

# **Molekularpharmakologische Charakterisierung des G-Protein-gekoppelten Rezeptors 84**

Inaugural-Dissertation  
zur Erlangung des Doktorgrades  
der Hohen Medizinischen Fakultät  
der Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität  
Bonn

**Alina Malov**  
aus Chisinau/ Moldawien  
2021

Angefertigt mit der Genehmigung  
der Medizinischen Fakultät der Universität Bonn

1. Gutachter: Prof. Dr. med. Ivar von Kügelgen
2. Gutachter: PD Dr. rer. nat. Andras Bilkei-Gorzo

Tag der Mündlichen Prüfung: 11.10.2021

Aus dem Institut für Pharmakologie und Toxikologie  
Direktor: Prof. Dr. med. Alexander Pfeifer

Meiner Familie Aurelia, Alla und Eugen.



## Inhaltsverzeichnis

<b>Abkürzungsverzeichnis</b>	9
<b>1. Einleitung</b>	16
1.1 GPR84 und Waisen-Rezeptoren	16
1.2 Biochemische Eigenschaften des GPR84 Rezeptorproteins	16
1.3 Expression des GPR84 Rezeptors	19
1.4 Pharmakologische Eigenschaften des GPR84 Rezeptors	21
1.4.1 Hinweise auf prinzipielle Signaltransduktionsmechanismen	21
1.4.2 Potenzielle physiologische Agonisten	21
1.4.3 Synthetische Agonisten	23
1.4.4 Positiv allosterische Modulatoren	28
1.4.5 Antagonisten	29
1.5 Physiologische Funktion des GPR84 Rezeptors	31
1.5.1 Makrophagen	31
1.5.2 Mikroglia	33
1.5.3 Monozyten	34
1.5.4 T- und B-Zellen	34
1.5.5 Neutrophilen	34
1.5.6 Adipozyten	35
1.5.7 Nozizeptive Signaltransduktion	36
1.5.8 Organentwicklung	37
1.6 Rolle von GPR84 in Krankheitsmodellen	37
1.6.1 Hämatookologie	37

1.6.2	Entzündungsgeschehen im ZNS	38
1.6.3	Gastrointestinale Krankheiten	39
1.6.4	Störung im Fettmetabolismus	40
1.6.5	Fibrose-induzierte autoimmune Erkrankungen	40
1.6.6	Andere autoimmune Krankheitsbilder	41
1.6.7	Anti-arteriosklerotische Eigenschaften	41
1.7	Struktur von Rezeptorproteinen	41
1.7.1	GPCR	41
1.7.2	Konformations-Schalter	42
1.7.3	Bindungsstellen der Liganden	43
1.8	Zielsetzung	46
<b>2.</b>	<b>Material und Methoden</b>	<b>48</b>
2.1	Molekularbiologie	48
2.2	Agarosegel-Elektrophorese	48
2.3	Transfektion von E. coli	48
2.4	DNA-Präparation	48
2.5	Zellkultur und Transfektion von CHO-Zellen	49
2.6	Immunfluoreszenz-Untersuchungen	49
2.7	Versuche mit Tritium markiertem cAMP	50
2.8	pNFAT-Luciferase Versuche	50
2.9	Pharmaka und Lösungsmittel	52
2.10	Statistik	53
<b>3.</b>	<b>Ergebnisse</b>	<b>54</b>

3.1	Molekularbiologie	54
3.2	Expressionsanalyse	54
3.3	[ <sup>3</sup> H]-cAMP-Versuche	62
3.4	NFAT-Reporter-gen-Versuche	68
<b>4.</b>	<b>Diskussion</b>	<b>74</b>
4.1	Methodenkritik	74
4.1.1	Allgemeine Methodenkritik	74
4.1.2	Potenzielle Fehlerquellen der Studie	75
4.2	Die Rezeptorfunktion	75
4.2.1	Calcium-Anstieg über G <sub>i</sub>	75
4.3	G <sub>i/o</sub> -G <sub>q</sub> -Ko-Aktivierung	76
4.4	Ergebnisse der Mutagenese-Studie und Vergleich zur Literatur	78
4.5	Vergleich von GPR84 mit drei GPCRs der δ-Subgruppe	80
4.5.1	Vergleich mit P2Y <sub>12</sub> -Rezeptoren	80
4.5.2	Vergleich mit P2Y <sub>1</sub> -Rezeptoren	83
4.5.3	Vergleich mit Protease-aktivierte Rezeptor 1	84
4.6	Ausblick	84
<b>5.</b>	<b>Zusammenfassung</b>	<b>87</b>
<b>6.</b>	<b>Anhang</b>	<b>89</b>
6.1	Material	89
6.2	Chemische Strukturen und Formeln	97
<b>7.</b>	<b>Literaturverzeichnis</b>	<b>103</b>

**8. Danksagung**

120



## Abkürzungsverzeichnis

2MeSADP	2-Methylthio-Adenosin-5'-Diphosphat
A	Alanin
ABCA1	ATP-bindender Kassettentransporter 1
ABCG1	ATP- bindender Kassettentransporter Subtyp G 1
AC	Adenylylcyclase
Act-Met	aktiver Metabolit vom Clopidogrel
ADSC	von Fettgewebe abgeleitete adulte Stammzellen
Akt	Proteinkinase B
AML	akute myeloische Leukämie
AMPK	5'-AMP-aktivierte Proteinkinase
ANOVA	Varianzanalyse (ANalysis Of VAriance)
APP/PS1	Amyloid-Vorläuferprotein/ Presenilin 1
AZD1283	Ethyl 6- (4- ((Benzylsulphonyl) Carbamyl) Piperidin- 1yl)-5 - Cyano- 2 Methylnicotinat
Bp	Basenpaare
BRET	Biolumineszenzresonanzenergietransfer
C	Cystein
C5A	Ergänzungskomponente 5a
C9	Nonansäure
C10	Caprinsäure
C11	Undecansäure

C12	Laurinsäure
Ca <sup>2+</sup>	Calcium
cAMP	zyklisches Adenosinmonophosphat
CB1	Cannabiod-Rezeptor 1
CCL2	C-C-Motiv-Chemokinvorläufer
CD	Gruppen mit immunphänotypischen Oberflächenmerkmalen von Zellen (Cluster of differentiation)
cDNA	komplementäre Desoxyribonukleinsäure
CHO	chinesische Hamster Ovarialzellen
CRE	cAMP response element
CSF3	Koloniestimulierender Faktor 3
CXCL	Chemokin (C-X-C-Motiv) Ligand
CXCR2	C-X-C-Motiv-Chemokinrezeptor 2
D	Asparaginsäure
DAG	Diacylglycerol
DIM	3,3'-Diindolylmethan
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxyribonukleotidtriphosphat
DPN I	Restriktionsenzym, das methylierte DNA abbaut
DSM 498	Escherichia coli Stamm
EC	extrazelluläre Schleife

EC <sub>50</sub>	effektive Konzentration mit 50% Maximalwirkung
EC <sub>80</sub>	effektive Konzentration mit 80% Maximalwirkung
E. coli	Escherischia Coli
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EGFP	verstärktes grün fluoreszierendes Protein
EPR	Elektronenspinresonanz
Erk 1/ 2	Extrazelluläre signalregulierte Kinase 1/ 2
EST	Expressed Sequence Tag
eYFP	verstärkt gelb fluoreszierendes Protein
F	Phenylalanin
FITC	Fluorescein-5-isothiocyanat
FLAG	Peptidsequenz vom N-Terminus zum C-Terminus: DYKDDDDK
FMLP	N-Formylmethionylleucylphenylalanin
fQRC	schnelle quantitative Cysteinreaktivität
GDP	Guaninnukleotid-Diphosphat
GERD	gastroösophageale Refluxkrankheit
GnRH	Gonadoliberin
GPCR	G-Protein gekoppelter Rezeptor
GPR84	G-Protein gekoppelter Rezeptor 84
H	Histidin
HBSS	Hank's Balanced Salt Solution
HEK293-Zellen	humane embryonale Nierenzellen 293

HET-1A-Zellen	humane Ösophagus-Autopsiegewebe-Zelllinie 1A
hGPR84	humaner G-Protein gekoppelter Rezeptor 84
HTRF	homogeneous time resolved fluorescence
I	Isoleucin
Iba1	ionisiertes Calciumbindungsadaptermolekül 1
IC	intrazelluläre Schleife
IC <sub>50</sub>	inhibitorische Konzentration mit 50% der Maximalwirkung
IL	Interleukin
IP3	Inositoltriphosphat
JNK	c-Jun N-terminale Kinase
K <sub>d</sub>	Dissoziationskonstante
KO	Knock-Out
L	Leucin
LT-1334	MRSA-Stamm 1334
LT-1338	MRSA-Stamm 1338
LDL	Lipoprotein niedriger Dichte
LSCs	Leukämische Stammzellen
LSM	Laser-Scanning-Mikroskopie
MAPK	mitogen-aktivierte Proteinkinase
MCFA	mittelkettige Fettsäure
MLL	mixed-lineage leukemia
mRNA	messenger RNA

mTOR	mammalian target of rapamycin, Säugetierziel von Rapamycin
MIP-2	Entzündliches Makrophagenprotein 2
MRS2365	(N)-Methanocarba-2-Methylthio-ADP
MRSA	Methicillin resistenter Staphylococcus aureus
N	Asparagin
NADPH	Nicotinsäureamid-Adenin-Dinukleotid-Phosphat
n.b.	nicht bestimmbar
NFAT	Nuklearfaktor der aktivierten T-Zellen
NFAT-RE	Nuklearfaktor der aktivierten T-Zellen -Antwortelement
NGAL	Neutrophilen-Gelatinase-assoziiertes Lipocalin
Nhe I	Restriktionsenzym, erkennt GCTAGC-Sequenz
RNA	Ribonukleinsäure
6-OAU	6-n-Octylaminouracil
ORF	offener Leserahmen
P	Prolin
p38	mitogen aktivierte Proteinkinase 38
P2Y <sub>1</sub> R	P2Y <sub>1</sub> -Rezeptor
P2Y <sub>12</sub> R	P2Y <sub>12</sub> -Rezeptor
PAF	plättchenaktivierender Faktor
PAR1	Protease-aktivierter Rezeptor 1
PBS	phosphat gepufferte Salzlösung
PBI-4050	(3-Pentylphenyl) Essigsäure

PCR	Polymerasen-Kettenreaktion
PI-3	Phosphoinositid-3
PKA	cAMP-abhängige Proteinkinase
PKC	Proteinkinase C
PLC	Phospholipase C
PMN	polymorphonukleare Leukozyten
PPADS	Pyridoxal-50-Phosphat-6-Azophenyl-20, 40-Disulfonat
PSB-1584	6-Hexylamino-2,4(1H,3H)-Pyrimidinedion
PSB-15160	Di (5-fluor-1H-indol-3-yl)-Methan
PSB-16434	6-((p-Chloro-Phenylethyl)Amino)-2,4(1H,3H)-Pyrimidinedion
PSB-16671	Di (5,7-difluor-1H-indol-3-yl)-Methan
PSB-17365	6-((p-Bromo-Phenylethyl)Amino)-2,4(1H,3H)-Pyrimidinedion
PTX	Pertussis Toxin
Q	Glutamin
qRT-PCR	Quantitative Reversetranscriptase-Polymerasekettenreaktion
R	Arginin
R-138727	((2- [1- [2-Cyclopropyl-1- (2- fluorphenyl) -2oxoethyl] -4-mercapto-3-piperidinylden]-Essigsäure)
ROS	reaktives Sauerstoffspezies
RLU	Relative Lichteinheiten
S	Serin
SEM	Standardfehler des Mittelwerts

Sf9-Zellen	klonales Isolat der Spodoptera frugiperda Sf21-Zellen
SRE	Serum-Antwort-Element
SRF	Serum-Antwort-Faktor
T	Threonin
TAE-Puffer	TRIS (Tris-hydroxymethyl-aminomethan)- Acetat- EDTA (Ethylendiamintetraessigsäure)- Puffer
TBLASTIN	Suchprogramm der Nukleotiddatenbanken mithilfe einer Proteinabfrage
TNF $\alpha$	Tumor-Nektose-Faktor $\alpha$
TM	Transmembranregion
VEGF	vaskulärer endothelialer Wachstumsfaktor
Verbindung 1	$C_{10}H_{16}O_2N_2S$
Verbindung 104	9- (5-Cyclopropyl- [1,2,4] oxadiazol-3-ylmethoxy) -2 - ((R) -1- [1,4] dioxan-2-ylmethoxy)-6,7-Dihydropyrimido [6,1-a] isochinolin-4-on
Verbindung 107	2 - ([1,4] Dioxan-2-ylmethoxy) -9- (3-phenylamino-prop-1-ynyl) -6, 7- Dihydropyrimido [6,1-a] isochinolin-4-on
Verbindung 161	2 - ((S) -1- [1,4] Dioxan-2-ylmethoxy) -9-(tetrahydropyran-4-yl) Methoxymethyl)-6,7-dihydropyrimido [6,1-a] isochinolin-4-on
Y	Tyrosin
W	Tryptophan
WT	Wildtyp
ZQ-16	2-(Hexylthio)Pyrimidin-4,6-diol

## 1. Einleitung

### 1.1 GPR84 und Waisen-Rezeptoren

Der G-Protein-gekoppelte Rezeptor 84 (GPR84) ist ein Waisen-Rezeptor. Waisen-Rezeptoren sind G-Protein-gekoppelte Rezeptoren, für die endogene Liganden nicht bekannt sind oder nicht eindeutig identifiziert wurden (Martin et al., 2015, Wittenberger et al., 2001). Mit Hilfe der Untersuchung der konstitutiven Aktivität von G-Protein-gekoppelten Rezeptoren wurden die Rezeptoren in mehrere Gruppen eingeteilt. GPR84 gehört zur Gruppe-A-Rezeptoren, die eine konstitutive Inhibierung sowohl der Basisaktivität als auch der Forskolin-stimulierten ‚cAMP response element‘ (CRE)-vermittelten Genexpression vermitteln (Martin et al., 2015).

### 1.2 Biochemische Eigenschaften des GPR84 Rezeptorproteins

Eine Expressed Sequence Tag (EST) Data Mining-Strategie hat im Jahr 2001 erfolgreich Gene für potenziell neue G-Protein-gekoppelte Rezeptoren, inklusive GPR84, entdeckt. Des Weiteren ist die Genomstruktur und die chromosomale Lokalisierung der jeweiligen Gene in Anwendung von in silico Methoden untersucht worden (Wittenberger et al., 2001).

Der EST AI392922 (GenBank-Eintrag) von menschlichen B-Zellen (Tab. 1) wurde als Ausgangspunkt für die Identifizierung des humanen GPR84-Rezeptors verwendet. 1191 Basenpaare (bp) des offenen Leserahmens (ORF) wurden als seine Kodierungssequenz identifiziert, wobei sich ein Stopcodon 15 bp vor der Startsequenz-ATG innerhalb einer Kozak-Sequenz und das Poly (A)-Signal AATAAA 193 bp in Richtung 3'-Ende des Stopkodons befindet (Wittenberger et al., 2001). Das humane GPR84-Gen ist auf Chromosom 12q13.13 lokalisiert und seine Kodierungssequenz ist nicht durch Introns unterbrochen. Es gibt jedoch ein 533-bp-Intron 8 bp in Richtung des 5'-Ende von der Startsequenz-ATG (Abb. 1). Das humane und murine GPR84-ORF kodieren für Proteine mit einer Länge von 396 Aminosäuren, die zu 85% identisch sind. Sie gelten daher als Orthologe. Die langen dritten intrazellulären Schleifen von 118 Aminosäuren zeigen den größten Sequenzunterschied zwischen den Orthologen, während die N- und C-Termini ähnlich und relativ kurz sind. GPR84 weist vermutlich



eine Struktur mit sieben vorhergesagten Transmembranregionen (TM) und Eigenschaften (Abb. 1, Tab. 2 und 3) auf, die typisch für GPCR der GPCR-Familie-1 sind (Wittenberger et al., 2001).

**Tab. 1:** Chromosomale Lokalisierung des humanen GPR84-Gens und Gewebe- bzw. Zellexpression. Unter ‚Nr. Baits‘ versteht man, wie viele der 189 ‚Baits‘ GPCR Sequenzen bei einem bestimmten EST als homologe Sequenz in der TBLASTN-Suche identifiziert werden. In anderen Geweben wurde mRNA von GPR84 mit Hilfe von Northern Blot Analyse identifiziert. Modifiziert nach Wittenberger et al., 2001.

Expressed Sequence Tag (EST)				Entsprechendes Gen		
Accession Number	Spezies	Gewebe	Nr. Baits	Name des Gens	Spezies	Lokalisation
AI392922	Homo sapiens	B-Zellen, Gehirn, Herz, Knochenmark, Plazenta, Milz, Kolon, Thymus, Leber, Muskel, Niere, Lunge.	10	GPR84	Homo sapiens, Maus	12q13.13



**Abb. 1:** Genetische Struktur mit chromosomaler Lokalisation des hGPR84- Gens. Sequenzen, die sowohl in der cDNA als auch auf genomischen Templates von GPR84 gefunden werden, werden mit der angezeigten Position und Größe der Introns dargestellt. Kodierungssequenzen wurden eingerahmt. Nukleotide werden entsprechend ihrer Position in der cDNA im Verhältnis zur kodierenden Sequenz markiert (Wittenberger et al., 2001). Das Polyadenylierungssignal und die Poly (A)-Strecke der mRNA werden gezeigt. Modifiziert nach Wittenberger et al., 2001.

**Tab. 2:** Konservierte Aminosäurenmotive und ihre Position im humanen und murinen GPR84. Modifiziert nach Wittenberger et al., 2001.

<b>N in TM1</b>	<b>LXXXD in TM2</b>	<b>C in EC1+2</b>	<b>[DE]RXXX[IV]XXP in TM3/IC2</b>
Asn <sup>38</sup>	L <sup>64</sup> TLAD <sup>68</sup>	Cys <sup>93,166,168</sup>	G <sup>117</sup> RYLLIAHP <sup>125</sup> Ser <sup>133,280,290,295,310</sup>

Das konservierte Asparagin (N) im TM1 ist möglicherweise an einer interhelikalen Wasserstoffbrücke beteiligt, wodurch die TM-Helices 1, 2 und 7 verbunden werden. Ebenfalls ist die konservierte Asparaginsäure (D) im TM2 möglicherweise daran involviert (Oliveira et al., 1994, Palczewski et al., 2000). Konservierte Cysteine (C) bilden in GPR84-ähnlichen P2Y-Rezeptoren in der ersten und zweiten extrazellulären Schleife (EC1+2) Disulfidbrücken (Hoffmann et al., 1999, Moro et al., 1999). Eines der typischsten Merkmale von GPCRs der Rhodopsin-Familie-1 ist das [DE]RXXX[IV]XXP-Motiv an der Grenze zwischen TM3 und der zweiten intrazellulären Schleife, welches für die G-Protein-Kopplung wichtig ist (Oliveira et al., 1994, Oliveira et al., 1999, Palczewski et al., 2000). Es wurde angenommen, dass Arginin eine Salzbrücke mit einer sauren Aminosäure bildet, wie es in der Struktur von Rinder-Rhodopsin gezeigt wurde (Palczewski et al., 2000), die in aktivierter Form des GnRH-Rezeptors unterbrochen wurde (Ballesteros et al., 1998, Wittenberger et al., 2001).

**Tab. 3:** Konservierte Aminosäurenmotive und ihre Position im humanen und murinen GPR84. Modifiziert nach Wittenberger et al., 2001.

<b>W und P in TM4</b>	<b>FXXXWXP in TM6</b>	<b>N-verknüpfte Glykosylierung</b>	<b>Phosphorylierungsstellen</b>
Trp <sup>145</sup> ; Pro <sup>154</sup>	F <sup>328</sup> ALSYIP <sup>334</sup>	N <sup>366</sup> PVLY <sup>370</sup>	Asn <sup>3, 8</sup>

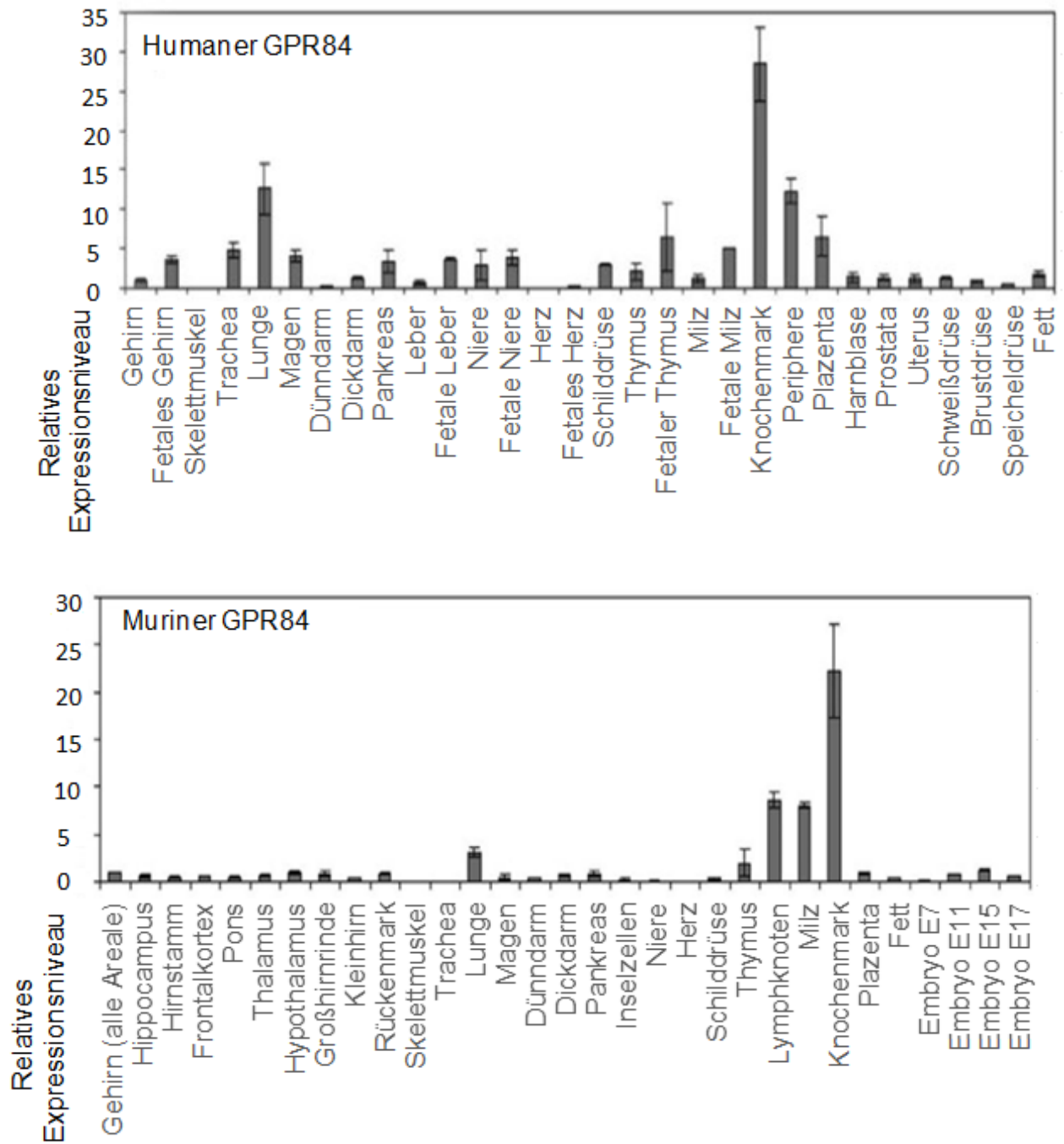
TM4 weist konservierte Tryptophane und Proline auf. Tryptophan könnte mit der Ligandenbindung in Verbindung stehen (Rhee et al., 2000). Konservierte Proline in TM6 können eine funktionell wichtige Rolle für den Konformationsschalter spielen (Sansom et al., 2000). Konsensus-Stellen für die Asparagin-verknüpfte Glykosylierung finden sich häufig in G-Protein-gekoppelten Rezeptoren im N-Terminus und in der ersten und zweiten extrazellulären Schleife (Wittenberger et al., 2001). Phosphorylierungsstellen, die für die Entkopplung des Rezeptors, die G-Protein-Kopplung und die Internalisierung

des Rezeptors wichtig sein könnten (Schwarz et al., 2000), finden sich in der dritten intrazellulären Schleife (IC3) und in den C-Termini (Bockaert et al., 1999, Wittenberger et al., 2001).

### 1.3 Expression des GPR84 Rezeptors

GPR84 ist ein membranständiger Rezeptor. Die Immunfluoreszenzfärbung von intakten chinesischen ovariellen Hamster Zellen (CHO)-Zellen mit rekombinanten GPR84-Rezeptoren zeigten eine deutliche Plasmamembranlokalisierung von GPR84-Protein (Wang et al., 2006). Die Zelloberflächenexpression von GPR84 wurde durch Durchflusszytometrie bestätigt (Wang et al., 2006). Es wurden keine eng mit GPR84 verwandten Rezeptoren gefunden (Wittenberger et al., 2001). GPR84 ist entfernt mit GPR85 aus der Gruppe der Waisen-GPCRs verwandt (Hellebrand et al., 2000, Wittenberger et al., 2001). mRNA für den humanen GPR84 wurde durch eine Northern-Blot-Analyse als ein Transkript von etwa 1,5 kilo Basenpaaren (kbp) in Gehirn, Herz, Muskel, Kolon, Thymus, Milz, Niere, Leber, Darm, Plazenta, Lunge und Leukozyten gefunden. Zusätzlich wurden ein 1,2 kbp-Transkript im Herz und ein 1,3 kbp-Transkript im Muskel nachgewiesen (Wittenberger et al., 2001). Eine Northern Blot-Analyse mit mRNA aus verschiedenen Hirnregionen ergab die stärkste Expression des 1,5 kbp-Transkripts in der Medulla oblongata sowie im Rückenmark. Weniger Transkripte wurde in der Substantia nigra, Thalamus und Corpus callosum gefunden. Die 1,5-kbp-Bande war auch in anderen Hirnregionen in geringen Maßen nachweisbar (Wittenberger et al., 2001).

Eine Expressionsanalyse mittels qRT-PCR (quantitative real-time polymerase chain reaction) zeigte, dass mRNA kodierend für den humanen und murinen GPR84-Rezeptor vorwiegend in hämatopoetischen Geweben exprimiert ist. In Menschen wurde eine hohe GPR84-mRNA-Expression im Knochenmark und, in einem geringeren Ausmaß, in den peripheren Leukozyten und der Lunge (Abb. 2) detektiert. In der Maus wurde GPR84 mRNA hauptsächlich im Knochenmark, den Lymphknoten und der Lunge identifiziert, wobei auch in der Milz Transkripte nachgewiesen wurden (Wang et al., 2006).



**Abb. 2:** Expression von mRNA kodierend für GPR84 in Menschen und in der Maus (qRT-PCR Analyse). Das Verhältnis von GPR84-mRNA zur Glyceraldehyd-3-phosphatdehydrogenase-mRNA wurde berechnet. Die Daten wurden als Mittelwerte  $\pm$  S.E. (Standardfehler) dargestellt. Modifiziert nach Wang et al., 2006.

## 1.4 Pharmakologische Eigenschaften des GPR84 Rezeptors

### 1.4.1 Hinweise auf prinzipielle Signaltransduktionsmechanismen

Bei GPR84 wurde der Pertussis Toxin (PTX)-empfindliche ( $G_{i/o}$ ) Signaltransduktionsweg in mehreren Studien beschrieben (Nikaido et al., 2015, Wang et al., 2006). Um die G-Proteinspezifität von GPR84 zu untersuchen, wurden CHO-Zellen mit Plasmiden transfiziert, die für den humanen GPR84 und einzelne kleine G-Proteine kodieren, und im Aequorin-Assay getestet. Das chimäre G-Protein  $G_{q19}$  potenzierte signifikant die Aktivierung von GPR84 durch Caprinsäure, während bei der  $G_{qs5}$ -Chimäre dies nicht der Fall war. Diese Ergebnisse deuteten darauf hin, dass GPR84 über einen  $G_{i/o}$ -Weg signalisieren kann (Wang et al., 2006).

In einer weiteren Studie wurden die Fusionsproteine GPR84- $G_{i\alpha}$ , die in Sf9-Zellen exprimiert wurden, für den  $[^{35}\text{S}]\text{GTP}\gamma\text{S}$ -Bindungstest verwendet. Die Zugabe der Agonisten Caprinsäure und DIM erhöhte konzentrationsabhängig die Menge an  $G_{i\alpha}$ -gebundenem  $[^{35}\text{S}]\text{GTP}\gamma\text{S}$ . Diese Ergebnisse bestätigen einen PTX-empfindlichen Signaltransduktionsweg (Nikaido et al., 2015).

### 1.4.2 Potenzielle physiologische Agonisten

GPR84 ist ein Rezeptor für mittelkettige Fettsäuren (MCFAs) mit einer Kohlenstoffkettenlänge von 9-14 mit der stärksten Aktivierung durch die folgenden Fettsäuren: Caprinsäure (C10: 0), Undecansäure (C11: 0) und Laurinsäure (C12: 0) (Tab. 4) mit einer mittleren effektiven Konzentration ( $\text{EC}_{50}$ ) von 5  $\mu\text{M}$ , 8  $\mu\text{M}$  und 9  $\mu\text{M}$  (Wang et al., 2006). Kurzkettige und langkettige Fettsäuren sind bei GPR84 inaktiv. MCFAs induzierten eine Calciummobilisierung, hemmten die 3',5'-cAMP-Produktion, und stimulierten GPR84 abhängig die  $[^{35}\text{S}]\text{Guanosin 5-O-(3-Thiotriphosphat)}$  Bindung (Wang et al., 2006). Die Aktivierung von GPR84 durch MCFAs ist in erster Linie an einen Bordetella Pertussis-Toxin empfindlichen  $G_{i/o}$ -Weg gekoppelt. Die MCFAs konnten die cAMP-Produktion in CHO-GPR84-Zellen in Abwesenheit von Forskolin nicht fördern, was darauf hindeutet, dass GPR84 nicht an einen  $G_s$ -vermittelten Signalweg koppelt (Wang et al., 2006).

GPR84 wurde durch MCFAs mit der Hydroxylgruppe in der 2- oder 3-Position (2-Hydroxy-Caprinsäure, 3-Hydroxy-Caprinsäure, 2-Hydroxy-Laurinsäure und 3-Hydroxy-Laurinsäure) mit einer EC<sub>50</sub>-Konzentration von jeweils 31 µM, 230 µM, 10 µM und 13 µM im [<sup>35</sup>S]GTPγS Bindungstest aktiviert (Tab. 4). Diese Aktivierung war wirksamer als durch den entsprechenden nicht-hydroxylierten MCFAs (Suzuki et al., 2013). Obwohl Laurinsäure den GPR84-Rezeptor im Phosphatidylinositol-Akkumulation-Assay aktiviert, zeigte Laurinsäure kein Signal beim [<sup>35</sup>S]GTPγS-Bindungstest. Möglicherweise wird Laurinsäure in Gegenwart von Zellen in 2- oder 3-Hydroxy-Laurinsäure umgewandelt (Suzuki et al., 2013). 2-Hydroxyfettsäuren sind in verschiedenen Geweben, insbesondere im Gehirn, vorhanden und werden durch Fettsäure-2-Hydroxylase gebildet und durch α-Oxidation abgebaut (Guo et al., 2012, Suzuki et al., 2013). 3-Hydroxyfettsäuren entstehen bei der β-Oxydation in Peroxisomen. Es wurde berichtet, dass ihre Plasmakonzentration bei mitochondrialen Fettsäure-Oxidationsstörungen im mikromolaren Bereich liegt (Costa et al., 1998, Jones et al., 2011, Suzuki et al., 2013). In der gleichen Studie wurde festgestellt, dass 3-Hydroxy-Laurinsäure die Menge an IL-6, einem proinflammatorischen Zytokin, das von menschlichen Blutzellen in vitro freigesetzt wird, erhöht. Allerdings war es nicht möglich, 3-Hydroxy-Laurinsäure im Plasma von Patienten mit metabolischem Syndrom, Krebs und rheumatoider Arthritis zu detektieren (Soydan et al., 2006, Suzuki et al., 2013).

**Tab. 4:** Ausgewählte physiologische Agonisten des humanen GPR84 mit Angabe halbmaximaler Konzentrationen  $EC_{50}$  (Suzuki et al., 2013, Wang et al., 2006).

<b>Substanz</b>	<b><math>EC_{50}</math> [<math>\mu</math>M]</b>	<b>Assay</b>	<b>Publikation</b>
2-Hydroxy-Laurinsäure (2-OH-C12)	10	[ $^{35}$ S]GTP $\gamma$ S- Bindungsassay	Suzuki et al., 2013
3-Hydroxy-Laurinsäure (3-OH-C12)	13	[ $^{35}$ S]GTP $\gamma$ S- Bindungsassay	Suzuki et al., 2013
2-Hydroxy-Caprinsäure (2-OH-C10)	31	[ $^{35}$ S]GTP $\gamma$ S- Bindungsassay	Suzuki et al., 2013
3-Hydroxy-Caprinsäure (3-OH-C10)	230	[ $^{35}$ S]GTP $\gamma$ S- Bindungsassay	Suzuki et al., 2013
Caprinsäure (C10:0)	5 bzw. 5	cAMP- Assay bzw. [ $^{35}$ S]GTP $\gamma$ S- Bindungsassay	Wang et al., 2006
Undecansäure (C11:0)	8 bzw. 9	cAMP- Assay bzw. [ $^{35}$ S]GTP $\gamma$ S- Bindungsassay	Wang et al., 2006
Laurinsäure (C12:0)	9 bzw. 11	cAMP- Assay bzw. [ $^{35}$ S]GTP $\gamma$ S- Bindungsassay	Wang et al., 2006
Nonansäure (C9:0)	52 bzw. 70	cAMP- Assay bzw. [ $^{35}$ S]GTP $\gamma$ S- Bindungsassay	Wang et al., 2006

#### 1.4.3 Synthetische Agonisten

Mehrere synthetische Agonisten mit einer stärkeren Wirksamkeit wurden entwickelt (Liu et al., 2016, Suzuki et al., 2013, Zhang et al., 2016 d). Es wurde ein Surrogat-Agonist, 6-n-Octylaminouracil, für GPR84 identifiziert. Diese potenziellen Liganden und der Surrogat-Agonist, 6-n-Octylaminouracil (Tab. 5), stimulierten die [ $^{35}$ S]GTP-Bindung und

einen Anstieg von Phosphoinositiden in einer GPR84-abhängigen Weise (Suzuki et al., 2013). 6-n-Octylaminouracil aktivierte GPR84 stärker als Diindolylmethan. Die agonistische Aktivität von 6-n-Octylaminouracil erfolgte im [<sup>35</sup>S]GTPγS-Bindungsassay bei einem EC<sub>50</sub>-Wert von 512 nM. Außerdem aktivierte 6-n-Octylaminouracil den humanen GPR84 in Anwesenheit von G<sub>q/15</sub> Chimära in HEK293-Zellen bei einem EC<sub>50</sub>-Wert von 105 nM im Phosphatidylinositol Akkumulations-Assay (Suzuki et al., 2013). Die Fluoreszenz von HEK293-GPR84-EGFP-Zellen zeigte eine markante Plasmamembran-Lokalisation des GPR84-Proteins und die Internalisierung von GPR84 wurde ab einer Konzentration von 6,25 μM 6-n-Octylaminouracil beobachtet. Laurinsäure hat GPR84 im [<sup>35</sup>S]GTPγS-Bindungsassay nicht aktiviert (Suzuki et al., 2013). In einem Transwell-Migrations-Assay bewirkten 3-Hydroxy-Laurinsäure und der Surrogat-Agonist 6-n-Octylaminouracil Chemotaxis von polymorphonukleären Leukozyten aus menschlichem peripherem Blut in konzentrationsabhängiger Weise mit einer EC<sub>50</sub>-Konzentration von 24,2 μM bzw. 318 nM (Suzuki et al., 2013). Im [<sup>35</sup>S]GTPγS-Bindungsassay zeigten die inaktiven MCFAs (Caprylsäure, Laurinsäure, 2-Hydroxy-Laurinsäure und Myristinsäure) keine chemotaktische Aktivität. Außerdem erhöhten 3-Hydroxy-Laurinsäure und 6-n-Octylaminouracil die Sekretion von IL-8 aus Lipopolysaccharid-stimulierten polymorphonukleären Leukozyten. Das weist daraufhin, dass diese Effekte durch GPR84-Aktivierung ausgelöst wurden. In Abwesenheit von Lipopolysacchariden betrug die IL-8-Produktion weniger als ein Zehntel im Vergleich zu Versuchen in Gegenwart von Lipopolysacchariden (Suzuki et al., 2013).

Weiterhin wurde 2-(Hexylthio) Pyrimidin-4,6-diol als ein potenter und selektiver Agonist von GPR84 identifiziert (Tab. 5). 2-(Hexylthio) Pyrimidin-4,6-diol aktivierte mehrere GPR84-vermittelte Signalwege, einschließlich Calciummobilisierung, Inhibierung der cAMP-Akkumulation, Phosphorylierung der extrazellulären Signal-regulierten Proteinkinase 1/2, Rezeptor-Desensibilisierung und Internalisierung sowie Rezeptor-β-Arrestin2-Wechselwirkung (Zhang et al., 2016). 2-(Hexylthio) Pyrimidin-4,6-diol zeigt einen additiven, aber nicht synergistischen Effekt mit den MCFAs. Dazu ist 2-(Hexylthio) Pyrimidin-4,6-diol potenter als der GPR84-Agonist 6-n-Octylaminouracil sowohl im Calciummobilisierungs-Assay mit einer EC<sub>50</sub>-Konzentration von 0,213 μM als auch im ‚homogeneous time resolved fluorescence‘ (HTRF) cAMP-Assay mit EC<sub>50</sub> von 0,134 μM. 2-(Hexylthio) Pyrimidin-4,6-diol ist auch hochselektiv für GPR84 und hat keine



Auswirkungen auf die anderen Rezeptoren für freie Fettsäuren (Zhang et al., 2016). Zudem wurde eine Reihe von weiteren Alkylpyrimidin-4,6-diol-Derivaten als neue GPR84-Agonisten auf der Basis eines Hochdurchsatz-Screenings getestet und synthetisiert. 6-Nonylpyridin-2,4-diol (Tab. 5) wurde als ein hoch potenter Agonist von GPR84 mit einer  $EC_{50}$  von 0,189 nM im Calciummobilisierungs-Assay identifiziert. Diese neuen GPR84-Agonisten könnten potenziell wertvolle Werkzeuge für die Untersuchung der physiologischen Funktionen von GPR84 sein (Liu et al., 2016).

6-Hexylamino-2,4(1H,3H)-Pyrimidinedion (PSB-1584), 6-((p-Chloro-Phenylethyl) Amino)-2,4(1H,3H)-Pyrimidinedion (PSB-16434) und 6-((p-Bromo-Phenylethyl)Amino)-2,4(1H,3H)-Pyrimidinedion (PSB-17365) erwiesen sich als die wirksamsten GPR84-Agonisten in der Reihe der 6-(Ar)Alkylamino-substituierten Derivaten (Tab. 5). Diese Verbindungen zeigten eine hohe Selektivität für GPR84. Die Verbindungen PSB-1584 und PSB-17365 erwiesen sich nach Inkubation mit menschlichen Lebermikrosomen als metabolisch stabil (Pillayiar et al., 2018). Im Gegensatz zu den Phenethyl-substituierten 6-Aminouracil-Derivate PSB-16434 und PSB-17365 zeigten die Alkyl-substituierten Agonisten, wie PSB-1584, bei gleichen  $EC_{50}$ -Werten in cAMP- und  $\beta$ -Arrestin-Assays eine funktionelle Selektivität des Signaltransduktionweges ( $G_i$ -vermittelte Adenylatzyklase Inhibierung). Die Phenethyl-substituierten 6-Aminouracil-Derivate können unterschiedliche pharmakologische Charakteristika aufweisen (Manglik et al., 2016, Pillayiar et al., 2018). Zum Beispiel können sie keine Rezeptor-Desensibilisierung induzieren und somit länger anhaltende Wirkungen oder unterschiedliche Signalwege auslösen (Pillayiar et al., 2018).

Das natürlich vorkommende Embelin, isoliert aus Pflanzen des Genus *Embelia ribes* (Hao et al., 2005), wurde als ein hochpotenter und selektiver Surrogat-Agonist des GPR84 identifiziert (Gaidarov et al., 2018). Unter anderem wurden für Embelin antineoplastische (Qian et al., 2018), antivirale (Hossan et al., 2018), antidepressive (Wang et al., 2018), antiinflammatorische (Lee et al., 2018) und antidiabetische Eigenschaften (Durg et al., 2018) beschrieben. Weiter wurde gezeigt, dass die 3-Hydroxytetradecansäure GPR84 effektiv aktiviert (Pillayiar et al., 2018).

Es wurde festgestellt, dass das marine Bakterium *Labrenzia* Spezies 011 cyclopropanenthaltende Fettsäuren mittlerer Kettenlänge produziert. Unter anderem wird cis-2-(2-Hexacyclopropyl) -Essigsäure produziert (Tab. 5), die als potenter partieller Agonist von GPR84 fungiert (Amiri Moghaddam et al., 2018). Zusätzlich hemmt diese Substanz das Wachstum von mehreren Bakterien: *Escherischia coli* DSM 498 und I-11276b, *Bacillus megaterium* DSM 32, *Pseudoroseovarius crassostreae* DSM 16950 und methicillin-resistenten *Staphylococcus aureus* (MRSA) LT-1338 und LT-1334. Die Verbindung zeigte eine konzentrationsabhängige Aktivierung der GPR84-abhängigen  $\beta$ -Arrestin-Rekrutierung mit einem  $EC_{50}$ -Wert von 114 nM. Die Wirksamkeit betrug 54% im Vergleich zum Voll-Agonisten Embelin (Amiri Moghaddam et al., 2018).

**Tab. 5:** Ausgewählte potente synthetische Agonisten des humanen GPR84 mit Angabe der halbmaximalen Konzentrationen.

Substanz	EC <sub>50</sub> [µM]	Assay	Publikation
6-Nonylpyridin-2,4-diol	0,189×10 <sup>-3</sup>	Calciummobilisierungs- -Assay	Liu et al., 2016
6-Hexylamino- 2,4(1H,3H)- Pyrimidinedione (PSB- 1584)	5,0× 10 <sup>-3</sup> bzw. 3,2× 10 <sup>-3</sup>	cAMP- Assay bzw. β-Arrestin-Assay	Pillaiyar et al., 2018
6-((p-Bromo- Phenylethyl)Amino)- 2,4(1H,3H)- Pyrimidinedione (PSB- 17365)	2,5× 10 <sup>-3</sup> bzw. 100× 10 <sup>-3</sup>	cAMP- Assay bzw. β-Arrestin-Assay	Pillaiyar et al., 2018
6-((p-Chloro- Phenylethyl)Amino)- 2,4(1H,3H)- Pyrimidinedione (PSB- 16434)	7,1× 10 <sup>-3</sup> bzw. 520× 10 <sup>-3</sup>	cAMP- Assay bzw. β-Arrestin-Assay	Pillaiyar et al., 2018
cis-2-(2- Hexacyclopropyl)- Essigsäure	114× 10 <sup>-3</sup>	β-Arrestin-Assay	Amiri Moghaddam et al., 2018
6-n-Octylaminouracil (6- OAU)	512× 10 <sup>-3</sup> bzw. 105× 10 <sup>-3</sup>	[ <sup>35</sup> S]GTPγS- Bindungsassay bzw. PI-Assay	Suzuki et al., 2013
2-(Hexylthio)Pyrimidin- 4,6-diol (ZQ-16)	0,213 bzw. 0,134	Calciummobilisierungs- -Assay bzw. HTRF cAMP- Assay	Zhang et al., 2016
Embelin	0,795 bzw. 0,420	cAMP- Assay bzw. β-Arrestin-Assay	Pillaiyar et al., 2018

#### 1.4.4 Positiv allosterische Modulatoren

Ein kleines Molekül, der GPR84 Surrogat-Agonist 3,3'-Diindolylmethan (DIM), aktiviert GPR84 mit größerer Wirksamkeit als der natürliche Ligand Caprinsäure (Tab.6). Die  $EC_{50}$ -Werte für DIM im cAMP und [ $^{35}$ S]GTP $\gamma$ S-Bindungsassays betragen jeweils 0,7 und 0,5  $\mu$ M im Vergleich zu 4,5 und 4,6  $\mu$ M für Caprinsäure (Wang et al., 2006). Diindolylmethan-Derivate wurden als Aktivatoren des humanen Rezeptors GPR84 erkannt, wobei die Agonisten Di (5-fluor-1H-indol-3-yl)-Methan ( $EC_{50}$  80,0 nM) und Di (5,7-difluor-1H-indol-3-yl)-Methan ( $EC_{50}$  41,3 nM) die höchste Aktivität (Tab.6) in cAMP-Assays zeigten (Pillaiyar et al., 2017).

Zunächst wurde DIM (Tab.6) als Agonist des GPR84 beschrieben (Wang et al., 2006) und in späteren Studien als positiver allosterischer Modulator charakterisiert (Nikaido et al., 2015). In einer Mutagenese Studie wurden Mutationen in den Transmembran-Helices 3, 5 und 7 mit Hilfe von [ $^{35}$ S]GTP $\gamma$ S-Bindungsassay untersucht (Nikaido et al., 2015). Es ist zu bemerken, dass Nikaido et. al. in ihrer Arbeit eine uneinheitliche Nomenklatur zur Beschreibung von Aminosäurenposition N7.40 benutzt, wobei sie auch als N7.39 und N7.41 bezeichnet wurde. In der vorliegenden Arbeit wird sie weiterhin als N7.40 gemäß Ballesteros-Weinstein Nummerierung beschrieben. Die Mutationen L3.32D (Ballesteros-Weinstein Nummerierung), F3.33Y und N3.36Q im TM-Helix 3 sowie N7.40D im TM-Helix 7 führten zu einer reduzierten Caprinsäure-Aktivität, obwohl die Aktivität von DIM beibehalten wurde. Interessanterweise zeigten die Konstrukte F3.33Y und N3.36Q die gleiche Aktivität wie der Wildtyp-Rezeptor auf DIM, während Zellen mit dem Konstrukt L3.32D eine höhere maximale Antwort auf DIM im Vergleich zum Wildtyp-Rezeptor zeigte (Nikaido et al., 2015).

Die Ergebnisse der Studie deuten an, dass diese Aminosäuren eine entscheidende Rolle für die Caprinsäure-Wechselwirkung haben, aber für die DIM-Interaktion nicht wesentlich sind. Es wurde angenommen, dass L3.32D nahe der Carboxylgruppe der Ligandenfettsäuren Caprinsäure lokalisiert ist (Nikaido et al., 2015). Zellen mit den Konstrukten Y5.46F und Y5.46H zeigten keine Änderung der Caprinsäure-Wirkung, jedoch wurde die Aktivierung durch DIM signifikant beeinträchtigt. Die L3.32D-Mutante reagierte auf das synthetische Fettamin Decylamin anstelle der Fettsäure Caprinsäure

als natürlichem Agonisten. Im Gegensatz dazu wurde die N7.40D- Mutante nicht durch Decylamin aktiviert, obwohl die N7.40D- Mutante ihre Aktivität als Reaktion auf Caprinsäure sowie die L3.32D-Mutante verloren hatte. Dieses Ergebnis zeigte, dass N7.40 nicht direkt mit der C10-Carbonylgruppe der Caprinsäure wechselwirkt (Nikaido et al., 2015). Aus den Ergebnissen des Doppelstimulationstests wurde in gleicher Studie DIM als ein positiver allosterischer Modulator für GPR84 identifiziert. Es wurde festgestellt, dass die Zugabe eines partiellen Agonisten, der Laurinsäure, die Aktivierung des Rezeptors durch Caprinsäure reduzierte, nicht aber die Gabe von DIM. Die Zugabe von DIM verstärkte additiv die Caprinsäure- und Laurinsäure-Rezeptoraktivierung, was darauf hindeutet, dass DIM und Fettsäuren gleichzeitig an GPR84 binden. Im [<sup>35</sup>S]GTPγS-Bindungsassay am Wildtyp GPR84 zeigte DIM einen EC<sub>50</sub> Wert von 5,9 x 10<sup>3</sup> μM (Nikaido et al., 2015).

**Tab. 6:** Ausgewählte potente positive allosterische Modulatoren des humanen GPR84 mit Angabe halbmaximaler Konzentrationen.

Substanz	EC <sub>50</sub> [μM]	Assay	Publikation
Di(5,7-difluor-1H-indol-3-yl)-Methan	0,041	cAMP-Assay	Pillaiyar et al., 2017
Di(5-fluor-1H-indol-3-yl)-Methan	0,08	cAMP-Assay	Pillaiyar et al., 2017
3,3'-Diindolylmethan (DIM)	0,7 bzw. 0,5	cAMP- Assay bzw. [ <sup>35</sup> S]GTPγS-Bindungsassay	Wang et al., 2006

#### 1.4.5 Antagonisten

Labeguere et al., (2014) haben über eine Reihe von Verbindungen berichtet, die GPR84 funktionell antagonisieren können. Des Weiteren wurde die Fähigkeit dreier eng verwandter Substanzen dieser Serie von Antagonisten, die [<sup>35</sup>S]GTPγS-Bindung zu begrenzen, untersucht. Die [<sup>35</sup>S]GTPγS-Bindung wurde durch Zugabe von Caprinsäure, Embelin und DIM in Membranen von FLAG-hGPR84-eYFP exprimierenden Zellen induziert. Die Verbindung 104 (9- (5-Cyclopropyl- [1,2,4] oxadiazol-3-ylmethoxy) -2 - ((R) -1-[1,4]dioxan-2-ylmethoxy)-6 7-Dihydropyrimido [6,1-a] isochinolin-4-on), die

Verbindung 107 (2 - ([1,4] Dioxan-2-ylmethoxy) -9- (3-phenylamino-prop-1-ynyl) -6, 7-Dihydropyrimido [6,1-a] isochinolin-4-on) und die Verbindung 161 (2 - ((S) -1- [1,4] Dioxan-2-ylmethoxy) -9-(tetrahydropyran-4-yl) Methoxymethyl)-6,7-dihydropyrimido [6,1-a] isochinolin-4-on)) wirken jeweils konzentrationsabhängig antagonistisierend am GPR84 (Tab.7), wobei die Verbindungen 104 und 107 wirksamer sind als die Verbindung 161. Die Verbindung 107 blockiert die Wirkung von Embelin in einer nicht-kompetitiven Weise, wahrscheinlich durch Bindung an eine allosterische Stelle am GPR84 (Al Mahmud et al., 2018, Labeguere et al., 2014). Darüber hinaus wurde bei höheren Konzentrationen der Verbindung 107 die maximale Wirkung von DIM auf GPR84 ebenfalls reduziert, was wiederum auf eine nicht-kompetitive Art der Wechselwirkung mit DIM hinweist. Ein weiterer Hinweis, dass die Verbindung 107 nicht an die orthosterische Agonist-Bindungsstelle bindet, ist, dass die Verbindung 107 die gleiche Wirksamkeit bei der Blockierung der DIM-stimulierte Bindung von [<sup>35</sup>S]GTPγS an GPR84-Cys352Ile Gα<sub>i2</sub> und der Arg172Ala GPR84-Cys352Ile Gα<sub>i2</sub>-Fusionsproteine hat (Al Mahmud et al., 2018, Labeguere et al., 2014).

Bindungseigenschaften einer radioaktiv markierten Form eines GPR84-Antagonisten [<sup>3</sup>H]G9543, der chemisch mit den Verbindungen 104, 107 und 161 verwandt ist, wurden untersucht. [<sup>3</sup>H]G9543 bindet an Membranen von Zellen, die FLAG-hGPR84-eYFP mit hoher Affinität exprimieren, mit einer K<sub>d</sub> (Dissoziationskonstante) von 0,24 nM und wahrscheinlich an einer einzelnen Bindungsstelle. Dies war auch der Fall für die Bindung an das GPR84-Cys352IleGα<sub>i2</sub>-Fusionsprotein (K<sub>d</sub> = 0,26 nM) (Al Mahmud et al., 2018). Die Bindung von [<sup>3</sup>H]G9543 an das GPR84-Cys352IleGα<sub>i2</sub>-Fusionsprotein wurde vollständig und wirksam durch die Verbindung 104 kompetitiv gehemmt. Caprinsäure, DIM und Embelin konnten nicht wirksam mit [<sup>3</sup>H]G9543 an GPR84 binden. Somit bindet wahrscheinlich [<sup>3</sup>H]G9543 und die Verbindung 104 an eine andere Bindungsstelle, als die für Caprinsäure, DIM und Embelin. Dies deutet auf eine Trennung von Agonist- und Antagonist-Bindungsstellen hin, wobei die Antagonisten die Agonistenfunktion im GPR84 nicht-kompetitiv blockieren. Zusätzlich wird dieses Wirkmodell durch die Bindungsaffinität von [<sup>3</sup>H]G9543 an den Rezeptorkonstrukten Arg172Ala GPR84-eYFP (K<sub>d</sub> = 0,15 nM) und Arg174Ala GPR84-eYFP (K<sub>d</sub> = 0,25 nM) unterstützt (Al Mahmud et al., 2018, Labeguere et al., 2014).

HEK293-Zellen, die mit GPR84 und dem  $G\alpha_i$ -Aktivierungs-BRET-Biosensor ko-transfiziert waren, wurden verwendet, um die Wirkung von PBI-4050 über diesen Signalweg zu testen. Die Stimulation von HEK293-Zellen mit steigenden Konzentrationen von Natriumdekanoat oder dem GPR84-Agonisten Embelin führte zu einer konzentrationsabhängigen BRET-Signalabnahme, was auf eine  $G_i$ -Aktivierung hinweist ( $pEC_{50}$  Natriumdekanoat:  $4,83 \times 10^6 \mu\text{M}$ , Embelin:  $5,01 \times 10^6 \mu\text{M}$ ) (Gagnon et al., 2018). In Pertussistoxin-vorbehandelten Zellen wurde die Natriumdekanoat-induzierte  $G_i$ -Aktivierung blockiert. Diese Blockierung fehlte in Zellen, in denen ein leerer Vektor anstelle von GPR84 ko-transfiziert wurde. Dies zeigte, dass der BRET-Signalabfall durch die GPR84-vermittelte  $G\alpha_i$ -Aktivierung stattfindet (Gagnon et al., 2018). Die gleichzeitige Behandlung von Natriumdekanoat-stimulierten Zellen mit steigenden Konzentrationen von PBI-4050 führte auch zu einer konzentrationsabhängigen Hemmung der  $G\alpha_i$ -Aktivierung ( $pIC_{50}$ :  $3,40 \times 10^6 \mu\text{M}$ ). Eine ähnliche Hemmung der  $G\alpha_i$ -Aktivierung durch PBI-4050 wurde auch in Embelin stimulierten Zellen beobachtet ( $pIC_{50}$ :  $3,68 \times 10^6 \mu\text{M}$ ) (Gagnon et al., 2018).

**Tab. 7:** Ausgewählte potente Antagonisten des humanen GPR84 je nach Stärke der Hemmung.

Substanz	$IC_{50}$ [nM]	Assay	Publikation
Verbindung 107	zwischen $10^{-2}$ und $10^2$	$[^{35}\text{S}]\text{GTP}\gamma\text{S}$ -Bindungsassay	Labeguere et al., 2014
Verbindung 104	zwischen $10^{-2}$ und $10^2$	$[^{35}\text{S}]\text{GTP}\gamma\text{S}$ -Bindungsassay	Labeguere et al., 2014
Verbindung 161	zwischen $10^2$ und $5 \times 10^2$	$[^{35}\text{S}]\text{GTP}\gamma\text{S}$ -Bindungsassay	Labeguere et al., 2014

## 1.5 Physiologische Funktion des GPR84 Rezeptors

### 1.5.1 Makrophagen

Es wurde gezeigt, dass GPR84 als proinflammatorischer Rezeptor sowohl in vitro als auch in vivo fungiert. Sowohl die potentiellen Liganden MCFAs und Hydroxy-MCFAs als

auch 6-n-Octylaminouracil induzierten die Chemotaxis von humanen polymorphonuklearen Leukozyten (PMNs) und Makrophagen und verstärkten die Lipopolysaccharid-stimulierte Produktion des proinflammatorischen Zytokins Interleukin (IL)-8 aus PMNs und des Tumor-Nekrose-Faktor  $\alpha$  (TNF $\alpha$ ) in Makrophagen (Suzuki et al., 2013). Eine GPR84-mRNA-Expression-Analyse mittels quantitativer PCR zeigte ein hohes GPR84-mRNA-Expressions-Niveau in humanen PMNs und Makrophagen (Suzuki et al., 2013). Zusätzlich war die GPR84-mRNA-Expression in Makrophagen nach Lipopolysaccharid-Stimulation erhöht. Somit wird deutlich, dass GPR84 daran beteiligt sein könnte, einen entzündlichen Zustand durch die Induktion der Chemotaxis zu initiieren und die Lipopolysaccharid-stimulierte entzündliche Zytokinproduktion in PMNs und Makrophagen zu verstärken (Suzuki et al., 2013).

Es wurde beobachtet, dass die GPR84-mRNA-Expression in murinen Geweben nach Endotoxämie, Hyperglykämie und Hypercholesterinämie erhöht ist. Ex-vivo-Studien zeigten, dass die GPR84-mRNA-Expression durch Lipopolysaccharide und andere entzündungsfördernde Moleküle in verschiedenen murinen und humanen Makrophagenpopulationen erhöht ist. In ähnlicher Weise erhöhten hohe Glukosekonzentrationen und die Anwesenheit von oxidiertem LDL die GPR84-Expression in Makrophagen (Recio et al., 2018). Aktivierung des GPR84-Rezeptors mit dem selektiven Agonisten 6-n-Octylaminouracil verstärkte die Expression von phosphoryliertem Akt, p-ERK, und p65 nuklearer Translokation unter Entzündungsbedingungen und erhöhte die Expressionsspiegel der Entzündungsmediatoren TNF $\alpha$ , IL-6, IL-12B, CCL2, CCL5 und CXCL1. Darüber hinaus fördert die GPR84-Aktivierung eine erhöhte bakterielle Adhäsion, Migration und Phagozytose in Makrophagen (Recio et al., 2018). Die durch 6-n-Octylaminouracil vermittelte Entzündungsreaktion wurde weder in GPR84-defizienten-Zellen noch in Makrophagen beobachtet, die mit einem selektiven GPR84-Antagonisten behandelt wurden. Zusammenfassend zeigen die Ergebnisse, dass GPR84 als ein Verstärker der Entzündungssignalisierung in Makrophagen fungiert, sobald eine Entzündung etabliert ist (Recio et al., 2018).

Eine andere Studie zeigte, dass die Aktivierung von rekombinantem GPR84 durch Embelin in HEK293-Zellen zur Signalweiterleitung durch den G<sub>i/o</sub>- und G<sub>12/13</sub>-Rho-



Signalweg führt. In menschlichen Makrophagen initiiert GPR84 Pertussistoxin-sensitive Erk1/2- und Akt-Phosphorylierung, PI-3-Kinaseaktivierung, Calcium-Konzentrationserhöhung und Freisetzung von Prostaglandin E2. Darüber hinaus ruft die GPR84-Signaltransduktion in Makrophagen G<sub>i</sub>-vermittelte Erhöhung von intrazellulärem cAMP-Niveau hervor (Gaidarov et al., 2018). Die GPR84-Aktivierung treibt die Chemotaxis menschlicher Neutrophile an und stimuliert sie für die Verstärkung der Freisetzung von reaktiven Sauerstoffradikalen, die durch die potenten chemotaktischen Faktoren FMLP und C5A induziert wird. Der Verlust von GPR84 ist mit abgeschwächter Lipopolysaccharid-induzierter Freisetzung von proinflammatorischen Mediatoren IL-6, KC-GRO $\alpha$ , VEGF, MIP-2 und NGAL aus peritonealen Exsudaten verbunden (Gaidarov et al., 2018).

### 1.5.2 Mikroglia

Zudem wurde gezeigt, dass GPR84 ein Mikroglia-assoziiertes, unter neuroinflammatorischen Bedingungen exprimierter Rezeptor ist. Es wurde berichtet, dass in unter Endotoxämie leidenden Mäusen Mikroglia GPR84 deutlich exprimiert wird (Bouchard et al., 2007). Dies wurde auch bei Subpopulationen peripherer Makrophagen und, in einem viel geringeren Ausmaß, bei Monozyten beobachtet. Mit Hilfe von qRT-PCR wurde gezeigt, dass periphere monozytäre Zellen, die nicht zur Mikroglia gehören, mRNA für GPR84 in Reaktion auf Lipopolysaccharide exprimieren (Bouchard et al., 2007). Die Induktion von GPR84-Expression im Gehirn während der Endotoxämie wird hauptsächlich durch TNF $\alpha$  und, in geringerem Maße, durch IL-1 vermittelt. Mäuse, bei denen entweder TNF $\alpha$ , IL-1 oder beide Moleküle fehlen, weisen während der frühen Phase der Endotoxämie weniger GPR84-exprimierende Zellen in ihrer Hirnrinde auf als Wildtyp-Mäusen (Bouchard et al., 2007). Zusätzlich stimuliert das intrazerebral injizierte oder den Mikroglia-Kulturen hinzugefügte rekombinante TNF $\alpha$  als proinflammatorisches Zytokin die GPR84-Expression durch einen Dexamethason-unempfindlichen Mechanismus (Bouchard et al., 2007).

### 1.5.3 Monozyten

Des Weiteren wurde bestätigt, dass GPR84 nach Zugabe von Caprinsäure den refraktären Zellzustand von Endotoxin-toleranten Monozyten durch einen Mechanismus modulieren kann, der zu einer erhöhten Transkription des mRNA von TNF $\alpha$  führt (Müller et al., 2017).

### 1.5.4 T- und B-Zellen

In einer weiteren Studie wurde die Rolle von GPR84 bei der Regulierung der frühen IL-4-Genexpression in aktivierten T-Zellen gezeigt (Venkataraman et Kuo, 2005). GPR84 wird im Knochenmark und in T-Zellen der Milz und B-Zellen stark exprimiert (Wang et al., 2006). Die Proliferation von T- und B-Zellen als Antwort auf verschiedene Mitogene war bei GPR84-defizienten Mäusen normal. Interessanterweise führte die Stimulation mit Anti-CD3 und Anti-CD28 zu erhöhten Spiegeln von IL-4-mRNA in GPR84-defizienten T-Zellen. Darüber hinaus produzierten Th2-Effektorzellen, die in vitro aus GPR84-defizienten Mäusen isoliert wurden, höhere Spiegel von IL-4, IL-5 und IL-13 im Vergleich zum Wildtyp (Venkataraman und Kuo, 2005).

### 1.5.5 Neutrophilen

Die durch den GPR84-Agonisten ZQ16 induzierte Produktion von reaktiven Sauerstoffspezies (ROS) in naiven Neutrophilen wird durch das proinflammatorische Zytokin TNF $\alpha$  verstärkt. Dabei vermittelt GPR84 die Freisetzung von NADPH-Oxidase-abgeleiteten ROS aus humanen Neutrophilen (Sundqvista et al., 2018). Eine erhöhte ROS-Produktion wurde in Neutrophilen gezeigt, die mit ZQ16 in Gegenwart von Latrunculin A stimuliert wurden. Jedoch scheint die Beendigung der Signaltransduktion und Desensibilisierung der besetzten Rezeptoren durch Latrunculin A nicht beeinträchtigt zu sein, was darauf hinweist, dass diese Effekte durch einen Aktin-Zytoskelett-unabhängigen Weg erreicht werden. Schließlich zeigen die Daten von in vivo transmigrierten Gewebsneutrophilen, dass GPR84 an Neutrophilen-Rekrutierungsprozessen beteiligt ist (Sundqvista et al., 2018).

### 1.5.6 Adipozyten

In humanen Adipozyten wurde nachgewiesen, dass die GPR84-Genexpression sehr empfindlich auf proinflammatorische Mediatoren reagiert. IL-1 $\beta$  und TNF $\alpha$  stimulieren die Expression des Fettsäurerezeptors GPR84 in humanen Adipozyten. GPR84-mRNA war nach Gabe dieser beiden Zytokine dramatisch erhöht (> 500-fache für IL-1 $\beta$  nach 4 h) (Muredda et al., 2017). Die MCFAs verstärken die Lipopolysaccharid-stimulierte Produktion der proinflammatorischen Zytokinen Interleukin-12 (IL-12) in Leukozyten, Monozyten und Makrophagen p40 durch GPR84. Diese Ergebnisse verknüpfen die Rolle von GPR84 im Fettsäuremetabolismus mit der immunologischen Regulation (Wang et al., 2006).

Bei Mäusen wurde die Expression von GPR84 im Fettgewebe durch eine fettreiche Diät hochreguliert. Bei 3T3-L1 Adipozyten, die in Zellkulturen zusammen mit der RAW264 Makrophagen Zelllinie oder mit TNF $\alpha$  kultiviert wurden, war die GPR84 Expression deutlich verstärkt. Das Adiponectin-mRNA-Expressionsniveau wurde in 3T3-L1 Adipozyten durch Caprinsäure, einem GPR84-Liganden, in Gegenwart von TNF $\alpha$  unterdrückt (Nagasaki et al., 2012). Der mRNA-Expressionsgrad von GPR84 in 3T3-L1-Adipozyten war gegenüber dem Kontrollwert um das 3-fache erhöht, was nahelegt, dass die 3T3-L1-Adipozyten GPR84 exprimieren (Nagasaki et al., 2012). Die Induktion des GPR84-mRNA-Expressionsniveau in 3T3-L1-Adipozyten wurde durch RAW264-Makrophagen verstärkt, was darauf hindeutet, dass bioaktive Substanzen aus den Makrophagen für die Induktion verantwortlich waren. Insgesamt haben die qRT-PCR-Analysen gezeigt, dass GPR84-mRNA überwiegend in Leukozyten oder RAW264 Makrophagen, jedoch in geringer Expressionsdichte auch in 3T3-L1-Adipozyten vorhanden ist (Nagasaki et al., 2012). Zusätzlich wurde gezeigt, dass TNF $\alpha$  und Lipopolysaccharide die GPR84-mRNA-Expression in 3T3-L1-Adipozyten und humane 'adipose tissue-derived adult stem cells' (ADSC)-Adipozyten stimulieren (Nagasaki et al., 2012).

In einer Studie wurde untersucht, ob das Mitglied der IL-1-Genfamilie, IL-33, auch die Expression der Fettsäurerezeptorgene in Adipozyten reguliert. Humane Fettzellen, die von Präadipozyten differenziert wurden, wurden 3 bzw. 24 Stunden lang mit drei verschiedenen Konzentrationen von IL-33 inkubiert und die mRNA wurde mittels qPCR

gemessen. Die Behandlung mit IL-33 induzierte nach 3 Stunden einen konzentrationsabhängigen Anstieg der GPR84-mRNA, wobei das Niveau mit der höchsten Dosis 13,7-fach höher war als in den Kontrollen (Zaibi et al., 2018). IL-33 stimulierte deutlich die Expression der IL1B-, CCL2-, IL6-, CXCL2- und CSF3-Genen. Am stärksten wirkte es auf CSF3, dessen mRNA-Niveau gegenüber der Kontrolle bei 3 Stunden Einwirkdauer mit der höchsten Dosis von IL-33 um das 183-fache erhöht war. Es gab eine parallele Zunahme der Sekretion von G-CSF-Protein in das Medium. Daraus wurde geschlossen, dass IL-33, das im Fettgewebe synthetisiert ist, in humanen Adipozyten eine starke stimulierende Wirkung auf die Expression von Zytokin- und Chemokin-Gen-Produkten, insbesondere CSF3, sowie auf die Expression von GPR84, einem proinflammatorischen Fettsäurerezeptor hat (Zaibi et al., 2018).

#### 1.5.7 Nozizeptive Signaltransduktion

Eine weitere Studie untersuchte die Rolle von GPR84 in einem Mausmodell mit traumatischer Nervenverletzung. GPR84-Knockout (KO)-Mäuse weisen normale akute Schmerzschwellen auf, aber die neuropathische Schmerz-Überempfindlichkeit fehlte (Nicol et al., 2015). Im Gegensatz zu Wildtyp-Mäusen entwickelten die GPR84-KO-Mäuse im Anschluss an die partielle Nervus ischiadicus Ligatur keine mechanischen oder thermischen Überempfindlichkeiten. Die Nervenverletzung erhöhte die Immunoreaktivität des ionisierten Calciumbindungsadaptermolekül 1 (Iba1) und der phosphorylierten p38 mitogen aktivierten Proteinkinase (MAPK) im dorsalen Horn des Rückenmarks und regulierte die Expression von Iba1- und CD45 im Nervus ischiadicus ohne Unterschied in beiden Genotypen hoch (Nicol et al., 2015). Die PCR-Array-Analyse zeigte, dass die GPR84-Expression im Rückenmark und im Nervus ischiadicus von Wildtyp-Mäusen bei traumatischer Nervenschädigung hochreguliert wurde. Es wurde festgestellt, dass Lipopolysaccharid-stimulierte KO-Makrophagen eine abgeschwächte Expression von mehreren proinflammatorischen Mediatoren, einschließlich IL-1, IL-6 und TNF- $\alpha$ , aufwiesen. Somit wird angenommen, dass GPR84 durch Modulation der Makrophagenfunktion zur nozizeptiven Signaltransduktion beiträgt (Nicol et al., 2015).

### 1.5.8 Organentwicklung

Des Weiteren spielt GPR84 eine wichtige Rolle bei der Entwicklung von verschiedenen Organen (Meng et al., 2016, Park et al., 2017, Perry et al., 2010). Der G-Proteingekoppelte Rezeptor GPR84 ist wichtig für die Entwicklung des Auges im *Xenopus laevis*. Während der Entwicklung wird die GPR84-Expression in der embryonalen Linsenplakode hochreguliert, wodurch Linsenfaserzellen, Retina und Hornhaut differenziert werden (Perry et al., 2010). Die Untersuchung der Zellproliferation unter Verwendung eines Antikörpers gegen Histon H3 S10P zeigt eine Vergrößerung der Linse und Retina bei GPR84-Knockout-Tieren. Dabei wurde bei den GPR84-Knockout-Embryonen durch den TUNEL-Assay eine Zunahme der Apoptose in der Retina und der Linse nachgewiesen (Perry et al., 2010). Zudem stimuliert Laurinsäure die Entwicklung der Glandula mammaria von Mäusen durch Aktivierung des GPR84- und PI3K/Akt-Signalweges (Meng et al., 2016). Der Rezeptor GPR84 steuert die Osteoklastengnese durch Inhibition der NF- $\kappa$ B- und MAPK-Signalwege. GPR84 fungiert als negativer Regulator bei der Osteoklastengnese. Die GPR84-Überexpression blockiert die RANKL-stimulierte Phosphorylierung von I $\kappa$ B $\alpha$  und MAPKs, JNK, ERK und p38. GPR84 unterdrückte auch die von RANKL vermittelte NF- $\kappa$ B-Transkriptionsaktivität (Park et al., 2017).

## 1.6 Rolle von GPR84 in Krankheitsmodellen

### 1.6.1 Hämatonkologie

GPR84 verstärkt gleichzeitig die  $\beta$ -Catenin-Signaltransduktion in leukämischen Stammzellen und in einem onkogenen Transkriptionsprogramm, das für die Etablierung von ‚mixed-lineage leukemia‘ (MLL) essentiell ist. In vivo wurde eine starke Abhängigkeit von hämatopoetischen Stammzell-abgeleiteten MLL-Leukämiezellen von GPR84 gezeigt (Dietrich et al., 2014).  $\beta$ -Catenin ist für die Etablierung von leukämischen Stammzellen (LSCs) bei akuter myeloischer Leukämie (AML) erforderlich. Hohe GPR84-Expressionsniveaus wurden in humanen und murinen AML-LSCs im Vergleich zu hämatopoetischen Stammzellen gezeigt. Die Suppression von GPR84 inhibierte das Zellwachstum durch die Induktion des G1-Phasen-Zellzyklusarrests in Prä-LSCs, verringerte die LSCs-Häufigkeit und beeinträchtigte die Rekonstitution von

stammzellbasierter MLL-AML, die einen aggressiven und arzneimittelresistenten Subtyp von AML darstellt (Dietrich et al., 2014). Der GPR84-defiziente Phänotyp bei AML konnte durch Expression von konstitutiv aktivem  $\beta$ -Catenin aufrechterhalten werden. Dazu verlieh GPR84 den prä-leukämischen Hoxa9/Meis1a-transduzierten Stammzellen einen Wachstumsvorteil. Eine Microarray-Analyse zeigte, dass GPR84 eine kleine Gruppe von MLL-Fusionszielen und  $\beta$ -Catenin-Koeffektoren hochregulierte und einen hämatopoetischen Zellzyklus-Inhibitor herunterregulierte (Dietrich et al., 2014). Die Rolle von GPR84 bei der Aufrechterhaltung von AML deutet, dass das Targeting der onkogenen GPR84/ $\beta$ -Catenin-Signalachse eine neue therapeutische Strategie für AML darstellen könnte (Dietrich et al., 2014).

### 1.6.2 Entzündungsgeschehen im ZNS

Es zeigte sich, dass die Expression von GPR84 in Mikroglia nicht nur während der Endotoxämie, sondern auch unter einer experimentellen autoimmunen Enzephalitis steigt, die ein Modell für die Multiple Sklerose ist (Bouchard et al., 2007). Die stereologische Analyse an Sagittalschnitten des Rückenmarks (Thorax 1-Thorax 10) ergab, dass GPR84 mRNA exprimierende Zellen zum Beginn der experimentellen autoimmunen Enzephalitis bereits reichlich vorhanden waren und dass ihre Zahl mit der Schwere der Erkrankung zunimmt. Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass GPR84 eine Rolle bei neuroinflammatorischen Erkrankungen, wie der Multiplen Sklerose, spielen könnte. Die mögliche Nutzung des Nachweises dieses Rezeptors als einem neuen sensitiven Marker für Mikroglia-Aktivierung sollte weiter untersucht werden (Bouchard et al., 2007).

Des Weiteren wurde beobachtet, dass GPR84-Mangel die Proliferation der Mikroglia reduziert, aber die dendritische Degeneration und den Abbau kognitiver Fähigkeiten in einem transgenem APP/PS1 Mausmodell der Alzheimer-Krankheit beschleunigt. Ohne GPR84 zeigen diese Mäuse sowohl eine beschleunigte kognitive Degeneration als auch eine reduzierte Anzahl von Mikroglia, vor allem in den Bereichen rund um die Plaques. Ein Mangel an GPR84 beeinträchtigte weder die Plaquebildung noch die Neurogenese im Hippocampus (Audoy-Rémus et al., 2015).

Agonisten für GPR84 verändern die zelluläre Morphologie und Motilität, induzieren jedoch keine proinflammatorischen Reaktionen in Mikroglia. Da GPR84 ein Rezeptor für mittelkettige Fettsäuren ist (Wang et al., 2006), wurde vermutet, dass die Fettsäuren, die aus geschädigten Gehirnzellen freigesetzt werden, an der Verstärkung der Mikroglia-Motilität durch GPR84 nach einem neuronalen Schaden beteiligt sein könnten (Wei et al., 2017).

### 1.6.3 Gastrointestinale Krankheiten

Mit Hilfe von Microarray-Analysen wurden 122 regulierende Gene in Patienten mit endoskopisch gesicherter, aktiver Colitis ulcerosa identifiziert. Eine Korrelation zum Grad der endoskopischen Aktivität wurde für mehrere Gene, einschließlich GPR84, beobachtet (Planell et al., 2017). Die Behandlung mit einer Anti-TNF $\alpha$ -Therapie über 14 Wochen erniedrigte im Blut die GPR84-Transkription bei Patienten mit Colitis ulcerosa und zeigte eine Korrelation mit der endoskopischen Aktivität der Krankheit. Somit werden GPR84-Transkripte im Blut als potenzieller Aktivitätsbiomarker für die Heilung der Mukosa bei Patienten mit Colitis ulcerosa in Betracht gezogen (Planell et al., 2017). Außerdem weist die Expression von GPR84 in Ghrelin-Zellen sowie in apikalen Zellen der Magen-Mukosa auf eine wichtige Rolle von mittelkettigen Fettsäuren in der sich entwickelnden Magenschleimhaut von säugenden Mäusen hin (Widmayer et al., 2017).

Die Expression von GPR84 im Ösophagusgewebe trägt zur Pathogenese der gastroösophagealen Refluxkrankheit (GERD) bei. Der Fettsäurerezeptor GPR84 war bei Ösophagitis im Ösophagusgewebe stark hochreguliert (Abdel-Aziz et al., 2015). In einem Ratten-Modell von chirurgisch induzierter subchronischer Ösophagitis wurde durch die Behandlung mit Protonenpumpenblocker Omeprazol die Hochregulation von GPR84-Rezeptorexpression vermindert. Dieser Befund wurde durch Western-Blot-Analyse und Immunhistochemie sowohl im Rattengewebe als auch in HET-1A-Zellen, eine physiologische humane Plattenepithelzelllinie der Speiseröhre, bestätigt. Zudem wurde gezeigt, dass GPR84 bei Patienten mit Refluxösophagitis vom Grad B hochreguliert ist (Abdel-Aziz et al., 2015).

#### 1.6.4 Störung im Fettmetabolismus

Zusätzlich zeigten die Daten, dass GPR84 an der Initiierung der Insulinresistenz in Adipozyten unter entzündlichen Zuständen beteiligt sein könnte. In Gegenwart von TNF $\alpha$  konnte MCFAs die Adiponectin-mRNA-Expression durch Bindung an GPR84 in 3T3-L1-Adipozyten nach unten regulieren (Nagasaki et al., 2012). Dazu verstärken MCFAs die Lipopolysaccharid-induzierte IL-12 p40-Produktion durch GPR84 in der Makrophagenzelllinie RAW264.7. Zusammengefasst zeigen die Ergebnisse, dass die GPR84-Expression in Adipozyten als Reaktion auf TNF $\alpha$  aus infiltrierenden Makrophagen hochreguliert wird (Nagasaki et al., 2012). Weitere Studien zeigen, dass GPR84 potenziell den Lipidmetabolismus beeinflussen kann, da GPR84-KO-Mäuse nach einer Diät mit vermehrten langkettigen Fettsäuren eine kleinere Leber und eine erhöhte Akkumulation von Triglyceriden im Myokard und in der Leber im Vergleich zu Kontrolltieren aufweisen (Du Toit et al., 2017).

#### 1.6.5 Fibrose-induzierte autoimmune Erkrankungen

Unter Verwendung von PBI-4050 (3-Pentylbenzolessigsäure), einem synthetischen Analogon einer mittelkettigen Fettsäure, das eine Antagonisten-Ligandenaffinität gegenüber GPR84 zeigt, wurde ein antifibrotischer Weg aufgedeckt (Gagnon et al., 2018). In Experimenten mit GPR84-KO-Mäusen in Modellen der Nierenfibrose (einseitige Ureterenobstruktion, langfristige postakute ischämische Verletzung und Adenin-induzierte chronische Nierenerkrankung) wurde gezeigt, dass GPR84 oder GPR84-mRNA bei Wildtyp-Mäusen bei diesen Krankheiten hochreguliert wurde, während in GPR84-KO-Mäusen die Nierenfibrose in einem Modell der Adenin-induzierten Nephropathie und Zystenformation reduziert wurde (Gagnon et al., 2018). Darüber hinaus hat PBI-4050 durch die Bindung an GPR84 die Fibrose in vielen Verletzungskontexten abgeschwächt. Dies wurde in Modellen an Niere, Leber, Herz, Lunge, Pankreas und Hautfibrose beobachtet (Gagnon et al., 2018). In der Leber moduliert PBI-4050 die intrazelluläre ATP-Konzentration und den LKB1/AMPK/mTOR-Transmissionsweg in Ito-Zellen und zeigt somit eine antifibrotische Aktivität (Grouix et al., 2018). Daher könnte GPR84 ein vielversprechendes molekulares Ziel bei der Behandlung der Fibrose darstellen. PBI-4050 wurde als eine Verbindung bezeichnet, die



bei entzündlichen und Fibrose-bedingten Erkrankungen wirksam sein könnte (Gagnon et al., 2018).

#### 1.6.6 Andere autoimmune Krankheitsbilder

Die potenzielle Beteiligung des Rezeptors an weiteren Krankheitsbildern wurde untersucht. Die Genexpression für GPR84-mRNA ist bei Patienten mit systemischen Lupus Erythematoses mit Lupus Nephritis im Vergleich zu den Patienten mit systemischen Lupus Erythematoses ohne Lupus Nephritis erhöht (Zhu et al., 2016).

#### 1.6.7 Anti-atherosklerotische Eigenschaften

Während GPR84 zahlreiche proinflammatorische Aktivitäten in Makrophagen und Neutrophilen initiiert, besitzt es auch antiatherosklerotische Eigenschaften in Makrophagen. Die Makrophagenrezeptoraktivierung führt zur Hochregulation der Cholesterintransporter ABCA1 und ABCG1 und stimuliert den reversen Cholesterintransport (Gaidarov et al., 2018).

### 1.7 Struktur von Rezeptorproteinen

#### 1.7.1 GPCR

Die Familie der G-Protein-gekoppelten Rezeptoren (GPCRs) ist die größte Rezeptorfamilie mit sieben Transmembran-Regionen als charakteristischem Merkmal, wobei der N-Terminus extrazellulär und der C-Terminus intrazellulär lokalisiert ist (Wittenberger et al., 2001). GPCRs werden durch eine Vielfalt von Stimuli aktiviert: Licht, Ionen, Aminosäuren, Nukleotiden, Lipiden, Peptiden und Proteine (Fredriksson und Schiöth 2005, Wang et al., 2006). Die Aktivierung von GPCRs durch Aminosäuren und andere Liganden wurde durch die 3-dimensionale Kristallstrukturanalyse der Rhodopsin-Rezeptoren bestätigt (Kobilka, 2007). Dabei spielen für die Aktivierung der Signalkaskaden des Rezeptors die ligandenspezifischen, energetisch günstigen Konformationsänderungen eine wichtige Rolle (Kobilka, 2007).

Ein wichtiger Mechanismus für den Informationsaustausch über die Lipidmembran hinweg ist das G-Protein-Signaltransduktionssystem. Wichtige Komponenten dieses Systems sind ein Rezeptor, ein heterotrimerer G-Protein-Komplex von  $G\alpha$ - und  $G\beta\gamma$ -Untereinheiten sowie ein Effektor. Ungefähr ein Tausend der  $\sim 80.000$  Gene beim Menschen kodieren für Rezeptoren mit sieben Transmembranrezeptoren. Einer dieser GPCRs ist der visuelle G-Protein-gekoppelter Rezeptor Rhodopsin, der durch Photonen aktiviert wird (Clapham et al., 1997). Rhodopsin- sowie  $\beta_2$ -adrenerge Rezeptoren gehören der Familie A der GPCRs an (Bockaert et al., 1999), die auch als Klasse A Rhodopsin-ähnliche Rezeptoren bezeichnet wird (Horn et al., 1998).

Die extrazelluläre Seite des G-Protein-gekoppelten Rezeptors dient der Erkennung eines spezifischen extrazellulären Signals. Wenn dieses spezifische Signal auf den Rezeptor eingewirkt hat, ändert sich die Rezeptorkonformation und nun katalysiert die intrazelluläre Domäne die Wechselwirkung mit heterotrimeren G-Protein-Komplex. Dies bewirkt die Freisetzung des Guaninnukleotid-Diphosphats (GDP) aus der  $G\alpha$ -Untereinheit (Clapham et al., 1997). GTP ersetzt das GDP in der Guaninnukleotid-Bindungsstelle von  $G\alpha$  und initiiert Konformationsänderungen in den Schalter-Regionen der  $G\alpha$ -Untereinheit. Diese Änderungen schwächen die Affinität von  $G\alpha$  und  $G\beta\gamma$ , sodass GTP-gebundene  $G\alpha$ - und  $G\beta\gamma$ -Untereinheiten mit anderen Proteinen wechselwirken (Clapham et al., 1997).

### 1.7.2 Konformations-Schalter

Ein Sequenzvergleich zwischen den verschiedenen GPCRs zeigte Rezeptorfamilien auf. Allen Rezeptoren gemeinsam ist das Vorhandensein von sieben Transmembranhelices (TM1 bis 7), die durch drei intrazelluläre (IC1, IC2 und IC3) und drei extrazelluläre (EC1, EC2 und EC3) Schleifen charakterisiert werden (Baldwin, 1993). Zwei Cysteine (einer in EC1 und einer in EC2), die in den meisten GPCRs konserviert sind, bilden eine Disulfid-Verbindung, die wahrscheinlich für die Faltung und für die Stabilisierung einer beschränkten Anzahl von Konformationen dieser sieben TMs wichtig ist. Abgesehen von Sequenzvariationen unterscheiden sich GPCRs in der Länge und Funktion ihrer N-terminalen extrazellulären Domäne, ihrer C-terminalen intrazellulären Domäne und ihrer intrazellulären Schleifen (Bockaert et al., 1999).

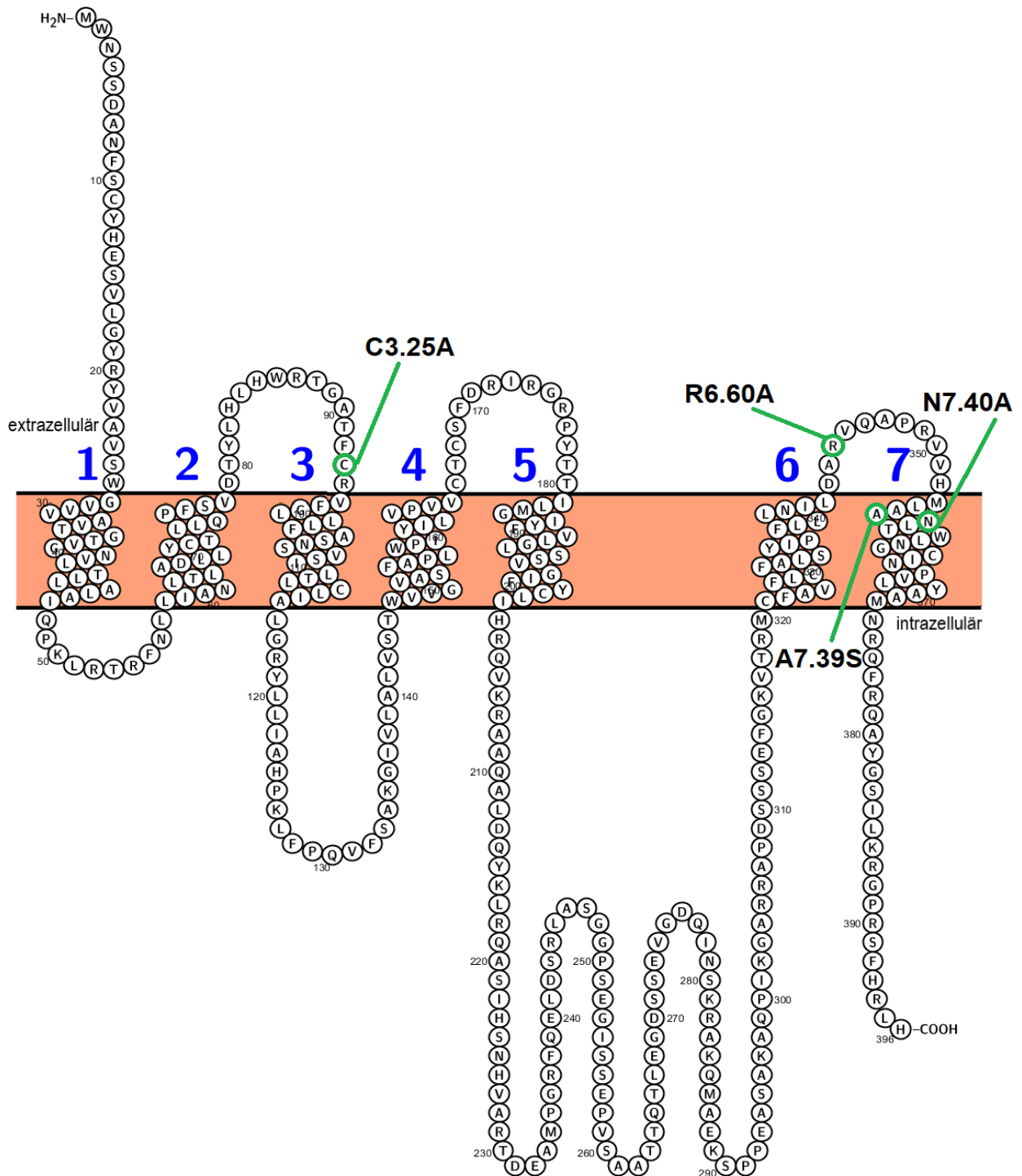
GPCRs weisen aktive und inaktive Konformationen auf. Agonisten stabilisieren die Rezeptorstruktur in ihrer aktiven Form, Antagonisten blockieren die Agonistenwirkung und inverse Agonisten stabilisieren den Rezeptor in seiner inaktiven Form. In Abwesenheit von Liganden wechseln GPCRs spontan zwischen den beiden Konformationen, also zwischen aktiven und inaktiven, und generieren so agonistunabhängige Basisaktivität (Bond et al., 2006, Doi et al., 2016, Milligan, 2003, Seifert et al., 2002). Das Ausmaß dieser spontanen Aktivität unterscheidet sich (Doi et al., 2016, Mehlmann et al., 2004, Mukhopadhyay et al., 2013). Abhängig von der Art des G-Proteins, an das der GPCR gekoppelt ist, kann eine Vielzahl von nachgeschalteten Signalwegen aktiviert werden (Doi et al., 2016). Die intrazelluläre Helix 3 fungiert als ein Konformations-Umschalter bei der Klasse-A-GPCR-Aktivierung. Während der Rezeptoraktivierung wurde für manche Rezeptoren eine Annäherung zwischen den intrazellulären Domänen der TM-Helices 3 und 7 und eine Trennung zwischen den TM-Helices 2 und 6 vermutet (Lans et al., 2015).

### 1.7.3 Bindungsstellen der Liganden

Mittels Homologie-Modellierung des Rezeptors GPR84 wurde eine integrale Rolle von Arg172, das in EC2 lokalisiert ist (Abb. 3.), bei der Erkennung von Liganden wie MCFAs, Embelin und Verbindung-1 (Strukturen siehe Anhang) vermutet (Al Mahmud et al., 2018). Für Versuche wurde Arg172 zu Alanin und zu Lysin im GPR84-Cys352Ile  $G\alpha_{i2}$  Fusionsprotein mutiert. Obwohl der positive allosterische Modulator DIM die volle Aktivität bei beiden Mutanten beibehielt, wurde in den untersuchten Mutanten keine Reaktion durch Caprinsäure, Embelin oder Verbindung-1 ausgelöst. Die Studien legen nahe, dass die hydrophoben Termini dieser Liganden in Richtung des Rezeptorkerns projizieren (Al Mahmud et al., 2018). Eine weitere Studie zeigte, dass das MCFA-Carboxylat tief in den Kern des Rezeptors reichen kann, um mit Asn104 (3.36) zu interagieren (Al Mahmud et al., 2018, Nikaido et al., 2015).

Es wurde festgestellt, dass Caprinsäure, Verbindung 1 und Embelin eine gemeinsame Bindungsstelle teilen, die sich von der DIM-Bindungsstelle unterscheidet und als orthosterische Agonisten bezeichnet werden (Al Mahmud et al., 2018). Patentierte Antagonisten mit Wirkung an GPR84 (WO 2013/092791 A1) waren in der Lage, die

Agonistenwirkungen sowohl von orthosterischen Agonisten als auch des allosterischen Agonisten DIM nicht-kompetitiv durch Bindung an einer Stelle zu blockieren, die sich von der Bindungsstelle dieser Agonisten unterscheidet. Somit wurden drei separate Ligandenbindungsstellen innerhalb von GPR84 identifiziert (Al Mahmud et al., 2018).



**Abb. 3:** Schematische Darstellung der vermuteten zweidimensionalen Struktur des humanen GPR84. Die untersuchten Mutationen: C3.25A (konventionelle Nummerierung: C93A), R6.60A (R344A), A7.39S (S356A) und N7.40A (N357A) in Ballesteros-Weinstein Nummerierung wurden mit grüner Umrandung markiert (Sequenz: uniprot.org/uniprot/Q9NQS5#function abgerufen am 01.07.2018). Erstellt mit: ‚Protter‘ <http://wlab.ethz.ch/protter/> abgerufen am 01.07.2018 (Omasits et al., 2014).

In dieser Studie wurde die Bezeichnung der Aminosäuren nach dem Ballesteros-Weinstein-System verwendet. Die an der höchsten konservierten Aminosäure in der betrachteten Transmembrandomäne wird mit der Position 50 definiert. Die Nummerierung nimmt in Richtung des N-Terminus ab und in Richtung des C-Terminus zu (Ballesteros und Weinstein, 1995).

### 1.8 Zielsetzung

Ziel der Arbeit ist die molekularpharmakologische Analyse des Rezeptors GPR84 mittels zielgerichteter Mutagenese und die Erforschung der Funktion von vier Aminosäuren in zellulär exprimierten Rezeptorkonstrukten. Zusätzlich wird eine Expressionsanalyse durchgeführt. Die Zellen mit den folgenden Konstrukten: C3.25A, R6.60A, A7.39S und N7.40A sollen funktionell-pharmakologisch mittels [<sup>3</sup>H]cAMP- und NFAT-Reporter-Gen-Versuche untersucht werden.

Die Aminosäure C3.25 ist ausgewählt aufgrund der möglichen Rolle in der Disulfidbrückenbildung zwischen den Cysteinen bei Rezeptoraktivierung, sowie bei Wechselwirkungen mit dem Nukleotidagonisten, wie im Fall von P2Y<sub>12</sub>R (Zhang et al., 2014 a, b). Da das Arginin in TM6 eine wichtige Funktion in vielen GPCRs zeigte, wie zum Beispiel R256 bei der Erkennung von Nukleotidagonisten im P2Y<sub>12</sub> Rezeptor (Hoffmann et al., 2008), wurde die Aminosäure R6.60 gewählt. Die Mutante N7.40D, die im TM 7 positioniert ist, hatte eine erniedrigte Caprinsäurenaktivität in GPR84 gezeigt (Nikaido et al., 2015). Somit ebenfalls die im TM7 positionierte Aminosäure A7.39 könnte wie auch N7.40 eine Rolle bei der Rezeptoraktivierung spielen.

Durch die Hemmung der Forskolin-induzierten cAMP-Produktion soll in Rahmen von Versuchen mit [<sup>3</sup>H]cAMP der G<sub>i</sub>-Signalweg analysiert werden. Ein möglicher Ca<sup>2+</sup>-Anstieg kann mittels des NFAT-Versuchs untersucht werden, da die Erhöhung der NFAT-Transkription durch die PLC-Aktivierung und den nachfolgenden [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub>-Anstieg bedingt ist (Cheng et al., 2010). Mittels der Immunfluoreszenzfärbung sollte die Membranexpression von mutierten Rezeptoren untersucht werden.

Mit Hilfe der Zellen mit der C3.25A-Mutante soll die mögliche Rolle einer Disulfidbrücke zwischen den Cysteinresten analysiert werden und mit den Zellen mit den Mutanten R6.60A, A7.39S und N7.40A soll eine mögliche Beteiligung der jeweiligen Aminosäuren

an der Ligandenbindung untersucht werden. Als Agonist wird 2-Hydroxy-Laurinsäure benutzt. Die Identifikation von wichtigen Aminosäuren könnte das Rezeptormodell verbessern und so neue Ansätze für die Arzneimittelentwicklung aufzeigen.

## 2. Material und Methoden

### 2.1 Molekularbiologie

Zur PCR-basierten Amplifikation der DNA wurden zunächst Vektor-DNA5, das Restriktionsenzym Nhe I und Pufferlösung gemischt, verdünnt und bei 22 °C für 20 min inkubiert. Dann wurde das Enzym Nhe I bei 65 °C für 20 min inaktiviert. Nach Zugabe der Primer Lösungen wurde die Lösung im PCR Gerät für 38 Zyklen inkubiert.

### 2.2 Agarosegel-Elektrophorese

Zur Durchführung der Agarosegel-Elektrophorese wurde ein 1 % Agarosegel hergestellt. Nach der Elektrophorese (75 V, 210 mA, 17W) wurde das Agarose-Gel im UV-Transilluminator analysiert.

### 2.3 Transfektion von E. coli

Zunächst wurde DNA mit dem Enzym DPN I gemischt und für 50 min im PCR-Gerät bei 37 °C für 30 min. Dabei wurde die Enzymaktivität durch Erhitzen bei 80 °C für 20 min deaktiviert.

Escherichia coli wurden aus Eis bei 36.8°C aufgetaut. In die Suspension wurden 2 µL DNA-Produkt pipettiert. Die Suspension wurde für 30 min auf Eis inkubiert. Danach wurde eine Hitzeschock-Behandlung durchgeführt, wobei die Bakterien für 30 s in einem Wasserbad mit 42 °C inkubiert wurden. Die Lösung wurde danach für 3 min auf Eis gestellt. Anschließend wurden 200 µL S.O.C. Medium zur Lösung gegeben und bei 36,8 °C für 60 min geschüttelt und inkubiert. 200 µL wurden auf zwei Agarplatten ausplattiert. Sie wurden bei 36 °C für etwa 12 h inkubiert. Die Agarplatten beinhalten das Antibiotikum Ampicillin in Konzentration von 100 µg/mL.

### 2.4 DNA-Präparation

Die DNA-Präparation wurde mittels QIAprep Spin Miniprep Kit nach Angaben des Herstellers durchgeführt.



## 2.5 Zellkultur und Transfektion von CHO-Zellen

CHO-Zellen wurden aufgetaut und ohne Antibiotikum für 24 Stunden mit Medium im Brutschrank inkubiert. Danach wurden Zeocin (100 µg/ mL) den Medien zugesetzt.

Sobald Zellen zu etwa 80-90 % konfluent wurden, wurde das alte Medium entfernt. Die Nährbodenflasche (75 cm<sup>2</sup> Oberfläche) wurde mit PBS Puffer gewaschen. 1,5 mL 0,05 % Trypsin-EDTA-Lösung wurden in die Nährbodenflasche pipettiert und für 2 min bei 36,5°C inkubiert. Nach der Inkubation veränderte sich die Form der Zellen von länglich zu rundlich. Trypsin wurde entfernt. Der Boden der Flasche mit adhären Zellen wurde mit 2 mL Medium abgewaschen. 10 % dieses Volumens (0,2 mL) wurde in die neue Nährbodenflasche pipettiert. Die Nährbodenflasche wurde dann bei 36,5°C und 5,2 % CO<sub>2</sub> inkubiert. In 4 kleinen Nährbodenflaschen (25 cm<sup>2</sup> Oberfläche) wurde das Medium durch das Medium ohne Antibiotikum ersetzt.

Rezeptor-DNA im Vektor pc\_DNA5 wurde mit dem Vektor pOG 44 gemischt (1 µg Vektor pc-DNA5 + 9 µg pOG 44). Mittels Lipofectamin 2000 wurde nach Herstellerangaben die Transfektion der CHO-Zellen durchgeführt. Die transfizierten Zellen wurden in Medium mit Hygromycin (500 µg/ mL) selektioniert.

## 2.6 Immunfluoreszenz-Untersuchungen

Die Analyse der Rezeptorexpression wurde mit LSM (laser scanning microscopy) durchgeführt. Es wurden FITC-gekoppelte Antikörper benutzt, die direkt an ein intrazelluläres Rezeptor-Epitop binden. Glasplättchen mit kultivierten Zellen wurden mit HBSS gewaschen. Die Zellen wurden dann mit 2 mL Methanol für 5 min fixiert. Nach dem Waschen werden die Zellen mit 1 mL Block-Lösung inkubiert. Die Block-Lösung enthielt 18 mL HBSS, 2 mL 10 % FBS und 40 µL 2 % Triton x 100. Nach 20 min Wartezeit wurde die Block-Lösung mit einer Pipette entfernt. 2 µL FITC-gekoppelte Antikörper-Lösung wurden zu 1 mL Block-Lösung hinzugegeben. Die Antikörper wurden mit der Block-Lösung im Verhältnis 1:500 verdünnt. 225 µL der verdünnten Antikörper-Lösung wurden auf die Zellen hinzugefügt. Zellen auf den Glasplättchen wurden für 1 h in einer lichtundurchlässigen Box bei Raumtemperatur inkubiert und dann mit HBSS gewaschen. Zur detaillierten Beschreibung der Materialien siehe Anhang.

Zur mikroskopischen Analyse wurden die Gläschen in einem Kunststoffrahmen platziert. Sie wurden mit HBSS gewaschen und mit HBSS überschichtet. LSM Konfiguration: Zeiss LSM 700, Anregungswellenlänge bei 488 nm, Verstärkung 1.0, Auflösung in X- und Y-Achsen 0.1  $\mu\text{m}$ , Objektiv: Plan-Apochromat 40 x/ 1.3 Oil DIC M27.

## 2.7 Versuche mit Tritium markiertem cAMP

Für die pharmakologische Analyse wurden die Zellen in Zellkulturplatten mit 24 Vertiefungen überführt (für das Ablösen mit Trypsin-EDTA-Lösung siehe oben).

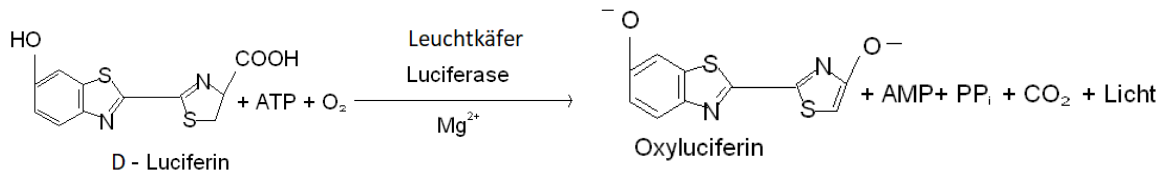
2-Hydroxy-Laurinsäure wurde als Agonist benutzt. Der Agonist wurde in DMSO zu den folgenden Konzentrationen gelöst: 10000  $\mu\text{M}$ , 3000  $\mu\text{M}$ , 1000  $\mu\text{M}$ , 300  $\mu\text{M}$ , 100  $\mu\text{M}$ , 30  $\mu\text{M}$  für die Wildtyp-Zellen und die Zellen mit den Mutationen R6.60A und A7.39S und 10000  $\mu\text{M}$ , 3000  $\mu\text{M}$ , 2000  $\mu\text{M}$ , 1000  $\mu\text{M}$ , 600  $\mu\text{M}$ , 300  $\mu\text{M}$ , 100  $\mu\text{M}$ , 30  $\mu\text{M}$  für die Zellen mit den Mutationen C3.25A und N7.40A.

2-Hydroxy-Laurinsäure wurde im Volumen von 1  $\mu\text{L}$  in steigenden Konzentrationen in die Zellkulturplatten pipettiert. 1  $\mu\text{L}$  DMSO wurde zu Proben ohne 2-Hydroxy-Laurinsäure hinzugegeben. 100  $\mu\text{L}$  Forskolin-Lösung (10  $\mu\text{M}$ ) wurden zu allen Vertiefungen mit Ausnahme der negativen Probe pipettiert und für 15 min bei 37 °C inkubiert (Endvolumen jeweils 1 mL). Danach wurde der Überstand entfernt. Die Zellen wurden mit heißer 0,5 M EDTA-Lösung (500 mL) aufgebrochen. Das Bindeprotein wurde aufgetaut und mit Puffer A, ohne Sukrose im 1:10 Verhältnis verdünnt. 30  $\mu\text{L}$  Tritium wurden in jedem Röhrchen pipettiert. 40  $\mu\text{L}$  Bindeprotein-Lösung wurden in jedem Röhrchen, außer der negativen Kontrolle hinzugefügt. Danach wurde die Zellkulturplatte für 60 min auf Eis inkubiert. Die Lösung wurde nach dem Hinzufügen einer Kohlensuspension (3 %) zentrifugiert und Radioaktivität nach Zugabe von Szintillatorflüssigkeit im Szintillatorgerät bestimmt. Die Konzentration von endogenen cAMP wurde mittels einer Eichkurve bestimmt.

## 2.8 pNFAT-Luciferase Versuche

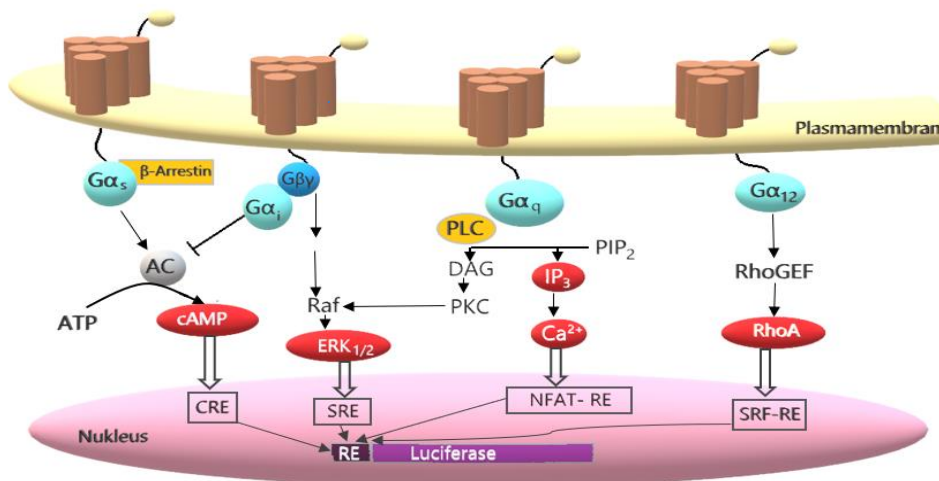
Ein häufig verwendetes Reporter-gen ist das Luciferase-Gen aus dem Leuchtkäfer *Photinus pyralis*. Dieses Gen kodiert für das 61 kDa Enzym Luciferase. Dieses Enzym oxidiert das D-Luciferin (Abb. 4.) in Gegenwart von ATP, Sauerstoff und  $\text{Mg}^{2+}$  und liefert

Photonen, die durch Messung in einem Plattenlesegerät quantifiziert werden können (Smale, 2010).



**Abb. 4:** Die Luciferase-Reaktion: Die Mono-Oxygenierung des D-Luciferins wurde von der Luciferase in Anwesenheit von ATP, molekularem Sauerstoff und Mg<sup>2+</sup> katalysiert, modifiziert nach Smale, 2010.

Der Vektor für das Rezeptorversuch enthielt das NFAT-Response Element (NFAT-RE), das Ca<sup>2+</sup>-Konzentrationserhöhungen registriert (Abb. 5.). Aktivierung des Gα<sub>q</sub> bewirkt eine Erhöhung von Inositoltriphosphat, das zur Steigerung der intrazellulären Ca<sup>2+</sup>-Konzentration führt, wodurch die endogene Transptionsfaktoren an NFAT-RE binden und die Expression der Luciferase aktivieren und so das Lichtsignal steigert (Cheng et al., 2010).



**Abb. 5:** Wichtigste GPCR-Signalwege und die korrespondierende Luciferase Reportergen-Vektoren. Nach Stimulation aktivieren die Gα<sub>s</sub>-gekoppelte Rezeptoren die Adenylylcyclase (AC), was zu einer Erhöhung von cAMP führt. Die Gα<sub>i</sub>-gekoppelte Rezeptoren hemmen AC und die βγ-Untereinheiten aktivieren den ERK<sub>1/2</sub>-Weg. Die Gα<sub>q</sub>-gekoppelte Rezeptoren aktivieren die Phospholipase C (PLC), um Inositoltriphosphat (IP<sub>3</sub>) und Diacylglycerol (DAG) zu erzeugen, was wiederum die intrazelluläre Calciumkonzentration (Ca<sup>2+</sup>) erhöht. Zusätzlich wird durch DAG der ERK<sub>1/2</sub>-Weg aktiviert. Die Gα<sub>12</sub>-gekoppelte Rezeptoren aktivieren die kleine G-Protein-RhoA-GTPase, modifiziert nach Cheng et al., 2010.

Im p-NFAT-Luciferase Assay werden die Zellen ohne Selektionsantibiotika kultiviert (siehe oben). Zur Transfektion wurde nach dem Mediumwechsel 10 µg pNFAT-luc Reporter-gen-Vektor und 25 µL Lipofectamin 2000 verwendet. Die Zellen wurden für 18 h bei 37 °C, 5,2 % CO<sub>2</sub> inkubiert. Danach wurden Zellen nach Trypsin-Behandlung in Zellkulturplatten mit 24 Vertiefungen überführt (siehe oben).

Nach Waschen der Zellen mit HBSS wurden die Zellen für 1 h bei 36,5 °C, 5,2 % CO<sub>2</sub> inkubiert. 2-Hydroxy-Laurinsäure wurde als Agonist genutzt und dafür in DMSO gelöst und verdünnt. Zu Kontrollversuchen wurde jeweils DMSO in gleiche Menge hinzugegeben. Zellen wurden für 3 h bei 36,5 °C, 5,2 % CO<sub>2</sub> inkubiert. Das Medium wurde dann entfernt. 50 µL HBSS und 50 µL Lyse-Puffer/ Luciferase-Substrat wurden zu jeder Vertiefung hinzugefügt und für 3 min inkubiert. 80 µL Überstand wurden in eine Vertiefung einer 96-Well-Platte pipettiert. Aufgrund der starken Lichtempfindlichkeit des Luciferase-Enzyms wurde die Luciferase-Assay-Platte danach in einer schwarzen Box zum Messgerät (BMG Labtech, FLUOstar OPTIMA) transportiert. Gesamtmessdauer 94 s, Zahl der Messzyklen: 3, Messungsinterval 3 s.

## 2.9 Pharmaka und Lösungsmittel

Die Quelle der verwendeten Pharmaka und verwendeten Lösungsmittel werden folgend erwähnt.

Für PCR: Blue Juice Gel Loading Puffer von Invitrogen, 1 kB Plus DNA- Leiter von Invitrogen, Enzym Nhe I, Platinum PCR SuperMix mit Taq Antikörper von Invitrogen, Enzym ACCU Prime Pfx SuperMix von Invitrogen, 1% Agarose-Gel von SERVA, 1 x TAE von Invitrogen, Ethidiumbromid von Invitrogen, wurden benutzt. Alle Oligonukleotiden stammen von biomers.net (siehe S. 89).

Für die Immunfluoreszenz-Versuche Triton von Sigma Aldrich, Anti-V<sub>5</sub>-FITC Antikörper von Invitrogen und Methanol von Sigma Aldrich benutzt (siehe S. 95).

Für den Versuch mit radioaktiv markiertem cAMP: DPBS ohne Ca<sup>2+</sup>/Mg<sup>2+</sup> von gibco by life technologies, 0.05 % Trypsin- EDTA, 10 µM Forskolin in EtOH / DMSO im 7:1 Verhältnis, DMSO 99,5 % von Sigma Aldrich, 1600 pmol cAMP in 5 mL H<sub>2</sub>O dist., Amersham Pharmacia, Biotech UK Limited, Kohlenstoff Suspension von Sigma Aldrich.

Das Bindeprotein wurde mit Protein aus der Nebennierenrinde vom Rind von der Arbeitsgruppe Kügelgen hergestellt, 5 mg/mL aus einer externen Rindschlacht. Tritium-markiertes cAMP von Perkin Elmer Life and Analytical Science, Lamagel Szintillator Gel und Puffer A ohne Sukrose von Sigma Aldrich wurden benutzt (siehe S. 94).

Für den Versuch mit p-NFAT-Luciferase Assay: 100  $\mu$ L NFAT\_luc vom Invitrogen und Lipofectamin 2000 von Invitrogen benutzt (siehe S. 94).

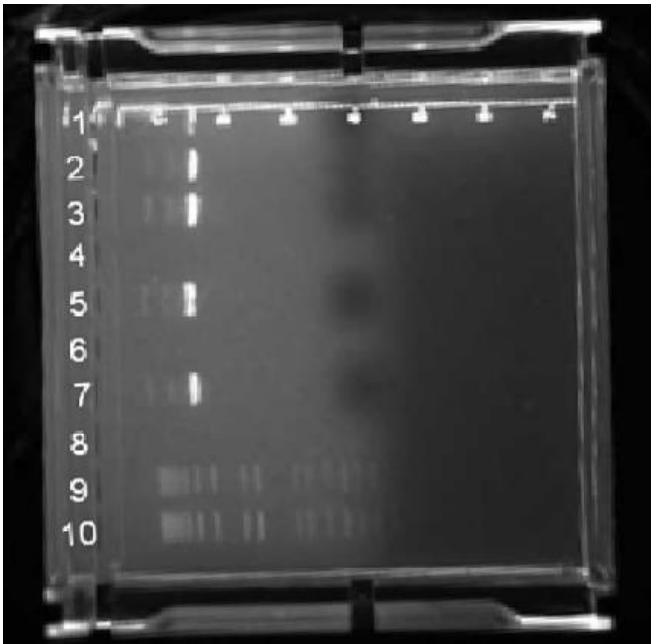
## 2.10 Statistik

Die Daten der [ $^3$ H]cAMP- und NFAT-Reporter-gen-Versuchen und der Immunfluoreszenz-Analyse wurden mit Hilfe des GraphPad Prism 4 Programms ausgewertet. Die Mittelwerte mit SEM wurden berechnet. Es wurde eine Varianzanalyse (ANOVA) und Bonferroni Post-Tests durchgeführt. Als die Signifikanzgrenze wurde  $P < 0,05$  definiert. Weiter wurden  $EC_{50}$ -Konzentrationen durch Anpassen einer sigmoidalen Kurve an die Daten geschätzt.

### 3. Ergebnisse

#### 3.1 Molekularbiologie

Mittels PCR-Reaktionen mit mutagenen Primern wurden zielgerichtet Mutanten der kodierenden DNA des humanen GPR84-Rezeptors erzeugt. Das Ergebnis einer Agarose-Gel-Elektrophorese mit PCR-Produkten ist beispielhaft in Abbildung 6 gezeigt:

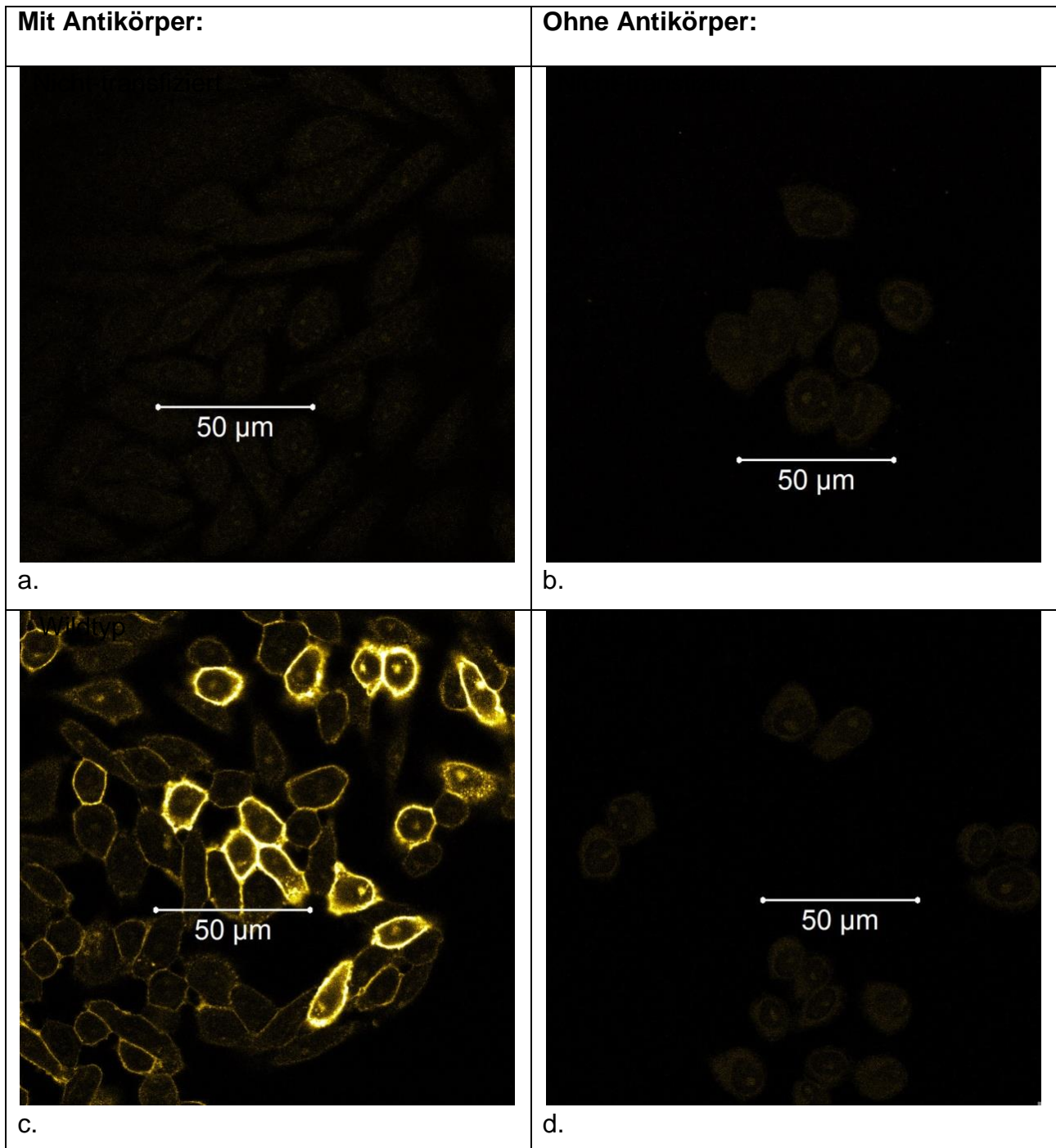


**Abb. 6:** Agarosegelelektrophorese von PCR-Produkten des humanen GPR84-Rezeptors, bei denen Arginin (R) durch Alanin (A) in Position 6.60 ausgetauscht wurde. Farbstoff Ethidiumbromid. Spuren 9 und 10: 1 kilo Basenpaar (kbp) DNA-Leiter.

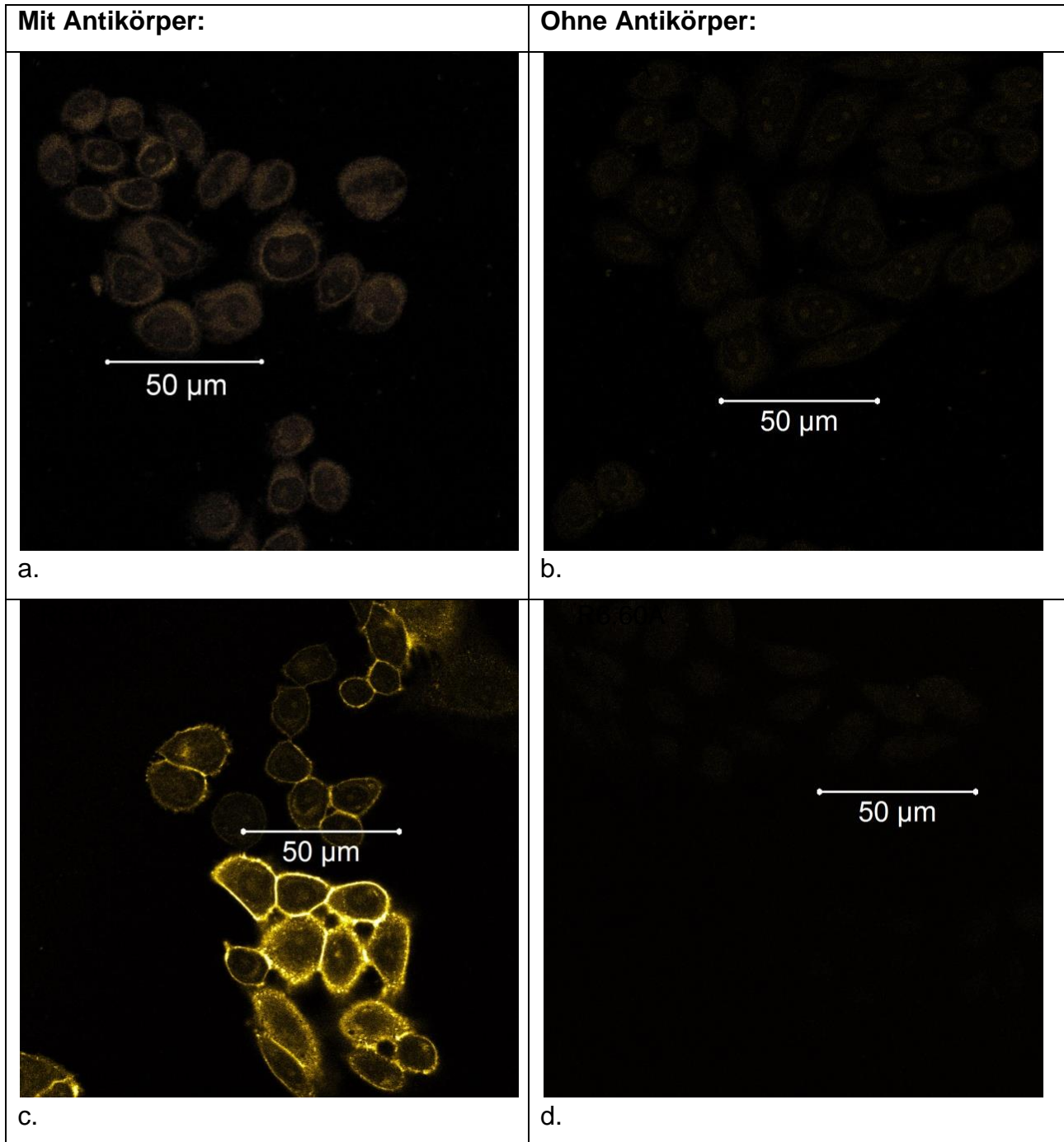
Die DNA wurde in Expressions-Vektoren (hGPR84 C3.25A\_C pcDNA5, hGPR84 N7.40A\_B pcDNA5, hGPR84 R6.60A\_C pcDNA5, hGPR84 A7.39S\_B pcDNA5) kloniert. Diese wurden durch die Firma GATC Köln sequenziert und für die Transfektion von CHO-Zellen verwendet.

#### 3.2 Expressionsanalyse

Mit Immunfluoreszenz-Analyse wurde die Rezeptorexpression gemessen. Fluorescein-5-isothiocyanat (FITC)-gekoppelte Antikörper gerichtet gegen ein intrazelluläres Rezeptor-Epitop wurden dafür verwendet. Die emittierte Lichtintensität korreliert somit mit der Stärke der Rezeptorexpression in Wildtyp- und Mutanten-Zellen.

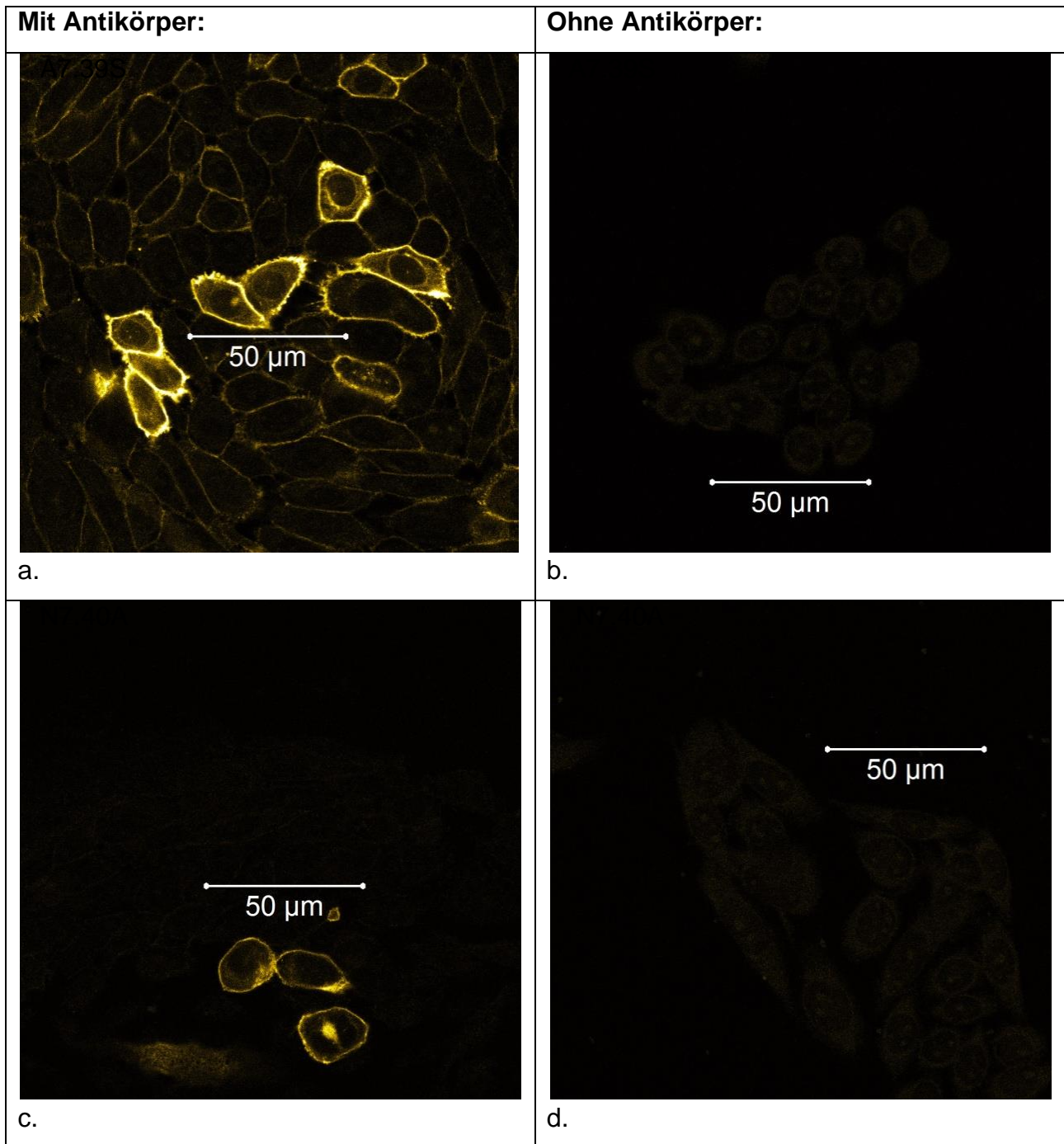


**Abb. 7 a und b:** Nicht-transfizierte Zellen, **c und d:** Wildtyp Zellen. Analyse der Rezeptorexpression mit LSM (laser scanning microscopy), mit Hilfe von FITC-gekoppelten Antikörpern, die direkt an einem Rezeptor-Epitop binden. Fluoreszenzmikroskop von Zeiss, 488 nm Exzitationswellenlänge, 2,02  $\mu\text{s}$ / Pixel und 40-x-Objektiv. Alle Aufnahmen sind Ausschnitte von Originalbildern von jeweils einem Konstrukt mit und ohne Antikörpermarkierung. Größenmaßstab 50  $\mu\text{m}$ . Beispielhafte Analysen mit mindestens 13 Wiederholungen.



**Abb. 8:** Zellen mit der **a** und **b**: C3.25A Mutante, **c** und **d**: R6.60A Mutante des humanen GPR84 Rezeptors. Weitere Details siehe Abb. 7.





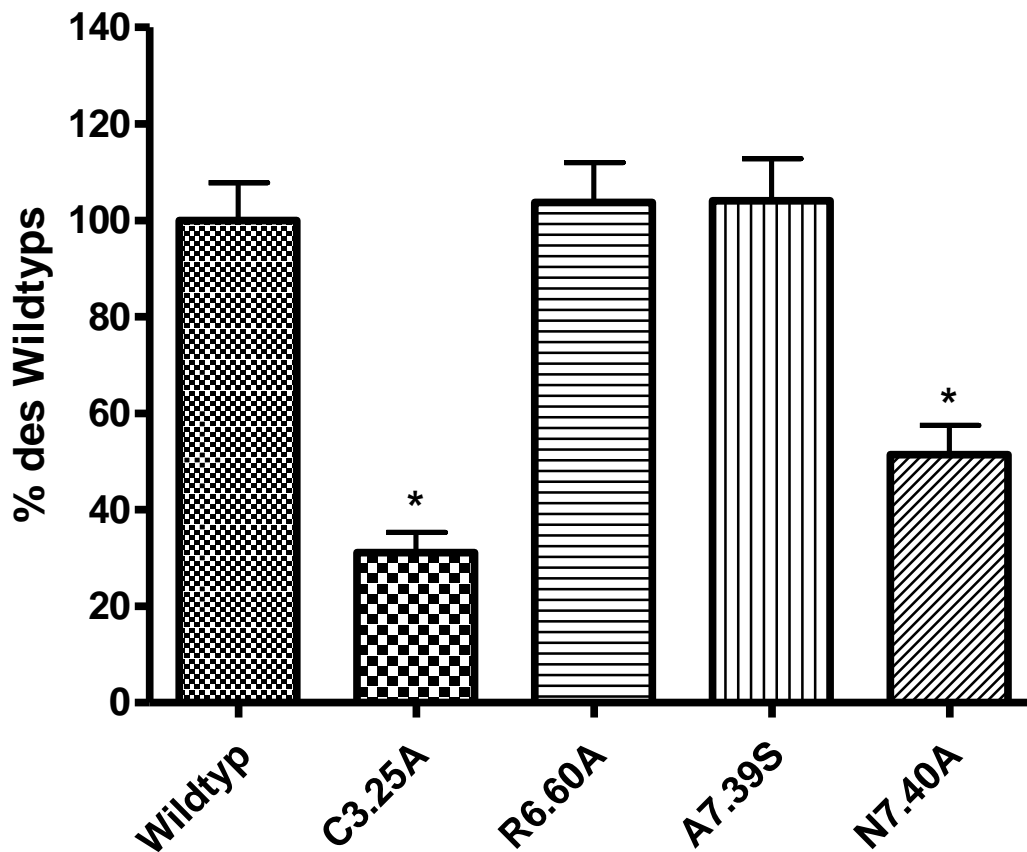
**Abb. 9:** Zellen mit **a** und **b**: A7.39S Mutante, **c** und **d**: N7.40A Mutante des humanen GPR84 Rezeptors. Weitere Details siehe Abb. 7.

**Tab. 8:** Mittelwerte der Relativen Lichteinheiten (RLU) gemessen an der Zellmembran und Abweichung in SEM in nicht-transfizierten Zellen und Zellen mit Rezeptorkonstrukten des humanen GPR84. Alle transfizierten Zelltypen wurden mit nicht-transfizierten Zellen verglichen (signifikante Unterschiede mit # markiert) und mit Zellen mit Wildtyp-Rezeptor (signifikanter Unterschied mit \* markiert). Alle Zellen mit Antikörper wurden zudem mit Zellen ohne Antikörper (signifikante Unterschiede mit † markiert) verglichen. Die Anzahl der ausgewerteten Zellen wurde mit „n“ angegeben (12-25 Färbeversuche). P< 0,001: \*\*, P< 0,01: #, P< 0,001: ## und P< 0,01: †, P< 0,001: †† entsprechend. ANOVA-Analyse mit Bonferroni Post-Tests.

<b>Immunfluoreszenz in der Zellmembran</b>	<b>Mit Antikörper (RLU) ± SEM</b>	<b>Ohne Antikörper (RLU) ± SEM</b>
<b>Nicht- transfiziert</b>	2133 ± 146 ** n=25	2002 ± 107 n=12
<b>Wildtyp</b>	39646 ± 2950 # #                    †† n= 32	1635 ± 138 n=16
<b>C3.25A</b>	12923 ± 1591 ** #                    † n=31	1016 ± 112 n=14
<b>R6.60A</b>	40197 ± 3155 # #                    †† n=26	788 ± 47,6 n=24
<b>A7.39S</b>	40840 ± 3319 # #                    †† n=25	1288 ± 121 n=16
<b>N7.40A</b>	20632 ± 2303 ** # #                    †† n=24	1025 ± 96,1 n=20

Digitalisierte Daten wurden mittels ANOVA-Analyse und Bonferroni Post-Tests bei allen Konstrukten ausgewertet (Abb. 7 bis 9, Tab. 8 und 9).

### Immunfluoreszenz in der Zellmembran, %



**Abb. 10:** Darstellung der Expression in der Zellmembran in % der Werte von Zellen mit dem Wildtyp GPR84. Die Rezeptorexpression wurde mittels Immunfluoreszenz im Bereich der Zellmembran mit Hilfe von FITC-gekoppelten Antikörpern gemessen. Mittelwerte  $\pm$  SEM von 12-32 ausgewerteten Zellen. Der Basalhintergrundwert wurde jeweils abgezogen. Es wurde die Lichtintensität der unterschiedlichen Zelltypen gemessen und mit Werten von Zellen mit dem Wildtyp-Rezeptor verglichen (ANOVA- und Bonferroni Post-Tests). Signifikante Unterschiede zu Wildtyp-Rezeptoren:  $P < 0,01$ : \*.

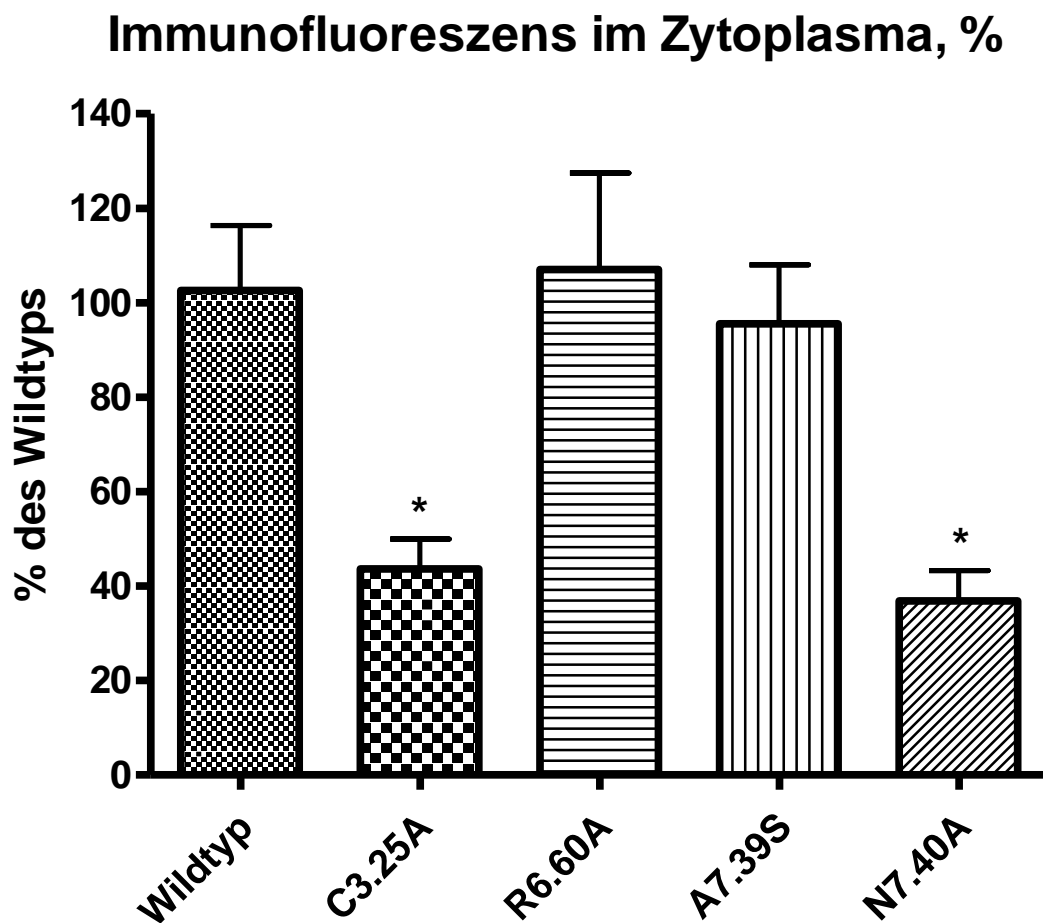
Wie in Tab. 8 gezeigt ist, zeigten die Zellen, die mit dem genetischen Material für Wildtyp-Rezeptor transfiziert wurden, im Rahmen der Immunfluoreszenzanalyse in der Zellmembran ein eindeutig stärkeres Signal als die nicht transfizierten Zellen. Im Vergleich zu Zellen mit Wildtyp-Rezeptor waren nur 33 % des Signals bei der C3.25A-

Mutante nachweisbar. Das Rezeptorkonstrukt N7.40A zeigte ebenfalls eine erniedrigte Signalstärke (52 %, Abb. 10). Die Expressionswerte der anderen Konstrukte unterschieden sich nicht von denen des Wildtyp-Rezeptors (Abb. 10).

**Tab. 9:** Mittelwerte der relativen Lichteinheiten (RLU) gemessen im Zytoplasma und Abweichung in SEM in nicht-transfizierten Zellen und Zellen mit Rezeptorkonstrukten des humanen GPR84. Alle transfizierten Zelltypen wurden mit nicht-transfizierten Zellen verglichen (signifikante Unterschiede mit # markiert) und mit Zellen mit Wildtyp-Rezeptor (signifikante Unterschiede mit \* markiert). Alle Zellen mit Antikörper wurden zudem mit Zellen ohne Antikörper (signifikante Unterschiede mit † markiert) verglichen. Die Anzahl der ausgewerteten Zellen wurde mit „n“ angegeben. Weitere Details siehe Tab. 8.

<b>Immunfluoreszenz im Zytoplasma</b>	<b>Mit Antikörper (RLU) ± SEM</b>	<b>Ohne Antikörper (RLU) ± SEM</b>
<b>Nicht- transfiziert</b>	1614 ± 109 ** n=25	1535 ± 81,0 n=12
<b>Wildtyp</b>	5987 ± 616 # #                    †† n= 32	1440 ± 155 n=16
<b>C3.25A</b>	2627 ± 287 ** n=31	602 ± 72,5 n=14
<b>R6.60A</b>	5313 ± 933 # #                    †† n=26	453 ± 29,4 n=24
<b>A7.39S</b>	5023 ± 566 # #                    †† n=25	674 ± 59,1 n=16
<b>N7.40A</b>	2192 ± 295 ** n=24	470 ± 31,1 n=20

Gefärbte Zellen ohne GPR84-Rezeptor zeigten keine Unterschiede in Stärke der Fluoreszenz in der Membran und in Zytoplasmata im Vergleich zu den nicht transfizierten Zellen ohne Antikörpermarkierung (Abb. 10 und Tab. 9). Zellen mit den Mutanten C3.25A und N7.40A sowie Zellen ohne GPR84-Rezeptor weisen eine erniedrigte Fluoreszenz im Zytoplasma auf im Verhältnis zu den Zellen mit dem Wildtyp-Rezeptor. Die Zellen mit den Mutanten R6.60A und A7.39S sowie Zellen mit dem Wildtyp-Rezeptor zeigen ein erhöhtes Fluoreszenzsignal im Vergleich zu den nicht-transfizierten (ohne GPR84-Rezeptor) Zellen (Tab. 9).



**Abb. 11:** Darstellung der Expression im Zytoplasma in % der Werte von Zellen mit dem Wildtyp GPR84. Die Rezeptorexpression wurde gemessen mittels Immunfluoreszenz im Bereich des Zytoplasmas mit Hilfe von FITC-gekoppelten Antikörpern. Mittelwerte  $\pm$  SEM von 12-32 ausgewerteten Zellen. Der Basalhintergrundwert wurde jeweils abgezogen. Es wurde die Lichtintensität der unterschiedlichen Zelltypen gemessen und mit Werten von Zellen mit dem Wildtyp-Rezeptor verglichen. Weitere Details siehe Abb. 10.

Wie in Abb. 11 gezeigt ist, weisen die Zellen, die mit dem genetischen Material für Wildtyp-Rezeptor transfiziert wurden, im Rahmen der Immunfluoreszenzanalyse im Zytoplasma ein eindeutig stärkeres Signal als die Mutanten C3.25A und N7.40A. Im Vergleich zu Zellen mit Wildtyp-Rezeptor waren nur 45 % des Signals bei der C3.25A-Mutante nachweisbar. Das Rezeptorkonstrukt N7.40A zeigte ebenfalls eine erniedrigte Signalstärke (38 %, Abb. 11). Die Zellen mit den Konstrukten R6.60A und A7.39S zeigten kein Unterschied zu den Zellen mit Wildtyp-Rezeptor.

Insgesamt ist die membranständige Signalstärke in allen Rezeptorkonstrukten höher als die zytoplasmatische. Signifikante Unterschiede mit  $P < 0,001$  wurden bei allen Zellen mit Rezeptorkonstrukten beobachtet, während die nicht transfizierten Zellen mit  $P > 0,05$  kein Unterschied in der Immunfluoreszenzstärke zwischen Zellmembran und Zytoplasma aufwiesen.

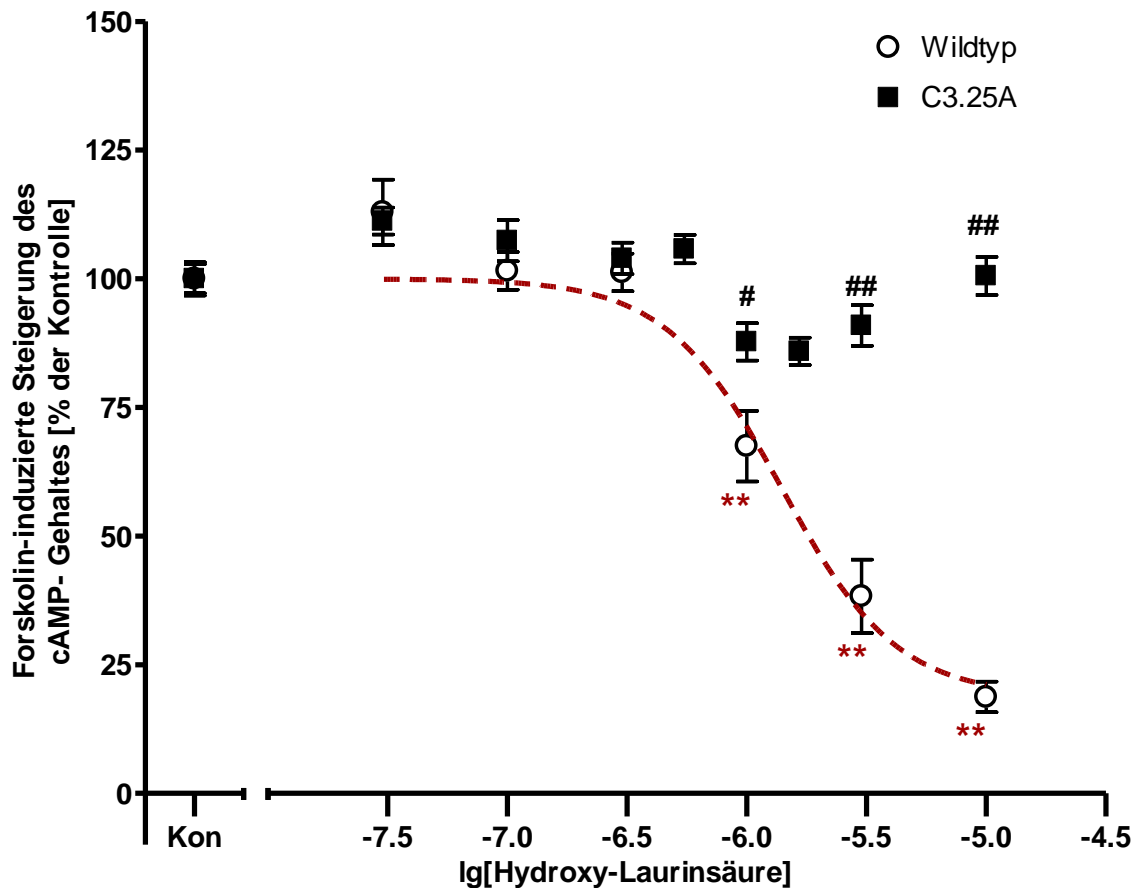
### 3.3 [ $^3\text{H}$ ]-cAMP-Versuche

Die basalen cAMP-Werte lagen im Bereich der Nachweisgrenze. In Anwesenheit des direkten Stimulators des Enzyms Adenylylcyclase Forskolin in der Konzentration von 10  $\mu\text{M}$  wurden bei allen Zelltypen die gemessenen cAMP Werte deutlich gesteigert (Tab. 11). Die Hemmung der cAMP-Produktion durch Zugabe einer bestimmten Konzentration von der 2-Hydroxy-Laurinsäure wurde als prozentualer Anteil der cAMP-Werte ohne 2-Hydroxy-Laurinsäure berechnet.

In Zellen mit Wildtyp-Rezeptor wurde eine konzentrationsabhängige Hemmung der cAMP-Produktion nach Zugabe von 2-Hydroxy-Laurinsäure gezeigt. In Zellen mit den Mutanten C3.25A war keine Hemmung der cAMP-Produktion nachweisbar (Abb.12). Dagegen zeigten Zellen mit der Mutante R6.60A eine Hemmung der Rezeptoraktivität nach Zugabe der gleichen Fettsäure (Abb.13). An Zellen mit der Mutante A7.39S zeigt die Konzentration-Wirkungskurve eine Linksverschiebung (Abb.14). An Zellen mit der Mutante N7.40A beobachtet man eine abgeschwächte Hemmung der Rezeptoraktivität (Abb.15). Die höchste scheinbare Aktivierbarkeit (gemessen am  $\text{EC}_{50}$ -Wert für 2-Hydroxy-Laurinsäure) weist das A7.39S-Konstrukt auf (Tab. 10).

**Tab. 10:** Basale cAMP-Werte und Abweichung in SEM in Zellen mit dem Wildtyp-Rezeptor sowie der Mutanten C3.25A, R6.60A, A7.39S, und N7.40A in Versuchen mit Tritium markierten cAMP. Signifikante Unterschiede zu den basalen cAMP Werten (mit † markiert). Signifikante Unterschiede bei gleicher Agonistenkonzentration zu Zellen mit dem Wildtyp-Rezeptor (mit # markiert) und signifikante Unterschiede zu den Werten in Anwesenheit von 10 µM Forskolin (mit \* markiert). Die jeweilige Anzahl der ausgewerteten Versuche wurde mit „n“ gekennzeichnet. Mit „n.b.“ die nicht bestimmbar Werte gekennzeichnet. P < 0,001: \*\* und entsprechend ## oder ††.

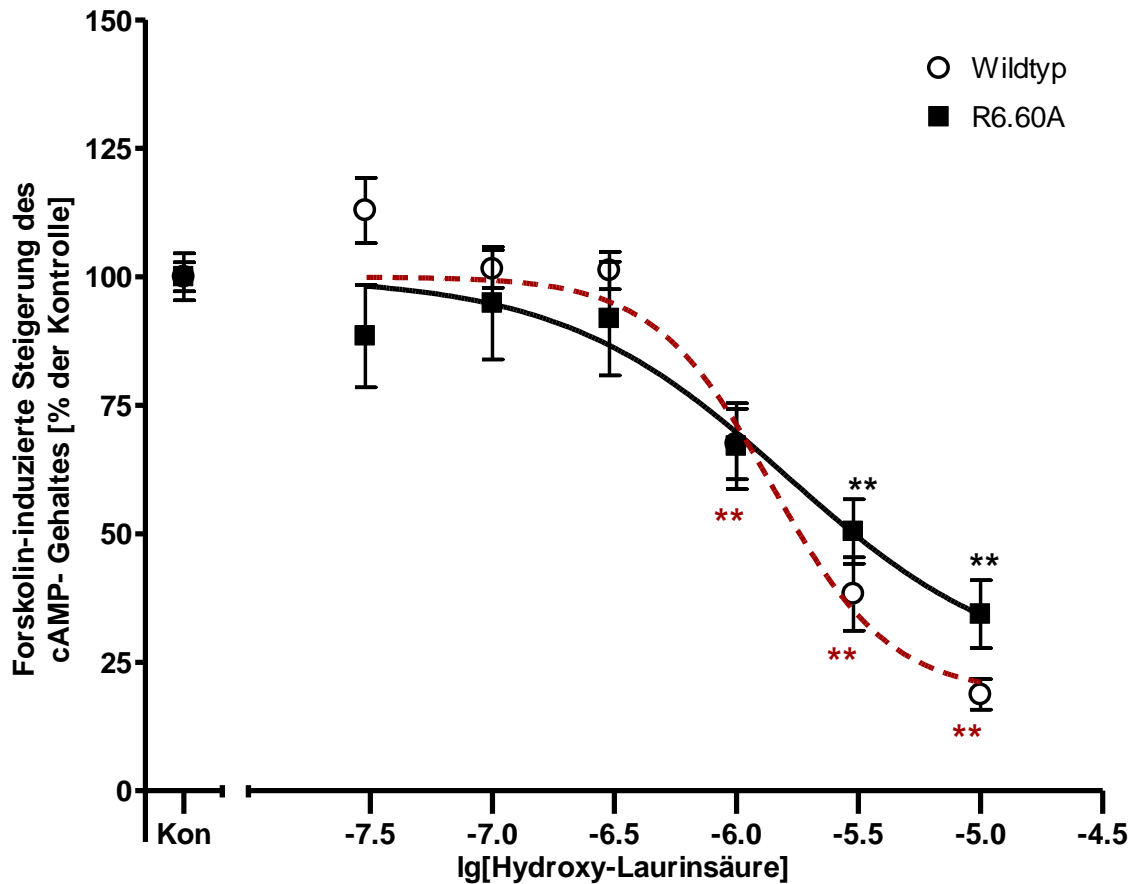
	<b>Basale cAMP Werte</b> (pmol/ 500 µL)	<b>cAMP in Anwesenheit von 10 µM Forskolin</b> (pmol/ 500 µL)	<b>cAMP in Anwesenheit von 10 µM 2-Hydroxy-Laurinsäure</b> (% der Kontrolle in Anwesenheit von Forskolin ohne 2-Hydroxy-Laurinsäure)	<b>Scheinbarer EC<sub>50</sub>-Wert für 2-Hydroxy-Laurinsäure</b> (µM)
<b>Wildtyp</b>	0 (n.b.) n=10	16,0 ± 1,6 n=19	18,7 ± 3,0 n=11 **	1,4
<b>C3.25A</b>	0,7 ± 0,8 n=14	24,0 ± 1,1 n=27 ††	100,1 ± 3,7 n=21 ##	n.b.
<b>R6.60A</b>	0,2 ± 0,3 n=10	15,7 ± 1,7 n= 20 ††	34,4 ± 6,6 n=13 **	1,6
<b>A7.39S</b>	1,5 ± 0,9 n=8	14,9 ± 1,4 n=16 ††	6,9 ± 4,5 n=11 **	0,4
<b>N7.40A</b>	0 (n.b.) n=12	17,7 ± 1,8 n=24	68,1 ± 12,1 n=12 ##	1,0



**Abb. 12:** [ $^3\text{H}$ ]-cAMP-Versuch: Die Wirkung von 2-Hydroxy-Laurinsäure in Zellen mit den Wildtyp-Rezeptoren und der C3.25-Mutante in Gegenwart von Forskolin 10  $\mu\text{M}$ . Mittelwerte  $\pm$  SEM von 11-27 Versuchen für die Mutante und 11-19 für den Wildtyp. Signifikante Unterschiede zu Werten ohne 2-Hydroxy-Laurinsäure (KON) (ANOVA- und Bonferroni-Multiple-Comparison-Post-Test),  $P < 0,001$ : \*\*. Signifikante Unterschiede bei gleicher Agonistenkonzentration (ANOVA und Bonferroni-Multiple-Comparison-Post-Test),  $P < 0,01$ : #,  $P < 0,001$ : ##. Inkubationszeit: 15 min.

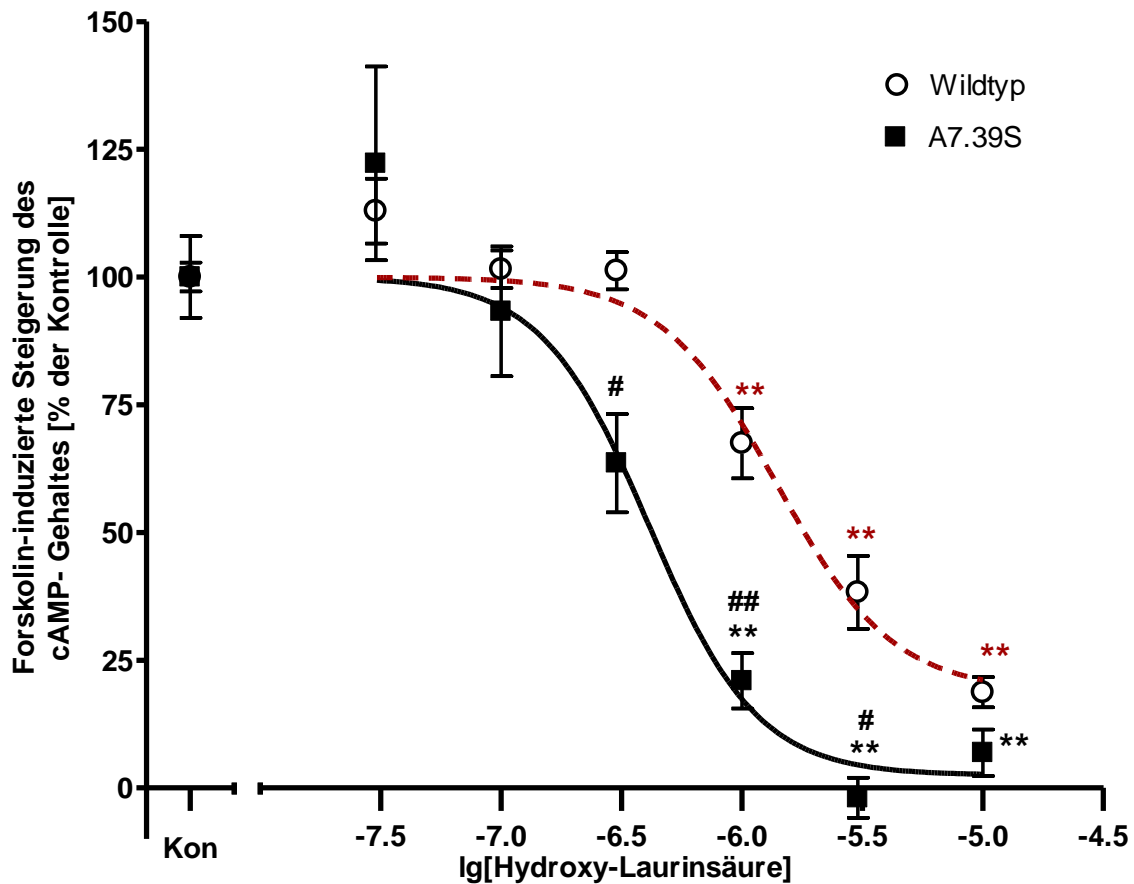
Abbildung 12 zeigt einen Wirkungsverlust von der Mutante C3.25A im Vergleich zu Zellen mit Wildtyp-Rezeptor. Der scheinbare  $\text{EC}_{50}$ -Wert beträgt beim Wildtyp 1,4  $\mu\text{M}$  und ist bei C3.25A nicht bestimmbar.





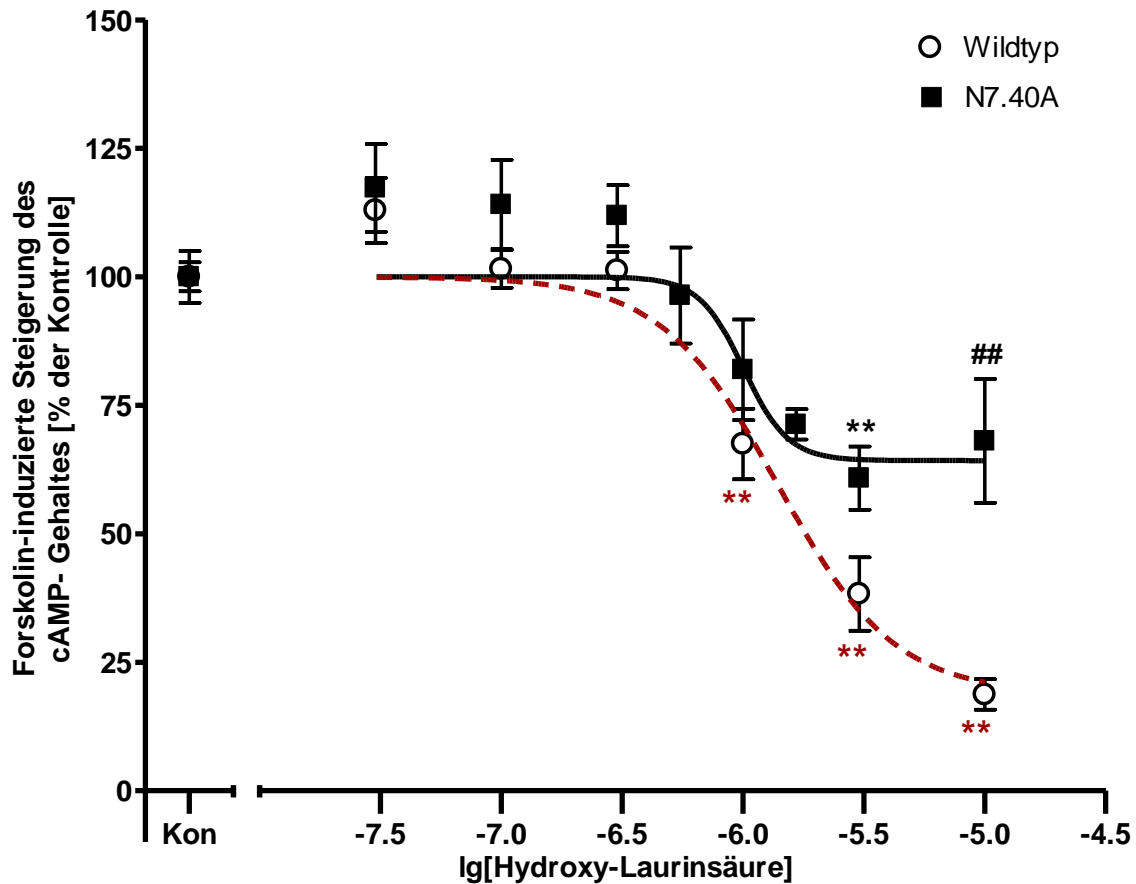
**Abb. 13:** [ $^3\text{H}$ ]-cAMP-Versuch: Die Wirkung von 2-Hydroxy-Laurinsäure in Zellen mit den Wildtyp-Rezeptoren und der R6.60-Mutante in Gegenwart von Forskolin 10  $\mu\text{M}$ . Mittelwerte  $\pm$  SEM von 13-20 Versuchen für die Mutante und 11-19 für den Wildtyp. Weitere Details in der Legende zu Abb. 12. Daten mit dem Wildtyp-Rezeptor sind aus Abb. 12 übernommen.

Abbildung 13 zeigt kein Unterschied der Kurve des R6.60A-Konstruktes im Vergleich zum Wildtyp in der Hemmung der cAMP-Werte durch 2-Hydroxy-Laurinsäure. Der  $\text{EC}_{50}$ -Wert beträgt beim Wildtyp 1,4  $\mu\text{M}$  und bei R6.60A 1,6  $\mu\text{M}$ .



**Abb. 14:** [ $^3\text{H}$ ]-cAMP-Versuch: Die Wirkung von 2-Hydroxy-Laurinsäure in Zellen mit den Wildtyp-Rezeptoren und der A7.39-Mutante in Gegenwart von Forskolin 10  $\mu\text{M}$ . Mittelwerte  $\pm$  SEM von 11-16 Versuchen für die Mutante und 11-19 für den Wildtyp. Weitere Details in der Legende zu Abb. 12. Daten mit dem Wildtyp-Rezeptor sind aus Abb. 12 übernommen.

Die A7.39S Mutante zeigt eine deutliche Verschiebung der Kurve nach links (Abb. 14). Der  $\text{EC}_{50}$ -Wert beträgt beim Wildtyp 1,4  $\mu\text{M}$ , und bei A7.39S 0,41  $\mu\text{M}$ . Ab 1  $\mu\text{M}$  des Agonisten ist eine Minderung der cAMP-Produktion im Vergleich zur Kontrolle zu beobachten.



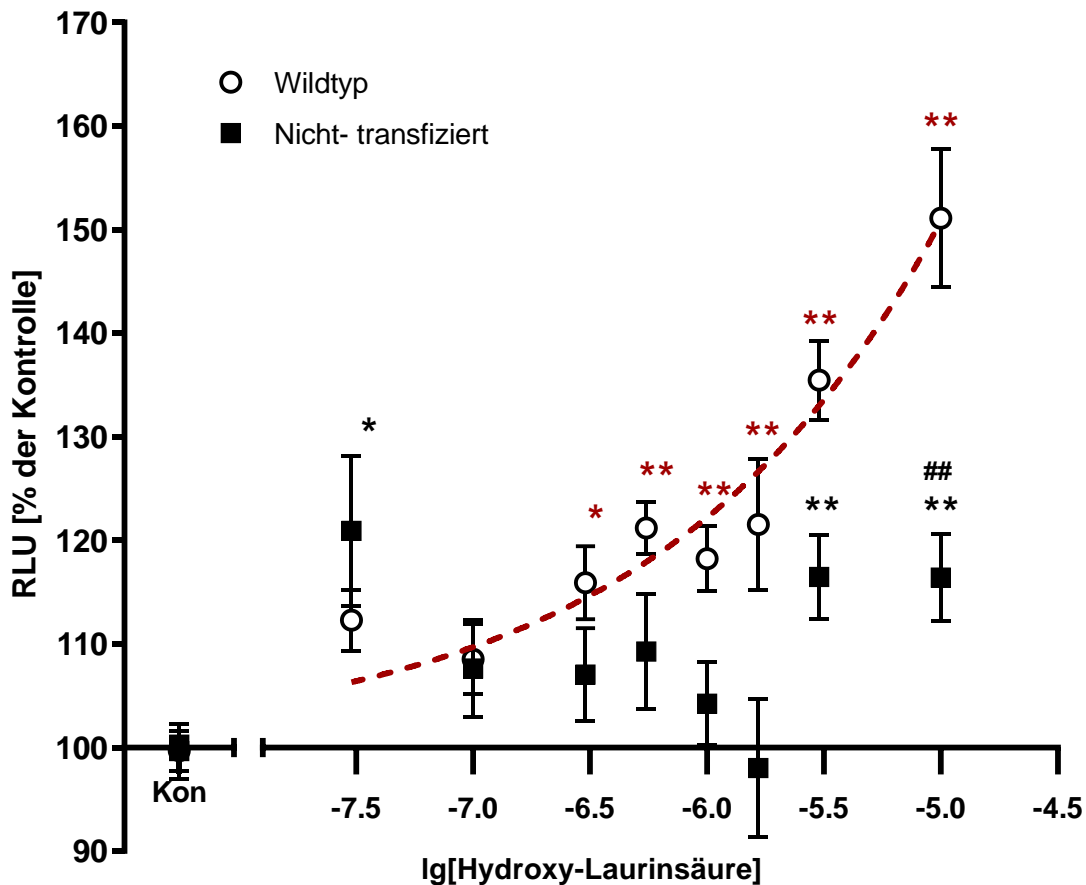
**Abb. 15:** [ $^3\text{H}$ ]-cAMP-Versuch: Die Wirkung von 2-Hydroxy-Laurinsäure in Zellen mit den Wildtyp-Rezeptoren und der N7.40-Mutante in Gegenwart von Forskolin 10  $\mu\text{M}$ . Mittelwerte  $\pm$  SEM von 6-24 Versuchen für die Mutante und 11-19 für den Wildtyp. Weitere Details in der Legende zu Abb. 12. Daten mit dem Wildtyp-Rezeptor sind aus Abb. 12 übernommen.

Die Abbildung 15 zeigt eine Abflachung der Kurve mit einem reduzierten Maximaleffekt bei Zellen mit der N7.40A-Mutante im Vergleich zu Werten der Zellen mit dem Wildtyp-Rezeptor. Der scheinbare  $\text{EC}_{50}$ -Wert beträgt beim Wildtyp 1,4  $\mu\text{M}$  und bei N7.40A 1,0  $\mu\text{M}$ . 10  $\mu\text{M}$  2-Hydroxy-Laurinsäure wirkten in Zellen mit der N7.40A-Mutante schwächer.

## 3.4 NFAT- Reporter-gen- Versuche

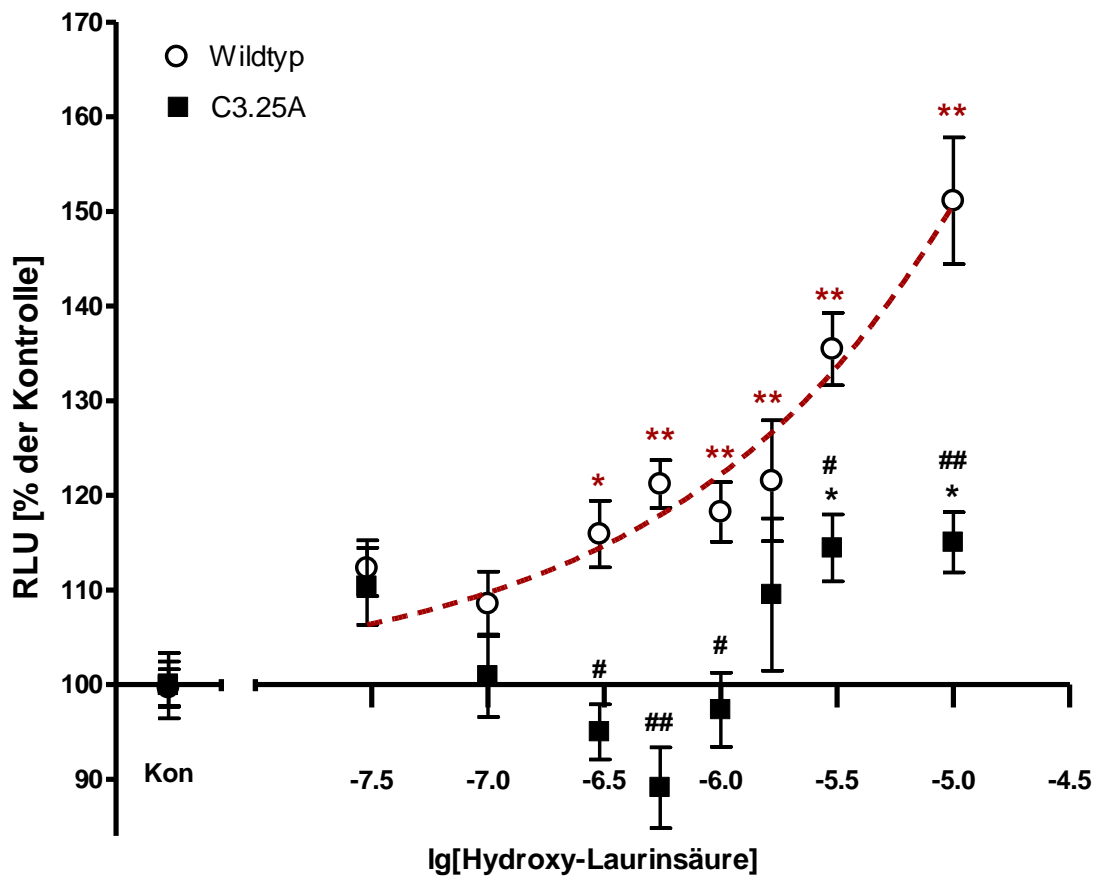
**Tab. 11:** Basale RLU Werte nach Transfektion mit pNFAT-luc in Zellen ohne GPR84 und Zellen, die den Wildtyp-Rezeptor oder die Mutanten C3.25A, R6.60A, A7.39S, N7.40A exprimieren in Versuchen mit dem Luciferase-Assay. Der maximale Anstieg der RLU wurde durch Zugabe von 2-Hydroxy-Laurinsäure (10  $\mu$ M) als prozentualer Anteil des gemittelten Basalwertes berechnet. Die jeweilige Anzahl der ausgewerteten Versuche wurde mit „n“ gekennzeichnet. Signifikante Unterschiede zu der basalen RLU (mit † markiert) und signifikante Unterschiede zu Zellen mit dem Wildtyp-Rezeptor (mit \* markiert).  $P < 0,001$ : \*\*, entsprechend † †.

	<b>Basale RLU</b>	<b>Anstieg in RLU (in % der Basalwerte) durch 2-Hydroxy-Laurinsäure 10 <math>\mu</math>M</b>
<b>Nicht- transfiziert</b>	1931 $\pm$ 151    n=94  **	16,4 $\pm$ 4,2    n=24  † †            **
<b>Wildtyp</b>	3173 $\pm$ 217    n=96	51,1 $\pm$ 6,7    n=24  † †
<b>C3.25A</b>	1327 $\pm$ 131    n=72  **	15,0 $\pm$ 3,2    n=18  †                **
<b>R6.60A</b>	3595 $\pm$ 156    n=72	35,2 $\pm$ 4,3    n=18  † †
<b>A7.39S</b>	1791 $\pm$ 164    n=72  **	39,8 $\pm$ 5,2    n=18  † †
<b>N7.40A</b>	4534 $\pm$ 187    n=66  **	24,8 $\pm$ 2,7    n=12  † †            **



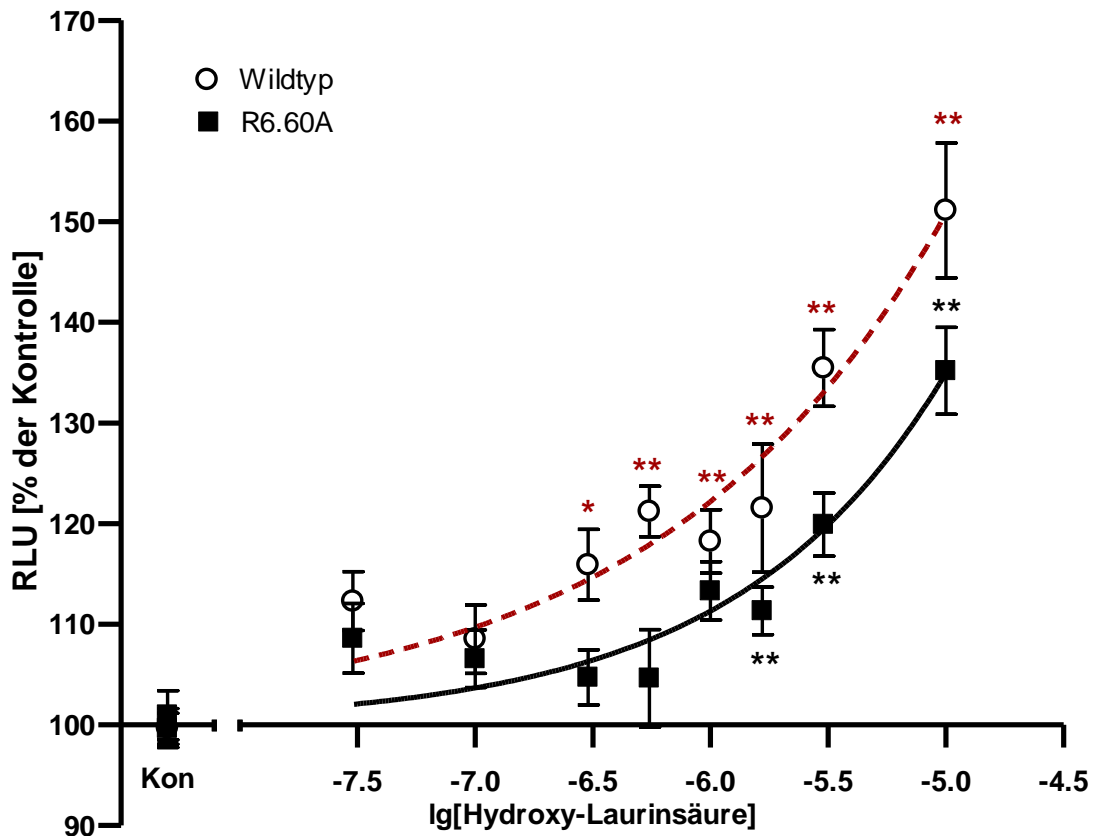
**Abb. 16:** NFAT-Reportergen-Versuch: Die Wirkung von 2-Hydroxy-Laurinsäure in Zellen ohne GPR84 und Zellen mit dem Wildtyp-Rezeptor. Mittelwerte  $\pm$  SEM (Standardfehler des Mittelwertes) von 12-94 Versuchen für Zellen ohne GPR84 und 9-96 für den Zellen mit dem Wildtyp-Rezeptor. Signifikante Unterschiede bei gleicher Agonistenkonzentration (ANOVA und Bonferroni-Multiple-Comparison-Post-Test),  $P < 0,01$ : #,  $P < 0,001$ : ##. Inkubationszeit: 15 min.

In Zellen mit Wildtyp-Rezeptor verursachte 2-Hydroxy-Laurinsäure einen Konzentrations-abhängigen Signalanstieg (Abb.16). Ein Maximum wurde nicht erreicht (Abb.16). Daher können keine  $EC_{50}$ -Konzentrationen geschätzt werden. In einer Konzentration von  $10 \mu\text{M}$  erhöhte 2-Hydroxy-Laurinsäure das Signal um durchschnittlich 51% der Basalwerte (Tab.11 und Abb.16). In Zellen ohne GPR84 induzierte 2-Hydroxy-Laurinsäure nur in den Konzentrationen von  $0.03$ ,  $3$  und  $10 \mu\text{M}$  schwache Signalanstiege (Abb.16).



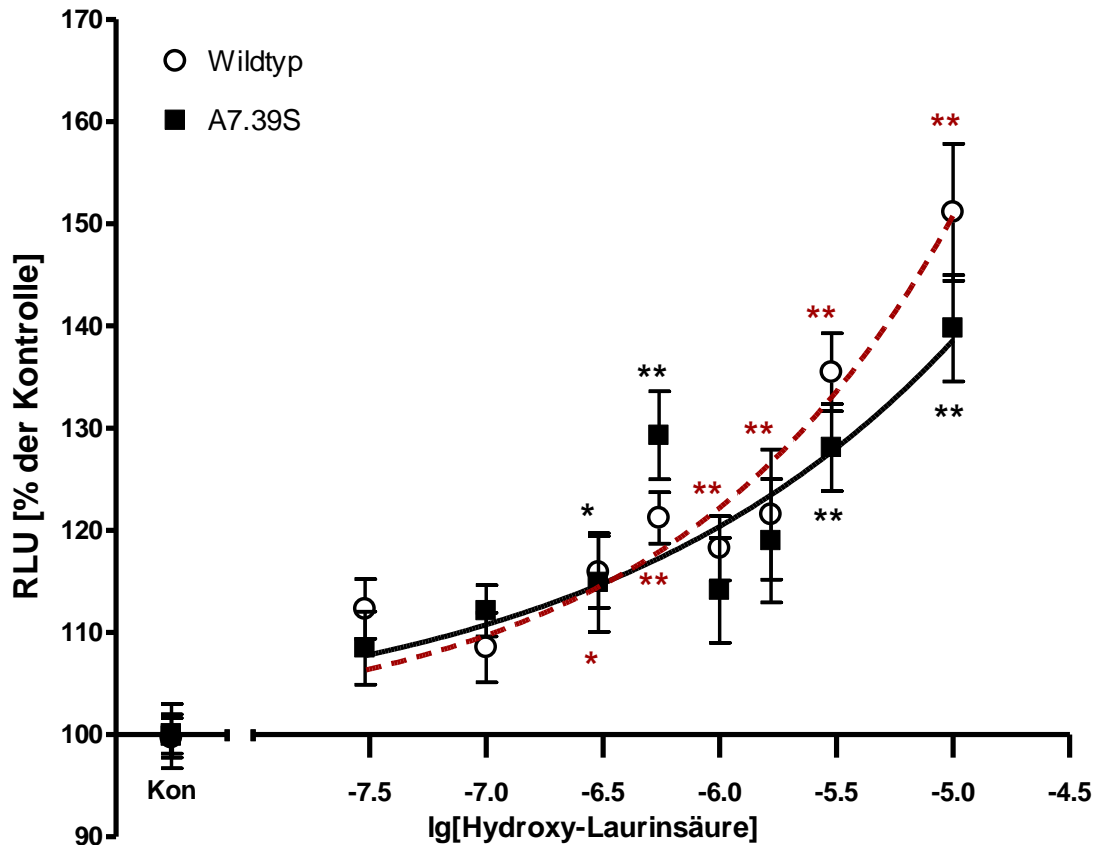
**Abb. 17:** NFAT-Reporterergen-Versuch: Die Wirkung von 2-Hydroxy-Laurinsäure in Zellen mit dem Wildtyp-Rezeptor und der C3.25-Mutante. Mittelwerte  $\pm$  SEM (Standardfehler des Mittelwertes) von 8-72 Versuchen für die Mutante und 9-96 für den Wildtyp. Die Daten aus Versuchen mit Zellen mit Wildtyp-Rezeptor sind aus Abb. 16 entnommen. Weitere Details siehe Legende zu Abb. 16.

In Vergleich zu Zellen mit dem Wildtyp-Rezeptor ist ein Wirkungsverlust im Fall der Zellen mit der C3.25A-Mutante zu beobachten (Abb. 17.). 2-Hydroxy-Laurinsäure bewirkte nur in der Konzentration 3  $\mu$ M und 10  $\mu$ M einen Signalanstieg. Die Steigerung der Rezeptoraktivität war bei den Zellen mit dieser Mutante bei gleicher Agonistenkonzentration schwächer als bei Zellen mit dem Wildtyp-Rezeptor.



**Abb. 18:** NFAT-Reporter-gen-Versuch: Die Wirkung von 2-Hydroxy-Laurinsäure in Zellen mit den Wildtyp-Rezeptoren und der R6.60-Mutante. Mittelwerte  $\pm$  SEM (Standardfehler des Mittelwertes) von 9-72 ausgewerteten Zellen für die Mutante und 9-96 für den Wildtyp. Die Daten aus Versuchen mit Zellen mit Wildtyp-Rezeptor sind aus Abb. 16 entnommen. Weitere Details siehe Legende zu Abb. 16.

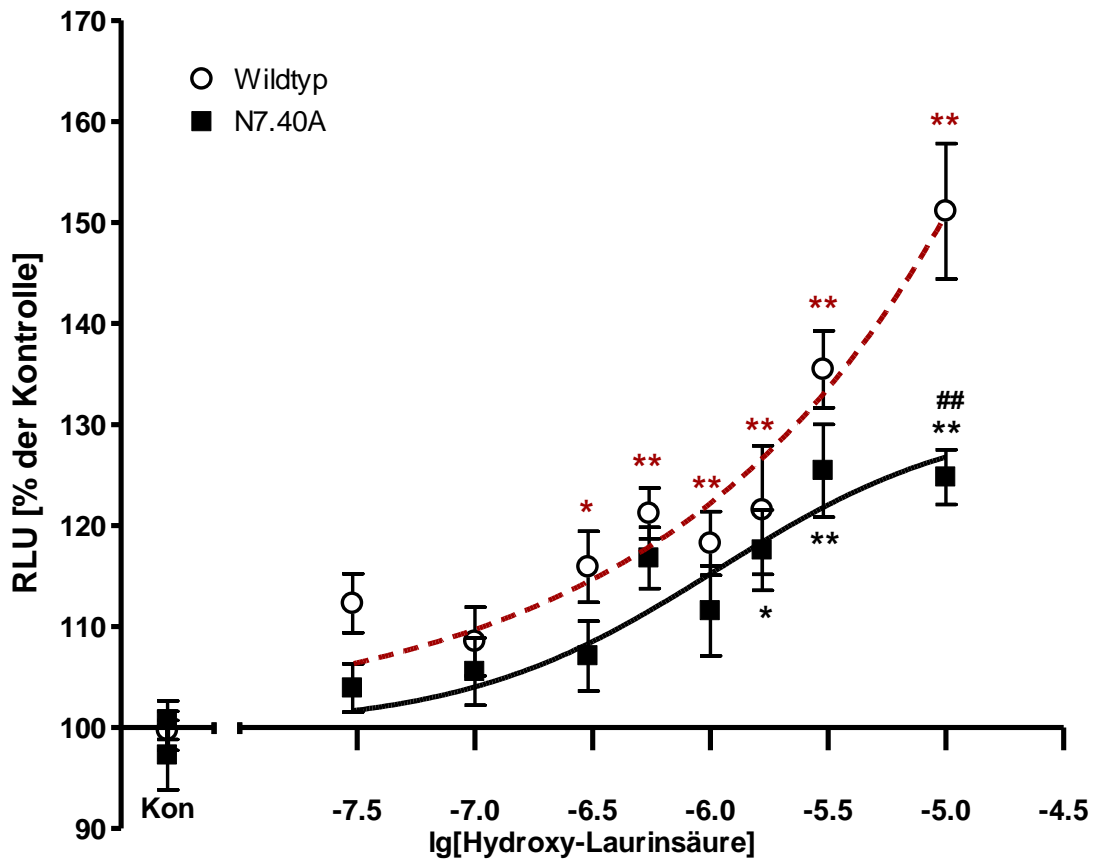
Die Abbildung 18 zeigt die Antwort auf 2-Hydroxy-Laurinsäure in Zellen mit der R6.60A Mutante. 2-Hydroxy-Laurinsäure ist erst ab einer Konzentration von 2  $\mu$ M wirksam. Es gibt aber keine signifikanten Unterschiede zu den Werten aus Zellen mit dem Wildtyp-Rezeptor. 2-Hydroxy-Laurinsäure (10  $\mu$ M) induzierte in Zellen mit der Mutation R6.60A einen Signalanstieg von 35,2 % der Basalwerte (Tab. 11 und Abb.18).



**Abb. 19:** NFAT-Reporterergen-Versuch: Die Wirkung von 2-Hydroxy-Laurinsäure in Zellen mit den Wildtyp-Rezeptoren und der A7.39-Mutante. Mittelwerte  $\pm$  SEM (Standardfehler des Mittelwertes) von 8-72 ausgewerteten Zellen für die Mutante und 9-96 für den Wildtyp. Die Daten aus Versuchen mit Zellen mit Wildtyp-Rezeptor sind aus Abb. 16 entnommen. Weitere Details siehe Legende zu Abb. 16.

Abbildung 19 zeigt Antworten in Zellen mit dem Wildtyp-Rezeptor und der A7.39S-Mutante. Es gibt kein Unterschied der Antworten. 2-Hydroxy-Laurinsäure (10  $\mu$ M) induzierte in Zellen mit der Mutation A7.39S zu einem Signalanstieg von knapp 40 % der Basalwerte (Tab. 11 und Abb.19).





**Abb. 20:** NFAT-Reportergen-Versuch: Die Wirkung von 2-Hydroxy-Laurinsäure in Zellen mit den Wildtyp-Rezeptoren und der N7.40-Mutante. Mittelwerte  $\pm$  SEM (Standardfehler des Mittelwertes) von 7-66 ausgewerteten Zellen für die Mutante und 9-96 für den Wildtyp. Die Daten aus Versuchen mit Zellen mit Wildtyp-Rezeptor sind aus Abb. 16 entnommen. Weitere Details siehe Legende zu Abb. 12.

Im Vergleich zu Werten mit Zellen mit dem Wildtyp-Rezeptor zeigt sich bei Zellen mit der N7.40A-Mutante eine geringere Antwort auf 10  $\mu$ M 2-Hydroxy-Laurinsäure (Abb. 20). 2-Hydroxy-Laurinsäure induzierte in Zellen mit der Mutation N7.40A einen Signalanstieg von 24,8 % der Basalwerte (Tab. 11 und Abb.20).

## 4. Diskussion

### 4.1 Methodenkritik

#### 4.1.1 Allgemeine Methodenkritik

Ein Rezeptorprotein wurde mittels zielgerichteten Mutagenese und der Durchführung funktioneller Versuche untersucht. Die Abweichung in der Funktion kann ein Hinweis auf die direkte Beteiligung der jeweiligen Aminosäure sein. Es könnte aber auch sein, dass die Mutation zu einer Konformationsänderung im Rezeptorprotein geführt hatte, die unabhängig von der direkten Bindung des Agonisten am Rezeptor ist. Ein Beispiel dafür ist die Mutation im humanen Cannabiod-Rezeptor 1 (CB1), der ein potenzielles therapeutisches Ziel in der Behandlung von Adipositas und Zwangsstörungen darstellt. Die Punktmutation T3.46A hatte zur Inaktivierung geführt und die Punktmutationen T3.46I und L3.43A hatten dazu geführt, dass der Rezeptor unabhängig von Agonistenbindung konstitutiv aktiv war (D'Antona et al., 2006). Die nachfolgende Forschung der Struktur von CB1 zeigte, dass die Änderung der Rezeptoraktivität und -konformation mit der Unterbrechung der Salzbrücken in Transmembranregionen 2,3,5 und 6 korrelierte (Ahn et al., 2013).

Mehrere Studien haben jedoch gezeigt, dass Kristallstrukturdaten mit den Daten entsprechender Mutagenese-Studien gut übereinstimmen (Woodley und Catlow, 2008), was die Vorhersagekraft der Mutagenese-Studien unterstützt. Das häufigste Merkmal der Rezeptoraktivierung ist eine umfassende Reorganisation der zytoplasmatischen Seite, bei der eine Auswärtsbewegung von TM6 in Kombination mit anderen Helices eine intrazelluläre Tasche freigibt, die zur Signalkomplexbildung führt. Die Konformationsdynamik von G-Proteinen kann durch liganden- oder phosphorylierungsabhängige Zustände des Rezeptors moduliert werden und liefert Hinweise auf eine allosterische Regulierung (Hilger et al., 2018). Weiterhin zeigen Elektronenparamagnetische Resonanzspektroskopie-Studien, dass die Photoaktivierung von Rhodopsin eine Rotation und Kippung von TM6 relativ zu TM3 beinhaltet. Dieser Mechanismus der Rhodopsinaktivierung wurde durch chemische Reaktivitätsmessungen, Fluoreszenzspektroskopie, Ultraviolettabsorptionsspektroskopie und durch Zinkverbindungen in Histidinen bestätigt (Kobilka et al. 2007).

#### 4.1.2 Potenzielle Fehlerquellen der Studie

Im Folgenden werden mögliche Fehlerquellen dieser Studie diskutiert. Eine potenzielle Fehlerquelle könnte die Zersetzung der Agonistenlösungen sein. Um dies zu vermeiden wurden die Lösungen jeweils neu angefertigt. Eine weitere potenzielle Fehlerquelle könnte die Expression eines Humanrezeptors im Hamsterzellensystem (CHO-Zellen) sein. Jedoch haben viele Studien gezeigt, dass die Flip-In™-CHO Zelllinie von Thermo Fisher Scientific, Invitrogen™ ein effizientes System ist (siehe zB. Gao et al., 2004, Han et al., 2006, Hoffmann et al., 2008, Hoffmann et al., 2014).

Zudem wurden GPR84 Rezeptoren mit einer Modifikation verwendet. Dabei befindet sich am C-Terminus ein zusätzliches Epitop. Dieses Epitop ermöglicht die Expressionsanalyse des Rezeptors GPR84 in Zellen durch Immunfluoreszenz-Verfahren. Die membranständige Lokalisation des Rezeptors wurde bereits mit Hilfe der Immunfluoreszenzfärbung durch Antikörpermarkierung mittels Anti-FLAG-Antikörper in CHO-Zellen, die den humanen GPR84 mit N-terminal FLAG-Epitop exprimieren, bestätigt (Wang et al., 2006).

Im Fall von NFAT-Reporter-Gen-Assays unterscheiden sich die wirksamen Konzentrationen deutlich von denen aus cAMP-Messungen. Zudem ist aus den Kurven kein Maximum bestimmbar (siehe Abb. 16-20). Daher wurden die Antworten auf 10 µM 2-Hydroxy-Laurinsäure verglichen. Im [<sup>3</sup>H]cAMP-Assay wurde beim Wildtyp sowie bei fast allen Mutanten sowie ein sigmoidaler Kurvenverlauf mit bestimmbareren EC<sub>50</sub>-Werten beobachtet.

### 4.2 Die Rezeptorfunktion

#### 4.2.1 Calcium-Anstieg über G<sub>i</sub>

Der Pertussis Toxin (PTX)-empfindliche (G<sub>i/o</sub>) Signaltransduktionsweg wurde bei GPR84 bereits in mehreren Arbeiten beschrieben (Nikaido et al., 2015, Wang et al., 2006). In dieser Studie wurde mittels [<sup>3</sup>H]cAMP-Messung eine effektive Hemmung der Forskolin-induzierten cAMP-Produktion nochmals bestätigt. Dabei hat der Agonist 2-Hydroxy-Laurinsäure wahrscheinlich den G<sub>i/o</sub>-Signalübertragungsweg des Rezeptors GPR84 aktiviert.

Zusätzlich wurde in dieser Studie eine Aktivierung des NFAT-Signalweges beobachtet. Bei der Zugabe von Agonisten wurde eine konzentrationsabhängige Erhöhung der Signale gemessen, was auf einen Transkriptions-Anstieg des transfizierten NFAT-Gens hindeutet. Die Steigerung der NFAT-Transkription kann durch die PLC-Aktivierung und den anschließenden  $[Ca^{2+}]_i$ -Anstieg bedingt sein (Cheng et al., 2010). Die Calciummobilisierung durch Aktivierung von GPR84 mittels Agonisten wurde bereits in mehreren Studien (Liu et al., 2016 und Zhang et al., 2016) beschrieben (siehe S. 24).

In Ko-Immunpräzipitations und -kompetitionsexperimenten wurde gezeigt, dass die Signalweiterleitung bei  $G_i$ -gekoppelten Rezeptoren durch die  $IP_3R$ -Aktivierung von  $G\beta\gamma$ -Einheiten  $Ca^{2+}$ -vermittelt stattfinden kann (Zeng et al., 2003). Dieser Signaltransduktionsweg präsentiert somit eine Alternative zur häufigsten Form der  $Ca^{2+}$ -Signalweiterleitung durch  $G_{q\alpha}$ -gekoppelten Rezeptoren, die  $PLC\beta 2$  aktivieren, die die  $Ca^{2+}$ -Freisetzung durch  $IP_3$  bewirken. Zudem ist dieser Signaltransduktionsweg durch die Hemmung der  $PLC\beta$  nicht beeinflusst (Zeng et al., 2003).

Ausserdem gibt es Hinweise, dass GPCRs an G-Proteine aus mehreren Familien koppeln und somit nachgeschaltete GPCR Signalwege regulieren können (Gudermann et al., 1992, Laugwitz et al., 1996, Xiao et al., 1995, Werry et al., 2003). Ein möglicher Mechanismus ist die Veränderung der verschiedenen Zustände desselben Rezeptors, wodurch eine Kopplung mit verschiedenen G-Proteinen ermöglicht wurde. Zum Beispiel besitzt der Chemokinrezeptor CXCR2 hoch- und niederaffine Bindungsformen und diese Konformationen scheinen deutliche Kopplungsspezifitäten in Reaktion auf denselben Liganden zu haben. Die niedrig affine Form vermittelt eine Erhöhung von  $[Ca^{2+}]_i$ , während die hochaffine Form die Neutrophilen-Chemotaxis vermittelt, was darauf hindeutet, dass eine Stabilisierung der niedrig affinen Form zu einer Potenzierung der  $Ca^{2+}$ -Signalisierung führen kann (Ahuja et al., 1996, Werry et al., 2003).

#### 4.3 $G_{i/o}$ - $G_q$ -Ko-Aktivierung

Darüber hinaus ist in der Literatur die mögliche  $G_{i/o}$ - $G_q$ -Ko-Aktivierung mit synergistischer Wirkung beschrieben (Chan et al., 2016, Shah et al., 1999), was im Fall der durchgeführten NFAT-Assays den Unterschied der wirksamen Konzentrationen erklären könnte (Chan et al., 2016, Shah et al., 1999, Wang et al., 2016).

Es wurde beschrieben, dass Mechanismen von ‚Cross-Talk‘ zwischen G-Protein-gekoppelten Rezeptoren zu einer gesteigerten Freisetzung von intrazellulärem  $\text{Ca}^{2+}$  führen. Die  $\text{Ca}^{2+}$ -Signalweitergabe in einem Typ von GPCR kann durch Stimulation eines anderen Typs des GPCR beeinflusst werden (Bouvier, 2001, Charles et al., 2003). Es gibt viele dokumentierte Beispiele für Wechselwirkungen zwischen GPCRs, die bevorzugt an unterschiedliche Signalwege koppeln, um die  $\text{Ca}^{2+}$ -Signalisierung zu potenzieren (Gudermann et al., 1992, Laugwitz et al., 1996, Xiao et al., 1995). Heterologe Wechselwirkungen oder ein ‚Cross-Talk‘ zwischen den Rezeptoren können zur Verstärkung oder zum Verlust der Funktion (Desensibilisierung) führen (Cordeaux et al., 2002, Werry et al., 2003). Somit könnte der  $G_i$ -Signalübertragungsweg durch die Wechselwirkung mit der  $G_q$ -Signaltransduktion potenziert werden, wodurch sich eine stärkere zelluläre Antwort ergeben könnte.

GPR142 ist ein G-Protein-gekoppelter Rezeptor, bei dem die Signaltransmission sowohl von  $G_i$ , als auch von  $G_q$  vermittelt ist. Der Rezeptor ist in Pankreasinseln exprimiert und wurde aufgrund seiner Wirkung auf Insulinsekretion als neuartiges therapeutisches Ziel für die Behandlung von Typ-2-Diabetes untersucht. Eine Studie zeigte, dass native ebenso wie synthetische GPR142-Agonisten in rekombinanten HEK293-Zellen sowohl die  $G_q$ - als auch  $G_i$ -Signaltransduktion aktivieren können (Wang et al., 2016). Als weiteres Beispiel bewirkt die Ko-Aktivierung von  $G_i$ - und  $G_q$ -Proteinen einen synergistischen Effekt auf die menschliche Thrombozytenaggregation durch Aktivierung von Phospholipase C (PLC)- und  $\text{Ca}^{2+}$ -Signalwegen (Banno et al., 1998, Della Rocca et al., 1997, Shah et al., 1999).

Zudem können die  $G_i/G_q$ -gekoppelten Protease-aktivierte Rezeptor 1 und Protease-aktivierte Rezeptor 2 nach Agonistenbindung die IL8-Expression induzieren (Ludwicka-Bradley et al., 2000). Dazu regulieren  $G\beta\gamma$ -Untereinheiten mehrere Signale, die sich mit denen von  $G\alpha_i$  und  $G\alpha_q$  (Smrcka, 2008) überlappen, wie die PLC $\beta$ -Isoformen 2/3 (Chan et al., 2016, Poon et al., 2009).

Die Entzündungsreaktion wird von hämatopoetischen Zellen wie Leukozyten koordiniert, die zwei Mitglieder der  $G_q$ -Familie mit variablen Rezeptorkopplung  $G\alpha_{16}$  und  $G\alpha_{14}$  exprimieren. Ansonsten stimulieren  $G\alpha_{16}$  und  $G\alpha_{14}$  den PLC $\beta$ -Signalweg nur mit  $G_i$ -

gekoppelten Rezeptoren. In Gegenwart von  $G\alpha_{16}$  sowie  $G\alpha_{14}$  können  $G_i$ -gekoppelte Rezeptoren in  $G_q$ -gekoppelte Rezeptoren umgewandelt werden, während die Fähigkeit zur Signalübertragung über  $G_i$ -Proteine erhalten bleibt. Da Leukozyten auch  $PLC\beta_{2/3}$  exprimieren, kann die Stimulierung eines einzelnen  $G_i$ -gekoppelten Rezeptors zu synergistischen Effekten führen (Chan et al., 2016). Alle oben erwähnte Mechanismen des  $G_i/G_q$ -Synergismus könnten potenziell eine Erklärung für die mögliche duale Signalkaskade ( $G_i$ - und  $Ca^{2+}$ -vermittelt) liefern.

Insgesamt wurde ein  $G_i/G_q$ -induzierter Synergismus bei der Regulation von vielen physiologischen Prozessen im menschlichen Organismus beobachtet, wie zum Beispiel bei der Vasokonstriktion (Wahlestedt et al., 1990), der Thrombozytenaktivierung (Dangelmaier et al., 2001), der  $PLC\beta$ -Signalübertragung (Chan et al., 2000) und der intrazelluläre  $Ca^{2+}$ -Mobilisierung (Chan et al., 2016, Rebres et al., 2011).

#### 4.4 Ergebnisse der Mutagenese-Studie und Vergleich zur Literatur

Es wurde berichtet, dass GPR84 durch MCFAs mit der Hydroxylgruppe in der 2- oder 3-Position wirksamer als durch nicht-hydroxylierte MCFAs aktiviert wird (Suzuki et al., 2013). Somit ist Hydroxy-Laurinsäure ein stärkerer Ligand als die entsprechende nicht hydroxylierte Fettsäuren (Suzuki et al., 2013) und wurde daher für die Durchführung der Versuche als Agonist ausgewählt.

Die Daten der direkten Immunfluoreszenzanalyse mittels FITC-gekoppelten Antikörpern zeigten deutlich die Lokalisation des GPR84 an der Zellmembran. Zellen, die keinen GPR84 exprimieren, wiesen eine geringere Fluoreszenzintensität auf als Mutanten und Zellen mit Wildtyp-Rezeptor (Abb. 10). Zudem wurde eine Abschwächung der Fluoreszenzintensität und somit auch Expressionsreduktion der C3.25A-Mutante beobachtet. Dies könnte in Verbindung mit dem Funktionsverlust (siehe unten) bei den Zellen mit dieser Mutation stehen. Eine ähnliche, jedoch weniger stark ausgeprägte Minderung der Expression ist bei den Zellen mit der N7.40A-Mutation beobachtet. Ein Beispiel eines GPCRs, bei dem aufgrund der Mutation einer hoch konservierten Aminosäure es zu einer Expressionsminderung kam, ist der Thromboxan-Rezeptor. Bei der natürlich vorkommenden, heterozygoten Thromboxan-A2-Rezeptor-Variante N42S

wurde aufgrund der verminderten Oberflächenexpression eine Funktionsstörung der Blutplättchenaggregation beobachtet (Nisar et al., 2014).

Im scharfen Kontrast zu Zellen mit dem Wildtyprezeptor, zeigten Zellen mit der C3.25A-Mutante keine Funktion im [ $H^3$ ]cAMP-Assay (Abb. 12). Der Funktionsverlust könnte auf eine fehlende Disulfidbrücke beruhen. Konservierte Cysteine spielen eine wichtige Rolle bei der Formierung von Disulfidbrücken in vielen ähnlichen GPCRs, wie Protease-aktivierte Rezeptor 1 (Zhang et al., 2012), P2Y<sub>1</sub> (Zhang et al., 2012) und P2Y<sub>12</sub> (Zhang et al., 2014 b). Im NFAT-Assay hatten Zellen mit der C3.25A-Mutante ein Signal nur bei maximaler Agonistenkonzentration gezeigt, was auch für einen Funktionsverlust spricht. Nicht-transfizierten Zellen weisen ähnliche Effekte im NFAT-Assay wie Zellen mit der C3.25A-Mutation auf (Abb. 17), was auf das Vorhandensein möglicher weiterer endogener Rezeptoren (Chan et al., 2016) in CHO-Zellen hindeutet.

Im [ $H^3$ ]cAMP-Assay zeigte die Konzentrationswirkungsbeziehung keinen Unterschied zwischen der R6.60A Mutante und dem Wildtyp (Abb. 18). Im NFAT-Assay ist eine Wirkung über mehreren Konzentrationsstufen zu sehen. Insgesamt zeigt diese Mutation keinen großen Einfluss auf die Rezeptorfunktion.

Bei der A7.39S Mutante wurde im [ $H^3$ ]cAMP-Assay eine Linksverschiebung der Konzentrations-Wirkungskurve beobachtet. Hingegen besteht beim NFAT-Assay kein Unterschied (Abb. 19). In diesem Fall könnte eine variable Rezeptoraktivierung durch Aktivierung eines alternativen Signalwegs eine mögliche Erklärung sein.

An Zellen mit der N7.40A-Mutante wurde in beiden Assaysystemen eine erniedrigte Wirkung auf die höchste Konzentration des Agonisten beobachtet (Abb. 15 und 20). Dies könnte auf der erniedrigten Expression des mutierten Rezeptors beruhen.

In Übereinstimmung mit dieser Arbeit zeigten Nikaido et al. (2015) eine erniedrigte Caprinsäureaktivität bei der Mutante N7.40D (siehe S. 28). Wir benutzen hier die Ballesteros-Weinstein Nummerierung (siehe S. 28). Zellen mit der Mutante N7.40D wurden in der Studie von Nikaido et al. (2015) durch das Fettamin Decylamin im [ $^{35}S$ ]GTP $\gamma$ S-Assay nicht aktiviert; zudem verlor Caprinsäure ihre Aktivität. Dieses Ergebnis zeigte, dass N7.40 nicht direkt mit der C10-Carbonylgruppe der Caprinsäure

interagierte (Nikaido et al., 2015). Zudem binden die Laurinsäure- und die Caprinsäure-Agonisten an der gleichen Bindungsstelle, wobei Laurinsäure sich mit stärkerer Affinität am GPR84 bindet (Nikaido et al., 2015).

#### 4.5 Vergleich von GPR84 mit GPCRs der $\delta$ -Subgruppe

Von den verwandten GPCRs P2Y<sub>1</sub>, P2Y<sub>12</sub> und PAR1 liegen Kristallstrukturdaten vor.

##### 4.5.1 Vergleich mit P2Y<sub>12</sub>-Rezeptor

Der P2Y<sub>12</sub>-Rezeptor (P2Y<sub>12</sub>R) gehört ähnlich wie GPR84 und andere P2YRs zur  $\delta$ -Subgruppe der Klasse A-GPCRs. Der P2Y<sub>12</sub>R wird in Megakaryozyten, Thrombozyten und neuronalen Geweben exprimiert (Abbracchio et al., 2006). Seine physiologische Rolle in der Bildung der Thromben in Gegenwart von ADP ist gut belegt (Cattaneo, 2011, Gachet, 2006). ADP ist der native Agonist des P2Y<sub>12</sub>-Rezeptors (Bodor et al., 2003, Hollopeter et al., 2001). Die aktiven Metaboliten der Thienopyridinverbindungen Ticlopidin (Maffrand et al., 1988), Clopidogrel (Herbert et al., 1993) und Prasugrel (Sugidachi et al., 2000) werden in der Pharmakotherapie als Rezeptorantagonisten zur Inhibierung der Thrombozytenaggregation verwendet (von Kügelgen und Hoffmann, 2016). Der P2Y<sub>12</sub>R verbindet sich mit G $\alpha$ <sub>i2</sub>, was eine Hemmung der Akkumulation von zyklischem AMP und zusätzliche Downstream-Ereignisse, einschließlich der Aktivierung von Phosphatidylinositol-3-Kinase und Rap1b-Proteinen, vermittelt. Diese aktiven Metaboliten blockieren P2Y<sub>12</sub>R und hemmen dadurch die ADP-induzierte Thrombozytenaggregation (von Kügelgen, 2017).

Im Fall von P2Y<sub>12</sub>R wurde die Agonisten gebundene Struktur in einer Kristallstrukturanalyse untersucht. Analog zu den Hinweisen dieser Studie für eine besondere Bedeutung einer Disulfidbrücke in den extrazellulären Anteilen von GPR84 (siehe S. 64 und 70) spielt eine Disulfidbrücke bei P2Y<sub>12</sub>-Rezeptoren eine wichtige Rolle. Cysteine, die die konservierte Disulfidbindung bilden, sind auch direkt an der Bindung des vollen Agonisten 2-Methylthio-Adenosin-5'-Diphosphat (2MeSADP) beteiligt. Das Hauptkettencarbonyl von C97 (3.25) von Helix III bildet eine Wasserstoffbindung mit der 3'-Hydroxylgruppe der Ribose und die Hauptketten-NH-Gruppe von C175 im EC2 wechselwirkt mit der  $\beta$ -Phosphatgruppe (Zhang et al., 2014 a, b). Eine Unterbrechung dieser labilen Disulfidbindung, zum Beispiel im Komplex mit dem



Antagonisten AZD1283, verhindert ein solches Koordinationssystem des Nukleosids. Die aktiven Metaboliten der Thienopyridin-Verbindungen könnten die Wechselwirkungen des P2Y<sub>12</sub>R mit dem Nukleotidagonisten durch kovalente Bindung an C97 (3.25) destabilisieren (Zhang et al., 2014 a, b). Die Mutation eines dieser Cysteine zu Alanin verringert die Agonistenbindung stark (Algaier et al., 2008), obwohl bekannt ist, dass das P2Y<sub>12</sub>R diese Disulfidbindung nicht für die gesamte strukturelle Integrität, also im Komplex mit AZD1283, benötigt (Zhang et al., 2014 a, b).

Funktionelle Assays zeigten, dass C97 (3.25) wahrscheinlich die kovalente Bindungsstelle für die aktiven Metabolite von P2Y<sub>12</sub>R-Wirkstoffen ist (Algaier et al., 2008, Ding et al., 2009, Savi et al., 2006). Die Experimente zeigten u.a. eine starke und irreversible Wirkung von R-138727 ((2- [1- [2-Cyclopropyl-1- (2- fluorphenyl) -2oxoethyl] -4-mercapto-3-piperidinylden]-Essigsäure), der aktive Metabolit von Prasugrel) am rekombinanten menschlichen P2Y<sub>12</sub>-Rezeptor. Die Daten legen nahe, dass R-138727 mit C97 und C175 (EC2) des Rezeptors interagiert, die wahrscheinlich eine Disulfidbrücke in nativen Rezeptoren bilden. Dazu wurde beobachtet, dass die Wirkungsstelle von R-138727 nahe an der Ligandenbindungsstelle des Rezeptors liegt (Algaier et al., 2008). Die Beteiligung von Cysteinresten von EC1 im P2Y<sub>12</sub>R am Wirkungsmechanismus des aktiven Metaboliten (Act-Met) von Clopidogrel, welches durch seine hepatische Metabolisierung entsteht, wurde auch in Rahmen einer Mutationsanalyse gezeigt. Dabei wurden die Rezeptoren jeweils mit einer einzelnen Mutation am Cysteinrest und einen chimären P2Y<sub>12</sub>-P2Y<sub>13</sub>-Rezeptor verwendet. Bei der C97A Mutante wurde ein kompletter Wirkverlust zum Act-Met beobachtet (Savi et al., 2006). Ähnlich zum P2Y<sub>12</sub>R, zeigen die Daten in dieser Studie die Bedeutung der Cysteinbrücken, wobei im GPR84 die C3.25A Mutation zu einem Funktionsverlust des Rezeptors führt.

Zwei Cysteine in Helix III und im EC2 (C97(3.25) und C175 in P2Y<sub>12</sub>R) sind in der gesamten GPCR-Familie hochkonserviert (Rader et al., 2004, Zhang et al., 2014 b) und bilden, wenn sie vorliegen, in nahezu allen bisher erforschten GPCR-Strukturen eine Disulfidbindung (Katritch et al., 2013, Tan et al., 2013, Zhang et al., 2014 b). Eine Ausnahme ist der Rezeptor S1P1, bei der die konservierte Cys3.25 und die

entsprechende Disulfidbrücke fehlt (Hanson et al., 2012), wobei auch eine Sekundärstruktur im EC2 fehlt (Zhang et al., 2014 b). In der Kristallstruktur des Agonisten-gebundenen P2Y<sub>12</sub>R wurde keine Elektronendichte für den größten Teil von EC2 oder für eine potentielle Disulfidbindung an C97 beobachtet, was auf die Möglichkeit dynamischer Disulfidbindung in P2Y<sub>12</sub>R schließen lässt (Zhang et al., 2014 b). Das könnte ein potenziell wichtiges funktionelles Unterscheidungsmerkmal im Vergleich zu anderen bekannten GPCRs sein.

In Übereinstimmung mit der labilen Natur einer Disulfidbindung behält die C97A(3.25)-Mutation des P2Y<sub>12</sub>-Rezeptors eine ähnliche Proteinausbeute und -stabilität ohne offensichtliche Aggregation gemäß der analytischen Größenausschlusschromatographie (aSEC). Die Schmelztemperatur der Mutante im Komplex mit dem P2Y<sub>12</sub>-Antagonisten Ethyl 6- (4- ((Benzylsulphonyl) Carbamyl) Piperidin- 1yl)- 5- Cyano-2 -Methylnicotinat (AZD1283) ist wesentlich höher als in der Apo-Form und ist äquivalent zu den nativen Konstrukten, was nahelegt, dass weder die Konformation des Rezeptors noch seine Fähigkeit, AZD1283 zu binden von der Cystein-Mutation betroffen wurde (Zhang et al., 2014 b). Weitere Daten deuten darauf hin, dass die Disulfidbrücke zwischen EC2 und Helix III in nativem P2Y<sub>12</sub>R (Ohlmann, et al., 2013) labil sein kann, sodass C97 (3.25) für Wechselwirkungen mit den Thiol-Einheiten von Arzneimittelmetaboliten verfügbar ist. Thiol-reaktive Reagenzien wie p-Chloromercuribenzolsulfonat hatten spezifisch die Aktivierung des P2Y<sub>12</sub>-Rezeptors, nicht aber der anderen Rezeptoren wie P2Y<sub>1</sub>R inhibiert (Ohlmann et al., 2013, Zhang et al., 2014 b). Da die Aminosäure C97 (3.25) zu der Tasche 2 im AZD1283-gebundenen P2Y<sub>12</sub>R gehört, können die aktiven Metaboliten von Arzneimitteln, die kovalent an diese Aminosäure binden, auch die Tasche 2 einnehmen. Dies stimmt mit der Docking-Analyse überein, aus der die Tasche 2 eine energetisch günstige Bindungsstelle für diese aktiven Metaboliten zu sein scheint. Das Andocken von Nukleotid-Agonisten in die Kristallstruktur von Antagonisten-gebundenem P2Y<sub>12</sub>R zeigt eine hohe konformative Plastizität der Liganden-bindenden Region (Zhang et al., 2014 b). Die aSEC-Ergebnisse zeigen C97 (3.25) des P2Y<sub>12</sub>-Rezeptors als die primäre Bindungsstelle für den aktiven Metaboliten von Prasugrel, R-138727. Darüber hinaus stimmen diese Beobachtungen in Bezug auf die dynamischen Wechselwirkungen mit der absoluten Selektivität der aktiven Metaboliten von Prasugrel und Clopidogrel für den P2Y<sub>12</sub>-Rezeptor überein (Zhang et al., 2014 b).

#### 4.5.2 Vergleich mit P2Y<sub>1</sub>-Rezeptor

Der P2Y<sub>1</sub>-Rezeptor (P2Y<sub>1</sub>R) weist eine erhöhte Expression in Gehirn, Prostata und Plazenta auf (Abbraccio et al., 2006, von Kügelgen und Wetter, 2000). P2Y<sub>1</sub>R ist an physiologischen Reaktionen wie Adeninnukleotid-induzierter Thrombozytenaggregation, Vasodilatation, Knochenresorption, Schmerzempfindung und astroglialer Signalübertragung beteiligt (Abbraccio et al., 2006, Barragan-Iglesias et al., 2015, Franke und Illies, 2014, Jacob et al., 2014, Ohlmann et al., 2010). Agonisten am P2Y<sub>1</sub>R bei Säugetieren sind: MRS2365 ((N)-Methanocarpa-2-Methylthio-ADP) >2-MeSADP (2-Methylthio-ADP) >ADP (Ayyanthan et al., 1996, Chhatriwala et al., 2004, Henderson et al., 1995, Janssens et al., 1996, Leon et al., 1996, Leon et al., 1997, Tokuyama et al., 1995, Waldo und Harden, 2004). Wichtige Antagonisten sind u. a.: Suramin (Charlton et al., 1996 a, b, O'Grady et al., 1996) und PPADS (Pyridoxal-50-Phosphat-6-Azophenyl-20, 40-Disulfonat) (Charlton et al., 1996 b, von Kügelgen und Hoffmann, 2016). Die P2Y<sub>1</sub>R-Strukturen teilen eine kanonische sieben-transmembrane (7TM) helikale Bündelarchitektur mit anderen bekannten GPCR-Strukturen. Es gibt zwei Disulfidbindungen, die den N-Terminus mit der Helix VII und die Helix III mit EC2 verbinden, wodurch die Konformationen der ECs stabilisiert werden. Das EC2 von P2Y<sub>1</sub>R weist eine Haarnadelstruktur auf, die zuvor in allen bekannten peptidgebundenen GPCR-Strukturen wie Protease-aktivierte Rezeptor 1 beobachtet wurde (Zhang et al., 2012, Zhang et al., 2015).

Die Cysteine, die eine Disulfidbrücke im P2Y<sub>1</sub>R (C124 in EC1 und C202 in EC2) bilden, sind in allen untersuchten Sequenzen (hGPR86, hGPR87, H963, KIAA0001, hGPR91, P2UR\_HUM, P2YR\_HUM) konserviert (Moro et al., 1999, Wittenberger et al., 2001). Im humanen P2Y<sub>1</sub>R spielen zwei Disulfidbrücken die Hauptrolle bei der Rezeptoraktivierung und dem Membrantransport-Rezeptor, wobei die EC2 über die Öffnung des Transmembranspaltes positioniert wird und somit der Zugang zur Bindungsstelle eingegrenzt wird (Moro et al., 1999). Die erste Disulfidbrücke befindet sich zwischen C124 (EC1) und C202 (EC2) und die zweite zwischen C42 (N-terminales Segment) und C296 (EC3) (Hoffmann et al., 1999, Moro et al., 1999). Die zweite Cystinbrücke scheint in allen Rezeptoren konserviert zu sein, mit Ausnahme von hGPR87 (Wittenberger et al., 2001). Mehrere Aminosäuren des P2Y<sub>1</sub>R, von denen

angenommen wird, dass sie direkt mit dem Liganden interagieren, Tyr136, His277 und Lys280, sind in den anderen Proteinen konserviert (Wittenberger et al., 2001).

#### 4.5.3 Vergleich mit Protease-aktivierte Rezeptor 1

Die Aminosäure an Position C3.25 kann außerdem eine wichtige Rolle bei der Stabilisierung der Antagonisten-Bindungstasche des Protease-aktivierte Rezeptor 1 spielen. Protease-aktivierte Rezeptor 1 ist das prototypische Mitglied einer Familie von G-Protein-gekoppelten Rezeptoren, die zelluläre Antworten auf Thrombin und verwandte Proteasen vermitteln (Zhang et al., 2012). Thrombin aktiviert Protease-aktivierte Rezeptor 1 irreversibel, indem es die amino-terminale Exodomäne des Rezeptors spaltet, die einen gebundenen Peptidliganden freilegt, der im heptahelikalen Bündel des Rezeptors bindet, um die G-Protein-Aktivierung zu beeinflussen. Die Kristallstruktur mit der 2.2 Å-Auflösung von humanem Protease-aktivierte Rezeptor 1 wurde mit Vorapaxar, einen Protease-aktivierte Rezeptor 1-Antagonisten, analysiert (Zhang et al., 2012). Dieses kleine Molekül bindet praktisch irreversibel, um die Rezeptoraktivierung durch den gebundenen Protease-aktivierte Rezeptor 1-Liganden zu inhibieren. Die Vorapaxar-Bindungstasche ist von der Membran aus gesehen oberflächlich, hat jedoch weniger Oberflächenkontakt gegenüber dem wässrigen Lösungsmittel. Der Protease-aktivierte Rezeptor 1 kann mehrere G-Proteine einschließlich  $G_i$ ,  $G_{12/13}$  und  $G_q$  aktivieren (Zhang et al., 2012). In humanem Protease-aktivierte Rezeptor 1 bilden C175 (3.25) in Helix III und C254 in EC2 eine konservierte Disulfidbindung. Der Zugang zur Vorapaxar-Bindungstasche ist durch die zentrale Lage von EC2 eingeschränkt, die die extrazellulär zugewandte Oberfläche von Vorapaxar fast vollständig bedeckt (Zhang et al., 2012).

#### 4.6 Ausblick

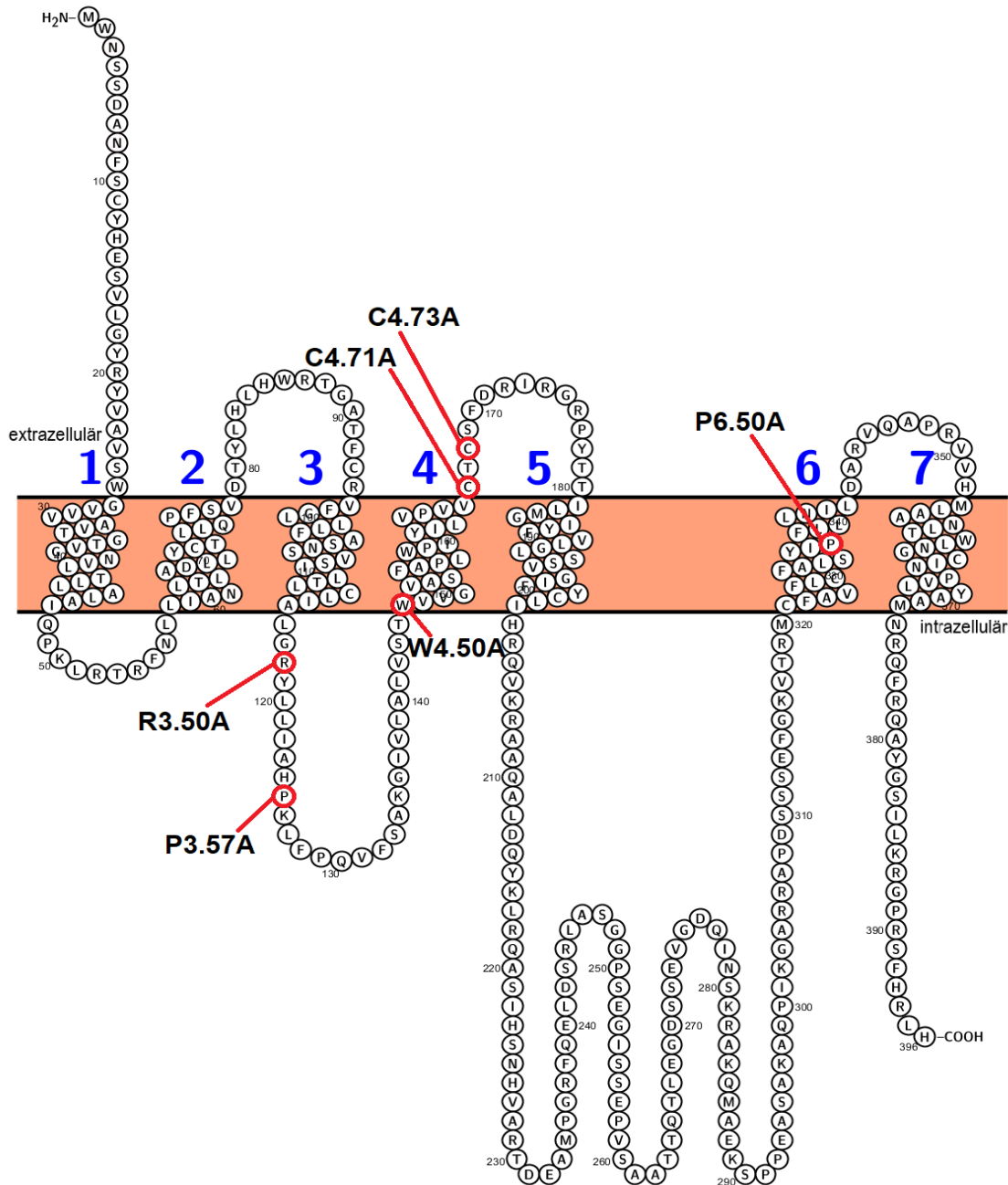
Die Durchführung von weiteren Mutagenese-Studien des GPR84 könnte Licht auf neue wichtige Ansatzpunkte für die pharmakologische Steuerung des Rezeptors werfen (Abb. 20.). Unter den potenziell wichtigen Aminosäuren des GPR84 finden sich C166 (C4.71A) und C168 (C4.73A), die mit C3.25 eine Disulfidbrücke bilden könnten. Eine konservierte Disulfidbrücke zwischen Cysteinen in der zweiten extrazellulären Schleife (EC2) und dem exofazialen Ende von TM3 erwies sich als essenziell für viele GPCRs.

Hochkonservierte Aminosäuren haben normalerweise eine funktionelle Rolle in Proteinen (Oliveira et al., 1994). Somit wurde die Wechselwirkung von G-Proteinen mit konservierten Teilen von GPCRs, wie dem vollständig konservierten Arginin, diskutiert (Oliveira et al., 1999). Wichtig für die Kopplung und Aktivierung von G-Proteinen sind das Asparaginsäure-Arginin-Tyrosin-Motiv am zytosolischen Ende der Helix III und die Schleifen zwischen den Helices III-IV und V-VI sowie die C-terminale Domäne (Oliveira et al., 1994). Solche funktionellen Mikrodomänen werden für eine effiziente Signaltransduktion benötigt (Ballesteros et al., 1998). Somit könnten R118 (R3.50) und P125 (P3.57) potenziell an der G-Protein-Kopplung des GPR84 beteiligt sein.

TM4 weist die konservierten Aminosäuren Tryptophan (W) und Prolin (P) auf (Wittenberger et al., 2001). Die konservierte W145 (W4.50) -Aminosäure in GPR84 (Wittenberger et al., 2001) könnte eine Rolle bei der Ligandenbindung spielen. Im CB2-Cannabinoid-Rezeptor, der zur GPCR-Familie gehört, hat die Entfernung der aromatischen Seitenkette durch das Mutieren von W172 zu Alanin oder Leucin in TM4 die Agonistenbindung eliminiert (Rhee et al., 2000). In GPCRs spielte die Konservierung von Prolin eine Schlüsselrolle bei der Identifizierung, Analyse und Modellierung der Transmembrandomänen (Ballesteros et al., 1995, Pogozeva et al., 1997, Sansom et Weinstein, 2000). Die konservierte P334 (P6.50) -Aminosäure (Wittenberger et al., 2001) im GPR84-Protein könnte die Funktion eines Konformationsschalters erfüllen.

Die EPR (‘electron paramagnetic resonance’) -Studien legen nahe, dass die Aktivierung von Rhodopsin eine Kaskade von Umlagerungen in der Konformation von TM6 auslöst, wobei die Flexibilität des Prolin-Knicks genutzt wird. Dies erweist sich als ein Schlüsselfaktor bei der Transduktion des Liganden-bindenden Signals an das zytoplasmatische Ende des Proteins, wo die Kopplung an G-Proteine stattfindet (Farrens et al., 1996, Sansom et Weinstein, 2000). Die strukturellen Veränderungen, die auf einen aktiven GPCR-Zustand zurückzuführen sind, betreffen im Apo-Protein von Rhodopsin, Opsin am meisten die TM5- TM7. Im aktivierten GPCR ist TM6 um 6–7 Å auf der zytoplasmatischen Seite nach außen geneigt, während die Helixstruktur von TM5 länglicher ist und nahe an TM6 liegt (Park et al., 2008). Somit könnten die gezielten

Mutationen der oben beschriebenen Aminosäuren in GPR84 zu Alanin (Abb. 20) zu einem Verlust der Rezeptorfunktion oder der Signaltransduktion führen.



**Abb. 21:** Schematische Darstellung der vermuteten zweidimensionalen Struktur des humanen GPR84. Die für die Rezeptorfunktion potenziell wichtigen Mutationen: R3.50A, P3.57A, W4.50A, C4.71A, C4.73A und P6.50A in Ballesteros-Weinstein Nummerierung wurden mit roter Umrandung markiert. Sequenz: uniprot.org/uniprot/Q9NQS5#function vom 20.07.2018. Erstellt mit: ‚Protter‘ <http://wlab.ethz.ch/protter/> abgerufen am 01.07.2018 (Omasits et al., 2014).

## 5. Zusammenfassung

Im Rahmen dieser zielgerichteten Mutagenese-Studie wurde Expression und Agonistenwirkung in CHO-Zellen mit den humanen GPR84 und den Rezeptormutanten C3.25A, R6.60A, A7.39S und N7.40A untersucht. Mit Hilfe einer immunhistochemischen Analyse wurde mittels eines Antikörpers die Rezeptorexpression untersucht. Als Agonist für funktionelle Versuche wurde 2-Hydroxy-Laurinsäure benutzt. Mittels [<sup>3</sup>H]cAMP-Assay wurde die Hemmung der Forskolin-induzierten cAMP-Produktion nach Zugabe des Agonisten gemessen, während mit dem NFAT (Nuklearfaktor der aktivierten T-Zellen) - Reporter-Gen-Assay ein Ca<sup>2+</sup>-abhängiger Signalweg untersucht wurde.

Die Expressionsanalyse in Zellen mit dem Wildtyp-Rezeptor und den Rezeptor-Mutanten hat die Membranexpression bestätigt. In der Zellmembran und im Zytoplasma der Zellen mit Wildtyp-Rezeptor wurde ein Anstieg der Lichtsignale im Vergleich zur Zellmembran und zum Zytoplasma von nicht transfizierten Zellen gemessen. Die Expression in der Zellmembran war signifikant größer als im Zytoplasma. Die Expression der Konstrukte C3.25A und N7.40A war niedriger als diejenige vom Wildtyp-Rezeptor, während die Expression der Konstrukte R6.60A und A7.39S kein Unterschied zum Wildtyp-Rezeptor zeigte. 2-Hydroxy-Laurinsäure (getestet bis 10 µM) hemmt die Forskolin-induzierte zelluläre cAMP-Produktion Konzentrations-abhängig in Zellen mit dem Wildtyp-Rezeptor. In den [<sup>3</sup>H]cAMP-Versuchen wurde bei Zellen mit der C3.25A-Mutante ein Funktionsverlust und bei Zellen mit der A7.39S-Mutante eine Linksverschiebung der Konzentrations-Wirkungskurve im Vergleich zu Zellen mit dem Wildtyp-Rezeptor gezeigt. Bei Zellen mit der Mutante R6.60A wurde kein Unterschied zu Zellen mit dem Wildtyp-Rezeptor in der cAMP-Hemmung beobachtet, während bei Zellen mit der N7.40A-Mutante eine Minderung des Maximaleffektes des Agonisten beobachtet wurde. 2-Hydroxy-Laurinsäure steigte die Signale im Ca<sup>2+</sup>-sensitiven NFAT-Assay. Ähnlich wie im [<sup>3</sup>H]cAMP-Assay wurde im NFAT-Reporter-Gen-Versuch bei den Zellen mit der C3.25A-Mutante ein Wirkungsverlust beobachtet. Bei den R6.60A- und A7.39S-Mutanten wurde in Funktionsassays kein Unterschied zum Wildtyp gezeigt. Ausserdem war der Effekt auf 2-Hydroxy-Laurinsäure in der Konzentration 10 µM bei der N7.40A-Mutante abgeschwächt.

Zusammenfassend zeigen die Daten, dass C3.25A wahrscheinlich an der Bildung einer Disulfidbrücke beteiligt ist. Die 7. Transmembranregion ist wahrscheinlich im Bereich der Aminosäuren A7.39 und N7.40 an Agonistenerkennung und/oder Rezeptoraktivierung beteiligt.



## 6. Anhang

### 6.1 Material

Molekularbiologie:

PCR Material:

- Oligonukleotiden: alle von biomers.net, (Quelle: Nukleotidendatenblatt)

**Tab. 12:** Primer-Sequenz gemäß Hersteller biomers.net GmbH.

<b>Primer:</b>	<b>Primersequenz:</b>	<b>Vol.f. 100 pmol/μL:</b>
hGPR84_R660A_rev	5'- cgt gga gcc tgg act gcg gca tcc aga atg -3'	98 μL
hGPR84_R660A_for	5'- cat tct gga tgc cgc agt cca ggc tcc acg -3'	145 μL
hGPR84_N740A_rev	5'- gag cca ggt gag ggc agc aag cat g - 3'	67 μL
hGPR84_N740A_for	5'- cat gct tgc tgc cgc cct cac ctg gct c-3'	184 μL
hGPR84_D658A_rev	5'- gag cct gga ctc tgg cag cca gaa tgt tga gca g-3'	120 μL
hGPR84_D658A_for	5'- ctg ctc aac att ctg gct gcc aga gtc cag gct c-3'	176 μL
hGPR84_C325A_rev	5'- gag ccc aaa tac cct ggc gaa ggt ggc tcc ggt gcg cca gtg-3'	134 μL
hGPR84_C325A_for	5'- cac tgg cgc acc gga gcc acc ttc gcc agg gta ttt ggg ctc-3'	150 μL
hGPR84_A739S_rev	5'- gag cca ggt gag gtt gga agc aag cat gtg gac-3'	177 μL
hGPR84_A739S_for	5'- gtc cac atg ctt gct tcc aac ctc acc tgg ctc-3'	188 μL

- Template: T84, hGPR84\_D\_pcDNA5

- 1 µL Template
- 2 µL forward Primer Lösung GPR84\_for
- 2 µL reverse Primer Lösung GPR84\_rev
- Blue Juice Gel Loading Puffer [1 mL], Invitrogen, Cat. No. 10816-015, Lot. No. 1136799
- 1 kB Plus DNA-Leiter, Invitrogen, Cat. No. 10787-018, Lot No. 946743
- Enzym Nhe I. Platinum PCR SuperMix, der Platinum Taq DNA Polymerase mit Taq Antikörper von Invitrogen beinhaltet, Cat. No. 11306-016. Platinum PCR SuperMix beinhalten Reagenzien zur Amplifikation von Nukleinsäuren Templates durch PCR. Es beinhaltet anti-Taq DNA-Polymerase Antikörper, Mg<sup>2+</sup>, dNTPs und rekombiniertes Taq DNA. Die Anti-Taq DNA-Polymerase Antikörper hemmen die Aktivität der Polymerase. Das Platinum SuperMix ist in einer inaktiven Form aufgrund der spezifischen Bindung der Antikörper und wird nach Denaturierung im PCR unter 94°C reaktiviert (<https://assets.thermofisher.com/TFS-Assets/LSG/manuals/11306016.pdf> vom 25.08.2018).
- Enzym: ACCU Prime Pfx SuperMix  
Cat.No.12344-040, Lot. No. 1070391

Das Enzym Nhe I Platinum PCR SuperMix wird benutzt für:

GPR84\_for und GPR84\_rev

Das Enzym ACCU Prime Pfx SuperMix wird benutzt für GPR84\_for und GPR84\_rev, jeweils bei Mutanten:

C3.25A, A7.39S, R6.60A, N7.40A

Agarosegel-Elektrophorese:

- Agarose-Gel SERVA for DNA electrophoresis research grade  
11404. Lot 071420
- 1 x TAE, also Tris-Acetat-EDTA-Puffer

**Tab. 13:** PCR (ACCU-PCR Program).

No.	Temperatur, [°C]	Zeit, [min]
1.	95	5
2.	95	0,5
3.	55	1
4.	72	13x16 Zyklen
5.	72	10
6.	4	Pause

Erzeugung von genetisch veränderten Organismen:

- DPN I: Restriktionsenzym. Bio Labs, New England, #R0176S, Lot.no. 0331112
- S.O.C.: Medium für Bakterien. Invitrogen. Cat. No. 15544-034, Lot. No. 953215, P/N 46-0700
- Escherichia coli: Invitrogen. Nicht humanpathogen. Chemisch kompetent, TOP 10, One Shot. Cat. Nos. C4040-10 (10 Reaktionen)

Die Selektion von Bakterienkolonien:

- Bakteriell Medium: LB Broth (1X), LOT 1616155 gibco by life technologies, REF 10855-001, 1000mL
- Antibiotikum: 100 µg/mL Ampicillin, für die Selektion von resistenten Escherichia coli
- Beimpfte Kolonien mit genetisch veränderten Escherichia coli

QIAprep Spin Miniprep Kit (250):

- 4 beimpfte Röhren mit 4 Kolonien
- QIAprep Spin Miniprep Kit (250). Cat. No. 27106. Gelagert auf 15-25°C. Lot. No. 142326168. Lyse Blue Reagent.

### Material für Zellkultur:

D1 KUC 576, hGPR84, pc\_DNA5, CHO Flp-In™, P2: 03.02.2012, aufgetaut: 25.08.2015.

D3 Zeocin™ NEU P4: 14.05.2012, MUC 637, aufgetaut: 25.08.2015.

### Medien:

Alle Zellen sind Flp-In™ Zellen. Die Flp-In™-CHO-Zelllinie wurde durch Transfektion von CHO-Zellen mit pFRT / lacZeo2 und Selektion der Zeocin™-resistenten Klonen erzeugt (<https://www.thermofisher.com/order/catalog/product/R75807> abgerufen am 25.08.2018).

- Flp-In™-CHO Cell Line, Cat. No. R75807, Invitrogen™
- Ohne AB: F12+ glu. + FBS (10 %)
- Hygromycin B: F12+ glu. + FBS (10%) +Hygromycin B (500 µg/ mL)
- Zeocin™: F12+ glu. + FBS (10 %) +Zeocin (100 µg/ mL)
  - Für ohne Antibiotikum Medium: gibco by life technologies
  - Ohne Antibiotikum: F-12 Nut Mix (1X) +GlutaMax –I  
F-12 Nutrient Mixture (Ham)  
REF: 31765-027, 500 mL  
31765-068, 10x500 mL  
LOT: 1603870 Exp: 06-2016

### Splitten der Zellen:

- D. PBS ohne Ca<sup>2+</sup>/Mg<sup>2+</sup>, steril, Waschpuffer
- 0,05 % Trypsin- EDTA, Rel: 25300- 054, Lot: 1401880
- Hygromycin B Medium
- Zeocin Medium
- Zellkulturen
- Mittlere Nährbodenflaschen, 75 cm<sup>2</sup>, 250 mL PS, steril, cellstar, greiner bio-on

## Transfektion von Zellen:

- Medium ohne Antibiotikum
- Opti-MEM I (1X), steril.  
Reduced Serum Medium, gibco by life technologies  
[+] L-Glutamin  
[+] HEPES  
[-] Phenol Rot  
Ref: 11058-021, 500 mL, Lot: 1136436.
- Lipofectamin 2000 Reagenz 1,5 mL (1 mg/ mL), Invitrogen, P/N: 52887, Lot. No. 1407103
- pOG 44 (maxiprep), Datum d. Plasmidpreparation: 12.11.2014, 3,49 µg/ µL (EB)
- Kleine Nährbodenflaschen, 25 cm<sup>2</sup>, 50 mL PS, steril, cellstar, greiner bio-one
- Mittlere Nährbodenflaschen, 75 cm<sup>2</sup>, 250 mL PS, steril, cellstar, greiner bio-one

**Tab. 14:** DNA-Vektoren.

Nummer:	Vektor:	Erzeugungs-Datum:
1	hGPR84_C3.25A_C, pc_DNA5	10.04.2015
2	hGPR84_N7.40A_B, pc_DNA5	14.04.2015
3	hGPR84_R6.60A_C, pc_DNA5	15.04.2015
4	hGPR84_A7.39S_B, pc_DNA5	16.04.2015

## Splitten der Zellen nach der Transfektion:

P<sub>0</sub> Medium: F12 +glut. +FBS (10 %) + Hygromycin B (600 µg/ mL)

## Versuch mit radioaktiv markiertes cAMP:

- Zellkulturen:
- CHO Flp- In, pc\_DNA5, hGPR84\_WT  
CHO Flp- In, pc\_DNA5, hGPR84\_C3.25A  
CHO Flp- In, pc\_DNA5, hGPR84\_R6.60A  
CHO Flp- In, pc\_DNA5, hGPR84\_A7.39S  
CHO Flp- In, pc\_DNA5, hGPR84\_N7.40A
- Ohne Antibiotikum Medium, Hygromycin B Medium, Zeocin Medium

- DPBS (1x) ohne  $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$ , gibco by life technologies, Ref: 14190-094 (500 mL), 14190-169 (10x 500 mL), Lot: 1561176
- Trypsin- EDTA: 0.05 %, Ref: 25300-054, Lot: 1401880
- Forskolin 10  $\mu\text{M}$  in EtOH / DMSO im 7:1 Verhältnis
- DMSO: Dimethylsulphoxide > 99,5 %.  $M = 78.13 \text{ g/mol}$   
Konzentration von Sigma Aldrich. D5879-500ML. Lot# SZBD0030V
- 24 Well-Zellkulturplatte, steril, Cellstar greiner bio-one, Cat. No. 662160. Lot: E140604Q.
- cAMP: 1600 pmol+ 5 mL  $\text{H}_2\text{O}$  dist. TRK432. Lot. 86A from Cyclic AMP [ $^3\text{H}$ ] Assay System. Amersham Pharmacia. Biotech UK Limited. Gelöst am: 17.06.2014. LTRK432SA/AA
- Kohlenstoff Suspension, Kohlendioxiddimethylester > 99 %, Produktenummer: 517127-100ML, Sigma Aldrich
- Puffer A ohne Sukrose
- Bindeprotein: Protein aus Nebenbierenrinde vom Rind, 5 mg/ mL von 12.07.2007.
- [ $^3\text{H}$ ]: radioaktives Tritium, Perkin Elmer Life and Analytical Science
- Lamagel Szintillator Gels
- Agonist: 2-Hydroxy-Laurinsäure

#### p-NFAT- Luciferase Assay:

- pNFAT\_luc, 100  $\mu\text{L}$
- Assay-Platten
- Lipofectamin 2000, Invitrogen, P/N 52887, Reagenz 1,5 mL (1 mg/ mL), Lot. No. 1609073
- Zellkulturen:  
CHO Flp- In, pc\_DNA5, hGPR84\_ C3.25A,  
CHO Flp- In, pc\_DNA5, hGPR84\_ N7.40A  
CHO Flp- In, pc\_DNA5, hGPR84\_ R6.60A  
CHO Flp- In, pc\_DNA5, hGPR84\_ A7.39S  
CHO Flp- In, pc\_DNA5, hGPR84\_WT  
CHO Flp- In, Zeocin

## Immunfluoreszenz:

- Messgerät: BMG Labtech, FLUOstar OPTIMA, Microplate: Greiner 96 F-Bottom
- FBS, gibco, Ref: 10270-106, Lot: 411213K
- Triton von Sigma Aldrich, triton x 100, 2 ‰
- Antikörper: Invitrogen, 50 mL at 1,08 mg/ mL, 1:500 (V/V), Anti-V<sub>5</sub>-FITC Ab. Part No. 46-0308, Lot. No: 1049405
- Methanol, Sigma Aldrich, 32213 Methanol, puriss. P.a. Reag. ACS. Lot. No: SZBA1530
- 6-Wellplatte
- Zeiss Laser-Scanning Mikroskop
- Aminosäuresequenz von hGPR84 Wildtyp.

[uniprot.org/uniprot/Q9NQS5#function](http://uniprot.org/uniprot/Q9NQS5#function) abgerufen am 20.06.2018:

10	20	30	40	50
MWNSSDANFS	CYHESVLGYR	YVAVSWGVVV	AVTGTVG NVL	TLLALAIQPK
60	70	80	90	100
LRTRFNLLIA	NLTLADLLYC	TLLQPFSVDT	YLHLHWRTGA	TFCRVFGLLL
110	120	130	140	150
FASNSVSILT	LCLIALGRYL	LIAHPKLFPQ	VFSAKGIVLA	LVSTWVVGVA
160	170	180	190	200
SFAPLWPIYI	LVPVVCTCSF	DRIRGRPYTT	ILMGIYFVLG	LSSVGIFYCL
210	220	230	240	250
IHRQVKRAAQ	ALDQYKLRQA	SIHSNHVART	DEAMPGRFQE	LDSRLASGGP
260	270	280	290	300
SEGISSEPVS	AATTQTLEGD	SSEVG DQINS	KRAKQMAEKS	PPEASAKAQP
310	320	330	340	350
IKGARRAPDS	SSEFGKVTRM	CFAVFLCFAL	SYIPFLLLNI	LDARVQAPRV
360	370	380	390	
VHMLAANLTW	LNGCINPVLY	AAMNRQFRQA	YGSILKRGPR	SFHRLH

## Software und Web-Links:

<https://www.sigmaaldrich.com/catalog/search/substructure/SubstructureSearchPage>  
abgerufen am 04.08.2018

<https://assets.thermofisher.com/TFS-Assets/LSG/manuals/11306016.pdf> abgerufen am  
25.08.2018

<https://www.thermofisher.com/order/catalog/product/R75807> abgerufen am 25.08.2018

‚Protter‘ <http://wlab.ethz.ch/protter/> abgerufen am 01.07.2018

Sequenz des humanen GPR84: [uniprot.org/uniprot/Q9NQS5#function](http://uniprot.org/uniprot/Q9NQS5#function) abgerufen am  
20.07.2018

GraphPad Prism Version 4.03, 25. Januar 2005

ZEN 2012 SP2 (blue edition) Copyright 1999-2013 von Carl Zeiss

## Mikroskop:

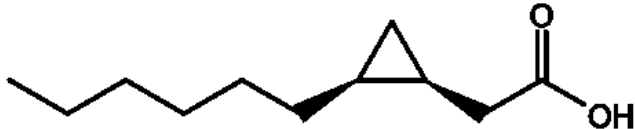
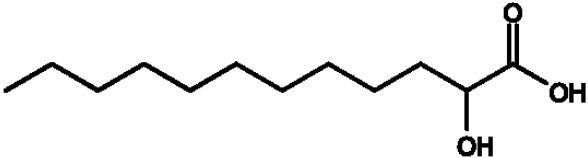
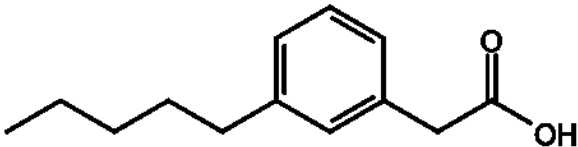
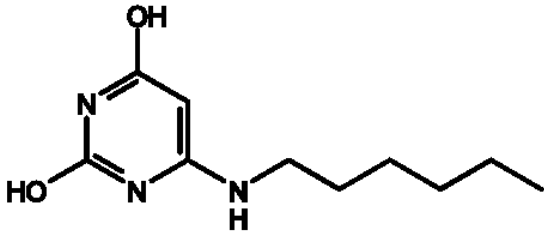
Observer Z1 Carl Zeiss, SIP-No. Zeiss AIM-System 2601000450

LSM Carl Zeiss Microscopy 4210153691, SN: 3834003144

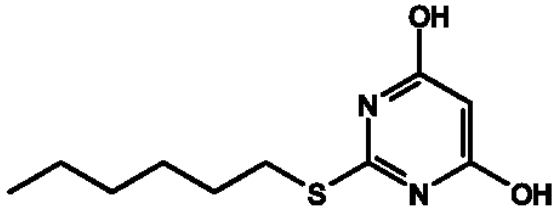
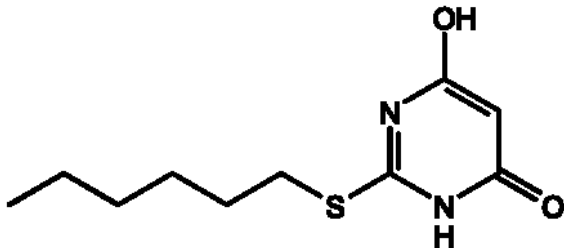
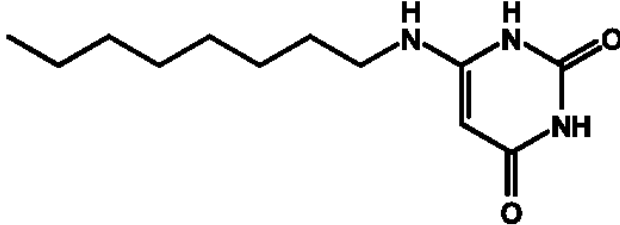
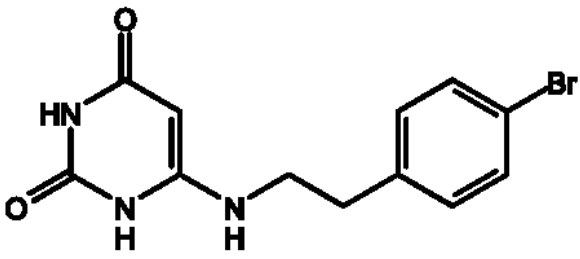


## 6.2 Chemische Strukturen und Formeln

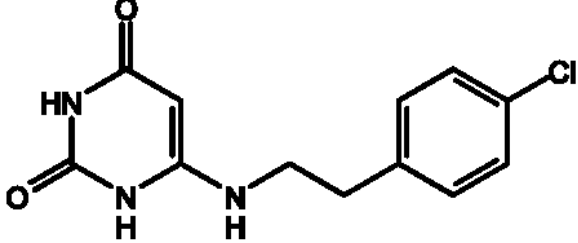
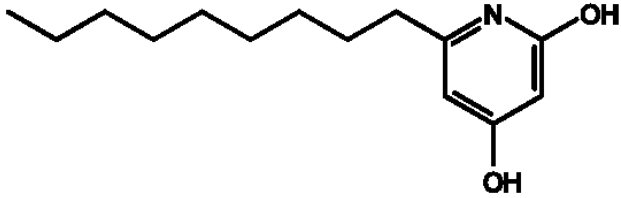
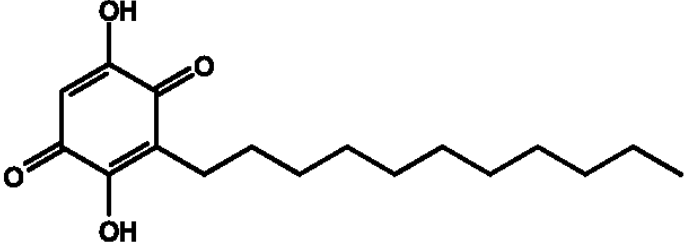
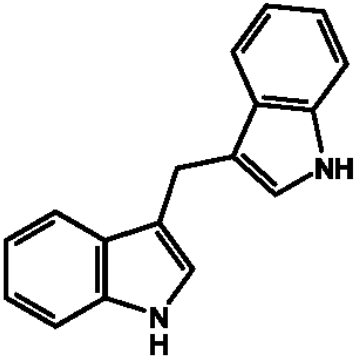
**Tab. 15:** Chemische Strukturen und Formeln. Verbindungen wurden mit Hilfe von <https://www.sigmaaldrich.com/catalog/search/substructure/SubstructureSearchPage> abgerufen am 04.08.2018 modelliert.

Name	Molekulare Formel	Struktur
Cis-2-(2-Hexacyclopropyl)-essigsäure	$C_{11}H_{20}O_2$	
2-Hydroxy-Laurinsäure	$C_{12}H_{24}O_3$	
(3-Pentylphenyl) Essigsäure (PBI-4050)	$C_{13}H_{18}O_2$	
6-Hexylamino-2,4(1H,3H)-Pyrimidinedione (PSB-1584)	$C_{10}H_{17}N_3O_2$	

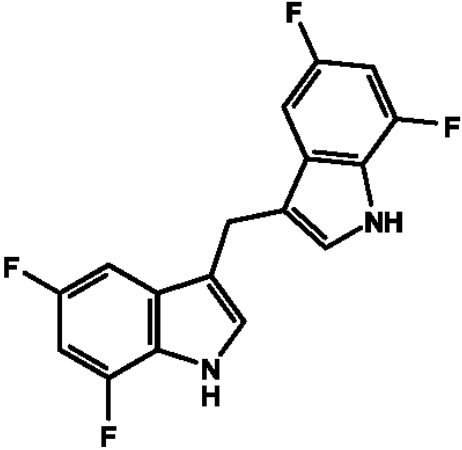
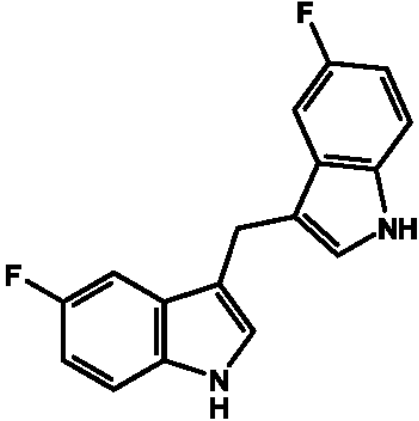
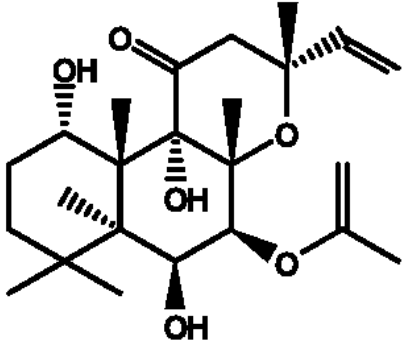
**Tab. 16:** Chemische Strukturen und Formeln. Für Details siehe Tab. 15.

Name	Molekulare Formel	Struktur
Verbindung 1	$C_{10}H_{16}O_2N_2S$	 <p>The structure shows a pyrimidine ring with hydroxyl groups at positions 4 and 6, and a hexylthio group at position 2.</p>
2-(Hexylthio) Pyrimidin-4,6-diol  (ZQ-16)	$C_{10}H_{16}N_2O_2S$	 <p>The structure shows a pyrimidine ring with a carbonyl group at position 4, a hydrogen atom at position 3, and a hexylthio group at position 2.</p>
6-n- Octylaminouracil (6-OAU)	$C_{12}H_{21}N_3O_2$	 <p>The structure shows a uracil ring with a carbonyl group at position 2, a hydrogen atom at position 3, and an octylamino group at position 6.</p>
6-((p-Bromo- Phenylethyl) Amino)-2,4(1H,3H)- Pyrimidinedione  (PSB-17365)	$C_{12}H_{12}O_2N_3Br$	 <p>The structure shows a pyrimidine-2,4-dione ring with a carbonyl group at position 2, a hydrogen atom at position 3, and a (p-bromophenylethyl)amino group at position 6.</p>

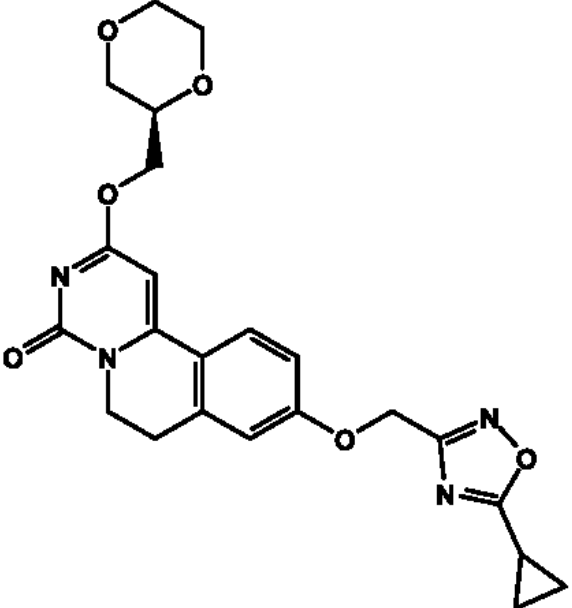
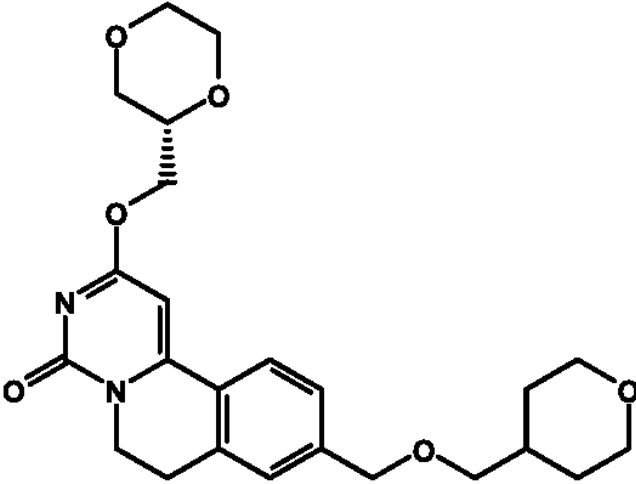
**Tab. 17:** Chemische Strukturen und Formeln. Für Details siehe Tab. 15.

Name	Molekulare Formel	Struktur
6-((p-Chloro-Phenylethyl) Amino)-2,4(1H,3H)-Pyrimidinedione  (PSB-16434)	$C_{12}H_{12}O_2N_3Cl$	
6-Nonylpyridin-2,4-diol	$C_{14}H_{23}NO_2$	
Embelin	$C_{17}H_{26}O_4$	
3,3'-Diindolylmethan  (DIM)	$C_{17}H_{14}N_2$	

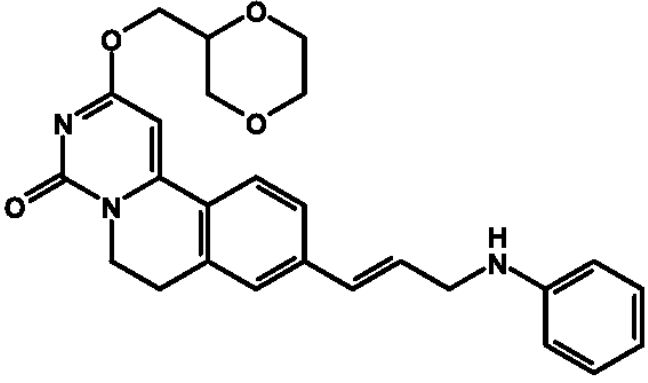
**Tab. 18:** Chemische Strukturen und Formeln. Für Details siehe Tab. 15.

Name	Molekulare Formel	Struktur
Di (5,7-difluor-1H-indol-3-yl)- Methan  (PSB-16671)	$C_{17}H_{10}N_2F_2$	
Di (5-fluor-1H-indol-3-yl)- Methan  (PSB-15160)	$C_{17}H_{12}N_2F_4$	
Forskolin	$C_{22}H_{34}O_7$	

**Tab. 19:** Chemische Strukturen und Formeln. Für Details siehe Tab. 15.

Name	Molekulare Formel	Struktur
9- (5-Cyclopropyl- [1,2,4] oxadiazol-3- ylmethoxy) -2 - ((R) -1- [1,4] dioxan-2- ylmethoxy) -6 7- Dihydropyrimido [6,1- a] isochinolin-4-on  (Verbindung 104)	$C_{23}H_{26}N_4O_6$	
2 - ((S) -1- [1,4] Dioxan-2-ylmethoxy) - 9- (tetrahydropyran-4- yl) Methoxymethyl) - 6,7-dihydropyrimido [6,1-a] isochinolin-4-on  (Verbindung 161)	$C_{24}H_{32}N_2O_6$	

**Tab. 20:** Chemische Strukturen und Formeln. Für Details siehe Tab. 15.

Name	Molekulare Formel	Struktur
2 - ([1,4] Dioxan-2-ylmethoxy) -9- (3-phenylamino-prop-1-ynyl) -6, 7-Dihydropyrimido [6,1-a] isochinolin-4-on (Verbindung 107)	$C_{26}H_{27}N_3O_4$	

## 7. Literaturverzeichnis

Abbracchio MP, Burnstock G, Boeynaems JM, Barnard EA, Boyer JL, Kennedy C, Knight GE, Fumagalli M, Gachet C, Jacobson KA, Weisman GA. International Union of Pharmacology LVIII: update on the P2Y G protein-coupled nucleotide receptors: from molecular mechanisms and pathophysiology to therapy. *Pharmacol Rev.* 2006; 58: 281-341

Abdel-Aziz H, Schneider M, Neuhuber W, Kassem AM, Khailah S, Müller J, Gamaleldeen H, Khairy A, Khayyal MT, Shcherbakova A, Efferth T, Ulrich-Merzenich G. GPR84 and TREM-1 signaling contribute to the pathogenesis of reflux esophagitis. *Mol Med.* 2015; 21:1011–1024

Ahn KH, Scott CE, Abrol R, Goddard WA 3rd, Kendall DA. Computationally-predicted CB1 cannabinoid receptor mutants show distinct patterns of salt-bridges that correlate with their level of constitutive activity reflected in G protein coupling levels, thermal stability, and ligand binding. *Proteins.* 2013; 81: 1304-1317

Ahuja SK, Lee JC, Murphy PM. CXC chemokines bind to unique sets of selectivity determinants that can function independently and are broadly distributed on multiple domains of human interleukin-8 receptor B. Determinants of high affinity binding and receptor activation are distinct. *J Biol Chem.* 1996; 271: 225-232

Al Mahmud Z, Jenkins L, Ulven T, Labéguère F, Gosmini R, De Vos S, Hudson BD, Tikhonova IG, Milligan G. Three classes of ligands each bind to distinct sites on the orphan G protein-coupled receptor GPR84. *Sci Rep.* 2017; 7: 17953

Algaier I, Jakubowski JA, Asai F, von Kügelgen I. Interaction of the active metabolite of prasugrel, R-138727, with cysteine 97 and cysteine 175 of the human P2Y<sub>12</sub> receptor. *J Thromb Haemost.* 2008; 6: 1908-1914

Amiri Moghaddam J, Dávila-Céspedes A, Kehraus S, Crüsemann M, Köse M, Müller CE, König GM. Cyclopropane-Containing Fatty Acids from the Marine Bacterium *Labrenzia* sp. 011 with Antimicrobial and GPR84 Activity. *Mar Drugs.* 2018; 16: 369

Audoy-Rémus J, Bozoyan L, Dumas A, Filali M, Lecours C, Lacroix S, Rivest S, Tremblay ME, Vallières L. GPR84 deficiency reduces microgliosis, but accelerates dendritic degeneration and cognitive decline in a mouse model of Alzheimer's disease. *Brain Behav Immun*. 2015; 46: 112-120

Ayyanathan K, Webbs TE, Sandhu AK, Athwal RS, Barnard EA, Kunapuli SP. Cloning and chromosomal localization of the human P2Y1 purinoceptor. *Biochem Biophys Res Commun*. 1996; 218: 783-888

Azimzadeh P, Olson JA Jr, Balenga N. Reporter gene assays for investigating GPCR signaling. *Methods Cell Biol*. 2017; 142: 89-99.

Baldwin JM. The probable arrangement of the helices in G protein-coupled receptors. *EMBO J*. 1993; 12: 1693-1703

Ballesteros JA, Weinstein H. Integrated methods for the construction of three-dimensional models and computational probing of structure-function relations in G protein-coupled receptors. *Methods Neurosci*. 1995; 25: 366-428

Ballesteros JA, Kitanovic S, Guarnieri F, Davies P, Fromme BJ, Konvicka K, Chi L, Millar RP, Davidson JS, Weinstein H, Sealfon SC. Functional microdomains in G-protein-coupled receptors. The conserved arginine-cage motif in the gonadotropin-releasing hormone receptor. *J Biol Chem*. 1998; 273: 10445-10453

Banno Y, Asano T, Nozawa Y. Stimulation by G protein betagamma subunits of phospholipase C beta isoforms in human platelets. *Thromb Haemost*. 1998; 79: 1008-1013

Barragán-Iglesias P, Mendoza-Garcés L, Pineda-Farias JB, Solano-Olivares V, Rodríguez-Silverio J, Flores-Murrieta FJ, Granados-Soto V, Rocha-González HI. Participation of peripheral P2Y1, P2Y6 and P2Y11 receptors in formalin-induced inflammatory pain in rats. *Pharmacol Biochem Behav*. 2015; 128: 23-32

Bockaert J, Pin JP. Molecular tinkering of G protein-coupled receptors: an evolutionary success. *EMBO J*. 1999; 18: 1723-1729



Bodor ET, Waldo GL, Hooks SB, Corbitt J, Boyer JL, Harden TK. Purification and functional reconstitution of the human P2Y<sub>12</sub> receptor. *Mol Pharmacol.* 2003; 64: 1210-1216

Bond RA, Ijzerman AP. Recent developments in constitutive receptor activity and inverse agonism, and their potential for GPCR drug discovery. *Trends Pharmacol Sci.* 2006; 27: 92-96

Bouchard C, Pagé J, Bédard A, Tremblay P, Vallières L. G protein-coupled receptor 84, a microglia-associated protein expressed in neuroinflammatory conditions. *Glia* 2007; 55: 790-800

Bouvier M. Oligomerization of G-protein-coupled transmitter receptors. *Nat Rev Neurosci.* 2001; 2: 274-286

Cattaneo M. The platelet P2Y<sub>12</sub> receptor for adenosine diphosphate: congenital and drug-induced defects. *Blood* 2011; 117: 2102-2112

Chan AS, Lau WW, Szeto AC, Wang J, Wong YH. Differential Regulation of CXCL8 Production by Different G Protein Subunits with Synergistic Stimulation by Gi- and Gq-Regulated Pathways. *J Mol Biol.* 2016; 428: 3869-3884

Chan JS, Lee JW, Ho MK, Wong YH. Preactivation permits subsequent stimulation of phospholipase C by G(i)-coupled receptors. *Mol Pharmacol.* 2000; 57: 700-708

Charles AC, Mostovskaya N, Asas K, Evans CJ, Dankovich ML, Hales TG. Coexpression of delta-opioid receptors with micro receptors in GH3 cells changes the functional response to micro agonists from inhibitory to excitatory. *Mol Pharmacol.* 2003; 63: 89-95

Charlton SJ, Brown CA, Weisman GA, Turner JT, Erb L, Boarder MR. PPADS and suramin as antagonists at cloned P2Y- and P2U-purinoceptors. *Br J Pharmacol.* 1996 a; 118: 704-710

Charlton SJ, Brown CA, Weisman GA, Turner JT, Erb L, Boarder MR. Cloned and transfected P2Y<sub>4</sub> receptors: characterization of a suramin and PPADS-insensitive response to UTP. *Br J Pharmacol.* 1996 b; 119: 1301-1303

Cheng Z, Garvin D, Paguio A, Stecha P, Wood K, Fan F. Luciferase Reporter Assay System for Deciphering GPCR Pathways. *Curr Chem Genomics* 2010; 4: 84-91

Chhatriwala M, Ravi RG, Patel RI, Boyer JL, Jacobson KA, Harden TK. Induction of novel agonist selectivity for the ADP-activated P2Y1 receptor versus the ADP-activated P2Y12 and P2Y13 receptors by conformational constraint of an ADP analog. *J Pharmacol Exp Ther.* 2004; 311: 1038-1043

Clapham DE, Neer EJ. G protein beta gamma subunits. *Annu Rev Pharmacol Toxicol.* 1997; 37: 167-203

Cordeaux Y, Hill SJ. Mechanisms of cross-talk between G-protein-coupled receptors. *Neurosignals.* 2002; 11: 45-57

Costa CG, Dorland L, Holwerda U, de Almeida IT, Poll-The BT, Jakobs C, Duran M. Simultaneous analysis of plasma free fatty acids and their 3-hydroxy analogs in fatty acid beta-oxidation disorders. *Clin Chem.* 1998; 44: 463-471

Dangelmaier C, Jin J, Smith JB, Kunapuli SP. Potentiation of thromboxane A2-induced platelet secretion by Gi signaling through the phosphoinositide-3 kinase pathway. *Thromb Haemost.* 2001; 85: 341-348

D'Antona AM, Ahn KH, Kendall DA. Mutations of CB1 T210 produce active and inactive receptor forms: correlations with ligand affinity, receptor stability, and cellular localization. *Biochemistry.* 2006; 45: 5606-5617

Della Rocca GJ, van Biesen T, Daaka Y, Luttrell DK, Luttrell LM, Lefkowitz RJ. Ras-dependent mitogen-activated protein kinase activation by G protein-coupled receptors. Convergence of Gi- and Gq-mediated pathways on calcium/calmodulin, Pyk2, and Src kinase. *J Biol Chem.* 1997; 272: 19125-19132

Dietrich PA, Yang C, Leung HH, Lynch JR, Gonzales E, Liu B, Haber M, Norris MD, Wang J, Wang JY. GPR84 sustains aberrant  $\beta$ -catenin signaling in leukemic stem cells for maintenance of MLL leukemogenesis. *Blood* 2014; 124: 3284-3294

Ding Z, Bynagari YS, Mada SR, Jakubowski JA, Kunapuli SP. Studies on the role of the extracellular cysteines and oligomeric structures of the P2Y<sub>12</sub> receptor when interacting with antagonists. *J Thromb Haemost.* 2009; 7: 232-234

Doi M, Murai I, Kunisue S, Setsu G, Uchio N, Tanaka R, Kobayashi S, Shimatani H, Hayashi H, Chao HW, Nakagawa Y, Takahashi Y, Hotta Y, Yasunaga J, Matsuoka M, Hastings MH, Kiyonari H, Okamura H. Gpr176 is a Gz-linked orphan G-protein-coupled receptor that sets the pace of circadian behaviour. *Nat Commun.* 2016; 7: 10583

Du Toit E, Browne L, Irving-Rodgers H, Massa HM, Fozzard N, Jennings MP, Peak IR. Effect of GPR84 deletion on obesity and diabetes development in mice fed long chain or medium chain fatty acid rich diets. *Eur J Nutr.* 2018; 57: 1737-1746

Durg S, Veerapur VP, Neelima S, Dhadde SB. Antidiabetic activity of *Embelia ribes*, embelin and its derivatives: A systematic review and meta-analysis. *Biomed Pharmacother.* 2017; 86: 195-204

Farrens DL, Altenbach C, Yang K, Hubbell WL, Khorana HG. Requirement of rigid-body motion of transmembrane helices for light activation of rhodopsin. *Science.* 1996; 274: 768-770

Franke H, Illes P. Nucleotide signaling in astrogliosis. *Neurosci Lett.* 2014; 565: 14-22

Fredriksson R, Lagerström MC, Lundin LG, Schiöth HB. 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

Fredriksson R, Schiöth HB. The repertoire of G-protein-coupled receptors in fully sequenced genomes. *Mol Pharmacol.* 2005; 67: 1414-1425

Gachet C. Regulation of platelet functions by P<sub>2</sub> receptors. *Annu Rev Pharmacol Toxicol.* 2006; 46: 277-300

Gagnon L, Leduc M, Thibodeau JF, Zhang MZ, Grouix B, Sarra-Bournet F, Gagnon W, Hince K, Tremblay M, Geerts L, Kennedy CRJ, Hébert RL, Gutsol A, Holterman CE, Kamto E, Gervais L, Ouboudinar J, Richard J, Felton A, Laverdure A, Simard JC,

Létourneau S, Cloutier MP, Leblond FA, Abbott SD, Penney C, Duceppe JS, Zacharie B, Dupuis J, Calderone A, Nguyen QT, Harris RC, Laurin P. A Newly Discovered Antifibrotic Pathway Regulated by Two Fatty Acid Receptors: GPR40 and GPR84. *Am J Pathol.* 2018; 188: 1132-1148

Gaidarov I, Anthony T, Gatlin J, Chen X, Mills D, Solomon M, Han S, Semple G, Unett DJ. Embelin and its derivatives unravel the signaling, proinflammatory and antiatherogenic properties of GPR84 receptor. *Pharmacol Res.* 2018; 131: 185-198

Gao J, Cha S, Jonsson R, Opalko J, Peck AB. Detection of anti-type 3 muscarinic acetylcholine receptor autoantibodies in the sera of Sjögren's syndrome patients by use of a transfected cell line assay. *Arthritis Rheum.* 2004; 50: 2615-2621

Grouix B, Sarra-Bournet F, Leduc M, Simard JC, Hince K, Geerts L, Blais A, Gervais L, Laverdure A, Felton A, Richard J, Ouboudinar J, Gagnon W, Leblond FA, Laurin P, Gagnon L. PBI-4050 Reduces Stellate Cell Activation and Liver Fibrosis through Modulation of Intracellular ATP Levels and the Liver Kinase B1/AMP-Activated Protein Kinase/Mammalian Target of Rapamycin Pathway. *J Pharmacol Exp Ther.* 2018; 367: 71-81.

Guo L, Zhang X, Zhou D, Okunade AL, Su X. Stereospecificity of fatty acid 2-hydroxylase and differential functions of 2-hydroxy fatty acid enantiomers. *J Lipid Res.* 2012; 53:1327-1335

Gudermann T, Birnbaumer M, Birnbaumer L. Evidence for dual coupling of the murine luteinizing hormone receptor to adenylyl cyclase and phosphoinositide breakdown and Ca<sup>2+</sup> mobilization. Studies with the cloned murine luteinizing hormone receptor expressed in L cells. *J Biol Chem.* 1992; 267: 4479-4488

Irino Y, Nakamura Y, Inoue K, Kohsaka S, Ohsawa K. Akt activation is involved in P2Y<sub>12</sub> receptor-mediated chemotaxis of microglia. *J Neurosci Res.* 2008; 86: 1511-1519

Hao K, Ali M, Siddiqui AW. New compounds from the seeds of *Embelia ribes* Burm. *Pharmazie.* 2005; 60: 69-71

- Han JF, Wang SL, He XY, Liu CY, Hong JY. Effect of genetic variation on human cytochrome p450 reductase-mediated paraquat cytotoxicity. *Toxicol Sci.* 2006; 91: 42-48
- Hanson MA, Roth CB, Jo E, Griffith MT, Scott FL, Reinhart G, Desale H, Clemons B, Cahalan SM, Schuerer SC, Sanna MG, Han GW, Kuhn P, Rosen H, Stevens RC. Crystal structure of a lipid G protein-coupled receptor. *Science* 2012; 335: 851-855
- Hellebrand S, Schaller HC, Wittenberger T. The brain-specific G-protein coupled receptor GPR85 with identical protein sequence in man and mouse maps to human chromosome 7q31. *Biochim Biophys Acta.* 2000; 1493: 269-272
- Henderson DJ, Elliot DG, Smith GM, Webb TE, Dainty IA. Cloning and characterisation of a bovine P2Y receptor. *Biochem Biophys Res Commun.* 1995; 212: 648-656
- Herbert JM, Tissinier A, Defreyn G, Maffrand JP. Inhibitory effect of clopidogrel on platelet adhesion and intimal proliferation after arterial injury in rabbits. *Arterioscler Thromb.* 1993; 13: 1171-1179
- Hilger D, Masureel M, and Kobilka BK. Structure and dynamics of GPCR signaling complexes. *Nat Struct Mol Biol.* 2018; 25: 4-12
- Hoffmann C, Moro S, Nicholas RA, Harden TK, Jacobson KA. The role of amino acids in extracellular loops of the human P2Y1 receptor in surface expression and activation processes. *J Biol Chem.* 1999; 274: 14639-14647
- Hoffmann K, Sixel U, Di Pasquale F, von Kügelgen I. Involvement of basic amino acid residues in transmembrane regions 6 and 7 in agonist and antagonist recognition of the human platelet P2Y(12)-receptor. *Biochem Pharmacol.* 2008; 76:1201-1213
- Hoffmann K, Lutz DA, Straßburger J, Baqi Y, Müller CE, von Kügelgen I. Competitive mode and site of interaction of ticagrelor at the human platelet P2Y12 -receptor. *J Thromb Haemost.* 2014; 12:1898-1905
- Hollopeter G, Jantzen HM, Vincent D, Li G, England L, Ramakrishnan V, Yang RB, Nurden P, Nurden A, Julius D, Conley PB. Identification of the platelet ADP receptor targeted by antithrombotic drugs. *Nature.* 2001; 409: 202-207

Horn F, Bettler E, Oliveira L, Campagne F, Cohen FE, Vriend G. GPCRDB information system for G protein-coupled receptors. *Nucleic Acids Res.* 2003; 31: 294-297

Hossan MS, Fatima A, Rahmatullah M, Khoo TJ, Nissapatorn V, Galochkina AV, Slita AV, Shtro AA, Nikolaeva Y, ZarubaeV VV, Wiart C. Antiviral activity of *Embelia ribes* Burm. f. against influenza virus in vitro. *Arch Virol.* 2018; 163: 2121-2131

Jacob PF, Vaz SH, Ribeiro JA, Sebastião AM. P2Y1 receptor inhibits GABA transport through a calcium signalling-dependent mechanism in rat cortical astrocytes. *Glia.* 2014; 62: 1211-1226

Janssens R, Communi D, Piroton S, Samson M, Parmentier M, Boeynaems JM. Cloning and tissue distribution of the human P2Y1 receptor. *Biochem Biophys Res Commun.* 1996; 221: 588-593

Jones PM, Bennett MJ. Clinical applications of 3-hydroxy fatty acid analysis by gas chromatography-mass spectrometry. *Biochim Biophys Acta.* 2011; 1811: 657-662

Kobilka BK. G protein coupled receptor structure and activation. *Biochim Biophys Acta.* 2007; 1768: 794-807

Katritch V, Cherezov V, Stevens RC. Structure-function of the G protein-coupled receptor superfamily. *Annu Rev Pharmacol Toxicol.* 2013; 53: 531-556

von Kügelgen I, Wetter A. Molecular pharmacology of P2Y-receptors. *Naunyn Schmiedeberg's Arch Pharmacol.* 2000; 362: 310-323

von Kügelgen I, Hoffmann K. Pharmacology and structure of P2Y receptors. *Neuropharmacology* 2016; 104: 50-61

von Kügelgen I. Structure, Pharmacology and Roles in Physiology of the P2Y12 Receptor. *Adv Exp Med Biol.* 2017; 1051: 123-138

Labeguere F, Alvey L, Newsome G, Saniere L, Fletcher S. Novel dihydropyrimidinoisoquinolinones and pharmaceutical compositions thereof for the treatment of inflammatory disorders (gpr84 antagonists). WO 2014095798A1; 2014

Laugwitz KL, Allgeier A, Offermanns S, Spicher K, Van Sande J, Dumont JE, Schultz G. The human thyrotropin receptor: a heptahelical receptor capable of stimulating members of all four G protein families. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1996; 93: 116-120

Lans I, Dalton JAR, Giraldo J. Helix 3 acts as a conformational hinge in Class A GPCR activation: An analysis of interhelical interaction energies in crystal structures. *J Struct Biol*. 2015; 192: 545-553

Lee IS, Cho DH, Kim KS, Kim KH, Park J, Kim Y, Jung JH, Kim K, Jung HJ, Jang HJ. Anti-inflammatory effects of embelin in A549 cells and human asthmatic airway epithelial tissues. *Immunopharmacol Immunotoxicol*. 2018; 40: 83-90

Léon C, Vial C, Cazenave JP, Gachet C. Cloning and sequencing of a human cDNA encoding endothelial P2Y1 purinoceptor. *Gene*. 1996; 171: 295-297

Léon C, Hechler B, Vial C, Leray C, Cazenave JP, Gachet C. The P2Y1 receptor is an ADP receptor antagonized by ATP and expressed in platelets and megakaryoblastic cells. *FEBS Lett*. 1997; 403: 26-30

Liu Y, Zhang Q, Chen LH, Yang H, Lu W, Xie X, Nan FJ. Design and Synthesis of 2-Alkylpyrimidine-4,6-diol and 6-Alkylpyridine-2,4-diol as Potent GPR84 Agonists. *ACS Med Chem Lett*. 2016; 7: 579-583

Ludwicka-Bradley A, Tourkina E, Suzuki S, Tyson E, Bonner M, Fenton JW 2nd, Hoffman S, Silver RM. Thrombin upregulates interleukin-8 in lung fibroblasts via cleavage of proteolytically activated receptor-I and protein kinase C-gamma activation. *Am J Respir Cell Mol Biol*. 2000; 22: 235-243

Maffrand JP, Bernat A, Delebassée D, Defreyn G, Cazenave JP, Gordon JL. ADP plays a key role in thrombogenesis in rats. *Thromb Haemost*. 1988; 59: 225-230

Manglik A, Lin H, Aryal DK, McCorvy JD, Dengler D, Corder G, Levit A, Kling RC, Bernat V, Hübner H, Huang XP, Sassano MF, Giguère PM, Löber S, Duan D, Scherrer G, Kobilka BK, Gmeiner P, Roth BL, Shoichet BK. Structure-based discovery of opioid analgesics with reduced side effects. *Nature*. 2016; 537: 185-190

Martin AL, Steurer MA, Aronstam RS. Constitutive Activity among Orphan Class-A G Protein Coupled Receptors. *PLoS One*. 2015; 10: 1-12

Mehlmann LM, Saeki Y, Tanaka S, Brennan TJ, Evsikov AV, Pendola FL, Knowles BB, Eppig JJ, Jaffe LA. The Gs-linked receptor GPR3 maintains meiotic arrest in mammalian oocytes. *Science*. 2004; 306: 1947-1950

Meng Y, Zhang J, Zhang F, Ai W, Zhu X, Shu G, Wang L, Gao P, Xi Q, Zhang Y, Liang X, Jiang Q, Wang S. Lauric Acid Stimulates Mammary Gland Development of Pubertal Mice through Activation of GPR84 and PI3K/Akt Signaling Pathway. *J Agric Food Chem*. 2017; 65: 95-103

Milligan G. Constitutive activity and inverse agonists of G protein-coupled receptors: a current perspective. *Mol Pharmacol*. 2003; 64: 1271-1276

Moro S, Hoffmann C, Jacobson KA. Role of the extracellular loops of G protein-coupled receptors in ligand recognition: a molecular modeling study of the human P2Y1 receptor. *Biochemistry* 1999; 38: 3498-3507

Müller MM, Lehmann R, Klassert TE, Reifenstein S, Conrad T, Moore C, Kuhn A, Behnert A, Guthke R, Driesch D, Slevogt H. Global analysis of glycoproteins identifies markers of endotoxin tolerant monocytes and GPR84 as a modulator of TNF $\alpha$  expression. *Sci Rep*. 2017; 7: 838

Mukhopadhyay S, Wen X, Ratti N, Loktev A, Rangell L, Scales SJ, Jackson PK. The ciliary G-protein-coupled receptor Gpr161 negatively regulates the Sonic hedgehog pathway via cAMP signaling. *Cell*. 2013; 152: 210-223

Muredda L, Kępczyńska MA, Zaibi MS, Alomar SY, Trayhurn P. IL-1 $\beta$  and TNF $\alpha$  inhibit GPR120 (FFAR4) and stimulate GPR84 (EX33) and GPR41 (FFAR3) fatty acid receptor expression in human adipocytes: implications for the anti-inflammatory action of n-3 fatty acids. 2018; 124: 97-108

Nagasaki H, Kondo T, Fuchigami M, Hashimoto H, Sugimura Y, Ozaki N, Arima H, Ota A, Oiso Y, Hamada Y. Inflammatory changes in adipose tissue enhance expression of



GPR84, a medium-chain fatty acid receptor: TNF $\alpha$  enhances GPR84 expression in adipocytes. *FEBS Lett.* 2012; 586 (Ausgabe 4): 368-372

Nicol LSC, Dawes JM, La Russa F, Didangelos A, Clark AK, Gentry C, Grist J, Davies JB, Malcangio M, McMahon SB. The role of G-protein receptor 84 in experimental neuropathic pain. *J Neurosci.* 2015; 35: 8959-8969

Nikaido Y, Koyama Y, Yoshikawa Y, Furuya T, Takeda S. Mutation analysis and molecular modeling for the investigation of ligand-binding modes of GPR84. *J Biochem.* 2015; 157: 311-320

Nisar SP, Lordkipanidzé M, Jones ML, Dawood B, Murden S, Cunningham MR, Mumford AD, Wilde JT, Watson SP, Mundell SJ, Lowe GC. A novel thromboxane A2 receptor N42S variant results in reduced surface expression and platelet dysfunction. *Thromb Haemost.* 2014; 111: 923-932

O'Grady SM, Elmquist E, Filtz TM, Nicholas RA, Harden TK. A guanine nucleotide-independent inwardly rectifying cation permeability is associated with P2Y1 receptor expression in *Xenopus* oocytes. *J Biol Chem.* 1996; 271: 29080-29087

Ohlmann P, de Castro S, Brown GG Jr, Gachet C, Jacobson KA, Harden TK. Quantification of recombinant and platelet P2Y(1) receptors utilizing a [(125)I]-labeled high-affinity antagonist 2-iodo-N(6)-methyl-(N)-methanocarpa-2'-deoxyadenosine-3',5'-bisphosphate [(125)I]MRS2500. *Pharmacol Res.* 2010; 62: 344-351

Ohlmann P, Lecchi A, El-Tayeb A, Müller CE, Cattaneo M, Gachet C. The platelet P2Y(12) receptor under normal and pathological conditions. Assessment with the radiolabeled selective antagonist [(3)H]PSB-0413. *Purinergic Signal.* 2013; 9: 59-66

Oliveira L, Paiva AC, Sander C, Vriend G. A common step for signal transduction in G protein-coupled receptors. *Trends Pharmacol Sci.* 1994; 15: 170-172

Oliveira L, Paiva AC, Vriend G. A low resolution model for the interaction of G proteins with G protein-coupled receptors. *Protein Eng.* 1999; 12: 1087-1095

Omasits U, Ahrens CH, Müller S, Wollscheid B. Protter: interactive protein feature visualization and integration with experimental proteomic data. *Bioinformatics* 2014; 30: 884-886

Palczewski K, Kumasaka T, Hori T, Behnke CA, Motoshima H, Fox BA, Trong IL, Teller DC, Okada T, Stenkamp RE, Yamamoto M, Miyano M. Crystal structure of rhodopsin: a G protein-coupled receptor. *Science* 2000; 289: 739-745

Park JH, Scheerer P, Hofmann KP, Choe HW, Ernst OP. Crystal structure of the ligand-free G-protein-coupled receptor opsin. *Nature*. 2008; 454: 183-187

Park JW, Yoon HJ, Kang WY, Cho S, Seong SJ, Lee HW, Yoon YR, Kim HJ. G protein-coupled receptor 84 controls osteoclastogenesis through inhibition of NF- $\kappa$ B and MAPK signaling pathways. *J Cell Physiol*. 2018; 233: 1481-1489

Perry KJ, Johnson VR, Malloch EL, Fukui L, Wever J, Thomas AG, Hamilton PW, Henry JJ. The G-protein-coupled receptor, GPR84, is important for eye development in *Xenopus laevis*. *Dev Dyn*. 2010; 239: 3024-3037

Pillaiyar T, Köse M, Sylvester K, Weighardt H, Thimm D, Borges G, Förster I, von Kügelgen I, Müller CE. Diindolylmethane Derivatives: Potent Agonists of the Immunostimulatory Orphan G Protein-Coupled Receptor GPR84. *J Med Chem*. 2017; 60: 3636-3655

Pillaiyar T, Köse M, Namasivayam V, Sylvester K, Borges G, Thimm D, von Kügelgen I, Müller CE. 6-(Ar)Alkylamino-Substituted Uracil Derivatives: Lipid Mimetics with Potent Activity at the Orphan G Protein-Coupled Receptor 84 (GPR84). *ACS Omega*. 2018; 3: 3365-3383

Planell N, Masamunt MC, Leal RF, Rodríguez L, Esteller M, Lozano JJ, Ramírez A, Ayrizono MLS, Coy CSR, Alfaro I, Ordás I, Visvanathan S, Ricart E, Guardiola J, Panés J, Salas A. Usefulness of Transcriptional Blood Biomarkers as a Non-invasive Surrogate Marker of Mucosal Healing and Endoscopic Response in Ulcerative Colitis. *J Crohns Colitis*. 2017; 11: 1335-1346

Pogozheva ID, Lomize AL, Mosberg HI. The transmembrane 7-alpha-bundle of rhodopsin: distance geometry calculations with hydrogen bonding constraints. *Biophys J*. 1997; 72: 1963-1985

Poon LS, Chan AS, Wong YH. Gbeta3 forms distinct dimers with specific Ggamma subunits and preferentially activates the beta3 isoform of phospholipase C. *Cell Signal.* 2009; 21: 737-744

Qian H, Chen Y, Huang T, Liu T, Li X, Jiang G, Zhang W, Cheng S, Li P. Combined application of Embelin and tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand inhibits proliferation and invasion in osteosarcoma cells via caspase-induced apoptosis. *Oncol Lett.* 2018; 15: 6931-6940

Rader AJ, Anderson G, Isin B, Khorana HG, Bahar I, Klein-Seetharaman J. Identification of core amino acids stabilizing rhodopsin. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2004; 101: 7246-7251

Rebres RA, Roach TI, Fraser ID, Philip F, Moon C, Lin KM, Liu J, Santat L, Cheadle L, Ross EM, Simon MI, Seaman WE. Synergistic Ca<sup>2+</sup> responses by G $\alpha$ <sub>i</sub>- and G $\alpha$ <sub>q</sub>-coupled G-protein-coupled receptors require a single PLC $\beta$  isoform that is sensitive to both G $\beta$  $\gamma$  and G $\alpha$ <sub>q</sub>. *J Biol Chem.* 201; 286: 942-951

Recio C, Lucy D, Purvis GSD, Iveson P, Zeboudj L, Iqbal AJ, Lin D, O'Callaghan C, Davison L, Griesbach E, Russell AJ, Wynne GM, Dib L, Monaco C, Greaves DR. Activation of the Immune-Metabolic Receptor GPR84 Enhances Inflammation and Phagocytosis in Macrophages. *Front Immunol.* 2018; 9 :1419

Rhee MH, Nevo I, Bayewitch ML, Zagoory O, Vogel Z. Functional role of tryptophan residues in the fourth transmembrane domain of the CB(2) cannabinoid receptor. *J Neurochem.* 2000; 75: 2485-2491

Sansom MS, Weinstein H. Hinges, swivels and switches: the role of prolines in signalling via transmembrane alpha-helices. *Trends Pharmacol Sci.* 2000; 21: 445-451

Savi P, Zacharyus JL, Delesque-Touchard N, Labouret C, Hervé C, Uzabiaga MF, Pereillo JM, Culouscou JM, Bono F, Ferrara P, Herbert JM. The active metabolite of Clopidogrel disrupts P2Y<sub>12</sub> receptor oligomers and partitions them out of lipid rafts. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2006;103: 11069-11074

Schwartz TW, IJzerman AP. Principles of agonism: undressing efficacy. *Trends Pharmacol Sci.* 1998; 19: 433-436

Seifert R, Wenzel-Seifert K. Constitutive activity of G-protein-coupled receptors: cause of disease and common property of wild-type receptors. *Naunyn Schmiedeberg's Arch Pharmacol.* 2002; 366: 381-416

Shah BH, Siddiqui A, Qureshi KA, Khan M, Rafi S, Ujan VA, Yakoob MY, Rasheed H, Saeed SA. Co-activation of Gi and Gq proteins exerts synergistic effect on human platelet aggregation through activation of phospholipase C and Ca<sup>2+</sup> signalling pathways. *Exp Mol Med.* 1999; 31: 42-46

Smale ST. Luciferase assay. *Cold Spring Harb Protoc.* 2010; doi: 10.1101/pdb.prot5421

Smrcka AV. G protein  $\beta\gamma$  subunits: central mediators of G protein-coupled receptor signaling. *Cell Mol Life Sci.* 2008; 65: 2191-2214

Soydan AS, Dokmetas HS, Cetin M, Koyuncu A, Kaptanoglu E, Elden H. The evaluation of the role of beta-hydroxy fatty acids on chronic inflammation and insulin resistance. *Mediators Inflamm.* 2006; 2006: 64980

Sugidachi A, Asai F, Ogawa T, Inoue T, Koike H. The in vivo pharmacological profile of CS-747, a novel antiplatelet agent with platelet ADP receptor antagonist properties. *Br J Pharmacol.* 2000; 129: 1439-1446

Sundqvist M, Christenson K, Holdfeldt A, Gabl M, Mårtensson J, Björkman L, Dieckmann R, Dahlgren C, Forsman H. Similarities and differences between the responses induced in human phagocytes through activation of the medium chain fatty acid receptor GPR84 and the short chain fatty acid receptor FFA2R. *Biochim Biophys Acta.* 2018; 1865: 695-708

Suzuki M, Takaishi S, Nagasaki M, Onozawa Y, Iino I, Maeda H, Komai T, Oda T. Medium-chain fatty acid-sensing receptor, GPR84, is a proinflammatory receptor. *J Biol Chem.* 2013; 288: 10684-10691

Takasaki J, Kamohara M, Saito T, Matsumoto M, Matsumoto S, Ohishi T, Soga T, Matsushime H, Furuichi K. Molecular cloning of the platelet P2T(AC) ADP receptor: pharmacological comparison with another ADP receptor, the P2Y(1) receptor. *Mol Pharmacol.* 2001; 60: 432-429

Tan Q, Zhu Y, Li J, Chen Z, Han GW, Kufareva I, Li T, Ma L, Fenalti G, Li J, Zhang W, Xie X, Yang H, Jiang H, Cherezov V, Liu H, Stevens RC, Zhao Q, Wu B. Structure of the CCR5 chemokine receptor-HIV entry inhibitor maraviroc complex. *Science* 2013; 341: 1387-1390

Tokuyama Y, Hara M, Jones EM, Fan Z, Bell GI. Cloning of rat and mouse P2Y purinoceptors. *Biochem Biophys Res Commun.* 1995; 211: 211-218

Venkataraman C, Kuo F. The G-protein coupled receptor, GPR84 regulates IL-4 production by T lymphocytes in response to CD3 crosslinking. *Immunol Lett.* 2005; 101: 144-153

Xiao RP, Ji X, Lakatta EG. Functional coupling of the beta 2-adrenoceptor to a pertussis toxin-sensitive G protein in cardiac myocytes. *Mol Pharmacol.* 1995; 47: 322-329

Wahlestedt C, Håkanson R, Vaz CA, Zukowska-Grojec Z. Norepinephrine and neuropeptide Y: vasoconstrictor cooperation in vivo and in vitro. *Am J Physiol.* 1990; 258: 736-742

Waldo GL, Harden TK. Agonist binding and Gq-stimulating activities of the purified human P2Y1 receptor. *Mol Pharmacol.* 2004; 65: 426-436

Wang B, Chen X, Zhou T, Wang X. Antidepressant-like effects of embelin and its possible mechanisms of action in chronic unpredictable stress-induced mice. *Neurol Res.* 2018; 21: 1-11

Wang J, Wu X, Simonavicius N, Tian H, Ling L. Medium-chain fatty acids as ligands for orphan G protein-coupled receptor GPR84. *J Biol Chem.* 2006; 281: 34457-34464

Wang J, Carrillo JJ, Lin HV. GPR142 Agonists Stimulate Glucose-Dependent Insulin Secretion via Gq-Dependent Signaling. *PLoS One.* 2016; 11: e0154452

Wei L, Tokizane K, Konishi H, Yu HR, Kiyama H. Agonists for G-protein-coupled receptor 84 (GPR84) alter cellular morphology and motility but do not induce pro-inflammatory responses in microglia. *J Neuroinflammation* 2017; 14: 198

Werry TD, Wilkinson GF, Willars GB. Mechanisms of cross-talk between G-protein-coupled receptors resulting in enhanced release of intracellular Ca<sup>2+</sup>. *Biochem J.* 2003; 374: 281-296

Widmayer P, Kusumakshi S, Hägele FA, Boehm U, Breer H. Expression of the Fatty Acid Receptors GPR84 and GPR120 and Cytodifferentiation of Epithelial Cells in the Gastric Mucosa of Mouse Pups in the Course of Dietary Transition. *Front Physiol.* 2017; 8: 601

Wittenberger T, Schaller HC, 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

Woodley SM, Catlow R. Crystal structure prediction from first principles. *Nat Mater.* 2008; 7: 937-946

Zaibi MS, Kępczyńska MA, Harikumar P, Alomar SY, Trayhurn P. IL-33 stimulates expression of the GPR84 (EX33) fatty acid receptor gene and of cytokine and chemokine genes in human adipocytes. *Cytokine* 2018; 110: 189-193

Zeng W, Mak DO, Li Q, Shin DM, Foskett JK, Muallem S. A new mode of Ca<sup>2+</sup> signaling by G protein-coupled receptors: gating of IP<sub>3</sub> receptor Ca<sup>2+</sup> release channels by Gbetagamma. *Curr Biol.* 2003; 13: 872-876

Zhang C, Srinivasan Y, Arlow DH, Fung JJ, Palmer D, Zheng Y, Green HF, Pandey A, Dror RO, Shaw DE, Weis WI, Coughlin SR, Kobilka BK. High-resolution crystal structure of human protease-activated receptor 1. *Nature* 2012; 492: 387-392

Zhang D, Gao ZG, Zhang K, Kiselev E, Crane S, Wang J, Paoletta S, Yi C, Ma L, Zhang W, Han GW, Liu H, Cherezov V, Katritch V, Jiang H, Stevens RC, Jacobson KA, Zhao

Q, Wu B. Two disparate ligand-binding sites in the human P2Y1 receptor. *Nature*. 2015; 520: 317-321

Zhang J, Zhang K, Gao ZG, Paoletta S, Zhang D, Han GW, Li T, Ma L, Zhang W, Müller CE, Yang H, Jiang H, Cherezov V, Katritch V, Jacobson KA, Stevens RC, Wu B, Zhao Q. Agonist-bound structure of the human P2Y12 receptor. *Nature* 2014 a; 509: 119-122

Zhang K, Zhang J, Gao ZG, Zhang D, Zhu L, Han GW, Moss SM, Paoletta S, Kiselev E, Lu W, Fenalti G, Zhang W, Müller CE, Yang H, Jiang H, Cherezov V, Katritch V, Jacobson KA, Stevens RC, Wu B, Zhao Q. Structure of the human P2Y12 receptor in complex with an antithrombotic drug. *Nature* 2014 b; 509: 115-118

Zhang Q, Yang H, Li J, Xie X. Discovery and Characterization of a Novel Small-Molecule Agonist for Medium-Chain Free Fatty Acid Receptor G Protein-Coupled Receptor 84. *J Pharmacol Exp Ther*. 2016; 357: 337-344

Zhu H, Mi W, Luo H, Chen T, Liu S, Raman I, Zuo X, Li QZ. Whole-genome transcription and DNA methylation analysis of peripheral blood mononuclear cells identified aberrant gene regulation pathways in systemic lupus erythematosus. *Arthritis Res Ther*. 2016; 18: 162

## **8. Danksagung**

Ich möchte mich hiermit bei Herrn Prof. Dr. med. Ivar von Kügelgen bedanken, der mich die Möglichkeit gegeben hat, am Institut für Pharmakologie und Toxikologie der Universität Bonn diese Arbeit unter seiner Leitung durchzuführen. Mein bester Dank für seine kompetente und umfangreiche Betreuung während der Labortätigkeit und der Erstellung der Dissertation.

Besonderen Dank auch an die gesamte Arbeitsgruppe und allen Arbeitskollegen des Institutes für Pharmakologie und Toxikologie für die freundliche Atmosphäre, ihre stetige Hilfsbereitschaft und kollegiale Unterstützung, die zum Gelingen dieser Arbeit beitragen haben.

Bei meiner Mutter und meinen Großeltern möchte ich mich ganz besonders herzlich bedanken für Ihre uneingeschränkte, liebevolle Unterstützung während der Fertigstellung dieser Doktorarbeit.