

Die Molekularpharmakologie des humanen MRGD-Rezeptors

Inaugural-Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades

der Hohen Medizinischen Fakultät

der Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität

Bonn

Michael Arbogast

aus Düren

2022

Angefertigt mit der Genehmigung
der Medizinischen Fakultät der Universität Bonn

1. Gutachter: Prof. Dr. med. Ivar von Kügelgen
2. Gutachter: Prof. Dr. med. Philipp Sasse

Tag der Mündlichen Prüfung: 26.04.2022

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

Meinen Eltern gewidmet

Inhaltsverzeichnis

	Abkürzungsverzeichnis	9
1.	Einleitung	12
1.1	Die Familie der G-Protein-gekoppelten Rezeptoren	12
1.1.1	Aufbau und Funktionsweise der G-Protein-gekoppelten Rezeptoren	13
1.1.2	Nomenklatur der Aminosäuren G-Protein-gekoppelter Rezeptoren	13
1.2	Die Familie der „mas-related-gene“ Rezeptoren	14
1.2.1	Charakterisierung der Mrg-Subtypen	15
1.2.1.1	Der MrgA-Rezeptor	16
1.2.1.2	Der MrgC-Rezeptor	17
1.2.1.3	Der MrgX-Rezeptor	18
1.3	Der MrgD-Rezeptor	19
1.3.1	Genetik	19
1.3.2	Expressionsort	20
1.3.3	Agonisten und Antagonisten	20
1.3.3.1	Der Agonist β -Alanin	21
1.3.3.2	Der Agonist Alamandin	21
1.3.3.3	Weitere Agonisten und Antagonisten	22
1.3.4	Physiologische Funktion	23
1.3.5	Wichtige Aminosäuren für die Ligandenbindung	25
1.4	Zielsetzung	26
2.	Material und Methoden	28
2.1	Substanzen	28
2.2	Lösungsmittel	28
2.3	Molekularbiologie	28

2.3.1	Amplifikation des hMRGD-Rezeptor-Gens	28
2.3.2	Agarose-Gelelektrophorese	29
2.3.3	Ligation der PCR-Produkte in die Expressionsvektoren	30
2.3.4	Transformation der hMRGD-Expressionsvektoren in kompetente E. coli	30
2.3.5	Extraktion der Plasmide aus E. coli (Minipräparation)	31
2.3.6	Zielgerichtete Mutagenese	31
2.4	Zellkultur	34
2.4.1	Kulturmedien	34
2.4.2	Kultivierung von CHO Flp-In™-Zellen	34
2.4.3	Einfrieren und Auftauen von CHO Flp-In™-Zellen	35
2.4.4	Transfektion	35
2.4.5	Vorbereitung von Zellen für pharmakologische Versuche	36
2.4.5.1	Vorbereitung für [³ H]cAMP-Radioaffinitäts-Assays	36
2.4.5.2	Vorbereitung für Luciferase-Reporter-Gen-Assays	37
2.5	Expressionsanalyse	37
2.5.1	Antikörper-vermittelte Fluoreszenzfärbung	37
2.5.2	Expressionsanalyse mittels fluoreszierender Proteine	38
2.6	Pharmakologische Versuche	38
2.6.1	[³ H]cAMP-Radioaffinitäts-Assay	39
2.6.1.1	Das cAMP-Bindeprotein	41
2.6.1.2	Herstellung der Aktivkohlesuspension	41
2.6.2	Luciferase-(Reporter-Gen)-Assays	41
2.7	Statistische Auswertung	42
2.8	Abschätzung von Affinitätskonstanten	43
3.	Ergebnisse	44
3.1	Analyse von Rezeptoren mit modifizierter Startsequenz	44

3.1.1	Expressionsanalyse von Rezeptoren mit modifizierter Startsequenz	44
3.1.2	Funktionsanalyse von Rezeptoren mit modifizierter Startsequenz	46
3.2	Analyse der punktmutierten kurzen Rezeptorvarianten	47
3.2.1	Expressionsanalyse der punktmutierten kurzen Rezeptorvarianten	48
3.2.2	Funktionsanalyse der punktmutierten kurzen Rezeptorvarianten	50
3.3	Analyse potentieller Antagonisten am hMRGD-Rezeptor	53
3.3.1	Analyse der antagonistischen Wirkung von THV201 am hMRGD-Rezeptor	54
3.4	Analyse von Alamandin als Agonist am hMRGD-Rezeptor	55
3.4.1	Analyse von Alamandin mittels NFAT-Luciferase- Assay	56
3.4.2	Analyse von Alamandin mittels SRE-Luciferase-Assay	57
4.	Diskussion	59
4.1	Methodendiskussion	59
4.1.1	Zielgerichtete Mutagenese	59
4.1.2	Zellsystem und verwendete Vektoren	59
4.1.3	Expressionsanalyse	60
4.1.4	Funktionelle Versuche	61
4.1.4.1	[³ H]cAMP-Assay	61
4.1.4.2	Reportergen-Assays	61
4.2	Charakterisierung der modifizierten Startsequenzen des hMRGD-Rezeptors	62
4.3	Charakterisierung der mutagenen kurzen Rezeptoren	63
4.3.1	Expressionsanalyse der mutagenen kurzen Rezeptoren	63
4.3.2	Funktionsanalyse der mutagenen kurzen Rezeptoren	64
4.3.2.1	Die Bedeutung des Arginins 3.30 im hMRGD-Rezeptor	64
4.3.2.2	Die Bedeutung der Tyrosine 3.33, 3.36 und 6.59 im hMRGD-Rezeptor	65
4.3.2.3	Die Bedeutung des Tyrosins 6.54 im hMRGD-Rezeptor	65
4.3.3	Einschränkung der Aussagekraft der vorliegenden Mutagenesestudien	66

4.4	Analyse potentieller Antagonisten	67
4.4.1	Analyse der antagonistischen Wirkung von THV 201	67
4.5	Analyse von Alamandin als Agonist	68
4.5.1	Analyse der G _q -Aktivierbarkeit durch Alamandin	68
4.5.2	Analyse der G _i -Aktivierbarkeit durch Alamandin	69
4.6	Ausblick	70
5.	Zusammenfassung	72
6.	Abbildungsverzeichnis	74
7.	Tabellenverzeichnis	75
8.	Anhang	76
8.1	Stoffe und Materialien	76
8.2	Geräte und Software	78
8.3	Strukturformeln	79
8.3.1	Agonisten	79
8.3.2	Antagonisten	79
9.	Literaturverzeichnis	81
10.	Danksagung	89

Abkürzungsverzeichnis

2MeSADP	2-Methylthio-adenosin-5'-diphosphat
[3H]cAMP	Tritium-markiertes cAMP
AC	Adenylatzyklase
ACE2	Angiotensin-Converting-Enzym 2
AG	Arbeitsgruppe
AIB	Aminoisobuttersäure
β Ala	β -Alanin
Alm	Alamandin
ANOVA	Analysis of Variance (Einwegvarianzanalyse)
ANP	Antinatriuretisches Peptid
ATP	Adenosin-5'-triphosphat
BABA	β -Aminobuttersäure
Bam8-22	Bovines Adrenales Medulla Peptid
Bp	Basenpaare
BCP	Bone Cancer Pain
BS	Bindungsstelle
BSA	Bovines Serumalbumin
cAMP	Adenosin-3',5'-cyclomonophosphat
CHO	Chinesische Hamster Ovarialzellen
CO ₂	Kohlenstoffdioxid
CP	Chlorpromazin
DAG	Diacylglycerin
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNase	Desoxyribonuklease
D-PBS	Dulbeco's Phosphate Salt Buffered Saline
DR	Dose Ratio
DRG	Dorsal root ganglia (dorsale Wurzelganglien)
E. coli	Escherichia coli
EC ₅₀	Halbmaximale Wirkkonzentration

EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
ELISA	Enzyme-Linked Immunosorbent Assay
eNOS	endotheliale NO-Synthase
FBS	Fetales bovines Serum
FITC	Fluorescein-Isothiocyanat
FRT	FLP Recombination Target
GABA	γ -Aminobuttersäure
G α_i	G _i -Protein
G α_q	G _q -Protein
G α_s	G _s -Protein
GPCR	G-Protein-gekoppelter Rezeptor
GTP	Guanosintriphosphat
HA-966	3-Amino-1-Hydroxy-Pyrrolidin-2-on
HBSS	Hanks balanced salt solution
HEK	Human Embryonic Kidney
HUVEC	Human Umbilical Vein Endothelial Cells
IB4	Isolectin B4
IC ₅₀	Halbmaximale Hemmkonzentration
IL-1 β	Interleukin-1 β
IP3	Inositoltriphosphat
KCNQ	Potassium Voltage-Gated Channel Subfamily Q Member 2/3
KV	Kurze (hMRGD)-Variante
LSC	Liquid scintillation counter
LSM	Laser-Scanning-Mikroskop
LV	Lange (hMRGD)-Variante
MMP-9	Matrix-Metalloproteinase-9
Mrg	Mas-related gene
MRGD	Mas-related gene Subtyp D
MRGPR	Mas-related G-Protein-coupled receptor
MSH	Melanozyten-stimulierendes Hormon
MV	Modifizierte (hMRGD)-Variante
NaCl	Natriumchlorid

NC-IUPHAR	Committee on Receptor Nomenclature and Drug Classification of the International Union of Basic and Clinical Pharmacology
NFAT	Nuclear factor of activated T-cells
NO	Stickstoffmonoxid
FMRF	Phenylalanin-Methionin-Arginin-Phenylalanin
NF- κ B	nuclear factor 'kappa-light-chain-enhancer' of activated B-cells
NPAF	Neuropeptid AF
NPFF	Neuropeptid FF
NSCLC	Non Small Cell Lung Cancer
P2X3	P2X Purinoceptor 3
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
PIP ₂	Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat
pK_B	Affinitätskonstante
PLC	Phospholipase C
PTX	Pertussistoxin
Ras	Ras-Protein
RAS	Renin-Angiotensin-System
Rho	Rho-Protein
RLU	Relative light units
RNA	Ribonukleinsäure
ROS	reaktiven Sauerstoffspezies
rpm	Umdrehungen pro Minute
SEM	Standardfehler
SG	Substantia gelatinosa
SNSR	Sensory Neuron-Specific Receptors
SRE	Serum Response Element
T_m	Schmelztemperatur
TM	Transmembrandomäne
TMN	TMN-Klassifikation (Tumor, Nodus, Metastase)
TRIS	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
VR1	Vanilloid Rezeptor 1
YFP	Yellow Fluorescent Protein

1. Einleitung

Die vorliegende Arbeit befasst sich mit der molekularpharmakologischen Charakterisierung des humanen Mas-related-gene-Rezeptors D (hMRGD). In den letzten Jahren konnte dieser G-Protein-gekoppelter Rezeptor für eine Vielzahl an (patho-) physiologischen Prozessen mitverantwortlich gemacht werden (vgl. Kapitel 1.3.4). Da das Verständnis solcher Prozesse zumeist den Kernpunkt von Therapieansätzen etlicher Erkrankungen darstellt, wurde als Ziel dieser Arbeit festgelegt, einen Beitrag zum besseren Verständnis des Rezeptors zu leisten. Zunächst wird im Rahmen der Einleitung eine Übersicht über die bereits in der Literatur vorhandenen Informationen bezüglich der Familie der Mrg-Rezeptoren – insbesondere des Subtyps D – vorgestellt.

1.1 Die Familie der G-Protein-gekoppelten Rezeptoren

Die Familie der G-Protein-gekoppelten Rezeptoren (GPCRs) beschreibt mit mehr als 800 identifizierten GPCRs die größte bekannte Gruppe von membranständigen Rezeptoren im menschlichen Organismus (Fredriksson et al., 2003). Sie besitzen eine herausragende pharmakologische Relevanz im klinischen Alltag. Insgesamt wirken annäherungsweise 35 % aller zugelassenen Medikamente an G-Protein-gekoppelten Rezeptoren. Gleichzeitig dienen über 130 unterschiedliche GPCRs als Zielstruktur für schätzungsweise 700 verschiedene Medikamente, die in der Europäischen Union oder den Vereinigten Staaten von Amerika zugelassen sind (Sriram et al., 2018). Durch ihre enorme Diversität an Liganden und Stimulantien, wie Hormone, Neurotransmitter, Peptide, Proteine, Lipide, Ionen oder Photonen, sowie einer Vielzahl an Signaltransduktionswegen, sind die GPCRs für ein breites Spektrum an physiologischen Prozessen verantwortlich (Fredriksson et al., 2003; Rosenbaum et al., 2009; Solinski et al., 2014). So bietet die fortwährende Forschung an GPCRs das Potential, weitere Zielstrukturen zu identifizieren, anhand derer Eingriffe in z.T. krankhaft veränderte Prozesse des Organismus vorgenommen werden können.

1.1.1 Aufbau und Funktionsweise der G-Protein-gekoppelten Rezeptoren

Alle GPCRs zeigen vermutlich den gleichen strukturellen Aufbau. Sie sind charakterisiert durch sieben transmembranäre α -Helices, welche durch intra- und extrazelluläre Schleifen miteinander verbunden sind. Anhand von phylogenetischen Analysen teilten Fredriksson und Mitarbeiter 2003 diese Superfamilie von G-Protein-gekoppelten Rezeptoren in die fünf folgenden großen Untergruppen ein: Rhodopsin- (Familie der A-Rezeptoren), Sekretin- (Familie der B-Rezeptoren), Glutamat- (Familie der C-Rezeptoren), „Frizzled“/Geschmack- und Adhäsions-Rezeptoren. Die Rhodopsin-Familie stellt dabei mit 701 einzelnen Rezeptoren die größte Gruppe von GPCRs dar, wobei wiederum vier Untergruppen (α , β , γ , und δ) unterschieden werden können (Fredriksson et al., 2003).

Allgemein besitzen GPCRs die Fähigkeit, sowohl intrazellulär mit einem oder mehreren G-Proteinen (heterotrimäre GTP-bindende Proteine) zu interagieren als auch durch direkte Interaktion mit anderen Proteinen zu wirken (Fredriksson et al., 2003; Rosenbaum et al., 2009). Heterotrimäre G-Proteine bestehen aus drei Untereinheiten, die als $G\alpha$ -, $G\beta$ - und $G\gamma$ -Untereinheit bezeichnet werden. Die $G\alpha$ -Untereinheit bindet dabei das GTP und lässt sich wiederum anhand von Ähnlichkeiten in der Aminosäuresequenz in vier verschiedene Gruppen unterteilen ($G\alpha_s$, $G\alpha_i$, $G\alpha_q$ und $G\alpha_{12}$), die jeweils klassische intrazelluläre Signalkaskaden aufweisen (Simon et al., 1991). Die $G\alpha_s$ -Untereinheit ist in der Lage, über eine Stimulation der Adenylatzyklase die intrazelluläre cAMP-Konzentration zu steigern, während die $G\alpha_i$ -Untereinheit über eine Inhibition der Adenylatzyklase die cAMP-Konzentration senkt. Untereinheiten des $G\alpha_q$ -Typs aktivieren intrazellulär die Phospholipase C (PLC), während die des $G\alpha_{12}$ -Typs über den Rho- und Ras-Signaltransduktionsweg wirken (Dhanasekara und Dermott, 1996; Simon et al., 1991).

1.1.2 Nomenklatur der Aminosäuren G-Protein-gekoppelter Rezeptoren

Um jede Aminosäure im gefalteten Rezeptor eindeutig zu kennzeichnen, wird in dieser Arbeit die für die Rhodopsin-Familie anerkannte Nomenklatur von Ballesteros und Weinstein (1995) benutzt. Danach wird jeweils die am höchsten konservierte Aminosäure einer Transmembrandomäne (X, 1-7) mit X.50 bezeichnet. Die weiteren Aminosäuren

werden in Bezug zu X.50 angegeben, wobei die Zahlen in Richtung N-Terminus kleiner und in Richtung C-Terminus größer werden. So bezeichnet beispielsweise die Abkürzung Y3.33 ein Tyrosin (Y) in der 3. Transmembrandomäne an Position 33, d.h. von der Position 3.50 aus in Richtung N-Terminus. Y3.33A gibt zusätzlich an, dass dieses Tyrosin gegen ein Alanin ausgetauscht wurde.

1.2 Die Familie der „mas-related-gene“ Rezeptoren

Im Jahr 2001 beschrieben Dong und Mitarbeiter eine Familie von etwa 50 G-Proteingekoppelten Rezeptoren, die in einer spezifischen Untergruppe von Neuronen mit kutanen sensorischen Fasern exprimiert werden. Aufgrund ihrer Verwandtschaft zum 1986 entdeckten Mas-Onkogen wurden diese als mas-related-genes (Mrgs) bezeichnet. Anhand von phylogenetischen Untersuchungen lassen sie sich in verschiedene Untergruppen unterteilen: MrgA, MrgB, MrgC, MrgD, MrgE, MrgF, MrgG, MrgH sowie MrgX₁₋₄ (Dong et al., 2001; Young et al., 1986). Unabhängig davon entdeckten Lembo et al. (2002) mittels Hochdurchsatz-Screenings ebenfalls eine Gruppe von GPCRs, genauer gesagt von „verwaisten“ GPCRs, die von Spaltprodukten des Proenkephalins A aktiviert werden. Als „verwaist“ werden GPCRs bezeichnet, deren natürliche oder endogene Liganden noch unbekannt sind (sogenannte „orphan“ GPCRs). Auch diese Gruppe wurde in sensorischen Neuronen des Menschen und der Ratte gefunden und von ihnen daher als sensory neuron-specific G protein-coupled receptors (SNSRs) benannt. Dabei wurde festgestellt, dass sie in Teilen der Gruppe der MrgX-Rezeptoren entspricht. Folglich wurde unabhängig voneinander zweimal dieselbe Gruppe von GPCRs entdeckt. Daher sind verschiedene Bezeichnungen für Mrg-Rezeptoren bekannt: Mrgs, SNSRs oder MRGPRs (Lembo et al., 2002; Solinski et al., 2014). In dieser Arbeit werden sie einheitlich als Mrg-Rezeptoren bezeichnet und humane (h) Rezeptoren durch Großbuchstaben gekennzeichnet (z.B. hMRGD). Einzelne Untergruppen der Mrg-Rezeptoren werden in den weiterführenden Kapiteln 1.2.1 und 1.3 beschrieben.

Die große Mehrzahl an Mrg-Rezeptoren wird dabei vorwiegend in somatosensorischen Isolectin B4⁺-(IB4⁺)-Neuronen der dorsalen Wurzelganglien (dorsal root ganglia, DRG) exprimiert. Solche Neurone können mit der Schmerzwahrnehmung in Zusammenhang gebracht werden (Dong et al., 2001; Lembo et al., 2002; Solinski et al., 2014).

Die gesamte Familie der Mrg-Rezeptoren wird der δ -Gruppe der Klasse A-Rezeptoren (Rhodopsin) zugeordnet. Damit sind sie u.a. strukturell verwandt mit den P2Y-Rezeptoren (z.B. P2Y₁₁ oder P2Y₁₂) oder F2R-Rezeptoren (Fredriksson et al., 2003). Daher liefert die Erforschung des P2Y₁₂-Rezeptors z.T. Informationen, die Hinweise auf die Funktionsweise und das Aussehen der Mrg-Rezeptoren geben könnten. So konnten Zhang et al. (2014 a, 2014 b) die Struktur des P2Y₁₂-Rezeptors durch Kristallstrukturanalysen sowohl mit gebundenem Agonisten als auch Antagonisten näher charakterisieren. Hierbei war es ihnen möglich, das erste Mal zwei unterschiedliche Ligandenbindungsstellen für δ -Rezeptoren der Klasse A-GPCRs zu identifizieren (Zhang et al., 2014 a; Zhang et al., 2014 b). Unter anderem zeigten sie, dass der Agonist 2MeSADP über eine π - π -Interaktion mit der Seitenkette des Tyrosins in Position 3.33 interagiert. Für das Tyrosin in Position 6.58 – sowie für das Arginin R6.55 und das Lysin K7.35 – konnte eine Beteiligung in der Koordination von Phosphatgruppen beschrieben werden. Auch die Argininreste R3.21 und R19 im N-Terminus interagieren mit dem Agonisten (Zhang et al., 2014 b). Für Mrg-Rezeptoren konnten bis zum jetzigen Zeitpunkt keine Kristallstrukturanalysen durchgeführt werden.

Die Mrg-Rezeptoren, deren Partizipation an verschiedenen (patho-) physiologischen Prozessen beschrieben wird, können aufgrund ihrer Phylogenetik weiter unterteilt werden, sodass eine präzisere Charakterisierung erfolgen kann. Im Folgenden sollen für diese Arbeit relevante Subtypen dargestellt werden, wobei zur umfassenden und tiefergehenden Beschreibung auf die Literatur (z.B. Solinski et al., 2014) verwiesen wird. Der MrgD-Rezeptor ist der Untersuchungsgegenstand der vorliegenden Arbeit. Daher wird er in einem separaten Kapitel 1.3 vorgestellt.

1.2.1 Charakterisierung der Mrg-Subtypen

Die einzelnen Untergruppen der Mrg-Rezeptorfamilie zeigen ein unterschiedliches Vorkommen in verschiedenen Spezies. So wurden die Subtypen MrgA, -B, -C und -H im Genom der Maus bzw. der Ratte gefunden, allerdings nicht im Menschen. Dabei konnten die Gene der MrgD, -E, -F und -G-Rezeptoren als Gencluster sowohl in Maus bzw. Ratte als auch im Menschen und Rhesusaffen beschrieben werden. Gene für MrgX-Rezeptoren

sind spezifisch im Genom des Menschen und Rhesusaffen zu finden, nicht aber in dem von Nagetieren (Burstein et al., 2006; Dong et al., 2001; Solinski et al., 2014; Wu et al., 2015).

Insgesamt wurden deutlich mehr Mrg-Rezeptortypen in Nagern gefunden als im Menschen. Da einige Subtypen (z.B. MrgA und MrgD) zum Teil spezifisch auf sensorischen Neuronen gefunden und mit der Nozizeption oder Mechanozeption im Zusammenhang gebracht wurden, könnten durch das veränderte Vorkommen von Mrg-Rezeptoren in verschiedenen Spezies Unterschiede in der Nozizeption oder Mechanozeption erklärt werden. Möglicherweise stehen diese Erkenntnisse im Zusammenhang mit dem Vorkommen bzw. Fehlen von Fell- oder Schnurrhaaren bei Nagern bzw. Menschen (Dong et al., 2001).

1.2.1.1 Der MrgA-Rezeptor

Im Jahr 2001 wiesen Dong et al. nach, dass viele Untergruppen des murinen MrgA-Rezeptor (MrgA₁₋₈) spezifisch in sensorischen Neuronen exprimiert werden, wobei selbige Neuronen nicht alle Subtypen der MrgA-Rezeptoren gleichzeitig co-exprimieren. Diese Beobachtung ließ sie vermuten, dass MrgA-Rezeptoren in der Empfindung oder Modulation von Schmerz eine Rolle spielen könnten. Für die nagerspezifischen MrgA-Rezeptoren werden enge Verwandtschaftsverhältnisse zu den humanen MRGX-Rezeptoren angegeben, welche daher als Orthologe gelten (Bender et al., 2002; Lembo et al., 2002). Mit weiteren Untersuchungen konnten verschiedene agonistisch wirkende Substanzen an Subtypen der MrgA-Rezeptoren identifiziert werden. So wurde 2009 die Aktivierbarkeit des MrgA₃-Rezeptors durch Chloroquin beschrieben, wodurch Histamin-unabhängig Juckreiz in Mäusen ausgelöst werden konnte (Liu et al., 2009; Solinski et al., 2014). Früher entdeckte Substanzen, die am MrgA-Rezeptor wirken, sind beispielsweise verschiedene Neuropeptide der Gruppe der FMRF-(Phe-Met-Arg-Phe)-Amide (speziell für MrgA₁ und MrgA₄, Wirkung im nanomolaren Bereich) und Adenin (Bender et al., 2002; Dong et al., 2001).

2007 veröffentlichten Heo et al. eine mittels MembStruk-Protokolls berechnete 3D-Struktur des MrgA-Rezeptors und analysierten die mutmaßlichen Bindungsstellen für Adenin, indem sie das HierDock-Protokoll verwendeten. Sie trafen Voraussagen über die

vermutlichen Transmembranregionen (TM) 3, 4, 5 und 6 und spezielle Aminosäuren (z.B. Asn88 in TM 3 und Asn146 in TM 4), die für die extrazelluläre Bindung des Liganden am MrgA-Rezeptor verantwortlich sind (Heo et al., 2007 b). 3D-Strukturen und Ligandenbindungsstellen von GPCRs – z.B. des humanen Dopamin D2-Rezeptors oder des β 2-Adrenozeptors – die durch das MembStruk- und HierDock-Protokoll vorausgesagt wurden, konnten häufig zur Identifizierung wichtiger Interaktionsstellen führen. Damit gelten diese Protokolle als relativ zuverlässige Methoden, um die wahrscheinliche Struktur von GPCRs zu beschreiben (Heo et al., 2007 b).

1.2.1.2 Der MrgC-Rezeptor

Der MrgC-Rezeptor wird in Nagern spezifisch in dorsalen Wurzelganglien und im Ganglion trigeminale exprimiert, wohingegen er im Menschen nicht vorgefunden wurde (Bender et al., 2002; Dong et al., 2001; Lembo et al., 2002). Die Forschung am murinen MrgC-Rezeptor kann trotz des Fehlens im Menschen klinisch relevante Informationen fördern, vor allem da der humane MRGX₁-Rezeptor aller Voraussicht nach das Ortholog des MrgC-Rezeptors ist (Solinski et al., 2014; Sun et al., 2016). Aktiviert wird der MrgC-Rezeptor durch Peptide wie BAM8-22 (bovine adrenal medulla peptide), NPFF, NPAF, γ 2-MSH oder Dynorphin-14 (Solinski et al., 2014). Analog zu den Untersuchungen am MrgA-Rezeptor und unter Verwendung derselben Methodik (vgl. Kapitel 1.2.1.1) konnte in früheren Studien für den MrgC-Rezeptor (Subtyp MrgC₁₁) ebenfalls eine Vorhersage über die dreidimensionale Struktur und die vermuteten FMRF-assoziierten Bindungsstellen getroffen werden. Auch in diesem Fall wurden die Transmembranregionen 3, 4, 5 und 6 als diejenigen vermutet, die mit den Liganden interagieren. Das Tyrosin in Position 110 in TM 3 könnte dabei mit dem endständigen Phenylalanin (F) des FMRF-Peptids in Wechselwirkung treten (Heo et al., 2007 a).

Nur wenige Jahre später wurde gezeigt, dass der murine MrgC₁₁-Rezeptor in Verbindung mit chronischem Schmerz gebracht werden kann. So könnte er inhibitorisch auf die Entstehung pathologischer Schmerzen und spinaler Sensibilisierung wirken. Der spezifische MrgC₁₁-Agonist BAM8-22 unterdrückt dabei die Entstehung von inflammatorischem Schmerz bei intrathekaler Gabe in Mäusen (Guan et al., 2010). In später durchgeführten Untersuchungen wurde dargelegt, dass die Pathogenese Krebs-

bedingter Knochenschmerzen (bone cancer pain, kurz BCP) unter anderem mit einer Hochregulierung der MrgC-Expression im Rückenmark assoziiert ist. Gleichzeitig verringerte die Gabe von BAM8-22 das Auftreten von BCP in untersuchten Mäusen (Sun et al., 2016). Des Weiteren unterbindet die BAM8-22-vermittelte Aktivierung von MrgC-Rezeptoren durch verringerte MMP-9 -und IL-1 β -Bildung in Neuronen der dorsalen Wurzelganglien die Entstehung einer Morphintoleranz (Zhang et al., 2017).

1.2.1.3 Der MrgX-Rezeptor

Die MrgX-Rezeptoren sind die einzigen Rezeptoren aus der Mrg-Familie, die ausschließlich in Primaten und Menschen vorzufinden sind. Nach NC-IUPHAR können sie in vier Subtypen (1-4, auch MRGPRX₁₋₄ genannt) unterteilt werden. Drei weitere Subtypen, die SNSR2, -3 und -5 oder MrgX₄₋₂, -X₆ oder -X₇ genannt werden, sind wahrscheinlich aufgrund der hohen Strukturgleichheit von circa 98 % zu anderen MrgX-Subtypen eher als Polymorphismen anzusehen (Burstein et al., 2006; Fredriksson et al., 2003; Lembo et al., 2002; Solinski et al., 2014). Evolutionär betrachtet, scheint die MrgX-Familie in Primaten und Menschen durch ihre Selektivität wichtig für die primaten- bzw. menschen-spezifische Physiologie zu sein. Das selektive Vorkommen der MrgX-Rezeptoren in diesen Spezies rührt wahrscheinlich aus dem Einfluss positiven Selektionsdrucks. Diese Erkenntnis könnte einen wichtigen Unterschied zwischen Primaten und Nagern erklären (Solinski et al., 2014).

Der MrgX-Rezeptor zeigt – in Analogie zum überwiegenden Teil der weiteren Mrg-Rezeptorfamilie – eine spezifische Expression in Neuronen der dorsalen Wurzelganglien von Menschen und Primaten (Guan et al., 2010; Solinski et al., 2014). Dadurch wird die Möglichkeit der physiologischen Funktionsuntersuchung von MrgX-Rezeptoren im Tiermodell maßgeblich beeinträchtigt (Burstein et al., 2006). Durch die in Kapitel 1.2.1.2 beschriebene Verwandtschaft des hMRGX₁-Rezeptors als Ortholog des MrgC-Rezeptors bieten die gewonnenen Erkenntnisse bezüglich des MrgC-Rezeptors allerdings das Potential, zumindest in gewissen Teilen auch für den hMRGX-Rezeptor zu gelten (Guan et al., 2010). Beispielsweise ist BAM8-22 als eigentlicher MrgC-Agonist ebenfalls in der Lage, den MrgX₁-Rezeptor zu aktivieren, zudem aber auch das MrgA-aktivierende Chloroquin (Liu et al., 2009). So könnten zukünftig hMRGX-Agonisten als neue

Medikamentenklasse zur Behandlung chronischer Schmerzen, als weiterer Ansatzpunkt in der Therapie der onkologisch bedingten Knochenschmerzen und als Hilfsmittel zum nachhaltigeren Opiatgebrauch im klinischen Alltag genutzt werden (Guan et al., 2010; Sun et al., 2016; Zhang et al., 2017).

1.3 Der MrgD-Rezeptor

Die molekularpharmakologische Charakterisierung des MrgD-Rezeptors, auch TGR7 oder MRGPRD genannt, stellt den Gegenstand der vorliegenden Arbeit dar. Daher wird dieser ausführlicher dargestellt.

1.3.1 Genetik

Der MrgD-Rezeptor wird – zusammen mit den Subtypen E, F und G – sowohl in Nagern als auch in Menschen exprimiert. Damit sind diese die einzigen Rezeptoren der Mrg-Familie, die speziesübergreifend vorkommen (Dong et al., 2001). Für den MrgD-Rezeptor existiert in allen bisher untersuchten Säugetieren nur eine einzelne Genkopie, wobei sich das rezeptorkodierende Gen des humanen MRGD-Rezeptors als Einzelgen auf dem Chromosomenabschnitt 11q13.3-q13.4 in unmittelbarer Nachbarschaft zum hMRGF-Gen befindet (Hao et al., 2012; Zylka et al., 2003). Die Gene für die Subtypen MrgE und MrgG sind nicht auf diesem Genabschnitt vorzufinden (Hao et al., 2012). Im Gegensatz dazu wurde das MrgD-Gen in Ratten bzw. Mäusen als MrgDEFG-Cluster auf Chromosom 1 bzw. 7 entdeckt (Zylka et al., 2003). Wie Shinohara et al. (2004) in ihrer Publikation zeigten, besitzt der humane MRGD-Rezeptor eine vermutete Länge von 321 Aminosäuren. Speziesübergreifend unterscheidet sich dabei die Anzahl der im MrgD-Rezeptor enthaltenen Aminosäuren nicht stark voneinander (Ratte 319, Maus 321, Affe 320 Aminosäuren). Verglichen mit dem Rezeptor des Affen und der Ratte zeigt sich bei der humanen Variante eine Übereinstimmung der einzelnen Aminosäuren von 80 % bzw. 58 %. Als weitere Auffälligkeit wurde für MrgD-Rezeptoren – wie auch für den Rest der Mrg-Familie – kurze N-Termini von 3-21 Aminosäuren beschrieben (Dong et al., 2001).

1.3.2 Expressionsort

Der MrgD-Rezeptor zeigt eine vorwiegende Expression in kutanen, IB4⁺, nichtpeptidergen, nozizeptiven Neuronen, die meist monosynaptisch in die Substantia gelatinosa (SG, Lamina II), im Hinterhorn des Rückenmarks projizieren (Shinohara et al., 2004; Wang und Zylka, 2009). Dabei wird dieser nur von solchen Nervenfasern exprimiert, welche sich frei und exklusiv im Stratum granulosum um die Keratozyten winden. Spezialisierte kutane Nervenendigungen weisen dabei keinen MrgD-Rezeptor auf. Jedoch wurden auch geringere Expressionslevel in anderen Organen, wie Harnblase, Hoden, Arterien, Herz, Lunge, Thymus, Kleinhirn, Trachea, Diaphragma, Skelettmuskel, Samenblase, Prostata, Uterus, weißem und braunem Fettgewebe entdeckt (Hrenak et al., 2016; Shinohara et al., 2004; Zylka et al., 2005). Des Weiteren beobachteten Zhu et al. (2020) MrgD-Rezeptoren auf verschiedenen Zellarten der murinen Retina, wie retinale Neuronen, retinale Pigmentepithel-Zellen oder gliale Müller-Zellen.

Im Laufe der letzten Jahre konnten ebenfalls Expressionslevel in pathologisch verändertem Gewebe beschrieben werden. So wurde entdeckt, dass bei inflammatorischen Prozessen des Mäusedarms die MrgD-Expression in intrinsischen sensorischen Neuronen des Ileums hochreguliert wird (Avula et al., 2013). Ein Jahr später konnte anhand von immunhistochemischen Analysen eine MrgD-Expression in arteriosklerotischen Plaques, in glatten Muskelzellen sowie in endothelialen NO-Synthase-exprimierenden Zellen (eNOS) nachgewiesen werden (Habiyakare et al., 2014). Auch auf Zellen von neoplastisch verändertem Gewebe wurde der MrgD-Rezeptor entdeckt. Diesbezüglich wurde eine Überexpression von MrgD-Rezeptoren in Lungenkrebszellen von Mäusen beschrieben (Nishimura et al., 2012).

1.3.3 Agonisten und Antagonisten

Dem ursprünglich als „verwaist“ bezeichneten MrgD-Rezeptor konnten im Laufe der letzten Jahre sowohl agonistisch als auch antagonistisch wirkende Substanzen zugeordnet werden. Diese tragen maßgeblich zur Charakterisierung des Rezeptors bei und sind daher für sein Verständnis unabdingbar.

1.3.3.1 Der Agonist β -Alanin

Der Stoff β -Alanin wirkt agonistisch am MrgD-Rezeptor (Shinohara et al., 2004). β -Alanin ist ein strukturelles Analogon von γ -Aminobuttersäure (GABA), Glycin, Alanin, Taurin und Anserin. Mit Ausnahme von GABA konnte für diese Stoffe allerdings kein Effekt am hMRGD-Rezeptor nachgewiesen werden. Da β -Alanin – sowie GABA und Glycin auch – agonistisch am GABA_A-Rezeptor wirkt, wurde zunächst vermutet, dass auch β -Alanin als inhibitorischer Neurotransmitter fungiert (Schmieden und Betz 1995; van Kuilenburg et al., 2004; Wu et al., 1993).

Shinohara et al. (2004) charakterisierten den MrgD-Rezeptor als einen für β -Alanin spezifischen G_i- bzw. G_q- gekoppelten GPCR, weshalb sich cAMP- sowie Ca²⁺- Assays für funktionelle Versuche zur Untersuchung des Rezeptors verwenden lassen. Anhand dieser Versuche wurden an den humanen Rezeptorvarianten in CHO-Zellen EC₅₀- Werte von ca. $3,8 \pm 1,3 \mu\text{M}$ festgestellt (Ajit et al., 2010). Kalzium-Assays, die an MrgD⁺ CHO-Zellen durchgeführt wurden, ergaben etwas höhere EC₅₀-Werte von $15 \pm 1 \mu\text{M}$ (hMRGD), $14 \pm 2 \mu\text{M}$ (rMrgD, Ratte) bzw. $44 \pm 6 \mu\text{M}$ (mMrgD, Maus) (Shinohara et al., 2004). Analysen der β -Alanin-Konzentration in unterschiedlichen Untersuchungsmaterialien zeigten Werte, die sich zumeist oberhalb des Bereichs der ermittelten EC₅₀-Werte bewegen. Dabei konnte im menschlichen Plasma eine β -Alanin-Konzentration von ca. $4 \mu\text{M}$, im N. Ischiadicus der Ratte von ca. $50 \mu\text{M}$ und im Gehirn der Katze von ca. $60 \mu\text{M}$ nachgewiesen werden. Daher kann es sich bei β -Alanin um einen endogenen Liganden handeln (Shinohara et al., 2004; van Kuilenburg et al., 2004).

Dem Organismus stehen verschiedene Möglichkeiten der β -Alanin-Synthese zur Verfügung. So kann β -Alanin sowohl aus den Dipeptiden Carnosin (β -Alanyl-Histidin) und Anserin (β -Alanyl-1-Methylhistidin) als auch aus der Pyrimidinbase Uracil durch den Uracil-Abbau generiert werden. Letzterer Syntheseweg stellt dabei den größten Anteil der β -Alanin-Synthese dar. Das in Skelettmuskelzellen in hoher Konzentration vorkommende Carnosin bildet allerdings den größten Speicher für β -Alanin (van Kuilenburg et al., 2004).

1.3.3.2 Der Agonist Alamandin

Mit der 2013 entdeckten Wirkung des im menschlichen Blut zirkulierenden Peptides Alamandins am MrgD-Rezeptor kam ein zweiter potentiell endogener Agonist hinzu

(Lautner et al., 2013). Bei Alamandin handelt es sich um das Heptapeptid $\text{H}_2\text{N-Ala-Arg-Val-Tyr-Ile-His-Pro-COOH}$, auch $\text{Ala}^1\text{-Angiotensin (1-7)}$ genannt, welches zum einen durch Hydrolyse des C-terminalen Phenylalanins aus dem Oktapeptid Angiotensin A via Angiotensin-Converting-Enzym 2 (ACE2) entstehen kann. Zum anderen kann Alamandin direkt durch Decarboxylierung des Aspartatrestes aus Angiotensin (1-7) generiert werden (Hrenak et al., 2016; Lautner et al., 2013; Solinski et al., 2014). Dabei konnte die Arbeitsgruppe um Lautner (2013) zeigen, dass es durch Aktivierung von MrgD^+ CHO-Zellen mittels Alamandin [10 nM] zu einer Freisetzung von Stickstoffmonoxid (NO) kam, indem sie einen fluoreszierenden NO-Indikator benutzten. Des Weiteren beobachteten sie, dass Alamandin zur Vasorelaxation in Aortenring-Proben aus Mäusen führte (Lautner et al., 2013).

Weiterführend wurde im Jahr 2018 mit Alamandin als Ligand nachgewiesen, dass der MrgD -Rezeptor ebenfalls $\text{G}_{\alpha\text{s}}$ -gekoppelt vorkommt. Mittels cAMP-ELISA-Untersuchungen wurde eine glockenförmige, dosisabhängige cAMP-Akkumulation in drei Zelllinien gezeigt, HUVEC-(human umbilical vein endothelial cells)-, HEK293 (human embryonic kidney)- und mesangiale Zellen, mit unterschiedlichen EC_{50} - und IC_{50} -Werten (EC_{50} : ca. 0,4-36 pM und IC_{50} : ca. 0,26-35,5 nM) (Tetzner et al., 2018). Dieser Alamandin-vermittelte cAMP-Anstieg konnte mit MrgD -Rezeptor-Antagonisten blockiert werden. (Schleifenbaum 2019; Tetzner et al., 2018). Durch Hinzugabe des $\text{G}_{\alpha\text{i}}$ -Inhibitors PTX (Pertussistoxin) in Versuchen mit HEK293-Zellen entdeckte dieselbe Arbeitsgruppe, dass folglich die cAMP-Konzentration nach initialem Anstieg nicht wieder absank, sondern auf konstantem Niveau stagnierte. Sie folgerten daraus, dass Alamandin in der Lage ist, sowohl den $\text{G}_{\alpha\text{s}}$ - als auch den $\text{G}_{\alpha\text{i}}$ -Signaltransduktionsweg des MrgD -Rezeptors zu aktivieren, wobei letzterer erst durch vergleichsweise höhere Konzentrationen aktiviert wird (Tetzner et al., 2018).

1.3.3.3 Weitere Agonisten und Antagonisten

Andere agonistisch wirkende Substanzen sind unter anderem GABA, BABA (β -Aminobuttersäure), L-Carnosin (nur am rMrgD -Rezeptor), Diethylstilbestrol, Angiotensin (1-7), das Racemat (\pm) HA-966 (3-Amino-1-Hydroxy-Pyrrolidin-2-on) und 5,7-Dihydroxytryptaminkreatininsulfat. Antagonistisch wirken Chlorpromazin, Thioridazin, (R)-

Propyl-norapomorphin, D-Pro⁷-Angiotensin (1-7), MU-6840 und PD123319 (Ajit et al., 2010; Gembardt et al., 2008; Lautner et al., 2013; Shinohara et al., 2004; Solinski et al., 2014; Uno et al., 2012).

1.3.4 Physiologische Funktion

Seit seiner Entdeckung im Jahr 2001 konnte dem MrgD-Rezeptor eine Beteiligung an vielen (patho-) physiologischen Prozessen zugesprochen werden. Aufgrund seiner relativ spezifischen Expression auf nozizeptiven Neuronen und der häufigen Co-Expression von P2X₃- und VR1- Rezeptoren auf MrgD⁺-Zellen wurde ihm eine mögliche Rolle in der Empfindung und Modulation von Schmerzen zugeschrieben (Dong et al., 2001; Shinohara et al., 2004). Wenige Jahre später zeigten Croizer und Mitarbeiter (2007), dass der MrgD-Rezeptor über die G_i-Kopplung in Neuronen der dorsalen Wurzelganglien inhibitorisch auf spezielle K⁺-Kanäle (KCNQ2/3-Kanäle) wirkt. Die Aktivierung dieser Interaktion durch β -Alanin führt zur verstärkten Erregbarkeit jener Neurone und könnte die Signalweiterleitung primärer afferenter Nozizeptoren verbessern. Das wiederum führt möglicherweise zur Ausprägung einer Schmerzschwelle oder auch zu Juckreiz (Croizer et al., 2007; Solinski et al., 2014).

Neuere Publikationen zeigen jedoch, dass der MrgD-Rezeptor für weitere Funktionen im Organismus mitverantwortlich gemacht werden kann. So spielt er mit Alamandin als einer seiner Agonisten eine Rolle im Renin-Angiotensin-System (RAS), indem er vasodilatierend und antiproliferativ zu wirken scheint (Hrenak et al., 2016; Lautner et al., 2013; Villela et al., 2014). Lautner und Mitarbeiter (2013) konnten nachweisen, dass Alamandin eine Endothel-abhängige Vasorelaxation in einem aus Mäusen entnommenen Aortenring verursacht. Sie untersuchten weiter, ob die beiden als endogen deklarierten Liganden Alamandin und β -Alanin in Blutgefäßen miteinander interagieren. Interessanterweise konnte durch alleinige Zugabe von β -Alanin in dieser Versuchsreihe keine Vasodilatation erwirkt, doch bei Vorinkubation mit β -Alanin [0,1 μ M] der vasodilatatorische Effekt von Alamandin blockiert werden. So entstand die Vermutung, dass Alamandin und β -Alanin am MrgD-Rezeptor verschiedene Signaltransduktionswege aktivieren. Weiterführend wurde gezeigt, dass eine einmalige Gabe von Alamandin zu einem langanhaltenden antihypertensiven Effekt in spontan hypertensiven Ratten führt.

Damit konnte auf eine mögliche therapeutische Relevanz von Alamandin hingewiesen werden (Lautner et al., 2013; Solinski et al., 2014).

Einige Jahre später konnten Park und Mitarbeiter (2018) einen MrgD-vermittelten kardioprotektiven Effekt von Alamandin gegen Reperfusionstraumata an Rattenherzen nachweisen. Sie entdeckten, dass Alamandin [0,1 mg/kg] die postischämische Prognose der behandelten Ratten gegenüber einer Kontrollgruppe verbesserte. So führte die Alamandinbehandlung zu einer gesteigerten linksventrikulären Druckentwicklung, einer kleineren Ausdehnung des Infarktareals, einem verbesserten koronaren Blutfluss, einer verringerten Expression apoptotisch wirkender und einer erhöhten Expression antioxidativ wirkender Proteine. Zudem bewirkte Alamandin in ihren Versuchen eine direkte Sekretion von ANP (antinatriuretisches Peptid). Bei Versuchen mit zusätzlichen MrgD-Antagonisten waren die kardioprotektiven Effekte des Alamandins abgeschwächt (Park et al., 2018).

Des Weiteren wurde von einer Arbeitsgruppe um Nishimura (2012) durch real-time-PCR- und immunhistochemischen Untersuchungen an humanen Gewebeproben von Lungentumoren eine hohe Expressionsrate von hMRGD-Rezeptoren beschrieben. Sie zeigten, dass die Überexpression von MrgD-Rezeptoren in Fibroblasten (NIH3T3-Zellen) den Adhäsionsverlust einzelner Tumorzellen einleitet und die Tumorgenese fördert. Die Behandlung von MrgD⁺ NIH3T3-Zellen mit β -Alanin förderte dabei die Sphäroidbildung entsprechender Zellen (Nishimura et al., 2012). Daraufhin publizierten Li et al. (2015), dass ein Zusammenhang zwischen der hMRGD-Expression im Tumorgewebe und der Prognose von Patienten mit Nicht-kleinzelligem Lungenkarzinom (NSCLC) besteht. Dabei korreliert das Expressionslevel von hMRGD-Rezeptoren in Krebszellen mit dem Vorkommen von Lymphknotenmetastasen, der Tumorgroße und dem klinischen TNM-Stadium. NSCLC-Patienten, die ein hohes Expressionslevel aufwiesen, überlebten durchschnittlich etwa 8 weitere Monate, wohingegen Patienten mit niedrigem Expressionslevel etwa 20 Monate überlebten. In Zukunft kann der MrgD-Rezeptor daher möglicherweise zu einem neuen Ziel in der Krebstherapie werden (Li et al., 2015).

Wie in Kapitel 1.3.2 beschrieben konnten Zhu und Mitarbeiter (2020) eine MrgD-Expression in der Retina nachweisen. Anhand von in vitro Studien an humanen retinalen Pigmentepithel-Zellen und glialen Müller-Zellen zeigten sie, dass Alamandin über den hMRGD-Rezeptor in der Retina protektiv zu wirken scheint. So reduzierte Alamandin den Angiotensin II- und Lipopolysaccharid-induzierten Anstieg an Entzündungsmediatoren,

wie der Genexpression von Zytokinen, der Aktivierung von NF- κ B und der Produktion von reaktiven Sauerstoffspezies (ROS). Diese anti-inflammatorischen und -oxidativen Effekte wurden durch Zugabe vom MrgD-Rezeptor-Antagonisten PD123319 verhindert (Zhu et al., 2020). Die genaue Rolle des MrgD-Rezeptors in Bezug auf den gesamten Organismus bleibt jedoch noch Gegenstand weiterer Forschung.

1.3.5 Wichtige Aminosäuren für die Ligandenbindung

Im Jahr 2013 publizierten Venkatakrisnan und Mitarbeiter eine systematische Analyse hochauflösender GPCR-Strukturen. Aus dieser geht hervor, dass es in fast allen GPCRs typische Aminosäuren gibt, welche mit dem Liganden interagieren. Vor allem betroffen sind dabei die Transmembranregionen 3, 6 und 7. Speziell genannt wurden hier beispielhaft die Stellen 3.32, 3.33, 3.36, 6.51 und 7.39 (Venkatakrisnan et al., 2013). Wie in Kapitel 1.2 beschrieben, konnte im Jahr 2014 für den P2Y₁₂-Rezeptor, einen nahen Verwandten des MrgD-Rezeptors, eine hochauflösende Kristallstruktur erstellt werden. In diesen Untersuchungen wurden unter anderem den Argininen R3.21 und R6.55 sowie den Tyrosinen Y3.33 und Y6.58 eine Rolle in der Rezeptor-Liganden-Interaktion zugesprochen (Zhang et al., 2014 a; Zhang et al., 2014 b). Bereits einige Jahre zuvor wurde für Mrg-Rezeptoren (MrgA und MrgC) prognostiziert, dass ebenfalls die Transmembrandomänen 3, 4, 5 und 6 entscheidend für die Rezeptor-Liganden-Interaktion sind (Heo et al., 2007 a; Heo et al. 2007 b). In Zusammenschau mit den o.g. Informationen über wahrscheinliche Interaktionsstellen und den bereits von Müller (2014) analysierten Aminosäuren wurden daher in der vorliegenden Arbeit folgende im Schema gekennzeichnete, hydrophile Aminosäuren näher untersucht, die mit dem ebenfalls hydrophilen Agonisten β -Alanin interagieren könnten (Abb. 1).

Als Auswahlkriterium für Aminosäuren, die auf ihre Relevanz für den Rezeptor untersucht wurden, war neben den oben dargestellten Informationen zudem der Konservierungsgrad zwischen verschiedenen Spezies ausschlaggebend. Mit Ausnahme des in der vorliegenden Arbeit untersuchten Tyrosins in Position 6.54, welches nur im Menschen und Rhesusaffen, nicht aber in Maus, Ratte oder Wolf vorkommt, sind alle anderen ausgewählten Aminosäuren zwischen allen genannten Spezies hoch konserviert (Müller, 2014, Tabelle 1).

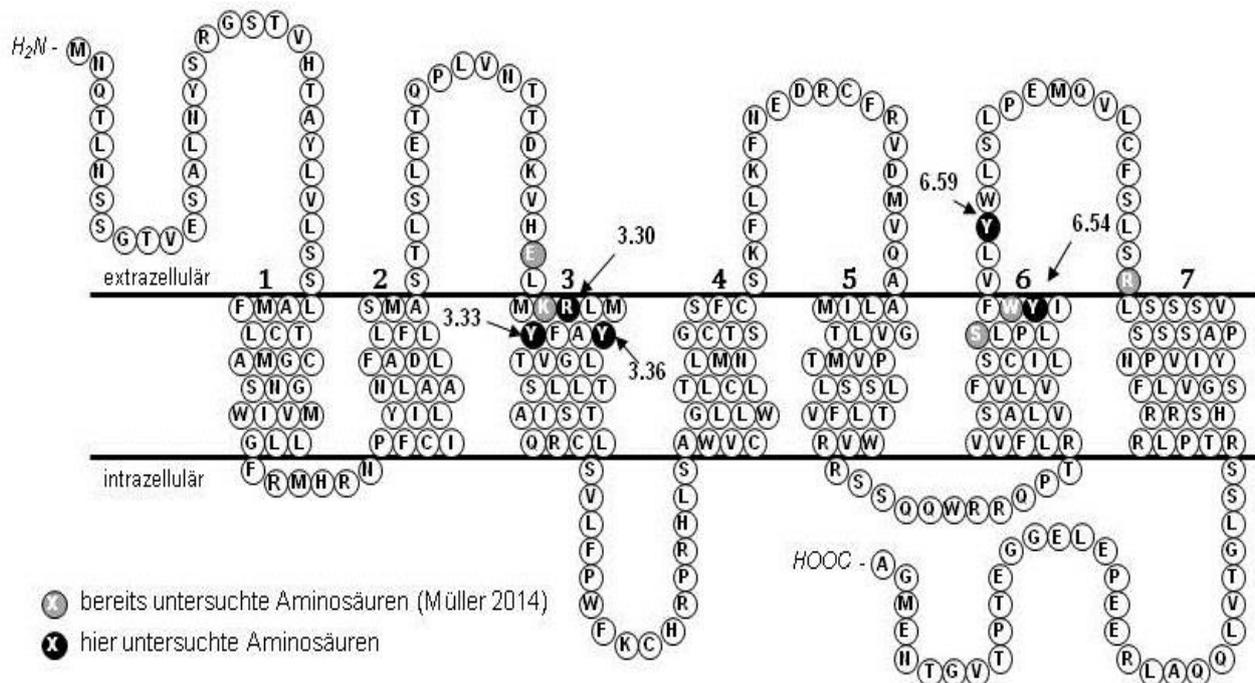


Abb. 1: Schematischer Aufbau des hMRGD-Rezeptors. 1-7 bezeichnen Transmembranregionen. Das Schema wurde mit PowerPoint erstellt. Dabei wurde der für Aminosäuren gängige Einbuchstabencode verwendet.

Tab. 1: Konservierungsgrad einzelner Aminosäuren im MrgD-Rezeptor an Positionen, die in dieser Arbeit untersucht wurden (Müller, 2014).

Art	3.30	3.33	3.36	6.54	6.59
Mensch	R	Y	Y	Y	Y
Maus	R	Y	Y	N	Y
Ratte	R	Y	Y	N	Y
Wolf	R	Y	Y	S	Y
Rhesusaffe	R	Y	Y	Y	Y

1.4 Zielsetzung

Aufgrund der möglichen Beteiligung des hMRGD-Rezeptors in der Schmerzwahrnehmung, der Blutdruckregulation mittels RAS, der Entstehung von Lungentumoren und einer Vielzahl an weiteren (patho-) physiologischen Prozessen (vgl. Kapitel 1.3.4), erscheint es von pharmakotherapeutischem Interesse, den Rezeptor

weitergehend zu charakterisieren (Dong et al., 2001; Lautner et al., 2013; Nishimura et al., 2012). In Anlehnung an die Dissertationsarbeit von Frau Dr. S. Müller (2014), in welcher bereits einzelne Aminosäuren speziell untersucht wurden, sollten in dieser Arbeit weitere, potentiell für die Interaktion zwischen Liganden und Rezeptor wichtige Aminosäuren auf ihre Relevanz für den Rezeptor analysiert werden. Aufgrund der Tatsache, dass für Mrg-Rezeptoren noch keine Kristallstrukturanalysen zur Verfügung stehen, wurde im Rahmen des vorliegenden Forschungsvorhabens die Funktionalität zielgerichtet mutierter hMRGD-Rezeptoren mittels cAMP- und Ca²⁺-Assays überprüft. Darüber hinaus wurde ihre Expression in CHO Flp-InTM-Zellen studiert. In einem weiteren Teil der Arbeit sollte die Wirkung von Alamandin näher untersucht und nach weiteren Antagonisten gesucht werden.

Durch die vorliegende Arbeit sollen dem bestehenden Wissen zum MrgD-Rezeptor molekularpharmakologische Daten hinzugefügt werden, um ein genaueres Verständnis der Funktion des Rezeptors zu erlangen. Diese könnten zukünftig für die Herstellung von Pharmaka hilfreich sein, welche den MrgD-Rezeptor als Zielstruktur haben.

2. Material und Methoden

2.1 Substanzen

Tab. 2: Testsubstanzen und Lösungsmittel, die in funktionellen Versuchen verwendet wurden.

Substanz	Lösungsmittel	Hersteller
Alamandin	H ₂ O	Bachem AG, Bubendorf, Schweiz
β-Alanin	H ₂ O	146064; Sigma [®] , Darmstadt, Deutschland
Chlorpromazin HCl	DMSO	C8138; Sigma [®] , Darmstadt, Deutschland
Forskolin	DMSO/Ethanol	F-6886; Sigma [®] , Darmstadt, Deutschland
THV201, THV202, THV203, THV204, THV211, THV213	DMSO	AG Müller, Institut für pharmazeutische Chemie, Universität Bonn

2.2 Lösungsmittel

Die Lösungsmittel der Substanzen wurden in Tabelle 2 angegeben. Zur Verdünnung einzelner Stammlösungen wurde am Versuchstag HBSS verwendet. Für Forskolin wurde eine Stammlösung [10 mM] in einem Ethanol/DMSO-Gemisch (7:1) hergestellt. Am Versuchstag wurde diese ebenfalls mit HBSS verdünnt. Für Negativkontrollen ohne Forskolin wurde den Zellen das Ethanol/DMSO-Gemisch in gleicher Konzentration zugesetzt. Die maximale Konzentration an Ethanol bzw. DMSO überstieg dabei nicht 1 ‰.

2.3 Molekularbiologie

2.3.1 Amplifikation des hMRGD-Rezeptor-Gens

Die DNA-Sequenz, welche den humanen MRGD-Rezeptor kodiert, befand sich bereits in den Expressionsvektoren pcDNA[™]3.1D/V5-His TOPO[®] (Invitrogen[™] Karlsruhe, Deutschland) und pcDNA5/FRT-V5-His[©]-TOPO[®] (Invitrogen[™]). Um mehrere der später folgenden pharmakologischen Versuche und die Expressionsanalyse durchzuführen, wurde das Rezeptor-kodierende Gen in den Expressionsvektor pcDNA[™]6.2/C-YFP-GW TOPO[®] (Invitrogen[™]) umkloniert. Dazu wurde eine Polymerase-Kettenreaktion (PCR, T-

personal, Biometra, Göttingen, Deutschland) mit dem doppelsträngigen DNA-Vektor und den zwei folgenden Primern durchgeführt:

PCR-Ansatz:

- 22,5 µl PCR Supermix High Fidelity (Invitrogen™)
- 2 µl Primer-Mix (hMRGD_for + hMRGD_rev, je 2,5 pmol/µl)
- 0,5 µl hMRGD-DNA im pcDNA™3.1D/V5-His TOPO® -Vektor

Primer (von biomers.net, Ulm, Deutschland):

- hMRGD_for: 5'-gat atg gca gaa cca gac ttt gaa tag cag tgg -3' (T_m: 66 °C)
- hMRGD_rev: 5'-ggc ccc cat ctc att ggt gcc cac -3' (T_m: 69,6 °C)

PCR-Bedingungen:

- 95 °C für 5 min
- 38 Zyklen: 95 °C (30 s) → 64 °C (30 s) → 72 °C (70 s)
- 72 °C für 10 min

Um abschätzen zu können, ob die PCR-Reaktion funktionierte, wurde das anschließend erhaltene PCR-Produkt mittels Agarose-Gelelektrophorese näher analysiert.

2.3.2 Agarose-Gelelektrophorese

Die Agarose-Gelelektrophorese bietet – durch die Gitterstruktur des Agarosegels und einer angelegten Spannung – die Möglichkeit, DNA-Fragmente von etwa 500-25.000 Basenpaaren ihrer Größe nach aufzutrennen (Voytas, 2001). Dadurch kann unmittelbar nach Abschluss der PCR-Reaktion durch ein DNA-Vergleichsgemisch (1 kB DNA-Ladder, Invitrogen™) überprüft werden, ob die entstandenen PCR-Produkte die erwartete homogene Länge aufweisen. Die Herstellung des benötigten Agarosegels erfolgte durch Erhitzen von 0,8 g Agarose in 80 ml TRIS-EDTA-Puffer auf ca. 100 °C. Nach Abkühlung der Flüssigkeit wurden 4 µl einer Ethidiumbromid-Lösung [10 mg/ml] hinzugegeben. Ethidiumbromid fungiert hierbei als fluoreszierender Nukleinsäure-Farbstoff. Das Gemisch wurde in eine Elektrophoresekammer (Peqlab, Biotechnologie GmbH, Erlangen,

Deutschland) gegossen und die Kammern nach endgültiger Abkühlung mit einem zuvor erstellten PCR-Mix bestehend aus 10 µl des PCR-Produktes und 2 µl des Ladepuffers BlueJuice™ (Invitrogen™) aufgefüllt. Nachdem für etwa 90 min eine Spannung von 90 V angelegt wurde, konnte von dem DNA-beladenem Gel in einem Universal Hood (Bio-Rad Laboratories, München, Deutschland) unter UV-Licht eine Aufnahme angefertigt werden. Diese wurde anschließend mit der Quantity One® 1-D Analysis Software (Bio-Rad Laboratories) ausgewertet.

Ergab die Auswertung der PCR-Produktlänge die erwartete klare Bande (Aufnahmen werden im Rahmen dieser Arbeit nicht demonstriert), so wurden die PCR-Produkte für das Einfügen der DNA-Sequenzen in die oben genannten Expressionsvektoren vorbereitet. Dieser Vorgang wird als Ligation bezeichnet.

2.3.3 Ligation der PCR-Produkte in die Expressionsvektoren

Vor der eigentlichen Ligation in die Expressionsvektoren wurden 10 µl des gewonnenen PCR-Produkts mit 1 µl DpnI (NewEngland BioLabs® Inc., Frankfurt am Main, Deutschland) versetzt. DpnI ist ein Enzym, das methylierte DNA abbaut, wie in diesem Fall die ursprünglich hMRGD-DNA. Dazu wurde das Gemisch für 30 min bei 37 °C inkubiert. Im Anschluss folgten 20 min bei 80 °C, um das DpnI-Enzym selbst zu zerstören. Durch diese Reaktion wird sichergestellt, dass ausschließlich die durch die PCR gewonnene unmethylierte DNA für den weiteren Ligrationsprozess verwendet wird.

Für die Ligation wurden 3 µl des PCR-Produktes mit 0,75 µl Salzlösung (1,2 M NaCl, 0,06 M MgCl₂) und 0,75 µl pcDNA™6.2/C-YFP-GW TOPO® oder pcDNA5/FRT-V5-His©-TOPO® zusammengegeben. Dieser Ansatz wurde 5 min bei Raumtemperatur inkubiert und in Anschluss unmittelbar auf Eis gelegt, bis die Transformation in kompetente E. coli Bakterien erfolgte.

2.3.4 Transformation der hMRGD-Expressionsvektoren in kompetente E. coli

Die Expressionsvektoren, die nun die DNA-Sequenz für den hMRGD-Rezeptor enthielten, wurden anschließend in One Shot™ Top 10 E. coli -Bakterien (Invitrogen™) transformiert. Dazu wurden die Bakterien nach vorsichtigem Auftauen auf Eis 30 min mit 2 µl der

Ligationslösung inkubiert. Anschließend folgte ein kurzer Hitzeschock für 30 s bei 42 °C, der für die Porenbildung der Bakterien und die Induktion der Plasmid-Aufnahme essentiell ist. Nach weiteren 2 min auf Eis wurden 200 µl S.O.C.-Medium (E. coli Nährmedium, Invitrogen™) hinzugegeben und für 60 min bei 37 °C geschüttelt (225 rpm). Daraufhin erfolgte das Ausplattieren von 200 µl bzw. 50 µl auf LB Agar-Platten, die mit Ampicillin [100 µg/ml] als Selektionsmedium versetzt waren. Die Agar-Platten wurden 18 h im Brutschrank (Heraeus Incubator, Thermo Scientific, Waltham, USA) bei 37 °C inkubiert, bevor sie zur Lagerung bei 4 °C in den Kühlschrank gestellt wurden.

2.3.5 Extraktion der Plasmide aus E. coli (Minipräparation)

Vor der eigentlichen Extraktion der Plasmide wurden einzelne Kolonien, die auf den LB Agar-Platten gewachsen waren, in je 3 ml LB Broth (Invitrogen™) mit Ampicillin [100 µg/ml] für 14 h in den Wärmeschüttler (225 rpm) gegeben. Nach dieser Inkubationszeit wurden 2 ml der expandierten Klone für 8 min bei 10.000 rpm (Eppendorf Mini Spin Plus; Eppendorf, Deutschland) abzentrifugiert. Die Minipräparation erfolgte mit dem QIAprep® Spin Miniprep Kit (250, Qiagen, Hilden, Deutschland) unter Befolgung der Herstellerangaben. Der alkalische Puffer führte in diesem Vorgang zur Bildung von Poren in der Bakterienmembran, sodass es zur Freisetzung der Plasmide kam. Die genomische DNA verblieb dabei in den Bakterien. Nach anschließender Neutralisation erfolgte die Trennung der Plasmide von weiteren Zellbestandteilen durch unterschiedlich stark konzentrierte Salzlösungen und weitere Zentrifugationsschritte. Die an eine Silikat-Säule gebundenen DNA-Plasmide wurden abschließend durch eine niedrig molare Pufferlösung eluiert. Die gewonnenen Plasmide wurden – wie oben beschrieben – ebenfalls mittels Agarose-Gelelektrophorese analysiert. Ergab sich erneut eine klare Bande im erwarteten Längenbereich, so wurden die DNA-Proben zur Sequenzierung durch die Firma GATC Biotech AG (Köln, Deutschland) abgegeben.

2.3.6 Zielgerichtete Mutagenese

Zur zielgerichteten Mutagenese wurde die bereits im Expressionsvektor pcDNA™3.1D/V5-His TOPO® enthaltene DNA-Sequenz verwendet, welche für den humanen MRGD-

Rezeptor kodiert. Mit Hilfe von mutagenen Primern (siehe unten) konnten nun in weiteren PCR-Reaktionen zielgerichtet Mutationen in die ursprüngliche DNA-Sequenz eingefügt werden. Die in diesem Fall verwendeten Oligonukleotid-Primer (for, forward, vorwärts und rev, reverse, gegenläufig) enthielten ein modifiziertes Basentriplett, das in allen Fällen der vorliegenden Arbeit für die Aminosäure Alanin kodierte. Diese lagerten sich an beide Matrizenstränge desjenigen DNA-Abschnitts an, in dem die gewünschte Mutation eingefügt werden sollte. Danach wurde unter Verwendung einer DNA-Polymerase, die zudem eine Korrekturfunktion enthielt, das gesamte Plasmid amplifiziert. Es folgte folgender Ansatz:

PCR-Ansatz:

- 22,5 µl AccuPrime Pfx Supermix (Invitrogen™)
- 1,5 µl Primer-Mix (siehe unten)
- 1 µl hMRGD-DNA im pcDNA™3.1D/V5-His TOPO®-Vektor

PCR-Bedingungen:

- 95 °C für 5 min
- 18 Zyklen: 95 °C (30 s) → 55 °C (60 s) → 68 °C (13 min)
- 68 °C für 10 min

Mutagene Primer (von biomers.net):

Mutante R3.30A:

for: 5'- ggt cca cga gct gat gaa agc gct gat gta ctt tgc -3' (T_m 74 °C)

rev: 5'- gca aag tac atc agc gct ttc atc agc tcg tgg acc -3' (T_m 74 °C)

Mutante Y3.33A:

for: 5'-ctg atg aag aga ctg atg gcc ttt gcc tac aca gtg g-3' (T_m 73 °C)

rev: 5'-cca ctg tgt agg caa agg cca tca gtc tct tca tca g-3' (T_m 73 °C)

Mutante Y3.36A

for: 5'-ctg atg tac ttt gcc gcc aca gtg ggc ctg agc-3' (T_m 76 °C)

rev: 5'-gtc cag gcc cac tgt ggc ggc aaa gta cat cag-3' (T_m 76 °C)

Mutante Y6.54A

for: 5'-cct gcc tct gag cat cgc ctg gtt tgt gct cta ctg-3' (T_m 76 °C)

rev: 5'-cag tag agc aca aac cag gcg atg ctc aga gcc agg-3' (T_m 76 °C)

Mutante Y6.59A

for: 5'-cca tct act ggt ttg tgc tag cct ggt tga gcc tgc c-3' (T_m 75 °C)

rev: 5'-ggc agg ctc aac cag gct agc aca aac cag tag atg g-3' (T_m 75 °C)

Für jede Mutante wurde ein Primer-Mix angefertigt, jeweils bestehend aus dem Primer „for“ (3,3 pmol/μl) und „rev“ (3,3 pmol/μl).

Da im Rahmen der zielgerichteten Mutagenese die gesamten Plasmide amplifiziert wurden, war im Anschluss keine Ligation erforderlich. Es erfolgte direkt die Transformation in kompetente One Shot™ Top 10 E. coli (Invitrogen™) mit anschließender Minipräparation und Sequenzierung bei erfolgreicher Plasmidextraktion. Zeigten die Sequenzierungsergebnisse ein korrekt inkludiertes mutagenes hMRGD-Gen, so wurden die hMRGD-Sequenzen aus dem Expressionsvektor pcDNA™3.1D/V5-His TOPO® in den Expressionsvektor pcDNA5/FRT-V5-His©-TOPO® umklontiert. Dazu wurden die Plasmide zunächst mit Hilfe einer Restriktionsendonuklease (MluI, New England BioLabs® Inc.) für 60 min bei 37 °C verdaut, wobei zuvor sichergestellt wurde, dass dabei keine Schnittstelle durch die mutagene hMRGD-Gensequenz verlief. Im Anschluss erfolgte die Amplifikation der mutagenen hMRGD-Sequenzen, wie in Kapitel 2.3.1 beschrieben. Nach Analyse der PCR-Produkte durch die Agarose-Gelelektrophorese und anschließendem DpnI-Verdau der methylierten Plasmid-DNA folgte erst die Ligation in pcDNA5/FRT-V5-His©-TOPO® und daraufhin die Transformation in E. coli. Die abschließende Sequenzierung durch die Firma GATC Biotech AG zeigte die korrekte Basenabfolge und Orientierung der Gensequenz im Expressionsvektor.

2.4 Zellkultur

2.4.1 Kulturmedien

Nährmedium I (Medium für native CHO Flp-InTM-Zellen)

- Ham's F-12 Nutrient Mix + GlutaMAXTM-I (GibcoTM)
- 10 % FBS (hitzeinaktiviert) (GibcoTM)
- Zeocin [100 µg/ml] (InvitrogenTM)

Nährmedium II (Medium für Transfektionen und Versuche von CHO Flp-InTM-Zellen)

- Ham's F-12 Nutrient Mix + GlutaMAXTM-I (GibcoTM)
- 10 % FBS (hitzeinaktiviert) (GibcoTM)

Nährmedium III (Medium für stabil transfizierte CHO Flp-InTM-Zellen, pcDNA5)

- Ham's F-12 Nutrient Mix + GlutaMAXTM-I (GibcoTM)
- 10 % FBS (hitzeinaktiviert) (GibcoTM)
- Hygromycin [500 µg/ml] (InvitrogenTM)

Nährmedium IV (Selektionsmedium für frisch transfizierte CHO Flp-InTM-Zellen, pcDNA5)

- Ham's F-12 Nutrient Mix + GlutaMAXTM-I (GibcoTM)
- 10 % FBS (hitzeinaktiviert) (GibcoTM)
- Hygromycin [600 µg/ml] (InvitrogenTM)

Nährmedium V (Medium für transfizierte CHO Flp-InTM-Zellen, pcDNA6.2)

- Ham's F-12 Nutrient Mix + GlutaMAXTM-I (GibcoTM)
- 10 % FBS (hitzeinaktiviert) (GibcoTM)
- Blastocidin [100 µg/ml] (GibcoTM)

2.4.2 Kultivierung von CHO Flp-InTM-Zellen

Als Zellsystem für die Expression der zu untersuchenden hMRGD-Rezeptoren wurden chinesische Hamster-Ovar Zellen (CHO Flp-InTM-Zellen, InvitrogenTM) verwendet. Diese

wurden in Zellkulturflaschen verschiedener Größe im Brutschrank (Heracell 150i, Thermo Scientific) bei 37 °C, 5 % CO₂ und unter Verwendung des Nährmediums I (mit Zeocin [100 µg/ml]) kultiviert. Bereits mit den Expressionsvektoren pcDNA5/FRT-V5-His[®]-TOPO[®] bzw. pcDNA[™]6.2/C-YFP-GW TOPO[®] transfizierte Zellen wurden mit dem Nährmedium III (mit Hygromycin [500 µg/ml], pcDNA5) bzw. dem Nährmedium V (mit Blasticidin [100 µg/ml], pcDNA6.2) kultiviert. Bei einer unter dem Mikroskop abgeschätzten Zelldichte von etwa 90-95 % (ca. 3-4 Kulturtage) wurden die Zellen gesplittet. Dazu wurden sie zunächst mit D-PBS-Lösung (Invitrogen[™]), die keine Kalzium- oder Magnesium-Ionen enthielt, gewaschen. Anschließend wurden sie mit Trypsin-EDTA von Flaschengrund abgelöst und ca. 10 % der Zellen in eine neue Kulturflasche überführt.

2.4.3 Einfrieren und Auftauen von CHO Flp-In[™]-Zellen

Um ausgewählte Zellkulturen zu sichern, wurden sie in Kryogefäßen bei -196 °C eingefroren. Dazu wurden etwa die Hälfte der Zellen einer 75 cm² großen Kulturflasche nach Ablösung von dem Flaschenboden durch Trypsin-EDTA im antibiotikalen Nährmedium II in ein Kryogefäß gegeben (ca. 1 ml). Anschließend wurde das Gefäß mit einem weiteren ml einer DMSO-Lösung (20%-ig, im gleichen Nährmedium, wie die Zellen selbst) aufgefüllt. So enthielt das Kryogefäß schlussendlich 10 % DMSO, was die Bildung von intrazellulären Eiskristallen, die die Zellen zerstören würden, verhinderte. Nach initialem Lagern bei -20 °C für 4 h wurden die Gefäße in Anschluss bei -196 °C dauerhaft gelagert. Das Auftauen eingefrorener Zellkulturen erfolgte zunächst langsam bei Raumtemperatur. Danach wurden sie in vorgewärmtes Nährmedium II ohne Selektionsantibiotikum gegeben. 24 h später erfolgte ein Medienwechsel, wobei dabei das entsprechende Selektionsmedium zugegeben wurde. Anschließend erfolgte die Kultivierung wie in Kapitel 2.4.2 beschrieben.

2.4.4 Transfektion

Für die Transfektion von CHO Flp-In[™]-Zellen wurden die Expressionsvektoren pcDNA5/FRT-V5-His[®]-TOPO[®] bzw. pcDNA[™]6.2/C-YFP-GW TOPO[®] verwendet, welche die zuvor erstellten hMRGD-Sequenzen enthielten. Transfektionen mit dem pcDNA5-

Vektor erfolgten unter Co-Transfektion mit dem pOG44-Vektor (Invitrogen™), welcher zur Expression der FLP-Rekombinase in den CHO Flp-In™-Zellen führt. Dadurch wird der pcDNA5-Vektor korrekt an der FRT-Schnittstelle in das Genom der entsprechenden Zelle integriert. Zur Transfektion wurden zum einem 3 µl der Rezeptor-DNA-Lösung (0,86 µg) mit 2,58 µl der pOG44-Vektor-Lösung (8,6 µg, also im Verhältniss 1:10) und zum anderen 20 µl Lipofectamine® 2000 (Invitrogen™) jeweils mit 500 µl Opti-MEM® I (Invitrogen™) versetzt. Nach 5 min Inkubationszeit wurden beide Ansätze vorsichtig ineinander pipettiert und für weitere 20 min inkubiert. Die zu transfizierenden Zellen, deren Zelldichte etwa 80 % betrug, befanden sich dabei in antibiotikafreiem Nährmedium II der 25 cm² großen Kulturflasche. Anschließend wurden die vorbereiteten Zellen mit der in Mizellen aufgenommenen DNA horizontal beträufelt und für 2 Tage in den Brutschrank gestellt, wobei währenddessen einmalig ein Medienwechsel erfolgte. Nach dieser Zeit wurden die frisch transfizierten Zellen mittels Trypsin-EDTA vom Flaschengrund abgelöst und in entsprechendem Selektionsmedium mit Hygromycin [600 µg/ml] (Nährmedium IV) kultiviert.

Transfektionen mit dem pcDNA6.2-Vektor erfolgten in analoger Abfolge zu denen mit dem pcDNA5-Vektor, jedoch ohne Co-Transfektion des pOG44-Vektors und mit 4 µl (1,28 µg) der Rezeptor-DNA. 2 Tage nach Transfektion wurden die transfizierten CHO Flp-In™-Zellen im Selektionsmedien Nährmedium V (mit Blasticidin [100 µg/ml]) kultiviert.

2.4.5 Vorbereitung von Zellen für pharmakologische Versuche

2.4.5.1 Vorbereitung für [³H]cAMP-Radioaffinitäts-Assays

Etwa 60 % der nicht benötigten transfizierten CHO Flp-In™-Zellen, welche beim Vorgang des Splittens von etwa 90 % konfluent gewachsenen Zellen (Kulturflasche: 25 cm²) übrig blieben, wurden in antibiotikafreies Nährmedium II (pcDNA5) oder Nährmedium V (pcDNA6.2) gegeben (insgesamt 13 ml) und durchmischt. Je 500 µl dieser Zellsuspension wurde in die 24 Kavitäten einer Platte gegeben und für 24 h bei 37 °C und 5 % CO₂ kultiviert. Nach mikroskopischer Kontrolle der homogenen Zelldichte (ca. 90 % pro Kavität) wurde der Versuch gestartet.

2.4.5.2 Vorbereitung für Luciferase-Reporter-Gen-Assays

Stabil transfizierte CHO Flp-In™-Zellen, die für das Luciferase-Assay vorbereitet wurden, wurden zunächst 24 h im antibiotikafreiem Nährmedium II kultiviert, bevor sie transient mit dem Reporter-Gen pNFAT-Luc (Stratagene™, Amsterdam, Niederlande) oder pSRE-Luc (Stratagene™) transfiziert wurden. Hierfür wurden entweder 4,8 µl (10 µg) des pNFAT-Luc- oder des pSRE-Luc-Vektors und 25 µl Lipofectamine® 2000 separiert in jeweils 500 µl Opti-MEM® I gegeben. Beide Ansätze wurden nach 5 min Inkubationszeit vorsichtig zusammengefügt und für weitere 20 min inkubiert. Nach der gleichmäßigen Verteilung der Lösung auf den vorbereiteten Zellen erfolgte eine 18 stündige Inkubation im Brutschrank. Anschließend wurden die Zellen analog zur Vorbereitung des [³H]cAMP-Assays ohne Selektionsantibiotikum auf eine Platte mit 24 Kavitäten aufgeteilt. Der Versuch startete 24 h nach Ausplattierung und mikroskopischer Kontrolle der homogenen Zelldichte.

2.5 Expressionsanalyse

2.5.1 Antikörper-vermittelte Fluoreszenzfärbung

Die hMRGD-Rezeptoren stabil transfizierter CHO Flp-In™ Zellen (pcDNA5/FRT-V5-His[®]-TOPO[®]) konnten mittels Fluorescein-Isothiocyanat-(FITC)-konjugierten Antikörpers (Anti-V5-FITC, Invitrogen™) optisch markiert werden. Damit kann sowohl die Expression des Rezeptors selbst nachgewiesen sowie sein Expressionslevel bestimmt werden. Der Antikörper bindet dabei an einem C-terminalen V5-Epitop, welches ebenfalls durch den Expressionsvektor kodiert wird. Für die Färbung wurden zunächst einzelne Zellen auf Glasplättchen ausgesät und mit dem Nährmedium III kultiviert. Nach zweifachem Waschen mit HBSS (Hanks Balanced Salt Solution) wurden die Zellen für 5 min mit Methanol (100 %) fixiert. Anschließend wurden die fixierten Zellen – nach einem erneuten Waschvorgang mit HBSS – für 20 min mit einer Blockierungslösung behandelt, die eine unspezifische Bindung des Antikörpers verhindert. Diese Lösung bestand aus HBSS mit 10 % FBS und 2 % Triton X-100 (Sigma[®], Darmstadt, Deutschland). Daraufhin wurden 225 µl der Antikörperlösung (Antikörper 1:500 in Blockierungslösung verdünnt) hinzugegeben und der Ansatz für 60 weitere Minuten im abgedunkelten Raum bei Raumtemperatur inkubiert. Nach Ablauf der Inkubationszeit wurde die Antikörperlösung

entfernt und die Zellen erneut mit HBSS gewaschen, bevor das mit den behandelten Zellen beladene Glasplättchen mit Hilfe eines konfokalen Laser-Scanning-Mikroskops (ObserverZ.1/LSM700; Zeiss, Jena, Deutschland) untersucht wurde. Die Aufnahmen erfolgten mit einem Plan-Apochromat-Objektiv (40x/1,3 Oil DICM27; Zeiss), einem 488 nm Anregungslaser und einem Beam Splitter bei 492 nm. Zur quantitativen Analyse der membranständigen Expression wurden die Lichtwerte von Teilbereichen der Zellmembran (10 Zellen pro Bild) bestimmt, wobei das Hintergrundrauschen (Lichtwert ohne Zellen) abgezogen wurde. Die Daten wurden mittels Zen 2010 Software (Zeiss) analysiert und die Mittelwerte \pm SEM von drei repräsentativen Bildern ausgewertet.

2.5.2 Expressionsanalyse mittels fluoreszierender Proteine

Die Expressionsanalyse von hMRGD-Rezeptoren in CHO Flp-In[™]-Zellen, welche mit dem Expressionsvektor pcDNA[™]6.2/C-YFP-GW TOPO[®] transfiziert wurden, erfolgte durch ein intrazellulär am C-Terminus gebundenes gelblich fluoreszierendes Protein (yellow fluorescent protein, YFP). Die Synthese dieses Proteins wird ebenfalls durch den Expressionsvektor kodiert. Einzelne zu analysierenden Zellen wurden auf Glasplättchen mit dem Nährmedium V kultiviert. Bei ausreichender Konfluenz wurden Aufnahmen der fluoreszierenden Zellen mittels Laser-Scanning-Mikroskop angefertigt. Die Aufnahmen und die Auswertung erfolgten analog zu der Antikörper-vermittelten Fluoreszenzfärbung (vgl. Kapitel 2.5.1), wobei ein Plan-Apochromat-Objektiv (63x/1,4 Oil DIC; Zeiss), ein 488 nm Anregungslaser und ein Beam Splitter bei 521 nm verwendet wurden.

2.6 Pharmakologische Versuche

Aufgrund der in Kapitel 1.3.3.1 beschriebenen G_i- bzw. G_q-Kopplung des hMRGD-Rezeptors wurden zur Überprüfung der Funktionalität der z.T. mutagen veränderten Rezeptorvarianten zwei Verfahren ausgewählt, die in der Lage sind, jeweils einen dieser Rezeptor-gekoppelten Signaltransduktionswege zu überprüfen. Dabei wird mittels

[³H]cAMP-Assay der in Abb. 2 dargestellte cAMP-abhängige Signaltransduktionsweg (A) und durch das NFAT-Luciferase-Assay der Signaltransduktionsweg (B) untersucht.

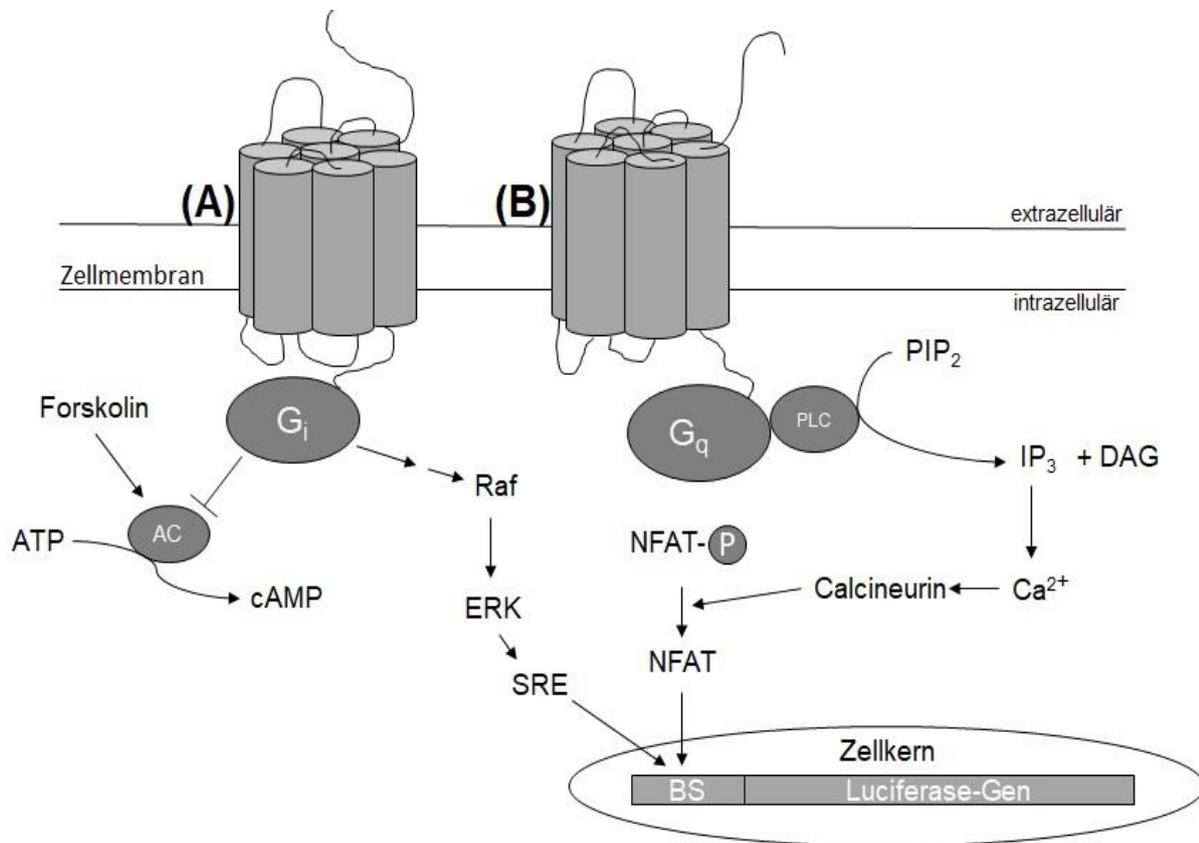


Abb. 2: Schematische Darstellung der G_i -gekoppelten Signalkaskade (A) bzw. der G_q -gekoppelten Signalkaskade (B) des hMRGD-Rezeptors. G_{α_i} : G_i -Protein, G_{α_q} : G_q -Protein, AC: Adenylatzyklase, PLC: Phospholipase C, ATP: Adenosintri-phosphat, cAMP: cyclisches Adenosinmonophosphat, PIP_2 : Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat, IP_3 : Inositoltriphosphat, DAG: Diacylglycerin, NFAT: nuclear factor of activated T-cells, P: Phosphat, BS: Bindungsstelle, SRE: serum response element, ERK: extrazelluläre signal-regulierte Kinase, \rightarrow : „führt zu“ oder „aktiviert“, \perp : „hemmt“. Das Schema wurde mit PowerPoint erstellt, modifiziert nach Cheng et al. (2010).

2.6.1 [³H]cAMP-Radioaffinitäts-Assay

Zur Funktionsuntersuchung der z.T. mutagen veränderten hMRGD-Rezeptoren wurde die G_i -vermittelte Änderung der intrazellulären cAMP-Konzentration bestimmt. Für dieses Experiment wurden die bereits vorbereiteten Zellplatten mit stabil transfizierten CHO Flp-In™-Zellen genutzt (vgl. Kapitel 2.4.5.1). Diese wurden nach Entfernung des Nährmediums zunächst mit erwärmtem HBSS gespült, darauffolgend mit 800 μ l HBSS je

Kavität aufgefüllt und anschließend für 1 h im Brutschrank inkubiert. Nach Ablauf dieser Inkubationszeit wurden die Zellplatten in ein Wasserbad bei 37 °C gestellt und je 100 µl einer HBSS-Lösung mit β -Alanin (Sigma®) verschiedener Konzentrationen hinzugegeben. Die Platten wurden kurz geschwenkt, sodass sich die Agonisten-Lösung gleichmäßig über die Zellen verteilen konnte. Direkt im Anschluss wurden die Zellen durch Zugabe von 100 µl Forskolin-Lösung (Endkonzentration 10 µM) zur cAMP-Produktion angeregt. Forskolin stimuliert hierbei direkt die Adenylatzyklase. Exakt 10 min später wurde die Reaktionslösung entfernt und die Zellen mit 500 µl ca. 90 °C heißer EDTA-Lösung (4 mM, 0,1 ‰ Triton 100 x, pH 7,5) lysiert. Dieser Ansatz inkubierte für 5 min, wobei die EDTA-Lösung in dieser Zeit abkühlte. Durch die Zugabe des Tritons wird eine Porenbildung der Zellmembran induziert, sodass das intrazellulär gebildete cAMP die Zelle verlassen und in den Überstand gelangen konnte. Das EDTA wirkte einem Abbau des entstandenen cAMPs durch Hemmung von Phosphodiesterasen entgegen. Nach Ablauf der 5 min wurde die Zellplatte mit den nun lysierten Zellen für 60 min auf Eis geschwenkt, bevor jeweils 50 µl des Überstandes für die Messung der cAMP-Konzentration entnommen wurden.

Im Radioisotopenlabor wurden den gewonnenen Proben jeweils 30 µl radioaktives [³H]cAMP und 40 µl einer cAMP-Bindeproteinlösung hinzugegeben. Die darauffolgenden 60 min Inkubationszeit auf Eis dienten der Einstellung eines Bindungsgleichgewichts von nativem und radioaktiv markierten cAMP am Bindeprotein. Je nach ursprünglicher Konzentration von nativem cAMP in den gewonnenen Proben stellt sich dabei ein jeweils eigenes Gleichgewicht ein. Nach den 60 min Inkubationszeit wurden 50 µl einer Aktivkohlesuspension hinzugegeben, die das nicht am Bindeprotein gebundene [³H]cAMP bindet. Dieses Gemisch wurde für 5 min auf Eis inkubiert. Durch Zentrifugation (5 min, 0 °C, 14.000 rpm) wurde die Aktivkohle anschließend wieder entfernt. Aus dem Überstand wurden 100 µl in ein Szintillationsröhrchen überführt, welches mit 2 ml Szintillationsgel (LSC-Universalcocktail) aufgefüllt wurde. Die Messungen der Radioaktivität erfolgten mittels LSC-Counters (LS 5000 TD; Beckman, Krefeld, Deutschland) über jeweils 10 min nach einer Adaptationsphase von 3 h. Durch diese Methode ergibt sich eine inverse Korrelation zwischen ursprünglicher cAMP-Konzentration der Proben und der gemessenen Radioaktivität.

Der cAMP-Gehalts der untersuchten Proben konnte anhand einer Kalibriergeraden mittels linearer Regression ermittelt werden. Diese Kalibriergerade wurde über die Messung der Radioaktivität definierter Konzentrationen eines cAMP-Standards (Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg, Deutschland) erstellt, wobei der cAMP-Gehalt der vermessenen Proben im Bereich der Kalibriergeraden lag. Der Forskolin-induzierte cAMP-Anstieg ohne Zugabe des Agonisten β -Alanin wurde als Positivkontrolle (100 %, K) verwendet. Die cAMP-Werte der Proben mit Zugabe von β -Alanin wurden als prozentuale Werte der Positivkontrolle nach Subtraktion der basalen zellulären cAMP-Menge bestimmt. Dieser ist definiert durch den cAMP-Gehalt der transfizierten CHO Zellen ohne Zugabe von Forskolin oder β -Alanin und wurde an jedem Versuchstag mitbestimmt.

2.6.1.1 Das cAMP-Bindeprotein

Das cAMP-Bindeprotein wurde durch Mitarbeiter der Arbeitsgruppe aus bovinen Nebennierenrinden gewonnen, die vom Schlachthof stammten. Nach Zerkleinerung und unterschiedlichen Wasch- und Zentrifugationsschritten wurde die Lösung [5 mg/ml] in einer Pufferlösung bestehend aus TRIS-HCl, NaCl und Dinatrium-EDTA eingefroren. Am Versuchstag wurde sie im Verhältnis 1:5 (in selbiger Pufferlösung verdünnt) verwendet.

2.6.1.2 Herstellung der Aktivkohlesuspension

Die Aktivkohlesuspension wurde durch Zugabe von 1 g bovinem Serumalbumin (BSA) und 0,75 g eines Aktivkohlepulvers (Endkonzentration von 3 %) in 25 ml einer zuvor angesetzten Natriumacetat-Lösung (50 mM, pH 6,2) hergestellt. Diese Suspension wurde bei 4 °C gekühlt und maximal 4 Wochen verwendet.

2.6.2 Luciferase-(Reporter)-Assays

Anhand der Untersuchung des G_i - bzw. G_q -vermittelten Signaltransduktionswegs von z.T. mutierten hMRGD-Rezeptoren mittels NFAT- (G_q) und SRE- (G_i) Luciferase-Assays wurde die Funktionalität der Rezeptorvarianten überprüft. Die Produkte des Reportergens (Luciferase-Gen) werden durch die Aktivierung spezifischer Signalkaskaden synthetisiert,

wobei die enzymatische Aktivität der Luciferase durch Messungen der Lichtstärke analysiert wird (Cheng et al., 2010). Die zugrundeliegenden Signaltransduktionswege des NFAT- (nuclear factor of activated T-cells) bzw. des SRE- (serum response element) abhängigen Reportergens werden in Abb. 2 dargestellt. Die Durchführung dieser Assays erfolgte in Anlehnung an Frau Dr. K. Hoffmann (Hoffmann, 2010) und Frau Dr. S. Müller (Müller, 2014).

Für die Versuche wurden die in Kapitel 2.4.5.2 vorbereiteten Zellen verwendet. Die Zellen wurden zunächst mit 400 µl HBSS gespült, bevor die Kavitäten der Zellplatte mit 900 µl HBSS aufgefüllt und die Zellen für 1 h im Brutschrank inkubiert wurden. Anschließend erfolgte die Zugabe der Agonisten β -Alanin bzw. Alamandin (Bachem, Bubendorf, Schweiz) in verschiedenen Konzentrationen gelöst in HBSS (insgesamt 100 µl). Bei Versuchen mit Antagonisten wurden diese 15 min vor Agonistenzugabe beigelegt. Im Anschluss erfolgte eine Inkubationszeit von 3 h (NFAT) bzw. 5 h (SRE). Durch Entfernen der Lösung wurde die Reaktion gestoppt und den Zellen 50 µl HBSS sowie 50 µl BRIGHT-GLO™ (Lyse-Puffer und Luciferase-Substrat, Promega, Mannheim, Deutschland) zugesetzt. Nach 9 min Inkubationszeit wurden jeweils 80 µl der Probe entnommen und auf eine Platte mit 96 Kavitäten gegeben. Zur quantitativen Analyse der Luciferaseaktivität wurden die relativen Lichteinheiten (RLUs) nach weiteren 6 min Inkubation mit einem Plattenluminometer (FLUOstar Optima, BMG Labtech) gemessen (3 Messungen, jeweils 5 s pro Vertiefung).

Zur Datenanalyse wurden die erhaltenen Ergebnisse (relative light units, RLU) der 3 Messungen gemittelt und als prozentualer Anstieg bezogen auf die ebenfalls gemittelten Kontrollen (Zugabe von HBSS statt der Agonisten) dargestellt.

2.7 Statistische Auswertung

Die Ergebnisse wurden als Mittelwerte \pm SEM (Standardfehler bezogen auf den Mittelwert) von n Experimenten präsentiert. Für die Analysen wurde die Prism® 4 Software (Graph Pad Software) benutzt. Die Unterschiede zwischen den Mittelwerten wurden mittels Einweg-Varianzanalyse (ANOVA) und einem anschließenden Bonferroni Post-Test auf Signifikanz getestet. Einzelne Unterschiede von IC₅₀-Werten und der maximalen Inhibition des cAMP-Anstiegs von Konzentrations-Wirkungskurven wurden mittels F-Test

(Extra-Quadratsummen-F-Test) auf Signifikanz getestet. Dieses Testverfahren wird im Text an entsprechender Stelle explizit genannt. Für alle Testverfahren wurde $p < 0,05$ als Signifikanzniveau festgelegt.

Mittels nicht-linearer Regression konnten an Hand der experimentellen Daten sigmoidale Konzentrations-Wirkungskurven berechnet werden. Den Berechnungen der Kurven wurden die IC_{50} - und EC_{50} -Werte entnommen. Folgende Gleichung wird dabei zugrunde gelegt:

$$Y = E_{\min} + (E_{\max} - E_{\min}) / (1 + 10^{(\log EC_{50} + X) * m})$$

X: \log [Konzentration], Y: gemessener Effekt, E_{\min} : Minimaleffekt, E_{\max} : Maximaleffekt, EC_{50} : halbmaximale Wirkkonzentration, m: Steigung

2.8 Abschätzung von Affinitätskonstanten

Zur Abschätzung der Affinität des Antagonisten zum Rezeptor dient der scheinbare pK_B -Wert. Dieser Wert schätzt, bei welcher Konzentration die Hälfte aller Rezeptoren einen Antagonisten binden. Zur Berechnung wurde folgende Gleichung benutzt:

$$-\log K_B = pK_B = \log (DR - 1) - \log [B]$$

[B] beschreibt hierbei die Konzentration des Antagonisten. $\log (DR - 1)$ beschreibt die Rechtsverschiebung der Konzentrations-Wirkungskurve durch den Antagonisten, wobei DR die „dose ratio“ (EC_{50} in Anwesenheit des Antagonisten / EC_{50} in Abwesenheit des Antagonisten) beschreibt. Dieser Wert wurde mittels Prism[®] 4 Software bestimmt. Bei der Berechnung wurde angenommen, dass es sich bei dem untersuchten Stoff um einen kompetitiven Antagonisten handelt.

3. Ergebnisse

3.1 Analyse von Rezeptoren mit modifizierter Startsequenz

Durch die Amplifikation der hMRGD-Sequenz (vgl. Kapitel 2.3.1) entstanden drei Varianten des hMRGD-Rezeptors mit unterschiedlichen Startsequenzen, eine mit kurzem N-Terminus (KV), eine mit modifiziertem N-Terminus (MV, doppelt enthaltenes Startcodon) und eine mit langem N-Terminus (LV), wobei Letztere der Genbanksequenz entspricht. Diese wurden mit Hilfe des Expressionsvektors pcDNA™6.2/C-YFP-GW TOPO® in CHO Flp-In™-Zellen transfiziert. Anschließend konnte die Rezeptorexpression durch das gelb fluoreszierende Protein (YFP), welches intrazellulär an den Rezeptor gekoppelt war, ermittelt werden. Im Folgenden wurden die Rezeptorvarianten mittels [³H]cAMP-Assays auf ihre Funktionalität untersucht. So konnte der Frage nachgegangen werden, inwiefern die Expression und Funktion des hMRGD-Rezeptors von der Startsequenz beeinflusst werden.

3.1.1 Expressionsanalyse von Rezeptoren mit modifizierter Startsequenz

Alle drei untersuchten Zellreihen, die mit Varianten des hMRGD-Rezeptors transfiziert wurden, wiesen eine Expression der Rezeptorkonstrukte auf. Eine konstante Signalanreicherung der Zellmembran wurde dabei nicht beobachtet (Abb. 3). Die drei Varianten lassen jeweils eine deutlich voneinander abweichende Expression der hMRGD-Rezeptoren erkennen. CHO Zellen, die mit der gleichen Rezeptorvariante transfiziert wurden, zeigten untereinander ein inhomogenes Expressionsmuster. Dies galt insbesondere für die Rezeptorvarianten mit langem und modifiziertem N-Terminus. In diesen Fällen zeigten sich sowohl Zellen, die marginal membranbetont angefärbt wurden als auch solche, deren Zytoplasma stark fluoreszierte (Abb. 3). Die relative Expressionshöhe konnte durch Analyse von ausgewählten Teilbereichen der Zellmembran bestimmt und somit das Expressionslevel der einzelnen Rezeptorvarianten miteinander verglichen werden. Dabei konnten an einzelnen Zellen sehr hohe Expressionslevel der langen und modifizierten Rezeptorvarianten festgestellt werden. Bezogen auf das kurze Konstrukt (KV) war die gemittelte Expression der langen bzw.

modifizierten Variante allerdings nicht signifikant verschieden (Abb. 4). Als Vergleich dienten CHO Zellen, die nicht mit dem hMRGD-Rezeptor transfiziert wurden (hMRGD^{neg}).

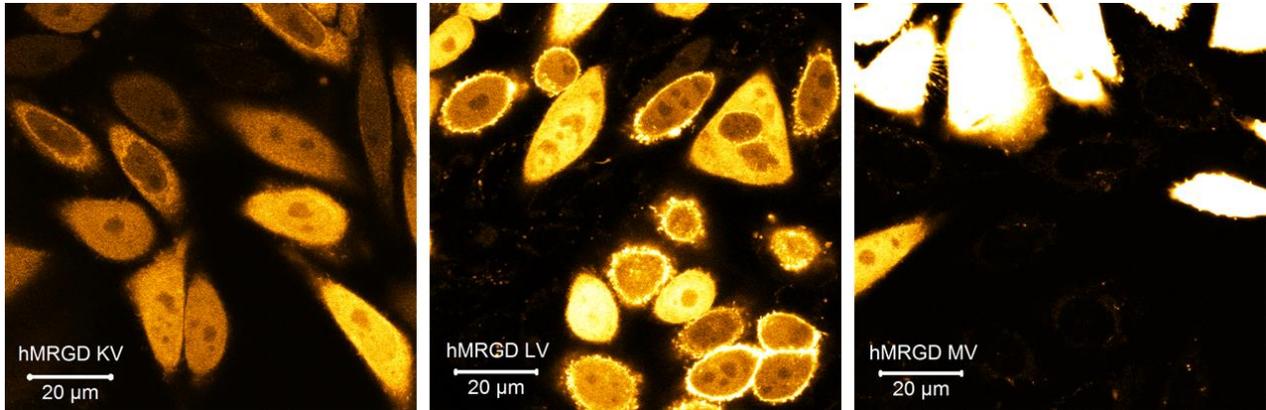


Abb. 3: Expression von Varianten des hMRGD-Rezeptors mit intrazellulär gekoppeltem YFP in CHO Zellen. KV: Variante mit kurzem N-Terminus, LV: Variante mit langem N-Terminus, MV: Variante mit modifiziertem N-Terminus. Die Aufnahmen wurden am Laser-Scanning-Mikroskop unter Zuhilfenahme der Zen 2010 Software erstellt. Färbe- und Aufnahmebedingungen sind mit einer 63-fachen Vergrößerung, einem Beam Splitter von 521 nm und einer Anregungswellenlänge von 488 nm jeweils identisch.

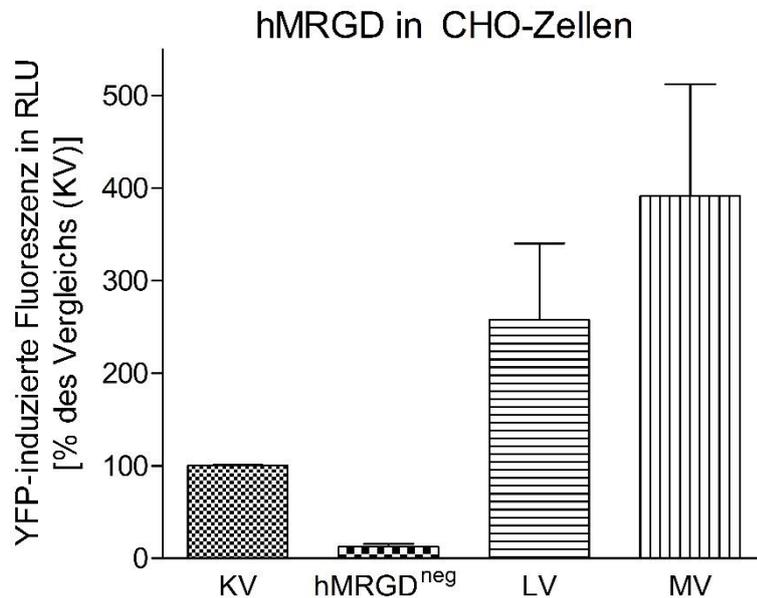


Abb. 4: Expression von YFP-Varianten des hMRGD-Rezeptors verglichen mit Zellen ohne hMRGD-Rezeptor (hMRGD^{neg}). KV: Variante mit kurzem N-Terminus, LV: Variante mit langem N-Terminus, MV: Variante mit modifiziertem N-Terminus. Alle Varianten sind intrazellulär an ein YFP gekoppelt. Die Mittelwerte \pm SEM von 3 Experimenten \acute{a} 10 ausgewertete Teilbereiche der Zellmembran sind in % der Werte von KV angegeben. Statistische Analyse: ANOVA mit anschließendem Bonferroni Post-Test.

3.1.2 Funktionsanalyse von Rezeptoren mit modifizierter Startsequenz

Zur Untersuchung der unterschiedlichen Startsequenzen des hMRGD-Rezeptors und zur Bestimmung ihrer Relevanz für die Rezeptorfunktion wurde der G_i -vermittelte Signaltransduktionsweg der Varianten mit kurzem, langem und modifiziertem N-Terminus und intrazellulär gebundenem YFP bezüglich ihrer Funktion überprüft. Zugleich konnte durch diese funktionelle Untersuchung der Frage nachgegangen werden, inwiefern das gekoppelte YFP die Rezeptorfunktion beeinflusst. Dazu wurde zunächst der intrazelluläre cAMP-Gehalt mittels direkter Stimulation der Adenylatzyklase durch Forskolin [10 μ M] gesteigert. Anschließend konnte die G_i -vermittelte Hemmung der cAMP-Akkumulation durch Zugabe des hMRGD-Rezeptor-Agonisten β -Alanin untersucht werden.

Es zeigte sich für die kurze Rezeptorform gegenüber dem Kontrollversuch ohne Agonistenzugabe eine signifikante, maximale Inhibition der cAMP-Akkumulation von ca. 54 % bei einer β -Alanin-Konzentration von 1 mM. Rechnerisch wurde ein EC_{50} -Wert von ca. 47 μ M bestimmt. Dabei konnte eine konzentrationsabhängige Verringerung des intrazellulären cAMP-Gehalts beobachtet werden. Je höher die β -Alanin-Konzentration gewählt wurde, desto niedriger war der cAMP-Wert (Abb. 5). Die anderen beiden Rezeptorformen zeigten keine oder nur geringe Abschwächungen der cAMP-Akkumulation. Eine konzentrationsabhängige Inhibition konnte hierbei nicht detektiert werden. So führte die β -Alanin-Konzentration von 100 μ M bei der modifizierten Variante lediglich zu einer isolierten, signifikanten Inhibition der cAMP-Akkumulation um ca. 15 % (Abb. 5). Bei der langen Variante und einer Konzentration von 1 mM wurde ein um 13 % signifikant erniedrigter cAMP-Gehalt bezogen auf die Kontrolle festgestellt (Abb. 5).

Außerdem konnte eine isolierte Steigerung des cAMP-Gehalts durch β -Alanin [3 μ M] bei der modifizierten Variante festgestellt werden. Dies wurde jedoch im Rahmen der vorliegenden Arbeit nicht weitergehend untersucht. Ebenso wurde auf eine weiterführende Untersuchung des G_q -vermittelten Signaltransduktionswegs der oben aufgeführten YFP-Varianten mittels NFAT-Luciferase-Assay verzichtet.

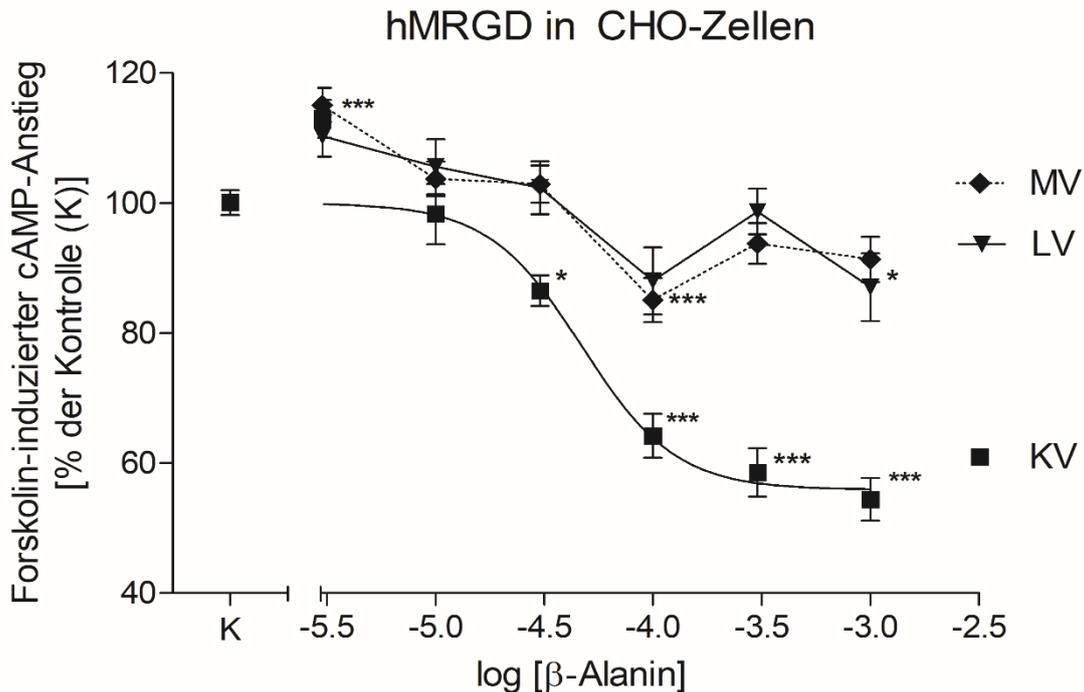


Abb. 5: β -Alanin vermittelte Inhibition der Forskolin-induzierten cAMP-Akkumulation von YFP-Varianten des hMRGD-Rezeptors. KV: Variante mit kurzem N-Terminus, LV: Variante mit langem N-Terminus, MV: Variante mit modifiziertem N-Terminus. YFP wurde am C-Terminus fusioniert. Die Mittelwerte \pm SEM von 9-43 Experimenten (A) sind als % der Kontrolle (K, ohne β -Alanin) angegeben. * $p < 0,05$; *** $p < 0,001$ signifikanter Unterschied gegenüber der Kontrolle. Statistische Analyse: ANOVA mit anschließendem Bonferroni Post-Test.

3.2 Analyse der punktmutierten kurzen Rezeptorvarianten

Zur Analyse der Relevanz einzelner Aminosäuren des hMRGD-Rezeptors in Bezug auf die Rezeptorfunktion wurden unterschiedliche Konstrukte der kurzen Rezeptorvariante durch zielgerichtete Mutagenese erstellt. Diese wurden durch den Expressionsvektor pcDNA5/FRT-V5-His[©]-TOPO[®] in CHO Flp-In[™]-Zellen transfiziert. Dementsprechend wiesen die punktmutierten Varianten kein intrazellulär gebundenes YFP auf. Die Expressionsanalyse der hMRGD-Rezeptoren auf den CHO-Zellen wurde daher mittels fluoreszierender Antikörper unter Zuhilfenahme eines Laser-Scanning-Mikroskops durchgeführt. Im Anschluss erfolgte die Funktionsuntersuchung der erstellten Konstrukte mittels [³H]cAMP- und NFAT-Luciferase-Assays, wobei jeweils die kurze Rezeptorvariante ohne zielgerichtete Mutation als Vergleich diente.

3.2.1 Expressionsanalyse der punktmutierten kurzen Rezeptorvarianten

Die punktmutierten hMRGD-Varianten stabil transfizierter CHO-Zellen wurden durch einen Fluorescein-Isothiocyanat-gekoppelten Antikörper markiert. Dieser bindet intrazellulär am V5-Epitop des C-terminalen Endes des hMRGD-Rezeptors. Analog zu den Varianten mit YFP erfolgte die Expressionsanalyse anhand der Signalstärke ausgewählter Teilbereiche der Zellmembran. Aus dieser Untersuchung sollte abgeleitet werden, inwiefern sich der Austausch einzelner Aminosäuren im hMRGD-Rezeptor auf dessen Expression auswirkt. Bei fast allen Zellen der punktmutierten Varianten zeigte sich eine membranbetonte Rezeptorexpression ähnlicher Signalstärke (Abb. 7). Bezogen auf die kurze Variante war bei den verschiedenen Mutanten in der quantitativen Analyse kein signifikanter Unterschied bezüglich der Expression des Rezeptors feststellbar. hMRGD-negative CHO-Zellen wurden ebenfalls mit gleichen Antikörpern untersucht. Diese zeigten gegenüber der Kontrolle eine signifikant niedrigere Signalstärke (Abb. 6).

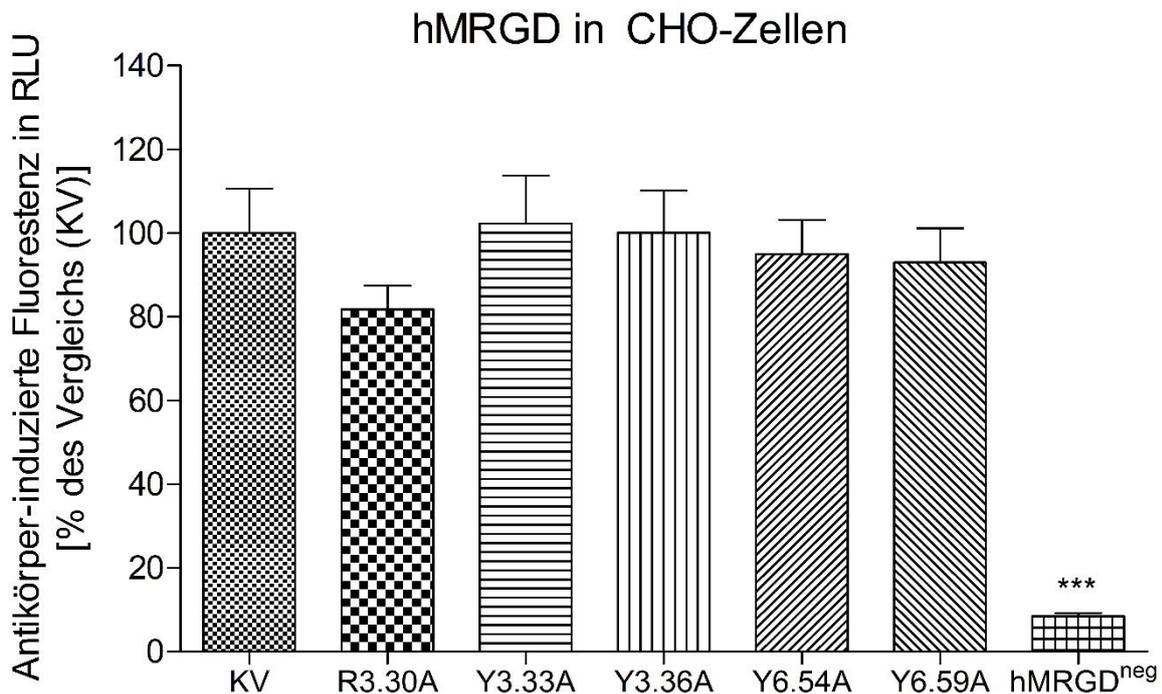


Abb. 6: Expression von zielgerichtet mutierten Varianten des hMRGD-Rezeptors verglichen mit Zellen ohne hMRGD-Rezeptor (hMRGD^{neg}). KV: Variante mit kurzem N-Terminus. Mutanten werden mit der Nomenklatur nach Ballesteros und Weinstein (1995) angegeben. Die Mittelwerte \pm SEM von 3 bzw. 4 Experimenten \acute{a} 10 Teilbereiche der Zellmembran sind als % des Vergleichs mit KV angegeben. *** $p < 0,001$, signifikanter Unterschied gegenüber KV. Statistische Analyse: ANOVA mit anschließendem Bonferroni Post-Test.

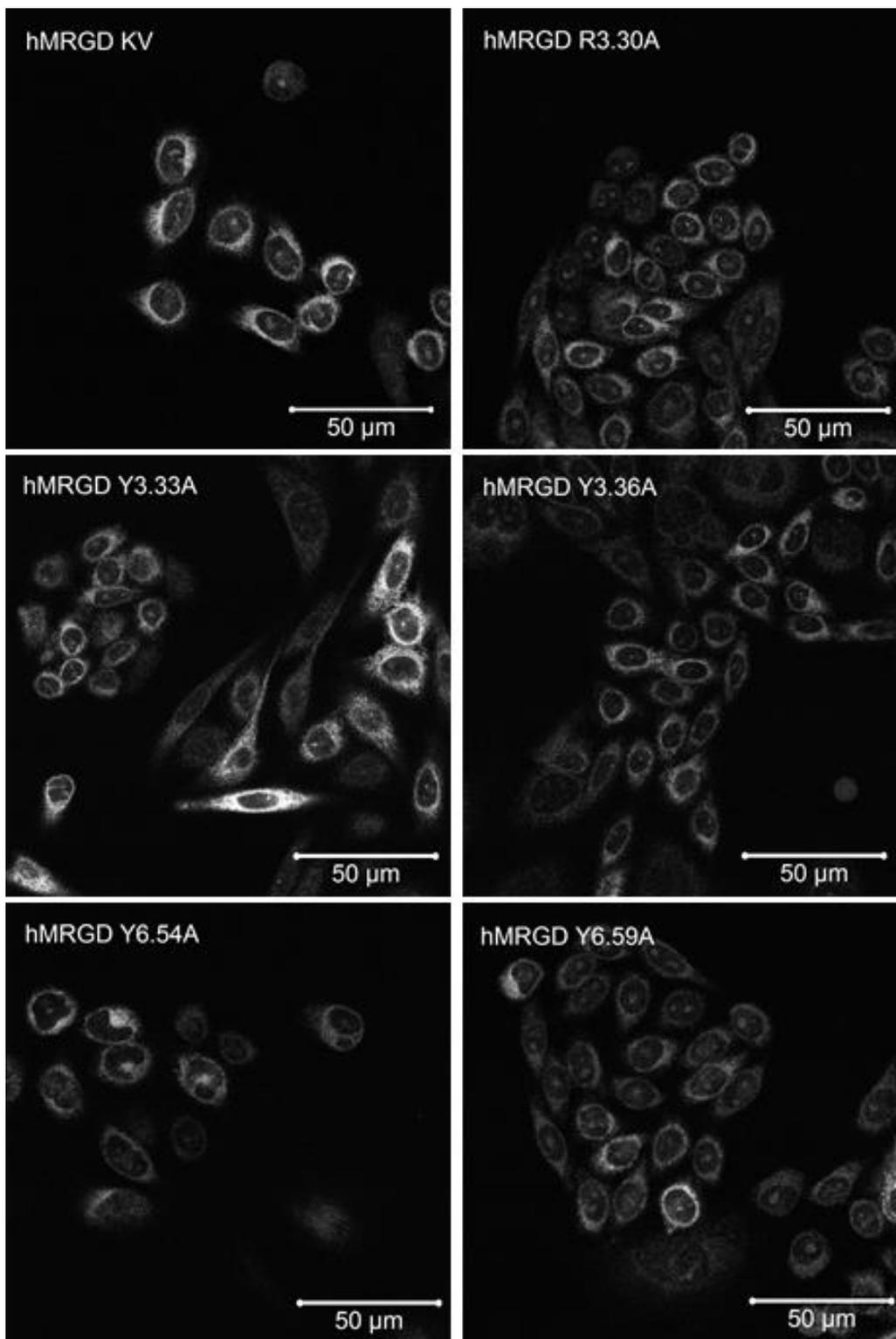


Abb. 7: Expression von punktmutierten, mit Anti-V5-FITC markierten Varianten des hMRGD-Rezeptors in CHO Zellen. Die Aufnahmen wurden am Laser-Scanning-Mikroskop unter Zuhilfenahme der Zen 2010 Software erstellt. Färbe- und Aufnahmebedingungen sind mit einer 40-fachen Vergrößerung, einem Beam Splitter von 492 nm und einer Anregungswellenlänge von 488 nm jeweils identisch. Mutanten werden nach Ballesteros und Weinstein (1995) benannt. Der Größenmaßstab beträgt 50 µm.

3.2.2 Funktionsanalyse der punktmultierten kurzen Rezeptorvarianten

Nachdem gezeigt werden konnte, dass sich die in Abb. 7 dargestellten mutierten Rezeptorvarianten bezüglich ihrer Expression nicht signifikant voneinander unterscheiden, wurde nun die Funktionalität mittels [^3H]cAMP- und NFAT-Luciferase-Assays überprüft. Dazu wurde zum einen die β -Alanin vermittelte Hemmung der cAMP-Akkumulation nach initialer Steigerung des cAMP-Gehalts mittels Forskolin [$10\ \mu\text{M}$] untersucht. Zum anderen wurde der G_q -vermittelte Signaltransduktionsweg über die Luciferaseaktivität nach Stimulation der hMRGD-Varianten durch β -Alanin getestet. Als Vergleich für diese Konstrukte diente auch hier die mutationslose kurze Variante des Rezeptors.

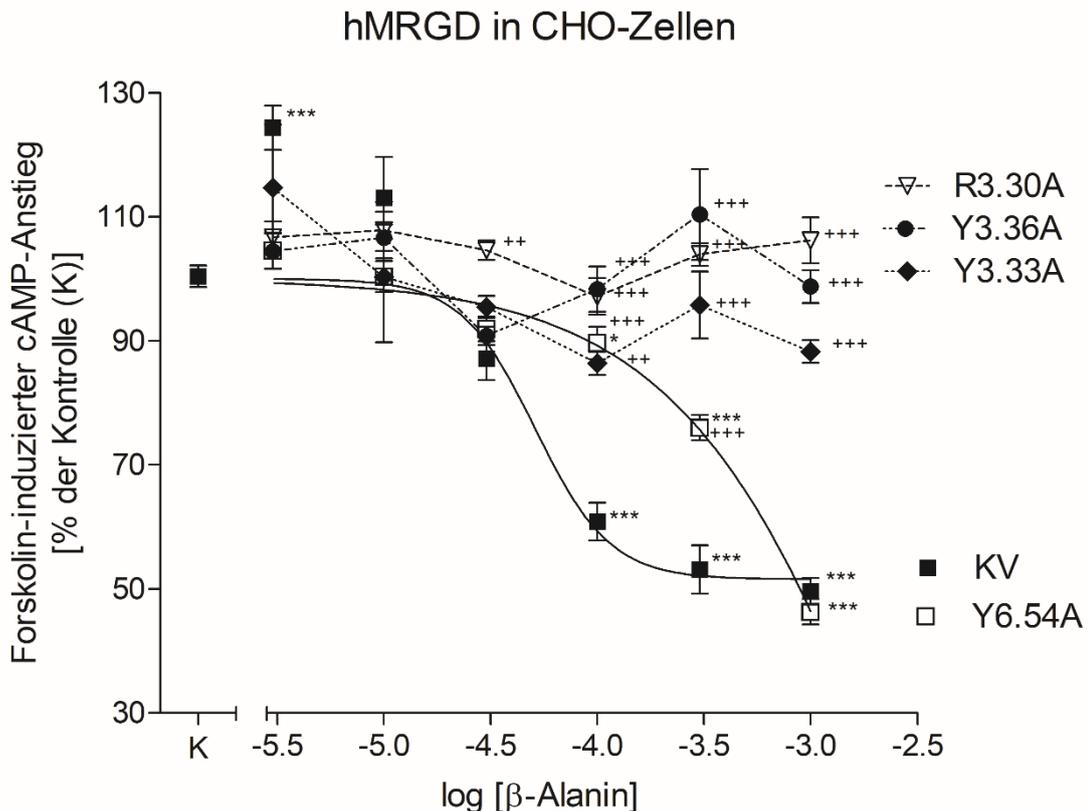


Abb. 8: β -Alanin vermittelte Inhibition der cAMP-Akkumulation in punktmultierten Varianten des hMRGD-Rezeptors. KV: Kurze Rezeptorvariante. Die Mittelwerte \pm SEM von 4-48 Experimenten werden als % der Kontrolle (K, ohne β -Alanin) angegeben. * $p < 0,05$; *** $p < 0,001$ signifikanter Unterschied gegenüber der Kontrolle, ++ $p < 0,01$; +++ $p < 0,001$ signifikanter Unterschied zu korrespondierenden Werten des Vergleichs (KV). Statistische Analyse: ANOVA mit nachfolgendem Bonferroni Post-Test.

Diese zeigte eine maximale Inhibition der cAMP-Akkumulation von ca. 50 % bei einer Konzentration von 1 mM mit einem IC_{50} -Wert von 63 μ M (Abb. 8; G_i -Kopplung des Rezeptors) bzw. einen maximalen Anstieg der Luciferase-Aktivität um 154 % [1 mM] mit einem EC_{50} -Wert von 86 μ M (Abb. 9; G_q -Kopplung des Rezeptors). Das Ergebnis der cAMP-Gehaltsbestimmung konnte mit der entsprechenden Rezeptorvariante, welche intrazellulär ein gebundenes YFP aufwies, verglichen werden. Dabei wurde mittels F-Test kein signifikanter Unterschied bezüglich der maximalen Inhibition und des IC_{50} -Wertes festgestellt (p-Wert von 0,44; als Vergleich: hMRGD + YFP: maximale Inhibition ca. 54 %, IC_{50} -Wert: 47 μ M, vgl. Kapitel 3.1.2).

hMRGD in CHO-Zellen

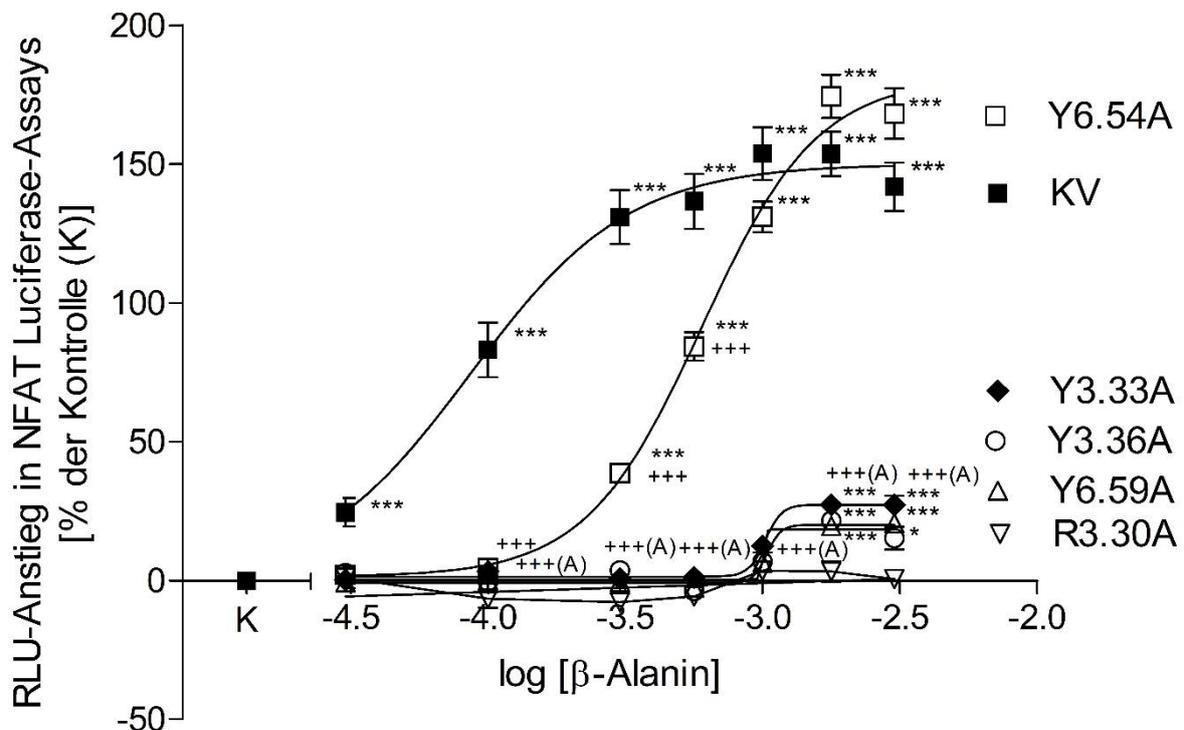


Abb. 9: β -Alanin vermittelter Anstieg der NFAT-abhängigen Luciferase-Aktivität in punktmutierten Varianten des hMRGD-Rezeptors. KV: Kurze Rezeptorvariante. Die Mittelwerte \pm SEM von 8-44 Experimenten werden als % der Kontrolle (K, ohne β -Alanin) angegeben. * $p < 0,05$; *** $p < 0,001$ signifikanter Unterschied gegenüber der Kontrolle, +++ $p < 0,001$ signifikanter Unterschied zu korrespondierenden Werten des Vergleichs (KV). (A): statistischer Wert bezogen auf die Varianten R3.30A, Y3.33A, Y3.36A und Y6.59A. Statistische Analyse: ANOVA mit nachfolgendem Bonferroni Post-Test.

Der Austausch des basischen Arginins (R) gegen ein neutrales Alanin (A) in Position 3.30 (kurz: R3.30A) führte einerseits zur fehlenden Inhibition der cAMP-Akkumulation (Abb. 8) und andererseits zum fehlenden Anstieg der Luciferase-Aktivität (Abb. 9). Gegenüber der Kontrolle ergaben sich daher jeweils keine signifikanten Änderungen.

Auch für die Konstrukte, bei denen das aromatische Tyrosin (Y) an den Positionen 3.33 bzw. 3.36 gegen Alanin ausgetauscht wurde, konnte in funktionellen Versuchen keine signifikante Verringerung der cAMP-Akkumulation detektiert werden (Abb. 8). Jedoch zeigten Zellen mit diesen Konstrukten – wie auch die Mutante Y6.59A – ab einer β -Alanin-Konzentration von 2 mM geringe aber signifikante Anstiege der NFAT-gesteuerten Luciferase-Aktivität. Im Vergleich mit der nicht mutierten kurzen Rezeptorform sind diese mit 27 % (Y3.33A, [2 mM]), 22 % (Y3.36A, [2 mM]) und 21 % (Y6.59A, [3 mM]) allerdings signifikant niedriger (Abb. 9). Dementsprechend liegen die EC_{50} -Werte mit jeweils ca. 1 mM (Y3.33A, Y3.36A und Y6.59A) um etwa das 12-fache höher als der entsprechende EC_{50} -Wert der kurzen Rezeptorform. Die Untersuchung des G_i -vermittelten Signaltransduktionswegs der Rezeptorvariante Y6.59A wurde nicht durchgeführt.

Der hMRGD-Rezeptor mit der Punktmutation Y6.54A führt in [3H]cAMP-Assays zur maximalen Inhibition der cAMP-Produktion von 46 % [1 mM] mit einem geschätzten IC_{50} -Wert von 287 μ M (Abb. 8). In NFAT-Luciferase-Assays ließ sich ein maximaler Anstieg der Luciferase-Aktivität von 174 % [2 mM] mit einem EC_{50} -Wert von 600 μ M bestimmen (Abb. 9). Damit wiesen die Konzentrations-Wirkungs-Kurven der Y6.54A-Variante beider Untersuchungsreihen eine signifikante Rechtsverschiebung gegenüber der Vergleichskurve der kurzen nicht mutierten Rezeptorform auf. Die maximale Inhibition der cAMP-Akkumulation bzw. der maximale RLU-Anstieg im NFAT-Luciferase-Assay unterschied sich dabei nicht signifikant voneinander.

NFAT-Luciferase-Versuche mit CHO Flp-InTM-Zellen ohne hMRGD (hMRGD^{neg}) zeigten bei Stimulation mit β -Alanin in unterschiedlichen Konzentrationen keinen Signalanstieg (Daten nicht demonstriert). Dieser Versuch wurde zur Kontrolle der spezifischen Wirkung von β -Alanin am hMRGD-Rezeptor durchgeführt.

3.3 Analyse potentieller Antagonisten am hMRGD-Rezeptor

Eine weiterführende Fragestellung in dieser Arbeit bestand darin, ob sich – neben den bereits bekannten Antagonisten am hMRGD-Rezeptor (vgl. Kapitel 1.3.3.1) – weitere antagonistisch wirkende Substanzen identifizieren lassen. Dazu wurden NFAT-Luciferase-Assays mit CHO-Zellen der rekombinanten kurzen Rezeptorvariante und dem Agonisten β -Alanin durchgeführt, wobei die jeweils zu untersuchenden Antagonisten in einer Konzentration von 10 μ M den entsprechenden Versuchsreihen hinzugegeben wurden. Der Versuchsansatz ohne Zugabe eines potentiellen Antagonisten wurde als Vergleich verwendet. Der Versuch mit dem bereits bekannten Antagonisten Chlorpromazin (CP) sollte als Abschätzungshilfe dienen, für den Fall, dass weitere Antagonisten unter den untersuchten Stoffen waren. Die Struktur der getesteten Substanzen ähnelte dabei der von Chlorpromazin (vgl. Kapitel 8.2.2).

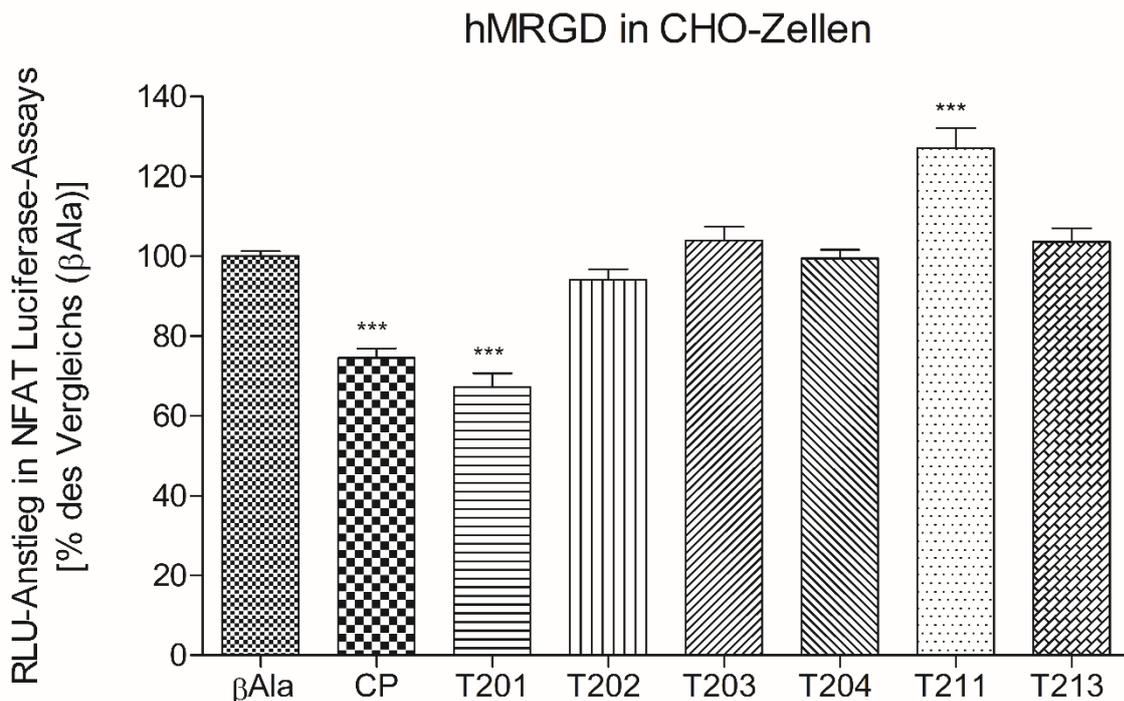


Abb. 10: Analyse potentieller Antagonisten. Es wird der β -Alanin-vermittelte Anstieg der NFAT-abhängigen Luciferase-Aktivität an CHO-Zellen gezeigt, welche stabil die kurze Variante des hMRGD-Rezeptors exprimieren. β -Ala: β -Alanin, CP: Chlorpromazin, T201-T213: THV201-THV213. Allen Versuchen wurde β -Alanin 100 μ M hinzugefügt. CP bzw. THV201-THV213 wurde jeweils in einer Konzentration von 10 μ M hinzugegeben. Die Mittelwerte \pm SEM von 3-14 Experimenten werden als % des Vergleichs mit β -Alanin (β Ala) angegeben. *** $p < 0,001$ signifikanter Unterschied zur Kontrolle. Statistische Analyse: ANOVA mit nachfolgendem Bonferroni Post-Test.

Es zeigte sich ein signifikant verringerter RLU-Anstieg in der Testreihe mit Chlorpromazin sowie mit THV201. Bezogen auf die Kontrolle (ohne Antagonisten) betrug dieser lediglich 75 % (Chlorpromazin) bzw. 67 % (THV201). Die beiden Substanzen unterschieden sich in ihrer Hemmstärke allerdings nicht signifikant voneinander (Abb. 10).

Die Zugabe der zu testenden Stoffe THV202-204 sowie THV213 zeigten keinen Einfluss auf den G_q -vermittelten RLU-Anstieg. Einzig die Substanz THV211 führte – in Kombination mit dem Agonisten β -Alanin – zu einem signifikant erhöhten Signalanstieg gegenüber dem Vergleich (β Ala, Abb. 10). In anschließenden Versuchen mit hMRGD^{neg} CHO Flp-InTM-Zellen zeigte sich ebenfalls ein solcher Signalanstieg (Daten nicht gezeigt). Daher wurde dieser Signalanstieg nicht weiter untersucht.

3.3.1 Analyse der antagonistischen Wirkung von THV201 am hMRGD-Rezeptor

Zur Analyse des potentiellen Antagonisten THV201 wurden die Konzentrations-Wirkungskurven von β -Alanin an der kurzen Form des hMRGD-Rezeptors mit und ohne THV201 [10 μ M] verglichen. Analog zu den Vortests zur Suche potentieller Antagonisten (vgl. Kapitel 3.3) wurde ebenfalls das NFAT-Luciferase-Assay zur Untersuchung verwendet. Dabei zeigte die Kurve mit Antagonisten eine signifikante Rechtsverschiebung und dementsprechend einen höheren EC_{50} -Wert von 172 μ M gegenüber der Kurve ohne Antagonisten von 97 μ M (Abb. 11). Der Anstieg der Luciferase-Aktivität ohne THV201 war in höherer β -Alanin-Konzentration von 1 mM gegenüber den Versuchen mit Antagonisten nicht signifikant verschieden. Um die Affinität des Antagonisten am hMRGD-Rezeptor zu schätzen, wurde die scheinbare Affinitätskonstante (scheinbarer pK_B -Wert) rechnerisch mit 4,7 bestimmt.

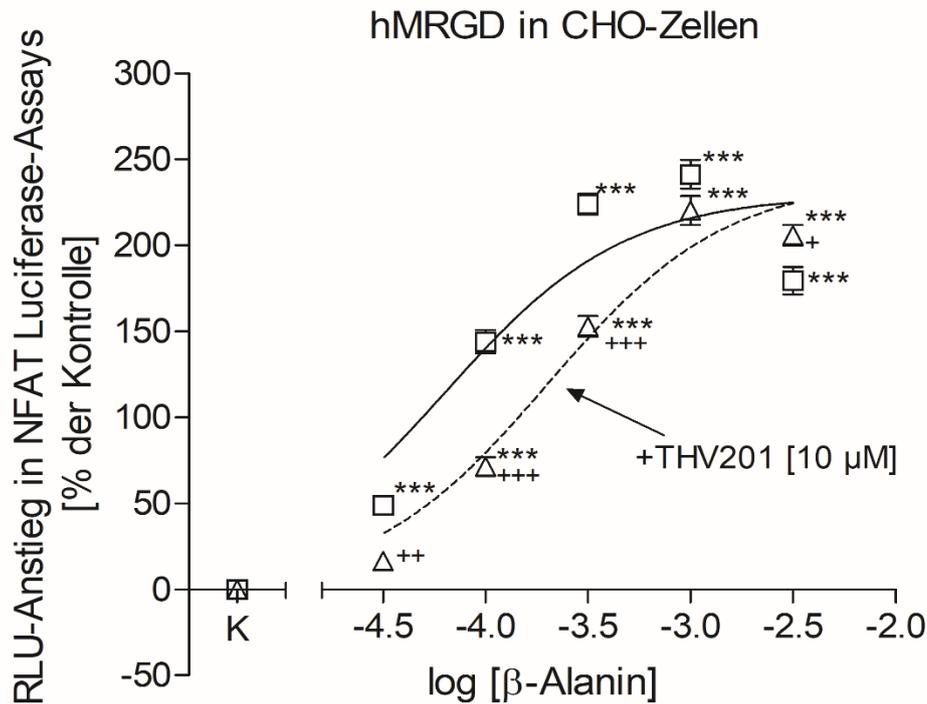


Abb. 11: Analyse des Antagonisten THV201. Es wird der β -Alanin-vermittelte Anstieg der NFAT-abhängigen Luciferase-Aktivität an CHO-Zellen gezeigt, welche stabil die kurze Variante des hMRGD-Rezeptors exprimieren. Die Mittelwerte \pm SEM von 8 Experimenten werden als % von der Kontrolle (K, ohne β -Alanin) angegeben. *** $p < 0,001$ signifikanter Unterschied zur entsprechenden Kontrolle. + $p < 0,05$; ++ $p < 0,01$; +++ $p < 0,001$ signifikanter Unterschied zu den korrespondierenden Werten ohne THV201. Statistische Analyse: ANOVA mit nachfolgendem Bonferroni Post-Test.

3.4 Analyse von Alamandin als Agonist am hMRGD-Rezeptor

Im Jahr 2013 wurde die agonistische Wirkung von Alamandin am hMRGD-Rezeptor entdeckt (Lautner et al., 2013). Da die Interaktion von Alamandin und dem Mrg-Rezeptor D einen großen Einfluss zu haben scheint (vgl. Kapitel 1.3.3.1), sollte als weiteres Ziel dieser Arbeit der zugrundeliegende Wirkmechanismus genauer untersucht werden. Dazu wurde die Aktivierbarkeit des G_q - bzw. G_i -vermittelten Signaltransduktionswegs des hMRGD-Rezeptors an Zellen mit der kurzen Variante durch Alamandin mittels NFAT- und SRE-Luciferase-Assays untersucht.

3.4.1 Analyse von Alamandin mittels NFAT-Luciferase- Assay

Zunächst wurde die Wirkung von Alamandin in verschiedenen Konzentrationen am hMRGD-Rezeptor mittels NFAT-Luciferase-Assay getestet. Dabei zeigten sich keine G_q -vermittelten Anstiege der RLU-Werte. Bezogen auf den Kontrollversuch (Experiment ohne Alamandin) wurden dementsprechend keine signifikanten Unterschiede detektiert (Abb. 12). In einem weiteren Versuchsansatz wurde der Frage nachgegangen, ob sich die zwei Liganden β -Alanin und Alamandin möglicherweise in ihrer Wirkung beeinflussen und so ein Alamandin-vermittelter Effekt am hMRGD-Rezeptor detektiert werden kann. Als Untersuchungsmethode wurde ebenfalls das NFAT-Luciferase-Assay gewählt. In diesen Versuchen zeigte sich bei Zugabe von β -Alanin und Alamandin ein signifikant erhöhter RLU-Anstieg von ca. 190 % gegenüber der Kontrolle. Dieser war allerdings – bezogen auf den Vergleichsversuch mit alleinigem β -Alanin (Signalanstieg von 174 %) – nicht signifikant verschieden (Abb. 13).

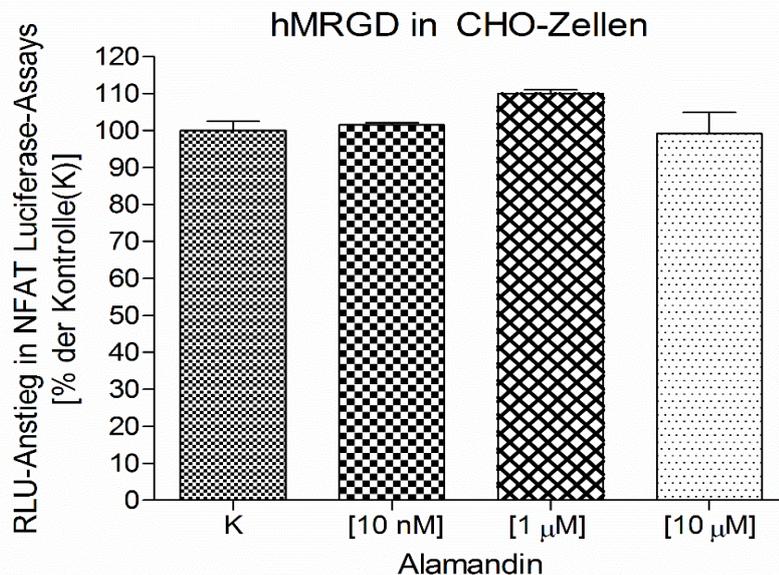


Abb. 12: Alamandin vermittelter Anstieg der NFAT-abhängigen Luciferase-Aktivität an CHO-Zellen, welche stabil die kurze Variante des hMRGD-Rezeptors exprimieren. Die Mittelwerte \pm SEM von 3-18 Experimenten werden als % der Kontrolle (K, ohne Alamandin) angegeben. Statistische Analyse: ANOVA mit nachfolgendem Bonferroni Post-Test.

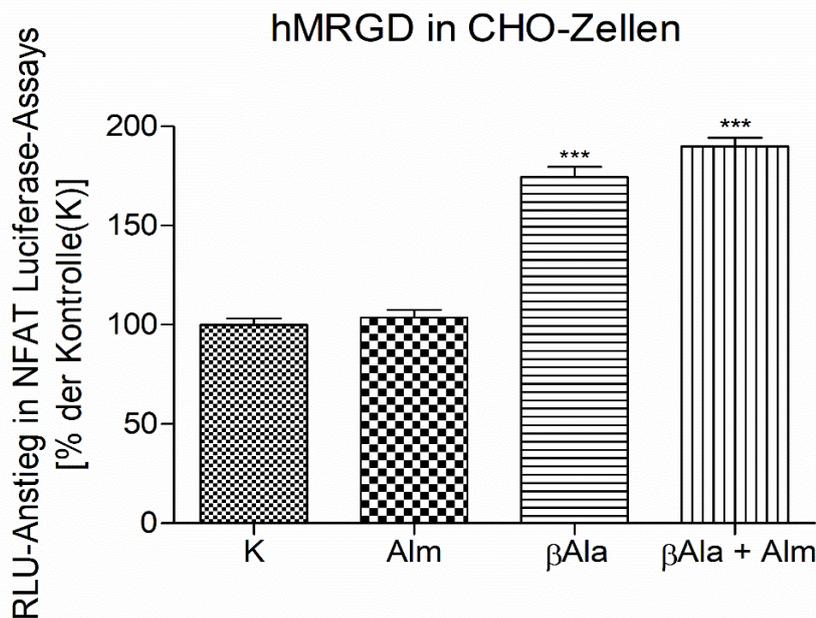


Abb. 13: Alamandin bzw. β -Alanin vermittelter Anstieg der NFAT-abhängigen Luciferase-Aktivität an CHO-Zellen, welche stabil die kurze Variante des hMRGD-Rezeptors exprimieren. Die Mittelwerte \pm SEM von 11-12 Experimenten werden als % der Kontrolle (K, ohne Alamandin oder β -Alanin) angegeben. *** $p < 0,001$ signifikanter Unterschied zur Kontrolle. β Ala: β -Alanin [100 μ M], Alm: Alamandin [10 μ M]. Statistische Analyse: ANOVA mit nachfolgendem Bonferroni Post-Test.

3.4.2 Analyse von Alamandin mittels SRE-Luciferase-Assay

In einer weiterführenden Versuchsreihe wurde überprüft, ob der G_i -gekoppelte Signaltransduktionsweg der kurzen Rezeptorvariante durch Alamandin aktivierbar ist. Dazu wurden hMRGD⁺ CHO-Zellen mittels SRE-Luciferase-Assays untersucht. Die Messung der RLUs konnte in diesen Versuchen ebenfalls mit einem Plattenluminometer vorgenommen werden. Es zeigte sich ein isolierter Alamandin-vermittelter Signalanstieg bei 10 nM. Mit einer Erhöhung der RLU-Werte um ca. 10 % gegenüber der Kontrolle war dieser zwar gering, aber dennoch signifikant verschieden. Die Konzentrations-Wirkungskurve verläuft dabei glockenförmig (Abb. 14).

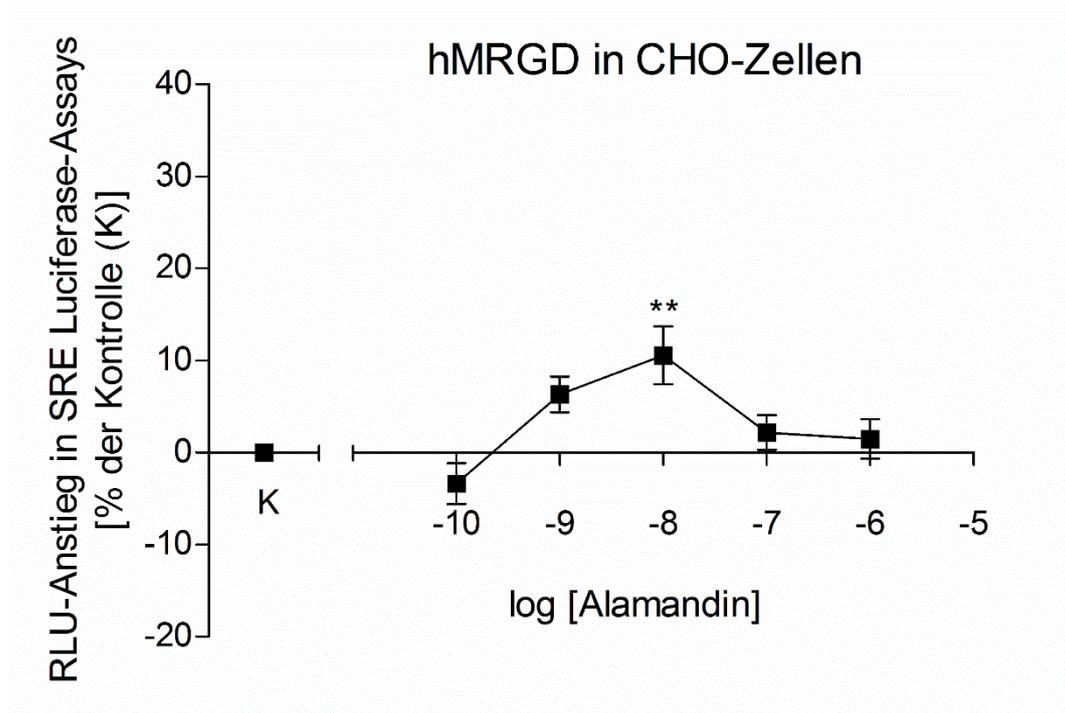


Abb. 14: Alamandin vermittelter Anstieg der SRE-abhängigen Luciferase-Aktivität an CHO-Zellen, welche stabil die kurze Variante des hMRGD-Rezeptors exprimieren. Die Mittelwerte \pm SEM von 13-15 Experimenten werden als % der Kontrolle (K, ohne Alamandin) angegeben. ** $p < 0,01$ signifikanter Unterschied zur Kontrolle. Statistische Analyse: ANOVA mit nachfolgendem Bonferroni Post-Test.

4. Diskussion

4.1 Methodendiskussion

4.1.1 Zielgerichtete Mutagenese

Anhand der zielgerichteten Mutagenese können einzelne Basentriplets eines Gens spezifisch ausgetauscht werden, weshalb die entstandenen DNA-Produkte folglich für ein gewünschtes mutagenes Protein kodieren. Da durch diese Vorgehensweise an nahezu allen Stellen der DNA Mutationen mit hoher Effektivität eingeführt werden können, gilt sie als etablierte Standardmethode der Molekularbiologie und wird von vielen Arbeitsgruppen verwendet (Carter 1986; Hoffmann et al., 2008; Müller, 2014; Reikofski und Tao 1992). Dabei bereiten unter anderem zusätzliche ungewollte Mutationen und die Selektion von reiner mutagener DNA Schwierigkeiten, wobei die Wahl weniger PCR-Zyklen und der anschließende DpnI-Verdau zur Vermeidung dieser beitragen (Weiner et al., 1994). Um der Entstehung ungewollter Mutationen in der vorliegenden Arbeit vorzubeugen, wurden lediglich 18 PCR-Zyklen durchlaufen und eine DNA-Polymerase genutzt, die eine Korrekturlesefunktion enthielt. Da außerdem Mutationen im Ausgangsvektor nicht ausgeschlossen werden konnten, wurde das im pcDNA™3.1D/V5-His TOPO® -Vektor erstellte DNA-Produkt in einen kommerziell erworbenen pcDNA5/FRT-V5-His®-TOPO®-Vektor umkopiert. Diese Maßnahmen konnten die Wahrscheinlichkeit für ungewollt auftretende Mutationen lediglich stark verringern. Den Beweis für das Fehlen solcher unerwünschten Mutationen erbrachte die Sequenzierung der DNA-Produkte. Damit im Anschluss auch nur die erstellten mutagenen DNA-Sequenzen verwendet wurden, wurde mittels DpnI-Verdau der ursprüngliche (methylierte) Matrizenstrang abgebaut. Durch Anwendung dieser Methodik konnten die zu untersuchenden mutagenen Rezeptoren mittels zielgerichteter Mutagenese erfolgreich erstellt werden.

4.1.2 Zellsystem und verwendete Vektoren

Als Zellsystem wurden ausschließlich CHO Flp-In™-Zellen der Firma Invitrogen™ genutzt. Laut Herstellerangaben sind diese zuverlässig dazu geeignet, in kurzer Zeit stabile Zelllinien zu generieren, die das gewünschte Protein exprimieren. Das ausgewählte Zellsystem ermöglicht es, die zu transfizierende Plasmid-DNA an speziellen Stellen durch

die FLP-Rekombinase an einer FRT-Schnittstelle im Genom der Zelle zu integrieren (O’Gorman et al., 1991). Diese Eigenschaften führten zur etablierten Nutzung und weiteren Untersuchung des Flp-In™-Systems in vielen weiteren Studien (Nielsen et al., 2006; Yanagisawa et al., 2002; Yuan et al., 2017). Auch in der vorliegenden Arbeit waren die Zellen vor allem in Kombination mit dem pcDNA5/FRT-V5-His[©]-TOPO[®]-Vektor geeignet, die mutagenen Konstrukte stabil zu exprimieren. Einige Rezeptorvarianten wurden allerdings auch mit dem pcDNA™6.2/C-YFP-GW TOPO[®]-Vektor in Zellen exprimiert, um die Expression durch fluoreszierende Proteine zu beurteilen. Des Weiteren wurde dieser zweite Expressionsvektor ausgewählt, um die Relevanz eines intrazellulär an den Rezeptor gebundenen Proteins auf die Rezeptorfunktion zu überprüfen.

4.1.3 Expressionsanalyse

Die Expressionsanalyse wurde anhand zweier verschiedener Methoden durchgeführt. Zum einen wurde das V5-Epitop, welches durch den pcDNA5/FRT-V5-His[©]-TOPO[®]-Vektor kodiert wurde, mittels FITC-gekoppelter Antikörper der Firma Invitrogen™ markiert. Durch diesen Antikörper konnten bereits in zahlreichen Studien die zu untersuchenden Proteine erfolgreich detektiert werden (Chen et al., 2017; Hoffmann, 2010; Müller, 2014). Diese Methode gilt daher als zuverlässig und etabliert. Somit war es auch in der vorliegenden Arbeit möglich, die mutagenen hMRGD-Rezeptoren durch den Anti-V5-Antikörper zu markieren. Zum anderen wurden Rezeptorvarianten durch intrazellulär gebundene gelb fluoreszierende Proteine optisch sichtbar gemacht. Diese wurden durch den entsprechenden Expressionsvektor pcDNA™6.2/C-YFP-GW TOPO[®] kodiert und konnten daher ohne großen Laboraufwand bereits 24 h nach Transfektion analysiert werden.

Die Auswertung erfolgte anhand der Lichtstärkenmessung ausgewählter Teilbereiche der Plasmamembran. Dadurch konnten die einzelnen z.T. inhomogen exprimierenden Zellen ihrem Anteil nach angemessen berücksichtigt werden. Jedoch kann abschließend nicht garantiert werden, dass das Eingrenzen jener Membranbereiche nicht das Auftreten von Messungenauigkeiten begünstigte. Besonders betroffen wären hiervon Varianten, bei denen durch das starke Signal die Zellmembran nicht sicher abzugrenzen war (Abb. 3, Kapitel 3.3.1).

4.1.4 Funktionelle Versuche

4.1.4.1 [³H]cAMP-Assay

Zur Analyse der Aktivierbarkeit des G_i-gekoppelten Signaltransduktionswegs der verschiedenen hMRGD-Rezeptorvarianten wurden u.a. [³H]cAMP-Assays durchgeführt. Diese Versuche eignen sich zum einen durch ihre gut reproduzierbaren und stabilen Ergebnisse und zum anderen dadurch, dass durch Zugabe von β-Alanin oder HBSS-Puffer keine störenden Signale detektiert werden (Müller, 2014). Mit solchen Assays war häufig – v.a. wegen der Separationsmethoden von proteingebundenem und freiem cAMP – ein relativ gesehen hoher Laboraufwand verbunden. Doch durch die bovine Proteinkinase als cAMP-Bindeprotein wurde das Verfahren leichter nutzbar (Nordstedt und Fredholm 1990). Bei dem verwendeten Radionukleotid Tritium ([³H]) handelt es sich allerdings um einen radioaktiven β-Strahler, weshalb gesonderte Anforderungen an das Labor gelten. Dieser Mehraufwand konnte allerdings durch die relativ geringe Anzahl an Versuchen in dieser Arbeit vernachlässigt werden, sodass das Assay für die durchgeführten Versuche geeignet war.

4.1.4.2 Reporter-gen-Assays

Für den Hauptteil der in der vorliegenden Arbeit durchgeführten Versuche wurden Luciferase-Reporter-gen-Assays (NFAT und SRE) benutzt. Anhand der Expression der ursprünglich aus dem Glühwürmchen stammenden Luciferase konnten sowohl der G_i- als auch der G_q-gekoppelte Signalweg untersucht werden. Diese Methodik zeichnet sich vor allem durch eine gute Sensitivität und einer einfachen bzw. schnellen Detektion der Genprodukte aus. Des Weiteren bietet sie das Potential, die zeitliche und auch räumliche Genexpression innerhalb einer Zelle optisch darzustellen. Daher findet ihre Anwendung weite Verbreitung, besonders als Potenzanalysen und Hochdurchsatzverfahren zur Identifizierung von GPCR-Liganden, die cAMP- oder Ca²⁺-Signalkaskaden aktivieren. Als Nachteil wird hauptsächlich die relative Instabilität der Genprodukte in vivo angeführt (Bornstein et al., 1994; Cheng et al., 2010). Daher wurden die unterschiedlichen Inkubationszeiten nach Möglichkeit kurzgehalten. Da der Ablauf dieser Versuche (SRE und NFAT) nahezu identisch ist, konnten sie parallel angesetzt werden.

An dieser Stelle sei zudem erwähnt, dass es bei der Auswertung der Versuchsdaten, die durch die o.g. Versuche produziert wurden, potentiell zu Fehlern kommen kann. So kann beispielsweise die Abschätzung von EC_{50} - bzw. IC_{50} -Werten z.T. fehlerhaft sein, wenn ein maximaler Anstieg der RLU-Werte im NFAT-Luciferase-Assay bzw. eine maximale Inhibition des cAMP-Anstiegs nicht sicher beobachtet werden konnte. Dies ist z.B. bei der Rezeptorvariante Y6.54A im [3H]cAMP-Test der Fall (Abb.8), hier wurde die maximal beobachtete Inhibition des cAMP-Anstiegs als die tatsächliche maximale Inhibition angenommen, um die halbmaximale Hemmkonzentration (IC_{50} -Wert) abschätzen zu können.

4.2 Charakterisierung der modifizierten Startsequenzen des hMRGD-Rezeptors

Der hMRGD-Rezeptor lässt in seiner Genbanksequenz zwei verschiedene Startkodons erkennen, wobei noch ungeklärt bleibt, welches in vivo für die Synthese des Proteins genutzt wird. Wird für die Rezeptorexpression das erste Startkodon genutzt, so enthält der hMRGD-Rezeptor einen N-Terminus, wohingegen bei Nutzung des zweiten Startkodons ein Rezeptor mit deletiertem N-Terminus entsteht (Müller, 2014). Da allerdings für Mrg-Rezeptoren durch Dong et al. (2001) kurze N-Termini von lediglich 3-21 Aminosäuren bekannt sind, ist es von Interesse, ob die Beschaffenheit des N-Terminus für die Funktion und Expression des hMRGD-Rezeptors von Bedeutung ist. Dazu wurden die drei verschiedenen Rezeptorvarianten (mit kurzem, modifiziertem und langem N-Terminus) mit einem intrazellulär gebundenem YFP optisch markiert und mittels [3H]cAMP-Assay untersucht. Die Daten zeigen mit β -Alanin als Agonisten eine vorhandene Rezeptorfunktion für die kurze Variante, nicht aber für die lange oder modifizierte Variante. Zwar konnten bei Letzteren einzelne isolierte und gegenüber der Kontrolle signifikant erniedrigte cAMP-Konzentrationen detektiert werden, jedoch wurde keine konzentrationsabhängige cAMP-Verringerung beobachtet. Daher scheint die Funktion der langen und modifizierten Rezeptorvariante erloschen oder zumindest massiv eingeschränkt zu sein (Abb. 5, Kapitel 3.1.2). Für Alamandin als Agonisten könnte dies nichtzutreffend sein, da die Versuchsbedingungen für β -Alanin optimiert wurden. Des Weiteren fällt eine große interindividuelle Inhomogenität der membranären Expressionsstärke der Rezeptoren mit langem und modifiziertem N-Terminus auf (Abb.

3, Kapitel 3.1.1). Hierbei konnten in einzelnen Zellen deutlich höhere Expressionslevel als bei der kurzen Rezeptorform registriert werden. Dies legt nahe, dass die N-terminal modifizierte und die lange Rezeptorvariante z. T. überexprimiert wurden, was potentiell zum Funktionsverlust des Rezeptors führen könnte. Für weitere Versuche wurde die Variante mit kurzem N-Terminus verwendet.

An allen drei Konstrukten war ein C-terminales YFP gekoppelt. Dieser Umstand kann ebenfalls potentiell die Funktionalität von Rezeptoren beeinflussen. Vergleicht man allerdings die Ergebnisse der [³H]cAMP-Assays beider kurzen Rezeptorvarianten (mit und ohne gekoppeltem YFP), so zeigt sich, dass die IC₅₀-Werte und die maximale Inhibition der cAMP-Akkumulation sich im F-Test nicht signifikant voneinander unterscheiden (p-Wert von 0,44; zum Vergleich: maximale Inhibition ca. 50 % (ohne YFP) und ca. 54 % (mit YFP), IC₅₀-Wert: 63 µM (ohne YFP) und 47 µM (mit YFP), vgl. Kapitel 3.1.2 und 3.2.2). Somit scheint das intrazellulär gekoppelte YFP keinen Einfluss auf die Rezeptorfunktion auszuüben. Weitere Untersuchungen am hMRGD-Rezeptor könnten daher zukünftig mit gekoppeltem YFP durchgeführt werden. So würde die Expressionsanalyse entsprechender Konstrukte vereinfacht werden.

4.3 Charakterisierung der mutagenen kurzen Rezeptoren

4.3.1 Expressionsanalyse der mutagenen kurzen Rezeptoren

Die Expression von Rezeptoren und deren Funktion kann u.a. von Mutationen im Rezeptor-kodierenden Genabschnitt abhängig sein (Bogatcheva et al., 2007; Chakraborty et al., 2012). Speziell für den hMRGD-Rezeptor zeigte Müller (2014), dass der Austausch des Tryptophans gegen Valin in Position 6.55 zur signifikant reduzierten Expression und damit auch zur fehlenden Funktion des mutagenen Rezeptors führt. Daher wurde im Rahmen der funktionellen Untersuchung der Rezeptorvarianten zunächst eine quantitative Expressionsanalyse durchgeführt. Dafür wurden die hMRGD-Rezeptoren durch spezifisch am V5-Epitop bindende FITC-gekoppelte Antikörper markiert. Hierbei zeigten sich keine signifikanten Unterschiede zwischen den verschiedenen mutagenen Rezeptoren und der kurzen Form des Rezeptors (vgl. Kapitel 3.2.1, Abb.6). Im Gegensatz zu den Rezeptorvarianten mit modifizierten oder langen N-Termini, welche durch ein YFP

markiert wurden, zeigten die mutagenen kurzen Rezeptorvarianten eine homogenere Rezeptorexpression. Folglich kann eine fehlende, abgeschwächte oder gesteigerte Rezeptoraktivierung in den [³H]cAMP- und NFAT-Luciferase-Assays nicht durch ein verändertes Expressionslevel erklärt werden.

4.3.2 Funktionsanalyse der mutagenen kurzen Rezeptoren

Anhand von Mutagenesestudien können gezielt einzelne Aminosäuren auf ihre Relevanz für Rezeptoren hin analysiert werden (Hoffmann et al., 2008; Zhang et al., 2015). Anhand dieses Standardverfahrens ist es z.B. möglich, die in der Einleitung erwähnten Aminosäuren, welche laut Venkatakrisnan et al. (2013) in vielen GPCR's für eine Interaktion mit ihren Agonisten in Frage kommen, näher zu untersuchen (Abb. 1). Für den hMRGD-Rezeptor zeigte bereits Müller (2014) mittels Mutagenesestudien den fehlenden Einfluss des Lysins 3.29 auf die Rezeptorexpression und –funktion, wobei der Austausch der Glutaminsäure 3.26, des Tryptophans 6.55 und des Arginins 7.39 zur jeweils signifikant schlechteren Rezeptoraktivierung führte. Einzig der Ersatz des Serins 6.52 gegen Alanin konnte die Rezeptorfunktion steigern. Damit konnten die genannten Aminosäuren mit Ausnahme von Lysin 3.29 als solche identifiziert werden, die wahrscheinlich mit dem Agonisten β -Alanin interagieren. Den in dieser Arbeit untersuchten Aminosäuren konnten ebenso relevante Einflüsse für die Funktionalität des Rezeptors nachgewiesen werden.

4.3.2.1 Die Bedeutung des Arginins 3.30 im hMRGD-Rezeptor

Der Austausch des Arginins in Position 3.30 gegen Alanin führt zum völligen Erliegen der Rezeptorfunktion in [³H]cAMP-Assays, da keine Verringerung der Forskolin-induzierten cAMP-Akkumulation durch Stimulation mit β -Alanin beobachtet werden konnte. Auch in NFAT-Luciferase-Assays wurde sogar bei hohen Konzentrationen des Agonisten von 3 mM keine Rezeptorfunktion registriert. So konnte der vollständige G_i- bzw. G_q-vermittelte Funktionsverlust des Rezeptors aufgezeigt werden (Abb. 8 und 9). Damit scheint das Arginin 3.30 eine wesentliche Rolle in der Bindung zwischen Rezeptor und Agonist zu spielen. Denkbar ist eine Interaktion zwischen der basischen Guanidinogruppe

des Arginins und der Carboxyl- oder Aminogruppe des β -Alanins. Diese Untersuchung stellt eine neue Erkenntnis für den hMRGD-Rezeptor dar.

4.3.2.2 Die Bedeutung der Tyrosine 3.33, 3.36 und 6.59 im hMRGD-Rezeptor

Mutagene hMRGD-Rezeptoren, die in den Positionen 3.33 oder 3.36 statt eines Tyrosins ein Alanin besitzen, zeigen einen signifikant verringerten Maximaleffekt. Gleichzeitig geht aus den deutlich erhöhten EC_{50} -Werten gegenüber der Kontrolle in NFAT-Luciferase-Assays eine Rechtsverschiebung der jeweiligen Konzentrations-Wirkungs-Kurve hervor. Dieses Ergebnis deutet auf eine stark verringerte Affinität des Rezeptors zum β -Alanin hin. In [3H]cAMP-Assays konnte den o.g. mutagenen Varianten keine bzw. nahezu keine Restfunktion nachgewiesen werden. Damit bestätigen sich auch erstmalig für den hMRGD-Rezeptor die Positionen 3.33 und 3.36, die bereits für viele GPCR's als Kontaktstellen zwischen Rezeptoren und Ligand detektiert wurden, als sehr wahrscheinliche Interaktionsstellen des Rezeptors mit dem Agonisten β -Alanin (Venkatakrishnan et al., 2013).

Einen nahezu identischen Einfluss auf die Rezeptorfunktion – wie die beiden zuletzt genannten Aminosäuren – zeigt das aromatische Tyrosin der Transmembranregion 6 in Position 6.59. Bei dieser Variante führt der Austausch gegen Alanin ebenfalls zur signifikanten Abschwächung der maximalen Rezeptorfunktion bei ähnlich herabgesetzter Aktivierbarkeit (Abb. 9). Demnach ist für Tyr6.59 in gleicher Weise eine Rolle bei der Interaktion mit dem Liganden oder eine Rolle bei der Rezeptoraktivierung anzunehmen.

4.3.2.3 Die Bedeutung des Tyrosins 6.54 im hMRGD-Rezeptor

Y6.54A-mutierte hMRGD-Rezeptoren zeigen sowohl in [3H]cAMP- als auch in NFAT-Luciferase-Assays eine Rechtsverschiebung der Konzentrations-Wirkungs-Kurve. Der Funktionsverlust ist im Vergleich zu den anderen Tyrosinen 3.33, 3.36 und 6.59 jedoch deutlich geringer. Für diese Variante konnte bei hohen Konzentrationen von 2 bzw. 3 mM eine gleiche maximale Hemmung wie der kurzen Rezeptorform nachgewiesen werden. Möglicherweise hat Tyr6.54 lediglich eine schwach stabilisierende Wirkung auf β -Alanin. Das könnte erklären, weshalb der Wegfall der aromatischen Seitenkette nur zur

Affinitätsabnahme des hMRGD-Rezeptors zum β -Alanin, nicht aber zu Funktionseinbußen bei maximaler Aktivierung führt. Auch erklärbar wäre damit, weshalb Y6.54 nur in der Gensequenz des Menschen und des Rhesusaffen vorkommt. In der Sequenz des Wolfs, der Ratte und der Maus wurde sie allerdings im Laufe der Evolution durch Asparagin, einer anderen polaren Aminosäure, ersetzt.

Bei allen Konstrukten, in denen Tyrosin durch Alanin ersetzt wurde, ist eine hydrophobe Wechselwirkung des aromatischen Kohlenstoffrings mit dem C3-Gerüst des β -Alanins denkbar. Doch auch die phenolische OH-Gruppe des Tyrosins kann möglicherweise mit der Carboxyl- oder Aminogruppe des β -Alanins interagieren.

4.3.3 Einschränkung der Aussagekraft der vorliegenden Mutagenesestudien

Anhand der durchgeführten Mutagenesestudien kann nicht ausgeschlossen werden, dass die genannten Mutationen zu veränderten Konformationen des hMRGD-Rezeptors führen, welche die Interaktion mit β -Alanin oder das Aktivieren nachgeschalteter Signaltransduktionswege erschwert. Beweisen ließe sich eine Interaktion des β -Alanins mit der jeweiligen Aminosäure durch Bindungsstudien, welche aufgrund der niedrigen Affinität des β -Alanins zum Rezeptor nur schwer realisierbar sind, oder durch Kristallstrukturanalysen des Rezeptors mit gebundenem β -Alanin. Letztere konnten bereits an anderen Rezeptoren durchgeführt werden, wie beispielsweise am P2Y₁₂-Rezeptor, welcher in Bezug auf die Mrg-Rezeptor-Familie als strukturell verwandt gilt (Fredriksson et al., 2003, Zhang et al., 2014 a; Zhang et al., 2014 b). Durch diese Kristallstrukturanalysen konnte u.a. nachgewiesen werden, dass die Aminosäuren Arginin 256 (R6.55), Tyrosin 259 (Y6.58) sowie Lysin 280 (K7.35) des P2Y₁₂-Rezeptors an der Bildung einer hydrophoben Ligandenbindungstasche und an der Koordination von Phosphatgruppen des Liganden beteiligt sind (Zhang et al., 2014 a; Zhang et al., 2014 b). Einige Jahre zuvor konnten anhand von Mutagenesestudien bereits vereinzelte Aminosäuren identifiziert werden, die zur Ligandenbindung von Agonisten sowie Antagonisten beitragen. Dazu gehören beispielsweise die drei o.g. Aminosäuren Arginin, Tyrosin sowie Lysin (Hoffmann et al., 2008, Hoffmann, 2010). Aus diesem Verlauf ist zu erkennen, dass sich Mutagenesestudien durchaus gut dazu eignen können,

entscheidende Aminosäuren für die Ligandenbindung von Rezeptoren präzise zu identifizieren.

4.4 Analyse potentieller Antagonisten

Die von Frau Prof. Dr. C. E. Müller aus dem Institut für pharmazeutische Chemie der Universität Bonn zur Verfügung gestellten Substanzen THV201, -202, -203, -204, -211 und -213 besitzen strukturelle Ähnlichkeiten zu Chlorpromazin und Thioridazin. Für Chlorpromazin bzw. Thioridazin wurde bereits ein antagonistischer Effekt am hMRGD-Rezeptor beschrieben (Ajit et al., 2010). Später wurden die scheinbaren pK_B -Werte von 5,1 (Chlorpromazin [10 μ M]) und 5,2 (Thioridazin [10 μ M]) bestimmt, wodurch sie als schwach potente Antagonisten charakterisiert werden konnten (Müller, 2014). Mittels NFAT-Luciferase-Assay an hMRGD⁺ CHO Fln-InTM-Zellen konnten die o.g. Substanzen auf ihre antagonistische Wirkung getestet werden, wobei der bekannte Antagonist Chlorpromazin als Abschätzhilfe mit untersucht wurde. In dieser Versuchsreihe zeigte sich lediglich ein signifikanter antagonistischer Effekt von THV201, der in etwa der Hemmstärke von Chlorpromazin entsprach. Die anderen strukturverwandten Stoffe führten zu keiner antagonistischen Wirkung. Auffällig war in diesen Versuchen der signifikante Signalanstieg durch THV211, weshalb initial ein agonistischer Effekt vermutet wurde, der die β -Alanin-vermittelte Wirkung noch verstärkt. Dies wurde allerdings in Kontrollversuchen mit hMRGD^{neg} CHO-Zellen widerlegt, da auch in diesen ein signifikanter THV211-vermittelter Signalanstieg zu beobachten war. Daher wird vermutet, dass THV211 an einem anderen auf CHO-Zellen exprimierten G_q-gekoppelten Rezeptor stimulierend wirkt.

4.4.1 Analyse der antagonistischen Wirkung von THV 201

Da für THV201 in den Vorversuchen eine antagonistische Wirkung am hMRGD-Rezeptor gezeigt werden konnte, wurde weiterführend der Effekt von THV201 [10 μ M] auf die β -Alanin-vermittelte Konzentrations-Wirkungskurve untersucht. Dabei konnte mittels NFAT-Luciferase-Assays eine annähernd parallele Rechtsverschiebung der Konzentrations-Wirkungskurve aufgezeigt werden. Der maximale rezeptorvermittelte Effekt durch β -

Alanin [1 μM] unterschied sich dabei gegenüber Versuchen ohne THV201 nicht (Abb. 11, Kapitel 3.3.1). Daher wird für THV201 ein kompetitiver Antagonismus angenommen, aufgrund dessen die scheinbare Affinitätskonstante – der pK_B -Wert – von 4,7 berechnet werden konnte. Ein kompetitiver Antagonismus gilt anhand dieser Annahmen allerdings nicht als bewiesen, sondern lediglich als wahrscheinlich. Der Beweis ließe sich mittels Schild-Plot-Analyse erbringen.

4.5 Analyse von Alamandin als Agonist

Im Jahr 2013 wurde mit Alamandin ein Heptapeptid als möglicher endogener Ligand am MrgD-Rezeptor entdeckt (Lautner et al., 2013). Im Laufe der letzten Jahre konnte diese neu beschriebene Alamandin-MrgD-Kaskade mit einer Vielzahl an (patho-) physiologischen Prozessen in Verbindung gebracht werden. Folglich erlangte sie seit seiner Entdeckung stetig an Bedeutung (vgl. Kapitel 1.3.4). Seit 2004 ist für den MrgD-Rezeptor mit β -Alanin als Agonisten eine G_i - bzw. G_q -Kopplung bekannt (Shinohara et al., 2004). Da laut Urban et al. (2007) generell viele Liganden in der Lage sind, jeweils unterschiedliche Signalkaskaden am selben Rezeptors zu aktivieren, sollte nun analysiert werden, ob sich analog zum β -Alanin ebenfalls eine G_q - bzw. G_i -Kopplung durch Stimulation mit Alamandin beobachten lässt. Dazu wurden NFAT- (G_q) und SRE- (G_i) Luciferase-Assays durchgeführt.

4.5.1 Analyse der G_q -Aktivierbarkeit durch Alamandin

Die Ergebnisse zeigen, dass die Stimulation des kurzen hMRGD-Rezeptors mit Alamandin [10 nM, 1 μM und 10 μM] gegenüber der Kontrolle nicht zu erhöhten Signalwerten in NFAT-Luciferase-Assays führt. Die G_q -gekoppelte Signalkaskade des Rezeptors scheint damit durch Alamandin alleine nicht aktivierbar zu sein (Abb.12). Zuvor zeigten Lautner et al. (2013) für Alamandin einen MrgD-vermittelten vasodilatatorischen Effekt am Aortenring von Mäusen, wohingegen β -Alanin nicht zur Vasodilatation führte. Auffällig war hierbei, dass die Alamandin-vermittelte Vasodilatation durch Vorinkubation mit β -Alanin aufgehoben wurde. Daher wurde im Anschluss an die vorherigen Versuche nun untersucht, ob sich die beiden Liganden β -Alanin und Alamandin in ihrer Wirkung

gegenseitig beeinflussen. In der entsprechenden Versuchsreihe führte die Hinzugabe beider Liganden (β -Alanin und Alamandin) nicht zu signifikant höheren RLU-Werten, als bei der alleinigen Zugabe von β -Alanin (Abb.13). Eine gegenseitige Beeinflussung der beiden Liganden im Rahmen einer allosterischen Modulation oder einer Konkurrenz um die Ligandenbindungstasche konnte somit nicht detektiert werden. Zudem wurde anhand der Untersuchungsreihe gezeigt, dass Alamandin die Interaktion zwischen β -Alanin und dem G_q -gekoppelten Signalweg des hMRGD-Rezeptors nicht beeinflusst. Da Alamandin alleine in den hier vorgestellten Versuchen nicht zur G_q -Aktivierung führt und die zusätzliche Exposition mit Alamandin den β -Alanin-vermittelten Effekt nicht abschwächt, kann man vermuten, dass Alamandin und β -Alanin an unterschiedlichen Stellen des hMRGD-Rezeptors binden. Beweisen ließe sich eine solche Vermutung anhand von Analysen ligandengebundener Kristallstrukturen des hMRGD-Rezeptors oder mit Mutagenese-Versuchen.

4.5.2 Analyse der G_i -Aktivierbarkeit durch Alamandin

Zur Analyse der G_i -gekoppelten Aktivierbarkeit des hMRGD-Rezeptors durch Alamandin wurden SRE-Luciferase-Assays durchgeführt. In Abb. 2 (Kapitel 2.6) wird der zugrundeliegende Signaltransduktionsweg dargestellt. In diesen Untersuchungen konnte ein isolierter Signalanstieg bei 10 nM beobachtet werden, welcher gegenüber des Kontrollversuchs mit 10 % signifikant erhöht war. Dadurch wurde die Aktivierbarkeit der G_i -Kopplung durch Alamandin demonstriert, welche jedoch nur gering ausgeprägt war (Abb. 14, Kapitel 3.4.2). Tetzner et al. (2018) zeigten durch cAMP-Messungen, dass Alamandin ebenfalls den G_s -vermittelten Signalweg stimulieren kann, wobei es dabei zur gleichzeitigen Aktivierung der G_i -vermittelten Hemmung der Adenylatzyklase kam. Diesen Umstand wiesen sie indirekt nach, indem sie den G_i -Signalweg selektiv durch PTX ausschalteten (Tetzner et al., 2018). In der vorliegenden Arbeit konnte der zuvor indirekt nachgewiesene G_i -Effekt durch direkte Versuche mittels SRE-Luciferase-Assays bestätigt werden. Eine Beurteilung der Co-Aktivierung des G_s -vermittelten Signaltransduktionsweg konnte hierbei jedoch nicht vorgenommen werden.

Bei diesen Versuchen fiel ein Signalanstieg auf, der an eine Glockenform denken lässt. Allerdings zeigte sich -wie oben bereits erwähnt – nur ein isolierter Wert (bei 10 nM)

signifikant erhöht. Bei den cAMP-Messungen der Arbeitsgruppe um Tetzner et al. (2018) konnte ebenfalls eine Glockenform beobachtet werden, wobei deren Maxima je nach Zellart mit 10 pM – 1 nM bei deutlich niedrigeren Alamandin-Konzentrationen lagen. Sollte sich in weiteren Versuchen mit Alamandin die vermutete glockenförmige Konzentrations-Wirkungskurve bestätigen, so stünde diese im Kontrast zu den zuvor erhobenen Daten des β -Alanins, da hierbei ein sigmoidaler Kurvenverlauf beobachtet wurde.

4.6 Ausblick

Im Rahmen dieser Arbeit wurde durch Analyse der bestehenden Literatur zum MrgD-Rezeptor aufgezeigt, dass der im Jahr 2001 entdeckte Rezeptor für eine Vielzahl an (patho-) physiologischen Prozesse mitverantwortlich gemacht werden kann. Wegen der stetig zunehmenden Wichtigkeit, die dem hMRGD-Rezeptor beigemessen wird, wurde als Ziel definiert, den Rezeptor näher zu charakterisieren. Die in der vorliegenden Arbeit erhobenen Daten konnten einen Beitrag zum besseren Verständnis des Rezeptors leisten und neue Fragestellungen für die weiterführende Charakterisierung aufzeigen, die in den folgenden Abschnitten dargestellt werden.

Für ein genaueres Verständnis wäre es wichtig, den Alamandin- und β -Alanin-vermittelten Wirkmechanismus besser zu verstehen. Anhand weiterer Mutagenesestudien sollte die Bindung beider Liganden präziser untersucht werden. Zudem sollte untersucht werden, ob Alamandin und β -Alanin – wie in Kapitel 4.5.1 bereits vermutet – an verschiedenen Bindungstaschen binden. Konkret könnten dafür beispielsweise die in dieser Arbeit erstellten mutagenen Konstrukte hMRGD_R3.30A, _Y3.33A oder _Y3.36A genutzt werden. Diese Punktmutationen führten zum Verlust bzw. zur starken Einschränkung der Rezeptorfunktion, weshalb die entsprechenden Aminosäuren sehr wahrscheinlich an der Bindung des β -Alanins beteiligt sind. Sollten Versuche mit Alamandin für diese Konstrukte eine normale Rezeptorfunktion aufzeigen, wäre das ein weiterer starker Hinweis für die Bindung an einer anderen Bindungsstelle. Für diese Fragestellung wäre die Analyse ligandengebundener Kristallstrukturen des Rezeptors optimal geeignet. Leider ist die Untersuchung der Ligandenbindung durch Erstellen von Rezeptorkristallen äußerst

komplex und häufig schwer zu realisieren. Daher können die o.g. weiterführenden Untersuchungen vorrangig mittels Mutagenesestudien durchgeführt werden.

Ein weiterer wichtiger Punkt für zukünftige Studien besteht in der Beantwortung der Frage, inwiefern sich die einzelnen am hMRGD-Rezeptor wirkenden Substanzen gegenseitig beeinflussen. So beschrieben Lautner et al. (2013) bereits eine Wechselwirkung von Alamandin und β -Alanin am murinen Aortenring. Da diese beiden als endogen vermuteten Liganden im menschlichen Organismus zirkulieren, könnten durch die o.g. Versuche Rückschlüsse auf deren gegenseitige Wechselwirkung in vivo gezogen werden. In der vorliegenden Arbeit wurde bereits gezeigt, dass Alamandin die Interaktion zwischen β -Alanin und dem G_q -gekoppelten Signalweg des hMRGD-Rezeptors nicht beeinflusst (vgl. Kapitel 4.5.1). In weiteren Versuchen sollte daher untersucht werden, wie sich die gleichzeitige Exposition beider Liganden auf andere Signalkaskaden (z.B. G_i und G_s) des hMRGD-Rezeptors auswirkt.

Die Suche nach neuen Antagonisten war mit der Identifikation des Stoffes THV201, als schwach potenter Antagonist, erfolgreich. Weiterführend sollte allerdings nach potenteren Antagonisten und weiteren Agonisten geforscht werden, um wirksame Modulatoren am hMRGD-Rezeptor zu generieren. Der MrgD-Rezeptor wurde bereits mit vielen (patho-)physiologischen Prozessen in Zusammenhang gebracht, wie etwa der Blutdruckregulation, kardioprotektiven Effekten, der Entstehung von Lungentumoren und der Empfindung von Schmerzen (vgl. Kapitel 1.3.4). Daher wäre es denkbar, dass der hMRGD-Rezeptor in Zukunft zur Regulation der o.g. Prozesse als Zielstruktur für potente Agonisten und Antagonisten dient.

5. Zusammenfassung

In dieser Arbeit wurde der humane MRGD-Rezeptor näher charakterisiert. Dabei wurden als Ziele die Analyse der Expression, der Relevanz einzelner Aminosäuren für die Rezeptoraktivierung, die nähere Charakterisierung der Wirkung des Alamandins und das Auffinden neuer Antagonisten definiert. Dazu wurden CHO-Zellen mit verschiedenen Varianten des hMRGD-Rezeptors transfiziert und anhand von etablierten Untersuchungsmethoden analysiert. Die gewonnenen Daten konnten einen Beitrag zum besseren Verständnis dieses Rezeptors leisten und werfen gleichzeitig neue Fragestellungen auf (vgl. Kapitel 4.6). Zum Abschluss dieser Arbeit werden in den folgenden Abschnitten die Kernaussagen und -thesen zusammenfassend dargestellt.

Die Expression der hMRGD-Konstrukte konnte mittels Laser-Scanning-Mikroskop und Analyse von Teilbereichen der Zellmembran untersucht werden. Die modifizierten YFP-Varianten des hMRGD-Rezeptors wiesen ein inhomogenes Expressionsmuster auf. Die kurze Rezeptorvariante (mit YFP) hingegen wurde homogener exprimiert und wies eine deutliche Rezeptorfunktion auf. Bei den punktmutierten kurzen Rezeptorvarianten zeigte sich eine gleichmäßige Expression aller Konstrukte, weshalb eine veränderte Rezeptorfunktion aufgrund eines abweichenden Expressionsniveaus ausgeschlossen werden konnte. Weitere Versuche wurden daher mit der kurzen Variante durchgeführt.

Die Relevanz spezifisch ausgewählter Aminosäuren für die Rezeptor-Liganden-Interaktion wurde an punktmutierten kurzen Rezeptorvarianten analysiert. Durch diese Mutagenesestudien konnte gezeigt werden, dass die Mutation R3.30A (Ballesteros-Weinstein-Nomenklatur) zum Erliegen der Rezeptorfunktion führt und somit das Arginin in Position 3.30 eine wichtige Rolle in der Ligandeninteraktion und der Rezeptoraktivierung spielt. Als ebenso wahrscheinlich beteiligte Aminosäuren wurden Y3.33, Y3.36 und Y6.59 identifiziert, da die Rezeptorfunktion durch Mutation des Rezeptors an diesen Positionen massiv eingeschränkt oder sogar erloschen war. Daher scheinen sie einen erheblichen Einfluss auf die Affinität des hMRGD-Rezeptors zum β -Alanin zu besitzen. Das Konstrukt Y6.54A hingegen zeigte eine erhaltene Rezeptorfunktion mit einer Rechtsverschiebung der Konzentrations-Bindungs-Kurve.

Folglich besteht die Vermutung, dass das Tyrosin in Position 6.54 für die Bindung zum β -Alanin lediglich einen schwach stabilisierenden Charakter hat. Diese Erkenntnisse zur wahrscheinlichen Beteiligung der Aminosäuren R3.30, Y3.33, Y3.36, Y6.54 und Y6.59 an der Ligandenbindung stellen neues molekularpharmakologisches Wissen zum hMRGD-Rezeptor dar und könnten z.B. zukünftige Modellrechnungen ermöglichen.

Zur Identifizierung des neuen Antagonisten am hMRGD-Rezeptor THV201, welcher ein Strukturanalogon von Chlorpromazin ist, wurden an der kurzen Rezeptorvariante Versuche mit und ohne Zugabe von THV201 [10 μ M] durchgeführt. Dabei zeigte sich in der Konzentrations-Wirkungs-Analyse eine Rechtsverschiebung der Kurve mit THV201 bei erhaltener maximaler Rezeptorfunktion. Mit einer berechneten scheinbaren Affinitätskonstante von 4,7 konnte THV201 als schwach potenter Antagonist charakterisiert werden. Somit steht ein neuer modulatorisch wirkender Stoff am hMRGD-Rezeptor für die experimentelle oder möglicherweise therapeutische Nutzung zur Verfügung.

Für die nähere Beschreibung der Wirkung des Alamandins am hMRGD-Rezeptor wurde der G_q - bzw. G_i -gekoppelte Signaltransduktionsweg analysiert. Hierbei konnte der G_i -gekoppelte Signalweg durch Alamandin isoliert aktiviert werden, wobei eine glockenförmige Konzentrations-Wirkungskurve beobachtet wurde. Weiterführend zeigten die Versuche, dass Alamandin den G_q -gekoppelten Signalweg nicht aktiviert. Daher wird vermutet, dass Alamandin und β -Alanin an unterschiedlichen Stellen am Rezeptor binden. Für ein besseres Verständnis der Wechselwirkung von Alamandin und β -Alanin am hMRGD-Rezeptor wird es von großer Relevanz sein, weiterführend die aufgestellte Vermutung zu prüfen, ob Alamandin und β -Alanin am hMRGD-Rezeptor tatsächlich an unterschiedlichen Bindungstaschen binden.

6. Abbildungsverzeichnis

Abb. 1: Schematischer Aufbau des hMRGD-Rezeptors.....	26
Abb. 2: Schematische Darstellung der G _i -gekoppelten Singalkaskade (A) bzw. der G _q -gekoppelten Signalkaskade (B) des hMRGD-Rezeptors..	39
Abb. 3: Expression von Varianten des hMRGD-Rezeptors mit intrazellulär gekoppeltem YFP in CHO Zellen.....	45
Abb. 4: Expression von YFP-Varianten des hMRGD-Rezeptors verglichen mit Zellen ohne hMRGD-Rezeptor (hMRGD ^{neg}).	45
Abb. 5: β-Alanin vermittelte Inhibition der Forskolin-induzierten cAMP-Akkumulation von YFP-Varianten des hMRGD-Rezeptors.	47
Abb. 6: Expression von Varianten des hMRGD-Rezeptors verglichen mit Zellen ohne hMRGD-Rezeptor (hMRGD ^{neg}).	48
Abb. 7: Expressionsverhalten von punktmutierten Varianten des hMRGD-Rezeptors in CHO Zellen.	49
Abb. 8: β-Alanin vermittelte Inhibition der cAMP-Akkumulation in punktmutierten Varianten des hMRGD-Rezeptors.....	50
Abb. 9: β-Alanin vermittelter Anstieg der NFAT-abhängigen Luciferase-Aktivität in punktmutierten Varianten des hMRGD-Rezeptors.	51
Abb. 10: Analyse potentieller Antagonisten.....	53
Abb. 11: Analyse des Antagonisten THV201.	55
Abb. 12: Alamandin vermittelter Anstieg der NFAT-abhängigen Luciferase-Aktivität an CHO-Zellen, welche stabil die kurze Variante des hMRGD-Rezeptors exprimieren.	56
Abb. 13: Alamandin bzw. β-Alanin vermittelter Anstieg der NFAT-abhängigen Luciferase-Aktivität an CHO-Zellen, welche stabil die kurze Variante des hMRGD-Rezeptors exprimieren.	57
Abb. 14: Alamandin vermittelter Anstieg der SRE-abhängigen Luciferase-Aktivität an CHO-Zellen, welche stabil die kurze Variante des hMRGD-Rezeptors exprimieren.	58

7. Tabellenverzeichnis

Tab. 1: Konservierungsgrad einzelner Aminosäuren im MrgD-Rezeptor an Positionen, die in dieser Arbeit untersucht wurden (Müller 2014).....	26
Tab. 2: Testsubstanzen und Lösungsmittel, die in funktionellen Versuchen verwendet wurden.	28

8. Anhang

8.1 Stoffe und Materialien

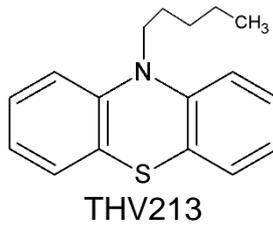
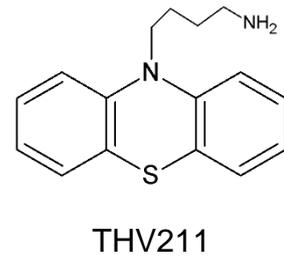
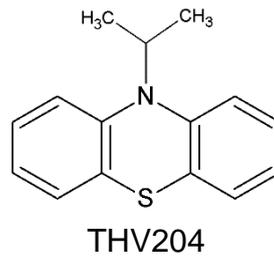
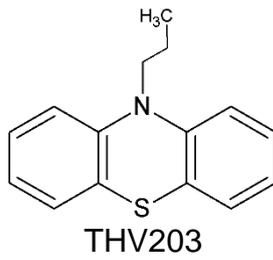
[³ H]-cAMP	TRK432; Amersham Bioscience,
100 bp DNA Ladder	15628019; Invitrogen™
1 Kb Plus Ladder	10787018; Invitrogen™
24 Well-Zellkultur-Flaschen	Greiner Bio-One
6 Well-Zellkultur-Flaschen	Greiner Bio-One
96 Well-Zellkultur-Flaschen	Greiner Bio-One
AccuPrime™ Pfx SuperMix	12344040; Invitrogen™
Agarose	11404; Serva,
Aktivkohle	C-5385; Sigma®
Alamandin	Bachem AG
β-Alanin	146064; Sigma®
Ampicillin Natriumsalz	13399; Serva
Anti-V5-FITC Antikörper	46-0308; Invitrogen™
Blasticidin	R21001; Gibco® Thermo Fischer Scientific
Blue Juice™ Gel Loading Buffer (10X)	10816015; Invitrogen™
Bright-Glo™ Luciferase Assay System	E2650; Promega
BSA; Bovine Serum Albumin	A7030; Sigma®
Cyclic AMP Standard	TRK432; Amersham Pharmacia Biotech
Chlorpromazin HCl	C8138; Sigma®
Destilliertes Wasser (DNase/RNase frei)	10977-035; Invitrogen™
Dinatrium-EDTA x 2 H ₂ O	11280; Serva
DMSO; Dimethylsulfoxid	A994.1; Roth
DPBS (Dulbeco's Phosphate Salt Buffered Saline; ohne Ca ²⁺ und Mg ²⁺)	14190; Invitrogen™
Dpnl	R0176 S; New England Biolabs
Ethidiumbromid 10 mg/ml	15585011; Invitrogen™
FBS (Fetal Bovine Serum)	10270106; Gibco™, Thermo Fisher Scientific

Forskolin	F-6886; Sigma®
Glasplättchen Ø 25mm	Thermo Scientific
Ham's F-12 Nutrient Mix + GlutaMAX™-I	31765027; Gibco™, Thermo Fisher Scientific
HBSS (1x) (Hanks Balanced Salt Solution)	14025050; Gibco™, Thermo Fisher Scientific
Hygromycin B	10687010; Invitrogen™
LB Agar (Lennox Agar)	22700; Invitrogen™
LB Broth	10855; Invitrogen™
Lipofectamin® 2000 Reagent	11668-019; Invitrogen™
Methanol	32213; Sigma®
Mlul	R0198S; New England Biolabs® Inc.
Natriumacetat	6773.2; Roth
Natriumchlorid	1.06404.1000; Merck
NEBuffer™ 3	B7003S; New England Biolabs® Inc.
One Shot™ TOP10 E. coli	404003; Invitrogen™
OptiMEM®I (1x)	11058021; Gibco™, Thermo Fisher Scientific
pcDNA™5/FRT/V5-His-TOPO® TA Expression Kit	K6020-01; Invitrogen™
pcDNA™6.2/C-YFP-GW TOPO® DNA6.2™ Mammalian Expression Vector	K361-20; Invitrogen™
PCR SuperMix High Fidelity (25rxn)	10790-020; Invitrogen™
pNFAT-Luc	Hergestellt von I. von Kügelgen, ursprünglich: 219094; Stratagene,
pOG44 Flp-Recombinase Expression Vector	V600520; Invitrogen™
pSRE-Luc	Hergestellt von I. von Kügelgen, ursprünglich: 219080, Stratagene

QIAprep® Spin Miniprep Kit	27106; Qiagen
Rotiszint® eco plus (LSC-Universalcocktail)	0016.3; Roth
Salt Solution	46-0205; Invitrogen™
S.O.C.-Medium	15544-034; Invitrogen™
THV201, -202, -203, -204, -211 und -213	AG Müller, Institut für pharmazeutische Chemie, Universität Bonn
TRIS (Base)	T1503; Sigma®
TRIS HCl	T1378; Sigma®
Triton X-100	T9284; Sigma®
Trypsin-EDTA (0.05%), phenol red	25300054; Gibco™, Thermo Fisher Scientific
Zellkulturflasche CELLSTAR®	Greiner Bio-One
Zeocin™	R25001; Invitrogen™

8.2 Geräte und Software

Brutschrank Bakterienkultur	Heraeus Incubator, Thermo Scientific
Brutschrank Zellkultur	Heracell 150i, Thermo Scientific
ChemSketch Freeware 12.01	ACD/Labs
Elektrophoresekammer	Peqlab, Biotechnologie GmbH
Feinwaage	Sartorius
Plattenluminometer FLUOstar Optima	BMG Labtech
Prism® 4 Software	Graph Pad
Laser-Scanning-Mikroskop (LSM)	Zeiss, ObserverZ.1/LSM700
LSC-Counter	LS 5000 TD; Beckman
Office 2007 (Excel und Word)	Microsoft
PCR – Thermozykler	T-personal, Biometra
Quantity One® 1-D	Bio-Rad Laboratories
UV-Transilluminator	BioRad Laboratories GmbH
Wärmeschüttler	Edmund Bühler GmbH
Zellkultur-Mikroskop	Zeiss, 10x Objektiv



Alle Strukturformeln wurden mit Hilfe der Software ACD/ChemSketch (Freeware Version) 12.01 erstellt.

9. Literaturverzeichnis

Ajit SK, Pausch MH, Kennedy JD, Kaftan EJ. Development of a FLIPR Assay for the Simultaneous Identification of MrgD Agonists and Antagonists from a Single Screen. *J Biomed Biotechnol* 2010; 2010: 1-8

Avula LR, Buckinx R, Favoreel H, Cox E, Adriaensen D, Nassauw L van, Timmermans J-P. Expression and distribution patterns of Mas-related gene receptor subtypes A–H in the mouse intestine: inflammation induced changes. *Histochem Cell Biol* 2013; 139: 639-658

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

Bender E, Buist A, Jurzak M, Langlois X, Baggerman G, Verhasselt_ P, Ercken M, Guo H-Q, Wintolders C, Wyngaert I van den, Oers I van, Schoofs L, Luyten W. Characterization of an orphan G protein-coupled receptor localized in the dorsal root ganglia reveals adenine as a signaling molecule. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2002; 99: 8573-8578

Bogatcheva NV, Ferlin A, Feng S, Truong A, Giancesello L, Foresta C, AgoulNIK AI. T222P mutation of the insulin-like 3 hormone receptor LGR8 is associated with testicular maldescent and hinders receptor expression on the cell surface membrane. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2007; 292: 138-144

Bornstein I, Fortin J, Stanley PE, Stewart GSAB, Kricka LJ. Chemiluminiscent and Bioluminiscent Reporter Gene Assays. *Anal Biochem* 1994; 219: 169-181

Burstein ES, Ott TR, Feddock M, Ma JN, Fuhs S, Wong S, Schiffer HH, Brann MR and Nash NR. Characterization of the Mas-related gene family: structural and functional conservation of human and rhesus MrgX receptors. *Br J Pharmacol* 2006; 147: 73-82

Carter P. Site-directed mutagenesis. *Biochem J* 1986; 237: 1-7

Chakraborty R, Pydi SP, Gleim S, Dakshinamurti S, Hwa J, Chelikani P. Site Directed Mutations and the Polymorphic Variant Ala160Thr in the Human Thromboxane Receptor Uncover a Structural Role for Transmembrane Helix 4. *PLoS ONE* 2012; 7: e29996

Chen R, Xu M, Nagati J, Garcia JA. Coordinate regulation of stress signaling and epigenetic events by Acss2 and HIF-2 in cancer cells. *PLoS ONE* 2017; 27: e0190241

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

Crozier RA, Ajit SK, Kaftan EJ, Pausch MH. MrgD Activation Inhibits KCNQ/M-Currents and Contributes to Enhanced Neuronal Excitability. *J Neurosci* 2007; 27: 4492-4496

Dhanasekaran N, Dermott JM. Signaling by the G12 Class of G Proteins. *Cell Signal* 1996; 8: 235-245

Dong X, Han S-K, Zylka MJ, Simon MI, Anderson DJ. A diverse family of GPCRs expressed in specific subsets of nociceptive sensory neurons. *Cell* 2001; 106: 619-632

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

Gembardt F, Grajewski S, Vahl M, Schultheiss H-P, Walther T. Angiotensin metabolites can stimulate receptors of the Mas-related genes family. *Mol Cell Biochem* 2008; 319: 115-123

Guan Y, Liu Q, Tang Z, Raja SN, Anderson DJ, Dong X. Mas-related G-protein-coupled receptors inhibit pathological pain in mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2010; 107: 15933-15938

Habiyakare B, Alsaadon H, Mathai ML, Hayes A, Zulli A. Reduction of angiotensin A and alamandine vasoactivity in the rabbit model of atherogenesis: differential effects of alamandine and Ang(1-7). *Int J Exp Pathol* 2014; 95: 290–295

Hao J-J, Shi Z-Z, Zhao Z-X, Zhang Y, Gong T, Li C-X, Zhan T, Cai Y, Dong J-T, Fu S-B, Zhan Q-M, Wang M-R. Characterization of genetic rearrangements in esophageal squamous carcinoma cell lines by a combination of M-FISH and array-CGH: further confirmation of some split genomic regions in primary tumors. *BMC Cancer* 2012; 12: 367

Heo J, Han S-K, Vaidehi N, Wendel J, Kekenes-Huskey P, Goddard WA. Prediction of the 3D Structure of FMRF-amide Neuropeptides Bound to the Mouse MrgC11 GPCR and Experimental Validation. *Chembiochem* 2007 a; 8: 1527–1539

Heo J, Han S-K, Vaidehi N, Wendel J, Goddard WA. Prediction of the 3D structure of rat MrgA G protein-coupled receptor and identification of its binding site. *J Mol Graph Model* 2007 b; 26: 800–812

Hoffmann K. Identifizierung der molekularen Interaktionstelle von Agonisten und neuen, hochpotenten Antagonisten am humanen P2Y₁₂-Rezeptor. Dissertation, Bonn 2010

Hoffmann K, Sixel U, Di Pasquale F, Kügelgen I von. Involvement of basic amino acid residues in transmembrane regions 6 and 7 in agonist and antagonist recognition of the human platelet P2Y₁₂-receptor. *Biochem Pharmacol* 2008; 76: 1201–1213

Hrenak J, Paulis L, Simko F. Angiotensin A/Alamandine/MrgD Axis: Another Clue to Understanding Cardiovascular Pathophysiology. *Int J Mol Sci* 2016; 17:1098: 1-9

Kuilenburg AB van, Stroomer AEM, Lenthe H van, Abeling NG, Gennip AH van. New insights in dihydropyrimidine dehydrogenase deficiency: a pivotal role for β -aminoisobutyric acid? *Biochem J* 2004; 379: 119–124

Lautner RQ, Villela DC, Fraga-Silva RA, Silva N, Verano-Braga T, Costa-Fraga F, Jankowski J, Jan-kowski V, Sousa F, Alzamora A, Soares E, Barbosa C, Kjeldsen F, Oliveira A, Braga J, Savergnini S, Maia G, Peluso AB, Passos-Silva D, Ferreira A, Alves F, Martins A, Raizada M, Paula R, Motta-Santos D, Kemplin F, Pimenta A, Alenina N, Sinisterra R, Bader M, Campagnole-Santos MJ, Santos RAS. Discovery and Characterization of Alamandine: A Novel Component of the Renin-Angiotensin System. *Circ Res* 2013; 112: 1104–1111

Lembo PMC, Grazzini E, Groblewski T, O'Donnell D, Roy M-O, Zhang J, Hoffert C, Cao J, Schmidt R, Pelletier M, Labarre M, Gosselin M, Fortin Y, Banville D, Shen S, Ström P, Payza K, Dray A, Walker P and Ahmad S. Proenkephalin A gene products activate a new family of sensory neuron-specific GPCRs. *Nat Neurosci* 2002; 5: 201–209

Li Z, Xie Y, Zhong T, Zhang X, Dang Y, Gan T, Chen G. Expression and clinical contribution of MRGD mRNA in non-small cell lung cancers. *J BUON* 2015; 20: 1101-1106

Liu Q, Tang Z, Surdenikova L, Kim S, Patel KN, Kim A, Ru F, Guan Y, Weng H-J, Geng Y, Udem BJ, Kollarik M, Chen Z-F, Anderson DJ and Dong X. Sensory Neuron-Specific GPCR Mrgprs Are Itch Receptors Mediating Chloroquine-Induced Pruritus. *Cell* 2009; 139: 1353–1365

Müller S. Molekularpharmakologische Charakterisierung des humanen MRGD-Rezeptors. Dissertation, Bonn 2014

Nielsen MJ, Madsen M, Møller HJ, Moestrup SK. The macrophage scavenger receptor CD163: endocytic properties of cytoplasmic tail variants. *J Leukoc Biol* 2006; 79: 837-845

Nishimura S, Uno M, Kaneta Y, Fukuchi K, Nishigohri H, Hasegawa J, Komori H, Takeda S, Enomoto K, Nara F, Agatsuma T, Li J. MRGD, a MAS-related G-protein Coupled Receptor, Promotes Tumorigenesis and Is Highly Expressed in Lung Cancer. *PLoS One* 2012; 7: e38618

Nordstedt C, Fredholm BB. A modification of a protein-binding method for rapid quantification of cAMP in cell-culture supernatants and body fluid. *Anal Biochem* 1990; 189: 231–234

O'Gorman S, Fox DT, Wahl GM. Recombinase-mediated gene activation and site-specific integration in mammalian cells. *Science* 1991; 251: 1351-1355

Park BM, Phuong HTA; Yu L, Kim SH. Alamandine Protects the Heart Against Reperfusion Injury via the MrgD Receptor. *Circ J* 2018; 82: 2584–2593

Reikofski J, Tao BY. Polymerase Chain Reaction (PCR) Techniques for Site-Directed Mutagenesis. *Biotechnol Adv* 1992; 10: 535-547

Rosenbaum DM, Rasmussen SGF, Kobilka BK. The structure and function of G-protein-coupled receptors. *Nature* 2009; 459: 356–363

Schleifenbaum J. Alamandine and Its Receptor MrgD Pair Up to Join the Protective Arm of the Renin-Angiotensin System. *Front Med (Lausanne)* 2019; 6:107: 1-6

Schmieden V, Betz H. Pharmacology of the Inhibitory Glycine Receptor: Agonist and Antagonist Actions of Amino Acids and Piperidine Carboxylic Acid Compounds. *Mol Pharmacol* 1995; 48: 919-927

Shinohara T, Harada M, Ogi K, Maruyama M, Fujii R, Tanaka H, Fukusumi S, Komatsu H, Hosoya M, Noguchi Y, Watanabe T, Moriya T, Itoh Y, Hinuma S. Identification of a G Protein-coupled Receptor Specifically Responsive to β -Alanine. *J Biol Chem* 2004; 279: 23559–23564

Simon MI, Strathmann MP, Gautam N. Diversity of G Proteins in Signal Transduction. *Science* 1991; 252: 802-808

Solinski HJ, Gudermann T, Breit A. Pharmacology and Signaling of MAS-Related G Protein-Coupled Receptors. *Pharmacol Rev* 2014; 66: 570–597

Sriram K, Insel PA. G Protein-Coupled Receptors as Targets for Approved Drugs: How Many Targets and How Many Drugs? *Mol Pharmacol* 2018; 93: 251–258

Sun Y, Jiang M, Hou B, Lu C, Lei Y, Ma Z, Gu X. Mas-Related Gene (Mrg) C Activation Attenuates Bone Cancer Pain via Modulating Gi and NR2B. *PLoS ONE* 2016; 11: e0154851

Tetzner A, Naughton M, Gebolys K, Eichhorst J, Sala E, Villacañas Ó, Walther T. Decarboxylation of Ang-(1–7) to Ala1-Ang-(1–7) leads to significant changes in pharmacodynamics. *Eur J Pharmacol* 2018; 833: 116–123

Uno M, Nishimura S, Fukuchi K, Kaneta Y, Oda Y, Komori H, Takeda S, Haga T, Agatsuma T, Nara F. Identification of Physiologically Active Substances as Novel Ligands for MRGPRD. *J Biomed Biotechnol* 2012; 2012:816159: 1-9

Urban JD, Clarke WP, Zastrow M von, Nichols DE, Kobilka B, Weinstein H, Javitch JA, Roth BL, Sexton ACPM, Miller KJ, Spedding M, Mailman RB. Functional Selectivity and Classical Concepts of Quantitative Pharmacology. *J Pharm Exp Ther* 2007; 320: 1-13

Venkatakrishnan AJ, Deupi X, Lebon G, Tate CG, Schertler GF and Babu MM. Molecular signatures of G-protein-coupled receptors. *Nature* 2013; 494: 185-194

Villela DC, Passos-Silva DG, Santos RAS. Alamandine: a new member of the angiotensin family. *Curr Opin Nephrol Hypertens* 2014; 23: 130–134

Voytas D. Agarose gel electrophoresis. *Curr Protoc Immunol* 1992; 2: 10.4.1-10.4.8

Wang H, Zylka MJ. Mrgprd-Expressing Polymodal Nociceptive Neurons Innervate Most Known Classes of Substantia Gelatinosa. *Neurons*. *J Neurosci* 2009; 29: 13202–13209

Weiner MP, Costa GL, Schoettlin W, Cline J, Mathur E, Bauer JC. Site-directed mutagenesis of double-stranded DNA by the polymerase chain reaction. *Gene* 1994; 151: 119–123

Wu FS, Gibbs TT, Farb DH. Dual activation of GABAA and glycine receptors by β -alanine: inverse modulation by progesterone and 5 α -pregnan-3 α -ol-20-one. *Eur J Pharmacol* 1993; 246: 239–246

Wu H, Zeng M, Cho EYP, Jiang W, Sha O. The Origin, Expression, Function and Future Research Focus of a G Protein-coupled Receptor, Mas-related Gene X2 (MrgX2). *Prog Histochem Cytochem* 2015; 50: 11–17

Yanagisawa H, Davis EC, Starcher BC, Ouchi T, Yanagisawa M, Richardson JA, Olson EN. Fibulin-5 is an elastin-binding protein essential for elastic fibre development in vivo. *Nature* 2002; 415: 168-171

Young D, Waitches G, Birchmeier C, Fasano O and Wigler M. Isolation and characterization of a new cellular oncogene encoding a protein with multiple potential transmembrane domains. *Cell* 1986; 6: 711–719

Yuan WM, Zhang WJ, Ma FL, Li JS, Zhang Q, Zheng LS. IFN- λ 1 in CHO cells: its expression and biological activity. *Cell Mol Biol Lett* 2017; 22:26: E1-10

Zhang K, Zhang J, Gao Z-G, 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 a; 509: 115–118

Zhang J, Zhang K, Gao Z-G, 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 b; 509: 119–122

Zhang Y, Wang L, Ardejani MS, Aris NF, Li X, Orner BP, Wang F. Mutagenesis study to disrupt electrostatic interactions on the twofold symmetry interface of Escherichia coli bacterioferritin. *J. Biochem.* 2015; 158: 505–512

Zhang Y, Wang K, Lin M, Li Q, Hong Y. Inhibition of morphine tolerance by MrgC receptor via modulation of interleukin-1 β and matrix metalloproteinase 9 in dorsal root ganglia in rats. *Eur J Pharmacol* 2017; 815: 10–17

Zhu P, Verma A, Prasad T, Li Q. Expression and Function of Mas-Related G Protein-Coupled Receptor D and Its Ligand Alamandine in Retina. *Mol Neurobiol* 2020; 57: 513–527

Zylka MJ, Dong X, Southwell AL, Anderson DJ. Atypical expansion in mice of the sensory neuron-specific Mrg G protein-coupled receptor family. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2003; 100: 10043–10048

Zylka MJ, Rice FL, Anderson DJ. Topographically Distinct Epidermal Nociceptive Circuits Revealed by Axonal Tracers Targeted to Mrgprd. *Neuron* 2005; 45: 17–25

10. Danksagung

Zunächst möchte ich mich ganz herzlich bei meinem Doktorvater, Herrn Prof. Dr. med. Ivar von Kugelgen, für die Möglichkeit der Promotion und die fortwährend gute Betreuung bedanken. Dank seiner Anregungen, seiner Hilfestellungen und seiner persönlichen Unterstützung im Labor war diese Arbeit überhaupt möglich.

Mein weiterer Dank gilt Frau Dr. K. Hoffmann. Ohne ihre intensive Anleitung und ihren vielen Tipps im Labor, wäre diese Arbeit in dieser Form nicht möglich gewesen.

Des Weiteren bedanke ich mich bei Frau Prof. C. E. Müller für die Überlassung der Substanzen THV201-THV213.

Auf diesem Wege möchte ich mich ganz besonders bei meiner Freundin und meinen Eltern vor allem für ihre Hilfe, ihre Motivation und ihre stetige Unterstützung danken, die weit über das Studium und diese Promotionsarbeit hinausgeht.