwei unabhängigen Experimenten ein reproduzierbares Signal lieferte. Da diese Verdünnung aber nahezu verbraucht wurde, konnte sie nicht für weitere Experimente eingesetzt werden. Eine neue Verdünnung der Verbindung lieferte keine Signale. Es ist daher davon auszugehen, dass die eingangs benutzte Verdünnung verunreinigt war. LC-MS-Analysen waren nicht möglich, um diese Hypothese zu überprüfen, da die Verdünnung verbraucht war.

Weitere Arbeiten an diesem Projekt wurden zugunsten der parallelen und vielversprechend verlaufenden Arbeit am GPR35 (Kapitel 5) im Rahmen dieser Doktorarbeit zurückgestellt. Leider konnten in diesem Projekt nicht die erhofften Erfolge erzielt werden. Insbesondere der Mangel an einem Agonisten und die Erfahrungen am GPR34 veranlassen dazu, die Ergebnisse mit Vorsicht zu interpretieren. Obwohl vom Hersteller der β -Arrestin-Zelllinie garantiert wird, dass die Expression über mindestens 10 Passagen stabil ist (daher wurden für die Experimente nie Zellen in höheren Passagen benutzt), ist nicht klar, ob β -Arrestin-Experimente an diesem Rezeptor überhaupt verlässliche Ergebnisse liefern. Im Oktober 2013 wurde schließlich der erste Ligand für den GPR171 der Maus und der Ratte beschrieben: BigLEN, ein 16 Aminosäuren umfassendes Peptid (GPR171 der Ratte: EC_{50} 1.6 nM in GTP γ S-Bindungsexperimenten, IC_{50} 7.9 nM).⁴⁶³ Es müsste untersucht werden, ob diese Verbindung auch den humanen Rezeptor aktiviert. Anhand dieses Agonisten könnte

dann erstmals gezeigt werden, ob β -Arrestin-Rekrutierungs-Experimente tatsächlich geeignet sind, um den hGPR171 pharmakologisch zu charakterisieren. Außerdem könnten durch diesen möglichen Agonisten die durch den chemogenomischen Ansatz vorgeschlagenen GPR171-Liganden auf Antagonismus untersucht werden. Weiterhin stellt PHA 665752 (**73**) einen weiteren potentiellen Antagonisten bzw. inversen Agonisten dar, der anhand dieses Standardagonisten weiter untersucht werden könnte. Nach der Überprüfung der Eignung der β -Arrestin-Rekrutierungs-Experimente zur pharmakologischen Untersuchung des GPR171 wäre es mit diesem System relativ einfach, in mittelhohem Durchsatz weitere Substanzbibliotheken zu testen. Obwohl BigLEN sehr hohe Affinität und Wirksamkeit an den Nager-Rezeptoren aufweist, wären kleine agonistische Moleküle sowie die ersten Antagonisten sehr nützlich bei der weiteren Erforschung dieses Orphan-Rezeptors.

5 Medizinische Chemie und Pharmakologie des P2Y-Rezeptor-artigen Waisen-Rezeptors GPR35

5.1 Einleitung

Die kodierende DNA-Sequenz des humanen GPR35 (hGPR35) wurde 1998 erstmals beschrieben.⁴⁶⁷ Das Rezeptorprotein besteht aus 309 Aminosäuren.⁴⁶⁷ Die korrespondierende mRNA wurde im Jahr 2000 identifiziert (Genbank Zugangsnummer: AF089087).⁴⁶⁸ Im Jahr 2004 konnten zwei weitere GPR35-mRNA-Varianten identifiziert werden (NCBI-Referenzsequenzen NM_001195381 und NM_001195382).⁴⁶⁹ Beide kodieren für identische Rezeptorproteine. Diese unterscheiden sich jedoch von dem zuvor beschriebenen Rezeptorprotein in ihren um 31 Aminosäuren verlängerten N-Termini (siehe Abbildung 5.1).⁴⁶⁹ Die weiteren 309 Aminosäuren sind bei allen drei Genprodukten identisch, da für die längere Rezeptor-Isoform ein im Leserahmen befindliches alternatives Startcodon genutzt wird.⁴⁶⁹ Okumura et al. schlugen zur Unterscheidung beider Rezeptor-Isoformen die Namen GPR35a für das kurze und GPR35b für das lange Rezeptorprotein vor. In den meisten Veröffentlichungen wird GPR35 als Synonym für GPR35a benutzt, sofern kein direkter Vergleich zwischen den Isoformen gezogen wird. Lediglich für den GPR35b wird der Buchstaben-Zusatz immer verwendet. Dieser Konvention wird auch in dieser Arbeit gefolgt: GPR35 steht im Folgenden für die Isoform a des Rezeptors.

Die Tatsache, dass mehrere Varianten der hGPR35-mRNA existieren, wird auf alternatives Spleißen zurückgeführt. Aufgrund der mRNA-Sequenzen und der genomischen Sequenz konnte die Struktur des hGPR35-Gens aufgeklärt werden: Das gesamte Gen besteht aus 7 Exons und erstreckt sich über 25851 bp.⁴⁶⁹ Die hGPR35a-mRNA ist ein zusammengesetztes Transkript von Exon 6 und Exon 7, während die beiden hGPR35b-mRNA-Sequenzen zusammengesetzte Transkripte von Exon 1-5 und Exon 7 darstellen (siehe Abbildung 5.2).⁴⁶⁹ Der komplette kodierende Anteil für den hGPR35a liegt auf Exon 7, der für hGPR35b auf Exon 5 und Exon 7. Über Fluoreszenz-In-situ-Hybridisierung (FISH) wurde bestimmt, dass sich das hGPR35-Gen auf Chromosom 2 in der Bande q37.3 befindet (Genbank-Zugangsnummer AF158748).^{467,470}

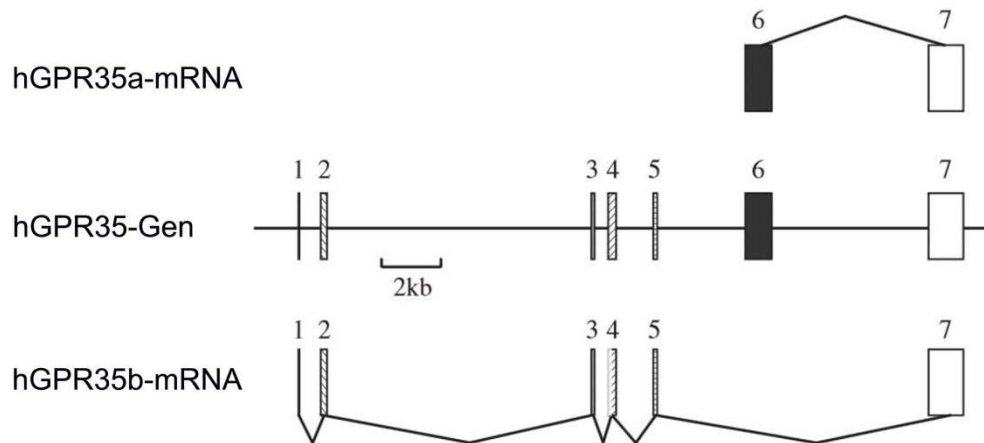


Abbildung 5.2: Struktur des humanen GPR35-Gens⁴⁶⁹

Das GPR35-Gen umfasst 25851 bp. Rechtecke stellen die sieben Exons dar. Die mRNA des GPR35a ist ein zusammengesetztes Transkript von Exon 6 und Exon 7. Die beiden mRNA-Varianten des GPR35b sind zusammengesetzte Transkripte aus Exon 1-5 und Exon 7, wobei bei einer der Varianten der 5'-Anteil des Exons 4 deletiert ist. Diese Darstellung wurde von Okumura et al.⁴⁶⁹ übernommen und modifiziert.

Das hGPR35-Gen ist hochpolymorph. So kann man in der „Short Genetic Variations“-Datenbank (dbSNP) des „National Center for Biotechnology Information“ (Bethesda, USA) über 600 Einzelnucleotid-Polymorphismen (SNPs) des Gens finden. Davon befinden sich 93 SNPs innerhalb des kodierenden Anteils. Die meisten Genvarianten weisen allerdings eine sehr geringe Allelfrequenz auf (siehe Tabelle 5.1 und Abbildung 5.6, S. 155).

Der hGPR35 weist jeweils eine hohe Aminosäuresequenzidentität zu dem Orphan-Rezeptor GPR55 (34 %) sowie einzelnen Subtypen der Lysophosphatidsäure-Rezeptoren (z. B. GPR23/LPA₄R, 28%), der P2Y-Rezeptoren (z. B. P2Y₄R 27 %) und der Hydroxycarbonsäure-Rezeptoren (z. B. HCAR3, 25 %) auf.^{467,470,471} Für Maus (m) und Ratte (r) wurde bislang je nur eine einzige Form des Rezeptors beschrieben. Der mGPR35 besteht aus 307 Aminosäuren,⁴⁶⁸ der rGPR35 aus 306 Aminosäuren.⁴⁷² Der humane Rezeptor weist moderate Identität zu den beiden genannten Nager-Orthologen auf (siehe Tabelle 5.2 und Abbildung 5.1). Proteinbiochemische Untersuchungen zeigten, dass der humane Rezeptor N-Glycosylierungen (Proteingrößen 62-74 kDa) besitzt, die sich durch das NGaseF-Enzym abspalten ließen (Proteingröße 55 kDa).⁴⁷³

Tabelle 5.1: Einzelnucleotid-Polymorphismen (SNPs) innerhalb der GPR35-cDNA^a

SNP	AS-Austausch	Position im hGPR35	MAF (%) ^b	SNP	AS-Austausch	Position im hGPR35	MAF (%) ^b
rs6437353	Arg>His	[13] ^c (NT)	49.3	rs371216594	Ala>Cys	135 (TM4)	k. A.
rs189259871	Val>Ile	[28] ^c (NT)	0.2	rs143712491	Val>Met	136 (TM4)	k. A.
rs200634739	-	3 (NT)	<0.1	rs376265458	Ala>Thr	138 (TM4)	k. A.
rs9808080	-	4 (NT)	k. A.	rs368592018	-	138 (TM4)	k. A.
rs139357553	-	5 (NT)	k. A.	rs201640570	-	145 (TM4)	k. A.
rs201744898	Asn>Thr	6 (NT)	<0.1	rs199812044	-	146 (TM4)	<0.1
rs372449386	Asp>Asn	12 (NT)	k. A.	rs111692730	Ser>Pro	147 (TM4)	k. A.
rs147585101	Thr>Ser	14 (NT)	k. A.	rs138283952	-	147 (TM4)	k. A.
rs376984747	Ala>Val	18 (NT)	k. A.	rs148358045	Ala>Thr	150 (TM4)	k. A.
rs144307503	Tyr>Phe	24 (TM1)	k. A.	rs34098457	-	159 (IL2)	1.8
rs185181357	-	24 (TM1)	<0.1	rs12468377	-	160 (IL2)	4.4
rs35146537	Ala>Thr	25 (TM1)	0.9	rs149473120	Arg>Trp	167 (IL2)	k. A.
rs141249079	Tyr>Stop	26 (TM1)	<0.1	rs61734452	Asn>Asp	169 (IL2)	0.2
rs150808237	Leu>Ser	27 (TM1)	0.2	rs200256196	-	176 (TM5)	<0.1
rs139197368	Val>Ile	29 (TM1)	0.6	rs146267919	Val>Met	186 (TM5)	k. A.
rs149363263	Gly>Ser	34 (TM1)	k. A.	rs369527208	-	194 (TM5)	k. A.
rs148595408	Ala>Val	41 (TM1)	k. A.	rs201441371	Val>Met	206 (EL3)	k. A.
rs61734451	-	41 (TM1)	0.5	rs142716446	Arg>Cys	213 (EL3)	0.2
rs144295667	Phe>Cys	45 (TM1)	k. A.	rs376362528	Arg>His	213 (EL3)	k. A.
rs368251622	Arg>His	48 (IL1)	k. A.	rs140850565	Arg>His	217 (TM6)	k. A.
rs372947090	-	55 (IL1)	k. A.	rs147700491	-	222 (TM6)	0.4
rs115880579	Arg>Cys	56 (IL1)	0.7	rs76041925	-	226 (TM6)	0.2
rs201529824	-	63 (TM2)	<0.1	rs199886367	Leu>Pro	233 (TM6)	k. A.
rs377201667	Asp>Asn	66 (TM2)	k. A.	rs373558269	Val>Met	235 (TM6)	k. A.
rs144901021	Cys>Tyr	68 (TM2)	k. A.	rs377190882	Arg>Ser	240 (IL3)	k. A.
rs35155396	-	72 (TM2)	1.6	rs370613558	Arg>Leu	240 (IL3)	k. A.
rs369256707	Pro>Leu	74 (TM2)	k. A.	rs12468453	-	241 (IL3)	4.4
rs372508109	-	75 (TM2)	k. A.	rs145963376	Ala>Thr	242 (IL3)	k. A.
rs13387859	Val>Met	76 (TM2)	1.4	rs138617727	-	246 (IL3)	0.1
rs141407998	-	86 (EL1)	k. A.	rs139042901	Glu>Gly	252 (IL3)	k. A.
rs138318280	-	91 (EL1)	k. A.	rs144191361	-	252 (IL3)	k. A.
rs376209708	Tyr>Phe	96 (TM3)	k. A.	rs12468485	Thr>Met	253 (IL3)	4.4
rs147336244	-	100 (TM3)	0.2	rs147827675	-	253 (IL3)	k. A.
rs369154325	Ile>Met	104 (TM3)	k. A.	rs183618703	Ala>Thr	267 (TM7)	<0.1
rs3749171	Thr>Met	108 (TM3)	15.5	rs202004164	-	272 (TM7)	k. A.
rs373167653	-	108 (TM3)	k. A.	rs201512343	Tyr>Cys	277 (TM7)	0.1
rs376310534	Ile>Val	110 (TM3)	k. A.	rs375252029	Ala>Val	280 (CT)	k. A.
rs142573812	-	111 (TM3)	k. A.	rs144723282	Ala>Val	286 (CT)	0.1
rs201044232	Val>Met	112 (TM3)	k. A.	rs140467268	-	286 (CT)	0.4
rs200996949	Arg>His	114 (TM3)	<0.1	rs138343579	Val>Met	291 (CT)	k. A.
rs199596106	Arg>Trp	119 (EL2)	<0.1	rs145091313	Pro>Ser	293 (CT)	k. A.
rs201885896	Pro>Gln	121 (EL2)	<0.1	rs3749172	Ser>Arg	294 (CT)	49.9
rs139794680	-	121 (EL2)	k. A.	rs368342447	Glu>Stop	301 (CT)	k. A.
rs34778053	Arg>Ser	125 (EL2)	1.6	rs141642870	Ser>Cys	303 (CT)	k. A.
rs375159727	Arg>Leu	125 (EL2)	k. A.	rs142918765	-	305 (CT)	0.4
rs61734453	Gly>Arg	126 (EL2)	0.3	rs142915042	-	308 (CT)	k. A.
rs368384952	Ala>Val	134 (TM4)	k. A.				

^aAlle Information wurden aus der „Short Genetic Variations“-Datenbank (dbSNP) des NCBI (Bethesda, USA) entnommen (www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/SNP; Stand: 17.10.2013). NT/CT: N-/C-Terminus, TM: Transmembrandomäne, IL/EL: intra-/extrazellulärer Loop. Die Rezeptor-Topologie wurde mit dem Online-Programm GPCRHMM (gpcrhmm.sbc.su.se) vorhergesagt. ^bMAF: „Minor Allele Frequency“ = Frequenz des zweithäufigsten Allels. ^cSNPs im N-Terminus des hGPR35b.

Tabelle 5.2: Identität und Ähnlichkeit zwischen GPR35 verschiedener Spezies^a

	hGPR35	mGPR35	rGPR35
hGPR35		72.3 % (82.0 %)	71.1 % (81.0 %)
mGPR35	72.3 % (82.0 %)		85.0 % (92.2 %)
rGPR35	71.1 % (81.0 %)	85.0 % (92.2 %)	

^aIdentitäten und Ähnlichkeiten (in Klammern) wurden mithilfe des internetbasierten Alignment-Programms EMBOSS Needle (www.ebi.ac.uk) bestimmt.

5.1.1 Expression

Über Northern-Blot-Experimente wurde die Expression der mRNA des GPR35 in verschiedenen Organen der Ratte untersucht (Darm, Herz, Milz, Leber, Lunge, Ovarien, Nieren, Gehirn). Dabei konnte ausschließlich im Darm die Expression des Rezeptors nachgewiesen werden.⁴⁶⁷ In den untersuchten menschlichen Organen (Lunge, Nebenniere) und unterschiedlichen Hirnarealen ließ sich keine Expression des Rezeptors nachweisen.⁴⁶⁷

Über Reverse-Transkriptase-PCR (RT-PCR) konnte man später die mRNA des GPR35 in menschlichen Proben aus dem Magen und Darm nachweisen.⁴⁶⁹ In dieser Studie wurde erstmals die GPR35b-Isoform beschrieben. Die Expression der GPR35b-mRNA war besonders hoch in Magen-Tumorgewebe und sowohl in diesem als auch gesundem Gewebe aus dem Magen höher als die der GPR35a-mRNA.⁴⁶⁹ Wie zuvor schon für Ratten nachgewiesen, konnte auch für den Menschen eine sehr hohe mRNA-Expression des GPR35 in Magen, Dünn- und Dickdarm gefunden werden.^{469,474} Darüber hinaus wurde über die mRNA des GPR35 auch eine relativ hohe Expression in der Milz und peripheren Lymphozyten (besonders in CD14⁺ Monozyten, T-Zellen, Neutrophilen und dendritischen Zellen) nachgewiesen.⁴⁷⁴ Ein ähnliches Bild erhielt man für die Expression des Rezeptors in der Maus, wo man außerdem auch mRNA-Expression in Rückenmark, Spinalganglien („dorsal root ganglion“) und Gliazellen fand.^{474,475} In der Ratte fand man durch RT-PCR-Untersuchungen außerdem GPR35-mRNA-Expression in Lunge, Skelettmuskeln, Uterus und ebenfalls in den Spinalganglien.^{472,476} Eine geringere Expression konnte man in Gehirn, Herz, Leber, Blase und Rückenmark nachweisen.⁴⁷² Dass in diesen Geweben in Northern-Blot-Experimenten zuvor keine Expression gefunden worden war, liegt wohl an der geringeren Sensitivität des Verfahrens. Die Expression des humanen Rezeptors konnte weiterhin über RT-PCR (genauso wie über Western Blot) in natürlichen Killer-T-Zellen des Typs 1 und anderen peripheren mononukleären Blutzellen gezeigt werden.⁴⁷⁷

Darüber hinaus ließ sich für den Menschen in Microassay-Untersuchungen eine Erhöhung der mRNA-Expression in Myokardgewebe nach Herzinsuffizienz nachweisen.⁴⁷⁸ In quantitativen Real-Time-PCR-Experimenten (qPCR) konnte gezeigt werden, dass der hGPR35 auch in Zellen der Haut,⁴⁷⁹ Mastzellen, Basophilen und Eosinophilen exprimiert ist, wobei eine signifikante Erhöhung der Expression in Mastzellen zu beobachten war, nachdem diese durch IgE-Antikörper aktiviert wurden.⁴⁸⁰

Durch In-situ-Hybridisierungs-Experimente mit Gewebeschnitten der Maus konnte festgestellt werden, dass der GPR35 vor allem in Epithel-Zellen der Lieberkühn-Krypten und in geringerem Ausmaß in denen der Darmzotten exprimiert wird, während man in tieferliegenden Zellschichten der Darmwand keine Expression des Rezeptors finden konnte.⁴⁷⁴ Immunhistochemisch konnte auch die Lokalisation des GPR35-Rezeptorproteins in den Spinalganglien von Ratten genauer bestimmt werden. Während Neuronen mit kleinem und mittlerem Durchmesser (< 40 µm) eine hohe Expression aufwiesen, war der Rezeptor in Neuronen mit großem Durchmesser kaum exprimiert.⁴⁷⁶ In endogen exprimierenden Zellen⁴⁸¹ wie auch in transfizierten Zelllinien konnte gezeigt werden, dass der Rezeptor hauptsächlich an der Zellmembran lokalisiert ist.^{474,482,483}

Weiterhin konnte gezeigt werden, dass die GPR35-Expression in Kardiomyozyten der Maus unter hypoxischen Bedingungen hochreguliert wurde.⁴⁸⁴ Dieser Effekt wird über den „hypoxia inducible factor 1“ (HIF-1) vermittelt.⁴⁸⁴ So weist der Promotor des mGPR35 eine „hypoxia responsive element“-Sequenz auf, an die HIF-1 binden und somit die Rezeptorexpression steigert.⁴⁸⁴

Zusammenfassend kann man sagen, dass der GPR35 in zahlreichen Geweben exprimiert ist, wobei die Expression im Darm, auf Immunzellen und im peripheren Nervensystem relativ hoch und bisher am besten untersucht ist.

5.1.2 Pharmakologie

5.1.2.1 Signalwege

Aufgrund der zunächst unbekanntes G-Protein-Kopplung des GPR35 wurden die ersten pharmakologischen Untersuchungen des Rezeptors unter Koexpression mit chimären und promiskuitiven G-Proteinen durchgeführt.^{472,474} So erhält man unabhängig von der eigentlichen Kopplung des Rezeptors ein G_q-Signal. Später nutzte man auch andere experimentelle Systeme, die die Signale aller G-Protein-Kopplungen integrieren wie Untersuchungen zur dynamischen Massenumverteilung (DMR)⁴⁸¹ oder komplett G-Protein-unabhängige β-Arrestin-Rekrutierungs-Experimente.⁴⁸³ Seltener wurden auch

[³⁵S]GTPγS-,⁴⁷⁴ Internalisierungs-Experimente (optische Umverteilung des Rezeptors)⁴⁸⁵ oder spezielle Experimente zur Untersuchung einzelner G-Protein-abhängiger Signalwege durchgeführt.^{476,486,487} Mit der Entdeckung des ersten Agonisten (siehe unten) konnte man auch erstmals Hinweise auf die Kopplung des Rezeptors erhalten: In Calcium-Mobilisierungs-Experimenten (transfizierte CHO-Zellen) und IP₁-Akkumulations-Experimenten (transfizierte HEK293-Zellen) erhielt man die höchsten Signale unter Koexpression des Rezeptors mit chimären G_{qi} oder G_{qo}-Proteinen.^{472,474} Sehr schwache bzw. keine Signale erhielt man jedoch ohne Koexpression chimärer G-Proteine.^{472,474} Unter zusätzlicher Koexpression von (nicht-chimären) G_q-Proteinen (HEK293) erhielt man in Calcium-Messungen kein Signal.⁴⁷³ Nach Koexpression mit G_{qs}-Proteinen konnte ebenfalls kein Signal generiert werden.^{472,474} Diese Beobachtungen lieferten erste Hinweise darauf, dass der Rezeptor G_{i/o}-, nicht aber G_s- oder G_q-gekoppelt ist.⁴⁷⁴ Die G_{i/o}-Kopplung des Rezeptors konnte weiterhin dadurch nachgewiesen werden, dass die Agonist-induzierten Effekte PTX-sensitiv waren, z. B. in [³⁵S]GTPγS-Bindungs-Experimenten⁴⁷⁴ und Patch-Clamp-Messungen (βγ-Untereinheit-vermittelte Inhibition von Calciumströmen).⁴⁸²

Interessanterweise wurde der Nachweis der G_{i/o}-Kopplung für den humanen Rezeptor immer nur indirekt erbracht, d. h. in der Literatur lassen sich bislang keine cAMP-Akkumulations-Experimente finden, die die G_i-Kopplung des Rezeptors belegen. Es wurde sogar beschrieben, dass cAMP-Akkumulations-Experimente am humanen GPR35 keine auswertbaren Ergebnisse lieferten.⁴⁷³ Für den Rattenrezeptor und den Mausrezeptor hat je eine Arbeitsgruppe die Ergebnisse aus einem solchen Experiment vorgestellt (Ratte: transfizierte CHO-Zellen / primäre Zellen der Spinalganglien; Maus: Primärkulturen von Gliazellen).^{475,476} Beim Rattenrezeptor konnte der Agonist-induzierte Effekt durch Vorbehandlung mit PTX aufgehoben werden.⁴⁷⁶

Man konnte hingegen direkt die hGPR35-vermittelte ERK1/2-Phosphorylierung^{483,486} nachweisen. Diese war PTX-sensitiv und ist damit durch die βγ-Untereinheit der G_{i/o}-Proteine vermittelt. Außerdem erhielt man später unter dem Einsatz von chimären G₁₃-Proteinen in verschiedenen experimentellen Systemen ein Agonist-induziertes Signal (Wachstumsförderung von Hefezellen nach Aktivierung⁴⁸⁷ und Calcium-Mobilisations-Experimente).⁴⁷³ Die G₁₃-Kopplung konnte man zudem mit der Agonist-induzierten Aktivierung von RhoA bestätigen.^{473,486}

In verschiedenen Experimenten wurde vielfach gezeigt, dass der Rezeptor nach Agonist-Aktivierung β-Arrestin-Moleküle rekrutiert. Dieser Vorgang ist nicht PTX-sensitiv, weil er G-Protein-unabhängig ist.⁴⁸³ Während sowohl die Rekrutierung von β-Arrestin 1 und 2 erfolgte, scheint β-Arrestin 2 präferiert zu werden.⁴⁷³ Auch die darauf folgende Internalisierung, also die Umverteilung von der Zelloberfläche⁴⁷³ in intrazelluläre

Strukturen, des Rezeptors konnte nachgewiesen werden.^{485,488} Weiterhin wurde auch eine (Agonist-unabhängige) Basalaktivität des Rezeptors beschrieben.⁴⁸²

Zusammenfassend kann man sagen, dass der GPR35 G_i- und G₁₃-gekoppelt ist, nach Aktivierung β-Arrestin-Moleküle rekrutiert und internalisiert wird.

5.1.2.2 Agonisten

Im Jahr 2006 wurde mit dem Tryptophan-Metaboliten Kynurensäure (**96**) der erste Agonist des GPR35 beschrieben (siehe Abbildung 5.3).⁴⁷⁴ Dieser war zudem selektiv gegenüber anderen getesteten GPCR, wie z. B. GPR55. Gleichzeitig wurde postuliert, dass es sich bei Kynurensäure um den endogenen Agonisten handelt. Interessant ist, dass weitere strukturell ähnliche Tryptophan-Metabolite keine agonistische Aktivität aufwiesen. So sind weder Kynurenin noch Anthranilsäure GPR35-Agonisten. Dies zeigt, dass das aromatische, bityklische System der Kynurensäure wichtig für die agonistische Aktivität ist.⁴⁷⁴ Auch die Carbonsäure-Gruppe der Verbindung scheint entscheidend für die Rezeptoraktivierung zu sein, da der Kynurensäure-Ethylester den Rezeptor kaum aktivierte.⁴⁷³ In späteren Studien konnte die agonistische Aktivität der Kynurensäure bestätigt werden.^{476,482}

Kynurensäure kann in vielen Geweben produziert werden, indem Tryptophan durch die Indolamin-2,3-Dioxygenase zu N-Formylkynurenin (geschwindigkeits-bestimmender Schritt), dann weiter zu L-Kynurenin (Formamidase) und schließlich zu Kynurensäure (Kynurenin-Aminotransferase) abgebaut wird.^{474,489} Kynurensäure ist am humanen Rezeptor mit EC₅₀-Werten im zwei- bis dreistelligen mikromolaren Bereich (siehe Tabelle 5.3) aber nicht sehr potent. Am Ratten- und Maus-Rezeptor ist Kynurensäure dagegen etwas besser wirksam mit EC₅₀-Werten im niedrigen mikromolaren Bereich (siehe Tabelle 5.3). Man konnte relativ hohe Kynurensäure-Konzentrationen in der Intestinalflüssigkeit (Dünndarm) von Ratten nachweisen, die zum Dickdarm hin zunehmen: 1.49 - 16.1 µM.⁴⁹⁰ Diese Konzentrationen sind ausreichend, um den Rattenrezeptor zu aktivieren. Da die Rattennahrung selbst auch Kynurensäure enthält, wurden die Ratten 24 Stunden vor der Messung nicht gefüttert, um nicht auch die von außen zugeführte Kynurensäure zu erfassen.⁴⁹⁰ Man ging nicht davon aus, dass endogen produzierte Kynurensäure in das Darmlumen abgegeben, sondern von im Darm befindlichen Bakterien produziert wurde.⁴⁹⁰ So konnte gezeigt werden, dass *E. coli*-Bakterien Kynurenin in Kynurensäure umwandeln können.⁴⁹⁰

Außer der Zufuhr von Kynurensäure mit der Nahrung und durch Produktion von Bakterien, wurde auch der Magensaft (Mensch: 9.91 nM), die Gallenflüssigkeit (Mensch:

306-832 nM, Schwein: 757 nM) und der Pankreassaft (Schwein: 1.11 μ M) als Quelle für Kynurensäure untersucht, von denen zumindest die beiden letzten zu der hohen Konzentration im Darm beitragen könnten.⁴⁹¹ Obwohl der GPR35 also in Ratten unter physiologischen Bedingungen von Kynurensäure aktiviert werden könnte, sind die beobachteten Konzentrationen zu gering, um den humanen Rezeptor aktivieren zu können (sofern man davon ausgeht, dass die Konzentrationen in der menschlichen intestinalen Flüssigkeit ähnlich sind wie die in der Ratte). Andererseits würde man nicht erwarten, dass der Rezeptor unter physiologischen Bedingungen dauerhaft aktiviert vorliegt. Man müsste daher klären, ob und unter welchen Bedingungen die Kynurensäure-Konzentration im Gastrointestinalraum weiter ansteigen könnte.

Während der Rezeptor in Leukozyten unter physiologischen Bedingungen im Blut nicht durch Kynurensäure aktiviert werden kann (Plasma-Konzentration im Menschen: 18.3-24.7 nM),^{492,493} wurde postuliert, dass die Kynurensäure-Konzentration aufgrund von Entzündungsreaktionen stark ansteigen könnte.⁴⁷⁴ In Patienten mit chronischen Entzündungen findet sich tatsächlich eine erhöhte Blutplasma-Konzentration von bis zu 660 nM.⁴⁹⁴ Allerdings ist diese immer noch nicht ausreichend, um den humanen Rezeptor zu aktivieren. Es wäre aber möglich, dass die Konzentrationen am Ort der Entzündung ausreichend hoch sind. Dazu bedarf es jedoch weiterer Untersuchungen. Während es möglich wäre, dass Kynurensäure der endogene Ligand der murinen GPR35-Rezeptoren ist, bleibt es also fraglich, ob dies auch auf den menschlichen Rezeptor zutrifft.

Gleichzeitig mit der Entdeckung der Kynurensäure als Agonist wurde auch der synthetische PDE-Inhibitor Zaprinast (**30**) als Agonist für den GPR35 beschrieben (siehe Abbildung 5.4).⁴⁷² Dabei konnte ausgeschlossen werden, dass die agonistische Aktivität auf die PDE-Inhibition zurückgeht, da andere strukturell nicht verwandte PDE-Inhibitoren nicht agonistisch am Rezeptor wirkten.⁴⁷² Inzwischen ist Zaprinast der Standardagonist des GPR35, da es gegenüber der Kynurensäure mit EC_{50} -Werten im mikro- bis submikromolaren Bereich ein deutlich potenterer Agonist des humanen Rezeptors ist. Wie auch bei Kynurensäure lässt sich bei Zaprinast eine gewisse Selektivität für die Nagerrezeptoren beobachten (siehe Tabelle 5.3).

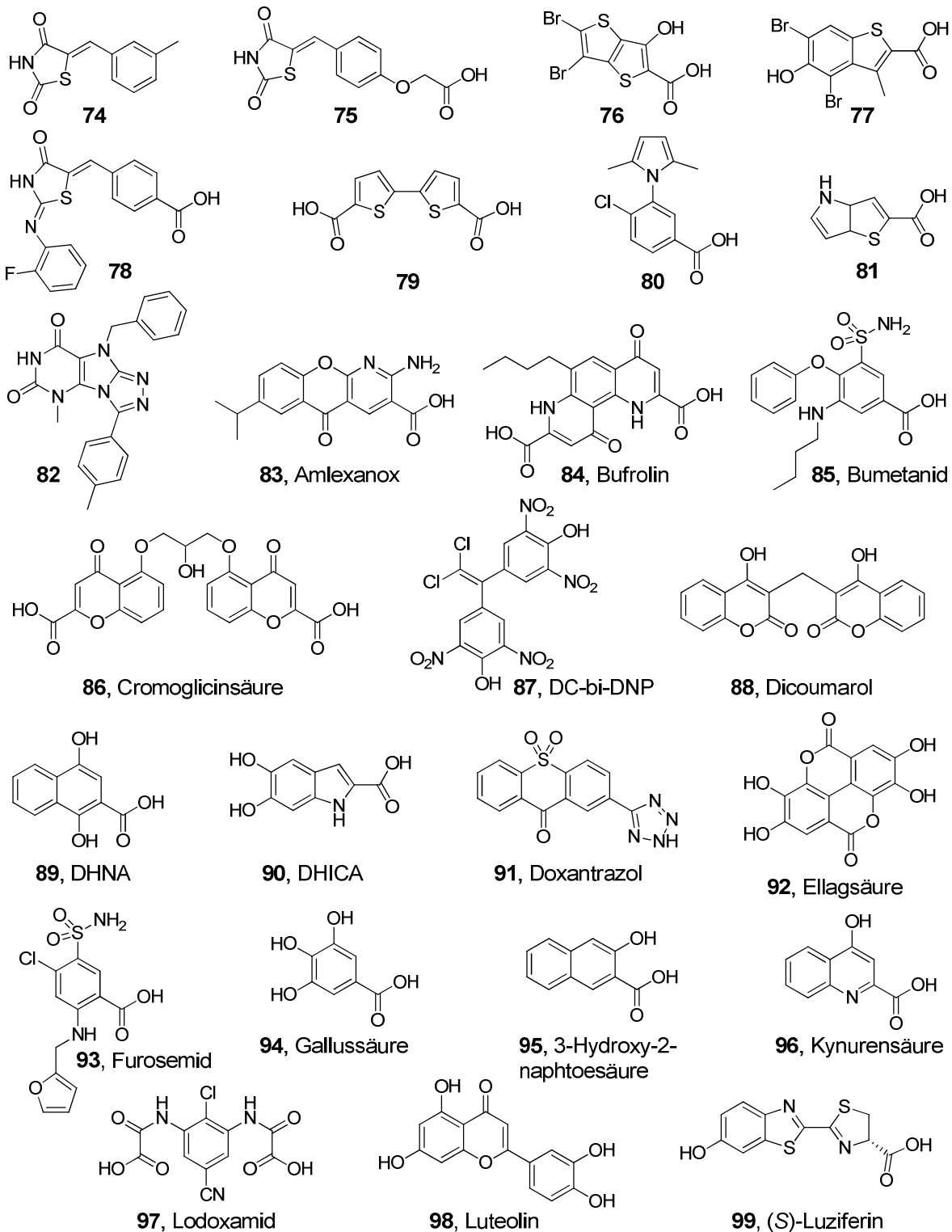


Abbildung 5.3: Publierte GPR35-Agonisten (Teil 1)

Tabelle 5.3: Wirksamkeit der publizierten GPR35-Agonisten

Verbindung	hGPR35				mGPR35	rGPR35
	β -Arrestin-Assay	DMR-Assay	Calcium-Assay	EC ₅₀ , μ M andere Assays		
74 ⁴⁷³	8.32 ^{473, a, *}					8.32 ^{473, a, *}
75 ⁴⁷³	1.38 ^{473, a, *}					7.41 ^{473, a, *}
76 ^{495, #}	2.46 ^{495, b}	0.016 ^{495, c}				
77 ^{496, #}	46.5 ^{496, b}	0.16 ^{496, c}				
78 ⁴⁹⁷	0.0257 ^{497, d, *} 0.0251 ^{497, a, *}		0.00316 ^{497, e, *}	0.00794 ^{497, f, *}	16.6 ^{497, a, *} 2.51 ^{497, f, *}	7.94 ^{497, a, *} 2.51 ^{497, f, *}
79 ⁴⁹⁷	0.501 ^{497, d, *} 3.16 ^{497, a, *}		1.00 ^{497, e, *}	0.316 ^{497, f, *}	>100 ^{497, a, *} 31.6 ^{497, f, *}	>100 ^{497, a, *} 31.6 ^{497, f, *}
80 ⁴⁹⁷	3.98 ^{497, d, *} 3.16 ^{497, a, *}		3.16 ^{497, e, *}	12.6 ^{497, f, *}	>100 ^{497, a, *} >100 ^{497, f, *}	>100 ^{497, a, *} >100 ^{497, f, *}
81 ⁴⁹⁷	2.51 ^{497, d, *} 12.6 ^{497, a, *}		0.159 ^{497, e, *}	2.51 ^{497, f, *}	20.0 ^{497, a, *} 1.00 ^{497, f, *}	50.1 ^{497, a, *} 1.58 ^{497, f, *}
82 ⁴⁹⁷	12.6 ^{497, d, *} 20.0 ^{497, a, *}		0.631 ^{497, e, *}	1.00 ^{497, f, *}	100 ^{497, a, *} 10.0 ^{497, f, *}	12.6 ^{497, a, *} 10.0 ^{497, f, *}
83 , Amlexanox	4.07 ^{498, a, *} 3.80 ^{499, d, *}					0.0234 ^{498, a, *}
84 , Bufrolin	0.0126 ^{498, a, *} 0.00293 ^{498, d}					0.0100 ^{498, a, *}
85 , Bumetanid			10.0 ^{479, g, *}	2.88 ^{479, h, *}	inaktiv ^{479, g, h}	inaktiv ^{479, g, h}
86 , Cromoglicinsäure	7.59 ^{487, a, *} 9.67 ^{500, b} 16.6 ^{485, a, *}	0.52 ^{500, c}	0.209 ^{480, g, *}	0.0617 ^{480, h, *} 6.46 ^{485, i, *} 0.479 ^{485, j, *}	1.55 ^{480, g, *} 0.708 ^{480, h, *} 57.5 ^{485, a, *} >10 ^{485, i, *} 2.82 ^{485, j, *}	0.891 ^{480, g, *} 0.490 ^{480, h, *} 4.37 ^{487, a, *} 5.01 ^{485, a, *} inaktiv ^{485, i, *} 1.51 ^{485, j, *}
87 , DC-bi-DNP [#]	2.12 ^{501, b}	0.0061 ^{501, c}				
88 , Dicoumarol	1.26 ^{487, a, *}					1.99 ^{487, a, *}
89 , DHNA	45 ^{483, k}					
90 , DHICA	22.9 ^{500, b}	24.2 ^{500, c}				
91 , Doxantrazol	3.39 ^{498, a, *}					0.309 ^{498, a, *}
92 , Ellagsäure [#]	2.96 ^{502, b}	0.11 ^{502, c}				
93 , Furosemid			6.17 ^{479, g, *}	2.34 ^{479, h, *}	inaktiv ^{479, g, h}	>33.1 ^{479, g, h, *}
94 , Gallussäure [#]	11.4 ^{503, b}	1.16 ^{503, c}				
95 , 3-Hydroxy-2-naphthoesäure	86 ^{483, k}					
96 , Kynurensäure	217 ^{483, k} >500 ^{500, b}	152 ^{500, c}	39.2 ^{474, l}	36 ^{474, m} 58 ^{482, n}	10.7 ^{474, l}	7.4 ^{474, l} 11 ^{476, o} 66.1 ^{473, a, *}
97 , Lodoxamid	0.00363 ^{498, a, *} 0.00161 ^{498, d}					0.0126 ^{498, a, *}
98 , Luteolin	13.5 ^{487, a, *} 3.20 ^{502, b}	7.24 ^{502, c}				9.77 ^{487, a, *}
99 , (S)-Luziferin	277 ^{488, b}	12.9 ^{488, c}				

Tabelle 5.3 (Fortsetzung)

100 , MANT-cGMP	2.00 ^{499, d}					
101 , NBQX [#]	1.12 ^{499, d}					
102 , Nedocromil			0.126 ^{480, g, *}	0.0309 ^{480, h, *}	7.24 ^{480, g, *} 2.95 ^{480, h, *}	2.75 ^{480, g, *} 1.35 ^{480, h, *}
103 , Nifluminsäure	14.5 ^{487, a, *} 41.6 ^{500, b}	1.11 ^{500, c}				>1000 ^{487, a, *}
104 , NPPB	4.4 ^{483, k}		12.2 ^{504, p}		>30 ^{504, p}	16.0 ^{504, p}
105 , Pamoasäure	0.079 ^{483, k} 0.0513 ^{487, a, *} 2.69 ^{500, b} 9.4 ^{488, b} 0.0525 ^{485, a, *}	0.0021 ^{500, c} 0.0024 ^{488, c}		0.065 ^{483, q} 0.138 ^{485, i, *} 0.00363 ^{485, j, *}	inaktiv ^{485, a, j} inaktiv ^{485, i, *} (100) ^{485, i, *}	>1000 ^{487, a, *} inaktiv ^{485, a, i} 0.708 ^{485, j, *}
106 , Quercetin	4.47 ^{487, a, *} 5.93 ^{502, b}	8.02 ^{502, c}				6.31 ^{487, a, *}
107 , Reverses T3 [#]	108 ^{500, b}	5.89 ^{500, c}				
108 , 2,3,5-THB [#]	8.35 ^{505, b}	0.25 ^{505, r}				
109 , Tyrphostin 25 [#]	5.3 ^{481, b}	0.94 ^{481, s}				
110 , Tyrphostin 51 [#]	7.7 ^{481, b}	0.19 ^{481, s}				
111 , Wedelolacton	1.39 ^{503, b}	2.73 ^{503, c}				
112 , YE120 [#]	10.2 ^{506, b}	0.032 ^{506, s}				
113 , YE210 [#]	15.0 ^{506, b}	0.064 ^{506, s}				
30 , Zaprinast	1.0 ^{483, k} 2.57 ^{487, a, *} 3.80 ^{473, t, *} 3.80 ^{473, a, *} 6.2 ^{481, b} 4.20 ^{506, b} 6.12 ^{500, b} 5.0 ^{488, b} 5.01 ^{485, a, *} 7.94 ^{497, d, *} 2.51 ^{497, a, *}	0.16 ^{481, s} 0.14 ^{500, c} 0.162 ^{488, c}	0.840 ^{472, p} 1.63 ^{504, p} 0.129 ^{480, g, *} 0.371 ^{479, g, *} 1.00 ^{497, e, *}	1.1 ^{482, n} 0.0316 ^{480, h, *} 2.6 ^{483, q} 14.1 ^{473, u, *} 29.5 ^{473, v, *} 0.0759 ^{479, h, *} 0.977 ^{485, i, *} 0.129 ^{485, w, *} 0.0832 ^{485, j, *} 0.126 ^{497, f, *}	0.022 ^{504, p} 0.0240 ^{480, g, *} 0.00363 ^{480, h, *} 0.0676 ^{479, g, *} 0.0117 ^{479, h, *} 0.977 ^{485, a, *} 0.234 ^{485, i, *} 0.00479 ^{485, w, *} 0.0159 ^{485, j, *} 0.251 ^{497, a, *} 0.0126 ^{497, f, *}	0.016 ^{472, p} 0.29 ^{476, o} 0.068 ^{504, p} 0.0166 ^{480, g, *} 0.00234 ^{480, h, *} 0.0676 ^{487, a, *} 0.00162 ^{473, t, *} 0.0741 ^{473, a, *} 0.0467 ^{473, v, *} 0.0182 ^{479, g, *} 0.00537 ^{479, h, *} 0.0955 ^{485, a, *} 0.0389 ^{485, i, *} 0.00339 ^{485, w, *} 0.00309 ^{485, j, *} 0.0794 ^{497, a, *} 0.00501 ^{497, f, *}

*aus pEC₅₀-Wert errechnet[#]Verbindung mit dem niedrigsten EC₅₀-Wert aus einer Serie strukturell verwandter Verbindungen^aβ-Arrestin-Assay (BRET): HEK293 + FLAG-GPR35-eYFP + β-Arrestin2-*Renilla*-Luciferase-6^bβ-Arrestin-Assay (Reporter-Gen-Assay / Tango): U2OS + GPR35-Gal4-VP16 + β-Arrestin2-TEV-Protease + β-Lactamase-Gen unter Kontrolle des UAS „response element“^cDMR-Assay (Signal-Messung: 60 Min. / ^r 15 Min. / ^s 8 Min.): HT-29 (endogener hGPR35)^dβ-Arrestin-Assay (Enzymkomplementierung): CHO + GPR35-Prolink™ + β-Arrestin2-EA^eCalcium-Mobilisations-Assay (Fluo-4): CHO + GPR35-Prolink™ + β-Arrestin2-EA

^fIP₁-Akkumulations (HTRF): HEK293 + FLAG-GPR35-eYFP + G_{q13}

^gCalcium-Mobilisations-Assay (Aequorin): CHO + GPR35 + G_{q05}

^hIP₁-Akkumulations-Assay ("Scintillation-Proximity-Assay"): HEK293 + GPR35 + G_{q05}

ⁱInternalisierungsassay (Umverteilung des Rezeptors): Flp-In T-REx 293 + FLAG-GPR35-eYFP

^jIP₁-Akkumulations-Assay ("Scintillation-Proximity-Assay"): HEK293 + FLAG-GPR35-eYFP + G_{q13/5}

^kβ-Arrestin-Assay (Umverteilung von β-Arrestin2): U2OS + HA-GPR35 + β-Arrestin2-GFP

^lCalcium-Mobilisations-Assay (Aequorin): CHO + FLAG-GPR35 + Gα₁₆, G_{q05}, G_{q19} und G_{qs5}

^m[³⁵S]GTPγS-Assay: CHO + FLAG-GPR35

ⁿGβγ-vermittelte Inhibition der Calcium-Ströme: SCG-Neuronen von Ratten + GPR35

^ocAMP-Assay (G_i / Forskolin): CHO + GPR35

^pCalcium-Mobilisations-Assay (Fura 2): HEK293 + GPR35 + G_{q15}

^qERK1/2-Phosphorylierungs-Assay (Western Blot): U2OS + HA-GPR35

^rDMR-Assay (Signal-Messung: 15 Min.): HT-29 (endogener hGPR35)

^sDMR-Assay (Signal-Messung: 8 Min.): HT-29 (endogener hGPR35)

^tβ-Arrestin-Assay (Enzymkomplementierung): HEK293 + FLAG-GPR35-ProLink™ + β-Arrestin2-EA

^uInternalisierungsassay (Biotinylierung / Western Blot): Flp-In T-REx 293 + FLAG-GPR35-eYFP

^vInternalisierungsassay (Zelloberflächen-ELISA): Flp-In T-REx 293 + FLAG-GPR35-eYFP

^wIP₁-Akkumulations-Assay ("Scintillation-Proximity-Assay"): HEK293 + FLAG-GPR35-eYFP + G_{q15}

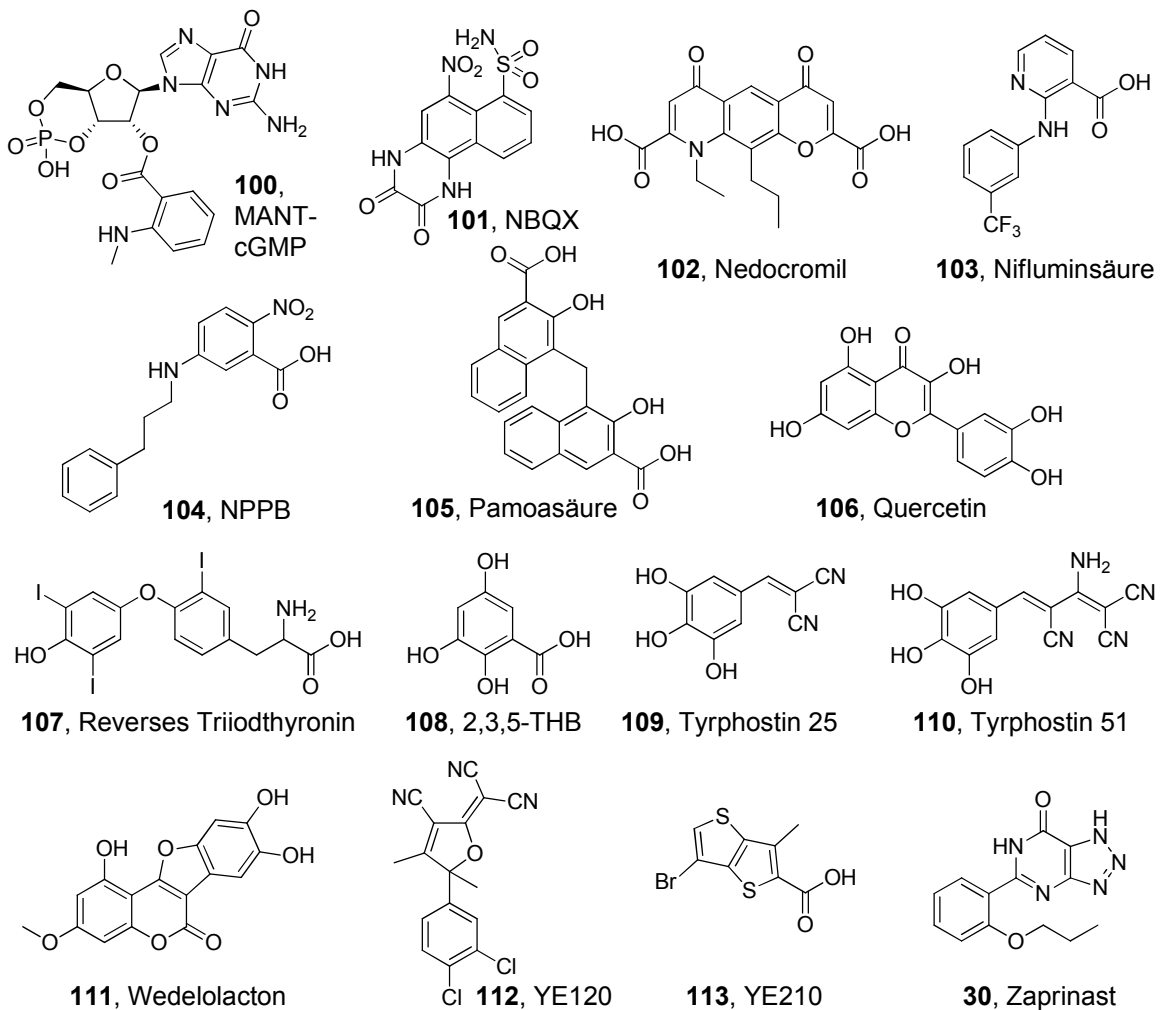


Abbildung 5.4: Publierte GPR35-Agonisten (Teil 2)

Neben Kynurensäure wurde für weitere endogen vorkommende Verbindungen ebenfalls eine agonistische Aktivität am GPR35 beschrieben. So wurden 2010 einzelne Lysophosphatidsäure(LPA)-Spezies als GPR35-Agonisten identifiziert: besonders 2-Oleyl-LPA, aber auch 2-Linoleyl- und 2-Arachidonoyl-LPA.⁴⁸⁶ Allerdings wurde ein Calcium-Mobilisations-Experiment genutzt, bei dem alle LPA-Spezies auch in Vektor-transfizierten HEK293-Zellen hohe Signale erzeugten.⁴⁸⁶ Diese Signale werden wohl durch die zahlreichen bisher bekannten und ubiquitär exprimierten LPA-Rezeptoren ausgelöst. Die Signale in GPR35-transfizierten HEK293-Zellen waren allerdings deutlich höher als die Hintergrundsignale.⁴⁸⁶ Der Einsatz von GPR35-Antagonisten wäre interessant gewesen, um zu untersuchen, ob der verstärkte Calcium-Influx wirklich dem GPR35 zugeschrieben werden kann, insbesondere weil gezeigt wurde, dass der GPR35 (auch in HEK293-Zellen) nicht G_q-gekoppelt ist⁴⁷²⁻⁴⁷⁴ und in diesen Experimenten keine Koexpression mit chimären G-Proteinen vorgenommen wurde. Es wäre denkbar, dass der GPR35 Di- oder Oligomere mit endogenen LPA-Rezeptoren bildet und so deren Aktivierung positiv moduliert. So scheint sich auch der EC₅₀-Wert der LPA-Kurven vor und nach GPR35-Expression nicht zu verändern (nur die Kurven, nicht die Werte sind angegeben).⁴⁸⁶ Andererseits wurde ein sehr schwaches Signal nach Zugabe von Zaprinast in den GPR35-transfizierten Zellen (nicht aber in der Kontrolle) erhalten.⁴⁸⁶ Überraschend ist jedoch, dass die Efficacy von Zaprinast viel geringer ist als die der genannten LPA-Spezies, obwohl Zaprinast als Vollagonist des Rezeptors beschrieben wurde. Möglicherweise ist LPA ein „biased“ Ligand des GPR35, der auch mit hoher Efficacy den G_q-Signalweg auslösen kann. In Experimenten zur Aktivierung von RhoA und ERK konnte man ähnliche (überlagerte) Effekte finden wie bei den Calcium-Mobilisations-Experimenten.⁴⁸⁶

Die LPA-Spezies wurden bislang nicht in einem Hintergrund-freien System getestet, da sie bis vor kurzem nicht kommerziell erhältlich waren.⁴⁸³ Aufgrund der nahen Verwandtschaft zum GPR55, der als möglicher neuer Cannabinoid-Rezeptor (CBR) angesehen wird, wurden in dieser Studie auch eine Reihe von CBR-Liganden getestet, die außer Δ^9 -Tetrahydrocannabinol (Δ^9 -THC) bei Konzentrationen von 10 μ M keine Signale auslösten.⁴⁸⁶ Genauso lösten verschiedene CBR-Liganden später auch keine Signale in β -Arrestin-Experimenten aus (bei 30 μ M).⁴⁸³

Außerdem wurden einige endogen produzierte Tyrosin-Metabolite als Agonisten des GPR35 beschrieben.⁵⁰⁰ Aber auch ihre Rolle als endogene GPR35-Agonisten ist fraglich: Während die potenteste Verbindung, reverses Triiodthyronin (reverses T3), in DMR-Experimenten einen EC₅₀-Wert im niedrigen mikromolaren Bereich zeigt,⁵⁰⁰ liegt seine Konzentration im menschlichen Serum bei nur ca. 0.1 nM.⁵⁰⁷ Der Tyrosin-Metabolit und GPR35-Agonist DHICA ist ein Baustein des in der Haut gebildeten Pigments Eumelanin.⁵⁰⁰ Da die GPR35-Expression in der Haut nachgewiesen worden ist⁴⁷⁹ und

sich die DHICA-Produktion unter UV-Einstrahlung erhöht, wäre es denkbar, dass ausreichend hohe Konzentrationen des DHICA zur Aktivierung des GPR35 in der Haut erhalten werden.⁵⁰⁰ Bislang liegen aber keine Konzentrationsmessungen dieser Verbindung in der Haut vor. In einer weiteren Studie wurden DHICA-Derivate als GPR35-Agonisten untersucht, wobei Verbindung **77** die potenteste darstellte (Struktur siehe Abbildung 5.4).⁴⁹⁶

Wie zuvor schon Kynurensäure⁴⁷⁴ und Zaprinast⁴⁷² wurden auch viele weitere Agonisten durch das Screening großer Substanzbibliotheken entdeckt.⁵⁰⁴ Dazu gehören die beiden gegen Asthma eingesetzten Chromone Cromoglicinsäure und Nedocromil.⁴⁸⁰ Der Wirkmechanismus dieser Arzneistoffe ist unbekannt, könnte aber GPR35-vermittelt sein,⁴⁸⁰ insbesondere, da gezeigt wurde, dass aktivierte Mastzellen eine erhöhte GPR35-Expression aufweisen.⁴⁸⁰ Die Chromone gehören zusammen mit 5-Nitro-2-(3-phenylpropylamino)benzoesäure (NPPB) zu den ersten Agonisten, die eine höhere Potenz am humanen als an den Nagerrezeptoren aufwiesen (in vergleichbaren Assaysystemen, siehe Tabelle 5.3). In einem anderen großen Screening konnte man die Pamoasäure als potenten Agonisten identifizieren,⁴⁸³ wobei diese in ERK-Phosphorylierungs- und β -Arrestin-Experimenten im Vergleich zu Zaprinast ein Partialagonist ist.^{483,487} Pamoasäure ist gegenüber anderen GPCRs wie GPR55 und CB1R selektiv für GPR35⁴⁸³ und unter den GPR35-Orthologen selektiv für den humanen Rezeptor.^{485,487} Interessanterweise handelt es sich bei diesem Agonisten um eine Verbindung, die man als „nicht-aktiven“ Inhaltsstoff in verschiedenen Arzneimitteln finden kann. So werden einige Arzneistoffe aus galenischen Gründen als Pamoat eingesetzt, da die Salze der Pamoasäure schwerlöslich sind.⁴⁸³

Pamoasäure ist ein Hydroxy-Naphthoesäure-Dimer.⁴⁸³ Es wird deutlich, dass beide Reste gleichermaßen für die hohe Wirksamkeit der Verbindung verantwortlich sind, da die „monomere“ 3-Hydroxy-2-Naphthoesäure einen um den Faktor 1000 geringeren EC_{50} -Wert aufweist.⁴⁸³ Die Tatsache, dass Salicylsäure (genauso wie Acetylsalicylsäure) im Vergleich zur 3-Hydroxy-2-Naphthoesäure keinen GPR35-vermittelten Effekt hervorruft, zeigt erneut, dass ein bizyklisches System für die Aktivität der Verbindung am GPR35 vorteilhaft sein kann.⁴⁸³

In anderen großen Screening-Kampagnen konnten Dicoumarol, Luteolin, Nifluminsäure, Quercetin und D-Luziferin als weitere GPR35-Partialagonisten identifiziert werden.^{487,488} Es ist interessant, dass Nifluminsäure, nicht aber Flufenaminsäure ein GPR35-Agonist ist, obwohl sie sich nur in einem einzigen Atom unterscheiden.⁴⁸⁷ Außerdem fand man auf diesem Weg weitere Agonisten: Tyrphostine⁴⁸¹ und Nitrophenole (darunter die COMT-Inhibitoren Entacapon, Tolcapon und Nitecapon),⁵⁰¹ ASS-Metabolite (wie 2,3,5-Trihydroxy-Benzoesäure),⁵⁰⁵ pflanzliche Phenole (wie die Ellagsäure),⁵⁰²

Methylfuranylidienmalononitrile (wie YE120),⁵⁰⁶ Thienothiophen-Carbonsäuren (wie YE210 und die später verbesserte Verbindung **76**),^{495,506} die Schleifendiuretika Furosemid und Bumetanid (nicht aber Vertreter anderer Diuretika-Klassen, wie Thiazide),⁴⁷⁹ Gallussäure⁵⁰³, Wedelolacton,⁵⁰³ MANT-cGMP⁴⁹⁹ und AMPA-Rezeptor-Antagonisten wie NBQX,⁴⁹⁹ sowie die strukturell nicht verwandten Verbindungen **79-82** (Strukturen siehe Abbildung 5.3 und Abbildung 5.4).⁴⁹⁷

Aufgrund der Verwandtschaft zum FFA1-Rezeptor, untersuchte man Thiazolidin-Dione (Glitazone) und fand, dass zwar nicht das ehemals klinisch angewandte Rosiglitazon, aber dessen Derivate GPR35-Agonisten sind (Verbindung **74** und **75**, siehe Abbildung 5.3 und Tabelle 5.3).⁴⁷³ Für **75** wurde postuliert, dass es sich nicht nur um einen orthosterischen Agonisten, sondern auch um einen allosterischen Inhibitor (bei Zaprinast-Aktivierung) handelt.⁴⁷³ Der beobachtete Effekt, der für letzteres spricht, ist aber sehr gering und könnte im Bereich der natürlichen Schwankungen liegen oder mit einem Partialagonismus der Verbindung erklärt werden. Andere allosterisch wirkende Verbindungen wurden bislang nicht beschrieben (oder in den entsprechenden experimentellen Systemen nicht als solche erkannt). Die später beschriebene, strukturell verwandte Verbindung **78** war einige Zeit der potenteste GPR35-Agonist (EC_{50} -Wert 26 nM, β -Arrestin-Rekrutierungs-Experimente, siehe Abbildung 5.3)⁴⁹⁷ Nach Abschluss der in der vorliegenden Arbeit vorgestellten Experimente wurden mit den Antiallergika Lodoxamid (EC_{50} 1.61 nM, β -Arrestin-Rekrutierungs-Experimente, siehe Abbildung 5.3 und Tabelle 5.3) und Bufrolin (EC_{50} 2.93 nM) zwei noch potentere Agonisten publiziert, die zudem eine ähnlich hohe Potenz am rGPR35 aufweisen.⁴⁹⁸

In den meisten Studien wurde nur der GPR35a pharmakologisch untersucht. In den seltenen Untersuchungen des GPR35b konnte man aber keinen Unterschied in den beobachteten Effekten bzw. der Pharmakologie im Vergleich zum GPR35a feststellen.^{482,483,498}

Wie man anhand der Tabelle 5.3 sehen kann, sind vor allem β -Arrestin-Rekrutierungs-Experimente zum Standard bei der pharmakologischen Erforschung des Rezeptors geworden. Grundsätzlich ist auch interessant, dass die Potenz der Agonisten in β -Arrestin-Rekrutierungs-Experimenten im Vergleich zu anderen experimentellen Systemen relativ gering ist. In DMR-Experimenten kann man dagegen meist eine höhere Potenz der Agonisten finden als bei anderen G-Protein-abhängigen Experimenten. Radioligand-Bindungsexperimente sind bislang nicht beschrieben worden, weshalb es auch unmöglich war, Affinitäten am GPR35 zu bestimmen.

Man kann zusammenfassen, dass die beschriebenen Agonisten eine überraschend hohe strukturelle Vielfalt aufweisen. Trotz der Heterogenität der Agonisten, kann man (von Ausnahmen abgesehen) gemeinsame Eigenschaften erkennen:

1. Alle Agonisten besitzen aromatische Kernstrukturen.
2. Viele Agonisten sind unter physiologischen Bedingungen negativ geladen. Die wichtige Rolle der Carbonsäure-Gruppe bei der Potenz der Verbindung wurde auch in Einzelfällen nachgewiesen.^{473,495,506}
3. Die meisten Agonisten besitzen viele funktionelle Gruppen oder Heteroatome in ihren Ringsystemen, die den Aufbau von Wasserstoffbrückenbindungen ermöglichen. Die Bedeutung der Lokalisation und Anzahl dieser Gruppen wurde in Einzelfällen nachgewiesen.^{481,505}

5.1.2.3 Antagonisten

Wie viele der publizierten Agonisten, wurden auch die bekannten GPR35-Antagonisten durch das Screening großer Substanzbibliotheken identifiziert. Bislang sind nur drei potente Antagonisten des GPR35 bekannt, die alle 2010 erstmals beschrieben wurden: CID 2745687,⁴⁸³ ML144 und ML145 (siehe Abbildung 5.5).⁵⁰⁸ Bei ML144 handelt es sich um den am wenigsten potenten Antagonisten (Tabelle 5.4), der zudem nur eine geringe (15fache) Selektivität gegenüber GPR55 aufweist. In den meisten Studien wird der Antagonist CID 2745687 eingesetzt (wohl auch weil dieser der erste kommerziell erhältliche Antagonist war). Dabei ist ML145 der potenteste der drei Antagonisten (IC₅₀-Werte siehe Tabelle 5.4) und weist zudem eine hohe Selektivität gegenüber GPR55 auf (>1000fach). CID 2745687 und ML145 hemmen die Effekte durch Zaprinast, Cromoglicinsäure und Pamoasäure in verschiedenen experimentellen Systemen vollständig.⁴⁸⁵ Der Antagonismus ist für ML145 stets reversibel und kompetitiv.⁴⁸⁵ Während für CID 2745687 gegen Pamoasäure zwar ein ebensolcher Mechanismus postuliert wurde,⁴⁸³ findet eine andere Arbeitsgruppe überzeugende Hinweise für einen nicht-kompetitiven Wirkmechanismus.⁴⁸⁵ Interessanterweise ist CID 2745687 gegen die anderen beiden Agonisten (Zaprinast und Cromoglicinsäure) ein kompetitiver Antagonist.⁴⁸⁵ Es konnte in verschiedenen experimentellen Systemen gezeigt werden, dass beide letztgenannten Antagonisten hochselektiv für den humanen GPR35 und praktisch inaktiv an den murinen Rezeptor-Orthologen sind.⁴⁸⁵

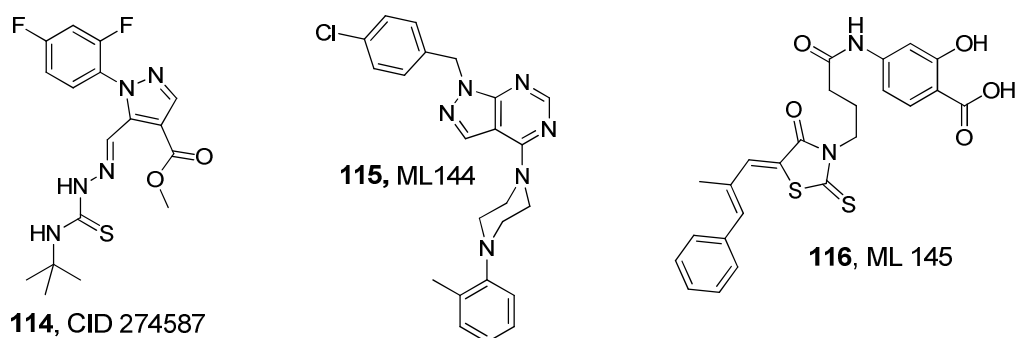


Abbildung 5.5: Publierte GPR35-Antagonisten

Tabelle 5.4: Wirksamkeit der publizierten GPR35-Antagonisten

Verbindung	hGPR35			mGPR35	rGPR35
	β -Arrestin-Assay	DMR-Assay	IC ₅₀ , μ M andere Assays		
114, CID 2745687	0.0128 ^{483, a} 0.200 ^{485, b, *} 0.537 ^{485, c, *} 0.0692 ^{485, d, *}	10.4 ^{500, e} 3.97 ^{500, f} 13.2 ^{500, g}	0.018 ^{483, h}	inaktiv ^{485, b, i, *}	inaktiv ^{485, b, i, j, *}
115, ML 144 [#]	2.22 ^{508, k}				
116, ML 145 [#]	0.0201 ^{508, k} 0.0269 ^{485, b, *} 0.0223 ^{485, c, *} 0.00832 ^{485, d, *}			inaktiv ^{485, b, i, *}	inaktiv ^{485, b, i, j, *}

*aus pIC₅₀-Wert errechnet[#]Verbindung mit dem niedrigsten EC₅₀-Wert aus einer Serie strukturell verwandter Verbindungen^a β -Arrestin-Assay (Umverteilung von β -Arrestin2-GFP): U2OS + HA-GPR35; Agonist: 1 μ M

Pamoasäure

^b β -Arrestin-Assay (BRET): HEK293 + FLAG-GPR35-eYFP + β -Arrestin2-Renilla-Luciferase-6; Agonist: hGPR35/mGPR35 4 μ M Zaprinast, rGPR35 0.4 μ M Zaprinast^c β -Arrestin-Assay (BRET): HEK293 + FLAG-GPR35-eYFP + β -Arrestin2-Renilla-Luciferase-6; Agonist: EC₈₀ Cromoglicinsäure^d β -Arrestin-Assay (BRET): HEK293 + FLAG-GPR35-eYFP + β -Arrestin2-Renilla-Luciferase-6; Agonist: EC₈₀ Pamoasäure^eDMR-Assay (Signal: Messung über 60 Min. nach Agonistzugabe): HT-29 (humane Zelllinie mit endogener GPR35-Expression); Agonist: 500 nM Zaprinast^fDMR-Assay (Signal: Messung über 60 Min. nach Agonistzugabe): HT-29 (humane Zelllinie mit endogener GPR35-Expression); Agonist: 10 nM Pamoasäure^gDMR-Assay (Signal: Messung über 60 Min. nach Agonistzugabe): HT-29 (humane Zelllinie mit endogener GPR35-Expression); Agonist: 2 μ M Cromoglicinsäure^hERK1/2-Phosphorylierungs-Assay (Western Blot): U2OS + HA-GPR35; Agonist: 1 μ M PamoasäureⁱInositol-Phosphat-Akkumulations-Assay ("Scintillation-Proximity-Assay"): HEK293 + FLAG-GPR35-eYFP + G_{q13/5}; Agonist: EC₈₀ Zaprinast^jInositol-Phosphat-Akkumulations-Assay ("Scintillation-Proximity-Assay"): HEK293 + FLAG-GPR35-eYFP + G_{q13/5}; Agonist: 10 μ M Pamoasäure^k β -Arrestin-Assay (Umverteilung von β -Arrestin2-GFP): U2OS + GPR35; Agonist: 10 μ M Zaprinast

5.1.3 Mutagenese-Studien

Mutagenese-Studien können dabei helfen die Aminosäuren zu identifizieren, die für die Ligandbindung und Aktivierung eines Rezeptors eine Rolle spielen. Bislang wurden zwei Studien dieser Art zum GPR35 veröffentlicht (Ergebnisse siehe auch Tabelle 5.5).^{473,498} Es wurde berichtet, dass das Arg3.36 (TMD3) einiger GPCRs, die durch saure Liganden aktiviert werden können (z. B. GPR81), eine wichtige Rolle bei der Liganden-Bindung spielen könnte.⁵⁰⁹ Da gezeigt wurde, dass auch der GPR35 durch saure Liganden aktiviert wird, tauschte man diese Aminosäure im menschlichen (Arg100) und im Rattenrezeptor (Arg97) gegen Alanin aus.⁴⁷³ Die Mutanten konnten (bei nur für die Rattenrezeptor-Mutante signifikant verminderter Expression) nicht mehr aktiviert werden. Ähnliche Effekte beobachtete man für die Alanin- und Leucin-Mutanten von Tyr3.32 (hGPR35: Tyr96, rGPR35: Tyr93).⁴⁷³ Diese Aminosäure liegt gemäß einem Modell direkt über Arg3.36.⁴⁷³ Außerdem wurde aufgrund eines Homologie-Modells Arg4.60 untersucht: Arg151 des hGPR35 und Arg148 des rGPR35 wurden gegen Methionin ausgetauscht.⁴⁹⁸ Die getesteten Agonisten wiesen eine starke Wirksamkeitsverringering an beiden Rezeptor-Mutanten auf.⁴⁹⁸ Die Ergebnisse zeigen, dass diesen drei Aminosäuren für die Aktivierung des GPR35 speziesübergreifend eine wichtige Rolle zukommt.⁴⁷³ Es wurde vorgeschlagen, dass sowohl Arg3.36 als auch Arg4.60 mit der Carboxygruppe der negativ geladenen GPR35-Agonisten interagieren.^{473,498}

In einer weiteren Reihe von Mutagenese-Studien wurden ausgewählte Aminosäuren des humanen Rezeptors gegen die homologe Aminosäure des Ratten-GPR35 ausgetauscht und umgekehrt (Ergebnisse dieser „Swap“-Mutanten siehe Tabelle 5.5).⁴⁹⁸ Der Effekt auf die Wirksamkeit der getesteten Agonisten war allerdings eher gering. Lediglich Arg150 des rGPR35, nicht aber die homologe Aminosäure Leu153 des hGPR35 (Position 4.62), spielte eine Rolle bei der Aktivierung des entsprechenden Rezeptors.⁴⁹⁸ Jedoch fällt auf, dass die Effekte der Mutationen Ligand-spezifisch sind.⁴⁹⁸ Beispielsweise scheinen die Aminosäuren Arg164 und Arg255 vornehmlich Bedeutung für die Aktivierung des hGPR35 durch Lodoxamid, nicht aber durch die anderen getesteten Agonisten zu haben. Es wurde daher vorgeschlagen, dass die oben genannten Aminosäuren Arg100 und Arg151 des hGPR35 mit einer Carboxygruppe des Lodoxamids, während Arg164 und Arg255 mit der anderen Carboxygruppe der Dicarbonsäure Lodoxamid interagieren.⁴⁹⁸

Tabelle 5.5: Ergebnisse von Mutagenesestudien am GPR35

hGPR35		Homolog des rGPR35	
Mutante	Wirksamkeit von Agonisten ^a	Mutante	Wirksamkeit von Agonisten ^a
Ausgewählte Aminosäuren ^{473,498}			
Y96A	stark verringert ^b	Y93A	stark verringert ^b
Y96L	stark verringert ^b (weniger als bei der Ala-Mutante)	Y93L	stark verringert ^b (weniger als bei der Ala-Mutante)
R100A	stark verringert ^b	R97A	stark verringert ^b
R151M	stark verringert ^c , außer Doxantrazol: unverändert	R148M	stark verringert ^c
„Swap“-Mutanten ⁴⁹⁸			
L153R	unverändert / leicht erhöht ^c	R150L	stark / moderat verringert ^c
R164S	unverändert / leicht verringert ^c außer Lodoxamid: stark verringert	S161R	moderat verringert ^c
R240Q	unverändert / leicht verringert ^c	Q238R	unverändert ^c
R255S	unverändert ^c außer Lodoxamid: stark verringert und Cromoglicinsäure: leicht erhöht	S253R	unverändert / leicht erhöht ^c
R240Q- R255S	unverändert ^c außer Lodoxamid & Bufrolin: stark verringert	Q238R S253R	unverändert ^c
SNP-Varianten des hGPR35 ⁴⁹⁸			
A25T	unverändert ^d	-	
V29I	unverändert ^d	-	
V76M	moderat verringerte Wirksamkeit ^d	-	
T108M	unverändert ^d	-	
R125S	unverändert ^d	-	
T253M	unverändert ^d	-	
S294R	unverändert ^d	-	

^aan den Mutanten wurden die folgenden Agonisten getestet:

^bZaprinast, Kynurensäure, Verbindung **75**

^cZaprinast, Lodoxamid, Bufrolin, Cromoglicinsäure, Amlexanox, Doxantrazol, Pemirolast

^dZaprinast, Lodoxamid, Cromoglicinsäure

Außerdem wurden einige auf SNPs basierende, natürlich vorkommende Varianten des Rezeptors untersucht. Dabei wurden vornehmlich die SNPs mit der höchsten Allelfrequenz ausgewählt (siehe auch Tabelle 5.1, S. 138). Nur an einer der Rezeptor-Varianten konnte eine verringerte Wirksamkeit der getesteten Agonisten gefunden werden: An der V76M-Variante. Die anderen Varianten wiesen das gleiche

pharmakologische Profil wie der Wildtyp auf, weshalb den ausgetauschten Aminosäuren keine Bedeutung bei der Rezeptoraktivierung beizumessen ist.

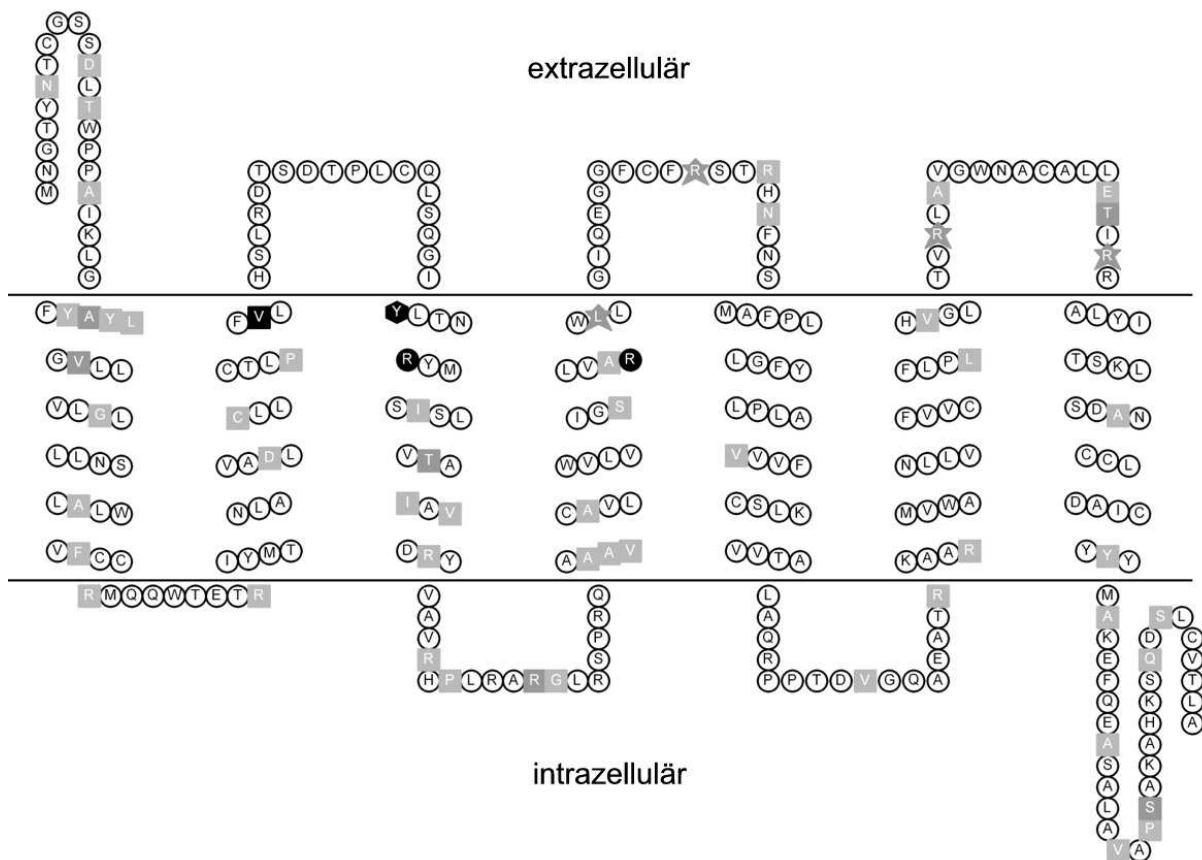


Abbildung 5.6: Rezeptor-Topologie des humanen GPR35

Aminosäuren, die bei Varianten des Rezeptors (SNPs) ausgetauscht sind (hellgrau, Quadrate) sowie solche die in Mutagenese-Studien ausgetauscht wurden (dunkelgrau und schwarz) sind hervorgehoben. Dunkelgrau markierte Aminosäuren wurden gegen die entsprechende Aminosäure der Rezeptorvariante ausgetauscht und spielten keine Rolle für die Rezeptoraktivierung. In Sternform dargestellte Aminosäuren wurden gegen die homologe Aminosäure des Ratten-GPR35 austauscht. Schwarz markierte Aminosäuren spielten eine wichtige Rolle bei der Rezeptoraktivierung (Quadrat: Austausch gegen die entsprechende Aminosäure der Rezeptorvariante; Kreis: Austausch gegen Alanin; Hexagon: Austausch gegen Alanin und Leucin).

Man kann zusammenfassen, dass Val76 sowie besonders Arg100, Tyr96 und Arg151 eine entscheidende Rolle bei der Aktivierung des hGPR35 spielen (siehe auch Abbildung 5.6). Es bleibt allerdings unklar, ob diese Aminosäuren für die Ligand-Bindung, für wichtige intramolekulare Bindungen oder für die während der Aktivierung stattfindenden Konformationsänderung des Rezeptors von Bedeutung sind. Radioligand-Bindungsstudien könnten sehr wertvolle zusätzliche Informationen liefern. Allerdings wurde bislang kein Radioligand für diesen Rezeptor beschrieben.

5.1.4 (Patho)physiologie

Erste Hinweise auf die (patho)physiologische Funktion des Rezeptors erhielt man aufgrund der Verknüpfung von Erkrankungen/Behinderungen mit Veränderungen im GPR35-Genlocus. So wurde in einer Studie festgestellt, dass Probanden mit einem der Albright'schen hereditären Osteodystrophie (AHO) ähnelndem Phänotyp eine Deletion im Chromosomabschnitt 2q37.3 aufwiesen.⁵¹⁰ Da die klassische AHO durch Mutation oder Deletion des Gens der α -Untereinheit eines G_s -Proteins (GNAS1 Gen) ausgelöst wird, erschien es nicht unwahrscheinlich, dass ein GPCR eine wichtige Rolle bei dem Auftreten einer ähnlichen Behinderung spielt.⁵¹⁰ Von den über 30 Genen, die bei den Probanden deletiert sind, war das einzige GPCR-Gen das des GPR35.⁵¹⁰ Daher wurde angenommen, dass das Fehlen des GPR35 hauptsächlich für das Auftreten dieser Form der geistigen Behinderung ist. Allerdings war zum Zeitpunkt der Studie nicht klar, dass der GPR35 nicht G_s - sondern wahrscheinlich G_i -gekoppelt ist. Darüber hinaus wurde der GPR35 ausgehend von genetischen Analysen mit dem Auftreten bestimmter kongenitaler Anomalien (VATER/VACTERL-Phänotyp) in Verbindung gebracht.⁵¹¹ Es konnte aber keine Assoziation des Krankheitsbildes mit einem GPR35-SNP nachgewiesen werden.⁵¹¹ Jedoch sprechen Expressionsanalysen in fötalen Mausgeweben dafür, dass der GPR35 eine Rolle bei der Entwicklung des Fötus und möglicherweise auch bei der Entstehung der genannten Anomalien spielen könnte.⁵¹¹ Ob der GPR35 tatsächlich eine Rolle bei der fötalen Entwicklung spielt bleibt unklar. Zumindest kommt dem Rezeptor keine Schlüsselfunktion zu, da GPR35-Knock-Out-Mäuse einen eher unauffälligen Phänotyp aufweisen (s. u.).⁴⁷⁸

In einer populationsgenetischen Studie wurde festgestellt, dass der GPR35 mit der Entstehung des Diabetes mellitus Typ 2 in Zusammenhang stehen könnte.⁵¹² Weitere Untersuchungen sind aber nötig um diese Aussage zu bestätigen. Eine weitere populationsgenetische Studie bringt den Einzelnucleotid-Polymorphismus (SNP) rs3749172 des GPR35 (siehe Tabelle 5.1, S. 138) mit einer erhöhten Wahrscheinlichkeit der Ablagerung kalkhaltiger Plaques in den Koronararterien in Zusammenhang.⁵¹³ Diese „Verkalkung“ tritt im Zuge arteriosklerotischer Veränderungen der Gefäße auf. Die Variante des Rezeptorgens, durch die der SNP bedingt wird, weist einen Basenaustausch von Adenin gegen Cytosin auf. Dieser Basenaustausch führt zu einem Aminosäure-Austausch von Serin gegen Arginin in Position 294 des Rezeptorproteins (C-Terminus). Mit diesem Austausch verschwindet eine Phosphorylierungsstelle des Rezeptors, was seine Pharmakologie beeinflussen könnte.⁵¹³ Auch hier fehlen weitere experimentelle Studien, um eindeutige Aussagen über die Rolle des GPR35 in der Pathogenese der koronaren Arteriosklerose zuzulassen.

Außerdem wurde ein SNP des GPR35 in Verbindung mit primär sclerosierender Cholangitis (einer chronischen Entzündung der Gallenwege) und Colitis ulcerosa in Verbindung gebracht: rs3749171. Die physiologischen Auswirkungen des Aminosäureaustausches in der Rezeptor-Variante (T108M) sind allerdings noch nicht weiter erforscht.⁵¹⁴

Andererseits kann man auch aufgrund des Expressionsmusters des Rezeptors Hinweise auf seine (patho)physiologische Rolle erhalten. So wurde festgestellt, dass die mRNA-Expression in Magentumoren im Vergleich zum umliegenden gesunden Gewebe besonders hoch war.⁴⁶⁹ Darüber hinaus kam es durch das Einbringen der GPR35-cDNA in die NIH3T3-Zelllinie (Maus-Fibroblasten) zur Transformation der Zellen.⁴⁶⁹ Aufgrund dieser Beobachtungen wurde angenommen, dass der GPR35 eine Rolle bei der Kontrolle des Zellwachstums spielen könnte.⁴⁶⁹ Basierend auf der Expression des Rezeptors in verschiedenen Zellen, Geweben und Organen wurde der GPR35 in einigen experimentellen Studien näher untersucht. So konnte nachgewiesen werden, dass beim Menschen eine erhöhte GPR35-mRNA-Expression in insuffizientem Myokardgewebe vorliegt.⁴⁷⁸ Um den Einfluss des Rezeptors auf die Herzfunktion näher zu untersuchen, wurden Mäuse generiert, die einen GPR35 „knock out“ (KO) aufwiesen. Die GPR35-KO-Mäuse hatten im Vergleich zu Wildtyp-Mäusen einen signifikant um 37.5 mmHg erhöhten Blutdruck.⁴⁷⁸ In weiteren Untersuchungen müsste geklärt werden, ob dies wirklich auf den Wegfall der GPR35-Signale am Herzen oder eher den in anderen Geweben zurückgeht. Während die Autoren der Veröffentlichung eine Rolle des GPR35 bei der Pathogenese kardiovaskulärer Erkrankungen postulieren,⁴⁷⁸ könnte man die Daten auch so deuten, dass der GPR35 kardioprotektiv wirkt, weshalb eine Hochregulierung der Rezeptorexpression in geschädigtem Myokard physiologisch sinnvoll wäre. Tatsächlich konnte eine solche gesteigerte Rezeptorexpression in Kardiomyozyten von Mäusen unter hypoxischen Bedingungen nachgewiesen werden.⁴⁸⁴ Auch eine Rolle bei der physiologischen Regulierung des Blutdrucks wurde vorgeschlagen.⁴⁸⁶

Abgesehen davon, dass die Expression des GPR35 in zahlreichen Zellen des Immunsystems nachgewiesen wurde,^{474,477,480} konnte gezeigt werden, dass die Aktivierung des Rezeptors auch Einfluss auf die Zellfunktion nehmen kann. In humanen Monozyten bewirkte Kynurensäure eine konzentrationsabhängige Verringerung der Lipopolysaccharid-induzierten Tumor-Nekrose-Faktor(TNF)- α -Sekretion.⁴⁷⁴ Außerdem wurde gezeigt, dass die Kynurensäure die Anheftung von Monozyten und Neutrophilen an das Gefäßendothel auslöst, welches einen wichtigen Schritt zur Rekrutierung von Leukozyten in entzündete Gewebe darstellt.⁴⁸⁹ Es ist unklar, ob die Kynurensäure-Konzentration unter Entzündungsbedingungen hoch genug ist, um diese Effekte auslösen zu können (s. o.). Das ändert aber nichts daran, dass der GPR35 die beobachteten Effekte vermitteln könnte.⁴⁷⁴ In einer weiteren Studie wurde gezeigt, dass

Zaprinast und Kynurensäure gleichermaßen konzentrationsabhängig die Sekretion von Interleukin 4 durch natürliche Killer-T-Zellen des Typs 1 reduzieren.⁴⁷⁷ Diese Zellen exprimieren den GPR35 und übernehmen durch Sekretion verschiedener Cytokine regulierende Aufgaben im Immunsystem.⁴⁷⁷

Man hat einige Hinweise darauf finden können, dass die Aktivierung des GPR35 Analgesie vermittelt. So wurde in einer Studie gezeigt, dass Zaprinast im Formalin-Test bei Ratten antinozizeptiv wirkt, diese Wirkung aber nicht von der PDE-Inhibition abhängig ist.⁵¹⁵ Deshalb wurde angenommen, dass die antinozizeptive Wirkung von Zaprinast GPR35-vermittelt ist.⁴⁷⁶ Antinozizeptive Effekte der Kynurensäure könnten ebenfalls GPR35-vermittelt sein, wurden zuvor aber meist ihrer antagonistischen Wirkung an spinalen NMDA-Rezeptoren zugeschrieben.⁴⁷⁶ Auch in einem Maus-Entzündungsschmerz-Modell („writhing test“) zeigten Zaprinast und Kynurensäure antinozizeptive Effekte.⁴⁷⁵ Pamoasäure wies in einem anderen Maus-Modell (für viszerale Schmerzen) ebenfalls antinozizeptive Effekte auf.⁴⁸³ Diese Wirkung wurde dem GPR35 zugeschrieben, was aber in Frage gestellt werden muss, da Pamoasäure am Mausrezeptor nicht aktiv ist.⁴⁸⁵ Außerdem wurde in Mäusen gezeigt, dass der konditionale KO von Ret (einer Rezeptor-Tyrosin-Kinase) zu einer Schmerzüberempfindlichkeit und zu erhöhter sensorischer und Kälte-Sensitivität führt.⁵¹⁶ Gleichzeitig wiesen die KO-Mäuse in ihren Spinalganglien eine verringerte Expression verschiedener Ionenkanäle und Rezeptoren auf, darunter der GPR35.⁵¹⁶ Daher wird spekuliert, dass die Reduzierung der GPR35-Signale ursächlich für die beobachteten Effekte, besonders der Hyperalgesie, ist.⁵¹⁶ Allerdings sind auch andere potentiell Analgesie-vermittelnde Rezeptoren in ihrer Expression reduziert (z. B. verschiedene Mrg-Rezeptoren),⁵¹⁶ so dass weitere Studien erforderlich sind, um Gewissheit über die Rolle des GPR35 zu erlangen.

Viele Studien sind nur begrenzt aussagekräftig, da der Großteil der beschriebenen GPR35-Agonisten oft mehrere andere Zielstrukturen adressiert und dies meist equipotent, oder sogar selektiv für die anderen Zielstrukturen: Dies gilt auch für die bisher in In-vivo- und In-vitro-Studien eingesetzten Agonisten Kynurensäure (AMPA/Kainat-Rezeptoren, NMDA-Rezeptoren, $\alpha 7$ -nikotische Achetylcholin-Rezeptoren, intrazelluläre Arylhydrocarbonsäure-Rezeptoren),⁵¹⁷ Zaprinast (PDE5 und 6)⁵¹⁸ und Pamoasäure (DNA-Polymerase β).⁵¹⁹ Außerdem waren lange Zeit keine GPR35-Antagonisten verfügbar (bislang für Nagerrezeptoren immer noch nicht). Der gelegentliche Einsatz von PTX als Ersatz-„Antagonist“ ist nur bedingt dazu geeignet, die beobachteten und durch PTX gehemmten Effekte auf den GPR35 zurückzuführen. Weniger Artefakt-behaftet ist es dagegen, die Aussagen durch „knock-down“- oder KO-Versuche zu untermauern. Dennoch fehlt es weiterhin an selektiven, hochpotenten Agonisten und Antagonisten (auch für die Nagerrezeptoren), um aussagekräftige

Versuche durchführen zu können und die physiologische Rolle des Rezeptors weiter zu erforschen.

5.2 Ergebnisse & Diskussion

Obwohl für mehrere natürlich vorkommende Verbindungen gezeigt werden konnte, dass sie den G-Protein-gekoppelten Rezeptor GPR35 aktivieren, konnte keine dieser Verbindungen zweifelsfrei als der endogene Agonist dieses Rezeptors identifiziert werden.^{474,486,500} Daher gilt der Rezeptor immer noch als Orphan-Rezeptor. Neben den natürlich vorkommenden Verbindungen, wurden auch einige synthetische, strukturell vielfältige GPR35-Agonisten beschrieben (siehe Tabelle 5.3, S. 145). Jedoch weisen die meisten dieser Verbindungen eine geringe Wirksamkeit auf und sind zudem größtenteils unselektiv. Ziel dieses Projektes war es daher, hochpotente und selektive Agonisten für diesen bislang wenig erforschten Rezeptor zu entwickeln. Darüber hinaus sollten neue Testsysteme für die pharmakologische Charakterisierung des GPR35 etabliert werden. Große Teile der in diesem Kapitel vorgestellten Ergebnisse und deren Diskussion wurden von uns bereits veröffentlicht.^{471,520}

Zu Beginn des Projektes sollte die kodierende DNA des GPR35 kloniert werden. Allerdings gelang es unter Standardbedingungen nicht, die DNA in PCR-Reaktionen zu amplifizieren. Daraufhin wurde die Primersequenz verlängert und eine Reihe von Zusätzen für die PCR-Reaktion getestet. Während die PCR unter Standardbedingungen keinerlei PCR-Produkt hervorbrachte, konnte allein durch den Zusatz von 2.5 % DMSO eine außergewöhnlich große DNA-Menge als PCR-Produkt erhalten werden. Die GPR35-DNA wurde in das für retrovirale Transfektionen genutzte Plasmid pLXSN eingebracht. Mit Hilfe dieses Transfektionssystems wurde der Rezeptor danach in CHO-Zellen zur Expression gebracht. Obwohl cAMP-Akkumulations-Experimente in der Literatur bislang nur für den Maus- und Ratten-GPR35 beschrieben wurden, hat man Hinweise darauf finden können, dass auch der humane GPR35 eine G_i-Kopplung aufweist.^{474,482} Aus diesem Grund wurde zuerst eine Reihe von cAMP-Akkumulations-Experimenten an diesem Rezeptor durchgeführt. Allerdings bewirkte der Standardagonist Zaprinast keine Verringerung der Forskolin-induzierten cAMP-Akkumulation ([³H]cAMP-Filtrationsexperimente). Um auszuschließen, dass dies auf die fehlende Rezeptor-Expression in den Zellen zurückzuführen ist, wurden semiquantitative

RT-PCR-Untersuchungen durchgeführt, die eine hohe Expression des Rezeptors nahe legten. Es ist zudem auszuschließen, dass es sich bei Zaprinast um einen funktionell selektiven Agonisten handelt, da die Verbindung den Rezeptor in jedem der publizierten Experimente zu aktivieren vermochte (siehe Tabelle 5.3, S. 145). Die experimentellen Bedingungen wurden daraufhin variiert. Es wurden z. B. zeitliche Variationen der Zugabe von Agonist, Forskolin oder der Gesamtinkubationszeit sowie die Variation des verwendeten Phosphodiesterase-Inhibitors vorgenommen. Doch es konnten keine Bedingungen gefunden werden, unter denen ein Signal erhalten werden konnte. Obwohl vielfach gezeigt wurde, dass G-Protein-abhängige Signale in funktionellen Experimenten am hGPR35 PTX-sensitiv sind, konnte die G_i -Kopplung des Rezeptors also nicht in cAMP-Akkumulations-Experimenten nachgewiesen werden.^{474,482} Durch die spätere Verfügbarkeit weiterer experimenteller Testsysteme konnten Hypothesen zu dieser überraschenden Beobachtung überprüft werden. In Kapitel 5.2.6.3 soll dieser Aspekt erneut aufgegriffen werden.

Aus diesem Grunde musste ein anderes experimentelles System für die pharmakologische Testung von Verbindungen am hGPR35 ausgewählt werden. Für Orphan-Rezeptoren werden meist Testsysteme genutzt, die alle möglichen G-Protein-vermittelten Signalkaskaden zugleich erfassen (DMR-Experimente), alle Signale in eine Signalkaskade umlenken (Calciumionen-Mobilisations-Experimente unter Koexpression von chimären oder promiskuitiven G-Proteinen) oder unabhängig von der G-Protein-Kopplung sind (β -Arrestin-Rekrutierungs-Experimente). β -Arrestin-Rekrutierungs-Experimente sind das Standard-Testsystem bei der pharmakologischen Erforschung des hGPR35. Gegenüber DMR- und Calciumionen-Mobilisations-Experimenten haben sie darüber hinaus den Vorteil, einen deutlich geringen Anteil unspezifischer Signale zu liefern. Daher wurde für weitere Untersuchungen eine Zelllinie erworben, die die Messung der Rezeptor-spezifischen β -Arrestin-Rekrutierung erlaubt (PathHunter[®], DiscoverX). Es handelt sich dabei um eine CHO-Zelllinie, in der ein Fusionsprotein aus β -Arrestin 2 und einer N-terminalen Deletionsmutante einer β -Galaktosidase sowie der humane GPR35, an dessen C-Terminus rekombinant ein Enzymfragment angefügt wurde, zur Expression gebracht wurden. Nach der Rezeptor-Aktivierung kommt es zur Rekrutierung von β -Arrestin-Molekülen an den Rezeptor. Dadurch kommt die Deletionsmutante der β -Galaktosidase in räumliche Nähe zu dem Enzymfragment, das an dem Rezeptorprotein hängt. Es kommt zur Enzymkomplementation, wodurch das Enzym aktiv wird. Anhand des Substratumsatzes, der aufgrund dabei entstehender

Lumineszenz gemessen werden kann, kann so auf die Rezeptoraktivierung rückgeschlossen werden.

5.2.1 Vortestungen

Zu Beginn der Testungen wurden zur Validierung des experimentellen Systems ausgewählte Standardliganden getestet: Neben Konzentrations-Wirkungskurven für Zaprinast (**30**) und Cromoglicinsäure (**86**) wurden Inhibitionskurven für die Antagonisten CID 2745687 (**114**) und ML 145 (**116**) aufgenommen (siehe Abbildung 5.7). Die bestimmten EC_{50} - und IC_{50} -Werte bewegten sich in einer ähnlichen Größenordnung wie sie für diese Verbindungen in β -Arrestin-Rekrutierungs-Experimenten am hGPR35 bereits beschrieben worden waren (siehe Tabelle 5.6). Lediglich der gemessene IC_{50} -Wert von ML 145 war etwas höher als in der Literatur angegeben (vergleiche Tabelle 5.6 mit Tabelle 5.4, S. 152). Allerdings muss man einschränkend dazu sagen, dass die Literatur-Daten nicht unter Verwendung des gleichen Expressions- und/oder Detektionssystems generiert wurden. Leichte Abweichungen sind daher nicht überraschend. Grundsätzlich entsprachen die Werte aber den Erwartungen.

Weiterhin ließ sich bei der Testung der Antagonisten eine interessante Beobachtung machen: Das untere Plateau der Inhibitionskurven beider Verbindungen lag unter dem Hintergrundwert, der als 0 % festgelegt wurde (siehe Abbildung 5.7). Mehrere Erklärungen für diesen Fund sind denkbar: Beide Verbindungen könnten unspezifische Effekte (z. B. aufgrund von Zytotoxizität) verursachen. **114** wurde daraufhin zur Kontrolle in einem einzelnen β -Arrestin-Rekrutierungs-Experiment mit entsprechenden Zellen untersucht, in denen der hGPR171 zur Expression gebracht wurde. Da sich weder bei 1 noch 10 μ M eine Verringerung des Lumineszenzsignals feststellen ließ, ist ein unspezifischer Effekt als Ursache für die Beobachtung unwahrscheinlich.

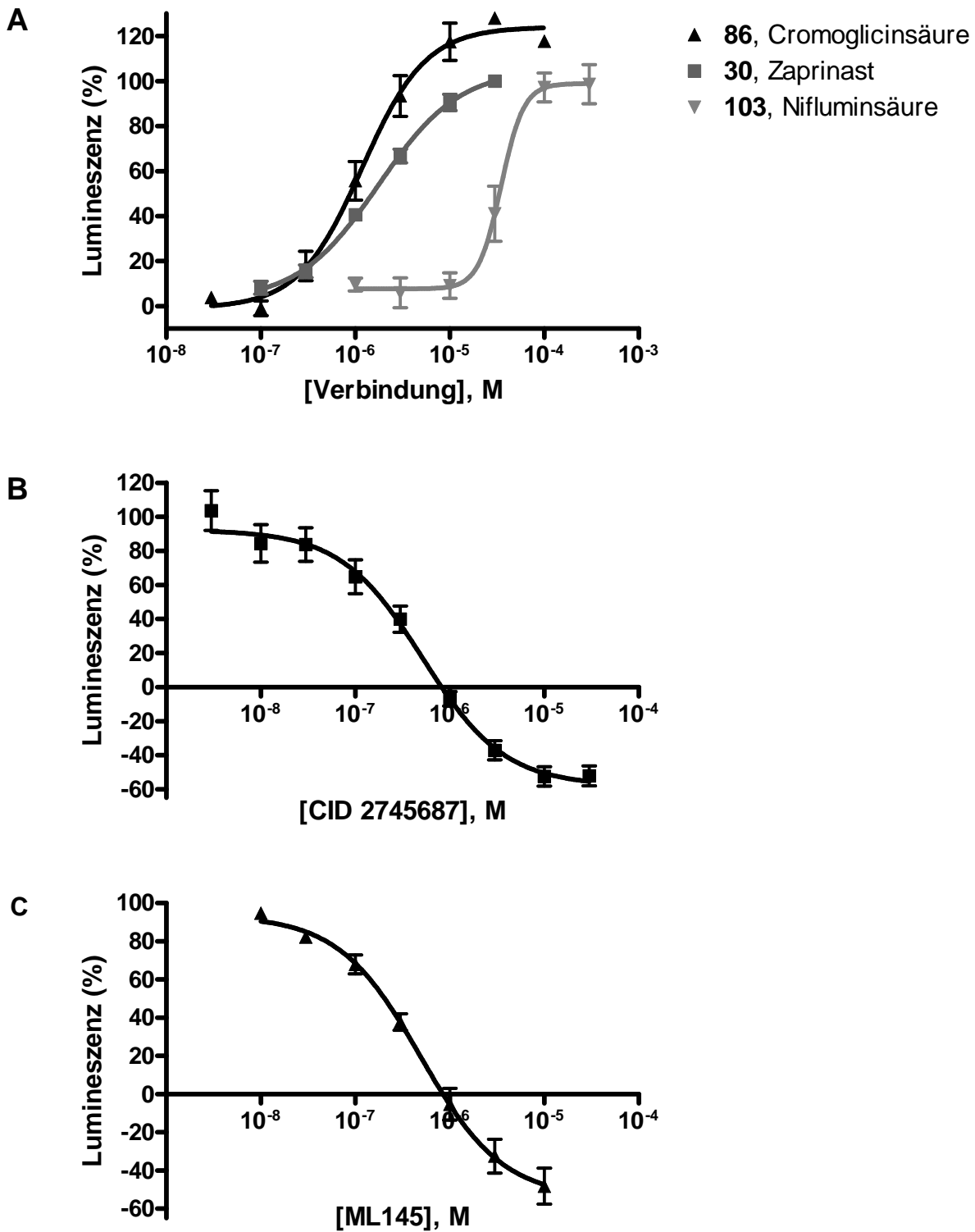


Abbildung 5.7: Pharmakologische Charakterisierung von Standard-Liganden am hGPR35.

(A) Konzentrations-Wirkungskurven von Standardagonisten, (B, C) Inhibitionskurven der Standardantagonisten CID 2745687 (114) und ML 145 (116). Die Wirksamkeit der Verbindungen wurde in funktionellen β -Arrestin-Rekrutierungsexperimenten bestimmt. Dargestellt sind die Mittelwert \pm Standardfehler aus drei bis vier unabhängigen Experimenten.

Eine andere Erklärung könnte sein, dass beide Verbindungen in diesen Experimenten als inverse Agonisten wirken, die die Basalaktivität des Rezeptors reduzierten. In Anbetracht dessen, dass das untere Plateau beider Kurven bei etwa -60 % liegt, muss in diesem Fall von einer hohen Basalaktivität des Rezeptors ausgegangen werden. Jedoch ist auch denkbar, dass im Reaktionsmedium ein Agonist vorliegt, der den Rezeptor aktiviert, ohne jedoch eine Maximalaktivität auszulösen. Es ist nicht leicht zu klären, welche der beiden letztgenannten Möglichkeiten zutreffend ist. Man könnte in zukünftigen Experimenten das Reaktionsmedium gegen einen Salzpuffer austauschen. Dadurch könnte ein im komplex zusammengesetzten Medium vorliegender Agonist aus dem Gemisch eliminiert werden. Jedoch ist nicht auszuschließen, dass der möglicherweise im Reaktionsgemisch vorliegende Agonist nicht aus dem Medium stammt, sondern von den Zellen selbst freigesetzt wird. Zudem ist das Medium gezielt auf dieses experimentelle System optimiert worden. Einzelne Versuche mit anderen Medien zeigten, dass die Experimente nur bei diesen optimalen Bedingungen auswertbare Ergebnisse liefern. Leider ist die genaue Zusammensetzung des eingesetzten Reaktionsmediums geheim, weshalb auch nicht gezielt Mangelmedien hergestellt werden können. Grundsätzlich wäre es aber interessant, genau diesen möglichen Agonisten (ob im Medium enthalten oder von den Zellen ausgeschüttet) zu identifizieren, weil es sich dabei um den endogenen Agonisten handeln könnte. Da aber anhand der Standard-Liganden gezeigt werden konnte, dass das experimentelle System verlässliche und reproduzierbare Ergebnisse liefert, erscheint es trotz dieser Grundaktivität oder Grundaktivierung des Rezeptors als geeignet für die weitere Testung. Außerdem konnte bereits gezeigt werden, dass sich die Wirksamkeit eines Agonisten z. B. in Anwesenheit konstanter Konzentrationen eines anderen Agonisten, die einen submaximalen Effekt auslösen, praktisch nicht verändert: So hatte die Anwesenheit verschiedener konstanter Konzentrationen von Cromoglicinsäure keinen Einfluss auf den EC_{50} -Wert von Zaprinast am hGPR35 (BRET-basierte β -Arrestin-Rekrutierungs-Experimente, Expressionssystem: HEK293-Zellen).⁴⁸⁵

In den anfänglichen Vortestungen wurden strukturell vielfältige Verbindungen unter Berücksichtigung der in Kapitel 5.1.2.2 herausgearbeiteten typischen Eigenschaften für GPR35-Agonisten aus einer internen Substanzbibliothek ausgewählt. Grundsätzlich wurden alle Verbindungen sowohl auf Agonismus als auch auf Antagonismus untersucht. Da sich aber herausstellte, dass alle antagonistisch wirkenden Verbindungen genau wie die beiden Standardantagonisten auch im Agonismus-Test als solche zu identifizieren sind (durch Messwerte, die unter dem Hintergrundwert lagen), wurde in späteren

Testungen teilweise auf eine Antagonismus-Testung verzichtet. Die Vortestung wurde in der Regel bei einer Konzentration von 10 μM durchgeführt. Eine Konzentrations-Wirkungskurve wurde in diesen anfänglichen Testungen dann bestimmt, wenn ein Effekt von über 30 % (normalisiert auf 30 μM Zaprinast, dem Maximaleffekt) gefunden wurde. Eine Inhibitionskurve wurde ab einer Inhibition von über 70 % des Effektes von 5 μM Zaprinast ($\sim \text{EC}_{80}$) aufgenommen.

Es gibt Hinweise darauf, dass die Aktivierung des GPR35 analgetische Wirkung hat.^{475,483,516} In diesem Zusammenhang ist es interessant, dass das nicht-steroidale Antirheumatikum (NSAR) Nifluminsäure (**103**) bereits als GPR35-Agonist beschrieben wurde.⁴⁸⁷ Jedoch ist es unwahrscheinlich, dass Nifluminsäure neben dem bekannten Wirkmechanismus auch über die Aktivierung des GPR35 wirkt: Unter der Therapie mit Talniflummat kann man lediglich subnanomolare Konzentrationen des aktiven Metaboliten Nifluminsäure im menschlichen Plasma nachweisen.⁵²¹ Diese Konzentrationen sind zu gering, um auch den GPR35 zu aktivieren (EC_{50} 30.8 μM , siehe Tabelle 5.6). Da es aber von Interesse ist, ob andere analgetisch wirkende Arzneistoffe möglicherweise mit höherer Potenz den Rezeptor aktivieren, wurde eine Reihe von Analgetika für die Testung ausgewählt. Jedoch stellte sich heraus, dass es sich bei keiner der getesteten Verbindungen um einen GPR35-Liganden handelte. Möglicherweise liegt dies auch an der Tatsache, dass außer Nifluminsäure keine der strukturell nah verwandten Analgetika ein Heteroatom in ihren aromatischen Ringsystemen aufweisen. Die Bedeutung dieses Heteroatoms wird besonders beim direkten Vergleich von Nifluminsäure (**103**) mit Flufenaminsäure (**117**) deutlich.⁴⁸⁷ Damit scheint also ein Wasserstoffbrückenakzeptor in dieser Position von entscheidender Bedeutung für die Wirksamkeit der Verbindung zu sein. Bei der Analyse der Daten von Nifluminsäure fällt auf, dass die Konzentrations-Wirkungskurve dieser Verbindung im Gegensatz zu denen der anderen getesteten GPR35-Agonisten einen sehr steilen Anstieg aufweist (Hill-Slope: 3.5, siehe Abbildung 5.7). Dies könnte darauf hindeuten, dass die Verbindung neben der orthosterischen auch noch eine allosterische Bindungsstelle des Rezeptors adressiert.

Tabelle 5.6: Wirksamkeit ausgewählter Verbindungen einer Substanzbibliothek am hGPR35

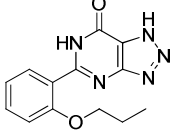
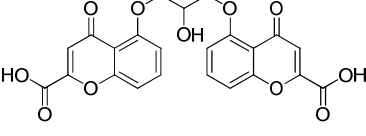
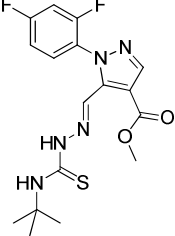
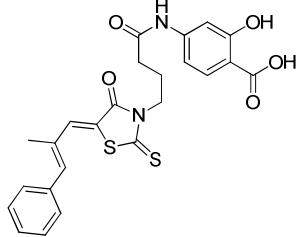
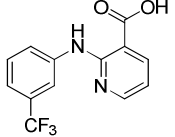
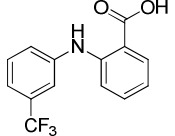
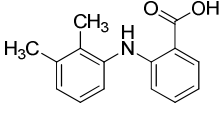
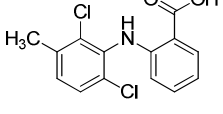
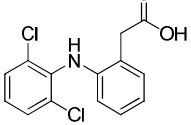
Verbindung	Struktur	β-Arrestin-Experimente ^a		
		EC ₅₀ ± SEM (μM) (% Effekt ± SEM) ^b	E _{max}	(% Inhibition ± SEM) ^c
30 , Zaprinast		1.96 ± 0.24	100	n. b.
86 , Cromoglicinsäure		1.26 ± 0.17	119	n. b.
114 , CID 2745687		n. b.	-	0.574 ± 0.050
116 , ML 145		n. b.	-	0.522 ± 0.066
103 , Nifluminsäure		30.8 ± 3.1	97	n. b.
117 , Flufenaminsäure		(10 ± 7)	-	(2 ± 7)
118 , Mefenaminsäure		(0 ± 4)	-	n. b.
119 , Meclofenaminsäure		(6 ± 2)	-	n. b.
120 , Diclofenac		(8 ± 3)	-	(-6 ± 2)

Tabelle 5.6 (Fortsetzung)

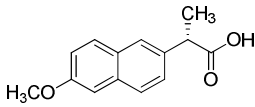
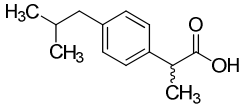
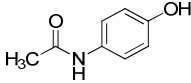
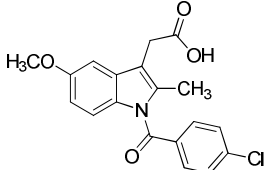
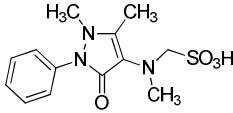
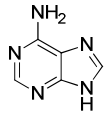
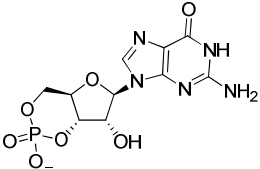
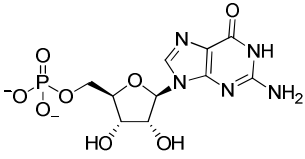
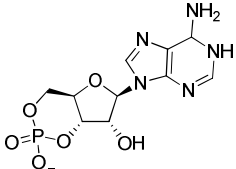
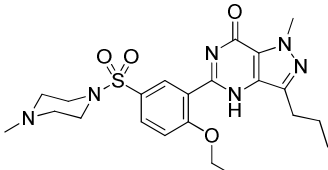
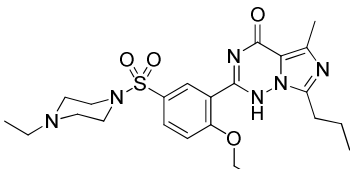
121, Naproxen		(10 ± 5)	-	(0 ± 8)
122, Ibuprofen		(2 ± 3)	-	n. b.
123, Paracetamol		(3 ± 1)	-	n. b.
124, Indomethacin		(-1 ± 3)	-	(-5 ± 6)
125, Metamizol		(-3 ± 3)	-	(10 ± 6)
1, Adenin		(0 ± 4)	-	n. b.
126, cGMP		576 ± 52	103	n. b.
127, GMP		(0 ± 3) ^d	-	n. b.
128, cAMP		(7 ± 4) ^d	-	n. b.
31, Sildenafil		(9 ± 5)	-	(-3 ± 5)
32, Vardenafil		(13 ± 4)	-	(-8 ± 15)

Tabelle 5.6 (Fortsetzung)

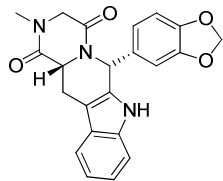
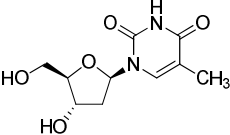
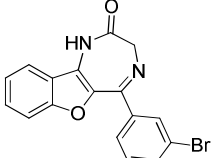
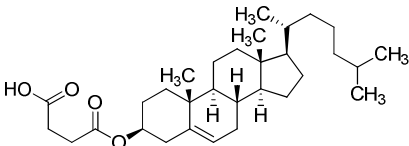
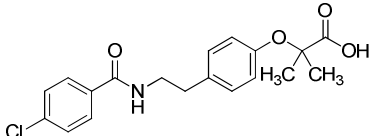
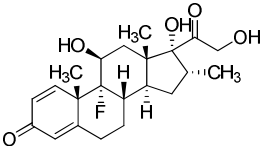
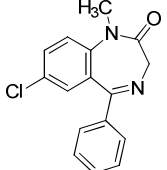
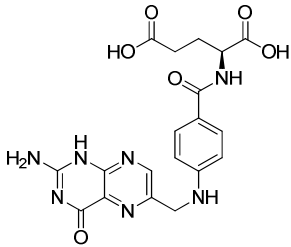
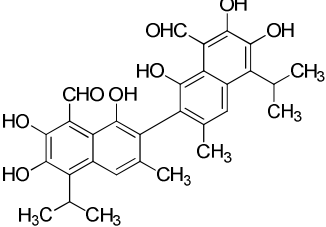
33, Tadalafil		(14 ± 7)	-	(-9 ± 16)
129, Thymidin		(8 ± 3)	-	(4 ± 3)
130, 5-BDBD		(-1 ± 0)	-	n. b.
131, Cholesteryl-Hemisuccinat		(-2 ± 1)	-	(-3 ± 1)
132, Bezafibrat		(1 ± 4)	-	(0 ± 5)
133, Dexamethason		(8 ± 3)	-	(-7 ± 2)
134, Diazepam		(7 ± 3)	-	(-4 ± 2)
135, Folsäure		(5 ± 2)	-	(-5 ± 6)
136, Gossypol		(-7 ± 1)	-	(56 ± 7)

Tabelle 5.6 (Fortsetzung)

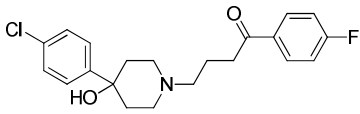
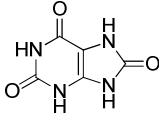
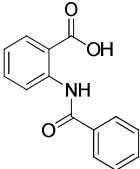
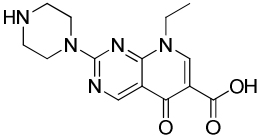
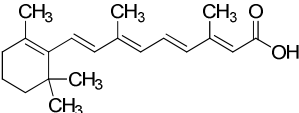
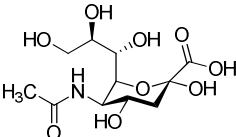
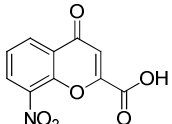
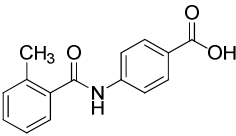
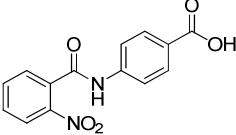
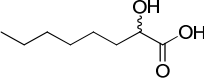
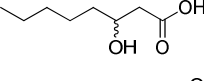
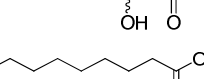
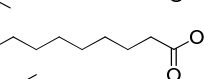

137, Haloperidol		(7 ± 1)	-	n. b.
138, Harnsäure		(1 ± 1)	-	(15 ± 5)
139		(3 ± 4)	-	(31 ± 17)
140, Pipemidsäure		(5 ± 1)	-	n. b.
141, Retinsäure		(-4 ± 1)	-	n. b.
142, Sialinsäure		(1 ± 4)	-	(-1 ± 3)
143		46.3 ± 3.2	101	n. b.
144		(-4 ± 1)	-	(-12 ± 9)
145		(-3 ± 1)	-	(11 ± 3)
146, 2-Hydroxy-Caprylsäure		(2 ± 2)	-	(-11 ± 3)
147, 3-Hydroxy-Caprylsäure		(3 ± 2)	-	(-4 ± 3)
148, 3-Hydroxy-Caprinsäure		(3 ± 3)	-	(3 ± 5)
149, Undecansäure		(-1 ± 6)	-	(1 ± 6)
150, Laurinsäure		(0 ± 1)	-	(8 ± 3)

Tabelle 5.6 (Fortsetzung)

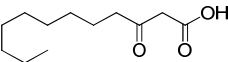
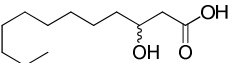
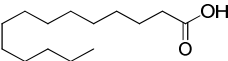
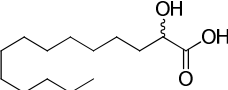
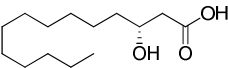
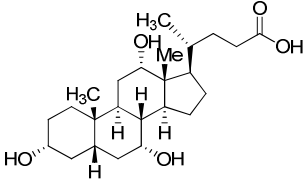
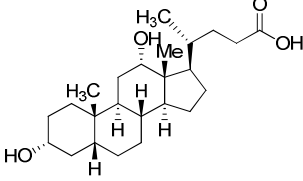
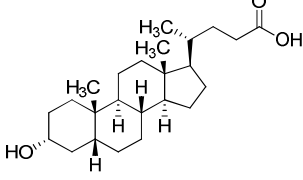
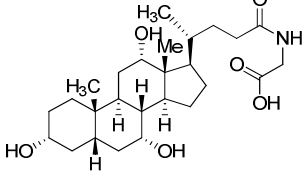
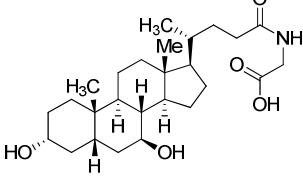
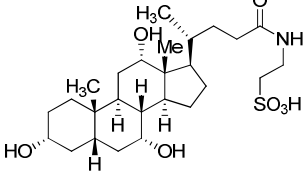
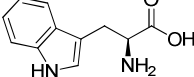
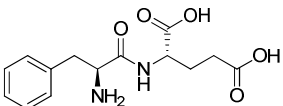
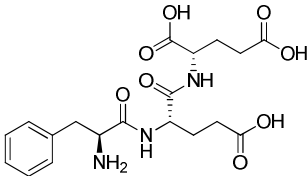
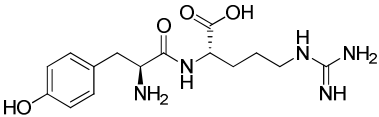
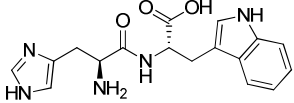
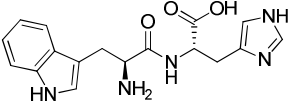
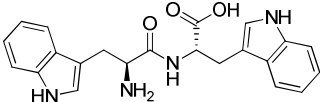
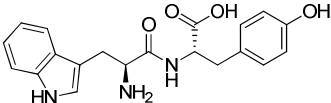
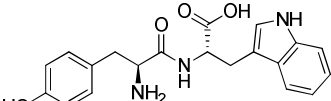
151, 3-Oxo-Laurinsäure		(-4 ± 3)	-	(0 ± 2)
152, 3-Hydroxy-Laurinsäure		(-1 ± 1)	-	(0 ± 4)
153, Myristinsäure		(0 ± 2)	-	(14 ± 3)
154, 2-Hydroxy-Myristinsäure		(3 ± 3)	-	(-2 ± 4)
155, 3-Hydroxy-Myristinsäure		(1 ± 4)	-	(3 ± 6)
156, Cholsäure		(8 ± 4)	-	(-5 ± 12)
157, Desoxycholsäure		(12 ± 5)	-	(-5 ± 6)
158, Lithocholsäure		(7 ± 2)	-	(-19 ± 10)
159, Glycocholsäure		(-2 ± 2)	-	n. b.
160, Glycoursodesoxycholsäure		(11 ± 2)	-	(-2 ± 10)
161, Taurocholsäure		(6 ± 2)	-	(-10 ± 7)
162, Tryptophan		(5 ± 5)	-	(-9 ± 1)

Tabelle 5.6 (Fortsetzung)

163, Peptid FE		(0 ± 4)	-	n. b.
164, Peptid FEE		(-1 ± 2)	-	n. b.
165, Peptid YR		(0 ± 3)	-	n. b.
166, Peptid HW		(5 ± 0)	-	n. b.
167, Peptid WH		(4 ± 5)	-	n. b.
168, Peptid WW		(1 ± 8)	-	n. b.
169, Peptid WY		(5 ± 9)	-	n. b.
170, Peptid YW		(-3 ± 4)	-	n. b.

^aVorstestungen wurden bei einer Konzentration von 10 µM durchgeführt.

^bEffekte wurden auf den Effekt von 30 µM Zaprinast normalisiert. Dieser entspricht dem Maximaleffekt.

^cInhibition des Effektes induziert durch 5 µM Zaprinast (~ EC₈₀).

^dScreening wurde bei einer Konzentration von 1000 µM durchgeführt

n. b. nicht bestimmt

Zaprinast ist ein Standardagonist des GPR35 und ist zudem ein bekannter cGMP-spezifischer PDE-Inhibitor. Da es das Nucleotid cGMP imitiert, wurden verwandte Verbindungen untersucht. Die Nucleobase Adenin (**1**) bewirkte keine Aktivierung des Rezeptors. Damit handelt es sich bei dem GPR35 nicht um den bislang noch nicht identifizierten humanen Adeninrezeptor. Jedoch wurde cGMP als GPR35-Agonist identifiziert (Tabelle 5.6, Abbildung 5.8, S. 180; durch die Vergleichstestung in β-Arrestin-Experimenten am hGPR55 konnte die Spezifität der beobachteten Signale bestätigt werden). Mit einem EC₅₀-Wert von 576 µM ist die Wirksamkeit von cGMP allerdings sehr

gering. Da cGMP ein metabolisch instabiles Molekül ist, wurde die Hypothese aufgestellt, dass es möglicherweise rasch von der Zelle aufgenommen und abgebaut wird. Um einerseits den cGMP-Transport und andererseits alle cGMP-spezifischen PDEs zu hemmen, wurden Konzentrations-Wirkungskurven von cGMP in der Anwesenheit von 50 μM Vardenafil aufgenommen. So wurde für PDE5-selektive Inhibitoren eine Hemmung des cGMP-Transportes beschrieben.^{361,362} Außerdem hemmt Vardenafil trotz Selektivität gegenüber der PDE5 bei der eingesetzten hohen Konzentration auch weitere cGMP-spezifische PDEs.^{369,380} In der Vortestung wurde zuvor festgestellt, dass Vardenafil auch bei einer Konzentration von 50 μM weder agonistische noch antagonistische Effekte am GPR35 aufwies. Aber auch in Anwesenheit von Vardenafil veränderte sich der EC_{50} -Wert von cGMP nicht ($547 \pm 18 \mu\text{M}$, $n = 2$). Interessanterweise hatte GMP (**127**) im Gegensatz zu cGMP keine agonistische Wirkung am hGPR35.

Man kann nicht ausschließen, dass cGMP durch andere Enzyme abgebaut wurde als Phosphodiesterasen, z. B. durch Nucleotid-Pyrophosphatase 1 (NPP1),⁵²² weshalb man weitere Testungen mit cGMP in Anwesenheit entsprechender Inhibitoren durchführen könnte. Da cGMP aber nicht nur metabolisch sondern auch chemisch instabil ist, ist weiterhin denkbar, dass es sich während der 90-minütigen Inkubationszeit bei 37 °C zersetzt, wodurch die Wirksamkeit der Verbindung unterschätzt wird. Allerdings ist es unwahrscheinlich, dass der wahre EC_{50} -Wert mehrere Zehnerpotenzen niedriger liegt. Damit kann ausgeschlossen werden, dass diese Beobachtung (die später auch von einer anderen Arbeitsgruppe publiziert wurde) physiologische Relevanz hat.⁴⁹⁹ Es gibt einige dimere GPR35-Agonisten, z. B. Pamoasäure. Für diese Verbindung konnte gezeigt werden, dass die Monomere einen um mehrere Zehnerpotenzen höheren EC_{50} -Wert aufweisen. Es ist daher denkbar, dass ein cGMP-Dimer deutlich potenter sein könnte als cGMP selbst. Solche Dimere werden physiologisch von Bakterien produziert und lösen Immunantworten aus.⁵²³ Da der GPR35 auch eine hohe Expression auf Immunzellen aufweist, könnte die hypothetische Aktivierung dieses Rezeptors durch zyklisches di-GMP physiologisch sinnvoll sein. In diesem Zusammenhang ist auch Kynurensäure als Agonist am GPR35 interessant. Wenn überhaupt werden nur im Darm ausreichend hohe Konzentrationen dieser Verbindung erreicht, um den humanen Rezeptor aktivieren zu können.⁴⁹⁰ Kynurensäure wird dabei vornehmlich von Bakterien produziert.⁴⁹⁰ Möglicherweise dient der GPR35 als Sensor für die Darmflora (über Kynurensäure) und als Detektor bakterieller Kontaminationen im Blut und Gewebe (über zyklische Dinucleotide). Diese Überlegungen bleiben allerdings spekulativ. Im Gegensatz zu cGMP war cAMP am hGPR35 inaktiv.

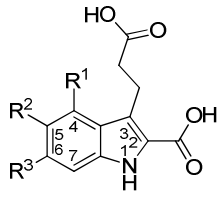
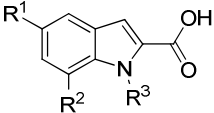
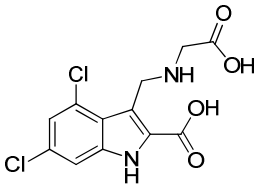
Neben dem bereits genannten Vardenafil, wurden auch Sildenafil und Tadalafil getestet. Alle drei PDE5-Inhibitoren waren inaktiv. Vergleicht man Sildenafil (**31**) und Vardenafil (**32**) mit Zaprinast (**30**), so kann man vermuten, dass diese Beobachtung in der größeren räumlichen Ausdehnung der beiden erstgenannten Verbindungen begründet ist. Möglicherweise ist aber auch die positive Ladung des unter physiologischen Bedingungen protonierten distalen Stickstoffatoms des Piperazinrestes von Sildenafil und Vardenafil unvorteilhaft für die Aktivierung des Rezeptors. So weist keine der bekannten, potenteren GPR35-Agonisten eine positive Ladung, sondern im Gegenteil häufig eine negative Ladung auf.

Zahlreiche weitere Verbindungen, die die herausgearbeiteten Kriterien für GPR35-Agonisten größtenteils erfüllten, wurden getestet. Darunter befanden sich Arzneistoffe, genauso wie andere synthetische Verbindungen, aber auch natürlich vorkommende Verbindungen. Teilweise wurden die Verbindungen nur aufgrund ihrer strukturellen Eigenschaften ausgewählt, teilweise geschah die Auswahl zusätzlich aufgrund des Expressionsprofils des Rezeptors (hohe Expression im Gastrointestinaltrakt: Testung von Gallensäuren) oder ähnlicher bereits bekannter GPR35-Liganden (wie Tyrosin- und Tryptophan-Metabolite: Testung von Tyrosin- und Tryptophan-Dipeptiden). Der Großteil der getesteten Verbindungen war inaktiv: Neben cGMP war das Chromenonsäure-Derivat **143** die einzige Verbindung dieser Testreihe, die als neuer GPR35-Agonist identifiziert werden konnte (siehe Tabelle 5.6, Abbildung 5.8, S. 180). Bei beiden Agonisten handelte es sich um Vollagonisten.

5.2.2 Testung einer Bibliothek von Indol-Derivaten

Eine vorliegende Indolcarbonsäure-Bibliothek erschien für die Testung am hGPR35 interessant, weil mit DHICA (**90**, 5,6-Dihydroxyindol-2-carbonsäure, siehe Abbildung 5.3, S. 144) in der Literatur bereits eine Indolcarbonsäure als GPR35-Agonist beschrieben wurde. Außerdem wurde zumindest für eines der Indol-Derivate (PSB-12150, **179**) eine agonistische Wirkung am nah verwandten GPR17 gefunden.⁵²⁴

Tabelle 5.7: Wirksamkeit von Indol-Derivaten am humanen GPR35

Verbindung	Struktur			β-Arrestin-Experimente ^a		
	R ¹	R ²	R ³	EC ₅₀ ± SEM (μM) (% Effekt ± SEM) ^b	E _{max}	(% Inhibition ± SEM) ^c
						
						
						
171-180						
181-195						
196						
171	H	H	Phenyl	(14 ± 6)	-	(16 ± 1)
172	H	H	Br	(7 ± 2)	-	(-1 ± 1)
173	H	H	I	(4 ± 4)	-	(6 ± 12)
174	I	H	H	(12 ± 6)	-	(-2 ± 8)
175	I	H	I	(7 ± 7)	-	(20 ± 4)
176	CF ₃	H	CF ₃	17.3 ± 1.5	74	(14 ± 7)
177	Phenyl	H	H	(9 ± 3)	-	(13 ± 4)
178	Phenyl	H	Phenyl	(1 ± 5)	-	(10 ± 5)
179, PSB-12150	Cl	H	Cl	(-1 ± 2)	-	(2 ± 6)
180	Cl	F	Cl	(-1 ± 4)	-	(16 ± 11)
181	Cl	Cl	H	(-2 ± 5)	-	(14 ± 12)
182	Cl	Cl	Methyl	(-1 ± 4)	-	(13 ± 8)
183	Cl	Cl	Ethyl	(2 ± 2)	-	(10 ± 8)
184	Cl	Cl	Propyl	(17 ± 5)	-	(10 ± 5)
185	Cl	Cl	But-3-enyl	(-1 ± 6)	-	(10 ± 12)
186	Cl	Cl	3-Acetoxypropyl	(10 ± 1)	-	(14 ± 6)
187	Cl	Cl	3-Hydroxy-3-oxopropyl	(4 ± 1)	-	(6 ± 11)
188	Cl	Cl	4-Hydroxybutyl	(11 ± 4)	-	(1 ± 8)
189	Cl	Cl	4-Hydroxy-4-oxobutyl	(4 ± 3)	-	(7 ± 8)
190	Cl	Cl	5-Hydroxy-5-oxopentyl	(10 ± 4)	-	(-10 ± 4)
191	Cl	Cl	6-Hydroxy-6-oxohexyl	(-1 ± 3)	-	(18 ± 6)
192	Br	Br	H	(-3 ± 9)	-	(10 ± 9)
193	Br	Br	2-Hydroxy-2-oxoethyl	(-8 ± 3)	-	(0 ± 10)
194	Br	Br	3-Hydroxy-3-oxopropyl	(-8 ± 2)	-	(13 ± 4)
195	Br	Br	4-Hydroxybutyl	(8 ± 4)	-	(14 ± 9)
196				(6 ± 3)	-	(2 ± 4)

^aVortestungen wurden bei einer Konzentration von 10 μM durchgeführt.

^bEffekte wurden auf den Effekt von 30 μM Zaprinast normalisiert. Dieser entspricht dem Maximaleffekt.

^cInhibition des Effektes induziert durch 5 μM Zaprinast (~ EC₈₀).

Die meisten der getesteten Verbindungen, darunter auch PSB-12150, stellten sich als inaktiv am hGPR35 heraus. Lediglich **176** konnte mit einem EC_{50} -Wert von 17.3 μ M als hGPR35-Agonist identifiziert werden. Durch die Vergleichstestung in β -Arrestin-Experimenten am hGPR55 konnte die Spezifität der beobachteten Signale am hGPR35 belegt werden. Allerdings handelte es sich bei **176** um einen Partialagonisten. Es ist nicht auszuschließen, dass weitere der getesteten Indolderivate ebenfalls Partialagonisten mit moderater Wirksamkeit darstellen, aber aufgrund einer sehr geringen Efficacy kein ausreichend hohes Signal lieferten um eine nähere Untersuchung zu veranlassen. Für den grundsätzlichen Partialagonismus dieser Verbindungsklasse spricht, dass bei den meisten Verbindungen sowohl geringe Signale als auch eine geringfügige Inhibition des Zaprinast-induzierten Signals gefunden werden konnten (vgl. Tabelle 5.7).

176 weist in 4- und 6-Position je einen stark elektronegativen Trifluormethyl-Substituenten auf. Es ist interessant, dass **179** im Gegensatz zu **176** komplett inaktiv ist. Mit zwei Chlor-Substituenten in Position 4 und 6 weist auch dieses Molekül stark negative Substituenten an den analogen Positionen auf. Obwohl der Trifluormethylrest einen stärkeren negativ induktiven Effekt auf das aromatische Ringsystem ausübt, würde man, sofern es nur auf diesen Effekt ankäme, für **179** einen etwas höheren Effekt erwarten, als es der Fall war. Daher könnte auch die größere räumliche Ausdehnung des Trifluormethylrestes im Vergleich zum Chlorsubstituenten eine Rolle spielen. Während große Phenylreste wie in Verbindung **177** oder **178** in beiden Positionen nicht toleriert werden, wäre es interessant zu untersuchen, welchen Effekt Methylreste in diesen Positionen hätten. Ebenso könnte ein Brom-Substituent in eine oder beide Positionen eingeführt werden. Dieser weist einen ähnlichen Radius wie der Trifluormethylrest, jedoch eine deutlich geringere Elektronegativität auf. Die Einführung eines solchen Substituenten in eine bicyclische Kernstruktur erwies sich nicht nur bei in der Literatur beschriebenen Thienothiophen-Derivaten, sondern auch bei der im Rahmen dieser Arbeit vorgenommenen Optimierung einer Leitstruktur als vorteilhaft (s. u.).⁵⁰⁶ Außerdem wäre es auch interessant zu untersuchen, ob beide Trifluormethyl-Substituenten gleichermaßen einen positiven Einfluss auf die Wirksamkeit haben. Ähnlich wie bei DHICA (**90**) könnten auch **176**-Derivate interessant sein, die Hydroxy-Gruppen in Positionen 5 und/oder 6 aufweisen. Da im Rahmen dieser Arbeit präferenziell ein hochpotenter Vollagonist entwickelt werden sollte, wurden weitere Optimierungsarbeiten an der identifizierten Indol-Leitstruktur jedoch vorerst zurückgestellt.

5.2.3 Testung von GPR55-Liganden

Da der hGPR35 sehr eng mit dem hGPR55 verwandt ist, sollten neben dem GPR55-Standardagonist Lyso-phosphatidylinositol (LPI) auch ausgewählte, in unserem Arbeitskreis durch Viktor Rempel identifizierte GPR55-Liganden getestet werden.⁵²⁵ Die Ergebnisse einer ersten Testreihe sind in Tabelle 5.8 angegeben. Allerdings handelte es sich bei keiner der getesteten Verbindungen um einen potenten GPR35-Liganden. Im Zusammenhang mit später besprochenen Struktur-Wirkungs-Beziehungen von Chromenonsäure-Derivaten erscheint es aber interessant, dass die Einführung eines Chlor-Substituenten in Verbindung **199** im Vergleich zu **198** eine deutliche Steigerung der antagonistischen Potenz herbeiführt.

Tabelle 5.8: Wirksamkeit ausgewählter GPR55-Liganden am humanen GPR35

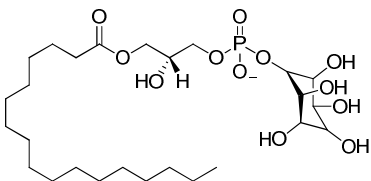
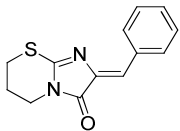
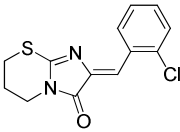
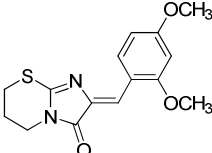
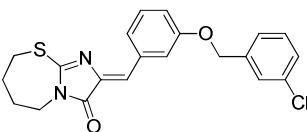
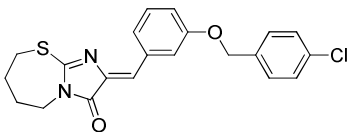
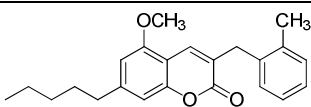
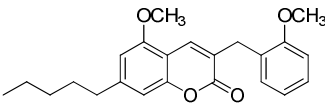
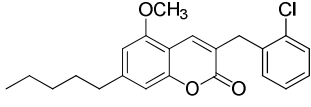
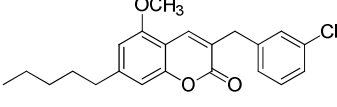
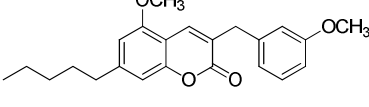
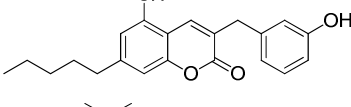
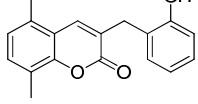
Verbindung	Struktur	β-Arrestin-Experimente ^a	
		(% Effekt ± SEM) ^b	(% Inhibition ± SEM) ^c
197 , Lyso-phosphatidyl-inositol		(-2 ± 2)	(5 ± 1)
198		(-5 ± 2)	(12 ± 5)
199		(-22 ± 2)	(49 ± 5)
200		(-7 ± 1)	(20 ± 6)
201		(-3 ± 1)	(25 ± 9)
202		(6 ± 3)	(1 ± 1)

Tabelle 5.8 (Fortsetzung)

203		(-3 ± 2)	(15 ± 2)
204		(0 ± 1)	(13 ± 3)
205		(-3 ± 1)	(12 ± 2)
206		(2 ± 2)	(11 ± 1)
207		(4 ± 6)	(6 ± 4)
208		(1 ± 2)	(13 ± 4)
209		(-10 ± 1)	(50 ± 11)

^aVorstudien wurden bei einer Konzentration von 10 μM durchgeführt.

^bEffekte wurden auf den Effekt von 30 μM Zaprinast normalisiert. Dieser entspricht dem Maximaleffekt.

^cInhibition des Effektes induziert durch 5 μM Zaprinast ($\sim \text{EC}_{80}$).

Obwohl **199** und **209** eine sehr geringe Wirksamkeit aufweisen, könnten beide Verbindungen als erste Leitstrukturen dienen, um potente GPR35-Antagonisten zu entwickeln. Insbesondere die Einführung von Carboxygruppen in die entsprechenden Moleküle erscheint als attraktive Modifikation, da die meisten GPR35-Liganden im Gegensatz zu GPR55-Liganden eine negative Ladung aufweisen.

Weiterhin wurden die Xanthin-Derivate **210-228** am hGPR35 getestet (Tabelle 5.9). Für diese Verbindungen konnte durch Viktor Rempel gezeigt werden, dass sie antagonistisch am hGPR55 wirken. Die meisten dieser Xanthin-Derivate schienen auch Antagonisten am hGPR35 zu sein, jedoch mit geringer Wirksamkeit. Moderate Wirksamkeit wiesen lediglich **222** und **223** auf (IC_{50} : 28.3 μM bzw. 24.1 μM).

Tabelle 5.9: Wirksamkeit ausgewählter Xanthin-Derivate am humanen GPR35

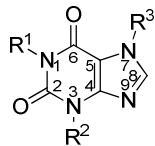
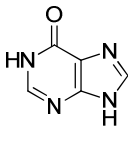
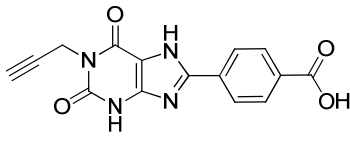
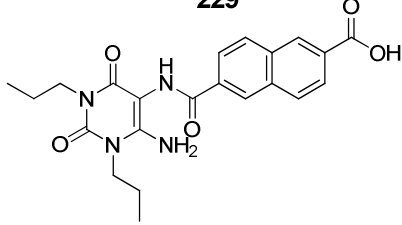

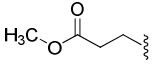

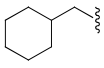
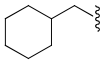
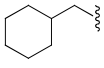
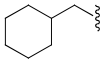
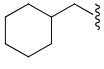
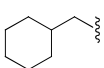

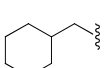
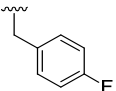
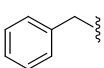
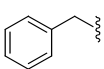
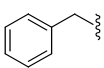
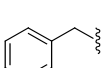

Verbindung	Struktur			β-Arrestin-Experimente ^a		
	R ¹	R ²	R ³	EC ₅₀ ± SEM (μM) (% Effekt ± SEM) ^b	E _{max} ^b	(% Inhibition ± SEM) ^c
						
						
						
						
210	Propyl		Methyl	(-8 ± 3)	-	(30 ± 7)
211			Methyl	(-6 ± 1)	-	(26 ± 2)
212		3-Methyl-butyl	Methyl	(4 ± 5)	-	(7 ± 4)
213		Pentyl	Propyl	(-1 ± 1)	-	(9 ± 6)
214		Pentyl	Prop-2-enyl	(-2 ± 2)	-	(11 ± 3)
215		Pentyl	Cyclopropyl	(-2 ± 2)	-	(10 ± 3)
216		4-Methyl-pentyl	Methyl	n. b.	-	(14 ± 6)
217			Methyl	(-12 ± 3)	-	(38 ± 1)
218			Methyl	(5 ± 2)	-	(10 ± 4)
219		3-Methyl-butyl	Methyl	(-20 ± 2)	-	(48 ± 3)
220		Pentyl	Methyl	(-20 ± 4)	-	(40 ± 9)
221		Hexyl	Methyl	(-11 ± 2)	-	(32 ± 4)
222			Methyl	(-31 ± 5)	-	28.3 ± 1.5

Tabelle 5.9 (Fortsetzung)

223			Methyl	(-37 ± 3)	-	24.1 ± 4.3
224		Pentyl	Methyl	n. b.	-	(7 ± 3)
225		Pentyl	Methyl	n. b.	-	(27 ± 7)
226		Pentyl	Methyl	n. b.	-	(2 ± 5)
227		Pentyl	Methyl	n. b.	-	(11 ± 3)
228			Methyl	n. b.	-	(63 ± 8)
12, Hypoxanthin				(3 ± 3)	-	n. b.
229				6.04 ± 1.55	56	-
230				(8 ± 1)	-	(-26 ± 9)
231				(-2 ± 2)	-	(-14 ± 8)

^aVorstestungen wurden bei einer Konzentration von 10 μM durchgeführt.

^bEffekte wurden auf das Signal von 30 μM Zaprinast (entspricht dem Maximaleffekt) normalisiert.

^cInhibition des Effektes induziert durch 5 μM Zaprinast ($\sim \text{EC}_{80}$).

n. b. nicht bestimmt

Auf der Basis von Inhibitionswerten ist es nicht einfach Struktur-Wirkungs-Beziehungen abzuleiten. Jedoch scheint klar, dass sowohl in 1- als auch in 3-Position ein aromatischer Substituent vorliegen muss (wie es bei den beiden genannten Verbindungen der Fall ist), um die Wirksamkeit der Verbindungen zu erhöhen. Aliphatische Reste in einer oder in beiden dieser Positionen bewirken eine Verringerung der Wirksamkeit (vergleiche z. B. **222** mit **217** oder **221**). Damit sind für die Bindung des Liganden wahrscheinlich π -Elektronen-Wechselwirkungen, die durch die aromatischen Benzyl-Substituenten vermittelt werden, von Bedeutung. Eine Verlängerung des Linkers zwischen der Kernstruktur und dem Aromaten der als Substituent in der 3-Position eingeführt wurde scheint nicht vorteilhaft für die antagonistische Aktivität der Verbindung zu sein (vgl. **220** und **226**). Man könnte auch in Position 1 überprüfen, ob die Variation der Länge des Linkers zu einer höheren Wirksamkeit der Verbindung führt. In beiden Fällen könnte statt eines Benzyl- auch ein Phenylsubstituent eingeführt werden. Weiterhin zeigte sich, dass

der stark elektronegative *para*-Fluor-Substituent des N³-Benzylrestes von **223** keinen Einfluss auf den IC₅₀-Wert der Verbindung hatte (vergleiche **223** mit **222**). Eine weitere wichtige Beobachtung ist die Tatsache, dass das untere Plateau der Inhibitionskurven von **222** und **223** mit -150 % weit tiefer liegt als bei den untersuchten Standardantagonisten. Dies könnte bedeuten, dass es sich bei diesen Verbindungen in diesem experimentellen System um effizientere inverse Agonisten handelt, als CID 2745687 oder ML 145. Jedoch kann auch nicht ausgeschlossen werden, dass **222** und **223** unspezifische Effekte vermitteln und zum Beispiel zytotoxisch sind, wodurch es bei hohen Konzentrationen zu einem drastischen Abfall des Lumineszenzsignals kommt. In einzelnen β -Arrestin-Experimenten am hGPR171 wurden **222** und **223** getestet. Es zeigte sich, dass die Verbindungen ab einer Konzentration von 10 μ M eine Verringerung des Lumineszenz-Signals bewirkten (was, wie oben genannt, für den Standard-hGPR35-Antagonisten **114** nicht der Fall war). Obwohl nicht ausgeschlossen werden kann, dass es sich bei **222** und **223** um inverse Agonisten am hGPR171 handelt, ist es doch wahrscheinlicher, dass beide Verbindungen das experimentelle System unspezifisch beeinflussen. Es ist auch möglich, dass sich ein GPR35-abhängiger Effekt mit einem unspezifischen Effekt überlagert. Um diesen Sachverhalt zu klären, wäre ein nicht Zell-basiertes System für die Testung von **222** und **223** wünschenswert. Ein solches System wurde im Rahmen dieser Arbeit etabliert und die aufgestellten Hypothesen zu Verbindungen **222** und **223** wurden anhand von weiteren Experimenten überprüft (s. u.). Aufgrund der anfänglichen Unsicherheit über die Spezifität der beobachteten Effekte wurde eine weitere Optimierung der Xanthinderivate als GPR35-Antagonisten zunächst nicht aktiv vorangetrieben.

Da wie schon für die anderen GPR55-Liganden ein möglicher Optimierungsschritt dieser Klasse von Verbindungen die Einführung einer Carboxygruppe darstellt, wurde jedoch in der internen Substanzbibliothek nach Xanthinderivaten gesucht, die eine Carboxygruppe aufwiesen. Mit **229**, **230** und **231** konnten solche Verbindungen gefunden werden, die sich jedoch deutlich von den zuvor getesteten Xanthinderivaten, insbesondere von **222** und **223** unterschieden. Während **230** und **231** inaktiv waren, konnte **229** als neuer hGPR35-Agonist identifiziert werden (EC₅₀ 6.04 μ M, Abbildung 5.8, durch die Vergleichstestung in β -Arrestin-Experimenten am hGPR55 konnte die Spezifität der beobachteten Signale bestätigt werden). Bei dieser Verbindung handelte es sich um einen Partialagonisten. In zukünftigen Experimenten wäre es interessant, **229**-Derivate zu testen, um Aussagen über Struktur-Wirkungs-Beziehungen und eine Optimierung dieser Leitstruktur zu ermöglichen. Wie zuvor schon das Indol-Derivat **176** erschien auch

229 im Rahmen dieser Arbeit als weniger interessante Leitstruktur, da es sich bei beiden Verbindungen um Partialagonisten handelte. Ziel dieser Arbeit war es jedoch, einen potenten Vollagonisten zu entwickeln.

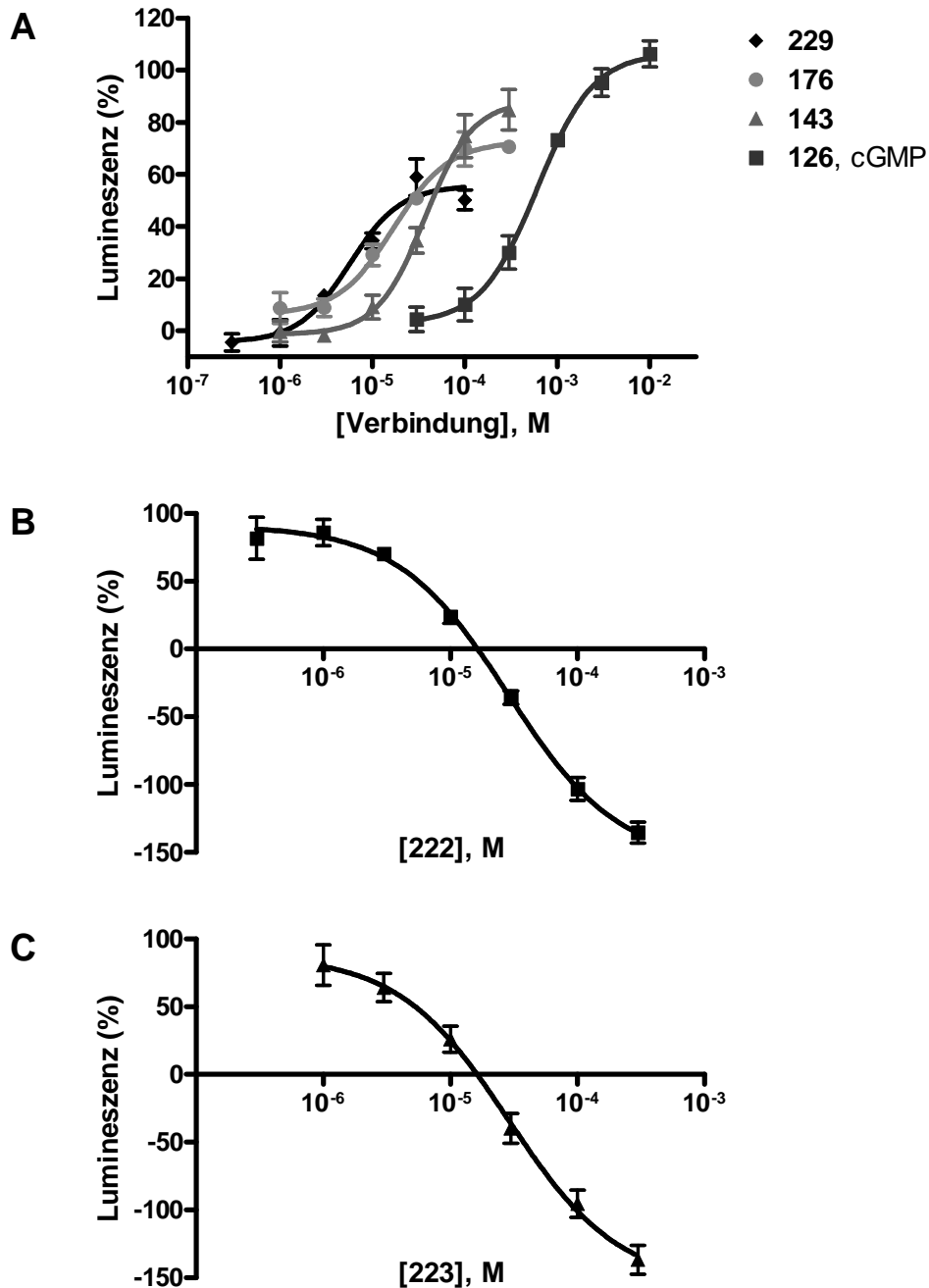


Abbildung 5.8: Pharmakologische Charakterisierung von in anfänglichen Testungen identifizierten GPR35-Liganden.

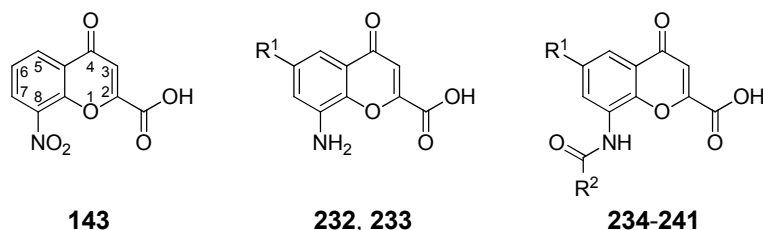
(A) Konzentrations-Wirkungskurven von Agonisten, (B,C) Inhibitionskurven von Antagonisten am humanen GPR35. Die Wirksamkeit der Verbindungen wurde in funktionellen β -Arrestin-Rekrutierungsexperimenten bestimmt. Dargestellt sind die Mittelwerte \pm Standardfehler aus drei bis vier unabhängigen Experimenten, die in Duplikaten durchgeführt wurden.

5.2.4 Testung und Optimierung von Chromenoncarbonsäure-Derivaten

5.2.4.1 Struktur-Wirkungs-Beziehungen am humanen GPR35

Bei den bislang gefundenen neuen GPR35-Liganden handelte es sich bei **222** und **223** um mögliche Antagonisten oder inverse Agonisten, bei **176** und **229** um Partialagonisten und bei cGMP (**126**) und dem Chromenoncarbonsäure-Derivat **143** um Vollagonisten. Da **143** der potentere der beiden Vollagonisten war, erschien es als attraktive Leitstruktur zur Entwicklung und Optimierung neuer und potenter hGPR35-Vollagonisten. Dies wurde zudem dadurch erleichtert, dass einige weitere Chromenonsäure-Derivate in einer internen Substanzbibliothek vorlagen und fortlaufende Synthesearbeiten zu dieser Verbindungsklasse stattfanden. Im Laufe der Testungen war es durch die Analyse der Struktur-Wirkungs-Beziehungen daher möglich, neue Verbindungen zu synthetisieren und die Agonisten immer weiter zu optimieren. Außer Zaprinast, Cromoglicinsäure und Pranlukast wurden alle in diesem Unterkapitel vorgestellten Verbindungen durch Mario Funke und Anne Meyer in unserem Arbeitskreis synthetisiert.

Zuerst erfolgten die Vortestungen der Chromen-4-on-2-carbonsäure-Derivate bei einer Konzentration von 10 μM . In der Regel wurde ab einem Effekt von 50 % (normalisiert auf die Maximalantwort, die durch 30 μM Zaprinast induziert wurde) eine Konzentrations-Wirkungskurve der entsprechenden Verbindung aufgenommen. Im Falle der Detektion eines geringeren Effektes, wurde in weiteren Vortestungen geprüft, ob die Verbindung den durch 5 μM Zaprinast ($\sim\text{EC}_{80}$) induzierten Effekt zu inhibieren vermochte. Bei einer Inhibition von 50 % wurde eine Inhibitionskurve aufgenommen. Fast alle der größtenteils neuen Verbindungen **143-275** (Tabelle 5.10 und Tabelle 5.11) erwiesen sich als GPR35-Agonisten. Zwar konnte bei einigen der Verbindungen eine leichte Verringerung der Efficacy im Vergleich zum Standardagonist Zaprinast gefunden werden, jedoch war dies häufig nicht statistisch signifikant. Weiterhin kann auch keine offensichtliche Korrelation zwischen Struktur und Efficacy gefunden werden. Bei dem Großteil der Verbindungen handelt es sich also um Vollagonisten.

Tabelle 5.10: Wirksamkeit von 8-substituierten Chromen-4-on-2-carbonsäure-Derivaten und Standardagonisten am GPR35

Struktur		β-Arrestin-Rekrutierungs-Experimente							
		hGPR35			mGPR35		rGPR35		
Verbindung	R ¹	R ²	EC ₅₀ ± SEM (μM) (% Effekt ± SEM) ^a	E _{max} ^a	(% Inhib. ± SEM) ^b	EC ₅₀ ± SEM (μM) (% Effekt ± SEM) ^a	E _{max} ^a	EC ₅₀ ± SEM (μM) (% Effekt ± SEM) ^c	E _{max} ^c
30 , Zaprinast			1.96 ± 0.24	100	-	1.60 ± 0.04	100	0.0611 ± 0.0061	100
86 , Cromoglicinsäure			1.26 ± 0.17	119	-	4.84 ± 0.60	102	0.986 ± 0.126	104
143			46.3 ± 3.2	101	-	(4 ± 6)	-	(38 ± 3)	-
232	H		(2 ± 4)	-	(15 ± 9)	(4 ± 2)	-	(40 ± 2)	-
233	Br		12.6 ± 1.5	84	-	(18 ± 4)	-	(40 ± 4)	-
234	H	Methyl	24.1 ± 3.3	91	-	(3 ± 1)	-	(31 ± 3)	-
235	H	Ethyl	13.4 ± 3.4	119	-	(12 ± 1)	-	(30 ± 5)	-
236	H	2-Methoxy-2-oxoethyl	20.2 ± 5.7	87	-	(15 ± 4)	-	6.65 ± 0.34	89
237	H	Cyclohexyl	4.20 ± 0.38	118	-	(38 ± 5)	-	1.20 ± 0.12	79
238	H	Phenyl	4.91 ± 0.65	107	-	(13 ± 4)	-	(39 ± 3)	-
239	H	Benzyl	8.96 ± 0.43	107	-	(19 ± 4)	-	(47 ± 5)	-
240	H	2-Naphthyl	4.67 ± 1.00	125	-	2.99 ± 0.51	79	(46 ± 3)	-
241	H	2-Chinolinylyl	1.34 ± 0.06	81	-	3.59 ± 0.30	65	(41 ± 6)	-

^aVorstestungen wurden bei einer Konzentration von 10 μM durchgeführt, Effekte wurden auf das Signal von 30 μM Zaprinast (entspricht dem Maximaleffekt) normalisiert.

^bInhibition des Effektes induziert durch 5 μM Zaprinast (~ EC₈₀).

^cVorstestungen wurden bei einer Konzentration von 10 μM durchgeführt, Effekte wurden auf das Signal von 10 μM Zaprinast (entspricht dem Maximaleffekt) normalisiert.

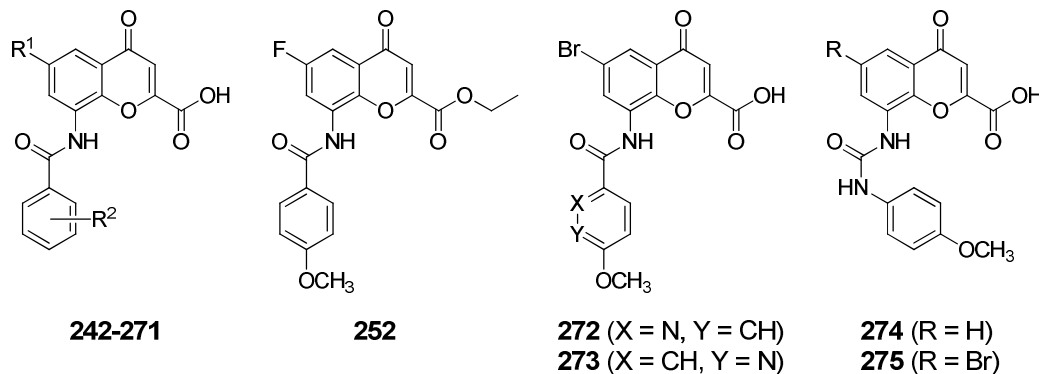
Die 8-Nitro-substituierte anfängliche Leitstruktur **143** stellt den am einfachsten aufgebauten GPR35-Agonisten dar. **143** besitzt mit einem EC₅₀-Wert von 46300 nM allerdings nur eine moderate Wirksamkeit. Durch die Reduktion der Nitrogruppe zu einer Aminogruppe in 8-Position (**232**) erhält man eine Verbindung, die am hGPR35 bei 10 μM weder agonistisch noch antagonistisch wirkt. Daraus kann geschlossen werden, dass ein Wasserstoffbrücken-Akzeptor in 8-Position essentiell für die Wirksamkeit der Verbindung

ist. Zur Einführung weiterer 8-Substituenten erschien daher ein Amid-Linker als günstig. Nicht nur das Vorhandensein eines Wasserstoffbrücken-Akzeptors, sondern auch die räumliche Ausdehnung des 8-Substituenten erwiesen sich als vorteilhaft: Die Verbindung mit einem 8-Acetamid-Substituenten (**234**) zeigte eine um den Faktor 2 erhöhte Wirksamkeit (EC_{50} 24100 nM) im Vergleich zum Nitro-Derivat **143**. Durch die Einführung längerer und voluminöser Reste über einen Amid-Linker konnte die Wirksamkeit der Verbindung weiter verbessert werden: Ethyl- (**235**, EC_{50} 13400 nM) und Cyclohexyl- (**237**) substituierte Verbindungen wiesen eine 2- bzw. 6-fach erhöhte Wirksamkeit im Vergleich zu **234** auf. Eine Erhöhung der Polarität des 8-Substituenten wie bei Verbindung **236**, die einen distalen Methylester aufweist, erschien dagegen als unvorteilhaft (EC_{50} 20200 nM). Im Gegensatz dazu zeigten Verbindungen mit aromatischen Gruppen in dieser Position, wie Phenyl- (**238**, EC_{50} 4910 nM), 2-Naphtyl- (**240**, EC_{50} 4670 nM) und 2-Chinolinyl- (**241**, EC_{50} 1340 nM) eine im Vergleich zum Cyclohexyl-Derivat **237** ähnlich hohe oder im Falle von **241** leicht erhöhte Wirksamkeit. Der 8-Substituent scheint daher in einer hydrophoben Tasche des Rezeptors zu liegen. Eine Verlängerung des Linkers zwischen der Chromenon-Kernstruktur und der distalen aromatischen Gruppe erwies sich nicht als vorteilhaft: Das Benzyl-Derivat **239** (EC_{50} 8960 nM) wies eine geringere Wirksamkeit auf, als das Phenyl-Derivat **238**. Dagegen schien die 6-Bromierung einen großen Einfluss auf die Wirksamkeit der Verbindungen zu haben. Während das 8-Amino-Derivat **232** inaktiv war, brachte die Einführung eines Brom-Substituenten in 6-Position die mit einem EC_{50} -Wert von 12600 nM moderat wirksame Verbindung **233** hervor.

Aufgrund ihrer im Vergleich zu den anderen Verbindungen hohen Wirksamkeit und der Verfügbarkeit zahlreicher Benzoessäure-Derivate als Synthesebausteine wurde die Verbindung **238** für weitere Modifikationen ausgewählt. In weiteren Untersuchungen wurde die Wirksamkeit von 8-Benzamidochromen-4-on-2-carbonsäuren mit variierenden Mono- und Disubstitutionen in *ortho*-, *meta*- oder *para*-Position bestimmt. Am genauesten wurde die *para*-Position untersucht, da sich einige Substituenten in dieser Position sehr günstig auf die Wirksamkeit der entsprechenden Verbindung auswirkten. Unter den Verbindungen mit unterschiedlichen *para*-Substituenten konnte folgende Reihenfolge der Wirksamkeit festgestellt werden: **246** (*p*-Methoxy, EC_{50} 346 nM) > **247** (*p*-Br, EC_{50} 804 nM) > **244** (*p*-Methyl, EC_{50} 1380 nM) > **238** (*p*-H, EC_{50} 4910 nM) > **245** (*p*-Trifluormethyl, 15500 nM). Die *meta*-Substitution durch eine Methyl- (**242**, EC_{50} 5440 nM) oder eine Nitrogruppe (**243**, EC_{50} 6970 nM) führte im Vergleich zum nicht-

substituierten Benzamidochromenon-Derivat **238** (EC_{50} 4910 nM) nicht zu einer erhöhten Wirksamkeit der Verbindungen.

Tabelle 5.11: Wirksamkeit von 8-Benzamidochromen-4-on-2-carbonsäure-Derivaten am GPR35



Verb.	Struktur				β -Arrestin-Rekrutierungs-Experimente					
	R ¹	R ²			hGPR35		mGPR35		rGPR35	
		<i>ortho</i>	<i>meta</i>	<i>para</i>	$EC_{50} \pm$ SEM (μ M)	E_{max}^a	$EC_{50} \pm$ SEM (μ M)	E_{max}^a	$EC_{50} \pm$ SEM (μ M)	E_{max}^b
242	H	H	CH ₃	H	5.44 \pm 1.34	70	(18 \pm 4)	-	2.75 \pm 0.35	71
243	H	H	NO ₂	H	6.97 \pm 0.30	112	(26 \pm 3)	-	(32 \pm 6)	-
244	H	H	H	CH ₃	1.38 \pm 0.14	104	(43 \pm 2)	-	(43 \pm 3)	-
245	H	H	H	CF ₃	15.5 \pm 3.1	81	(23 \pm 2)	-	(38 \pm 4)	-
246	H	H	H	OCH ₃	0.346 \pm 0.037	104	5.03 \pm 0.67	66	2.16 \pm 0.22	85
247	H	H	H	Br	0.804 \pm 0.148	122	(28 \pm 1)	-	(49 \pm 6)	-
248	F	Cl	Cl	H	0.382 \pm 0.056	106	n. b.	-	3.13 \pm 0.28	82
249	F	Cl	H	Cl	0.0170 \pm 0.0017	113	(24 \pm 4)	-	(46 \pm 3)	-
250	F	H	Cl	Cl	0.117 \pm 0.026	131	(37 \pm 4)	-	2.65 \pm 0.36	80
251	F	H	H	OCH ₃	0.112 \pm 0.011	123	(30 \pm 4)	-	1.76 \pm 0.08	78
252					0.112 \pm 0.024	80	(7 \pm 2)	-	(1 \pm 1)	-
253	Cl	H	H	H	0.430 \pm 0.063	115	(31 \pm 3)	-	2.84 \pm 0.41	65
254	Cl	H	CH ₃	H	1.22 \pm 0.17	102	(31 \pm 5)	-	2.10 \pm 0.21	92
255	Cl	H	H	NO ₂	1.71 \pm 0.16	130	(18 \pm 1)	-	3.14 \pm 0.65	115
256	Cl	H	H	OCH ₃	0.0168 \pm 0.0021	110	(34 \pm 3)	-	1.83 \pm 0.27	86
257	Br	H	H	H	0.303 \pm 0.021	110	(40 \pm 4)	-	2.75 \pm 0.60	75
258	Br	H	CH ₃	H	0.842 \pm 0.165	138	(27 \pm 5)	-	2.08 \pm 0.33	79
259	Br	H	H	Cl	0.0251 \pm 0.0019	115	(27 \pm 4)	-	(47 \pm 1)	-
260	Br	Cl	H	Cl	0.0164 \pm 0.0011	110	(12 \pm 4)	-	(32 \pm 3)	-

Tabelle 5.11 (Fortsetzung)

261	Br	H	Cl	Cl	0.0154 ± 0.0030	110	(29 ± 2)	-	3.25 ± 0.35	62
262	Br	H	H	CN	0.399 ± 0.060	108	(41 ± 1)	-	2.26 ± 0.21	99
263	Br	H	H	OCH ₃	0.0121 ± 0.0010	121	(36 ± 1)	-	1.40 ± 0.03	88
264	Br	H	H	Ethoxy	0.634 ± 0.076	99	(36 ± 3)	-	1.36 ± 0.16	74
265	Br	H	H	OH	0.716 ± 0.085	106	1.07 ± 0.12	98	0.349 ± 0.020	86
266	Br	OCH ₃	H	H	1.66 ± 0.28	91	4.95 ± 0.81	71	1.10 ± 0.18	73
267	Br	H	OCH ₃	OCH ₃	0.425 ± 0.075	102	6.40 ± 0.48	72	1.30 ± 0.16	106
268	Br	H	OCH ₂ O		0.0599 ± 0.0042	107	(34 ± 4)	-	2.05 ± 0.55	86
269	Br	Cl	H	OCH ₃	0.0111 ± 0.0031	120	(35 ± 2)	-	4.17 ± 0.33	81
270	CH ₃	H	H	OCH ₃	0.0377 ± 0.0036	118	n. b.	-	n. b.	-
271	OCH ₃	H	H	OCH ₃	0.0255 ± 0.0027	124	n. b.	-	n. b.	-
272					0.144 ± 0.017	115	(27 ± 5)	-	1.54 ± 0.21	68
273					0.0305 ± 0.0016	117	4.98 ± 0.35	64	0.991 ± 0.064	94
274					2.89 ± 0.12	96	5.49 ± 0.77	98	0.677 ± 0.178	80
275					0.458 ± 0.055	110	3.05 ± 0.34	94	0.729 ± 0.110	80

^aVortestungen wurden bei einer Konzentration von 10 µM durchgeführt, Effekte wurden auf das Signal von 30 µM Zaprinast oder ^b10 µM Zaprinast (entspricht dem jeweiligen Maximaleffekt) normalisiert.

Aufgrund der Beobachtung, dass ein Bromsubstituent in 6-Position als sehr vorteilhaft erschien (vgl. **232** mit **233**), wurden weitere Verbindungen mit Halogen-Substituenten in dieser Position synthetisiert: Derivate von **246** (EC₅₀ 346 nM), dem bislang potentesten Agonisten der Serie von Verbindungen. Durch den Vergleich von **246** (6-H) mit **251** (6-F, EC₅₀ 112 nM), **256** (6-Cl, EC₅₀ 16.8 nM) und **263** (6-Br, EC₅₀ 12.1 nM) wurde deutlich, dass jedes der eingeführten Halogenatome einen Anstieg der Wirksamkeit bewirkte. Der voluminöse Brom-Substituent hatte dabei die größte positive Auswirkung, gefolgt von dem Chlor- und dem Fluor-Substituenten. Obwohl die Wirksamkeits-Unterschiede zwischen den Brom- und Chlor-substituierten Verbindungen gering sind, kann man sie doch für alle Verbindungspaare beobachten, die sich nur in diesem Substituenten unterscheiden (z. B. **257**, 6-Br, EC₅₀ 303 nM versus **253**, 6-Cl, EC₅₀ 430 nM; **258**, 6-Br, EC₅₀ 842 nM versus **254**, 6-Cl, 1220 nM sowie **263**, 6-Br, EC₅₀ 12.1 nM versus **256**, 6-Cl,

EC₅₀ 16.8 nM). In diesem Zusammenhang ist es interessant, dass auch eine andere Gruppe feststellen konnte, dass die Einführung eines Brom-Atoms als Substituent einer bicyklischen, aromatischen Kernstruktur eine deutliche erhöhte Wirksamkeit der Verbindung herbeiführte.⁴⁹⁵

Um zu klären, ob der positive Effekt des 6-Brom-Substituenten in erster Linie auf seinen negativ induktiven Effekt auf das benachbarte aromatische System oder aufgrund seiner räumlichen Ausdehnung zurückzuführen ist, wurde die Verbindung **270** untersucht. Diese Verbindung weist einen Methylrest in 6-Position auf. Dieser hat einen ähnlich großen Radius wie der Brom-Substituent. Es zeigte sich, dass **270** (6-Methyl, EC₅₀ 37.7 nM) zwar eine deutlich höhere Wirksamkeit als **246** (6-H, EC₅₀ 346 nM) besaß, aber nicht wirksamer war als **263** (6-Br, EC₅₀ 12.1 nM). In diesem Zusammenhang ist auch der erneute Vergleich zwischen **251** (6-F, EC₅₀ 112 nM) und **246** (6-H, EC₅₀ 346 nM) interessant, deren Substituenten ebenfalls eine ähnliche Größe haben. Anhand dieser Vergleiche kann geschlussfolgert werden, dass für die Wirksamkeit die räumliche Ausdehnung des 6-Substituenten und sein negativ-induktiver Effekt bedeutsam sind. Letzterer scheint jedoch eine weniger wichtige Rolle zu spielen. Da der Brom-Substituent beide genannten Eigenschaften aufweist, erscheint dieser (unter den getesteten Substituenten) optimal. Der 6-Substituent scheint also eine hydrophobe Tasche des Rezeptor-Proteins auszufüllen. Möglicherweise spielt aber auch die durch den elektronegativen Substituenten induzierte verringerte Elektronendichte in der aromatischen Kernstruktur eine - wenn auch untergeordnete - Rolle. Es ist interessant, dass noch längere hydrophobe Reste in 6-Position gut toleriert werden (**271**, 6-Methoxy, EC₅₀ 25.5 nM versus **270**, 6-Methyl, EC₅₀ 37.7 nM). Daher sollten in Zukunft auch längere und voluminösere hydrophobe Substituenten in 6-Position eingeführt werden. Um die günstige verringerte Elektronendichte in dem benachbarten aromatischen System zusätzlich sicher zu stellen, wäre es möglicherweise sinnvoll, diese Reste in Kombination mit einem Halogen-Substituenten in 5- oder 7-Position einzuführen.

Da sich ein Brom-Atom als der beste 6-Substituent erwies, wurden vorwiegend Verbindungen synthetisiert und getestet, die ebenfalls diesen Substituenten aufwiesen. Dagegen wurden nur wenige 6-Fluor- und 6-Chlor-substituierte Verbindungen getestet. In der 6-Brom-substituierten Serie von Verbindungen ergab sich bei Verbindungen mit variierendem *para*-Substituenten am 8-Benzamid-Rest folgende Reihenfolge der Wirksamkeit: **263** (*p*-Methoxy, EC₅₀ 12.1 nM) > **259** (*p*-Chlor, EC₅₀ 25.1 nM) > **257** (*p*-H, EC₅₀ 303 nM) ≥ **262** (*p*-Cyano, EC₅₀ 399 nM) > **264** (*p*-Ethoxy, EC₅₀ 634 nM) > **265** (*p*-Hydroxy, EC₅₀ 716 nM). Damit stellte sich auch in dieser Serie eine Methoxy-Gruppe

als optimaler *para*-Substituent heraus. Außerdem war weder ein polarer (Hydroxyfunktion in **265**) noch ein zu langer Substituent (Ethoxy-Rest in **264**) vorteilhaft. Der positive Effekt der Methoxy-Gruppe ist darüber hinaus wahrscheinlich nicht von dem Sauerstoffatom als Wasserstoffbrücken-Akzeptor abhängig. Eine solche Funktion hätte ebenfalls der Cyano- oder der Hydroxy-Substituent, die beide die Wirksamkeit im Vergleich zum unsubstituierten Benzamid-Derivat herabsetzten. Um überprüfen zu können, ob dem Sauerstoffatom der Methoxy-Gruppe eine entscheidende Rolle zukommt, wäre es interessant eine Verbindung mit einem *para*-Ethyl-Substituenten zu testen. Dieser hat eine ähnliche Länge und wäre nur unwesentlich voluminöser als ein Methoxy-Substituent.

Bei der kleinen Serie von 6-Chlor-substituierten Benzamidochromenon-Derivaten konnten ähnliche Beobachtungen gemacht werden wie für die Serie der 6-Brom-substituierten Derivate: Auch hier hat sich die Einführung einer *para*-Methoxy-Gruppe (**256**, EC₅₀ 16.8 nM) im Vergleich zum unsubstituierten Benzamid (**253**, EC₅₀ 430 nM) sehr vorteilhaft auf die Wirksamkeit der Verbindung ausgewirkt. Ein *para*-Nitro-Substituent wurde dagegen nicht gut toleriert (**255**, EC₅₀ 1710 nM).

Neben zahlreichen *para*-Substituenten, wurden auch einige Substituenten in anderen Positionen des 8-Benzamidrestes der Verbindungen untersucht. Es konnte gezeigt werden, dass die Methoxy-Substitution in *ortho*-Position bei 6-Brom-substituierten Verbindungen nicht vorteilhaft war (vergleiche **266**, EC₅₀ 1660 nM und **257**, EC₅₀ 303 nM). Und auch ein Methylsubstituent in *meta*-Position führte zu einer verringerten Wirksamkeit der Verbindung (**258**, EC₅₀ 842 nM) im Vergleich zum unsubstituierten Benzamid-Derivat. Diese Beobachtung kann man auch für die Serie der 6-Chlor-substituierten Verbindungen machen (vergleiche **254**, EC₅₀ 1220 nM, mit **253**, EC₅₀ 430 nM). Man müsste weitere Derivate testen, um die Aussage zu sichern, aber möglicherweise ist die Bindungstasche des Rezeptors an den entsprechenden Stellen relativ eng, so dass eine räumliche Ausdehnung an der *ortho*- und *meta*-Position aus sterischen Gründen nicht gut toleriert wird.

Weiterhin wurden auch Disubstitutionen am Benzamid-Ring untersucht. Unter den 6-Fluor-substituierten Verbindungen befanden sich *o,m*- (**248**), *o,p*- (**249**) und *m,p*- (**250**) Dichlor-substituierte Derivate. Nach der Testung dieser Verbindungen ergab sich folgende Wirksamkeits-Reihenfolge: *o,p*-Dichlor (EC₅₀ 17.0 nM) >> *m,p*-Dichlor (EC₅₀ 117 nM) > *o,m*-Dichlor (EC₅₀ 382 nM). Diese Daten unterstreichen erneut die entscheidende Rolle hydrophober *para*-Substitutionen. Aus diesem Grund wurden in der

Serie aus 6-Brom-substituierten Verbindungen nur die *o,p*- (**260**) und *m,p*- (**261**) Dichlor-substituierten Derivate untersucht. Die Verbindungen mit diesen Substitutionsmustern zeigten eine vergleichbar hohe Wirksamkeit (**260**, EC₅₀ 16.4 nM; **261**, EC₅₀ 15.4). Die Struktur-Wirkungs-Beziehungen waren also nicht immer analog zwischen den Serien von 6-Fluor- und 6-Brom-substituierten Verbindungen. Diese Ergebnisse illustrieren die gegenseitige Abhängigkeit der Substitutionen in 6- und in 8-Position.

Die *m,p*-Dimethoxy-Substitution eines 6-Brom-substituierten Benzamid-Derivates (**267**, EC₅₀ 425 nM) führte zu einer drastischen Wirksamkeits-Verringerung im Vergleich zur *p*-Methoxy-substituierten Verbindung (**263**, EC₅₀ 12.1 nM). Dagegen wurde die korrespondierende weniger voluminöse *m,p*-Methyldioxy-Substitution (**268**, EC₅₀ 59.9 nM) deutlich besser toleriert. Wie zuvor schon vorgeschlagen könnten größere Substituenten in anderen Positionen als der *para*-Position aus sterischen Gründen unvorteilhaft sein. Chlor-Atome gehören zu den wenigen Substituenten die auch in anderen Positionen toleriert werden. So bewirkte die Kombination eines *o*-Chlor-Substituenten mit einem *p*-Methoxy-Substituenten (bei **269**, EC₅₀ 11.1 nM) keine Verringerung, aber auch keine deutliche Verbesserung der Wirksamkeit im Vergleich zum monosubstituierten *p*-Methoxy-Derivat (**263**, EC₅₀ 12.1 nM).

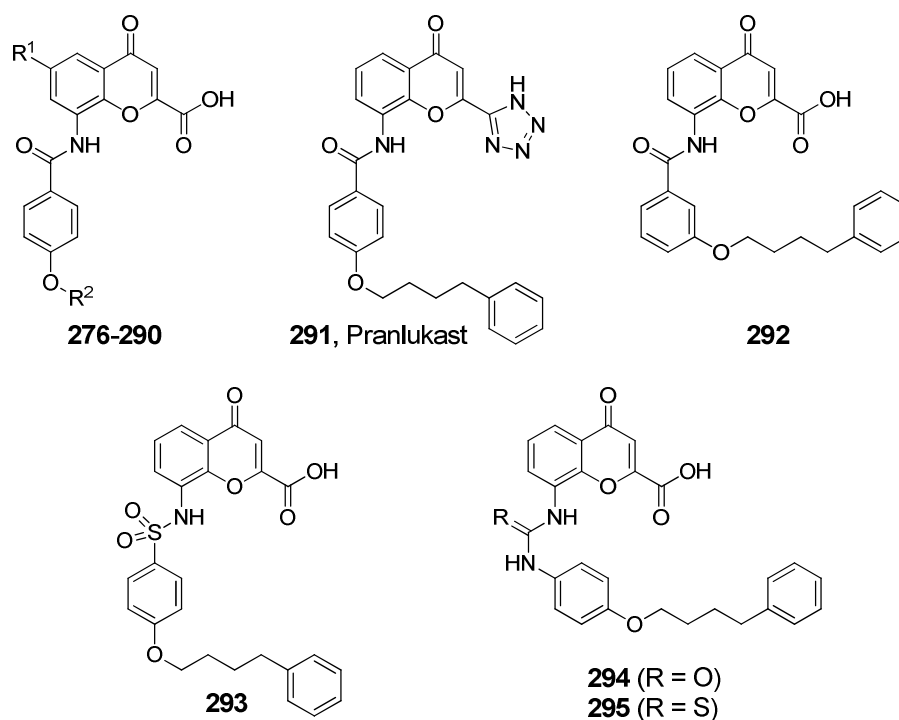
Weiterhin wurden Verbindungen getestet bei denen der *p*-Methoxybenzamid- gegen analoge Stickstoff-haltige Methoxypyridin-Ringe ausgetauscht worden waren. Es stellte sich heraus, dass ein Stickstoffatom in 3-Position (**275**, EC₅₀ 30.5 nM) besser toleriert wurde als in 2-Position (**274**, EC₅₀ 144 nM). Jedoch zeigten beide Verbindungen eine gegenüber dem korrespondierenden Methoxybenzamid-Derivat (**263**, EC₅₀ 12.1 nM) reduzierte Wirksamkeit.

Nicht alle, aber die meisten GPR35-Agonisten, die in der Literatur beschrieben wurden, weisen unter physiologischen Bedingungen eine negative Ladung auf. Um herauszufinden, ob die negative Ladung der Chromenoncarbonsäure-Derivate für die Rezeptor-Aktivierung eine Rolle spielt, wurde Verbindung **252**, ein Ethylester der potenten Verbindung **251** getestet. Beide Verbindungen waren mit einem EC₅₀-Wert von je 112 nM gleichermaßen wirksam. Dies ist überraschend, weil für die Ethylester anderer saurer GPR35 Agonisten gezeigt wurde, dass sie eine deutlich geringere Wirksamkeit aufweisen.^{473,495,506} Obwohl **252** und **251** ähnlich wirksam waren, war die Efficacy von **252** gegenüber **251** um 40 % reduziert, was dafür spricht, dass es sich bei **252** um einen Partialagonisten handelt. Es könnte also sein, dass die Carbonsäure bei dieser Verbindungsklasse nicht für die Wirksamkeit sondern für die intrinsische Aktivität eine

Rolle spielt. Wahrscheinlicher ist aber, dass der metabolisch instabile Ethylester während der 90-minütigen Inkubation mit den Zellen bei 37 °C gespalten wurde, z. B. durch Esterasen. Damit ist denkbar, dass **252** in **251** umgewandelt wurde, wodurch sich die tatsächliche Inkubationszeit mit dem entstandenen **251** verkürzt und dadurch ein geringeres Maximalsignal erreicht wurde. Da die Kurve keinen offensichtlichen biphasischen Verlauf hat, muss man in diesem Fall davon ausgehen, dass **252** gänzlich inaktiv ist. Jedoch zeigten der Ester und die Säure deutlich unterschiedliche Wirksamkeiten am Ratten-GPR35 (s. u.). Dies wiederum spricht dafür, dass der Ester nicht gespalten wird. Um Klarheit über die Rolle der negativen Ladung der Verbindungen zu erhalten, sollte ein metabolisch stabiles, ungeladenes Derivat synthetisiert werden. Dazu würde sich ein Amid anbieten. Dieses hätte eine ähnliche räumliche Ausdehnung wie die Carboxygruppe und könnte genau wie die Carboxygruppe als Wasserstoffbrückenakzeptor und -donator dienen.

Weiterhin wurden eine Reihe von Pranlukast-artigen Chromenoncarbonsäure-Derivaten getestet, die nicht gezielt für den hGPR35 synthetisiert und optimiert wurden (siehe Tabelle 5.12). Genau wie Pranlukast (**291**) selbst waren die Derivate **276-292** aber inaktiv. Während also das *para*-Methoxybenzamido-Derivat **246** eine relativ hohe Wirksamkeit besaß (EC_{50} 346 nM), wird eine Verlängerung des Alkoxy-Restes in *para*-Position nicht toleriert: Schon der Propoxy-Rest von **276** bewirkt, dass die Verbindung bei 10 μ M völlig inaktiv ist. Interessant sind dagegen Pranlukast-abgeleitete Chromenoncarbonsäure-Derivate dessen Amid-Linker gegen andere Linker ausgetauscht wurden. So stellten sich die Verbindung **293** (Sulfonamid-Linker, IC_{50} 266000 nM) und die Verbindung **294** (Harnstoff-Linker, IC_{50} 46600 nM) als schwache GPR35-Antagonisten heraus. Die Verbindung **295** (Thioharnstoff-Linker) ist dagegen inaktiv. Dies verdeutlicht erneut die schon eingangs diskutierte Notwendigkeit eines Wasserstoffbrücken-Akzeptors nahe der 8-Position der Chromenon-Kernstruktur. Bei dem entdeckten Antagonismus handelt es sich wahrscheinlich nicht um ein Artefakt, da sich in einem Einzelexperiment zeigte, dass die Verbindung in β -Arrestin-Rekrutierungsexperimenten am hGPR171 keine Verringerung des Lumineszenz-Signales bewirkte.

Tabelle 5.12: Wirksamkeit von Pramlukast-abgeleiteten Chromenon-Derivaten am GPR35



Verbindung	Struktur		β -Arrestin-Rekrutierungs-Experimente					
	R ¹	R ²	hGPR35		mGPR35		rGPR35	
			(% Effekt \pm SEM) ^a	IC ₅₀ \pm SEM (μ M) (% Inhib. \pm SEM) ^b	EC ₅₀ \pm SEM (μ M) (% Effekt \pm SEM) ^a	E _{max} ^a	EC ₅₀ \pm SEM (μ M) (% Effekt \pm SEM) ^c	E _{max} ^c
276	H	Propyl	(4 \pm 2)	(2 \pm 5)	(13 \pm 4)	-	3.61 \pm 0.38	80
277	H	Butyl	(8 \pm 5)	(-3 \pm 2)	(14 \pm 3)	-	(29 \pm 4)	-
278	H	Pentyl	(4 \pm 2)	(-1 \pm 6)	(16 \pm 2)	-	(31 \pm 1)	-
279	H	4-Methylpentyl	(1 \pm 2)	(1 \pm 4)	(18 \pm 4)	-	(20 \pm 3)	-
280	H	Heptyl	(0 \pm 4)	(2 \pm 2)	(18 \pm 4)	-	(6 \pm 3)	-
281	H	3,3-Dimethyl-2-oxobutyl	(7 \pm 7)	(-9 \pm 2)	(21 \pm 3)	-	3.88 \pm 0.45	68
282	H	Cyclopropylmethyl	(10 \pm 3)	(4 \pm 2)	(13 \pm 3)	-	(48 \pm 1)	-
283	H	2-Cyclohexylethyl	(10 \pm 8)	(3 \pm 6)	(17 \pm 4)	-	(19 \pm 3)	-
284	H	2-Phenylethyl	(26 \pm 3)	(-3 \pm 5)	(24 \pm 3)	-	2.45 \pm 0.38	94
285	H	3-Cyclohexylpropyl	(-8 \pm 9)	(15 \pm 2)	(24 \pm 4)	-	(3 \pm 2)	-
286	H	3-Phenylpropyl	(2 \pm 3)	(-1 \pm 7)	(39 \pm 5)	-	(22 \pm 2)	-
287	Cl	3-Phenylpropyl	(-3 \pm 2)	(10 \pm 3)	(11 \pm 3)	-	(17 \pm 2)	-
288	Br	3-Phenylpropyl	(6 \pm 4)	(10 \pm 3)	(14 \pm 3)	-	(16 \pm 2)	-
289	H	3-(4-Methoxyphenyl)-propyl	(2 \pm 3)	(17 \pm 3)	(26 \pm 4)	-	(15 \pm 1)	-
290	H	4-Phenylbutyl	(18 \pm 3)	(14 \pm 5)	(11 \pm 1)	-	(37 \pm 1)	-

Tabelle 5.12 (Fortsetzung)

291 , Pramlukast	(12 ± 2)	(12 ± 4)	(58 ± 1)	-	0.480 ± 0.036	100
292	(2 ± 5)	(-2 ± 3)	(32 ± 4)	-	(19 ± 2)	-
293	(-10 ± 4)	266 ± 49^d	(0 ± 3)	-	(-25 ± 3)	-
294	(-26 ± 11)	46.6 ± 3.5	5.85 ± 0.14	75	1.30 ± 0.09	85
295	(2 ± 3)	(- 2 ± 4)	(12 ± 2)	-	(11 ± 3)	-

^aVortestungen wurden bei einer Konzentration von 10 µM durchgeführt, Effekte wurden auf das Signal von 30 µM Zaprinast (entspricht dem Maximaleffekt) normalisiert.

^bInhibition des Effektes induziert durch 5 µM Zaprinast (~ EC₈₀).

^cVortestungen wurden bei einer Konzentration von 10 µM durchgeführt, Effekte wurden auf das Signal von 10 µM Zaprinast (entspricht dem Maximaleffekt) normalisiert.

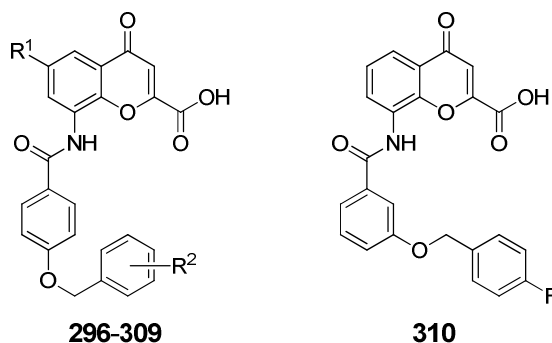
^dKurve wurde aufgrund mangelnder Löslichkeit der entsprechenden Verbindung bei hohen Konzentrationen extrapoliert.

Es stellte sich die Frage, ob die Verbindung aufgrund des veränderten Linkers und damit aufgrund der veränderten räumlichen Ausrichtung des proximalen Phenylrestes antagonistisch und nicht mehr agonistisch wirkt. Um diese Frage zu klären und in der Hoffnung, potentere Antagonisten zu erhalten, wurde die Synthese eines Derivates der para-Methoxybenzamidchromenoncarbonsäure **263** vorgeschlagen, bei dem der Amid-Linker wie bei **294** gegen einen Harnstofflinker ausgetauscht wurde. Die resultierende Verbindung **275** stellte sich jedoch als moderat wirksamer Agonist heraus (EC₅₀ 458 nM). Damit scheint der 4-Phenylbutoxy-Rest von **294** ursächlich für den Antagonismus der Verbindung. Wahrscheinlich blockierte dieser Rest die bei der Aktivierung auftretende Konformationsänderung des Rezeptors. Obwohl es nicht selbstverständlich ist, so ist doch anzunehmen, dass man die Wirksamkeit dieses Antagonisten durch die 6-Bromierung wie bei den Agonisten (vgl. **274** und **275**) weiter steigern kann. Außerdem wären weitere Variationen dieser möglichen neuen Leitstruktur für Antagonisten interessant.

Weiterhin wurde eine Serie von Benzyloxobenzamidochromenoncarbonsäure-Derivaten getestet (**296-310**, Tabelle 5.13). Außer **305** und **307**, bei denen es sich um moderate Agonisten handelte, waren die meisten Verbindungen nahezu inaktiv. Beide Verbindungen weisen an ihrer distalen aromatischen Ringstruktur einen *para*-Fluor-Substituenten auf. Analoge Verbindungen mit einem Brom-Atom in der *para*-Position waren deutlich weniger wirksam. Es ist unklar, ob dies an dem größeren Volumen oder der geringeren Elektronegativität des Brom-Substituenten im Vergleich zum Fluor-Substituenten liegt. Wie schon für zahlreiche der anderen Chromenon-Derivate konnte

auch für diese Serie von Verbindungen gezeigt werden, dass ein 6-Brom-Substituent (**307**, EC_{50} 4110 nM) etwas günstiger war, als ein 6-Chlor-Substituent (**305**, EC_{50} 7080 nM).

Tabelle 5.13: Wirksamkeit von Benzyloxobenzamidchromenon-Derivaten am GPR35



Verbindung	Struktur				β -Arrestin-Rekrutierungs-Experimente					
	R ¹	R ²			hGPR35			mGPR35	rGPR35	
		<i>o</i>	<i>m</i>	<i>p</i>	$EC_{50} \pm SEM$ (μ M) (% Effekt \pm SEM) ^a	E_{max} ^a	(% Inhib. \pm SEM) ^b	(% Effekt \pm SEM) ^a	$EC_{50} \pm SEM$ (μ M) (% Effekt \pm SEM) ^c	E_{max} ^c
296	H	H	H	H	(9 \pm 4)	-	(2 \pm 3)	(34 \pm 3)	(47 \pm 2)	-
297	H	F	H	H	(12 \pm 5)	-	(14 \pm 3)	(9 \pm 3)	(43 \pm 4)	-
298	H	H	F	H	(9 \pm 2)	-	(14 \pm 7)	(26 \pm 4)	(40 \pm 2)	-
299	H	H	H	F	(10 \pm 2)	-	(0 \pm 1)	(38 \pm 2)	(39 \pm 4)	-
300	H	H	H	Cl	(9 \pm 5)	-	(8 \pm 4)	(33 \pm 4)	(21 \pm 3)	-
301	H	H	H	Br	(6 \pm 1)	-	(1 \pm 2)	(38 \pm 1)	(21 \pm 3)	-
302	H	H	H	CH ₃	(25 \pm 6)	-	(12 \pm 2)	(23 \pm 5)	(31 \pm 2)	-
303	H	H	H	CF ₃	(3 \pm 2)	-	(1 \pm 2)	(35 \pm 2)	(5 \pm 2)	-
304	F	H	H	F	(18 \pm 5)	-	(9 \pm 4)	(11 \pm 3)	5.75 \pm 0.52	70
305	Cl	H	H	F	7.08 \pm 2.21	73	-	(9 \pm 1)	(48 \pm 1)	-
306	Cl	H	H	Br	(-3 \pm 3)	-	(8 \pm 5)	(28 \pm 3)	(24 \pm 4)	-
307	Br	H	H	F	4.11 \pm 1.04	89	-	(11 \pm 4)	(36 \pm 2)	-
308	Br	H	Br	H	(36 \pm 3)	-	(-6 \pm 6)	(26 \pm 2)	(30 \pm 2)	-
309	Br	H	H	Br	(11 \pm 4)	-	(5 \pm 2)	(31 \pm 5)	(28 \pm 3)	-
310					(31 \pm 1)	-	(4 \pm 4)	(6 \pm 1)	(31 \pm 5)	-

^aVortestungen wurden bei einer Konzentration von 10 μ M durchgeführt, Effekte wurden auf das Signal von 30 μ M Zaprinast (entspricht dem Maximaleffekt) normalisiert.

^bInhibition des Effektes induziert durch 5 μ M Zaprinast ($\sim EC_{80}$).

^cVortestungen wurden bei einer Konzentration von 10 μ M durchgeführt, Effekte wurden auf das Signal von 10 μ M Zaprinast (entspricht dem Maximaleffekt) normalisiert.

Es fällt außerdem auf, dass es sich bei diesen Verbindungen eher um Partialagonisten handelt. Möglicherweise sind die anderen Verbindungen der Serie ähnlich wirksame Verbindungen, die jedoch eine geringere Efficacy aufweisen.

Zusammenfassend konnte gezeigt werden, dass es gelang, diese Verbindungsklasse stetig weiter zu optimieren (siehe auch Abbildung 5.9 und Abbildung 5.10): Die Wirksamkeit der praktisch inaktiven Chromen-4-on-2-carbonsäure **232** konnte durch den über einen Amid-Linker in 8-Position eingeführten Phenylrest deutlich erhöht werden (**238**, EC_{50} 4910 nM). Sowohl die 6-Brom-Substitution an der Chromenon-Kernstruktur (**257**, EC_{50} 303 nM), wie auch die Einführung einer Methoxy-Gruppe in der para-Position des Phenylrings (**246**, EC_{50} 346 nM) führte zur einer weiteren Erhöhung der Wirksamkeit der entsprechenden Verbindungen. Die Kombination beider Substituenten hatte additive Effekte auf die Wirksamkeit und resultierte in einer Verbindung mit einem EC_{50} -Wert von 12.1 nM (**263**). Außerdem hatten auch Chlor-Substituenten am Phenylring der 8-Benzamidochromenon-Derivate einen deutlichen positiven Einfluss auf die Wirksamkeit der entsprechenden Verbindungen: Die *para*-Chlor-substituierte Verbindung hatte einen EC_{50} -Wert von 25.1 nM und durch einen zusätzlichen Chlorsubstituenten in *ortho*- (**260**, EC_{50} 16.4 nM) oder in *meta*-Position (**261**, EC_{50} 15.4 nM) konnte die Wirksamkeit noch weiter leicht gesteigert werden. Angefangen mit der ersten Leitstruktur (**143**, EC_{50} 46300 nM) bis hin zur Verbindung **263** (EC_{50} 12.1 nM) bzw. **269** (EC_{50} 11.1 nM) konnte die Wirksamkeit der Verbindungen schrittweise um mehr als den Faktor 3800 gesteigert werden (**263** erhielt den Namen PSB-13253). Damit handelte es sich bei PSB-13253 (**263**) und **269** um die zum Zeitpunkt ihrer Publikation durch unsere Gruppe potentesten Agonisten des hGPR35.⁵²⁰

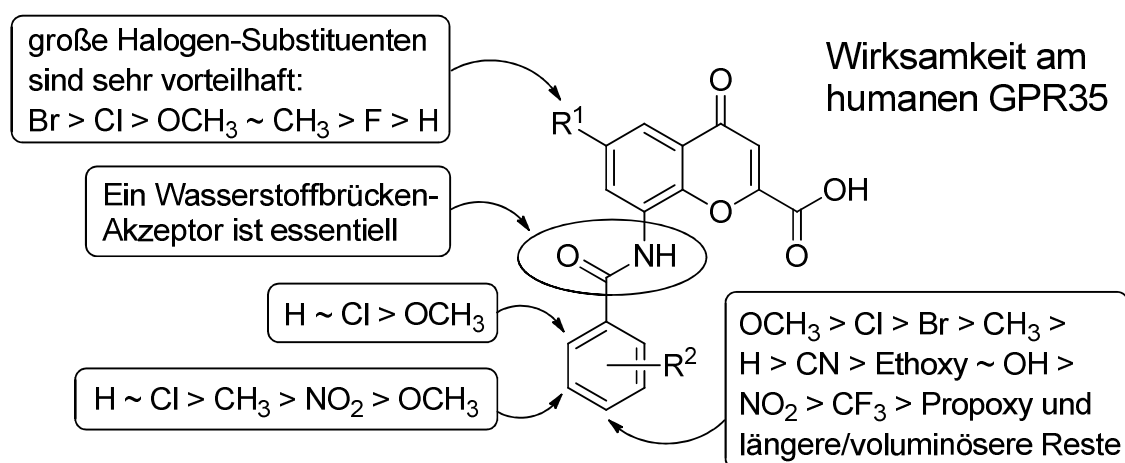


Abbildung 5.9: Zusammenfassung der Struktur-Wirkungs-Beziehungen am hGPR35.

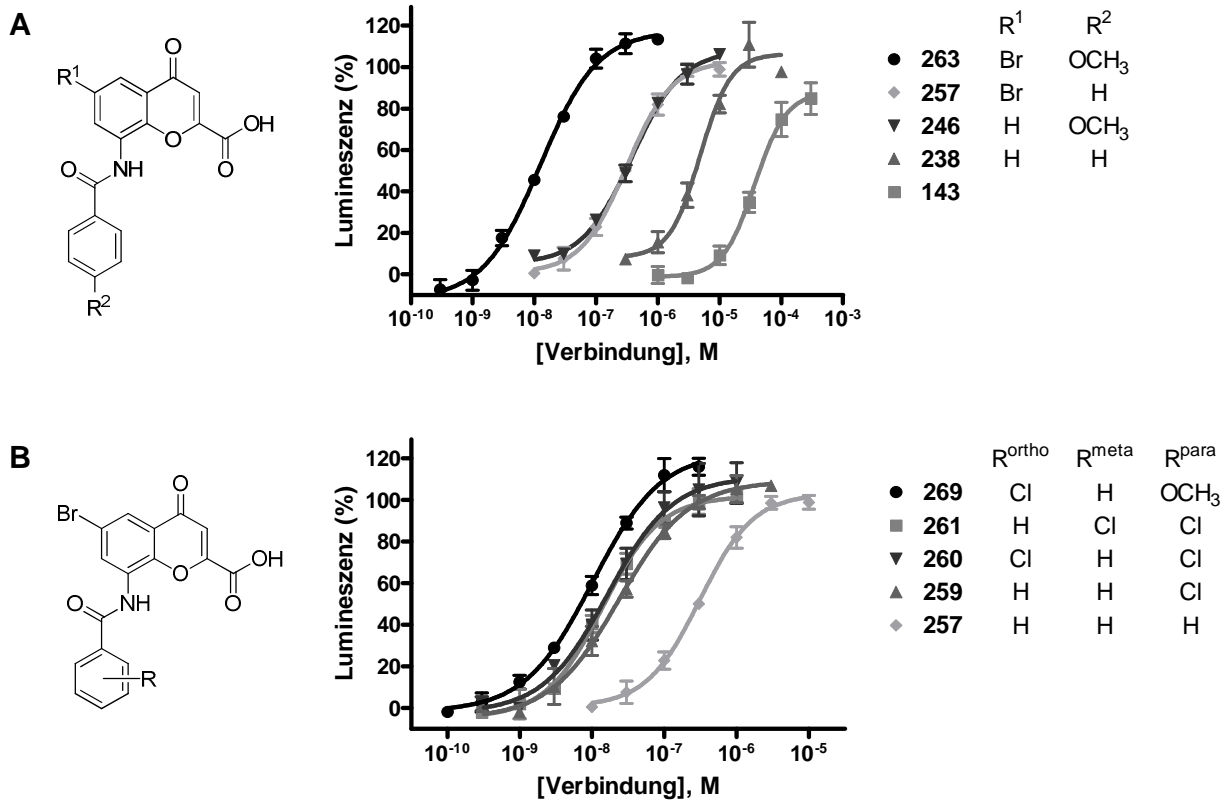


Abbildung 5.10: Konzentrations-Wirkungskurven von Benzamidchromenoncarbonsäure-Derivaten am humanen GPR35

(A, B) Konzentrations-Wirkungskurven von ausgewählten, schrittweise optimierten Verbindungen am humanen GPR35. Die Wirksamkeit der Verbindungen wurde in funktionellen β -Arrestin-Rekrutierungsexperimenten bestimmt. Dargestellt sind die Mittelwert \pm Standardfehler aus drei bis vier unabhängigen Experimenten.

5.2.4.2 Inhibition der PSB-13253-vermittelten Rezeptor-Aktivierung durch bekannte Antagonisten des humanen GPR35

Um die Spezifität des optimierten hGPR35-Agonisten PSB-13253 zu überprüfen, wurden Experimente mit bekannten hGPR35-Antagonisten durchgeführt. Dabei wurden Konzentrations-Wirkungskurven von PSB-13253 in Ab- und Anwesenheit unterschiedlicher Konzentrationen der Antagonisten CID 2745687 (**114**) und ML 145 (**116**) aufgenommen. Wie in Abbildung 5.11 dargestellt, waren beide Antagonisten in der Lage, die Konzentrations-Wirkungskurve von PSB-13253 nach rechts zu verschieben (EC₅₀-Werte siehe Tabelle 5.14). Daher kann davon ausgegangen werden, dass PSB-13253 an die gleiche Bindungstasche bindet wie beide Antagonisten. Ginge man von einem kompetitiven Antagonismus aus, könnte man pA₂-Werte bestimmen, die für beide Antagonisten ähnlich hoch ausfallen würden (siehe Tabelle 5.14).

Interessanterweise kann aber zumindest für ML 145 bei der Konzentration von 5 μM auch eine Verringerung der Efficacy von PSB-13253 beobachtet werden. Dies spricht dafür, dass der Antagonist einen dualen Wirkmechanismus besitzt: Während er in niedrigen Konzentrationen die Aktivierung des Rezeptors durch PSB-13253 kompetitiv zu hemmen scheint, kommt es bei höheren Konzentrationen zusätzlich zu einer nicht-kompetitiven Hemmung. Möglicherweise bindet der Antagonist also an zwei verschiedene Bindungsstellen des Rezeptors. Eine andere Gruppe fand dagegen, dass CID 2745687 gegen Pamoasäure einen nicht-kompetitiven Hemmmechanismus aufweist, während die Aktivierung durch Zaprinast und Cromoglicinsäure rein kompetitiv gehemmt wird.⁴⁸⁵ Somit scheint der Hemmmechanismus Agonist-abhängig zu sein. Dies deutet auch darauf hin, dass die orthosterische Bindungstasche des Rezeptors in unmittelbarer Nähe zu einer allosterischen Bindungstasche liegen könnte, die beide durch die Antagonisten adressiert werden. Ob es zu einer allosterischen Modulation kommt, scheint wiederum von dem Bindungsmodus des entsprechenden Agonisten abzuhängen.

Tabelle 5.14: Verschiebung der Konzentrations-Wirkungskurven von PSB-13253 am humanen GPR35 durch ausgewählte GPR35-Antagonisten

Verbindung	β -Arrestin-Experimente, $\text{EC}_{50} \pm \text{SEM}$ (nM)					pA_2^{a}
	ohne Antagonist	+ Antagonist-Konzentration 1 ^b	„Shift“ ^c	+ Antagonist-Konzentration 2 ^b	„Shift“ ^c	
114 , CID 2745687	12.1 \pm 0.09	39.4 \pm 6.3	3	404 \pm 48	33	7.07
116 , ML 145	13.8 \pm 0.06	65.5 \pm 6.3	5	630 \pm 86	46	(7.06)

^aDer pA_2 -Wert wurde auf der Basis des Schild-Modells bestimmt.

^bAntagonisten-Konzentrationen: CID 2745687, Konzentration 1: 0,3 μM , Konzentration 2: 3 μM ; ML 145, Konzentration 1: 0,5 μM , Konzentration 2: 5 μM .

^cDer „Shift“ beschreibt die Verschiebung der Agonist-Kurve und ist der Quotient aus EC_{50} in Anwesenheit des Antagonisten und EC_{50} in Abwesenheit des Antagonisten.

Zu diesen Ergebnissen muss jedoch einschränkend gesagt werden, dass die zur Darstellung übliche Hintergrundkorrektur ein möglicherweise verfälschtes Bild der Daten liefert. Tatsächlich sind bei höheren Konzentrationen nicht nur die oberen Plateaus, sondern auch die unteren Plateaus nach unten verschoben. Wie schon am Anfang dieses Kapitels erwähnt wurde, bewirken die Antagonisten einen Abfall des Lumineszenzsignals unter den Hintergrundwert. Es sind also beide Plateaus nach unten verschoben, wodurch die Amplitude des Effektes etwa gleich bleibt. Dies erschwert die Interpretation der Daten, da nach wie vor unklar ist, wodurch der Abfall unter den

Hintergrundwert zustande kommt. Um eine gesicherte Aussage über den Hemmmechanismus von ML 145 gegen PSB-13253 zuzulassen, wären daher Experimente in einem experimentellen System ohne hohe Grundaktivität bzw. Grundaktivierung des Rezeptors interessant. Dennoch belegen diese Experimente, dass die durch PSB-13253 induzierten Lumineszenz-Signale auf die Aktivierung des hGPR35 zurückgehen müssen und nicht unspezifisch sind.

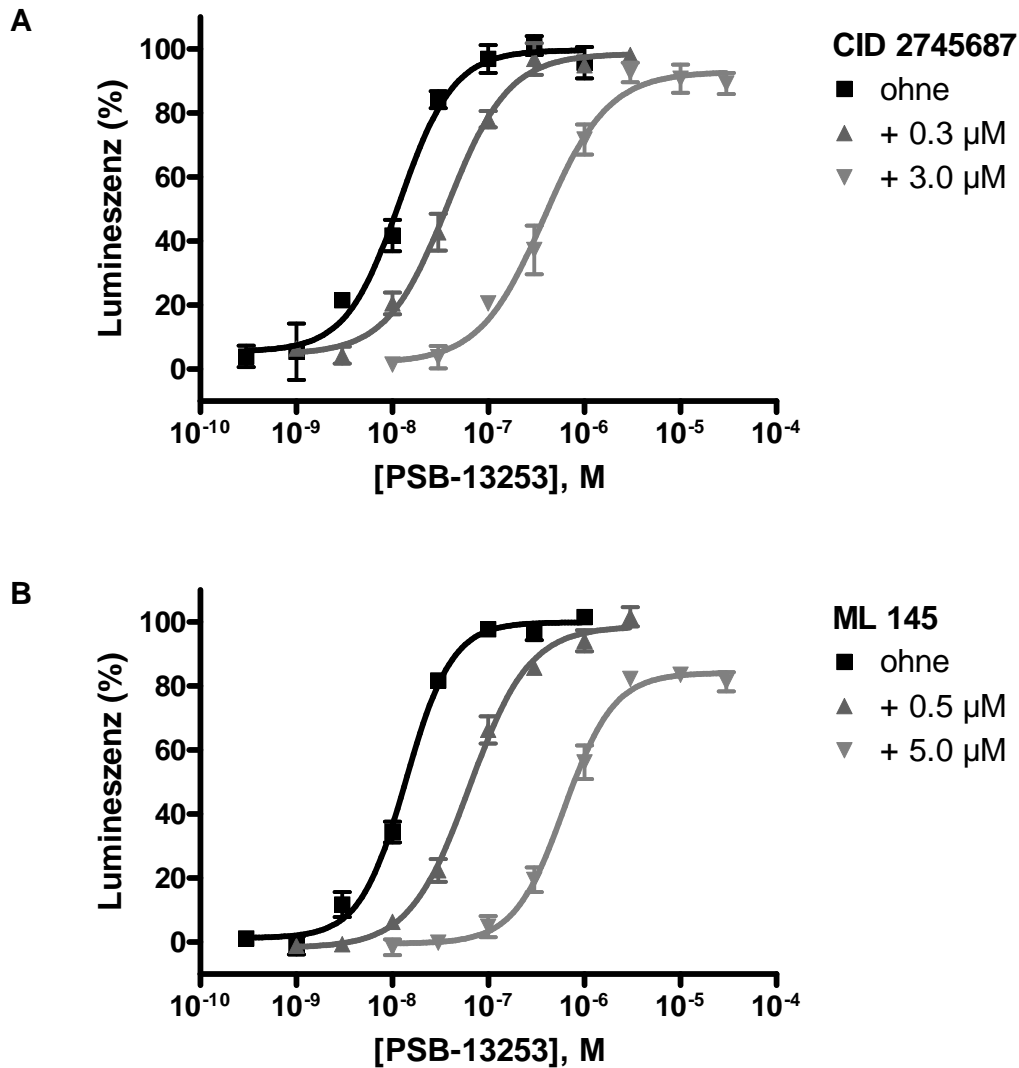


Abbildung 5.11: Verschiebung der Konzentrations-Wirkungskurve von PSB-13253 am humanen GPR35 durch Standardantagonisten

Dazu wurden (A) CID 2745687 und (B) ML 145 eingesetzt. Die Wirksamkeit von PSB-13253 wurde in funktionellen β -Arrestin-Rekrutierungsexperimenten bestimmt. Dargestellt sind die Mittelwerte \pm Standardfehler aus drei bis vier unabhängigen Experimenten, die in Duplikaten durchgeführt wurden.

5.2.4.3 Untersuchungen am humanen GPR35b-Isotyp

Für Menschen wurden zwei Isotypen des GPR35 beschrieben: Der hauptsächlich untersuchte GPR35a (für den es zur Konvention wurde, den Buchstaben-Zusatz in der Regel nicht zu nennen) und den weniger gut untersuchten GPR35b. Das GPR35b-Rezeptor-Protein weist einen um 31 Aminosäuren verlängerten N-Terminus auf, ist in seiner Sequenz ansonsten aber identisch zum GPR35.⁴⁶⁹ Um diesen zweiten Isotyp des Rezeptors untersuchen zu können, wurde seine DNA-Sequenz in das Plasmid pCMV-ARMS2-PK2 eingebracht (womit dieser Isotyp den gleichen ProLink™-„Tag“ erhielt wie der zuvor untersuchte Isotyp). Eine spezielle Mutterzelllinie (PathHunter[®], DiscoverRx) wurde mit diesem Konstrukt transfiziert, wodurch ein Testsystem zur Durchführung von β -Arrestin-Rekrutierungs-Experimenten geschaffen wurde, das komplett analog zu dem zuvor für den anderen Isotyp genutzten System war. Zaprinast und eine Reihe ausgewählter Chromenon-Derivate wurden am GPR35b getestet (siehe Tabelle 5.15).

Tabelle 5.15: Wirksamkeit von 8-Benzamidochromenon-Derivaten am humanen GPR35b

Verbindung	β -Arrestin-Rekrutierungs-Experimente	
	EC ₅₀ \pm SEM (μ M) ^a	E _{max} ^a
30, Zaprinast	2.24 \pm 0.47 ^{ns}	100
246	0.472 \pm 0.057 ^{ns}	115
247	0.678 \pm 0.100 ^{ns}	113
248	0.873 \pm 0.100 [*]	104
249	0.0205 \pm 0.0010 ^{ns}	110
250	0.106 \pm 0.004 ^{ns}	136
251	0.143 \pm 0.028 ^{ns}	113
256	0.0286 \pm 0.0041 ^{ns}	125
258	0.699 \pm 0.061 ^{ns}	111
259	0.0405 \pm 0.0092 ^{ns}	130
260	0.0346 \pm 0.0093 ^{ns}	116
261	0.0272 \pm 0.0054 ^{ns}	109
263	0.0221 \pm 0.0036 ^{ns}	136
267	0.628 \pm 0.047 ^{ns}	101
268	0.128 \pm 0.025 ^{ns}	118
269	0.0147 \pm 0.0014 ^{ns}	129

^aErgebnisse eines zweiseitigen t-Tests: ^{ns}nicht signifikant unterschiedlich vom humanen GPR35, ^{*}p>0.05

^bEffekte wurden auf das Signal von 30 μ M Zaprinast (entspricht dem Maximaleffekt) normalisiert.

Die Wirksamkeit fast aller getesteten Verbindungen an diesem Isotyp unterschied sich nicht signifikant von der zuvor am kürzeren Isotyp bestimmten Wirksamkeit. Auch andere Gruppen, die beide Isotypen untersuchten, konnten keine Unterschiede zwischen ihren jeweiligen pharmakologischen Profilen erkennen.^{482,483,498}

Die physiologische Rolle des GPR35b ist unklar. Jedoch wurde zuvor vorgeschlagen, dass es sich dabei um ein Vorläufer-Protein handeln könnte, das nach Abspaltung des N-Terminus in seine „aktive“ Form überführt wird.⁴⁶⁹ Man würde allerdings erwarten, dass sich beide Isotypen in diesem Falle pharmakologisch klar voneinander unterscheiden. Obwohl sich die EC_{50} -Werte am hGPR35 und hGPR35b nicht unterscheiden, konnte festgestellt werden, dass die absolute Signalhöhe beim GPR35b-Isotyp geringer ausfällt. Eine ähnliche Beobachtung wurde von einer anderen Gruppe auch bei BRET-basierten β -Arrestin-Rekrutierungs-Experimenten gemacht.⁴⁹⁸ Man könnte also die Hypothese aufstellen, dass der GPR35b einen Rezeptor mit geringer Efficacy darstellt – gewissermaßen ein partial-aktivierbarer Rezeptor. Allerdings ist davon auszugehen, dass die absolute Signalhöhe sehr eng mit der Rezeptordichte korreliert. Da die erworbenen GPR35-Zellen auf eine hohe Expression hin selektioniert wurden, dies bei der selbst hergestellten GPR35b-Zelllinie aber nicht der Fall war, ist die Beobachtung zur unterschiedlichen Signalhöhe daher nicht verwunderlich. In der genannten Publikation wurde die Expression der beiden Rezeptor-Isotypen nicht untersucht.⁴⁹⁸ Die Hypothese könnte am besten dadurch überprüft werden, dass eine Zelllinie eingesetzt wird in der der hGPR35b zur Expression gebracht wurde. Vor einigen Experimenten könnte der N-Terminus des hGPR35b enzymatisch abgespalten werden um den GPR35b in den GPR35 umzuwandeln. Theoretisch müssten dann vergleichbare Rezeptordichten vorliegen (sofern der N-Terminus die Oberflächenexpression nicht direkt beeinflusst). Dem abgespaltenen N-Terminus selbst könnte auch eine physiologische Rolle zum Beispiel als Signalpeptid zukommen. Solche Signalpeptide kommen häufig bei GPCRs der Klasse B vor, wurden aber auch für GPCRs der Klasse A vorgeschlagen.²⁶⁸

Interessanterweise wurde der GPR35b bislang nur auf mRNA-Ebene, aber nie auf Proteinebene nachgewiesen.⁴⁶⁹ Möglicherweise wird die GPR35b-mRNA zumindest teilweise in den GPR35 übersetzt, da das Startcodon des GPR35 in der GPR35b-Sequenz mit vorgeschalteter Kozak-Sequenz enthalten ist. Bei diesem als „leaky scanning“ bekannten Vorgang werden solche alternativen Startcodons genutzt. Möglicherweise existiert der GPR35b auf Proteinebene überhaupt nicht und das veränderte 5'-Ende der GPR35b-mRNA dient nicht der Translation sondern der

Regulation (z. B. der Expression). In der Zukunft wäre es daher interessant zu untersuchen, ob der GPR35b tatsächlich auf Proteinebene existiert und zu überprüfen, ob und unter welchen Umständen der N-Terminus der Verbindung abgespalten wird.

5.2.4.4 Spezies-Selektivität

Um die Spezies-Selektivität der Chromenoncarbonsäure-Derivate zu untersuchen, wurden wie schon für den hGPR35b Zelllinien hergestellt, anhand derer die Durchführung von β -Arrestin-Rekrutierungs-Experimenten am Maus- und Ratten-GPR35 (mGPR35 und rGPR35) ermöglicht wurden. Zunächst wurde das β -Lactamase-Enzymfragment an beide Nagerrezeptoren über den gleichen Linker (ARMS2-PK2) angefügt, wie es bei dem hGPR35 und hGPR35b der Fall war. Da das Signal:Hintergrund-Verhältnis bei dem Ratten-Rezeptor mangelhaft war, wurden für diesen Rezeptor vier Zelllinien erstellt, bei dem der Rezeptor mit je einem anderen Linker versehen wurde (PK1, PK2, ARMS1-PK2 und ARMS2-PK2). Der direkte Vergleich zeigte, dass nur durch den Einsatz des ARMS1-PK2-Linkers ein befriedigendes Signal:Hintergrund-Verhältnis erhalten werden konnte. Daher wurde die entsprechende Zelllinie für die Untersuchungen verwendet.

In Tabelle 5.10, Tabelle 5.11, Tabelle 5.12 und Tabelle 5.13 sind die Ergebnisse der Untersuchungen an den Nagerrezeptoren angegeben. Bei den meisten Verbindungen schien es sich auch an den Nagerrezeptoren um Agonisten zu handeln. Allerdings war ihre Wirksamkeit an den murinen Rezeptoren meist deutlich geringer als am humanen GPR35. Außerdem lag die ausgelöste Maximalantwort der Verbindungen für die eine Konzentrations-Wirkungskurve bestimmt wurde häufig unter der von Zaprinast. Damit scheint es sich bei den meisten Verbindungen an den murinen Rezeptoren um Partialagonisten zu handeln.

Am GPR35 der Maus bewirkten lange und voluminöse Substituenten die über einen Amid-Linker in 8-Position an die Chromenon-Kernstruktur angefügt wurden (wie 2-Naphthyl bei **240**, EC_{50} 2990 nM und 2-Chinolinyll bei **241**, EC_{50} 3590 nM) einen deutlichen Anstieg der Wirksamkeit im Vergleich zu simpleren Derivaten wie der 8-Amino-substituierten Verbindung **143**. Hier gibt es Parallelen zu den Struktur-Wirkungs-Beziehungen am humanen Rezeptor. Allerdings wirkten sich nur bicyclische Substituenten oder sehr wenige substituierte Phenyl-Substituenten vorteilhaft auf die Wirksamkeit aus. Die aktiven Verbindungen mit letzteren Substituenten waren **246** (*p*-Methoxyphenyl, EC_{50} 5030 nM), **265** (*p*-Hydroxyphenyl kombiniert mit 6-Brom-

Substitution, EC₅₀ 1070 nM), **266** (*o*-Methoxyphenyl kombiniert mit 6-Brom-Substitution, EC₅₀ 4950 nM) und **267** (*m,p*-Methoxyphenyl kombiniert mit 6-Brom-Substitution, EC₅₀ 6400 nM). Im Gegensatz zu den Beobachtungen am humanen Rezeptor bewirkte die Chlorsubstitution in verschiedenen Positionen des Phenylrings des 8-Benzamid-Restes keine Wirksamkeitssteigerung der Verbindungen. Besonders interessant ist **265**, da es aus der Reihe der getesteten Verbindungen den wirksamsten Agonisten am mGPR35 darstellt. Während also die Einführung der polaren Hydroxy-Gruppe in *para*-Position für die Wirksamkeit am Rezeptor der Maus sehr vorteilhaft erschien, ist am humanen Rezeptor das genaue Gegenteil der Fall. Dagegen war die am humanen Rezeptor vorteilhafte Einführung eines unsubstituierten Benzamid-Restes in 8-Position (**238**) für die Wirksamkeit der Verbindung am mGPR35 nicht vorteilhaft.

Ein weiterer großer Unterschied in den Struktur-Wirkungs-Beziehungen zwischen mGPR35 und hGPR35 ist die Tatsache, dass Halogen-Substituenten in 6-Position am Rezeptor der Maus eine Verringerung der Wirksamkeit herbeiführen. Dies erkennt man beim Vergleich des 6-unsubstituierten *p*-Methoxybenzamido-Derivats **246** (EC₅₀ 5030 nM) mit den entsprechenden halogenierten Analogen **251** (6-F), **256** (6-Cl), **263** (6-Br) (EC₅₀ > 10000 nM). Im Gegensatz dazu schien sich ein 6-Brom-Substituent (**275**, 6-Br, EC₅₀ 3050 nM; **274**, 6-H, EC₅₀ 5490 nM) interessanterweise eher positiv auszuwirken, wenn der Amid-Linker von **246** bzw. **263** gegen einen Harnstoff-Linker (**274** und **275**) ausgetauscht wurde. Dies lässt darauf schließen, dass der Linker Einfluss darauf nimmt, wie die Liganden in der Bindungstasche des mGPR35 liegen. Der Austausch des *p*-Methoxy-Rest von **274** gegen einen 4-Phenylbutyl-Rest (**294**, EC₅₀ 5850 nM) wird sehr gut toleriert. **294** ist ein Agonist am mGPR35, während es am humanen Rezeptor antagonistisch wirkt. Dies ist ein weiterer der vielen Unterschiede zwischen dem humanen und dem Maus-Rezeptor.

Der Austausch des *p*-Methoxy-substituierten Phenylrings **246** (kombiniert mit 6-Br, EC₅₀ > 10000 nM) gegen einen entsprechenden 3-Pyridyl-Rest (**273**, kombiniert mit 6-Br, EC₅₀ 4980 nM) stellte sich am mGPR35 als vorteilhaft heraus. Der Austausch gegen einen entsprechenden 2-Pyridyl-Rest (**272**) bewirkte dagegen keinen Anstieg der Wirksamkeit. Obwohl die getesteten Pranlukast-abgeleiteten Chromenon-Derivate am mGPR35 inaktiv waren, deutet der Vergleich von Pranlukast (**291**, EC₅₀ ~ 10000 nM) mit dem analogen Carbonsäure-Derivat **290** (EC₅₀ >> 10000 nM) darauf hin, dass ein Tetrazolyl-Rest in 2-Position der Chromenon-Grundstruktur wahrscheinlich günstiger ist als eine Carboxy-Gruppe (siehe Tabelle 5.12Tabelle 5.12). Unter den getesteten

Bezyloxobenzamid-chromenon-Derivaten (Tabelle 5.13) befand sich kein potenter mGPR35-Agonist.

Für den GPR35 der Ratte zeigte sich wie schon für die anderen Orthologen, dass Chromenon-Derivate mit kleinen Substituenten in der 8-Position (wie z. B. **232**, 8-Amino) nur eine sehr geringe Wirksamkeit aufwiesen. Ähnlich wie bei dem humanen Rezeptor konnte die Wirksamkeit deutlich durch einen über einen Amid-Linker in 8-Position eingeführten Cyclohexylrest gesteigert werden. Aromatische Reste in der gleichen Position (Phenyl- bei **238**, Benzyl bei **239**, 2-Naphtyl bei **240** oder 2-Chinolinyl bei **241**, EC_{50} je > 10000 nM) führten dagegen nicht zu einer deutlichen Steigerung der Wirksamkeit. Darin unterschieden sich die Struktur-Wirkungs-Beziehungen des rGPR35 vom hGPR35 (an dem sich jeder der genannten Reste günstig auswirkte) und vom mGPR35 (an dem zumindest die bicyclischen Reste einen positiven Einfluss auf die Wirksamkeit hatten). Während also die Verbindung mit unsubstituiertem Benzamid-Rest in 8-Position (**238**) ähnlich schwach wirksam war wie das 8-Amino-Derivat (**143**), konnte eine Erhöhung der Wirksamkeit durch unterschiedliche Substitutionen am Phenylrest von **238** beobachtet werden. So resultierte aus einer *p*-Methoxy-Substitution eine erhöhte Wirksamkeit der entsprechenden Verbindung (**246**, EC_{50} 2160 nM). Diese Beobachtung konnte also für alle drei orthologen Rezeptoren gemacht werden. Neben einem Methoxy-Rest wurden in der *para*-Position im Vergleich zu den entsprechenden unsubstituierten Derivaten auch Nitro- (kombiniert mit 6-Cl, **255**, EC_{50} 3140 nM) und Cyano-Substituenten toleriert (kombiniert mit 6-Br, **262**, EC_{50} 2260 nM). Weniger günstig erschien dagegen ein Methyl- (**244**) oder Trifluormethyl-Substituent (**245**) in *para*-Position. Die Einführung einer Hydroxy-Funktion in *para*-Position (**265**) führte ähnlich wie beim mGPR35 zu einem deutlichen Anstieg der Wirksamkeit (EC_{50} 349 nM), was **265** nicht nur zum potentesten rGPR35-Agonisten unter den Benzamid-Derivaten sondern unter allen getesteten Chromenon-Derivaten machte. Der Vergleich aller Chlor-substituierten Benzamid-Derivate zeigte, dass vor allem ein Chlorsubstituent in *meta*-Position eine Steigerung der Wirksamkeit bewirkt. Man muss allerdings anmerken, dass die Wirksamkeits-Unterschiede zwischen den unterschiedlich substituierten Benzamid-Derivaten relativ gering sind.

Der Austausch des bioisosteren Phenylrings von **263** (EC_{50} 1400 nM) gegen einen 2-Pyridyl- (**272**, EC_{50} 1540 nM) bzw. 3-Pyridyl-Rest (**273**, EC_{50} 991 nM) wurde gut toleriert. Es ergibt sich hier also ein ähnliches Bild wie an dem mGPR35. Es gibt aber auch einige Struktur-Wirkungs-Beziehungen, die nur auf den Ratten-Rezeptor zutreffen: Halogen-Substituenten in 6-Position der Chromenon-Kernstruktur, die sehr vorteilhaft am

humanen Rezeptor, jedoch nachteilig am Maus-Rezeptor sind, haben kaum einen Einfluss auf die Wirksamkeit der Verbindungen am GPR35 der Ratte: So weisen beispielsweise die *p*-Methoxybenzamido-Derivate **246** (6-H, EC₅₀ 2160 nM), **251** (6-F, EC₅₀ 1760 nM), **256** (6-Cl, EC₅₀ 1830 nM) und **263** (6-Br, EC₅₀ 1400 nM) sehr ähnliche EC₅₀-Werte auf.

Der Austausch des Amid-Linkers der *p*-Methoxybenzamid-Derivate **246** (6-H, EC₅₀ 2160 nM) bzw. **263** (6-Br, EC₅₀ 1400 nM) gegen einen Harnstoff-Linker (**274**, 6-H, EC₅₀ 677 nM bzw. **275**, 6-Br, EC₅₀ 729 nM) wirkte sich positiv auf die Wirksamkeit der Verbindungen aus. Da der Phenyl-Ring in diesen Verbindungen eine andere räumliche Ausrichtung als in den Benzamid-Derivaten hat ist davon auszugehen, dass die für die Benzamid-Derivate beobachteten Struktur-Wirkungs-Beziehungen nicht auf diese Verbindungen übertragbar sind. Es wäre interessant zu untersuchen, ob andere Substitutionsmuster des Phenylrestes zu einer weiteren Steigerung der Wirksamkeit führen können. Bei der am humanen GPR35 als Antagonist identifizierten Verbindung **294** handelt es sich wie am mGPR35 auch am rGPR35 um einen Agonisten. Eine Verlängerung des *para*-Substituenten des proximalen Phenylrestes wie man sie bei **294** findet (*p*-4-Phenylbutoxy, EC₅₀ 1300 nM) erscheint im Vergleich zu **274** (*p*-Methoxy, EC₅₀ 677 nM) nicht als vorteilhaft.

Im Gegensatz zum humanen Rezeptor werden am Ratten-Rezeptor auch größere *para*-Substituenten bei den Benzamid-Derivaten toleriert. So weist das *p*-Ethoxy-Derivat **264** (6-Br, EC₅₀ 1360 nM) einen ähnlichen EC₅₀-Wert auf, wie das *p*-Methoxy-Derivat **263** (6-Br, EC₅₀ 1400 nM). Während auch ein *p*-Propoxy-Rest (**276**, 6-H, EC₅₀ 3610 nM im Vergleich zu **246**, 6-H, *p*-Methoxy, EC₅₀ 2160 nM) toleriert wird, resultiert aus der weiteren Verlängerung der Alkoxy-Kette eine Wirksamkeits-Verringerung der entsprechenden Verbindung (z. B. **277**, 6-H, *p*-Butoxy, EC₅₀ > 10000 nM). Der Vergleich von Pramlukast (**291**, EC₅₀ 480 nM) mit seinem Carbonsäure-Analog **290** (EC₅₀ >10000 nM) ist sehr aufschlussreich. Ein Tetrazolyl-Rest in 2-Position der Chromenon-Kernstruktur scheint die Wirksamkeit der Verbindung wie beim Maus-Rezeptor drastisch zu steigern. Interessanterweise gehört Pramlukast unter den Chromenon-Derivaten auch zu den wenigen Vollagonisten am rGPR35.

Obwohl die getesteten Verbindungen an den murinen Rezeptoren im Vergleich zum humanen Rezeptor meist deutlich geringere Wirksamkeiten aufwiesen, konnten doch einige günstige Substitutionsmuster identifiziert werden, die größtenteils identisch für beide murinen Rezeptoren sind. Dazu gehörte die unsubstituierte Position 6 (gilt nur für

mGPR35) sowie die Einführung eines Tetrazolyl-Restes in Position 2 und eines 3-Pyridylamid-Substituenten in 8-Position der Chromenon-Grundstruktur. Außerdem erwies sich für den Maus-Rezeptor eine Methoxy-Gruppe in *ortho*- und *meta*-, sowie für den Rattenrezeptor ein Chlorsubstituent in *meta*-Position eines 8-Benzamid-Restes als günstig. An beiden Rezeptoren stellte eine Hydroxyfunktion in *para*-Position desselben 8-Benzamid-Restes den optimalen Substituenten dar. Es wäre interessant, zwei oder mehr dieser Substitutionsmuster miteinander zu kombinieren, um zu überprüfen, ob sich daraus additive Effekt auf die Wirksamkeit der entsprechenden Verbindungen ergeben.

Obwohl die orthologen Rezeptoren in sehr vielen ihrer Aminosäuren identisch sind (siehe Abbildung 5.1, S. 136), ist es interessant zu beobachten, dass insbesondere die kürzeren 8-Benzamidchromenon-Derivate größtenteils eine deutliche Selektivität für den humanen Rezeptor aufweisen. Dies konnte auch für die wenigen anderen potenteren hGPR35-Agonisten beobachtet werden.^{487,497} Während häufig Parallelen in den Struktur-Wirkungs-Beziehungen zwischen dem GPR35 der Maus und der Ratte gefunden wurden, unterscheiden sich die Ergebnisse an den murinen Rezeptoren teilweise deutlich von denen am hGPR35. Da unter den aufgeklärten Röntgen-Kristallstrukturen derzeit keine ausreichend gute Vorlage für Homologiemodelle des GPR35 verfügbar ist, mit deren Hilfe man die Unterschiede der Struktur-Wirkungs-Beziehungen zwischen den Spezies erklären könnte, könnten Mutagenese-Studien helfen, um die an der jeweiligen Bindungstasche beteiligten Aminosäuren zu identifizieren. Man könnte die Hypothese aufstellen, dass die für die Bindung hochpotenter hGPR35-Agonisten wie PSB-13253 (**263**) verantwortlichen Aminosäuren im humanen GPR35, nicht aber in den beiden murinen Orthologen konserviert sind. Ein Alignment der drei GPR35-Orthologen zeigt, dass sich der humane von den murinen GPR35 in 30-40 Aminosäuren unterscheidet, die aufgrund ihrer Position an der Ligandenbindung beteiligt sein könnten. Ein wenn auch wahrscheinlich unpräzises Modell könnte die Anzahl der interessanten Aminosäuren weiter eingrenzen. Eine interessante Beobachtung, die man bei der Analyse des Sequenzvergleichs der orthologen Rezeptoren machen kann, ist, dass fast keine Aminosäure des ECL3 in den murinen und dem humanen GPR35 konserviert ist. Möglicherweise sorgt der unterschiedliche ECL3 für eine leicht veränderte Ausrichtung der angrenzenden Transmembrandomänen im humanen und den murinen Rezeptoren. Jedoch gab es bislang ein großes Problem bei der ausführlichen pharmakologischen Charakterisierung von GPR35-Mutanten (was wahrscheinlich auch ein Grund dafür ist, dass nur sehr wenige Mutanten dieses Rezeptors beschrieben wurden): Die Tatsache

dass aufgrund des Mangels eines geeigneten Radioliganden keine Affinitätsdaten an den Rezeptormutanten erhoben werden können.

Zusammenfassend kann man sagen, dass die meisten der getesteten Chromenon-Derivate hochgradig spezies-selektiv für den humanen GPR35 waren, u. a. PSB-13253 (**263**, >100-fache Selektivität gegenüber dem GPR35 der Ratte und >1000-fache Selektivität gegenüber dem GPR35 der Maus). Allerdings konnten auch Verbindungen gefunden werden, die zwei der drei Rezeptor-Orthologen mit ähnlicher Wirksamkeit aktivierten:

1. hGPR35 & rGPR35: **237** (EC_{50} : hGPR35 4200 nM, rGPR35 1200 nM), **242** (EC_{50} : hGPR35 5440 nM, rGPR35 2750 nM), **254** (EC_{50} : hGPR35 1220 nM, rGPR35 2100 nM), **255** (EC_{50} : hGPR35 1710 nM, rGPR35 3140 nM), **258** (EC_{50} : hGPR35 842 nM, rGPR35 2080 nM) und **275** (EC_{50} : hGPR35 458 nM, rGPR35 729 nM).
2. hGPR35 & mGPR35: **240** (EC_{50} : hGPR35 4670 nM, mGPR35 2990 nM), **241** (EC_{50} : hGPR35 1340 nM, mGPR35 3590 nM) und **274** (EC_{50} : hGPR35 2890 nM, rGPR35 5490 nM).
3. rGPR35 & mGPR35: **246** (EC_{50} : rGPR35 5030 nM, mGPR35 2160 nM)

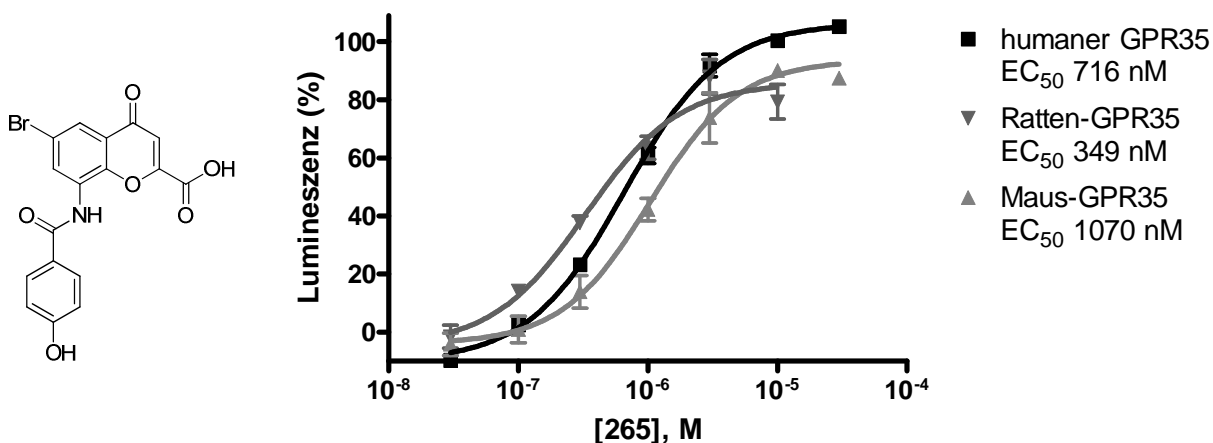


Abbildung 5.12: Konzentrations-Wirkungskurven Verbindung 265 an den GPR35-Orthologen

Die Wirksamkeit der Verbindungen wurde in funktionellen β -Arrestin-Rekrutierungsexperimenten bestimmt. Dargestellt sind die Mittelwerte \pm Standardfehler aus drei bis vier unabhängigen Experimenten, die in Duplikaten durchgeführt wurden.

Mit **266** (EC_{50} : hGPR35 1660 nM, mGPR35 4950 nM, rGPR35 1100 nM) und **265** (siehe Abbildung 5.12, EC_{50} : hGPR35 716 nM, mGPR35 1070 nM, rGPR35 349 nM) konnten aber auch zwei Verbindungen gefunden werden, die alle orthologen Rezeptoren mit der gleichen Wirksamkeit im niedrigen mikro- bis submikromolaren Bereich aktivierten.

5.2.4.5 Rezeptor-Selektivität

Die Chromenon-Derivate, die hier als neue GPR35-Agonisten beschrieben wurden, sollten in β -Arrestin-Rekrutierungs-Experimenten am eng verwandten humanen GPR55 (hGPR55) getestet werden. Die Testung wurde von Anika Püsche durchgeführt (siehe Tabelle 5.16). Keine der Verbindungen löste bei 10 μ M eine Aktivierung des hGPR55 aus. Daher handelt es sich bei den untersuchten Verbindungen um selektive Agonisten des GPR35. Darüber hinaus kann aufgrund dieser Daten ausgeschlossen werden, dass es sich bei den Effekten am hGPR35 um ein Artefakt handelt, da das gleiche experimentelle System für beide Testungsreihen genutzt wurde (CHO-Zelllinien, PathHunter[®], DiscoverX). In einer weiteren Reihe von Experimenten wurden die Verbindungen auf Antagonismus am hGPR55 untersucht. Es stellte sich heraus, dass einige Verbindungen den durch den Standardagonisten LPI (**197**) vermittelten Effekt hemmen können. Für die potentesten Antagonisten (ab einer Inhibition über 60 % des Signales von 1 μ M LPI bei einer Konzentration von 10 μ M der Verbindung) wurde eine Inhibitionskurve aufgenommen. Unter den potenten hGPR35-Agonisten stellten sich nur **263** (IC_{50} 21700 nM), **269** (IC_{50} 21700 nM) und **272** (IC_{50} 8920 nM) als hGPR55-Antagonisten heraus. Damit konnten neue, aber unselektive hGPR55-Antagonisten mit moderater Potenz identifiziert werden. Interessanterweise gehörten **263** und **269** nicht nur zu den potentesten hGPR55 Antagonisten unter den simpleren Chromenon-Derivaten, sondern stellten auch die potentesten hGPR35-Agonisten der Serie dar. Dennoch waren beide Verbindungen über 1700fach selektiv für den hGPR35.

Auch einige Pranlukast-abgeleitete Chromenon-Derivate stellten sich als Antagonisten mit moderater Wirksamkeit heraus. Es ist schwierig aus den Ergebnissen klare Struktur-Wirkungs-Beziehungen abzuleiten, da die Wirksamkeitsunterschiede nicht sehr groß sind. Grundsätzlich erschien die Verlängerung des Substituenten in *para*-Position des 8-Benzamid-Restes tendenziell vorteilhaft zu sein, wobei endständige Cyclohexyl-Reste besser toleriert wurden, als endständige Phenylreste (vergleiche z. B. **283**, *p*-Cyclohexylethoxy, EC_{50} 7780 nM mit **284**, *p*-Phenylethoxy, EC_{50} > 10000 nM).

Bei allen Benzyloxobenzamidchromenon-Derivaten handelte es sich um schwache hGPR55-Antagonisten. Interessant ist, dass weder die 6-Halogenierung der Kernstruktur, noch die unterschiedliche Substitution des distalen Phenylrestes (meist ebenfalls durch Halogenatome) kaum einen Einfluss auf die Wirksamkeit der Verbindungen am hGPR55 hatte.

Tabelle 5.16: Wirksamkeit von Chromen-4-on-2-carbonsäure-Derivaten am humanen GPR55

β-Arrestin-Rekrutierungs-Experimente ^a			β-Arrestin-Rekrutierungs-Experimente ^a		
Verbind.	(% Effekt ± SEM) ^b	IC ₅₀ ± SEM (μM) ^c (% Inhibition ± SEM)	Verbind.	(% Effekt ± SEM) ^b	IC ₅₀ ± SEM (μM) ^c (% Inhibition ± SEM)
143	(-6 ± 2)	(32 ± 8)	272	(4 ± 4)	8.92 ± 0.64
232	(-11 ± 4)	(19 ± 2)	273	(10 ± 5)	(6 ± 2)
233	(4 ± 2)	(17 ± 3)	274	(1 ± 4)	(10 ± 10)
234	(1 ± 7)	(-41 ± 9)	275	(5 ± 4)	(32 ± 2)
235	(15 ± 4)	(16 ± 4)	276	(10 ± 1)	(21 ± 9)
236	(-4 ± 7)	(31 ± 8)	277	(0 ± 5)	23.2 ± 7.4
237	(17 ± 7)	(16 ± 6)	278	(3 ± 6)	(52 ± 6)
238	(3 ± 2)	(24 ± 2)	279	(-6 ± 1)	7.34 ± 0.68
239	(-11 ± 3)	(26 ± 10)	280	(-11 ± 4)	6.46 ± 1.05
240	(6 ± 5)	29.1 ± 17.3	281	(-7 ± 3)	(9 ± 2)
241	(-6 ± 4)	(31 ± 3)	282	(-5 ± 7)	(24 ± 6)
242	(10 ± 6)	(25 ± 3)	283	(-8 ± 4)	7.78 ± 1.06
243	(12 ± 7)	(20 ± 3)	284	(15 ± 5)	(29 ± 2)
244	(6 ± 6)	(16 ± 8)	285	(-3 ± 7)	10.9 ± 2.0
245	(1 ± 3)	(5 ± 14)	286	(1 ± 2)	(57 ± 1)
246	(0 ± 6)	(-3 ± 3)	287	(11 ± 4)	(40 ± 5)
247	(8 ± 7)	(9 ± 4)	288	(13 ± 4)	(43 ± 10)
248	(5 ± 4)	(40 ± 8)	289	(-10 ± 7)	(53 ± 5)
249	(-8 ± 5)	(18 ± 9)	290	(18 ± 6)	(53 ± 5)
250	(3 ± 0)	(54 ± 5)	291	(9 ± 2)	(40 ± 7)
251	(7 ± 3)	(34 ± 7)	292	(10 ± 3)	4.25 ± 0.82
252	(-1 ± 5)	(26 ± 1)	293	(-3 ± 7)	(54 ± 3)
253	(20 ± 4)	(23 ± 1)	294	(9 ± 9)	2.65 ± 0,90
254	(4 ± 4)	(40 ± 6)	295	(5 ± 4)	26.0 ± 12.7
255	(8 ± 2)	(14 ± 9)	296	(12 ± 5)	7.30 ± 1.15
256	(-2 ± 3)	(47 ± 6)	297	(1 ± 1)	8.03 ± 1.00
257	(23 ± 7)	(21 ± 6)	298	(1 ± 4)	5.05 ± 0.89
258	(-8 ± 4)	(46 ± 6)	299	(4 ± 6)	9.78 ± 1.29
259	(12 ± 4)	(40 ± 5)	300	(-5 ± 6)	7.14 ± 0.63
260	(10 ± 9)	(43 ± 5)	301	(-6 ± 4)	9.18 ± 4.00
261	(16 ± 5)	(47 ± 7)	302	(-6 ± 8)	7.63 ± 1.90
262	(0 ± 2)	(38 ± 10)	303	(-7 ± 3)	9.10 ± 0.93
263	(0 ± 5)	21.7 ± 6.2	304	(0 ± 1)	4.34 ± 0.88
264	(-1 ± 7)	(39 ± 7)	305	(6 ± 7)	5.77 ± 2.29
265	(1 ± 9)	(32 ± 9)	306	(-6 ± 4)	5.39 ± 1.73
266	(9 ± 5)	(44 ± 2)	307	(12 ± 3)	12.3 ± 5.0
267	(-12 ± 1)	(45 ± 5)	308	(7 ± 5)	5.39 ± 0.56
268	(9 ± 3)	(46 ± 4)	309	(1 ± 3)	(50 ± 4)
269	(10 ± 2)	21.7 ± 1.9	310	(-4 ± 6)	18.0 ± 4.2

^aVortestungen wurden bei einer Konzentration von 10 μM durchgeführt,

^bEffekte wurden auf das Signal von 1 μM LPI normalisiert.

^cInhibition des Effektes induziert durch 1 μM LPI (~ EC₈₀).

Mit den Chromenon-Derivaten konnten demnach neue, unselektive hGPR55-Antagonisten identifiziert werden. Auch wenn diese keine hohe Wirksamkeit aufwiesen, könnte man versuchen die Verbindungen in zukünftigen Synthese- und Versuchsreihen weiter zu optimieren. In Zukunft wäre es interessant die Chromenon-Derivate an weiteren verwandten (Orphan-) Rezeptoren zu testen. Falls einzelne Verbindungen auch an phylogenetisch verwandten Rezeptoren aktiv sind, könnte ggf. die Evolution der Chromenon-Bindungstasche analysiert und diskutiert werden.

5.2.5 Entwicklung und Charakterisierung des Radioliganden [³H]PSB-13253

Ein Problem bei der pharmakologischen Charakterisierung des hGPR35 ist die Tatsache, dass die klassischen Testsysteme, in denen die G-Protein-Kopplung (G_s , G_i und G_q) des Rezeptors untersucht wird, keine auswertbaren Daten liefern. Unklar ist in diesem Zusammenhang besonders, warum die Rezeptoraktivierung nicht in cAMP-Akkumulations-Experimenten untersucht werden kann, da es einige überzeugende Hinweise darauf gibt, dass der Rezeptor G_i -gekoppelt ist.^{474,482} Es wurden einzelne Testsysteme zur Untersuchung der GPR35-vermittelten ERK-Phosphorylierung sowie zur Untersuchung der $G_{12/13}$ -Signalkaskade beschrieben.^{473,483,486} Diese sind aber aufgrund des hohen experimentellen Aufwandes nur für einen geringen Durchsatz an Verbindungen geeignet. Um große Screening-Kampagnen zu ermöglichen, wird für diesen Rezeptor in der Regel auf β -Arrestin-Rekrutierungs-Experimente, Calciumionen-Mobilisationsexperimente unter Koexpression chimärer/promiskuitiver G-Proteine oder DMR-Experimente zurückgegriffen. Wie bei allen funktionellen Experimenten müssen die Ergebnisse, besonders dieser teilweise hochartifizialen Systeme, mit Vorsicht ausgewertet werden. So können die Rezeptordichte, die funktionelle Selektivität der getesteten Liganden und unspezifische, Rezeptor-unabhängige Effekte die Ergebnisse beeinflussen.⁵²⁶ Neben der Bestimmung der u. a. durch diese Faktoren beeinflusste Wirksamkeit könnte die Bestimmung der Affinität der Testverbindungen wertvolle ergänzende Informationen für die pharmakologische Charakterisierung liefern. Darüber hinaus können Radioliganden bei der Bestimmung der Rezeptordichte und für die Qualitätskontrolle bei den experimentellen Schritten eingesetzt werden, die einer Rezeptor-Kristallisation vorangehen.⁵²⁷⁻⁵²⁹ Bindungsdaten können zudem wichtige Hinweise bei der Interpretation von Kristall-Strukturen liefern und sind von großer Bedeutung bei der Untersuchung von Rezeptor-Mutanten.^{295,530} Bislang war es jedoch

nicht möglich die Affinität am hGPR35 zu bestimmen, da kein geeigneter Radioligand für diesen Rezeptor verfügbar war.

In der vorliegenden Arbeit konnte mit PSB-13253 (**263**) ein hochpotenter Vollagonist des hGPR35 entwickelt werden (der zur Zeit seiner Publikation der potenteste Agonist war, der bislang für den hGPR35 beschrieben wurde).⁵²⁰ Mario Funke entwickelte in unserem Arbeitskreis einen Syntheseweg, der die radioaktive Markierung dieser Verbindung erlaubt.⁴⁷¹ Nach der erfolgreichen Trititierung durch die damit beauftragte Firma (Quotient Bioresearch, Großbritannien) konnte der neue Radioligand [³H]PSB-13253 (siehe Abbildung 5.13) charakterisiert werden.

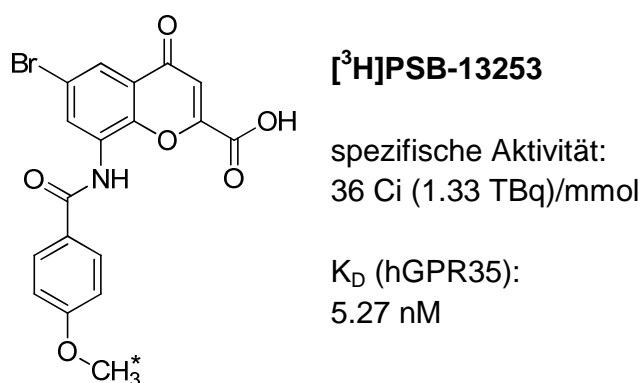


Abbildung 5.13: Der neue Radioligand [³H]PSB-13253.

Der angegebene K_D-Wert ist der Mittelwert aus drei unabhängigen Sättigungsexperimenten am hGPR35. Für Bindungsstudien wurden Membranpräparationen von CHO-Zellen eingesetzt, in denen der hGPR35 zur Expression gebracht wurde.

In Vorversuchen zeigte sich, dass der Radioligand mit hoher Affinität an Membranpräparationen von CHO-Zellen bindet, in denen der hGPR35 zur Expression gebracht wurde. Außerdem konnte gezeigt werden, dass der Zusatz von Magnesiumionen in den Inkubationspuffer zu einer deutlichen Steigerung der spezifischen Bindung führte (s. u.). Diese Beobachtung konnte auch schon für eine Vielzahl weiterer Agonist-Radioliganden an anderen GPCRs gemacht werden.⁵³¹⁻⁵³⁴ Ein standardmäßiger Zusatz von MgCl₂ ist daher für viele Agonist-Radioliganden üblich, weshalb auch dem Inkubationspuffer für Bindungsstudien am hGPR35 10 mM MgCl₂ zugesetzt wurde.^{533,535-538} Der Einfluss weiterer Kationen wurde nach der umfassenden pharmakologischen Charakterisierung des Radioliganden durchgeführt (s. u.).

In Sättigungsexperimenten wurde eine große Bandbreite an verschiedenen Radioligand-Konzentrationen sowie 10 µg Protein pro Reaktionsansatz eingesetzt (siehe Abbildung 5.14). Radioligand und Protein wurden im Reaktionspuffer verdünnt (50 mM Tris, 10 mM

MgCl₂, pH 7.4). Anhand von Vorversuchen wurde bestimmt, dass eine Inkubationszeit von 150 min ausreichte, um das Gleichgewicht der Bindungsreaktion zu erreichen. In drei unabhängigen, in Duplikaten durchgeführten Sättigungsexperimenten wurde ein K_D-Wert von 5.27 ± 0.18 nM bestimmt. Außerdem wurde für die eingesetzten Membranen von CHO-Zellen, in denen der hGPR35 zur Expression gebracht wurde, ein hoher B_{max}-Wert von 12.6 ± 1.2 pmol/mg Protein errechnet.

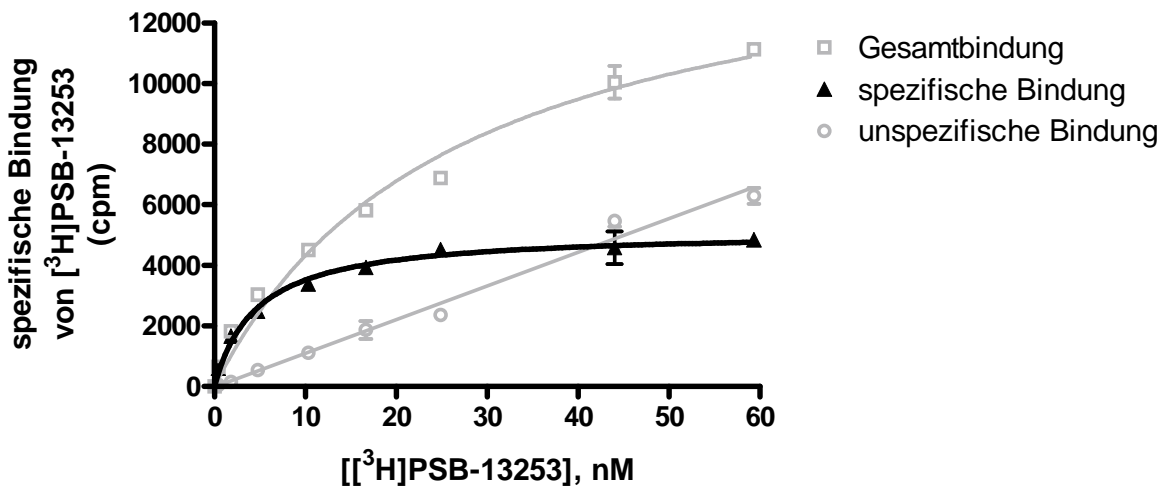


Abbildung 5.14: Sättigung der Bindung von [³H]PSB-13253 an den humanen GPR35.

Für Bindungsstudien wurden Membranpräparationen von CHO-Zellen eingesetzt, in denen der GPR35 zur Expression gebracht wurde (10 µg Protein pro Reaktionsansatz). Angegeben sind Mittelwerte ± Standardfehler eines typischen Experimentes, das in Duplikaten durchgeführt wurde.

In Experimenten zur Untersuchung der Assoziations- und Dissoziations-Kinetik wurden 5 nM des Radioliganden und 10 µg Protein pro Reaktionsansatz eingesetzt. In Assoziationsexperimenten wurden Radioligand und Rezeptor-Protein bis zu 200 min lang inkubiert. Die Dissoziation des Radioliganden wurde durch die Zugabe von Pamoasäure in einer hohen Konzentration (10 µM) nach einer 100-minütigen Vorinkubation induziert. Die Ergebnisse aus Assoziations- und Dissoziations-Experimenten zeigten, dass die Bindungsreaktion nach etwa 60 min im Gleichgewicht steht, das mindestens 200 min stabil bleibt (Abbildung 5.15). Sofern nicht anders angegeben, wurden alle weiteren Bindungsstudien aufgrund dieser Charakterisierung bei einer Radioligand-Konzentration von 5 nM, 10 µg Protein pro Reaktionsansatz und einer Inkubationszeit von 100 min in dem beschriebenen Puffer (50 mM Tris, 10 mM MgCl₂, pH 7.4) durchgeführt.

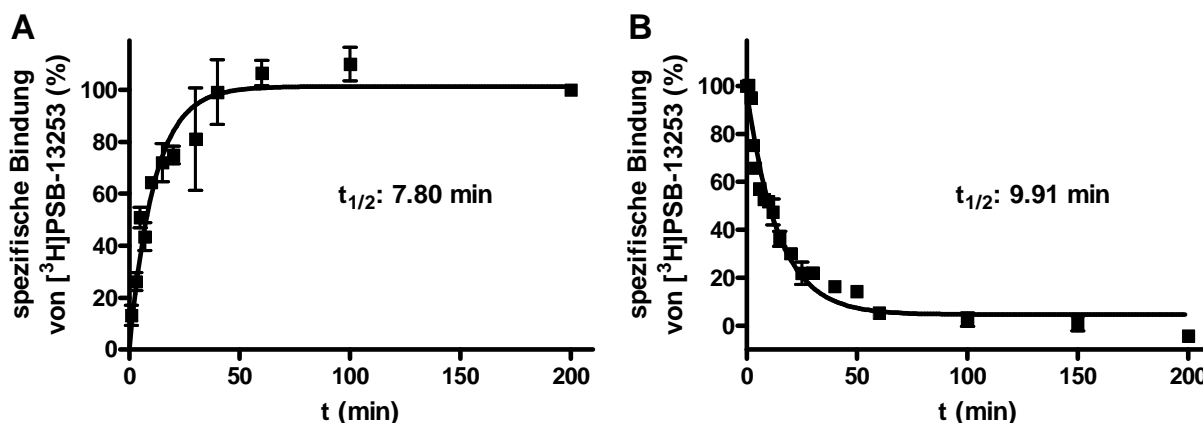


Abbildung 5.15: Kinetik der Bindung von [³H]PSB-13253 an den humanen GPR35.

(A) Assoziations- und (B) Dissoziationskurve. Die Dissoziation des Radioliganden wurde durch die Zugabe von Pamoasäure (10 μ M) nach 100 minütiger Vorinkubation ausgelöst. Für die Bindungsstudien wurden Membranpräparationen von CHO-Zellen genutzt, in denen der GPR35 zur Expression gebracht wurde. Der Radioligand wurde in einer Endkonzentration von 5 nM eingesetzt. Angegeben sind die Mittelwerte aus zwei unabhängigen Experimenten, die in Duplikaten durchgeführt wurden.

In Experimenten, bei denen verschiedene Proteinmengen eingesetzt wurden, konnte gezeigt werden, dass die Bindung des Radioliganden strikt Protein-abhängig ist (Abbildung 5.16). Darüber hinaus konnte gezeigt werden, dass die spezifische Bindung des Radioliganden an Membranen untransfizierter CHO-Zellen vernachlässigbar gering war. Dies war nicht selbstverständlich, da für den Chinesischen Streifenhamster ein hypothetischer GPR35-ähnlicher Rezeptor beschrieben wurde (NCBI-Zugangsnummer: XP_003499301). Da jedoch gezeigt werden konnte, dass PSB-13253 (**263**) gegenüber den murinen Rezeptoren hochgradig selektiv für den humanen Rezeptor war, kann man annehmen, dass der Radioligand nur mit geringer Affinität an den hypothetischen Rezeptor des Chinesischen Streifenhamsters bindet. Demnach würde dieser Rezeptor durch den Radioligand nicht markiert werden. Man muss jedoch einschränkend dazu sagen, dass die zur Bestimmung der unspezifischen Bindung eingesetzte Pamoasäure ebenso keine Aktivität an den murinen Rezeptoren zeigte.⁴⁸⁵ Geht man davon aus, dass dies auch auf den Rezeptor des Chinesischen Streifenhamsters zutrifft, könnte es sein, dass aufgrund dessen die spezifische Bindung an Membranen untransfizierter CHO-Zellen unterschätzt wurde. Um dies ausschließen zu können, wurde die unspezifische Bindung im Falle der untransfizierten Zellen zusätzlich in der Anwesenheit von Zaprinast, einem Agonisten mit hoher Wirksamkeit an den murinen GPR35 (siehe Tabelle 5.3, S. 145), bestimmt. Die unspezifische Bindung fiel jedoch unabhängig von der zu ihrer Bestimmung eingesetzten Verbindung praktisch gleich gering aus (siehe Abbildung

5.16). Daraus kann geschlossen werden, dass der hypothetische GPR35-artige Rezeptor des Chinesischen Streifenhamsters entweder nicht durch den Radioligand markiert wird, nicht in Ovarialzellen (CHO-Zellen) exprimiert wird oder nicht existiert.

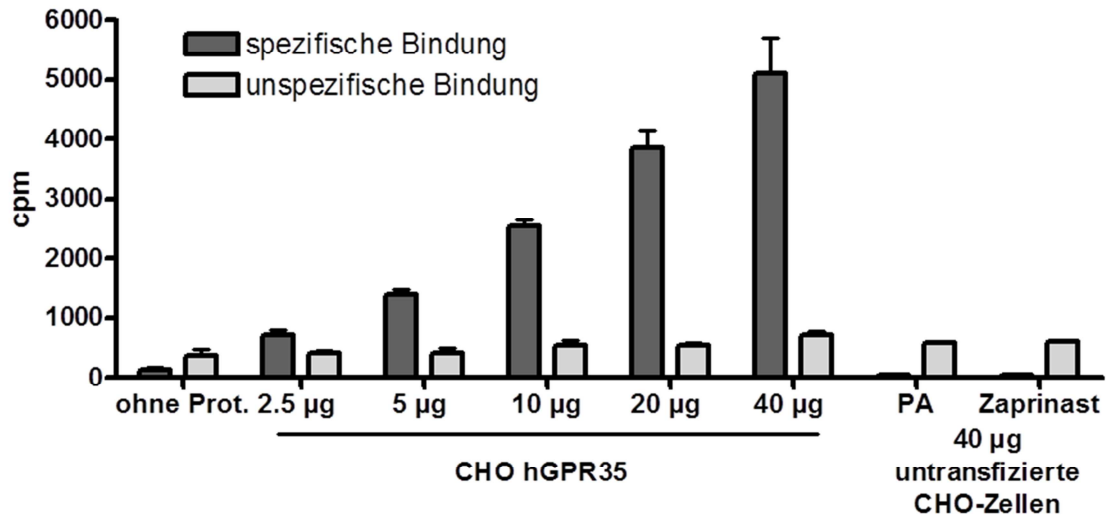


Abbildung 5.16: Proteinabhängigkeit der Bindung von [³H]PSB-13253 an den humanen GPR35.

Für Bindungsstudien wurden Membranpräparationen von CHO-Zellen eingesetzt, in denen der GPR35 zur Expression gebracht wurde (Proteinmengen pro Reaktionsansatz sind angegeben). Dargestellt sind Mittelwerte \pm Standardfehler von drei Experimenten, die in Duplikaten durchgeführt wurden. Zur Bestimmung der unspezifischen Bindung wurde 10 μ M Pamoasäure (PA) eingesetzt. An Membranpräparationen von untransfizierten CHO-Zellen wurde dafür zusätzlich 250 μ M Zaprinast eingesetzt.

Interessanterweise stieg die unspezifische Bindung mit der Erhöhung der Proteinmenge kaum an. Vielmehr blieb sie relativ konstant, unabhängig davon ob überhaupt Protein zugegeben wurde bzw. welche der beiden Membranpräparationen eingesetzt wurden. Daraus kann geschlussfolgert werden, dass der Radioligand eine sehr geringe unspezifische Bindung an CHO-Zell-Membranen aufwies. Dies hat den Vorteil, dass man das Verhältnis von spezifischer zu Gesamtbindung durch den Einsatz höherer Proteinmengen zumindest theoretisch beliebig vergrößern kann. Die Tatsache, dass der Radioligand nicht an Membranen von CHO-Zellen zu binden scheint, deutet außerdem darauf hin, dass er auch eng mit dem GPR35 verwandte Rezeptoren nicht markiert, die endogen in CHO-Zellen exprimiert werden, z. B. LPA- oder P2Y-Rezeptoren.⁵³⁹⁻⁵⁴¹

In Vorversuchen wurde der Radioligand auch an Membranpräparationen von CHO-Zellen getestet, in denen der GPR35 der Maus oder der Ratte zur Expression gebracht wurde. Dabei wurde eine Konzentration von 15 nM [³H]PSB-13253, 100 μ g Protein pro Reaktionsansatz und eine Inkubationszeit von 2 Stunden genutzt. Die unspezifische

Bindung wurde in der Anwesenheit von 250 μM Zaprinast bestimmt. Während die spezifische Bindung am humanen GPR35 unter ähnlichen Bedingungen bei etwa 90 % der Gesamtbindung lag, war sie sehr gering für den Fall des Ratten- (20 %) bzw. Maus- (8 %) Rezeptors. Da gezeigt wurde, dass PSB-13253 (**263**) in β -Arrestin-Rekrutierungsexperimenten nur eine schwache Wirksamkeit an den murinen GPR35-Rezeptoren aufwies, ist davon auszugehen, dass der Radioligand auch nur mit geringer Affinität an diese beiden Orthologen bindet. Aus diesem Grund scheint der Radioligand sich nicht für die Bestimmung der Affinität an den murinen Rezeptoren zu eignen.

In weiteren Experimenten wurde der Einfluss verschiedener Kationen auf die Radioligand-Bindung untersucht. Dazu wurden homologe Kompletions-Experimente durchgeführt, in denen dem Inkubationspuffer kein MgCl_2 zugesetzt oder es durch 10 mM CaCl_2 bzw. 100 mM NaCl ersetzt wurde (Abbildung 5.17A, eingesetzte Proteinmenge: 15 μg pro Reaktionsansatz). Unter Einsatz eines Tris-Inkubationspuffers (50 mM Tris, pH 7.4) ohne weitere Ionenzusätze belief sich spezifische Bindung auf 65 % der Gesamtbindung. Durch den Zusatz von 10 mM MgCl_2 oder 10 mM CaCl_2 erhöhte sich die spezifische Bindung auf 90 % (MgCl_2) bzw. 85 % (CaCl_2) der Gesamtbindung. Dabei erhöhte sich vornehmlich die spezifische Bindung während die unspezifische Bindung kaum durch die divalenten Kationen beeinflusst wurde. Neben der Bindungskapazität erhöhte sich durch den Zusatz von Magnesium- oder Calcium-Ionen auch die Affinität von PSB-13253 (Abbildung 5.17B). Anhand der homologen Kompetition konnten folgende K_D -Werte bestimmt werden: 50 mM Tris, pH 7.4 ohne Ionenzusatz 115 ± 32 nM, bei Zusatz von 10 mM MgCl_2 5.65 ± 0.28 nM, bei Zusatz von 10 mM CaCl_2 5.92 ± 0.18 nM. Es wurde bereits vielfach beschrieben, dass die Affinität und die Anzahl der spezifischen Bindungsstellen für Agonisten von GPCRs durch die Anwesenheit von Magnesiumionen erhöht werden können.^{531,534} Allerdings ist der zugrundeliegende Wirkmechanismus noch unklar. Es wird jedoch angenommen, dass Magnesiumionen größere Anteile der Rezeptorpopulation in die für Agonisten hochaffine aktive Konformation überführen, wodurch die beobachteten Effekte auf Agonist-Radioliganden erklärt werden könnten.⁵⁴² Es wäre interessant herauszufinden, ob der Effekt von divalenten Kationen allein auf die vorgeschlagene allosterische Modulation des Rezeptors zurückgeht oder ob sie auch eine direkte Rolle bei der Liganden-Bindung spielen, z. B. durch die Bildung von Metallkomplexen zwischen Rezeptor und Ligand.

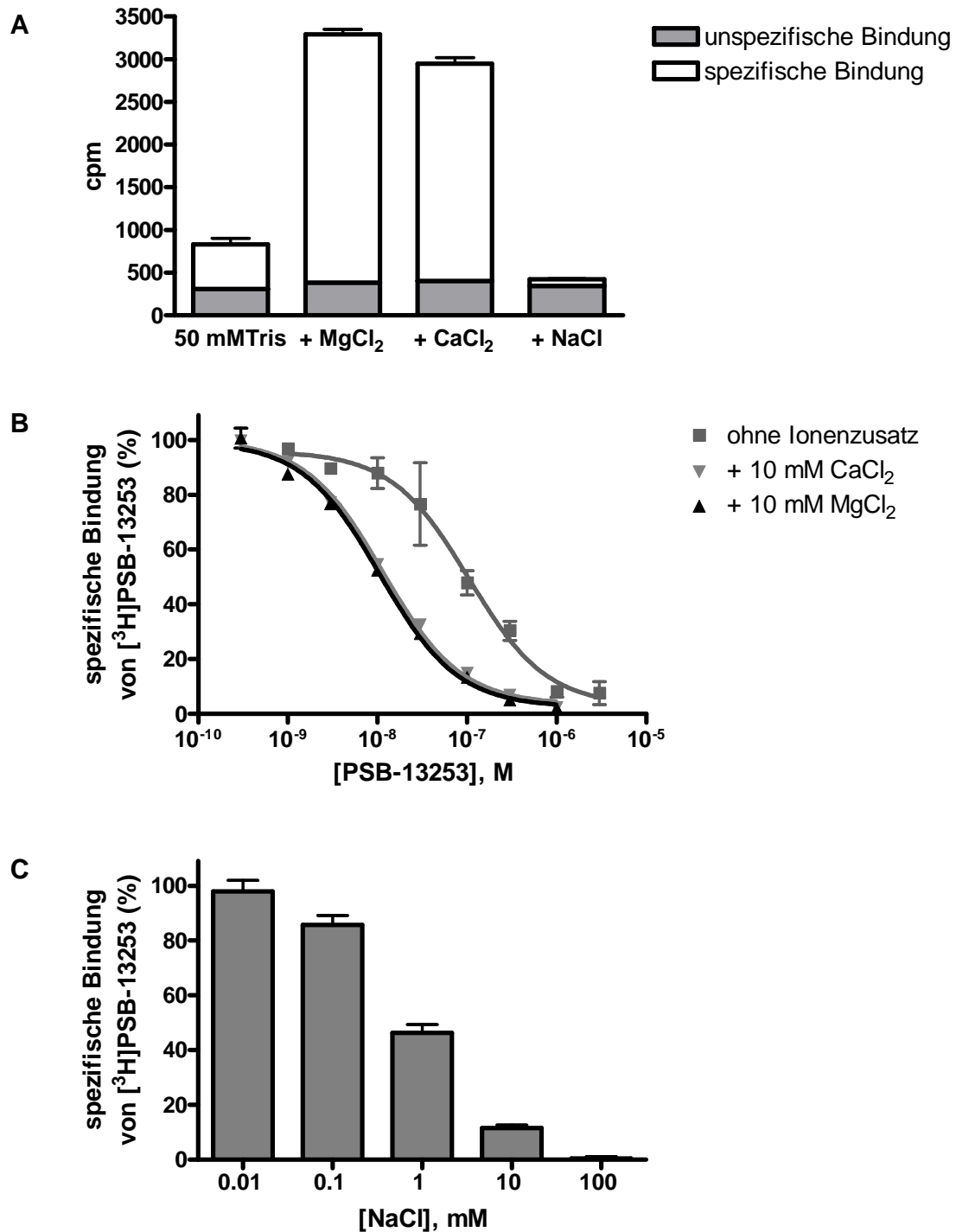


Abbildung 5.17: Einfluss von Kationen auf die Bindung von [³H]PSB-13253 an den hGPR35

(A) Einfluss auf die Bindungskapazität, (B) Einfluss auf die Affinität, (C) Einfluss von NaCl auf die spezifische Bindung von [³H]PSB-13253 in einem Inkubationspuffer dem 10 mM MgCl₂ zugesetzt wurde. Die Radioligand-Bindungsstudien wurden bei einer Radioligand-Konzentration von 5 nM und unter Einsatz von Membranpräparationen von CHO-Zellen durchgeführt, in denen der GPR35 zur Expression gebracht wurde. Angegeben sind Mittelwerte aus drei unabhängigen Experimenten, die in Duplikaten durchgeführt wurden.

Während Magnesium-Ionen die Affinität von Agonisten an vielen GPCRs erhöhen, scheinen die Effekte von Calcium-Ionen Rezeptor-spezifisch zu sein: Für verschiedene Rezeptoren wurde beschrieben, dass sie die Affinität von Agonisten erhöhten, herabsetzen bzw. überhaupt nicht beeinflussten.^{531,543,544}

Im Gegensatz zu divalenten Kationen bewirkten Natrium-Ionen (100 mM NaCl) einen Verlust der spezifischen Bindung des agonistischen Radioliganden. Dies wurde auch für viele andere Agonisten an anderen GPCRs beschrieben.^{532,545-548} In einer Kristallstruktur des humanen A_{2A}-Adenosin-Rezeptors (hA_{2A}AR) wurde gefunden, dass ein Natrium-Ion über ein Netzwerk aus Wasser-Molekülen an hochkonservierte Aminosäurereste (Asn1.50, Asp2.50, Ser3.39, Trp6.48, Asn7.45, Asn7.49 und Tyr7.63) bindet.⁵⁴⁷ Über Mutagenese-Studien wurde gezeigt, dass der Effekt von Natriumionen an verschiedenen GPCRs durch die Aminosäure Asp2.50 vermittelt wird.⁵⁴⁷ Diese Aminosäure ist auch im hGPR35 konserviert. Der Vergleich verschiedener Kristallstrukturen zeigte, dass die Natrium-Bindungstasche im hA_{2A}AR nur in der inaktiven Konformation des Rezeptors vorliegt.⁵⁴⁷ Damit stellen Natriumionen negativ allosterische Modulatoren vieler verschiedener GPCRs dar, was auch für den hGPR35 zuzutreffen schien. Daraus ergab sich jedoch, dass man die Bindungsdaten solcher Verbindungen, die als Natriumsalze vorlagen (z. B. Cromoglicinsäure), mit Vorsicht interpretieren muss. Daher wurde der Effekt von Natriumionen im Standard-Inkubationspuffer (50 mM Tris, 10 mM MgCl₂, pH 7.4) untersucht (Abbildung 5.17C). Dabei zeigte sich, dass die spezifische Bindung des Radioliganden mit steigender NaCl-Konzentration stetig abnimmt. Dieser Effekt tritt ab einer Konzentration von 100 µM NaCl auf und bei 100 mM NaCl kommt es zum kompletten Verlust der spezifischen Bindung von [³H]PSB-13253. Aus diesem Grunde sollten Kompetitionskurven von Verbindungen, die als Natriumsalze vorliegen, bei höheren Konzentrationen extrapoliert werden. Man kann sich die Frage stellen, welche physiologische Auswirkung diese Modulation durch Natriumionen hat, da auch unter physiologischen Bedingungen besonders extrazellulär hohe Konzentrationen dieses Kations vorliegen. In β-Arrestin-Experimenten konnte gezeigt werden, dass PSB-13253 den Rezeptor in einem Medium mit einer physiologischen Natrium-Konzentration von über 100 mM (Angabe von DiscoverX) voll aktivieren kann. Daher ist davon auszugehen, dass die Natrium-Bindungsstelle des Rezeptors nicht aus dem Extrazellularraum zugänglich ist. Nähere Untersuchungen zur Rolle der Natriumkonzentration auf die Aktivierbarkeit durch Agonisten wie PSB-13253 sind anhand zellulärer Systeme aber kaum möglich, da eine definierte Natriumionen-

Konzentration intra- und extrazellulär vorliegen muss, um ein optimales Membranpotential aufrecht zu erhalten.

5.2.6 Kompetitions-Bindungsstudien am humanen GPR35

Die Bindungsstudien wurden unter den oben genannten Standardbedingungen durchgeführt. Alle Verbindungen wurden zuerst bei einer Konzentration von in der Regel 10 μM getestet. Verbindungen, die bei dieser Konzentration eine Inhibition der Radioligand-Bindung von über 50 % auslösten, wurden durch die Bestimmung von Inhibitionskurven näher untersucht.

5.2.6.1 Testung bekannter GPR35-Liganden

In Kompetitions-Bindungsstudien wurde erstmals die Affinität ausgewählter bekannter Liganden am hGPR35 bestimmt. Die Ergebnisse aus diesen und aus β -Arrestin-Rekrutierungs-Experimenten sind in Tabelle 5.17 angegeben (siehe auch Abbildung 5.18, S. 219). Alle getesteten GPR35-Liganden vermittelten eine Inhibition der Radioligand-Bindung, so dass jeweils vollständige Inhibitionskurven bestimmt werden konnten. Dies deutet darauf hin, dass alle getesteten Verbindungen die gleiche oder zumindest eine überlappende Bindungsstelle des Rezeptors adressierten wie [^3H]PSB-13253.

Der K_i -Wert der meisten Agonisten war 2-9fach geringer als ihr EC_{50} -Wert. Überraschenderweise traf dies auch bei den Antagonisten zu: Ihre Affinität war deutlich höher als ihre Wirksamkeit. Allerdings gab es auch Ausnahmen von dieser Regel: Auffällig war, dass die Affinität der dimeren Verbindungen Dicoumarol (**88**) und Pamoasäure (**105**) um mehr als den Faktor 100 von ihrer jeweiligen Wirksamkeit abwich. Interessanterweise wurde für beide Verbindungen ein Partialagonismus am hGPR35 beschrieben.⁴⁸⁷ Die Tatsache, dass die Efficacy dieser Verbindungen in den hier beschriebenen β -Arrestin-Experimenten nicht reduziert ist, könnte auf eine sehr hohe Rezeptor-Dichte der verwendeten Zellen zurückgehen. Andererseits gibt es Hinweise darauf, dass Partialagonisten eine vergleichbar hohe Rezeptordesensibilisierung auslösen können wie ein Vollagonist.⁵⁴⁹ Daraus könnte geschlossen werden, dass auch Partialagonisten eine maximale β -Arrestin-Rekrutierung (die einen bei der Rezeptordesensibilisierung zentralen Vorgang darstellt) auslösen können. Außer Nifluminsäure weisen alle getesteten Partialagonisten (nämlich (S)-Luziferin, Dicoumarol und Pamoasäure) eine unverhältnismäßig höhere Affinität auf, als es funktionelle

Experimente vermuten lassen. Dies könnte dadurch erklärt werden, dass es sich bei diesen Verbindungen um Agonisten mit funktioneller Selektivität handelt. Dies scheint zumindest für Pamoasäure der Fall zu sein (β -Arrestin-Rekrutierungs-Experimente: niedrige Wirksamkeit, DMR-Experimente: sehr hohe Wirksamkeit, siehe Tabelle 5.3, S. 145). Man könnte anhand dieser Daten die Hypothese aufstellen, dass bestimmte Partialagonisten am hGPR35 grundsätzlich funktionell selektiv sind und die β -Arrestin-Rekrutierung mit einer geringeren Wirksamkeit auslösen.

Zu den interessantesten bekannten Liganden, die in Bindungsstudien getestet wurden, zählen Kynurensäure, Bumetanid, Lodoxamid und Pamoasäure. Kynurensäure wurde als der endogene Agonist des GPR35 beschrieben.⁴⁷⁴ Die IUPHAR empfahl kürzlich sogar die offizielle Anerkennung dieser Paarung.⁵⁵⁰ Mit den hier erhobenen Daten können die ohnehin existierenden Zweifel daran aber weiter verdichtet werden.⁵⁵¹ Kynurensäure hatte mit 137 μM eine sehr geringe Affinität am hGPR35. Während die Kynurensäure-Konzentration im menschlichen Körper in den meisten Geweben gering ist (sie liegt im mittleren nanomolaren Bereich), werden nur im Darmlumen höhere Konzentrationen erreicht.⁵⁵² Mit Konzentrationen von bis zu 16 μM im Darmlumen von Ratten wurde die höchste Konzentration von Kynurensäure in Gewebepräparaten von verschiedenen Säugetieren bestimmt.⁵⁵² In Anbetracht des hohen K_i - und des wahrscheinlich deutlich höheren EC_{50} -Wertes von Kynurensäure erscheint es nahezu unmöglich, dass der humane Rezeptor durch physiologische Konzentrationen von Kynurensäure aktiviert werden könnte. Neben Kynurensäure wurden auch einzelne LPA-Spezies als endogene hGPR35-Liganden vorgeschlagen.^{486,550} Zwar schienen diese eine relativ hohe Wirksamkeit zu haben (EC_{50} -Werte im zweistelligen nanomolaren Bereich), jedoch konnte bislang nur eine Gruppe einen Agonismus für diese Verbindungen zeigen.⁴⁸⁶ Dabei wurde zudem ein ungünstiges Testsystem genutzt (Calciumionen-Mobilisations-Experimente/HEK293-Zellen), da endogen exprimierte LPA-Rezeptoren ein sehr hohes Hintergrundsignal lieferten.⁴⁸⁶ Erst seit sehr kurzer Zeit sind die entsprechenden LPA-Spezies kommerziell erhältlich. Sie sollten in Zukunft in Bindungsstudien am hGPR35 getestet werden um die zahlreichen Zweifel an ihrer Rolle als endogener Ligand (eingehendere Diskussion siehe Kapitel 5.1.2.2) zu erhärten oder auszuräumen.

Tabelle 5.17: Wirksamkeit & Affinität ausgewählter, bekannter GPR35-Liganden am hGPR35

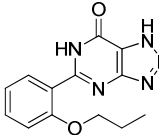
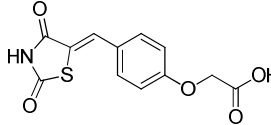
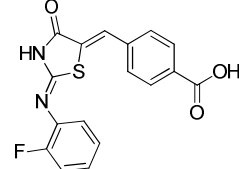
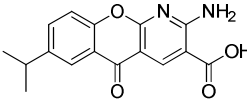
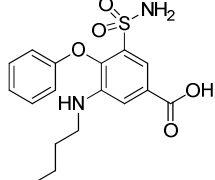
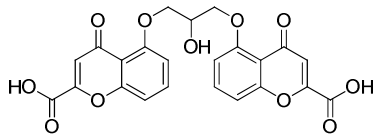
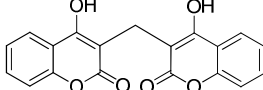
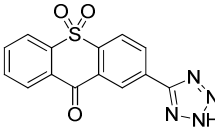
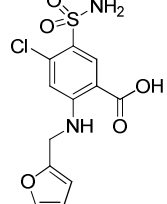
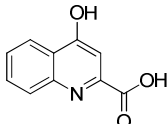
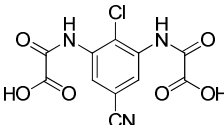
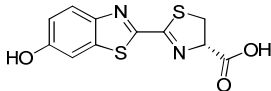
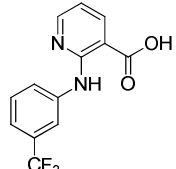
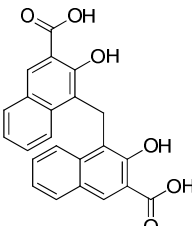
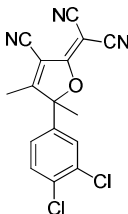
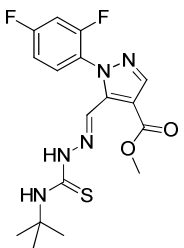
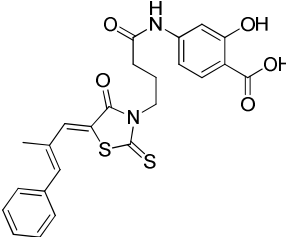
Verbindung	Struktur	β-Arrestin-Experimente ^a		Radioligand-Bindungs-Experimente ^d
		EC ₅₀ ^b oder IC ₅₀ ^c ± SEM (μM) (% Effekt ± SEM) ^b	E _{max} ^b	K _i ± SEM (μM)
Agonisten				
30, Zaprinast		1.96 ± 0.24	100	0.401 ± 0.015
75		0.349 ± 0.052	107	0.0508 ± 0.0023
78		0.0257 ⁴⁹⁷	95 ⁴⁹⁷	0.00290 ± 0.00024
83, Amlexanox		3.80 ⁴⁹⁹	ca. 80 ⁴⁹⁹	1.64 ± 0.06
85, Bumetanid		37.1 ± 5.1	114	6.62 ± 0.42
86, Cromoglicinsäure		1.26 ± 0.17	119	2.34 ± 0.04^e
88, Dicoumarol		9.78 ± 1.73	107	0.0390 ± 0.0038
91, Doxantrazol		3.39 ^{498, f}	k. A. ⁴⁹⁸	1.93 ± 0.13
93, Furosemid		11.2 ± 0.9	96	3.27 ± 0.28
96, Kynurensäure		(25 ± 5) ^g		137 ± 6^e

Tabelle 5.17 (Fortsetzung)

97, Lodoxamid		0.00161 ⁴⁹⁸	k. A. ⁴⁹⁸	0.000861 ± 0.000070
99, (S)-Luziferin		(11 ± 1)		9.86 ± 1.41
103, Nifluminsäure		30.8 ± 3.1	97	3.61 ± 0.07
105, Pamoasäure		1.20 ± 0.13	95	0.0115 ± 0.0010
112, YE120		(1 ± 4)		0.655 ± 0.035
Antagonisten				
114, CID 2745687		0.574 ± 0.050		0.0422 ± 0.0029
116, ML 145		0.522 ± 0.066		0.00876 ± 0.00043

^aVorstestungen wurden in der Regel bei einer Konzentration von 10 µM durchgeführt, außer ^g100 µM

^bEffekte wurden auf das Signal von 30 µM Zaprinast (entspricht dem Maximaleffekt) normalisiert.

^cInhibition des Effektes induziert durch 5 µM Zaprinast (~ EC₈₀).

^dKompetitionsexperimente gegen [³H]PSB-13253.

^eKurve wurde extrapoliert, Cromoglicinsäure: liegt als Natriumsalz vor, Kynurensäure: mangelnde Löslichkeit bei hohen Konzentrationen

^fstatt des PathHunter[®]-β-Arrestin-Assays wurde ein BRET-basierter β-Arrestin-Assay durchgeführt, der jedoch vergleichbare Daten liefert⁴⁹⁸

k. A. keine Angabe

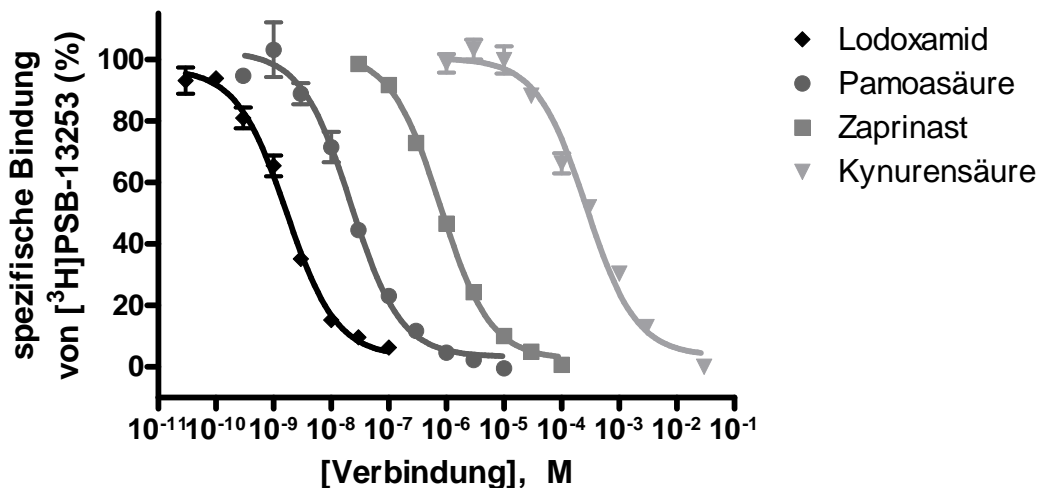


Abbildung 5.18: Kompetitionskurven von Standard-Agonisten am humanen GPR35

Die Radioligand-Bindungsstudien wurden bei einer Radioligand-Konzentration von 5 nM und unter Einsatz von Membranpräparationen von CHO-Zellen durchgeführt, in denen der GPR35 zur Expression gebracht wurde. Angegeben sind Mittelwerte aus drei bis vier unabhängigen Experimenten, die in Duplikaten durchgeführt wurden.

Deletionen in der chromosomalen Region 2q37.3 haben das Auftreten eines Syndroms zur Folge, das der Albright'schen hereditären Osteodystrophie (AHO) ähnelt.⁵¹⁰ Dabei handelt es sich um eine geistige Behinderung, die unter anderem mit verschiedenen Formen von Autismus einhergeht.⁵⁵³ Die Deletion des GPR35, dessen Gen in der betroffenen Region liegt, wurde als eine mögliche Ursache für das Entstehen des Syndroms vorgeschlagen.⁵¹⁰ Es war sehr interessant als 2010 beschrieben wurde, dass Autismus-Symptome bei Kindern durch pharmakotherapeutische Intervention gemildert werden konnten.⁵⁵⁴ Bei dem in der Studie eingesetzten Arzneistoff handelte es sich um das Schleifendiuretikum Bumetanid.⁵⁵⁴ Als Wirkmechanismus wurde vorgeschlagen, dass Bumetanid neuronale NKCC1-Transporter hemmt, wodurch die Chloridionen-Konzentration in GABAergen Neuronen herabgesetzt wird.⁵⁵⁵ Da Bumetanid aber auch ein GPR35-Agonist ist, der mit moderater Affinität (K_i 6.62 μ M) an den Rezeptor bindet, wäre es möglich, dass auch diesem u. a. im ZNS exprimierten Rezeptor eine Rolle bei der Therapie mit Bumetanid zukommt. Gerade weil die Deletion des GPR35-Gens möglicherweise ein Syndrom verursacht, das mit Autismus einhergeht, erscheint ein positiver Einfluss durch die Aktivierung des Rezeptors nicht als unwahrscheinlich. Jedoch gibt es keine umfassenden Studien in denen die Bumetanid-Konzentration im ZNS nach oraler Gabe bestimmt wurde. Da Bumetanid den NKCC1-Transporter mit deutlich höherer Wirksamkeit hemmt (hNKCC1: IC_{50} 420 nM)⁵⁵⁶ als es den GPR35

aktiviert ist unklar, ob dem Rezeptor wirklich eine Rolle bei der Wirkung von Bumetanid zugesprochen werden kann. Falls die Aktivierung des GPR35 dem Therapieerfolg jedoch tatsächlich dient, wäre es interessant die therapeutische Eignung potenterer hGPR35-Agonisten zu evaluieren.

Im Oktober 2013 wurde mit dem Mastzellstabilisator Lodoxamid einer der potentesten Agonisten des hGPR35 beschrieben.⁴⁹⁸ In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass die Verbindung hochaffin an den Rezeptor bindet (K_i 0.861 nM). Lodoxamid gehört zu einer Gruppe von Antiallergika, deren Wirkmechanismus noch nicht völlig aufgeklärt ist. Weitere verwandte Arzneistoffe wie Amlexanox, Cromoglicinsäure und Doxantrazol aktivieren den GPR35 ebenfalls.^{480,498} In Bindungsstudien wurde gezeigt, dass die genannten Verbindungen mit K_i -Werten im niedrigen mikromolaren Bereich an den Rezeptor binden. Möglicherweise wirken diese Antiallerika also über den hGPR35.^{480,498}

Eine weitere interessante Verbindung ist Pamoasäure. Sie galt lange als pharmakologisch inert. Da die Salze dieser Verbindung schwerlöslich sind, werden einige Arzneistoffe, um eine Depotwirkung zu erreichen, als Pamoate eingesetzt.⁵⁵⁷ Im Jahr 2010 wurde jedoch beschrieben, dass Pamoasäure den GPR35 aktiviert.⁴⁸³ In Bindungsstudien wurde festgestellt, dass die Verbindung mit überraschend hoher Affinität an den Rezeptor bindet (K_i 11.5 nM). Es ergibt sich die Frage, ob Pamoasäure bei Arzneistoffen, die als Pamoate formuliert werden, Nebenwirkungen auslöst oder eventuell sogar von therapeutischem Nutzen ist. In diesem Zusammenhang sind besonders die Anthelminthika Pyrantel- und Pyrvinium-Pamoat interessant. Die vorteilhaften Effekte dieser als Salz der Pamoasäure verabreichten Arzneistoffe wurden auf ihre günstigen physikochemischen Eigenschaften zurückgeführt. Jedoch weisen Endothelzellen des Darms eine sehr hohe GPR35-Expression auf.^{469,474} Aufgrund der hohen Affinität von Pamoasäure ist davon auszugehen, dass der Rezeptor aktiviert wird. Daher ist nicht auszuschließen, dass Pamoasäure den Therapieerfolg beeinflussen könnte. Der GPR35 wird auch von verschiedenen Immunzellen exprimiert und seine Aktivierung moduliert ihre Funktion.^{474,477,480,489} Auch diese Wirkung könnte bei der anthelminthischen Therapie eine Rolle spielen. Jedoch gibt es keine umfassenden Studien dazu, in welchem Ausmaß Pamoasäure resorbiert wird. In zukünftigen Studien sollte überprüft werden, ob und wie die Aktivierung des GPR35 die Wirkung von Arzneimitteln beeinflusst, die Pamoasäure enthalten.

5.2.6.2 Testung von Chromenon-Derivaten

In Bindungsstudien gegen [³H]PSB-13253 wurde die Affinität der zuvor anhand funktioneller Experimente optimierten Chromenon-Derivate bestimmt. Bezieht man alle getesteten Verbindungen (auch die Standardagonisten) ein, so findet man, dass die Affinität der Verbindungen sehr gut mit der in β -Arrestin-Rekrutierungs-Experimenten bestimmten Wirksamkeit korreliert ($r^2 = 0.855$, Ergebnis eines zweiseitigen Pearson-Tests, der dazugehörige Scatterplot ist in Abbildung 5.19 dargestellt. Für den Test wurden nur Verbindungen berücksichtigt, für die ein EC_{50} -Wert bestimmt werden konnte).

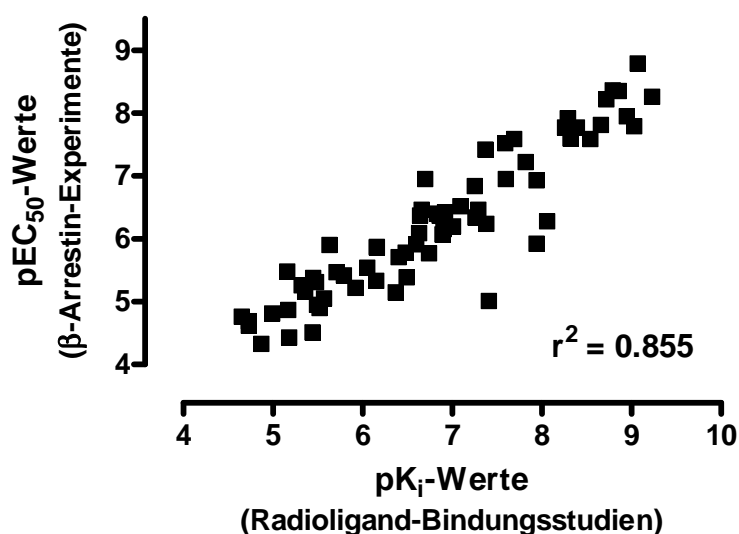
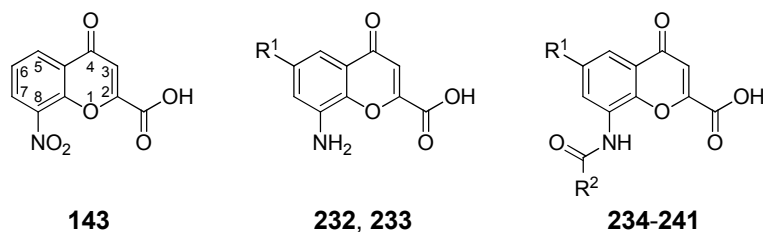


Abbildung 5.19: Scatterplot.

pEC₅₀-Werte von 8-substituierten Chromen-4-on-2-carbonsäure-Derivaten und Standardagonisten wurden gegen ihre pK_i-Werte aufgetragen. r^2 wurde in einem zweiseitigen Pearson-Test bestimmt.

Dementsprechend konnten die in Kapitel 5.2.4.1 diskutierten Struktur-Wirkungs-Beziehungen für die Chromenon-Derivate **143-314** grundsätzlich bestätigt werden (siehe Tabelle 5.18 und Tabelle 5.19). Für die Affinität und die Wirksamkeit erschien ein Wasserstoffbrücken-Akzeptor in 8-Position des Chromenon-Grundgerüsts essentiell (vergleiche **143**, 8-Nitro, K_i 13600 nM, EC₅₀ 46300 nM mit dem inaktiven 8-Amino-Derivat **232**). Die Einführung längerer und voluminöserer Reste (wie z. B. eines Benzamid-Rest, **238**, K_i 3290 nM, EC₅₀ 4910 nM) wirkte sich positiv auf Affinität und Wirksamkeit der Verbindung aus. Die Einführung eines *para*-Hydroxy-Substituenten des 8-Benzamid-Restes (**246**, K_i 221 nM, EC₅₀ 346 nM) und die zusätzliche 6-Bromierung der Chromenon-Kernstruktur (PSB-13253, **263**, K_i 5.18 nM, EC₅₀ 12.1 nM) bewirkten eine weitere Steigerung beider pharmakologischer Parameter.

Tabelle 5.18: Affinität und Wirksamkeit von 8-substituierten Chromen-4-on-2-carbonsäure-Derivaten am humanen GPR35

Verbindung	Struktur		β -Arrestin-Rekrutierungs-Experimente			Radioligand-Bindungsstudien
	R ¹	R ²	EC ₅₀ \pm SEM (μ M) (% Effekt \pm SEM) ^a	E _{max} ^a	(% Inhib. \pm SEM) ^b	K _i \pm SEM (μ M) ^c (% Inhibition \pm SEM)
143			46.3 \pm 3.2	101	-	13.6 \pm 0.7
232	H		(2 \pm 4)	-	(15 \pm 9)	>10 (7 \pm 2)
233	Br		12.6 \pm 1.5	84	-	3.01 \pm 0.30
234	H	Methyl	24.1 \pm 3.3	91	-	18.5 \pm 0.5
235	H	Ethyl	13.4 \pm 3.4	119	-	6.77 \pm 0.80
236	H	2-Methoxy-2-oxoethyl	20.2 \pm 5.7	87	-	18.6 \pm 1.0
237	H	Cyclohexyl	4.20 \pm 0.38	118	-	3.58 \pm 0.26
238	H	Phenyl	4.91 \pm 0.65	107	-	3.29 \pm 0.19
239	H	Benzyl	8.96 \pm 0.43	107	-	2.72 \pm 0.07
240	H	2-Naphthyl	4.67 \pm 1.00	125	-	0.714 \pm 0.041
241	H	2-Chinolinylyl	1.34 \pm 0.06	81	-	0.691 \pm 0.056

^aVorstudien wurden bei einer Konzentration von 10 μ M durchgeführt, Effekte wurden auf das Signal von 30 μ M Zaprinast (entspricht dem Maximaleffekt) normalisiert.

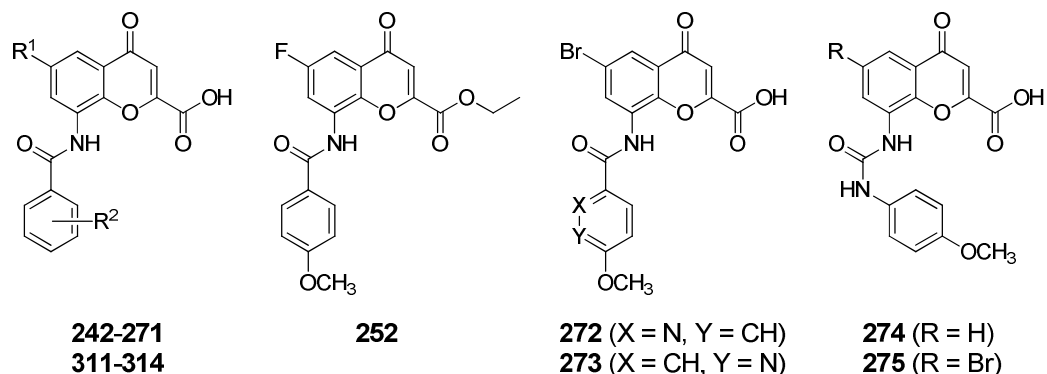
^bInhibition des Effektes induziert durch 5 μ M Zaprinast (\sim EC₈₀).

^cKompetitionsexperimente gegen [³H]PSB-13253.

Damit können die in funktionellen Experimenten bestimmten wesentlichen Struktur-Wirkungs-Beziehungen auch in Bindungsstudien beobachtet werden. Allerdings gab es auch Unterschiede. Bei den unterschiedlich 6-substituierten Verbindungen kann eine ähnliche Tendenz in den Struktur-Wirkbeziehungen für Affinität und Wirksamkeit beobachtet werden: Br (**263**) > Cl (**256**) > OCH₃ (**271**) \sim F (**251**) \sim CH₃ (**270**) > H (**246**). Im direkten Vergleich der genannten substituierten Derivate mit der unsubstituierten Verbindung **246** zeigt sich jedoch, dass Halogen-Substituenten die Affinität doppelt so stark ansteigen lassen wie die Wirksamkeit, während es sich bei den hydrophoben Methyl- und Methoxy-Resten etwa umgekehrt verhält (x-fache Steigerung im Vergleich zu **246**: **251**, 6-F, Wirksamkeit: 3, Affinität: 9; **256**, 6-Cl, Wirksamkeit: 21, Affinität: 40; **263**, 6-Br, Wirksamkeit: 29, Affinität: 43, **270**, 6-CH₃, Wirksamkeit: 9, Affinität: 5; **271**, 6-OCH₃, Wirksamkeit: 14, Affinität: 10). Dies deutet darauf hin, dass der negativ-

induktive Effekt der Halogene eine große Rolle für die hochaffine Bindung der Liganden, während die räumliche hydrophobe Ausdehnung in 6-Position eine entscheidende Rolle für die potente Aktivierung des Rezeptors spielt.

Tabelle 5.19: Affinität und Wirksamkeit von Benzamidchromenon-Derivaten am hGPR35



Verb.	Struktur				β-Arrestin-Rekrutierungs-Experimente		Radioligand-Bindungsstudien
	R ¹	R ²			EC ₅₀ ± SEM (μM)	E _{max} ^a	K _i ± SEM (μM) ^c
		<i>ortho</i>	<i>meta</i>	<i>para</i>			
242	H	H	CH ₃	H	5.44 ± 1.34	70	4.78 ± 0.36
243	H	H	NO ₂	H	6.97 ± 0.30	112	4.39 ± 0.17
244	H	H	H	CH ₃	1.38 ± 0.14	104	0.697 ± 0.033
245	H	H	H	CF ₃	15.5 ± 3.1	81	10.3 ± 0.8
246	H	H	H	OCH ₃	0.346 ± 0.037	104	0.221 ± 0.020
247	H	H	H	Br	0.804 ± 0.148	122	0.233 ± 0.014
248	F	Cl	Cl	H	0.382 ± 0.056	106	0.119 ± 0.004
249	F	Cl	H	Cl	0.0170 ± 0.0017	113	0.00412 ± 0.00009
250	F	H	Cl	Cl	0.117 ± 0.026	131	0.0115 ± 0.0005
251	F	H	H	OCH ₃	0.112 ± 0.011	123	0.0254 ± 0.0023
252					0.112 ± 0.024	80	0.198 ± 0.019
253	Cl	H	H	H	0.430 ± 0.063	115	0.138 ± 0.013
254	Cl	H	CH ₃	H	1.22 ± 0.17	102	0.250 ± 0.012
255	Cl	H	H	NO ₂	1.71 ± 0.16	130	0.183 ± 0.006
256	Cl	H	H	OCH ₃	0.0168 ± 0.0021	110	0.00550 ± 0.00012
257	Br	H	H	H	0.303 ± 0.021	110	0.0816 ± 0.0056
258	Br	H	CH ₃	H	0.842 ± 0.165	138	0.128 ± 0.001
259	Br	H	H	Cl	0.0251 ± 0.0019	115	0.00479 ± 0.00044
260	Br	Cl	H	Cl	0.0164 ± 0.0011	110	0.000938 ± 0.000097
261	Br	H	Cl	Cl	0.0154 ± 0.0030	110	0.00218 ± 0.00005
262	Br	H	H	CN	0.399 ± 0.060	108	0.148 ± 0.014

Tabelle 5.19 (Fortsetzung)

263 , PSB-13253	Br	H	H	OCH ₃	0.0121 ± 0.0010	121	0.00518 ± 0.00033
264	Br	H	H	Ethoxy	0.634 ± 0.076	99	0.0984 ± 0.0017
265	Br	H	H	OH	0.716 ± 0.085	106	0.125 ± 0.009
266	Br	OCH ₃	H	H	1.66 ± 0.28	91	0.331 ± 0.021
267	Br	H	OCH ₃	OCH ₃	0.425 ± 0.075	102	0.228 ± 0.014
268	Br	H		OCH ₂ O	0.0599 ± 0.0042	107	0.0150 ± 0.0015
269	Br	Cl	H	OCH ₃	0.0111 ± 0.0031	120	0.00112 ± 0.00009
270	CH ₃	H	H	OCH ₃	0.0377 ± 0.0036	118	0.0428 ± 0.0032
271	OCH ₃	H	H	OCH ₃	0.0255 ± 0.0027	124	0.0205 ± 0.0022
272					0.144 ± 0.017	115	0.0568 ± 0.0056
273					0.0305 ± 0.0016	117	0.0257 ± 0.0022
274					2.89 ± 0.12	96	0.884 ± 0.043
275					0.458 ± 0.055	110	0.0555 ± 0.0026
311	Cl	F	H	OCH ₃	0.00606 ± 0.00088	111	0.00192 ± 0.00012
312	Br	F	H	OCH ₃	0.00445 ± 0.00030	120	0.00137 ± 0.00011
313	Br	H	F	OCH ₃	0.00437 ± 0.00048	120	0.00164 ± 0.00018
314	Br	di-F	H	OCH ₃	0.00554 ± 0.00029	119	0.000589 ± 0.000076

^aVorstestungen wurden bei einer Konzentration von 10 µM durchgeführt, Effekte wurden auf das Signal von 30 µM Zaprinast (entspricht dem Maximaleffekt) normalisiert.

^bKompetitionsexperimente gegen [³H]PSB-13253.

Ein weiterer Unterschied offenbarte sich beim Vergleich der Verbindungen mit Chlor-Substitutionen am Aromaten des 8-Benzamid-Restes: Während ein Methoxy-Rest vor Chlor-Substituenten in *para*-Position den größten positiven Einfluss auf die Wirksamkeit hatte, wirken sich beide Reste gleichermaßen positiv auf die Affinität aus (vergleiche **263**, *p*-Methoxy, EC₅₀ 12.1 nM, K_i 5.18 nM mit **259**, *p*-Cl, EC₅₀ 25.1 nM, K_i 4.79 nM). Zusätzliche Chlor-Substituenten in *ortho*- oder *meta*-Position hatten einen sehr geringen positiven Einfluss auf die Wirksamkeit der *para*-Chlor-substituierten Verbindung **259** (vergleiche **259** mit **260**, *o,p*-di-Cl, EC₅₀ 16.4 nM, K_i 0.938 nM und **261**, *m,p*-di-Cl, EC₅₀ 15.4 nM, K_i 2.18 nM). Es ist interessant, dass der *ortho*-Chlor-Substituent die Wirksamkeit um den Faktor 1.5, die Affinität jedoch um den Faktor 5 erhöht (vergleiche **259**, *p*-Cl, mit **260**, *o,p*-di-Cl). Ein ähnlicher Effekt eines *ortho*-Chlor-Substituenten lässt sich auch für bei den *para*-Methoxy-substituierten Derivaten beobachten (**263**, *o*-H, EC₅₀ 12.1 nM, K_i 5.18 nM und **269**, *o*-Cl, EC₅₀ 11.1 nM, K_i 1.12 nM): Der Substituent hat praktisch keinen Einfluss auf die Wirksamkeit aber ein sehr vorteilhaften Einfluss auf die Affinität der Verbindung.

Ein *ortho*-Substituent mit negativ induktivem Effekt ist demnach also sehr günstig für die Affinität, aber kaum für die Wirksamkeit der entsprechenden Verbindungen. Aus diesem Grunde wurde die Synthese weiterer *p*-Methoxy-substituierter Derivate vorgeschlagen und durchgeführt, die Fluor-Substitutionen in *ortho*- und *meta*-Positionen aufwiesen (siehe Tabelle 5.19): **311** (6-Cl, *o*-F, K_i 1.92 nM, EC_{50} 6.06 nM), **312** (6-Br, *o*-F, K_i 1.37 nM, EC_{50} 4.45 nM), **313** (6-Br, *m*-F, K_i 1.64 nM, EC_{50} 4.37 nM) and **314** (6-Br, *o,o'*-di-F, K_i 0.589 nM, EC_{50} 5.54 nM). Durch zusätzliche Fluorsubstituenten konnte die Wirksamkeit der Derivate weiter gesteigert werden. Dies deutet daraufhin, dass sich zwar der negativ induktive Effekt von entsprechenden *meta*- und besonders *ortho*-Substituenten positiv auf Wirksamkeit und Affinität auswirkt, voluminösere elektronegative (Chlor-)Substituenten in diesen Positionen aber nicht vorteilhaft bei der Aktivierung des Rezeptors sind. Die Fluor-substituierten Verbindungen **312-314** stellen zusammen mit Lodoxamid die potentesten GPR35-Agonisten dar, die bislang beschrieben wurden.⁴⁹⁸ Mit einem subnanomolaren K_i -Wert handelte es sich bei **314** zudem um den GPR35-Liganden mit der höchsten Affinität (siehe auch Abbildung 5.20). Bemessen an ihren entsprechenden physikochemischen Parametern besitzen PSB-13253 und **312-314** außerdem eine hohe „druglikeness“.^{471,520}

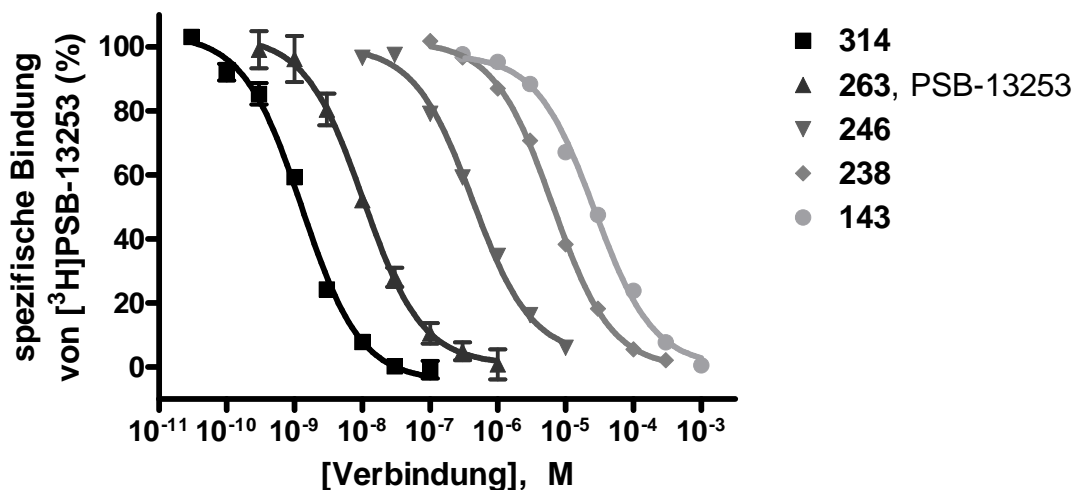


Abbildung 5.20: Kompetitionskurven ausgewählter 8-substituierter Chromenoncarbonsäure-Derivate am humanen GPR35

Die Radioligand-Bindungsstudien wurden bei einer Radioligand-Konzentration von 5 nM und unter Einsatz von Membranpräparationen von CHO-Zellen durchgeführt, in denen der GPR35 zur Expression gebracht wurde. Angegeben sind Mittelwerte aus drei bis vier unabhängigen Experimenten, die in Duplikaten durchgeführt wurden.

Wie schon in funktionellen Experimenten wurde auch in Bindungsstudien die Verbindung **252** untersucht, die ein Ethylester von **251** darstellt (**252**, K_i 198 nM, EC_{50} 112 nM; **251**, K_i 25.4 nM, EC_{50} 112 nM). Dadurch sollte überprüft werden, ob die negative Ladung eine entscheidende Rolle für die Affinität der Chromenon-Derivate spielt. Während die Daten suggerieren, dass die negative Ladung keine Rolle für die Wirksamkeit spielte, schien sie relativ wichtig für die Affinität der Verbindungen zu sein. Wie schon oben diskutiert ist denkbar, dass in den zellbasierten funktionellen Experimenten Esterasen die Verbindung spalten, wodurch **252** in **251** umgewandelt wird. In Bindungsstudien, in denen aufgereinigte Membranfraktionen eingesetzt werden, sind zumindest keine nicht in der Membran verankerten Esterasen vorhanden, was die Beobachtung erklären könnte. Dennoch kann auch in Bindungsstudien die Spaltung des Esters durch Membran-gebundene Esterasen nicht ausgeschlossen werden. Man kann also annehmen, dass die negative Ladung der Verbindungen tatsächlich eine bedeutende Rolle für ihre pharmakologischen Eigenschaften spielt. Wie oben bereits vorgeschlagen, wäre die Testung eines Carbonsäure-Amides allerdings interessant um dies eindeutig zu belegen. Das Amid wäre sowohl metabolisch stabiler und wäre der Carboxygruppe auch sterisch ähnlicher. Schließlich kann auch nicht ausgeschlossen werden, dass der negative Effekt des Ethylesters auf die Affinität von **252** schlicht auf seine größere räumliche Ausdehnung zurückzuführen ist.

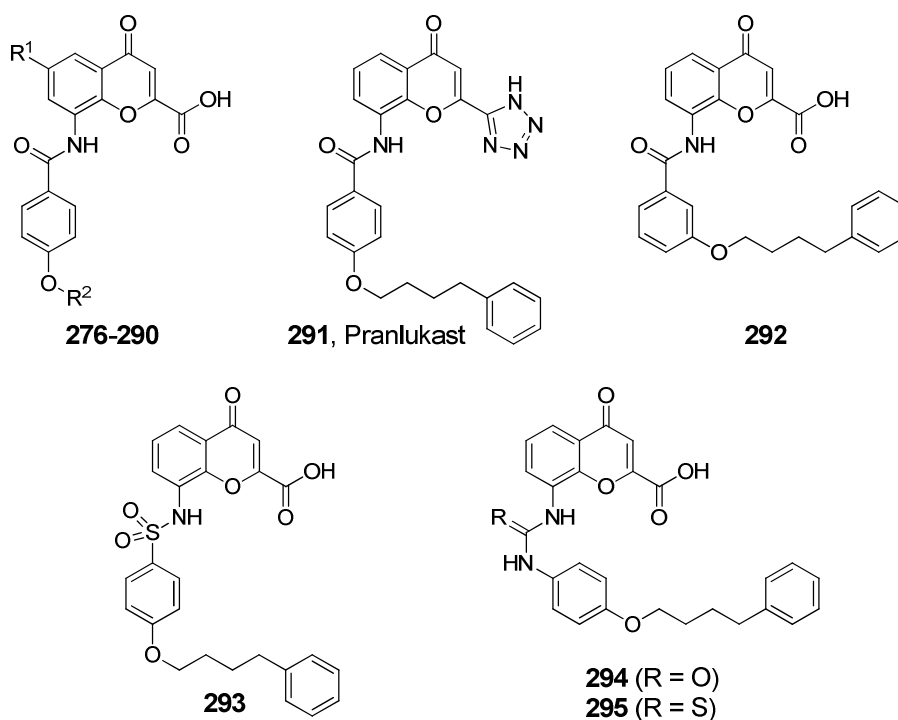


Abbildung 5.21: Strukturformeln Pramlukast-abgeleiteter Chromenoncarbonsäure-Derivate

Testungsergebnisse siehe Tabelle 5.20

Tabelle 5.20: Affinität und Wirksamkeit von Pranlukast-abgeleiteten Chromen-4-on-2-carbonsäure-Derivaten am humanen GPR35

Verbindung	Struktur		β-Arrestin-Rekrutierungs-Experimente		Radioligand-Bindungsstudien
	R ¹	R ²	(% Effekt ± SEM) ^a	IC ₅₀ ± SEM (μM) (% Inhib. ± SEM) ^b	K _i ± SEM (μM) ^c (% Inhibition ± SEM)
276	H	Propyl	(4 ± 2)	(2 ± 5)	8.06 ± 0.22
277	H	Butyl	(8 ± 5)	(-3 ± 2)	3.74 ± 0.44
278	H	Pentyl	(4 ± 2)	(-1 ± 6)	1.15 ± 0.07
279	H	4-Methylpentyl	(1 ± 2)	(1 ± 4)	0.578 ± 0.043
280	H	Heptyl	(0 ± 4)	(2 ± 2)	0.115 ± 0.013
281	H	3,3-Dimethyl-2-oxobutyl	(7 ± 7)	(-9 ± 2)	>10 (13 ± 1)
282	H	Cyclopropylmethyl	(10 ± 3)	(4 ± 2)	3.71 ± 0.43
283	H	2-Cyclohexylethyl	(10 ± 8)	(3 ± 6)	0.380 ± 0.025
284	H	2-Phenylethyl	(26 ± 3)	(-3 ± 5)	1.49 ± 0.12
285	H	3-Cyclohexylpropyl	(-8 ± 9)	(15 ± 2)	0.102 ± 0.004
286	H	3-Phenylpropyl	(2 ± 3)	(-1 ± 7)	0.830 ± 0.060
287	Cl	3-Phenylpropyl	(-3 ± 2)	(10 ± 3)	0.413 ± 0.038^d
288	Br	3-Phenylpropyl	(6 ± 4)	(10 ± 3)	0.343 ± 0.026^d
289	H	3-(4-Methoxyphenyl)propyl	(2 ± 3)	(17 ± 3)	0.217 ± 0.005
290	H	4-Phenylbutyl	(18 ± 3)	(14 ± 5)	0.133 ± 0.011
291 , Pranlukast			(12 ± 2)	(12 ± 4)	0.0407 ± 0.0073
292			(2 ± 5)	(-2 ± 3)	1.06 ± 0.08
293			(-10 ± 4)	266 ± 49^d	1.01 ± 0.10
294			(-26 ± 11)	46.6 ± 3.5	0.102 ± 0.009
295			(2 ± 3)	(-2 ± 4)	0.618 ± 0.049

Die Strukturformeln der hier angegebenen Verbindungen sind in Abbildung 5.21 dargestellt.

^aVortestungen wurden bei einer Konzentration von 10 μM durchgeführt, Effekte wurden auf das Signal von 30 μM Zaprinast (entspricht dem Maximaleffekt) normalisiert.

^bInhibition des Effektes induziert durch 5 μM Zaprinast (~ EC₈₀).

^cKompetitionsexperimente gegen [³H]PSB-13253. Vortestungen wurden bei einer Konzentration von 10 μM durchgeführt.

^dKurve wurde aufgrund mangelnder Löslichkeit der entsprechenden Verbindung bei hohen Konzentrationen extrapoliert.

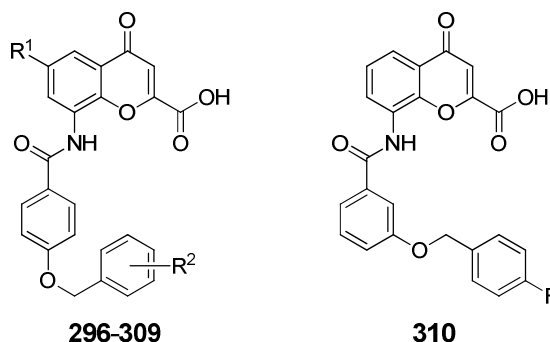
Weitere überraschende Ergebnisse konnten bei der Testung der komplexeren Chromenon-Derivate **276-310** in Bindungsstudien beobachtet werden (siehe Tabelle 5.20 und Tabelle 5.21). Eine Methoxy-Gruppe in *para*-Substitution stellte für die Affinität der 8-Benzamid-Derivate den günstigsten Substituenten dar. Der Austausch gegen eine Ethoxy-Gruppe (vergleiche die 6-bromierten **263** und **264**) war unvorteilhaft. Diese

Beobachtungen trafen auf die Affinität wie auf die Wirksamkeit der Verbindungen zu. Während die weitere Verlängerung der *para*-Alkoxy-Kette in funktionellen Studien nicht toleriert wurde, bewirkte sie überraschenderweise eine Steigerung der Affinität (**246**, Methoxy, K_i 221 nM; **276**, Propoxy, K_i 8060 nM; **277**, Butoxy, K_i 3740 nM; **278**, Pentoxy, K_i 1150 nM). Ein Heptoxy-Rest in der *para*-Position stellte sich sogar als für die Affinität vorteilhafter heraus (**280**, K_i 115 nM), als ein Methoxy-Rest in dieser Position. Der Vergleich von **283** (2-Cyclohexylethoxy, K_i 380 nM) mit **284** (2-Phenylethoxy, K_i 1490 nM) sowie von **285** (3-Cyclohexylpropoxy, K_i 102 nM) mit **286** (3-Phenylpropoxy, K_i 830 nM) verdeutlicht darüber hinaus, dass rein aliphatische Reste in der *para*-Position von 8-Benzamidchromen-4-on-2-carbonsäuren besser toleriert werden als vergleichbare Reste mit weniger flexiblen endständigen Aromaten.

Wie schon bei den Verbindungen mit kürzeren Substituenten in *para*-Position des 8-Benzamid-Restes konnte durch die Halogenierung der 6-Position eine Erhöhung der Affinität erreicht werden, wobei wie schon zuvor ein Brom-Atom den günstigsten 6-Substituenten darstellte (vergleiche **286**, 6-H, K_i 830 nM mit **287**, 6-Cl, K_i 413 nM und **288**, 6-Br, K_i 343 nM). Allerdings fällt dieser Effekt wesentlich moderater aus, als es bei den simpleren Derivaten der Fall war. Dies könnte darauf hindeuten, dass diese Pranlukast-artigen Derivate zwar ähnlich, aber nicht exakt gleich binden wie PSB-13253-artige Derivate.

Weiterhin konnte mit Pranlukast ein neuer hochaffiner GPR35-Ligand identifiziert werden. Interessanterweise war **290**, die dem Pranlukast analoge Carbonsäure, in Bindungsstudien etwas weniger potent (Pranlukast, **291**, K_i 40.7 nM; **290**, K_i 133 nM). Daher scheint ein Tetrazolyl-Rest in 2-Position der Chromenon-Kernstruktur vorteilhafter zu sein, als ein Carboxyl-Rest. Eine ähnliche Beobachtung konnte bereits bei der Wirksamkeit am Ratten-GPR35 gemacht werden (s. o.). Außerdem liegt der K_i -Wert der beiden Antagonisten **293** und **294** wie bei den Standardantagonisten deutlich tiefer als der in funktionellen Experimenten bestimmte IC_{50} -Wert (**293**, IC_{50} 266000 nM, K_i 1010 nM; **294**, IC_{50} 46600 nM, K_i 102 nM).

Genau wie die Pranlukast-artigen Chromenon-Derivate waren auch die meisten der Benzyloxobenzamidochromenon-Derivate **296-310** in funktionellen β -Arrestin-Experimenten inaktiv, banden an den Rezeptor aber mit unerwartet hoher Affinität (siehe Tabelle 5.21).

Tabelle 5.21: Affinität und Wirksamkeit von Benzyloxobenzamidochromen-4-on-2-carbonsäure-Derivaten und Standardagonisten am GPR35

Verbindung	Struktur				β-Arrestin-Rekrutierungs-Experimente			Radioligand-Bindungsstudien
	R ¹	R ²			EC ₅₀ ± SEM (μM) (% Effekt ± SEM) ^a	E _{max} ^a	(% Inhibition ± SEM) ^b	K _i ± SEM (μM) ^c (% Inhibition ± SEM)
		<i>o</i>	<i>m</i>	<i>p</i>				
296	H	H	H	H	(9 ± 4)	-	(2 ± 3)	1.92 ± 0.06
297	H	F	H	H	(12 ± 5)	-	(14 ± 3)	1.56 ± 0.02
298	H	H	F	H	(9 ± 2)	-	(14 ± 7)	1.68 ± 0.07
299	H	H	H	F	(10 ± 2)	-	(0 ± 1)	0.985 ± 0.020
300	H	H	H	Cl	(9 ± 5)	-	(8 ± 4)	0.717 ± 0.047
301	H	H	H	Br	(6 ± 1)	-	(1 ± 2)	0.379 ± 0.025
302	H	H	H	CH ₃	(25 ± 6)	-	(12 ± 2)	0.797 ± 0.025
303	H	H	H	CF ₃	(3 ± 2)	-	(1 ± 2)	0.640 ± 0.035
304	F	H	H	F	(18 ± 5)	-	(9 ± 4)	1.13 ± 0.07
305	Cl	H	H	F	7.08 ± 2.21	73	-	0.427 ± 0.036
306	Cl	H	H	Br	(-3 ± 3)	-	(8 ± 5)	0.350 ± 0.028
307	Br	H	H	F	4.11 ± 1.04	89	-	0.327 ± 0.038
308	Br	H	Br	H	(36 ± 3)	-	(-6 ± 6)	0.265 ± 0.015
309	Br	H	H	Br	(11 ± 4)	-	(5 ± 2)	0.432 ± 0.030
310					(31 ± 1)	-	(4 ± 4)	0.750 ± 0.066^d

^aVortestungen wurden bei einer Konzentration von 10 μM durchgeführt, Effekte wurden auf das Signal von 30 μM Zaprinast (entspricht dem Maximaleffekt) normalisiert.

^bInhibition des Effektes induziert durch 5 μM Zaprinast (~ EC₈₀).

^cKompetitionsexperimente gegen [³H]PSB-13253. Vortestungen wurden bei einer Konzentration von 10 μM durchgeführt.

^dKurve wurde aufgrund mangelnder Löslichkeit der entsprechenden Verbindung bei hohen Konzentrationen extrapoliert.

Fluorsubstitutionen in verschiedenen Positionen des Benzyl-Restes der Verbindungen wurden gut toleriert, steigerten die Affinität der Verbindungen aber kaum im Vergleich zum unsubstituierten Derivat **296** (**296**, K_i 1920 nM; **297**, *o*-F, K_i 1560 nM; **298**, *m*-F, K_i 1680 nM, **299**, *p*-F, K_i 985 nM). Während der Fluor-Substituent in *para*-Position zwar

eine geringe Steigerung der Affinität bedingte, konnte ein größerer Effekt durch die Einführung voluminöserer Halogenatome und anderer Reste erzielt werden, wobei sich für die entsprechend *para*-substituierten Verbindungen folgende Reihenfolge der Affinität ergab: Br (**301**, K_i 379 nM) > CF₃ (**303**, K_i 640 nM) > Cl (**300**, K_i 717 nM) > CH₃ (**302**, K_i 797 nM) > F (**299**, K_i 985 nM) > H (**296**, K_i 1920 nM). Damit scheint die Einführung eines voluminöseren hydrophoben Restes in *para*-Position genauso wichtig zu sein, wie sein negativ induktiver Effekt, der die Elektronendichte im angrenzenden aromatischen System herabsetzt. Auch für diese Gruppe von Verbindungen konnte gezeigt werden, dass Halogene in 6-Position der Kernstruktur die Affinität steigern, wobei wie bei den anderen Chromenon-Derivaten ein Brom-Substituent vorteilhafter war als ein Chlor- oder Fluor-Substituent (**299**, 6-H, K_i 985 nM; **304**, 6-F, K_i 1130 nM; **305**, 6-Cl, K_i 427 nM; **307**, 6-Br, K_i 327 nM). Wie schon bei den Pramlukast-artigen Derivaten war der Effekt aber viel geringer als bei den simpleren Benzamid-Derivaten **242-271**. Ein Brom-Substituent in *meta*-Position erscheint zumindest in Kombination mit einem Brom-Substituenten in 6-Position als die vorteilhafteste Substitution des Benzylrestes (**308**, K_i 265 nM).

Es stellt sich die Frage, wieso die beiden zuletzt besprochenen Gruppen von Verbindungen mit teilweise hoher Affinität an den Rezeptor banden, aber in β -Arrestin-Experimenten weder agonistisch noch antagonistisch wirkten. Die einfachste Erklärung dafür ist, dass es sich um Agonisten mit funktioneller Selektivität handeln könnte. Möglicherweise bewirken sie die Aktivierung des Rezeptors und lösen nur G-Protein-vermittelte Signale aus, ohne gleichzeitig eine β -Arrestin-Rekrutierung auszulösen. In zukünftigen Studien sollte dies überprüft werden. Man muss allerdings berücksichtigen, dass die Verbindungen in funktionellen Experimenten zur Antagonismus-Testung gegen Zaprinast getestet wurden, während sie in Bindungsstudien mit einem anderen Agonisten, nämlich [³H]PSB-13253 um die Bindung an den Rezeptor konkurrierten. Es ist zwar unwahrscheinlich, aber eine Erklärung für die Beobachtungen könnte daher sein, dass die Verbindungen nur gegen PSB-13253, nicht aber gegen Zaprinast antagonistisch wirken. Um diesen Fall auszuschließen, wurden beispielhaft die jeweils affinsten Verbindungen beider Serien auf einen möglichen Antagonismus gegen PSB-13253 in β -Arrestin-Rekrutierungs-Experimenten untersucht (Inhibition der Aktivierung des Rezeptors durch 100 nM PSB-13253 bei einer Konzentration der Testverbindung von 10 μ M, **285**: 3 ± 4 % Inhibition, **308**: 0 ± 4 % Inhibition). Da beide Verbindungen die Rezeptoraktivierung durch PSB-13253 nicht inhibierten, kann davon ausgegangen werden, dass auch ihre Derivate keine Antagonisten darstellen.

Eine weitere mögliche Erklärung für die unerwarteten Ergebnisse könnte sein, dass es sich bei den Verbindungen **276-310** um Partialagonisten handelt. So weisen viele dieser Verbindungen bei 10 μM in funktionellen Experimenten einen geringen Effekt, aber auch eine geringe Inhibition auf. Möglicherweise ist die Efficacy der Verbindungen so gering, dass die Maximalantwort der Verbindungen deutlich unter 50 %, dem Grenzwert zur Bestimmung einer Konzentrations-Wirkungskurve, liegt. Auch für diesen Fall wäre die Testung der Verbindungen in einem anderen funktionellen Experiment interessant: Für Partialagonisten können in einem amplifizierenden Testsystem (wie die Testsysteme zu G-Protein-abhängigen Signalen) häufig eine deutlich höher Efficacy gefunden werden als in nicht-amplifizierenden Testsystemen (wie den β -Arrestin-Rekrutierungs-Experimenten).⁶⁸ Andererseits ist nicht auszuschließen, dass die Wirksamkeit wie bei den Partialagonisten Pamoasäure und Dicoumarol drastisch geringer ist als die Affinität der Verbindungen. Geht man davon aus, dass die zuvor aufgestellte Hypothese zutrifft, dass sich nämlich Partialagonisten wie Pamoasäure in β -Arrestin-Experimenten wie weniger wirksame Vollagonisten verhalten, könnte dies auch erklären, warum die Verbindungen den Effekt von Vollagonisten nicht oder kaum hemmen können.

Weitere Beobachtungen könnten ebenfalls dahingehend gedeutet werden, dass es sich um Partialagonisten handelt: Der für die identifizierten Vollagonisten herausragend wichtige Brom-Substituent in 6-Position hat nur einen sehr geringen Effekt auf die Affinität der funktionell inaktiven Chromenon-Derivate. Möglicherweise liegen die letztgenannten Verbindungen also anders in der Bindungstasche, so dass der Brom-Substituenten an Bedeutung verliert und keine volle Aktivierung des Rezeptors erfolgt. In diesem Zusammenhang wäre es interessant, ob die Einführung eines 6-Brom-Substituenten in die beiden antagonistischen Derivate **293** und **294** einen positiven Effekt auf ihre Affinität hat. Sollte die aufgestellte Hypothese stimmen, könnte man erwarten, dass hier überhaupt kein Effekt zu beobachten ist. Zumindest für die Derivate mit Harnstoff-Linker konnte gezeigt werden, dass sich die intrinsische Aktivität durch die Verlängerung des para-Substituenten am proximalen Phenylrest komplett herabsetzen ließ (vergleiche **274** und **294**). Eine ähnliche Verlängerung des analogen Substituenten bei den Benzamid-Derivaten könnte demnach auch eine Verringerung der intrinsischen Aktivität der Verbindungen hervorrufen. Durch die Testung der Verbindungen in weiteren funktionellen Experimenten könnten die hier aufgestellten Hypothesen überprüft werden.

Eine andere interessante Beobachtung ist die Tatsache, dass an allen aromatischen Ringsystemen (Chromenon-Grundstruktur, 8-Benzamid- und 8-Benzylloxobenzamid-Rest) der getesteten Moleküle ähnliche Substituenten vorteilhaft sind: Brom-, Chlor-,

Fluor-, Methoxy- und Methyl-Substituenten. Dies könnte natürlich Zufall sein, aber in Anbetracht dessen, dass es einige symmetrische bzw. dimere GPR35-Agonisten gibt, wäre es interessant auch eine symmetrische Chromenon-Verbindung zu testen. Gerade weil ein Chinolinyln-Rest (**241**) in funktionellen und Bindungsexperimenten deutlich potenter war als der in den meisten Verbindungen vorliegende Phenylrest (**238**) erscheint die Einführung eines zweiten Chromenon-Grundgerüsts an dieser Position attraktiv. Jedoch ist nicht davon auszugehen, dass dadurch ein ähnlich hochaffiner Agonist wie z. B. PSB-13253 erhalten werden kann.

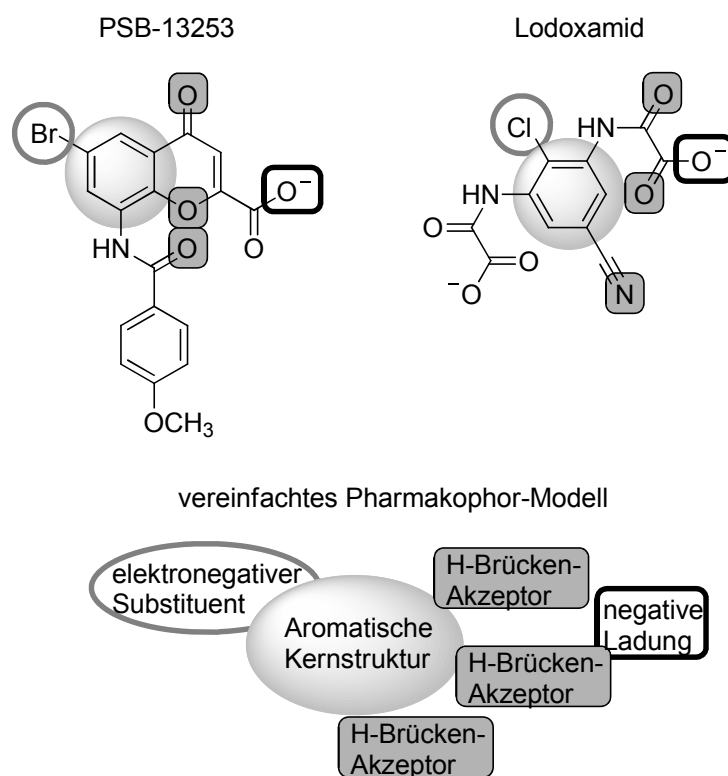


Abbildung 5.22: Vereinfachtes Pharmakophormodell für Kernstrukturen hochpotenter Agonisten des humanen GPR35.

Um Ideen für weitere Optimierungsschritte der hier entwickelten Agonisten zu erhalten, könnte der Vergleich mit anderen potenten Agonisten hilfreich sein. Einer dieser Agonisten ist Lodoxamid. Zwar können die Strukturen von Lodoxamid und PSB-13253 nicht deckungsgleich überlagert werden, aber beide Verbindungen teilen einige Strukturelemente, die sich auch in anderen GPR35-Agonisten finden lassen (siehe Abbildung 5.22). Ein Vergleich beider Strukturen legt nahe, dass eine monocyclische Kernstruktur für die potente Aktivierung des Rezeptors ausreicht. Daher könnte in zukünftigen Synthesearbeiten ein Ring der Chromenon-Grundstruktur geöffnet werden. Außerdem suggeriert der Vergleich, dass Substituenten in 7-Position der Chromenon-

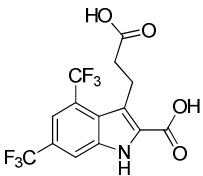
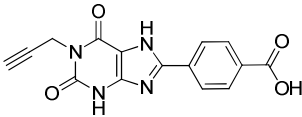
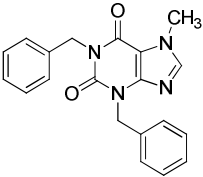
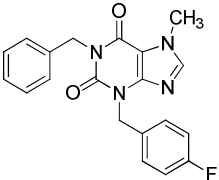
Derivate gut toleriert werden. Natürlich sind die Strukturen nur bedingt vergleichbar, aber es könnte sich lohnen, Schritte in die beschriebenen Richtungen zu unternehmen, auch um potentere Agonisten an den murinen Rezeptoren zu erhalten (Lodoxamid aktiviert den Ratten-GPR35 fast mit der gleichen Wirksamkeit wie den humanen GPR35).⁴⁹⁸

Zusammenfassend kann man sagen, dass die in β -Arrestin-Experimenten bestimmten Struktur-Wirkungs-Beziehungen der 8-Benzamidchromen-4-on-2-carbonsäure-Derivate durch die Bindungsstudien größtenteils bestätigt werden konnten. Anhand der sorgfältigen Analyse der Unterschiede der Ergebnisse aus funktionellen und Bindungsexperimenten konnte mit dem Fluor-substituierten Derivat **314** eine der potentesten Agonisten am hGPR35 entwickelt werden, der zudem mit einem K_i -Wert im subnanomolaren Bereich auch den GPR35-Liganden mit der bislang höchsten Affinität darstellt.

5.2.6.3 Testung weiterer neuer Liganden des humanen GPR35 und sonstiger Verbindungen

Neben den Chromenon-Derivaten wurden in dieser Arbeit auch das Indol-Derivat **176** und das Xanthin-Derivat **229** als hGPR35-Agonisten identifiziert. Außerdem konnte für die beiden Xanthin-Derivate **222** und **223** eine antagonistische Aktivität am hGPR35 festgestellt werden. Diese vier Verbindungen wurden in Bindungsstudien untersucht (siehe Tabelle 5.22 und Abbildung 5.23). Es konnten K_i -Werte bestimmt werden, die sich in derselben Größenordnung bewegten, wie die zuvor bestimmten EC_{50} -Werte. Dies ist besonders für die beiden Antagonisten interessant. In Kontrollexperimenten konnte gezeigt werden, dass sie in dem genutzten System für funktionelle Experimente unspezifische Effekte auslösten (s. o.). Da die Verbindungen den Radioligand verdrängen, kann man davon ausgehen, dass sich die unspezifischen lediglich mit den spezifischen Effekten überlagert haben und es sich bei den Verbindungen tatsächlich um hGPR35-Liganden handelt. Es ist jedoch interessant, dass für die Agonisten keine großen Unterschiede zwischen Wirksamkeit und Affinität gefunden werden konnten, wie es für alle anderen getesteten Antagonisten der Fall war (s. o.). Besonders aufgrund der Erfahrungen mit den Chromenon-Derivaten könnte es sinnvoll sein die komplette Bibliothek von Indol- und Xanthinderivaten in Bindungsstudien zu testen, da möglicherweise auch solche Verbindungen an den Rezeptor binden, die in funktionellen Experimenten inaktiv waren.

Tabelle 5.22: Wirksamkeit & Affinität neu identifizierter GPR35-Liganden am humanen GPR35

Verbindung	Struktur	β -Arrestin-Experimente		Radioligand-Bindungs-Studien ^b
		EC ₅₀ oder IC ₅₀ \pm SEM (μ M) (% Effekt \pm SEM) ^a	E _{max} ^a	K _i \pm SEM (μ M)
Agonisten				
176		17.3 \pm 1.5	74	22.2 \pm 1.6
229		6.04 \pm 1.55	56	1.19 \pm 0.10
Antagonisten				
222		28.3 \pm 1.5		38.6 \pm 2.7^c
223		24.1 \pm 4.3		28.0 \pm 1.6^c

^aAgonisten: Effekte wurden auf das Signal von 30 μ M Zaprinast (entspricht dem Maximaleffekt) normalisiert. Antagonisten: Inhibition des Effektes induziert durch 5 μ M Zaprinast (\sim EC₈₀).

^bKompetitionsexperimente gegen [³H]PSB-13253.

^cKurve wurde aufgrund mangelnder Löslichkeit der entsprechenden Verbindung bei hohen Konzentrationen extrapoliert

Es wurde bereits beschrieben, dass funktionelle cAMP-Akkumulations-Experimente am hGPR35 keine auswertbaren Daten lieferten, obwohl es überzeugende Hinweise darauf gibt, dass der Rezeptor G_i-gekoppelt ist (s. o.). Es ist auszuschließen, dass die für diese funktionellen Experimente genutzten Zellen keine Rezeptorexpression aufwiesen, da diese nicht nur durch einen RT-PCR-Ansatz auf DNA-Ebene, sondern durch Radioligand-Bindungs-Experimente auch auf Proteinebene nachgewiesen werden konnte.

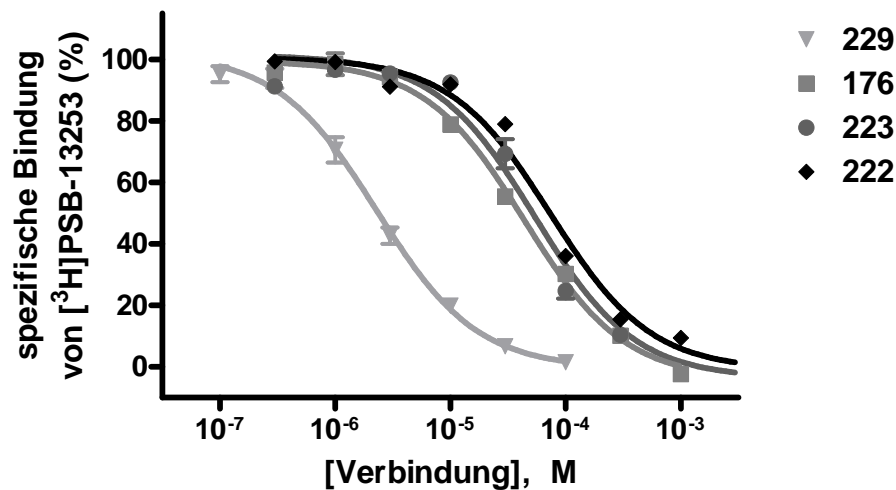


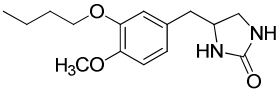
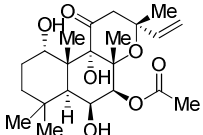
Abbildung 5.23: Kompetitionskurven ausgewählter neu identifizierter Liganden am hGPR35

Die Radioligand-Bindungsstudien wurden bei einer Radioligand-Konzentration von 5 nM und unter Einsatz von Membranpräparationen von CHO-Zellen durchgeführt, in denen der GPR35 zur Expression gebracht wurde. Angegeben sind Mittelwerte aus drei bis vier unabhängigen Experimenten, die in Duplikaten durchgeführt wurden.

Auch unter Verwendung der für β -Arrestin-Rekrutierungsexperimente eingesetzten Zellen, die nachweislich einen funktionalen Rezeptor exprimierten, blieben cAMP-Akkumulationsexperimente erfolglos. Daher wurde die Hypothese aufgestellt, dass möglicherweise zu dem experimentellen System gehörige Verbindungen selbst Liganden des hGPR35 sind. Die in konstanten Mengen zugesetzten Verbindungen Ro20-1724 und Forskolin würden die Experimente stören, wenn es sich dabei um Agonisten (Erhöhung des Hintergrunds und Verschlechterung des Signal:Hintergrund-Verhältnisses) oder Antagonisten (Hemmung der Rezeptoraktivierung) handeln würde. Daten aus funktionellen Experimenten deuteten darauf hin, dass es sich bei Ro20-1724 um einen schwachen Antagonisten und bei Forskolin um einen schwachen Agonisten handeln könnte. Jedoch löste keine der Verbindungen eine Inhibition der Radioligand-Bindung aus (siehe Tabelle 5.23). Möglicherweise hemmt Ro20-1724 nur die durch Zaprinast (und nicht die durch PSB-13253) ausgelöste Rezeptoraktivierung. Allerdings ist der Effekt so schwach, dass man allenfalls eine Verschiebung der Konzentrations-Wirkungskurve und keine komplette Signalhemmung in cAMP-Akkumulationsexperimenten erwarten würde. Außerdem konnte auch mit PSB-13253 keine Konzentrations-Wirkungskurve in cAMP-Akkumulationsexperimenten erhalten werden. Die Bindungsdaten legen nahe, dass Ro20-1724 weder um die gleiche Bindungstasche wie PSB-13253 konkurriert noch einen negativen allosterischen Modulator darstellt, der

die Affinität von Agonisten herabsetzt (in diesem Fall würde man eine deutliche Inhibition der Bindung des agonistischen Radioliganden erwarten). Den geringen agonistischen Effekt von Forskolin in β -Arrestin-Experimenten kann man am besten dadurch erklären, dass die durch Forskolin ausgelöste intrazelluläre Produktion von cAMP die Proteinkinase A aktiviert.⁵ Diese ist in der Lage GPCRs zu phosphorylieren, wodurch die β -Arrestin-Rekrutierung ausgelöst wird.⁵

Tabelle 5.23: Wirksamkeit und Affinität von in cAMP-Akkumulations-Experimenten eingesetzten Verbindungen am humanen GPR35

Verbindung	Struktur	β -Arrestin-Experimente ^a		Radioligand-Bindungs-Studien ^d
		(% Effekt \pm SEM) ^b	(% Inhibition \pm SEM) ^c	$K_i \pm$ SEM (μ M) (% Inhibition \pm SEM)
315 , Ro20-1724		(2 \pm 6)	(22 \pm 6)	>10 (0 \pm 6)
316 , Forskolin		(26 \pm 2)	n. b.	>10 (0 \pm 2)

^aVorstestungen wurden bei einer Konzentration von 10 μ M durchgeführt.

^bEffekte wurden auf das Signal von 30 μ M Zaprinast (entspricht dem Maximaleffekt) normalisiert.

^cInhibition des Effektes induziert durch 5 μ M Zaprinast (\sim EC₈₀).

^dKompetitionsexperimente gegen [³H]PSB-13253.

n. b. nicht bestimmt

Damit bleibt weiterhin unklar, warum der GPR35 nicht anhand von cAMP-Akkumulations-Experimenten untersucht werden kann. Eventuell könnte aber die zumindest in β -Arrestin-Rekrutierungs-Experimenten gefundene hohe Basalaktivität des Rezeptors ursächlich dafür sein. Daraus kann die Verringerung des Signal:Hintergrund-Verhältnisses durch ein hohes Hintergrundsignal resultieren. Zur Überprüfung dieser Hypothese wäre die Testung von inversen Agonisten interessant. Außerdem verursacht eine hochgradige Rekrutierung von β -Arrestin-Molekülen unter Basalbedingungen (und darauf weisen die Ergebnisse aus β -Arrestin-Rekrutierungsexperimenten mit Antagonisten hin) die G-Protein-Entkopplung des Rezeptors. In Zukunft könnte man versuchen, cAMP-Akkumulationsexperimente mit Zellmembranen durchzuführen, die zuvor mit Phosphatasen behandelt wurden, um der vorgeschlagenen G-Protein-Entkopplung entgegen zu wirken.

5.2.6.4 Testung von Zaprinast-Derivaten und -Analoga

Da es sich bei Zaprinast um den Standard-Agonisten des GPR35 handelt, sollten weitere, teilweise strukturell verwandte PDE5-Inhibitoren in Bindungsstudien getestet werden (Tabelle 5.24). Es konnte gezeigt werden, dass es sich bei keiner der getesteten Verbindungen um einen GPR35-Liganden handelte. Da zuvor verschiedene Xanthin-Derivate als GPR35-Liganden identifiziert werden konnten, wurden weitere Xanthin-Derivate in Bindungsstudien getestet, die Zaprinast-Analoga darstellen. Auch unter diesen Verbindungen befanden sich kaum potente GPR35-Liganden (siehe Tabelle 5.25, Tabelle 5.26 und Tabelle 5.27). Ein Grund dafür könnte die Tatsache sein, dass keine der Verbindungen eine Carboxy-Gruppe oder das bei Zaprinast vorliegende, bioisostere Triazolo-Motiv aufwies. Ein weiterer Grund für die geringe Affinität von Zaprinast-abgeleiteten PDE5-Inhibitoren könnte auch die positive Ladung am distalen Stickstoffatom ihrer Piperazin-Reste sein. So weist keine der potenteren GPR35-Liganden eine positive Ladung auf.

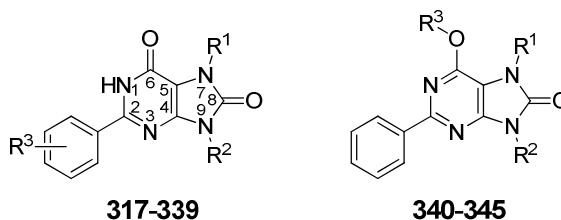
Wenige Purindion- bzw. Purinon-Derivate stellten sich als Liganden am GPR35 mit moderater Affinität heraus. Dazu zählte unter anderem **336** (K_i 5.63 μ M). Bei dieser Verbindung scheint mit einem Butyl-Rest eine günstige Alkylkettenlänge in 7-Position vorzuliegen, da die analoge Verbindung mit einem Propylrest in dieser Position (**321**) bei 10 μ M kaum an den Rezeptor zu binden scheint. Es wäre interessant, ob eine Verlängerung der Alkylkette eine weitere Verbesserung der Affinität bewirkt. In 9-Position wird dagegen kein Alkyl-Substituent toleriert (vergleiche **336** und **337**). Das Sulfonsäure-Derivat **331** ist die einzige Verbindung, die eine negative Ladung aufweist. Allerdings besaß auch diese Verbindung eine geringe Affinität. Durch den Vergleich mit **229** kann man vermuten, dass ein negativ geladener Substituent in 8-Position vorteilhafter wäre.

Die Purinon-Derivate **342**, **343** und **344** waren die einzigen anderen der getesteten Verbindungen, die eine Affinität im einstelligen mikromolaren Bereich aufwiesen. Beim Vergleich von **342** mit **340** wurde deutlich, dass ein Alkylrest in 7-Position (**342** Methyl, **340** H) essentiell für die Bindung des Liganden ist. Es ist interessant, dass **342** mit einem Methylrest in 7-Position und einem Propylrest in 9-Position ähnlich affin war, wie **343**, bei dem das umgekehrte Substitutionsmuster vorliegt. Benzyl-Substituenten in diesen beiden Positionen wurden zumindest in Kombination nicht toleriert (**345**).

Tabelle 5.24: Affinität von PDE5-Inhibitoren zum humanen GPR35

Verbindung	Struktur	$K_i \pm \text{SEM} (\mu\text{M})^a$ (% Inhibition $\pm \text{SEM})^b$
30, Zaprinast		0.401 \pm 0.015
31, Sildenafil		>10 (1 \pm 3)
32, Vardenafil		>10 (-1 \pm 4)
33, Tadalafil		>10 (0 \pm 4)
34, Avanafil		>10 (2 \pm 2)
35, Lodenafil		>10 (-1 \pm 3)
36, Mirodenafil		>10 (1 \pm 3)
37, Udenafil		>10 (-2 \pm 4)
38, Gisadenafil		>10 (0 \pm 4)

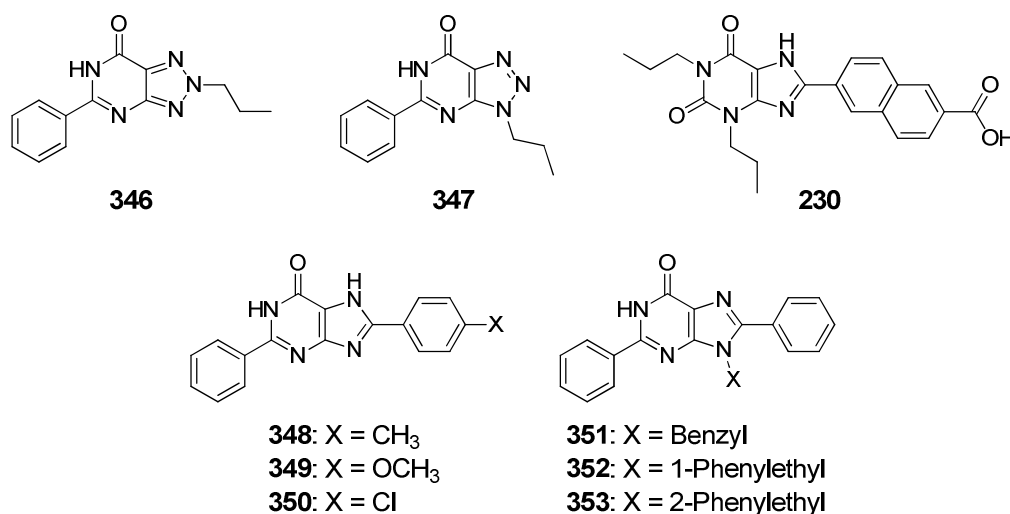
^aKompetitionsexperimente gegen [³H]PSB-13253.^bVorstudien wurden bei einer Konzentration von 10 μM durchgeführt.

Tabelle 5.25: Affinität von 1*H*-Purin-6,8-dion- und 8*H*-Purin-8-on-Derivaten am humanen GPR35

Verbindung	Struktur			K _i ± SEM (μM) ^a (% Inhibition ± SEM) ^b
	R ¹	R ²	R ³	
317	H	Propyl	-	>10 (3 ± 1)
318	Methyl	H	-	>10 (11 ± 5)
319	Methyl	Methyl	-	>10 (22 ± 4)
320	Methyl	Propyl	-	>10 (25 ± 1)
321	Propyl	H	-	>10 (13 ± 3)
322	Propyl	Methyl	-	>10 (34 ± 2)
323	Propyl	Propyl	-	>10 (5 ± 1)
324	Propyl	Propyl	<i>o</i> -Cl	>10 (7 ± 0)
325	Propyl	Propyl	<i>m</i> -Cl	>10 (2 ± 1)
326	Propyl	Propyl	<i>p</i> -Cl	>10 (-4 ± 3)
327	Propyl	Propyl	<i>p</i> -F	>10 (10 ± 2)
328	Propyl	Propyl	<i>p</i> -Methyl	>10 (-17 ± 3)
329	Propyl	Propyl	<i>p</i> -Hydroxy	>10 (3 ± 4)
330	Propyl	Propyl	<i>p</i> -Methoxy	>10 (-2 ± 2)
331	Propyl	Propyl	<i>p</i> -SO ₃ H	>10 (8 ± 3)
332	Propyl	Propyl	<i>p</i> - <i>N,N</i> -Dimethylsulfamoyl	>10 (13 ± 4)
333	Propyl	Propyl	<i>o</i> -Ethoxy	>10 (3 ± 1)
334	Propyl	Benzyl	-	>10 (4 ± 1)
335	Prop-2-ynyl	Prop-2-ynyl	-	>10 (9 ± 3)
336	Butyl	H	-	5.63 ± 0.57^c
337	Butyl	Ethyl	-	>10 (29 ± 2)
338	Benzyl	Propyl	-	>10 (18 ± 1)
339	Benzyl	Benzyl	-	>10 (-20 ± 3)
340	H	Propyl	Benzyl	>10 (14 ± 1)
341	Methyl	Methyl	Methyl	> 10 (22 ± 4)
342	Methyl	Propyl	Benzyl	1.07 ± 0.10^c
343	Propyl	Methyl	Benzyl	1.20 ± 0.02^c
344	Propyl	Propyl	Propyl	1.06 ± 0.09^c
345	Benzyl	Benzyl	Benzyl	>10 (8 ± 0)

^aKompetitionsexperimente gegen [³H]PSB-13253. ^bVorstudien wurden bei einer Konzentration von 10 μM durchgeführt. ^cKurve wurde aufgrund mangelhafter Löslichkeit der entsprechenden Verbindung bei hohen Konzentrationen extrapoliert.

Tabelle 5.26: Affinität von Xanthinderivaten und analogen Verbindungen am humanen GPR35



Verbindung	K _i (μM) ^a (% Inhibition ± SEM) ^b
346	>10 (5 ± 3)
347	>10 (18 ± 2)
230	>10 (33 ± 2)
348	>10 (28 ± 2)
349	>10 (22 ± 3)
350	>10 (13 ± 4)
351	>10 (9 ± 5)
352	>10 (24 ± 6)
353	>10 (37 ± 3)

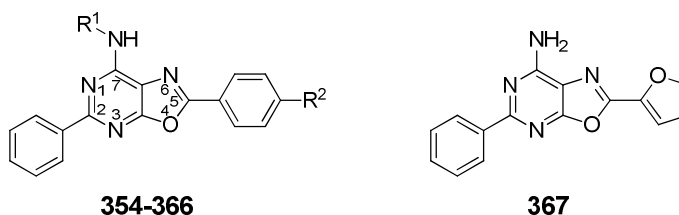
^aKompetitionsexperimente gegen [³H]PSB-13253.

^bVorstestungen wurden bei einer Konzentration von 10 μM durchgeführt.

In 6-Position scheint ein Phenylmethoxy-Rest (**342**, **343**) genauso toleriert zu werden wie ein Propoxy-Rest (**344**). Leider kann wegen mangelnder Vergleichbarkeit der Verbindungen nicht festgestellt werden, welcher der beiden Reste günstiger ist. Auffällig ist, dass sich die Struktur-Wirkungs-Beziehungen der Purindione deutlich von denen der Purinone zu unterscheiden scheinen. Daher ist davon auszugehen, dass die Verbindungen beider Gruppen unterschiedlich in der Ligandenbindungstasche liegen.

Obwohl in dieser Testungsreihe keine potenten GPR35-Liganden identifiziert wurden, konnte doch gezeigt werden, dass es unter allen in dieser Arbeit getesteten Xanthin-Derivaten einige wenige mögliche Leitstrukturen gibt, die ein Startpunkt für die weitere Optimierung darstellen könnten.

Tabelle 5.27: Affinität von Oxazolopyrimidin-Derivaten am humanen GPR35



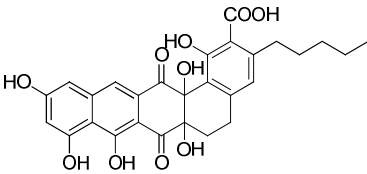
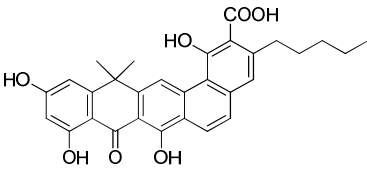
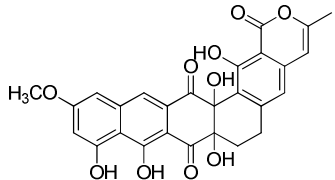
Verbindung	Struktur		K _i (μM) ^a (% Inhibition ± SEM) ^b
	R ¹	R ²	
354	H	H	>10 (2 ± 1)
355	H	Cl	>10 (-3 ± 4)
356	H	OCH ₃	>10 (-1 ± 4)
357	CH ₃	H	>10 (31 ± 4)
358	1-Oxoethyl	H	>10 (-2 ± 1)
359	Propyl	H	~10 (47 ± 2)
360	Benzyl	H	>10 (18 ± 2)
361	Benzoyl	H	>10 (-28 ± 1)
362	1-Phenylethyl	H	>10 (24 ± 2)
363	2-Phenylethyl	H	>10 (21 ± 2)
364	2-Phenylpropyl	H	>10 (19 ± 1)
365	Ethylaminooxomethyl	H	>10 (-3 ± 2)
366	Oxo-1-(phenylamino)methyl	H	>10 (0 ± 3)
367			>10 (15 ± 2)

^aKompetitionsexperimente gegen [³H]PSB-13253. ^bVortestungen wurden bei 10 μM durchgeführt.

5.2.6.5 Testung von GPR55- und Cannabinoid-Rezeptor-Liganden

In funktionellen Experimenten und Bindungsstudien wurde eine Reihe von GPR55- und Cannabinoid-Rezeptor-Liganden am hGPR35 getestet. In einer ersten Testungsreihe wurde die Wirksamkeit und Affinität von Polyketiden untersucht (Tabelle 5.28). Viktor Rempel konnte zeigen, dass diese Verbindungen Liganden der oben genannten Rezeptoren darstellen. Es zeigte sich, dass Precollinon ein neuer Partialagonist am hGPR35 ist. Auch bei Benarhodin A schien es sich um einen Partialagonisten mit niedriger Wirksamkeit zu handeln, während Benastatin A ein schwacher Antagonist am hGPR35 zu sein schien. In Bindungsstudien konnte bestimmt werden, dass alle Verbindungen mit einem K_i-Wert im niedrigen mikromolaren Bereich an den Rezeptor banden.

Tabelle 5.28: Wirksamkeit und Affinität von Polyketiden am humanen GPR35

Verbindung	Struktur	β -Arrestin-Experimente ^a			Radioligand-Bindungs-Studien ^d
		$EC_{50} \pm SEM$ (μM) (% Effekt $\pm SEM$) ^b	E_{max} ^b	(% Inhib. $\pm SEM$) ^c	$K_i \pm SEM$ (μM)
368 , Benarhodin A		(11 \pm 4)	-	(23 \pm 4)	2.48 \pm 0.20
369 , Benastatin A		(-23 \pm 4)	-	(58 \pm 7)	5.92 \pm 0.57
370 , Precollinon		3.32 \pm 0.31	63	-	6.91 \pm 0.68

^aVorstudien wurden bei einer Konzentration von 10 μM durchgeführt.

^bEffekte wurden auf den Effekt von 30 μM Zaprinast normalisiert. Dieser entspricht dem Maximaleffekt.

^cInhibition des Effektes induziert durch 5 μM Zaprinast ($\sim EC_{80}$).

^dKompetitionsexperimente gegen [³H]PSB-13253.

n. b. nicht bestimmt

Allerdings müssen die Ergebnisse mit Vorsicht interpretiert werden, da die Verdünnungen von Benarhodin A und Benastatin A eine intensive Farbe haben. Die Detektion in beiden experimentellen Systemen beruht auf der Messung von Licht. Dieses könnte durch die intensive Farbe der Testverbindungen „gequencht“ werden. Damit besteht die Gefahr, dass die Verbindungen in funktionellen Experimenten fälschlicherweise als Antagonisten und in Bindungsstudien fälschlicherweise als Liganden identifiziert werden. Damit kann nur mit Sicherheit gesagt werden, dass es sich bei Precollinon um einen Agonisten handelt, dessen Efficacy aber möglicherweise durch seine intensive Farbe geringer erschien als sie ist. Insbesondere bei Bindungsstudien ist es schwierig, Kontrollversuche durchzuführen, da nicht der gleiche Anteil der Verbindung die im Reaktionsgemisch vorliegt auch auf dem Filter zurückbleibt. Die Tatsache, dass jedoch überhaupt ein farbiger Rückstand auf dem Filter verbleibt spricht andererseits dafür, dass die entsprechende Verbindung an den Rezeptor gebunden hat und deshalb zurückgehalten wurde. Für die Bestätigung der erhobenen Daten wäre daher die

Testung anhand eines weiteren experimentellen Systems wünschenswert, dessen Detektionsmethodik nicht durch die optische Dichte der Testverbindung beeinflusst wird. Abgesehen von der Ungewissheit über artifizielle Einflüsse auf diese Ergebnisse ist es schwierig Struktur-Wirkungs-Beziehungen zu erkennen, weil die Zahl an Derivaten zu gering, die Zahl ihrer strukturellen Unterschiede dagegen zu hoch ist.

In einer weiteren Testreihe wurden Cannabinoid-Rezeptor-Liganden (oder Verbindungen die das Endocannabinoid-System beeinflussen), die teilweise auch GPR55-Liganden darstellen, getestet (Tabelle 5.29). In funktionellen Experimenten erschienen alle Verbindungen als inaktiv. Eine andere Gruppe fand für einen Großteil der getesteten Verbindungen bereits ähnliche Ergebnisse in β -Arrestin-Rekrutierungs-Experimenten.⁴⁸³ Jedoch zeigte sich in Bindungsstudien, dass einzelne Verbindungen mit moderater Affinität an den hGPR35 banden. Darunter befand sich neben Δ^9 -THC auch CP 55,940, Rimonabant, AM251, AM281, *N*-Oleoyl-Serin, *N*-Arachidonyl-Glycin, 2-Arachidonyl-Glycerol, Arachidonyl-2'-Chlor-Ethylamid, AM404, Honokiol und die Magnolol-Derivate **388-392**.

Es ist überraschend, dass diese Verbindungen zwar an den Rezeptor zu binden schienen, aber in funktionellen Experimenten weder agonistisch noch antagonistisch wirkten. Eine ähnliche Beobachtung konnte jedoch bereits für Chromenon-Derivate gemacht werden. Der einfachste Erklärungsansatz wäre auch hier, dass es sich um Agonisten mit funktioneller Selektivität handelt, die keinen Einfluss auf die β -Arrestin-Rekrutierung haben. Wie bei den Chromenon-Derivaten wurde für Δ^9 -THC und AM404 als die potentesten Liganden beispielhaft überprüft, ob sie die Rezeptoraktivierung durch PSB-13253 (also die unmarkierte Form des Radioliganden) hemmen. Dies war jedoch nicht der Fall (Inhibition der Rezeptoraktivierung durch 100 nM PSB-13253 bei 10 μ M der Testverbindung: Δ^9 -THC -6 ± 2 % Inhibition, AM404 -7 ± 3 % Inhibition).

Tabelle 5.29: Wirksamkeit und Affinität ausgewählter Cannabinoid-Rezeptor- und GPR55-Liganden am humanen GPR35

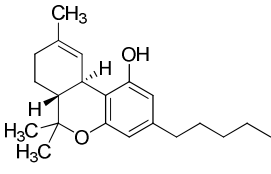
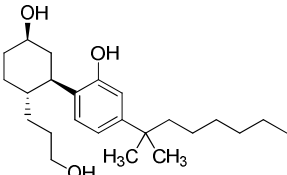
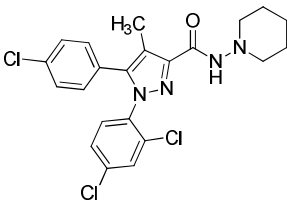
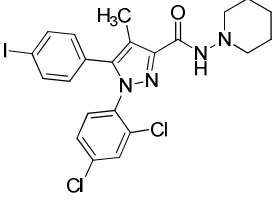
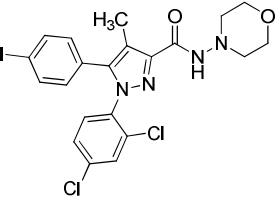
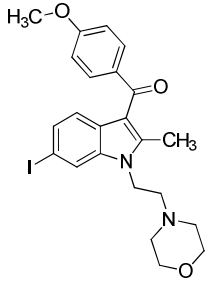
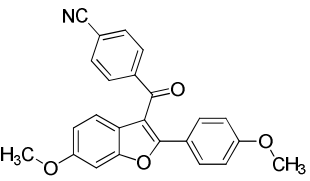
Verbindung	Struktur	β-Arrestin-Experimente ^a		Radioligand-Bindungs-Experimente ^d
		(% Effekt ± SEM) ^b	(% Inhibition ± SEM) ^c	K _i ± SEM (μM) (% Inhibition ± SEM) ^a
371, Δ ⁹ -THC		(12 ± 8)	(-8 ± 3)	0.929 ± 0.013
372, CP 55,940		(4 ± 2)	(4 ± 2)	2.81 ± 0.31
373, Rimonabant		(-7 ± 1)	(23 ± 3)	2.17 ± 0.06^e
374, AM251		(-4 ± 2)	(15 ± 7)	1.28 ± 0.13^e
375, AM281		(-3 ± 3)	(18 ± 3)	(43 ± 3)
376, AM630		(6 ± 3)	(-6 ± 3)	(30 ± 3)
377, LY 320135		(-1 ± 2)	(5 ± 3)	(21 ± 6)

Tabelle 5.29 (Fortsetzung)

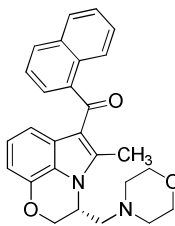
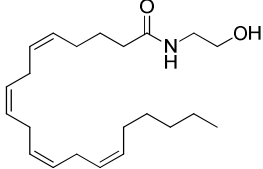
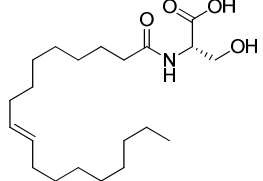
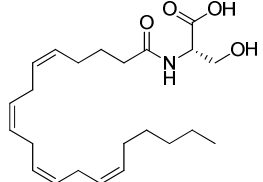
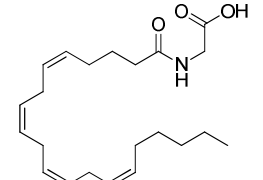
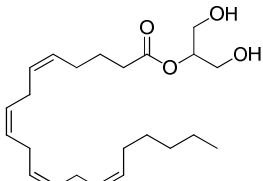
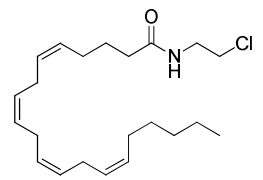
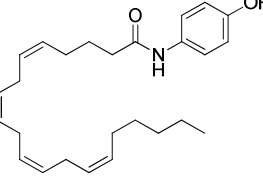
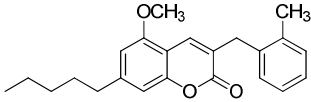
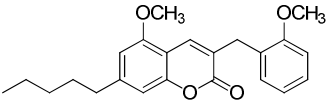
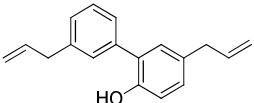
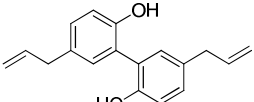
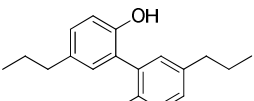
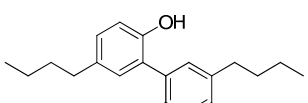
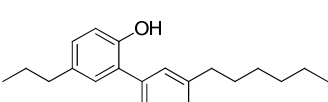
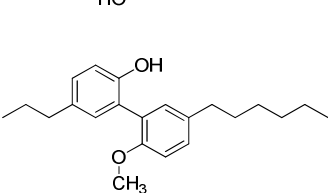
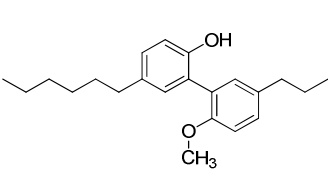
378, WIN 55,212-2		(9 ± 0)	(-10 ± 3)	(24 ± 2)
379, Anandamid		(25 ± 7)	(-16 ± 7)	(24 ± 5)
380, N-Oleyl-Serin		(-5 ± 1)	(-3 ± 3)	1.33 ± 0.17
381, N-Arachidonyl-L-Serin		(0 ± 4)	(-5 ± 3)	(38 ± 2)
382, N-Arachidonyl-Glycin		(8 ± 1)	(-9 ± 3)	1.17 ± 0.13
383, 2-Arachidonyl-Glycerol		(-1 ± 2)	(-5 ± 3)	1.75 ± 0.15
384, Arachidonyl-2'-Chlor-Ethylamid		(1 ± 2)	(-4 ± 2)	5.04 ± 0.35^e
385, AM404		(11 ± 7)	(-9 ± 2)	0.697 ± 0.078
203		(-3 ± 2)	(15 ± 2)	(35 ± 3)

Tabelle 5.29 (Fortsetzung)

204		(0 ± 1)	(13 ± 3)	(42 ± 4)
386, Honokiol		(0 ± 3)	(-4 ± 3)	5.84 ± 0.34^e
387, Magnolol		(1 ± 2)	(-5 ± 5)	(28 ± 6)
388		(2 ± 2)	(-9 ± 3)	3.32 ± 0.22
389		(2 ± 1)	(-4 ± 1)	3.04 ± 0.28
390		n. b.	n. b.	2.39 ± 0.13^e
391		n. b.	n. b.	1.88 ± 0.17
392		n. b.	n. b.	1.98 ± 0.20

^aVorstudien wurden bei einer Konzentration von 10 µM durchgeführt.

^bEffekte wurden auf den Effekt von 30 µM Zaprinast normalisiert. Dieser entspricht dem Maximaleffekt.

^cInhibition des Effektes induziert durch 5 µM Zaprinast (~ EC₈₀).

^dKompetitionsexperimente gegen [³H]PSB-13253.

^eKurve wurde aufgrund mangelhafter Löslichkeit der entsprechenden Verbindung bei hohen Konzentrationen extrapoliert.

n. b. nicht bestimmt

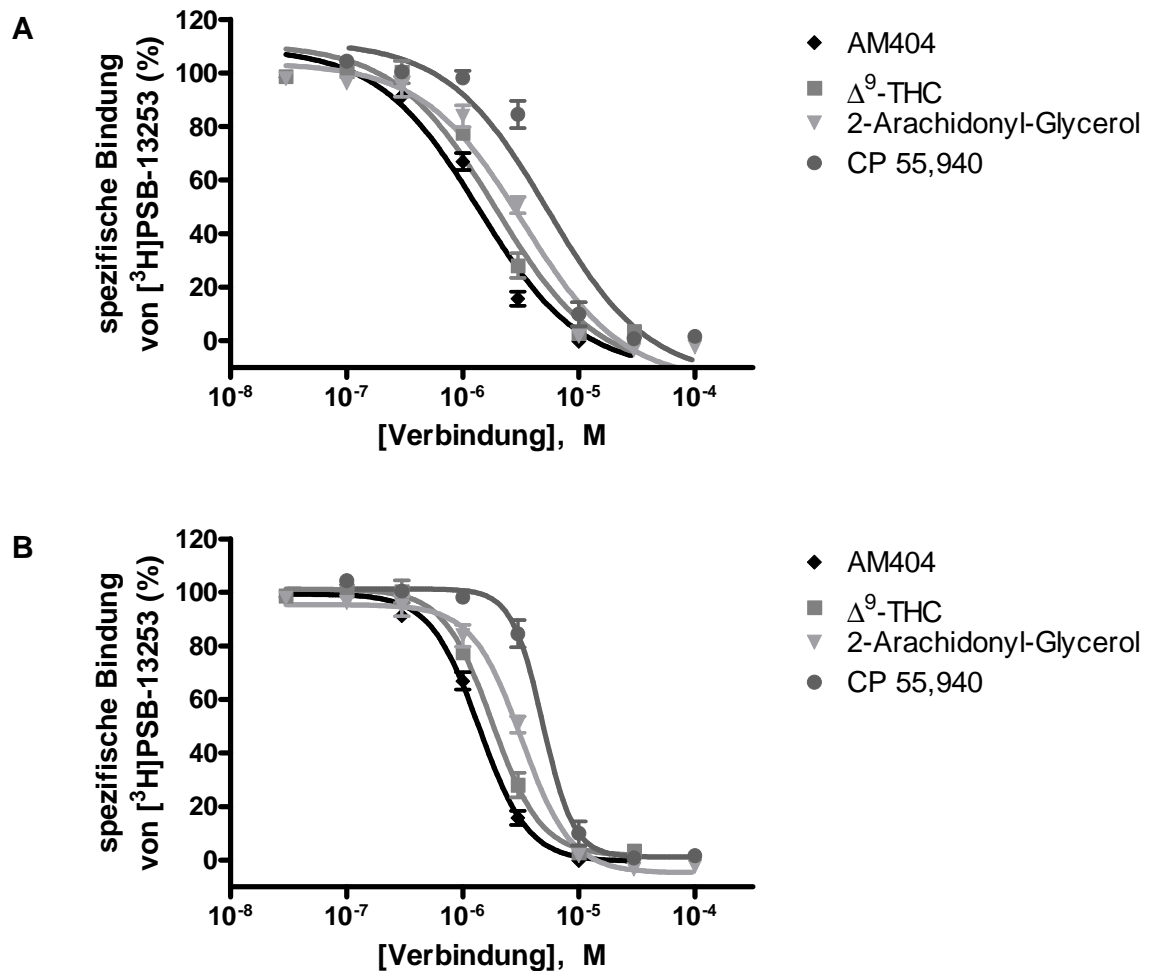


Abbildung 5.24: Kompetitionskurven ausgewählter Cannabinoid-Rezeptor Liganden bzw. Modulatoren des Endocannabinoid-Systems am humanen GPR35.

(A) Die Daten wurden standardmäßig mit einem festgelegten Hill-Slope von -1 ausgewertet. (B) Für die Auswertung der Daten wurde kein konstanter Hill-Slope festgelegt. Die Radioligand-Bindungsstudien wurden bei einer Radioligand-Konzentration von 5 nM und unter Einsatz von Membranpräparationen von CHO-Zellen durchgeführt, in denen der GPR35 zur Expression gebracht wurde. Angegeben sind Mittelwerte aus drei bis vier unabhängigen Experimenten, die in Duplikaten durchgeführt wurden.

Während diese Beobachtung zwar unerwartet war, aber leicht zu erklären ist, gab es einen weiteren sehr überraschenden Aspekt dieser Ergebnisse: Die Inhibitionskurven konnten nur unzureichend durch die standardmäßig für Auswertung von Bindungsdaten eingesetzte Gleichung beschrieben werden. Genauer gesagt weisen die Inhibitionskurven keinen wie sonst üblichen Hill-Slope von -1 auf, sondern sind mit einem Hill-Slope von etwa -2 deutlich steiler (siehe Abbildung 5.24). Diese für Bindungsstudien sehr selten gemachte Beobachtung deutet (sofern man einen Artefakt ausschließt) auf einen positiv kooperativen Effekt bei der Bindung der Liganden hin. Der Ligand hat also theoretisch mehrere Bindungsstellen an einem Rezeptor-Molekül. Die Bindung an eine

Bindungsstelle erhöht dann allosterisch die Affinität der anderen Bindungsstelle. Damit müssten die getesteten Verbindungen sowohl an eine allosterische als auch an die durch den Radioligand besetzte orthosterische Bindungsstelle binden. Es wäre jedoch ein großer Zufall, wenn die hier getesteten strukturell deutlich unterschiedlichen Verbindungen alle an beide Bindungsstellen binden würden. Man könnte sich vorstellen, dass nur eine allosterische Bindungsstelle adressiert wird, die die Affinität des Radioliganden herabsetzt. In diesem Fall wäre aber ein Antagonismus gegen PSB-13253 in funktionellen Experimenten zu erwarten. Es könnte auch sein, dass der GPR35 in Oligomeren vorliegt und dass die untersuchten Verbindungen nach der Bindung an der orthosterischen Bindungsstelle eines Rezeptors eine Konformationsänderung hervorruft, die die anderen im Oligomer vorliegenden Rezeptoren so allosterisch moduliert, dass die Affinität dieser Rezeptoren für die entsprechende Verbindung erhöht ist. Da in beiden Experimenten CHO-Zellen eingesetzt wurden, kann man Heterooligomere zwischen GPR35 und CB-Rezeptoren ausschließen, da dieses Expressionssystem standardmäßig als hintergrundfreies System zur heterologen Expression von CB-Rezeptoren genutzt wird und damit keine endogenen CB-Rezeptoren exprimiert werden.^{525,558}

Für diese Reihe von Verbindungen wäre ein weiteres Testsystem hochinteressant, um ausschließen zu können, dass es sich bei den in Bindungsstudien gemachten Beobachtungen schlicht um Artefakte handelt. Aufgrund des veränderten Hill-Slope der Kurven ist es eigentlich nicht sinnvoll K_i -Werte zu berechnen. Die Werte sind zur Orientierung dennoch in Tabelle 5.29 angegeben (und wurden anhand der standardmäßigen Gleichung berechnet, in der ein Hill-Slope von -1 festgesetzt wurde). Unter der Voraussetzung, dass es sich nicht um Artefakte handelt, sind die Ergebnisse sehr interessant. Seit langem wird nach weiteren Cannabinoid-Rezeptoren gesucht.⁵⁵⁹ Sofern sich in weiteren funktionellen Experimenten herausstellt, dass Δ^9 -THC und Endocannabinoide wie 2-Arachidonyl-Glycerol Agonisten sind, würde es sich beim GPR35 definitionsgemäß um einen (niedrig-affinen) CB-Rezeptor handeln.⁵⁵⁹

Die meisten der getesteten Verbindungen weisen am hGPR35 eine deutlich geringere Affinität auf, als an den CB-Rezeptoren (mit K_i -Werten im größtenteils einstelligen nanomolaren Bereich).⁵⁵⁹ Falls der GPR35 überhaupt für die Pharmakologie dieser Verbindungen eine Rolle spielt, ist diese den CB-Rezeptoren klar untergeordnet. Eine interessante Ausnahme stellt aber AM404, ein Paracetamol-Metabolit, dar.⁵⁶⁰ Diese Verbindung bindet nur mit geringer Affinität an den CB₁-Rezeptor (Rattenhirnmembranen, K_i 1760 nM).^{559,561} Ein größerer Effekt auf das Endocannabinoid-System kommt wahrscheinlich durch die Hemmung von Anandamid-Transportern

zustande.⁵⁶² Allerdings weist AM404 auch an diesem Transporter eine relativ geringe Wirksamkeit auf (IC_{50} in Neuronen der Ratte 1000 μ M).⁵⁶² Außerdem hemmt AM404 mit geringer Potenz spannungsgesteuerte L-Typ-Calciumionen-Kanäle (IC_{50} in Skelettmuskelzellen der Ratte 3200 nM).⁵⁶³ AM404 weist nur an TRPV1-Rezeptoren, an denen es agonistisch wirkt, eine höhere Wirksamkeit auf (EC_{50} 50.1 nM).⁵⁶⁴ Es wird angenommen, dass der analgetische Effekt von AM404 auf die Wirkung an TRPV1-Rezeptoren zurückzuführen ist.⁵⁶⁵ Interessanterweise wurde gezeigt, dass ein Großteil der TRPV1-positiven Neuronen der Dorsalganglien von Ratten auch den GPR35 exprimieren.⁴⁷⁶ Weiterhin gibt es Hinweise darauf, dass die Aktivierung des GPR35 analgetische Effekte vermittelt.^{475,483,516} Geht man davon aus, dass AM404 ein Agonist des GPR35 ist, der zudem funktionelle Selektivität aufweist und dadurch möglicherweise nicht zu einer Rezeptorsensibilisierung führt, könnte seine analgetische Wirkung teilweise auch über den GPR35 vermittelt werden (K_i 697 nM).

Ein weiterer interessanter Fund ist, dass Magnolol-Derivate an den GPR35 binden. Obwohl aufgrund minimaler Unterschiede zwischen ihrer Affinität keine klaren Struktur-Wirkungs-Beziehungen erkannt werden konnten, so schien die Verlängerung der beiden Alkylsubstituenten als tendenziell günstig für die Affinität der Verbindungen. Es wäre interessant, weitere Derivate zu testen, die in einer internen Substanzbibliothek vorliegen. Die nächsten Schritte in diesem Projekt müssen sich aber damit befassen die Ergebnisse aus Bindungsstudien in einem funktionellen Experiment zu bestätigen. Interessant dafür wären Experimente, bei denen G-Protein-vermittelte Signalwege untersucht werden, also GTP γ S-Bindungsexperimente oder Calciummobilisations-Experimente unter Coexpression chimärer oder promiskuitiver G-Proteine. Möglicherweise können diese Experimente auch wichtige Hinweise liefern, die die Interpretation der ungewöhnlich steilen Kompetitionskurven erleichtern.

5.2.7 Zusammenfassung

Bei der Testung ausgewählter Verbindungen aus einer internen Substanzbibliothek konnten die Xanthin-Derivate **222** und **223** als neue Antagonisten und neben der Indolcarbonsäure **176** auch die Xanthincarbonsäure **229** sowie die simple Chromenoncarbonsäure **143** als neue Agonisten des humanen GPR35 identifiziert werden. Diese Verbindungen wiesen jedoch nur moderate Wirksamkeit am hGPR35 auf. **143** wurde als Leitstruktur ausgewählt und schrittweise optimiert: Mit dem 8-Benzamid-

chromen-4-on-2-carbonsäure-Derivat PSB-13253 konnte ein hochpotenter hGPR35-Agonist entwickelt werden. Es konnte gezeigt werden, dass PSB-13253 hochgradig selektiv gegenüber dem eng verwandten humanen GPR55 war. Die Verbindung war darüber hinaus auch Spezies-selektiv. Mit dem Chromenon-Derivat **265** konnte jedoch auch eine Verbindung entwickelt werden, die die murinen und den humanen GPR35-Orthologen mit gleicher Wirksamkeit aktivierte.

Es konnte gezeigt werden, dass Tritium-markierte PSB-13253 mit hoher Affinität an den hGPR35 band. Damit konnte mit [³H]PSB-13253 der erste Radioligand für diesen Orphan-Rezeptor entwickelt werden. Nach der umfassenden Charakterisierung des Radioliganden wurde zum ersten Mal die Affinität ausgewählter GPR35-Liganden bestimmt. Durch die sorgfältige Analyse der Bindungsdaten konnten darüber hinaus weitere PSB-13253-Derivate entwickelt werden, die eine noch höhere Wirksamkeit und Affinität am hGPR35 aufwiesen: Die Fluor-substituierten PSB-13253-Derivate **312-314** gehören zu den potentesten hGPR35-Agonisten, die bislang beschrieben wurden. **314** hat darüber hinaus mit einem K_i-Wert im subnanomolaren Bereich die höchste Affinität unter allen getesteten GPR35-Liganden. Im Vergleich zur ersten Leitstruktur konnten damit Wirksamkeit und Affinität der Verbindungen um mehr als den Faktor 8000 gesteigert werden. Sowohl [³H]PSB-13253 als auch die hochpotenten Verbindungen **312-314** stellen wichtige pharmakologische Werkzeuge dar, die das Potenzial haben, die Erforschung des Orphan-Rezeptors GPR35 maßgeblich voranzutreiben.

6 Zusammenfassung

In der vorliegenden Arbeit wurden G-Protein-gekoppelte Purin- und verwandte Waisen-Rezeptoren untersucht. Dabei stand die Charakterisierung bzw. die Entwicklung und Optimierung potenter und selektiver Liganden dieser Rezeptoren im Vordergrund.

6.1 Adenin-Rezeptoren

Adenin-Rezeptoren (AdeR) stellen eine neue und wenig erforschte Klasse G-Protein-gekoppelter Rezeptoren dar, die u. a. eine Rolle bei der Schmerzwahrnehmung spielen und neuroprotektive Effekte vermitteln könnten.^{78,182,183,281} Obwohl es zahlreiche Hinweise auf die Existenz weiterer Vertreter dieser Klasse von Rezeptoren gibt, konnten bislang nur drei Adenin-Rezeptoren identifiziert werden: ein Rezeptor der Ratte (rAdeR) und zwei Rezeptoren der Maus (mAde1R und mAde2R).^{78,84,271} Bindungsdaten und die Ergebnisse funktioneller Experimente deuteten darauf hin, dass CHO-Zellen einen endogenen Adenin-Rezeptor exprimieren.^{84,267} In der vorliegenden Arbeit konnte ein solcher **neuer Adenin-Rezeptor** des Chinesischen Streifenhamsters identifiziert und charakterisiert werden, der **cAdeR** genannt wurde (c steht für die Spezies *Cricetulus griseus*).

Nachdem die cDNA des cAdeR identifiziert und kloniert wurde, erfolgte die Expression des Rezeptors in Sf9-Insektenzellen. Mit Membranpräparationen dieser Zellen konnten Radioligand-Bindungsstudien durchgeführt werden. Es wurde gezeigt, dass

- Membranpräparationen cAdeR-exprimierender Zellen **Adenin mit hoher Affinität und Kapazität binden** (K_D 301 nM, B_{max} 17.7 pmol/mg Protein);
- der cAdeR die meisten **Veränderungen des Adenin-Moleküls** nicht oder **nicht gut toleriert**. Während lediglich 2-Fluoradenin eine höhere Affinität als Adenin zum cAdeR aufweist, führt die Einführung von Substituenten in anderen Positionen zu einer z. T. drastischen Verringerung der Affinität;
- der cAdeR damit ähnliche, aber nicht identische Struktur-Wirkungs-Beziehungen wie die anderen Nager-AdeR aufweist.

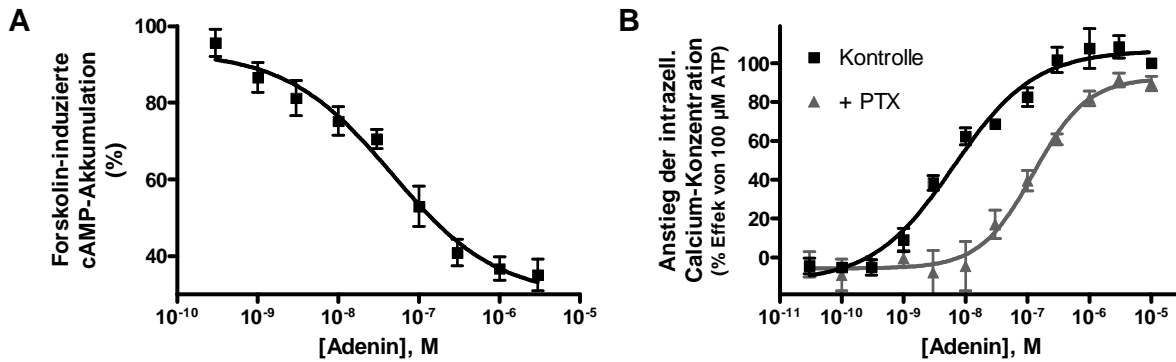


Abbildung 6.1: Konzentrations-Wirkungskurven von Adenin am cAdeR

Die funktionellen Experimente ($n = 3$) wurden mit transfizierten CHO-Zellen durchgeführt. (A) cAMP-Akkumulations-Experimente, EC_{50} : 51.6 nM (gemäß einem F- und einem AIC-Test werden die Daten korrekt von einer Gleichung beschrieben, die einen mono- statt einen biphasischen Kurvenverlauf annimmt). (B) Calcium-Mobilisations-Experimente, EC_{50} : 6.24 nM (die Kurve stellt eine Überlagerung der G_i - und G_q -Komponente der Calciumsignale dar), EC_{50} nach Vorbehandlung der Zellen mit PTX: 128 nM (G_q -Komponente des Calciumsignals).

Mit Hilfe eines retroviralen Expressionssystems wurde der cAdeR in CHO-Zellen zur Expression gebracht. In Radioligand-Bindungsstudien an Membranpräparationen der transfizierten Zellen und in funktionellen Experimenten konnte gezeigt werden, dass der Rezeptor

- Adenin hochaffin bindet (K_D 79.9 nM, B_{max} 5.62 pmol/mg Protein) und durch Adenin aktiviert wird;
- genau wie die AdeR der Ratte und der Maus **G_i -gekoppelt** ist (EC_{50} 51.6 nM);
- zusätzlich eine **G_q -Kopplung** aufweist (EC_{50} 128 nM, siehe Abbildung 6.1). Diese Kopplung wurde bislang für keinen anderen Adenin-Rezeptor beschrieben.

Die vorgestellten Ergebnisse wurden bereits von uns publiziert (Thimm, D.; Knospe, M.; Abdelrahman, A.; Moutinho, M.; Alsdorf, B. B. A.; von Kugelgen, I.; Schiedel, A. C.; Müller, C. E. Characterization of new G protein-coupled adenine receptors in mouse and hamster. *Purinergic Signal.* **2013**, 9, 415-426).

Die Erkenntnisse zu diesem neuen Rezeptor können wichtige Impulse für die weitere Erforschung der neuen Klasse der Adenin-Rezeptoren liefern: Durch den Vergleich der Aminosäure-Sequenzen aller Adenin-Rezeptoren mit eng verwandten Rezeptoren, die Adenin nicht binden, können hochkonservierte Aminosäuren der AdeR identifiziert werden, die potentiell an der Liganden-Bindungstasche beteiligt sein könnten. In Mutagenesestudien könnte die Rolle dieser Aminosäuren untersucht werden, wodurch die bislang unzureichend präzisen Homologie-Modelle dieser Rezeptoren entscheidend verbessert werden könnten.^{268,291} Diese Modelle können dem rationalen Design neuer

synthetischer, hochpotenter Agonisten dienen. Die Kenntnis der räumlichen Struktur der Adenin-Bindungstasche kann über einen vergleichenden bioinformatischen Ansatz außerdem entscheidend zur Identifikation eines humanen Adenin-Rezeptors beitragen, da dieser Rezeptor trotz eines wahrscheinlich geringen Verwandtschaftsgrades mit den Nager-AdeR möglicherweise eine ähnliche Adenin-Bindungstasche aufweist.

6.2 Adenosin-Rezeptoren

Adenosin-Rezeptoren weisen eine ubiquitäre Expression im Körper auf und spielen bei zahlreichen physiologischen Prozessen eine Rolle.⁸² Therapeutisch kann besonders ihre kardioprotektive Funktion (A_1 AR), ihr Einfluss auf Symptome neurodegenerativer Erkrankungen (A_{2A} AR) sowie ihre modulierende Funktion auf das Immunsystem (A_{2A} -, A_{2B} -, A_3 AR) ausgenutzt werden.⁵⁶⁶ Mit Serin-279 konnte basierend auf Mutagenese-Studien eine Aminosäure des A_{2B} -Adenosin-Rezeptors identifiziert werden, die eine essentielle Rolle bei der Interaktion des Rezeptors mit nucleosidischen Agonisten einnimmt. Dagegen konnte gezeigt werden, dass diese Aminosäure keine Rolle bei der Bindung von nicht-nucleosidischen Agonisten (BAY60-6583) sowie Antagonisten spielt. Diese Ergebnisse wurden bereits von uns publiziert (Thimm, D.; Schiedel, A. C.; Sherbiny, F. F.; Hinz, S.; Hochheiser, K.; Bertarelli, D. C.; Maaß, A.; Müller, C. E. Ligand-specific binding and activation of the human adenosine A_{2B} receptor. *Biochemistry* **2013**, *52*, 726-740). Sie dienen der Verbesserung eines Homologie-Modells und erleichtern dadurch das rationale Design optimierter A_{2B} AR-Liganden, insbesondere von Agonisten, die dringend benötigt werden.

Da dem A_{2B} -Adenosin-Rezeptor eine Bedeutung bei der erektilen Funktion des Penis zugeschrieben wird,^{342,390} sollte überprüft werden, ob die zur Behandlung der erektilen Dysfunktion klinisch eingesetzten **PDE5-Inhibitoren** an diesen und andere Adenosin-Rezeptorsubtypen binden. Es konnte gezeigt werden, dass einige von Sildenafil abgeleiteten PDE5-Inhibitoren tatsächlich **Adenosin-Rezeptor-Liganden** sind, jedoch **Selektivität für den A_{2A} -Adenosin-Rezeptor** aufweisen. An diesen Subtyp binden die untersuchten PDE5-Inhibitoren mit **hoher Affinität** (K_i -Werte: Sildenafil 72.7 nM, Vardenafil 80.3 nM, Lodenafil 227 nM, Udenafil 95.8 nM). In cAMP-Akkumulations-Experimenten konnte gezeigt werden, dass es sich bei diesen Verbindungen um A_{2A} -Adenosin-Rezeptor-**Antagonisten** handelt. Diese Daten helfen entscheidend bei der Interpretation von Ergebnissen, die unter Einsatz von PDE-Inhibitoren wie Sildenafil erhalten wurden.

6.3 P2Y-Rezeptor-artige Waisen-Rezeptoren

Wie die meisten Waisen-Rezeptoren sind GPR34, GPR35 und GPR171 bislang nur wenig erforscht. Viele Hinweise zu ihrer physiologischen Rolle wurden von ihrem Expressionsprofil abgeleitet. Obwohl für die Erforschung des GPR35 eine Reihe von Liganden zur Verfügung steht, sind sie kaum als pharmakologische Werkzeuge geeignet, da sie zumeist unselektiv und/oder wenig potent sind. In der vorliegenden Arbeit wurden für die drei genannten Waisen-Rezeptoren pharmakologische Testsysteme etabliert, um durch die Testung von Substanzbibliotheken neue Liganden identifizieren zu können. Insbesondere für den **GPR35** konnten unter Einsatz von β -Arrestin-Rekrutierungs-Assays **neue Leitstrukturen** gefunden werden. 8-Nitro-4-oxo-4*H*-chromen-2-carbonsäure (**143**) wurde als niedermolekularer **Agonist** mit moderater Wirksamkeit (EC_{50} 46300 nM) für die weitere Optimierung ausgewählt. Durch die sorgfältige Analyse der Struktur-Wirkungs-Beziehungen (siehe auch Abbildung 6.2) wurden Agonisten entwickelt, deren **Wirksamkeit sukzessive gesteigert** werden konnte. Als besonders vorteilhaft erwies sich die Einführung

- eines Wasserstoffbrückenakzeptors in 8-Position (z. B. die Carbonylgruppe eines Amid-Linkers)
- eines über den genannten Amid-Linker in 8-Position verknüpften Phenylrestes
- eines *para*-Methoxy-Substituenten am 8-Benzamid-Rest
- eines Halogenatoms in 6-Position der Chromenon-Grundstruktur (wobei der Effekt eines Brom-Substituenten am größten war)

Die untersuchten Verbindungen stellten größtenteils auch Agonisten der ebenfalls untersuchten murinen Rezeptoren (Maus- und Ratten-GPR35) dar, wobei sie an diesen jedoch deutlich geringere Wirksamkeit aufwiesen; auch die Struktur-Wirkungs-Beziehungen unterschieden sich von den am humanen Rezeptor beobachteten. 6-Brom-8-(4-hydroxybenzamid)-4-oxo-4*H*-chromen-2-carbonsäure (**265**) war der potenteste Agonist an den murinen Rezeptoren und zeigte zudem ähnliche Aktivität am humanen und Ratten-Rezeptor (EC_{50} : hGPR35 716 nM, rGPR35 349 nM, mGPR35 1070 nM).

Durch die Kombination eines 8-(4-Methoxybenzamid)- mit einem 6-Brom-Substituenten wurde die Verbindung PSB-13253 (Struktur siehe Abbildung 6.2) erhalten. Diese Verbindung war zum Zeitpunkt ihrer Entwicklung der potenteste Agonist am humanen GPR35 (EC_{50} 12.1 nM in β -Arrestin-Rekrutierungs-Experimenten), der zudem eine >1700fach Selektivität für den hGPR35 gegenüber dem eng verwandten hGPR55 aufweist.

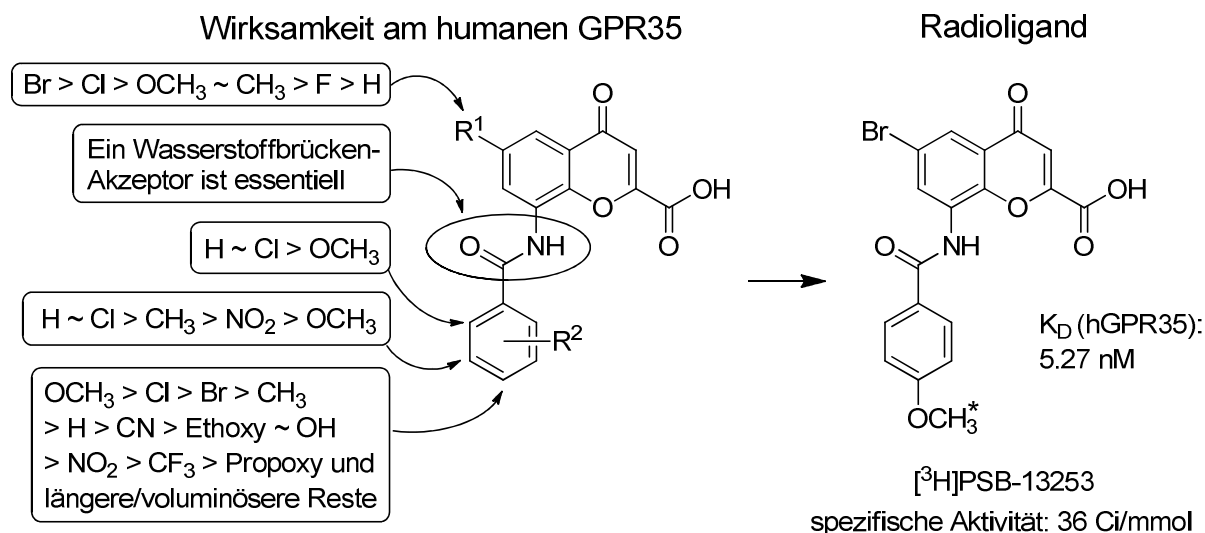


Abbildung 6.2: Struktur-Wirkungs-Beziehungen von Chromen-4-on-2-carbonsäure-Derivaten und der entwickelte Radioligand [³H]PSB-13253.

PSB-13253 wurde durch Tritiierung radioaktiv markiert. Es konnte gezeigt werden, dass **der neue Radioligand [³H]PSB-13253 mit hoher Affinität** (K_D 5.27 nM, B_{max} 12.6 pmol/mg Protein) an den hGPR35 bindet. Damit war es nun erstmals möglich, die Affinität von GPR35-Liganden in Radioligand-Bindungsstudien zu bestimmen. Neben Standard-Agonisten wurden auch alle bereits funktionell untersuchten Chromenon-Derivate in Bindungsstudien getestet. Basierend auf diesen Testergebnissen wurden neue Fluor-substituierte PSB-13253-Derivate entwickelt. Diese gehören zu den **potentesten hGPR35-Agonisten** die bislang bekannt sind. 6-Brom-8-(2,6-difluor-4-methoxybenzamid)-4-oxo-4*H*-chromen-2-carbonsäure (**314**) weist mit einem **K_i-Wert im subnanomolaren Bereich** (K_i 589 nM) die höchste Affinität unter allen getesteten GPR35-Liganden auf. Ausgehend von der ersten Leitstruktur bis hin zu dieser Verbindung konnten Wirksamkeit und Affinität sukzessive um mehr als den Faktor 8000 gesteigert werden (siehe auch Abbildung 6.3). Die Ergebnisse dieses Projektes wurden bereits teilweise von uns publiziert (Funke, M.;* Thimm, D.;* Schiedel, A. C.; Müller, C. E. 8-Benzamidochromen-4-one-2-carboxylic acids: potent and selective agonists for the orphan G protein-coupled receptor GPR35. *J. Med. Chem.* **2013**, *56*, 5182-5197, *geteilte Erstautorenschaft, und Thimm, D.; Funke, M.; Meyer, A.; Müller, C. E. 6-Bromo-8-(4-[³H]methoxy-benzamido)-4-oxo-4*H*-chromene-2-carboxylic acid ([³H]PSB-13253): a powerful tool for studying orphan G protein-coupled receptor GPR35. *J. Med. Chem.* **2013**, *56*, 7084-7099).

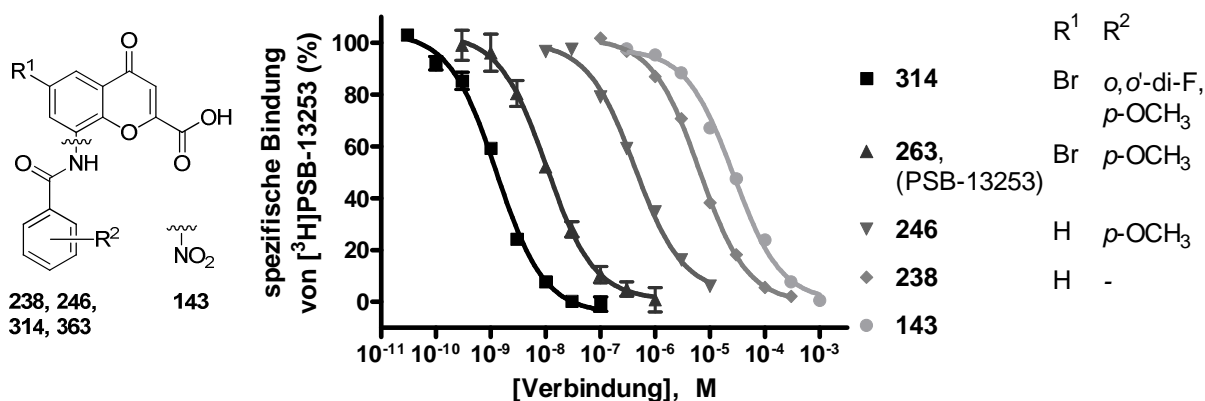


Abbildung 6.3: Sukzessive Optimierung der Chromenoncarbonsäure-Derivate als Agonisten am humanen GPR35.

Sowohl die Verbindung **314** als auch der neue Radioligand stellen wertvolle pharmakologische Werkzeuge zur weiteren Erforschung des Waisen-Rezeptors GPR35 dar. Die Ergebnisse dieses Projektes dienen nicht nur der weiteren Optimierung von Liganden für die murinen GPR35-Orthologen, mit dem Ziel, In-vivo-Studien durchzuführen. Darüber hinaus kann PSB-13253, das bereits Arzneistoff-artige Eigenschaften aufweist, als Leitstruktur für die Entwicklung von Arzneistoffen dienen. So haben GPR35-Agonisten großes Potential z. B. für die Behandlung von (neuropathischen) Schmerzen.^{475,476,567} Außerdem könnten die entwickelten Verbindungen zur zukünftigen Röntgenkristall-Strukturanalyse dieses Rezeptors beitragen. Während Bindungsstudien mit dem Radioliganden unerlässliche Informationen bei der Interpretation der Strukturdaten liefern, könnten hochaffine Agonisten wie **314** kokristallisiert werden, um Informationen über die aktive Rezeptorkonformation zu erhalten. Strukturdaten wären auch von großem Interesse für nahe verwandte Rezeptoren, für die ebenfalls keine ausreichend geeignete Vorlage zur Erstellung eines aussagekräftigen Homologie-Modells vorliegt (wie z. B. GPR55).

Die Ergebnisse und dadurch inspirierte zukünftige Experimente können damit nicht nur wichtige Erkenntnisse über die jeweiligen Rezeptoren selbst, sondern auch entscheidende Impulse für die Erforschung verwandter Rezeptoren bis hin zur gesamten Klasse der G-Protein-gekoppelten Rezeptoren liefern.

7 Experimenteller Teil

7.1 Material

7.1.1 Geräte, Instrumente, Verbrauchsmaterialien

Analysenwaage	CP225D, Sartorius
Autoklav	Varioklav [®] Dampfsterilisator 75T, H+P, 3850 ELV, Systec
Autoklavierbeutel	Sarstedt
Bakterienkulturröhrchen	Sarstedt
Bakterienschüttler	Innova 4200 Incubator shaker, New Brunswick Scientific
Brutschrank	Jouan IG 650, HERAccl [®] , Heraeus
Dispenserspitzen	Ritips [®] professional 1.0 ml, 2.5 ml, 5 ml, 10 ml, Labomedic
Drigalski-Spatel	Roth
Duranflaschen	500 ml, 250 ml, 50 ml, Roth
Einmalspritzen	20 ml, 5 ml, Braun
Elektrophoresekammer	Schütt Labortechnik
Elektrophoresenetzgerät	Power Pac 300, ELITE 300 Plus, Schütt Labortechnik
Fluorimeter	NOVOstar [®] , BMG Labtech
Flüssig-Szintillations-Messflasche	4 ml / 20 ml, Roth
Flüssig-Szintillations-Zähler	TRICARB [®] 2900TR, Packard / Perkin-Elmer Topcount NXT [™] , Packard
Gefriergefäße	Kryovials, steril, Sarstedt
Gelfotodokumentator	Universal Hood II Geldoc, BioRad
Glasfaserfilter	GF/B Glass fibre cuts, Ref. No. 10428183, Whatman
Glasfaserfilter-Platten	UniFilter [®] 96, GF/B, Perkin Elmer
Hamiltonspritze	Syringes 705 (10 µl, 50µl), Hamilton
Harvester	MP-24, MP-48 und MPXRI-96TT, Brandel, Gaithersburg, MD, USA
Heizblock	Thermomixer comfort, Eppendorf
Homogenisator	RW 16 basic, IKA Labortechnik
Küvetten	PS, Sarstedt

Laminar-Airflow-Werkbänke	NUNC® Safe flow 1.2 NUNC® BIOFLOW
Magnetrührer und Heizplatte	RCT Basic, IKA Labortechnik
Mikroskop	Axiovert 25, Zeiss
Mikrotiterplatten, 24 Loch	Gewebekulturplatte 24 Well, steril mit Abdeckplatte, Greiner bio-one
Mikrotiterplatten, 96 Loch	96F Nunclon Delta Surface, weiß, Thermo Scientific Micro Assay Plate, Greiner bio-one MegaBlock 96Well, 1.2 ml, PP, Sarstedt Optiplate 96, schwarz, Perkin-Elmer TC-Platte 96WellF, Sarstedt
Mikrowelle	Microwave 800, Severin
Multipette	Multipette Plus, Eppendorf
Neubauer Zählkammer	Marienfeld Germany
pH-Meter	691 pH Meter, Metrohm Seven compact, Mettler-Toledo
Photometer	DU® 530, Beckman
Pipetten	0.5-10 µl, 2-20 µl, 20-200 µl, 100-1000µl, Eppendorf
Pipettenspitzen	Sarstedt
Pipettierhilfen	Pipettus Akku, Eppendorf Accu Jet, Brand
Plastikwannen, steril	Reagent Reservoir, VWR
Platten-Heizschüttler	Shaker DTS-4, Elmi
Pumpen	N811KN.18 KNF Neuberger CVC2, Vacuubrand
Quarzküvetten	Präzisionsküvetten aus Quarzglas SUPRASIL®, 10 mm, Hellma®
Reaktionsgefäße	1.5 ml / 2.0 ml Safe-Lock, Sarstedt 4.0 ml, PE-Vials, Roth
Röhrchen	15 ml / 50 ml, Sarstedt
Serologische Einmalpipetten	5 ml, 10 ml, 25 ml, 50 ml, steril, Sarstedt
Sterilfilter	Filtropur 0.22 µm, Sarstedt
Thermocycler	Px2 Thermal Cycler, Thermo Scientific
Ultraschallstab	UV 2070 / Sonopuls, Bandelin Electronic
Ultraturrax	T25 basic, IKA Labortechnik
Verschlussfolie für Mikrotiterplatten	Klebefolie, optisch klar, Sarstedt

Vortexer	2x3, UniEquip MS2 Minishaker, IKA Labortechnik VV3, VWR
Waagen	SBC 42, Scaltec 440-47N, Kern
Wägeschalen	Roth
Wasserbad mit Schüttler	1083, GFL®
Zellkulturflaschen	175 cm ² , 75 cm ² , 25 cm ² , steril, Sarstedt
Zellkulturschalen	175 cm ² , steril, Sarstedt
Zellschaber	Josef Peske GmbH & Co.
Zellstoff	Labomedic
Zentrifugen	Mikro 200, Hettich Allegra™ 21 R, Beckman Coulter Avanti™ J-201, Beckman BIOFUGE pico, Heraeus Rotofix 32, Hettich
Zentrifugenröhrchen	Ultra-Clear® Tubes, Beckman

7.1.2 Software & Onlineprogramme

BLAST®	National Center for Biotechnology Information, USA http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi
Chemdraw Pro 12.0.2	CambridgeSoft
Chromas Lite 2.01	Technelysium Pty Ltd.
Clone Manager 9	Scientific & Editorial Software
ClustalW2	EMBL-European Bioinformatics Institute, http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalw2
DNAtrans 4.0	Dr. A. Schiedel / J. Bosmann
EMBOSS Needle	EMBL-European Bioinformatics Institute, http://www.ebi.ac.uk/Tools/psa/emboss_needle
Excel 2010	Microsoft®
OligoAnalyzer 3.1	Integrated DNA Technologies, http://eu.idtdna.com/analyzer/applications/oligoanalyzer
PhotoDraw 2000	Microsoft®
Phylogeny.fr ⁵⁶⁸	Information Génomique et Structurale http://www.phylogeny.fr
Prism® 4.02	GraphPad
PyMOL™ 0.99	DeLano Scientific

QuantityOne 4.4.0	Biorad
QuickCalcs	GraphPad, Chemical and radiochemical calculators, http://www.graphpad.com/quickcalcs/radcalcform/
Zadas (R 2.12.2)	Matthias Zepper
Word 2010	Microsoft®

7.1.3 Chemikalien

8-Aminoadenin (PSB-09032)	synthetisiert im AK Prof. Dr. Müller, Universität Bonn
Adenin	Sigma-Aldrich, A8626
Adenosin	Sigma-Aldrich, A9251
Adenosindesaminase	Roche, 10102105001
Agarose	Roth, 2267
AM251	Biotrend, BN0063
AM281	Sigma-Aldrich, A0980
AM630	Tocris, 1120
Amlexanox	AK Prof. Dr. Milligan, Universität Glasgow, GB
Ampicillin-Natriumsalz	Roth, K029
Anandamid	Tocris, 1339
Arachidonyl-2'-Chlor-Ethylamid	Sigma-Aldrich, A9719
2-Arachidonyl-Glycerol	Sigma-Aldrich, 80676
N-Arachidonyl-Glycin	Tocris, 1445
N-Arachidonyl-L-Serin	Cayman Chemical, 10005455
ATP-Dinatriumsalz	Sigma-Aldrich, A26209
Avanafil	Biozol, TRC-A794670
5-BDBD	Tocris, 3579
BAY60-6583	Dr. Thomas Krahn, Bayer AG
Benarhodin A	AK Prof. Dr. Piel, Universität Bonn
Benastatin A	AK Prof. Dr. Piel, Universität Bonn
Bromphenolblau	Applichem, 3640
BSA / Albumin Fraktion V	Roth, 8076
CADO	TCI, C2192
Calciumchlorid Dihydrat	Fluka, 21097
cAMP-Natriumsalz	Enzo Life Sciences, ALX-480-011
cGMP-Natriumsalz	Sigma-Aldrich, G6129
Cholesteryl-Hemisuccinat	Sigma-Aldrich, C6512

Cholsäure (Natriumsalz)	Applichem, C1254
CID 2745687	Tocris, 4293
CP 55,940	Tocris, 0949
D-(+)-Glukose	Sigma-Aldrich, G7021
Desoxycholsäure (Natriumsalz)	Sigma-Aldrich, 30970
Dicoumarol	Sigma-Aldrich, M1390
DMSO	AppliChem, A3608
DMSO für die Zellkultur	AppliChem, A3672
Doxantrazol	AK Prof. Dr. Milligan, Universität Glasgow, GB
DPCPX	Tocris, 0439
EDTA-Dinatriumsalz	Roth, X986
EGTA	Roth, 3054
Eisessig	Merck, 1.00063.1011
Ethanol p.a.	Merck, 1.00983
Ethanol technisch	ZVE Universität Bonn, 123974
2-Fluoradenin	Sigma-Aldrich, 535087
Flufenaminsäure	Alfa Aesar, B23583
Flüssigscintillations-Cocktail	Ready-Safe™, Beckman Lumasafe™, Perkin-Elmer
Folin-Reagenz	Sigma, F9252
Forskolin	Enzo Life Sciences, BML-CN100
G418	Applichem, A2167
GelRed™	Biotrend, 41002
Gentamicinsulfat	Roth, 0233
Gisadenafil	Sigma-Aldrich, PZ0172
Glycerin	Applichem, A1123
Glycocholsäure (Natriumsalz)	Sigma-Aldrich, G7132
Glycoursodesoxycholsäure	Sigma-Aldrich, 06863
GMP-Dinatriumsalz	Sigma-Aldrich, G8377
Gossypol	Tocris, 1964
Harnsäure	Applichem, A2562
Hefeextrakt	Applichem, A3732
HEPES	Sigma-Aldrich, H3375
Honokiol	Biomol, LKT-H5654.25
2-Hydroxy-Caprylsäure	Sigma-Aldrich, H7396
2-Hydroxy-Myristinsäure	Sigma-Aldrich, H6771
3-Hydroxy-Caprynsäure	Larodan, 14-1003-8

3-Hydroxy-Caprylsäure	Sigma-Aldrich, H3898
3-Hydroxy-Laurinsäure	Larodan, 14-1203-8
3-Hydroxy-Myristinsäure	Santa Cruz Biotechnology, sc-208231
Hypoxanthin	Appllichem, A0700
IPTG	Roth, CN08.1
Isopropanol	ZVE Universität Bonn, 123903
Kaliumchlorid	Fluka, 60128
Kaliumdihydrogenphosphat	Sigma-Aldrich, P9791
Kanamycinsulfat	Roth, T832
Kupfersulfat Pentahydrat	Appllichem, A1034
Kynurensäure	Sigma-Aldrich, K3375
Laurinsäure	Sigma-Aldrich, L556
LB-Agar	Roth, X965
LB-Pulvermedium	Roth, X968
Lipofectamine® 2000	Life Technologies, 11668019
Lithocholsäure	Sigma-Aldrich, L6250
Lodenafil	Biozol, TRC-H942840
Lodoxamid	AK Prof. Dr. Milligan, Universität Glasgow, GB
(S)-Luziferin	Sigma-Aldrich, L9504
LY 320135	Tocris, 2387
Lysophosphatidylinositol (Dinatrium-Salz)	Sigma-Aldrich, T2376
Magnesiumchlorid	Sigma, M8266
Magnesiumsulfat	Sigma, M2643
Meclofenaminsäure	Sigma, M4531
Mefenaminsäure	Sigma, M4267
1-Methyladenin	Acros, 201310250
7-Methyladenin	Acros, 365401000
9-Methyladenin	Acros, 325871000
Microscint 20	Perkin Elmer, 6013621
Mirodenafil	Ochem, 189M955
ML 145	Tocris, 4172
Mycophenolsäure	Tocris, 1505
Myristinsäure	Sigma-Aldrich, M3128
Natriumbutyrat	Alfa Aesar, A11079
di-Natriumcarbonat	AppliChem, A1881
Natriumchlorid	Roth, 3957

Natriumhydrogencarbonat	Sigma, S5761
di-Natriumhydrogenphosphat	Applichem, A1938
Natriumhydroxid	Fluka, 71689
di-Natriumtartrat Dihydrat	Applichem, A2662
NECA	Sigma, E2387
Nifluminsäure	Sigma, N0630
<i>N</i> -Oleyl-Serin	Cayman Chemical, 13058
Oregon Green [®] 488 BAPTA-1, AM	Molecular Probes, O6807
Pamoasäure	Sigma-Aldrich, 45150
Peptide FE, FEE, HW, WH, WY, YR, YW	Biomatik
Phenolrot	Sigma-Aldrich, P0290
Pipemidic Acid	Sigma-Aldrich, P7903
Pluronic [®] F-127	Sigma-Aldrich, P2443
Polybren	Sigma-Aldrich, 107689
Polyethylenimin	Sigma-Aldrich, P3143
Pranlukast	Sigma-Aldrich, P0080
Precollinon	AK Prof. Dr. Piel, Universität Bonn
PSB-08162	synthetisiert im AK Prof. Dr. Müller, Universität Bonn
PSB-09073	synthetisiert im AK Prof. Dr. Müller, Universität Bonn
PSB-09097	synthetisiert im AK Prof. Dr. Müller, Universität Bonn
PSB-603	synthetisiert im AK Prof. Dr. Müller, Universität Bonn
Retinoic Acid	Sigma-Aldrich, R2625
RNAse-Exitus	Applichem, A6613
Ro20-1724	Sigma-Aldrich, B8279
R-PIA	Sigma-Aldrich, P4532
Salzsäure, 37 %	Applichem, A0659
SDS-Lösung, 20%	Applichem, A0675
Sialinsäure	VWR, A1002
Stearoyl-Lyso-PS	Avanti Polar Lipids, 858144P
Sterillium	Labomedic, E10601
Tadalafil	AK Scientific, 65531
Taurocholsäure (Natriumsalz)	Sigma-Aldrich, 86339
Tetracyclin-HCl	Roth, HP63

Thymidin	Sigma-Aldrich, T1895
Tocriscreen Mini-Substanzbibliothek	Tocris, 2890
Tris	Roth, AE15.3
Triton™ X-100	Sigma-Aldrich, X-100
Trypton	Applichem, A1553
U73122	Tocris, 1268
U73343	Tocris, 4133
Udenafil	Biozol, TRC-U250500
Undecansäure	Sigma-Aldrich, W324507
Vardenafil	AK Scientific, 69429
Verbindung 75 , „Compound 10“	Sigma-Aldrich, SML0174
Verbindung 78	AK Prof. Dr. Milligan, Universität Glasgow, GB
Verbindungen 41-67	Chemdiv
Verbindungen 139, 143-145, 171-196, 210-290, 292-314, 317-367 und 388-392	synthetisiert im AK Prof. Dr. Müller, Universität Bonn
Verbindungen 203-209	AK Prof. Dr. Bräse, Universität Karlsruhe
Verbindungen 198-202	AK Prof. Dr. Kieć-Kononowicz, Universität Krakau, Polen
Wasser, gereinigt, steril	VWR, AX021403
WIN 55,212-2	Tocris, 1038
Xanthin	Sigma-Aldrich, X7375
X-Gal	VWR, 437132J
YE120	Tocris, 4457
Zaprinast	Sigma-Aldrich, Z0878

Alle nichtaufgeführten Chemikalien stammen aus einer internen Substanzbibliothek (<http://mueller-group.pharma.uni-bonn.de/bibliothek>) oder wurden von Sigma-Aldrich bezogen.

7.1.4 Nucleinsäuren & Nucleotide

Plasmide	
pCMV6-Entry-hGPR35b-myc-DDK	Origene
pCMV6-Entry-rGPR35	Origene
pCMV6-Kan/Neo-mGPR35	Origene
pCMV6-XL4-hGPR171	Origene
pCMV6-XL4-hGPR35	Origene

pCMV6-XL5-hGPR34	Origene
pCMV-ARMS1- Prolink™2	DiscoverX
pCMV-ARMS2- Prolink™2	DiscoverX
pCMV-Prolink™1 (PK1)	DiscoverX
pCMV-Prolink™2 (PK2)	DiscoverX
pFastBac™1 (aus Bac-to-Bac® Baculovirus Expression System)	Life Technologies
pGL4.29[<i>luc2P</i> /CRE/Hygro]	AK Prof. Dr. von Kügelgen, Universität Bonn
pJet1.2 (aus CloneJet PCR Cloning Kit)	Thermo Scientific
pLXSN	AK Prof. Dr. R. Nicholas, Universität von North Carolina, USA
DNA-Marker	
Lambda DNA/EcoRI+HindIII-Marker	Thermo Scientific, SM0191
PhiX174 DNA-HaeIII-Marker	New England Biolabs®, N3026S
Oligonucleotide	
Oligo d(T) ₁₆ -Primer	Life Technologies, N8080128
Primer (Sequenzen siehe Kapitel 7.2.2)	Life Technologies

7.1.5 Enzyme

Restriktionsenzyme

BamHI	New England Biolabs®, R0136S oder FastDigest, Thermo Scientific, FD0054
EcoRI	New England Biolabs®, R0101S oder FastDigest, Thermo Scientific, FD0274
HindIII	FastDigest, Thermo Scientific, FD0504
MluI	New England Biolabs®, R0198S oder FastDigest, Thermo Scientific, FD0564
NheI	FastDigest, Thermo Scientific, FD0973
XhoI	New England Biolabs®, R0146L oder FastDigest, Thermo Scientific, FD0694

Sonstige Enzyme

Adenosin-Desaminase (ADA)	Roche, 10102105001
---------------------------	--------------------

BioMix™ Red	Bioline, BIO-25006
Pyrobest® DNA-Polymerase	Takara, R005A
T4-Ligase	New England Biolabs®, M0202S
Trypsin	Lonza, 17-160

Alle Enzyme wurden mit den ggf. benötigten Zusätzen geliefert.

7.1.6 Kits & Chemikalienmischungen

Bac-to-Bac® Baculovirus Expression System	Life Technologies, 10359-016
Bright-Glo™ Luciferase Assay System	Promega, E2620
CloneJET PCR Cloning Kit	Thermo Scientific, K1231
DNA Clean & Concentrator™-25 Kit	Zymo Research, D4033
GeneRacer® Kit with SuperScript® III RT	Life Technologies, L1502-01
Omniscript RT Kit	Qiagen, 205111
PathHunter® Detection Kit	DiscoverX, 93-0001L
PerfectPure RNA Cultured Cell Kit	5 Prime, 2302340
PureLink® Genomic DNA Mini Kit	Life Technologies, K182000
PureLink® HiPure Plasmid Filter Midiprep Kit	Life Technologies, K2100-15
QuantiTect Reverse Transcription Kit	Qiagen, 205310
TRIzol® Reagent	Life Technologies, 15596-026
ZR BAC DNA Miniprep Kit	Zymo Research, D4048
Zymoclean™ Gel DNA Recovery Kit	Zymo Research, D4002
Zyppy™ Plasmid Maxiprep Kit	Zymo Research, D4028
Zyppy™ Plasmid Miniprep Kit	Zymo Research, D4020

7.1.7 Zellkulturmedien & Medienzusätze

DMEM (Dulbecco's modified Eagle Medium)	Life Technologies, 41966029
DMEM/F-12, HEPES	Life Technologies, 31330038
Fötales Kälberserum	Sigma-Aldrich, F0804
Ham's F-12 Nutrient Mix	Life Technologies, 21765037
HAT Supplement	Life Technologies, 21060017
Hygromycin B	Merck Millipore, 400052
Insect-Xpress	Lonza, 12-730F
Penicillin-Streptomycin	Life Technologies, 15140122

PathHunter[®] Cell Plating 1 Reagent DiscoverX, 93-0563R1A

PathHunter[®] Cell Plating 2 Reagent DiscoverX, 93-0563R2A

Weitere Zusätze für Zellmedien wurden durch die Lösung der entsprechenden Verbindung in Reinstwasser und anschließender Sterilfiltration der Lösung hergestellt (s. u.).

7.1.8 Zellen

CHO-K1-Zellen (Ovarialzellen, <i>Cricetulus griseus</i>)	ATCC [®] , CCL-61 [™]
GP ⁺ envAM-12 (embryonale Fibroblasten, <i>Mus musculus</i>)	ATCC [®] , CRL-9641 [™]
NCB-20-Zellen (Hybridom: Neuroblastom, <i>Mus musculus</i> x embryonale Hirnzellen, <i>Cricetulus griseus</i>)	AK Prof. Dr. Sung, Katholische Universität von Korea, Seoul, Südkorea
One Shot [®] TOP 10 chemically competent <i>E. coli</i>	Life Technologies, C404010
PathHunter [®] CHO-K1 hGPR35 β -Arrestin Cell Line (Ovarialzellen, <i>Cricetulus griseus</i>)	DiscoverX, 93-0355C2
PathHunter [®] CHO-K1 hGPR171 β -Arrestin Cell Line (Ovarialzellen, <i>Cricetulus griseus</i>)	DiscoverX, 93-0415C2A
PathHunter [®] CHO-K1 β -Arrestin Parental Cell Line (Ovarialzellen, <i>Cricetulus griseus</i>)	DiscoverX, 93-0164
Sf9-Insektenzellen (Ovarialzellen, <i>Spodoptera frugiperda</i>)	AK Prof. Dr. Wiese, Universität Bonn

7.1.9 Radioliganden

[³ H]Adenin	spezifische Aktivität: 36 Ci/mmol	Perkin Elmer
[³ H]cAMP	spezifische Aktivität: 34 Ci/mmol	Perkin Elmer
[³ H]CCPA	spezifische Aktivität: 58 Ci/mmol	GE Healthcare
[³ H]MSX-2*	spezifische Aktivität: 84 Ci/mmol	Quotient Bioresearch
[³ H]PSB-11*	spezifische Aktivität: 53 Ci/mmol	Quotient Bioresearch
[³ H]PSB-13253*	spezifische Aktivität: 36 Ci/mmol	Quotient Bioresearch
[³ H]PSB-603*	spezifische Aktivität: 73 Ci/mmol	GE Healthcare

* Die nicht-markierten Vorstufen dieser Radioliganden wurde im AK Prof. Dr. Müller (Universität Bonn) synthetisiert und durch die genannten Firmen tritiert. ^{347,471,569,570}

7.1.10 Lösungen, Puffer und Medien

7.1.10.1 Lösungen, Puffer und Medien für die Molekularbiologie

Medienzusätze:	Ampicillin-Na	100 mg/ml	Die Verbindungen wurden in Reinstwasser gelöst und steril filtriert. Die Lagerung der Stammlösungen erfolgte bei -20 °C. X-Gal wurde unter Lichtausschluss gelagert.
	Gentamycinsulfat	7 mg/ml	
	IPTG	40 mg/ml	
	Kanamycinsulfat	50 mg/ml	
	Tetracyclin-HCl	10 mg/ml	
	X-Gal	20 mg/ml	

S.O.C.-Medium:	Trypton	2 %	Trypton, Hefeextrakt, NaCl, KCl und MgCl ₂ wurden in Reinstwasser gelöst und autoklaviert. Danach wurde im Verhältnis 1:50 eine 1-molare, sterilfiltrierte Glukose-Lösung zugegeben. Die Lagerung des Mediums erfolgte bei -20 °C
	Hefeextrakt	0.5 %	
	NaCl	8.6 mM	
	KCl	2.5 mM	
	MgCl ₂	10 mM	
	Glukose	20 mM	

LB-Medium /
LB-Agar-Platten: Fertigmischungen für LB-Medium bzw. LB-Agar wurden gemäß den Herstellerangaben in demineralisiertem Wasser gelöst und autoklaviert.

LB-Medium wurde bei Raumtemperatur gelagert. Kurz vor Gebrauch wurden dem Medium entsprechend der Resistenz der kultivierten Bakterien Antibiotika zugegeben (Endkonzentrationen: 100 µg/ml Ampicillin oder 50 µg/ml Kanamycin). Die weitere Lagerung erfolgte bei 4 °C.

Nachdem die LB-Agar-Lösung (direkt nach dem Autoklavieren) eine Temperatur von etwa 60 °C erreicht hatte, wurden der Lösung entsprechend der Resistenz der kultivierten Bakterien Antibiotika zugegeben (Endkonzentrationen: 100 µg/ml Ampicillin oder 50 µg/ml Kanamycin oder für die Kultivierung von Bacmid-enthaltenden Bakterien im Rahmen des Bac-to-Bac[®] Baculovirus Expression Systems: 50 µg/ml Kanamycin, 7 µg/ml Gentamycin, 10 µg/ml Tetracyclin, 100 µg/ml X-Gal und 40 µg/ml IPTG).

50 x TAE-Puffer:	Tris	2 M	Tris, Eisessig und EDTA wurden in Reinstwasser gelöst und für eine Verlängerung der Haltbarkeit autoklaviert. Vor dem Gebrauch wurde der Puffer mit demineralisiertem Wasser im Verhältnis 1:50 verdünnt.
	Eisessig	1 M	
	EDTA	50 mM	
6 x Ladepuffer:	Bromphenolblau	0.25 %	Die Verbindungen wurden in Reinstwasser gelöst. Die Lagerung des Puffers erfolgte bei 4 °C.
	Glycerin	50 %	

7.1.10.2 Lösungen für die Proteinbestimmung nach Lowry

Reagenz A:	Na ₂ CO ₃	2 %	Die Verbindungen wurden in Reinstwasser gelöst.
	NaOH	0.1 N	
Reagenz B:	CuSO ₄	0.5 %	Die Verbindungen wurden einzeln in Reinstwasser gelöst und anschließend vereinigt (angegeben sind die Endkonzentrationen).
	Natrium-Tartrat	1 %	
Reagenz C:	Reagenz A	50 Teile	Kurz vor Gebrauch wurden die Reagenzien im Verhältnis 50:1 gemischt.
	Reagenz B	1 Teil	
Reagenz D:	Folin-Reagenz wurde im Verhältnis 1:5 mit Reinstwasser verdünnt.		

7.1.10.3 Lösungen, Puffer und Medien für die Zellkultur

Medienzusätze	Hypoxanthin	10 mg/ml	Die Verbindungen wurden in Reinstwasser gelöst (im Falle von Hypoxanthin, Xanthin und Mycophenolsäure wurde bis zur Lösung der Verbindung 1 N Natronlauge zugetropft) und steril filtriert. Die Lagerung der Stammlösungen erfolgte bei -20 °C (4 °C bei Polybren). Mycophenolsäure wurde unter Lichtausschluss gelagert.
	Xanthin	10 mg/ml	
	Mycophenolsäure	10 mg/ml	
	Natriumbutyrat	500 mM	
	Polybren	4 mg/ml	
	G418	50 mg/ml	
PBS-Puffer	NaCl	137 mM	Die Salze wurden in Reinstwasser gelöst und autoklaviert. Die Lagerung des PBS-Puffers erfolgte bei Raumtemperatur.
	KCl	2.5 mM	
	Na ₂ HPO ₄	7.5 mM	
	KH ₂ PO ₄	1.5 mM	
Trypsin-Puffer	EDTA	0.6 mM	Die Lösung von EDTA in PBS wurde autoklaviert. Nach Abkühlen der Lösung wurde eine sterile Trypsin- und Phenolrot-Stammlösung zugegeben. Der Trypsin-Puffer wird bei Raumtemperatur gelagert.
	Trypsin	0.05 %	
	Phenolrot	0.01 %	

Medium zur Kultivierung von NCB-20-Zellen

DMEM

10 % FCS

100 U/ml Penicillin

100 µg/ml Streptomycin

HAT-Supplement

Medium zur Kultivierung von GP⁺envAM-12-Verpackungs-Zellen

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

Medium zur Kultivierung von CHO-K1-Zellen

DMEM/F-12
10 % FCS
100 U/ml Penicillin
100 µg/ml Streptomycin

Zusatz bei transfizierten Zellen:

Selektionsmedium:
800 µg/ml G418
Kulturmedium:
200 µg/ml G418

Medium zur Kultivierung von PathHunter[®] CHO-K1 β-Arrestin Zelllinien

Ham's F-12 Nutrient Mix
10 % FCS
100 U/ml Penicillin
100 µg/ml Streptomycin
300 µg/ml Hygromycin B

Zusatz bei transfizierten Zellen:

800 µg/ml G418

Zell-
Dissoziations-
Puffer

EDTA	2 mM
Glucose	10 mM

EDTA und Glucose wurden in PBS gelöst. Die Lösung wurde autoklaviert und bei Raumtemperatur gelagert.

7.1.10.4 Puffer für funktionelle und Radioligandbindungs-Experimente

Für Test-Verbindungen wurden in der Regel DMSO-Stammlösungen (10 mM) hergestellt. Um einzelne Verbindungen in hohen Konzentrationen testen zu können wurden höher konzentrierte Stammlösungen (100 mM) hergestellt. Sehr hydrophile

Verbindungen wurden statt in DMSO in Reinstwasser gelöst. Um eine konstante DMSO-Konzentration bei allen Experimenten sicherzustellen, wurde im Falle von in Wasser gelösten Verbindungen eine entsprechende Menge DMSO zugegeben.

HBSS-Puffer:	HEPES	20 mM	Die Verbindungen wurden in autoklaviertem Reinstwasser gelöst. Der pH-Wert des Puffers wurde auf 7.4 eingestellt und der Puffer wurde bis zur Verwendung bei -20 °C gelagert.
	NaCl	13 mM	
	Glukose	5.5 mM	
	KCl	5.4 mM	
	NaHCO ₃	4.2 mM	
	CaCl ₂	1.25 mM	
	MgCl ₂	1 mM	
	MgSO ₄	0.8 mM	
	KH ₂ PO ₄	0.44 mM	
	Na ₂ HPO ₄	0.34 mM	
Lyse-Puffer: (cAMP-Experimente)	EDTA	4 mM	Die Verbindungen wurden in autoklaviertem Reinstwasser gelöst. Der pH-Wert der Lösung wurde auf 7.4 eingestellt. Der Lyse-Puffer wurde bei 4 °C gelagert.
	Triton™ X-100	0.01 %	
Krebs-Hepes-Puffer (KHP):	NaCl	118.6 mM	Nachdem die Verbindungen in Reinstwasser gelöst waren, wurde der Puffer auf einen pH-Wert von 7.4 eingestellt. Die Lagerung des Puffers erfolgte bei -20 °C.
	Glukose	11.7 mM	
	HEPES	10 mM	
	KCl	4.7 mM	
	NaHCO ₃	4.2 mM	
	CaCl ₂	1.3 mM	
	MgSO ₄	1.2 mM	
	KH ₂ PO ₄	1.2 mM	
Calciumfreier KHP:	Calciumionen wurden durch Magnesiumionen ersetzt. Außerdem wurde dem Puffer EGTA (Endkonzentration 100 µM) zugegeben. Der pH-Wert des Puffers wurde auf 7.4 eingestellt. Die Lagerung des Puffers erfolgte bei -20 °C.		

Tris/EDTA-Lösung:	Tris EDTA	5 mM 2 mM	Beide Verbindungen wurden in Reinstwasser gelöst. Der pH-Wert der Lösung wurde auf 7.4 eingestellt. Die Lösung wurde bei 4 °C gelagert.
Oregon Green [®] :	50 µg Oregon Green [®] 488 BAPTA-1/AM wurden in 39.7 µl DMSO gelöst. Diese Stammlösung wurde aliquotiert (3 µl) und unter Lichtausschluss bei -20 °C gelagert.		
Pluronic [®] -F127:	Es wurde eine Stammlösung mit einer Konzentration von 250 mg/ml hergestellt. Diese wurde bei Raumtemperatur gelagert und vor Gebrauch kurz bei 37 °C im Wasserbad erwärmt.		
Tris-Waschpuffer	Tris Bindungsstudien am hA _{2B} AR: + BSA	50 mM 0.1 %	Die Lösung aus Tris in Reinstwasser wurde auf einen pH-Wert von 7.4 eingestellt. Die Lagerung des Puffers erfolgte bei 4 °C.

7.2 Molekularbiologie

7.2.1 Isolierung von Nucleinsäuren aus Zellen

Die Isolierung von RNA aus Zellen erfolgte nach Herstellerangaben mit TRIzol[®] Reagent oder dem PerfectPure RNA Cultured Cell Kit. Die RNA wurde nach Herstellerangaben mithilfe des Omniscript RT Kits oder des QuantiTect Reverse Transcription Kits in cDNA umgeschrieben. Zuvor wurde ggf. photometrisch die RNA-Konzentration einer Verdünnung im Verhältnis 1:100 bestimmt. Zur Nullwert-Bestimmung wurde RNase-freies Wasser eingesetzt.

Für RACE-Experimente wurde gemäß den Herstellerangaben des GeneRacer[®] Kits eine Vorbehandlung der RNA vor dem Umschrieb in DNA durchgeführt.

Genomische DNA wurde entsprechend den Herstellerangaben anhand des PureLink[®] Genomic DNA Mini Kits aus Zellen isoliert.

7.2.2 Primerkonstruktion

Die konstruierten Primer wurden mithilfe der Programme DNATrans (Dr. A. Schiedel / J. Bosmann) und OligoAnalyzer (Integrated DNA Technologies) analysiert und i. d. R. durch die Firma Life Technologies synthetisiert. Nur die Primer gegen die murinen β -Aktin-Sequenzen wurden durch die Firma MWG-Biotech synthetisiert.

Die Kürzel f und r am Anfang des Primernamens stehen für „forward“ und „reverse“. Zur Kennzeichnung der Spezies sind die Buchstaben m (Maus), r (Ratte), h (Mensch) und c (Chinesischer Streifenhamster) direkt vor dem Gennamen angegeben. Ggf. an den Primer angefügte Schnittstellen-Sequenzen sind kursiv dargestellt (die Namen der entsprechenden Restriktionsenzyme sind am Ende des Primernamens angegeben). Nicht-hybridisierende Anteile der Primer sind in grau dargestellt. Nummern im Primernamen geben die Position des ersten (f) bzw. letzten Nucleotides (r) der cDNA-Sequenz an, an das der Primer bindet.

β -Aktin-Primer:

- | | |
|-------------------------|---------------------------------|
| 1, f-m/r β -Aktin | 5'-CCCTAAGGCCAACCGTGAAAAGAT-3' |
| 2, r-r β -Aktin | 5'-AGGTCCC GGCCAGCCAGGTC-3' |
| 3, f-c β -Aktin | 5'-TGACGATATCGCTGCGCTCGTTGTC-3' |
| 4, r-c β -Aktin | 5'-CCATCTCCTGCTCGAAGTCCAGGG-3' |

Umgeschriebene RNA aus CHO-Zellen oder NCB-20-Zellen wurde anhand von PCR-Reaktionen mit dem Primerpaar 1/2 kontrolliert (obwohl die Primer basierend auf der Gensequenz von Ratten konstruiert wurden, konnten auch die Sequenzen des Chinesischen Streifenhamsters amplifiziert werden, da ein hoher Konservierungsgrad zwischen den Sequenzen vorlag). Nach Bekanntwerden der Sequenzen des CHO-Zell-Genoms wurden einzelne umgeschriebene RNA-Präparate nachträglich in PCR-Reaktionen mit dem Primerpaar 3/4 kontrolliert.

Primer zur Amplifikation eines cDNA-Fragmentes des cAdeR:

- | | |
|-------------|-----------------------------|
| 5, f-Ade249 | 5'-GCTGACTTCCTCTTCCTC-3' |
| 6, r-Ade857 | 5'-CCACGAAGAAGTAAATGATGG-3' |

Die Nummern dieser und der weiteren cAdeR-Primer richteten sich nach der Position der Nucleotide im prototypischen, orthologen rAdeR.

RACE-Primer:

7, f-cAde-330-RACE	5'-CTCCCGTGCTTTAACACCGTCATG-3'
8, f-cAde-440-RACE	5'-CTGCCGCCGCCAAAACACACATC-3'
9, r-cAde-642-RACE	5'-GGCTAGGCTGGATAGACAGAGAAC-3'
10, r-cAde-831-RACE	5'-CAGGACGAGTGATGCCAGATAAAGAC-3'

RACE-Primer wurden aufgrund von Vorgaben konstruiert, die von den Herstellern des für diese Experimente genutzten GeneRacer[®] Kits vorgeschlagen wurden. Primer 5 oder 6 sowie Primer 7 oder 8 wurden mit Primern des GeneRacer[®] Kits gemäß Herstellerangaben kombiniert.

Primer zur Amplifikation von DNA-Fragmenten des cAdeR-Gens:

11, f-AdeEx1(-)233	5'-AAGCATAGCAAAACCAGAG-3'
12, f-AdeEx1(-)205	5'-TGTCTCAGGAGGAACATG-3'
13, r-AdeEx1(+)169	5'-CTGTCTGCACCAAACCTC-3'
14, r-AdeEx1(+)253	5'-TCTGTGATTTGAGCTCATC-3'
15, f-AdeEx2(-)m	5'-TCATTTCTTCTTTGTGTTCCC-3'
16, f-AdeEx2(-)r	5'-CATGTCTTCTTTGTGTTCCC-3'
17, r-AdeEx2(+)58	5'-CAGCAGGGCAGTGCTCAC-3'
18, r-AdeEx2(+)251	5'-GAAAGCTTCAGAGGAAGTTAG-3'

Es wurden DNA-Fragmente mit den Primerpaaren 11/13, 11/14, 12/13, 12/14, 15/6, 16/6, 5/17 und 5/18 amplifiziert.

Primer zur Amplifikation der Gesamt-cDNA des cAdeR:

19, f-cAde-ATG	5'-ATGGGGAAAGCAGCACCAGGTCAGG-3'
20, r-cAde(+)23	5'-GAGGTCCAGGCAGAGGC-3'

Die Gesamt-cDNA wurde zuerst in zwei Teilen mit den Primerpaaren 5/20 und 19/6, sowie in einem Stück mit dem Primerpaar 19/20 amplifiziert.

Primer zur Klonierung des cAdeR

21, f-cAdeATG-EcoRI	5'-GATCAGAATTCATGGGGAAAGCAGCACC-3'
22, r-cAdeTGA-BamHI	5'-ACTACGGATCCTCACTGCTCCACTCTGCTG-3'
23, r-cAdeTGA-XhoI	5'-TGTCGCTCGAGTCACTGCTCCACTCTGCTG-3'

Für die Insertion der cAdeR-cDNA in den Vektor pLXSN wurde ein PCR-Produkt mit dem Primerpaar 21/22 erzeugt, während für die Einführung der Sequenz in den Vektor pFastBac™1 ein PCR-Produkt anhand des Primerpaars 21/23 erzeugt wurde.

Primer zur Generierung der cAdeR-Δ321-327-Mutante

24, r-cAdeCΔ1 5'-TGCTGGACATCTCTGCTGTGTTATCACCCGTCTCGGGAG-3'

25, r-cAdeCΔ2 5'-TCACTGCTCCACTCTGCTGCTGGACATCTCTGCTGTG-3'

Zur Generierung der Mutante wurde in einem ersten Schritt das Primerpaar 19/24 genutzt. Nach einer Gelaufreinigung des PCR-Produktes wurde es als Matrize für eine PCR mit dem Primerpaar 19/25 eingesetzt. Das resultierende PCR-Produkt wurde wiederum für eine PCR mit den Klonierungsprimern 21/22 als Matrize eingesetzt. Über die Primer erfolgte das schrittweise verfrühte Anfügen des 5'-Endes an die Sequenz der cAdeR-cDNA. Somit konnten die Basen deletiert werden, die für Aminosäuren codierten, die kein Homolog in anderen AdeR besitzen.

Primer zur Klonierung des hGPR34 und hGPR171

26, f-hGPR34-EcoRI 5'-ACATAGAATTCCACCATGAGAAGTCATACCATAACAATG-3'

27, f-hGPR34-NheI 5'-ACATAGCTAGCACCATGAGAAGTCATACCATAACAATG-3'

28, r-hGPR34-ohneStopp-HindIII

5'-ACTAGACAAGCTTGAAGTACTTTTAGAAGTACTGACTGTAT-3'

29, r-hGPR34-BamHI 5'-ACATAGGATCCTCAAGTACTTTTAGAAGTACTGACTG-3'

30, f-hGPR171-EcoRI 5'-ACATAGAATTCCACCATGACAAACAGTTCGTTCTTCTG-3'

31, f-hGPR171-MluI(myc)

5'-ACATAGACGCGTTGATGACAAACAGTTCGTTCTTCTG-3'

32, r-GPR171-BamHI 5'-ACATAGGATCCTTATGCATTATTTTACATCTTAATT-3'

Für die Insertion der cDNAs in das Plasmid pLXSN wurde ein PCR-Produkt anhand des Primerpaars 26/29 (hGPR34) bzw. 30/32 (hGPR171) generiert. Außerdem wurde nach der Einführung einer myc-Tag-Sequenz in den pLXSN-Vektor auch die Primerkombination 31/32 genutzt um die hGPR171-cDNA in den Vektor einzubringen und nach Expression einen N-terminal markierten Rezeptor zu erhalten. Dabei mussten zwei zusätzliche Nucleotide in 5'-Richtung vor dem Startcodon in den Primer eingebracht werden um sicherzustellen, dass die Rezeptor-cDNA im durch das Myc-Tag-Startcodon vorgegebenen Leseraster liegt.

Zur Insertion der hGPR34-cDNA in die pCMV-ProLink™-Plasmide wurde mit dem Primerpaar 27/28 ein PCR-Produkt generiert. Damit das C-terminale ProLink™-Fragment im korrekten Leseraster liegt, mussten beim Primer 28 ebenfalls zwei Nucleotide in 3'-Richtung vom letzten Codon eingebracht werden (das Stopp-Codon wurde in der Primer-Sequenz deletiert).

Primer zur Klonierung des hGPR35, hGPR35b, mGPR35 und rGPR35

33, f-hGPR35-EcoRI 5'-ACATAGAATTCACCATGAATGGCACCTACAACACCTG-3'

34, r-hGPR35-BamHI 5'-ACATAGGATCCTTAGGCGAGGGTCACGCACAG-3'

35, f-hGPR35-LONG-EcoRI

5'-TAACAGAATTCACCATGAATGGCACCTACAACACCTGTGGCTCCAGC-3'

36, r-hGPR35-LONG-BamHI

5'-TAACAGGATCCTTAGGCGAGGGTCACGCACAGAGAGTCCTGG-3'

37, f-hGPR35b-EcoRI 5'-TAACAGAATTCACCATGCTGAGTGGTTCCTCCGGGCTGTCCCCAC-3'

38, f-hGPR35b-NheI 5'-TAGTAGCTAGCACCATGCTGAGTGGTTCCTCCGGGCTGTCCCCAC-3'

39, r-hGPR35-LONG-ohneStopp-HindIII

5'-TAACACGAAGCTTGAGGCGAGGGTCACGCACAGAGAGTCCTGGCT-3'

40, f-mGPR35-EcoRI

5'-TAACAGAATTCACCATGAATAGTACAACCTGTAACAGCACCCCTCACGTGG-3'

41, f-mGPR35-NheI

5'-TAACAGCTAGCACCATGAATAGTACAACCTGTAACAGCACCCCTCACGTGG-3'

42, r-mGPR35-BamHI 5'-TAACAGGATCCCTAGGTGAGGCTCAGGATCTGGGAATCTTGGC-3'

43, r-mGPR35-ohneStopp-HindIII

5'-TAACACGAAGCTTGAGGTGAGGCTCAGGATCTGGGAATCTTGGCTC-3'

44, f-rGPR35-EcoRI

5'-TAACAGAATTCACCATGAACAATACAAATTGTAGCATCCTCCCGTGGCC-3'

45, f-rGPR35-NheI

5'-TAACAGCTAGCACCATGAACAATACAAATTGTAGCATCCTCCCGTGGCC-3'

46, r-rGPR35-BamHI 5'-TAACAGGATCCCTAGGTGAGGCTCAGGCTCTGAGTATCTTGGCTC-3'

47, r-rGPR35-ohneStopp-BglII

5'-TAACAGAGATCTGGGTGAGGCTCAGGCTCTGAGTATCTTGGCTC-3'

Anhand des Primerpaars 33/34 konnte kein PCR-Produkt erhalten werden, weshalb längere Primer für den GPR35 konstruiert wurden. Zur Insertion der cDNA der Rezeptoren in das pLXSN-Plasmid wurden PCR-Produkte anhand der Primerpaare 35/36 (hGPR35), 37/36 (hGPR35b), 40/42 (mGPR35) und 44/46 (rGPR35) amplifiziert. Um die Rezeptor-cDNAs in die pCMV-ProLink™-Plasmide einbringen zu können, wurden außerdem PCR-Ansätze mit den Primerpaaren 38/39 (hGPR35b), 41/43 (mGPR35) und 45/47 (rGPR35) hergestellt. Aus demselben Grund wie für Primer 28 beschrieben wurden auch in die Primer 39, 43 und 47 zusätzliche Nucleotide nach dem letzten Codon des Rezeptors in die Primer-Sequenz eingeführt, bei dem zusätzlich das jeweilige Stoppcodon deletiert wurde.

7.2.3 Polymerase-Ketten-Reaktion

Alle PCR-Reaktionen wurden unter Einsatz der Pyrobest®-Polymerase oder BioMix™ Red durchgeführt. Die Standard-Zusammensetzungen waren folgendermaßen:

Ansatz mit Pyrobest®-Polymerase:

x	µl	Matrizen-DNA	(~ 20 ng Plasmid, >100 ng cDNA oder gDNA)
2	µl	f-Primer	(5 µM)
2	µl	r-Primer	(5 µM)
5	µl	Pyrobest®-Puffer	(10 x)
4	µl	dNTP-Mix	(je 2.5 mM)
0.5	µl	Pyrobest®-Polymerase	(5 U / µl)
[2.5	µl	DMSO	(100 %)]
y	µl	steriles Wasser	

50 µl

Ansatz mit BioMix™ Red:

x	µl	Matrizen-DNA	(~ 20 ng Plasmid, >100 ng cDNA oder gDNA)
2	µl	f-Primer	(5 µM)
2	µl	r-Primer	(5 µM)
25	µl	BioMix™ Red	(2 x)
[2.5	µl	DMSO	(100 %)]
y	µl	steriles Wasser	
<hr/>			
50	µl		

Bei geringen Ausbeuten wurde DMSO (Endkonzentration 5 %) zugesetzt.

Folgende Standardprogramme wurden für die PCR-Reaktionen genutzt:

Pyrobest®-Ansatz:

98 °C	10 s] 30x
T _m -3 °C	40 s	
72 °C	60 s / kbp	
72 °C	120 s	

BioMix™-Ansatz:

94 °C	20 s] 30 x
94 °C	30 s	
T _m -3 °C	30 s	
72 °C	60 s / kbp	
72 °C	600 s	

Die Anlagerungstemperatur richtete sich nach der Schmelztemperatur der eingesetzten Primer, die Elongationszeit nach der Länge des erwarteten PCR-Produktes.

7.2.4 Agarose-Gelelektrophorese

Die elektrophoretische Auftrennung von DNA-Fragmenten erfolgte in einem 1%igen Agarosegel. Dazu wurde Agarose in 1x TAE-Puffer mehrfach in der Mikrowelle aufgekocht, bis eine klare Lösung erhalten wurde. Nach kurzer Abkühlung erfolgte die Zugabe von GelRed™ zur Agarose-Lösung im Verhältnis 1:20000. Die Lösung wurde im Anschluss daran in einen mit Kämmen bestückten Gelschlitten gegossen. Nach dem Erstarren des Gels, wurden die Kämmen entfernt. Das Gel wurde in eine Elektrophorese-Kammer gelegt und mit 1x TAE-Puffer überschichtet. Die aufzutrennenden DNA-Proben wurden mit einem 6x Ladepuffer versetzt und in die Taschen des Gels pipettiert. Die

Gelelektrophorese erfolgte bei 100 V. Durch Bestrahlung des Gels mit UV-Licht wurden die aufgetrennten DNA-Banden sichtbar gemacht und fotografisch dokumentiert. Die Abschätzung der Fragment-Größe und DNA-Menge pro Bande erfolgte anhand eines zusätzlich auf das Gel aufgetragenen Markers.

7.2.5 Aufreinigung von DNA-Fragmenten

In Lösungen enthaltene DNA-Fragmente wurden mit dem DNA Clean & Concentrator™-25 Kit nach Herstellerangaben aufgereinigt und aufkonzentriert. Aus Gelstücken wurden DNA-Fragmente anhand des Zymoclean™ Gel DNA Recovery Kits isoliert und aufgereinigt.

7.2.6 Restriktionsverdau

Aufgereinigte PCR-Produkte und Vektoren, in die die DNA-Fragmente eingebracht werden sollten, wurden mit Restriktions-Endonucleasen behandelt. Es wurden teilweise FastDigest-Enzyme der Firma Thermo Scientific, teilweise Enzyme der Firma New England Biolabs® (NEB) eingesetzt. Für den Verdau wurden die folgenden Standardzusammensetzungen gewählt:

FastDigest-Ansatz:

x	µl	DNA	(>100 ng Plasmid, >800 ng PCR-Produkt)
1	µl	FastDigest-Puffer	(10 x)
je 1	µl	FastDigest-Enzym	
y	µl	steriles Wasser	
<hr/>			
10	µl		

Inkubation: nach Herstellerangaben für das jeweilige Enzym 30-60 min bei 37 °C

NEB-Ansatz:

x	µl	DNA	(>100 ng Plasmid, >800 ng PCR-Produkt)
1	µl	NEB-Puffer 3	(10 x)
je 0.5	µl	NEB-Enzym	
[1	µl	BSA	(10x)]
y	µl	steriles Wasser	
<hr/>			
10	µl		

Inkubation: 60 min bei 37 °C

(Die Zugabe von BSA erfolgte nur, falls diese für das jeweilige Enzym nach Herstellerangaben erforderlich war.)

Die Plasmide, in die DNA-Fragmente eingebracht werden sollten, wurden mit folgenden Enzymen geschnitten:

pFastBac™1	EcoRI / XhoI
pLXSN	EcoRI / BamHI
pLXSN-myc	MluI / BamHI
pCMV-ProLink™-Vektoren	NheI / HindIII
	(nur im Falle des rGPR35 mit Nhe / BglII)

Zur Entfernung kurzer DNA-Fragmente wurde der Verdau-Ansatz von PCR-Produkten nach der Inkubation mit dem DNA Clean & Concentrator™-25 Kit nach Herstellerangaben aufgereinigt. Mit Ansätzen, in denen Plasmide verdaut wurden, erfolgte dagegen eine elektrophoretische Auftrennung. Die gewünschten Banden wurden dann aus dem Gel ausgeschnitten und mithilfe des Zymoclean™ Gel DNA Recovery Kits aus dem Gel isoliert.

7.2.7 Ligation von DNA-Fragmenten

Das Einführen von mit Endonucleasen geschnittenen DNA-Fragmenten in ähnlich behandelte Plasmide wurde durch die Ligation beider Nucleinsäuren nach folgendem Standardansatz durchgeführt:

x	µl	PCR-Produkt	(~ 200 ng)
y	µl	Plasmid-DNA	(~ 50 ng)
1	µl	Ligase-Puffer	(10 x)
0.5	µl	ATP	(10 mM)
0.5	µl	T4-Ligase	
z	µl	steriles Wasser	

10 µl

Inkubation: über Nacht bei 16 °C oder 2 h bei RT

Für die Klonierung von DNA-Fragmenten der cAdeR-cDNA wurde das CloneJET PCR Cloning Kit eingesetzt. Die Präparation des PCR-Produktes sowie seine Ligation mit dem im Kit enthaltenen aufgeschnittenen pJet1.2-Plasmid wurden nach Angaben des Herstellers durchgeführt.

7.2.8 Herstellung chemisch kompetenter Bakterien

4 ml LB-Medium ohne Antibiotika wurden mit 50 µl einer Glycerinkultur nicht-transformierter *E. coli* Top10-Bakterien angeimpft. Diese Kultur wird über Nacht bei 37 °C und 220 rpm schüttelnd inkubiert. Am nächsten Tag wurde diese Bakterienkultur in 40 ml LB-Medium ohne Antibiotika überführt. Nach einer etwa 45minütigen Inkubation unter den bereits genannten Bedingungen wurde die optische Dichte der Bakterienkultur bei 550 nm bestimmt. Sobald eine optische Dichte von 0.5 erreicht war, wurden die Bakterien durch eine 20minütige Zentrifugation bei 1700 g und 4 °C sedimentiert. Sie wurden danach in 20 ml einer sterilen, eiskalten 0.1 M CaCl₂-Lösung aufgenommen und 30 min unter Eiskühlung inkubiert. Anschließend wurden die Bakterien erneut unter den gleichen Bedingungen wie zuvor sedimentiert. Die sedimentierten Bakterien wurden in 2 ml eiskalter CaCl₂-Lösung resuspendiert. Nach Zugabe von 0.5 ml Glycerol wurde die Bakteriensuspension aliquotiert (à 100 µl) und bis zur Verwendung bei -80 °C gelagert.

7.2.9 Transformation kompetenter Bakterien

Die zur Transformation einzusetzenden Bakterien wurden unter Eiskühlung aufgetaut. Der Ligationsansatz oder 10 ng eines Plasmides wurden danach vorsichtig unter die Bakterienkultur gemischt. Nach einer 30 min dauernden Inkubation auf Eis erfolgte ein Hitzeschock in Form einer 2 min dauernden Inkubation des entsprechenden Reaktionsgefäßes im 37 °C warmen Wasserbad. Nach einer erneuten 2minütigen Inkubation unter Eiskühlung wurden der Bakteriensuspension 200 µl S.O.C.-Medium zugegeben. Die Kultur wurde danach 30-60 min bei 37 °C unter Schütteln (220 rpm) inkubiert. Die komplette Kultur wurde mit einem Drigalski-Spatel auf einer LB-Agarplatte ausgestrichen, die das jeweilige Antibiotikum enthielt gegen das das transformierte Plasmid Resistenz verleiht. Die Platte wird dann mit der Unterseite nach oben für ca. 15 Stunden bei 37 °C inkubiert.

7.2.10 Anzucht monoklonaler Bakterienkulturen

Einzelne auf einer LB-Agar-Platte gewachsene monoklonale Bakterienkolonien wurden mit einer Pipettenspitze in 4 ml (für eine Plasmid-Präparation im Mini-Maßstab) oder 250 ml (für eine Plasmidpräparation im Midi oder Maxi-Maßstab) LB-Medium überführt, dem das geeignete Antibiotikum zugesetzt wurde. Die Bakterienkultur wird etwa 15 h unter Schütteln (220 rpm) bei 37 °C inkubiert. Alternativ könnte das LB-Medium auch mit einer Glycerinkultur einer zuvor hergestellten monoklonalen Bakterienkultur angeimpft werden.

7.2.11 Isolierung von Plasmid-DNA aus Bakterien

Die Isolierung von Plasmid-DNA aus monoklonalen Bakterienkulturen wurde im Mini-Maßstab mit dem Zyppy™ Plasmid Miniprep Kit nach Angaben des Herstellers durchgeführt. Größere Mengen an Plasmid-DNA wurden unter Einsatz des PureLink® HiPure Plasmid Filter Midiprep Kits oder des Zyppy™ Plasmid Maxiprep Kits erhalten. Die Durchführung der Plasmid-DNA-Isolierung mithilfe dieser Kits erfolgte entsprechend der vom Hersteller empfohlenen Protokolle. Alle drei Kits basieren auf der Methode der alkalischen Lyse.

7.2.12 Generierung und Isolierung von Bacmid-DNA aus Bakterien

Nach Herstellerangaben wurde anhand des Bac-to-Bac[®] Baculovirus Expression Systems Bacmid-DNA mit der gewünschten DNA-Insertion generiert. Schlüsselschritte dabei war das Einführen der gewünschten DNA in den Vektor pFastBac[™]1. Mit dem Konstrukt wurde dann ein im Kit mitgelieferter Bakterienstamm transformiert, in dem die Übertragung der in das Plasmid eingebrachten DNA auf eine Bacmid-DNA stattfand. Die Bakterien wurden gemäß Herstellerangaben auf Agar-Platten kultiviert und monoklonal selektiert. Aus den resultierenden Bakterienkulturen wurde dann mit Hilfe des ZR BAC DNA Miniprep Kits nach den Angaben des Herstellers die enthaltene Bacmid-DNA isoliert.

7.2.13 Sequenzierung

Die Sequenzierung isolierter Plasmid-DNA wurde durch die Firma GATC-Biotech durchgeführt. Dazu wurden Sequenzierungsprimer von dieser Firma bereitgestellte Primer ausgewählt, die 40-60 bp vor der Insertionsstelle an die Sequenz des DNA-Konstruktes banden. Die Analyse der erhaltenen Elektropherogramme erfolgte mit dem Programm Chromas Lite 2.01.

7.2.14 Anlegen von Glycerinkulturen

Zur Konservierung von (transformierten) Bakterien wurden Glycerinkulturen dieser Bakterien angelegt. Dazu wurden 200 µl Glycerin in ein Reaktionsgefäß vorgelegt und mit 800 µl einer frischen Übernachtskultur der Bakterien vermischt. Die Lagerung der Kulturen erfolgte bei -20 °C.

7.3 Zellkultur

Die Kultivierung von Zellen fand stets unter sterilen Bedingungen und mit sterilen Lösungen statt.

7.3.1 Auftauen von Zellen

Um kryokonservierte Zellen in Kultur zu nehmen, wurden sie zunächst schnell (z. B. im warmen Wasserbad) aufgetaut. Die empfindlichen Verpackungs- und NCB-20- und Sf9-Insekten-Zellen wurden in Medium resuspendiert (ca. 15 ml, jeweils verwendete Mediumzusammensetzung siehe Kapitel 7.1.10.3, für Sf9-Insektenzellen wurde das Insect-Xpress Medium ohne Zusätze verwendet) und durch eine fünfminütige Zentrifugation bei 200 x g sedimentiert. Die sedimentierten Zellen wurden dann in 15 ml Medium vereinzelt. Die Zellsuspension wurde in eine 75 cm² Zellkulturflasche überführt. Bei weniger empfindlichen Zellen wurden 25 ml des für die Zellen geeigneten Mediums in eine 175 cm² Zellkulturflasche gegeben. Die Zellsuspension wurde nach dem Auftauen direkt in die Zellkulturflasche überführt.

7.3.2 Kultivierung von Zellen

Die Kultivierung von Sf9-Insektenzellen erfolgte sowohl in adhärenenten als auch in Suspensions-Kulturen bei 27 °C. Nachdem die Zellen eine Konfluenz von 80-90 % bzw. eine Zelldichte von 9×10^6 Zellen/ml erreicht hatten, wurden sie passagiert. Bei adhärenenten Zellkulturen wurde dazu das überstehende Medium entfernt und gegen 10 ml frisches Medium ersetzt. Durch kräftiges Klopfen wurden die Zellen mechanisch abgelöst und durch Pipettieren vereinzelt. 12×10^6 Zellen/ml (etwa ein Aufteilungsverhältnis von 1:4) wurden dann in eine neue Zellkulturflasche mit Medium überführt. Zum passagieren der Zellen in Suspensionskultur wurden die Zellen über 5 min bei 200 x g sedimentiert. Die Zellen wurden in frischem Medium aufgenommen und neue Suspensionskulturen mit einer Zelldichte von etwa 1×10^6 Zellen/ml wurden angelegt. Die weitere Kultivierung erfolgte unter den oben genannten Standardbedingungen.

Die Kultivierung der in dieser Arbeit verwendeten Säugetier-Zelllinien erfolgte bei 37 °C und 5 % CO₂. Sobald die Zellen eine Konfluenz von 80-90 % erreicht hatten, wurden sie passagiert. Dazu wurde das über den Zellen stehende Medium abgenommen. Nach dem Waschen der Zellen mit 10 ml PBS-Puffer wurden 2 ml einer 0.05 % Trypsin / 0.6 mM EDTA-Lösung auf die Zellen getropft. Die Lösung verursachte im Zuge einer etwa 2minütigen Inkubationszeit die Ablösung der Zellen. Anschließend wurden 10 ml Medium zugegeben, in dem die Zellen vereinzelt wurden. Teile der Zellsuspension wurden in eine neue mit Medium gefüllte Zellkulturflasche überführt. Das Aufteilungsverhältnis wurde

an die aktuelle Wachstumsrate der Zelllinie angepasst. Die Zellen wurden unter den oben genannten Standardbedingungen weiter kultiviert.

7.3.3 Anlegen von Kryokulturen

Zur Konservierung von Zelllinien wurden diese bei -196 °C in flüssigem Stickstoff eingefroren. Wie beim Passagieren der jeweiligen Zelllinie wurden die Zellen abgelöst und durch Zentrifugation (5 min, $200 \times g$) sedimentiert. Die Zellen wurden dann in einer Mischung aus 90 % FCS / 10 % DMSO aufgenommen und in Kryogefäße überführt. Das Einfrieren erfolgte in einer geschlossenen Styroporbox über Nacht bei -80 °C . Am nächsten Tag wurden die Kryokulturen dann in einen Stickstofftank überführt.

7.3.4 Bestimmung der Zellzahl

Zur Bestimmung der Zellzahl einer Zellsuspension wurde eine Neubauer-Zählkammer eingesetzt. Am Rand eines auf der Zählkammer befestigten Deckglases wurden dazu $10\text{ }\mu\text{l}$ der Zellsuspension aufgetragen. Durch Kapillarkräfte verteilte sich die Suspension unter dem Deckglas und damit über die Fläche der Zählkammer. Die vier Großquadrate der Zählkammer wurden ausgezählt. Um die Zelldichte der Suspension zu bestimmen, wurde die ermittelte Zellzahl durch vier geteilt und mit dem Faktor 10^4 multipliziert. Das Ergebnis entsprach der Zellzahl pro ml Zellsuspension.

7.3.5 Transfektion und Infektion von Insektenzellen

Die Transfektion von Insektenzellen sowie die Ernte erster Baculovirus-Überstände erfolgte gemäß Herstellerangaben des Bac-to-Bac[®] Baculovirus Expression Systems. Zur Infektion einer adhärennten Sf9-Insektenzell-Kultur wurden 18×10^6 Zellen (die zuvor in 15 ml Medium vereinzelt wurden) in eine 175 cm^2 -Zellkulturflasche überführt. Nach 30-60 Minuten wurde das über den nun angehefteten Zellen stehende Medium verworfen. Auf die Zellen wurden dann 3 ml eines Baculovirus-Überstandes aufgetropft, die gut verteilt wurden. Nach einer 60minütigen Inkubation bei Raumtemperatur unter gelegentlichem Schwenken wurden 17 ml Medium zugegeben. Nach der Infektion

wurden die Zellen drei Tage lang unter Standardbedingungen kultiviert und am vierten Tag in dem Medium durch starkes Klopfen abgelöst. Die Zellsuspension wurde zentrifugiert. Der Überstand (der Baculoviren enthält) wurde bei 4 °C gelagert bis er für weitere Infektionen von Insektenzellen eingesetzt wurde. Die sedimentierten Zellen wurden direkt für eine Membranpräparation eingesetzt oder nach zweimaligem Waschen mit PBS bei -80 °C gelagert. Zur Infektion von Suspensionskulturen wurde eine solche Kultur mit einer Zelldichte von 3×10^6 Zellen/ml hergestellt. Es erfolgte die Zugabe von 0.3 ml Virusüberstand pro ml Zellsuspension. Die Ernte der infizierten Zellen und des Baculovirus-Überstandes erfolgte wie oben beschrieben.

7.3.6 Transfektion von Säugetierzellen

Zelllinien für die Durchführung von β -Arrestin-Rekrutierungs-Experimenten wurden durch die Transfektion einer speziellen Mutterzelllinie (PathHunter[®] CHO-K1 β -Arrestin Parental Cell Line) hergestellt. Dazu wurden 5 ml Standardmedium (s. o.) mit 2×10^6 Zellen in eine 25 cm²-Zellkulturflasche gegeben. Am nächsten Tag erfolgte die Transfektion unter Einsatz von Lipofectamine[®] 2000 entsprechend den Herstellerempfehlungen. Für einen Ansatz wurden 10 μ g DNA eingesetzt. Dabei handelte es sich um pCMV-ProLink[™]-Vektoren, in die die gewünschte Rezeptor-DNA eingebracht wurde. Am Tag nach der Transfektion wurden die Zellen abgelöst und in eine 175 cm²-Zellkulturflasche überführt. Am darauffolgenden Tag wurde das Standardmedium gegen ein Selektionsmedium ausgetauscht, das zusätzlich 800 μ g/ml G418 enthielt. Nach einer einwöchigen Selektionsphase konnten die Zellen für β -Arrestin-Rekrutierungs-Experimente eingesetzt werden.

7.3.7 Retrovirale Transfektion von Säugetierzellen

Am Tag vor ihrer Transfektion werden 1.5×10^6 GP+envAM-12-Verpackungszellen in 5 ml Medium ohne Xanthin, Hypoxanthin und Mycophenolsäure in eine 25 cm²-Zellkulturflasche gegeben. Am Tag der Transfektion erfolgt ein Mediumwechsel: Das Medium wurde abgenommen und gegen DMEM, 10 % FCS ersetzt. Gemäß dem Protokoll des Herstellers wurde eine Transfektion mit Lipofectamine[®] 2000 durchgeführt. Für den Transfektionsansatz wurden 6.25 μ g eines pLXSN-DNA-Konstruktes mit dem

gewünschtem Rezeptor-cDNA-Insert und 3.75 µg eines pcDNA3.1-DNA-Konstruktes, in dem die kodierende DNA für das VSV-G-Protein eingebracht wurde, eingesetzt. 12-15 Stunden nach der Transfektion wurde das Medium durch 3 ml frischen Mediums (DMEM, 10 % FCS, 100 U/ml Penicillin, 100 µg/ml Streptomycin) ausgetauscht. Dem Medium wurden zur Steigerung der Retrovirus-Produktion außerdem 30 µl einer 500 mM, sterilfiltrierten Natriumbutyrat-Lösung zugegeben. Die weitere Kultivierung der Verpackungszellen erfolgte bei 32 °C für 48 h. Einen Tag vor der Infektion der Zielzellen (CHO-K1-Zellen) wurden 3×10^5 dieser Zellen in einer 25 cm²-Zellkulturflasche ausgesät und unter Standardbedingungen kultiviert. Am Tag der Infektion wurde das Medium der Zielzellen abgenommen und durch den sterilfiltrierten, virenhaltigen Mediumüberstand der Verpackungszellen ersetzt. Außerdem erfolgte die Zugabe von 6 µl einer Polybren-Lösung (4 mg/ml). Nach einer 150minütigen Inkubation wurde der Mediumüberstand verworfen und durch 5 ml des Standardmediums für die Zielzellen ersetzt. Nach 48 h wurden die Zellen abgelöst, in 25 ml Selektionsmedium (800 µg/ml G418, s. o.) aufgenommen und in eine 175 cm²-Zellkulturflasche überführt. Eine Woche lang wurde an jedem zweiten Tag das Medium gewechselt. Nach dieser Selektionsphase wurde die G418-Konzentration im Kulturmedium auf 200 µg/ml reduziert.

7.3.8 Monoklon-Selektion

Für die Selektion monoklonaler Zelllinien wurde eine Zellsuspension polyklonaler Zellen (in dem entsprechenden Kulturmedium) hergestellt, die eine Zelldichte von 1 Zelle pro 100 µl aufwies. Pro Vertiefung einer 96-Loch-Zellkulturplatte wurde danach ein Volumen von 100 µl dieser Suspension zugegeben. Nach 2 Tagen der Kultivierung wurde jede Vertiefung mikroskopisch untersucht. Nur solche Vertiefungen, die eine einzige Zellkolonie aufwiesen, wurden für die weitere Kultivierung ausgewählt. Nachdem die Zellen eine Konfluenz von 80-90 % erreicht hatten, wurden die Zellen aus 10-15 Vertiefungen abgelöst und jeweils in eine 25 cm²-Zellkulturflasche überführt, weiter vermehrt und schließlich in entsprechenden Experimenten eingesetzt.

7.3.9 Membranpräparation

Infizierte Sf9-Insektenzellen wurden sedimentiert, in PBS resuspendiert und erneut sedimentiert. Nach der Wiederholung dieses Waschschrilles mit PBS wurden die Zellen in sterilem 50 mM Tris-Puffer, pH 7.4 resuspendiert. Unter Einsatz eines Dounce Homogenisators wurden die Zellen mit 20 Stößen mechanisch aufgeschlossen. Die Zelllysate wurden 5 min bei 200 x g zentrifugiert. Die im erhaltenen Überstand enthaltenen Membranen wurden bei einer einstündigen Zentrifugation bei 48000 x g sedimentiert. Der Überstand wurde verworfen und die Membranen wurden in sterilem 50 mM Tris-Puffer, pH 7.4 resuspendiert. Diese Membranpräparation wurde bis zum Gebrauch bei -80 °C gelagert.

Transfizierte Säugetier-Zellen wurden für Membranpräparationen in Zellkulturschalen gezüchtet. Nach Erreichen einer Konfluenz von 80-90 % wurde das überstehende Medium verworfen. Die Zellen wurden mit PBS gewaschen. Die Zellkulturschalen wurden dann bis zur Weiterverarbeitung bei -20 °C gelagert. Pro Zellkulturschale wurden 1-2 ml eines sterilen Puffers aus 5 mM Tris / 2 mM EDTA zugegeben. Mit einem Gummischaber wurden die Zellen dann abgelöst und die erhaltene Zellsuspension aller Kulturschalen wurde vereinigt. Mithilfe eines Ultraturrax (Stufe 6, 2 x 15 Sekunden) wurden die Zellen unter Eiskühlung mechanisch aufgeschlossen. Die Zelllysate wurden dann 10 min bei 1000 x g und 4 °C zentrifugiert. Der erhaltene Überstand wurde abgenommen und die darin enthaltenen Membranen wurden 1 h bei 48000 x g und 4 °C sedimentiert. Der Überstand wurde verworfen, während die sedimentierten Membranen in sterilem 50 mM Tris-Puffer, pH 7.4 resuspendiert wurden. Nach dem Aliquotieren wurden die Membranpräparationen bis zum Gebrauch bei -80 °C gelagert.

7.3.10 Proteinbestimmung

Die Proteinkonzentration einer Membranpräparation wurde i. d. R. mit der Proteinbestimmung nach Lowry ermittelt.⁵⁷¹ Zur Bestimmung einer Standardgeraden wurde eine BSA-Stammlösung (1 mg/ml) in demineralisiertem Wasser angesetzt. Die Absorption der in eine Quarzküvette gefüllten Lösung wird bei einer Wellenlänge von 280 nm gemessen. Der erwartete Wert liegt bei 0.66. Da es einen linearen Zusammenhang zwischen der OD₂₈₀ und der in der Lösung vorliegenden BSA-Konzentration gibt, kann anhand des OD₂₈₀ auf die tatsächlich vorliegende BSA-Konzentration rückgeschlossen werden. Die BSA-Standardgerade hatte folgende Konzentrations-Soll-Werte (die

entsprechend der gemessenen OD_{280} korrigiert wurden): 500, 400, 300, 200, 100 und 50 $\mu\text{g/ml}$. Die Verdünnung der BSA-Lösung erfolgte in 50 mM Tris-Puffer, pH 7.4. 200 μl dieser Lösungen oder 200 μl einer unterschiedlich stark verdünnten Membranpräparation (i. d. R. 1:10 und 1:20 in 50 mM Tris-Puffer, pH 7.4) wurden in Duplikaten in Reagenzgläser vorgelegt. Für einen Nullwert-Abgleich wurden in einem Reagenzglas außerdem 200 μl 50 mM Tris-Puffer, pH 7.4 vorgelegt. In jedes Reagenzglas wurde dann 1 ml Reagenz C (s. o.) zugegeben. Die Lösung wird gemischt und 20 min bei Raumtemperatur inkubiert. Danach wurde jedem Ansatz 100 μl Reagenz D (s. o.) zugegeben. Nach der Mischung erfolgte eine weitere Inkubation von 30 min bei Raumtemperatur. 1 ml aus jedem Ansatz wurde dann in eine Halbmikroküvette überführt und am Photometer bei 500 nm vermessen. Anhand der aufgenommenen Standardgerade konnte (unter Berücksichtigung des jeweiligen Verdünnungsfaktors) auf die Proteinkonzentrationen der Membranpräparationen rückgeschlossen werden.

7.4 Pharmakologische Experimente

7.4.1 cAMP-Experimente

7.4.1.1 [^3H]cAMP-Filtrationsexperimente

Am Tag vor dem Experiment wurden die zu untersuchenden Zellen auf einer 24-Loch-Platte ausgesät. In jede Vertiefung wurden 2×10^5 Zellen in 500 μl des jeweils passenden Zellkultur-Mediums gegeben. Die im Folgenden genannten Volumina gelten für eine Vertiefung der Zellkultur-Platte. Am Tag des Experimentes wurde das Zellkulturmedium abgeschüttet und durch 300 μl warmen HBSS-Puffers ersetzt. Nachdem dieser Puffer verworfen worden war, wurden erneut 300 μl HBSS-Puffer zugegeben. Bei cAMP-Experimenten an Adenosin-Rezeptoren wurde dieser HBSS-Puffer mit 1 U ADA pro ml des Puffers versetzt. Nur bei der Messung von Adenosin wurde erfolgte keine Zugabe von ADA. Die Zellen wurden dann 2 h bei 37 °C inkubiert.

Bei Untersuchungen an G_s -gekoppelten Rezeptoren erfolgte nach dieser Inkubation die Zugabe von 100 μl einer Lösung des Phosphodiesterase-Inhibitors Ro20-1724 (2 % DMSO in HBSS-Puffer, Endkonzentration 40 μM). Nach einer 10minütigen Inkubation auf einer Mikrotiterplatten-Heizplatte bei 37 °C wurden 100 μl einer Agonisten-Lösung zugegeben (5 % DMSO in HBSS-Puffer, verschiedene Konzentrationen in Duplikaten

oder Triplikaten). In Kontroll-Ansätzen erfolgte die Zugabe von 100 µl einer Forskolin-Lösung (5 % DMSO in HBSS-Puffer, Endkonzentration 100 µM). Nach einer 15minütigen Inkubation wurde der Puffer unter Einsatz einer Membranpumpe abgesaugt. Danach erfolgte die Zugabe von 500 µl 90 °C heißen Lysepuffers (4 mM EDTA, 0.01 % Triton™ X-100, pH 7.4). Die Zellkulturplatten wurden dann bis zur Fortsetzung des Experimentes bei -20 °C eingefroren. Das Auftauen der Platten erfolgte unter Eiskühlung. Durch Auf- und Abpipettieren wurden die Zelllysate durchmischt. 50 µl jedes Zelllysates wurden zur radioaktiven Bestimmung der enthaltenen cAMP-Konzentration in Reaktionsgefäße überführt. Jedem Reaktionsansatz wurden 30 µl [³H]cAMP (in Lysepuffer, Endkonzentration 3 nM) und 40 µl cAMP-Bindeprotein (Präparation einer bovinen PKA aus der Nebenniere, in Lysepuffer, 50 µg pro Reaktionsansatz) zugesetzt.⁵⁷² Zur Bestimmung der Gesamtbindung wurde statt der Zelllysate Lysepuffer in einzelne Reaktionsgefäße pipettiert, während zur Bestimmung der unspezifischen Bindung des Radioliganden an das Filtermaterial statt Zelllysaten und Bindeprotein ein entsprechendes Volumen an Lysepuffer in einzelne Reaktionsgefäße gegeben wurde. Darüber hinaus wurde bei jedem Experiment eine Standardgerade bestimmt. Hierfür wurden statt der Zelllysate-Lösungen cAMP-Lösungen mit bekannter Konzentration in die Reaktionsmischung gegeben. Nachdem der Versuchsansatz eine Stunde auf Eis inkubiert worden war, erfolgte unter Einsatz eines Zellharvesters die Filtration der Reaktionsansätze durch einen Glasfaserfilter (GF/B). Die erhaltenen Filterscheiben jedes Ansatzes wurden in Szintillationsgefäße überführt. Nach Zugabe von 2.5 ml Szintillations-Cocktail wurden die in den Gefäßen stattfindenden radioaktiven Zerfälle durch Flüssig-Szintillations-Zählung in einem entsprechenden Gerät ermittelt. Anhand der zurückgehaltenen Radioaktivität auf dem Filter kann auf die relative und anhand der Standardgeraden auf die absolute cAMP-Menge in den Zelllysaten rückgeschlossen werden. Die Effekte wurden auf die Maximaleffekte des jeweiligen Agonisten (A_{2B}AR), auf den Effekt von 100 µM Forskolin (A_{2A}AR) oder auf den Effekt von 10 µM (G_i-gekoppelte Rezeptoren) normalisiert. Es wurden i. d. R. drei unabhängige Experimente durchgeführt. Die Auswertung der Daten erfolgte mit den Programmen Excel und GraphPad Prism®. Durch die Auftragung der relativen cAMP-Produktion gegen die Agonist-Konzentration konnte eine Dosis-Wirkungskurve erhalten und ein EC₅₀-Wert bestimmt werden.

Dieses Protokoll wurde für Experimente zur Verschiebung der Agonisten-Kurve durch eine konstante Konzentration eines Antagonisten leicht abgewandelt: Statt 100 µl wurden in diesem Fall 50 µl einer Ro20-1724-Lösung zugegeben (wobei die

Endkonzentration nicht verändert wurde). Gleichzeitig mit der Zugabe des Phosphodiesterase-Inhibitors wurden außerdem 50 µl einer Antagonisten-Lösung zugegeben. Alle weiteren Schritte erfolgten wie oben beschrieben.

Auch für die Untersuchung von G_i-gekoppelten Rezeptoren wurde das beschriebene Protokoll leicht angepasst: Nach der zweistündigen Inkubation der Zellen in HBSS-Puffer wurden 50 µl einer Ro20-1724-Lösung zugegeben (2 % DMSO in HBSS-Puffer, Endkonzentration 40 µM). Nach einer 10minütigen Inkubation erfolgte die Zugabe von 100 µl der Agonist-Lösung (5 % DMSO in HBSS, verschiedene Konzentrationen, Duplikate). Fünf Minuten später wurde dann außer in die Kontrollansätze 50 µl einer Forskolin-Lösung (Endkonzentration 10 µM) zugegeben. Nach einer weiteren Inkubation von 15 min wurde die über den Zellen stehende Lösung abgenommen und mit dem Experiment wie oben beschrieben fortgeföhren.

7.4.1.2 Reportergenexperimente

Drei Tage vor dem Experiment wurden konfluent gewachsene, mit der entsprechenden Rezeptor-DNA transfizierte Zellen einer 75 cm²-Zellkulturflasche abgelöst. Ein Viertel der Zellen wurde in eine andere 75 cm²-Zellkulturflasche überföhrt und 24 h unter Standardkulturbedingungen inkubiert. Danach erfolgte die Transfektion der Zellen unter Einsatz von Lipofectamine[®] 2000 gemäß dem von den Herstellern vorgeschlagenen Protokoll. Für die Transfektion wurden 24 µg des Plasmides pGL4.29 eingesetzt. Nach einer Inkubation von 18 h unter Standardkulturbedingungen wurden die Zellen abgelöst und in 25 ml Medium überföhrt. In jede Vertiefung einer 24-Loch-Zellkulturplatte wurden dann 500 µl dieser Zellsuspension zugegeben. Am nächsten Tag wurde dann das cAMP-Akkumulations-Experiment durchgeführt. Dazu wurde das Zellmedium abgenommen. Die Zellen wurden mit 300 µl HBSS-Puffer gewaschen und in jede Vertiefung wurde im Anschluss 350 µl HBSS-Puffer zugegeben. Nach einer einstündigen Inkubation der Zellen bei 37 °C wurde 100 µl einer Agonisten-Lösung zugegeben (5 % DMSO in HBSS, verschiedene Konzentrationen). Nach einer fünfminütigen Inkubation erfolgte die Zugabe von 50 µl Forskolin (Endkonzentration 1 µM). In Kontrollansätzen wurde die Agonist-Lösung bzw. die Forskolin-Lösung gegen ein entsprechendes Volumen an Puffer ersetzt. Nach einer Inkubation von 3.5 h wurde der Zellüberstand abgenommen. In jede Vertiefung wurden dann 50 µl HBSS-Puffer und 50 µl des Detektionsreagenzes (Bright-Glo[™] Luciferase Assay System) gegeben. Nach einer dreiminütigen Inkubation bei Raumtemperatur wurden 90 µl des Gemisches jeder

Vertiefung in eine weiße 96-Loch-Platte übertragen. Danach erfolgte die Messung der Lumineszenz durch den Topcount NXT™ (Messungszeitraum: 1 min). Es wurden zwei unabhängige Experimente durchgeführt.

Das Prinzip des Experimentes basiert darauf, dass die Expression eines für eine Luziferase kodierenden Gens unter der Kontrolle eines „cAMP-responsive elements“ (CRE) steht. Dieses Genkonstrukt wurde mit dem Plasmid pGL4.29 in die Zelle eingebracht. Die Lumineszenz-Signale, die aufgrund des Substratumsatzes der Luziferase gemessen wurden, korrelieren daher mit der gebildeten cAMP-Menge in den Zellen. Die Lumineszenz-Signale wurden auf das Signal normalisiert, das durch 1 µM Forskolin ausgelöst wurde. Die Auswertung der Daten erfolgte mit dem Programm GraphPad Prism®. Durch die Auftragung der relativen Lumineszenzsignale gegen die Agonist-Konzentration konnte eine Dosis-Wirkungskurve erhalten und ein EC₅₀-Wert bestimmt werden.

7.4.2 Calciumionen-Mobilisations-Experimente

Die Zellen von zwei 175 cm²-Zellkulturflaschen, die eine Konfluenz von 80-90 % aufwiesen, wurden mit Trypsin abgelöst und in 30 ml Zellkulturmedium im Brutschrank 45 min lang inkubiert. Nach der Inkubation wurden die Zellen bei 200 x g für 5 min sedimentiert. Sie wurden dann in 994 µl KHP-Puffer vereinzelt. Nach der Zugabe von 3 µl einer Oregon Green® BAPTA-1/AM- und 3 µl einer Pluronic® F127-Stammlösung (s. o.) wurden die Zellen 1 h bei Raumtemperatur und 200 rpm unter Lichtausschluss inkubiert. Anschließend wurden sie bei 2500 rpm innerhalb von 12 s sedimentiert. Nach zweimaligem Waschen mit 994 µl KHP-Puffer wurden die Zellen in 20 ml KHP-Puffer aufgenommen und darin vereinzelt. Die Zellsuspension wurde in eine Glaswanne überführt. Unter Schwenken der Wanne wurde eine schwarze 96-Loch-Platte pro Vertiefung mit 180 µl Zellsuspension beladen. Nach einer 20minütigen Inkubation der Platte wurde unter Einsatz eines NOVOstar®-Fluorimeters eine Validierung durchgeführt, bei der die Signalverstärkung des Gerätes anhand der Grundfluoreszenz der Versuchsansätze angepasst wurde: Die Einstellung wurde so gewählt, dass die Grundfluoreszenz bei 38000-42000 Fluoreszenzeinheiten lag. Danach wurden 20 µl einer Agonistlösung (10 % DMSO in KHP, verschiedene Konzentrationen) in jede Vertiefung der Mikrotiterplatte pipettiert. Als Kontrolle wurde bei entsprechenden Ansätzen statt einer Agonistlösung eine ATP-Lösung (Endkonzentration 100 µM)

zupipettiert. Die Zugabe der Lösungen erfolgte automatisch durch das NOVOstar[®]-Fluorimeter. Die Lösungen wurden durch das Gerät aus einer 96-Loch-Reagenzplatte entnommen, in die die entsprechenden Lösungen vorgelegt wurden. Über einen Zeitraum von 24 Sekunden wird in jeder Vertiefung der Platte die Fluoreszenzintensität gemessen (Anregungswellenlänge 485 nm, Emissionswellenlänge 520 nm, 60 Messpunkte, Intervallzeit 0.4 s). Anhand dieses Parameters kann auf die Anstiege der intrazellulären Calciumionenkonzentration rückgeschlossen werden. Nach einem Basislinien-Abgleich werden die erhaltenen Fluoreszenz-Werte für jede Vertiefung gemittelt. Danach erfolgte die Normalisierung der Signale auf das Signal von 100 μ M ATP. Bei jeder Untersuchung wurden drei unabhängige Experimente durchgeführt. Die Auswertung der Daten erfolgte mit dem Programm Zadas sowie GraphPad Prism[®]. Durch die Auftragung des relativen Fluoreszenzsignals gegen die Agonist-Konzentration konnte eine Dosis-Wirkungskurve erhalten und ein EC₅₀-Wert bestimmt werden.

In einigen Experimenten wurden die Zellen vor Beginn des Experimentes 18 h lang in einem Medium kultiviert, das 50 ng/ml PTX enthielt. In anderen Experimenten wurde den Zellen kurz vor der Messung der PLC-Inhibitor U73122 (Endkonzentration 5 μ M) zugegeben oder es wurde der calciumhaltige KHP-Puffer bei der Herstellung der Zellsuspension mit der die Messplatte bestückt gegen calciumfreien Puffer ausgetauscht (s. o.).

7.4.3 β -Arrestin-Rekrutierungs-Experimente

β -Arrestin-Rekrutierungs-Experimente wurden mit gekauften oder selbst hergestellten Zelllinien des PathHunter[®]-Systems von DiscoverX durchgeführt. Am Tag vor dem Experiment wurden dazu die entsprechenden Zellen mit einem Trypsin-freien Dissoziationspuffer (s. o.) abgelöst. Pro Vertiefung einer weißen 96-Loch-Zellkulturplatte wurden 2×10^5 Zellen in 90 μ l PathHunter[®] Cell Plating 1 Reagent (GPR171) oder PathHunter[®] Cell Plating 2 Reagent (GPR35) ausgesät. Nach einer Inkubation von etwa 24 h bei Standardkulturbedingungen wurde 10 μ l einer Agonisten-Lösung zugegeben (10 % DMSO in Cell Plating Reagent, verschiedene Konzentrationen). Als Negativkontrolle wurde in entsprechende Ansätze 10 μ l des Puffers gegeben, während zur Positivkontrolle 10 μ l eines Standardagonisten hinzugegeben wurde (GPR35: Zaprinast, hGPR35 und mGPR35: 30 μ M Endkonzentration, rGPR35: 10 μ M Endkonzentration). Nach einer 90minütigen Inkubation bei 37 °C wurden 50 μ l eines Detektionsreagenz

(PathHunter[®] Detection Kit) in jede Vertiefung gegeben. Nach einer weiteren Inkubation von 1 h bei Raumtemperatur wurde die Lumineszenz in jeder Vertiefung unter Einsatz eines Topcount NXT[™]-Gerätes gemessen (Messungszeitraum: 1 min).

In den Zellen wurde ein Fusions-Protein aus β -Arrestin und einer N-terminalen Deletionsmutante des Enzyms β -Galaktosidase zur Expression gebracht. Die rekombinant koexprimierten GPCRs weisen an ihrem C-Terminus ein Enzymfragment auf. Durch die Rekrutierung von β -Arrestin an zuvor aktivierte Rezeptoren kommt es zur Enzymkomplementation. Das nun aktive Enzym setzt unter Freisetzung von Lumineszenz ein Substrat um. Das Lumineszenzsignal ist daher ein Nachweis für die Aktivierung des Rezeptors.

Nach einer Grundlinienkorrektur wurden die Lumineszenzsignale auf das Signal des Standardagonisten normalisiert. Falls kein Standardagonist zur Verfügung stand, wurde das Signal:Hintergrund-Verhältnis berechnet. Falls nicht anders angegeben wurden für alle Untersuchungen drei bis vier unabhängige Experimente durchgeführt. Die Auftragung des relativen Lumineszenzsignales gegen die Agonistenkonzentration ergab eine Dosis-Wirkungskurve anhand derer ein EC_{50} -Wert bestimmt werden konnte. Diese Analyse wurde mit dem Programm GraphPad Prism[®] durchgeführt.

Sollte auf Antagonismus geprüft werden wurden die entsprechenden Verbindungen 30 min vor der Zugabe einer konstanten Konzentration eines Agonisten ($\sim EC_{80}$, hGPR35: 5 μ M Zaprinast) zugegeben (5 μ l Antagonist, 5 μ l Agonist, je 10 % DMSO in Cell Plating Reagent). Das weitere Vorgehen entsprach dem der Agonismustestung. Auch diese Daten wurden mit GraphPad Prism[®] analysiert um einen IC_{50} -Wert zu bestimmen.

7.4.4 Radioligand-Bindungsstudien

Grundsätzlich verliefen alle durchgeführten Radioligand-Bindungsstudien gleich: Die zu testenden Verbindungen wurden in Reaktionsgefäßen vorgelegt. Grundsätzlich wurden in jedem Experiment die Gesamtbindung (in Abwesenheit eines unmarkierten Liganden) und die unspezifische Bindung (in Anwesenheit einer hohen Konzentration eines unmarkierten Liganden) des jeweiligen Radioliganden bestimmt. Es erfolgte die Zugabe des Radioliganden und der Membranen, in die der zu untersuchende Rezeptor eingebettet war. Nachdem ein Gleichgewicht der Radioligand-Bindung erreicht war,

wurde der Reaktionsansatz unter Einsatz eines Zellharvesters durch einen GF/B-Glasfaser-Filter filtriert. Der Filter wurde drei Mal mit eiskaltem, sterilen 50 mM Tris-Puffer, pH 7.4 gewaschen. Grundsätzlich werden nur große Makromoleküle (wie die Rezeptor-Proteine), nicht aber kleine Moleküle (wie der Radioligand) von dem Filter zurückgehalten. Die Filter wurden in Szintillationsgefäße überführt und mit einem 2.5 ml Szintillationscocktail versetzt und bis zur Messung 6 h inkubiert. Anhand der in einem Flüssigszintillations-Zähler bestimmten radioaktiven Zerfälle kann auf die Menge an Radioligand rückgeschlossen werden, der zum Zeitpunkt der Filtration an die Rezeptorproteine gebunden war und deshalb auf dem Filter verblieben ist. Die Auswertung der Daten erfolgte anhand entsprechender Modelle und Gleichungen des Programms GraphPad Prism[®].

7.4.4.1 Sättigungsexperimente

Für Sättigungsexperimente wurde eine breite Spanne von Radioligand-Konzentrationen eingesetzt (etwa 0.1-10 x K_D des Radioliganden). Die in dieser Arbeit gewählten Reaktionsansätze waren folgendermaßen zusammengesetzt:

	<u>cAdeR:</u>	<u>hGPR35:</u>
Puffer		190 μ l
Puffer oder unmarkierter Ligand	50 μ l (10 % DMSO)	10 μ l (100 % DMSO)
Radioligand verdünnt in Puffer	50 μ l	100 μ l
Membranpräparation in Puffer	100 μ l	100 μ l
	200 μ l	400 μ l

Weitere Parameter wurden folgendermaßen gewählt:

	<u>cAdeR:</u>	<u>hGPR35:</u>
Radioligand	[³ H]Adenin	[³ H]PSB-13253
Inkubations-Puffer	50 mM Tris, pH 7.4, steril	50 mM Tris, 10 mM MgCl ₂ , pH 7.4, steril
Ligand zur Bestimmung der unspezifischen Bindung	100 μ M Adenin	250 μ M Zaprinast
Proteinmenge/Ansatz	Sf9-cAdeR: 30 μ g CHO-cAdeR: 70 μ g	CHO-hGPR35: 10 μ g
Inkubation	1 h, RT	2.5 h, RT

Im Falle der Sättigungsexperimente mit [^3H]Adenin wurde die spezifische Bindung des Radioliganden durch die Mischung mit unmarkiertem Adenin auf 20 % des ursprünglichen Wertes herabgesetzt. Die Gesamtbindung und die unspezifische Bindung des jeweiligen Radioliganden bei unterschiedlichen Konzentrationen wurde in Duplikaten bestimmt. Insgesamt wurden jeweils drei unabhängige Experimente durchgeführt.

Zur Auswertung dieser Experimente wurden die Werte der unspezifischen Bindung bei jeder Radioligand-Konzentration von den jeweiligen Werten der Gesamtbindung abgezogen. Die erhaltene spezifische Bindung des Radioliganden wurde mit dem Programm GraphPad Prism[®] gegen die eingesetzte Radioligand-Konzentration aufgetragen. Durch eine nicht-lineare Regression wurde eine Sättigungskurve erhalten anhand derer der K_D -Wert des Radioliganden bestimmt werden konnte. Der B_{max} -Wert wurde anhand der QuickCalcs-GraphPad-Online-Programme von cpm in fmol/mg umgerechnet.

7.4.4.2 Assoziations- und Dissoziations-Experimente

Für Assoziations- und Dissoziations-Experimente am hGPR35 wurde die gleiche Zusammensetzung des Reaktionsgemisches gewählt wie bei den Sättigungsexperimenten. Für beide Experimente wurde eine konstante Konzentration des Radioliganden [^3H]PSB-13253 von 5 nM gewählt. In Assoziationsexperimenten wurden die Reaktionsansätze unterschiedlich lang bei Raumtemperatur inkubiert: 1, 3, 5, 7, 10, 15, 20, 30, 40, 60, 100 und 200 min. Für jede Inkubationszeit wurde die Gesamt- und die unspezifische Bindung (in Anwesenheit von 10 μM Pamoasäure) bestimmt. Die Durchführung zwei unabhängiger Experimente erfolgte in Duplikaten. Um die spezifische Bindung des Radioliganden unter den verschiedenen Bedingungen zu bestimmen, wurde die unspezifische Bindung von der Gesamtbindung abgezogen. Die Analyse der Daten erfolgte mit dem Programm GraphPad Prism[®]. Dabei wurde die spezifische Bindung gegen die Inkubationszeit aufgetragen.

Zur Untersuchung der Dissoziation des Radioliganden wurden die kompletten Reaktionsansätze 100 min lang bei Raumtemperatur inkubiert, so dass sich ein Gleichgewicht der Radioligand-Bindung einstellen konnte. Als Kontrolle wurde zu Beginn dieser Inkubationszeit in zwei Reaktionsgefäße 10 μM Pamoasäure zugegeben (zur Bestimmung der unspezifischen Bindung). Nach der Vorinkubation wurde (außer einem Kontrollansatz zur Bestimmung der Gesamtbindung) jedem Ansatz zeitversetzt 100 μl

Pamoasäure (Endkonzentration 10 μM) zugegeben, wodurch die Dissoziation des Radioliganden ausgelöst wurde. Die Inkubationszeiten in Anwesenheit von Pamoasäure beliefen sich auf 1, 2, 3, 4, 6, 8, 10, 12, 15, 20, 25, 30, 40, 50, 60, 100, 150 und 200 min. Die Dissoziationskinetik wurde in zwei unabhängigen Experimenten in Duplikat-Messungen untersucht. Bei der Analyse der Daten mit dem Programm GraphPad Prism[®] wurden von allen ermittelten cpm-Werten zunächst die Werte der unspezifischen Bindung abgezogen. Die spezifische Bindung wurde dann gegen die Inkubationszeit der Mixtur in Anwesenheit von Pamoasäure aufgetragen.

7.4.4.3 Konkurrenzexperimente

Bei Konkurrenzexperimenten wurden verschiedene Konzentrationen einer unmarkierten Verbindung in die Reaktionsgefäße vorgelegt. Die Zusammensetzungen der Reaktionsansätze für die Untersuchung verschiedener Rezeptoren sind im Folgenden angegeben:

	<u>cAdeR / hGPR35 / hAR</u>	<u>hA_{2B}AR^a</u>	<u>hA_{2B}AR^b</u>
Puffer	190 μl		775 μl
Puffer oder Liganden-Lösung	10 μl (100 % DMSO)	50 μl^a	25 μl^b
Radioligand verdünnt in Puffer	100 μl	50 μl	100 μl
Membranpräparation in Puffer	100 μl	100 μl	100 μl
	400 μl	200 μl	1000 μl

^aAnsatz der Experimente aus Kapitel 3.1 (unmarkierte Verbindungen wurden in einer Lösung aus 10 % DMSO / 50 mM Tris, pH 7.4 zugegeben).

^bAnsatz der Experimente aus Kapitel 3.2 (unmarkierte Verbindungen wurden in einer Lösung aus 100 % DMSO zugegeben).

Für den cAdeR und den hGPR35 wurden weitere Parameter folgendermaßen gewählt:

	<u>cAdeR:</u>	<u>hGPR35:</u>
Radioligand	10 nM [³ H]Adenin	5 nM [³ H]PSB-13253
Inkubations-Puffer	50 mM Tris, pH 7.4	50 mM Tris, 10 mM MgCl ₂ , pH 7.4
Ligand zur Bestimmung der unspezifischen Bindung	100 µM Adenin	10 µM Pamoasäure
Proteinmenge/Ansatz	Sf9-cAdeR: 25 µg CHO-cAdeR: 50 µg	10 oder 15 µg
Inkubation	60 min, RT	100 min, RT

Im Falle der Bindungsstudien an Adenosin-Rezeptoren wurde die Membranpräparation 20 min vor der Zugabe in die Reaktionsansätze mit 2 U ADA pro mg Protein versetzt. GF/B-Filter, die Einsatz bei Filtration von Reaktionsansätzen mit hA_{2A}AR-Proteinen fanden, wurden 30 min vor der Filtration in 0.3%iger Polyethylenimin-Lösung eingelegt. Zum Waschen der Filter bei Bindungsstudien am hA_{2B}AR wurde ein Waschpuffer genutzt, der 50 mM Tris und 0.1 % BSA (pH 7.4) enthielt. Weitere Parameter der Bindungsstudien an Adenosin-Rezeptoren sind im Folgenden angegeben:

	<u>hA₁AR</u>	<u>hA_{2A}AR</u>	<u>hA_{2B}AR</u>	<u>hA₃AR</u>
Radioligand	[³ H]CCPA	[³ H]MSX-2	[³ H]PSB-603	[³ H]PSB-11
Radioligand-Konzentration	1 nM	1 nM	0.3 nM	1 nM
Inkubations-Puffer	50 mM Tris, pH 7.4			
Ligand zur Bestimmung der unspezifischen Bindung	10 µM CADO	50 µM NECA	10 µM DPCPX	100 µM R-PIA
Proteinmenge/Ansatz	70 µg	50 µg	50 µg	125 µg
Inkubation	90 min	30 min	75 min	45 min

Zur Auswertung der Daten wurde mithilfe des Programmes GraphPad Prism[®] die prozentuale spezifische Bindung des jeweiligen Radioliganden gegen die Konzentration der eingesetzten unmarkierten Verbindung aufgetragen. Anhand dieser Kompetitionskurve konnte der IC₅₀-Wert der Verbindung bestimmt, sowie der K_i-Wert der Verbindung berechnet werden.

8 Abkürzungsverzeichnis

3-MA	3-Methyladenin
ADA	Adenosindesaminase
AdeR	Adenin-Rezeptor(en)
ADORA	Adenosin-Rezeptor-Gen
Ago	Agonist
AHO	Albright'sche hereditäre Osteodystrophie
AOPP	„advanced oxidation protein products“
AP-2	β2-Adaptin
Ap ₄ A	Diadenosintetraphosphat
APRT	Adeninphosphoribosyltransferase
AR	Adenosin-Rezeptor(en)
ATP	Adenosintriphosphat
B _{max}	Maximale Zahl der Bindungsstellen
bp	Basenpaare
BRET	Biolumineszenz-Resonanz-Energie-Transfer
BSA	bovines Serumalbumin
c/h/m/p/r	Speziesbezeichnung: Chinesischer Streifenhamster, Mensch, Maus, Schwein, Ratte
CADO	2-Chloradenosin
CaM-Kinasen	Calcium/Calmodulin-abhängige Kinasen
cAMP	zyklisches Adenosinmonophosphat
CASK	Calcium/Calmodulin-abhängige Serin-Protein-Kinase
CB(R)	Cannabinoid(-Rezeptor)
CCPA	2-Chlor-N ⁶ -cyclopentyladenosin
cGMP	zyklisches Guanosinmonophosphat
CHO-Zellen	Ovarialzellen des Chinesischen Streifenhamsters
COPD	chronisch obstruktive Lungenerkrankungen
cpm	Zählereignis pro Minute (radioaktive Zerfälle)
Da	Dalton
DAG	Diacylglycerol
DMEM	„Dulbecco's modified eagle medium“
DMSO	Dimethylsulfoxid
dNTP	Desoxynucleotide
DPCPX	8-Cyclopentyl-1,3-dipropylxanthin
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EC ₅₀	halbmaximal wirksame effektive Konzentration
ECL / EL bzw. ICL / IL	extra- bzw. intrazellulärer „Loop“
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure

EGTA	Ethylenglycol-bis(aminoethylether)-N,N,N',N'-tetraessigsäure
ELISA	„enzyme-linked immunosorbent assay“
ENT bzw. CNT	äquibrative bzw. konzentrierte Nucleosid-Transporter
ERK	„extracellular-signal regulated“-Kinasen
f/r (bei Primern)	„forward“- / „reverse“-Primer
FCS	Fötale Kälber-Serum
FISH	Fluoreszenz-In-situ-Hybridisierung
g	Erdbeschleunigung
G-CSF	„granulocyte colony stimulating factor“
gDNA/cDNA	genomische/kodierende DNA
GDP	Guanosindiphosphat
GEF	Guaninnucleotid-Austauschfaktor
GFP/YFP	grün-/gelb-fluoreszierendes Protein
GMP	Guanosinmonophosphat
GPCR	G-Protein-gekoppelter Rezeptor
GRK	G-Protein-gekoppelte-Rezeptor-Kinasen
GTP	Guanosintriphosphat
HEK-Zellen	humane embryonale Nierenzellen
HEPES	4-(2-Hydroxyethyl)piperazin-1-ethansulfonsäure
HIF	„hypoxia inducible factor“
HIV	humanes Immunodefizienz-Virus
HXM	Hypoxanthin/Xanthin/Mycophenolsäure
IC ₅₀	halbmaximale inhibitorische Konzentration
ICL / IL	intrazellulärer „Loop“
inakt.	inaktiv
IP ₃	Inositoltriphosphat
IPTG	Isopropyl-β-D-1-thiogalactopyranosid
k. A.	keine Angabe
K _D	Dissoziationskonstante
KHP	Krebs-Hepes-Puffer
K _i	Inhibitionskonstante
K _m	Michaeliskonstante
KO	„knock out“
LB	„lenox broth“
LD ₅₀	mittlere letale Dosis
LDL	„low density“ Lipoprotein
LPA	Lysophosphatidsäure
LPI	Lysophosphatidylinositol
(Lyso-)PS	(Lyso-)Phosphatidyl-L-Serin
M	mol/l
MAP-Kinasen	Mitogen-aktivierte Protein-Kinasen

Mrg	„Mas-related gene“
mRNA	messenger RNA
MSX-2	3-(3-Hydroxypropyl)-8-(<i>m</i> -methoxystyryl)-7-methyl-1-propargylxanthin
MTA	5'-Methylthioadenosin
MTAP	5'-Methylthioadenosin-Phosphorylase
n. b.	nicht bestimmt
NAD / NADP	Nicotinamid-Adenin-Dinucleotid/(-Phosphat)
NCBI	National Center for Biotechnology Information
NEB	New England Biolabs
NECA	5'-(N-Ethylcarboxamid)adenosin
NOS	NO-Synthase
NPP	Nucleotid-Pyrophosphatase
ns	nicht signifikant unterschiedlich
NSAR	nicht-steroidale Antirheumatika
NT/CT	N-/C-terminale Domäne
PA	Pamoasäure
PBS	Phosphat-gepufferte Salzlösung
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
PCR	Polymerase Kettenreaktion
PDE	Phosphodiesterase
PDGF	„platelet-derived growth factor“
PI3K	Phosphatidylinositol-3-Kinase
PIP ₂	Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat
PK	Prolink
PKA, -B, -C, -G, -N	Proteinkinase A, B, C, G, N
PLC	Phospholipase C
PNP	Purin-Nucleosid-Phosphorylase
PRPP	5-Phosphoribosyl-1-pyrophosphat
PSB	„Pharmaceutical Sciences Bonn“
PTX	Pertussis-Toxin
qPCR	quantitative Real-time-Polymerase-Kettenreaktion
RGS	„regulators of G protein signaling“
RHO	Rhodopsin-Gen
RL	Radioligand
R-PIA	(<i>R</i>)-N ⁶ -(1-Methyl-2-phenylethyl)adenosin
rpm	Umdrehungen pro Minute
RT-PCR	Reverse-Transkriptase-Polymerase-Kettenreaktion
S.O.C.	„super optimal broth“ mit Glukosezusatz
SAM	S-Adenosylmethionin
Sf	<i>Spodoptera frugiperda</i>

sGC	lösliche Guanylatzyklase
siRNA	„small interfering“ RNA
SNSR	„sensory neuron-specific receptors“
SNP	„single nucleotide polymorphism“ / Einzelnucleotid-Polymorphismus
SR	sarkoplasmatisches Retikulum
$t_{1/2}$	Halbwertszeit
T3	Triiodthyronin
Δ^9 -THC	Δ^9 -Tetrahydrocannabinol
TMD / TM	Transmembran-Domäne
transf.	transfiziert
TRPV-Kanal	„transient receptor potential vanilloid“-Kanal
U	Unit (Einheit)
UDP	Uridindiphosphat
UTP	Uridintriphosphat
VSV	Vesikulärstomatitis-Virus
wt	Wildtyp

9 Literaturverzeichnis

- (1) Langley, J. N. On the reaction of cells and of nerve-endings to certain poisons, chiefly as regards the reaction of striated muscle to nicotine and to curari. *J. Physiol.* **1905**, 33, 374-413.
- (2) Prüll, C. R. Part of a scientific master plan? Paul Ehrlich and the origins of his receptor concept. *Med. Hist.* **2003**, 47, 332-356.
- (3) 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.
- (4) Ruffolo, R. R., Jr. Review important concepts of receptor theory. *J. Auton. Pharmacol.* **1982**, 2, 277-295.
- (5) Pierce, K. L.; Premont, R. T.; Lefkowitz, R. J. Seven-transmembrane receptors. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **2002**, 3, 639-650.
- (6) Müller, C. E.; Schiedel, A. C.; Baqi, Y. Allosteric modulators of rhodopsin-like G protein-coupled receptors: opportunities in drug development. *Pharmacol. Ther.* **2012**, 135, 292-315.
- (7) Fredriksson, R.; Lagerstrom, 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) Lefkowitz, R. J. Seven transmembrane receptors: something old, something new. *Acta Physiol.* **2007**, 190, 9-19.
- (9) Hopkins, A. L.; Groom, C. R. The druggable genome. *Nat. Rev. Drug Discov.* **2002**, 1, 727-730.
- (10) Rask-Andersen, M.; Masuram, S.; Schiöth, H. B. The Druggable Genome: Evaluation of Drug Targets in Clinical Trials Suggests Major Shifts in Molecular Class and Indication. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* **2013**.
- (11) Ovchinnikov Yu, A. Rhodopsin and bacteriorhodopsin: structure-function relationships. *FEBS Lett.* **1982**, 148, 179-191.
- (12) Dixon, R. A.; Kobilka, B. K.; Strader, D. J.; Benovic, J. L.; Dohlman, H. G.; Frielle, T.; Bolanowski, M. A.; Bennett, C. D.; Rands, E.; Diehl, R. E.; Mumford, R. A.; Slater, E. E.; Sigal, I. S.; Caron, M. G.; Lefkowitz, R. J.; Strader, C. D. Cloning of the gene and cDNA for mammalian β -adrenergic receptor and homology with rhodopsin. *Nature* **1986**, 321, 75-79.
- (13) Jacoby, E.; Bouhelal, R.; Gerspacher, M.; Seuwen, K. The 7 TM G-protein-coupled receptor target family. *ChemMedChem* **2006**, 1, 761-782.
- (14) Kolakowski, L. F., Jr. GCRDb: a G-protein-coupled receptor database. *Receptors Channels* **1994**, 2, 1-7.
- (15) Rodbell, M.; Birnbaumer, L.; Pohl, S. L.; Krans, H. M. The glucagon-sensitive adenyl cyclase system in plasma membranes of rat liver. V. An obligatory role of guanylnucleotides in glucagon action. *J. Biol. Chem.* **1971**, 246, 1877-1882.
- (16) Luttrell, L. M. Reviews in molecular biology and biotechnology: transmembrane signaling by G protein-coupled receptors. *Mol. Biotechnol.* **2008**, 39, 239-264.
- (17) Milligan, G.; Kostenis, E. Heterotrimeric G-proteins: a short history. *Br. J. Pharmacol.* **2006**, 147 Suppl 1, S46-55.
- (18) Schneider, E. H.; Seifert, R. Sf9 cells: a versatile model system to investigate the pharmacological properties of G protein-coupled receptors. *Pharmacol. Ther.* **2010**, 128, 387-418.
- (19) Hein, P.; Frank, M.; Hoffmann, C.; Lohse, M. J.; Bunemann, M. Dynamics of receptor/G protein coupling in living cells. *EMBO J.* **2005**, 24, 4106-4114.
- (20) Waelbroeck, I. Kinetics versus equilibrium: the importance of GTP in GPCR activation. *Trends Pharmacol. Sci.* **1999**, 20, 477-481.

- (21) Bünemann, M.; Frank, M.; Lohse, M. J. G_i protein activation in intact cells involves subunit rearrangement rather than dissociation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2003**, *100*, 16077-16082.
- (22) Berridge, M. J. Inositol trisphosphate and diacylglycerol as second messengers. *Biochem. J.* **1984**, *220*, 345-360.
- (23) Katada, T.; Bokoch, G. M.; Northup, J. K.; Ui, M.; Gilman, A. G. The inhibitory guanine nucleotide-binding regulatory component of adenylate cyclase. Properties and function of the purified protein. *J. Biol. Chem.* **1984**, *259*, 3568-3577.
- (24) Kozasa, T.; Jiang, X.; Hart, M. J.; Sternweis, P. M.; Singer, W. D.; Gilman, A. G.; Bollag, G.; Sternweis, P. C. p115 RhoGEF, a GTPase activating protein for G α_{12} and G α_{13} . *Science* **1998**, *280*, 2109-2111.
- (25) Logothetis, D. E.; Kurachi, Y.; Galper, J.; Neer, E. J.; Clapham, D. E. The $\beta\gamma$ subunits of GTP-binding proteins activate the muscarinic K⁺ channel in heart. *Nature* **1987**, *325*, 321-326.
- (26) Lüscher, C.; Slesinger, P. A. Emerging roles for G protein-gated inwardly rectifying potassium (GIRK) channels in health and disease. *Nat. Rev. Neurosci.* **2010**, *11*, 301-315.
- (27) Nishizuka, Y. The role of protein kinase C in cell surface signal transduction and tumour promotion. *Nature* **1984**, *308*, 693-698.
- (28) Ross, C. A.; Meldolesi, J.; Milner, T. A.; Satoh, T.; Supattapone, S.; Snyder, S. H. Inositol 1,4,5-trisphosphate receptor localized to endoplasmic reticulum in cerebellar Purkinje neurons. *Nature* **1989**, *339*, 468-470.
- (29) Ross, E. M.; Howlett, A. C.; Ferguson, K. M.; Gilman, A. G. Reconstitution of hormone-sensitive adenylate cyclase activity with resolved components of the enzyme. *J. Biol. Chem.* **1978**, *253*, 6401-6412.
- (30) Rozengurt, E. Mitogenic signaling pathways induced by G protein-coupled receptors. *J. Cell. Physiol.* **2007**, *213*, 589-602.
- (31) Siderovski, D. P.; Willard, F. S. The GAPs, GEFs, and GDIs of heterotrimeric G-protein alpha subunits. *Int. J. Biol. Sci.* **2005**, *1*, 51-66.
- (32) Skelding, K. A.; Rostas, J. A. The role of molecular regulation and targeting in regulating calcium/calmodulin stimulated protein kinases. *Adv. Exp. Med. Biol.* **2012**, *740*, 703-730.
- (33) Sutherland, E. W.; Rall, T. W.; Menon, T. Adenyl cyclase. I. Distribution, preparation, and properties. *J. Biol. Chem.* **1962**, *237*, 1220-1227.
- (34) Takai, Y.; Kishimoto, A.; Iwasa, Y.; Kawahara, Y.; Mori, T.; Nishizuka, Y. Calcium-dependent activation of a multifunctional protein kinase by membrane phospholipids. *J. Biol. Chem.* **1979**, *254*, 3692-3695.
- (35) Walsh, D. A.; Perkins, J. P.; Krebs, E. G. An adenosine 3',5'-monophosphate-dependant protein kinase from rabbit skeletal muscle. *J. Biol. Chem.* **1968**, *243*, 3763-3765.
- (36) Luttrell, L. M. 'Location, location, location': activation and targeting of MAP kinases by G protein-coupled receptors. *J. Mol. Endocrinol.* **2003**, *30*, 117-126.
- (37) Ritter, S. L.; Hall, R. A. Fine-tuning of GPCR activity by receptor-interacting proteins. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **2009**, *10*, 819-830.
- (38) Marrero, M. B.; Venema, V. J.; Ju, H.; Eaton, D. C.; Venema, R. C. Regulation of angiotensin II-induced JAK2 tyrosine phosphorylation: roles of SHP-1 and SHP-2. *Am. J. Physiol.* **1998**, *275*, C1216-1223.
- (39) Frank, G. D.; Saito, S.; Motley, E. D.; Sasaki, T.; Ohba, M.; Kuroki, T.; Inagami, T.; Eguchi, S. Requirement of Ca²⁺ and PKC δ for Janus kinase 2 activation by angiotensin II: involvement of PYK2. *Mol. Endocrinol.* **2002**, *16*, 367-377.
- (40) Bulenger, S.; Marullo, S.; Bouvier, M. Emerging role of homo- and heterodimerization in G-protein-coupled receptor biosynthesis and maturation. *Trends Pharmacol. Sci.* **2005**, *26*, 131-137.
- (41) Franco, R.; Casado, V.; Cortes, A.; Ferrada, C.; Mallol, J.; Woods, A.; Lluís, C.; Canela, E. I.; Ferré, S. Basic concepts in G-protein-coupled receptor homo- and heterodimerization. *ScientificWorldJournal* **2007**, *7*, 48-57.

- (42) Kelly, E.; Bailey, C. P.; Henderson, G. Agonist-selective mechanisms of GPCR desensitization. *Br. J. Pharmacol.* **2008**, *153 Suppl 1*, S379-388.
- (43) Stadel, J. M.; Nambi, P.; Shorr, R. G.; Sawyer, D. F.; Caron, M. G.; Lefkowitz, R. J. Catecholamine-induced desensitization of turkey erythrocyte adenylate cyclase is associated with phosphorylation of the β -adrenergic receptor. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **1983**, *80*, 3173-3177.
- (44) Benovic, J. L.; Pike, L. J.; Cerione, R. A.; Staniszewski, C.; Yoshimasa, T.; Codina, J.; Caron, M. G.; Lefkowitz, R. J. Phosphorylation of the mammalian β -adrenergic receptor by cyclic AMP-dependent protein kinase. Regulation of the rate of receptor phosphorylation and dephosphorylation by agonist occupancy and effects on coupling of the receptor to the stimulatory guanine nucleotide regulatory protein. *J. Biol. Chem.* **1985**, *260*, 7094-7101.
- (45) Clark, R. B.; Kunkel, M. W.; Friedman, J.; Goka, T. J.; Johnson, J. A. Activation of cAMP-dependent protein kinase is required for heterologous desensitization of adenylyl cyclase in S49 wild-type lymphoma cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **1988**, *85*, 1442-1446.
- (46) Benovic, J. L.; Strasser, R. H.; Caron, M. G.; Lefkowitz, R. J. β -adrenergic receptor kinase: identification of a novel protein kinase that phosphorylates the agonist-occupied form of the receptor. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **1986**, *83*, 2797-2801.
- (47) Kühn, H.; Dreyer, W. J. Light dependent phosphorylation of rhodopsin by ATP. *FEBS Lett.* **1972**, *20*, 1-6.
- (48) Lorenz, W.; Inglese, J.; Palczewski, K.; Onorato, J. J.; Caron, M. G.; Lefkowitz, R. J. The receptor kinase family: primary structure of rhodopsin kinase reveals similarities to the β -adrenergic receptor kinase. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **1991**, *88*, 8715-8719.
- (49) Willets, J. M.; Challiss, R. A.; Nahorski, S. R. Non-visual GRKs: are we seeing the whole picture? *Trends Pharmacol. Sci.* **2003**, *24*, 626-633.
- (50) Shukla, A. K.; Xiao, K.; Lefkowitz, R. J. Emerging paradigms of β -arrestin-dependent seven transmembrane receptor signaling. *Trends Biochem. Sci.* **2011**, *36*, 457-469.
- (51) Ferguson, S. S. Evolving concepts in G protein-coupled receptor endocytosis: the role in receptor desensitization and signaling. *Pharmacol. Rev.* **2001**, *53*, 1-24.
- (52) Rajagopal, S.; Rajagopal, K.; Lefkowitz, R. J. Teaching old receptors new tricks: biasing seven-transmembrane receptors. *Nat. Rev. Drug Discov.* **2010**, *9*, 373-386.
- (53) Goodman, O. B., Jr.; Krupnick, J. G.; Santini, F.; Gurevich, V. V.; Penn, R. B.; Gagnon, A. W.; Keen, J. H.; Benovic, J. L. β -arrestin acts as a clathrin adaptor in endocytosis of the β_2 -adrenergic receptor. *Nature* **1996**, *383*, 447-450.
- (54) Laporte, S. A.; Oakley, R. H.; Zhang, J.; Holt, J. A.; Ferguson, S. S.; Caron, M. G.; Barak, L. S. The β_2 -adrenergic receptor/ β arrestin complex recruits the clathrin adaptor AP-2 during endocytosis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **1999**, *96*, 3712-3717.
- (55) Shenoy, S. K.; Lefkowitz, R. J. β -Arrestin-mediated receptor trafficking and signal transduction. *Trends Pharmacol. Sci.* **2011**, *32*, 521-533.
- (56) Pitcher, J. A.; Payne, E. S.; Csontos, C.; DePaoli-Roach, A. A.; Lefkowitz, R. J. The G-protein-coupled receptor phosphatase: a protein phosphatase type 2A with a distinct subcellular distribution and substrate specificity. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **1995**, *92*, 8343-8347.
- (57) Shenoy, S. K.; Modi, A. S.; Shukla, A. K.; Xiao, K.; Berthouze, M.; Ahn, S.; Wilkinson, K. D.; Miller, W. E.; Lefkowitz, R. J. β -arrestin-dependent signaling and trafficking of 7-transmembrane receptors is reciprocally regulated by the deubiquitinase USP33 and the E3 ligase Mdm2. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2009**, *106*, 6650-6655.
- (58) Perry, S. J.; Baillie, G. S.; Kohout, T. A.; McPhee, I.; Magiera, M. M.; Ang, K. L.; Miller, W. E.; McLean, A. J.; Conti, M.; Houslay, M. D.; Lefkowitz, R. J. Targeting of cyclic AMP degradation to β_2 -adrenergic receptors by β -arrestins. *Science* **2002**, *298*, 834-836.
- (59) Nelson, C. D.; Perry, S. J.; Regier, D. S.; Prescott, S. M.; Topham, M. K.; Lefkowitz, R. J. Targeting of diacylglycerol degradation to M_1 muscarinic receptors by β -arrestins. *Science* **2007**, *315*, 663-666.

- (60) Gurevich, V. V.; Pals-Rylaarsdam, R.; Benovic, J. L.; Hosey, M. M.; Onorato, J. J. Agonist-receptor-arrestin, an alternative ternary complex with high agonist affinity. *J. Biol. Chem.* **1997**, *272*, 28849-28852.
- (61) Luttrell, L. M.; Ferguson, S. S.; Daaka, Y.; Miller, W. E.; Maudsley, S.; Della Rocca, G. J.; Lin, F.; Kawakatsu, H.; Owada, K.; Luttrell, D. K.; Caron, M. G.; Lefkowitz, R. J. β -arrestin-dependent formation of β_2 adrenergic receptor-Src protein kinase complexes. *Science* **1999**, *283*, 655-661.
- (62) Kim, J.; Ahn, S.; Ren, X. R.; Whalen, E. J.; Reiter, E.; Wei, H.; Lefkowitz, R. J. Functional antagonism of different G protein-coupled receptor kinases for β -arrestin-mediated angiotensin II receptor signaling. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2005**, *102*, 1442-1447.
- (63) Ren, X. R.; Reiter, E.; Ahn, S.; Kim, J.; Chen, W.; Lefkowitz, R. J. Different G protein-coupled receptor kinases govern G protein and β -arrestin-mediated signaling of V2 vasopressin receptor. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2005**, *102*, 1448-1453.
- (64) Andresen, B. T. A pharmacological primer of biased agonism. *Endocr. Metab. Immune Disord. Drug Targets* **2011**, *11*, 92-98.
- (65) Moore, R. H.; Millman, E. E.; Godines, V.; Hanania, N. A.; Tran, T. M.; Peng, H.; Dickey, B. F.; Knoll, B. J.; Clark, R. B. Salmeterol stimulation dissociates β_2 -adrenergic receptor phosphorylation and internalization. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* **2007**, *36*, 254-261.
- (66) Wisler, J. W.; DeWire, S. M.; Whalen, E. J.; Violin, J. D.; Drake, M. T.; Ahn, S.; Shenoy, S. K.; Lefkowitz, R. J. A unique mechanism of β -blocker action: carvedilol stimulates β -arrestin signaling. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2007**, *104*, 16657-16662.
- (67) Carter, A. A.; Hill, S. J. Characterization of isoprenaline- and salmeterol-stimulated interactions between β_2 -adrenoceptors and β -arrestin 2 using beta-galactosidase complementation in C2C12 cells. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **2005**, *315*, 839-848.
- (68) Reiter, E.; Ahn, S.; Shukla, A. K.; Lefkowitz, R. J. Molecular mechanism of β -arrestin-biased agonism at seven-transmembrane receptors. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* **2012**, *52*, 179-197.
- (69) Dias, J. A.; Bonnet, B.; Weaver, B. A.; Watts, J.; Kluetzman, K.; Thomas, R. M.; Poli, S.; Mutel, V.; Campo, B. A negative allosteric modulator demonstrates biased antagonism of the follicle stimulating hormone receptor. *Mol. Cell. Endocrinol.* **2011**, *333*, 143-150.
- (70) Venkatakrisnan, A. J.; Deupi, X.; Lebon, G.; Tate, C. G.; Schertler, G. F.; Babu, M. M. Molecular signatures of G-protein-coupled receptors. *Nature* **2013**, *494*, 185-194.
- (71) Palczewski, K.; Kumasaka, T.; Hori, T.; Behnke, C. A.; Motoshima, H.; Fox, B. A.; Le Trong, I.; Teller, D. C.; Okada, T.; Stenkamp, R. E.; Yamamoto, M.; Miyano, M. Crystal structure of rhodopsin: A G protein-coupled receptor. *Science* **2000**, *289*, 739-745.
- (72) 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.; Stevens, R. C. High-resolution crystal structure of an engineered human β_2 -adrenergic G protein-coupled receptor. *Science* **2007**, *318*, 1258-1265.
- (73) Rasmussen, S. G.; Choi, H. J.; Rosenbaum, D. M.; Kobilka, T. S.; Thian, F. S.; Edwards, P. C.; Burghammer, M.; Ratnala, V. R.; Sanishvili, R.; Fischetti, R. F.; Schertler, G. F.; Weis, W. I.; Kobilka, B. K. Crystal structure of the human β_2 adrenergic G-protein-coupled receptor. *Nature* **2007**, *450*, 383-387.
- (74) Drury, A. N.; Szent-Gyorgyi, A. The physiological activity of adenine compounds with especial reference to their action upon the mammalian heart. *J. Physiol.* **1929**, *68*, 213-237.
- (75) Ralevic, V.; Burnstock, G. Receptors for purines and pyrimidines. *Pharmacol. Rev.* **1998**, *50*, 413-492.
- (76) Burnstock, G. Purinergic receptors. *J. Theor. Biol.* **1976**, *62*, 491-503.
- (77) Fredholm, B. B.; Burnstock, G.; Harden, T. K.; Spedding, M. Receptor nomenclature. *Drug Dev. Res.* **1996**, *39*, 461-466.
- (78) Bender, E.; Buist, A.; Jurzak, M.; Langlois, X.; Baggerman, G.; Verhasselt, P.; Ercken, M.; Guo, H. Q.; Wintolders, C.; Van den Wyngaert, I.; Van Oers, I.; Schoofs, L.; Luyten, W. Characterization of an orphan G protein-coupled receptor localized in the dorsal root ganglia reveals adenine as a signaling molecule. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2002**, *99*, 8573-8578.

- (79) Brunschweiler, A.; Müller, C. E. P2 receptors activated by uracil nucleotides--an update. *Curr. Med. Chem.* **2006**, *13*, 289-312.
- (80) Burnstock, G. Purine and pyrimidine receptors. *Cell. Mol. Life Sci.* **2007**, *64*, 1471-1483.
- (81) Burnstock, G. Purinergic signalling: its unpopular beginning, its acceptance and its exciting future. *Bioessays* **2012**, *34*, 218-225.
- (82) Fredholm, B. B.; AP, I. J.; Jacobson, K. A.; Klotz, K. N.; Linden, J. International Union of Pharmacology. XXV. Nomenclature and classification of adenosine receptors. *Pharmacol. Rev.* **2001**, *53*, 527-552.
- (83) Rittiner, J. E.; Korboukh, I.; Hull-Ryde, E. A.; Jin, J.; Janzen, W. P.; Frye, S. V.; Zylka, M. J. AMP is an adenosine A₁ receptor agonist. *J. Biol. Chem.* **2012**, *287*, 5301-5309.
- (84) 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.
- (85) Fredholm, B. B.; AP, I. J.; Jacobson, K. A.; Linden, J.; Müller, C. E. International Union of Basic and Clinical Pharmacology. LXXXI. Nomenclature and classification of adenosine receptors--an update. *Pharmacol. Rev.* **2011**, *63*, 1-34.
- (86) Yegutkin, G. G. Nucleotide- and nucleoside-converting ectoenzymes: Important modulators of purinergic signalling cascade. *Biochim. Biophys. Acta* **2008**, *1783*, 673-694.
- (87) Zimmermann, H.; Zebisch, M.; Strater, N. Cellular function and molecular structure of ectonucleotidases. *Purinergic Signal.* **2012**, *8*, 437-502.
- (88) 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.
- (89) Civelli, O.; Reinscheid, R. K.; Zhang, Y.; Wang, Z.; Fredriksson, R.; Schiöth, H. B. G protein-coupled receptor deorphanizations. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* **2013**, *53*, 127-146.
- (90) Chung, S.; Funakoshi, T.; Civelli, O. Orphan GPCR research. *Br. J. Pharmacol.* **2008**, *153 Suppl 1*, S339-346.
- (91) Civelli, O.; Saito, Y.; Wang, Z.; Nothacker, H. P.; Reinscheid, R. K. Orphan GPCRs and their ligands. *Pharmacol. Ther.* **2006**, *110*, 525-532.
- (92) Kobilka, B. K.; Matsui, H.; Kobilka, T. S.; Yang-Feng, T. L.; Francke, U.; Caron, M. G.; Lefkowitz, R. J.; Regan, J. W. Cloning, sequencing, and expression of the gene coding for the human platelet α_2 -adrenergic receptor. *Science* **1987**, *238*, 650-656.
- (93) Kobilka, B. K.; Frielle, T.; Collins, S.; Yang-Feng, T.; Kobilka, T. S.; Francke, U.; Lefkowitz, R. J.; Caron, M. G. An intronless gene encoding a potential member of the family of receptors coupled to guanine nucleotide regulatory proteins. *Nature* **1987**, *329*, 75-79.
- (94) Fargin, A.; Raymond, J. R.; Lohse, M. J.; Kobilka, B. K.; Caron, M. G.; Lefkowitz, R. J. The genomic clone G-21 which resembles a β -adrenergic receptor sequence encodes the 5-HT_{1A} receptor. *Nature* **1988**, *335*, 358-360.
- (95) Levoe, A.; Jockers, R. Alternative drug discovery approaches for orphan GPCRs. *Drug Discov. Today* **2008**, *13*, 52-58.
- (96) Jones, K. A.; Borowsky, B.; Tamm, J. A.; Craig, D. A.; Durkin, M. M.; Dai, M.; Yao, W. J.; Johnson, M.; Gunwaldsen, C.; Huang, L. Y.; Tang, C.; Shen, Q.; Salon, J. A.; Morse, K.; Laz, T.; Smith, K. E.; Nagarathnam, D.; Noble, S. A.; Branchek, T. A.; Gerald, C. GABA_B receptors function as a heteromeric assembly of the subunits GABA_BR1 and GABA_BR2. *Nature* **1998**, *396*, 674-679.
- (97) Pin, J. P.; Kniazeff, J.; Liu, J.; Binet, V.; Goudet, C.; Rondard, P.; Prezeau, L. Allosteric functioning of dimeric class C G-protein-coupled receptors. *FEBS J.* **2005**, *272*, 2947-2955.
- (98) Levoe, A.; Dam, J.; Ayoub, M. A.; Guillaume, J. L.; Jockers, R. Do orphan G-protein-coupled receptors have ligand-independent functions? New insights from receptor heterodimers. *EMBO Rep.* **2006**, *7*, 1094-1098.
- (99) Cain, S. A.; Monk, P. N. The orphan receptor C5L2 has high affinity binding sites for complement fragments C5a and C5a des-Arg(74). *J. Biol. Chem.* **2002**, *277*, 7165-7169.

- (100) Kalant, D.; Cain, S. A.; Maslowska, M.; Sniderman, A. D.; Cianflone, K.; Monk, P. N. The chemoattractant receptor-like protein C5L2 binds the C3a des-Arg77/acylation-stimulating protein. *J. Biol. Chem.* **2003**, *278*, 11123-11129.
- (101) Li, R.; Coulthard, L. G.; Wu, M. C.; Taylor, S. M.; Woodruff, T. M. C5L2: a controversial receptor of complement anaphylatoxin, C5a. *FASEB J.* **2013**, *27*, 855-864.
- (102) Reitman, M. L.; Dishy, V.; Moreau, A.; Denney, W. S.; Liu, C.; Kraft, W. K.; Mejia, A. V.; Matson, M. A.; Stoch, S. A.; Wagner, J. A.; Lai, E. Pharmacokinetics and pharmacodynamics of MK-5046, a bombesin receptor subtype-3 (BRS-3) agonist, in healthy patients. *J. Clin. Pharmacol.* **2012**, *52*, 1306-1316.
- (103) Dudzinska, W.; Hlynczak, A. J.; Skotnicka, E.; Suska, M. The purine metabolism of human erythrocytes. *Biochemistry (Mosc.)* **2006**, *71*, 467-475.
- (104) Nyhan, W. L. Disorders of purine and pyrimidine metabolism. *Mol. Genet. Metab.* **2005**, *86*, 25-33.
- (105) Riscoe, M. K.; Brouns, M. C.; Fitchen, J. H. Purine metabolism as a target for leukemia chemotherapy. *Blood Rev.* **1989**, *3*, 162-173.
- (106) Van den Berghe, G.; Vincent, M. F.; Jaeken, J. Inborn errors of the purine nucleotide cycle: adenylosuccinase deficiency. *J. Inherit. Metab. Dis.* **1997**, *20*, 193-202.
- (107) Bzowska, A.; Kulikowska, E.; Shugar, D. Purine nucleoside phosphorylases: properties, functions, and clinical aspects. *Pharmacol. Ther.* **2000**, *88*, 349-425.
- (108) Saebo, J.; Ueland, P. M. A study on the sequestration of adenosine and its conversion to adenine by the cyclic AMP-adenosine binding protein/S-adenosylhomocysteinase from mouse liver. *Biochim. Biophys. Acta* **1979**, *587*, 333-340.
- (109) Stoeckler, J. D.; Poirot, A. F.; Smith, R. M.; Parks, R. E., Jr.; Ealick, S. E.; Takabayashi, K.; Erion, M. D. Purine nucleoside phosphorylase. 3. Reversal of purine base specificity by site-directed mutagenesis. *Biochemistry* **1997**, *36*, 11749-11756.
- (110) Barsotti, C.; Tozzi, M. G.; Ipata, P. L. Purine and pyrimidine salvage in whole rat brain. Utilization of ATP-derived ribose-1-phosphate and 5-phosphoribosyl-1-pyrophosphate generated in experiments with dialyzed cell-free extracts. *J. Biol. Chem.* **2002**, *277*, 9865-9869.
- (111) Brady, T. Adenosine deaminase. *Biochem. J.* **1942**, *36*, 478-484.
- (112) Kamatani, N.; Carson, D. A. Dependence of adenine production upon polyamine synthesis in cultured human lymphoblasts. *Biochim. Biophys. Acta* **1981**, *675*, 344-350.
- (113) Pegg, A. E.; Williams-Ashman, H. G. Phosphate-stimulated breakdown of 5'-methylthioadenosine by rat ventral prostate. *Biochem. J.* **1969**, *115*, 241-247.
- (114) Avila, M. A.; Garcia-Trevijano, E. R.; Lu, S. C.; Corrales, F. J.; Mato, J. M. Methylthioadenosine. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* **2004**, *36*, 2125-2130.
- (115) Guan, R.; Ho, M. C.; Brenowitz, M.; Tyler, P. C.; Evans, G. B.; Almo, S. C.; Schramm, V. L. Entropy-driven binding of picomolar transition state analogue inhibitors to human 5'-methylthioadenosine phosphorylase. *Biochemistry* **2011**, *50*, 10408-10417.
- (116) Igarashi, K.; Kashiwagi, K. Modulation of cellular function by polyamines. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* **2010**, *42*, 39-51.
- (117) Ciccarelli, R.; Ballerini, P.; Sabatino, G.; Rathbone, M. P.; D'Onofrio, M.; Caciagli, F.; Di Iorio, P. Involvement of astrocytes in purine-mediated reparative processes in the brain. *Int. J. Dev. Neurosci.* **2001**, *19*, 395-414.
- (118) Murray, A. W. The biological significance of purine salvage. *Annu. Rev. Biochem.* **1971**, *40*, 811-826.
- (119) 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.
- (120) Leung, H. B.; Schramm, V. L. Adenylate degradation in *Escherichia coli*. The role of AMP nucleosidase and properties of the purified enzyme. *J. Biol. Chem.* **1980**, *255*, 10867-10874.

- (121) Köse, M.; Schiedel, A. C. Nucleoside/nucleobase transporters: drug targets of the future? *Future Med. Chem.* **2009**, *1*, 303-326.
- (122) Griffith, D. A.; Jarvis, S. M. Nucleoside and nucleobase transport systems of mammalian cells. *Biochim. Biophys. Acta* **1996**, *1286*, 153-181.
- (123) Yao, S. Y.; Ng, A. M.; Cass, C. E.; Baldwin, S. A.; Young, J. D. Nucleobase transport by human equilibrative nucleoside transporter 1 (hENT1). *J. Biol. Chem.* **2011**, *286*, 32552-32562.
- (124) 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.
- (125) 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.
- (126) Barnes, K.; Dobrzynski, H.; Foppolo, S.; Beal, P. R.; Ismat, F.; Scullion, E. R.; Sun, L.; Tellez, J.; Ritzel, M. W.; Claycomb, W. C.; Cass, C. E.; Young, J. D.; Billeter-Clark, R.; Boyett, M. R.; Baldwin, S. A. Distribution and functional characterization of equilibrative nucleoside transporter-4, a novel cardiac adenosine transporter activated at acidic pH. *Circ. Res.* **2006**, *99*, 510-519.
- (127) 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*, R1988-1995.
- (128) 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.
- (129) Taylor, M. W.; Olivelle, S.; Levine, R. A.; Coy, K.; Hershey, H.; Gupta, K. C.; Zawistowich, L. Regulation of de novo purine biosynthesis in Chinese hamster cells. *J. Biol. Chem.* **1982**, *257*, 377-380.
- (130) Brault, J. J.; Terjung, R. L. Purine salvage to adenine nucleotides in different skeletal muscle fiber types. *J. Appl. Physiol.* **2001**, *91*, 231-238.
- (131) King, M. E.; Honeysett, J. M.; Howell, S. B. Regulation of de novo purine synthesis in human bone marrow mononuclear cells by hypoxanthine. *J. Clin. Invest.* **1983**, *72*, 965-970.
- (132) Lajtha, L. G.; Vane, J. R. Dependence of bone marrow cells on the liver for purine supply. *Nature* **1958**, *182*, 191-192.
- (133) Mackinnon, A. M.; Deller, D. J. Purine nucleotide biosynthesis in gastrointestinal mucosa. *Biochim. Biophys. Acta* **1973**, *319*, 1-4.
- (134) Kamatani, N.; Takeuchi, F.; Nishida, Y.; Yamanaka, H.; Nishioka, K.; Tatara, K.; Fujimori, S.; Kaneko, K.; Akaoka, I.; Tofuku, Y. Severe impairment in adenine metabolism with a partial deficiency of adenine phosphoribosyltransferase. *Metabolism* **1985**, *34*, 164-168.
- (135) Amzel, L. M.; Pedersen, P. L. Proton ATPases: structure and mechanism. *Annu. Rev. Biochem.* **1983**, *52*, 801-824.
- (136) Dzeja, P. P.; Terzic, A. Phosphotransfer networks and cellular energetics. *J. Exp. Biol.* **2003**, *206*, 2039-2047.
- (137) Harzand, A.; Tamariz, L.; Hare, J. M. Uric acid, heart failure survival, and the impact of xanthine oxidase inhibition. *Congest. Heart Fail.* **2012**, *18*, 179-182.
- (138) Andersohn, F.; Konzen, C.; Garbe, E. Systematic review: agranulocytosis induced by nonchemotherapy drugs. *Ann. Intern. Med.* **2007**, *146*, 657-665.
- (139) Reznikoff, P. Nucleotide Therapy in Agranulocytosis. *J. Clin. Invest.* **1930**, *9*, 381-391.
- (140) Reznikoff, P. The treatment of agranulocytosis with adenine sulphate. *J. Clin. Invest.* **1933**, *12*, 45-53.
- (141) Doan, C. A.; Zervas, L. G.; Warren, S.; Ames, O. A study of the mechanism of nucleinate-induced leucopenic and leucocytic states, with special reference to the relative roles of liver, spleen, and bone marrow. *J. Exp. Med.* **1928**, *47*, 403-435.

- (142) Auditore, J. V.; Akintonwa, A.; Ballard, B. R.; Green, L. D. Adenine induced granulocytosis in the rabbit. *Life Sci.* **1979**, *24*, 733-738.
- (143) Shi, Y.; Evans, J. E.; Rock, K. L. Molecular identification of a danger signal that alerts the immune system to dying cells. *Nature* **2003**, *425*, 516-521.
- (144) Kobayashi, T.; Kouzaki, H.; Kita, H. Human eosinophils recognize endogenous danger signal crystalline uric acid and produce proinflammatory cytokines mediated by autocrine ATP. *J. Immunol.* **2010**, *184*, 6350-6358.
- (145) Gualtieri, R. J.; Berne, R. M.; McGrath, H. E.; Huster, W. J.; Quesenberry, P. J. Effect of adenine nucleotides on granulopoiesis and lithium-induced granulocytosis in long-term bone marrow cultures. *Exp. Hematol.* **1986**, *14*, 689-695.
- (146) Pospisil, M.; Hofer, M.; Znojil, V.; Vacha, J.; Netikova, J.; Hola, J. Synergistic effect of granulocyte colony-stimulating factor and drugs elevating extracellular adenosine on neutrophil production in mice. *Blood* **1995**, *86*, 3692-3697.
- (147) Bar-Yehuda, S.; Madi, L.; Barak, D.; Mittelman, M.; Ardon, E.; Ochaion, A.; Cohn, S.; Fishman, P. Agonists to the A₃ adenosine receptor induce G-CSF production via NF- κ B activation: a new class of myeloprotective agents. *Exp. Hematol.* **2002**, *30*, 1390-1398.
- (148) Hofer, M.; Pospisil, M.; Znojil, V.; Hola, J.; Streitova, D.; Vacek, A. Homeostatic action of adenosine A₃ and A₁ receptor agonists on proliferation of hematopoietic precursor cells. *Exp. Biol. Med.* **2008**, *233*, 897-900.
- (149) Lemoli, R. M.; Ferrari, D.; Fogli, M.; Rossi, L.; Pizzirani, C.; Forchap, S.; Chiozzi, P.; Vaselli, D.; Bertolini, F.; Foutz, T.; Aluigi, M.; Baccarani, M.; Di Virgilio, F. Extracellular nucleotides are potent stimulators of human hematopoietic stem cells in vitro and in vivo. *Blood* **2004**, *104*, 1662-1670.
- (150) Sugita, Y.; Simon, E. R. The mechanism of action of adenine in red cell preservation. *J. Clin. Invest.* **1965**, *44*, 629-642.
- (151) Hess, J. R.; Greenwalt, T. G. Storage of red blood cells: new approaches. *Transfus. Med. Rev.* **2002**, *16*, 283-295.
- (152) Jia, T.; Olauson, H.; Lindberg, K.; Amin, R.; Edvardsson, K.; Lindholm, B.; Andersson, G.; Wernerson, A.; Sabbagh, Y.; Schiavi, S.; Larsson, T. E. A novel model of adenine-induced tubulointerstitial nephropathy in mice. *BMC Nephrol.* **2013**, *14*, 116.
- (153) Yokozawa, T.; Zheng, P. D.; Oura, H.; Koizumi, F. Animal model of adenine-induced chronic renal failure in rats. *Nephron* **1986**, *44*, 230-234.
- (154) Yokozawa, T.; Oura, H.; Okada, T. Metabolic effects of dietary purine in rats. *J. Nutr. Sci. Vitaminol. (Tokyo)*. **1982**, *28*, 519-526.
- (155) Diwan, V.; Mistry, A.; Gobe, G.; Brown, L. Adenine-induced chronic kidney and cardiovascular damage in rats. *J. Pharmacol. Toxicol. Methods* **2013**, *68*, 197-207.
- (156) Yokozawa, T.; Oura, H.; Nakada, T. Blood flow in renal tissue, blood pressure, and blood hormone levels in rats with adenine-induced renal failure. *Nihon Jinzo Gakkai Shi* **1987**, *29*, 1145-1151.
- (157) Akintonwa, A.; Auditore, J. V.; Green, L. D. The toxicological effects of pure dietary adenine base in the rat. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* **1979**, *47*, 229-235.
- (158) Warner, W. L. Toxicology and pharmacology of adenine in animals and man. *Transfusion (Paris)*. **1977**, *17*, 326-332.
- (159) Wyngaarden, J. B.; Dunn, J. T. 8-Hydroxyadenine as the intermediate in the oxidation of adenine to 2, 8-dihydroxyadenine by xanthine oxidase. *Arch. Biochem. Biophys.* **1957**, *70*, 150-156.
- (160) Manfredi, J. P.; Holmes, E. W. Purine salvage pathways in myocardium. *Annu. Rev. Physiol.* **1985**, *47*, 691-705.
- (161) Klenow, H. The enzymic oxidation and assay of adenine. *Biochem. J.* **1952**, *50*, 404-407.
- (162) Okabe, C.; Borges, R. L.; de Almeida, D. C.; Fanelli, C.; Barlette, G. P.; Machado, F. G.; Arias, S. C.; Malheiros, D. M.; Camara, N. O.; Zatz, R.; Fujihara, C. K. NF- κ B activation mediates crystal translocation and interstitial inflammation in adenine overload nephropathy. *Am. J. Physiol. Renal Physiol.* **2013**, *305*, F155-163.

- (163) Story, D. L.; Shrader, R. E.; Theriault, L. L.; Lumijarvi, D. L.; Shenoy, T. S.; Savaiano, D. A.; Shaffer, R. H.; Ho, C. Y.; Clifford, A. J. Effects of dietary protein, adenine, and allopurinol on growth and metabolism of rats. *J. Nutr.* **1977**, *107*, 1044-1052.
- (164) Tamura, M.; Aizawa, R.; Hori, M.; Ozaki, H. Progressive renal dysfunction and macrophage infiltration in interstitial fibrosis in an adenine-induced tubulointerstitial nephritis mouse model. *Histochem. Cell Biol.* **2009**, *131*, 483-490.
- (165) Marra, G.; Vercelloni, P. G.; Edefonti, A.; Manzoni, G.; Pavesi, M. A.; Fogazzi, G. B.; Garigali, G.; Mockel, L.; Picot, I. C. Adenine phosphoribosyltransferase deficiency: an underdiagnosed cause of lithiasis and renal failure. *JIMD Rep.* **2012**, *5*, 45-48.
- (166) Hsieh, J. F.; Wu, S. H.; Yang, Y. L.; Choong, K. F.; Chen, S. T. The screening and characterization of 6-aminopurine-based xanthine oxidase inhibitors. *Biorg. Med. Chem.* **2007**, *15*, 3450-3456.
- (167) Raska, S. B. The production of experimental pellagra by adenine. *Science* **1947**, *105*, 126-127.
- (168) DesGroseilliers, J. P.; Shiffman, N. J. Pellagra. *Can. Med. Assoc. J.* **1976**, *115*, 768-770.
- (169) Williams, A. C.; Ramsden, D. B. Pellagra: A clue as to why energy failure causes diseases? *Med. Hypotheses* **2007**, *69*, 618-628.
- (170) Williams, J. N., Jr. Inhibition of coenzyme I-requiring enzyme by adenine and adenyl metabolites in vitro. *J. Biol. Chem.* **1952**, *195*, 629-635.
- (171) Duley, J. A.; Christodoulou, J.; de Brouwer, A. P. The PRPP synthetase spectrum: what does it demonstrate about nucleotide syndromes? *Nucleosides Nucleotides Nucl. Acids* **2011**, *30*, 1129-1139.
- (172) Cameron, J. S.; Simmonds, H. A.; Cadenhead, A.; Farebrother, D. Metabolism of intravenous adenine in the pig. *Adv. Exp. Med. Biol.* **1977**, *76A*, 196-205.
- (173) Sun, L.; Lu, J.; Yu, X. J.; Li, D. L.; Xu, X. L.; Wang, B.; Ren, K. Y.; Liu, J. K.; Zang, W. J. Adenine sulfate improves cardiac function and the cardiac cholinergic system after myocardial infarction in rats. *J. Pharmacol. Sci.* **2011**, *115*, 205-213.
- (174) Cohen, M. V.; Downey, J. M. Adenosine: trigger and mediator of cardioprotection. *Basic Res. Cardiol.* **2008**, *103*, 203-215.
- (175) Xu, Z.; Park, S. S.; Mueller, R. A.; Bagnell, R. C.; Patterson, C.; Boysen, P. G. Adenosine produces nitric oxide and prevents mitochondrial oxidant damage in rat cardiomyocytes. *Cardiovasc. Res.* **2005**, *65*, 803-812.
- (176) Shinozuka, H.; Estes, L. W.; Farber, E. Studies on acute methionine toxicity. I. Nucleolar disaggregation in guinea pig hepatic cells with methionine or ethionine and its reversal with adenine. *Am. J. Pathol.* **1971**, *64*, 241-256.
- (177) Shinozuka, H.; Goldblatt, P. J.; Farber, E. The disorganization of hepatic cell nucleoli induced by ethionine and its reversal by adenine. *J. Cell Biol.* **1968**, *36*, 313-328.
- (178) Berry, D. E.; Friedman, M. A. Effects of adenine, ATP, and methionine on L-ethionine inhibition of RNA synthesis in mouse liver. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* **1977**, *41*, 497-505.
- (179) Villa-Trevino, S.; Shull, K. H.; Farber, E. The role of adenosine triphosphate deficiency in ethionine-induced inhibition of protein synthesis. *J. Biol. Chem.* **1963**, *238*, 1757-1763.
- (180) Yamada, M.; Takahashi, J. Reversal of ethionine intoxication in the domestic fowl with methionine and adenine sulphate. *Br. Poult. Sci.* **1977**, *18*, 567-571.
- (181) Shull, K. H.; McConomy, J.; Vogt, M.; Castillo, A.; Farber, E. On the mechanism of induction of hepatic adenosine triphosphate deficiency by ethionine. *J. Biol. Chem.* **1966**, *241*, 5060-5070.
- (182) 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.
- (183) 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.
- (184) Volonte, C.; Rukenstein, A.; Loeb, D. M.; Greene, L. A. Differential inhibition of nerve growth factor responses by purine analogues: correlation with inhibition of a nerve growth factor-activated protein kinase. *J. Cell Biol.* **1989**, *109*, 2395-2403.

- (185) Mukai, H. The structure and function of PKN, a protein kinase having a catalytic domain homologous to that of PKC. *J. Biochem.* **2003**, *133*, 17-27.
- (186) Coleman, R. A. Purine antagonists in the identification of adenosine-receptors in guinea-pig trachea and the role of purines in non-adrenergic inhibitory neurotransmission. *Br. J. Pharmacol.* **1980**, *69*, 359-366.
- (187) Walaschewski, R.; Begrow, F.; Verspohl, E. J. Impact and benefit of A_{2B}-adenosine receptor agonists for the respiratory tract: mucociliary clearance, ciliary beat frequency, trachea muscle tonus and cytokine release. *J. Pharm. Pharmacol.* **2013**, *65*, 123-132.
- (188) Alunni, S.; Orru, M.; Ottavi, L. A study on the inhibition of adenosine deaminase. *J. Enzyme Inhib. Med. Chem.* **2008**, *23*, 182-189.
- (189) Saito, D.; Abe, Y.; Tani, H.; Takeda, K.; Hyodo, T.; Nakatsu, T.; Ueeda, M.; Kusachi, S. Effect of adenosine deaminase inhibitors on myocardial reactive hyperaemia following brief coronary occlusions. *Cardiovasc. Res.* **1985**, *19*, 578-583.
- (190) Goren, E. N.; Rosen, O. M. The effect of nucleotides and a nondialyzable factor on the hydrolysis of cyclic AMP by a cyclic nucleotide phosphodiesterase from beef heart. *Arch. Biochem. Biophys.* **1971**, *142*, 720-723.
- (191) Gulyassy, P. F. Inhibition of cyclic 3',5'-nucleotide phosphodiesterase by adenine compounds. *Life Sci. II* **1971**, *10*, 451-461.
- (192) Klotz, U.; Vapaatalo, H.; Stock, K. Rat adrenal cyclic nucleotide-phosphodiesterase; inhibition by drugs known to affect steroidogenesis. *Naunyn. Schmiedebergs Arch. Pharmacol.* **1972**, *273*, 376-385.
- (193) Epstein, P. M.; Strada, S. J.; Sarada, K.; Thompson, W. J. Catalytic and kinetic properties of purified high-affinity cyclic AMP phosphodiesterase from dog kidney. *Arch. Biochem. Biophys.* **1982**, *218*, 119-133.
- (194) Bach-Dieterle, Y.; Holden, W. E.; Junod, A. F. A comparison of adenine and some derivatives on pig isolated tracheal muscle. *Br. J. Pharmacol.* **1983**, *80*, 603-611.
- (195) Aksoy, M. O.; Kelsen, S. G. Relaxation of rabbit tracheal smooth muscle by adenine nucleotides: mediation by P₂-purinoceptors. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* **1994**, *10*, 230-236.
- (196) Montano, L. M.; Cruz-Valderrama, J. E.; Figueroa, A.; Flores-Soto, E.; Garcia-Hernandez, L. M.; Carbajal, V.; Segura, P.; Mendez, C.; Diaz, V.; Barajas-Lopez, C. Characterization of P_{2Y} receptors mediating ATP induced relaxation in guinea pig airway smooth muscle: involvement of prostaglandins and K⁺ channels. *Pfluegers Arch./Eur. J. Physiol.* **2011**, *462*, 573-585.
- (197) Tokuda, S.; Fukuda, T.; Kobayashi, Y.; Tanaka, M.; Matsui, T. Effect of the uncharged imidazolium moiety in adenine on endothelium-independent relaxation in the contracted thoracic aorta of Sprague-Dawley rats. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **2012**, *76*, 828-830.
- (198) Rousseau, E.; Ladine, J.; Liu, Q. Y.; Meissner, G. Activation of the Ca²⁺ release channel of skeletal muscle sarcoplasmic reticulum by caffeine and related compounds. *Arch. Biochem. Biophys.* **1988**, *267*, 75-86.
- (199) Yamanouchi, H.; Kanemasa, T.; Kasai, M. Effects of adenine nucleotides on the Ca²⁺-gated cation channel in sarcoplasmic reticulum vesicles. *J. Biochem.* **1984**, *95*, 161-166.
- (200) Uneyama, C.; Uneyama, H.; Takahashi, M.; Akaike, N. Biological actions of purines on rat megakaryocytes: potentiation by adenine of the purinoceptor-operated cytoplasmic Ca²⁺ oscillation. *Br. J. Pharmacol.* **1994**, *112*, 349-351.
- (201) Tolhurst, G.; Vial, C.; Leon, C.; Gachet, C.; Evans, R. J.; Mahaut-Smith, M. P. Interplay between P_{2Y}₁, P_{2Y}₁₂, and P_{2X}₁ receptors in the activation of megakaryocyte cation influx currents by ADP: evidence that the primary megakaryocyte represents a fully functional model of platelet P₂ receptor signaling. *Blood* **2005**, *106*, 1644-1651.
- (202) Murgo, A. J.; Contrera, J. G.; Sistare, F. D. Evidence for separate calcium-signaling P_{2T} and P_{2U} purinoceptors in human megakaryocytic Dami cells. *Blood* **1994**, *83*, 1258-1267.
- (203) Uneyama, H.; Uneyama, C.; Akaike, N. Intracellular mechanisms of cytoplasmic Ca²⁺ oscillation in rat megakaryocyte. *J. Biol. Chem.* **1993**, *268*, 168-174.

- (204) Uneyama, C.; Uneyama, H.; Takahashi, M.; Akaike, N. Pharmacological studies on mechanisms involved in Ca^{2+} oscillations in rat megakaryocytes. *Eur. J. Pharmacol.* **1995**, *291*, 381-386.
- (205) Martini, M.; Canella, R.; Fesce, R.; Rossi, M. L. The amplitude and inactivation properties of the delayed potassium currents are regulated by protein kinase activity in hair cells of the frog semicircular canals. *PLoS One* **2013**, *8*, e67784.
- (206) Kaldor, A.; Rihan, Z. E.; Nichols, T. R.; Butterfield, W. J. Effects of Adenine and Guanine on Hepatic Glucose Release and on the Action of Insulin on the Liver. *Nature* **1964**, *203*, 1186.
- (207) Cortes, D.; Guinzberg, R.; Villalobos-Molina, R.; Pina, E. Evidence that endogenous inosine and adenosine-mediated hyperglycaemia during ischaemia-reperfusion through A_3 adenosine receptors. *Auton. Autacoid Pharmacol.* **2009**, *29*, 157-164.
- (208) Guinzberg, R.; Cortes, D.; Diaz-Cruz, A.; Riveros-Rosas, H.; Villalobos-Molina, R.; Pina, E. Inosine released after hypoxia activates hepatic glucose liberation through A_3 adenosine receptors. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metabol.* **2006**, *290*, E940-951.
- (209) Kim, Y. A.; King, M. T.; Teague, W. E., Jr.; Rufo, G. A., Jr.; Veech, R. L.; Passonneau, J. V. Regulation of the purine salvage pathway in rat liver. *Am. J. Physiol.* **1992**, *262*, E344-352.
- (210) Gao, Z.; Li, B. S.; Day, Y. J.; Linden, J. A_3 adenosine receptor activation triggers phosphorylation of protein kinase B and protects rat basophilic leukemia 2H3 mast cells from apoptosis. *Mol. Pharmacol.* **2001**, *59*, 76-82.
- (211) Jin, X.; Shepherd, R. K.; Duling, B. R.; Linden, J. Inosine binds to A_3 adenosine receptors and stimulates mast cell degranulation. *J. Clin. Invest.* **1997**, *100*, 2849-2857.
- (212) Buang, J. The differences in metabolic responses between dietary orotate and adenine in lipid profiles of serum and liver tissues. *Med. J. Indones.* **2010**, *19*, 217-222.
- (213) Raben, M. S.; Matsuzaki, F. Effect of purines on epinephrine-induced lipolysis in adipose tissue. *J. Biol. Chem.* **1966**, *241*, 4781-4786.
- (214) Camaioni, E.; Costanzi, S.; Vittori, S.; Volpini, R.; Klotz, K. N.; Cristalli, G. New substituted 9-alkylpurines as adenosine receptor ligands. *Biorg. Med. Chem.* **1998**, *6*, 523-533.
- (215) Fredholm, B. B.; Irenius, E.; Kull, B.; Schulte, G. Comparison of the potency of adenosine as an agonist at human adenosine receptors expressed in Chinese hamster ovary cells. *Biochem. Pharmacol.* **2001**, *61*, 443-448.
- (216) Ukena, D.; Padgett, W. L.; Hong, O.; Daly, J. W.; Daly, D. T.; Olsson, R. A. N6-substituted 9-methyladenines: a new class of adenosine receptor antagonists. *FEBS Lett.* **1987**, *215*, 203-208.
- (217) Dhalla, A. K.; Chisholm, J. W.; Reaven, G. M.; Belardinelli, L. A_1 adenosine receptor: role in diabetes and obesity. *Handb. Exp. Pharmacol.* **2009**, 271-295.
- (218) Szkudelski, T.; Szkudelska, K.; Nogowski, L. Effects of adenosine A_1 receptor antagonism on lipogenesis and lipolysis in isolated rat adipocytes. *Physiol. Res.* **2009**, *58*, 863-871.
- (219) Lambertucci, C.; Antonini, I.; Buccioni, M.; Dal Ben, D.; Kachare, D. D.; Volpini, R.; Klotz, K. N.; Cristalli, G. 8-Bromo-9-alkyl adenine derivatives as tools for developing new adenosine A_{2A} and A_{2B} receptors ligands. *Biorg. Med. Chem.* **2009**, *17*, 2812-2822.
- (220) Griffiths, T. D.; Carpenter, J. G.; Dahle, D. B. DNA synthesis and cell survival after X-irradiation of mammalian cells treated with caffeine or adenine. *Int. J. Radiat. Biol. Relat. Stud. Phys. Chem. Med.* **1978**, *33*, 493-505.
- (221) Mlejnek, P.; Kozubek, S. Adenine-induced arrest of mammalian cells in early S-phase is related to the prevention of DNA synthesis inhibition caused by gamma-irradiation. *Int. J. Radiat Biol.* **1997**, *71*, 505-513.
- (222) Mlejnek, P.; Kozubek, S. Protective effect of adenine on DNA synthesis in irradiated Ehrlich ascites tumor cells. *Radiat. Res.* **1997**, *147*, 477-483.
- (223) Labib, K.; De Piccoli, G. Surviving chromosome replication: the many roles of the S-phase checkpoint pathway. *Philos. Trans. R. Soc. London, Ser. B* **2011**, *366*, 3554-3561.
- (224) Legerski, R. J. Repair of DNA interstrand cross-links during S phase of the mammalian cell cycle. *Environ. Mol. Mutagen.* **2010**, *51*, 540-551.

- (225) Sassanfar, M.; Roberts, J. Constitutive and UV-mediated activation of RecA protein: combined effects of recA441 and recF143 mutations and of addition of nucleosides and adenine. *J. Bacteriol.* **1991**, *173*, 5869-5875.
- (226) Henning, W.; Sturzbecher, H. W. Homologous recombination and cell cycle checkpoints: Rad51 in tumour progression and therapy resistance. *Toxicology* **2003**, *193*, 91-109.
- (227) Tomblin, G.; Shim, K. S.; Fishel, R. Biochemical characterization of the human RAD51 protein. II. Adenosine nucleotide binding and competition. *J. Biol. Chem.* **2002**, *277*, 14426-14433.
- (228) Hartmann, J.; Getoff, N. Radiation-induced effect of adenine (vitamin B4) on mitomycin C activity. In vitro experiments. *Anticancer Res.* **2006**, *26*, 3005-3010.
- (229) Wang, X. Y.; Ma, Z. C.; Shao, S.; Hong, Q.; Wang, Y. G.; Tan, H. L.; Lu, X. Q.; Dong, Z.; Gao, Y. Radioprotective effect of adenine on irradiation-induced apoptosis. *Chin. J. Nat. Med.* **2013**, *11*, 139-144.
- (230) Johari, H.; Parhizkar, Z.; Talebi, E. Effects of adenine on the pituitary-gonad axis in newborns rats. *Pak. J. Biol. Sci.* **2008**, *11*, 2413-2417.
- (231) Volonte, C.; Greene, L. A. Induction of ornithine decarboxylase by nerve growth factor in PC12 cells: dissection by purine analogues. *J. Biol. Chem.* **1990**, *265*, 11050-11055.
- (232) Ferro, A. J.; Wrobel, N. C.; Nicolette, J. A. 5-methylthioribose 1-phosphate: a product of partially purified, rat liver 5'-methylthioadenosine phosphorylase activity. *Biochim. Biophys. Acta* **1979**, *570*, 65-73.
- (233) Feng, Y.; Zhang, Q.; Dai, D. Z.; Ying, H. J.; Dai, Y. Strontium fructose 1,6-diphosphate rescues adenine-induced male hypogonadism and upregulates the testicular endothelin-1 system. *Clin. Exp. Pharmacol. Physiol.* **2007**, *34*, 1131-1137.
- (234) Bochi, G. V.; Torbitz, V. D.; Cargnin, L. P.; Sangoi, M. B.; Santos, R. C.; Gomes, P.; Moresco, R. N. Fructose-1,6-bisphosphate and N-acetylcysteine attenuate the formation of advanced oxidation protein products, a new class of inflammatory mediators, in vitro. *Inflammation* **2012**, *35*, 1786-1792.
- (235) Witko-Sarsat, V.; Friedlander, M.; Nguyen Khoa, T.; Capeillere-Blandin, C.; Nguyen, A. T.; Canteloup, S.; Dayer, J. M.; Jungers, P.; Drueke, T.; Descamps-Latscha, B. Advanced oxidation protein products as novel mediators of inflammation and monocyte activation in chronic renal failure. *J. Immunol.* **1998**, *161*, 2524-2532.
- (236) Fabiani, R.; Johansson, L.; Lundkvist, O.; Ronquist, G. Prolongation and improvement of prostasome promotive effect on sperm forward motility. *Eur. J. Obstet. Gynecol. Reprod. Biol.* **1995**, *58*, 191-198.
- (237) Fujii, T. Relation between embryotoxicity of adenine in mice and day of prenatal treatment. *Teratology* **1970**, *3*, 299-310.
- (238) Fujii, T.; Nishimura, H. Teratogenic action of adenine on mouse embryos. *Jpn. J. Pharmacol.* **1970**, *20*, 445-447.
- (239) Fujii, T.; Nishimura, H. Teratogenicity of adenine in the rat embryo. *Okajimas Folia Anat. Jpn.* **1972**, *49*, 47-53.
- (240) Fujii, T.; Nishimura, H. Side preponderant forelimb defects of mouse fetuses induced by maternal treatment with adenine. *Okajimas Folia Anat. Jpn.* **1972**, *49*, 75-80.
- (241) Akintonwa, A.; Auditore, J. V. Reversal of adenine-induced depression of mouse locomotor activity by amphetamine. *Arch. Int. Pharmacodyn. Ther.* **1978**, *235*, 248-253.
- (242) Chen, J. F.; Moratalla, R.; Impagnatiello, F.; Grandy, D. K.; Cuellar, B.; Rubinstein, M.; Beilstein, M. A.; Hackett, E.; Fink, J. S.; Low, M. J.; Ongini, E.; Schwarzschild, M. A. The role of the D₂ dopamine receptor (D₂R) in A_{2A} adenosine receptor (A_{2A}R)-mediated behavioral and cellular responses as revealed by A_{2A} and D₂ receptor knockout mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2001**, *98*, 1970-1975.
- (243) Taliaferro, W. H.; D'Alesandro, P. A. Trypanosoma lewisi infection in the rat: effect of adenine. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **1971**, *68*, 1-5.
- (244) Laiakis, E. C.; Hyduke, D. R.; Fornace, A. J. Comparison of mouse urinary metabolic profiles after exposure to the inflammatory stressors γ radiation and lipopolysaccharide. *Radiat. Res.* **2012**, *177*, 187-199.

- (245) Eltzschig, H. K.; Sitkovsky, M. V.; Robson, S. C. Purinergic signaling during inflammation. *N. Engl. J. Med.* **2012**, *367*, 2322-2333.
- (246) Hirasawa, K.; Yoshida, O.; Fujinami, T.; Sohma, K.; Watanabe, A. Adenine-induced selective apoptosis toward HIV chronically infected cells in vitro. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2000**, *273*, 1025-1032.
- (247) Wang, X.; Gao, Y.; Tan, J.; Devadas, K.; Ragupathy, V.; Takeda, K.; Zhao, J.; Hewlett, I. HIV-1 and HIV-2 infections induce autophagy in Jurkat and CD4⁺ T cells. *Cell. Signal.* **2012**, *24*, 1414-1419.
- (248) Seglen, P. O.; Gordon, P. B. 3-Methyladenine: specific inhibitor of autophagic/lysosomal protein degradation in isolated rat hepatocytes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **1982**, *79*, 1889-1892.
- (249) Caro, L. H.; Plomp, P. J.; Wolvetang, E. J.; Kerkhof, C.; Meijer, A. J. 3-Methyladenine, an inhibitor of autophagy, has multiple effects on metabolism. *Eur. J. Biochem.* **1988**, *175*, 325-329.
- (250) Wu, Y. T.; Tan, H. L.; Shui, G.; Bauvy, C.; Huang, Q.; Wenk, M. R.; Ong, C. N.; Codogno, P.; Shen, H. M. Dual role of 3-methyladenine in modulation of autophagy via different temporal patterns of inhibition on class I and III phosphoinositide 3-kinase. *J. Biol. Chem.* **2010**, *285*, 10850-10861.
- (251) Axelrod, J.; Daly, J. The enzymic conversion of adenine to 3-methyladenine. *Biochim. Biophys. Acta* **1962**, *61*, 855-856.
- (252) Kandel, J.; Collier, R. J.; Chung, D. W. Interaction of fragment A from diphtheria toxin with nicotinamide adenine dinucleotide. *J. Biol. Chem.* **1974**, *249*, 2088-2097.
- (253) Lemichez, E.; Bomsel, M.; Devilliers, G.; vanderSpek, J.; Murphy, J. R.; Lukianov, E. V.; Olsnes, S.; Boquet, P. Membrane translocation of diphtheria toxin fragment A exploits early to late endosome trafficking machinery. *Mol. Microbiol.* **1997**, *23*, 445-457.
- (254) Yamaizumi, M.; Mekada, E.; Uchida, T.; Okada, Y. One molecule of diphtheria toxin fragment A introduced into a cell can kill the cell. *Cell* **1978**, *15*, 245-250.
- (255) Shaw, P. C.; Wong, K. B.; Chan, D. S.; Williams, R. L. Structural basis for the interaction of [E160A-E189A]-trichosanthin with adenine. *Toxicon* **2003**, *41*, 575-581.
- (256) Sha, O.; Niu, J.; Ng, T. B.; Cho, E. Y.; Fu, X.; Jiang, W. Anti-tumor action of trichosanthin, a type 1 ribosome-inactivating protein, employed in traditional Chinese medicine: a mini review. *Cancer Chemother. Pharmacol.* **2013**, *71*, 1387-1393.
- (257) Zhang, J. S.; Liu, W. Y. The mechanism of action of trichosanthin on eukaryotic ribosomes--RNA N-glycosidase activity of the cytotoxin. *Nucleic Acids Res.* **1992**, *20*, 1271-1275.
- (258) Ito, K.; Uchino, H. Control of pyrimidine biosynthesis in human lymphocytes. Inhibitory effect of guanine and guanosine on induction of enzymes for pyrimidine biosynthesis de novo in phytohemagglutinin-stimulated lymphocytes. *J. Biol. Chem.* **1976**, *251*, 1427-1430.
- (259) Sugita, M.; Urakabe, S.; Handler, J. S.; Orloff, J. The effect of some nucleotides and related compounds on sodium transport and water permeability of the urinary bladder of the toad. *Comp. Biochem. Physiol. A: Physiol.* **1973**, *45*, 157-167.
- (260) Dissing, J.; Rangaard, B.; Christensen, U. Activity modulation of the fast and slow isozymes of human cytosolic low-molecular-weight acid phosphatase (ACP1) by purines. *Biochim. Biophys. Acta* **1993**, *1162*, 275-282.
- (261) Shi, J.; Liu, H. F.; Wong, J. M.; Huang, R. N.; Jones, E.; Carlson, T. J. Development of a robust and sensitive LC-MS/MS method for the determination of adenine in plasma of different species and its application to in vivo studies. *J. Pharm. Biomed. Anal.* **2011**, *56*, 778-784.
- (262) Traut, T. W. Physiological concentrations of purines and pyrimidines. *Mol. Cell. Biochem.* **1994**, *140*, 1-22.
- (263) de Verdier, C. H.; Ericson, A.; Niklasson, F.; Westman, M. Adenine metabolism in man. 1. After intravenous and peroral administration. *Scand. J. Clin. Lab. Invest.* **1977**, *37*, 567-575.
- (264) Kishimoto, T. A primer on meiotic resumption in starfish oocytes: the proposed signaling pathway triggered by maturation-inducing hormone. *Mol. Reprod. Dev.* **2011**, *78*, 704-707.
- (265) Yoshikuni, M.; Ishikawa, K.; Isobe, M.; Goto, T.; Nagahama, Y. Characterization of 1-methyladenine binding in starfish oocyte cortices. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **1988**, *85*, 1874-1877.

- (266) Toole, B.; Schuetz, A. W.; Boylan, E. Uptake and cellular localization of ^3H -1-methyladenine and ^3H -adenine in the starfish gonad and oocytes. *Gen. Comp. Endocrinol.* **1974**, *22*, 199-208.
- (267) Bender, E.; Buist, A.; Ercken, M.; Baggerman, G.; Jurzak, M.; Schoofs, L. G protein coupled receptor. WO01/74902A2, 20011011, 2001.
- (268) Knospe, M.; Müller, C. E.; Rosa, P.; Abdelrahman, A.; von Kügelgen, I.; Thimm, D.; Schiedel, A. C. The rat adenine receptor: pharmacological characterization and mutagenesis studies to investigate its putative ligand binding site. *Purinergic Signal.* **2013**, *9*, 367-381.
- (269) 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.
- (270) Watanabe, S.; Ikekita, M.; Nakata, H. Identification of specific [^3H]adenine-binding sites in rat brain membranes. *J. Biochem.* **2005**, *137*, 323-329.
- (271) Thimm, D.; Knospe, M.; Abdelrahman, A.; Moutinho, M.; Alsdorf, B. A. A.; von Kügelgen, I.; Schiedel, A. C.; Müller, C. E. Characterization of new G protein-coupled adenine receptors in mouse and hamster. *Purinergic Signal.* **2013**, *9*, 415-426.
- (272) 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.
- (273) Abdelrahman, A. Development of cell-based assays for adenine receptors and selected purine receptor subtypes: receptor characterization and search for novel ligands. Doktorarbeit, Universität Bonn, Bonn, 2010.
- (274) Gorzalka, S. Neuartige G-Protein-gekoppelte Purinrezeptoren: Funktionelle Charakterisierung nativer Adeninrezeptoren und Evaluation neuer Purinrezeptor-Liganden. Doktorarbeit, Universität Bonn, Bonn, 2006.
- (275) 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.
- (276) Lembo, P. M.; Grazzini, E.; Groblewski, T.; O'Donnell, D.; Roy, M. O.; Zhang, J.; Hoffert, C.; Cao, J.; Schmidt, R.; Pelletier, M.; Labarre, M.; Gosselin, M.; Fortin, Y.; Banville, D.; Shen, S. H.; Strom, P.; Payza, K.; Dray, A.; Walker, P.; Ahmad, S. Proenkephalin A gene products activate a new family of sensory neuron-specific GPCRs. *Nat. Neurosci.* **2002**, *5*, 201-209.
- (277) 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. U. S. A.* **2003**, *100*, 10043-10048.
- (278) 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.
- (279) Vanhoutte, P. M.; Humphrey, P. P.; Spedding, M. X. International Union of Pharmacology recommendations for nomenclature of new receptor subtypes. *Pharmacol. Rev.* **1996**, *48*, 1-2.
- (280) Kishore, B. K.; Zhang, Y.; Gevorgyan, H.; Kohan, D. E.; Schiedel, A. C.; Müller, C. E.; Peti-Peterdi, J. Cellular Localization of Adenine Receptors (AdeR) in the Rat Kidney, and their Functional Significance in the Inner Medullary Collecting Duct. *Am. J. Physiol. Renal Physiol.* **2013**.
- (281) 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.
- (282) Watanabe, A.; Sohail, M. A.; Gautam, S.; Gomes, D. A.; Mehal, W. Z. Adenine induces differentiation of rat hepatic stellate cells. *Dig. Dis. Sci.* **2012**, *57*, 2371-2378.
- (283) Sun, Y.; Huang, J.; Xiang, Y.; Bastepe, M.; Juppner, H.; Kobilka, B. K.; Zhang, J. J.; Huang, X. Y. Dosage-dependent switch from G protein-coupled to G protein-independent signaling by a GPCR. *EMBO J.* **2007**, *26*, 53-64.
- (284) Daaka, Y.; Luttrell, L. M.; Lefkowitz, R. J. Switching of the coupling of the β_2 -adrenergic receptor to different G proteins by protein kinase A. *Nature* **1997**, *390*, 88-91.
- (285) Bachmann, V. A.; Riml, A.; Huber, R. G.; Baillie, G. S.; Liedl, K. R.; Valovka, T.; Stefan, E. Reciprocal regulation of PKA and Rac signaling. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2013**, *110*, 8531-8536.

- (286) Sun, W.; Yang, J. Molecular basis of lysophosphatidic acid-induced NF- κ B activation. *Cell. Signal.* **2010**, *22*, 1799-1803.
- (287) Schülein, R.; Westendorf, C.; Krause, G.; Rosenthal, W. Functional significance of cleavable signal peptides of G protein-coupled receptors. *Eur. J. Cell Biol.* **2012**, *91*, 294-299.
- (288) Ye, K.; Mulder-Krieger, T.; Beukers, M. W.; IJzerman, A. P. [3 H]Adenine's high filter binding precludes its use as a radioligand for adenine receptors. *Purinergic Signal.* **2006**, *2*, 71.
- (289) Schiedel, A. C.; Meyer, H.; Alsdorf, B. B.; Gorzalka, S.; Brüssel, H.; Müller, C. E. [3 H]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.
- (290) Siegert, F. Etablierung zellbasierter Hypoxiemodelle und Untersuchungen zur Wirkung potentiell protektiver Pharmaka. Dissertation, Universität Leipzig, Leipzig, 2011.
- (291) Heo, J.; Vaidehi, N.; Wendel, J.; Goddard, W. A., 3rd. Prediction of the 3-D structure of rat MrgA G protein-coupled receptor and identification of its binding site. *J. Mol. Graphics Modell.* **2007**, *26*, 800-812.
- (292) Heo, J.; Han, S. K.; Vaidehi, N.; Wendel, J.; Kekenus-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.
- (293) Kohli, M.; Rago, C.; Lengauer, C.; Kinzler, K. W.; Vogelstein, B. Facile methods for generating human somatic cell gene knockouts using recombinant adeno-associated viruses. *Nucleic Acids Res.* **2004**, *32*, e3.
- (294) Miller, D. G.; Wang, P. R.; Petek, L. M.; Hirata, R. K.; Sands, M. S.; Russell, D. W. Gene targeting in vivo by adeno-associated virus vectors. *Nat. Biotechnol.* **2006**, *24*, 1022-1026.
- (295) Thimm, D.; Schiedel, A. C.; Sherbiny, F. F.; Hinz, S.; Hochheiser, K.; Bertarelli, D. C.; Maass, A.; Müller, C. E. Ligand-specific binding and activation of the human adenosine A_{2B} receptor. *Biochemistry* **2013**, *52*, 726-740.
- (296) Backliwal, G.; Hildinger, M.; Kuettel, I.; Delegrange, F.; Hacker, D. L.; Wurm, F. M. Valproic acid: a viable alternative to sodium butyrate for enhancing protein expression in mammalian cell cultures. *Biotechnol. Bioeng.* **2008**, *101*, 182-189.
- (297) Lovinger, D. M.; Sung, K. W.; Zhou, Q. Ethanol and trichloroethanol alter gating of 5-HT₃ receptor-channels in NCB-20 neuroblastoma cells. *Neuropharmacology* **2000**, *39*, 561-570.
- (298) Taleb, O.; Maammar, M.; Brumar, D.; Bourguignon, J. J.; Schmitt, M.; Klein, C.; Kemmel, V.; Maitre, M.; Mensah-Nyagan, A. G. Xanthurenic acid binds to neuronal G-protein-coupled receptors that secondarily activate cationic channels in the cell line NCB-20. *PLoS One* **2012**, *7*, e48553.
- (299) Kwon, J. S.; Kim, G. H.; Kim da, Y.; Yoon, S. M.; Seo, H. W.; Kim, J. H.; Min, B. H.; Kim, M. S. Chitosan-based hydrogels to induce neuronal differentiation of rat muscle-derived stem cells. *Int. J. Biol. Macromol.* **2012**, *51*, 974-979.
- (300) Safford, K. M.; Hicok, K. C.; Safford, S. D.; Halvorsen, Y. D.; Wilkison, W. O.; Gimble, J. M.; Rice, H. E. Neurogenic differentiation of murine and human adipose-derived stromal cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2002**, *294*, 371-379.
- (301) Gloriam, D. E.; Fredriksson, R.; Schiöth, H. B. The G protein-coupled receptor subset of the rat genome. *BMC Genomics* **2007**, *8*, 338.
- (302) Strotmann, R.; Schrock, K.; Boselt, I.; Staubert, C.; Russ, A.; Schöneberg, T. Evolution of GPCR: change and continuity. *Mol. Cell. Endocrinol.* **2011**, *331*, 170-178.
- (303) Clapham, D. E.; Neer, E. J. G protein $\beta\gamma$ subunits. *Annu. Rev. Pharmacool. Toxicol.* **1997**, *37*, 167-203.
- (304) Kaslow, H. R.; Burns, D. L. Pertussis toxin and target eukaryotic cells: binding, entry, and activation. *FASEB J.* **1992**, *6*, 2684-2690.
- (305) Adapala, R. K.; Talasila, P. K.; Bratz, I. N.; Zhang, D. X.; Suzuki, M.; Meszaros, J. G.; Thodeti, C. K. PKC α mediates acetylcholine-induced activation of TRPV4-dependent calcium influx in endothelial cells. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* **2011**, *301*, H757-765.
- (306) Pochynyuk, O.; Zaika, O.; O'Neil, R. G.; Mamenko, M. Novel insights into TRPV4 function in the kidney. *Pflügers Arch. - Eur. J. Physiol.* **2013**, *465*, 177-186.

- (307) Palazzo, E.; Luongo, L.; de Novellis, V.; Rossi, F.; Marabese, I.; Maione, S. Transient receptor potential vanilloid type 1 and pain development. *Curr. Opin. Pharmacol.* **2012**, *12*, 9-17.
- (308) Marz, R.; Wohlhueter, R. M.; Plagemann, P. G. Purine and pyrimidine transport and phosphoribosylation and their interaction in overall uptake by cultured mammalian cells. A re-evaluation. *J. Biol. Chem.* **1979**, *254*, 2329-2338.
- (309) Knospe, M. Molekularbiologie und Pharmakologie neuer G-Protein-gekoppelter Purin-Rezeptoren. Doktorarbeit, Universität Bonn, Bonn, 2012.
- (310) Bock, A.; Merten, N.; Schrage, R.; Dallanocce, C.; Batz, J.; Klockner, J.; Schmitz, J.; Matera, C.; Simon, K.; Kebabian, A.; Peters, L.; Müller, A.; Schrobang-Ley, J.; Trankle, C.; Hoffmann, C.; De Amici, M.; Holzgrabe, U.; Kostenis, E.; Mohr, K. The allosteric vestibule of a seven transmembrane helical receptor controls G-protein coupling. *Nat. Commun.* **2012**, *3*, 1044.
- (311) Michal, P.; El-Fakahany, E. E.; Dolezal, V. Muscarinic M₂ receptors directly activate G_{q/11} and G_s G-proteins. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **2007**, *320*, 607-614.
- (312) Tobin, G.; Giglio, D.; Lundgren, O. Muscarinic receptor subtypes in the alimentary tract. *J. Physiol. Pharmacol.* **2009**, *60*, 3-21.
- (313) Müller, C. E.; Borrmann, T.; Abdelrahman, A. Adenine receptor ligands. US2011/0288106A1, 20111124, 2011.
- (314) Alsdorf, B. A. A. Heterologe Expression und Charakterisierung des Maus-Adenin-Rezeptors in Sf21-Insektenzellen und Interaktion potentieller Wirkstoffe mit Membranrezeptoren. Universität Bonn, Bonn, 2006.
- (315) Cöster, M.; Wittkopf, D.; Kreuchwig, A.; Kleinau, G.; Thor, D.; Krause, G.; Schöneberg, T. Using ortholog sequence data to predict the functional relevance of mutations in G-protein-coupled receptors. *FASEB J.* **2012**, *26*, 3273-3281.
- (316) Plakidou-Dymock, S.; Dymock, D.; Hooley, R. A higher plant seven-transmembrane receptor that influences sensitivity to cytokinins. *Curr. Biol.* **1998**, *8*, 315-324.
- (317) Kanyuka, K.; Couch, D.; Hooley, R. Correction: A higher plant seven-transmembrane receptor that influences sensitivity to cytokinins. *Curr. Biol.* **2001**, *11*, 535.
- (318) Heckmann, B. L.; Yang, X.; Zhang, X.; Liu, J. The autophagic inhibitor 3-methyladenine potently stimulates PKA-dependent lipolysis in adipocytes. *Br. J. Pharmacol.* **2013**, *168*, 163-171.
- (319) Rhodes, C.; Alarcon, C. Methods of use of adenine derivatives for the treatment of diabetes and other disorders. WO2010/002492A1, 20100701, 2010.
- (320) Pierce, K. D.; Furlong, T. J.; Selbie, L. A.; Shine, J. Molecular cloning and expression of an adenosine A_{2B} receptor from human brain. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **1992**, *187*, 86-93.
- (321) Linden, J.; Thai, T.; Figler, H.; Jin, X.; Robeva, A. S. Characterization of human A_{2B} adenosine receptors: radioligand binding, western blotting, and coupling to G_q in human embryonic kidney 293 cells and HMC-1 mast cells. *Mol. Pharmacol.* **1999**, *56*, 705-713.
- (322) Belleannée, C.; Da Silva, N.; Shum, W. W.; Brown, D.; Breton, S. Role of purinergic signaling pathways in V-ATPase recruitment to apical membrane of acidifying epididymal clear cells. *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* **2010**, *298*, C817-830.
- (323) Chandrasekharan, B. P.; Kolachala, V. L.; Dalmasso, G.; Merlin, D.; Ravid, K.; Sitaraman, S. V.; Srinivasan, S. Adenosine 2B receptors (A_{2B}AR) on enteric neurons regulate murine distal colonic motility. *FASEB J.* **2009**, *23*, 2727-2734.
- (324) Dando, R.; Dvoryanchikov, G.; Pereira, E.; Chaudhari, N.; Roper, S. D. Adenosine enhances sweet taste through A_{2B} receptors in the taste bud. *J. Neurosci.* **2012**, *32*, 322-330.
- (325) Lee, T. K.; Koh, H. C. Involvement of NO and K_{ATP} channel in adenosine A_{2B} receptors induced cardiovascular regulation in the posterior hypothalamus of rats. *J. Cardiovasc. Pharmacol.* **2009**, *53*, 167-172.
- (326) Rüsing, D.; Müller, C. E.; Verspohl, E. J. The impact of adenosine and A_{2B} receptors on glucose homeostasis. *J. Pharm. Pharmacol.* **2006**, *58*, 1639-1645.
- (327) Wen, J.; Grenz, A.; Zhang, Y.; Dai, Y.; Kellems, R. E.; Blackburn, M. R.; Eltzschig, H. K.; Xia, Y. A_{2B} adenosine receptor contributes to penile erection via PI3K/AKT signaling cascade-mediated eNOS activation. *FASEB J.* **2011**, *25*, 2823-2830.

- (328) Cacciari, B.; Pastorin, G.; Bolcato, C.; Spalluto, G.; Bacilieri, M.; Moro, S. A_{2B} adenosine receptor antagonists: recent developments. *Mini-Rev. Med. Chem.* **2005**, *5*, 1053-1060.
- (329) Hasko, G.; Csoka, B.; Nemeth, Z. H.; Vizi, E. S.; Pacher, P. A_{2B} adenosine receptors in immunity and inflammation. *Trends Immunol.* **2009**, *30*, 263-270.
- (330) Elzein, E.; Kalla, R. V.; Li, X.; Perry, T.; Gimbel, A.; Zeng, D.; Lustig, D.; Leung, K.; Zablocki, J. Discovery of a novel A_{2B} adenosine receptor antagonist as a clinical candidate for chronic inflammatory airway diseases. *J. Med. Chem.* **2008**, *51*, 2267-2278.
- (331) Cekic, C.; Sag, D.; Li, Y.; Theodorescu, D.; Strieter, R. M.; Linden, J. Adenosine A_{2B} receptor blockade slows growth of bladder and breast tumors. *J. Immunol.* **2012**, *188*, 198-205.
- (332) Nakatsukasa, H.; Tsukimoto, M.; Harada, H.; Kojima, S. Adenosine A_{2B} receptor antagonist suppresses differentiation to regulatory T cells without suppressing activation of T cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2011**, *409*, 114-119.
- (333) Novitskiy, S. V.; Ryzhov, S.; Zaynagetdinov, R.; Goldstein, A. E.; Huang, Y.; Tikhomirov, O. Y.; Blackburn, M. R.; Biaggioni, I.; Carbone, D. P.; Feoktistov, I.; Dikov, M. M. Adenosine receptors in regulation of dendritic cell differentiation and function. *Blood* **2008**, *112*, 1822-1831.
- (334) Ryzhov, S.; Novitskiy, S. V.; Zaynagetdinov, R.; Goldstein, A. E.; Carbone, D. P.; Biaggioni, I.; Dikov, M. M.; Feoktistov, I. Host A_{2B} adenosine receptors promote carcinoma growth. *Neoplasia* **2008**, *10*, 987-995.
- (335) Stagg, J.; Divisekera, U.; McLaughlin, N.; Sharkey, J.; Pommey, S.; Denoyer, D.; Dwyer, K. M.; Smyth, M. J. Anti-CD73 antibody therapy inhibits breast tumor growth and metastasis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2010**, *107*, 1547-1552.
- (336) Abo-Salem, O. M.; Hayallah, A. M.; Bilkei-Gorzo, A.; Filipek, B.; Zimmer, A.; Müller, C. E. Antinociceptive effects of novel A_{2B} adenosine receptor antagonists. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **2004**, *308*, 358-366.
- (337) Bilkei-Gorzo, A.; Abo-Salem, O. M.; Hayallah, A. M.; Michel, K.; Müller, C. E.; Zimmer, A. Adenosine receptor subtype-selective antagonists in inflammation and hyperalgesia. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol.* **2008**, *377*, 65-76.
- (338) Csoka, B.; Nemeth, Z. H.; Rosenberger, P.; Eltzschig, H. K.; Spolarics, Z.; Pacher, P.; Selmeczy, Z.; Koscsó, B.; Himer, L.; Vizi, E. S.; Blackburn, M. R.; Deitch, E. A.; Hasko, G. A_{2B} adenosine receptors protect against sepsis-induced mortality by dampening excessive inflammation. *J. Immunol.* **2010**, *185*, 542-550.
- (339) Figler, R. A.; Wang, G.; Srinivasan, S.; Jung, D. Y.; Zhang, Z.; Pankow, J. S.; Ravid, K.; Fredholm, B.; Hedrick, C. C.; Rich, S. S.; Kim, J. K.; LaNoue, K. F.; Linden, J. Links between insulin resistance, adenosine A_{2B} receptors, and inflammatory markers in mice and humans. *Diabetes* **2011**, *60*, 669-679.
- (340) Koeppen, M.; Harter, P. N.; Bonney, S.; Bonney, M.; Reithel, S.; Zachskorn, C.; Mittelbronn, M.; Eckle, T. Adora2b signaling on bone marrow derived cells dampens myocardial ischemia-reperfusion injury. *Anesthesiology* **2012**, *116*, 1245-1257.
- (341) Koupenova, M.; Johnston-Cox, H.; Vezzeridis, A.; Gavras, H.; Yang, D.; Zannis, V.; Ravid, K. A_{2B} adenosine receptor regulates hyperlipidemia and atherosclerosis. *Circulation* **2012**, *125*, 354-363.
- (342) Mi, T.; Abbasi, S.; Zhang, H.; Uray, K.; Chunn, J. L.; Xia, L. W.; Molina, J. G.; Weisbrodt, N. W.; Kellems, R. E.; Blackburn, M. R.; Xia, Y. Excess adenosine in murine penile erectile tissues contributes to priapism via A_{2B} adenosine receptor signaling. *J. Clin. Invest.* **2008**, *118*, 1491-1501.
- (343) Xi, J.; McIntosh, R.; Shen, X.; Lee, S.; Chanoit, G.; Criswell, H.; Zvara, D. A.; Xu, Z. Adenosine A_{2A} and A_{2B} receptors work in concert to induce a strong protection against reperfusion injury in rat hearts. *J. Mol. Cell. Cardiol.* **2009**, *47*, 684-690.
- (344) Eckle, T.; Hughes, K.; Ehrentraut, H.; Brodsky, K. S.; Rosenberger, P.; Choi, D. S.; Ravid, K.; Weng, T.; Xia, Y.; Blackburn, M. R.; Eltzschig, H. K. Crosstalk between the equilibrative nucleoside transporter ENT2 and alveolar Adora2b adenosine receptors dampens acute lung injury. *FASEB J.* **2013**, *27*, 3078-3089.
- (345) Ortore, G.; Martinelli, A. A_{2B} receptor ligands: past, present and future trends. *Curr. Top. Med. Chem.* **2010**, *10*, 923-940.

- (346) Baraldi, P. G.; Tabrizi, M. A.; Fruttarolo, F.; Romagnoli, R.; Preti, D. Recent improvements in the development of A_{2B} adenosine receptor agonists. *Purinergic Signal*. **2009**, *5*, 3-19.
- (347) Borrmann, T.; Hinz, S.; Bertarelli, D. C.; Li, W.; Florin, N. C.; Scheiff, A. B.; Müller, C. E. 1-Alkyl-8-(piperazine-1-sulfonyl)phenylxanthines: development and characterization of adenosine A_{2B} receptor antagonists and a new radioligand with subnanomolar affinity and subtype specificity. *J. Med. Chem.* **2009**, *52*, 3994-4006.
- (348) Sherbiny, F. F.; Schiedel, A. C.; Maass, A.; Müller, C. E. Homology modelling of the human adenosine A_{2B} receptor based on X-ray structures of bovine rhodopsin, the β_2 -adrenergic receptor and the human adenosine A_{2A} receptor. *J. Comput. Aided Mol. Des.* **2009**, *23*, 807-828.
- (349) Schiedel, A. C.; Hinz, S.; Thimm, D.; Sherbiny, F.; Borrmann, T.; Maass, A.; Müller, C. E. The four cysteine residues in the second extracellular loop of the human adenosine A_{2B} receptor: role in ligand binding and receptor function. *Biochem. Pharmacol.* **2011**, *82*, 389-399.
- (350) Seibt, B. F.; Schiedel, A. C.; Thimm, D.; Hinz, S.; Sherbiny, F. F.; Müller, C. E. The second extracellular loop of GPCRs determines subtype-selectivity and controls efficacy as evidenced by loop exchange study at A₂ adenosine receptors. *Biochem. Pharmacol.* **2013**, *85*, 1317-1329.
- (351) Palaniappan, K. K.; Gao, Z. G.; Ivanov, A. A.; Greaves, R.; Adachi, H.; Besada, P.; Kim, H. O.; Kim, A. Y.; Choe, S. A.; Jeong, L. S.; Jacobson, K. A. Probing the binding site of the A₁ adenosine receptor reengineered for orthogonal recognition by tailored nucleosides. *Biochemistry* **2007**, *46*, 7437-7448.
- (352) Townsend-Nicholson, A.; Schofield, P. R. A threonine residue in the seventh transmembrane domain of the human A₁ adenosine receptor mediates specific agonist binding. *J. Biol. Chem.* **1994**, *269*, 2373-2376.
- (353) Kim, J.; Wess, J.; van Rhee, A. M.; Schöneberg, T.; Jacobson, K. A. Site-directed mutagenesis identifies residues involved in ligand recognition in the human A_{2A} adenosine receptor. *J. Biol. Chem.* **1995**, *270*, 13987-13997.
- (354) Palmer, R. M.; Ferrige, A. G.; Moncada, S. Nitric oxide release accounts for the biological activity of endothelium-derived relaxing factor. *Nature* **1987**, *327*, 524-526.
- (355) Francis, S. H.; Busch, J. L.; Corbin, J. D.; Sibley, D. cGMP-dependent protein kinases and cGMP phosphodiesterases in nitric oxide and cGMP action. *Pharmacol. Rev.* **2010**, *62*, 525-563.
- (356) Hammond, J.; Balligand, J. L. Nitric oxide synthase and cyclic GMP signaling in cardiac myocytes: from contractility to remodeling. *J. Mol. Cell. Cardiol.* **2012**, *52*, 330-340.
- (357) Ding, H. L.; Ryder, J. W.; Stull, J. T.; Kamm, K. E. Signaling processes for initiating smooth muscle contraction upon neural stimulation. *J. Biol. Chem.* **2009**, *284*, 15541-15548.
- (358) Mahavadi, S.; Nalli, A.; Al-Shboul, O.; Murthy, K. S. Inhibition of MLC₂₀ phosphorylation downstream of Ca²⁺ and RhoA: A novel mechanism involving phosphorylation of myosin phosphatase interacting protein (M-RIP) by PKG and stimulation of MLC phosphatase activity. *Cell Biochem. Biophys.* **2013**.
- (359) Wooldridge, A. A.; MacDonald, J. A.; Erdodi, F.; Ma, C.; Borman, M. A.; Hartshorne, D. J.; Haystead, T. A. Smooth muscle phosphatase is regulated in vivo by exclusion of phosphorylation of threonine 696 of MYPT1 by phosphorylation of Serine 695 in response to cyclic nucleotides. *J. Biol. Chem.* **2004**, *279*, 34496-34504.
- (360) Xia, C.; Bao, Z.; Yue, C.; Sanborn, B. M.; Liu, M. Phosphorylation and regulation of G-protein-activated phospholipase C- β_3 by cGMP-dependent protein kinases. *J. Biol. Chem.* **2001**, *276*, 19770-19777.
- (361) Jedlitschky, G.; Burchell, B.; Keppler, D. The multidrug resistance protein 5 functions as an ATP-dependent export pump for cyclic nucleotides. *J. Biol. Chem.* **2000**, *275*, 30069-30074.
- (362) Sager, G. Cyclic GMP transporters. *Neurochem. Int.* **2004**, *45*, 865-873.
- (363) Marsh, N.; Marsh, A. A short history of nitroglycerine and nitric oxide in pharmacology and physiology. *Clin. Exp. Pharmacol. Physiol.* **2000**, *27*, 313-319.
- (364) Broughton, B. J.; Chaplen, P.; Knowles, P.; Lunt, E.; Pain, D. L.; Wooldridge, K. R.; Ford, R.; Marshall, S.; Walker, J. L.; Maxwell, D. R. New inhibitor of reagin-mediated anaphylaxis. *Nature* **1974**, *251*, 650-652.

- (365) Ballard, S. A.; Gingell, C. J.; Tang, K.; Turner, L. A.; Price, M. E.; Naylor, A. M. Effects of sildenafil on the relaxation of human corpus cavernosum tissue in vitro and on the activities of cyclic nucleotide phosphodiesterase isozymes. *J. Urol.* **1998**, *159*, 2164-2171.
- (366) Gibson, A. Phosphodiesterase 5 inhibitors and nitrenergic transmission-from zaprinast to sildenafil. *Eur. J. Pharmacol.* **2001**, *411*, 1-10.
- (367) Salonia, A.; Rigatti, P.; Montorsi, F. Sildenafil in erectile dysfunction: a critical review. *Curr. Med. Res. Opin.* **2003**, *19*, 241-262.
- (368) Ban, T. A. The role of serendipity in drug discovery. *Dialogues Clin. Neurosci.* **2006**, *8*, 335-344.
- (369) Ravipati, G.; McClung, J. A.; Aronow, W. S.; Peterson, S. J.; Frishman, W. H. Type 5 phosphodiesterase inhibitors in the treatment of erectile dysfunction and cardiovascular disease. *Cardiol. Rev.* **2007**, *15*, 76-86.
- (370) Corbin, J. D.; Francis, S. H.; Webb, D. J. Phosphodiesterase type 5 as a pharmacologic target in erectile dysfunction. *Urology* **2002**, *60*, 4-11.
- (371) Bell, A. S.; Palmer, M. J. Novel phosphodiesterase type 5 modulators: a patent survey (2008 - 2010). *Expert Opin. Ther. Pat.* **2011**, *21*, 1631-1641.
- (372) Gresser, U.; Gleiter, C. H. Erectile dysfunction: comparison of efficacy and side effects of the PDE-5 inhibitors sildenafil, vardenafil and tadalafil--review of the literature. *Eur. J. Med. Res.* **2002**, *7*, 435-446.
- (373) Lee, S. K.; Kim, Y.; Kim, T. K.; Im, G. J.; Lee, B. Y.; Kim, D. H.; Jin, C.; Yoo, H. H. Determination of mirodenafil and sildenafil in the plasma and corpus cavernous of SD male rats. *J. Pharm. Biomed. Anal.* **2009**, *49*, 513-518.
- (374) Kang, S. G.; Kim, J. J. Udenafil: efficacy and tolerability in the management of erectile dysfunction. *Ther. Adv. Urol.* **2013**, *5*, 101-110.
- (375) Codevilla, C. F.; Lemos, A. M.; Delgado, L. S.; Rolim, C. M.; Adams, A. I.; Bergold, A. M. Development and validation of a stability-indicating LC method for the assay of lodenafil carbonate in tablets. *J. Chromatogr. Sci.* **2011**, *49*, 502-507.
- (376) Waxman, A.; Chen, S. Y.; Boulanger, L.; Watson, J. A.; Golden, G. Factors associated with adherence to phosphodiesterase type 5 inhibitors for the treatment of pulmonary arterial hypertension. *J. Med. Econ.* **2013**, *16*, 298-306.
- (377) Tamimi, N. A.; Mincik, I.; Haughie, S.; Lamb, J.; Crossland, A.; Ellis, P. A placebo-controlled study investigating the efficacy and safety of the phosphodiesterase type 5 inhibitor UK-369,003 for the treatment of men with lower urinary tract symptoms associated with clinical benign prostatic hyperplasia. *BJU Int.* **2010**, *106*, 674-680.
- (378) Lin, C. S.; Lau, A.; Tu, R.; Lue, T. F. Expression of three isoforms of cGMP-binding cGMP-specific phosphodiesterase (PDE5) in human penile cavernosum. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2000**, *268*, 628-635.
- (379) Boolell, M.; Allen, M. J.; Ballard, S. A.; Gepi-Attee, S.; Muirhead, G. J.; Naylor, A. M.; Osterloh, I. H.; Gingell, C. Sildenafil: an orally active type 5 cyclic GMP-specific phosphodiesterase inhibitor for the treatment of penile erectile dysfunction. *Int. J. Impot. Res.* **1996**, *8*, 47-52.
- (380) Saenz de Tejada, I.; Angulo, J.; Cuevas, P.; Fernandez, A.; Moncada, I.; Allona, A.; Lledo, E.; Korschen, H. G.; Niewohner, U.; Haning, H.; Pages, E.; Bischoff, E. The phosphodiesterase inhibitory selectivity and the in vitro and in vivo potency of the new PDE5 inhibitor vardenafil. *Int. J. Impot. Res.* **2001**, *13*, 282-290.
- (381) Smith, W. B., 2nd; McCaslin, I. R.; Gokce, A.; Mandava, S. H.; Trost, L.; Hellstrom, W. J. PDE5 inhibitors: considerations for preference and long-term adherence. *Int. J. Clin. Pract.* **2013**, *67*, 768-780.
- (382) Kedia, G. T.; Uckert, S.; Assadi-Pour, F.; Kuczyk, M. A.; Albrecht, K. Avanafil for the treatment of erectile dysfunction: initial data and clinical key properties. *Ther. Adv. Urol.* **2013**, *5*, 35-41.
- (383) Toque, H. A.; Teixeira, C. E.; Lorenzetti, R.; Okuyama, C. E.; Antunes, E.; De Nucci, G. Pharmacological characterization of a novel phosphodiesterase type 5 (PDE5) inhibitor lodenafil carbonate on human and rabbit corpus cavernosum. *Eur. J. Pharmacol.* **2008**, *591*, 189-195.

- (384) Choi, Y. H.; Lee, Y. S.; Bae, S. H.; Kim, T. K.; Lee, B. Y.; Lee, M. G. Dose-dependent pharmacokinetics and first-pass effects of mirodenafil, a new erectogenic, in rats. *Biopharm. Drug Dispos.* **2009**, *30*, 305-317.
- (385) Giovannoni, M. P.; Vergelli, C.; Graziano, A.; Dal Piaz, V. PDE5 inhibitors and their applications. *Curr. Med. Chem.* **2010**, *17*, 2564-2587.
- (386) Rawson, D. J.; Ballard, S.; Barber, C.; Barker, L.; Beaumont, K.; Bunnage, M.; Cole, S.; Corless, M.; Denton, S.; Ellis, D.; Floc'h, M.; Foster, L.; Gosset, J.; Holmwood, F.; Lane, C.; Leahy, D.; Mathias, J.; Maw, G.; Million, W.; Poincard, C.; Price, J.; Russel, R.; Street, S.; Watson, L. The discovery of UK-369003, a novel PDE5 inhibitor with the potential for oral bioavailability and dose-proportional pharmacokinetics. *Biorg. Med. Chem.* **2012**, *20*, 498-509.
- (387) Park, K. H.; Rubin, L. E.; Gross, S. S.; Levi, R. Nitric oxide is a mediator of hypoxic coronary vasodilatation. Relation to adenosine and cyclooxygenase-derived metabolites. *Circ. Res.* **1992**, *71*, 992-1001.
- (388) Filippi, S.; Mancini, M.; Amerini, S.; Bartolini, M.; Natali, A.; Mancina, R.; Forti, G.; Ledda, F.; Maggi, M. Functional adenosine receptors in human corpora cavernosa. *Int. J. Androl.* **2000**, *23*, 210-217.
- (389) Kilic, S.; Salih, M.; Anafarta, K.; Baltaci, S.; Kosar, A. Adenosine: a new agent in the diagnosis of impotence. *Int. J. Impot. Res.* **1994**, *6*, 191-198.
- (390) Wen, J.; Xia, Y. Adenosine signaling: good or bad in erectile function? *Arterioscler. Thromb. Vac. Biol.* **2012**, *32*, 845-850.
- (391) Jhaveri, K. A.; Toth, L. A.; Sekino, Y.; Ramkumar, V. Nitric oxide serves as an endogenous regulator of neuronal adenosine A₁ receptor expression. *J. Neurochem.* **2006**, *99*, 42-53.
- (392) Lima, F. O.; Souza, G. R.; Verri, W. A., Jr.; Parada, C. A.; Ferreira, S. H.; Cunha, F. Q.; Cunha, T. M. Direct blockade of inflammatory hypernociception by peripheral A₁ adenosine receptors: involvement of the NO/cGMP/PKG/KATP signaling pathway. *Pain* **2010**, *151*, 506-515.
- (393) Kuno, A.; Solenkova, N. V.; Solodushko, V.; Dost, T.; Liu, Y.; Yang, X. M.; Cohen, M. V.; Downey, J. M. Infarct limitation by a protein kinase G activator at reperfusion in rabbit hearts is dependent on sensitizing the heart to A_{2b} agonists by protein kinase C. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* **2008**, *295*, H1288-H1295.
- (394) Nickels, T. J.; Reed, G. W.; Drummond, J. T.; Blevins, D. E.; Lutz, M. C.; Wilson, D. F. Does nitric oxide modulate transmitter release at the mammalian neuromuscular junction? *Clin. Exp. Pharmacol. Physiol.* **2007**, *34*, 318-326.
- (395) Akula, K. K.; Dhir, A.; Kulkarni, S. K. Nitric oxide signaling pathway in the anti-convulsant effect of adenosine against pentylenetetrazol-induced seizure threshold in mice. *Eur. J. Pharmacol.* **2008**, *587*, 129-134.
- (396) Fischer, H.; Prast, H.; Philippu, A. Adenosine release in the ventral striatum of the rat is modulated by endogenous nitric oxide. *Eur. J. Pharmacol.* **1995**, *275*, R5-6.
- (397) Nikodijevic, O.; Klein, D. C. Adenosine stimulates adenosine 3',5'-monophosphate and guanosine 3',5'-monophosphate accumulation in rat pinealocytes: evidence for a role for adenosine in pineal neurotransmission. *Endocrinology* **1989**, *125*, 2150-2157.
- (398) Zhao, T.; Xi, L.; Chelliah, J.; Levasseur, J. E.; Kukreja, R. C. Inducible nitric oxide synthase mediates delayed myocardial protection induced by activation of adenosine A₁ receptors: evidence from gene-knockout mice. *Circulation* **2000**, *102*, 902-907.
- (399) Ikeda, U.; Kurosaki, K.; Shimpo, M.; Okada, K.; Saito, T.; Shimada, K. Adenosine stimulates nitric oxide synthesis in rat cardiac myocytes. *Am. J. Physiol.* **1997**, *273*, H59-65.
- (400) Abebe, W.; Hussain, T.; Olanrewaju, H.; Mustafa, S. J. Role of nitric oxide in adenosine receptor-mediated relaxation of porcine coronary artery. *Am. J. Physiol.* **1995**, *269*, H1672-1678.
- (401) Olanrewaju, H. A.; Mustafa, S. J. Adenosine A_{2A} and A_{2B} receptors mediated nitric oxide production in coronary artery endothelial cells. *Gen. Pharmacol.* **2000**, *35*, 171-177.
- (402) Cushing, D. J.; Brown, G. L.; Sabouni, M. H.; Mustafa, S. J. Adenosine receptor-mediated coronary artery relaxation and cyclic nucleotide production. *Am. J. Physiol.* **1991**, *261*, H343-348.

- (403) Ikeda, U.; Kurosaki, K.; Ohya, K.; Shimada, K. Adenosine stimulates nitric oxide synthesis in vascular smooth muscle cells. *Cardiovasc. Res.* **1997**, *35*, 168-174.
- (404) Hirokawa, K.; O'Shaughnessy, K.; Moore, K.; Ramrakha, P.; Wilkins, M. R. Induction of nitric oxide synthase in cultured vascular smooth muscle cells: the role of cyclic AMP. *Br. J. Pharmacol.* **1994**, *112*, 396-402.
- (405) Zhu, C. B.; Hewlett, W. A.; Feoktistov, I.; Biaggioni, I.; Blakely, R. D. Adenosine receptor, protein kinase G, and p38 mitogen-activated protein kinase-dependent up-regulation of serotonin transporters involves both transporter trafficking and activation. *Mol. Pharmacol.* **2004**, *65*, 1462-1474.
- (406) Miller, K. J.; Hoffman, B. J. Adenosine A₃ receptors regulate serotonin transport via nitric oxide and cGMP. *J. Biol. Chem.* **1994**, *269*, 27351-27356.
- (407) Cobb, B. R.; Fan, L.; Kovacs, T. E.; Sorscher, E. J.; Clancy, J. P. Adenosine receptors and phosphodiesterase inhibitors stimulate Cl⁻ secretion in Calu-3 cells. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* **2003**, *29*, 410-418.
- (408) Gross, E. R.; Gross, G. J. Pharmacologic therapeutics for cardiac reperfusion injury. *Expert Opin. Emerging Drugs* **2007**, *12*, 367-388.
- (409) Methner, C.; Lukowski, R.; Grube, K.; Loga, F.; Smith, R. A.; Murphy, M. P.; Hofmann, F.; Krieg, T. Protection through postconditioning or a mitochondria-targeted S-nitrosothiol is unaffected by cardiomyocyte-selective ablation of protein kinase G. *Basic Res. Cardiol.* **2013**, *108*, 337.
- (410) Salloum, F. N.; Das, A.; Thomas, C. S.; Yin, C.; Kukreja, R. C. Adenosine A₁ receptor mediates delayed cardioprotective effect of sildenafil in mouse. *J. Mol. Cell. Cardiol.* **2007**, *43*, 545-551.
- (411) Lee, H. G.; Kim, W. M.; Park, C. H.; Yoon, M. H. Roles of adenosine and serotonin receptors on the antinociception of sildenafil in the spinal cord of rats. *Yonsei Med. J.* **2010**, *51*, 960-964.
- (412) Lee, H. G.; Kim, W. M.; Choi, J. I.; Yoon, M. H. Roles of adenosine receptor subtypes on the antinociceptive effect of sildenafil in rat spinal cord. *Neurosci. Lett.* **2010**, *480*, 182-185.
- (413) Przyklenk, K.; Kloner, R. A. Sildenafil citrate (Viagra) does not exacerbate myocardial ischemia in canine models of coronary artery stenosis. *J. Am. Coll. Cardiol.* **2001**, *37*, 286-292.
- (414) Sanders, M. P.; Roumen, L.; van der Horst, E.; Lane, J. R.; Vischer, H. F.; van Offenbeek, J.; de Vries, H.; Verhoeven, S.; Chow, K. Y.; Verkaar, F.; Beukers, M. W.; McGuire, R.; Leurs, R.; IJzerman, A. P.; de Vlieg, J.; de Esch, I. J.; Zaman, G. J.; Klomp, J. P.; Bender, A.; de Graaf, C. A prospective cross-screening study on G-protein-coupled receptors: lessons learned in virtual compound library design. *J. Med. Chem.* **2012**, *55*, 5311-5325.
- (415) Lenzi, O.; Colotta, V.; Catarzi, D.; Varano, F.; Poli, D.; Filacchioni, G.; Varani, K.; Vincenzi, F.; Borea, P. A.; Paoletta, S.; Morizzo, E.; Moro, S. 2-Phenylpyrazolo[4,3-d]pyrimidin-7-one as a new scaffold to obtain potent and selective human A₃ adenosine receptor antagonists: new insights into the receptor-antagonist recognition. *J. Med. Chem.* **2009**, *52*, 7640-7652.
- (416) Gillespie, R. J.; Cliffe, I. A.; Dawson, C. E.; Dourish, C. T.; Gaur, S.; Jordan, A. M.; Knight, A. R.; Lerpiniere, J.; Misra, A.; Pratt, R. M.; Roffey, J.; Stratton, G. C.; Upton, R.; Weiss, S. M.; Williamson, D. S. Antagonists of the human adenosine A_{2A} receptor. Part 3: Design and synthesis of pyrazolo[3,4-d]pyrimidines, pyrrolo[2,3-d]pyrimidines and 6-arylpurines. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2008**, *18*, 2924-2929.
- (417) Hamilton, H. W.; Ortwine, D. F.; Worth, D. F.; Bristol, J. A. Synthesis and structure-activity relationships of pyrazolo[4,3-d]pyrimidin-7-ones as adenosine receptor antagonists. *J. Med. Chem.* **1987**, *30*, 91-96.
- (418) Neustadt, B. R.; Hao, J.; Lindo, N.; Greenlee, W. J.; Stamford, A. W.; Tulshian, D.; Ongini, E.; Hunter, J.; Monopoli, A.; Bertorelli, R.; Foster, C.; Arik, L.; Lachowicz, J.; Ng, K.; Feng, K. I. Potent, selective, and orally active adenosine A_{2A} receptor antagonists: arylpiperazine derivatives of pyrazolo[4,3-e]-1,2,4-triazolo[1,5-c]pyrimidines. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2007**, *17*, 1376-1380.
- (419) Hetman, J. M.; Soderling, S. H.; Glavas, N. A.; Beavo, J. A. Cloning and characterization of PDE7B, a cAMP-specific phosphodiesterase. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2000**, *97*, 472-476.
- (420) Soderling, S. H.; Bayuga, S. J.; Beavo, J. A. Cloning and characterization of a cAMP-specific cyclic nucleotide phosphodiesterase. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **1998**, *95*, 8991-8996.

- (421) Fehr, T. F.; Dickinson, E. S.; Goldman, S. J.; Slakey, L. L. Cyclic AMP efflux is regulated by occupancy of the adenosine receptor in pig aortic smooth muscle cells. *J. Biol. Chem.* **1990**, *265*, 10974-10980.
- (422) Stief, C. G.; Uckert, S.; Becker, A. J.; Harringer, W.; Truss, M. C.; Forssmann, W. G.; Jonas, U. Effects of sildenafil on cAMP and cGMP levels in isolated human cavernous and cardiac tissue. *Urology* **2000**, *55*, 146-150.
- (423) Gao, Z. G.; Gross, A. S.; Jacobson, K. A. Effects of the allosteric modulator SCH-202676 on adenosine and P2Y receptors. *Life Sci.* **2004**, *74*, 3173-3180.
- (424) Lewandowicz, A. M.; Vepsäläinen, J.; Laitinen, J. T. The 'allosteric modulator' SCH-202676 disrupts G protein-coupled receptor function via sulphhydryl-sensitive mechanisms. *Br. J. Pharmacol.* **2006**, *147*, 422-429.
- (425) Corbin, J. D.; Blount, M. A.; Weeks, J. L., 2nd; Beasley, A.; Kuhn, K. P.; Ho, Y. S.; Saidi, L. F.; Hurley, J. H.; Kotera, J.; Francis, S. H. [³H]Sildenafil binding to phosphodiesterase-5 is specific, kinetically heterogeneous, and stimulated by cGMP. *Mol. Pharmacol.* **2003**, *63*, 1364-1372.
- (426) Crider, J. Y.; Griffin, B. W.; Sharif, N. A. Endogenous EP4 prostaglandin receptors coupled positively to adenylyl cyclase in Chinese hamster ovary cells: pharmacological characterization. *Prostaglandins Leukot. Essent. Fatty Acids* **2000**, *62*, 21-26.
- (427) Müller, C. E.; Ferré, S. Blocking striatal adenosine A_{2A} receptors: a new strategy for basal ganglia disorders. *Recent Pat. CNS Drug Discov.* **2007**, *2*, 1-21.
- (428) Nichols, D. J.; Muirhead, G. J.; Harness, J. A. Pharmacokinetics of sildenafil after single oral doses in healthy male subjects: absolute bioavailability, food effects and dose proportionality. *Br. J. Clin. Pharmacol.* **2002**, *53 Suppl 1*, 5S-12S.
- (429) Marchese, A.; Sawzdargo, M.; Nguyen, T.; Cheng, R.; Heng, H. H.; Nowak, T.; Im, D. S.; Lynch, K. R.; George, S. R.; O'Dowd, B. F. Discovery of three novel orphan G-protein-coupled receptors. *Genomics* **1999**, *56*, 12-21.
- (430) Engemaier, E.; Rompler, H.; Schöneberg, T.; Schulz, A. Genomic and supragenomic structure of the nucleotide-like G-protein-coupled receptor GPR34. *Genomics* **2006**, *87*, 254-264.
- (431) Schöneberg, T.; Schulz, A.; Grosse, R.; Schade, R.; Henklein, P.; Schultz, G.; Gudermann, T. A novel subgroup of class I G-protein-coupled receptors. *Biochim. Biophys. Acta* **1999**, *1446*, 57-70.
- (432) Schöneberg, T.; Hermsdorf, T.; Engemaier, E.; Engel, K.; Liebscher, I.; Thor, D.; Zierau, K.; Rompler, H.; Schulz, A. Structural and functional evolution of the P2Y₁₂-like receptor group. *Purinergic Signal.* **2007**, *3*, 255-268.
- (433) Schulz, A.; Schöneberg, T. The structural evolution of a P2Y-like G-protein-coupled receptor. *J. Biol. Chem.* **2003**, *278*, 35531-35541.
- (434) Bedard, A.; Tremblay, P.; Chernomoretz, A.; Vallières, L. Identification of genes preferentially expressed by microglia and upregulated during cuprizone-induced inflammation. *Glia* **2007**, *55*, 777-789.
- (435) Kasukawa, T.; Masumoto, K. H.; Nikaido, I.; Nagano, M.; Uno, K. D.; Tsujino, K.; Hanashima, C.; Shigeyoshi, Y.; Ueda, H. R. Quantitative expression profile of distinct functional regions in the adult mouse brain. *PLoS One* **2011**, *6*, e23228.
- (436) Sugo, T.; Tachimoto, H.; Chikatsu, T.; Murakami, Y.; Kikukawa, Y.; Sato, S.; Kikuchi, K.; Nagi, T.; Harada, M.; Ogi, K.; Ebisawa, M.; Mori, M. Identification of a lysophosphatidylserine receptor on mast cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2006**, *341*, 1078-1087.
- (437) Steffen, J. S.; Simon, E.; Warneke, V.; Balschun, K.; Ebert, M.; Rocken, C. LGR4 and LGR6 are differentially expressed and of putative tumor biological significance in gastric carcinoma. *Virchows Arch.* **2012**, *461*, 355-365.
- (438) Baens, M.; Finalet Ferreira, J.; Tousseyn, T.; Urbankova, H.; Michaux, L.; de Leval, L.; Dierickx, D.; Wolter, P.; Sagaert, X.; Vandenberghe, P.; De Wolf-Peeters, C.; Wlodarska, I. t(X;14)(p11.4;q32.33) is recurrent in marginal zone lymphoma and up-regulates GPR34. *Haematologica* **2012**, *97*, 184-188.

- (439) Qin, Y.; Verdegaal, E. M.; Siderius, M.; Bebelman, J. P.; Smit, M. J.; Leurs, R.; Willemze, R.; Tensen, C. P.; Osanto, S. Quantitative expression profiling of G-protein-coupled receptors (GPCRs) in metastatic melanoma: the constitutively active orphan GPCR GPR18 as novel drug target. *Pigment Cell Melanoma Res.* **2011**, *24*, 207-218.
- (440) Ansell, S. M.; Akasaka, T.; McPhail, E.; Manske, M.; Braggio, E.; Price-Troska, T.; Ziesmer, S.; Secreto, F.; Fonseca, R.; Gupta, M.; Law, M.; Witzig, T. E.; Dyer, M. J.; Dogan, A.; Cerhan, J. R.; Novak, A. J. t(X;14)(p11;q32) in MALT lymphoma involving GPR34 reveals a role for GPR34 in tumor cell growth. *Blood* **2012**, *120*, 3949-3957.
- (441) Kitamura, H.; Makide, K.; Shuto, A.; Ikubo, M.; Inoue, A.; Suzuki, K.; Sato, Y.; Nakamura, S.; Otani, Y.; Ohwada, T.; Aoki, J. GPR34 is a receptor for lysophosphatidylserine with a fatty acid at the sn-2 position. *J. Biochem.* **2012**, *151*, 511-518.
- (442) Makide, K.; Kitamura, H.; Sato, Y.; Okutani, M.; Aoki, J. Emerging lysophospholipid mediators, lysophosphatidylserine, lysophosphatidylthreonine, lysophosphatidylethanolamine and lysophosphatidylglycerol. *Prostaglandins Other Lipid Mediat.* **2009**, *89*, 135-139.
- (443) Iwashita, M.; Makide, K.; Nonomura, T.; Misumi, Y.; Otani, Y.; Ishida, M.; Taguchi, R.; Tsujimoto, M.; Aoki, J.; Arai, H.; Ohwada, T. Synthesis and evaluation of lysophosphatidylserine analogues as inducers of mast cell degranulation. Potent activities of lysophosphatidylthreonine and its 2-deoxy derivative. *J. Med. Chem.* **2009**, *52*, 5837-5863.
- (444) Liebscher, I.; Müller, U.; Teupser, D.; Engemaier, E.; Engel, K. M.; Ritscher, L.; Thor, D.; Sangkuhl, K.; Ricken, A.; Wurm, A.; Piehler, D.; Schmutzler, S.; Fuhrmann, H.; Albert, F. W.; Reichenbach, A.; Thiery, J.; Schöneberg, T.; Schulz, A. Altered immune response in mice deficient for the G protein-coupled receptor GPR34. *J. Biol. Chem.* **2011**, *286*, 2101-2110.
- (445) Ritscher, L.; Engemaier, E.; Staubert, C.; Liebscher, I.; Schmidt, P.; Hermsdorf, T.; Rompler, H.; Schulz, A.; Schöneberg, T. The ligand specificity of the G-protein-coupled receptor GPR34. *Biochem. J.* **2012**, *443*, 841-850.
- (446) Makide, K.; Aoki, J. GPR34 as a lysophosphatidylserine receptor. *J. Biochem.* **2013**, *153*, 327-329.
- (447) Jacobi, F. K.; Broghammer, M.; Pesch, K.; Zrenner, E.; Berger, W.; Meindl, A.; Pusch, C. M. Physical mapping and exclusion of GPR34 as the causative gene for congenital stationary night blindness type 1. *Hum. Genet.* **2000**, *107*, 89-91.
- (448) Inoue, A.; Ishiguro, J.; Kitamura, H.; Arima, N.; Okutani, M.; Shuto, A.; Higashiyama, S.; Ohwada, T.; Arai, H.; Makide, K.; Aoki, J. TGF α shedding assay: an accurate and versatile method for detecting GPCR activation. *Nat. Methods* **2012**, *9*, 1021-1029.
- (449) Jacobs, K. A.; Collins-Racie, L. A.; Colbert, M.; Duckett, M.; Golden-Fleet, M.; Kelleher, K.; Kriz, R.; LaVallie, E. R.; Merberg, D.; Spaulding, V.; Stover, J.; Williamson, M. J.; McCoy, J. M. A genetic selection for isolating cDNAs encoding secreted proteins. *Gene* **1997**, *198*, 289-296.
- (450) Wittenberger, T.; Schaller, H. C.; Hellebrand, S. An expressed sequence tag (EST) data mining strategy succeeding in the discovery of new G-protein coupled receptors. *J. Mol. Biol.* **2001**, *307*, 799-813.
- (451) von Kügelgen, I. Pharmacological profiles of cloned mammalian P2Y-receptor subtypes. *Pharmacol. Ther.* **2006**, *110*, 415-432.
- (452) Regard, J. B.; Sato, I. T.; Coughlin, S. R. Anatomical profiling of G protein-coupled receptor expression. *Cell* **2008**, *135*, 561-571.
- (453) Hidalgo, L. G.; Sellares, J.; Sis, B.; Mengel, M.; Chang, J.; Halloran, P. F. Interpreting NK cell transcripts versus T cell transcripts in renal transplant biopsies. *Am. J. Transplantation* **2012**, *12*, 1180-1191.
- (454) Joensuu, T.; Hamalainen, R.; Yuan, B.; Johnson, C.; Tegelberg, S.; Gasparini, P.; Zelante, L.; Pirvola, U.; Pakarinen, L.; Lehesjoki, A. E.; de la Chapelle, A.; Sankila, E. M. Mutations in a novel gene with transmembrane domains underlie Usher syndrome type 3. *Am. J. Hum. Genet.* **2001**, *69*, 673-684.
- (455) Lokk, K.; Vooder, T.; Kolde, R.; Valk, K.; Vosa, U.; Roosipuu, R.; Milani, L.; Fischer, K.; Koltsina, M.; Urgard, E.; Annilo, T.; Metspalu, A.; Tonisson, N. Methylation markers of early-stage non-small cell lung cancer. *PLoS One* **2012**, *7*, e39813.

- (456) Cho, S. J.; Jin, L. J.; Kim, B. Y.; Cho, S. I.; Jung, W. Y.; Han, J. H.; Ha, S. Y.; Kim, H. K.; Kim, A. Increased expression of matrix metalloproteinase 9 and tubulin- α in pulmonary sclerosing hemangioma. *Oncol. Rep.* **2007**, *18*, 1139-1144.
- (457) Vincent-Fabert, C.; Fiancette, R.; Rouaud, P.; Baudet, C.; Truffinet, V.; Magnone, V.; Guillaudeau, A.; Cogne, M.; Dubus, P.; Denizot, Y. A defect of the INK4-Cdk4 checkpoint and Myc collaborate in blastoid mantle cell lymphoma-like lymphoma formation in mice. *Am. J. Pathol.* **2012**, *180*, 1688-1701.
- (458) Rönnerberg, E.; Guss, B.; Pejler, G. Infection of mast cells with live streptococci causes a toll-like receptor 2- and cell-cell contact-dependent cytokine and chemokine response. *Infect. Immun.* **2010**, *78*, 854-864.
- (459) Coldren, C. D.; Nick, J. A.; Poch, K. R.; Woolum, M. D.; Fouty, B. W.; O'Brien, J. M.; Gruber, M. P.; Zamora, M. R.; Svetkauskaite, D.; Richter, D. A.; He, Q.; Park, J. S.; Overdier, K. H.; Abraham, E.; Geraci, M. W. Functional and genomic changes induced by alveolar transmigration in human neutrophils. *Am. J. Physiol. Lung Cell. Mol. Physiol.* **2006**, *291*, L1267-1276.
- (460) Liew, K. J.; Chow, V. T. Microarray and real-time RT-PCR analyses of a novel set of differentially expressed human genes in ECV304 endothelial-like cells infected with dengue virus type 2. *J. Virol. Methods* **2006**, *131*, 47-57.
- (461) Karagiannis, G. S.; Weile, J.; Bader, G. D.; Minta, J. Integrative pathway dissection of molecular mechanisms of moxLDL-induced vascular smooth muscle phenotype transformation. *BMC Cardiovasc. Disord.* **2013**, *13*, 4.
- (462) Rossi, L.; Lemoli, R. M.; Goodell, M. A. Gpr171, a putative P2Y-like receptor, negatively regulates myeloid differentiation in murine hematopoietic progenitors. *Exp. Hematol.* **2013**, *41*, 102-112.
- (463) Gomes, I.; Aryal, D. K.; Wardman, J. H.; Gupta, A.; Gagnidze, K.; Rodriguiz, R. M.; Kumar, S.; Wetsel, W. C.; Pintar, J. E.; Fricker, L. D.; Devi, L. A. GPR171 is a hypothalamic G protein-coupled receptor for BigLEN, a neuropeptide involved in feeding. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2013**, *110*, 16211-16216.
- (464) Strange, P. G. Agonist binding, agonist affinity and agonist efficacy at G protein-coupled receptors. *Br. J. Pharmacol.* **2008**, *153*, 1353-1363.
- (465) Lefkowitz, R. J. G-protein-coupled receptors. Turned on to ill effect. *Nature* **1993**, *365*, 603-604.
- (466) van der Horst, E.; Peironcely, J. E.; van Westen, G. J.; van den Hoven, O. O.; Galloway, W. R.; Spring, D. R.; Wegner, J. K.; van Vlijmen, H. W.; IJzerman, A. P.; Overington, J. P.; Bender, A. Chemogenomics approaches for receptor deorphanization and extensions of the chemogenomics concept to phenotypic space. *Curr. Top. Med. Chem.* **2011**, *11*, 1964-1977.
- (467) O'Dowd, B. F.; Nguyen, T.; Marchese, A.; Cheng, R.; Lynch, K. R.; Heng, H. H.; Kolakowski, L. F., Jr.; George, S. R. Discovery of three novel G-protein-coupled receptor genes. *Genomics* **1998**, *47*, 310-313.
- (468) Horikawa, Y.; Oda, N.; Cox, N. J.; Li, X.; Orho-Melander, M.; Hara, M.; Hinokio, Y.; Lindner, T. H.; Mashima, H.; Schwarz, P. E.; del Bosque-Plata, L.; Oda, Y.; Yoshiuchi, I.; Colilla, S.; Polonsky, K. S.; Wei, S.; Concannon, P.; Iwasaki, N.; Schulze, J.; Baier, L. J.; Bogardus, C.; Groop, L.; Boerwinkle, E.; Hanis, C. L.; Bell, G. I. Genetic variation in the gene encoding calpain-10 is associated with type 2 diabetes mellitus. *Nat. Genet.* **2000**, *26*, 163-175.
- (469) Okumura, S.; Baba, H.; Kumada, T.; Nanmoku, K.; Nakajima, H.; Nakane, Y.; Hioki, K.; Ikenaka, K. Cloning of a G-protein-coupled receptor that shows an activity to transform NIH3T3 cells and is expressed in gastric cancer cells. *Cancer Sci.* **2004**, *95*, 131-135.
- (470) Sawzdargo, M.; Nguyen, T.; Lee, D. K.; Lynch, K. R.; Cheng, R.; Heng, H. H.; George, S. R.; O'Dowd, B. F. Identification and cloning of three novel human G protein-coupled receptor genes GPR52, PsiGPR53 and GPR55: GPR55 is extensively expressed in human brain. *Mol. Brain Res.* **1999**, *64*, 193-198.
- (471) Thimm, D.; Funke, M.; Meyer, A.; Müller, C. E. 6-Bromo-8-(4-[³H]methoxybenzamido)-4-oxo-4H-chromene-2-carboxylic acid: a powerful tool for studying orphan G protein-coupled receptor GPR35. *J. Med. Chem.* **2013**, *56*, 7084-7099.

- (472) Taniguchi, Y.; Tonai-Kachi, H.; Shinjo, K. Zaprinast, a well-known cyclic guanosine monophosphate-specific phosphodiesterase inhibitor, is an agonist for GPR35. *FEBS Lett.* **2006**, *580*, 5003-5008.
- (473) Jenkins, L.; Alvarez-Curto, E.; Campbell, K.; de Munnik, S.; Canals, M.; Schlyer, S.; Milligan, G. Agonist activation of the G protein-coupled receptor GPR35 involves transmembrane domain III and is transduced via $G_{\alpha_{13}}$ and β -arrestin-2. *Br. J. Pharmacol.* **2011**, *162*, 733-748.
- (474) Wang, J.; Simonavicius, N.; Wu, X.; Swaminath, G.; Reagan, J.; Tian, H.; Ling, L. Kynurenic acid as a ligand for orphan G protein-coupled receptor GPR35. *J. Biol. Chem.* **2006**, *281*, 22021-22028.
- (475) Cosi, C.; Mannaioni, G.; Cozzi, A.; Carla, V.; Sili, M.; Cavone, L.; Maratea, D.; Moroni, F. G-protein coupled receptor 35 (GPR35) activation and inflammatory pain: studies on the antinociceptive effects of kynurenic acid and zaprinast. *Neuropharmacology* **2011**, *60*, 1227-1231.
- (476) Ohshiro, H.; Tonai-Kachi, H.; Ichikawa, K. GPR35 is a functional receptor in rat dorsal root ganglion neurons. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2008**, *365*, 344-348.
- (477) Fallarini, S.; Magliulo, L.; Paoletti, T.; de Lalla, C.; Lombardi, G. Expression of functional GPR35 in human iNKT cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2010**, *398*, 420-425.
- (478) Min, K. D.; Asakura, M.; Liao, Y.; Nakamaru, K.; Okazaki, H.; Takahashi, T.; Fujimoto, K.; Ito, S.; Takahashi, A.; Asanuma, H.; Yamazaki, S.; Minamino, T.; Sanada, S.; Seguchi, O.; Nakano, A.; Ando, Y.; Otsuka, T.; Furukawa, H.; Isomura, T.; Takashima, S.; Mochizuki, N.; Kitakaze, M. Identification of genes related to heart failure using global gene expression profiling of human failing myocardium. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2010**, *393*, 55-60.
- (479) Yang, Y.; Fu, A.; Wu, X.; Reagan, J. D. GPR35 is a target of the loop diuretic drugs bumetanide and furosemide. *Pharmacology* **2012**, *89*, 13-17.
- (480) Yang, Y.; Lu, J. Y.; Wu, X.; Summer, S.; Whoriskey, J.; Saris, C.; Reagan, J. D. G-protein-coupled receptor 35 is a target of the asthma drugs cromolyn disodium and nedocromil sodium. *Pharmacology* **2010**, *86*, 1-5.
- (481) Deng, H.; Hu, H.; Fang, Y. Tyrphostin analogs are GPR35 agonists. *FEBS Lett.* **2011**, *585*, 1957-1962.
- (482) Guo, J.; Williams, D. J.; Puhl, H. L., 3rd; Ikeda, S. R. Inhibition of N-type calcium channels by activation of GPR35, an orphan receptor, heterologously expressed in rat sympathetic neurons. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **2008**, *324*, 342-351.
- (483) Zhao, P.; Sharir, H.; Kapur, A.; Cowan, A.; Geller, E. B.; Adler, M. W.; Seltzman, H. H.; Reggio, P. H.; Heynen-Genel, S.; Sauer, M.; Chung, T. D.; Bai, Y.; Chen, W.; Caron, M. G.; Barak, L. S.; Abood, M. E. Targeting of the orphan receptor GPR35 by pamoic acid: a potent activator of extracellular signal-regulated kinase and β -arrestin2 with antinociceptive activity. *Mol. Pharmacol.* **2010**, *78*, 560-568.
- (484) Ronkainen, V. P.; Tuomainen, T.; Huusko, J.; Laidinen, S.; Malinen, M.; Palvimo, J. J.; Yla-Herttuala, S.; Vuolteenaho, O.; Tavi, P. Hypoxia-inducible factor 1-induced G protein-coupled receptor 35 expression is an early marker of progressive cardiac remodelling. *Cardiovasc. Res.* **2013**.
- (485) Jenkins, L.; Harries, N.; Lappin, J. E.; MacKenzie, A. E.; Neetoo-Isseljee, Z.; Southern, C.; McIver, E. G.; Nicklin, S. A.; Taylor, D. L.; Milligan, G. Antagonists of GPR35 display high species ortholog selectivity and varying modes of action. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **2012**, *343*, 683-695.
- (486) Oka, S.; Ota, R.; Shima, M.; Yamashita, A.; Sugiura, T. GPR35 is a novel lysophosphatidic acid receptor. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2010**, *395*, 232-237.
- (487) Jenkins, L.; Brea, J.; Smith, N. J.; Hudson, B. D.; Reilly, G.; Bryant, N. J.; Castro, M.; Loza, M. I.; Milligan, G. Identification of novel species-selective agonists of the G-protein-coupled receptor GPR35 that promote recruitment of β -arrestin-2 and activate $G_{\alpha_{13}}$. *Biochem. J.* **2010**, *432*, 451-459.
- (488) Hu, H.; Deng, H.; Fang, Y. Label-free phenotypic profiling identified D-luciferin as a GPR35 agonist. *PLoS One* **2012**, *7*, e34934.
- (489) Barth, M. C.; Ahluwalia, N.; Anderson, T. J.; Hardy, G. J.; Sinha, S.; Alvarez-Cardona, J. A.; Pruitt, I. E.; Rhee, E. P.; Colvin, R. A.; Gerszten, R. E. Kynurenic acid triggers firm arrest of leukocytes to vascular endothelium under flow conditions. *J. Biol. Chem.* **2009**, *284*, 19189-19195.

- (490) Kuc, D.; Zgrajka, W.; Parada-Turska, J.; Urbanik-Sypniewska, T.; Turski, W. A. Micromolar concentration of kynurenic acid in rat small intestine. *Amino Acids* **2008**, *35*, 503-505.
- (491) Paluszkiwicz, P.; Zgrajka, W.; Saran, T.; Schabowski, J.; Piedra, J. L.; Fedkiv, O.; Rengman, S.; Pierzynowski, S. G.; Turski, W. A. High concentration of kynurenic acid in bile and pancreatic juice. *Amino Acids* **2009**, *37*, 637-641.
- (492) Pi, L. G.; Tang, A. G.; Mo, X. M.; Luo, X. B.; Ao, X. More rapid and sensitive method for simultaneous determination of tryptophan and kynurenic acid by HPLC. *Clin. Biochem.* **2009**, *42*, 420-425.
- (493) Zhao, J.; Gao, P.; Zhu, D. Optimization of Zn²⁺-containing mobile phase for simultaneous determination of kynurenine, kynurenic acid and tryptophan in human plasma by high performance liquid chromatography. *J. Chromatogr. B* **2010**, *878*, 603-608.
- (494) Forrest, C. M.; Youd, P.; Kennedy, A.; Gould, S. R.; Darlington, L. G.; Stone, T. W. Purine, kynurenine, neopterin and lipid peroxidation levels in inflammatory bowel disease. *J. Biomed. Sci.* **2002**, *9*, 436-442.
- (495) Deng, H.; Hu, J.; Hu, H.; He, M.; Fang, Y. Thieno[3,2-b]thiophene-2-carboxylic acid derivatives as GPR35 agonists. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2012**, *22*, 4148-4152.
- (496) Deng, H. Y.; Fang, Y. Synthesis and agonistic activity at the GPR35 of 5,6-dihydroxyindole-2-carboxylic acid analogues. *ACS Med. Chem. Lett.* **2012**, *3*, 550-554.
- (497) Neetoo-Isseljee, Z.; Mackenzie, A. E.; Southern, C.; Jerman, J.; McIver, E. G.; Harries, N.; Taylor, D. L.; Milligan, G. High-throughput identification and characterization of novel, species-selective GPR35 agonists. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **2013**, *344*, 568-578.
- (498) MacKenzie, A. E.; Caltabiano, G.; Kent, T. C.; Jenkins, L.; McCallum, J. E.; Hudson, B. D.; Nicklin, S. A.; Fawcett, L.; Lane, R.; Charlton, S. J.; Milligan, G. The antiallergic mast cell stabilizers lodoxamide and bufrolin as the first high and equipotent agonists of human and rat GPR35. *Mol. Pharmacol.* **2013**.
- (499) Southern, C.; Cook, J. M.; Neetoo-Isseljee, Z.; Taylor, D. L.; Kettleborough, C. A.; Merritt, A.; Bassoni, D. L.; Raab, W. J.; Quinn, E.; Wehrman, T. S.; Davenport, A. P.; Brown, A. J.; Green, A.; Wigglesworth, M. J.; Rees, S. Screening β -arrestin recruitment for the identification of natural ligands for orphan G-protein-coupled receptors. *J. Biomol. Screen.* **2013**.
- (500) Deng, H.; Hu, H.; Fang, Y. Multiple tyrosine metabolites are GPR35 agonists. *Sci. Rep.* **2012**, *2*, 373.
- (501) Deng, H. Y.; Fang, Y. Discovery of nitrophenols as GPR35 agonists. *Medchemcomm* **2012**, *3*, 1270-1274.
- (502) Deng, H. Y.; Hu, H. B.; Ling, S. Z.; Ferrie, A. M.; Fang, Y. Discovery of natural phenols as G protein-coupled receptor-35 (GPR35) agonists. *ACS Med. Chem. Lett.* **2012**, *3*, 165-169.
- (503) Deng, H.; Fang, Y. Anti-inflammatory gallic acid and wedelolactone are G protein-coupled receptor-35 agonists. *Pharmacology* **2012**, *89*, 211-219.
- (504) Taniguchi, Y.; Tonai-Kachi, H.; Shinjo, K. 5-Nitro-2-(3-phenylpropylamino)benzoic acid is a GPR35 agonist. *Pharmacology* **2008**, *82*, 245-249.
- (505) Deng, H.; Fang, Y. Aspirin metabolites are GPR35 agonists. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol.* **2012**, *385*, 729-737.
- (506) Deng, H.; Hu, H.; He, M.; Hu, J.; Niu, W.; Ferrie, A. M.; Fang, Y. Discovery of 2-(4-methylfuran-2(5H)-ylidene)malononitrile and thieno[3,2-b]thiophene-2-carboxylic acid derivatives as G protein-coupled receptor 35 (GPR35) agonists. *J. Med. Chem.* **2011**, *54*, 7385-7396.
- (507) Peeters, R. P.; van der Geyten, S.; Wouters, P. J.; Darras, V. M.; van Toor, H.; Kaptein, E.; Visser, T. J.; Van den Berghe, G. Tissue thyroid hormone levels in critical illness. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* **2005**, *90*, 6498-6507.
- (508) Heynen-Genel, S.; Dahl, R.; Shi, S.; Sauer, M.; Hariharan, S.; Sergienko, E.; Dad, S.; Chung, T. D. Y.; Stonich, D.; Su, Y.; Caron, M.; Zhao, P.; Abood, M. E.; Barak, L. S. Selective GPR35 antagonists - probes 1 & 2. In *Probe Reports from the NIH Molecular Libraries Program, Bethesda, MD.*, National Center for Biotechnology Information (US), [updated 2010 Oct 4];: 2010.

- (509) Liu, C.; Wu, J.; Zhu, J.; Kuei, C.; Yu, J.; Shelton, J.; Sutton, S. W.; Li, X.; Yun, S. J.; Mirzadegan, T.; Mazur, C.; Kamme, F.; Lovenberg, T. W. Lactate inhibits lipolysis in fat cells through activation of an orphan G-protein-coupled receptor, GPR81. *J. Biol. Chem.* **2009**, *284*, 2811-2822.
- (510) Shrimpton, A. E.; Braddock, B. R.; Thomson, L. L.; Stein, C. K.; Hoo, J. J. Molecular delineation of deletions on 2q37.3 in three cases with an Albright hereditary osteodystrophy-like phenotype. *Clin. Genet.* **2004**, *66*, 537-544.
- (511) Hilger, A.; Schramm, C.; Pennimpede, T.; Wittler, L.; Dworschak, G. C.; Bartels, E.; Engels, H.; Zink, A. M.; Degenhardt, F.; Muller, A. M.; Schmiedeke, E.; Grasshoff-Derr, S.; Marzheuser, S.; Hosie, S.; Holland-Cunz, S.; Wijers, C. H.; Marcelis, C. L.; van Rooij, I. A.; Hildebrandt, F.; Herrmann, B. G.; Nothen, M. M.; Ludwig, M.; Reutter, H.; Draaken, M. De novo microduplications at 1q41, 2q37.3, and 8q24.3 in patients with VATER/VACTERL association. *Eur. J. Hum. Genet.* **2013**, *21*, 1377-1382.
- (512) Vander Molen, J.; Frisse, L. M.; Fullerton, S. M.; Qian, Y.; Del Bosque-Plata, L.; Hudson, R. R.; Di Rienzo, A. Population genetics of CAPN10 and GPR35: implications for the evolution of type 2 diabetes variants. *Am. J. Hum. Genet.* **2005**, *76*, 548-560.
- (513) Sun, Y. V.; Bielak, L. F.; Peyser, P. A.; Turner, S. T.; Sheedy, P. F., 2nd; Boerwinkle, E.; Kardina, S. L. Application of machine learning algorithms to predict coronary artery calcification with a sibship-based design. *Genet. Epidemiol.* **2008**, *32*, 350-360.
- (514) Ellinghaus, D.; Folseraas, T.; Holm, K.; Ellinghaus, E.; Melum, E.; Balschun, T.; Laerdahl, J. K.; Shiryayev, A.; Gotthardt, D. N.; Weismuller, T. J.; Schramm, C.; Wittig, M.; Bergquist, A.; Bjornsson, E.; Marschall, H. U.; Vatn, M.; Teufel, A.; Rust, C.; Gieger, C.; Wichmann, H. E.; Runz, H.; Sterneck, M.; Rupp, C.; Braun, F.; Weersma, R. K.; Wijmenga, C.; Ponsioen, C. Y.; Mathew, C. G.; Rutgeerts, P.; Vermeire, S.; Schrupf, E.; Hov, J. R.; Manns, M. P.; Boberg, K. M.; Schreiber, S.; Franke, A.; Karlsen, T. H. Genome-wide association analysis in Primary sclerosing cholangitis and ulcerative colitis identifies risk loci at GPR35 and TCF4. *Hepatology* **2012**.
- (515) Yoon, M. H.; Choi, J. I.; Bae, H. B.; Jeong, S. W.; Chung, S. S.; Yoo, K. Y.; Jeong, C. Y.; Kim, S. J.; Chung, S. T.; Kim, C. M. Lack of the nitric oxide-cyclic GMP-potassium channel pathway for the antinociceptive effect of intrathecal zaprinast in a rat formalin test. *Neurosci. Lett.* **2005**, *390*, 114-117.
- (516) Franck, M. C.; Stenqvist, A.; Li, L.; Hao, J.; Usoskin, D.; Xu, X.; Wiesenfeld-Hallin, Z.; Ernfors, P. Essential role of Ret for defining non-peptidergic nociceptor phenotypes and functions in the adult mouse. *Eur. J. Neurosci.* **2011**, *33*, 1385-1400.
- (517) Albuquerque, E. X.; Schwarcz, R. Kynurenic acid as an antagonist of $\alpha 7$ nicotinic acetylcholine receptors in the brain: Facts and challenges. *Biochem. Pharmacol.* **2012**, *85*, 1027-1032.
- (518) Soderling, S. H.; Bayuga, S. J.; Beavo, J. A. Identification and characterization of a novel family of cyclic nucleotide phosphodiesterases. *J. Biol. Chem.* **1998**, *273*, 15553-15558.
- (519) Hu, H. Y.; Horton, J. K.; Gryk, M. R.; Prasad, R.; Naron, J. M.; Sun, D. A.; Hecht, S. M.; Wilson, S. H.; Mullen, G. P. Identification of small molecule synthetic inhibitors of DNA polymerase β by NMR chemical shift mapping. *J. Biol. Chem.* **2004**, *279*, 39736-39744.
- (520) Funke, M.; Thimm, D.; Schiedel, A. C.; Müller, C. E. 8-Benzamidochromen-4-one-2-carboxylic acids: potent and selective agonists for the orphan G protein-coupled receptor GPR35. *J. Med. Chem.* **2013**, *56*, 5182-5197.
- (521) Park, E. J.; Na, D. H.; Shin, Y. H.; Lee, K. C. Liquid chromatography-mass spectrometric method for the sensitive determination of niflumic acid in human plasma and its application to pharmacokinetic study of talniflumate tablet. *J. Chromatogr. B* **2008**, *876*, 159-162.
- (522) Zimmermann, H. Extracellular metabolism of ATP and other nucleotides. *Naunyn. Schmiedebergs Arch. Pharmacol.* **2000**, *362*, 299-309.
- (523) Burdette, D. L.; Monroe, K. M.; Sotelo-Troha, K.; Iwig, J. S.; Eckert, B.; Hyodo, M.; Hayakawa, Y.; Vance, R. E. STING is a direct innate immune sensor of cyclic di-GMP. *Nature* **2011**, *478*, 515-518.
- (524) Hennen, S.; Wang, H.; Peters, L.; Merten, N.; Simon, K.; Spinrath, A.; Blattermann, S.; Akkari, R.; Schrage, R.; Schroder, R.; Schulz, D.; Vermeiren, C.; Zimmermann, K.; Kehraus, S.; Drewke, C.; Pfeifer, A.; König, G. M.; Mohr, K.; Gillard, M.; Müller, C. E.; Lu, Q. R.; Gomeza, J.; Kostenis, E. Decoding Signaling and Function of the Orphan G Protein-Coupled Receptor GPR17 with a Small-Molecule Agonist. *Sci. Signal.* **2013**, *6*, ra93.

- (525) Rempel, V.; Volz, N.; Hinz, S.; Karcz, T.; Meliciani, I.; Nieger, M.; Wenzel, W.; Bräse, S.; Müller, C. E. 7-Alkyl-3-benzylcoumarins: a versatile scaffold for the development of potent and selective cannabinoid receptor agonists and antagonists. *J. Med. Chem.* **2012**, *55*, 7967-7977.
- (526) Seifert, R.; Schneider, E. H.; Dove, S.; Brunskole, I.; Neumann, D.; Strasser, A.; Buschauer, A. Paradoxical stimulatory effects of the "standard" histamine H4-receptor antagonist JNJ7777120: the H4 receptor joins the club of 7 transmembrane domain receptors exhibiting functional selectivity. *Mol. Pharmacol.* **2011**, *79*, 631-638.
- (527) Gessi, S.; Varani, K.; Merighi, S.; Cattabriga, E.; Pancaldi, C.; Szabadkai, Y.; Rizzuto, R.; Klotz, K. N.; Leung, E.; Mac Lennan, S.; Baraldi, P. G.; Borea, P. A. Expression, pharmacological profile, and functional coupling of A_{2B} receptors in a recombinant system and in peripheral blood cells using a novel selective antagonist radioligand, [³H]MRE 2029-F20. *Mol. Pharmacol.* **2005**, *67*, 2137-2147.
- (528) Singh, S.; Zhang, M.; Bertheleme, N.; Kara, E.; Strange, P. G.; Byrne, B. Radioligand binding analysis as a tool for quality control of GPCR production for structural characterization: adenosine A_{2a}R as a template for study. *Curr. Protoc. Protein Sci.* **2012**, *Chapter 29*, Unit 29 23.
- (529) Wu, H.; Wacker, D.; Mileni, M.; Katritch, V.; Han, G. W.; Vardy, E.; Liu, W.; Thompson, A. A.; Huang, X. P.; Carroll, F. I.; Mascarella, S. W.; Westkaemper, R. B.; Mosier, P. D.; Roth, B. L.; Cherezov, V.; Stevens, R. C. Structure of the human κ-opioid receptor in complex with JD1c. *Nature* **2012**, *485*, 327-332.
- (530) Haga, K.; Kruse, A. C.; Asada, H.; Yurugi-Kobayashi, T.; Shiroishi, M.; Zhang, C.; Weis, W. I.; Okada, T.; Kobilka, B. K.; Haga, T.; Kobayashi, T. Structure of the human M₂ muscarinic acetylcholine receptor bound to an antagonist. *Nature* **2012**, *482*, 547-551.
- (531) Goodman, R. R.; Cooper, M. J.; Gavish, M.; Snyder, S. H. Guanine nucleotide and cation regulation of the binding of [³H]cyclohexyladenosine and [³H]diethylphenylxanthine to adenosine A₁ receptors in brain membranes. *Mol. Pharmacol.* **1982**, *21*, 329-335.
- (532) Mong, S.; Wu, H. L.; Hogaboom, G. K.; Clark, M. A.; Crooke, S. T. Characterization of the leukotriene D₄ receptor in guinea-pig lung. *Eur. J. Pharmacol.* **1984**, *102*, 1-11.
- (533) Schloos, J.; Wellstein, A.; Palm, D. Agonist binding at alpha₂-adrenoceptors of human platelets using ³H-UK-14,304: regulation by Gpp(NH)p and cations. *Naunyn. Schmiedebergs Arch. Pharmacol.* **1987**, *336*, 48-59.
- (534) Slipetz, D. M.; O'Neill, G. P.; Favreau, L.; Dufresne, C.; Gallant, M.; Gareau, Y.; Guay, D.; Labelle, M.; Metters, K. M. Activation of the human peripheral cannabinoid receptor results in inhibition of adenylyl cyclase. *Mol. Pharmacol.* **1995**, *48*, 352-361.
- (535) 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.
- (536) Chin, C. N.; Lucas-Lenard, J.; Abadji, V.; Kendall, D. A. Ligand binding and modulation of cyclic AMP levels depend on the chemical nature of residue 192 of the human cannabinoid receptor 1. *J. Neurochem.* **1998**, *70*, 366-373.
- (537) Igel, P.; Geyer, R.; Strasser, A.; Dove, S.; Seifert, R.; Buschauer, A. Synthesis and structure-activity relationships of cyanoguanidine-type and structurally related histamine H4 receptor agonists. *J. Med. Chem.* **2009**, *52*, 6297-6313.
- (538) Tunaru, S.; Kero, J.; Schaub, A.; Wufka, C.; Blaukat, A.; Pfeffer, K.; Offermanns, S. PUMA-G and HM74 are receptors for nicotinic acid and mediate its anti-lipolytic effect. *Nat. Med.* **2003**, *9*, 352-355.
- (539) Fang, Y.; Li, G.; Ferrie, A. M. Non-invasive optical biosensor for assaying endogenous G protein-coupled receptors in adherent cells. *J. Pharmacol. Toxicol. Methods* **2007**, *55*, 314-322.
- (540) Holdsworth, G.; Slocombe, P.; Hutchinson, G.; Milligan, G. Analysis of endogenous S1P and LPA receptor expression in CHO-K1 cells. *Gene* **2005**, *350*, 59-63.
- (541) Iredale, P. A.; Hill, S. J. Increases in intracellular calcium via activation of an endogenous P2-purinoceptor in cultured CHO-K1 cells. *Br. J. Pharmacol.* **1993**, *110*, 1305-1310.
- (542) Hoffman, B. B.; Lefkowitz, R. J. Radioligand binding studies of adrenergic receptors: new insights into molecular and physiological regulation. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* **1980**, *20*, 581-608.

- (543) Arrang, J. M.; Roy, J.; Morgat, J. L.; Schunack, W.; Schwartz, J. C. Histamine H₃ receptor binding sites in rat brain membranes: modulations by guanine nucleotides and divalent cations. *Eur. J. Pharmacol.* **1990**, *188*, 219-227.
- (544) Tsai, B. S.; Lefkowitz, R. J. Agonist-specific effects of monovalent and divalent cations on adenylate cyclase-coupled α adrenergic receptors in rabbit platelets. *Mol. Pharmacol.* **1978**, *14*, 540-548.
- (545) Bertarelli, D. C.; Diekmann, M.; Hayallah, A. M.; Rusing, D.; Iqbal, J.; Preiss, B.; Verspohl, E. J.; Müller, C. E. Characterization of human and rodent native and recombinant adenosine A_{2B} receptors by radioligand binding studies. *Purinergic Signal.* **2006**, *2*, 559-571.
- (546) Drabczynska, A.; Yuzlenko, O.; Köse, M.; Paskaleva, M.; Schiedel, A. C.; Karolak-Wojciechowska, J.; Handzlik, J.; Karcz, T.; Kuder, K.; Müller, C. E.; Kiec-Kononowicz, K. Synthesis and biological activity of tricyclic cycloalkylimidazo-, pyrimido- and diazepinopurinediones. *Eur. J. Med. Chem.* **2011**, *46*, 3590-3607.
- (547) Liu, W.; Chun, E.; Thompson, A. A.; Chubukov, P.; Xu, F.; Katritch, V.; Han, G. W.; Roth, C. B.; Heitman, L. H.; AP, I. J.; Cherezov, V.; Stevens, R. C. Structural basis for allosteric regulation of GPCRs by sodium ions. *Science* **2012**, *337*, 232-236.
- (548) Puttfarcken, P.; Werling, L. L.; Brown, S. R.; Cote, T. E.; Cox, B. M. Sodium regulation of agonist binding at opioid receptors. I. Effects of sodium replacement on binding at μ - and δ -type receptors in 7315c and NG108-15 cells and cell membranes. *Mol. Pharmacol.* **1986**, *30*, 81-89.
- (549) Charlton, S. J. Agonist efficacy and receptor desensitization: from partial truths to a fuller picture. *Br. J. Pharmacol.* **2009**, *158*, 165-168.
- (550) Davenport, A. P.; Alexander, S. P.; Sharman, J. L.; Pawson, A. J.; Benson, H. E.; Monaghan, A. E.; Liew, W. C.; Mpamhanga, C. P.; Bonner, T. I.; Neubig, R. R.; Pin, J. P.; Spedding, M.; Harmar, A. J. International Union of Basic and Clinical Pharmacology. LXXXVIII. G protein-coupled receptor list: recommendations for new pairings with cognate ligands. *Pharmacol. Rev.* **2013**, *65*, 967-986.
- (551) Milligan, G. Orthologue selectivity and ligand bias: translating the pharmacology of GPR35. *Trends Pharmacol. Sci.* **2011**, *32*, 317-325.
- (552) Turski, M. P.; Turska, M.; Paluszkiwicz, P.; Parada-Turska, J.; Oxenkrug, G. F. Kynurenic Acid in the Digestive System-New Facts, New Challenges. *Int. J. Tryptophan Res.* **2013**, *6*, 47-55.
- (553) Leroy, C.; Landais, E.; Briault, S.; David, A.; Tassy, O.; Gruchy, N.; Delobel, B.; Gregoire, M. J.; Leheup, B.; Taine, L.; Lacombe, D.; Delrue, M. A.; Toutain, A.; Paubel, A.; Mugneret, F.; Thauvin-Robinet, C.; Arpin, S.; Le Caignec, C.; Jonveaux, P.; Beri, M.; Leporrier, N.; Motte, J.; Fiquet, C.; Brichet, O.; Mozelle-Nivoix, M.; Sabouraud, P.; Golovkine, N.; Bednarek, N.; Gaillard, D.; Doco-Fenzy, M. The 2q37-deletion syndrome: an update of the clinical spectrum including overweight, brachydactyly and behavioural features in 14 new patients. *Eur. J. Hum. Genet.* **2013**, *21*, 602-612.
- (554) Lemonnier, E.; Ben-Ari, Y. The diuretic bumetanide decreases autistic behaviour in five infants treated during 3 months with no side effects. *Acta Paediatr.* **2010**, *99*, 1885-1888.
- (555) Lemonnier, E.; Degrez, C.; Phelep, M.; Tyzio, R.; Josse, F.; Grandgeorge, M.; Hadjikhani, N.; Ben-Ari, Y. A randomised controlled trial of bumetanide in the treatment of autism in children. *Transl. Psychiatry* **2012**, *2*, e202.
- (556) Somasekharan, S.; Tanis, J.; Forbush, B. Loop diuretic and ion-binding residues revealed by scanning mutagenesis of transmembrane helix 3 (TM3) of Na-K-Cl cotransporter (NKCC1). *J. Biol. Chem.* **2012**, *287*, 17308-17317.
- (557) Neubig, R. R. Mind your salts: when the inactive constituent isn't. *Mol. Pharmacol.* **2010**, *78*, 558-559.
- (558) Rempel, V.; Fuchs, A.; Hinz, S.; Karcz, T.; Lehr, M.; Koetter, U.; Müller, C. E. Magnolia extract, magnolol, and metabolites: activation of cannabinoid CB₂ receptors and blockade of the related GPR55. *ACS Med. Chem. Lett.* **2012**, *4*, 41-45.
- (559) Pertwee, R. G.; Howlett, A. C.; Abood, M. E.; Alexander, S. P.; Di Marzo, V.; Elphick, M. R.; Greasley, P. J.; Hansen, H. S.; Kunos, G.; Mackie, K.; Mechoulam, R.; Ross, R. A. International Union of Basic and Clinical Pharmacology. LXXIX. Cannabinoid receptors and their ligands: beyond CB₁ and CB₂. *Pharmacol. Rev.* **2010**, *62*, 588-631.

- (560) Sinning, C.; Watzler, B.; Coste, O.; Nusing, R. M.; Ott, I.; Ligresti, A.; Di Marzo, V.; Imming, P. New analgesics synthetically derived from the paracetamol metabolite N-(4-hydroxyphenyl)-(5Z,8Z,11Z,14Z)-icosatetra-5,8,11,14-enamide. *J. Med. Chem.* **2008**, *51*, 7800-7805.
- (561) Khanolkar, A. D.; Abadji, V.; Lin, S.; Hill, W. A.; Taha, G.; Abouzid, K.; Meng, Z.; Fan, P.; Makriyannis, A. Head group analogs of arachidonylethanolamide, the endogenous cannabinoid ligand. *J. Med. Chem.* **1996**, *39*, 4515-4519.
- (562) Beltramo, M.; Stella, N.; Calignano, A.; Lin, S. Y.; Makriyannis, A.; Piomelli, D. Functional role of high-affinity anandamide transport, as revealed by selective inhibition. *Science* **1997**, *277*, 1094-1097.
- (563) Alptekin, A.; Galadari, S.; Shuba, Y.; Petroianu, G.; Oz, M. The effects of anandamide transport inhibitor AM404 on voltage-dependent calcium channels. *Eur. J. Pharmacol.* **2010**, *634*, 10-15.
- (564) Zygmunt, P. M.; Chuang, H.; Movahed, P.; Julius, D.; Hogestatt, E. D. The anandamide transport inhibitor AM404 activates vanilloid receptors. *Eur. J. Pharmacol.* **2000**, *396*, 39-42.
- (565) Barriere, D. A.; Mallet, C.; Blomgren, A.; Simonsen, C.; Daulhac, L.; Libert, F.; Chapuy, E.; Etienne, M.; Hogestatt, E. D.; Zygmunt, P. M.; Eschaliere, A. Fatty acid amide hydrolase-dependent generation of antinociceptive drug metabolites acting on TRPV1 in the brain. *PLoS One* **2013**, *8*, e70690.
- (566) Müller, C. E.; Jacobson, K. A. Recent developments in adenosine receptor ligands and their potential as novel drugs. *Biochim. Biophys. Acta* **2011**, *1808*, 1290-1308.
- (567) MacKenzie, A. E.; Lappin, J. E.; Taylor, D. L.; Nicklin, S. A.; Milligan, G. GPR35 as a Novel Therapeutic Target. *Front. Endocrinol.* **2011**, *2*, 68.
- (568) Dereeper, A.; Guignon, V.; Blanc, G.; Audic, S.; Buffet, S.; Chevenet, F.; Dufayard, J. F.; Guindon, S.; Lefort, V.; Lescot, M.; Claverie, J. M.; Gascuel, O. Phylogeny.fr: robust phylogenetic analysis for the non-specialist. *Nucleic Acids Res.* **2008**, *36*, W465-469.
- (569) Müller, C. E.; Diekmann, M.; Thorand, M.; Ozola, V. [³H]8-Ethyl-4-methyl-2-phenyl-(8R)-4,5,7,8-tetrahydro-1H-imidazo[2,1-*i*]-purin-5-one ([³H]PSB-11), a novel high-affinity antagonist radioligand for human A₃ adenosine receptors. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2002**, *12*, 501-503.
- (570) Müller, C. E.; Maurinsh, J.; Sauer, R. Binding of [³H]MSX-2 (3-(3-hydroxypropyl)-7-methyl-8-(*m*-methoxystyryl)-1-propargylxanthine) to rat striatal membranes - a new, selective antagonist radioligand for A_{2A} adenosine receptors. *Eur. J. Pharm. Sci.* **2000**, *10*, 259-265.
- (571) 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.
- (572) 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.

Danksagung

Mein besonderer Dank gilt Frau Prof. Dr. Christa E. Müller unter deren Betreuung diese Arbeit angefertigt wurde. Liebe Christa, vielen Dank für Deine Unterstützung, für die Gewährung vieler Freiräume, aber auch dafür, dass Du immer Zeit für mich gefunden hast und mir mit Ratschlägen und Anregungen zur Seite standest.

Außerdem bin ich besonders Frau PD Dr. Anke C. Schiedel dankbar. Liebe Anke, herzlichen Dank für Deine Betreuung und stete Hilfsbereitschaft, für viele Diskussionen und Gespräche und auch (je nachdem wie die Experimente verlaufen sind) für Aufmunterung und für geteilte Freude.

Weiterhin möchte ich Herrn Prof. Dr. Ulrich Jaehde und Herrn Prof. Dr. Ivar von Kügelgen herzlich für ihr Mitwirken bei der Promotionskommission danken.

Außerdem bin ich für die finanzielle Unterstützung durch die NRW-Forschungsschule Biotech-Pharma dankbar.

Darüber hinaus möchte ich meinen Kollegen Mario Funke und Anne Meyer für die gute Zusammenarbeit im GPR35-Projekt danken. Lieber Mario und liebe Anne, danke für die Synthese der potenten Verbindungen und für viele angeregte Diskussionen.

I would like to thank Miguel Moutinho for his support in the cAdeR project. Thank you Miguel for a great time in the lab, for your ongoing interest in and ideas for the project and especially for your friendship and great vacations in Lisbon.

Für die sehr angenehme Arbeitsatmosphäre bin ich allen Kollegen des Pharmazeutischen Instituts, insbesondere den Mitarbeitern unseres Arbeitskreises sehr dankbar.

Besonders möchte ich Dr. Andreas Spinrath danken. Lieber Andi, danke für Deine Einarbeitung, angeregte Unterhaltungen und danke, dass Marieke und Du mich zum Trauzeugen und Patenonkel gemacht habt.

Außerdem danke ich Bernt Alsdorf und Dr. Viktor Rempel. Lieber Bernt und lieber Viktor, danke für eine schöne Zeit innerhalb und außerhalb des Labors, für die gegenseitige Unterstützung und für viele - manchmal auch wissenschaftliche - Gespräche.

Weiterhin danke ich Amelie Zech. Liebe Amelie, danke für das Korrekturlesen der Arbeit, für die gute Zusammenarbeit und für die vielen Einladungen auf Deinen Balkon oder in Deine Wohnung zum Futtern diverser Köstlichkeiten.

Neben meinen Kollegen und Freunden Amelie Zech, Viktor Rempel, Bernt Alsdorf, Andreas Spinrath und Mario Funke, bin ich auch Simone Hildenbrand und Sabrina Gollos für die schöne Zeit dankbar, die wir auf einigen „Klassenfahrten“ u. a. auf Kraken oder Brockencoastern verbracht haben.

Außerdem danke ich meinen Kollegen Dr. Sonja Hinz für wissenschaftliche Diskussionen, Nicole Florin für die perfekte Labororganisation und Dr. Jörg Hockemeyer für die geduldige Beantwortung diverser Fragen zur Chemie.

Meinen Praktikantinnen Katharina Riesner und Franziska Bauer danke ich für ihre Unterstützung im Labor.

Den Mit-Assistenten und besonders dem Leiter des Siebtsemester-Praktikums für Pharmazie-Studenten, Dr. Ralf Mayer, möchte ich für die stets angenehme Arbeitsatmosphäre danken.

Sehr dankbar bin ich meinen Freunden, besonders Johanna. Liebe Johanna, danke, dass Du Dir geduldig diverse molekularbiologische und pharmakologische Überlegungen angehört hast, obwohl Du in Deiner agrarwissenschaftlichen Doktorarbeit selbst eher weniger damit konfrontiert warst. Vielen Dank fürs Mitfiebern.

Außerdem möchte ich auch meiner Familie sehr danken: Ich danke meiner Tante Christa für liebe Worte und gute Wünsche und meiner Schwester Verena. Liebe Rena, danke dass Du immer genau die richtigen Worte findest, um mich aufzumuntern und dass Du immer für mich da bist. Ganz besonders möchte ich meinem Vater danken, der mir immer alles ermöglicht und vieles erleichtert hat. Lieber Papa, für Deine Unterstützung und Deine vielen Ratschläge bis hin zu kleinen Gesten bin ich unendlich dankbar!

Publikationsverzeichnis

Publikationen

Klotz, L.; Hucke, S.; Thimm, D.; Classen, S.; Gaarz, A.; Schultze, J.; Edenhofer, F.; Kurts, C.; Klockgether, T.; Limmer, A.; Knolle, P.; Burgdorf, S. Increased antigen cross-presentation but impaired cross-priming after activation of peroxisome proliferator-activated receptor gamma is mediated by up-regulation of B7H1. *J. Immunol.* **2009**, *183*, 129-136.

Schiedel, A. C.; Hinz, S.; Thimm, D.; Sherbiny, F.; Borrmann, T.; Maaß, A.; Müller, C. E. The four cysteine residues in the second extracellular loop of the human adenosine A_{2B} receptor: role in ligand binding and receptor function. *Biochem. Pharmacol.* **2011**, *82*, 389-399.

Thimm, D.; Schiedel, A. C.; Sherbiny, F. F.; Hinz, S.; Hochheiser, K.; Bertarelli, D. C.; Maaß, A.; Müller, C. E. Ligand-specific binding and activation of the human adenosine A_{2B} receptor. *Biochemistry* **2013**, *52*, 726-740.

Knospe, M.; Müller, C. E.; Rosa, P.; Abdelrahman, A.; von Kügelgen, I.; Thimm, D.; Schiedel, A. C. The rat adenine receptor: pharmacological characterization and mutagenesis studies to investigate its putative ligand binding site. *Purinergic Signal.* **2013**, *9*, 367-381.

Seibt, B. F.; Schiedel, A. C.; Thimm, D.; Hinz, S.; Sherbiny, F. F.; Müller, C. E. The second extracellular loop of GPCRs determines subtype-selectivity and controls efficacy as evidenced by loop exchange study at A₂ adenosine receptors. *Biochem. Pharmacol.* **2013**, *85*, 1317-1329.

Thimm, D.; Knospe, M.; Abdelrahman, A.; Moutinho, M.; Alsdorf, B. B. A.; von Kügelgen, I.; Schiedel, A. C.; Müller, C. E. Characterization of new G protein-coupled adenine receptors in mouse and hamster. *Purinergic Signal.* **2013**, *9*, 415-426.

Funke, M.* Thimm, D.* Schiedel, A. C.; Müller, C. E. 8-Benzamidochromen-4-one-2-carboxylic acids: potent and selective agonists for the orphan G protein-coupled receptor GPR35. *J. Med. Chem.* **2013**, *56*, 5182-5197.

Thimm, D.; Funke, M.; Meyer, A.; Müller, C. E. 6-Bromo-8-(4-[³H]methoxy-benzamido)-4-oxo-4H-chromene-2-carboxylic acid ([³H]PSB-13253): a powerful tool for studying orphan G protein-coupled receptor GPR35. *J. Med. Chem.* **2013**, *56*, 7084-7099.

*geteilte Erstautorenschaft

Kongressbeiträge

Thimm, D. T.; Schiedel, A. C.; Hochheiser, K.; Hinz, S.; Sherbiny, F. F.; Maaß, A.; Müller, C. E. Role of selected amino acid residues in ligand binding and activation of the human adenosine A_{2B} receptor. *DPhG Jahrestagung, Bonn*, Oktober **2008** (Poster).

Thimm, D. T.; Schiedel, A. C.; Hochheiser, K.; Hinz, S.; Sherbiny, F. F.; Maaß, A.; Müller, C. E. From models to mutants to drugs – new insights in ligand binding and activation of the human adenosine A_{2B} receptor. *Small Purine Meeting, Stockholm*, September **2009** (Poster).

Schiedel, A. C.; Thimm, D.; Hinz, S.; Sherbiny, F.; Maaß, A.; Müller, C. E. Drug-receptor interaction and activation of the human adenosine A_{2B} receptor and selected mutants. *EMBO-Meeting, Amsterdam*, August **2009** (Poster).

Schiedel, A. C.; Thimm, D.; Hinz, S.; Sherbiny, F.; Borrmann, T.; Maaß, A.; Müller, C. E. Importance of selected amino acid residues of the human adenosine A_{2B} receptor for ligand binding and receptor activation. *Purines 2010, Tarragona/Barcelona*, Mai **2010** (Poster).

Thimm, D. T.; Schiedel, A. C.; Hochheiser, K.; Hinz, S.; Sherbiny, F. F.; Maaß, A.; Müller, C. E. How 2B bound – New insights into ligand recognition by the human adenosine A_{2B} receptor. *DPhG Jahrestagung, Braunschweig*, Oktober **2010** (Poster).

Thimm, D. T.; Schiedel, A. C.; Hochheiser, K.; Hinz, S.; Sherbiny, F. F.; Maaß, A.; Müller, C. E. Born 2B wildtyp – importance of selected amino acids responsible for ligand recognition by the human adenosine A_{2B} receptor. *Annual Signal Transduction Society Meeting, Weimar*, Oktober **2010** (Poster).

Thimm, D.; Moutinho, M.; Schiedel, A. C.; Müller, C. E. First Ade for Chinese hamsters – exploring a new purinergic receptor. *German-Italian Purine Club Meeting, Bonn*, Oktober **2011** (Poster).

Hinz, S.; Schiedel, A. C.; Thimm, D. T.; Sherbiny, F.; Borrmann, T.; Maaß, A.; Müller, C. E. One is all it takes: disulfide bonds and cysteine residues in extracellular loop 2 of the adenosine A_{2B} receptor. *German-Italian Purine Club Meeting, Bonn*, Oktober **2011** (Poster).

Thimm, D.; Funke, M.; Meyer, A.; Schiedel, A. C.; Müller, C. E. Tracing an orphan – development of [³H]PSB-13253 as the first radioligand for the human orphan G protein-coupled receptor GPR35. *DPhG Jahrestagung, Freiburg*, Oktober **2013** (Poster & Kurzvortrag).