

**“Funktionelle Charakterisierung der *orphan*
G-Protein-gekoppelten Rezeptoren gpr3, gpr6 und gpr12:
Ligandenidentifizierung, Expression und potentielle
Bedeutung im Herz-Kreislauf-System.”**

Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Naturwissenschaften

vorgelegt beim Fachbereich
Chemische und Pharmazeutische Wissenschaften
der Johann Wolfgang Goethe-Universität
in Frankfurt am Main

von
Kirsten Stoidtner (geb. Uhlenbrock)
aus Köln

Frankfurt 2002
(DF1)

vom Fachbereich Chemische und Pharmazeutische Wissenschaften der Johann Wolfgang Goethe-Universität als Dissertation angenommen.

Dekan: Prof. Müller

Gutachter: Prof. B. Ludwig und Prof. J. Pfeilschifter

Datum der Disputation: 12.02.2003

ERKLÄRUNG

Die vorliegende Arbeit wurde in der Zeit vom 1. März 2000 - 30. Juni 2002 bei Aventis Pharma Deutschland GmbH, DI&A, Herz-Kreislauf-Forschung als externe Dissertation angefertigt. Ich erkläre hiermit an Eides Statt, daß ich die vorliegende Arbeit selbständig und ohne die Benutzung anderer als der angegebenen Hilfsmittel angefertigt habe. Die aus fremden Quellen direkt oder indirekt übernommenen Gedanken sind als solche kenntlich gemacht. Ich habe bisher an keinem anderen Fachbereich diese oder eine anderen Dissertation zur Promotion vorgelegt.

Teile dieser Arbeit sind in folgenden Arbeiten publiziert bzw. zur Publikation eingereicht:

Patente:

Kostenis, E., **Uhlenbrock, K.**, Gassenhuber, H.: Verfahren zur Identifizierung von Liganden von GPCRs. (Patentanmeldung Vorl. Reg.-Nr. NAE-004255, 03.04.2001, Anmeldung im Ausland 03.04.2002)

Originalveröffentlichungen:

Uhlenbrock, K., Gassenhuber, H., Kostenis, E.: Sphingosine 1-phosphate is a ligand of the human gpr3, gpr6 and gpr12 family of constitutively active G protein-coupled receptors. *Cell. Signal.* (2002) Vol. 14 (11): 941-953

EMBL/GenBank Eintrag: rat gpr3 (AJ427482), eingereicht am 09.01.2002

Uhlenbrock, K., Huber, J., Ardati, A., Busch, E.A., Kostenis, E.: Fluid shear stress differentially regulates gpr3, gpr6, and gpr12 expression in human umbilical vein endothelial cells. *Cell. Physiol. Biochem.* (2003) Vol. 13: 75-84

Cremers, B., Stoff, A., Kostenis, E., **Uhlenbrock, K.**, Kilter, H., Rosenkranz, S., Böhm, M.: Lysophosphatidic acid induces hypertrophy in rat neonatal cardiomyocytes. Manuskript in Vorbereitung

Kongreßbeiträge:

Cremers, B., Stoff, A., Kostenis, E., **Uhlenbrock, K.**, Böhm, M.: Lysophosphatidic acid (LPA) induced hypertrophy in rat neonatal cardiomyocytes. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol.* 2002; 365 (Suppl. 1): R148

Cremers, B., Stoff, A., **Uhlenbrock, K.**, Kostenis, E.: Lysophosphatidic acid induced hypertrophy in neonatal rat cardiomyocytes. *Z. Kardiol.* 2002; 91 (Suppl. 1): 91

Frankfurt, im Februar 2003

I Zusammenfassung

II Einleitung

1. GPCRs in der industriellen Pharmaforschung	9
1.1. Wirtschaftliche Bedeutung G-Protein-gekoppelter Rezeptoren.	9
1.2. Targetidentifizierung und -validierung von <i>orphan</i> GPCRs	13
2. Physiologie G-Protein-gekoppelter Rezeptoren	15
2.1. Klassifizierung und übereinstimmende Charakteristika	15
2.2. G-Protein-abhängige und -unabhängige Signaltransduktion	17
2.3. Regulation der GPCR-Aktivität	18
3. Die Rezeptoren gpr3, 6 und 12.	22
4. Aufgabenstellung.	25

III Material und Methoden

1. Molekularbiologische Methoden	27
1.1. Isolierung von Nukleinsäuren	27
1.2. Polymerasekettenreaktion	28
1.3. Gelelektrophoretische Auftrennung von Nukleinsäuren	32
1.4. Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren	33
1.5. Subklonierung	33
1.6. Reinigung von Nukleinsäuren	35
1.7. DNA-Sequenzanalyse	36
1.8. Northern Blot-Analyse	38
2. Mikrobiologische Methoden.	41
2.1. Kultivierung von <i>E.coli</i>	41
2.2. Konservierung von <i>E.coli</i> -Klonen	41
2.3. Transformation von <i>E.coli</i>	42
3. Zellbiologische Methoden.	42
3.1. Kultivierung von Säugerzellen.	42
3.2. Einfrieren und Auftauen von Säugerzellen	43
3.3. Transfektion von Säugerzellen.	44
3.4. FLIPR/Ca ²⁺ -Assay	46
3.5. cAMP-Assay	48
3.6. Funktionelle Internalisierung	50
3.7. Scherstress als endotheliales Funktionsmodell	50
4. Biochemische Methoden	52
4.1. Konzentrationsbestimmung von Proteinen	52
4.2. Membranpräparation	52
4.3. Herstellung von Zelllysaten proliferierender Zellen	52
4.4. Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)	53

5.	Immunologische Methoden	54
5.1.	Western Blot-Analyse	54
5.2.	Generierung von Peptidantikörpern gegen gpr3, 6 und 12	55
5.3.	Zytoimmunfluoreszenz	56
6.	Graphische Bildbearbeitung und statistische Auswertung	59

IV Ergebnisse

1.	Bioinformatische Grundlagen	60
1.1.	gpr3, 6 und 12 haben Ähnlichkeit zu Lipidrezeptoren.	60
1.2.	Klonierung des gpr3 Ratten-Homologen	62
2.	Ligandenidentifizierung	64
2.1.	gpr3, 6 und 12 sind konstitutive Aktivatoren der Adenylat-Zyklase.	64
2.2.	S1P und DHS1P aktivieren eine gpr3-, 6- und 12-vermittelte Ca^{2+} -Freisetzung	65
2.3.	Suramin fördert die S1P-induzierte Ca^{2+} -Freisetzung durch gpr3, 6 und 12	67
2.4.	EC ₅₀ -Werte von gpr3, 6 und 12 für S1P liegen im nanomolaren Bereich	68
2.5.	gpr3, 6 und 12 reagieren neben S1P/DHS1P auf keine weiteren Lipide	71
2.6.	Die gpr3-, 6- und 12-vermittelte G α_s -Aktivierung ist stimulierbar durch S1P.	72
2.7.	S1P induziert die Internalisierung eines gpr6-GFP-Fusionsproteins.	74
2.8.	Eine stabile gpr3-Zelllinie zeigt dramatisch erhöhte basale cAMP-Spiegel	76
3.	Signaltransduktion von gpr3, 6 und 12 in HEK293-Zellen.	77
3.1.	gpr3, 6 und 12 koppeln an G α_i - und G α_s -Signaltransduktionswege	77
3.2.	Die S1P-vermittelte Ca^{2+} -Freisetzung entstammt TG-sensitiven Speichern	79
3.3.	Die Sphingosin-Kinase ist an der Signaltransduktion beteiligt	80
4.	Einfluß von konstitutiver Aktivität auf die zelluläre Lokalisation von gpr3, 6 und 12 .	81
4.1.	Herstellung und Charakterisierung eines gpr6-GFP-Fusionsproteins	81
4.2.	Lokalisation von gpr3, 6 und 12 in HEK293-Zellen	82
4.3.	Die Adenylat-Zyklase-Aktivierung verhält sich umgekehrt proportional zum Expressionsniveau .	83
4.4.	Ein putatives ER-Retentions-Signal hat keinen Einfluß auf die Lokalisation	84
4.5.	Einfluß von Kotransfektion auf die intrazelluläre Lokalisation.	86
4.6.	Untersuchung von inversem Agonismus am Rezeptor gpr6	86
5.	Expressionsprofile der Rezeptoren gpr3, 6 und 12	88
5.1.	Charakterisierung von Peptidantikörpern, RNA-Sonden und PCR-primern	88
5.2.	Absättigung der Antikörpersignale mit den Anti-Peptiden	90
5.3.	Untersuchung kompletter Organsysteme	94
5.4.	Untersuchung isolierter Zellsysteme	99
6.	Physiologische Bedeutung von gpr3, 6 und 12	103
6.1.	Immunologischer Nachweis von gpr3, 6 und 12 in Plasmamembranfraktionen humaner Gewebe	103
6.2.	gpr3, 6 und 12 sind in HUVEC-Plasmamembranen lokalisiert.	103
6.3.	gpr3 wird in einem endothelialen Funktionsmodell reguliert	104
6.4.	gpr3-ASOs führen zu keiner Reduktion der Proteinexpression.	107

V Diskussion

1. Strategien zur Ligandenidentifizierung	109
1.1. Bioinformatik und <i>in silico</i> -Ergebnisse	110
1.2. <i>in vitro</i> -Ergebnisse und Identifizierung von S1P als natürlicher Agonist	112
1.3. Einordnung von gpr3, 6 und 12 als Lipidrezeptoren	117
2. Signaltransduktion und konstitutive Aktivität.	119
2.1. Duale Kopplung an G α_i und G α_s	120
2.2. Beteiligung der Sphingosin-Kinase	123
2.3. Basale Internalisierung als Folge von konstitutiver Aktivität	125
2.4. Ursachen der konstitutiven Aktivität von gpr3, 6 und 12	129
3. Physiologische Bedeutung von gpr3, 6 und 12	133
3.1. Expression von gpr3, 6 und 12 im kardiovaskulären System	133
3.2. Hinweise auf <i>in vivo</i> -Krankheitsrelevanz	138

VI Weiterführende Aspekte und Ausblick

VII Anhang

1. Abkürzungsverzeichnis	143
2. Danksagung	146

VIII Literaturverzeichnis

IX Lebenslauf

I Zusammenfassung

G-Protein-gekoppelte Rezeptoren (GPCRs) bilden eine Superfamilie von plasmamembranständigen Proteinen. Die chemische Vielfalt ihrer Aktivatoren macht sie zu der größten und variantenreichsten Proteinfamilie mehrzelliger Organismen. Moderne Klonierungstechniken sowie der Abschluß der Humangenom-Sequenzierung im Jahr 2001 haben die Existenz von ca. 140 unbekanntem GPCR-Sequenzen offengelegt, denen bislang weder ein natürlicher Ligand noch eine physiologische Funktion zugeordnet werden konnte. Sie werden daher als „*orphan*“ Rezeptoren (engl.: Waisenkind) bezeichnet.

Mehr als 30% der auf dem internationalen Pharma-Markt zugelassenen Substanzen sind GPCR-Wirkstoffe mit einem Jahresumsatz (2000) von 23,5 Mrd. US-\$ (Wise *et al.*, 2002). Aufgrund der großen wirtschaftlichen Bedeutung dieser Rezeptorfamilie ist es verständlich, daß die pharmazeutische Forschung mit hohem Aufwand an der Ligandenidentifizierung von *orphan* GPCRs arbeitet und die Ergebnisse patentrechtlich absichert. Die unter den Begriffen „Reverse Pharmakologie“ und „*Orphan* Rezeptor Strategie“ zusammengefaßte, praktische Wirkstoffentwicklung an *orphan* GPCRs vereint Techniken aus Bioinformatik, Zell- und Molekularbiologie, Biochemie und Pharmakologie.

Im Zentrum dieser Arbeit stehen die humanen *orphan* Rezeptoren *gpr3* (Iismaa *et al.*, 1994), *gpr6* (Heiber *et al.*, 1995) und *gpr12* (Song *et al.*, 1995). Die Sequenz-Identität beträgt 57-61% auf der Proteinebene, und das deutet auf eine neue GPCR-Subfamilie hin. Aufgrund dominanter Präsenz von *gpr3*-, 6- und 12-mRNA-Transkripten im ZNS ist bislang ein Ligand mit neuromodulatorischen Eigenschaften vermutet worden. Eggerickx *et al.*, 1995 zeigen, daß *gpr3*-transfizierte COS-7-Zellen konstitutiv, d.h. Agonist-unabhängig, die Adenylat-Zyklase aktivieren und so zu basal erhöhten cAMP-Spiegeln führen. Die Autoren vermuten die Ursache der Agonist-Unabhängigkeit entweder in einer basalen Aktivierung durch einen ubiquitären Serumfaktor im Kulturmedium oder in einer starken Überexpression im COS-7-Zellmodell.

Bioinformatische Analysen im Vorfeld dieser Arbeit (Dr. Gassenhuber, Aventis Pharma, 2000) zeigen große Ähnlichkeiten von *gpr3*, 6 und 12 zu der Cannabinoid (*cb*)- und zu der *endothelial differentiation gene* (*edg*)-Lipidrezeptorfamilie von 42-44% auf der Proteinebene, und das deutet auf ein Lipid als potentiellen Liganden hin.

Die *edg*-Rezeptoren regulieren über die bioaktiven Lipid-Mediatoren Sphingosin-1-Phosphat (S1P) und Lysophosphatidsäure (LPA) zentrale physiologische Funktionen im Rahmen von Proliferation und Zelldifferenzierung sowie eine Vielzahl kardiovaskulärer Effekte (z.B. Plättchenaktivierung, Schutz des Endothels vor Apoptose, Angiogenese, negative Chronotropie, Entwicklung des Herzens etc.).

Aventis Pharma Deutschland GmbH beschäftigt sich u.a. mit der molekularbiologischen und pharmakologischen Charakterisierung dieser kardiovaskulären Effekte.

Die zentrale Fragestellung dieser Arbeit besteht darin, zu klären, ob auch die *orphan* Rezeptoren *gpr3*, 6 und 12 über bioaktive Lipide und eine zusätzliche Expression in peripheren, Herz-Kreislauf-relevanten Organen eine Rolle spielen.

Die Ergebnisse dieser Arbeit identifizieren gpr3, 6 und 12 als eine Familie von konstitutiv aktiven Rezeptoren, wobei die konstitutive Aktivierung unabhängig vom Rezeptor-Subtyp, der Spezies oder dem Zelltyp ist. Die Beobachtung, daß HEK293-Zellen, die mit den potentiellen Lipidrezeptoren gpr3, 6 und 12 transfiziert wurden, in lipidfreiem Medium (Aktivkohle-resorbiertes Serum) reduzierte, basale cAMP-Spiegel zeigen, führt zu der Schlußfolgerung, daß zumindest ein Teil der konstitutiven Aktivität auf ein Lipid des Serums zurückzuführen sein muß.

In *second messenger*-Assays sind die bioaktiven Lipide S1P und Dihydro-S1P (DHS1P) als Modulatoren der konstitutiven gpr3-, 6- und 12-Aktivität identifiziert und funktionell charakterisiert worden. S1P- und DHS1P-Wirkungen an diesen Rezeptoren induzieren in HEK293-Zellen sowohl eine Ca^{2+} -Mobilisierung ($EC_{50} = 50-100nM$), eine Stimulation der Adenylat-Zyklase als auch eine funktionelle Internalisierung eines Fusionskonstruktes aus gpr6 mit einem grün fluoreszierenden Protein (GFP). Das im Rahmen dieser Arbeit klonierte gpr3-Homologe der Ratte (Acc.Nr.: AJ427482) läßt sich ebenfalls durch S1P und DHS1P in funktionellen Ca^{2+} - und cAMP-Assays anschalten.

Eine Substanz-Bibliothek mit 200 bioaktiven Lipiden bestätigt die Wirksamkeit von S1P und DHS1P und liefert darüber hinaus keinen weiteren Liganden mit agonistischen Eigenschaften an den humanen Rezeptoren gpr3, 6 und 12.

Expressionsprofile von gpr3, 6 und 12 sind mittels Nachweismethoden auf mRNA- (RT-PCR, Echtzeit-Taqman-PCR, Northern Blot, RNA-Chip) und Proteinebene (Western Blot) erstellt worden. Sie konnten mit Informationen aus der LifeSpan Bioscience-Datenbank (www.isbio.com) ergänzt werden, die ein immunhistologisches Profil des humanen Rezeptors gpr12 im gesunden und kranken Gewebe zur Verfügung stellt.

Der Nachweis von gpr3-, 6- und 12-mRNA-Transkripten und Proteinen in einer Vielzahl humaner peripherer Organe und in isolierten Zellsystemen des Herz-Kreislauf- (Herz, Niere, Endothel- und glatte Gefäßmuskelzellen, Blutplättchen) und Immunsystems (Milz, Thymus, Leukozyten) weist eindeutig auf zusätzliche, periphere Funktionen dieser Rezeptorfamilie hin. Dies untermauert die kardiovaskuläre Relevanz, die bereits aufgrund des Liganden S1P zu vermuten war.

In einem endothelialen Funktionsmodell, bei dem der pulsierende Blutstrom im Gefäßlumen simuliert wird (Scherstress), wird der Rezeptor gpr3 um den Faktor 2 auf Proteinebene hochreguliert. Es ist jedoch offen, ob diese Regulation auf eine Schutzfunktion im Endothel oder auf eine funktionelle Gegenregulation zurückzuführen ist. Zur Klärung dieser Frage sind Antisense-Oligonukleotide gegen den Rezeptor gpr3 getestet worden; eine Reduktion des gpr3-Proteinniveaus konnte jedoch nicht nachgewiesen werden.

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit identifizieren die humanen *orphan* Rezeptoren gpr3, 6 und 12 als weitere Mitglieder einer kontinuierlich wachsenden Lipidrezeptorfamilie. Es ist ein wesentlicher Schwerpunkt zukünftiger Studien, diesen für die Herz-Kreislauf-Forschung interessanten Rezeptoren eine physiologische bzw. pathophysiologische Funktion zuzuordnen.

II Einleitung

1. GPCRs in der industriellen Pharmaforschung

1.1. Wirtschaftliche Bedeutung G-Protein-gekoppelter Rezeptoren

G-Protein-gekoppelte Rezeptoren (GPCRs) bilden die größte und variantenreichste Proteinfamilie in der Natur mehrzelliger Organismen. Sie zählen zu den ältesten bekannten Proteinfamilien, und Vertreter dieses Rezeptortyps finden sich bereits in Protozoen, Schleimpilzen, Hefen und Pflanzen (Bockeaert & Pin, 1999). Verfügt die einzellige Hefe *Saccharomyces cerevisiae* erst über zwei GPCR-Gene, so sind es bei der Nematode *Caenorhabditis elegans* bereits ca. 1100, das entspricht 5% des Nematoden-Genoms (Bargmann *et al.*, 1998). Diese rasante Vervielfältigung des GPCR-Repertoires im Prozeß der evolutionären Entwicklung von einzelligen Eukaryonten (Hefe) zum komplexen Mehrzeller (Nematode) verdeutlicht die Relevanz dieses Rezeptortyps für interzelluläre Kommunikationsmechanismen.

Für den Menschen wurden ursprünglich mehrere Tausend GPCR-Gene postuliert. Nach Abschluß der Humangenom-Sequenzierung im Jahr 2001 (Venter *et al.*, 2001, Lander *et al.*, 2001), sowie früherer Schätzungen, geht man jedoch davon aus, daß das humane GPCR-Repertoire nur ca. 1000 Gene umfaßt (Marchese *et al.*, 1999, Civelli *et al.*, 2001). Bei einer Gesamtzahl der humanen, Protein-kodierenden Gene von 30000-40000 (Lander *et al.*, 2001) entspricht das einem Anteil von <1%. Davon kodieren ca. 700 GPCR-Gene für Duft- und Geschmackstoff-Rezeptoren. Weitere 300 GPCRs steuern zentrale physiologische Funktionen als Hormon, (Neuro-)transmitter oder Gewebshormon (Civelli *et al.*, 2001) (Tabelle 1, S.10). Die Vielfältigkeit der GPCR-Aktivatoren reicht von biogenen Aminen (z.B. Adrenalin, Dopamin, Azetylcholin), Aminosäuren und -derivaten (z.B. Serotonin, Histamin), Nukleotiden und -derivaten, (z.B. ATP, UDP-Glucose), Peptiden/Proteinen (z.B. Urotensin-II, Parathormon), Lipiden und -derivaten (z.B. Prostaglandin, Lysophosphatidsäure) bis zu physikalischen Lichtreizen (Rhodopsin-Rezeptor).

Neben den GPCRs mit bekannten Funktionen und Aktivatoren existiert eine beträchtliche Gruppe von ca. 155 humanen GPCR-Genen (Wise *et al.*, 2002), denen bislang weder ein natürlicher Ligand noch eine physiologische Funktion zugeordnet werden konnte. Man bezeichnet diese deshalb als „*orphan*“ Rezeptoren (engl.: Waisenkind). Die Recherchen von Civelli *et al.*, 2001 beziffern die Gruppe der derzeit bekannten humanen (Neuro-)Transmitter-GPCRs auf 160, deren physiologische Funktionen durch 97 natürliche Liganden vermittelt werden (Tabelle 1, S.10). Dem gegenüber steht eine vergleichbar große Gruppe von 140 *orphan* GPCRs mit unbekanntem Liganden. Da meist mehrere Rezeptoren-Subtypen für einen Liganden existieren, kann spekuliert werden, daß möglicherweise die Hälfte des humanen GPCR-Liganden-Repertoires noch unbekannt ist. Daraus ergibt sich ein großes pharmakologisches Potential für die Arzneimittelentwicklung in der pharmazeutischen Chemie.

Tabelle 1 Klassifizierung von GPCRs und Liganden
(übernommen von Civelli *et al.*, 2001)

GPCR und Liganden	Anzahl
GPCRs	ca. 1000
GPCRs für Duft- und Geschmackstoffe	ca. 700
GPCRs für Chemokine- und chemotaktische Stoffe	18
Transmitter-GPCRs	ca. 300
aktiviert durch bekannte Liganden	160
aktiviert durch unbekannte Liganden (<i>orphan</i> GPCRs)	140
natürliche GPCR-Liganden	
Duft- und Geschmackstoffe	sehr viele
Chemokine und chemotaktische Stoffe	45
Transmitter	97
biogene Amine, Aminosäuren und -derivate, Nukleotide und -derivate, Ca ²⁺ , Retinal	17
Lipid-Mediatoren (Eikosanoide, Lipide)	11
(Neuro-)Peptide	69

Mehr als 30% aller auf dem internationalen Pharma-Markt zugelassenen Substanzen sind Wirkstoffe an G-Protein-gekoppelten Rezeptoren. Sie haben einen Anteil von 9% am globalen Markt der Pharmazeutischen Chemie von 23,5 Mrd. US-\$ (2000) (Wise *et al.*, 2002). Etwa ein Viertel (22,5%, Bailey *et al.*, 2001) der Top 200 Medikamente weltweit modulieren GPCR-Funktionen. Die Tabelle 2, S.12 zeigt die Top 20 GPCR-Medikamente des Jahres 2000 in den USA incl. Hersteller, Indikation und Umsatz. Gründe für den Erfolg dieser Proteinfamilie liegen in der Vielfalt ihrer physiologischen Funktionen und in der guten Erreichbarkeit durch synthetische Wirkstoffe. Als Plasmamembranproteine binden sie extrazelluläre Liganden bzw. Wirkstoffe, deren lipophilen oder hydrophilen Eigenschaften für eine Wirkung irrelevant sind. Es ist erwähnenswert, daß sich das aktuelle Spektrum der Top 20 GPCR-Wirkstoffe überwiegend auf GPCRs konzentriert, die von Aminosäurederivaten und biogenen Aminen aktiviert werden (Adrenalin, Histamin, Dopamin, Serotonin, Azetylcholin, siehe Tabelle 2, S.12). Die Entwicklung von Wirkstoffen an anderen GPCR-Ligandenklassen (z.B. Nukleotide, Lipide) verspricht weitere therapeutische Erfolge.

Andere Einsatzmöglichkeiten von GPCR-Wirkstoffen ergeben sich aus der steigenden Zahl von Krankheiten, die mit GPCR-Mutationen oder Polymorphismen in Verbindung gebracht werden. Polymorphismen stellen Mutationen in der GPCR-Sequenz dar, die keine offensichtlichen Veränderungen der Rezeptor-Physiologie zur Folge haben, jedoch die Wahrscheinlichkeit zur Ausbildung einer multifaktoriellen Erkrankung erhöhen. So werden beispielsweise β_3 -Adrenozeptor-Polymorphismen mit einem erhöhten Risiko zur Ausbildung einer Insulin-Resistenz assoziiert (Strosberg, 1997).

Mutationen eines GPCRs, die den Funktionsverlust des Rezeptors zur Folge haben, führen dagegen unweigerlich zu manifestierten pathologischen Krankheitsbildern. Beispiele hierfür sind Diabetes insipidus (Vasopressin V_2 -Rezeptor), Obesitas (β_3 -Adrenozeptor), Bluthochdruck (Glukagon-Rezeptor), Retinitis pigmentosa (Rhodopsin-Rezeptor) (Birnbaumer, 1995, Edwards *et al.*, 2000, Coughlin, 1994).

Aufgrund der hohen wirtschaftlichen Bedeutung dieser Rezeptorfamilie ist es verständlich, warum die pharmazeutische Forschung in die Ligandenidentifizierung von *orphan* GPCRs als neue potentielle therapeutische Angriffspunkte und in deren patentrechtliche Absicherung (Bailey *et al.*, 2001) investiert. Es ist eine große naturwissenschaftliche Aufgabe, GPCRs und ihre teilweise bislang unbekanntenen Liganden einander zuzuordnen und all jene GPCRs herauszufiltern, die für die Pathogenese einer Krankheit relevant sind.

Die Begriffe „Reverse Pharmakologie“ und „*Orphan* Rezeptor Strategie“ beschreiben praktische Ansätze zur Wirkstoffentwicklung an *orphan* GPCRs, die im Rahmen von Targetidentifizierung und -validierung in der modernen Pharmaforschung Anwendung finden (1.2., S.13). Vorrangiges Ziel der Pharmaforschung ist es, die Bedeutung bzw. Relevanz einer GPCR-Liganden-Kombination in einer Krankheit zu verstehen und daraus Therapieansätze zu entwickeln.

Leitstrukturerzeugung und -optimierung (Abb.1, S.11) befassen sich anschließend mit der Identifizierung bzw. Struktur-Optimierung von Modulatoren (Agonisten oder Antagonisten) eines validierten GPCRs durch Hochdurchsatz-Screening (HTS, ca. 10^5 Substanzen). Erst in der klinischen Entwicklung zeigt sich die Wirksamkeit eines Wirkstoffes/Medikamentes hinsichtlich der Modulation eines GPCRs und die sich daraus ergebenden therapeutischen Wirkungen am gesunden bzw. kranken Menschen.

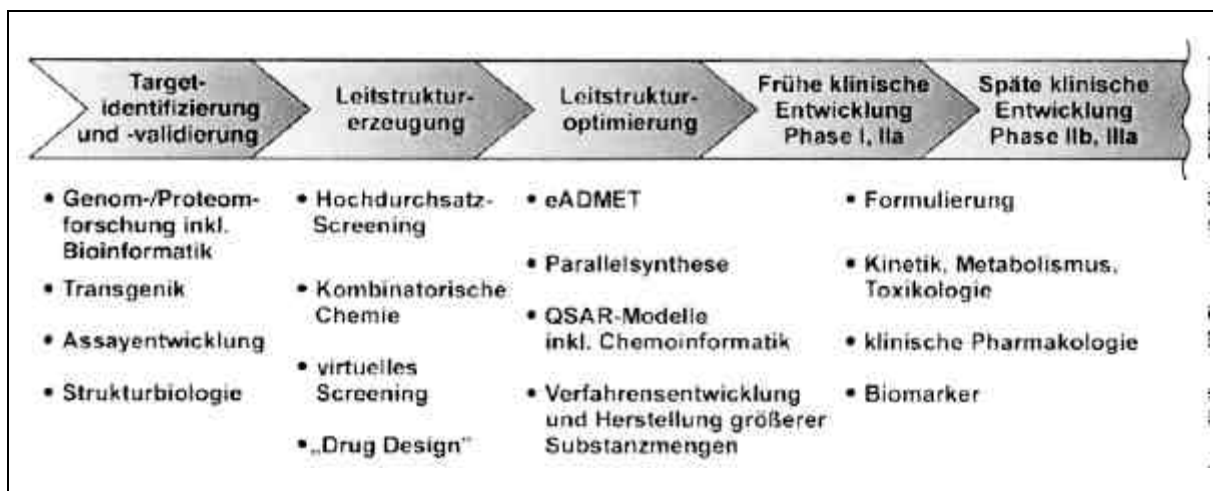


Abb.1 **Wertschöpfungskette der Arzneimittelforschung: Ausgewählte Schlüsseltechnologien und Aktivitäten.** (aus: Wess *et al.*, 2001)

Tabelle 2 Top 20 der rezeptpflichtigen GPCR-Medikamente (2000)
(übernommen von Bailey et al., 2001)

Markenname	GPCR	Indikation	Firma	Umsatz (Mrd. US-\$)
Claritin	Histamin H ₁	Allergie/Asthma	Schering Plough	2,862
Zyprexa	Dopamin	ZNS Störungen	Eli Lilly	1,418
Allegra	Histamin H ₃	Allergie/Asthma	Aventis	1,120
Oxycontin	Opioid	Schmerz	Purdue Pharma	1,053
Risperdal	Serotonin 5-HT ₂	ZNS Störungen	Janssen	0,960
Imitrex	Serotonin 5-HT _{1A/1B}	Migräne	GlaxoSmithKline	0,932
Wellbutrin SR	Dopamin	Depression	GlaxoSmithKline	0,851
Zyrtec	Histamin H ₁	Allergie/ Asthma	Pfizer	0,849
Buspar	Serotonin 5-HT _{1A}	Psychosen/ Depression	Bristol-Myers-Squibb	0,699
Singulair	CysL1R	Asthma	Merck	0,677
Pepcid	Histamin H ₂	Magengeschwür	Merck	0,569
Serevent	Adrenozeptor β ₂	Asthma	GlaxoSmithKline	0,449
Cozaar	Adrenozeptor α ₂	Hypertension	Merck	0,395
Toprol XL	Addrenozeptor β ₂	Hypertension	Astra Zeneca	0,354
Duragesic	Opioid mu	Schmerz	Janssen	0,353
Serzone	Serotonin 5-HT ₂	Psychosen/ Depression	Aventis	0,349
Cardura	Adrenozeptor α ₁	Hypertension	Pfizer	0,344
Xalatan	Prostanoid FP	Glaukom	Pharmacia & Upjohn	0,340
Detrol	Muskarinischer Azetylcholin Rezeptor	Inkontinenz	Pharmacia & Upjohn	0,319
Seroquel	Serotonin 5-HT ₂	Schizophrenie	Astra Zeneca	0,319

1.2. Targetidentifizierung und -validierung von *orphan* GPCRs

In der klassischen Pharmakologie wird ein Ligand über seine physiologische Wirkung in *ex vivo* Organbad-Experimenten isoliert und charakterisiert. Die Identifizierung des entsprechenden Rezeptors erfolgt anschließend durch Proteinreinigung und Expressions-Klonierung.

Die Strategie zur Funktionsaufklärung eines *orphan* Rezeptors bis hin zur Entwicklung von Wirkstoffen wird als „Reverse Pharmakologie“ oder „*Orphan* Rezeptor Strategie“ bezeichnet, um sie von der konventionellen Wirkstoffentwicklung zu unterscheiden.

Beide Strategien verwenden einen GPCR unbekannter Funktion als „Angelhaken“ zum „Fischen“ des spezifischen Liganden aus einem komplexen Gewebeextrakt (Abb.2A, S.13) bzw. einer definierten Bibliothek synthetischer (naturidentischer oder künstlicher) Substanzen (Abb.2B, S.13) (siehe Reviews Civelli *et al.*, 2001, Howard *et al.*, 2001, Wilson *et al.*, 1998).

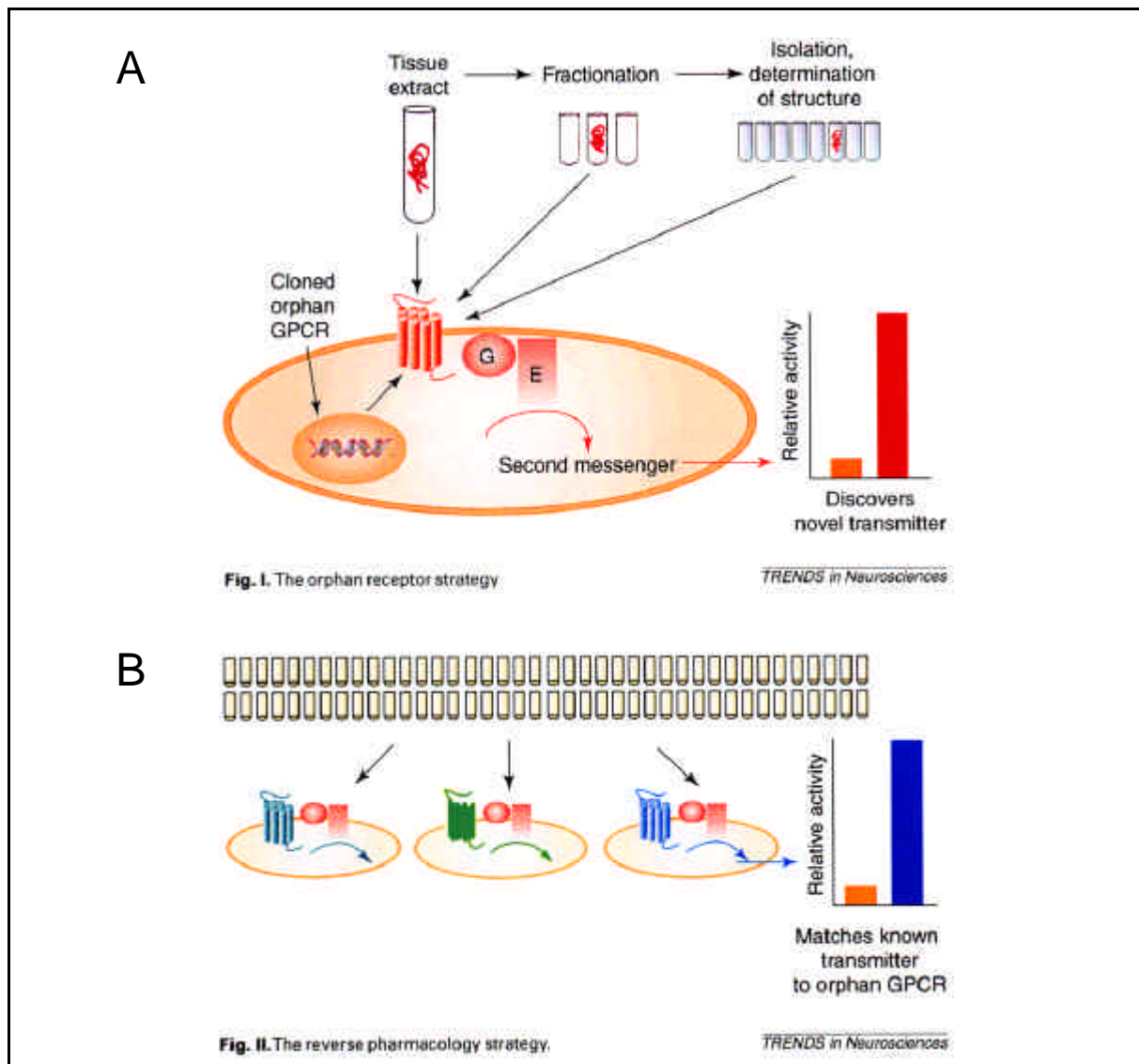


Abb.2 „Orphan Rezeptor Strategie“ (A) und „Reverse Pharmakologie“ (B). (aus Civelli *et al.*, 2001)

Während die chemische Struktur des Liganden in einer komplexen Gewebeprobe (z.B. Hirnextrakt) erst durch aufwendige Fraktionierung und Reinigung identifiziert werden muß, liefert eine synthetische Substanz-Bibliothek die schnellere und einfachere Zuordnung von Ligand und Rezeptor und hat sich daher in der industriellen Forschung durchgesetzt. Der Erfolg einer definierten Substanz-Bibliothek hängt unmittelbar von der Zusammensetzung der Testsubstanzen ab, bietet jedoch auch die Möglichkeit zur Entwicklung chemische Agonisten, ohne den natürlichen Liganden zu kennen.

Entscheidender Vorteil der Gewebe-Extrakte bleibt die Entdeckung bislang unbekannter, bioaktiver Liganden.

Letztendlich haben sowohl die „*Orphan* Rezeptor Strategie“ als auch die „Reverse Pharmakologie“ zu erfolgreichen Paarungen von Rezeptor und Ligand geführt und das Verständnis dieser Rezeptor-Superfamilie vorangetrieben. Der Serotonin 5-HT_{1A}- (Fargin *et al.*, 1988) und der Dopamin D₂-Rezeptor (Bunzow *et al.*, 1988) waren die ersten *orphan* GPCRs, deren Liganden mittels moderner, bioinformatischer und molekularbiologischer Methoden entdeckt wurden.

Die Tabelle 3, S.14 nennt einige Beispiele für Ligandenidentifizierungen in den letzten Jahren.

Tabelle 3 Beispiele für Ligandenidentifizierungen (1995-2001)

oRezeptor	Ligand	Methode	Funktion	Ref.
ORL-1	Nociceptin/ Orphanin FQ	cAMP Hirn Extrakt	Schmerz	Meunier <i>et al.</i> , 1995 Reinscheid <i>et al.</i> , 1995
edg2	LPA	Serum-Fraktionierung	Zelldifferenzierung	Hecht <i>et al.</i> , 1996
edg1	S1P	Serum-Fraktionierung	Zelldifferenzierung	Lee <i>et al.</i> , 1998
gpr14	Urotensin II	Ca ²⁺ Hirn Extrakt	Vasokonstriktion	Nothacker <i>et al.</i> , 1999 Ames <i>et al.</i> , 1999
OGR-1	SPC	Ca ²⁺ syntetischer Ligand	Proliferation Wundheilung	Xu <i>et al.</i> , 2000
gpr105	UDP-Glucose	Hefe syntetischer Ligand	unbekannt	Chambers <i>et al.</i> , 2000
PNR	„ <i>trace amines</i> “	Oozyten syntetischer Ligand	Neurotransmitter	Borowsky <i>et al.</i> , 2001

2. Physiologie G-Protein-gekoppelter Rezeptoren

2.1. Klassifizierung und übereinstimmende Charakteristika

Gemeinsames Strukturelement aller GPCRs ist die Faltung in sieben α -helikale Domänen (TM-I bis TM-VII, transmembranär), die die Plasmamembranen, jeweils verbunden durch drei intrazelluläre bzw. zytoplasmatische (C1-C3, engl. *cytoplasmatic*) und drei extrazelluläre (E1-E3) Schleifen, durchspannen (Abb.3, S.16). Arbeiten von Unger *et al.*, 1997 und Palczewski *et al.*, 2000 unterstreichen dieses Strukturmotiv mittels Kristallstrukturanalysen bei 9Å bzw. 2,8Å Auflösung am Beispiel des Rhodopsin-Rezeptors.

Trotz der Vielfalt der biologischen GPCR-Aktivatoren und nur gering ausgeprägter sequenzieller Ähnlichkeiten innerhalb der Superfamilie verfügen alle GPCRs über einen vergleichbaren Aktivationsmechanismus, der von Ligand-induzierten Konformationsänderungen innerhalb der TM-Domänen geprägt ist. Röntgenstrukturanalysen und umfangreiche Mutagenese-Studien haben ergeben, daß die Bindung eines extrazellulären Liganden eine relative Verschiebung von TM-III und TM-VI bewirkt. Infolgedessen resultiert eine Verlagerung von C2 und C3, die den Zugang intrazellulärer Bindungsstellen für G-Proteine ermöglicht (Bourne, 1997, Farrens *et al.*, 1996).

Unabhängig von diesem gemeinsamen TM-Domänen-Motiv bestimmt die Länge und Funktion der extrazellulär gelegenen N-terminalen und der intrazellulär gelegenen C-terminalen Domäne, sowie die Ausprägung der intrazellulären Schleifen C1-C3, die Spezifität eines GPCRs hinsichtlich des Liganden und der nachgeschalteten Signaltransduktionswege.

Im Rahmen posttranslationaler Modifikationen werden N-Glykosylierungen an spezifische Aminosäuren des N-Terminus angefügt; der intrazelluläre C-Terminus verfügt über mehrere Phosphorylierungs- und Palmitoylierungsstellen, die unmittelbar in die Signaltransduktion und in intrazelluläre Transportvorgänge involviert sind.

Basierend auf den Aminosäure-Identitäten der verschiedenen Rezeptoren, wird die GPCR-Superfamilie in fünf Hauptfamilien eingeteilt (siehe Review Bockaert & Pin, 1999). Der überwiegende Teil der GPCRs, incl. der Duft- und Geschmackstoff-Rezeptoren sowie des Rhodopsin-Rezeptors, gehört der Familie 1 mit den Unterfamilien a-c an. Allen Unterfamilien sind zwei konservierte Cystein-Reste in E1 und E2 gemein, die untereinander eine kovalente, stabilisierende Disulfidbrücke ausbilden. Ein weiteres Charakteristikum der Familie 1 ist die Aminosäure Aspartat (Asp) in TM-II und ein hochkonserviertes „DRY“- oder „ERW“-Motiv am Übergang von TM-III zu C2, welches in die Interaktion mit G-Proteinen an der zytoplasmatischen Seite der Plasmamembran involviert ist.

GPCRs der Familie 1a werden durch relativ kleine Liganden (z.B. Nukleotide, biogene Amine, Lipide etc.) aktiviert, deren Bindungstasche innerhalb der Plasmamembran, umgeben von den sieben TMs, liegt. GPCRs der Familie 1b und 1c binden kleine Peptide (z.B. Thrombin, Zytokine) bzw. Glykoprotein- Hormone (z.B. LH, TSH, FSH) und zeichnen sich durch die Involvierung des N-Terminus und der extrazellulären Schleifen an der Ligandenbindung aus. Etwa 1/3 der GPCRs aus Familie 1 sind derzeit *orphan* GPCRs.

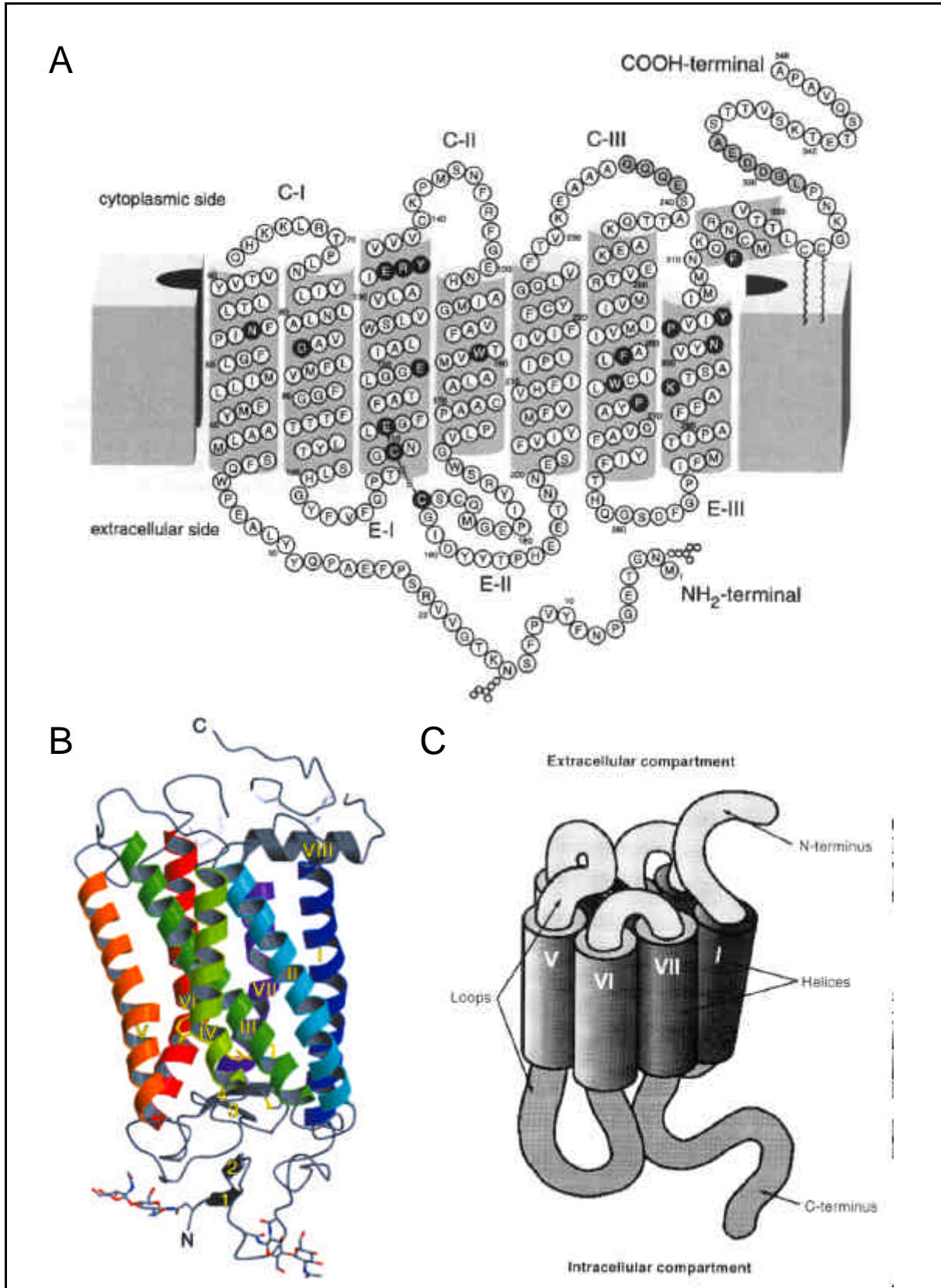


Abb.3 **GPCR-Transmembran Topologie am Beispiel des Rhodopsin-Rezeptors.** **A:** Zwei-dimensionale Darstellung, **B:** Darstellung der transmembranären α -Helices und **C:** Schematische 3D-Darstellung (**A+B** aus Palczewski et al., 2000, **C** aus Horn et al., 1998)

Die Sekretin/Glukagon-Rezeptorfamilie (Familie 2) stellt eine relativ kleine Gruppe von Neuropeptid- und Peptid-Hormon Rezeptoren dar, die ihre Liganden ähnlich der Familie 1b/c unter Beteiligung des N-Terminus bindet.

Familie 3 setzt sich zusammen aus den metabotropen Glutamat-Rezeptoren (mGluR), GABA_B (γ -Amino-Buttersäure)- und einer Gruppe von ca. 100 Pheromon-Rezeptoren. Charakteristikum dieser Rezeptorfamilie ist eine sehr große N-terminale extrazelluläre Domäne, die sequenzielle Ähnlichkeit zu periplasmatischen Transportproteinen in Bakterien zeigt.

Der Familie 4 werden weitere Pheromon-Rezeptoren (VNs) zugeteilt, und Familie 5 umfaßt letztendlich „frizzled“ und „smoothened“ Rezeptoren der Embryonalentwicklung und cAMP-Rezeptoren (cAR), deren Expression bislang jedoch nur in *D. discoideum* beobachtet wurde.

2.2. G-Protein-abhängige und -unabhängige Signaltransduktion

GPCRs bilden eine Superfamilie von plasmamembranständigen Proteinen, die zahlreiche externe Signale G-Protein-abhängig oder -unabhängig in das Zellinnere transduzieren können (siehe Review Hall 1999, Marinissen & Gutkind, 2001). Es wird angenommen, daß die GPCR-vermittelte Signaltransduktion die Lokalisation des Rezeptors in der Plasmamembran voraussetzt, von wo aus die Interaktion mit intrazellulären heterotrimeren (α , β , γ) G-Proteinen (kurz für Guanosin-bindendes Protein) erfolgt, die über Palmitylierungen und Myristylierungen (Wedegaertner *et al.*, 1995) als „Lipid-Anker“ an der zytoplasmatischen Seite der Plasmamembran gehalten werden.

G-Proteine werden, entsprechend der α -Untereinheiten, in vier Proteinfamilien eingeteilt: $G\alpha_s$ (incl. $G\alpha_{olf}$), $G\alpha_{i/o}$ (incl. $G\alpha_t$, $G\alpha_{gust}$ und $G\alpha_z$), $G\alpha_{q/11}$ (incl. $G\alpha_{14}$, $G\alpha_{15}$ und $G\alpha_{16}$) und $G\alpha_{12/13}$. Derzeit umfaßt die G-Protein-Familie 18 α -, 5 β - und 11 γ -Gene (Hildebrandt, 1997, Hamm & Gilchrist, 1996). Die Kristallisierung eines heterotrimeren G-Proteins durch Lambright *et al.*, 1996 und nicht zuletzt umfangreiche Mutagenesestudien (Wess, 1998, Kostenis *et al.*, 1999) haben wertvolle Einblicke in die molekularen Wirkmechanismen dieser heterotrimeren Proteine aufgezeigt.

Bei der G-Protein-abhängigen Signaltransduktion (Sprang, 1997, Sternweis, 1994, Hamm & Gilchrist, 1996) fungieren G-Proteine als molekulare Schalter zur Weitergabe eines externen Signals an intrazelluläre Effektoren: Die Aktivierung eines G-Proteins durch einen Ligand-besetzten Rezeptor fördert die Freisetzung von Guanosindiphosphat (GDP) und den Austausch zu Guanosintriphosphat (GTP) an der α -Untereinheit des G-Proteins, gefolgt von der Dissoziation zu α -GTP und $\beta\gamma$. Sowohl α -GTP als auch freies $\beta\gamma$ sind in Lage, zelluläre Effektorsysteme zu modulieren, wie z.B. die Adenylat- oder Guanylat-Zyklase, die cGMP-Phosphodiesterase, Phospholipasen sowie K^+ - oder Ca^{2+} -Ionenkanäle etc., welche letztendlich den biologischen Effekt vermitteln. Am besten charakterisiert ist derzeit die Aktivierung der Phospholipase-C (PLC) durch G-Proteine des Typs $G\alpha_q$ bzw. die $\beta\gamma$ -Untereinheit von $G\alpha_i$ und die Stimulation bzw. Inhibition der Adenylat-Zyklase durch G-Proteine des Typs $G\alpha_s$ bzw. $G\alpha_i$. Limitiert durch die intrinsische GTPase-Aktivität der α -Untereinheit und allosterische Wechselwirkungen mit RGS-Proteinen (*regulators of G-protein signalling*) (Wieland & Chen, 1999, De Vries & Farquhar, 1999) erfolgt die Reassoziaton von $G\alpha$ -GDP mit dem $\beta\gamma$ -Komplex und bringt den G-Protein-Aktivierungs-Zyklus zurück in den Grundzustand (Abb.4, S.18).

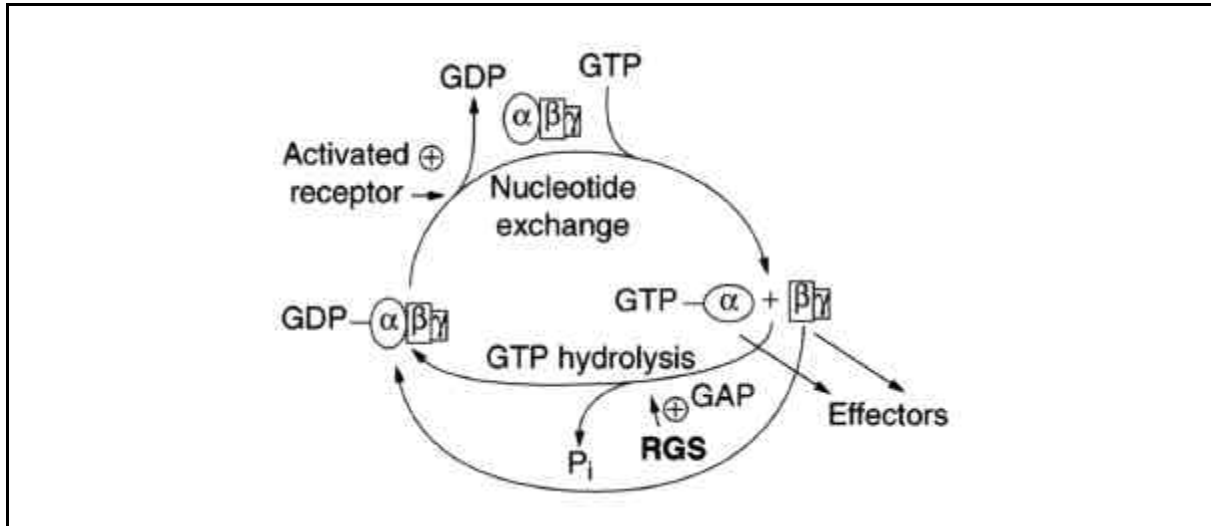


Abb.4 **Der G-Protein-Aktivierungs-Zyklus.** Beschreibung siehe Text (GDP: Guanosindiphosphat, GTP: Guanosintriphosphat, RGS: Regulator der G-Protein-Signaltransduktion, GAP: GTPase Aktivierendes Protein, P_i : Phosphat), übernommen aus De Vries & Farquhar, 1999

Eine stetig wachsende Zahl von Hinweisen hat in den letzten Jahren zu einer Modifizierung des ursprünglichen Verständnisses über die Physiologie von G-Protein-gekoppelten Rezeptoren geführt, wonach ein GPCR spezifisch mit nur einem Typ von G-Proteinen interagiert. GPCRs sind vielmehr in der Lage, zusätzlich mit unterschiedlichsten intrazellulären Proteinklassen zu interagieren und so ein hochkomplexes Signaltransduktionsnetzwerk mit zahlreichen Regulationsebenen aufzubauen (2.3., S.18). Neben der Ausbildung von funktionellen GPCR-Homo- und Heterodimeren werden funktionelle Interaktionen mit Rezeptor-Tyrosin-Kinasen, zytoplasmatischen Regulatorproteinen und Komponenten des Zytoskeletts beschrieben (siehe Reviews Selbie & Hill, 1998, Bockaert & Pin, 1999, Marinissen & Gutkind, 2001). GPCRs können mit Mitgliedern der PDZ- (Hall *et al.*, 1998), Homer- (Tu *et al.*, 1999) oder RAMP (*receptor activity modifying proteins*)- (Sexton *et al.*, 2001) Proteinfamilien interagieren, welche an entsprechende Motive des intrazellulären Rezeptor-C-Terminus binden und auf diese Weise modulierend auf die Rezeptor-Funktion einwirken.

2.3. Regulation der GPCR-Aktivität

Die Lokalisation eines GPCRs auf der Zelloberfläche bildet die Voraussetzung für die Reaktion einer Zelle auf die Stimulation durch einen spezifischen Liganden. Entgegen früherer Auffassungen stellt der Plasmamembran-Transport eines GPCRs nach seiner Synthese im Endoplasmatischen Retikulum (ER) keinen konstitutiven, sondern einen hochgradig regulierten Prozeß dar, und die Präsenz auf der Zelloberfläche ist das Ergebnis komplexer, dynamischer Vorgänge.

Beispielsweise zeigen Brismar *et al.*, 1998 die Rekrutierung von Dopamin D_1 -Rezeptoren vom ER zur Plasmamembran in einer proximalen Tubulus Zelllinie (LLCPK1) nach Inkubation mit einem D_1 -Agonisten oder einem Inhibitor des Dopamin-Metabolismus. Die Stimulus-abhängige Translokation von κ Opioid-Rezeptoren zu präsynaptischen Plasmamembranen in Vasopressin neurosekretorischen Neuronen (Shuster *et al.*, 1999) wirft ebenfalls ein komplett neues Licht auf Regulationsmechanismen der (Neuro-)Transmitter-Freisetzung.

Der Transport von Dopamin D_1 -Rezeptoren zur Zelloberfläche ist weiter reguliert durch ein ER-Membran assoziiertes Protein DRiR78, welches ein konserviertes „FxxxFxxxF“-Motiv im C-Terminus des Rezeptors bindet und als ER-Exportsignal fungiert. Die Überexpression von DRiR78 resultiert entsprechend in einer Zurückhaltung des D_1 -Rezeptors im ER (Bermak *et al.*, 2001). Des Weiteren haben Bermak *et al.*, 2002 konservierte hydrophobe Aminosäurereste im C-Terminus des D_1 -Rezeptors identifiziert, die eine funktionelle Assoziation mit der γ -Untereinheit eines COPI-Komplex *in vivo* ermöglichen, der relevant für den korrekten Transport zur Plasmamembran ist. Roche *et al.*, 1999 zeigen, daß der Plasmamembran-Transport des metabotropen Glutamat-Rezeptors mGluR5 durch direkte Protein-Protein-Interaktion mit dem zytoplasmatischen Protein Homer 1b (H1b) reguliert wird. So bewirkt die Bindung von H1b eine Retention des mGluR5 im ER von HeLa- und primären Purkinje-Zellen.

Die Expression funktioneller $GABA_B$ -Rezeptoren auf der Zelloberfläche erfordert die Heterodimerisierung von $GABA_{B1}$ - und $GABA_{B2}$ -Rezeptoren (Kaupmann *et al.*, 1998, Kuner *et al.*, 1999). Margeta-Mitrovic *et al.*, 2000 haben kürzlich gezeigt, daß die Expression der $GABA_{B1}$ -Rezeptor-Untereinheit auf der Zelloberfläche durch ein C-terminales „RXR(X)“-Retentions-Motiv verhindert wird, welches diese Rezeptoren im ER zurückhält. Erst die Heterodimerisierung von $GABA_{B1}$ - mit $GABA_{B2}$ -Rezeptoren maskiert dieses Motiv und schafft die Voraussetzungen für den Transport des funktionellen Heterodimers zur Plasmamembran (Pagano *et al.*, 2001).

Bislang ist nicht bekannt, ob das Regulationsprinzip aus Retention und Heterodimerisierung mit verwandten Rezeptoren (z.B. innerhalb einer Subfamilie), wie es beispielsweise bei den $GABA_B$ -Rezeptoren zutrifft, universell für die GPCR-Familie gültig ist.

Neben dem regulierten Transport eines GPCRs vom ER zur Plasmamembran können Agonist-abhängige und -unabhängige Mechanismen die Rezeptordichte auf der Zelloberfläche durch Rezeptor-Internalisierung und Runterregulation reduzieren, und somit die Rezeptor-Funktion maßgeblich beeinflussen (siehe Review Ferguson, 2001, Tsao, *et al.*, 2001, Bünemann, *et al.*, 1999, Zhang *et al.*, 1999).

Initiiert durch Agonist-vermittelte Konformationsänderungen im Rezeptor wird die Interaktion mit G-Proteinen ermöglicht (2.1., S.15), aber auch die Phosphorylierung durch GPCR-Rezeptor-Kinasen (GRK) an spezifischen Aminosäuren des zytosolischen C-Terminus und an den intrazellulären Schleifen gefördert (Bünemann & Hosey, 1999). Gefolgt von der Translokation zytosolischer β -Arrestine zur Plasmamembran binden β -Arrestine hochspezifisch an GRK-phosphorylierte GPCRs (Kovoor *et al.*, 1999) und vermitteln so die Rezeptor-Desensibilisierung durch sterische Entkopplung der GPCR/G-Protein-Interaktion. Gleichzeitig ermöglichen sie als Adapter die funktionelle Interaktion mit dem Protein Clathrin, das die Dynamin-abhängige oder -unabhängige Internalisierung zu intrazellulären Kompartimenten einleitet (Ferguson, 1996, Santini *et al.*, 2001) (Abb.5, S.20). Die Internalisierung eines Ligand-besetzten Rezeptors erfolgt in Form endozytischer Vesikel, die im Rahmen intrazellulärer Transport- und Sortierungsvorgänge sowie nach Dephosphorylierung und Dissoziation von Ligand und Rezeptor (Cornea *et al.*, 1999) zurück zur Zelloberfläche gelangen („Recycling“) - wo sie erneut aktiviert werden können - oder zu irreversibler, lysosomaler Degradation (Runterregulation) bestimmt sind.

Die Ergebnisse einer Arbeit von Shenoy *et al.*, 2001 deuten darauf hin, daß β -Arrestine nicht nur eine Adapter-Funktion für die Internalisierungsmaschinerie übernehmen, sondern ebenfalls direkten Einfluß auf die Rezeptor-Degradierung ausüben. β -Arrestine regulieren beispielsweise die Ubiquitinierung des β_2 -adrenergen Rezeptors (β_2 AR) durch E2 Ubiquitin-Ligasen (Stous & Govers, 1999). Darüber hinaus weisen die Ergebnisse einer Arbeit von Daaka *et al.*, 1998 darauf hin, daß die GPCR-Internalisierung funktioneller Teil des Aktivierungsprozesses sein kann, so bildet die Translokation des β_2 -adrenergen Rezeptors zu intrazellulären Kompartimenten der Zelle die Voraussetzung für die G-Protein-unabhängige Aktivierung einer Mitogen-aktivierten Protein-Kinase.

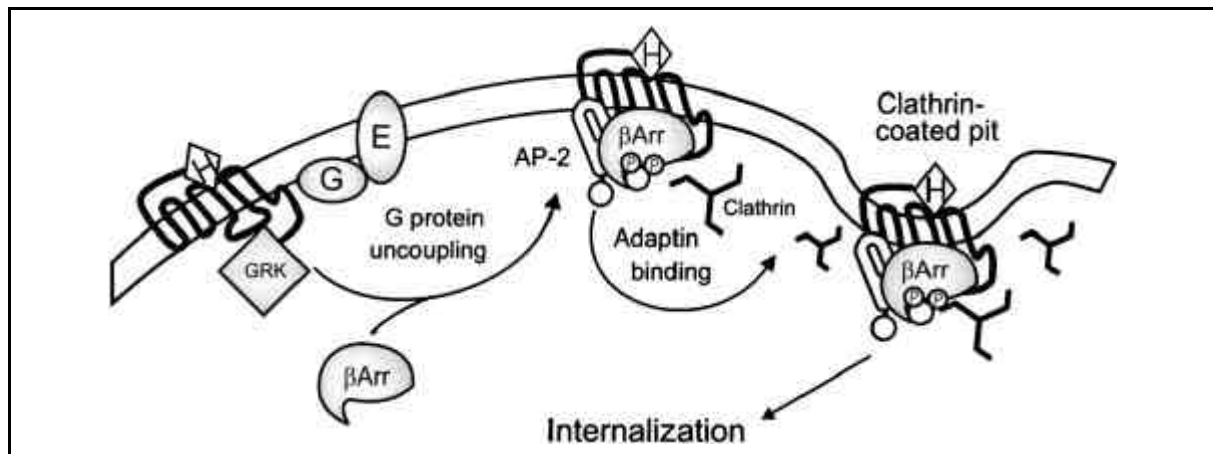


Abb.5 GRK- und β -Arrestin-abhängige GPCR-Desensitivierung und -Internalisierung. Beschreibung siehe Text (β Arr: β -Arrestin, GRK: GPCR-Rezeptor-Kinase, G: G-Protein, E: Effektor, AP-2: Adapter-Protein-2, H: Hormon), übernommen aus Ferguson, 2001.

Tatsächlich sind Internalisierungsvorgänge das Ergebnis sehr komplexer Regulationsmechanismen, die, ähnlich wie die GPCR-Signaltransduktion, auch ohne G-Protein-Beteiligung ablaufen können. Beispielsweise beschreiben Chen *et al.*, 2002 die Agonist-vermittelte Internalisierung des PAF (*platelet activating factor*)-Rezeptors als Ergebnis der β -Arrestin-Interaktion mit dem C-Terminus und einem „DPXXY“-Internalisierungsmotiv in TM-VII, und zwar unabhängig von der Aktivierung Rezeptor-assoziiierter G-Proteine. Untersuchungen der Internalisierung des muskarinischen Azetylcholin- (Schlador *et al.*, 2000) und des Parathormon (PTH)-Rezeptors (Villardaga *et al.*, 2001) sowie einer konstitutiv aktiven μ -Opioid-Rezeptor-Mutante (Trunc354) (Segredo *et al.*, 1997) unterstützen die Existenz G-Protein-unabhängiger Internalisierungsmechanismen. In diesem Zusammenhang beschreiben Klein *et al.*, 2001 die Blockierung der Agonist (Isoproterenol)-induzierten β_2 -Adrenozeptor-Internalisierung durch simultane Koexpression von Vasopressin V_2 -Rezeptoren in HEK293-Zellen und führen diesen Effekt auf eine β -Arrestin-vermittelte „Kreuzregulation“ zurück. Des Weiteren weisen die Ergebnisse mehrere Arbeiten darauf hin, daß Di-Leucin-Motive „LL“ (Leu-Leu) oder „LI“ (Leu-Ile) im C-Terminus von GPCRs eine wichtige Rolle in der Agonist-induzierten Rezeptor-Internalisierung (Gabilondo *et al.*, 1997) und in endosomal/lysosomalen Transportvorgängen spielen können (Marks, *et al.*, 1996, Schulein *et al.*, 1998, Nakamura & Ascoli, 1999, Preisser *et al.*, 1999). Die Existenz von Di-Leucin-Motiven zur Regulation intrazellulärer Transportprozesse ist nicht auf GPCRs limitiert. Beispielsweise zeigen Shewan *et al.*, 2000, daß auch der Insulin-abhängige Glukose-Transporter GLUT4 über ein entsprechendes funktionales LL-Motiv verfügt.

Im Gegensatz zu anderen plasmamembranständigen Rezeptoren, wie z.B. den Rezeptor-Tyrosin-Kinasen (RTK), für die die funktionelle Dimerisierung Teil des Aktivationsprozesses darstellt, wurden GPCRs lange Zeit als funktionelle Monomere angesehen. In den letzten Jahren hat die Komplexität der GPCR-Biologie durch Veröffentlichungen über Regulation und Signaltransduktion von GPCR-Homo- und Heterodimerisierung stark zugenommen. Es ist jedoch nicht eindeutig belegt, ob alle GPCRs Oligomerisierungs-Strategien teilen und ob gemeinsame Signale verwendet werden, die diese Assemblierungen gewährleisten (z.B. Retention im ER).

Beispielsweise bilden GABA_B-Rezeptoren funktionelle Heterodimere (Kaupmann *et al.*, 1998, Kuner *et al.*, 1999) und δ -Opioid- (Cvejic & Devi, 1997) und TRH-Rezeptoren (Kroeger *et al.*, 2001) funktionelle Homodimere. Jordan & Devi, 1999 analysieren ein κ/δ -Opioid-Rezeptor-Heterodimer mit komplett unterschiedlichen pharmakologischen Eigenschaften im Vergleich zu den entsprechenden Monomeren. Nicht zuletzt weisen die Ergebnisse von Cvejic & Devi, 1997 darauf hin, daß die Interkonversion zwischen dimeren und monomeren Opioid-Rezeptoren die Agonist-induzierte Internalisierung regulieren kann.

Da Dopamin D₂- und Somatostatin SSRT5-Rezeptoren ebenfalls funktionelle Heterodimere kreieren (Rochevill *et al.*, 2000), können auch Interaktionen zwischen einzelnen GPCR-Unterfamilien modulierend auf die GPCR-Signaltransduktion einwirken (Klinger *et al.*, 1998, Liu *et al.*, 2000). Darüber hinaus existieren Hinweise darauf, daß Wechselwirkungen zwischen GPCR- und RTK-Signaltransduktionskaskaden bestehen, die Agonist-unabhängige Modifikationen über „Transaktivierung“ ermöglichen („*receptor crosstalk*“). Daub *et al.*, 1996 berichten in diesem Zusammenhang von der Tyrosin-Phosphorylierung von EGF (*epidermal growth factor*)-Rezeptoren nach Stimulation von Ratten-1-Zellen mit den GPCR-Agonisten Endothelin-1, LPA oder Thrombin.

Die Eigenschaften von GPCRs können ebenfalls durch die Interaktion mit Zell-Oberflächenproteinen variiert werden. So binden P2Y₂-Rezeptoren über ein „RGD“-Motiv in der E1-Schleife an Integrin $\alpha_v\beta_3$. Mutationen dieses Motivs oder Integrin-Antikörper, die die Interaktion sterisch blockieren, führen zum nahezu kompletten Funktionsverlust des P2Y₂-Rezeptors gegenüber den Liganden UTP und ATP (Erb *et al.*, 2001). Li *et al.*, 2000 beschreiben die funktionelle Interaktion von Dopamin D₂-Rezeptoren mit dem Aktin-assoziierten Protein ABP-280. Das Zytoskelett-Protein ABP-280 bindet hochspezifisch an die C3-Schleife des D₂-Rezeptors und fördert dessen Signaltransduktion.

Zahlreiche zytoplasmatische, GPCR-bindende Regulatorproteine sind bislang entdeckt worden, die modulierende Eigenschaften auf die GPCR-Signaltransduktion besitzen. Cismowski *et al.*, 2000 identifizieren beispielsweise das monomere GTP-bindende Protein AGS-1 (*activator of G-protein signalling-1*) als Rezeptor-unabhängigen Aktivator von G α_i , der die GTP-Bindung durch direkte Interaktion mit G α_i *in vitro* fördert. Santagata *et al.*, 2001 liefern Hinweise auf die Funktion des Proteins *tubby* als membrangebundenem Transkriptions-Regulator, der über eine C-terminale „*tubby*-Domäne“ an Phosphoinositol-diphosphat (PIP₂) bindet und, initiiert durch die G α_q -vermittelte Phosphoinositol-Hydrolyse, zum Zellkern transportiert wird. Damit wird eine direkte Verbindung zwischen GPCR-Signaltransduktion und der Regulation von Genexpression aufgezeigt.

3. Die Rezeptoren gpr3, 6 und 12

Die humanen Rezeptoren gpr3, 6 und 12 wurden Mitte der 90er Jahre unabhängig voneinander in drei verschiedenen Arbeitsgruppen kloniert und gelten seither als *orphan* Rezeptoren.

Mit Hilfe degenerierter Oligonukleotid *primer* gelang Iismaa *et al.*, 1994 die partielle Klonierung einer bislang unbekanntem GPCR-Sequenz aus einer Ratten Insulinoma RINm5F-Zelllinie mit der Bezeichnung R4 (Acc. Nr.: L32829). Diese R4-Sequenz wurde unter gering stringenten Bedingungen gegen eine Reihe verschiedener humaner cDNA-Bibliotheken gescreent und führte zu der Klonierung eines 0,94 kb Fragments aus einer humanen Neuroblastoma cDNA-Bibliothek. Nach Vervollständigung der Rezeptorsequenz mit Hilfe einer Humangenom cDNA-Bibliothek wurde eine bislang unbekanntem humane GPCR-Sequenz (330 Aminosäuren) unter dem Namen gpr3 (Acc. Nr.: L32831) bei der GenBank/EMBL-Datenbank registriert.

Die Autoren ermittelten eine Konsensus-Sequenz für eine potentielle N-Glykosylierungsstelle im N-Terminus, zwei Konsensus-Sequenzen für cAMP-abhängige Protein Kinasen (PKA) und eine für Protein Kinase-C (PKC) im C-Terminus. Des weiteren schlossen Iismaa *et al.*, 1994 aufgrund des Fehlens der konservierten Aminosäure Asp in TM-III, die mit der Bindung kleiner Neurotransmitter-Liganden wie Adrenalin oder Azetylcholin in Verbindung gebracht wird, auf eine möglicherweise komplett neue Ligandenklasse. Die *orphan* Rezeptoren gpr3 (human) und R4 (Ratte) weisen auf dem Aminosäureniveau 87,5% Identität auf und werden daher als Homologe eingestuft. Gleichzeitig besteht eine 41- bzw. 54%-ige Sequenz-Identität von R4 und gpr3 zu dem Ratten *orphan* Rezeptor R334 (Acc. Nr.: U12184), der von Eidne *et al.*, 1991 aus der Ratten-Hypophyse kloniert wurde, und zu dem Maus *orphan* Rezeptor GPCR21 (Acc. Nr.: D21061) (Saeki *et al.*, 1993), der das Maus-Homologe zu R4 darstellt.

Eine radioaktiv markierte gpr3 mRNA-Sonde auf Grundlage des 0,94kb Fragments ergab in einer Northern Blot-Analyse eine dominante Präsenz im humanen Hirn und wesentlich schwächer in Lunge und Niere (Iismaa *et al.*, 1994). Auch der Rezeptor R334 und das Maus gpr3 Homologe GPCR21 zeigten dominierende Signale im ZNS (Eidne *et al.*, 1991, Saeki *et al.*, 1993). Mittels *in situ* Hybridisierung wurde der Gen-Lokus des humanen Rezeptors gpr3 auf dem Chromosom 1p34.4 bestimmt.

Zeitgleich zu Iismaa *et al.*, 1994 klonierten Marchese *et al.*, 1994a den humanen Rezeptor gpr3 aus einer humanen Hippocampus-cDNA und erkannten ebenfalls die Ähnlichkeit zu der Ratten R334-Sequenz (Eidne *et al.*, 1991). Im Gegensatz zu Iismaa *et al.*, 1994 lokalisierten Marchese *et al.*, 1994 das gpr3-Gen auf dem Chromosom 1p35-p36.1.

Unabhängig von der Iismaa- und der Marchese-Arbeitsgruppe klonierten auch Eggerickx *et al.*, 1995 den humanen Rezeptor gpr3 aus einer humanen Genombibliothek und identifizierten ihn als humanes Homologe des Maus GPCR21 (Saeki *et al.*, 1993). Im Gegensatz zu den Angaben von Iismaa *et al.*, 1994 postulierte diese Arbeitsgruppe keine PKA-, aber zwei PKC-Phosphorylierungsstellen in den zytoplasmatischen Domänen, sowie mehrere Ser und Thr Aminosäure-Reste als Zielsequenzen von GPCR-Rezeptor-Kinasen.

Die Autoren erkannten zum ersten Mal die nahe Verwandtschaft zu den *orphan* Rezeptoren edg1 (Hla & Maciag, 1990) und AGR16/edg5 (Okazaki *et al.*, 1993), den Cannabinoid-Rezeptoren (cbr) (Munroe *et al.*, 1993, Matsuda *et al.*, 1990) sowie zu *orphan* rCNL3.

Der Ratten-Rezeptor rCNL3 wurde von Song *et al.*, 1994 aus Ratten Zerebralcortex-cDNA kloniert und zeigte im Northern Blot eine dominante Expression im Ratten-Hirn (Striatum).

Die funktionelle Expression des Rezeptors gpr3 in COS-7-Zellen resultierte in einer dramatischen, konstitutiven Stimulation der Adenylat-Zyklase, und der Rezeptor erhielt daher die Bezeichnung hACCA (*human adenylate cyclase constitutive activator*). Eggerickx *et al.*, 1995 testeten eine Reihe potentieller Liganden, incl. verschiedener cbr-Agonisten, konnten jedoch keine Wirkungen feststellen. Da das reklonierte Maus-Homologe (mACCA = GPCR21) ebenfalls konstitutive Aktivität zeigte und sich dieser Effekt ebenfalls in weiteren Zelltypen reproduzieren ließ, schlossen die Autoren, daß diese Agonist-unabhängige Signaltransduktion nicht auf eine Punktmutation im humanen Rezeptor zurückzuführen sein konnte. Sie postulierten u.a. einen ubiquitären Liganden im Medium oder einen autokrin sezernierten Liganden als Ursache der Agonist-Unabhängigkeit. Ein RNase-Protektions-Assay zeigte die Expression des mACCA in ZNS sowie im Auge, im Testis und in den Ovarien und bestätigte die Ergebnisse von Saeki *et al.*, 1993.

Der humane Rezeptor gpr6 wurde von Heiber *et al.*, 1995 mittels degenerierter Oligonukleotid *primer* aus humaner Lymphozyten-cDNA kloniert und ergab eine bislang unbekannt GPCR-Sequenz von 362 Aminosäuren (Acc. Nr.: L36150). Ähnlich wie dem humanen gpr3, fehlt dem gpr6 die konservierte Aminosäure Asp in TM-III. Die Autoren beschrieben drei Konsensus-Sequenzen für N-terminale N-Glykosylierungen, eine PKA-Phosphorylierungsstelle im C2 und drei potentielle PKC-Phosphorylierungsstellen in C2, C3 und im C-Terminus. Gleichzeitig postulierten Heiber *et al.*, 1995 zwei Palmytylierungsstellen im C-Terminus.

Bioinformatische Sequenzvergleiche ergaben, daß der Rezeptor gpr6 mit einer 71%-igen Aminosäure-Identität der nächste Verwandte zu dem humanen *orphan* Rezeptor gpr3 (Marchese *et al.*, 1994) ist und hohe Ähnlichkeiten zum Maus-Rezeptor GPCR01 (Saeki *et al.*, 1993) und dem Ratten-Rezeptor R334 (Eidne *et al.*, 1991) aufweist. mRNA Transkripte des humanen gpr6 wurden per Northern Blot-Analyse im Putamen, Frontalcortex, Hippokampus und dem Hypothalamus detektiert, und als Gen-Lokus wurde das Chromosom 6p21-p21.1 bestimmt. Diese Arbeitsgruppe klonierte ebenfalls das gpr6 Ratten-Homologe (Acc. Nr.: U12006) mit einer 80%-igen Nukleotid-Identität zum humanen gpr6 und untersuchte dessen Expression per Northern Blot-Analyse und *in situ*-Hybridisierung im Ratten-Hirn (Marchese *et al.*, 1994b). Verglichen mit dem humanen Homologen, ergaben sich keine Unterschiede des Expressionsmusters im ZNS.

Das Auftreten differentiell regulierter Gene während der Entwicklung des Ratten-Cortex wurde von Chenn *et al.*, 2001 untersucht. In einem PCR-*differential display*-Ansatz wurde ein GPCR kloniert, der bereits als *orphan* rCNL3 bekannt war (Song *et al.*, 1994). Dieses gpr6 Ratten-Homologe ist postnatal temporär hochreguliert, und die Autoren interpretierten dies als eine Beteiligung dieses Rezeptors an der neuronalen Differenzierung.

Von der Arbeitsgruppe Song *et al.*, 1995 wurden mittels Cosmiden einer Humangenom-Bibliothek die humanen Homologe von gpr3, 6 und 12, jeweils ausgehend von den Ratten- bzw. Maus-Sequenzen, kloniert. Dabei wurde eine bis dahin unbekannt humane Rezeptor-Sequenz kloniert und als gpr12 (Acc.Nr.: U18548) bezeichnet.

Die Sequenz umfaßt 334 Aminosäuren und besitzt eine Aminosäure-Identität von 60% innerhalb der Rezeptorfamilie (gpr3, 6 und 12), was auf einen identischen Liganden hinweist. Darüber hinaus ermittelten Song *et al.*, 1995 eine sequenzielle Identität auf der Ebene der Primärsequenz gegenüber den Nager-Homologen von 93-, 88- bzw. 92%. Eine *in situ* Fluoreszenz-Hybridisierung ergab eine Chromosomen-Lokalisation der humanen Rezeptoren gpr3, 6 und 12 von 1p34.3-p36.1, 6q12 bzw. 13q12.

Die nahe Verwandtschaft der drei Rezeptoren untereinander, die höher ist als zu allen anderen GPCRs, deutet auf eine eigene GPCR-Subfamilie hin. Gleichzeitig impliziert die dominante Präsenz von gpr3-, 6- und 12-mRNA-Transkripten im Ratten-, Maus- und humanen ZNS physiologische, zentralneurologische Funktionen und einen Liganden mit neuromodulatorischen Eigenschaften. Bislang sind funktionelle Daten nur für das humane und Maus gpr3-Homologe beschrieben worden (Eggerickx *et al.*, 1995).

In einem TIPS-Review von Marchese *et al.*, 1999 werden die humanen *orphan* Rezeptoren gpr3, 6, 12 und edg6 (Acc. Nr.: AJ000479) als eigenständige, cbr-ähnliche Rezeptorfamilie klassifiziert. Yamazaki *et al.*, 2000 zeigen, daß der Rezeptor edg6 ein weiteres Mitglied der S1P-Rezeptorfamilie ist.

Die nahe Verwandtschaft von *orphan* gpr3, 6 und 12 zu Lipidrezeptoren (edg und cbr) deutet insgesamt auf einen Liganden mit Lipid-Charakter hin.

4. Aufgabenstellung

Moderne Klonierungstechniken sowie der Abschluß der Humangenom-Sequenzierung haben die Existenz einer Gruppe von ca. 150 bislang unbekannter GPCR-Sequenzen offengelegt. Die Zuordnung dieser *orphan* GPCRs zu ihren physiologischen Liganden und der damit verbundenen biologischen Funktionen ist eine große Herausforderung für die molekularbiologische Forschung. Private Forschungsinstitute, Universitäten und die Pharmaindustrie wetteifern um die Selektion der interessantesten Kandidaten und deren patentrechtliche Absicherung. Das „*de-orphaning*“ boomt seit Mitte der 90er Jahre und wird nicht zuletzt durch die kontinuierliche Weiterentwicklung zellulärer Testsysteme und die Verfügbarkeit sogenannter Substanz-Bibliotheken vorangetrieben. Letztendlich vereint der Prozeß der Ligandenidentifizierung Techniken aus Bioinformatik, Zell-/Molekularbiologie, Biochemie und Pharmakologie.

Im Zentrum dieser Arbeit stehen die humanen *orphan* Rezeptoren gpr3, 6 und 12. Bioinformatische Analysen im Vorfeld dieser Arbeit (Dr. Gassenhuber, Aventis Pharma, 2000, unveröffentlicht) zeigen eine große Ähnlichkeit zu den Rezeptoren der *endothelial differentiation gene* (edg)-Familie, die über die bioaktiven Lipid Mediatoren Sphingosin-1-Phosphat (S1P) und Lysophosphatidsäure (LPA) u.a. eine Reihe kardiovaskulärer Prozesse regulieren.

Die Herz-Kreislauf-Forschung von Aventis-Pharma Deutschland GmbH beschäftigt sich u.a. mit der molekularbiologischen und pharmakologischen Charakterisierung dieser kardiovaskulären Effekte. Die Zielsetzung dieser Arbeit ist daher die Antwort auf die Frage, ob auch die *orphan* Rezeptoren gpr3, 6 und 12 über bioaktive Lipide eine Relevanz im Herz-Kreislauf-System besitzen.

Die komplexe Aufgabenstellung wird in vier Teilaufgaben gegliedert:

1. Aufbau eines zellulären *second messenger*-Assays, der die funktionelle Charakterisierung von gpr3, 6 und 12 erlaubt und gleichzeitig die Möglichkeit zur Anwendung einer Substanz-Bibliothek im 96-well Format bietet. Die Kopplung von GPCRs an die Phospholipase-C (PLC) und die Quantifizierung Ligand-induzierter Ca^{2+} -Freisetzung mittels der *Fluorescent Imaging Plate Reader* (FLIPR)-Technologie gilt hierfür als valides Testsystem. Die Nutzung der PLC-Signaltransduktionskaskade erfordert gegebenenfalls den Einsatz promiskuitiver G-Proteine für die Umkopplung des natürlichen Signaltransduktionsweges an die Ca^{2+} -Antwort der Zelle (2., S.64).
2. Erstellung eines detaillierten Expressionsprofils von gpr3, 6 und 12 mit Schwerpunkt im humanen Herz-Kreislauf-System mittels mRNA- (RT-PCR, Northern Blot, RNA-Chip) und Protein-basierter (Western Blot, Zytoimmunfluoreszenz) Nachweismethoden. Die Gewinnung spezifischer RNA-Sonden und Peptidantikörper ist hierfür die Voraussetzung. Neben der qualitativen Untersuchung gesamter Organe (z.B. Herz, Niere) sollen auch isolierte Primärzellen (z.B. Kardiomyozyten, Endothelzellen, glatte Gefäßmuskelzellen, Blutplättchen) auf die Präsenz dieser Rezeptoren getestet werden (5., S.88).

3. Untersuchung differentieller Gen-Regulation in einem endothelialen Funktionsmodell (Scherstress) mittels RT-PCR- und Western Blot-Analysen. Da Scherstress-vermittelte Mechanismen hinsichtlich Inflammation und Apoptose protektiv auf die Pathogenese der Atherosklerose wirken, liefert dieses Modell Aussagen über eine mögliche Relevanz der Rezeptoren in der endothelialen Dysfunktion (6.3., S.104).
4. Spezifische Ausschaltung der gpr3-, 6- oder 12-Expression in Primärzellen (z.B. Endothelzellen) mittels Antisense Oligonukleotid (ASO)-Technologie und Charakterisierung der Auswirkungen hinsichtlich kardiovaskulärer Problemstellungen (z.B. endotheliale Dysfunktion) (6.4., S.107).

Zusätzliche interessante Aspekte, die sich aus den einzelnen Arbeitsschritten ergeben, werden in die Untersuchungen miteinbezogen.

III Material und Methoden

1. Molekularbiologische Methoden

1.1. Isolierung von Nukleinsäuren

1.1.1. RNA-Isolierung aus komplexen Organen

Die Isolierung von Gesamt-RNA aus komplexen Organen der Ratte erfolgt unter der Verwendung des „RNeasy Maxi-Protokolls für die Isolierung totaler RNA aus tierischen Geweben“ nach Angaben des Herstellers (Qiagen). Für die Isolierung von Gesamt-RNA aus Herzen wird das vom Hersteller empfohlene, modifizierte Protokoll mit einem zusätzlichen Proteinase K-Inkubationsschritt verwendet. Es werden Ausbeuten von 1-2mg bzw. 0,5-1mg Gesamt-RNA pro 700mg Nieren- bzw. 500mg Herzgewebe erhalten (Lagerung bei -80°C).

1.1.2. RNA-Isolierung aus isolierten Zellen

Gesamt-RNA proliferierender Zellen wird mit Hilfe des TRIZOL-Reagenz (GIBCO) nach Angaben des Herstellers isoliert (Protokoll für die Isolierung von RNA aus Monolayer-Kulturen).

Pro 10 cm² Kulturfläche werden Ausbeuten von 15-20µg Gesamt-RNA erhalten (Lagerung bei -80°C). Neben der spektroskopischen Quantifizierung (RATIO 1,8-2,0) dienen Ergebnisse von Gelelektrophorese und PCR-Reaktion als Qualitätskriterien für die isolierte Gesamt-RNA (Abb.6, S.27). DNA-Kontaminationen in Gesamt-RNA-Präparationen werden durch Negativ-Amplifikationen eines Standard-Haushaltsgens (z.B. GAPDH) ausgeschlossen.

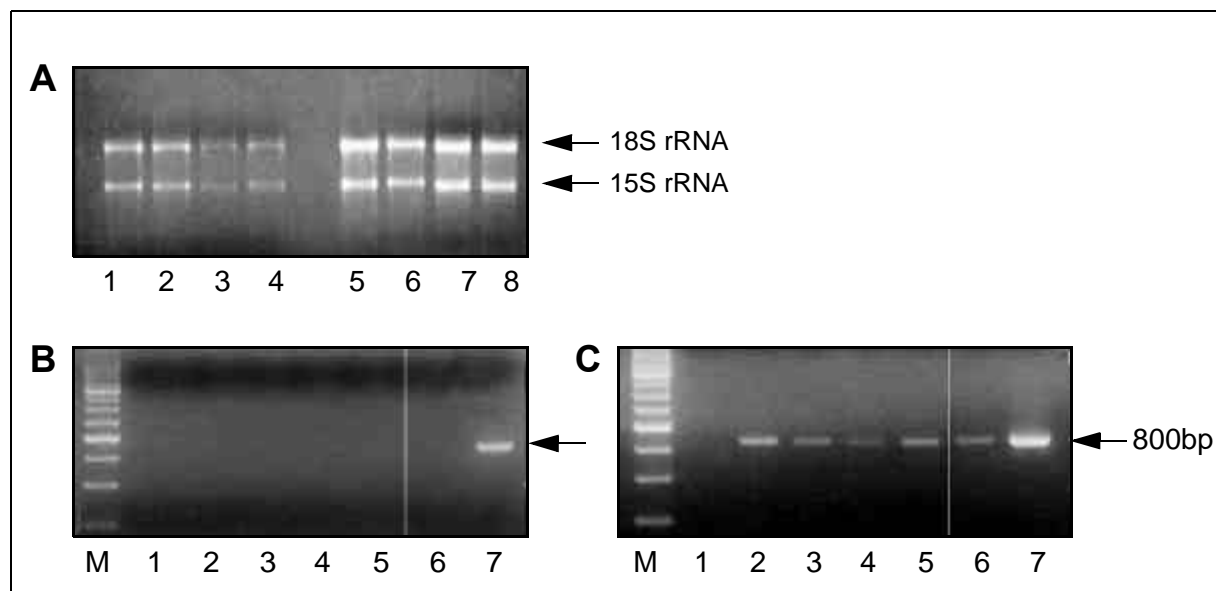


Abb.6 **Beurteilung von RNA-Qualität.** A: 500ng Gesamt-RNA (Proben 1-8) werden in einem 1% Agarose/Formaldehyd-Gel elektrophoretisch aufgetrennt und mit EtBr angefärbt. Amplifikation des GAPDH-Gens in Gesamt-RNA (B) und cDNA(C) am Beispiel eines HUVEC Scherstress (SS)-Experiments. Der negative Nachweis des Haushaltsgens GAPDH in 750ng Gesamt-RNA wird als Kriterium zum Ausschluß von DNA-Kontaminationen angesehen (B). Nach cDNA-Synthese kann mit Hilfe der GAPDH-primern das GAPDH-Gen amplifiziert werden (C) (M:250kb Standard, 1:1h SS, 2:2h SS, 3:4h SS, 4:8h SS, 5:12h SS, 6:KO, 7: GAPDH-Kontrolle).

1.1.3. Isolierung von Plasmid-DNA

Plasmidpräparationen aus *E.coli*-Übernachtskulturen werden standardmäßig mit Komplettsystemen der Firma Qiagen durchgeführt. Plasmide, die zur Herstellung stabiler Zelllinien vorgesehen sind (z.B. pEAK8), werden unter Endotoxin-freien Bedingungen isoliert.

Plasmid-DNA wird in TE-Puffer (10mM Tris, 1mM EDTA, pH=7,4) aufgenommen und bei 4°C bzw. -20°C gelagert.

Tabelle 4 verwendete Plasmide

Invitrogen Life Technologies, USA	pcDNA3.1, pcDNA1.1
Roche Diagnostics, Schweiz	pSPT18
Clontech Laboratories, USA	pTAdv, pEGFP-N3
Edge Biosystems, USA	pEAK8
Startagene Cloning Systems, USA	pCR-Script Cam(+)

Tabelle 5 RNA-Quellenangaben, Organe

Invitrogen Life Technologies, USA	Discovery line human normal brain mRNA, mouse testis total RNA
Aventis Pharma, Deutschland	Dahl Ratte (alt), totale RNA aus Hirn und Herz Wistar Ratte (jung), totale RNA aus Hirn
Prof. Böhm, Klinik III für Innere Medizin der Universität zu Köln	Gesamt-RNA aus Kardiomyozyten der Ratte (neonatal)

Tabelle 6 Material zur Isolierung von Nukleinsäuren

GIBCO RBL, Life Technologies, Eggenstein	TRIZOL Reagent
Qiagen GmbH, Hilden	RNeasy Maxi Präparation Kit, RNase-free DNase Set QIAfilter Maxiprep Kit QIAprep spin Miniprep Kit QIAfilter Maxiprep Kit, endotoxin-free
Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Deisenhofen	Proteinase K DEPC, 0,1% (v/v) DEPC in Millipore H ₂ O, autoklaviert

1.2. Polymerasekettenreaktion

Die PCR (*polymerase chain reaction*) (Mullis & Faloona, 1986) ist ein *in vitro*-Verfahren zur selektiven, enzymatischen Vermehrung einer DNA-Sequenz mit Hilfe thermostabiler DNA-Polymerasen (z.B. *taq*, *pfu*). Eine PCR ist eine Abfolge von 25-35 Zyklen, jeweils bestehend aus Denaturierung, Hybridisierung und DNA-Synthese.

Die Einsatzmöglichkeiten der PCR-Technologie sind vielfältiger Natur und reichen von qualitativen und quantitativen Nachweismethoden über Mutagenese, Markierungsreaktionen (z.B. Digoxigenin) bis zu Subklonierungen.

1.2.1. Standard-PCR

Routinemäßig wird der *Amplitaq Gold*-Polymerase Kit (Perkin Elmer) für PCR-Amplifikationen eingesetzt. *Taq*-PCR-Produkte können aufgrund einzelner 3'-A-Überhänge im Rahmen sogenannter PCR-Produkt-Klonierungen direkt in entsprechende TA-Klonierungsvektoren ligiert werden (1.5., S.33).

<u><i>Taq</i>-PCR-Ansatz (50µl):</u>	5µl 10 x <i>Amplitaq Gold</i> -Reaktionspuffer
	1µl <i>primer</i> (for) 10pmol/µl
	1µl <i>primer</i> (rev) 10pmol/µl
	100ng DNA <i>template</i>
	8µl dNTPs (je 1,25µmol)
	xµl H ₂ O
	0,5µl <i>Amplitaq Gold</i> -Polymerase (5U/µl)

Das *Amplitaq Gold*-PCR-Programm umfaßt folgende Schritte: 94°C 10min (Aktivierung und Denaturierung), 35 Zyklen à (94°C 1min, 60°C 1min, 72°C 1min), 72°C 10min, 4°C.

Die *Pfu*-Polymerase (Promega) wird aufgrund ihrer katalytischen 5'- und 3'-Exonukleasefunktion insbesondere für PCR-Amplifikationen eingesetzt, bei denen Punktmutationen bzw. Fehler bei der Amplifikation zu vermeiden sind (z.B. Gen-Klonierungen aus cDNA, Umklonierungen in Expressionsvektoren etc.). *Pfu*-PCR-Produkte weisen *blunt-ends* auf; für direkte PCR-Produkt-Klonierungen kommen spezielle *blunt-end*-Klonierungsvektoren zum Einsatz (1.5., S.33).

<u><i>Pfu</i>-PCR-Ansatz (50µl):</u>	5µl 10 x <i>Pfu</i> -Reaktionspuffer
	1µl <i>primer</i> (for) 10pmol/µl
	1µl <i>primer</i> (rev) 10pmol/µl
	100ng DNA <i>template</i>
	5µl dNTPs (2,5mM)
	xµl H ₂ O
	1µl <i>Pfu</i> -Polymerase (5U/µl), hot-start

Das *Pfu*-PCR-Programm umfaßt folgende Schritte: 95°C 2min (Denaturierung) 25 Zyklen à (94°C 1min, 50°C 1min, 72°C 3min), 72°C 10min, 4°C.

1.2.2. PCR-Screening

Im Gegensatz zum analytischen Restriktionsverdau wird beim *PCR-screening* die Anwesenheit eines *inserts* per PCR nachgewiesen: Eine Bakterienkolonie einer Selektionsplatte wird mit einer sterilen Pipettenspitze gepickt und in 10µl sterilem H₂O resuspendiert. 5µl dieser Bakteriensuspension werden in 2ml LB- bzw. 2YT-Medium überführt, um eine Übernachtskultur als Sicherheitskopie anzuzüchten; die verbleibenden 5µl werden als *template* in einer PCR-Reaktion eingesetzt.

Das Bandenmuster elektrophoretisch aufgetrennter PCR-Ansätze identifiziert Klone mit *insert* (z.B. Abb.7A, S.35).

<u>PCR-Screening-Ansatz (10μl):</u>	5 μ l Zellen in H ₂ O
	1 μ l 10 x <i>Taq</i> -Reaktionspuffer
	0,6 μ l MgCl ₂
	0,5 μ l <i>primer</i> (for) 10pmol/ μ l
	0,5 μ l <i>primer</i> (rev) 10pmol/ μ l
	0,1 μ l <i>Taq</i> -Polymerase (2,5U/ μ l)
	0,5 μ l dNTPs (2,5mM)
	1,5 μ l H ₂ O

Nach Lyse der Bakterien (3min, 94°C) werden 25 PCR-Zyklen à (1min 94°C, 1min 55°C, 1min 72°C) mit einer *Taq*-Polymerase durchgeführt.

1.2.3. Spezielle PCR-Anwendungen

Die Amplifikation GC-reicher DNA-Sequenzen gestaltet sich aufgrund starker intramolekularer Sekundärstrukturen meist schwierig, da entsprechende DNA-Moleküle bei konventionellen Schmelztemperaturen (94°C) nicht/kaum denaturieren und so ein effizientes *primer annealing* erschweren. Der GC-Melt Kit (Clontech) verbessert die Amplifikation GC-reicher Sequenzen durch Zusätze von Sekundärstruktur-destabilisierenden Reagenzen.

<u>GC-Melt-PCR-Ansatz (50μl):</u>	10 μ l 5x GC cDNA PCR Puffer
	10 μ l GC Melt (5M)
	1 μ l 50x dNTP Mix (je 10 μ M)
	2 μ l <i>primer</i> (for + rev) je 10 μ M
	1 μ l DNA <i>template</i>
	25 μ l H ₂ O
	1 μ l Advantage-GC cDNA Polymerase Mix (50x)

Eine PCR-Reaktion verläuft über 1min, 94°C (Denaturierung), 30 Zyklen à (94°C 30sec, 68°C 3min), 68°C 3min, 4°C.

1.2.4. Taqman-PCR

In einer Kollaboration mit Dr. Ali Ardati (Aventis Pharma, USA, ZNS-Forschung) ist die Expression der humanen Rezeptoren *gpr3*, *6* und *12* mit Hilfe spezifischer Taqman-Sonden in einem Echtzeit-RT-PCR-Ansatz (je 40 PCR-Zyklen à 95°C, 15sec, 60°C, 1min, 100nM Taqman Sonde, 50nM *primer*, 25 μ l Reaktionsansatz, PCR-Kit Perkin Elmer, Angaben Dr. Ardati) charakterisiert worden. Die Optimierung der Sonden, die Versuchsdurchführung sowie die Analyse der PCR-Daten ist durch Dr. Ardati erfolgt.

Tabelle 7 Taqman-Sonden für gpr3, 6 und 12

Name	Sequenz 5'-3'	mer
gpr3-KU37-for	GAG AGA CTC CCA CCA CGT ATC C	22mer
gpr3-KU38-rev	TGA CCA AGC TGG GTG ATG G	19mer
gpr3-Taqman Sonde	FAM-CCT CAC CCC CTC CAG ACC CCA A-TAMRA	22mer
gpr6-KU-39-for	TGT CCT CTC ACC AAC ACC ACA	21mer
gpr6-KU40-rev	AGA GTT CGT CAG CAG GCA CC	20mer
gpr6-Taqman Sonde	FAM-CCC AAC AAG CCA GCC TTT GGT AAG C-TAMRA	25mer
gpr12-KU35-for	ACG CCC ATC AGA TAG CCC T	19mer
gpr12-KU36-rev	TTT CCG GGT GGT CAC ATA GTG	21mer
gpr12-Taqman Sonde	FAM-CAG CAC CAC TTC CTG GCC ACG TC-TAMRA	23mer

1.2.5. RT-Reaktion und cDNA

Die RT-PCR-Technologie ermöglicht den sensitiven Nachweis von Genexpression auf der Ebene der Transkription. Im Rahmen dieser Arbeit wird der ProSTAR First Strand-RT-PCR-Kit zur Herstellung von cDNA aus Gesamt- oder poly-A⁺-mRNA-Präparationen verschiedener Quellen verwendet. mRNA (100ng poly-(A)⁺-mRNA bzw. 5µg Gesamt-RNA) wird hierbei durch die enzymatische Katalyse der MMLV-RT (*moloney murine leukemia virus reverse transkriptase*) mit oligo-d(T)₁₈-primern in cDNA umgeschrieben (1h 37°C, siehe Angaben des Herstellers).

5µl des cDNA-Ansatzes (50µl) dienen als *template* für folgende PCR-Reaktionen (1.2.1., S.29). Die umfangreichen Studien zur Gewebeverteilung sind durch kommerziell verfügbare humane cDNAs nicht-pathologischen Ursprungs ergänzt worden.

Tabelle 8 Material für PCR

Clontech Laboratories, USA	Advantage-GC cDNA Polymerase Mix, GAPDH-Sonde human smooth muscle Quick-clone cDNA human whole brain Quick-clone cDNA
Invitrogen Life Technologies, USA	human cDNA liver right lobe, human cDNA kidney, human cDNA fetal heart, human cDNA aorta, human cDNA heart, human cDNA left atrium, human cDNA left ventricle, human cDNA right ventricle, human cDNA right atrium
MBI Fermentas, St. Leon-Roth	<i>Taq</i> -DNA-Polymerase Kit, 2,5mM dNTPs
New England Biolabs, Schwalbach	oligo-(dT) ₁₈ <i>primer</i> , MMLV reverse transkriptase + MMLV 10x Reaktionspuffer
Perkin Elmer, Langen	<i>Amplitaq Gold</i> -Polymerase Kit, Gene Amp dNTPs, 1,25µmol stock
Promega, Mannheim	<i>pfu</i> -Polymerase + 10xPuffer
Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Deisenhofen	DMSO
Startagene Cloning Systems, USA	ProSTAR First Strand RT-PCR Kit

1.3. Gelelektrophoretische Auftrennung von Nukleinsäuren

Die elektrophoretische Auftrennung von Nukleinsäuren zwischen 50bp und mehreren Kilobasen erfolgt standardmäßig in 0,8-1,5%igen Agarosegelen. Für spezielle Anforderungen werden 4% NuSieve-Agarose-Gele (Bio-Whittaker) verwendet, die sich durch ein sehr hohes Auflösungsvermögen auszeichnen.

In dieser Arbeit werden Agarosegelelektrophoresen in horizontalen Flachbettgelen mit den entsprechenden Apparaturen durchgeführt (BioRad). Die Anfärbung von Nukleinsäuren erfolgt mit Ethidiumbromid (EtBr), das Agarose-Gel und Laufpuffer beigemischt wird. Die Auswertung der Bandenmuster erfolgt in einer Geldoc-Station unter UV-Licht ($\lambda=254-366\text{nm}$).

1.3.1. DNA

Agarose wird entsprechend der gewünschten Konzentration des Gels (0,8-1,5% bzw. 4%) eingewogen, in 1x TAE Puffer (40mM Tris-Azetat, 1mM EDTA) aufgenommen und in der Mikrowelle durch Aufkochen gelöst. Die flüssige Agarose wird auf ca. 50°C abgekühlt, mit 0,1µg/ml EtBr versetzt und in eine mit einem Kamm versehene Gelkammer gegossen. Nach ca. 15min wird das ausgehärtete Agarosegel in eine mit 1x TAE-Puffer (0,05µg/ml EtBr) gefüllte Elektrophoresekammer gelegt und der Kamm herausgezogen. DNA-Proben werden 1:5 mit Auftragspuffer versetzt und parallel zu Molekulargewichts-Standards aufgetragen. Die elektrophoretische Separierung wird für 30 bis 60min bei 100 V (RT) durchgeführt.

Es wird prinzipiell zwischen analytischen und präparativen Agarosegelen unterschieden. Zur Prüfung eines PCR-Ergebnisses oder eines Restriktionsverdaus wird ein analytisches Agarosegel mit 20µl-Proben eingesetzt; präparative Gele (50-100µl-Proben) dienen der Reinigung einer DNA-Bande durch anschließende Gelextraktion. Hierfür wird eine DNA-Bande unter UV-Licht aus dem Agarosegel ausgeschnitten und nach Angaben des Herstellers aus der Agarose extrahiert (Gel Extraction Kit, QIAGEN).

1.3.2. RNA

Die elektrophoretische Auftrennung von RNA erfolgt in MOPS/Formaldehyd-Agarosegelen (1-1,5% Agarose, 2% Formaldehyd). Bei der Herstellung des Gels sowie der Durchführung der Elektrophorese ist auf konsequent RNase-freies Arbeiten zu achten (ausgebackene Glasgefäße, *tray*, Kamm und Gelkammer mit RNA-Zap auswischen, DEPC-vorbehandeltes H₂O).

<u>MOPS/Formaldehyd-Agarose-Gel (100ml):</u>	1g Agarose
	90ml H ₂ O (RNase-frei)
	5ml 20x MOPS (400mM MOPS, 160mM NaOAc, 20mM EDTA, pH=7, autoklaviert in RNase-freiem H ₂ O)
	5ml Formaldehyd
	(1µl EtBr)

Die Agarose wird in 1x MOPS in der Mikrowelle aufgekocht, auf ca. 50°C abgekühlt, mit Formaldehyd versetzt und abschließend in eine mit einem Kamm versehene Gelkammer gegossen. Auf den Zusatz von EtBr wird für Northern Blots verzichtet. Das ausgehärtete Gel wird in eine Gel-Kammer mit 1x MOPS-Laufpuffer gelegt und der Kamm herausgezogen. RNA-Proben (5µg Gesamt-RNA bzw. 1µg Poly-(A)⁺-mRNA) werden 1:3 mit RNA-Ladepuffer (Sigma) versetzt, 10min bei 65°C denaturiert und anschließend auf Eis gestellt. Die Proben werden in die trockenen Gel-Taschen gefüllt und gegebenenfalls mit Ladepuffer aufgefüllt. Nach Einlaufen der Proben in das Gel (80V, ca. 5min) wird das Gel komplett mit 1x MOPS-Laufpuffer überschichtet. Die elektrophoretische Auftrennung der RNA-Proben erfolgt bei 80V für 1-2h bzw. bei 15V über Nacht unter Rühren des Laufpuffers. Bis zum Transfer der Gelbanden auf eine Nylonmembran verbleibt das Gel in der Gelkammer.

Tabelle 9 Material Elektrophorese

Bio-Whittaker, Belgien	Nusieve Agarose
BioRad Laboratories, USA	Ethidiumbromid Lösung (10mg/ml)
Eppendorff, Hamburg	50x TAE-Puffer
GIBCO BRL, Life Technologies, Karlsruhe	Agarose
MBI Fermentas, St. Leon-Roth	DNA Probenpuffer (6x) 1kb- 250bp-, 100bp-, 50bp-DNA-Leiter
Qiagen GmbH, Hilden	Gel Extraction Kit
Roche Diagnostics, Schweiz	DIG-markierte RNA-Marker II + III
Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Deisenhofen	RNA sample loading Buffer (3x) MOPS (3-(N-Morpholino)-Propansulfonsäure), 20x Stock-Lösung in H ₂ O (RNase-frei)

1.4. Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren

Eine wässrige Nukleinsäure-Lösung (RNA oder DNA) wird 1:100 oder 1:50 in H₂O verdünnt und die Extinktion bzw. optische Dichte (OD) in einem Spektral-Photometer (GeneQuant II, RNA/DNA Calculator, Pharmacia Biotech) bei $\lambda=260\text{nm}$ gegen reines H₂O bestimmt (Quarzküvetten). Das Verhältnis $\text{OD}_{260\text{nm}}/\text{OD}_{280\text{nm}}$ ist ein Kriterium für die Reinheit einer Probe, wobei Werte von 1,8-2,0 nahezu reinen Nukleinsäure-Lösungen entsprechen.

1.5. Subklonierung

Klonierungen bzw. Subklonierungen werden entsprechend molekularbiologischer Standardmethoden (Sambrook *et al.*, 1989) durchgeführt. Die Abb.8, S.37 gibt einen Überblick über im Rahmen dieser Arbeit hergestellte Konstrukte von gpr3, 6 und 12.

In einem präparativen Restriktionsverdau werden DNA-Fragmente bzw. Plasmide unter Erzeugung spezifischer 5'- und 3'-Enden geschnitten (50µl-Ansatz, 2h). Restriktionsverdauete DNA-Fragmente werden über ein präparatives Agarosegel aufgetrennt, durch Gelextraktion in hoher Reinheit zurückgewonnen und zur Ligation eingesetzt.

<u>Restriktions-Ansatz (50µl):</u>	1µg Plasmid-DNA
	Restriktionsenzym 1 (4U)
	Restriktionsenzym 2 (4U)
	5µl 10 x Restriktionspuffer, w/o BSA (100µg/ml)
	x µl H ₂ O

Entsprechend der Herstellerempfehlungen werden folgende Reaktionspuffer eingesetzt:

Restriktionsenzym (e)	verwendeter Puffer
<i>HindIII</i>	NEB2 + BSA
<i>HindIII/ XbaI</i>	NEB2 + BSA
<i>BamHI</i>	<i>BamHI</i> -Puffer + BSA
<i>EcoRI/BamHI</i>	<i>EcoRI</i> -Puffer + BSA <i>EcoRI</i> 1:10 in Diluent C <i>BamHI</i> 1:10 in Diluent A
<i>EcoRI/EcoRV</i>	<i>EcoRI</i> -Puffer + BSA

Katalysiert durch DNA-Ligasen werden kovalente Verknüpfungen zwischen 5'-Phosphat- und 3'-OH-Gruppen komplementärer 5'- und 3'- Enden zu einem Strang bzw. Ring hergestellt. Standard-Ligationen werden mit der T₄-DNA-Ligase und einem molaren Verhältnis Vektor:*insert* von 1:2 durchgeführt. Die Komponenten des Ansatzes werden auf Eis zusammenpipettiert, gemischt und über Nacht bei 16°C (ca. 16h) inkubiert. Der Einsatz einer *fast-link* DNA-Ligase (Epicentre Technologies) verkürzt die Ligationsreaktion auf 5min bzw. 15min bei *sticky* bzw. *blunt ends* (siehe Angaben des Herstellers). Nach Hitzeinaktivierung (10min, 65°C) wird der Ligationsansatz zur Transformation von kompetenten *E. coli*-Zellen eingesetzt (2.3., S.42).

<u>T₄-Ligase-Ansatz (20µl):</u>	1-2µl restriktionsverdaute Plasmid-DNA
	1-6µl restriktionsverdautes <i>insert</i>
	2µl T ₄ -DNA-Ligase 10x Puffer+ATP
	1µl T ₄ -DNA-Ligase (2,5U/µl)
	x µl H ₂ O

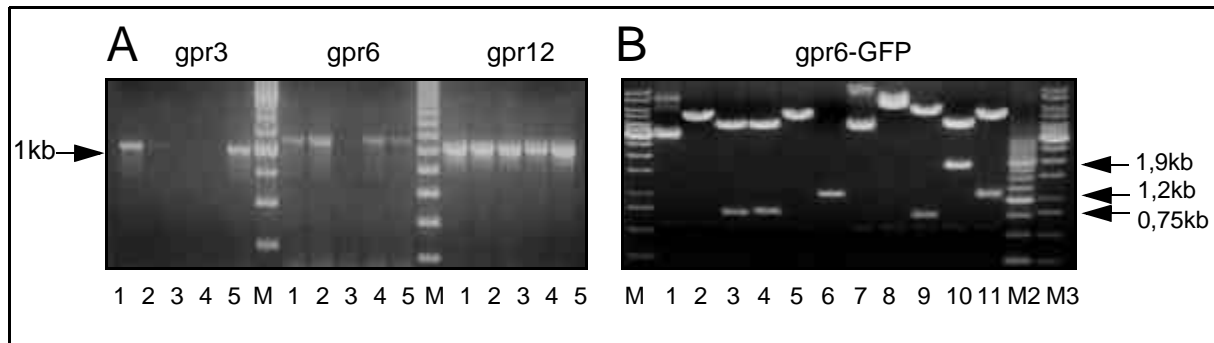


Abb.7 Nachweismethoden eines inserts. **A:** Identifizierung von Klonen im Vektor *pSPT18* per PCR-Screening. Je 5 Kolonien einer Selektionsplatte werden einem PCR-Screening unterzogen und die PCR-Ansätze anschließend elektrophoretisch aufgetrennt (M: 250bp Standard, 1-5: Klon 1-5). **B:** Restriktionsverdau-Analyse des *gpr6* in *pEGFP-N3* (M: 1kb Standard, 1: *pEGFP*, unverdaut, 2: *pEGFP*, *NotI*, 3: *pEGFP*, *NotI/BamHI*, 4: *pEGFP*, *NotI/EcoRI*, 5: *pEGFP*, *EcoRI/BamHI*, 6: *gpr6* PCR-Produkt (primer 29/31), 7: *pEGFP/gpr6*, unverdaut 8: *pEGFP/gpr6*, *NotI*, 9: *pEGFP/gpr6*, *NotI/BamHI*, 10: *pEGFP/gpr6*, *NotI/EcoRI*, 11: *pEGFP/gpr6*, *EcoRI/BamHI*, M2: 250bp Standard, M3: 1kb Standard).

Es existieren mehrere Methoden, um PCR-Produkte direkt nach ihrer Amplifizierung ohne einen vorherigen Restriktionsverdau effizient zu ligieren: *Taq*-PCR-Produkte (3'-A-Überhänge) werden mit Hilfe des TA-Klonierungs-Kit (Invitrogen) nach Angaben des Herstellers in den linearisierten, dephosphorylierten Vektor (pT-Adv) ligiert (14°C, 4-16h), anschließend in kompetente *E.coli*-Zellen transformiert und über Blau-Weiß-Selektion (LB-Platte mit 40µl X-Gal, 20mg/ml in DMF+Amp) selektioniert. *blunt-end Pfu*-PCR-Produkte werden mit Hilfe des pCR-Script Cam(+) (Stratagene) subkloniert. Die Ligation erfolgt für 1h bei RT, anschließend wird der Ligationsansatz hitzeinaktiviert, in kompetente *E.coli*-Zellen transformiert und auf Chloramphenicol (Cam) selektiert.

Analytischer Restriktionsverdau (20µl-Ansatz, 500ng DNA, 1h) oder PCR-Screening (1.2.2., S.29) werden zur Identifizierung von Plasmiden bzw. Klonen mit *insert* herangezogen (Abb.7, S.35).

Tabelle 10 Material Subklonierung

Clontech Laboratories, USA	TA-Cloning Kit pT-Adv
New England Biolabs, Schwalbach	<i>EcoRI</i> , <i>EcoRV</i> , <i>BamHI</i> , <i>XbaI</i> , <i>HindIII</i> + 10x Puffer T ₄ -Ligase + 10X Puffer
Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Deisenhofen	X-Gal, 20mg/ml Stock in DMF, -20°C
Stratagene Cloning Systems, Heidelberg	pCR-Script Cam(+) Ligation Kit
Epicentre Technologies, USA	Fast Link DNA Ligation Kit

1.6. Reinigung von Nukleinsäuren

1.6.1. Phenol-Chloroform-Extraktion

Eine wässrige DNA-Lösung (100-400µl) wird mit einem Volumen Roti-Phenol/Chloroform (Sigma) versetzt und nach der Phasentrennung (14000rpm, 3min, RT) sauber abgenommen, während die proteinhaltige Interphase und die untere organische Phase verworfen werden. Bei starker Proteinkontamination wird die Extraktion mit Phenol/Chloroform wiederholt.

In der wässrigen Phase gelöstes Phenol wird durch Zugabe eines Volumens Chloroform/Isoamylalkohol (24:1) extrahiert. Nach der Phasentrennung (s.o.) wird wiederum die obere, wässrige Phase abgenommen und enthaltene DNA durch Ethanol gefällt (1.6.2., S.36).

1.6.2. Ethanolfällung von Nukleinsäuren

Wässrige Lösungen von DNA oder RNA werden mit 1/10-Volumen 3M Natriumazetat, pH 5,2 und dem 2,5-fachen Volumen an eiskaltem 100%-igen Ethanol versetzt und mindestens eine Stunde bei -80°C oder über Nacht bei -20°C gekühlt. Präzipitate werden abzentrifugiert (30min bei 14000rpm, 4°C) und zur Reduktion verbleibender Salze mit 70% eiskaltem Ethanol (RNase-frei für RNA) gewaschen und erneut sedimentiert (s.o.). Der EtOH-Überstand wird komplett abgezogen und das Nukleinsäure-Pellet kurz an der Luft getrocknet. Abschließend werden die Nukleinsäuren in wässrigem Puffer (EB-Puffer für DNA bzw. H_2O (RNase-frei) für RNA) aufgenommen und bei -20°C (DNA) bzw. -80°C (RNA) gelagert.

Tabelle 11 Material zur Reinigung von Nukleinsäuren

Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Deisenhofen	Roti-Phenol/Chloroform Chloroform/Isoamylalkohol 24:1 Ethanol Natriumazetat, 3M pH=5,2, steril
--	---

1.7. DNA-Sequenzanalyse

Produkte aus PCR-Amplifikationen werden vor ihrer weiteren Verwendung, z.B. Umklonierung in Expressionsvektoren, sequenzanalytisch untersucht (Methode nach Sanger *et al.*, 1977).

500ng Plasmid-DNA oder 100pg eines PCR-Produkts (100-1000bp) werden entsprechend der Angaben des Herstellers (Perkin Elmer) einer Sequenzierreaktion per *cyle-sequencing*-PCR (25 Zyklen à (96°C 10sec, 50°C 5sec, 60°C 4min), 4°C) zugeführt und anschließend über Clean-up-columns (Qiagen) gereinigt. Die Sequenzanalyse erfolgt mit dem ABI PRISMTM-System und einer Kombination von vier verschiedenen Fluoreszenzfarbstoffen per Kapillarelektrophorese (Abi 310, Perkin Elmer).

<u>Sequenzierungs-Ansatz (20µl):</u>	500ng Plasmid-DNA oder 100pg PCR-Produkt
	4µl big dye Mix
	1µl <i>primer</i> for oder rev (10µmol)
	x µl H_2O

Tabelle 12 Material für DNA-Sequenzierung

Merck, Darmstadt	LiChrosolv H_2O
Perkin Elmer, Langen	big Dye Terminator Cycle Sequencing-Kit
Qiagen GmbH, Hilden	Clean-up-columns

Konstrukt	Restriktionsverdau	Klonierung	Kommentar	sonstige primer
fgpr3/pcDNA3.1	5'-HindIII, 3'-XbaI (1,0kb + 5,4kb)	Klonierung aus genomischer DNA		GTG GGG ACT DCT GGG TTC GGT GGC (KU1-For) AGG TCC GTG TCA CTG TTG TCT CT (KU3-rev)
fgpr6/pcDNA3.1	5'-HindIII, 3'-XbaI (1,2kb + 5,4kb)	Klonierung aus genomischer DNA		GCG TCC ACT CCG GCG CTG GCG ACG (KU5-For) GCA CCG CCA ACA GGG TCG GGC GC (KU7-rev)
fgpr12/pcDNA3.1	5'-HindIII, 3'-XbaI (1,1kb + 5,4kb)	Klonierung aus genomischer DNA		TTC CAG AAC CCG AGC CTG CGA GCA (KU9-For) AGG TAA ACG TGA CCG TCC TCT CC (KU11-rev)
fgpr3/pcDNA3.1	5'-HindIII, 3'-XbaI (1,0kb + 5,4kb)	Einfügen der Kozak-Sequenz (gpr3/pSPT18, pU-Polymerase), Ligation in pcDNA3.1 AMG CTT GCC ATG GCG TGG TTC TCA GCC GGC TCA (KU32-For)		
fgpr3/pSPT18	5'-HindIII, 3'-XbaI (1,1kb + 3,1kb)	Umklonierung aus gpr3/pcDNA3.1 (cod and paste)		
fgpr12/pSPT18	5'-HindIII, 3'-XbaI (1,2kb + 3,1kb)	Umklonierung aus gpr12/pcDNA3.1 (cod and paste)		
fgpr3/psPT18	5'-HindIII, 3'-XbaI (1,0kb + 3,1kb)	Klonierung aus Ratien Hm cDNA (Gc-MeH-RN), Ligation in pSPT18 AAG CTT ATG GCC TGG TTC TCA GCC GCG TCA (KU22-For) TCT AGA CTA GAC ATC ACT AGG GGA CCG GGA (KU24-rev)		TGG TCC TGC ACT TCG GTG CTG (KU28-For) GCC GTG GTG CTT GGC GCG TTT (KU27-For)
fgpr6/pSPT18	5'-HindIII, 3'-XbaI (1,2kb + 3,1kb)	Klonierung aus Ratien Hm cDNA (Gc-MeH-RN), Ligation in pSPT18 GGC GCG AAG CTT ATG AAC GAA GAC CCG AAG GTC AAT (KU17-For) GGC GCG TCT AGA CTA CAC ATC GCT GGG AGA GCG TCC (KU15-rev)	XbaI-DNAI-Methylierung	
fgpr3/pEAK8	5'-EcoRV, 3'-EcoRV (1,0kb + 6,2kb)	Änderung der Schnittstellen (gpr3/pcDNA3.1, pU-Polymerase), Ligation in pEAK8 GCG GAA TTC GCC ATG ATG TGG GGT GCA GGC (KU44-For) GCG GAT ATC CTA GAC ATC ACT GCG GGA GCG (KU48-rev)		
fgpr6/pEAK8	5'-EcoRV, 3'-EcoRV (1,2kb + 6,2kb)	Änderung der Schnittstellen (gpr6/pcDNA3.1, pU-Polymerase), Ligation in pEAK8 GCG GAA TTC GCC ATG AAC GCG AGC GCC GCG (KU48-For) GCG GAT ATC TCA GAC CTC GCT GGG AGA CCG TCA (KU52-rev)		
fgpr12/pEAK8	5'-EcoRV, 3'-EcoRV (1,1kb + 6,2kb)	Änderung der Schnittstellen (gpr12/pcDNA3.1, pU-Polymerase), Ligation in pEAK8 GCG GAA TTC GCC ATG AAT GAA GAC CTG AAG (KU52-For) GCG GAT ATC CTA CAC ATC ACT GCG CGA GCG (KU54-rev)		
gpr6-GFP	5'-EcoRV, 3'-BamHI (1,2kb + 4,7kb)	Änderung der Schnittstellen (gpr6/pcDNA3.1, pU-Polymerase), Ligation in pEGFP-N3 GCG GAA TTC GCC ATG AAC GCG AGC GCC GCG TCG CTC AAC G (KU29-For) GCG GGA TCC GAC CTC GCT BBB AGA GCT GGA ACG AAA GGG (KU31-rev)		
edg3-GFP	5'-EcoRV, 3'-BamHI (1,2kb + 4,7kb)	Änderung der Schnittstellen (edg3/pcDNA3.1, pU-Polymerase), Ligation in pEGFP-N3 GCG GAA TTC GCC ATG GCA ACT GCG CTC CCG CCG (edg3GFP-15) GCG GGA TCC GTT GCA GAA GAT CCC ATT CTG AAG (edg3GFP-1A3)		
gpr3(RSR->AAA)-GFP	5'-EcoRV, 3'-BamHI (1,2kb + 4,7kb)	Austausch des RSR-Motivs durch Alanine (AA 355-357) in gpr6-GFP AcaI-ACC CCG CCG TCT ACA CTT ACG BamHI-GGC GAT GGA TCC GAC CTC GCT GGG ACG gpc gpc ggc AAA GGG C (Mutagenese)		

Abb.8 gpr3, 6 und 12-Konstrukte. Die Umklonierung in pEAK8 ist von U. Stillger und die Herstellung des gpr6(RSR->AAA)-GFP-Konstruktes von S. Otto vorgenommen worden. Bis auf die pSPT18-Konstrukte enthalten alle inserts die Kozak-Sequenz (Kozak et al., 1986).

1.8. Northern Blot-Analyse

Die Herstellung sowohl Digoxigenin (DIG)-markierter *antisense* RNA-Sonden als auch die Detektion von RNA-Hybriden über eine Chemilumineszenz-Reaktion wird im Rahmen dieser Arbeit mit kommerziell verfügbaren Kits der Firma Roche durchgeführt. Protokolle werden den Arbeitsvorschriften des Herstellers entnommen.

1.8.1. Sondenherstellung

Die kodierenden Bereiche von *gpr3*, 6 und 12 werden in den Vektor pSPT18 (Roche) subkloniert (Abb.8, S.37), linearisiert, durch eine Phenol-Chloroform-Extraktion (1.6.1., S.35) gereinigt und in einer T7-RNA-Polymerase-katalysierten Reaktion mit DIG-Uracil markiert (*in vitro*-Transkription).

<u>Markierungsreaktion (20µl):</u>	1µg <i>template</i> -DNA (linearisiert)
	2µl NTP-Markierungs-Gemisch
	2µl 10x Transkriptionspuffer
	1µl RNase-Inhibitor
	xµl H ₂ O (RNase-frei)
	2µl T7-RNA-Polymerase

Der Reaktionsansatz wird auf Eis zusammenpipettiert und für 2h bei 37°C inkubiert. Zur abschließenden Degradierung des DNA-*templates* werden 2µl DNaseI, RNase-frei (15min, 37°C) und abschließend 2µl EDTA (0,2M, pH=8) zugesetzt. Der Markierungsansatz wird mit H₂O (RNase-frei) auf 100µl aufgefüllt (+76µl) und bei -80°C gelagert. Zur Quantifizierung der Markierung wird ein Tüpfel-Test (1.8.2., S.38) durchgeführt.

1.8.2. Tüpfel-Test

Die Ausbeute einer Markierungsreaktion wird mit Hilfe einer Verdünnungsreihe der DIG-markierten Sonde bestimmt (Tabelle 13, S.39).

Je 1µl der Verdünnungsstufen 5-12 (10pg/µl - 0pg/µl) werden parallel zur einer Kontroll-RNA (Roche Kontrollreaktion) auf eine 2,5x5cm Nylonmembran getropft. Die Membran wird durch Auflegen auf 2xSSC getränktes Whatmanpapier befeuchtet, die RNA durch UV-Crosslink fixiert und die DIG-Markierung über einen DIG-Antikörper (Roche) quantifiziert (1.8.4., S.40) (Abb.9, S.39).

Für eine Northern Blot-Hybridisierung werden 100ng DIG-markierter RNA-Sonde pro ml Hybridisierungslösung empfohlen.

Tabelle 13 Verdünnungsreihe Tüpfel-Test

Gefäß Nr.	RNA [μ l] aus Gefäß	DEPC-H ₂ O [μ l]	Gesamtvolumen [μ l]	Verdünnung	Endkonzentration
1	2 μ l aus Original/ Kontrolle	198	200	1:100	1ng/ μ l
2	15 μ l aus (1)	35	50	1:3,3	300pg/ μ l
3	5 μ l aus (1)	45	50	1:10	100pg/ μ l
4	5 μ l aus (2)	45	50	1:10	30pg/ μ l
5	5 μ l aus (3)	45	50	1:10	10pg/ μ l
6	5 μ l aus (4)	45	50	1:10	3pg/ μ l
7	5 μ l aus (5)	45	50	1:10	1pg/ μ l
8	5 μ l aus (6)	45	50	1:10	0,3pg/ μ l
9	5 μ l aus (7)	45	50	1:10	0,1pg/ μ l
10	5 μ l aus (8)	45	50	1:10	0,03pg/ μ l
11	5 μ l aus (9)	45	50	1:10	0,01pg/ μ l
12	0	50	50	-	0

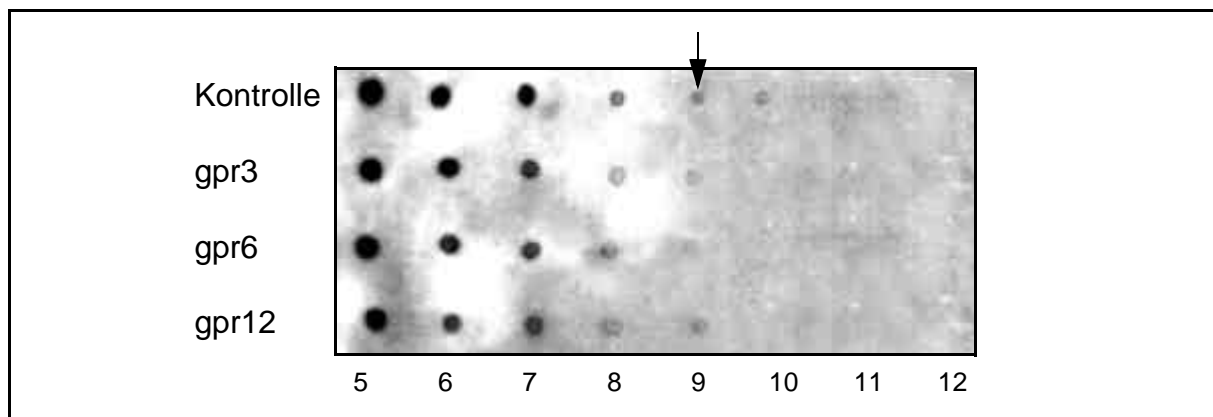


Abb.9 **Tüpfel-Test.** Detektion der DIG-markierten RNA-Sonden von *gpr3*, 6 und 12: Spot 5 (10pg/ μ l), Spot 6 (3pg/ μ l), Spot 7 (1pg/ μ l), Spot 8 (0,3pg/ μ l), Spot 9 (0,1pg/ μ l), Spot 10 (0,03pg/ μ l), Spot 11 (0,001pg/ μ l), Spot 12 (0pg/ μ l). Bei positiver Detektion des 0,1pg/ μ l Spots (Spot 9) kann von einer optimalen Markierungsausbeute von 100ng/ μ l ausgegangen werden.

1.8.3. Kapillarblot

Der Transfer elektrophoretisch separierter RNA-Banden (1.3.2., S.32) auf eine Nylon-Membran erfolgt durch einen Kapillarblot. Das Gel (9x15cm) wird zur Reduktion der Formaldehyd-Konzentration und Äquilibration in 20x SSC-Puffer inkubiert (10min, RT, Schütteln) und anschließend seitenverkehrt, mit der RNA-Seite nach unten, auf eine Brücke aus feuchtem Whatmanpapier (9x25cm) gelegt, welche beidseitig in ein Pufferreservoir aus 20x SSC-Transferpuffer eintaucht. Luftblasen werden mit einer sterilen Plastikpipette entfernt. Auf das Gel werden nacheinander eine Nylon-Membran (9x15cm), 3 Stücke Whatmanpapier (9x15cm), ein ca. 10cm-Stapel saugfähiges Haushaltspapier (ca. 10x16cm), eine

Glasplatte und ein 500g Gewicht geschichtet. Der Transfer erfolgt über Nacht (ca. 16h) bei RT. Nach UV-Crosslink der RNA auf der Membran (beidseitig) und kurzem Waschen in H₂O (RNase-frei) wird die Membran in Plastikfolie eingeschweißt und bis zur Hybridisierung bei 4°C gelagert.

1.8.4. Hybridisierung und Detektion

Die DIG-markierte-RNA-Sonde (100ng/ml Hybridisierungslösung = 1µl Sonde/ml bei Detektion des Spot Nr.9) wird zur Zerstörung von RNA-Sekundärstrukturen 5min bei 100°C in einem PCR-Block denaturiert (Verdünnung in H₂O (RNase-frei) zur Reduktion von Kondensationsverlusten), im Eisbad abgekühlt und anschließend in Hybridisierungslösung (DIG Easy Hyb, 68°C) in einer DEPC-behandelten und autoklavierten Hybridisierungsröhre (mit Hilfsmembran, 10x15cm) eingesetzt (Tabelle 14, S.40).

Die Detektion von RNA-Hybriden erfolgt nach mehreren Waschschritten über eine Chemilumineszenz-Reaktion des Substrats CPD-Star. Prinzip des Nachweises ist die enzymatische Dephosphorylierung von Antikörper-RNA-Konjugaten durch die Alkalische Phosphatase und die Ausbildung eines metastabilen Phenolat-Anions, welches beim Zerfall detektierbares Licht der Wellenlänge $\lambda=477\text{nm}$ emittiert.

Tabelle 14 Detektion des Northern Blots

Prähybridisierung	68°C, 30min	DIG Easy Hyb (15ml)
Hybridisierung	68°C für 16h	100ng RNA-Sonde/ ml (denaturiert) in DIG Easy Hyb (7ml)
<i>low-stringency</i> Waschen	2x5 min, RT	2xSSC, 0,1% SDS in H ₂ O (RNase-frei) (15ml)
<i>high-stringency</i> Waschen	2x15min, 68°C	0,1xSSC, 0,1% SDS in H ₂ O (RNase-frei) (15ml)
Äquilibration	2min, RT	DIG-Waschpuffer (15ml)
Blocken	30min, RT	DIG-Block-Puffer (15ml)
Inkubation	30min, RT	Anti-DIG 1:10000 in DIG-Block-Puffer (20ml) (AK-Aggregate vorher sedimentieren, 5min, 13.000rpm)
Waschen	2x15min, RT	DIG-Waschpuffer (15ml)
Äquilibration	5min, RT	Detektionspuffer (15ml)
Detektion	5min, RT	CDP-Star 1:100 in Detektionspuffer (0,5-1ml)

Für die Detektion wird die Membran aus der Hybridisierungsröhre herausgenommen und zusammen mit dem Chemilumineszenz-Substrat luftblasenfrei in Klarsichtfolie eingeschweißt. Die Detektion des Chemilumineszenz-Signals erfolgt an der Canon-Geldoc-Station (15sec-10min Exposition).

1.8.5. Herunterwaschen von RNA-Sonden (*strippen*)

Das Herunterwaschen von RNA-Sonden von der Membran erfolgt unter denaturierenden Bedingungen (50% Formamid, 5% SDS, 50mM Tris/HCl) während 2 x 60min Inkubation in einem Schüttelwasserbad bei 80°C. Anschließend wird die Membran kurz in 2xSSC gewaschen und kann erneut zur Hybridisierung verwendet werden.

Die Vollständigkeit des Herunterwaschens wird durch negativ-Detektion überprüft.

Tabelle 15 Material für Northern Blot

Clontech Laboratories, USA	multi-tissue Northern blot, human cardiovascular Northern blot, human
GIBCO RBL, Life Technologies, Karlsruhe	RNase Away
Roche Diagnostics, Schweiz	DIG RNA Labeling Kit (SP6/ T7) DIG Easy Hyb DIG Wash and Block Buffer Set Anti-DIG-AP, CDP-Star DIG-RNA molecular weightmarkers II + III Nylon Membranes, positively charged β -actin Sonde, DIG-markiert
Sigma-Aldrich Chemie, Deisenhofen	10% SDS, DNase-, RNase free 20xSSC, DNase- and RNase-free Tris 1M

2. Mikrobiologische Methoden

2.1. Kultivierung von *E.coli*

Zum Zweck der Plasmidpräparation werden 2,5ml bzw. 100ml Medium (Tabelle 16, S.41) incl. entsprechender Selektionsantibiotika (Tabelle 17, S.41) mit einzelnen *E.coli*-Klonen einer Selektionsplatte angeimpft und über Nacht kultiviert (37°C, 250rpm). Alternativ erfolgt das Animpfen mit 50 μ l einer Glycerinkultur des entsprechenden Klons (2.2., S.41) bzw. 5 μ l eines frischen Transformationsansatzes (2.3., S.42).

Tabelle 16 Medien für *E.coli*

LB-Medium / Liter:		2YT-Medium / Liter:	
NaCl	10g	NaCl	5g
Bacto-Trypton	10g	Bacto-Trypton	16g
Bacto-Yeast	5g	Bacto-Yeast	10g
für Festmedien werden 15g/l Agar zugegeben, autoklavieren		für Festmedien werden 15g/l Agar zugegeben, autoklavieren	

Tabelle 17 Antibiotika

Ampicillin	50 mg/ml in H ₂ O, -20°C (1:500)
Kanamycin	25mg/ml in H ₂ O, -20°C (1:500)
Chloramphenicol	50mg/ml in EtOH, -20°C (1:500)

2.2. Konservierung von *E.coli*-Klonen

Glycerinkulturen eines *E.coli*-Klons werden durch die Resuspension von 500 μ l Übernachtskultur in 1ml sterilem 87%-igen Glycerin angelegt. Die Lagerung erfolgt in 2ml Cryo-Röhrchen bei -20°C.

2.3. Transformation von *E.coli*

100µl kompetente *E.coli*-Zellen (DH5α, HB101 oder MC1061) werden auf Eis aufgetaut, mit 100ng Plasmid-DNA oder 5µl eines Ligationsansatzes versetzt und 30min auf Eis inkubiert. Nach einem Hitzeschock (42°C, 45sec) wird der Ansatz für 2min auf Eis gestellt, anschließend in 400µl LB-Medium überführt und 60min bei 37°C, 250rpm geschüttelt. 50-200µl des Ligationsansatzes werden auf Selektions-Agarplatten ausgestrichen und über Nacht bei 37°C inkubiert.

Tabelle 18 Material für *E.coli*

Difco Laboratories, USA	Agar Trypton Bacto-Yeast
Invitrogen Life Technologies, USA	Library efficiency <i>E.coli</i> DH5α competent cells <i>E.coli</i> HB101(competent cells) <i>E.coli</i> MC1061, P3 episom (competent cells)
Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Deisenhofen	Kanamycin Ampicilin Chloramphenicol

3. Zellbiologische Methoden

3.1. Kultivierung von Säugerzellen

3.1.1. Immortalisierte Zelllinien

Die Kultivierung und Anzucht von Säugerzellen erfolgt nach dem Standardprotokoll bei 37°C, 5% CO₂ und 95% RH in einem Brutschrank.

HEK293-Zellen werden zur Verbesserung der Adhäsion auf Poly-D-Lysin beschichteten Oberflächen kultiviert (Poly-D-Lysin-Lösung, 0,01%, 30min, 37°C, anschließend 3 x Waschen mit PBS).

Tabelle 19 Medien

CHO-Zellmedium		HEK293-Zellmedium	
Iscove Basalmedium	500ml	DMEM + Glutamax	500ml
FCS	50ml	FCS	50ml
Gentamycin (500x)	0,5ml	Penicillin/Streptomycin	5ml
0,2M L-Glutamin	5ml	1M HEPES pH=7,0	12,5ml
Penicillin/Streptomycin	5ml	sterilfiltrieren (0,2µm)	
sterilfiltrieren (0,2µm)			
Freezing-Medium		HEK293 (PSC)-Zellmedium	
FCS	90%	DMEM + Glutamax	500ml
DMSO	10%	FCS	50ml
		1M HEPES pH=7,0	12,5ml
		Penicillin/Streptomycin	5ml
		G418	5ml
		(Puromycin (500x))	500µl
		sterilfiltrieren (0,2µm)	

Tabelle 20 Kultivierte Zelltypen

human embryonic kidney (HEK293) chinese hamster ovary (CHO-K1)	ATTC, USA
PEAK stable cells (PSC)	Edge Biosystems, USA

3.1.2. Primärzellen

Primäre venöse Endothelzellen aus humanen Nabelschnüren (HUVEC) werden in EBM Bullet Medium (Clonetics) mit Hydrocortison (1µg/ml), Rinderhirnextrakt (3µg/ml), Gentamycin (50µg/ml), Amphotericin B (50µg/ml), epidermalem Wachstumsfaktor (10µg/ml) und 5% fötalem Kälberserum (FCS) auf Collagen-I-beschichteten Oberflächen (0,02% HOAc/ 1% Collagen I, 30min bei RT, anschließend 3 x Waschen mit PBS) in einem 37°-Brutschrank (5% CO₂, 95% RH) kultiviert .

Zum Passagieren werden die Zellen unter Verwendung eines Detach-Kits (Clonetics) trypsiniert und die Zellzahl bestimmt (Casy Zellcounter). Nach Sedimentation (10min, 1000g, RT) werden die Zellen in der gewünschten Zelldichte in frischem, angewärmten Medium aufgenommen und ausgesät.

Für die Kultivierung von HAoSM, HPASM und HCASM (Promocell) wird das vom Vertreter empfohlene SMG-2-Medium (Promocell) verwendet.

Tabelle 21 Primärzellen

Human umbilicus vein endothelial cells (HUVEC)	Marienkrankenhaus, Frankfurt (präpariert von E. Kessler bzw. A. Hullmann)
Human coronary artery smooth muscle cells (HCASMC) Human pulmonary artery smooth muscle cells (HPASMC) Human Aorta smooth muscle cells (HAoSMC)	Promocell GmbH, Heidelberg

Konfluente Kulturen von HMVEC-L (EGM-2 MV-Medium, Promocell), HPAEC (ECGM-Medium, Promocell), HCAEC (EGM-2-Medium, Promocell) werden freundlicherweise aus dem Labor Dr. Wohlfart (Aventis Pharma, DG Herz-Kreislauf) zur Verfügung gestellt.

3.2. Einfrieren und Auftauen von Säugerzellen

Eine subkonfluente Monolayer-Kultur wird 2x mit PBS gewaschen und mit Trypsin/EDTA komplett abgelöst (5min, 37°C). Die Zellen werden in 10ml Medium aufgenommen und durch Zentrifugation (10min, 1000rpm) sedimentiert. Das Zellpellet wird in 2ml (pro T75) 90%FCS/10% DMSO (*freezing-Medium* (Tabelle 19, S.42) durch mehrfaches Auf- und Abpipettieren resuspendiert und á 1ml Aliquots in sterile Cryovials (Nunc) überführt. In Cryo-Containern (Nalgene) werden die Zellen langsam auf -80°C abgekühlt und nach 24h in einen N₂-Tank umgelagert.

Zum Auftauen von N₂-Kulturen werden die Zellen im Cryovial (Oberflächendesinfektion) schnell in einem 37°C-Wasserbad aufgetaut und in warmem, frischem Medium aufgenommen. Zur Reduktion der DMSO-Konzentration werden die Zellen durch Zentrifugation sedimentiert (10min, 1000rpm), wiederum in warmem, frischem Medium resuspendiert und in einer Zellkulturflasche ausgesät. Nach 24h wird erneut das Medium gewechselt, um DMSO-Rückstände und tote Zellen zu entfernen.

Tabelle 22 Material Zellkultur

Biochrom KG, Berlin	fetal calf serum Iscove Basalmedium
Clonetics/ BioWhittaker, USA	EGM Bullet Medium Kit + Supplements Reagent Pack: HBSS, Trypsin, Trypsin-Inhibitor
Collaborative biomedical Products, USA	Collagen Typ1, rat
Edge Biosystems, USA	Puromycin (1mg/ml)
GIBCO RBL, Life Technologies, Eggenstein	Dulbecco's Eagle Medium (DMEM) ohne Natriumpyruvat mit 4500mg/l Glucose mit Pyridoxine, 1M HEPES pH=7,0, Penicillin /Streptomycin (10000 IU/ml - 10000µg/ml), L-Glutamin (200mmol/l), Trypsin (mg/ml), PBS Dulbecco's w/o calcium and magnesium w/o sodium bicarbonate
Nalgene Nunc, USA	Cryo 1°C freezing container (-1°C/min)
PAN Biotech, Aidenbach	FCS charcoal stripped (FCSCS)
Promocell GmbH, Heidelberg	Smooth muscle cell growth medium-2 (SMG-2)
Roche Diagnostics, Schweiz	Gentamycin 500x (25mg/ml)
Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Deisenhofen	DMSO Poly-D-Lysin Lösung

3.3. Transfektion von Säugerzellen

3.3.1. Transiente Transfektion von Plasmid-DNA

CHO- oder HEK293-Zellen werden in geeignete Kulturschalen ausgesät (Tabelle 23, S.44) und nach Erreichen von 30-50% Konfluenz (nach ca. 16h) nach Angaben des Herstellers mit Hilfe lipidartiger Transfektionsmittel (*uptake-enhancer*) transfiziert. Das Transfektionsmittel FuGENE6 (Roche) wird für HEK293-Zellen verwendet, während LipofectAMINE (GIBCO) für CHO-Zellen eingesetzt wird. Die Inkubationszeit der Zellen mit dem Transfektionsgemisch beträgt je nach Angaben der Hersteller 4h-16h.

Tabelle 23 Transfektion von HEK293- und CHO-Zellen

Kulturschale	Oberfläche	Zelldichte	DNA	Medium
100mm	75 cm ²	4x10 ⁶ HEK293	8µg/48µl FuGENE	10ml
T25	25 cm ²	7,5x10 ⁵ HEK293	5µg/30µl FuGENE	5ml
6-well-Platte	9,4 cm ²	3x10 ⁵ HEK293 1x10 ⁵ CHO	1µg/6µl FuGENE 1µg/12µl LipofectAMIN	2ml
24-well-Platte	1,8 cm ²	4x10 ⁴ HEK293,	0,5µg/3µl FuGENE	500µl
8-Kammer-Objektträger	0,8 cm ²	2x10 ⁴ HEK293	0,25µg/1,5µl FuGENE	250µl

3.3.2. Transfektion von Primärzellen

Die Transfektion primärer HUVECs mit Antisense-Oligonukleotiden (ASO) wird mit dem Transfektionsmittel Lipofectin (GIBCO) nach Angaben des Herstellers durchgeführt. Es wird mit ASO-Endkonzentrationen von 100nM-1µM gearbeitet.

Zum Entfernen des Serums werden die Zellen 2x mit warmem Opti-MEM (GIBCO) gewaschen und anschließend mit dem Lipofectin-Transfektionsansatz überschichtet. Nach 4h Inkubation bei 37°C werden die Zellen 2x mit warmem PBS gewaschen und mit HUVEC-Zellmedium überschichtet.

Die Reduktion der Proteinexpression wird per Western Blot-Analyse nach 24h, 48h bzw. 72h überprüft.

Tabelle 24 Transfektion von HUVEC

Kulturschale	Oberfläche	Zelldichte	DNA	Medium
6-well-Platte	9,4 cm ²	2,5x10 ⁵ HUVEC	100nM-1µM ASO/3µl Lipofectin	2ml
24-well-Platte	1,8 cm ²	5x10 ⁴ HUVEC	100nM-1µM ASO/1,5µl Lipofectin	500µl

Tabelle 25 gpr3-ASO

ASO	Sequenz	Hersteller
<i>gpr3 sense</i> (129696)	5'-ATTCGCCAGACAACACTGAC-3'	ISIS Pharmaceuticals, USA
<i>gpr3 antisense</i> (191414)	5'-ACCCACATCATGGTACCTG-3'	ISIS Pharmaceuticals, USA

3.3.3. Stabile Transfektion

gpr3/pEAK8-, *gpr6/pEAK8*- und *gpr12/pEAK8*-Konstrukte (Abb.8, S.37) werden in HEK293 pEAK stable cells (PSC-Zellen) transfiziert, die das große T-Antigen von SV40 exprimieren (1-2µg Plasmid-DNA (Endotoxin-frei), 6-well-Platte 50% Konfluenz, FuGENE6) (3.3.1., S.44). Durch die Interaktion von EBNA-1/ Ori P des pEAK8-Vektors mit dem großen T-Antigen der PCS-Zelle wird die Replikation des episomalen pEAK8-Vektors bei jedem Zellzyklus erreicht.

30h nach der Transfektion wird dem Kulturmedium 0,4µg/ml Puromycin (Edge Biosystems) als Selektionsmittel zugesetzt und in den folgenden 4-6 Wochen in 0,1-0,25µg/ml-Schritten bis auf 1µg/ml erhöht. Das pEAK8/Puromycin-System selektiert eine Mischpopulation transfizierter Zellen, während eine Puromycin-Konzentration von 0,4µg/ml nach 4 Tagen zu 100% letal auf untransfizierte Zellen wirkt.

Tabelle 26 Material für Transfektionen

Edge Biosystems, USA	pEAK8, Puromycin (1mg/ml)
GIBCO RBL, Life Technologies, Eggenstein	LipofektAMIN, Lipofectin, Opti-MEM
ISIS Pharmaceuticals, USA	hc-raf-ASO, FITC-markiert
Roche Diagnostics, Schweiz	FuGENE6

3.4. FLIPR/Ca²⁺-Assay

Die FLIPR-Technologie (*Fluorescent Imaging Plate Reader*, Molecular Devices) wird im Rahmen dieser Arbeit zur funktionellen Messung des intrazellulären Botenstoffs Ca²⁺ verwendet. Durch Anfärben der Zellen mit einem Ca²⁺-sensitiven Fluoreszenzfarbstoff (fluo-4) wird die ligandeninduzierte, GPCR-vermittelte Ca²⁺-Mobilisierung als quantifizierbares Fluoreszenz-Signal, ausgehend von einem Fluoreszenz-Grundniveau, gemessen.

15-20h nach transienter Transfektion (3.2., S.43) werden CHO- bzw. HEK293-Zellen in unbeschichtete black-wall 96-well-Platten (Costar) bzw. Poly-D-Lysin-beschichtete black-wall 96-well-Platten (Falcon) in einer Zelldichte von 50.000 bzw. 80.000 pro well ausgesät und weitere 18-24h kultiviert. Entsprechend der Versuchsbedingungen wird zu diesem Zeitpunkt bereits die Serumkonzentration im Medium von 10% auf 1% reduziert.

Zum Anfärben der Zellen mit dem Ca²⁺-Indikator fluo-4 (Molecular Probes) wird der adhärenente Zellrasen mit 95µl/well Färbelösung (Tabelle 27, S.47) überschichtet und 60min bei 37°C inkubiert. CHO-Zellen wird zur Inhibierung des Anionen-Austauscher-Proteins 2,5mM Probenicid (p-Dipropylsulfamoyl-Benzoesäure) in Färbelösung, Waschpuffer und Substanzplatten zugesetzt. In einem *cell washer* (Tecan) wird freier Farbstoff durch dreimaliges Waschen mit Waschpuffer (Tabelle 27, S.47) entfernt und abschließend auf ein Restvolumen von 100µl pro well eingestellt.

Lipide (LPA, S1P, DHS1P etc.) werden als 2mM Stock-Lösungen in DMSO gelöst (falls nötig mit Hilfe von Ultraschall) und bei -20°C gelagert (Tabelle 28, S.47). Zur Herstellung von FLIPR-Substanzplatten werden Lipide als 4x-Lösung in Waschpuffer verdünnt (mindestens 1:500) und in 96-well-Platten aliquotiert (50µl pro Messung). Für Versuche in Anwesenheit von Inhibitoren (Suramin, Thapsigargin, DMS etc.) wird eine zusätzliche 96-well-Platte hergestellt, die 3x-Lösungen der jeweiligen Wirkstoffe in Waschpuffer enthält (Tabelle 28, S.47). Substanzplatten mit Probenicid (für CHO) und Inhibitor-Platten mit Suramin werden frisch hergestellt und kurzfristig bei 4°C gelagert. Sonstige Substanz-Platten (Lipide, Thapsigargin, oder Sphingosin-Kinase-Inhibitoren) können auf Vorrat hergestellt und bei -80°C gelagert werden.

Zur Ca²⁺-Messung werden vollautomatisch 50µl der 3x-Inhibitor-Platte auf jedes well der Zellplatte transferiert und intrazelluläre Fluoreszenzveränderungen in einem Zeitraum von 3 min bei 37°C in 3 sec-Intervallen in der ersten sowie 10 sec-Intervallen in den letzten zwei Minuten gemessen. Es werden keine Fluoreszenzveränderungen nach Gabe von Inhibitoren, wie z.B. Suramin, DMS etc., beobachtet. In Abhängigkeit des verwendeten Inhibitors werden Vorinkubationen bei 37°C durchgeführt (Tabelle 28, S.47). In einer zweiten Messung werden 50µl der 4x-Lipidplatte auf die Zellplatte transferiert und wiederum Fluoreszenzveränderungen aufgezeichnet (s.o.).

Die FLIPR-Software (Molecular Devices) normalisiert initiale Fluoreszenz-Werte einer Platte auf ein einheitliches Niveau bei t=0 und ermöglicht so die Quantifizierung agonistischer bzw. antagonistischer Aktivitäten einer Substanz. Messungen von konstitutiver Aktivität, die auf ein erhöhtes Ca²⁺-Grundniveau zurückgehen, sind mit dem FLIPR-System nicht möglich.

Tabelle 27 Lösungen für FLIPR-Assays

Waschpuffer/ pro 500ml: PBS 500ml MgCl ₂ 1mM EGTA 1mM BSA, fettsäurefrei 0,8% nur bei CHO Probenicid-Lösung 5ml mit HCl auf pH=7,4 - 7,5 einstellen	Färbelösung für HEK293/ pro 96-well-Platte: HEK-Medium 1% 10,5ml Pluronsäure 23µl FLUO-4/DMSO 23µl (frisch ansetzen und dunkel lagern)
Probenicid-Lösung/pro 500ml: Probenicid 10757mg HBSS/25mM HEPES 7,5ml NaOH (1N) 7,5ml (frisch ansetzen)	Färbelösung für CHO/ pro 96-well-Platte: HBSS/25mM HEPES 10,5ml Probenicid 105µl FCS 105µl Pluronsäure 23µl FLUO-4/DMSO 23µl (frisch ansetzen und dunkel lagern)

Tabelle 28 Substanzen und Inhibitoren

Substanz	Konzentration	Hersteller
S1P, LPA, Sphingosin, SPC, LPC, PSY	2mM Stock in DMSO (-20°C) Endkonzentration: 1nM-3000nM	Sigma Aldrich Chemie GmbH, Deisenhofen
DHS1P, Dihydrosphingosin	2mM Stock in DMSO (-20°C) Endkonzentration: 1nM-3000nM	Biomol Research Laboratories, USA
Suramin (1,3,5-Naphthalentrisulfonsäure)	Endkonzentration: 100-1000µM in Waschpuffer, frisch einwiegen (4°C) 3min Inkubation	Sigma Aldrich Chemie GmbH, Deisenhofen
Thapsigargin	1mM Stock in DMSO (-20°C) Endkonzentration: 2µM 3min Inkubation	Sigma Aldrich Chemie GmbH, Deisenhofen
DMS	5mg/ml Stock in Isoprop -20°C Endkonzentration: 15 - 7,5µM 15min Inkubation	Matreya, USA
Pertussistoxin (PTX)	10µg/ml Stock in H ₂ O, 4°C Endkonzentration: 75ng/ml Medium, 15h Inkubation	Sigma Aldrich Chemie GmbH, Deisenhofen
Urotensin II (UII) Angiotensin II (AII)	1-2mM Stock in H ₂ O, -20°C Endkonzentration: 1-10nM	Bachem Biochemica, Heidelberg

3.4.1. Substanz-Bibliothek

Bioaktive Lipide einer Substanz-Bibliothek (Biomol), die insgesamt 200 Vertreter der wichtigsten Lipid-Klassen, z.B. Eicosanoide, ungesättigte Fettsäuren, Sphingolipide, Cannabinoide, fettlösliche Vitamine etc., und darüber hinaus bekannte Agonisten und Antagonisten des Lipid-Metabolismus enthält, werden im Rahmen dieser Arbeit auf Wirksamkeit getestet.

In den Substanz-Mutterplatten (3 x 96-well) liegen die Substanzen in einer Konzentration von 1mM bzw. 100 μ M in geeigneten Lösemitteln (DMSO, DMF o.ä.) vor. Lediglich fünf Lipide der Platte 3 mußten aus Gründen reduzierter Stabilität frisch gelöst werden (Angaben des Herstellers). Mit Hilfe eines Pipettierroboters werden die Mutterplatten in FLIPR-Waschpuffer (PBS, 1mM MgCl₂, 1mM EGTA, 0,2% BSA-FAF) zuerst 1:33 zu den Tochterplatten und anschließend 1:10 zu den Enkelplatten verdünnt. Die Enkelplatten mit einer resultierenden 3x Konzentration von 3 μ M bzw. 0,3 μ M werden bei -80°C gelagert.

Tabelle 29 Material für FLIPR-Assays

Becton Dickinson Labware,, USA	BIOCOAT Poly-D-Lysine Cellware, 96-well black/clear plate
Biomol Research Laboratories, USA	Bioactive Lipid Library (3 x 96-well)
Corning Life Science, Niederlande	black-wall microplates
GIBCO BRL, Life Technologies, Eggenstein	HBSS - Hanks' balanced salt w/o phenol red
Molecular Probes, Niederlande	Pluronic acid (20% in DMSO) 50 μ l-Aliquots (-20°C) fluo-4, 1mM solution in DMSO; 25 μ l-Aliquots (-20°C)
Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Deisenhofen	Probenicid Bovine serum albumine (fatty acid free)

3.5. cAMP-Assay

Grundlage der Messung intrazellulärer cAMP-Spiegel (AlphaScreen cAMP Detection Kit, BioSignal/Packard) ist eine Kompetitions-Reaktion zwischen endogen gebildetem cAMP und exogen zugegebenem Biotin-cAMP.

Nach cAMP-Bindung an ein Anti-cAMP-Akzeptor-*bead*-Konjugat erfolgt die selektive Kopplung von Biotin-cAMP-Molekülen an ein Streptavidin-Donor-*bead*-Konjugat über eine hochaffine Protein-Attraktion. Die räumliche Nähe von Donor- und Akzeptor-*beads* führt nach Anregung bei $\lambda=680\text{nm}$ zur Freisetzung eines quantifizierbaren Lumineszenz-Signals bei $\lambda=520\text{-}620\text{nm}$ (Fusion α , Packard) (Abb.10, S.49).

Das Signal fällt hoch (wenig endogenes cAMP) bzw. niedrig (viel endogenes cAMP) aus. Vektor-transfizierte Zellen dienen als Negativkontrolle (hohes Signal), Forskolin-stimulierte Vektor-transfizierte Zellen als Positivkontrolle (niedriges Signal).

24h oder 48h nach transients Transfektion von HEK293- oder CHO-Zellen in T25-Flaschen (3.3., S.44) werden die Zellen 1x mit PBS gewaschen, mit 0,5ml Versen pro Flasche abgelöst (10min, 37°C) und in 4,5ml serumfreiem Medium aufgenommen. Nach gründlicher Resuspension wird die Zellzahl bestimmt (Casy 1TT Counter), und die Zellen werden durch Zentrifugation sedimentiert (10min, 1000rpm). Das Medium wird abgezogen, und die Zellen werden mit Stimulationspuffer auf eine Konzentration von 3333 Zellen/ μ l eingestellt. Der Zusatz von IBMX im Stimulationspuffer inhibiert den enzymatischen Abbau von cAMP in der Zelle. Die Bestimmung des cAMP-Spiegels erfolgt in Suspension bei RT nach Angaben des Herstellers.

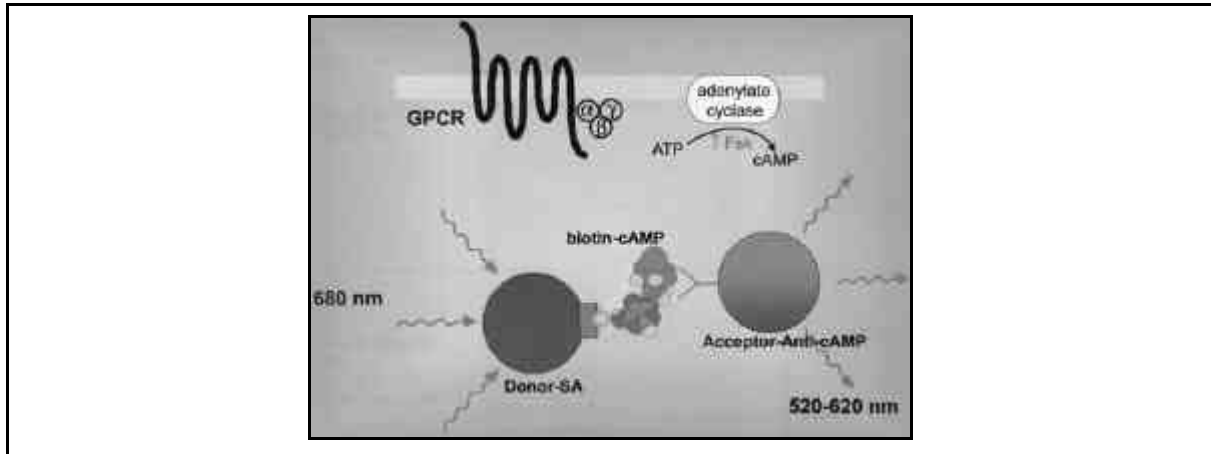


Abb.10 **Prinzip des AlphaScreen cAMP Detection Kits.** Erklärung siehe Text. Fsk: Forskolin, SA: Streptavidin, ATP: Adenosin triphosphat, cAMP: zyklisches Adenosinmonophosphat (aus: Packard Bioscience, Produktinformationen).

Stimulationspuffer (50ml)		Lysispuffer (50ml)	
HEPES 50mM	3ml	HEPES 50mM	5ml
HBSS 10X	2ml	BSA 0,11% in H ₂ O	45ml
BSA 0,11% in H ₂ O	45ml	Tween-20	150µl
IBMX 50mM	500µl		

Tabelle 30 cAMP-Assay

Basalniveau (Vektor-transfizierte Zelle)	Positivkontrolle (Vektor-transfizierte Zelle)	gpr3, gpr6, gpr12
25µl Zellsuspension (8,3x10 ⁴ Zellen)	25µl Zellsuspension (8,3x10 ⁴ Zellen)	25µl Zellsuspension (8,3x10 ⁴ Zellen)
0,5µl Anti-cAMP-Acceptor beads (1:50)	0,5µl Anti-cAMP-Acceptor beads (1:50)	0,5µl Anti-cAMP-Acceptor beads (1:50)
25µl Stimulationspuffer	25µl Fsk/Stimulationspuffer (5x10 ⁻⁴ M, 1:200)	25µl Stimulationspuffer evtl. + Lipide (2x)

Zellsuspensionen Vektor- bzw. gpr3-, 6- oder 12-transfizierter Zellen (3333 Zellen/µl) werden in ein Eppendorf-Reaktionsgefäß transferiert, 1:50 mit Anti-cAMP-Acceptor-beads und, zur Stimulation der Adenylat-Zyklase, mit Lipiden bzw. Forskolin versetzt (Tabelle 30, S.49). Die Ansätze werden vorsichtig gemischt und 30min bei 25°, 300rpm im Dunkeln inkubiert. Parallel werden in einem Master-Mix-Ansatz Biotin-cAMP und Streptavidin-Donor-beads in Lysispuffer präinkubiert (750µl Lysispuffer + 2,5µl biotin-cAMP (1:300) + 10µl Streptavidin-Donor-beads (1:75), vortex, 30min bei 25°C, 300rpm, dunkel). Pro 25µl-Ansatz werden 75µl Streptavidin-Donor-bead/biotin-cAMP-Mix zugegeben, kräftig gevortext (Zelllyse) und weitere 90min (bis 24h) bei 25°C, 300rpm (dunkel) inkubiert. Der Komplettansatz (125µl) wird à 6x15µl-Aliquots (10.000 Zellen/well) in eine 384-well-Platte pipettiert. Zur Unterdrückung von Randeffecten werden in die Randwells je 15µl Stimulationspuffer vorgelegt. Um Verdunstungsverlusten vorzubeugen, wird die Platte mit einer Folie luftdicht verklebt und bis zur Messung dunkel gelagert.

Der Fusion α -Detektor liefert Meßwerte im Excel-Format.

Tabelle 31 Material cAMP-Assay

GIBCO RBL, Life Technologies, Eggenstein	HEPES 1M, HBSS 10x, Versen
Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Deisenhofen	IBMX, 50mM-Stock in H ₂ O (+NaOH), 4°C Forskolin 0,1M-Stock in EtOH, 4°C BSA
BioRad Laboratories, USA	Tween-20
Packard Bioscience, Canada	cAMP Detection Kit Alpha Screen, 4°C
Greiner Labortechnik, Frickenhausen	384-well plate, small volume, white

3.6. Funktionelle Internalisierung

4-6h nach transients Transfektion mit GFP-Fusionsproteinen (gpr6-GFP, edg3-GFP, edg8-GFP und UII-GFP) (3.3.1., S.44) werden HEK293-Zellen unter konsequentem Lipidentzug (10% FCSCS) kultiviert. 30-40h nach der Transfektion erfolgt eine 1-2-stündige Inkubation in serumfreiem Medium. Anschließend werden die Zellen Lipiden in einer Konzentration von 100nM-1 μ M (verdünnt in 10% FCSCS-Medium) ausgesetzt (zeitversetzt für 120, 60, 30, 15min , incl. 4°C-Kontrolle). Nach Ablauf der Inkubationszeiten werden die Zellen 1x mit PBS gewaschen, PFA-fixiert, eingedeckelt (5.3.1., S.56) und im Fluoreszenzmikroskop analysiert.

3.7. Scherstress als endotheliales Funktionsmodell

Die Rotation eines Metallkonus in einer *cone-and-plate*-Apparatur (Noris *et al.*, 1995) (Abb.11, S.50) übt laminare Scherkräfte (Schubspannung) auf ein Endothelzell-Monolayer aus. Die Scherkräfte (7,5-15dyn/cm²) imitieren den pulsierenden Blutstrom an den Innenseiten des Gefäßlumens (endotheliales Funktionsmodell). Ziel dieses Modells ist es, durch Untersuchung von Expressionsprofilen (RNA- und Proteinebene) potentiell regulierte Gene zu identifizieren, die für die Protektion des Endothels relevant sind.

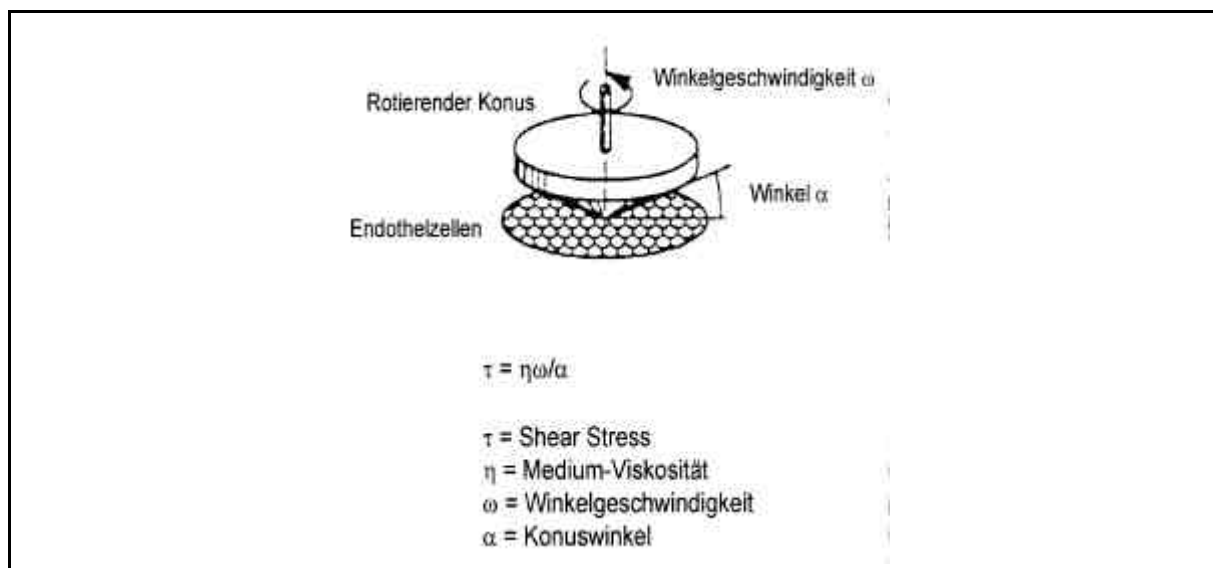


Abb.11 Applikation von Scherstress an Endothelzellen. (modifiziert nach Noris *et al.*, 1995)

4×10^5 primäre Endothelzellen (HUVECs, Passage 1-5) werden in Collagen-I-beschichtete 21cm² Kulturschalen ausgebracht (4ml Medium) und nach Erreichen von 70% Konfluenz laminarem Scherstress (12dyn/cm²) für 0,5-18h ausgesetzt. Nach Ablauf des Versuches und Kontrolle der Zell-Morphologie im Lichtmikroskop wird die Gesamt-RNA der Zellen für *Taqman*-PCR-Studien bzw. DNA-Chip-Analysen (Affymetrix, U96, 15µg Gesamt-RNA) isoliert (1.1., S.27) und/oder Zellen für Western Blot-Analysen lysiert (4.3., S.52).

Tabelle 32 Material Scherstress

Becton Dickinson Biosciences, Heidelberg	Collagen-I-beschichtete Zellkulturschalen, 21cm ²
Uniklinikum Frankfurt/Main, Physiologie	Scherstress-Kammern

4. Biochemische Methoden

4.1. Konzentrationsbestimmung von Proteinen

Proteinbestimmungen werden mit Hilfe des D_C Protein Assay Kits (BioRad) durchgeführt. Grundlage der Quantifizierung ist die Reaktion von Proteinen mit Kupfertartrat unter alkalischen Bedingungen und ihre anschließende Reduktion (Folin-Reagenz). Oxidierte Kupfer-Proteine zeigen charakteristische Blaufärbungen, die für die colorimetrische Quantifizierung herangezogen werden.

Eine BSA-Eichgerade im Bereich von 0,2mg/ml bis 1,5mg/ml wird in Reagenz A erstellt, parallel zu der Probe in eine 96-well-Platte vorgelegt (5µl) und mit 25µl Reagenz A und 200µl Reagenz B aufgefüllt (insg. 230µl). Nach 15min Inkubation bei RT erfolgt die Auswertung der Farbreaktion in einem ELISA-Reader bei 750nm. Die Berechnung der Proteinkonzentration erfolgt entsprechend der BSA-Eichgerade.

4.2. Membranpräparation

Der konfluente Zellrasen einer T-175 Zellkulturflasche wird 2x mit eiskaltem PBS gewaschen und in 5ml hypotonem Puffer inkubiert (10min, 4°C). Die Zellen werden mit einem Zellschaber abgekratzt, in ein UZ-Zentrifugenröhrchen (Ti60) überführt, kurz gevortext und weitere 5-10min bei 4°C inkubiert. Membranen werden bei >10.000g (Ti60, 32.000rpm) in einer UZ pelletiert (30min, 4°C). Das Membranpellet wird in hypotonem Puffer (5ml) resuspendiert, 5-10min bei 4°C inkubiert und erneut abzentrifugiert (s.o.). Membranständige Proteine werden durch Resuspension in Solubilisierungspuffer (250µl pro cm² Kulturoberfläche) aus der Membranfraktion herausgelöst (5-10min, 4°C).

Nach Abtrennen unlöslicher Bestandteile durch Zentrifugation (s.o.) wird der Überstand einer Proteinbestimmung unterzogen (4.1., S.52) und bei -80°C gelagert (Protokoll von Dr. Wohlfart, Aventis Pharma, DG Herz-Kreislauf).

Hypotoner Puffer		Solubilisierungs Puffer	
HEPES	5mM	HEPES	20mM
EDTA	1mM	NaCl	150mM
pH 7,6 (NaOH)		DTT	1mM
Complete Proteaseinhibitor-Mix		CaCl ₂	1mM
		CHAPS	1,1%
		pH=7,6 (NaOH)	
		Complete Proteaseinhibitor-Mix	

4.3. Herstellung von Zellysaten proliferierender Zellen

Eine 80-90% konfluente Monolayerkultur wird 2x mit kaltem PBS gewaschen und mit Lysispuffer (10mM Tris/1% SDS pH=7,4 + Complete Proteaseinhibitor-Mix) oder 2x-Laemmli-SDS-Probenpuffer (+β-ME) überschichtet (je nach Kulturoberfläche 50-1000µl). Nach ca. 5-minütiger Inkubation bei RT werden die Lysate mit einem Zellschaber abgekratzt und in ein Eppendorff-Reaktionsgefäß überführt. Zur Denaturierung von Proteinen und DNA wird das Zellysat 10min bei 95°C aufgeköcht und anschließend zur Zerkleinerung genomischer DNA kräftig gevortext. Alternativ kann hier ein Ultraschallstab zur Scherung genomischer DNA verwendet werden.

Unlösliche Bestandteile werden durch Zentrifugation abgetrennt (5min, 13.000rpm, RT); anschließend wird die Proteinkonzentration bestimmt (nach Zusatz von Laemmli-Probenpuffer nicht mehr möglich). Zelllysate werden bei -20°C gelagert.

4.4. Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Proteinproben (30-75µg) werden 1:2 mit Laemmli-Probenpuffer (+β-ME) (Laemmli, 1970) versetzt und nach Hitze-Denaturierung (10min, 95°C) in 12,5%-igen denaturierenden Criterion precast Gelen (BioRad) in 1x Tris/Glycin/SDS-Laufpuffer bei 50mA pro Gel (ca. 1,5h) parallel zu einem Molekulargewichts-Standard elektrophoretisch aufgetrennt.

Die Analyse elektrophoretisch aufgetrennter Proteinproben erfolgt im Western Blot (5.1., S.54).

Tabelle 33 Material Proteinbiochemie

Clontech Laboratories, USA	human platelets protein medley, 10mg/ml
BioRad Laboratories, USA	Laemmli Probenpuffer (2x) Criterion cell electrophoresis and blotter system Criterion precast gels, 12,5% (18 comb, 12+2 comb) Tris/Glycin/SDS 10x Dc Protein Assay Kit
Ambion, USA	human adult normal tissue protein from heart, kidney, artery, liver, lung, skeletal muscle, small intestine (total and plasma membrane fraction)
Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg	rainbow marker RPN756
Promega, Mannheim	CHAPS (3-((3-Cholamidopropyl)-dimethylammonio)-1 Propansulphonat)
Roche Diagnostics, Schweiz	Complete Proteaseinhibitor Mix DTT, 1M stock solution, -20°C (1,4-Dithiothreit, Cleland's Reagenz)

5. Immunologische Methoden

5.1. Western Blot-Analyse

Der Transfer elektrophoretisch aufgetrennter Proteinbanden (4.4., S.53) auf eine PVDF- oder eine Nitrozellulose-Membran (Burnette *et al.*, 1981) erfolgt in 1x Tris/Glycin/MeOH-Transferpuffer (10% v/v MeOH) in einer Criterion Blotter-Apparatur (BioRad) (30min, 100V, 4°C). Eine reversible PonceauS-Färbung (Sigma) dient der Überprüfung der Vollständigkeit des Transfers.

Blockierungs-, Inkubations- und Waschschrte werden in 1x TBST-Puffer (1x TBS, 0,1% Tween-20, 0,01% NaN₃) auf einem Taumel-Schwenk-Schüttler durchgeführt (Tabelle 34, S.54). Die Detektion von Proteinbanden erfolgt über ein Fluoreszenz-Substrat (Amersham) am FluoScanner 595 (Molecular Devices).

Tabelle 34 Western Blot-Analyse

Blocken	60min, RT	TBST + 5% Blotto
Primärantikörper	60min, RT, alternativ über Nacht bei 4°C	Antikörper-Verdünnung in TBST + 5% Blotto
Waschen	3 x 5-10 min, RT	TBST
Sekundärantikörper	60min, RT	Antikörper (1:10000) in TBST + 0,2% BSA
Waschen	3 x 5-10 min, RT	TBST
Detektion	ca. 5min, RT	ECF-Fluoreszenzsubstrat

Nach Herunterwaschen gebundener Antikörper von der Membran („*strippen*“, Western Blot recycling Kits, alpha diagnostics) kann ein Blot bis zu drei Mal wiederverwendet werden (Lagerung in Blotto-Milch, 4°C). Verdünnungen von Primär- und Sekundärantikörpern werden ebenfalls bis zu drei Mal verwendet (Lagerung bei 4°C).

Tabelle 35 Antikörper-Verdünnungen

Antikörper	Hersteller	Verdünnung
Anti-Maus GAPDH, Kaninchen (6C5), monoklonal, 4°C	Advanced Immunochemical, USA	1:200
Anti-Maus Living colors A.v. (Anti-GFP), monoklonal (JL-8), -20°C	Clontech Laboratories, USA	1:100
Anti-Maus eNOS, human, -80°C	Transduction Lab., USA	1:1000
Anti-Kaninchen gpr3, human, -20°C	Aventis Pharma	1:100
Anti-Kaninchen gpr6, human, -20°C	Aventis Pharma	1:100
Anti-Kaninchen gpr12, human, -20°C	Aventis Pharma	1:500
Anti-Kaninchen-IGg-AP, -80°C	Dianova, Hamburg	1:10000
Anti-Maus-IGg-AP, -80°C	Dianova, Hamburg	1:10000

Tabelle 36 Material für Western Blot

alpha diagnostics, USA	Western Blot recycling kit
Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg	ECF-Substrat NC-Membran
BioRad Laboratories, USA	Tris/Glycine 10x Blotto Tris-buffered-saline (TBS) 10x Criterion gel blotter
Clonetics/ BioWhittaker, USA	EndoPanel 1 Immunoblot, 75µg Protein MusclePanel 1 Immunoblot, 75µg Protein
Oncogene Research Products, USA	Multiple-tissue blot, human, 75µg Protein
Pall Corp., USA	PVDF-Membran
Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Deisenhofen	Tween 20 PonceauS 2% Lösung (w/v) 1:10 in H ₂ O

5.2. Generierung von Peptidantikörpern gegen gpr3, 6 und 12

Peptidsequenzen (Tabelle 37, S.55) entsprechend antigener Bereiche der N-Termini von gpr3, 6 und 12 (Lasergene, DNASTAR, Inc., USA) werden chemisch synthetisiert (Steven French, Aventis Pharma, USA). Nach kovalenter Kopplung über ein C-terminales Cystein an die hochmolekulare Trägersubstanz KLH (MBS-Methode) werden je zwei Kaninchen pro Peptid immunisiert (alpha diagnostics, USA). Auffrischungsimpunisationen (*boosts*, alpha diagnostics, USA) werden alle drei bis vier Wochen durchgeführt. Blutproben (*bleeds*) zum Zeitpunkt 0, #0 (Präimmenserum), Woche 7, #1 (49d), Woche 9, #2 (63d) und Woche 11, #3 (77d) werden zur Beurteilung der Immunisierung per ELISA (alpha diagnostics, USA) und Western Blot-Analyse an HUVECs-Membranpräparationen (4.2., S.52) getestet. Die Präimmenserum #0 dienen dem Ausschluß von Kreuzreaktionen gegen das KLH-Peptid-Konjugat. Proben der bleedings #0 bis #3 werden aliquotiert und bei -20°C gelagert.

Tabelle 37 gpr3-, 6- und 12-Peptide

GPCR	Sequenz	Mr
gpr3	NH ₂ -val-gly-pro-ala-glu-gly-pro-thr-gly-pro-ala-ala-(cys)-COOH	13mer/1,43kDa
gpr6	NH ₂ -gly-gly-pro-asp-thr-gly-glu-trp-gly-(cys)-COOH	10mer/1,1kDa
gpr12	NH ₂ -ser-gly-leu-pro-arg-asp-tyr-leu-asp-ala-ala-ala-ala-(cys)-COOH	14mer/1,54kDa

5.2.1. Affinitätsreinigung der Peptidantikörper

Die in der finalen Blutprobe (100ml) enthaltenen Peptidantikörper werden durch Affinitätschromatographie gereinigt (Charles River Wiga Deutschland GmbH, Kisslegg): 1. Ammoniumsulfat-Präzipitation, 2. 2x Affinitätschromatographie (FPLC-ÄKTA-Peptid-Hydra-Matrix, FPLC-ÄKTA Gelfiltration, Superdex 200, HR10/30, analytisch) (Abb.12, S.56).

Fraktion A und B der gereinigten Peptidantikörper werden mit 0,05% Na-Azid versetzt und in kleinen Aliquots bei -20°C gelagert.

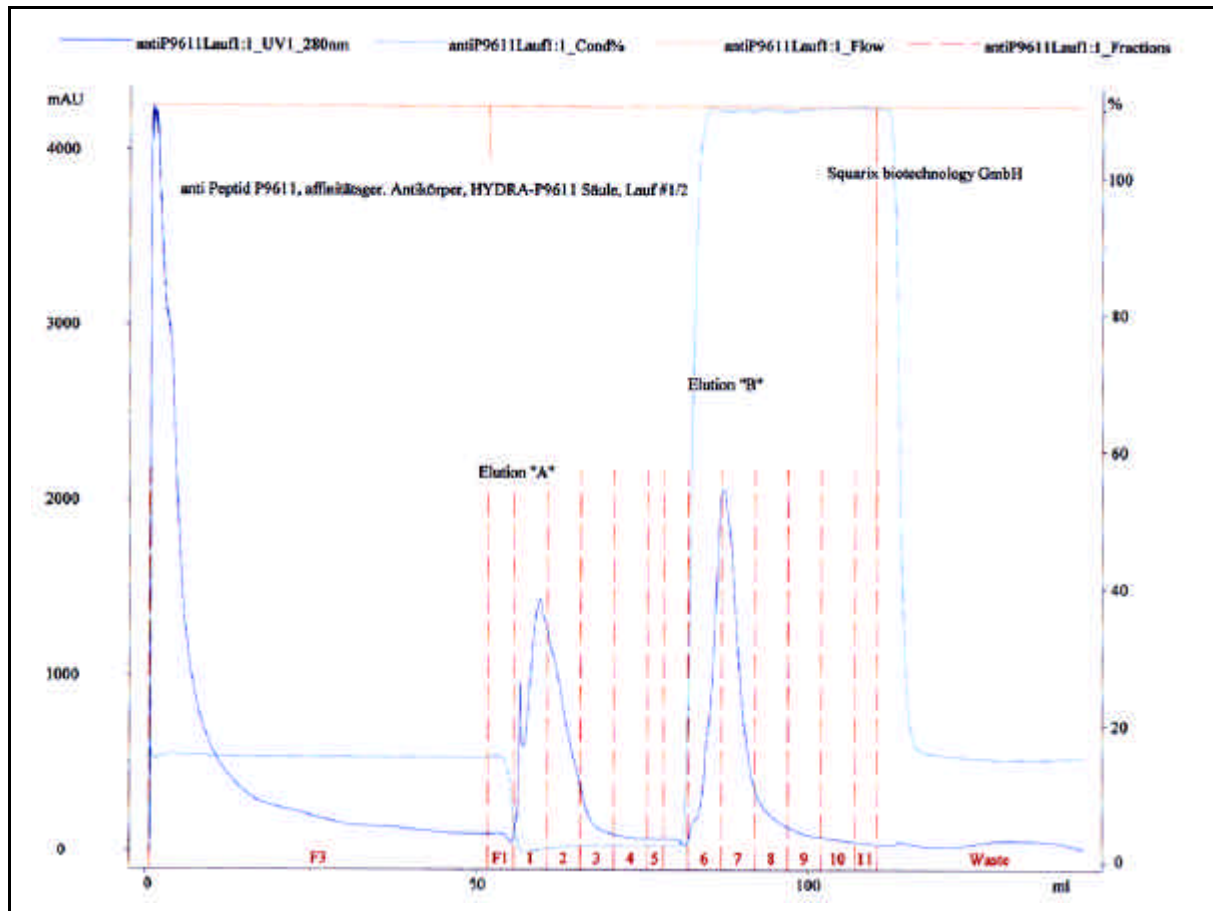


Abb.12 **Affinitätschromatographie zur Reinigung von Peptidantikörpern.** Original-Chromatogramm der Reinigung von Anti-gpr6 (P9611) über eine Hydra-P9611-Matrix (Charles River, Kisslegg).

5.3. Zytoimmunfluoreszenz

Zytoimmunfluoreszenz bezeichnet die spezifische Detektion von Proteinen oder Organellen in intakten Zellen (*in situ*) mit Hilfe entsprechender Fluoreszenz-markierter Antikörper oder Chromophore.

Im Rahmen dieser Arbeit werden Mikroskopieaufnahmen an einem Zeiss Axiovert 135M Immersionsmikroskop mit einer Hamamatsu Digitalkamera (schwarz/weiß) bzw. einem Zeiss Axiovert 100 LSM erstellt.

Zellen werden in gekammerten 8-well- oder 4-well-Objektträgern oder auf 10-12mm Deckgläschen in einer 24-well-Platte ausgesät und -falls erforderlich- bei einer Konfluenz von 40-50% transfiziert (3.3.1., S.44). Es werden Oberflächen-Beschichtungen mit Poly-D-Lysin (HEK293), Collagen-I (HUVECs) oder Permanox (CHO) verwendet.

5.3.1. Fixierung und Immunfärbung von Zellen

Adhärenente Zellen werden mit Paraformaldehyd (5%) fixiert, permeabilisiert (Triton X-100) und mit Primärantikörpern, Fluoreszenz-markierten Sekundärantikörpern bzw. Organell-spezifischen Chromophoren (z.B. Kernfärbung) inkubiert.

Alle Schritte des Fixier- und (Immun-) Färbeprotokolls (Tabelle 38, S.57) werden bei RT auf einem Schwenk-Taumel-Schüttler durchgeführt (Protokoll Dr. Huber, Aventis Pharma, DG Herz-Kreislauf).

Tabelle 38 Fixier- und (Immun-)Färbeprotokoll

Waschen	3 x 5min	PBS, Entfernen des Kulturmediums
Fixierung	20min	5% Paraformaldehyd/PBS pH=7,4
Waschen	3 x 5min	PBS
Permeabilisierung	5min	0,1% Triton X-100/PBS
Waschen	3 x 5min	PBS
Kernfärbung	10min	Hoechst Farbstoff 33258, 1:5000 in PBS oder TOTO-3, 1:2000 in PBS
Waschen	4 x 5min	PBS
Blocken	30min, 4°C	10% FCS/ PBS + 0,02% NaN ₃
Primärantikörper	60min	Verdünnung in 10% FCS/ PBS + 0,02% NaN ₃
Waschen	3 x 10min	PBS
Sekundärantikörper	60min (dunkel)	Verdünnung in 10% FCS/ PBS + 0,02% NaN ₃
Waschen	3 x 10min	PBS

Tabelle 39 Antikörper-Verdünnungen

Antikörper	Hersteller	Verdünnung
Anti-Maus Nukleoporin p62, human, -20°C	Transduction Lab., USA	1:1000
Anti-Maus Living colors A.v. (Anti-GFP), monoklonal (JL-8), -20°C	Clontech Laboratories, USA	1:500
Anti-Kaninchen gpr3, human -20°C	Aventis Pharma	1:100
Anti-Kaninchen gpr6, human, -20°C	Aventis Pharma	1:50
Anti-Kaninchen gpr12, human, -20°C	Aventis Pharma	1:100
Alexa-Fluor 594 Anti-Kaninchen IgG, 2mg/ml (1:500), -20°C Alexa-Fluor 594 Anti-Maus IgG, 2mg/ml (1:500), -20°C Alexa-Fluor 532 Anti-Kaninchen IgG, 2mg/ml (1:500), -20°C Alexa-Fluor 532 Anti-Maus IgG, 2mg/ml (1:500), -20°C	Molecular Probes, Niederlande	alle 1:500

Die Proben werden in *Mounting-Medium* (1ml Mowiol + 50ng DABCO, 37°C) luftblasenfrei zwischen Deckgläschen und Objektträger eingedeckelt. Zur Vermeidung von nachträglichem Luft-Eintritt werden die Kanten des Deckgläschens mit handelsüblichem Nagellack (farblos) abgedichtet. Objektträger werden bei 4°C gelagert (dunkel).

Tabelle 40 Material Zytoimmunfluoreszenz

Becton Dickinson Bioscience, Heidelberg	BIOCOAT cellware, Poly-D-Lysin, 8-well culture slides BIOCOAT cellware, Poly-D-Lysine, 12mm round coverslips LabTek-1, 4-well chamberslides, borosilikatglass No.1
Calbiochem-Novabiochem, Schwallbach	Mowiol, 1ml Aliquots in H ₂ O, -20°C
Molecular Probes, Niederlande	Hoechst 33258, 10mM stock, -20°C (350nm) TOTO- 3 iodide, 2mM in DMSO, -20°C (630nm)
Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Deisenhofen	5% Paraformaldehyd, 10ml Aliquots bei -20°C Triton X-100 DABCO, 50ng Aliquots, 4°C EGTA 100mM RT Trypanblau-Lösung (0,4%)

Rekonstitution von Paraformaldehyd (PFA) (100ml):

5g PFA werden in 70ml ddH₂O durch Rühren bei ca. 50°C und tropfenweise Zugabe von 5N NaOH gelöst. Nach Abkühlen der Lösung auf RT wird 10ml 10x PBS (GIBCO) zugegeben und der Ansatz mit ddH₂O auf 100ml aufgefüllt. Der pH-Wert wird mit 1N HCl auf 7,4 eingestellt und die 5% PFA-Lösung in 10ml-Aliquots bei -20°C gelagert (Angaben von Dr. Huber, Aventis Pharma, DG Herz-Kreislauf).

Rekonstitution von Mowiol:

2,4g Mowiol werden in 6g Glycerin für 60min und anschließend nach Zugabe von 6ml H₂O weitere 2h gerührt. Es werden 12ml Tris/HCl (0,2mol/l, pH8,5) zugegeben und die Lösung bei 50°C auf einer Heizplatte gerührt, bis Mowiol komplett in Lösung gegangen ist. Unlösliche Rückstände werden durch Zentrifugation abgetrennt (15min, 5000g) und Mowiol à 1ml-Aliquots (0,1%) bei -20°C gelagert (Angaben von Calbiochem-Novabiochem).

6. Graphische Bildbearbeitung und statistische Auswertung

Die Dokumentation von EtBr-Gelen, Western Blots, Northern Blots etc. erfolgt in digitaler Form an einer Gel-Dokumentations-Station (Kodak digital science Image station 400 CF) im tif-Format.

Western Blot-Signale werden mit der Software ImageQuant 5.1 (Molecular Dynamics) quantifiziert.

Die Digital-Kamera des inversen Zeiss-Mikroskops speichert Schwarz-Weiß-Bilder, die nachträglich mit der Hamamatsu-software farbig eingefärbt und überlagert werden. Bilder des konfokalen LSM-Mikroskops werden direkt farbig im tif-Format gespeichert. Die Bildbearbeitung erfolgt mit dem Programm Adobe Photoshop 6.0 und beschränkt sich auf die Auswahl und Ausrichtung von Bildausschnitten.

Versuche werden in der Regel in einer Dreifachbestimmung mit je 3-6 Meßpunkten durchgeführt und statistisch ausgewertet. Standardabweichung (S.D. = *standard derivation*) bzw. Standardfehler (SEM = *standard error of the mean*) werden bestimmt und die Versuchsergebnisse als Mittelwert \pm SEM von n Experimenten bzw. als repräsentativer Einzelversuch mit Mittelwert \pm SD dargestellt.

Die statistische Auswertung erfolgt mit dem ungepaarten t-Test der Software Graph Pad Prism 3.0. Ein p-Wert von $p < 0,05$ wird als statistisch signifikant angesehen.

IV Ergebnisse

1. Bioinformatische Grundlagen

1.1. gpr3, 6 und 12 haben Ähnlichkeit zu Lipidrezeptoren

Die G-Protein-gekoppelten Rezeptoren gpr3, 6 und 12 bilden eine kleine GPCR-Familie (Tabelle 41, S.60) mit bislang unbekanntem Liganden und physiologischen Funktionen. Ihre nächsten Verwandten sind die Rezeptoren der Cannabinoid- (cb), Melanocortin- (mc) und *endothelial differentiation gene* (edg)-Familie (Abb.13A, S.61).

cb-Rezeptoren werden durch das Lipid Anandamid, mc-Rezeptoren durch die Peptide MC1-5 und edg-Rezeptoren durch die Lipide Sphingosin-1-Phosphat (S1P) und Lysophosphatidsäure (LPA) aktiviert. Basierend auf der Aminosäuresequenz beträgt die Ähnlichkeit zu cb-, mc- und edg-Rezeptoren 42%, 44% und 43% (LPA- als auch S1P-edgs) (Berechnungen von Dr. Gassenhuber, Aventis Pharma, 2000). Die Beziehung von gpr3, 6 und 12 zu Rezeptorfamilien mit bekannten Liganden ist nicht so nah, um auf einen identischen bzw. ähnlichen Liganden schließen zu können, dennoch weisen die bioinformatischen Daten auf einen Liganden mit Lipid- oder Peptidcharakter hin.

Der direkte Primärsequenzvergleich von gpr3, 6 und 12 ergibt eine Identität von 57-61% bzw. eine Ähnlichkeit von 66-68%. Die Abb.13B, S.61 stellt die Primärsequenzen der drei Rezeptoren vergleichend gegenüber und beinhaltet Vorhersagen über die Lage der sieben TM-Domänen (Berechnungen von Dr. Gassenhuber, Aventis Pharma, 2000).

Tabelle 41 Homologe von gpr3, 6 und 12

Gen	Spezies	Accession-Nr.	Referenz	Synonym	Kommentar
gpr3	human	L32831	Iismaa <i>et al.</i> , 1994 Marchese <i>et al.</i> , 1994 Song <i>et al.</i> , 1995 Eggerickx <i>et al.</i> , 1995	hACCA	konstitutiver Aktivator der Adenylat-Zyklase
	Ratte	L32829 AJ427482	Iismaa <i>et al.</i> , 1994 Uhlenbrock <i>et al.</i> , 2002	R4	partielle Sequenz
	Maus	D21062	Saeki <i>et al.</i> , 1993	GPCR21, mACCA	
gpr6	human	L36150	Heiber <i>et al.</i> , 1995 Song <i>et al.</i> , 1995		
	Ratte	U12006	Song <i>et al.</i> , 1994 Marchese <i>et al.</i> , 1994 Chenn <i>et al.</i> , 2001	rCNL3	
	Maus	unbekannt			
gpr12	human	U18548	Song <i>et al.</i> , 1995		
	Ratte	U12184	Eidne <i>et al.</i> , 1991	R334	3 frameshifts
	Maus	D21061	Saeki <i>et al.</i> , 1993	GPCR01	

1.2. Klonierung des gpr3 Ratten-Homologen

Der Rezeptor gpr3 der Ratte (rgpr3) wird im Rahmen dieser Arbeit aus Ratten-Hirn-cDNA (Dahl-Ratte) kloniert und funktionell charakterisiert (Abb.21, S.70 und Abb.24C, S.73).

Grundlage der Klonierung ist ein N-terminales Fragment des rgpr3 (334bp) mit der Bezeichnung R4 (Iismaa *et al.*, 1994, Acc. Nr: L32829) und das 3'-Ende des Maus gpr3 Homologen (Saeki *et al.*, 1993, Acc. Nr. D21062) (Abb.14A, S.62).

Das resultierende 1kb-PCR Produkt (Abb.14B, S.62) wird mehrfach sequenziert und in der Genbank unter der Acc. Nr: AJ427482 (Uhlenbrock *et al.*, 2002) registriert.

Die Abb.15, S.63 zeigt die vollständige Nukleotid- und putative Primärsequenz des rgpr3.

Die Identität des rgpr3 zu seinem humanen Homologen beträgt 94%, basierend auf der Aminosäuresequenz (Berechnung von Dr. Gassenhuber, Aventis Pharma, 2001). Übereinstimmungen in dieser Größenordnung sind für einen Vergleich von Nager- und humanen Homologen zu erwarten.

Mit Hilfe der Genbank-Sequenzdaten für rgpr6 und rgpr12 werden auch diese Homologe aus Ratten-Hirn-cDNA kloniert (keine Abb.) (Abb.8, S.37).

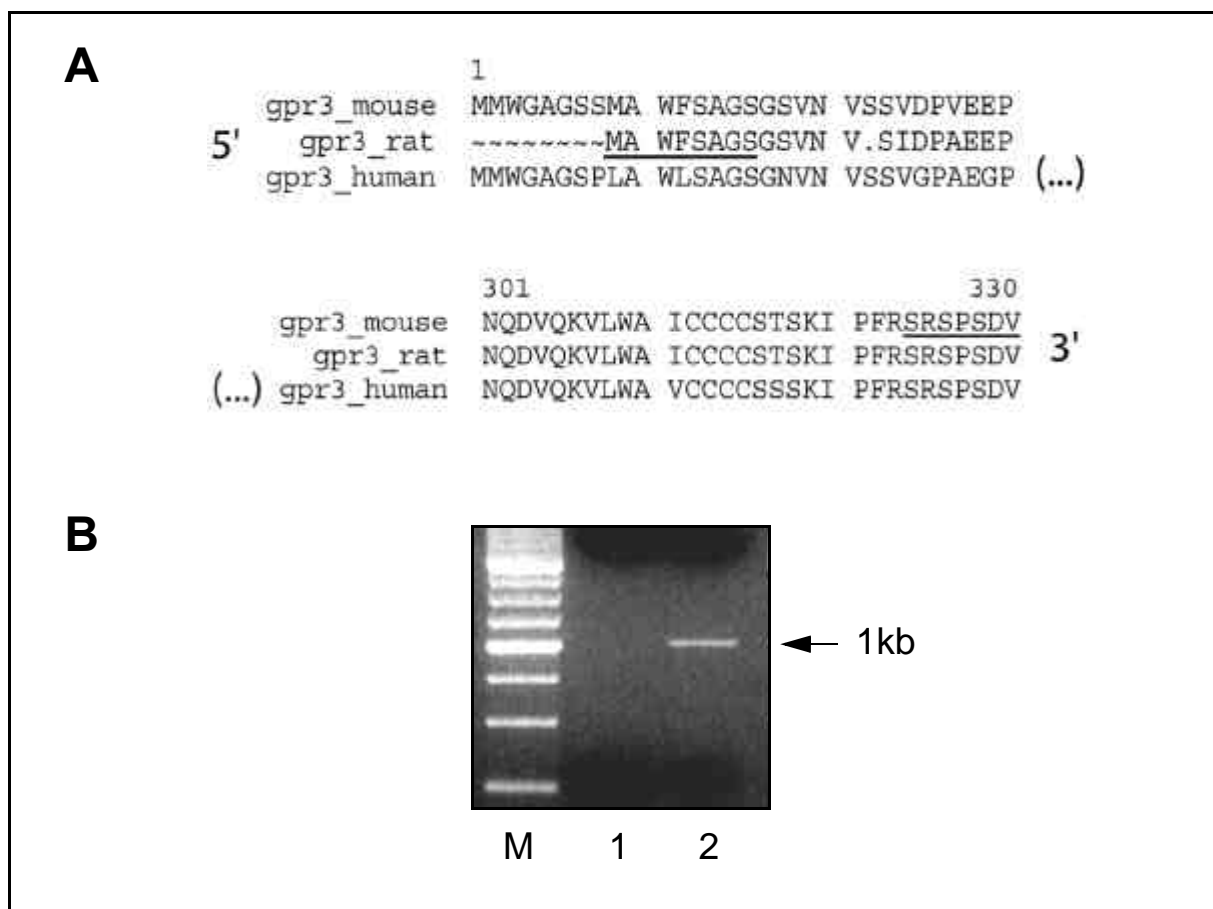


Abb.14 **Klonierung des rgpr3 aus Ratten-Hirn-cDNA.** **A:** 5'-, und 3'-Enden der Maus-, Ratten- und humanen gpr3-Homologen. Die primer-Sequenzen sind unterstrichen. **B:** Original RT-PCR-Ergebnis nach elektrophoretischer Auftrennung (M: 250bp Standard, 1: H₂O-Kontrolle, 2: Ratten Hirn-cDNA).

2. Ligandenidentifizierung

2.1. gpr3, 6 und 12 sind konstitutive Aktivatoren der Adenylat-Zyklase

Die Aktivierung der Adenylat-Zyklase durch die humanen Rezeptoren gpr3, 6 und 12 sowie rgpr3 wird in transient transfizierten HEK293-Zellen in einem funktionellen cAMP-Assay gemessen. Alle vier GPCRs induzieren ohne die Zugabe eines Liganden eine starke Erhöhung des intrazellulären cAMP-Spiegels von 300-450% über dem Basalniveau Vektor-transfizierter Zellen. Dieses Ergebnis deutet auf eine konstitutive Aktivierung des $G\alpha_s$ -Signaltransduktionsweges durch die Rezeptoren gpr3, 6, 12 (Abb.16, S.64) und rgpr3 (Abb.24C, S.73) hin.

Die erhöhten cAMP-Spiegel können durch die Kultivierung der Zellen in lipidfreiem Medium (Zusatz von Aktivkohle-adsorbiertem FCS, FCSCS=FCS *charcoal stripped*) signifikant reduziert werden, bleiben jedoch weiterhin stark erhöht gegenüber Vektor-transfizierten Zellen (Abb.16A, S.64). Der Wechsel von FCS- zu FCSCS-supplementiertem Medium bewirkt insgesamt keine signifikante Änderung der Forskolin-Positivkontrollen. Die Modulierbarkeit der konstitutiven gpr3-, 6- und 12-Aktivität durch Lipidentzug lässt einen lipidartigen Liganden vermuten.

Das Ausmaß der gpr3-, 6- und 12-induzierten cAMP-Freisetzung ist vergleichbar mit dem anderer $G\alpha_s$ -koppelnder GPCRs nach maximaler Stimulation durch ihren spezifischen Liganden. Angesichts der Größenordnung der $G\alpha_s$ -Stimulation, scheint ein cAMP-Assay ungeeignet für die Suche nach Aktivatoren von gpr3, 6 und 12 zu sein. Aber dieser cAMP-Assay ist prädestiniert für die Identifizierung von Substanzen mit invers-agonistischen Eigenschaften an den Rezeptoren gpr3, 6 und 12.

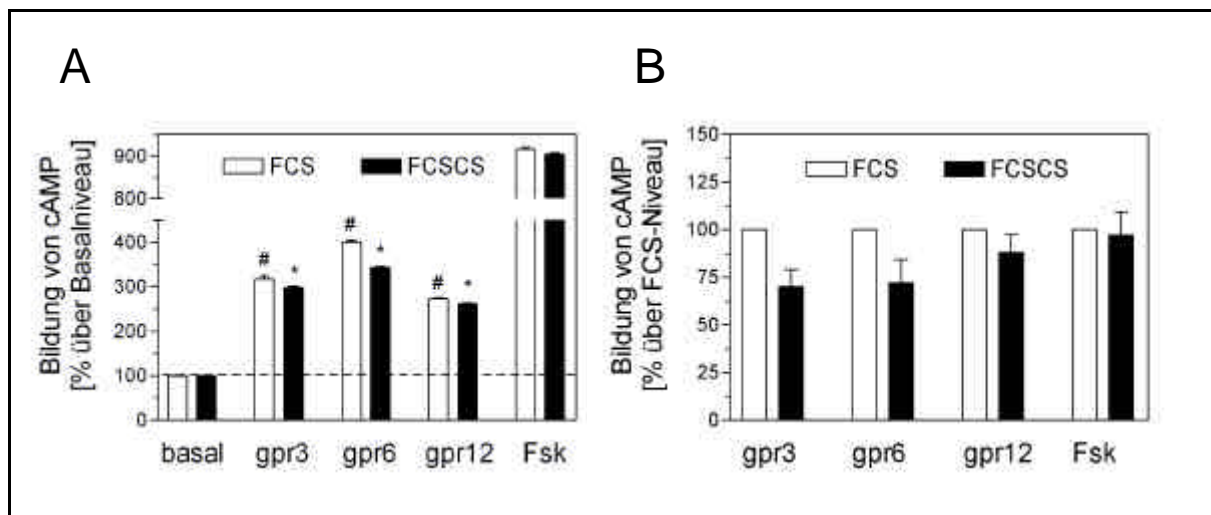


Abb.16 **Adenylat-Zyklase-Aktivierung durch gpr3, 6 und 12.** Transient transfizierte HEK293-Zellen zeigen eine starke konstitutive Aktivierung der Adenylat-Zyklase nach Kultivierung in Standardmedium (10% FCS, **A**). In lipidfreiem Medium (10% FCSCS) ist die konstitutive Aktivität dagegen reduziert (**A+B**), was auf einen lipidartigen Aktivator im Serum hinweist. **A:** Ein repräsentatives Experiment (Mittelwerte \pm Standardfehler, $n=16$) von $n=3$ unabhängigen Experimenten als Prozent der Vektor-Kontrolle (Basalwert). **B:** Reduktion der cAMP-Bildung in serumreduziertem Medium (FCSCS) in % (Mittelwerte \pm SEM, $n=3$ (FCS) und $n=6-8$ (FCSCS)). Die Forskolin (fsk)-Kontrollen in beiden Medien zeigen insgesamt keinen signifikanten Unterschied. # kennzeichnet signifikante Unterschiede von gpr3, 6 und 12 zu basalen Werten ($p<0,001$); * kennzeichnet signifikante Unterschiede beider Medien ($p<0,05$) (**A**).

2.2. S1P und DHS1P aktivieren eine gpr3-, 6- und 12-vermittelte Ca^{2+} -Freisetzung

gpr3, 6 und 12 werden transient in HEK293- und CHO-Zellen transfiziert und auf die Freisetzung intrazellulären Calciums (Ca^{2+}) nach Stimulation mit verschiedenen Lyso- bzw. Lysophospholipiden (Sphingosin-1-Phosphat (S1P), Lysophosphatidsäure (LPA), Dihydrosphingosin-1-Phosphat (DHS1P), Sphingosylphosphorylcholin (SPC), Lysophosphatidylcholin (LPC) und Sphingosin (Sph), je $1\mu\text{M}$) untersucht.

Die Koexpression von gpr3, 6 und 12 mit $G\alpha_q$, $G\alpha_{16}$ und anderen promiskuitiven $G\alpha$ -Untereinheiten liefert keine signifikante Ca^{2+} -Freisetzung unter Standard-Kultivierungsbedingungen (10% FCS) in HEK293- und CHO-Zellen (keine Abb.).

Dagegen reagieren gpr3-, 6- und 12-transfizierte HEK293-Zellen, die unter Serumreduktion (1% FCS) kultiviert werden, mit signifikanter Ca^{2+} -Freisetzung von 200-350% über dem Basalwert Vektor- bzw. $G\alpha$ -transfizierter Zellen nach Gabe von S1P, DHS1P und LPA (nur gpr3) (Abb.17, S.66). SPC, LPC und Sph sind wirkungslos, während LPA zu dramatischen, endogenen Ca^{2+} -Freisetzungen führt (Abb.18A, S.67), wodurch verlässliche Aussagen nicht möglich sind. Agonistische Eigenschaften von LPA auf gpr3, 6 und 12 können zum jetzigen Zeitpunkt nicht ausgeschlossen werden, erfordern jedoch die Bestätigung in Zellen mit geringem/keinem endogenen LPA-Hintergrund.

Interessanterweise sind endogene Hintergrundsignale in HEK293-Zellen nach Gabe von S1P/DHS1P und LPA unter Serumreduktion um das 2-3- bzw. 15-20-fache erhöht (Abb.18A, S.67). Endogene Signale auf LPC, SPC und Sph werden nicht beobachtet (keine Abb.).

Im Gegensatz zu der HEK293-Zelle verfügt die CHO-Zelle über einen deutlich geringeren endogenen Lipid-Hintergrund, der durch Serumreduktion im Medium weiter reduziert werden kann (Abb.18B, S.67). Die transiente Transfektion von gpr3, 6 und 12 führt jedoch zu keiner Ca^{2+} -Freisetzung in CHO-Zellen (keine Abb.).

Zur Charakterisierung des endogenen Lipid-Hintergrundes in HEK293-Zellen wird ein Expressionsprofil bekannter S1P/LPA-Lipidrezeptoren per RT-PCR erstellt (Abb.18C, S.67) und die Präsenz von edg1 (schwach), edg2, edg3, edg5, edg7 und edg8 (A. Niedernberg, Aventis Pharma, DG Herz-Kreislauf, unpubliziert) als auch gpr3, 6 und 12 nachgewiesen.

Die S1P-Stimulation ($1\mu\text{M}$) von HEK293-Zellen nach transienter Transfektion mit den S1P-Rezeptoren edg1, 3, 5, 6 oder 8 (Abb.18D, S.67) identifiziert sowohl den $G\alpha_q$ -Koppler edg3 als auch die $G\alpha_i$ -Koppler edg5 und edg8 als Hauptverursacher des endogenen S1P-Hintergrundes. edg1 führt ohne die Kotransfektion eines promiskuitiven G-Proteins zu keiner Ca^{2+} -Freisetzung; edg6 führt zwar zur Ca^{2+} -Freisetzung, ist aber nicht endogen exprimiert. Es ist davon auszugehen, daß auch die endogen exprimierten $G\alpha_i$ -Koppler gpr3, 6 und 12 (3.1., S.77) zum endogenen S1P-Hintergrund beitragen.

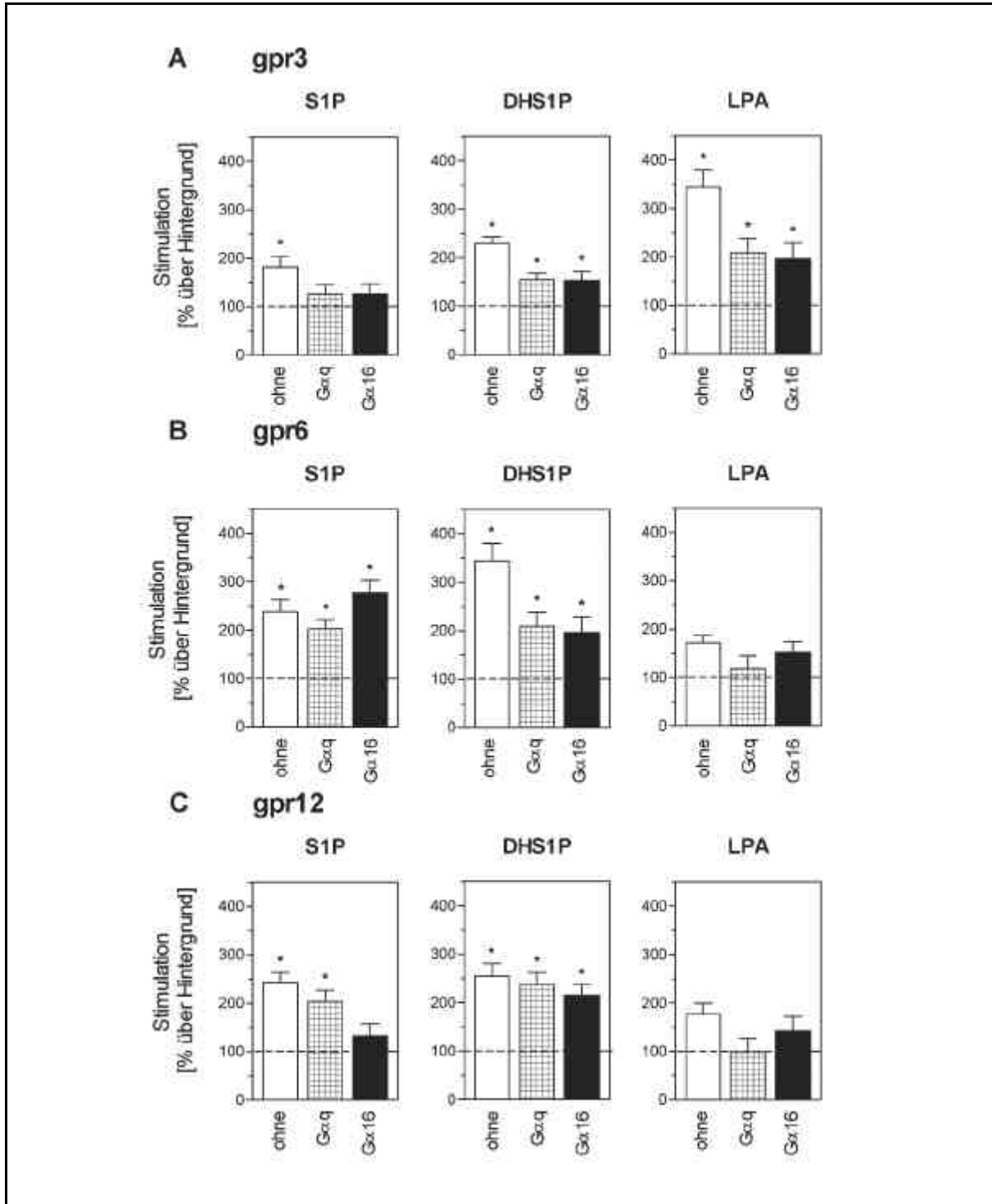


Abb.17 **S1P-, DHS1P-, und LPA-induzierte Ca^{2+} -Freisetzung durch gpr3, 6 und 12 in HEK293-Zellen.** Nach transienter Kotransfektion von gpr3 (A), 6 (B) und 12 (C) mit Vektor (ohne), $G\alpha_q$ oder $G\alpha_{16}$ und Kultivierung der Zellen unter Lipidreduktion (1% FCS) werden Lipid-induzierte Ca^{2+} -Freisetzungen gemessen. Die prozentuale Stimulation über dem jeweiligen Lipid-Hintergrund (Vektor bzw. G-Protein) ist dargestellt als Mittelwert \pm SEM ($n=5$, je Dreifachbestimmungen). * kennzeichnet signifikante Unterschiede über dem Lipid-Hintergrund (Vektor oder G-Protein), $p < 0,05$.

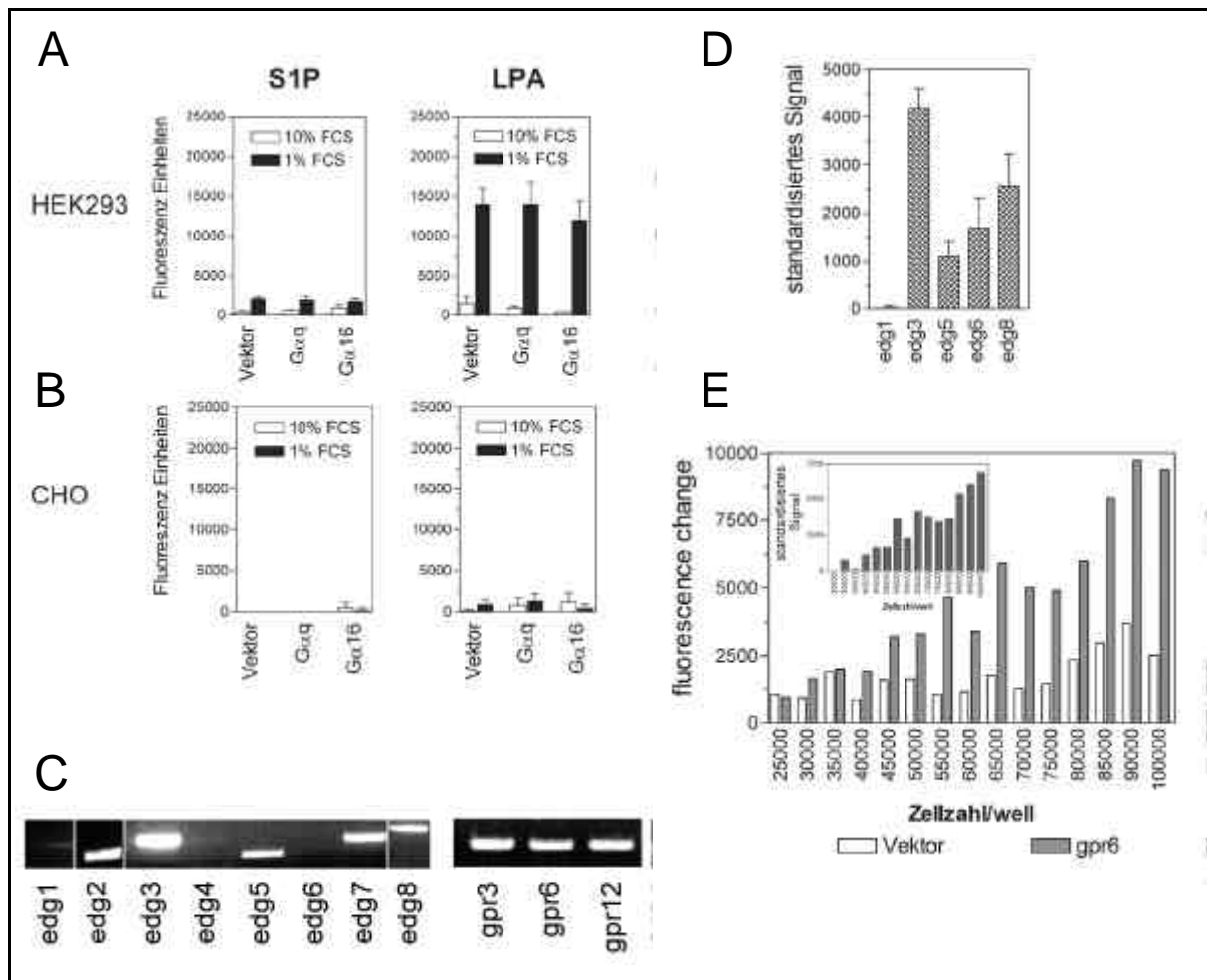


Abb.18 Untersuchung endogener S1P- und LPA-Signale in HEK293- und CHO-Zellen. Typische endogene Hintergrundeffekte in Standard- (10% FCS) und serumreduziertem Medium (1% FCS) in HEK293- (A) und in CHO-Zellen (B) (Mittelwerte \pm SEM, n=3-8). Die Lipidreduktion bewirkt sowohl bei S1P als auch bei LPA eine Vergrößerung des Hintergrundes in HEK293-Zellen. Eine repräsentative RT-PCR-Analyse der S1P/LPA-Rezeptor Expression in HEK293-Zellen (C) zeigt die Präsenz von edg1 (schwach), edg2, edg3, edg5, edg7, edg8, gpr3, 6 und 12. D: Standardisierte Ca²⁺-Freisetzung der jeweiligen S1P-edgs nach transienter Transfektion in HEK293-Zellen (Mittelwerte \pm SEM, n=3). E: Optimierung der Zellzahl für S1P-Messungen am Beispiel des gpr6 (Dreifachbestimmung, n=1).

2.3. Suramin fördert die S1P-induzierte Ca²⁺-Freisetzung durch gpr3, 6 und 12

Suramin (1,3,5-Naphthalentrisulfonsäure) wird beschrieben als kompetitiver edg3-Antagonist ohne Wirksamkeit an den verwandten S1P-GPCRs edg1 und edg5 (Ancellin & Hla, 1999). Angesichts endogener Lipidrezeptor-Expression in HEK293-Zellen und der Beobachtung, daß Suramin einige edg-Rezeptoren selektiv zu inhibieren vermag, wird versucht, durch Suramin den ungewollten endogenen und durch Serumreduktion weiter geförderten S1P-Hintergrund in Ca²⁺-Assays (Abb.18A, S.67) zu unterdrücken. Transient transfizierte HEK293-Zellen werden hierzu in funktionellen Ca²⁺-Assays verschiedenen Suramin-Konzentrationen (100, 300, 1000µM) ausgesetzt und nachfolgend mit 1µM S1P stimuliert (Abb.19A, S.68). Die alleinige Gabe von Suramin führt zu keiner Ca²⁺-Freisetzung aus HEK293-Zellen (Abb.21B a), S.70), jedoch erwartungsgemäß zu einer signifikanten Reduzierung des endogenen S1P-Hintergrundes in Vektor-transfizierten Zellen (Abb.19C, S.68).

gpr3, 6 und 12 zeigen insgesamt eine Verbesserung des S1P-vermittelten Ca^{2+} -Signals nach Suramin-Gabe, und das deutet darauf hin, daß S1P-Rezeptoren in HEK293-Zellen identische Signaltransduktionswege zur Ca^{2+} -Freisetzung benutzen. Die Präinkubation transfizierter Zellen mit $300\mu\text{M}$ Suramin führt zu einer signifikanten Stimulation der gpr3-, 6-, 12- (Abb.19B, S.68) und rgpr3 (keine Abb.)-vermittelten S1P-Antwort. Suramin wird daher routinemäßig in den Ca^{2+} -Assays zur Charakterisierung dieser Rezeptoren eingesetzt.

Suramin hat keinen Einfluß auf die LPA-Hintergrund-Signale in HEK293-Zellen (keine Abb.).

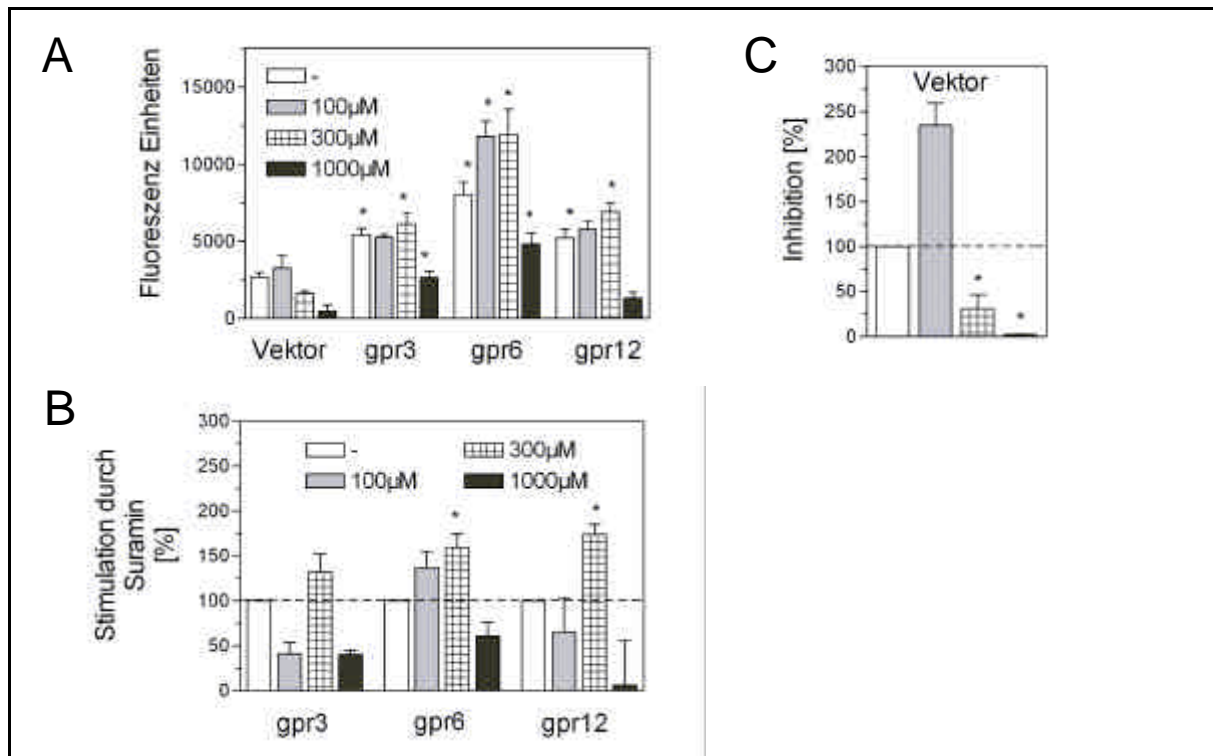


Abb.19 Effekt von Suramin auf die S1P-induzierte Ca^{2+} -Freisetzung durch gpr3, 6 und 12. Die drei Rezeptoren zeigen keine Sensitivität (A) sondern eine gesteigerte Effizienz (B) des S1P-vermittelten Ca^{2+} -Signals nach Präinkubation mit $300\mu\text{M}$ Suramin, während der endogene S1P-Hintergrund signifikant unterdrückt wird (C). Die Behandlung von HEK293-Zellen mit $300\mu\text{M}$ Suramin führt zu keiner Ca^{2+} -Freisetzung (keine Abb.). Die Ergebnisse sind dargestellt als Original Fluoreszenz-Einheiten (A) bzw. als Prozent der jeweiligen Kontrolle (B+C) (Mittelwerte \pm SEM, $n=3-5$, je Dreifachbestimmungen). * kennzeichnet Signifikanz gegenüber Vektor-transfizierten Zellen (A) bzw. Kontrollen ohne Suramin (B+C) ($p<0,05$).

2.4. EC_{50} -Werte von gpr3, 6 und 12 für S1P liegen im nanomolaren Bereich

Zur Erstellung von Dosis-Wirkungs-Kurven werden transient mit gpr3, 6, 12 (Abb.20, S.69) und rgpr3 (Abb.21, S.70) transfizierte HEK293-Zellen mit S1P-Konzentrationen von 3nM - $3\mu\text{M}$, jeweils mit und ohne Suramin ($300\mu\text{M}$), in einem funktionellen Ca^{2+} -Assay stimuliert.

Die Gegenwart von Suramin führt dabei zu einer scherenähnlichen Verbesserung des Meßfensters: Der endogene S1P/DHS1P-Hintergrund wird reduziert bei gleichzeitiger Potenzierung des Ca^{2+} -Signals der gesamten gpr3, 6 und 12-Familie (incl. rgpr3), und zwar ohne signifikante Beeinflussung der EC_{50} -Werte (Tabelle 42, S.70). Berechnete EC_{50} -Werte für S1P und DHS1P liegen im Bereich von 5×10^{-8} - $1 \times 10^{-7}\text{M}$ (+Suramin).

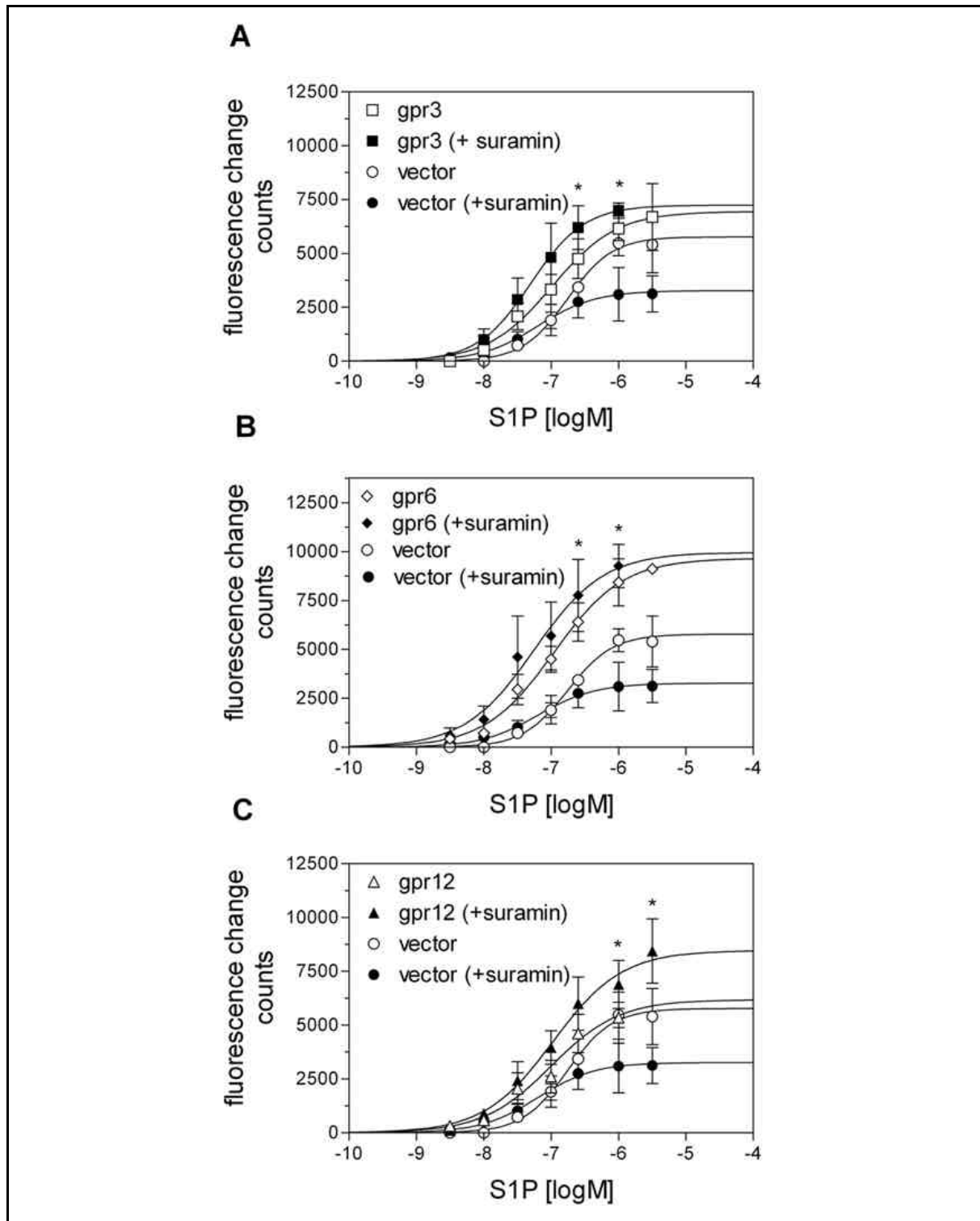


Abb.20 *S1P-induzierte Dosis-Wirkungs-Kurven von gpr3, 6, 12 mit und ohne Suramin.* Nach transienter Transfektion von gpr3 (A), 6 (B), 12 (C) in HEK293-Zellen und Kultivierung der Zellen unter serumreduzierten Bedingungen werden EC_{50} -Werte der S1P-vermittelten Ca^{2+} -Freisetzung im Bereich von 50-100nM nach Stimulation mit angezeigten S1P-Konzentrationen gemessen (leere Symbole: ohne Suramin; gefüllte Symbole: mit Suramin). Suramin führt zu einer Inhibierung des endogenen S1P-Hintergrundes, während die Ca^{2+} -Signale der Rezeptoren potenziert werden (Mittelwerte \pm SEM, $n=3$ (je Dreifachbestimmungen)). * kennzeichnet Signifikanz gegenüber Vektor-transfizierten Zellen ($p < 0,05$) in Gegenwart von Suramin.

Tabelle 42 EC₅₀-Werte für gpr3, 6 und 12 [nM]
(Angaben als horizontale Mittelung ± SEM und vertikale Mittelung (in Klammern))

Rezeptor	S1P (ohne Suramin)	S1P (mit Suramin)	DHS1P (ohne Suramin)	DHS1P (mit Suramin)
hgpr3	145 + 65 (103)	92 + 50 (50)	148 + 85 (91)	88 + 5 (87)
hgpr6	97 + 18 (109)	62 + 27 (56)	58 + 15 (53)	51 + 16 (85)
hgpr12	78 + 16 (100)	113 + 42 (106)	174 + 33 (128)	75 + 10 (41)
rgpr3	-	68 + 18 (83)	-	35 + 7 (34)

Der rgpr3 führt im Vergleich mit dem humanen gpr3 (hgpr3) zu einer effizienteren Ca²⁺-Freisetzung nach S1P-Stimulation (Abb.21C, S.70). Es ist jedoch offen, ob dieser Effekt auf eine stärkere Überexpression des rgpr3 in HEK293-Zellen zurückzuführen ist.

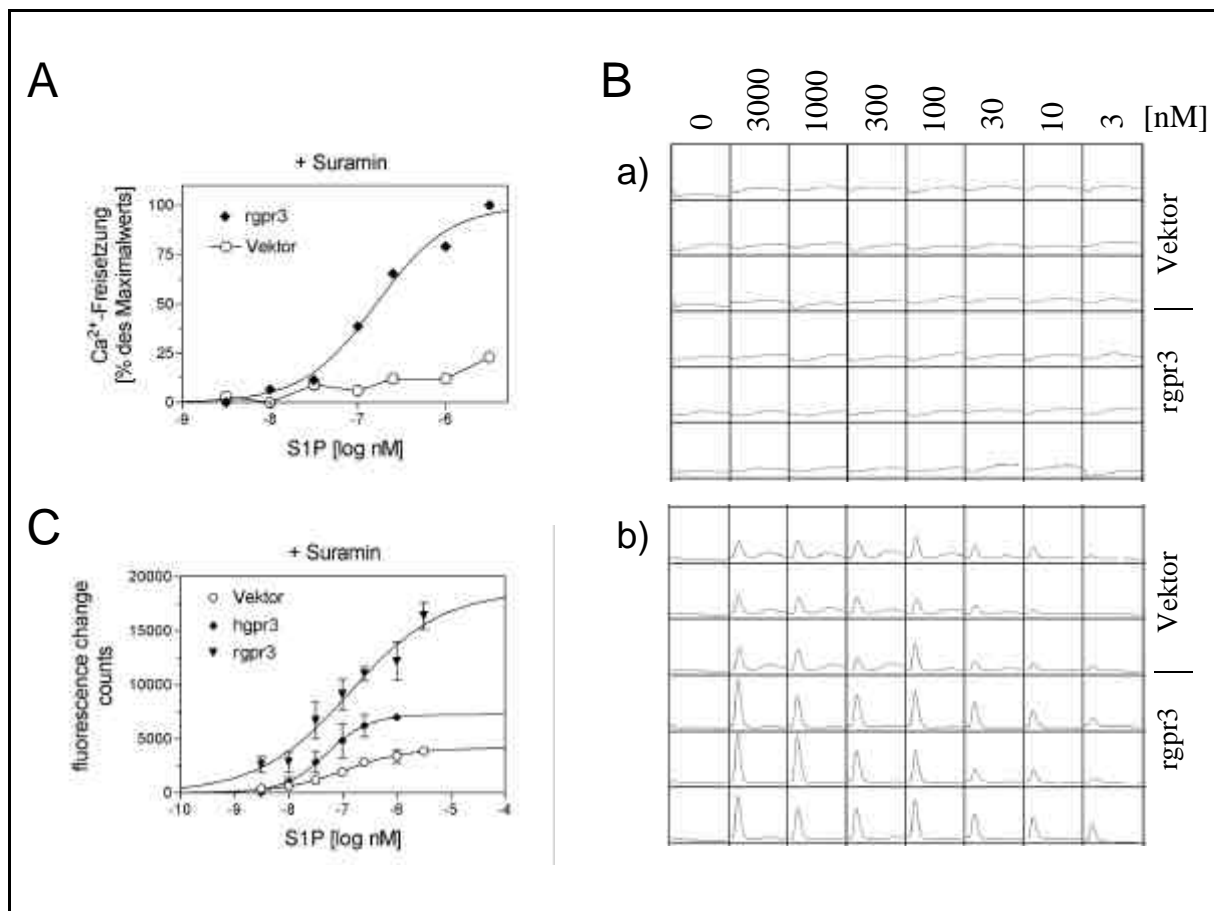


Abb.21 Funktionelle Ca²⁺-Freisetzung durch rgpr3. **A** zeigt eine repräsentative Dosis-Wirkungs-Beziehung als Prozent des Maximalwertes in HEK293-Zellen in Gegenwart von Suramin (300 μM). **B**: Original-Ca²⁺-Kurven einer 96-well-Platte, in die Vektor- bzw. rgpr3-transfizierte HEK293-Zellen ausgesät wurden (Kultivierung in 1% FCS) **a**) Gabe von Suramin, **b**) Gabe von S1P (3 μM-3 nM) auf die Zellen von **a**), jeweils in einer Dreifachbestimmung für Vektor und rgpr3. **C**: Direkter Vergleich der S1P-Dosis-Wirkungs-Kurven von humanem (hgpr3) und Ratten-gpr3 (rgpr3) (Mittelwerte ± SEM, n=3 (hgpr3) bzw n=5 (rgpr3)). Die Daten für hgpr3 sind identisch mit Abb.20A, S.69.

2.5. gpr3, 6 und 12 reagieren neben S1P/DHS1P auf keine weiteren Lipide

Da mehrere Lipidrezeptoren auf mehr als ein biologisch aktives Lipid reagieren (z.B. gpr4 wird aktiviert durch SPC und LPC, Zhu *et al.*, 2001), wird nach weiteren Aktivatoren von gpr3, 6 und 12 gesucht. Eine Bibliothek, bestehend aus 200 bioaktiven Lipiden (0,1-1 μ M, drei 96-well-Platten), wird in einem funktionellen FLIPR/Ca²⁺-Assay an transient transfizierten HEK293-Zellen appliziert, die unter serumreduzierten Bedingungen (1% FCS) kultiviert worden sind (Abb.22, S.71; Abb.23. S.72).

Neun Lipide (5% der Bibliothek) induzieren Ca²⁺-Signale (Abb.22A, S.71), aber nur die S1P- und DHS1P-induzierte Ca²⁺-Freisetzung liegt signifikant über dem jeweiligen Lipid-Hintergrund (Abb.22B, S.71). Suramin wird hier nicht zur Inhibierung des Lipid-Hintergrundes verwendet, da mögliche Interaktionen mit Substanz-Komponenten nicht ausgeschlossen werden können.

Die Stärke des S1P/DHS1P-induzierten Ca²⁺-Signals, das unter Verwendung der Bibliothek erhalten wird, entspricht der Signalstärke von Einzelversuchen ohne Suramin.

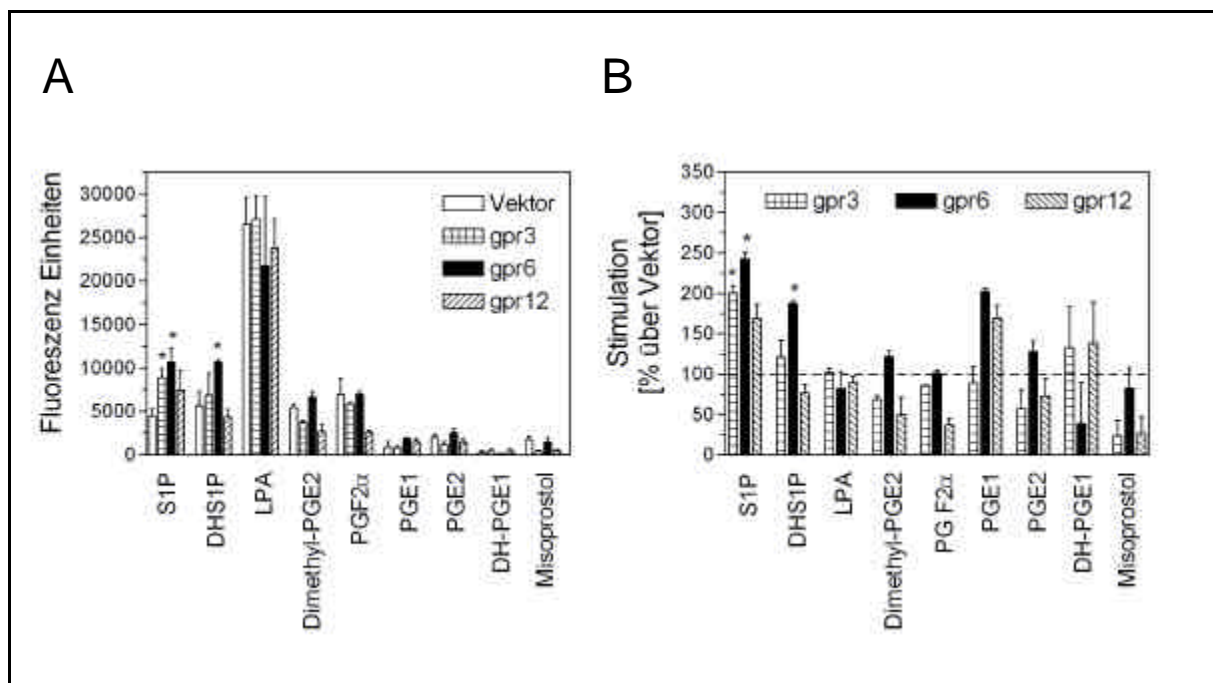


Abb.22 Suche nach gpr3-, 6- und 12-Aktivatoren in einer Bibliothek aus 200 bioaktiven Lipiden. Neun Lipide rufen Ca²⁺-Freisetzungen in transient gpr3-, 6- und 12-transfizierten HEK293-Zellen hervor, wobei nur S1P und DHS1P signifikant über dem jeweiligen Lipid-Hintergrund liegen. Daten sind dargestellt als Original-Fluoreszenz-Einheiten (A) oder als Prozent der Kontrolle (B) (Mittelwerte \pm SEM, n=3). * kennzeichnet Signifikanz über dem jeweiligen endogenen HEK293-Hintergrund mit $p < 0,05$.

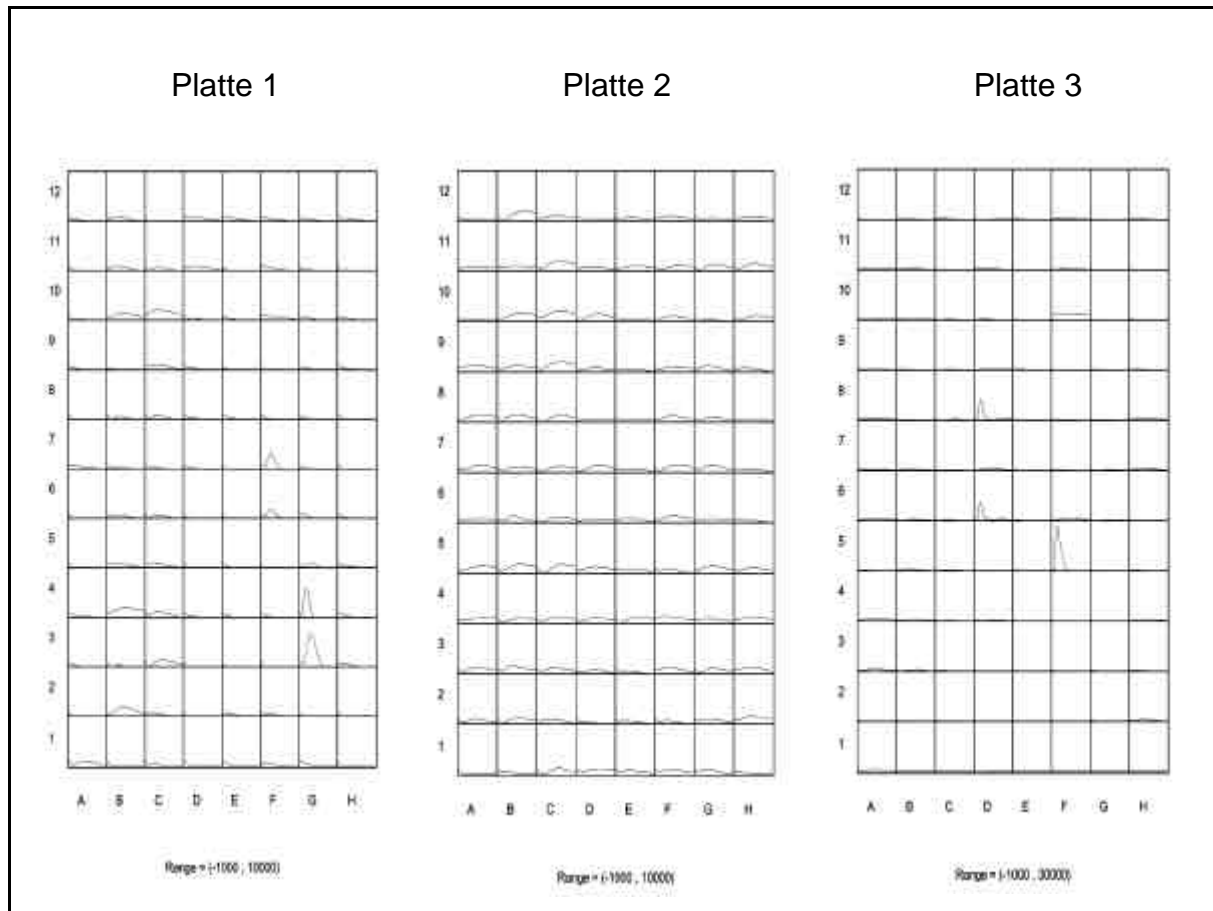


Abb.23 Originale Ca^{2+} -Kurven der Substanz-Bibliothek am Rezeptor *gpr6*. HEK293-Zellen werden transient mit *gpr6* transfiziert und unter Serumreduktion kultiviert. Die Abb. zeigt die Ca^{2+} -Signale der 200 bioaktiven Lipide eines repräsentativen Experiments. Nur die Ca^{2+} -Mobilisierung von S1P (Platte 3, D6) und DHS1P (Platte 3, D8) liegt signifikant über dem jeweiligen Lipid-Hintergrund ($n=3$).

2.6. Die *gpr3*-, 6- und 12-vermittelte $\text{G}\alpha_s$ -Aktivierung ist stimulierbar durch S1P

Um zu untersuchen, ob S1P neben der *gpr3*-, 6-, 12- und *rgpr3*-vermittelten Ca^{2+} -Freisetzung auch aktivierend auf die Adenylat-Zyklase wirkt, werden HEK293-Zellen mit den o.g. Rezeptoren transfiziert und nach Kultivierung in lipidfreiem Medium (FCSCS) einer S1P-Konzentration von $1\mu\text{M}$ ausgesetzt. Bei allen Rezeptoren zeigt sich ein relativ schwacher Anstieg des intrazellulären cAMP-Spiegels von $\sim 25\%$ über dem basalen, konstitutiv erhöhten cAMP-Spiegel (Abb.24A+C, S.73).

Demgegenüber bewirken die Lipide DHS1P und LPA (je $1\mu\text{M}$) nur eine Erhöhung der *gpr3*-vermittelten cAMP-Bildung (Abb.24A, S.73). LPA zeigt auch Wirksamkeit am *rgpr3* in vergleichbarer Größenordnung (Abb.24C, S.73).

Der Betrag der *gpr3*-vermittelten cAMP-Bildung durch exogene S1P-Gabe entspricht dem Betrag der Reduktion der basalen cAMP-Bildung durch Lipidentzug im Medium (Abb.24B, S.73 vgl. mit Abb.16, S.64). Dieser Effekt ist bei den Rezeptoren *gpr6* und *gpr12* nur tendenziell zu erkennen.

Dieses Ergebnis läßt zusammenfassend folgende Schlüsse zu:

- 1.) S1P ist ein funktioneller Modulator der gpr3, 6 und 12-Familie: gpr3 ist am stärksten und gpr12 am schwächsten modulierbar.
- 2.) Die Reduktion konstitutiv erhöhter cAMP-Spiegel durch Lipidentzug kann komplett (gpr3) bzw. teilweise (gpr6+12) durch das Lipid S1P kompensiert werden.
- 3.) gpr3, 6 und 12 sind aufgrund der konstitutiven Aktivität bereits nahezu maximal aktiviert.

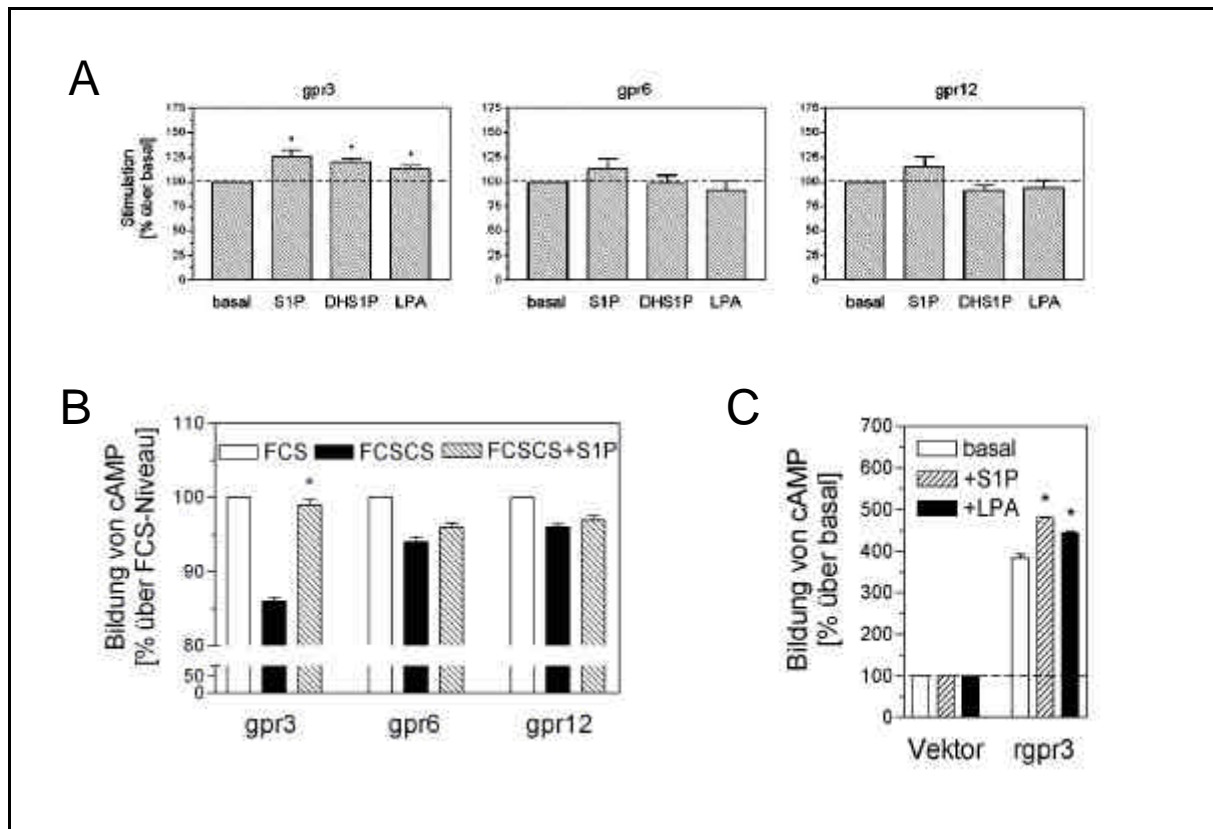


Abb.24 Modulation der gpr3-, 6- und 12-vermittelten Adenylat-Zyklase-Stimulation durch Lipide. Die konstitutive Aktivierung der Adenylat-Zyklase kann in transient gpr3-, 6- und 12-transfizierten HEK293- Zellen durch S1P, DHS1P und LPA (nur gpr3) gesteigert werden ($1\mu\text{M}$) (A). Die Effekte der drei Lipide sind dargestellt als Prozent über der Vektor-Transfektion (Mittelwert \pm SEM, $n=5$, je 6-fach Bestimmung). B: Die intrazelluläre cAMP-Bildung durch exogene S1P-Gabe entspricht komplett (gpr3) bzw. teilweise (gpr6+12) dem Betrag der cAMP-Reduktion durch Lipidentzug (FCSCS-supplementiertes Medium). Die Daten sind dargestellt als Prozent gegenüber dem cAMP-Niveau in Standard-Medium (10% FCS) (Mittelwerte \pm Standardfehler eines repräsentativen Experiments (6-fach Bestimmung), $n=3$). C: S1P- und LPA-vermittelte Adenylat-Zyklase-Aktivierung durch den Rezeptor rgpr3 als Prozent über Kontrolle (Vektor-Transfektion) (Mittelwert \pm Standardfehler eines repräsentativen Experiments (6-fach Bestimmung), $n=2-3$). * kennzeichnet Signifikanz gegenüber dem Basalniveau (A+C) bzw. Standard-Medium (B) mit $p<0,05$.

2.7. S1P induziert die Internalisierung eines gpr6-GFP-Fusionsproteins

Die Agonist (S1P)-induzierte Internalisierung eines C-terminalen Fusionsproteins aus gpr6 und einem grün fluoreszierenden Protein (GFP) wird per Fluoreszenzmikroskopie in transient transfizierten HEK293-Zellen analysiert. gpr6-GFP wird dabei exemplarisch für die gesamte gpr3, 6 und 12-Rezeptorfamilie behandelt. GFP-Konstrukte der Rezeptoren edg3, edg8 und Urotensin II (UII) werden zum Vergleich mit bekannten S1P-Rezeptoren (edg3-GFP, edg8-GFP) bzw. nicht-Lipidrezeptoren (UII-GFP, A. Hattenberger, Aventis Pharma, 2001, unpubliziert) herangezogen.

Nach transients Transfektion kann gpr6-GFP in der Plasmamembran und in intrazellulären Membranen von HEK293-Zellen lokalisiert werden. Die Präsenz des gpr6 auf der Zelloberfläche ist stark abhängig vom Lipidgehalt des Mediums. Während sie unter Standard-Kultivationsbedingungen (10% FCS) nicht detektiert werden kann (vgl. Abb.33, S.82), verstärkt das „Aushungern“ gpr6-GFP-transfizierter HEK293-Zellen in lipidfreiem Medium (10% FCSCS) bzw. einem zusätzlichen Inkubationsschritt in serumfreiem Medium die Ausprägung der Plasmamembran-Lokalisation (Abb.34, S.83). Der Anteil gpr6-GFP-transfizierter Zellen, der unter serumfreien Kultivationsbedingungen eindeutige, teilweise zusätzliche, Plasmamembran-Lokalisation aufweist, wird auf ca. 20% geschätzt. Im Gegensatz dazu kann der S1P-Rezeptor edg3-GFP ausschließlich in der Plasmamembran detektiert werden.

Die folgenden Untersuchungen beziehen sich auf die S1P-induzierte Internalisierung der plasmamembranständigen gpr6-GFP-Rezeptoren unter serumfreien Bedingungen, während die basale, intrazelluläre Lokalisation dieses Rezeptors gesondert unter Kapitel 4, S.81 behandelt wird.

Unter serumfreien Bedingungen führt die S1P-Behandlung (100nM) gpr6-GFP-transfizierter Zellen für 30min und 60min (Abb.25C+D+F, S.75) zur vermehrten Translokation membranständiger Rezeptoren zu intrazellulären Kompartimenten bei 37°C, nicht aber bei 4°C (Abb.25B, S.75). DHS1P löst wie S1P eine Translokation ins Zellinnere aus und nach der Behandlung können keine GFP-Signale mehr in der Plasmamembran detektiert werden.

LPC, SPC oder Sph führen zu keiner Zunahme von gpr6-Internalisierungen (keine Abb.). Obwohl LPA tendenziell zu gpr6-vermittelter Ca^{2+} -Mobilisierung führt (Abb.17B, S.66), löst es keine vermehrte Internalisierung des gpr6-GFP Konstruktes aus (keine Abb.).

Unter serumfreien Bedingungen verhalten sich die plasmamembranständigen gpr6-GFP-Rezeptoren wie die S1P-Rezeptoren edg3- und edg8-GFP, die mit 100nM S1P ebenfalls komplett internalisiert werden können. Teilweise wird eine beginnende Abkuglung edg3/8- und gpr6-GFP-transfizierter Zellen nach 60min beobachtet. Im gleichen Zeitraum löst die Behandlung UII-GFP transfizierter HEK293-Zellen weder Translokation noch Abkuglung aus (Abb.26, S.75).

Ein funktioneller cAMP-Assay belegt die Funktionalität des gpr6-GFP Konstrukts (Abb.32, S.81).

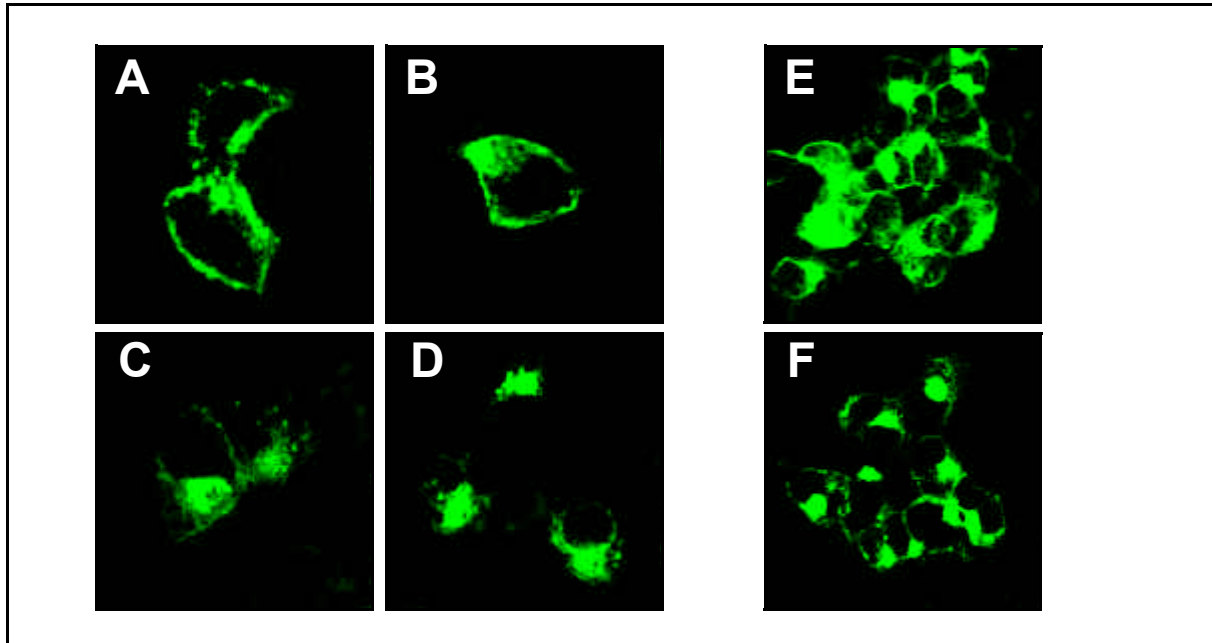


Abb.25 **Agonist-induzierte gpr6-GFP-Internalisierung.** Nach transienter Transfektion mit gpr6-GFP und consequentem Serumentzug werden HEK293-Zellen mit lipidfreiem Medium (A+E) oder 100nM SIP für 30min (C+F) oder 60min (D) behandelt. Am konfokalen Fluoreszenzmikroskop (40x Ölimmersion) zeigt sich die zeitabhängige, SIP-induzierte Internalisierung plasmamembranständiger Rezeptoren bei 37°C, nicht aber bei 4°C (B). Die Fluoreszenzbilder zeigen einzelne Zellen (A-D) bzw. einen Überblick (E+F) von n=5 unabhängigen Einzelexperimenten.

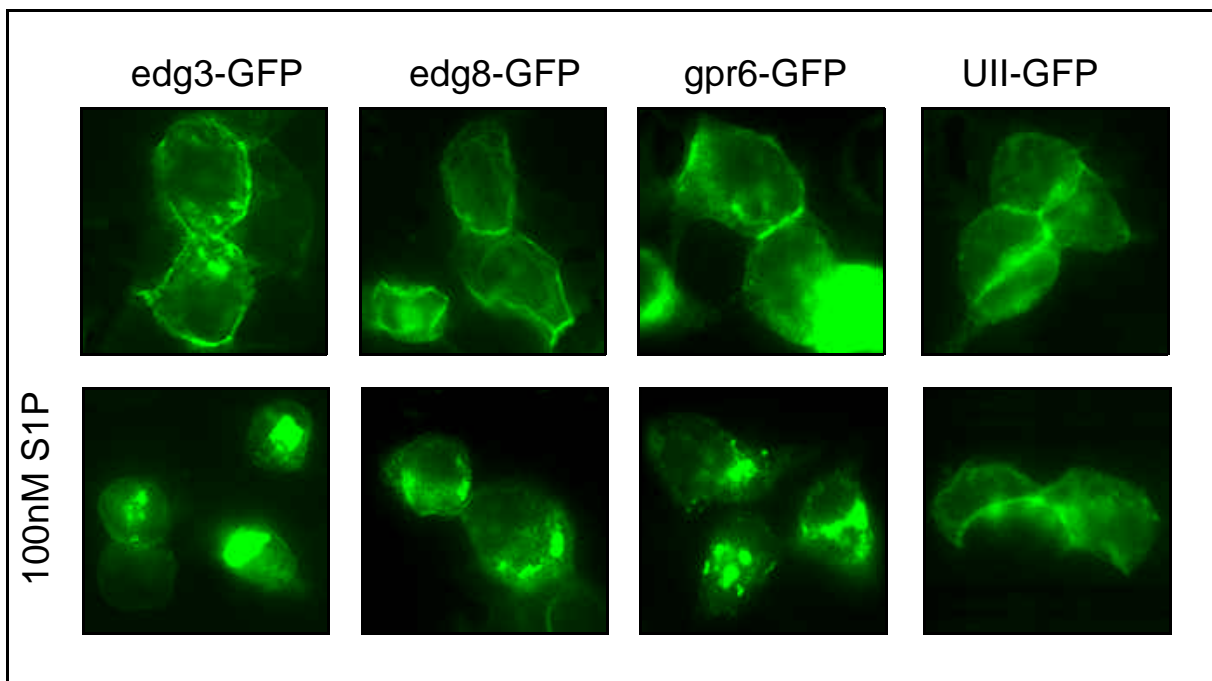


Abb.26 **SIP-induzierte Internalisierung.** edg3-, edg8-, gpr6- und Ull-GFP-transfizierte HEK293-Zellen werden lipid- und serumfrei kultiviert und anschließend für 60min (37°C) einer SIP-Konzentration von 100nM ausgesetzt. Im Fluoreszenzmikroskop (63x Ölimmersion) zeigt sich eine komplette Internalisierung der SIP-Rezeptoren edg3/8 sowie des Rezeptors gpr6 mit beginnender Zellabkuglung. Der Peptidrezeptor Ull ist insensitiv gegenüber SIP. Die Fluoreszenzbilder zeigen Zellen aus n=5 unabhängigen Einzelexperimenten.

2.8. Eine stabile gpr3-Zelllinie zeigt dramatisch erhöhte basale cAMP-Spiegel

HEK293/PSC-Zellen werden mit gpr3/pEAK8 (puro) und pEAK8-Vektor transfiziert und 5 Wochen unter kontinuierlich steigenden Konzentrationen des Selektions-Antibiotikums Puromycin (1mg/ml Endkonzentration) kultiviert.

Nach Ablauf der Selektions-Phase werden gpr3/PSC-Zellen in einem FLIPR/Ca²⁺- und in einem cAMP-Assay auf Funktionalität getestet: In einer Dosis-Wirkungs-Kurve kann gegenüber einer stabilen pEAK8/PSC-Zelllinie keine Ca²⁺-Freisetzung nach Stimulation mit 3nM-3µM S1P gemessen werden (n=2, keine Abb.).

Im Gegensatz dazu wird in gpr3/PSC-Zellen eine Erhöhung des intrazellulären cAMP-Spiegels von >Faktor 10 gegenüber pEAK8/PSC-Zellen gemessen. Vergleichbar hohe cAMP-Freisetzungen werden in pEAK8/PSC-Zellen durch Stimulation mit 250µM Forskolin (fsk) erzielt (Abb.27, S.76).

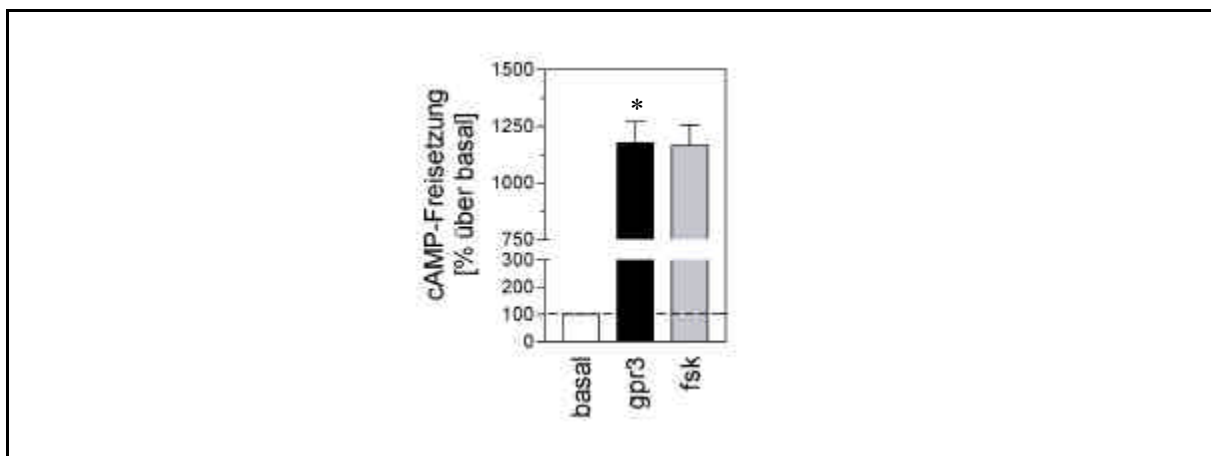


Abb.27 **Konstitutive Aktivierung der Adenylat-Zyklase in einer stabilen gpr3/PSC-Zelllinie.** In einem funktionellen cAMP-Assay zeigt eine stabile gpr3-Zelllinie dramatisch erhöhte basale cAMP-Spiegel, die der Aktivierung Vektor-transfizierter Zellen mit 250µM Forskolin (fsk) entspricht (Mittelwerte \pm SEM, n=4). * kennzeichnet signifikante Unterschiede zu basalen Werten ($p < 0,01$).

3. Signaltransduktion von gpr3, 6 und 12 in HEK293-Zellen

Neben der Identifizierung des Liganden ist die Aufklärung des Signaltransduktionsweges eines G-Protein-gekoppelten Rezeptors entscheidend für das Verständnis seiner Physiologie.

In diesem Kapitel wird die Involvierung der gut charakterisierten G-Proteine $G\alpha_i$, $G\alpha_s$ und $G\alpha_q$ mit Hilfe spezifischer Inhibitoren untersucht. Andere G-Protein-Typen wie z.B. $G\alpha_{12/13}$ werden in diese Untersuchung nicht mit einbezogen.

3.1. gpr3, 6 und 12 koppeln an $G\alpha_i$ - und $G\alpha_s$ -Signaltransduktionswege

Die transiente Transfektion von gpr3, 6 oder 12 in HEK293-Zellen resultiert in einer dramatischen Erhöhung des intrazellulären cAMP-Spiegels, ohne daß es einer Stimulation mit einem Agonisten bedarf. Dieses Verhalten deutet auf eine konstitutive Aktivierung von G-Proteinen des Typs $G\alpha_s$ durch gpr3, 6 und 12 hin (Abb.16, S.64). Überraschenderweise fällt in einem cAMP-Assay, der zur Inaktivierung endogener $G\alpha_i$ -Proteine in Gegenwart von Pertussistoxin (PTX) durchgeführt wird, die konstitutive Aktivierung der Adenylat-Zyklase signifikant höher aus (Abb.28A, S.77). Gleichzeitig können die gpr3-, 6- und 12-vermittelten, konstitutiv erhöhten cAMP-Spiegel durch die Koexpression von $G\alpha_i$ reduziert werden (Abb.28B, S.77). Die fsk-Kontrollen werden weder von PTX noch von der $G\alpha_i$ -Kotransfektion signifikant beeinflusst.

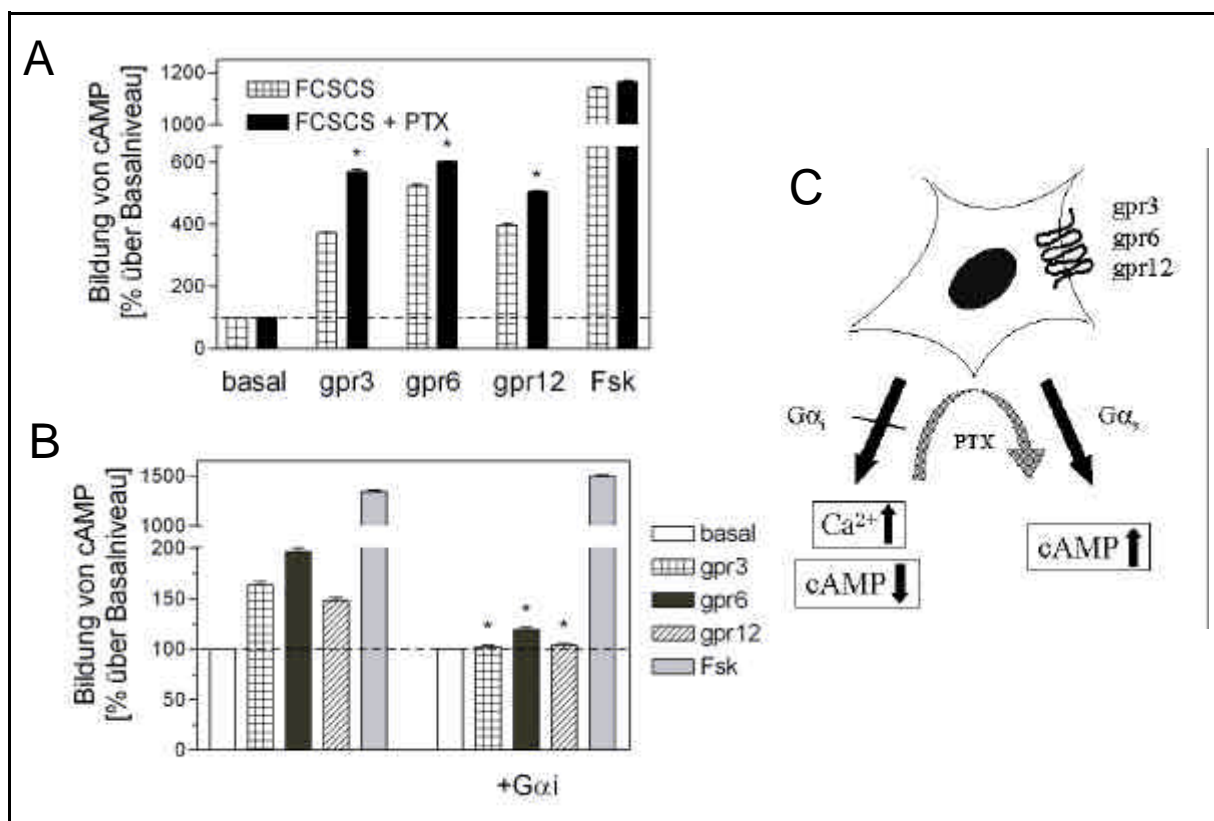


Abb.28 **Konstitutiv aktive Kopplung von gpr3, 6 und 12 an $G\alpha_i$ und $G\alpha_s$.** Die konstitutive Aktivierung der Adenylat-Zyklase durch gpr3, 6 und 12 kann durch PTX signifikant erhöht (A) und durch $G\alpha_i$ -Kotransfektion signifikant erniedrigt werden (B). Darstellung als Prozent der Kontrolle (Vektor-Transfektion) mit Mittelwerten \pm Standardfehler je eines repräsentativen Experiments (6-fach Bestimmung), $n=3$. * kennzeichnet Signifikanz von $p<0.05$ der PTX-Behandlung (A) bzw. der $G\alpha_i$ -Kotransfektion (B). C: Schematische Darstellung der Kopplung an $G\alpha_i$ und $G\alpha_s$.

Diese Ergebnisse lassen zwei Schlußfolgerungen zu:

- 1.) gpr3, 6 und 12 aktivieren parallele Signaltransduktionswege über $G\alpha_i$ und $G\alpha_s$ („*dual coupling*“, Abb.28C, S.77) und
- 2.) Konstitutive Aktivität von gpr3, 6 und 12 aktiviert $G\alpha_i$ - und $G\alpha_s$ -Signaltransduktionswege.

G-Proteine des Typs $G\alpha_i$ vermitteln neben der Stimulation der Adenylat-Zyklase über die α -Untereinheit die Freisetzung des intrazellulären Botenstoffes Ca^{2+} über die $\beta\gamma$ -Untereinheit. Tatsächlich führt die S1P-Stimulation transient gpr3-, 6- und 12-transfizierter HEK293-Zellen in FLIPR/ Ca^{2+} -Assays zu intrazellulären Ca^{2+} -Freisetzungen (Abb.17, S.66). Das S1P-induzierte Ca^{2+} -Signal von gpr3, 6 und 12 kann durch PTX komplett inhibiert werden und bestätigt so die Beteiligung von $G\alpha_i$ -Untereinheiten an der Signaltransduktion, während G-Proteine des Typs $G\alpha_q$ ausgeschlossen werden können (Abb.29A+B, S.78). Die Freisetzung von intrazellulärem Ca^{2+} erfolgt entsprechend über die $\beta\gamma$ -Untereinheit des $G\alpha_i$ -Proteins. Als Kontrolle für die PTX-Behandlung wird der $G\alpha_q$ -koppelnde Angiotensin II-Rezeptor (ATII_{1A}) verwendet, der PTX-Insensitivität aufweist (Abb.29C, S.78).

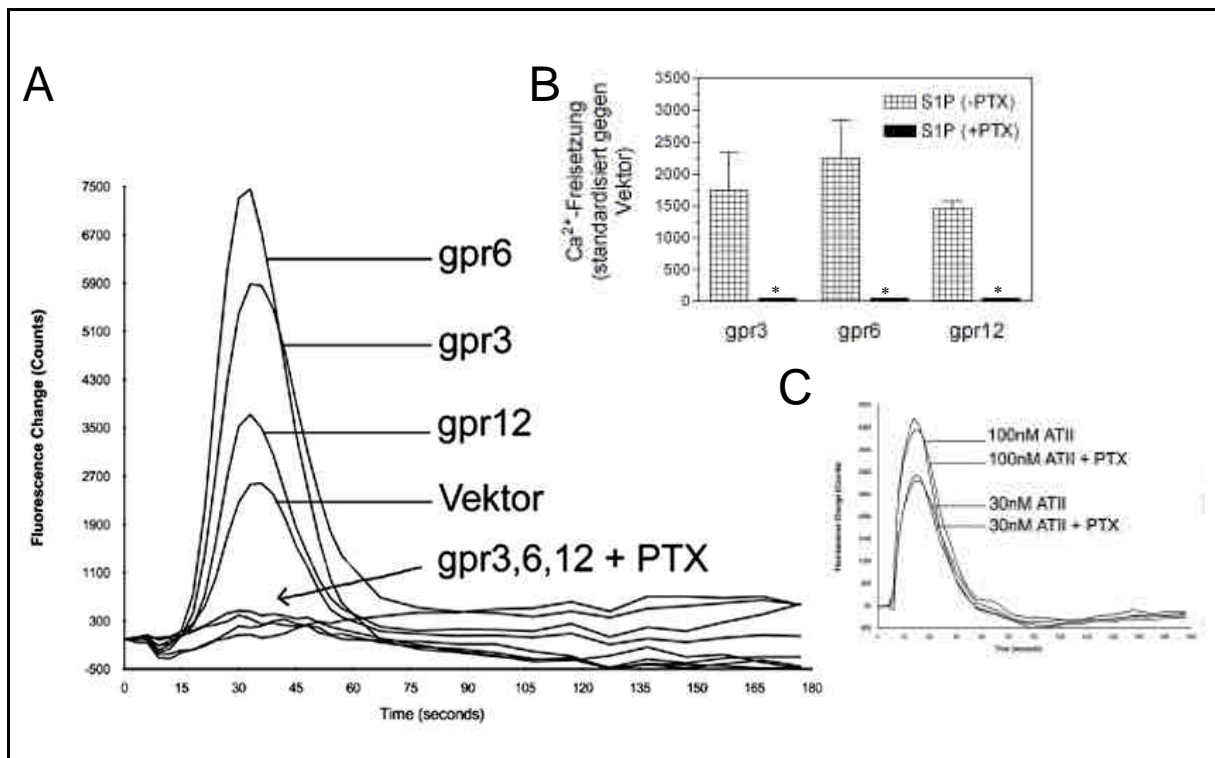


Abb.29 **Beteiligung von $G\alpha_i$ -Untereinheiten an der gpr3-, 6- und 12-Signaltransduktion.** Originale Ca^{2+} -Kurven eines repräsentativen Einzelerperiments (A) und standardisierte Fluoreszenz-Einheiten (Mittelwerte \pm SEM, n=3) (B) zeigen die totale PTX-Sensitivität der S1P ($1\mu M$)-induzierten Ca^{2+} -Freisetzung durch gpr3, 6 und 12, nicht jedoch der des Rezeptors ATII_{1A} nach AT-II-Stimulation (30 und 100nM) (C). * kennzeichnet Signifikanz von $p < 0.001$.

3.2. Die S1P-vermittelte Ca^{2+} -Freisetzung entstammt TG-sensitiven Speichern

Thapsigargin (TG) ist ein Inhibitor der Ca^{2+} -ATPase des Endoplasmatischen Reticulums (ER) und führt zur irreversiblen Leerung intrazellulärer ER- Ca^{2+} -Speicher. Folglich stehen diese Speicher für die Freisetzung von Ca^{2+} nach $\text{G}\alpha_i$ - oder $\text{G}\alpha_q$ -Aktivierung nicht mehr zur Verfügung.

Nach der TG-Behandlung transient gpr3-, 6- und 12-transfizierter HEK293-Zellen ist die S1P-vermittelte Ca^{2+} -Freisetzung komplett aufgehoben (Abb.30A+B, S.79), so daß TG-sensitive, intrazelluläre Ca^{2+} -Speicher als ausschließliche Quellen für die Ca^{2+} -Freisetzung angesehen werden können.

Da mit LPA ($1\mu\text{M}$) noch geringe Mengen Ca^{2+} aus TG-vorbehandelten, Vektor-transfizierten HEK293-Zellen freigesetzt werden kann (Abb.30C, S.79), müssen weitere intrazelluläre Ca^{2+} -Speicher neben dem ER an der LPA-Signaltransduktion beteiligt sein (z.B. der Zellkern oder Mitochondrien).

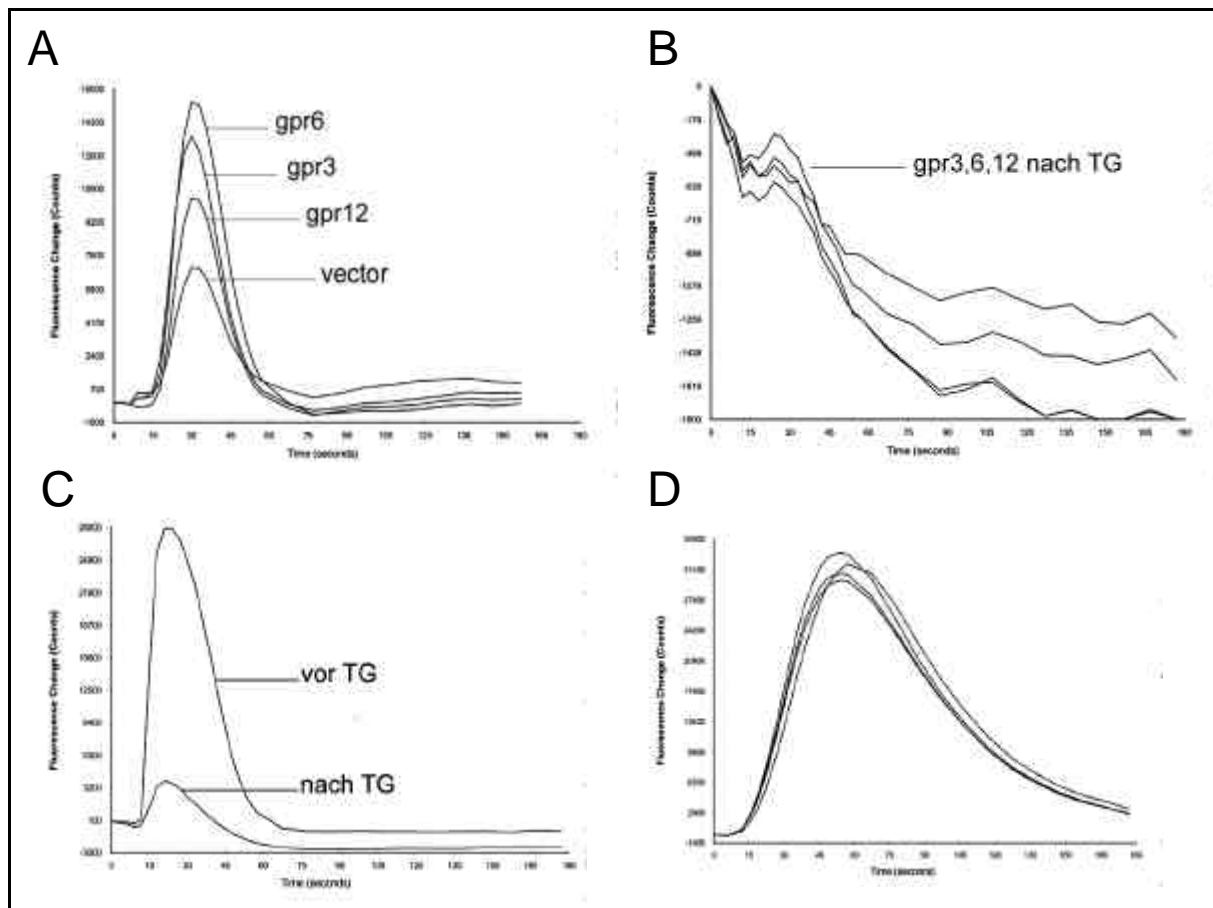


Abb.30 **Inhibition der gpr3-, 6- und 12-vermittelten Ca^{2+} -Mobilisierung durch Thapsigargin (TG).** Das S1P-induzierte Ca^{2+} -Signal der drei Rezeptoren (A) ist komplett hemmbar durch TG (B). Im Gegensatz dazu lassen sich nach der TG-Behandlung Vektor-transfizierter HEK293-Zellen mit LPA noch geringe Mengen Ca^{2+} freisetzen (C). D: Typische Ca^{2+} -Freisetzungen initiiert durch TG. Originaldaten von $n=3$ Experimenten (je Dreifachbestimmung) sind dargestellt.

3.3. Die Sphingosin-Kinase ist an der Signaltransduktion beteiligt

Eine 15-minütige Präinkubation von gpr3-, 6- und 12-transfizierten HEK293-Zellen mit dem kompetitiven Sphingosin-Kinase-Inhibitor Dimethylsphingosin (DMS, 30 μ M) führt zu einer 50-75%igen Reduktion des S1P-induzierten Ca²⁺-Signals (Abb.31A, S.80). Dieses Ergebnis deutet auf die Involvierung der intrazellulären Sphingosin-Kinase an der gpr3-, 6- und 12-vermittelten Ca²⁺-Signaltransduktionskaskade hin.

Im Gegensatz dazu ist die endogene, LPA-induzierte Ca²⁺-Freisetzung in HEK293-Zellen komplett insensitive gegenüber DMS (Abb.31B, S.80).

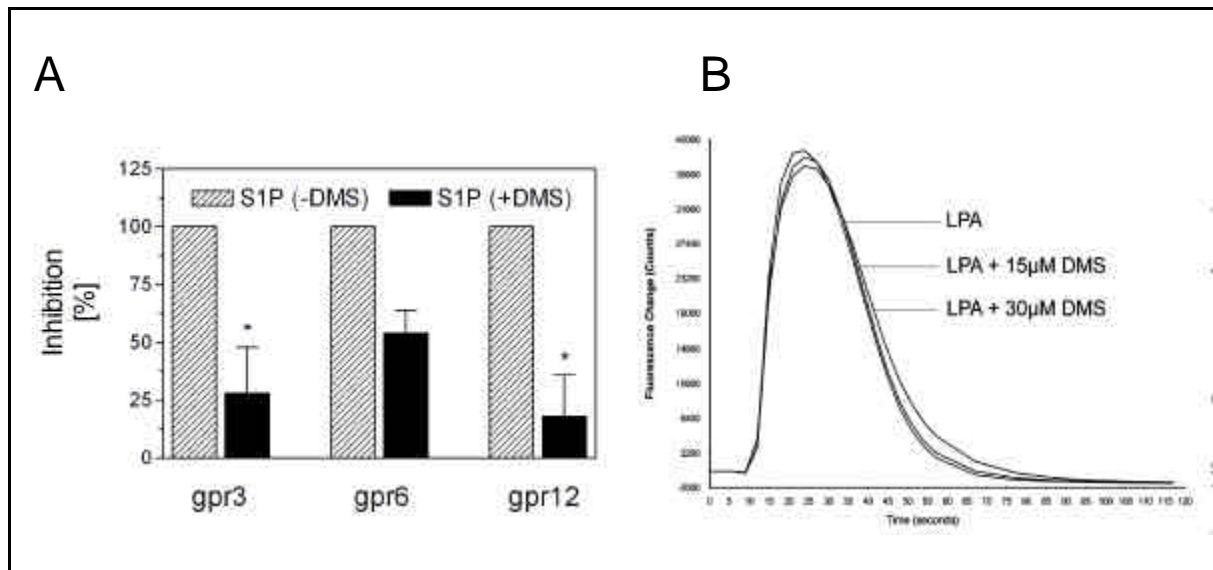


Abb.31 Beteiligung der Sphingosin-Kinase an der gpr3-, 6- und 12-vermittelten Ca²⁺-Freisetzung. Das Ca²⁺-Signal der drei Rezeptoren in HEK293-Zellen ist partiell sensitiv gegenüber Inhibitoren der Sphingosin-Kinase (z.B. DMS) (A). Daten sind dargestellt als Prozent der Kontrolle ohne DMS-Behandlung (Mittelwerte \pm SEM, n=3). * kennzeichnet Signifikanz von $p < 0.05$ gegenüber unbehandelten Zellen. **B:** Repräsentative Ca²⁺-Kurven des endogenen LPA-Hintergrundes zeigen Insensitivität gegenüber DMS.

4. Einfluß von konstitutiver Aktivität auf die zelluläre Lokalisation von gpr3, 6 und 12

4.1. Herstellung und Charakterisierung eines gpr6-GFP-Fusionsproteins

Exemplarisch für die gpr3, 6 und 12-Rezeptorfamilie wird ein C-terminales Fusionskonstrukt des humanen Rezeptors gpr6 mit einem grün-fluoreszierenden Protein der Qualle *Aequoria victoria* (GFP) hergestellt und hinsichtlich Lokalisation und Physiologie in HEK293-Zellen per Fluoreszenzmikroskopie analysiert.

Für die Fusion ist es erforderlich, das STOP-Codon der gpr6-Sequenz durch PCR-Mutagenese zu deletieren und das PCR-Fragment *in-frame* in den GFP-Fusionsvektor pEGFP-N3 (Clontech) zu klonieren. Zum Vergleich mit anderen S1P- bzw. Peptid-Rezeptoren werden edg3-GFP, edg8-GFP bzw. Urotensin-II (UII)-GFP-Konstrukte (A. Hattenberger, Aventis Pharma, unveröffentlicht) hergestellt.

24h nach transients Transfektion des Fusionskonstrukts gpr6-GFP in HEK293-Zellen kann in einem cAMP-Assay eine signifikante Erhöhung des intrazellulären cAMP-Spiegels im Vergleich zu Vektor (pEGFP-N3)-transfizierten Zellen gemessen werden (Abb.32, S.81). Obwohl das gpr6-GFP-Konstrukt konstitutive Aktivität aufweist, ist das Ausmaß der Stimulation in HEK293-Zellen gegenüber dem gpr6-Wild-Typ reduziert und muß als partielle Einschränkung der gpr6-Physiologie durch das eGFP-tag (Beeinträchtigung der Proteinfaltung, Expressionsrate etc.) interpretiert werden. Nichtsdestotrotz erfolgt offensichtlich die Expression und der Transport des Fusionsproteins zur Plasmamembran, gefolgt von konstitutiver Stimulation des $G\alpha_s$ -Signaltransduktionswegs.

Aufgrund überlappender Absorption von GFP und dem Ca^{2+} -Indikator fluo-4 bei 488nm kann der FLIPR/ Ca^{2+} -Assay nicht zur Charakterisierung von GFP-Konstrukten, z.B. anhand von Dosis-Wirkungs-Beziehungen, herangezogen werden.

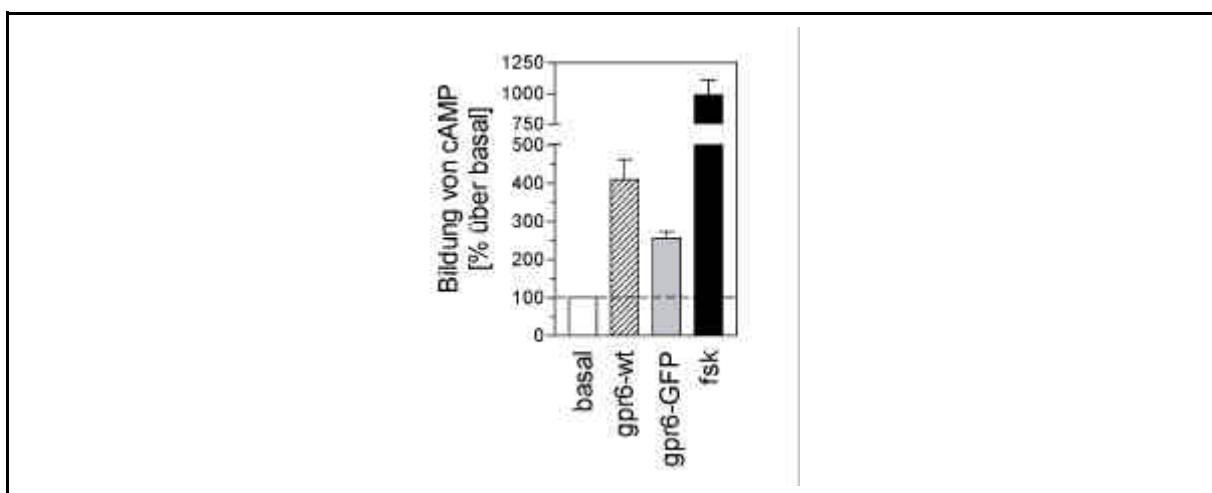


Abb.32 **Funktionalität des gpr6-GFP-Fusionsproteins in HEK293-Zellen.** gpr6-GFP und gpr6-wt werden transient in HEK293-Zellen transfiziert und in einem funktionellen cAMP-Assay hinsichtlich konstitutiver Aktivierung der Adenylat-Zyklase nach Kultivierung in lipidfreiem Medium untersucht. Die Ergebnisse sind dargestellt als Prozent über basal (pcDNA3.1 (gpr6-wt) bzw. pEGFP (gpr6-GFP)) je als Mittelwert \pm SEM, n=3 (gpr6-GFP) bzw. n=8 (gpr6-wt).

4.2. Lokalisation von gpr3, 6 und 12 in HEK293-Zellen

Nach Kultivierung unter Standard-Bedingungen (10% FCS) werden endogen exprimierte Rezeptoren gpr3, 6 und 12 (Abb.18C, S.67) unter Verwendung der gpr3-, 6- und 12-Peptidantikörper und einem Anti-Kaninchen Alexa530nm-Sekundärantikörper in untransfizierten HEK293-Zellen immunologisch detektiert. Am konfokalen Fluoreszenzmikroskop zeigt sich für alle drei Rezeptoren eine überwiegend diffuse, intrazelluläre Lokalisation mit Aussparung des Zellkerns (Abb.33, S.82).

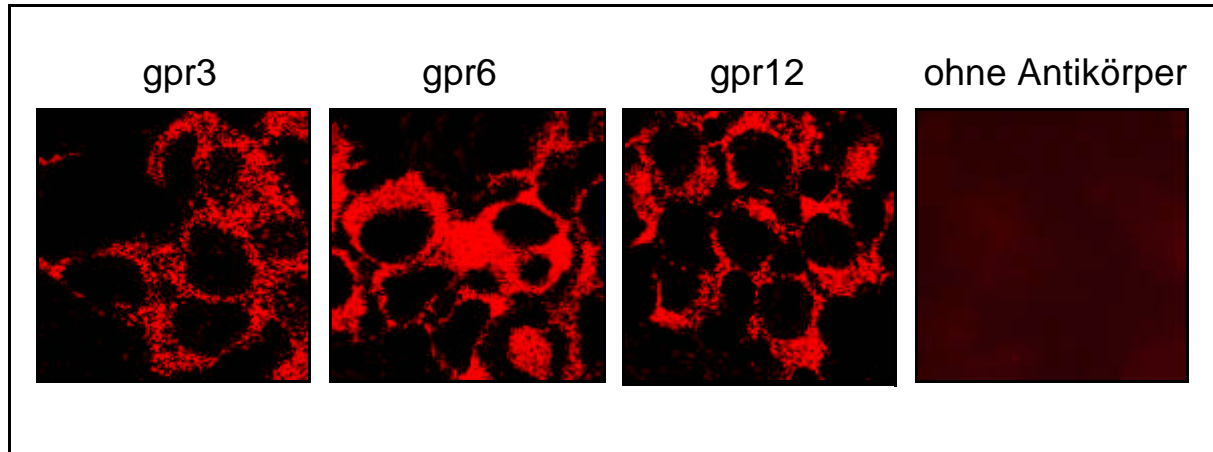


Abb.33 Zytoimmunologische Färbung endogen exprimierter Rezeptoren gpr3, 6 und 12. HEK293-Zellen (Kultivierung in Standard-Medium) werden fixiert, permeabilisiert und mit gpr3-, 6- bzw. 12-Peptidantikörpern inkubiert. Die Analyse der Immunfärbung erfolgt per konfokaler Fluoreszenzmikroskopie nach Kofärbung mit einem Alexa530nm-Sekundärantikörper. Für alle drei Rezeptoren werden diffuse Signale im Zellinneren mit Aussparung der Zellkerne erhalten, während der Sekundärantikörper keine Signale liefert. Die dargestellten Bilder zeigen repräsentative Zellen aus 2 unabhängigen Immunfärbungen.

Die intrazelluläre Verteilung des endogen exprimierten Rezeptors gpr6 (Abb.33, S.82) unterscheidet sich nicht von der des rekombinanten gpr6-GFP-Fusionsproteins unter Standard-Kultivationsbedingungen (10% FCS) (Abb.34A, S.83). Folglich kann das Auftreten der intrazellulären Lokalisation aufgrund der Fusion mit dem GFP-Protein ausgeschlossen werden.

Die Kultivierung in lipidfreiem Medium (10% FCSCS) fördert die Ausprägung einer Plasmamembran-Lokalisation (Abb.34B, S.83) und kann durch konsequenten Serumentzug im Medium (1-2h, 37°C) tendenziell weiter verstärkt werden (Abb.34C, S.83) (vgl. 2.7, S.74). Vergleichsweise ist der S1P-Rezeptor edg3-GFP, für den keine konstitutive Aktivität beschrieben ist, unabhängig vom Lipidgehalt des Mediums in der Plasmamembran lokalisiert (Abb.34D, S.83).

Die Abhängigkeit vom Serum- bzw. Lipidgehalt im Medium ist eine weitere Bestätigung für einen bioaktiven Aktivator im Serum. Nichtsdestotrotz kann der Anteil der Zellen, die eine Plasmamembran-Lokalisation zeigen, nicht über ca. 20% gesteigert werden.

Möglicherweise ist die konstitutive Aktivität des gpr6 mit für die intrazelluläre Lokalisation verantwortlich.

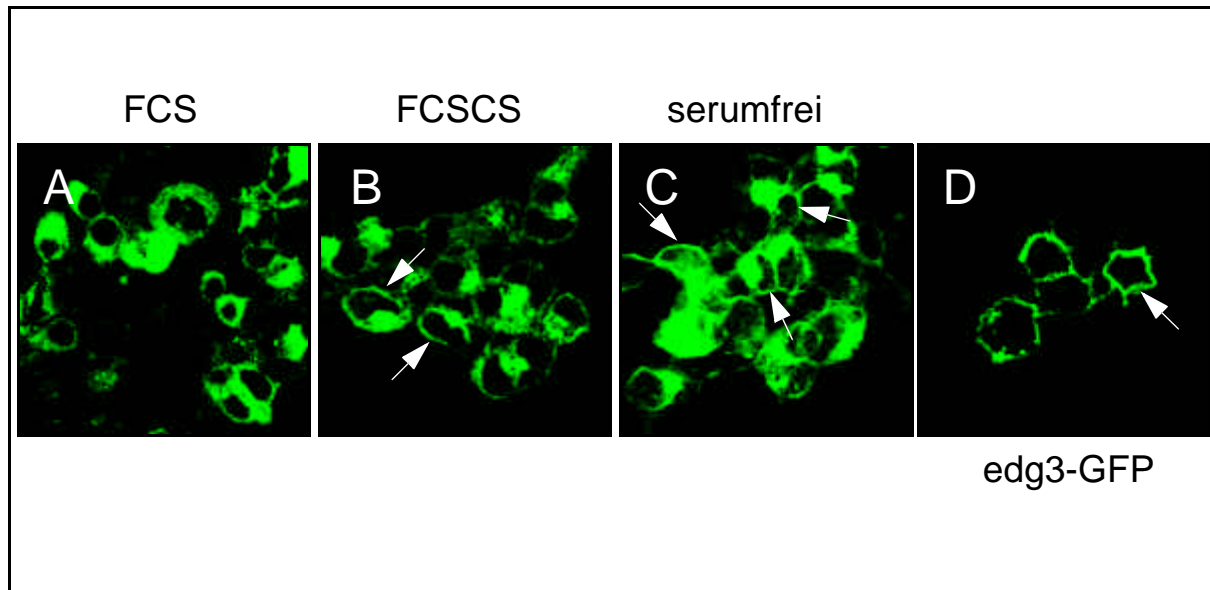


Abb.34 Intrazelluläre Lokalisation von gpr6-GFP. HEK293-Zellen werden mit gpr6-GFP (A-C) transfiziert und unter Standard-Bedingungen (10% FCS) (A), Lipidentzug (10% FCSCS) (B) bzw. Serumentzug (1-2h, 37°C) (C) kultiviert. 30h nach transients Transfektion und Kultivierung in 10% FCS ist gpr6-GFP fast ausschließlich intrazellulär lokalisiert (A). Lipidentzug erhöht den Anteil der Zellen, die eine zusätzliche Plasmamembran-Lokalisation des gpr6-GFP aufweisen (B). Die Ausprägung der Plasmamembran-Lokalisation kann durch Serumentzug (C) weiter gesteigert werden. Der Anteil der Zellen, die unter Serumentzug eine Plasmemembran-Lokalisation des gpr6-GFP zeigen (siehe Pfeile) beträgt ca. 20%. Der SIP-Rezeptor edg3-GFP ist unabhängig vom Lipidgehalt des Mediums in der Plasmamembran lokalisiert (D). Die Bilder A-D zeigen repräsentative Zellen aus 3-5 unabhängigen Experimenten im konfokalen Fluoreszenzmikroskop. edg3-GFP (D) wird stärker exprimiert als gpr6-GFP (A-C) und kann deshalb mit geringeren Belichtungszeiten detektiert werden.

4.3. Die Adenylat-Zyklase-Aktivierung verhält sich umgekehrt proportional zum Expressionsniveau

Zum Zeitpunkt relativ schwacher gpr6-GFP Expression (<36h) wird in HEK293-Zellen unter lipidfreien Bedingungen eine schwach ausgeprägte Plasmamembran-Lokalisation mit zusätzlichen, dominierenden intrazellulären GFP-Signalen festgestellt (Abb.34B, S.83). Da die konstitutive Aktivierung der Adenylat-Zyklase ausschließlich von GPCRs in der Plasmamembran initiiert werden kann, ist die Abhängigkeit der Adenylat-Zyklase-Aktivierung vom gpr3-, 6- und 12-Expressionsniveau in HEK293-Zellen untersucht worden.

Die drei GPCRs induzieren 24h nach transients Transfektion und Kultivierung in lipidfreiem Medium (10% FCSCS) einen starken Anstieg des basalen cAMP-Spiegels um 300% gegenüber dem Niveau Vektor-transfizierter Zellen (vgl. Abb.16, S.64). Dieses Verhalten wird anhand vorheriger Ergebnisse als konstitutive G α_s -Aktivierung interpretiert (3.1., S.77).

Interessanterweise reduziert sich das Ausmaß der Agonist-unabhängigen Adenylat-Zyklase-Stimulation um 25-45% nach 48h (Abb.35A, S.84). Um zu untersuchen, ob die reduzierte Funktionalität der Rezeptoren auf eine verringerte Expression auf der Plasmamembran zurückzuführen ist, wird zur „Visualisierung“ der zellulären Bedingungen die konfokale Fluoreszenzmikroskopie herangezogen.

24h nach der Transfektion (lipidfreie Bedingungen) ist die Expression des gpr6-GFP sehr schwach ausgeprägt, und GFP-Fluoreszenzsignale können in intrazellulären Kompartimenten und teilweise an der Plasmamembran lokalisiert werden. Nach weiteren 24h sind gpr6-GFP-Signale deutlich verstärkt, allerdings weisen nahezu alle Zellen GFP-Signale innerhalb der Zelle auf. Im direkten Vergleich dazu zeigen edg3-GFP transfizierte Zellen 48h nach der Transfektion ausschließlich Plasmamembran-Lokalisation (Abb.35B, S.84).

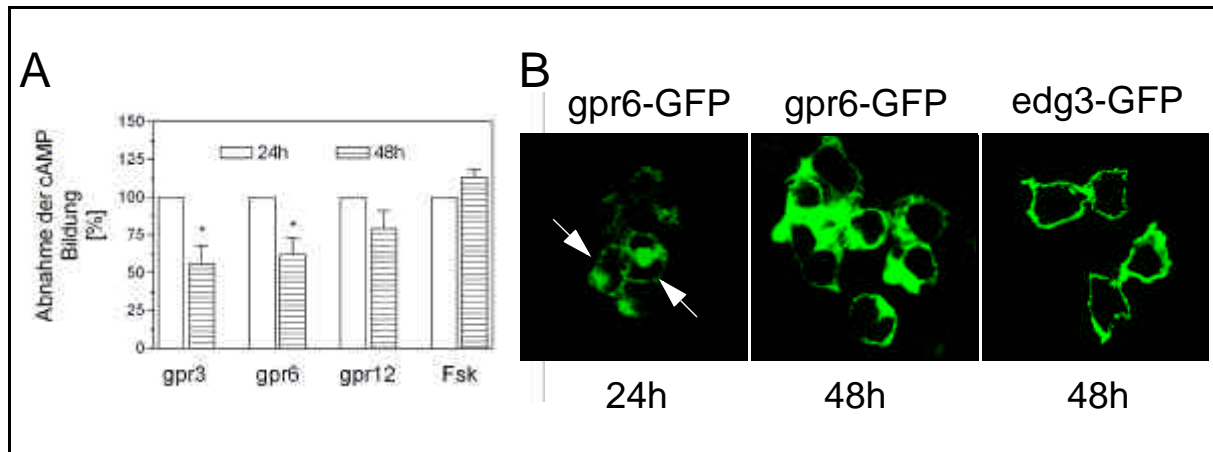


Abb.35 Korrelation zwischen konstitutiver Aktivität und intrazellulärer Lokalisation. Das Ausmaß der Adenylat-Zyklase-Aktivierung nach transienter Transfektion von gpr3, 6 und 12 ist nach 48h geringer als nach 24h (A). Anhand des gpr6-GFP Konstruktes kann im Vergleich zum 24h-Zeitwert eine Zunahme der Expression sowie die Anhäufung von GFP-Fusionsproteinen im Zellinneren nach 48h festgestellt werden (B). Daten in A sind dargestellt als prozentuelle Abnahme der cAMP-Bildung (Mittelwert \pm SEM, n=3); * symbolisiert signifikante Unterschiede zwischen 24h und 48h Zeitwerten. B: Konfokale Fluoreszenzbilder des gpr6-GFP 24h und 48h nach der Transfektion im Vergleich zu edg3-GFP (n=2). Die Pfeile kennzeichnen schwache Plasmamembranlokalisation nach 24h. Die Belichtungszeiten der Bilder sind identisch.

4.4. Ein putatives ER-Retentions-Signal hat keinen Einfluß auf die Lokalisation

Primärsequenz-Analysen zeigen die Präsenz von Dileucin (Isoleucin)-Motiven im C-Terminus von gpr6 und gpr12 sowie eines „RXR“-Motivs im C-Terminus von gpr3, 6 und 12 (Abb.36A, S.85) und rgpr3 (Abb.15, S.63). Sowohl „LL/LI“ als auch „RXR“ werden mit intrazellulären Transport- und Internalisierungsvorgängen in Verbindung gebracht. Das „RXR“-Motiv vermittelt beispielsweise bei GABA_{B1}-Rezeptoren eine Retention im ER. Erst durch die Heterodimerisierung mit einer GABA_{B2}-Untereinheit wird das Motiv maskiert und der funktionelle GABA_{B1/B2}-Rezeptor zur Plasmamembran transportiert (Margeta-Mitrovic *et al.*, 2000, Pagano *et al.*, 2001).

Um die Relevanz dieses putativen Motivs für die Lokalisation des gpr6-GFP zu untersuchen, bzw. um die Frage zu klären, ob die intrazelluläre Lokalisation möglicherweise auf eine ER-Retention zurückzuführen ist, wird das Motiv per PCR-Mutagenese gegen die neutralen Aminosäuren Alanin (A) ausgetauscht. Das Entfernen des putativen ER-Retentions-Motivs im Rezeptor gpr6-GFP sollte im Falle gleicher physiologischer Bedeutung wie beim GABA_{B1}-Rezeptor zur Aufhebung der Retention und zum Transport des Fusionskonstruktes gpr6(RSR->AAA)-GFP zur Plasmamembran führen.

gpr6-GFP und gpr6(RSR->AAA)-GFP werden in HEK293-Zellen transfiziert und die Lokalisation per konfokaler Fluoreszenzmikroskopie analysiert. Die GFP-Signale des gpr6(RSR->AAA)-GFP (Abb.36D, S.85) sind gegenüber dem gpr6-GFP (Abb.36C, S.85) deutlich schwächer ausgeprägt, jedoch liegt nach Kultivierung der Zellen in lipidfreiem Medium (10% FCSCS) weiterhin eine Anhäufung im ER vor. Da auch das gpr6(RSR->AAA)-GFP Konstrukt in einem cAMP-Assay zu erhöhten cAMP-Spiegeln führt (Abb.36B, S.85), können daraus folgende Schlüsse gezogen werden:

- 1.) Das „RXR“-Motiv hat im Fall von gpr6-GFP nicht die Funktion der ER-Retention wie im Fall des GABA_{B1}-Rezeptors.
2. Das Motiv ist relevant, es fehlen jedoch weitere charakteristische Wechselwirkungspartner in HEK293-Zellen.
- 3.) Das „RXR“-Motiv im C-Terminus von gpr3, 6 und 12 ist Zufall.

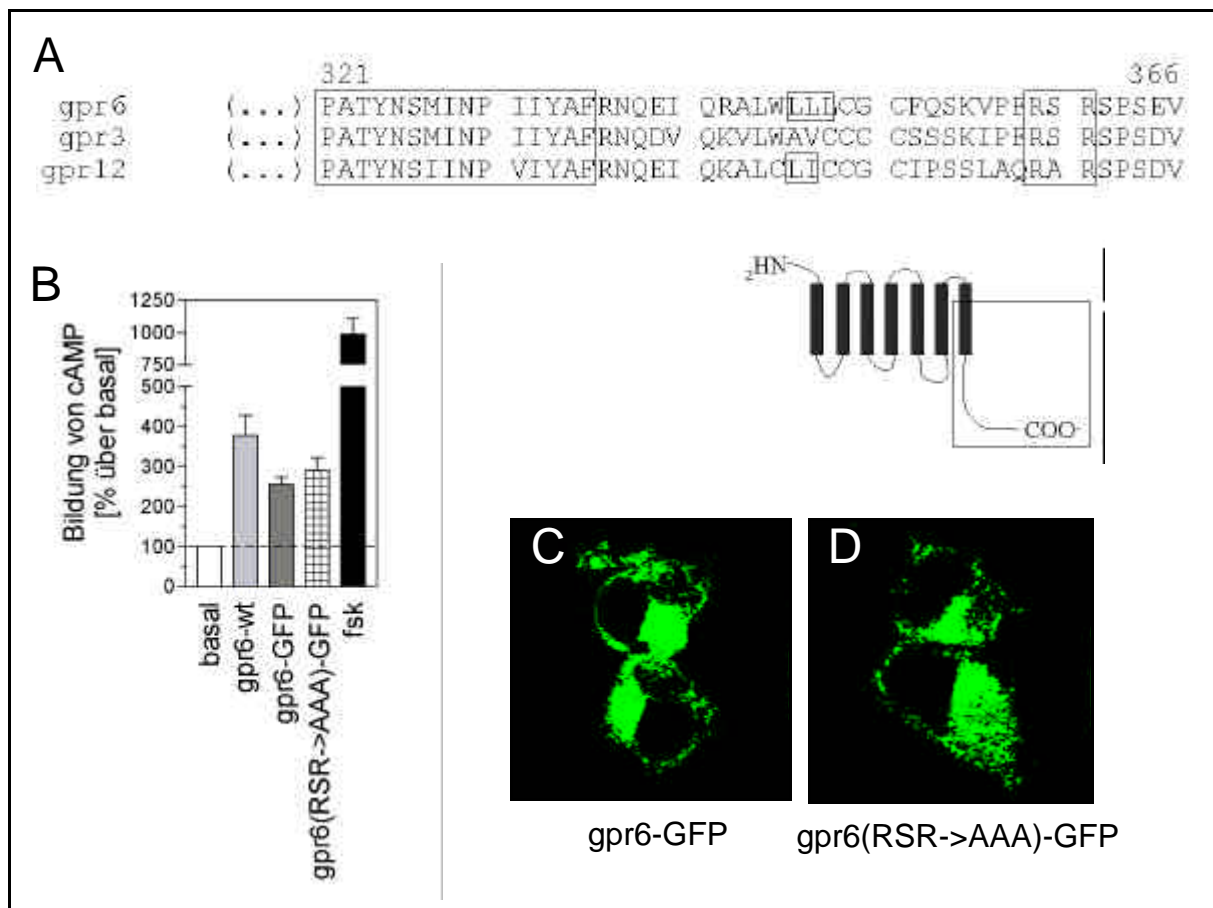


Abb.36 Substitution eines putativen ER-Retentions-Motivs. Der C-Terminus von gpr3, 6 und 12 zeigt „LL/LI“-Motive und ein „RXR“-Motiv, das ER-Retention bei GABA_B-Rezeptoren bewirkt (A). Eine gpr6-GFP-Mutante ohne das „RSR“-Motiv (RSR->AAA) zeigt eine konstitutive Adenylat-Zyklase-Stimulation von ca. 300% über dem Niveau Vektor-transfizierter Zellen (B) und unterscheidet sich nicht in der intrazellulären Lokalisation (D) von gpr6-GFP (C). Die cAMP-Bildung durch gpr6-wt, gpr6-GFP bzw. gpr6(RSR->AAA)-GFP ist dargestellt als Prozent über basal (pcDNA3.1- bzw. pEGFP-Transfektion) (Mittelwerte \pm SEM, n=2-3). C und D zeigen repräsentative intrazelluläre Verteilungen per konfokaler Fluoreszenzmikroskopie (40x Ölimmersion) (n=2).

4.5. Einfluß von Kotransfektion auf die intrazelluläre Lokalisation

In den letzten Jahren haben Berichte über GPCR-Oligomerisierung die Komplexität dieser Rezeptorfamilie weiter erhöht. Wie bereits unter 4.4., S.84 angesprochen, ist beispielsweise die Heterodimerisierung von GABA_{B1}- und GABA_{B2}-Untereinheiten Kriterium für den Transport zur Plasmamembran (Pagano *et al.*, 2001).

Da gpr3, 6 und 12 jeweils endogen in HEK293-Zellen exprimiert werden (Abb.18C, S.67; Abb.33, S.82), kann nicht ausgeschlossen werden, daß diese Rezeptoren untereinander funktionelle Heterodimere ausbilden, die möglicherweise für den funktionellen Transport zur Plasmamembran bzw. die Zurückhaltung im ER relevant sind.

gpr3 und gpr12 werden jeweils mit gpr6-GFP kotransfiziert und die Beeinflussung der gpr6-GFP-Lokalisation per konfokaler Fluoreszenzmikroskopie analysiert. Weder die Kotransfektion mit gpr3 noch mit gpr12 führt zu Veränderungen der überwiegend perinukleär dominierten Lokalisation von gpr6-GFP (Abb.37, S.86). Mit diesem Ergebnis kann eine funktionelle Heterodimerisierung innerhalb der gpr3, 6 und 12-Rezeptorfamilie nicht absolut ausgeschlossen werden; es kann aber postuliert werden, daß eine Heterodimerisierung von gpr3 oder gpr12 mit gpr6-GFP unrelevant für den Transport von gpr6-GFP zur Plasmamembran ist.

Da das GFP-Protein am C-Terminus von gpr6-GFP möglicherweise zur sterischen Hinderung einer Interaktion mit gpr3 oder gpr12 beiträgt, kann eine exakte Interaktionsanalyse nur durch Kotransfektion der Wildtyp-Rezeptoren geklärt werden.

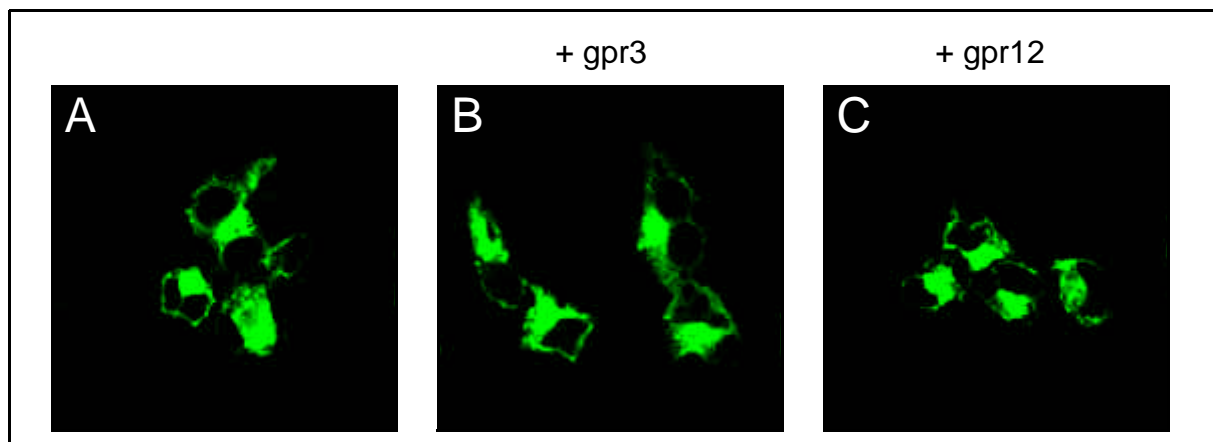


Abb.37 **Kotransfektion von gpr6-GFP mit gpr3 und gpr12.** 48h nach transientser Kotransfektion von gpr6-GFP mit pcDNA3.1 (A), gpr3 (B) bzw. gpr12 (C) und Kultivierung in lipidfreiem Medium (10% FCSCS) zeigt sich im konfokalen Fluoreszenzmikroskop (40x Ölimmersion) eine überwiegend intrazelluläre Lokalisation von gpr6-GFP. Die parallele Präsenz von gpr3 (B) bzw. gpr12 (C) hat keinen Einfluß auf das zelluläre Verteilungsmuster. Die Bilder zeigen repräsentative Zellen aus 2 unabhängigen Experimenten.

4.6. Untersuchung von inversem Agonismus am Rezeptor gpr6

Während eine Agonist-stimulierte Aktivierung durch einen Antagonisten aufgehoben werden kann, versteht man unter inversem Agonismus die Abschaltung einer Agonist-unabhängigen, konstitutiven Aktivität. Sofern die intrazelluläre Lokalisation von gpr3, 6 und 12 tatsächlich durch konstitutive basale Internalisierung ausgelöst wird, könnte ein inverser Agonist diesem Prozeß entgegenwirken und die „Externalisierung“ zur Plasmamembran ermöglichen.

Arena Pharmaceuticals, USA beansprucht in seinem Patent WO 0162765 eine Reihe von Substanzen mit Wirkung als inverse Agonisten am Rezeptor gpr6 (ca. 100 Stück). Zwei dieser Substanzen wurden ausgewählt, Aventis-intern synthetisiert (Bereitstellung durch Dr. Stengelin, Aventis Pharma, DG Metabolismus) und hinsichtlich der Reduktion konstitutiv erhöhter cAMP-Spiegel sowie „Externalisierung“ des gpr6-GFP Konstrukts getestet.

Keine der beiden Substanzen (Aventis-interne Bezeichnungen ARE-111 und ARE-112) führt zu einer signifikanten Reduktion der gpr6-vermittelten Adenylat-Zyklase-Aktivierung in einer Konzentration von 100µM (30min bzw. 90min Inkubation) (Abb.38A, S.87). Im Fluoreszenzmikroskop zeigt sich eine verstärkte Vesikelbildung, gefolgt von Zellabkuglung und Zelltod nach >2h bei 37°C (100mM Stock-Lösungen beider Substanzen in DMSO, Verdünnung in Medium 1:1000) (Abb.38B, S.87). Geringere Konzentrationen von ARE-111 oder ARE-112 (bis 100nM) mit entsprechend verlängerten Inkubationszeiten (1h, 2h, 6h, 20h) führen ebenfalls zur Zellabkuglung und haben keinen erkennbaren Effekt auf die Adenylat-Zyklase-Stimulation.

Das Fazit aus diesem Versuch ist, daß die Substanzen ARE-111 und ARE-112 keine invers-agonistische Wirkung an dem Rezeptor gpr6 haben. Das „Zerstören“ der GFP-Signale ist weniger auf eine beginnende „Externalisierung“ zur Plasmamembran als auf Zytotoxizitäts-Effekte zurückzuführen. Entsprechend ist die Bestimmung der gpr6-GFP-Lokalisation nach Abschalten der konstitutiven Aktivität mit diesen Substanzen nicht möglich.

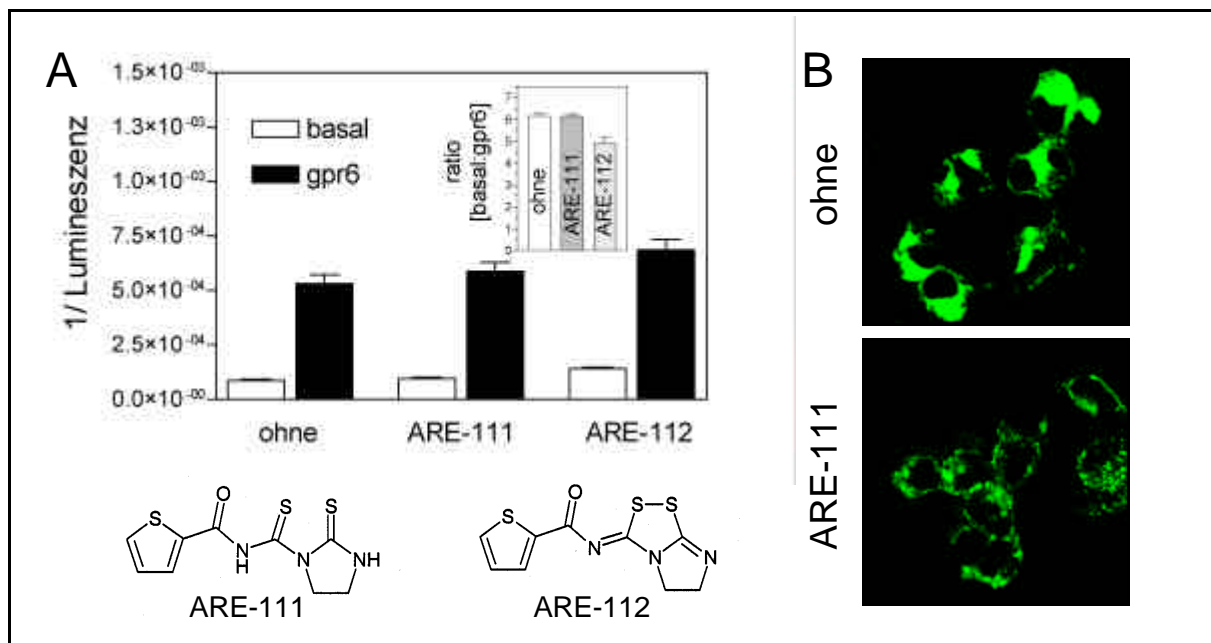


Abb.38 Untersuchung potentiell inverser Agonisten am Rezeptor gpr6. gpr6 bzw. gpr6-GFP transfizierte HEK293- Zellen werden mit den Substanzen ARE-111 und ARE-112 präinkubiert (100µM, 30 bzw. 90min) und nachfolgend in einem funktionellen cAMP-Assay (**A**) bzw. im konfokalen Fluoreszenzmikroskop (**B**) auf Wirkung untersucht. Keine der Substanzen führt zu einer Reduktion der gpr6-vermittelten Adenylat-Zyklase-Aktivierung (**A**). Dargestellt ist die relative Stimulation der Adenylat-Zyklase durch gpr6 und Vektor-Kontrolle sowie das Verhältnis Vektor:gpr6 (siehe Insert in **A**) (Mittelwerte ± SEM, n=3). Die gpr6-GFP Signale scheinen sich nach Behandlung mit ARE-111 (100µM, 1h) zu zerstreuen (**B**). Dieser Effekt scheint jedoch weniger auf ein Abschalten der konstitutiven Aktivität als auf Zytotoxizität zurückzuführen zu sein. Die Bilder zeigen repräsentative Zellen aus n=2 unabhängigen Versuchen.

5. Expressionsprofile der Rezeptoren gpr3, 6 und 12

Aufgrund dominanter Expression im Hirn wurde bislang ein Ligand mit Neurotransmitterfunktion für gpr3, 6 und 12 vermutet (Iismaa *et al.*, 1994, Heiber *et al.*, 1995, Eggerickx *et al.*, 1995).

Der im Rahmen dieser Arbeit identifizierte Ligand S1P impliziert nun zusätzlich kardiovaskuläre Funktionen.

Die systematische Charakterisierung der Gewebeverteilung dieser Rezeptorfamilie wird im folgenden Kapitel mit unterschiedlichsten Methoden untersucht: Neben RNA-basierenden Nachweismethoden (RT-PCR-, Taqman-PCR-, Northern Blot- und RNA-Chip-Analyse) wird mit Hilfe spezifischer gpr3-, 6- und 12-Peptidantikörper die Expression auf der Proteinebene (Western Blot-, Zytoimmunfluoreszenz-Analyse) untersucht.

Der Schwerpunkt der Arbeiten wird auf Organe bzw. Gewebe mit Herz-Kreislauf-relevantem Charakter gelegt.

5.1. Charakterisierung von Peptidantikörpern, RNA-Sonden und PCR-primern

5.1.1. Antikörper-Gewinnung: Analyse der Immunisierung im Western Blot

Die Immunisierung von Kaninchen mit Peptiden des N-Terminus von gpr3, 6 bzw. 12 (Alpha Diagnostics, USA) wird mit Hilfe von ELISA (Alpha Diagnostics, USA) und Western Blot-Analyse an HUVEC-Membranfraktionen bzw. HUVEC-Gesamtzellslysaten überprüft. Nach drei Auffrischungsimmunisierungen werden die Peptidantikörper durch Affinitätschromatographie über das jeweilige Peptid gereinigt (Charles River Wiga Deutschland GmbH).

Die Abb. 39-41, S.89-90 zeigen die Serumproben je eines Kaninchens vor der Immunisierung (A-0, Präimmunserum) und nach jeweils 7(A), 9 (B) und 20 Wochen (C) sowie die gereinigten Antikörper (D) in drei Verdünnungen (z.B. 1:10, 1:100, 1:1000) in Western Blot-Analysen. Die Membranen werden nach dem Transfer elektrophoretisch aufgetrennter HUVEC-Proteine in mehrere identische Streifen geschnitten, um verschiedene Verdünnungen gleichzeitig testen zu können.

Die theoretisch zu erwartenden Molekulargewichte von gpr3, 6 und 12 betragen 35kDa, 38kDa bzw. 37kD. Da bereits in der Literatur mehrere potentielle Glykosylierungsstellen für gpr3 und gpr6 postuliert wurden sind (Iismaa *et al.*, 1994, Heiber *et al.*, 1995) (3., S.22), ist davon auszugehen, daß entsprechende posttranslationale Modifikationen zu Vergrößerungen des Molekulargewichtes beitragen können.

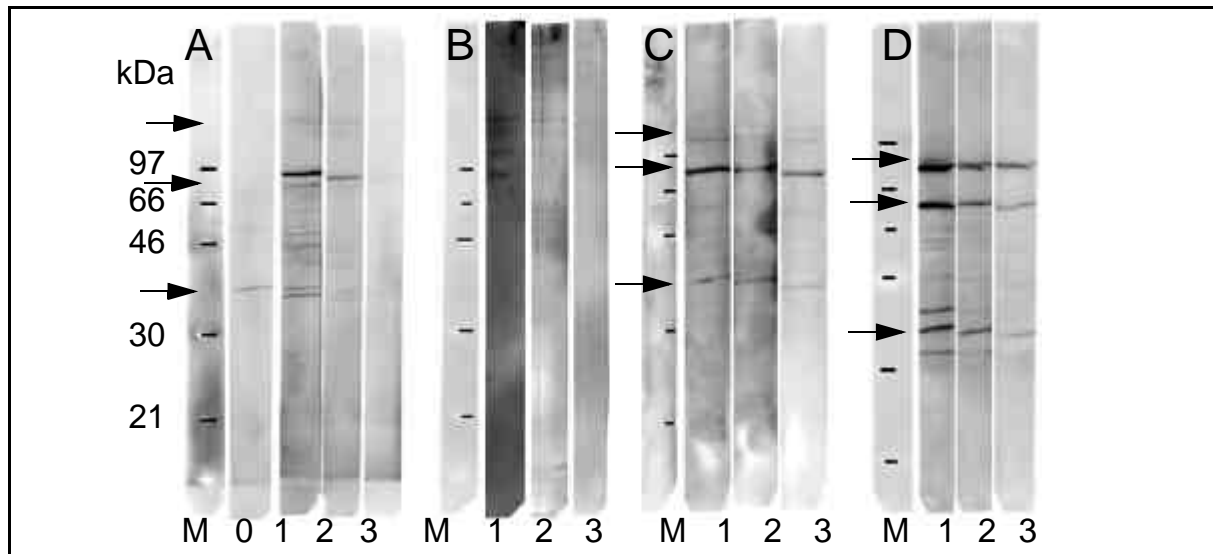


Abb.39 Generierung eines gpr3-Peptidantikörpers. Das Kaninchen #5277 wurde mit dem Peptid P9610 immunisiert und Blutproben #1(A), #2(B) und #3(C) nach 7, 9 bzw. 20 Wochen im Western Blot an HUVEC-Membranpräparationen (A+B) bzw. -Zelllysaten (C+D) analysiert (in Streifen geschnittenen PVDF-Membranen). **A:** bleed#1 in 1:10 (1), 1:100 (2) und 1:1000 (3)-Verdünnungen, 0: Präimmunsereum des Kaninchens #5277 (1:10). **B:** bleed#2 in 1:10 (1), 1:100 (2) und 1:1000 (3)-Verdünnungen (gestrippte Membranen von A). **C:** bleed#3 in 1:10 (1), 1:100 (2) und 1:1000 (3)-Verdünnungen. **D:** Peptidantikörper nach Reinigung durch Peptid-Affinitätschromatographie in 1:100 (1), 1:500 (2) und 1:1000 (3)-Verdünnungen. Eine charakteristische Bande von 35kDa (Monomer) ist in allen Proben enthalten; teilweise können 40kDa, 80kDa (Dimer) und ca 160kDa (Trimer)-Banden detektiert werden (M: Molekulargewichtsstandard).

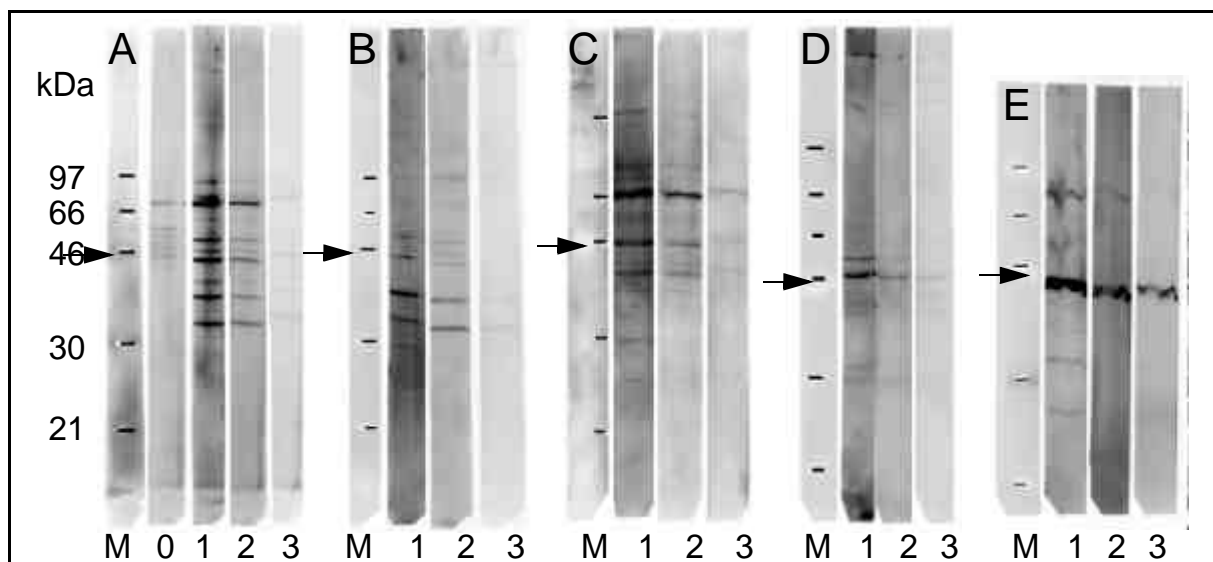


Abb.40 Generierung eines gpr6-Peptidantikörpers. Das Kaninchen #5280 wurde mit dem Peptid P9611 immunisiert und Blutproben #1(A), #2(B) und #3(C) nach 7, 9 bzw. 20 Wochen im Western Blot an HUVEC-Membranpräparationen (A+B) bzw. -Zelllysaten (C+D) analysiert. **A:** bleed#1 in 1:10 (1), 1:100 (2) und 1:1000 (3)-Verdünnungen, 0: Präimmunsereum des Kaninchens #5280 (1:10). **B:** bleed#2 in 1:10 (1), 1:100 (2) und 1:1000 (3)-Verdünnungen (gestrippte Membranen von A). **C:** bleed#3 in 1:10 (1), 1:100 (2) und 1:1000 (3)-Verdünnungen. **D+E:** Peptidantikörper nach Reinigung durch Peptid-Affinitätschromatographie in 1:100 (1), 1:500 (2) und 1:1000 (3)-Verdünnungen an HUVEC- (D) bzw. HEK293-Zelllysaten (E). Eine charakteristische Bande von 45kDa ist in allen Proben enthalten.

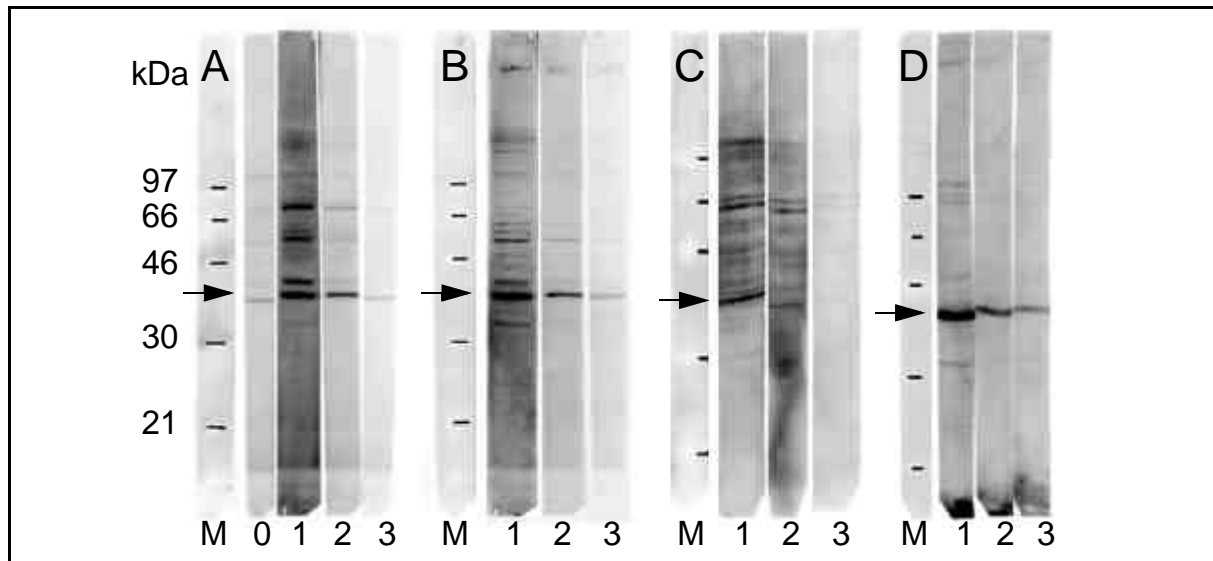


Abb.41 Generierung eines gpr12-Peptidantikörpers. Das Kaninchen #5282 wurde mit dem Peptid P9612 immunisiert und Blutproben #1(A), #2(B) und #3(C) nach 7, 9 bzw. 20 Wochen im Western Blot an HUVEC-Membranpräparationen (A+B) bzw. -Zelllysaten (C+D) analysiert (in Streifen geschnittenen PVDF-Membranen). **A:** bleed#1 in 1:10 (1), 1:100 (2) und 1:1000 (3)-Verdünnungen, 0 zeigt das Präimmenserum des Kaninchens #5282 (1:10). **B:** bleed#2 in 1:10 (1), 1:100 (2) und 1:1000 (3)-Verdünnungen (gestrippte Membranen von A). **C:** bleed#3 in 1:10 (1), 1:100 (2), 1:1000 (3)-Verdünnungen. **D:** Peptidantikörper nach Reinigung durch Peptid-Affinitätschromatographie in 1:100 (1), 1:500 (2) und 1:1000 (3)-Verdünnungen. Eine charakteristische Bande von 43kDa ist in allen Proben enthalten.

5.2. Absättigung der Antikörpersignale mit den Anti-Peptiden

Der Beweis für die Spezifität der Antikörpersignale wird durch die Absättigung der affinitätschromatographisch gereinigten Peptidantikörper mit dem jeweiligen Anti-Peptid erbracht. An dieser Stelle sei darauf hingewiesen, daß bereits während der Reinigung durch Affinitätschromatographie (Charles River Wiga Deutschland GmbH) alle Antikörper des Blutsersums abgetrennt worden sind, die eine Affinität gegenüber dem jeweiligen Peptid aufweisen.

In einem Parallelansatz werden je zwei Antikörperverdünnungen (1:100 für gpr3 und gpr6; 1:500 für gpr12) jeweils mit und ohne Zusatz des entsprechenden Anti-Peptids (2mM) in Blockierungspuffer hergestellt (P9610: 2,86mg/ml (1,43kDa); P9611: 2,2mg/ml (1,1kDa); P9612: 3,08mg/ml (1,54kDa)). Beide Ansätze werden 2h bei 37°C unter Rotation präinkubiert und anschließend als Primärantikörper in einer Western Blot-Analyse an identischen HUVEC-Gesamtzelllysat-Streifen eingesetzt.

Es tritt eine Reduktion der Banden-Signalintensitäten um 25%-80% auf (Abb.42, S.91).

Der polyklonale gpr3-Antikörper (Anti-P9610) liefert in HUVECs neben einer Bande von 35kDa meist auch Banden bei 40kDa, 80kDa (Dimer) und ca. 160kDa (Trimer) (vgl. Abb. 39, S.89). Da auch diese Antikörpersignale durch das Peptid P9610 reduziert werden können, sind sie als spezifisch anzusehen (Abb.42A, S.91).

Der polyklonale gpr6-Antikörper (Anti-P9611) liefert in HUVEC eine schwache Bande von 45kDa, die teilweise schwer zu reproduzieren ist und stark von der eingesetzten Proteinmenge (>50µg) abhängt. Im Gegensatz dazu wird in HEK293-Zelllysaten ein reproduzierbar starkes Signal gleicher molekularer Größe erhalten (vgl. Abb.40, S.89), das durch Vorbehandlung des Antikörpers mit dem Peptid P9611 nahezu komplett aufgehoben werden kann (Abb.42B, S.91).

Der polyklonale gpr12-Antikörper (Anti-P9612) liefert bereits nach der ersten Immunisierung ein prägnantes Signal von 43kDa (vgl. Abb.41, S.90), welches mit Hilfe des Peptids P9612 teilweise in seiner Signalintensität abgesättigt werden kann (Abb.42C, S.91).

Posttranslationale Modifikationen (Glykosylierungen, Palmylierungen etc.) und/oder die Ausbildung von Di- bzw. Trimeren können die Ursache für zusätzliche Banden sein.

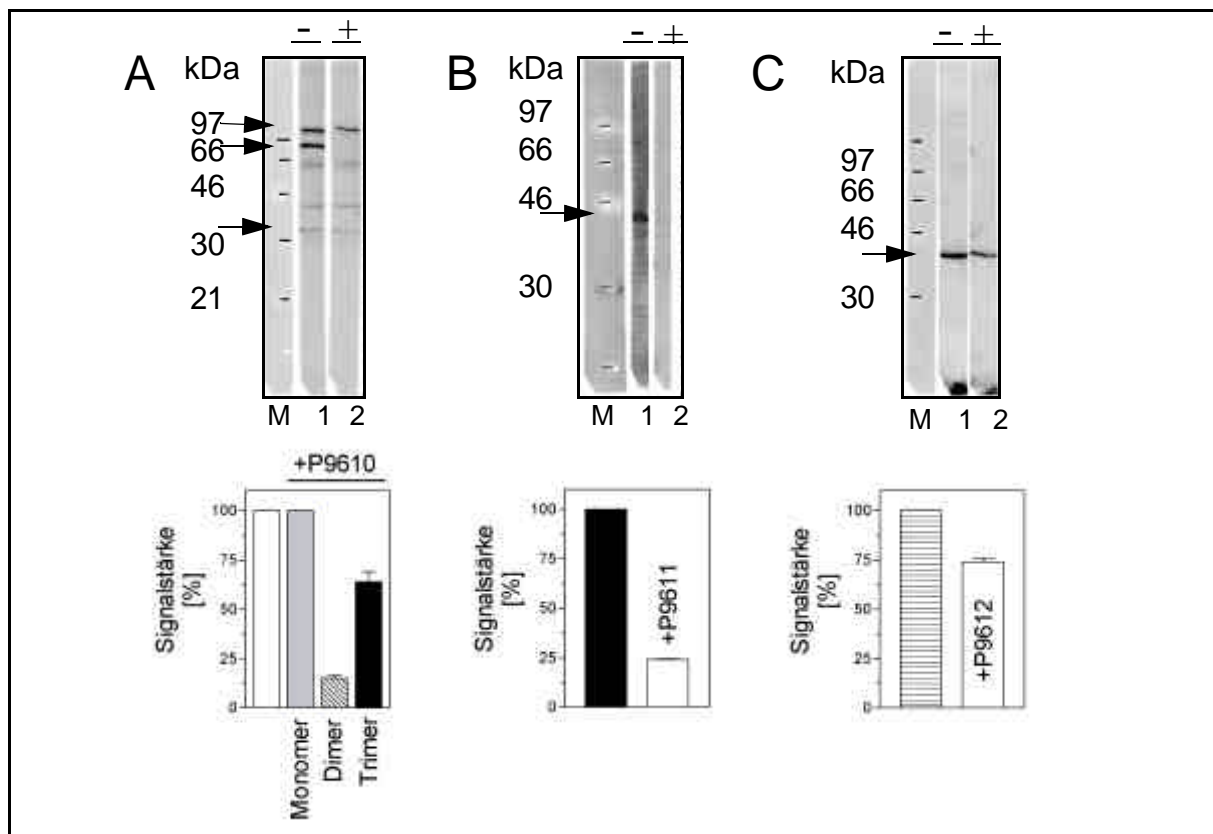


Abb.42 Kontrolle der Signalspezifität durch Absättigung der Antikörper mit den jeweiligen Peptiden. HUVEC- (A+C) bzw. HEK293- (B) Zelllysate (50µg) werden elektrophoretisch separiert und auf eine PVDF-Membran transferiert, die anschließend in identische Streifen geschnitten wird (Spur 1+2). Die durch Affinitätschromatographie gereinigten Peptidantikörper gpr3 (1:100) (A), gpr6 (1:500) (B) und gpr12 (1:500) (C) werden in Blockierungspuffer mit und ohne Zugabe des jeweiligen Anti-Peptids P9610 (gpr3), P9611 (gpr6) bzw. P9612 (gpr12) in einer Konzentration von je 2mM präinkubiert (2h, 37°C, Schütteln) und anschließend auf die Streifen gegeben. Nach Detektion der Signale mit einem Anti-Kaninchen-Sekundärantikörper wird die Signalstärke densitrometrisch analysiert (M: Molekulargewichtsstandard, Spur 1: gpr3 (A), gpr6 (B) und gpr12 (C) ohne Vorbehandlung und Spur 2: gpr3 (A), gpr6 (B) und gpr12 (C) nach Vorbehandlung mit dem Peptid P9610 (gpr3, A), P9611 (gpr6, B) bzw. P9612 (gpr12, C)).

5.2.1. Charakterisierung von gpr3-, 6- und 12-RNA-Sonden

DIG-markierte RNA-Sonden gegen hgpr3, 6 und 12 werden im Rahmen einer Northern Blot-Analyse mit humaner Hirn-mRNA (1µg) hybridisiert und die resultierenden Signale mit den Literaturdaten verglichen.

Für den Rezeptor gpr3 wird ein spezifisches Signal von 2,2 kb im humanen Hirn erhalten, welches mit Angaben von Iismaa *et al.*, 1994 übereinstimmt (Abb.43, Spur 1, S.92).

Die gpr6- (Abb.43, Spur 2, S.92) und die gpr12-Sonde (Abb.43, Spur 3, S.92) liefert je ein Signal von 5,5kb im humanen Hirn. Marchese *et al.*, 1994b und Heiber *et al.*, 1995 geben für den humanen bzw. Ratten-gpr6 eine mRNA-Größe in Hirn von 1,8kb an. Dies Ergebniss kann nicht bestätigt werden.

Literaturdaten bezüglich der mRNA-Größe des humanen Rezeptors gpr12 sind nicht vorhanden.

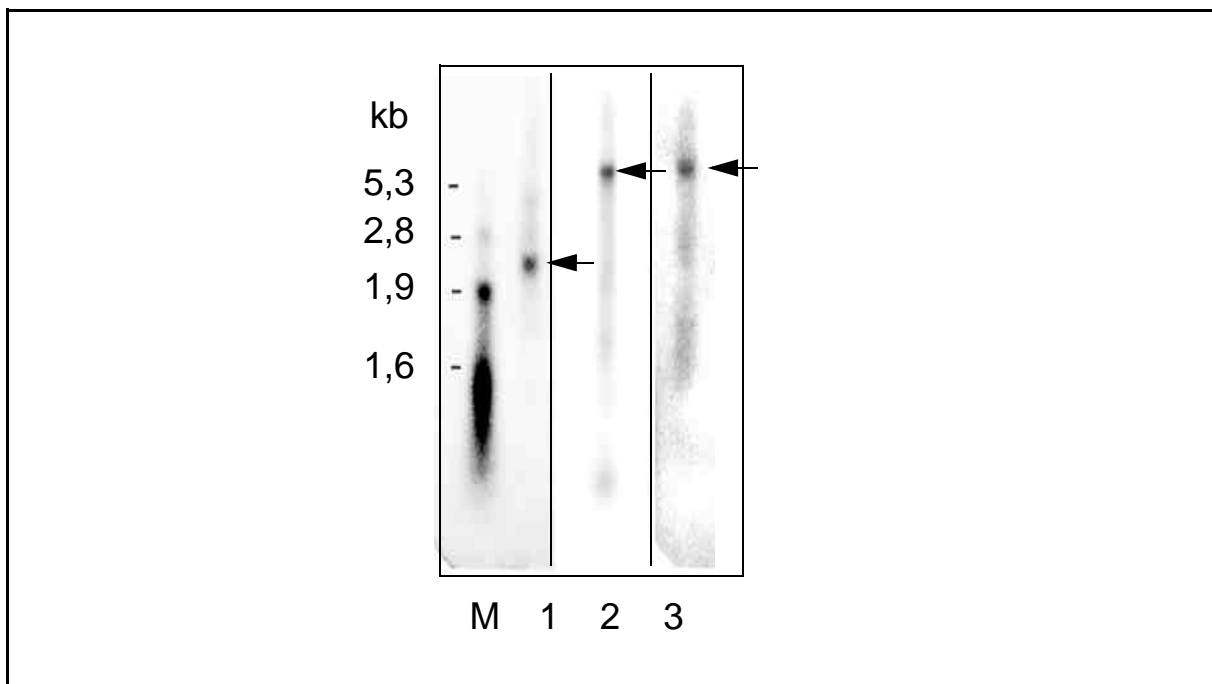


Abb.43 **Nachweis von gpr3-, 6- und 12-mRNA im humanen Hirn.** Gesamt-RNA (5µg) des Hirns wird elektrophoretisch separiert und nach dem Transfer auf eine Nylon-Membran in drei identische Streifen geschnitten. Diese Streifen werden in einer Northern Blot-Analyse mit DIG-markierten RNA-Sonden gegen gpr3, 6 und 12 (100pg/ml) hybridisiert. Für die drei Rezeptoren wird je ein spezifisches Signal von 2,2kb (gpr3), 5,5kb (gpr6) und 5,5kb (gpr12) erhalten (M: DIG-markierter Molekulargewichts-Standard, 1: gpr3, 2: gpr6, 3: gpr12).

5.2.2. Spezifität von gpr3-, 6- und 12-PCR-primern

Aufgrund der hohen sequenziellen Übereinstimmung von gpr3, 6 und 12 ist die Selektivität der PCR-*primer* Voraussetzung für den Einsatz in RT-PCR-Analysen. Es werden *primer*-Paare ausgewählt, die ein relativ kleines PCR-Fragment von 230-250bp liefern, und die Selektivität wird durch Negativ-Amplifikation mit gpr3-, 6- und 12-Plasmid-DNA getestet (Abb.44, S.93).

Bei den gewählten Versuchsbedingungen zeigen das gpr3- und gpr12-*primer*-Paar absolute Selektivität gegenüber gpr3- (Abb.44, Spur 2, S.93) bzw. gpr12-Plasmid-DNA (Abb.44, Spur 12, S.93). Lediglich das gpr6-*primer*-Paar amplifiziert zusätzlich und in geringen Mengen den Rezeptor gpr12 aus Plasmid-DNA (Abb.44, Spur 7+11, S.93). Dennoch wird das gpr6-*primer*-Paar für RT-PCR-Studien eingesetzt.

RT-PCR-Banden von gpr3, 6 und 12 werden stichprobenartig ausgeschnitten und einer DNA-Sequenzanalyse unterzogen. Es sind in keinem Fall Kontaminationen festgestellt worden.

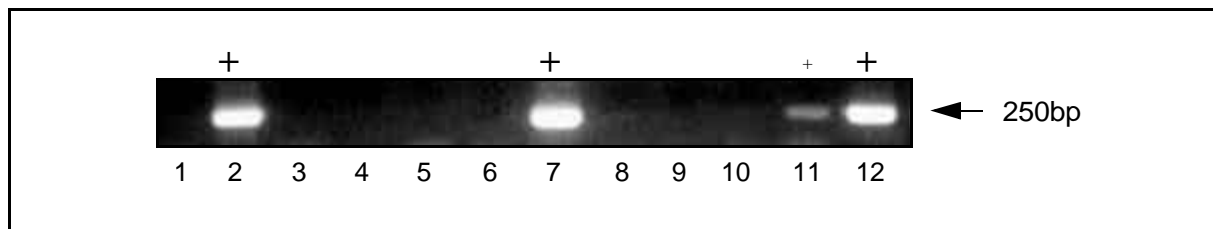


Abb.44 Überprüfung der Primerspezifität. *gpr3*-, 6- und 12-Plasmid-DNA (in *pcDNA3.1*) wird jeweils mit PCR-primern für *gpr3*, 6 und 12 amplifiziert (je 100pg Plasmid-DNA, 35 PCR-Zyklen). Die PCR-Produkte werden elektrophoretisch aufgetrennt und mit EtBr gefärbt. 1: Negativkontrolle, 2: *gpr3/pcDNA3.1* mit *KU1for+KU3rev(gpr3)*, 3: *gpr3/pcDNA3.1* mit *KU5for+KU7rev (gpr6)*, 4: *gpr3/pcDNA3.1* mit *KU9for+KU11rev (gpr12)*, 5: Negativkontrolle, 6: *gpr6/pcDNA3.1* mit *KU1for+KU3rev (gpr3)*, 7: *gpr6/pcDNA3.1* mit *KU5for+KU7rev (gpr6)*, 8: *gpr6/pcDNA3.1* mit *KU9for+KU11rev (gpr12)*, 9: Negativkontrolle, 10: *gpr12/pcDNA3.1* mit *KU1for+KU3rev (gpr3)*, 11: *gpr12/pcDNA3.1* mit *KU5for+KU7rev (gpr6)*, 12: *gpr12/pcDNA3.1* mit *KU9for+KU11rev(gpr12)*.

5.3. Untersuchung kompletter Organsysteme

Mittels der gewählten Nachweismethoden kann die Präsenz von gpr3, 6 und 12 in peripheren Organen, insbesondere in den Herz-Kreislauf-relevanten Organen Herz und Niere, sowohl auf RNA- als auch auf Proteinebene nachgewiesen werden (Abb.45-48, S.94-97). Die gesamte Expressionsanalyse wird der Übersichtlichkeit halber in Form einer Tabelle zusammengefaßt (Tabelle 43, S.98).

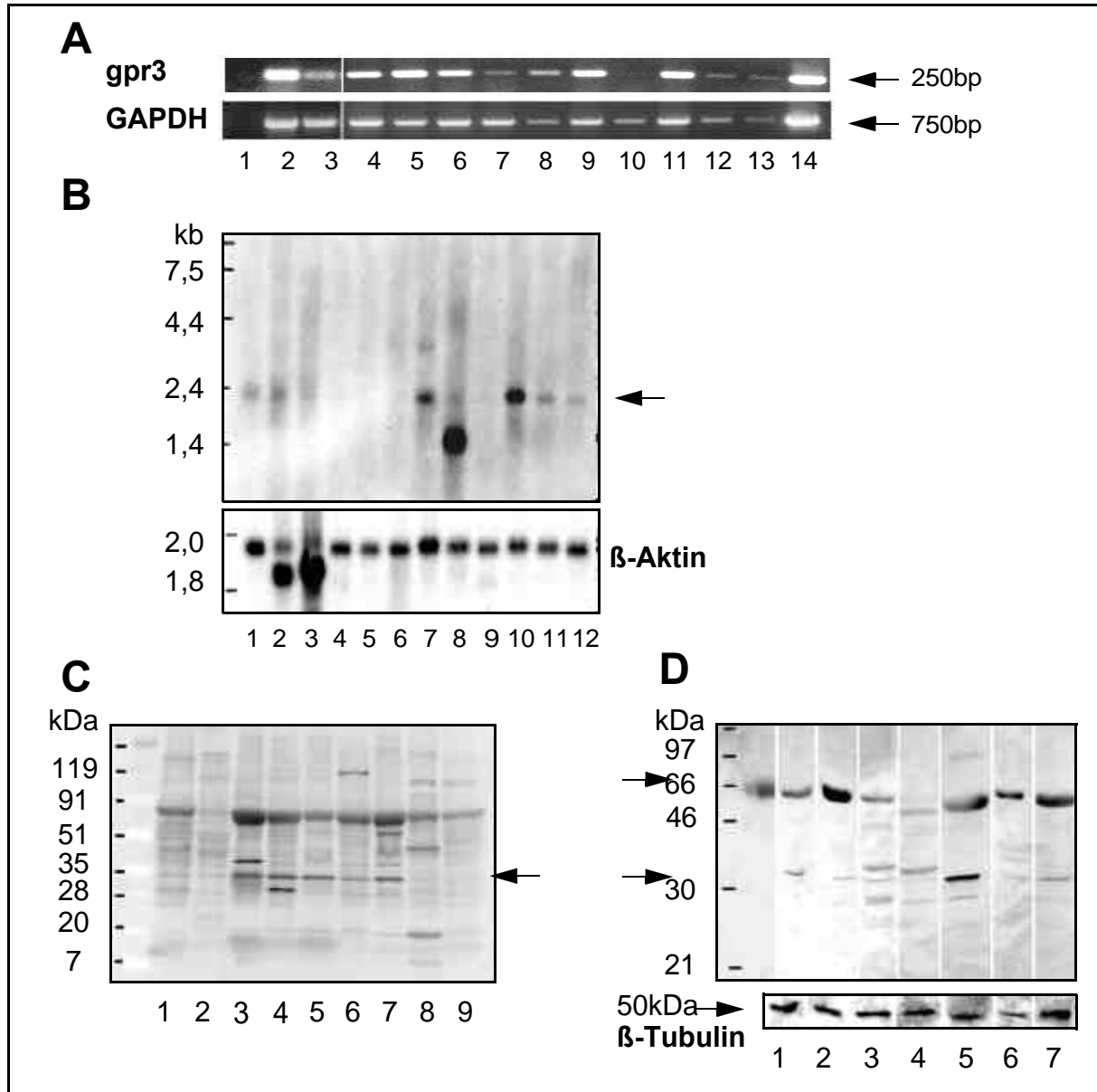


Abb.45 Expressionsprofil des humanen Rezeptors gpr3. **A:** Amplifikation aus humaner cDNA (1000ng cDNA, primer KUI/3, 35 Zyklen) 1: Negativkontrolle, 2: Atrium, rechts, 3: Ventrikel, rechts, 4: Ventrikel, links, 5: Atrium, links, 6: Herz, 7: Aorta, 8: fötales Herz, 9: Niere, 10: Leber, 11: gesamtes Gehirn, 12: glatter Muskel, 13: Lunge, 14: Positivkontrolle (100pg Plasmid-DNA) incl. GAPDH-Kontrollen. **B:** Northern Blot-Analyse mittels einer DIG-markierten RNA-Sonde (MTN Blot/Clonetch, 1: Hirn, 2: Herz, 3: Skelettmuskel, 4: Colon, 5: Thymus, 6: Milz, 7: Niere, 8: Leber, 9: Dünndarm, 10: Plazenta, 11: Lunge, 12: Leukozyte) incl. β-Aktin-Kontrolle. Western Blot-Analyse (1:100) an **C:** multi tissue blot/Oncogene 1: Leber, 2: Hirn, 3: Lunge, 4: Niere, 5: Milz, 6: Testis, 7: Ovarien, 8: Herz, 9: Pankreas und **D:** Gewebepräparationen/Ambion 1: Arterie, 2: Herz, 3: Niere, 4: Leber, 5: Lunge, 6: Skelettmuskel, 7: Dünndarm incl. β-Tubulin Kontrolle.

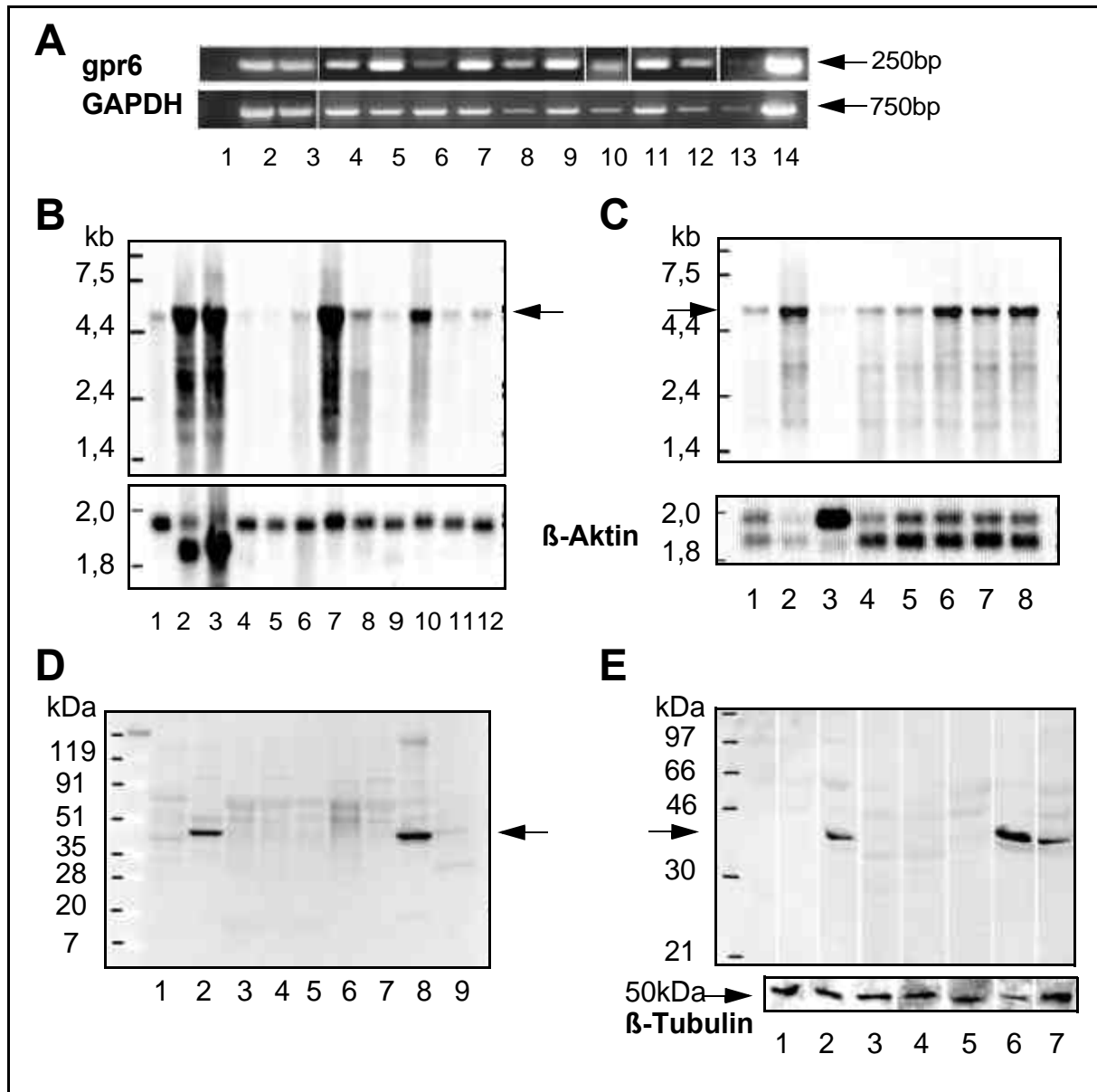


Abb.46 Expressionsprofil des humanen Rezeptors gpr6. **A:** Amplifikation aus humaner cDNA (1000ng cDNA, primer KU5/7, 35 Zyklen) 1: Negativkontrolle, 2: Atrium, rechts, 3: Ventrikel, rechts, 4: Ventrikel, links, 5: Atrium, links, 6: Herz, 7: Aorta, 8: fötales Herz, 9: Niere, 10: Leber, 11: gesamtes Gehirn, 12: glatter Muskel, 13: Lunge, 14: Positivkontrolle (100pg Plasmid-DNA) incl. GAPDH-Kontrollen. Northern Blot-Analyse mittels einer DIG-markierten RNA-Sonde an **B:** MTN Blot/Clontech, 1: Hirn, 2: Herz, 3: Skelettmuskel, 4: Colon, 5: Thymus, 6: Milz, 7: Niere, 8: Leber, 9: Dünndarm, 10: Plazenta, 11: Lunge, 12: Leukozyte) und **C:** Cardiovascular Blot/Clontech (1: fötales Herz, 2: Herz, 3: Aorta, 4: Herzspitze (Apex), 5: Atrium, links, 6: Atrium, rechts, 7: Ventrikel, links, 8: Ventrikel, rechts) je incl. β -Aktin Kontrolle. Western Blot-Analyse (1:100) an **D:** multi tissue blot/Oncogene 1: Leber, 2: Hirn, 3: Lunge, 4: Niere, 5: Milz, 6: Testis, 7: Ovarien, 8: Herz, 9: Pankreas und **E:** Gewebepräparationen/Ambion 1: Arterie, 2: Herz, 3: Niere, 4: Leber, 5: Lunge, 6: Skelettmuskel, 7: Dünndarm incl. β -Tubulin Kontrolle.

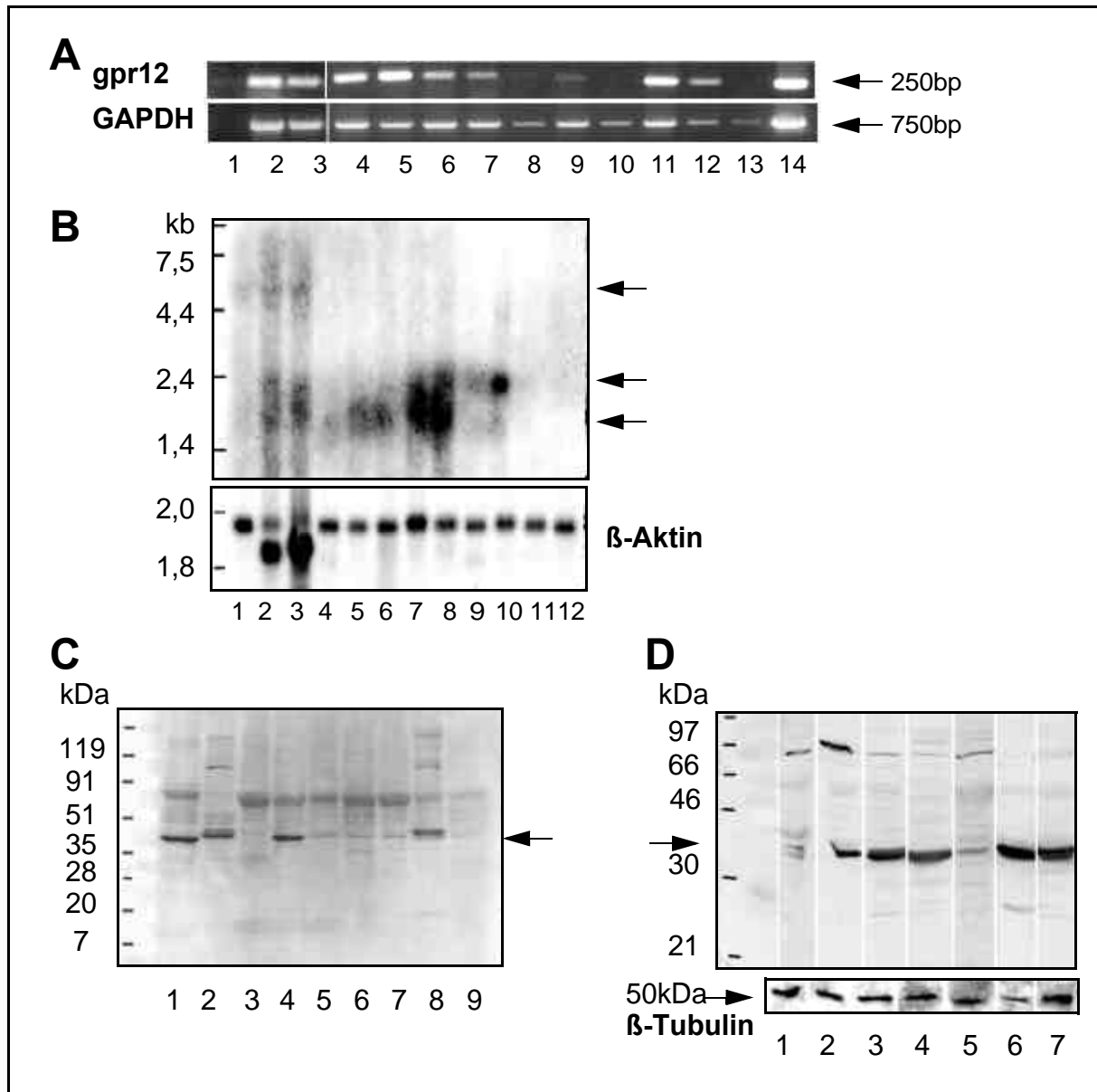


Abb.47 Expressionsprofil des humanen Rezeptors gpr12. **A:** Amplifikation aus humaner cDNA (1000ng cDNA, primer KU9/11, 35 Zyklen) 1: Negativkontrolle, 2: Atrium, rechts, 3: Ventrikel, rechts, 4: Ventrikel, links, 5: Atrium, links, 6: Herz, 7: Aorta, 8: fötales Herz, 9: Niere, 10: Leber, 11: gesamtes Gehirn, 12: glatter Muskel, 13: Lunge, 14: Positivkontrolle (100pg Plasmid-DNA) incl. GAPDH-Kontrollen. **B:** Northern Blot-Analyse mittels einer DIG-markierten RNA-Sonde an MTN Blot/Clonetch (1: Hirn, 2: Herz, 3: Skelettmuskel, 4: Colon, 5: Thymus, 6: Milz, 7: Niere, 8: Leber, 9: Dünndarm, 10: Plazenta, 11: Lunge, 12: Leukozyte) incl. β-Aktin Kontrolle und Western Blot-Analyse (1:500) an **C:** multi tissue blot/Oncogene 1: Leber, 2: Hirn, 3: Lunge, 4: Niere, 5: Milz, 6: Testis, 7: Ovarien, 8: Herz, 9: Pankreas und **D:** Gewebepräparationen/Ambion 1: Arterie, 2: Herz, 3: Niere, 4: Leber, 5: Lunge, 6: Skelettmuskel, 7: Dünndarm incl. β-Tubulin Kontrolle.

Taqman-basierte Echtzeit-RT-PCR-Expressionsanalysen für gpr3, 6 und 12 sind in Kollaboration mit Dr. Ali Ardati (Aventis Pharma USA, ZNS-Forschung, 2000) durchgeführt worden.

In Übereinstimmung mit den Literaturdaten (gpr3: Iismaa *et al.*, 1994, gpr6: Heiber *et al.*, 1995) ergibt sich für gpr3 und gpr6 eine dominante Expression im ZNS. Für den Rezeptor gpr12 werden ebenfalls starke Signale im Hirn erhalten.

Zusätzlich dazu wird in geringerem Ausmaß die Präsenz von gpr3 (Abb.48A, S.97) und gpr12 (Abb.48B, S.97) in peripheren Organen u.a. in Herz und Niere festgestellt. Der Rezeptor gpr6 (Abb.48C, S.97) kann mit den gewählten Taqman-primern nicht in der Peripherie nachgewiesen werden.

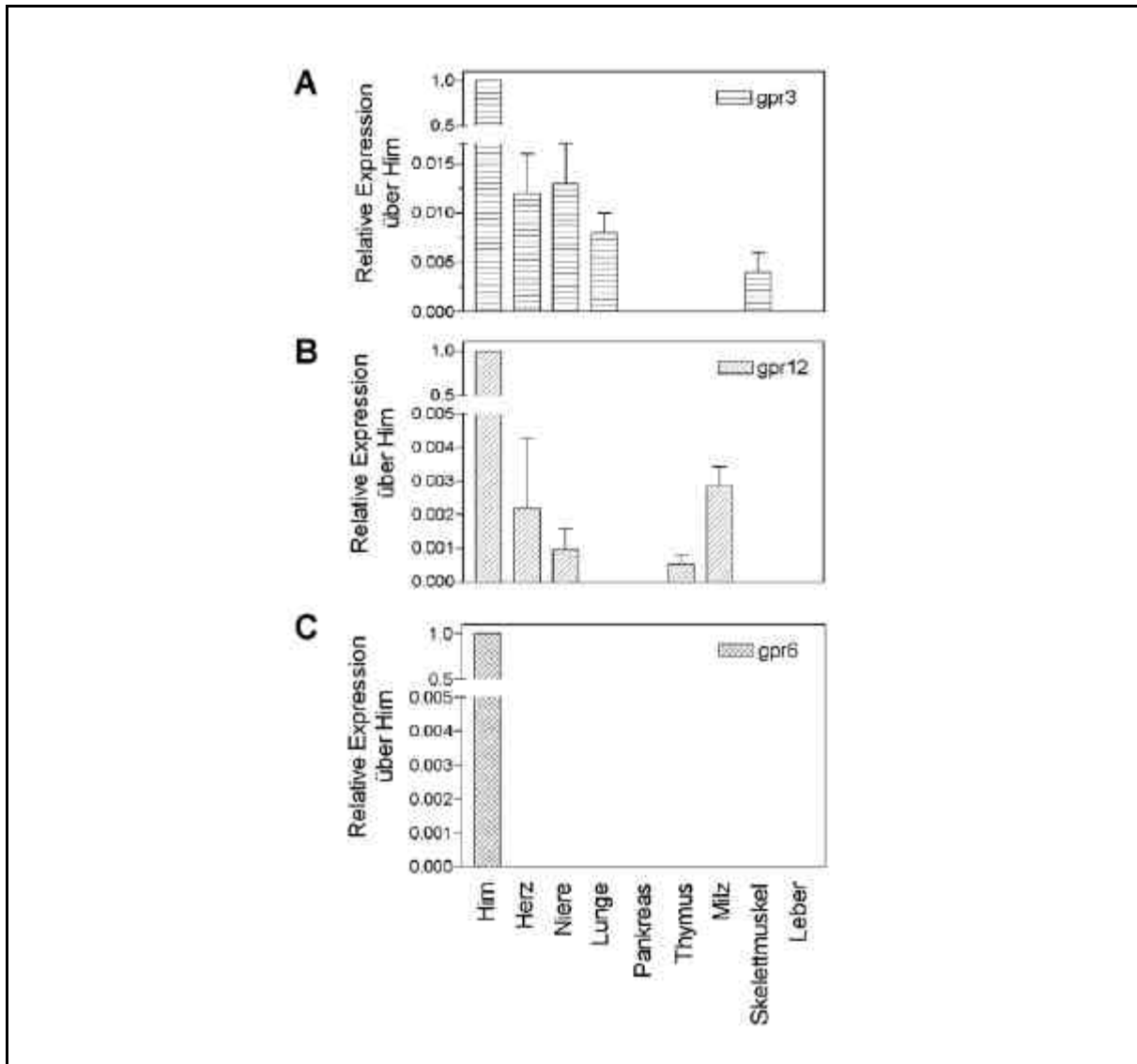


Abb.48 **Expressionsprofile der humanen Rezeptoren gpr3, 6 und 12 mittels Echtzeit-Taqman-PCR.** Gesamt-RNA humaner Gewebe wird in cDNA umgeschrieben und mit gpr3-, 6- und 12-primern und einer Taqman-Sonde auf die Expression dieser Rezeptoren untersucht. Für alle drei Rezeptoren werden dominante Signale im Hirn erhalten, zusätzlich dazu kann für gpr3 (A) und gpr12 (B) in geringerem Ausmaß die Präsenz u.a. in Herz und Niere festgestellt werden. gpr6 (C) kann mit den gewählten primern nicht in der Peripherie nachgewiesen werden. Die Daten wurden gegen humanes β -Actin standardisiert und sind dargestellt als relative Expression im Vergleich zum Hirn (Mittelwerte \pm SEM, n=2) (durchgeführt von Dr. Ardati, Aventis Pharma USA).

Tabelle 43 Expression gpr3, 6 und 12 (Abb. 45-48)

PCR: RT-PCR-Analyse (incl. Taqman-PCR), NB: Northern Blot-Analyse, WB: Western Blot-Analyse
 nachgewiesen (+), nicht nachgewiesen (-), nicht analysiert (n.a), in zwei unabhängigen
 Analysen nachgewiesen (+) (+) bzw. nicht nachgewiesen (-) (-)

Gewebe	gpr3			gpr6			gpr12		
	PCR	NB	WB	PCR	NB	WB	PCR	NB	WB
re. Ventrikel	+	n.a.	n.a.	+	+	n.a.	+	n.a.	n.a.
li. Ventrikel	+	n.a.	n.a.	+	+	n.a.	+	n.a.	n.a.
re. Atrium	+	n.a.	n.a.	+	+	n.a.	+	n.a.	n.a.
li. Atrium	+	n.a.	n.a.	+	+	n.a.	+	n.a.	n.a.
Herz	+(+)	+	+(+)	+(-)	+(+)	+(+)	+(+)	+	+(+)
fötales Herz	+	n.a.	n.a.	+	+	n.a.	-	n.a.	n.a.
Niere	+(+)	+	+(+)	+(-)	+	-(-)	+(+)	+	+(+)
Hirn	+(+)	+	+	+(+)	+	+	+(+)	+	+
Leber	-(-)	+	+(+)	+(-)	+	-(-)	-(-)	+	+(+)
glatter Muskel	+	n.a.	n.a.	+	n.a.	n.a.	+	n.a.	n.a.
Aorta	+	n.a.	n.a.	+	+	n.a.	+	n.a.	n.a.
Lunge	+(+)	+	+(+)	+(-)	+	-(-)	-	-	-(+)
Plazenta	n.a.	+	n.a.	n.a.	+	n.a.	n.a.	+	n.a.
Leukozyte	n.a.	+	n.a.	n.a.	+	n.a.	n.a.	-	n.a.
Colon	n.a.	-	n.a.	n.a.	-	n.a.	n.a.	-	n.a.
Thymus	-	-	n.a.	-	-	n.a.	+	+	n.a.
Milz	-	-	+	-	+	-	+	+	+
Testis	n.a.	n.a.	+	n.a.	n.a.	-	n.a.	n.a.	+
Ovar	n.a.	n.a.	+	n.a.	n.a.	-	n.a.	n.a.	+
Pankreas	-	n.a.	+	-	n.a.	-	-	n.a.	+
Arterie	n.a.	n.a.	+	n.a.	n.a.	-	n.a.	n.a.	+
Skelettmuskel	+	+	+	-	+	+	-	+	+
Dünndarm	n.a.	-	+	n.a.	+	+	n.a.	+	+

5.4. Untersuchung isolierter Zellsysteme

5.4.1. Präsenz von gpr3, 6 und 12 im Gefäßsystem

Zusätzlich zu Gesamt-Organsystemen (5.3., S.94) wird die Expression von gpr3, 6 und 12 auf mRNA- und Proteinebene in humanen Primärzellen des Gefäßsystems (Endothelzellen (EC) und glatte Muskelzellen (SMC, engl.: *smooth muscle cell*)) untersucht. Die Gesamt-RNA verschiedener primärer Endothel- und Gefäßmuskelzelltypen wird per RT-PCR-Analyse auf die Präsenz von mRNA-Transkripten getestet. Parallel dazu werden kommerziell verfügbare Western Blots mit Gesamtproteinpräparationen verschiedener primärer Endothel- und Muskelzelltypen zur Untersuchung der Expression auf Proteinebene verwendet.

Die Expression der Rezeptoren gpr3 (Abb.49, S.99) und gpr12 (Abb.51, S.100) kann sowohl im humanen Endothel als auch in glatter Gefäßmuskulatur auf RNA- und Proteinebene nachgewiesen werden. Diese Befunde bestätigen eine Herz-Kreislauf-Relevanz, die aufgrund des Liganden S1P vermutet wurde. Der schwache Nachweis des Rezeptors gpr6 in Endothel- und in glatten Gefäßmuskelzellen auf RNA-Ebene kann mit dem affinitätschromatographisch gereinigten Peptidantikörper und kommerziell verfügbaren Western Blots (Endopanel/Musclepanel, Clontech) nicht bestätigt werden (Abb.50, S.100). Das immunisierte Blutserum Anti-P9611(gpr6, #3) liefert mehrere Banden im Endopanel Blot (Clontech), deren Zuordnung nicht eindeutig möglich ist (Abb.50A, S.100).

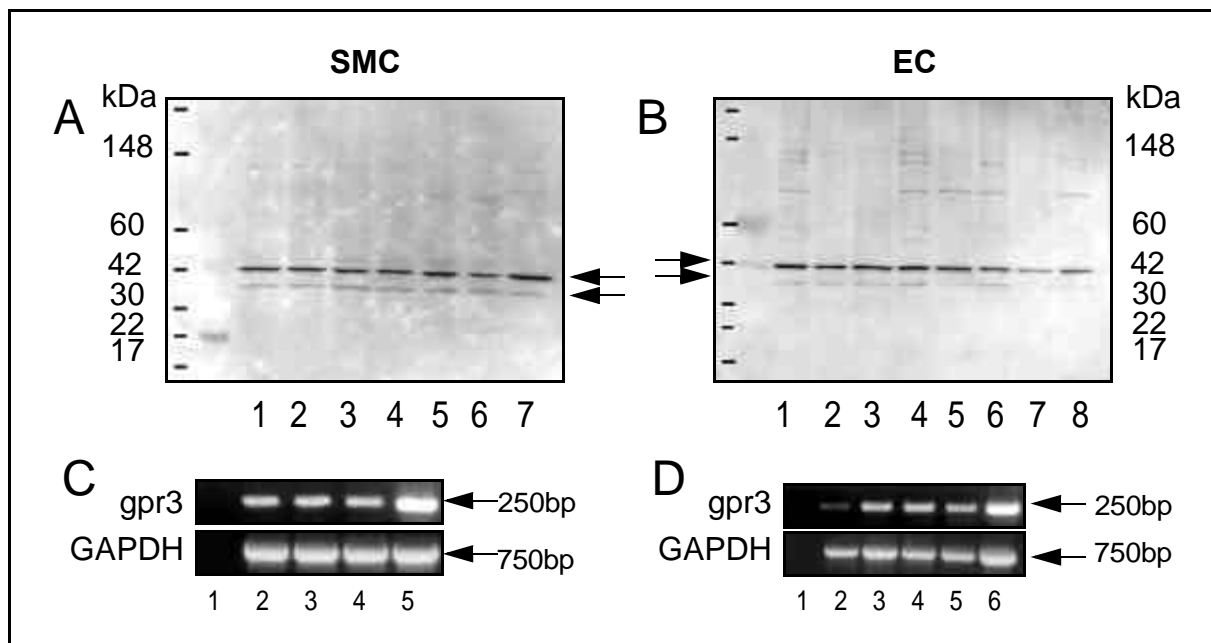


Abb.49 Expression des Rezeptors gpr3 in humanen Gefäßen. Western Blot-Analyse des gpr3 (1:100) in Gesamt-Proteinpräparationen (75µg) **A** primäre Muskelzellen (MusclePanel/Clonetics, 1: HAoSMC, 2: HBSCMC, 3: HCASMC, 4: HPASMC, 5: HUASMC, 6: HUiSMC, 7: HSKMC) und **B** primäre Endothelzellen (EndoPanel/Clonetics, 1: HPAEC, 2: HCAEC, 3: HIAEC, 4: HAoEC, 5: HMVEC-L, 6: HUVEC, 7: HUAEC, 8: HMVEC-d). RT-PCR-Analyse (je 0,5µg Gesamt-RNA) der gpr3-Expression in Gesamt-RNA isolierter, primärer glatter Muskelzellen (**C** 1: Negativkontrolle, 2:HAoSMC, 3: HCASMC, 4: HPASMC, 5:Positivkontrolle, 100pg gpr3/pcDNA3.1) und Endothelzellen (**D** 1: Negativkontrolle, 2:HMVEC-L, 3: HPAEC, 4: HCAEC, 5: HUVEC, 6: Positivkontrolle, 100pg GAPDH-Sonde (Clontech)).

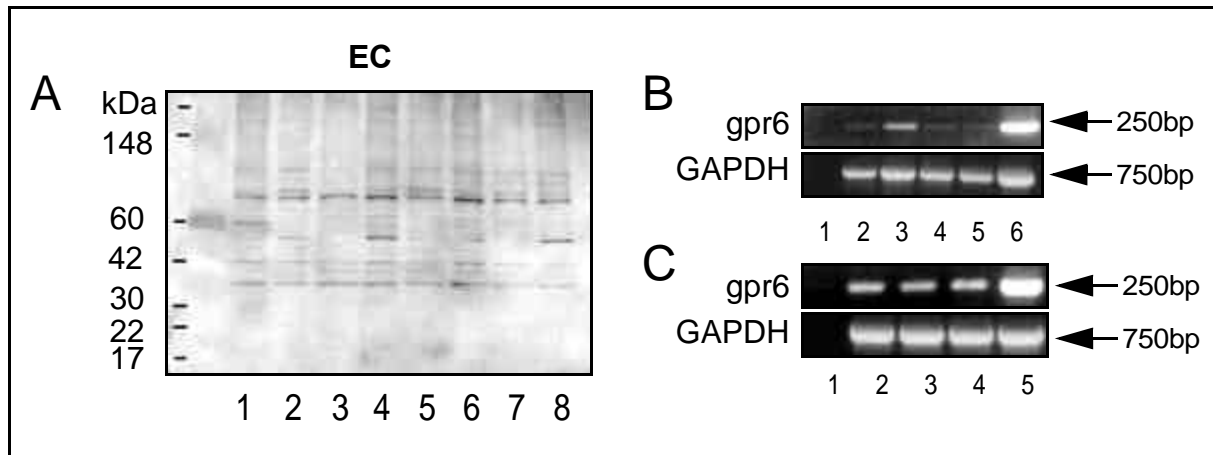


Abb.50 Expression des Rezeptors gpr6 in humanen Gefäßen. Western Blot-Analyse des gpr6 (bleed#3, 1:10) in Gesamt-Zelllysaten primärer Endothelzellen (EndoPanel/Clonetics, 1: HPAEC, 2: HCAEC, 3: HIAEC, 4: HAoEC, 5: HMVEC-L, 6: HUVEC, 7: HUAEC, 8: HMCEC-d) (A). RT-PCR-Analyse (je 0,5µg Gesamt-RNA) der gpr6-Expression in Gesamt-RNA isolierter, primärer Endothelzellen (B 1: Negativkontrolle, 2:HMVEC-L, 3: HPAEC, 4: HCAEC, 5: HUVEC, 6: Positivkontrolle, 100pg gpr6/pcDNA3.1) und glatter Muskelzellen (C 1: Negativkontrolle, 2:HAoSMC, 3: HCASMC, 4: HPASMC, 5:Positivkontrolle (s.o.)). Für die GAPDH-Kontrollen werden 2µl cDNA (entspricht 0,2µg totaler RNA) mit humanen GAPDH-primern (Uls103 + Uls104) amplifiziert (Positivkontrolle, 100pg GAPDH-Sonde (Clontech)).

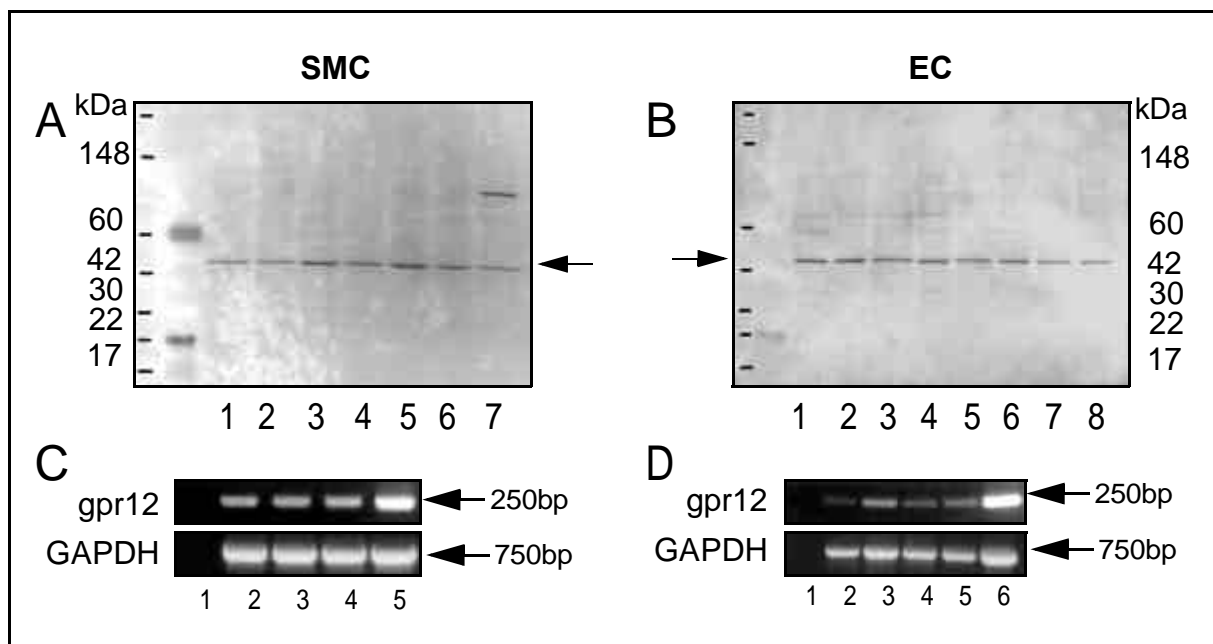


Abb.51 Expression des Rezeptors gpr12 in humanen Gefäßen. Western Blot-Analyse des gpr12 (1:500) in Gesamt-Zelllysaten (75µg) A primärer Muskelzellen (MusclePanel/Clonetics, 1: HAoSMC, 2: HBSMC, 3: HCASMC, 4: HPASMC, 5: HUASMC, 6: HUtSMC, 7: HSKMC) und B primärer Endothelzellen (EndoPanel/Clonetics, 1: HPAEC, 2: HCAEC, 3: HIAEC, 4: HAoEC, 5: HMVEC-L, 6: HUVEC, 7: HUAEC, 8: HMCEC-d). RT-PCR-Analyse (je 0,5µg Gesamt-RNA) der gpr12-Expression in Gesamt-RNA isolierter, primärer glatter Muskelzellen (C 1: Negativkontrolle, 2:HAoSMC, 3: HCASMC, 4: HPASMC, 5:Positivkontrolle, 100pg gpr12/pcDNA3.1) und Endothelzellen (D 1: Negativkontrolle, 2:HMVEC-L, 3: HPAEC, 4: HCAEC, 5: HUVEC, 6: Positivkontrolle, 100pg GAPDH-Sonde (Clontech)).

5.4.2. gpr3 und gpr12 sind in Blutplättchen exprimiert

Gesamtzelllysate humaner Blutplättchen (Clontech) werden in einer Western Blot-Analyse (75µg Protein) auf die Anwesenheit von gpr3, 6 und 12 getestet. Die Antikörper liefern jeweils ein reproduzierbares Signal für gpr3 (Abb.52A, S.101) und gpr12 (Abb.52C, S.101) von 30kDa bzw. 43kDa. Dem gegenüber ist der Nachweis des gpr6 in Blutplättchen mit dem gpr6-Peptidantikörper nicht eindeutig (Abb.52B, S.101).

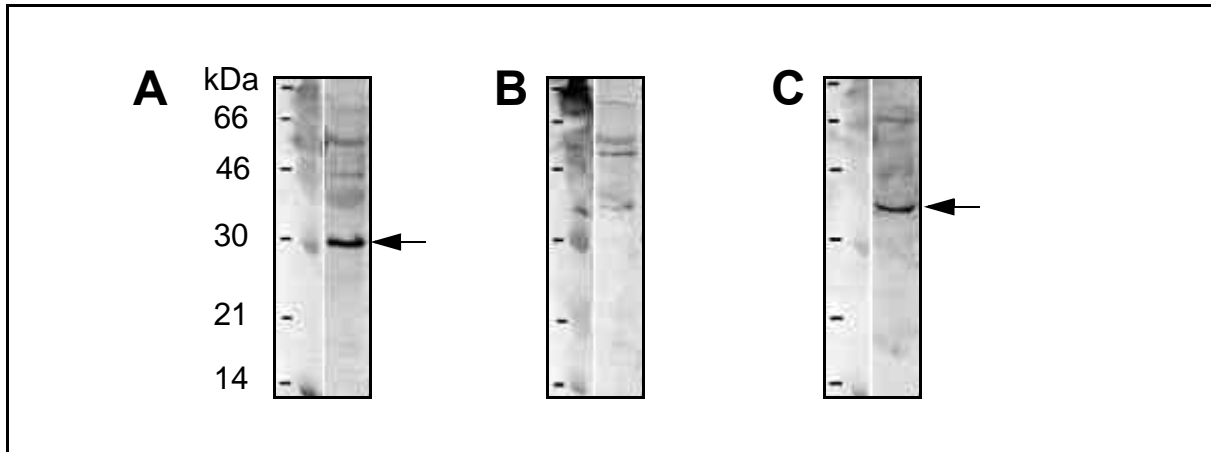


Abb.52 Präsenz von gpr3, 6 und 12 in Gesamtzelllysaten humaner Blutplättchen. Die Peptidantikörper Anti-P9610 (gpr3, 1:100, A) und Anti-P9612 (gpr12, 1:500, C) liefern in einer Western Blot-Analyse ein Signal von 30kDa bzw. 43kDa (75µg Protein). Die Präsenz des gpr6 (Anti-P9611, 1:100, B) ist unklar. Die Abb. zeigt einen von je n=2 Western Blots mit gleichen Ergebnissen .

5.4.3. gpr3, 6 und 12 der Ratten sind nicht in der Kardiomyozyte exprimiert

In einer Kollaboration mit der Arbeitsgruppe Prof. Böhm des Zentrums für Innere Medizin der Universität zu Köln wird Gesamt-RNA neonataler Kardiomyozyten der Ratte für Expressionsanalysen verwendet.

Im direkten Vergleich zu Ratten-Herz-cDNA, die eine sehr schwache Präsenz der Ratten-Homologen von gpr3 und gpr12 zeigt (Abb.53, Spur 2 (rgpr3) + 4 (rgpr12), S.102), ist in neonatalen Kardiomyozyten per RT-PCR-Analyse keine Expression feststellbar (Abb.53, Spur 5 (rgpr3) + 7 (rgpr12), S.102); rgpr6 kann weder im Herzen noch in der Kardiomyozyte nachgewiesen werden (Abb.53, Spur 3 (Herz) + 6 (Kardiomyozyte), S.102). Dieses Ergebnis liefert Hinweise auf ein möglicherweise unterschiedliches Expressionsmuster von humanem und Ratten-gpr6.

Die gewählten PCR-*primer* sind keine optimierten RT-PCR-*primer*. Sie sind zu der Klonierung der gpr3-, 6- und 12-Homologen aus Ratten-Hirn-cDNA verwendet worden (1.2., S.62).

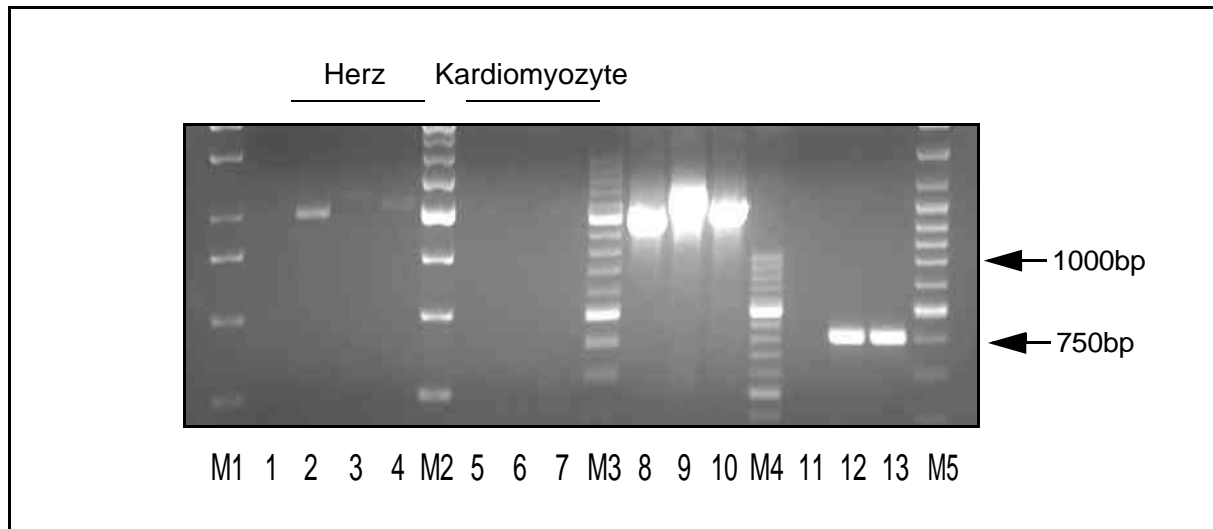


Abb.53 Expression von *rgpr3*, *6* und *12* in neonatalen Ratten-Kardiomyozyten. RT-PCR-Analysen zeigen die schwache Präsenz von *rgpr3* und *rgpr12* im Herzen (Spur 2+4), nicht jedoch in der Kardiomyozyte (Spur 5+7). *rgpr6* ist weder im Herzen noch in der Kardiomyozyte nachweisbar (Spur 3+6). Die gewählten PCR-primere amplifizieren die kompletten Sequenzen von 1kb (*gpr3*, Spur 8), 1,2kb (*gpr6*, Spur 9) und 1,1kb (*gpr12*, Spur 10) (M1-5 Molekulargewichtsstandards, 1: Negativkontrolle, 2-4: Herz (2: *gpr3*, 3: *gpr6*, 4: *gpr12*), 5-7: Kardiomyozyte (5: *gpr3*, 6: *gpr6*, 7:*gpr12*), 8-10: Positivkontrolle *pSPT18* Plasmid-DNA (8: *gpr3*, 9: *gpr6*, 10: *gpr12*), 11: Negativkontrolle, 12: GAPDH-Kontrolle Herz, 13: GAPDH-Kontrolle Kardiomyozyte).

6. Physiologische Bedeutung von gpr3, 6 und 12

6.1. Immunologischer Nachweis von gpr3, 6 und 12 in Plasmamembranfraktionen humaner Gewebe

Kommerziell verfügbare Proteinfractionen von Herz- und Nieren-Plasmamembranen (Ambion) werden elektrophoretisch separiert (je 75µg) und in einer Western Blot-Analyse auf die Präsenz von gpr3, 6 und 12 untersucht.

Für alle drei Rezeptoren werden Signale entsprechend der zu erwartenden molekularen Größen in Herz und Niere (gpr6 sehr schwach) erhalten (Abb.54, S.103). Der Nachweis in Plasmamembranfraktionen liefert den immunologischen Beweis für den korrekten Transport von gpr3, 6 und 12 zur Plasmamembran in Herz und Niere *in vivo*.

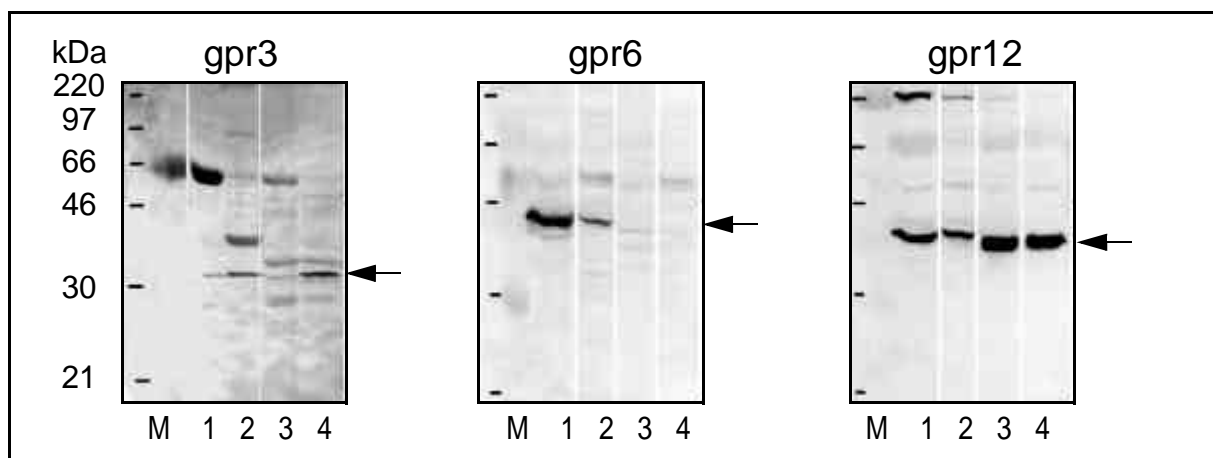


Abb.54 **Immunologischer Nachweis von gpr3, 6 und 12 in Membranfraktionen.** 75µg Gesamt- und Plasmamembranprotein (Ambion) von Herz und Niere werden in einer Western Blot-Analyse positiv auf die Präsenz von gpr3, gpr6 (nur Herz) und gpr12 getestet (M: Molekulargewichtsstandard, 1: Herz, 2: Membran Herz, 3: Niere, 4: Membran Niere). Die Abb. zeigt einen von 2-3 Western Blots mit gleichen Ergebnissen.

6.2. gpr3, 6 und 12 sind in HUVEC-Plasmamembranen lokalisiert

Primäre Endothelzellen (HUVEC) werden auf Collagen-beschichteten Deckgläschen kultiviert (Standard-Medium), PFA-fixiert, permeabilisiert und mit gpr3-, 6- bzw. 12-Peptidantikörpern (Anti-Kaninchen) inkubiert. Nach Behandlung mit einem Alexa594nm-Anti-Kaninchen-Sekundärantikörper zeigt die Fluoreszenzanalyse (63x Ölimmersion) die spezifische Immunfärbung von gpr3, 6 und 12 in HUVEC-Plasmamembranen, während der Sekundärantikörper lediglich zu einem schwachen, diffusen Hintergrundsignal führt (Abb.55, S.104).

Die Immunfärbung in primären HUVEC visualisiert die zu erwartende Lokalisation eines GPCRs in der Plasmamembran und steht im Widerspruch zur überwiegend intrazellulären Lokalisation von gpr3, 6 und 12 in HEK293-Zellen nach Kultivierung unter Standard-Bedingungen (Abb.33, S.82).

Gleichzeitig wird die immunologische Detektion von gpr3, 6 und 12 in HUVEC-Membranfraktionen per Western Blot-Analyse bestätigt (5.1.1., S.88).

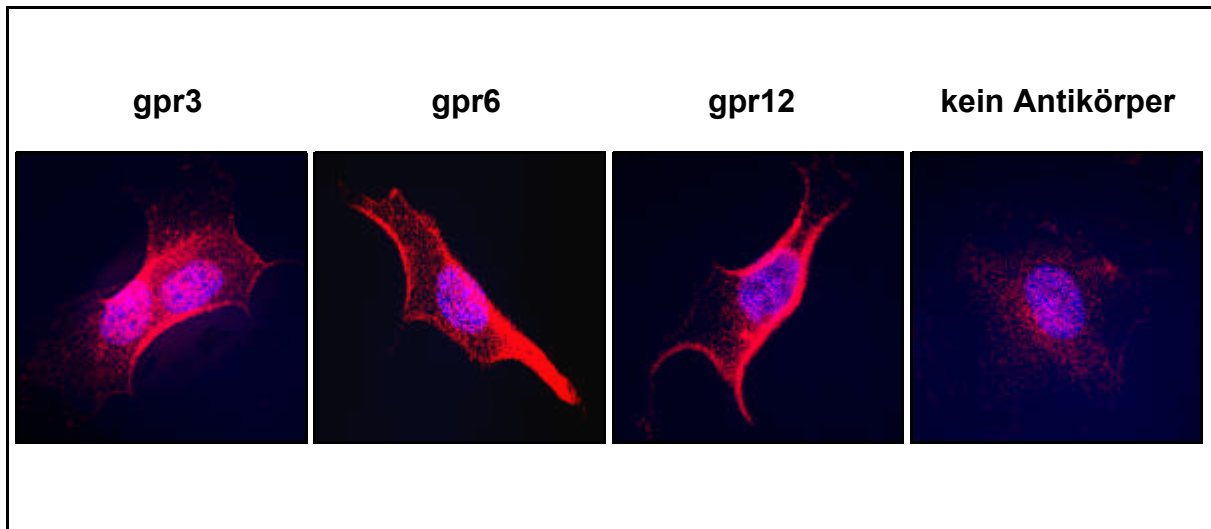


Abb.55 Zytoimmunfluoreszenz detektiert gpr3, 6 und 12 in der Plasmamembran primärer Endothelzellen. Fixierte HUVEC (Passage 3) werden mit Peptidantikörpern (Anti-Kaninchen), die gegen den extrazellulären N-Terminus von gpr3, 6 und 12 gerichtet sind, und Hoechst 33258 inkubiert. Immunfärbungen mit einem 594nm-Alexa-Sekundärantikörper (Anti-Kaninchen) nach Überlagerung mit einer Kern-Färbung (Hoechst 33258) sind dargestellt. Die Aufnahmen sind an einem Fluoreszenzmikroskop (63x Ölimmersion) erstellt worden und zeigen Einzelzellen von n=2 unabhängigen Experimenten.

6.3. gpr3 wird in einem endothelialen Funktionsmodell reguliert

In Kollaboration mit der Arbeitsgruppe Prof. Busse des Universitätsklinikums Frankfurt, Molekulare Kardiologie werden primäre Endothelzellen (HUVEC) in einem endothelialen Funktionsmodell (Scherstress (SS)) auf die Regulation von gpr3, 6 und 12 auf RNA- und Proteinebene untersucht.

Ausgehend von Gesamt-RNA-Isolationen werden Affymetrix-Chips hybridisiert (U95, Labor Dr. Ivashchenko und Dr. Margerie, Aventis Pharma, DG Herz-Kreislauf, 2001) und Taqman-basierte Echtzeit-PCR-Studien durchgeführt (Dr. Ardati, Aventis Pharma USA, 2001). Die Analyse der Proteinexpression erfolgt mit Hilfe von Western Blots, ausgehend von Gesamtzelllysaten. Während für Untersuchungen der Expression auf RNA-Ebene relativ kurze Scherstress-Zeitwerte herangezogen werden (z.B. 1h, 2h, 4h), dienen längere Scherstress-Expositionen (6h, 12h, bis 18h) zur Untersuchung der Proteinexpression.

Laminarer Scherstress hat einen positiven Einfluß auf die Zellmorphologie proliferierender Endothelzellen (HUVEC) und vermittelt einen Apoptoseschutz (Endothelprotektion). Bereits nach wenigen Stunden haben sich die Endothelzellen parallel zum applizierten Scherstress ausgerichtet und zeigen darüber hinaus ein deutlich reduziertes Maß an basalen Apoptosen bzw. toten Zellen (Abb.56A, S.105). Die parallele Ausrichtung der Zellen ist in den Randbereichen der Kulturschale besonders ausgeprägt. Neben morphologischen Effekten wird die Hochregulation der endothelialen NO-Synthase (eNOS) als Qualitätsstandard verwendet. Auf der Proteinebene ist eine kontinuierliche Hochregulation der eNOS-Expression um den Faktor 2,5 nach 18h zu beobachten (Abb.56C+D, S.105).

Erste Versuche mit kurzen Scherstress-Zeitwerten sind unter Anleitung von Carmen Urbich im Labor von PD Dr. S. Dimmeler, Kardiologie, Uniklinikum Frankfurt durchgeführt worden. Danach erfolgen die Versuche bei Aventis Pharma. Nach eigenen Beobachtungen ist die Temperaturkonstanz im Zellkulturmedium von entscheidender Bedeutung. Ohne Kühlung werden aufgrund der Motorwärme und der Wärmezufuhr über den Metallkonus bereits nach wenigen Stunden Temperaturen von $>42^{\circ}\text{C}$ im Medium erzielt. Die Kühlung der Motoren über Kühllakus ist daher eine unabdingbare Voraussetzung für reproduzierbare Ergebnisse.

Während die Scherstress-Kammern in der Arbeitsgruppe von Dr. Dimmeler über keine Kühllakus verfügen, sind die für Aventis Pharma angefertigten Scherstress-Kammer entsprechend ausgestattet (Hersteller: Physiologie Uniklinikum Frankfurt, Herr R. Popp).

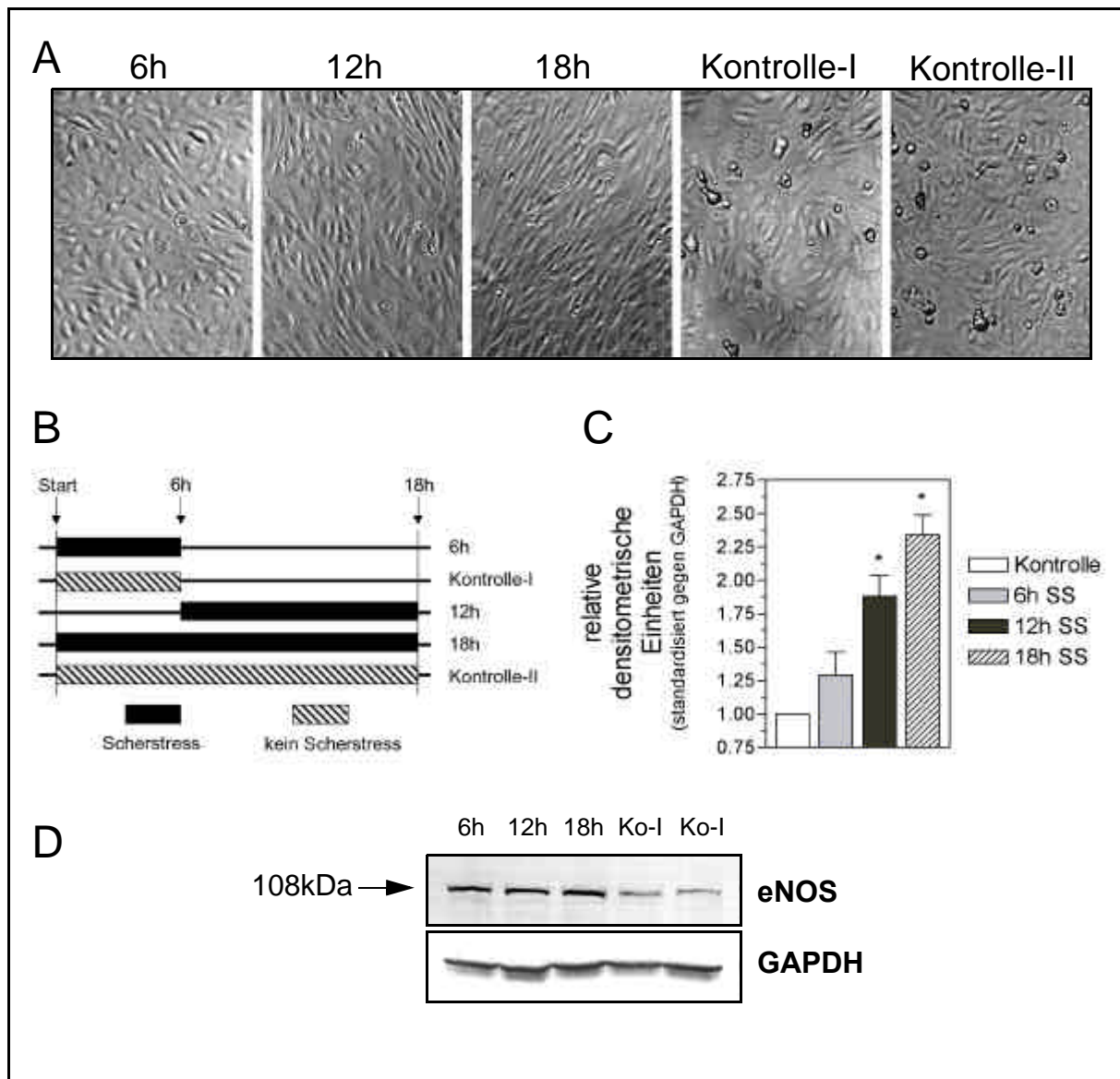


Abb.56 **Aufbau eines endothelialen Funktionsmodells (Scherstress).** **A:** Typische Veränderung der HUVEC-Zellmorphologie unter laminarem Scherstress von 12dynes/cm^2 nach 6, 12 und 18h (repräsentative Zellmorphologie von $n=4$). **B:** Ablauf eines typischen Scherstress-Experiments. **C:** Standardisierte Regulation der eNOS (Mittelwert \pm SEM, $n=3$), * symbolisiert eine Signifikanz von $p<0,05$. **D:** Western Blot-Analyse der eNOS-Hochregulation unter Scherstress ($n=3$).

Die Untersuchung einer Scherstress-induzierten gpr3-, 6- und 12-Regulation auf RNA-Ebene führt zu keinem aussagekräftigen Ergebnis. Echtzeit-PCR-Studien (Dr. Ardati, Aventis Pharma USA, 2001) zeigen zwar nach Standardisierung gegen GAPDH tendenziell eine Hochregulation mit einem temporären Maximum bei 2h (gpr3) bzw. 4h (gpr12); der ermittelte Regulationsfaktor von 1,5 (gpr3) bzw. 2,0 (gpr12) ist jedoch bei einer PCR-basierten Analyse zu vernachlässigen (Abb.57A, S.106). gpr6 ist mit den gewählten Taqman-Sonden in HUVECs nicht nachweisbar (vgl. Abb.48C, S.97).

Die Affymetrix Chip-Analyse bestätigt die Hochregulation der eNOS auf der RNA-Ebene; die Hybridisierungs-Signale von gpr3, 6 und 12, sowie auch der meisten edg-Rezeptoren, liegen jedoch unterhalb der Nachweisgrenze (keine Abb.).

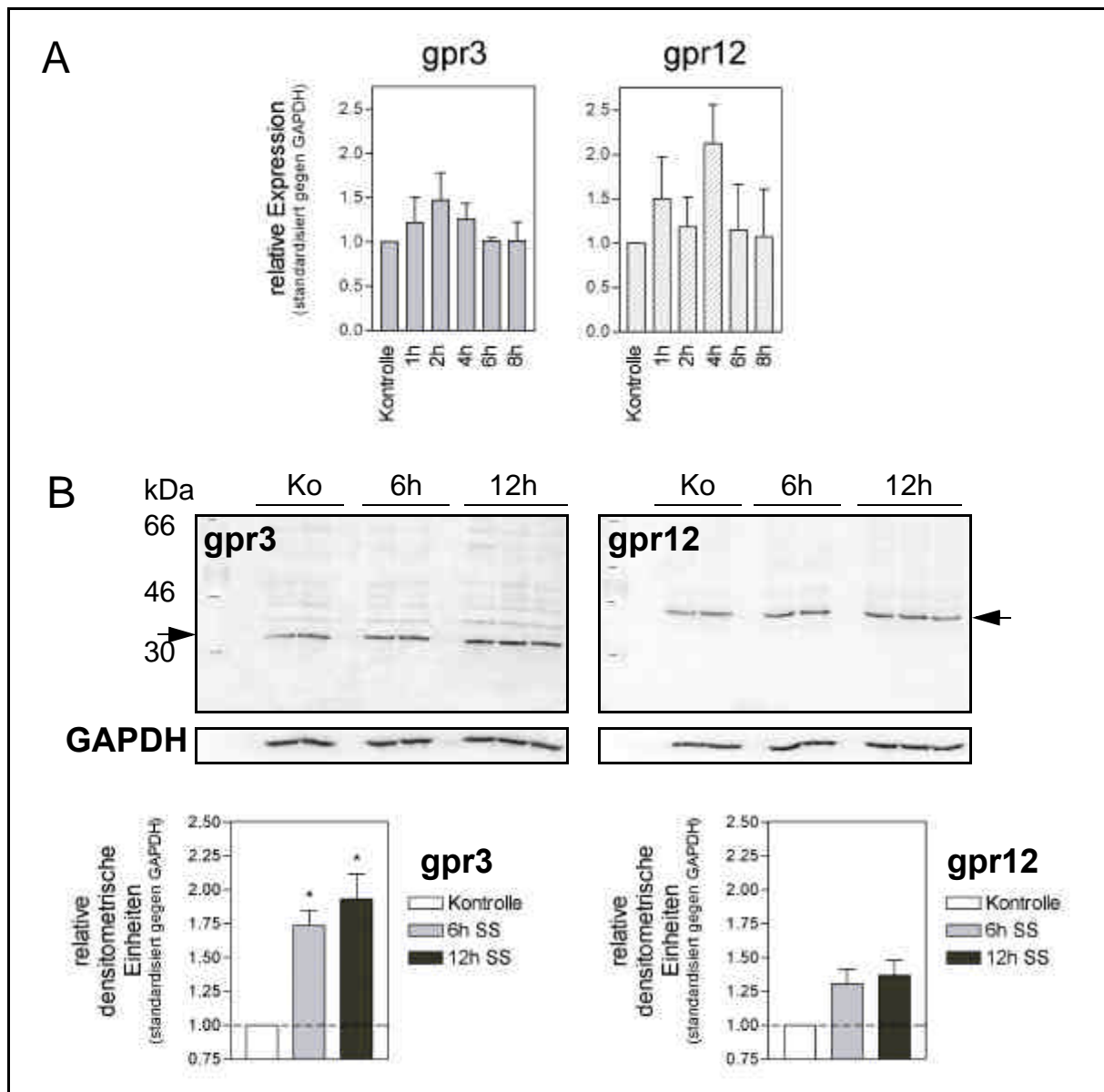


Abb.57 **Regulation von gpr3 und gpr12 durch Scherstress.** **A:** Echtzeit-PCR-Analysen (Dr. A. Ardati) zeigen eine tendenzielle Hochregulation von gpr3 und gpr12 um <Faktor 2 (Mittelwerte \pm SEM, $n=3-5$). **B:** Western Blot-Analysen zeigen dagegen eine signifikante Hochregulation von gpr3 um ca. 95% (12h) und eine tendenzielle Hochregulation von gpr12 um ca. 30% (Mittelwerte \pm SEM, $n=5$). Ein Western Blot mit je $n=2-3$ Proben für jeden Zeitwert ist abgebildet.

Im Gegensatz zur RNA-Ebene zeigt sich auf der Proteinebene eine signifikante, Scherstress-induzierte Hochregulation des Rezeptors gpr3. Nach densitometrischer Quantifizierung der Western Blot-Signale und Standardisierung gegen GAPDH beträgt die Hochregulation ca. 75% (6h) bzw. 95% (12h) (Abb.57B, S.106).

Für den Rezeptor gpr12 ergibt sich auf der Proteinebene tendenziell eine Hochregulation um 30% (6h) bzw. 40% (12h) (Abb.57B, S.106).

Aufgrund der schwachen Präsenz des gpr6 in HUVECs wurde dessen Expression hier nicht untersucht.

Das bioaktive Lipid S1P wird mit Endothelprotektion bzw. Apoptose-Schutz in Verbindung gebracht (Hisano *et al.*, 1999, Kwon *et al.*, 2001). Die Beobachtung einer Regulation von gpr3 (signifikant) und gpr12 (tendenziell) in einem endothelialen Funktionsmodell unterstreicht die physiologische Relevanz dieser Rezeptorfamilie für die Herz-Kreislauf-Forschung.

6.4. gpr3-ASOs führen zu keiner Reduktion der Proteinexpression

Den S1P-Rezeptoren edg1 und edg5 werden endothelprotektive Eigenschaften zugeordnet. Um zu untersuchen, ob S1P auch über gpr3, 6 und 12 einen Apoptoseschutz vermittelt, wird der Ansatz verfolgt, die Expression von gpr3, 6 und 12 in primären Endothelzellen (HUVEC) durch Behandlung mit Antisense-Oligonukleotiden (ASO) kurzzeitig zu unterbinden. Die Relevanz dieser Gene für die Induktion von Apoptosen bzw. dessen Schutz soll nach Ausschalten eines oder mehrerer S1P-Rezeptoren in Kombination (z.B. mit edg1, edg5) auf der Ebene von Caspase-Aktivierung und DNA-Fragmentierung (TUNEL-Assay) quantifiziert bzw. mikroskopisch analysiert werden.

Die Entwicklung und Optimierung von ASOs mit Hilfe Taqman-basierter PCR-Screening-Verfahren gegen gpr3, 6 und 12 in HUVECs (ISIS Pharmaceuticals) erwies sich aufgrund der schwachen Präsenz von mRNA-Transkripten als schwierig. Erst nach PMA-Stimulation konnte ein ASO gegen gpr3 selektiert werden; ASOs gegen gpr6 und gpr12 sind noch nicht verfügbar. Der Hersteller gibt für die spezifische Reduktion der gpr3-mRNA nach Behandlung von HUVEC mit dem Nukleotid 191414 (*antisense*) einen IC₅₀-Wert im Bereich von 30nM an, während das Kontroll-Nukleotid 129596 (*sense*) keinen Effekt auf die gpr3-mRNA ausüben soll (4h nach Transfektion mit Lipofectin) (Abb.58A, S.108).

Da für einen biologischen Effekt letztendlich das Protein und nicht das mRNA-Transkript verantwortlich ist, werden primäre HUVECs in 6-well-Platten bei einer Konfluenz von 75% mit den Nukleotiden 191414 (*antisense*) bzw. 129596 (*sense*) transfiziert (0,1-1µM Endkonzentration, Lipofectin). Die Reduktion der gpr3-Proteinexpression wird nach 24h, 48h und 72h per Western Blot-Analyse quantifiziert (Abb.58B, S.108).

Anhand der Western Blot-Signale kann keine Reduktion der Proteinexpression nach 72h bei einer finalen ASO-Konzentration von 1µM gegenüber untransfizierten bzw. mit Kontroll-Nukleotid (129596)-transfizierten HUVECs festgestellt werden.

Die Transfektionsbedingungen werden mit Hilfe eines FITC-markierten ASO gegen hc-raf-mRNA (ISIS Pharmaceuticals) kontrolliert; sie zeigen eine nahezu 100%-ige Transfektionseffizienz mit Lipofektin. Die FITC-Signale können zum überwiegenden Teil in den Kernen transfizierter Zellen lokalisiert werden (Abb.58C, S.108). Andere Transfektionsmittel, wie z.B. Superfect oder FuGene, liefern vergleichsweise deutlich schlechtere Ergebnisse (keine Abb.).

Nach Kontrolle der Transfektionsbedingungen sind weitere Versuche mit dem gpr3-ASO unterlassen worden. Da das ASO zur Reduktion der gpr3-mRNA (Daten von ISIS Pharmaceuticals, Abb. 58A, S.108), nicht jedoch des Proteins führt (Abb.58B, S.108), ist davon auszugehen, daß es sich um ein sehr stabiles Protein handelt, das über einen Zeitraum von 72h nicht abgebaut wird.

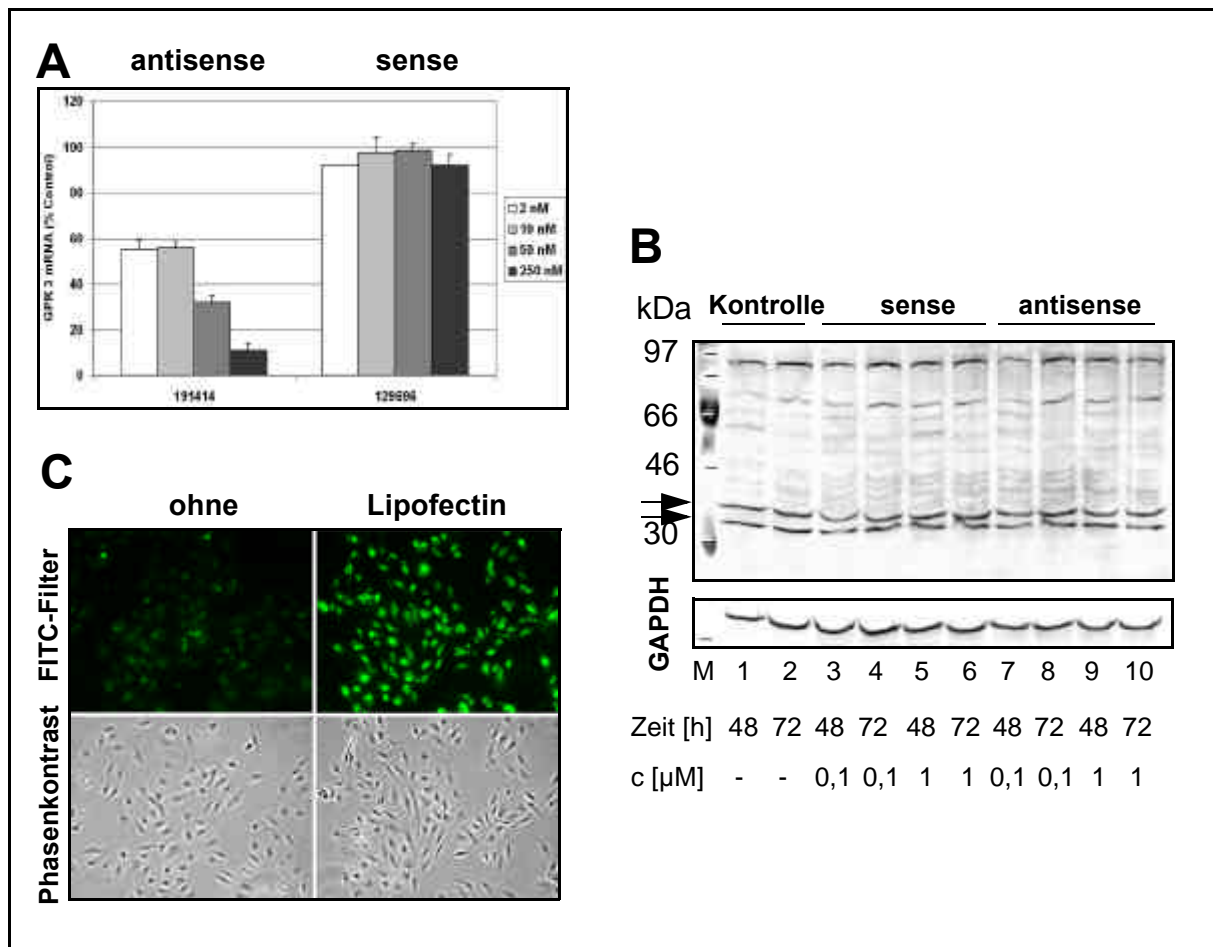


Abb.58 **Transfektion von HUVEC mit gpr3-ASOs.** **A:** Spezifische Reduktion der gpr3-mRNA in einem Echtzeit-PCR-Experiment (191414: gpr3 ASO, 129696: gpr3 sense, ISIS Pharmaceuticals). **B:** Die Untersuchung der gpr3-Expression auf Proteinebene nach Transfektion (0,1 und 1μM Endkonzentration) mit gpr3 sense und antisense Oligonukleotiden zeigt ein unverändertes Expressionsniveau der 35kDa- und der 40kDa-Bande nach 48h und 72h (n=3) (M: Molekulargewichts-Standard, 1-2: Kontrolle, untransfiziert, 3-6: sense, 7-10: antisense). **C:** Überprüfung der Transfektions-Bedingungen (mit und ohne Lipofectin) mit Hilfe eines FITC-gelabelten hc-raf ASO (ISIS Pharmaceuticals) nach 4h Inkubation (100nM Endkonzentration).

V Diskussion

1. Strategien zur Ligandenidentifizierung

Das Ziel der vorliegenden Arbeit ist die Identifizierung des natürlichen Liganden der humanen Rezeptorfamilie gpr3, 6 und 12 entsprechend des Ansatzes der „Reversen Pharmakologie“. Bioinformatische sowie molekular- und zellbiologische Methoden werden hierfür angewendet (Abb.59, S.109).

Die Erstellung von Expressionsprofilen mittels mRNA- und Protein-basierender Nachweismethoden sowie die Untersuchung einer möglichen Regulation in einem endothelialen Funktionsmodell soll Informationen sowohl über den Liganden als auch über eine mögliche Pathophysiologie von gpr3, 6 und 12 liefern.

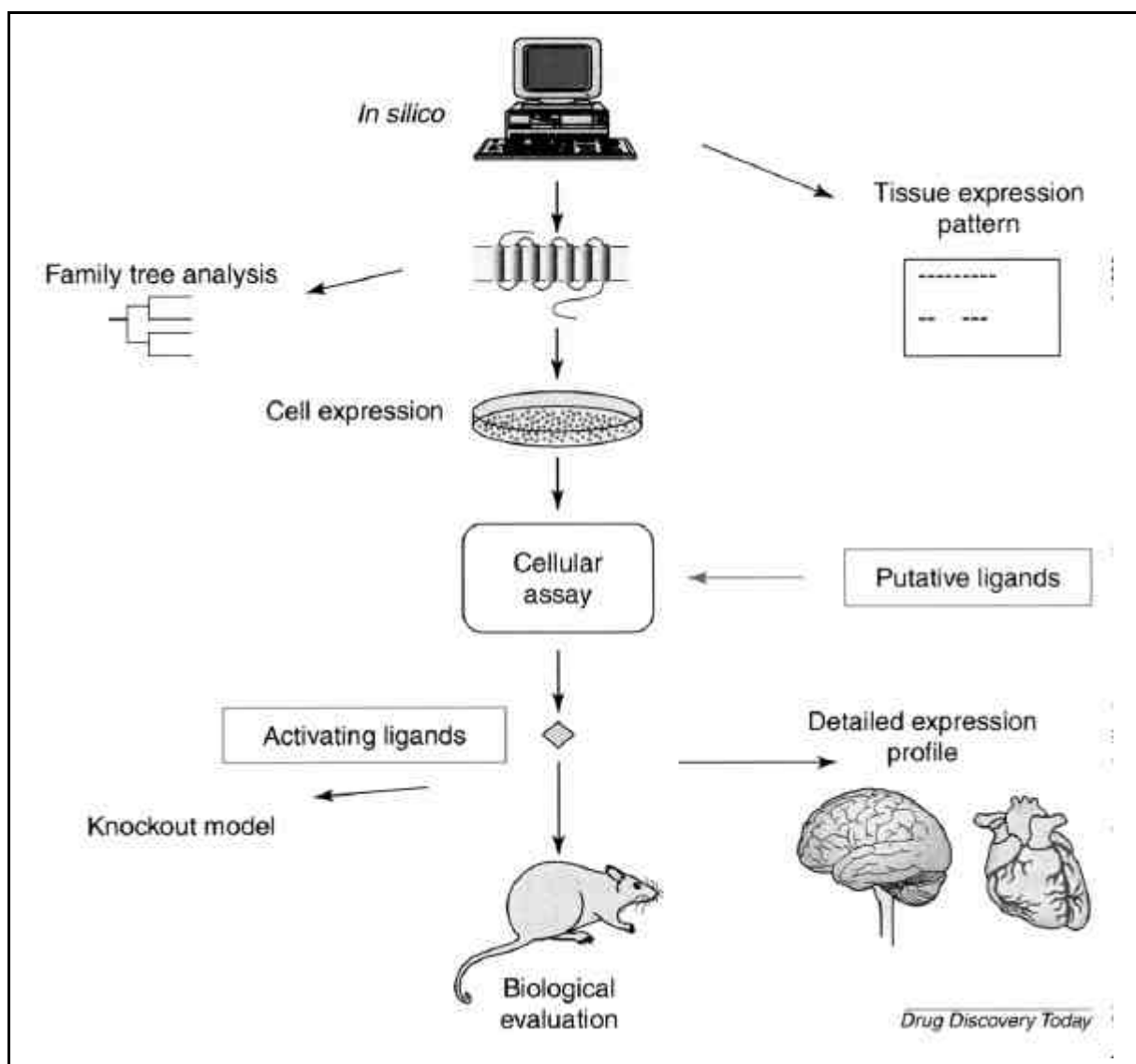


Abb.59 **Ligandenidentifizierung von orphan GPCRs nach dem Ansatz der „Reversen Pharmakologie“.** (aus: Wise et al.,2002)

1.1. Bioinformatik und *in silico*-Ergebnisse

Phylogenetische Analysen zeigen, daß Rezeptoren für identische oder ähnliche Liganden meist Kluster bilden und diese die ersten Hinweise auf den physiologischen Liganden eines *orphan* GPCR geben. Da die Lage oder charakteristische Aminosäuren der Liganden-Bindungstasche selten beschrieben sind, beziehen sich diese Vorhersagen meist auf Vergleiche der gesamten kodierenden Rezeptorsequenzen und sind deshalb nicht unfehlbar.

Die Identifizierung des Lipids Sphingosin-1-Phosphat (S1P) als Ligand von *edg1* (Lee *et al.*, 1998) hat zu der richtigen Vorhersage geführt, daß auch *orphan edg3* und *orphan edg5/H812* mit einer 50%-igen Sequenz-Identität S1P-Rezeptor-Subtypen sind (Van Brocklyn *et al.*, 1999). Histamin H3- (Lovenberg *et al.*, 1999) und H4- (Oda *et al.*, 2000) Rezeptoren weisen dagegen nur ein 20%-ige Sequenz-Identität zu H1- und H2-Rezeptoren auf, sind aber dennoch hochaffine Histamin-Rezeptoren. Andere *orphan* GPCRs weisen höhere Homologien zueinander auf als zu anderen bekannten GPCR-Familien. Das ist ein Indiz dafür, daß sie Subfamilien mit einem möglicherweise neuen, bislang unbekanntem Liganden bilden. Eine Ausnahme dieses Homologie-Ansatzes bildet z.B. der Nociceptin/Orphanin FQ-Rezeptor (Reinscheid *et al.*, 1995) mit einer 65%-igen Aminosäure-Identität zu Opioid-Rezeptoren, jedoch keiner Affinität zu Opioid-Peptiden.

Die Ähnlichkeit von *orphan gpr3* (hACCA) zu den *orphan* Rezeptoren rCLN3 (*gpr6*, Ratte, Song *et al.*, 1994), R334 (*gpr12*, Ratte, Eidne *et al.*, 1991) und zu der *edg*-Rezeptorfamilie *orphan edg1* (human, Hla & Magiag, 1990) und *orphan AGR16* (*edg5*, Ratte, Okazaki *et al.*, 1993) wurde erstmals von Eggerickx *et al.*, 1995 festgestellt, konnte jedoch zum damaligen Zeitpunkt nicht weiter interpretiert werden. Bioinformatische Analysen von Marchese *et al.*, 1999 klassifizieren *gpr3*, 6 und 12 als Cannabinoidrezeptorfamilie und deuten so, vor dem Hintergrund einer stetig wachsenden GPCR-Lipidrezeptorfamilie, auf ein Lipid als möglichen Aktivator hin.

Die Ergebnisse umfangreicher bioinformatischer Analysen in GenBank (Nukleotid-Sequenzen) und SWISS-PROT (Protein-Sequenzen) im Rahmen dieser Arbeit erlauben die Einordnung von *gpr3* (Iismaa *et al.*, 1994), *gpr6* (Heiber *et al.*, 1995) und *gpr12* (Song *et al.*, 1995) als eigenständige, kleine Rezeptorfamilie, deren nächste Verwandte in den Rezeptorfamilien der *endothelial differentiation gene* (*edg*) (siehe Review Fukushima *et al.*, 2001, Pyne & Pyne, 2000a, Hla, 2001)-, Cannabinoid (*cb*) (Matsuda *et al.*, 1990; Munroe *et al.*, 1993)- und Melanocortin (*mc*)-GPCRs (Abdel-Malek, 2001) zu finden sind (1.1., S.60). Die Ähnlichkeit beträgt 42-44% auf der Proteinebene (H. Gassenhuber, Aventis Pharma, 2000).

Typischerweise besitzen Rezeptoren einer Familie 50-70% Primärsequenz-Identität, entsprechend kann für *gpr3*, 6 und 12 mit einer Sequenz-Identität von 57-61% auf der Proteinebene (Dr. Gassenhuber, Aventis Pharma, 2000) ein identischer Ligand postuliert werden. Die zu anderen Lipid (*edg*, *cbr*)- und Peptidrezeptoren (*mcr*) vergleichbar hohe Sequenz-Homologie läßt die Annahme zu, daß es sich höchstwahrscheinlich um ein Lipid oder ein Peptid handelt. Der Ausschluß von möglichen Amin- oder Opioid-Liganden wurde bereits von Iismaa *et al.*, 1994 und Heiber *et al.*, 1995 aufgrund des Fehlens der konservierten Aminosäure Asp in TM3 vermutet.

Parill *et al.*, 2000 zeigen per Mutagenese, Bindungs- und [³⁵S]GTPγS-Assays, daß die drei Aminosäuren Arg¹²⁰, Arg²⁹² und Glu¹²¹ in der S1P-edg-Familie (edg1, 3, 5, 6 und 8) konserviert sind und eine Ligandenbindungstasche ausbilden, die die spezifische Erkennung und Bindung von S1P realisiert. Dieses Motiv ist in der gpr3, 6 und 12-Familie jedoch nicht vorhanden.

Des weiteren weisen alle edg-Rezeptoren ein „GWNCLX₅CS“-Motiv am Ende von TM-IV bzw. in der E2-Schleife auf, das sich auch in der gpr3, 6 und 12-Familie und in cbr1 und cbr2 befindet (Abb.60, S.111). Dieses Motiv wird bereits von Gräler *et al.*, 1999 als edg-charakteristisches „GWN/HC“-Motiv angesprochen. Der Rhodopsin-Rezeptor als typischer Vertreter der GPCR-Familie 1 weist dieses Motiv nicht auf, d.h. das Motiv ist möglicherweise ein Charakteristikum von GPCR-Lipidrezeptoren.

Darüber hinaus fehlen gpr3, 6 und 12 sowie allen edg-Rezeptoren zwei konservierte Cystein-Reste in E1 und E2 (Gräler *et al.*, 1999), die in GPCRs der Familie 1 eine charakteristische, stabilisierende Disulfidbrücke ausbilden. Da die zwei Cysteine im „GWNCLX₅CS“-Motiv sieben Aminosäuren auseinander liegen, besteht die Möglichkeit, daß diese - in Analogie zur S-S-Brücke zwischen E1 und E2 - eine extrazelluläre Disulfidbrücke ausbilden (Dr. Gassenhuber, mündliche Auskunft).

Systematische Mutagenesestudien könnten die Funktion des „GWNCLX₅CS“-Motivs aufklären und die Existenz einer putativen, stabilisierenden Disulfidbrücke in E2 bestätigen.

	TM-IV	TM-V
cb2r_human	IMWVLSALVSYLPIMGWT.....C	CPRPCSELFPLI-PNDYLLSWLLFIAFLPSG
cb1r_human	LMWETIAIVIAVLPILGWN.....C	ERLQSVCSDIIPHI-DETYLMFWIGVTSVLLLF
gpr6_human	ATWTVSLGLGLLPVLGWN.....C	LAERAAESVVRPL-ARSHVALLSAAPFMVPGI
gpr3_human	LWGGALGLGLLPVLAWN.....C	LDGLTTCGVVYPL-SKNHLVVLAIAFFMVGFI
gpr12_human	MLWGTSTICLGLLPVMGWN.....C	LRDESTCSVVRPL-TKNNAATLSVSFLFMPAL
edg4_human	GVWVAALGLGLLPASWH.....C	LCALDRCSRMAPLL-SRSYLAVWALSLLVPLL
edg2_human	VIWTAIVMGAIPSVGWN.....C	ICDIENCSNMAPLY-SDSYLVFNALFNLVTFVY
edg7_human	LWVAIAIFMGAVPTLGN.....C	ICNISACSSLAPLY-SRSYLVFVWTVSNLMAPLI
edg3_human	MCWLIAPTGLALPILGWN.....C	IHNLPDCSTILPLY-SKKYIAPCISIFTAILVT
edg1_human	ACWVISLILGGLPIMGWN.....C	TSALSSCSTVLPPLY-HKHYYLFCCTVFTLLLLS
edg5_human	ASWLTSLVLGGLPILGWN.....C	IGHLEACSTVLPPLY-ARHYVLCVVTI FSIITLLA
edg8_human	AANGVSLLLGLLPALGWN.....C	IGRLDACSTVLPPLY-AKAYVLFVCLAFVGI LAA
edg6_human	LCWLLAALGLMPLPILGWN.....C	ICAFDRCSLLPLY-SKRYILFCVIVIFAGVLAT
OPSD_BOVIN	PTWVMALACAAPPLVGSRYIPEGMQCSCGIDYYTPHEETNNE SFVIYMFVWHPIIPLIV	

Abb.60 Sequenzvergleich der humanen cb-, edg- und gpr3-, 6- und 12-Rezeptoren im Bereich von TM-IV. Ein „GWNCLX₅CS“-Motiv ist in diesen Lipid-GPCRs konserviert. Der Rhodopsin-Rezeptor (OPSD) weist dieses Motiv nicht auf (Dr. Gassenhuber, Aventis Pharma, 2001).

Die vollständige Sequenz des gpr3 Ratten-Homologen (rgpr3) ist in der Literatur nicht beschrieben. Dieser Rezeptor wird im Rahmen dieser Arbeit per RT-PCR aus Ratten-Hirn kloniert, und zwar ausgehend von einer partiellen 334bp langen 5'-Nukleotidsequenz mit der Bezeichnung R4 (Iismaa *et al.*, 1994) und dem 3'-Ende des gpr3 Maus-Homologen (Saeki *et al.*, 1993) (1.2., S.62). Die Sequenzdaten sind unter der Acc. Nr. AJ427482 bei der GenBank registriert worden (Abb.15, S.63).

Die sequenzielle Identität des rgpr3 mit dem humanen und dem Maus-Homologen liegt bei 94% bzw. 99% auf der Proteinebene (Berechnungen Dr. Gassenhuber, Aventis Pharma, 2001). Sequenz-Identitäten in der Größenordnung von >90% sind für Vergleiche zwischen humanen und Nager-Homologen zu erwarten. Die vollständigen Sequenzen aller humanen und Ratten-Homologen der gpr3, 6 und 12-Familie sind damit bekannt (Tabelle 41, S.60).

1.2. *in vitro*-Ergebnisse und Identifizierung von S1P als natürlicher Agonist

Eggerickx *et al.*, 1995 beschreiben die Fähigkeit des humanen G-Protein-gekoppelten Rezeptors *gpr3* (Originalbezeichnung *hACCA* = *human adenylate cyclase constitutive activator*) zur Agonist-unabhängigen Stimulation der $G\alpha_s$ -Signaltransduktionskaskade nach transienter Transfektion u.a. in COS-7 (*monkey kidney fibroblast*)-, CHO-K1 (*chinese hamster ovary*)-, NIH3T3 (*mouse embryonic fibroblast*)- und HBL-100 (*human mammary epithelial*)-Zellen. Das Ausmaß der Erhöhung basaler cAMP-Spiegel durch *gpr3* entspricht dem anderer GPCRs (z.B. MC5) nach maximaler Agonist-Stimulation und ist ebenfalls von der Eggerickx-Arbeitsgruppe für das *gpr3* Maus-Homologe (*mACCA* = GPCR21, Saeki *et al.*, 1993) bestätigt worden. Eggericks *et al.*, 1995 konnten nicht eindeutig klären, ob die basale Aktivität auf die starke Überexpression des Rezeptors *gpr3* oder auf einen ubiquitären Serumfaktor im Kulturmedium zurückzuführen ist.

Die Ergebnisse dieser Arbeit bestätigen die Befunde von Eggerickx *et al.*, 1995 bezüglich des Rezeptors *gpr3* (human), und sie identifizieren darüber hinaus *gpr3*, 6 und 12 als Familie von konstitutiv aktiven Rezeptoren mit der Fähigkeit zur Stimulation der Adenylat-Zyklase in HEK293 (2.1., S.64)- und CHO-Zellen (Dr. S. Grüneberg, Aventis Pharma, 2001) in Abwesenheit eines aktivierenden Liganden.

Da die humanen, Ratten- und Maus (Eggerickx *et al.*, 1995)-Homologen des *gpr3* subtyp-, spezies- und zelltypunabhängige konstitutive Aktivatoren des $G\alpha_s$ -Signaltransduktionsweges darstellen, kann eine Punktmutation als Ursache für die Agonist-Unabhängigkeit weitestgehend ausgeschlossen werden.

Die Beobachtung, daß HEK293-Zellen, die mit den potentiellen Lipidrezeptoren *gpr3*, 6 und 12 transient transfiziert werden, in Medium mit Aktivkohle-resorbiertem (lipidfreiem) Serum reduzierte basale cAMP-Spiegel zeigen, führt zu der Schlußfolgerung, daß zumindest ein Teil der konstitutiven Aktivität auf ein Lipid des Serums zurückzuführen sein muß (Abb.16, S.64). Tatsächlich kann die Lipidentzugbedingte Reduktion der Adenylat-Zyklase-Stimulation komplett (*gpr3*) bzw. teilweise (*gpr6+gpr12*) durch das Lipid S1P (1 μ M) wiederhergestellt werden (Abb.24B, S.73).

Dennoch muß festgestellt werden, daß die konstitutive, Agonist-unabhängige Aktivierung von *gpr3*, 6 und 12 durch Lipidentzug nur marginal reduziert werden kann (Abb.16, S.64). Folglich können diese Lipide nicht die einzigen Aktivatoren dieser Rezeptorfamilie sein, und/oder es handelt sich hier um eine S1P-Rezeptorfamilie, die natürlicherweise konstitutive Aktivität zeigt und überwiegend durch Expression reguliert wird.

Die konstitutive Aktivierung des $G\alpha_s$ -Signaltransduktionsweges durch den Rezeptor *gpr3* wird sowohl nach transienter Transfektion in HEK293- und CHO-Zellen (Dr. S. Grüneberg, Aventis Pharma, 2001, unveröffentlicht) als auch in einer stabilen *gpr3/PSC*-Zelllinie beobachtet (2.8., S.76). In einer Western Blot-Analyse ergibt sich jedoch weder eine Zunahme der *gpr3*-Bandenintensität nach transienter Transfektion in HEK293- oder CHO-Zellen noch in der stabilen *gpr3/PSC*-Zelllinie (keine Abb.). Dieses Ergebnis deutet darauf hin, daß die verwendeten Zellen die Überexpression des konstitutiv aktiven Rezeptors *gpr3* nur in geringen Maßen tolerieren können, welche möglicherweise unterhalb der Sensitivität eines Western Blots liegt. Nichtsdestotrotz reicht die Überexpression für funktionelle Untersuchungen der *second messenger* Ca^{2+} und cAMP aus.

gpr3, 6 und 12 werden durch die Lipid-Mediatoren Sphingosin-1-Phosphat (S1P) und Dihydro-S1P (DHS1P) aktiviert, die bereits als physiologische Liganden der edg-Rezeptorfamilie identifiziert worden sind (siehe Reviews Fukushima *et al.*, 2001, Hla, 2001, Pyne & Pyne, 2000a). Beide Lipide bewirken in transient gpr3-, 6- und 12- transfizierten HEK293-Zellen unter serumreduzierten (1% FCS) bzw. lipidfreien Bedingungen (10% FCSCS) intrazelluläre Ca^{2+} -Freisetzungen mit EC_{50} -Werten im nanomolaren Bereich (2.2, S.65; 2.4, S.68; 2.5, S.71) und einen Anstieg der konstitutiv erhöhten cAMP-Spiegel (2.6., S.72). Es kann kein Unterschied in der agonistischen Wirkung zwischen S1P und seiner reduzierten Form DHS1P in Form von Dosis-Wirkungs-Kurven (EC_{50} -Werte) festgestellt werden (Tabelle 42, S.70).

Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen eine erhöhte agonistische Effizienz der S1P-vermittelten Ca^{2+} -Freisetzung an den Rezeptoren gpr3, 6 und 12 in Gegenwart von Suramin (2.3, S.67; 2.4., S.68) ohne Beeinflussung der Potenz der Ca^{2+} -Mobilisierung (keine Linksverschiebung der Dosis-Wirkungs-Kurve). Bislang wurde Suramin als Antagonist der GPCR-Aktivierung angesehen und zwar entweder als kompetitiver Rezeptor-Antagonist (Jenkinson & Reid, 2000) oder als unspezifischer Antagonist der Rezeptor/G-Protein-Interaktion (Kimura *et al.*, 2000). Das gilt unter anderem auch für LPA- und S1P-Rezeptoren (Postma *et al.*, 1996) mit einer gewissen Spezifität für den Subtyp edg3 (Ancellin & Hla., 1999). Die Vorbehandlung transfizierter HEK293-Zellen mit 300 μ M Suramin (3min, 37°C) induziert keine spontanen Ca^{2+} -Freisetzungen (Abb.21B a), S.70), verbessert aber deutlich das Meßfenster durch Inhibierung endogener S1P Rezeptoren (Abb.19C, S.68) bei gleichzeitiger Potenzierung der S1P-vermittelten gpr3-, 6- und 12-Signale (Abb.19A+B, S.68; Abb.20, S.69). Dieser Effekt deutet darauf hin, daß gpr3, 6 und 12 die identische Signaltransduktionskaskade benutzen, wie die Suramin-antagonisierten Rezeptoren.

Im direkten Vergleich zu seinem humanen Homologen führt rgpr3 in einer S1P-Dosis-Wirkungs-Beziehung zur wesentlich effizienteren Ca^{2+} -Freisetzung in Gegenwart von Suramin (Abb.21C, S.70). Gleichzeitig fällt die konstitutive Erhöhungen der basalen cAMP-Spiegel in HEK293-Zellen durch rgpr3 tendenziell höher aus (vgl. Abb.16, S.64; Abb.24C, S.73). Da jedoch die Expression der beiden Rezeptoren auf der Zelloberfläche von HEK293-Zellen nicht quantifiziert worden ist (z.B. durch Western Blot oder Bindungsassay), kann die intrinsische Aktivität von S1P an den Rezeptor-Homologen nicht bestimmt werden.

In Einzelversuchen führt auch das Lipid LPA zur gpr3-vermittelten Ca^{2+} -Freisetzung (2.2., S.65) und zur Erhöhung des basalen cAMP-Spiegels der gpr3-Homologen von Mensch (Abb.24A, S.73) und Ratte (Abb.24C, S.73), während gpr6 und gpr12 unbeeinflusst bleiben. Zum jetzigen Zeitpunkt können agonistische Wirkungen dieses Lipids am Rezeptor gpr3 nicht ausgeschlossen werden, bedürfen jedoch aufgrund des sehr hohen endogenen LPA-Hintergrundes in HEK293-Zellen (Abb.18A, S.67) einer Bestätigung in einem Zellsystem mit keinem/geringerem LPA-Hintergrund.

Suramin hat keinen Effekt auf den endogenen LPA-Hintergrund in HEK293-Zellen (keine Abb.).

Da Lipid-GPCRs meist durch mehrere bioaktive Lipide aktiviert werden können (z.B. Zhu *et al.*, 2001), ist in einer Substanz-Bibliothek, bestehend aus 200 bioaktiven Lipiden, nach zusätzlichen Aktivatoren in einem FLIPR/ Ca^{2+} -Assay gesucht worden (2.5., S.71).

Neben S1P und DHS1P weist kein weiteres Lipid der Bibliothek agonistische Eigenschaften an den Rezeptoren gpr3, 6 und 12 auf.

Aufgrund ubiquitärer S1P-Rezeptor-Expression verfügen nahezu alle Säugerzellen über endogene S1P-Rezeptoren, die ein relativ hohes Hintergrundsignal verursachen. HEK293-Zellen, die in dieser Arbeit überwiegend für funktionelle Untersuchungen von gpr3, 6 und 12 verwendet werden, verfügen über eine ausgeprägte endogene Ca^{2+} -Freisetzung nach S1P- und LPA-Stimulation und exprimieren darüber hinaus endogene gpr3, 6 und 12-Rezeptoren (Abb.18, S.67).

Beispiele aus der Literatur zeigen, daß schwache Ca^{2+} -Signale eines transfizierten Rezeptors unspezifische Fluktuationen endogener Rezeptoren widerspiegeln können, was zu Mißinterpretationen verleiten kann (z.B. Jazin *et al.*, 1993). Ein Meßsystem mit deutlich geringerem bzw. keinem endogenen S1P-Hintergrund ist folglich anzustreben. Zelllinien, die einen relativ geringen endogenen S1P-Hintergrund aufweisen, sind beispielsweise *Spodoptera frugiperda* (Sf9) Insektenzellen, *Xenopus* Oozyten, *Saccharomyces cerevisiae* oder die Ratten Hepatomzelllinie Rh7777. Die Untersuchung humaner GPCRs in niederen Zelltypen, wie z.B. Insekten-, Amphibien- oder Hefe-Zellen, birgt jedoch meist komplett unterschiedliche bzw. deutlich reduzierte Signaltransduktionskaskaden sowie Änderungen in posttranslationalen Modifikationen, die die Funktion des Rezeptors verändern können.

McAllister *et al.*, 2000 haben ein Fusionskonstrukt des konstitutiv aktiven LPA-Rezeptors edg2 mit einem $\text{G}\alpha_i$ -Protein hergestellt, welches durch die Punktmutation 351C->G PTX-Insensitivität erlangt hat. Nach transienter Transfektion des Fusionskonstruktes in HEK293-Zellen und Inaktivierung endogener G-Proteine des Typs $\text{G}\alpha_i$ durch PTX konnte die hochspezifische LPA-induzierte [^{35}S]GTP γ S-Bindung gegenüber einem schwach ausgeprägten, endogenen LPA-Hintergrund gemessen werden. Dagegen kann im Rahmen dieser Arbeit aufgrund des dramatisch hohen endogenen LPA-Hintergrundes in HEK293-Zellen keine spezifische LPA-induzierte Ca^{2+} -Freisetzung des Rezeptors edg2 gemessen werden (keine Abb.). Dieses Beispiel zeigt die Problematik endogener Hintergrundsignale bei ubiquitär exprimierten Lipidrezeptoren, insbesondere bei der Untersuchung relativ schwach ausgeprägter Ca^{2+} -Mobilisierungen über G-Proteine des Typs $\text{G}\alpha_i$ (3.1., S.77).

Die Arbeit von McAllister *et al.*, 2000 zeigt darüber hinaus eine deutliche Verbesserung der edg2/ $\text{G}\alpha_i$ -Protein-Kopplung durch kovalente Verknüpfung von Rezeptor und PTX-insensitivem $\text{G}\alpha_i$ -Protein gegenüber der Kotransfektion beider Komponenten. Da der endogene S1P-Hintergrund von HEK293-Zellen nahezu komplett durch PTX inhibierbar ist (Abb.29A, S.78), ist es wahrscheinlich, daß ein entsprechendes gpr3-, 6- oder 12-Fusionskonstrukt mit $\text{G}\alpha_i$ (C351G) zur Quantifizierung der S1P-Aktivierung geeignet sein wird. Obwohl McAllister und Mitarbeiter ausschließlich die LPA-induzierte G-Protein-Aktivierung ([^{35}S]GTP γ S-Bindung) untersucht haben, ist davon auszugehen, daß vergleichbare Fusionsproteine aufgrund der räumlichen Nähe von Rezeptor und G-Protein auch deutliche Verbesserungen bei der Messung funktioneller *second messenger* mit sich ziehen werden.

Eine zentrale Bedeutung in der Regulation G-Protein-gekoppelter Rezeptoren nimmt die Ligand-induzierte Internalisierung des Rezeptors zu intrazellulären Kompartimenten ein, die zu einer kurzzeitigen und reversiblen Reduktion der Aktivierbarkeit durch einen spezifischen Liganden bzw. der Verfügbarkeit von Rezeptormolekülen auf der Zelloberfläche führt (Desensitivierung). Im Gegensatz dazu ist die langfristige Runterregulation eines GPCRs durch irreversible proteolytische/lysosomale Degradierung des Rezeptors geprägt (siehe Review Ferguson *et al.*, 2001, Tsao *et al.*, 2001).

Die Verwendung Epitop- oder fluoreszenzmarkierter Rezeptoren (z.B. GFP-Fusionskonstrukte) bietet die Möglichkeit zur Untersuchung von Internalisierungsvorgängen einzelner Rezeptoren unabhängig von endogenen Hintergrundproblemen. Zhang *et al.*, 1999 zeigen darüber hinaus die Translokation eines β -Arrestin2-GFP-Fusionsproteins (β arr₂) zur Plasmamembran nach Stimulation einer Reihe von GPCRs mit ihren spezifischen Liganden. Sie beschreiben die β arr₂-Translokation als nahezu universell einsetzbare Methode zur Untersuchung von Ligand-induzierten Endozytosen.

Analog zu Liu *et al.*, 1999, die die Agonist (S1P)-induzierte Internalisierung und Translokation des Rezeptors edg1 in HEK293-Zellen zeigen, wird im Rahmen dieser Arbeit die Agonist-induzierte Translokation der S1P-Rezeptoren edg3- und edg8-GFP im direkten Vergleich zu gpr6-GFP und dem Peptid-GPCR Urotensin-II (UII) untersucht (2.7., S.74).

Unter serumfreien Bedingungen induzieren S1P und DHS1P (je 100nM) die energieabhängige Internalisierung der drei Rezeptoren edg3-, edg8- und gpr6-GFP in HEK293-Zellen mit beginnender Zellabkugelung, nicht jedoch des UII-Rezeptors (Abb.26, S.75). Es sei darauf hingewiesen, daß gpr6-GFP, im Gegensatz zu edg3-, edg8- und UII-GFP, bereits vor der Zugabe von Lipiden größtenteils intrazellulär vorliegt, wie es für einen Rezeptor mit konstitutiver Aktivität theoretisch zu erwarten ist. Eine basale Internalisierung konstitutiv aktiver GPCRs ist bereits mehrfach beschrieben worden (Miserey-Leinkei *et al.*, 2001, Shapiro *et al.*, 1996, McCune *et al.*, 2000, Tarasova *et al.*, 1997); sie wird für gpr6-GFP gesondert unter 2.3, S.125 diskutiert.

Nur nach konsequentem „Aushungern“ gpr6-GFP-transfizierter HEK293-Zellen in lipid- und serumfreiem Medium weisen ca. 20% der Zellen eine schwache Plasmamembran-Lokalisation auf. Die Abhängigkeit der gpr6-Lokalisation vom Lipid- bzw. Serum-Gehalt des Medium bestätigt die Existenz eines bioaktiven Aktivators im Serum (Abb.34, S.83). Durch exogene Gabe von S1P bzw. DHS1P wird der intrazelluläre Anteil des Rezeptoren gpr6-GFP über funktionelle Internalisierung bei 37°C, nicht aber bei 4°C, erhöht (Abb.25, S.75). Andere Lipide wie LPA, SPC, LPC, Sph etc. induzieren hingegen keine vermehrte Internalisierung des Rezeptor gpr6-GFP (keine Abb.). Das bestätigt die Ergebnisse aus den Ca²⁺-Assays (2.2., S.65; 2.5., 71) und belegt eine Selektivität von gpr6 gegenüber S1P und DHS1P.

Das Auftreten S1P-induzierter, morphologischer Zellabkugelung („cell rounding“) in HEK293-Zellen ist bereits von Van Brocklyn *et al.*, 1999 für die Rezeptoren edg1, edg3 und H218/edg5 beschrieben worden, und kann zumindest für den Rezeptor edg3 (edg3-GFP) bestätigt werden. Darüber hinaus ergeben sich Hinweise auf Zellabkugelungs-Effekte nach transients Transfektion der Rezeptoren edg8-GFP (Niedernberg *et al.*, 2002, Manuskript in Vorbereitung) und gpr6-GFP.

Ein zellulärer Internalisierungs-Assay der Arbeitsgruppe Conway *et al.*, 1999 ermöglicht die subzelluläre Quantifizierung eines PTH (Parathormon)- und β 2-Adrenozeptor-GFP-Fusionsproteins in lebenden Zellen im Mikrotiterplatten-Maßstab (ArrayScanTM, Cellomics, USA). Das Meßsystem setzt die stabile Transfektion der Fusionskonstrukte voraus und bestimmt die relative Anhäufung der GFP-Fluoreszenz im Zellinneren nach Gabe potentieller Agonisten/Antagonisten.

Im Rahmen dieser Arbeit ist an stabilen GPCR/pEGFP-Zelllinien gearbeitet worden (z.B. UII/pEGFP, edg8/pEGFP, A. Hattenberger, Aventis Pharma, DG Herz-Kreislauf, unpubliziert); es sind jedoch große Probleme hinsichtlich Zytotoxizität aufgetreten. Da auch im Fall des gpr6-GFP zytotoxische Effekte beobachtet werden, ist die funktionelle Internalisierungen der Rezeptoren edg3-, edg8-, gpr6- und UII-GFP in einem transienten Expressionssystem untersucht worden. Aufgrund der konstitutiven Aktivität von gpr6-GFP und der daraus resultierenden, überwiegend intrazellulären Verteilung des Rezeptors (Abb.34, S.83), ist dieser HTS-fähige Internalisierungs-Assay ungeeignet. Funktionelle Veränderungen bzw. Transportvorgänge konnten lediglich durch arbeits- und zeitintensive Einzelzell-Analysen beobachtet werden.

Im Falle weiterführender Arbeiten empfiehlt sich möglicherweise der Einsatz eines GFP-Fusionsvektors, der nicht mit einem konstitutiv aktiven (z.B. CMV-Promotor bei pEGFP-Vektoren), sondern mit einem induzierbaren Promotor arbeitet.

Howard *et al.*, 2001 nennen Plasmamembranständigkeit von *orphan* GPCRs als unverzichtbares Kriterium für eine erfolgreiche Ligandenidentifizierung. Die Herstellung Epitop-markierter (his-tag, myc-tag, HA-tag) Konstrukte dient in der Regel der Überprüfung der Lokalisation in transfizierten Zellen.

Tatsächlich ist dieses Kriterium für gpr3, 6 und 12 sowie gpr6-GFP nicht erfüllt, aber dennoch glückt die Identifizierung der bioaktiven Lipide S1P und DHS1P als Modulatoren dieser Rezeptorfamilie.

1.3. Einordnung von gpr3, 6 und 12 als Lipidrezeptoren

Der Rezeptor *edg1* wurde ursprünglich als *immediate early gene* der Endothelzell-Differenzierung kloniert (Hla & Maciag, 1990) und fiel unabhängig davon als Scherstress-induziertes Gen in Endothelzellen auf (Takada *et al.*, 1997). Damit wurde *edg1* Namensgeber für sieben weitere „*endothelial differentiation gene*“-Subtypen, die im gleichen Zeitraum kloniert wurden und hohe sequenzielle Ähnlichkeit untereinander aufwiesen. Durch Fraktionierung des Serums gelangen Lee *et al.*, 1998 die Identifizierung des bioaktiven Lipids Sphingosin-1-Phosphat (S1P) als hochaffiner Ligand des Rezeptors *edg1* mit einem EC₅₀-Wert von 8nM. Das verwandte Lipid Lysophosphatidsäure (LPA) konnte dem *orphan* Rezeptor *edg2* zugeordnet werden (Hecht *et al.*, 1996).

Bislang umfaßt die *edg*-Rezeptorfamilie die Subtypen *edg1*, 3, 5, 6 und 8 mit Affinität für das Lipid S1P und *edg2*, 4 und 7 als hochaffine Rezeptoren für LPA (siehe Review Fukushima *et al.*, 2001, Hla, 2001, Goetzl & An, 1998, Moolenaar *et al.*, 1997).

Die Entdeckung der bioaktiven Lipide LPA und S1P und ihre Zuordnung zu G-Protein-gekoppelten Rezeptoren lieferte den „Startschuß“ für die Identifizierung weiterer Rezeptoren für bioaktive Lipid-Mediatoren in den letzten 2-3 Jahren. So ist das Sphingolipid Lysophosphatidylcholin (LPC) bekannt als Regulator von entzündlichen Prozessen wie z.B. Autoimmunerkrankungen und Atherosklerose. Kabarowski *et al.*, 2001 gelangen jedoch erst kürzlich die Zuordnung dieses bioaktiven Lipids zu dem *orphan* Rezeptor G2A. Diese Arbeitsgruppe identifizierte darüber hinaus den *orphan* Rezeptor OGR1 (*ovarian cancer G-protein-coupled receptor 1*) als hochaffinen Rezeptor für das bioaktive Lipid Sphingosylphosphorylcholin (SPC) (Xu *et al.*, 2000) und konnte belegen, daß der *orphan* Rezeptor *gpr4* einen hochaffinen Rezeptor für SPC und LPC darstellt (Zhu *et al.*, 2001).

Die Arbeitsgruppe Im *et al.*, 2001b konnte den *orphan* Rezeptor TDAG-8 (*T-cell death-associated gene-8*) dem Lipid Psychosin (D-Galaktosyl-Sphingosin) zuordnen. Psychosin reguliert über TDAG-8 Globoid-Zellformationen, die z.B. bei der Globoid-Zell-Leukodystrophie aufgrund des Ausfalls des Enzyms Galaktosyl-Ceramidase gestört sind.

Darüber hinaus lieferten Alderton *et al.*, 2001 Hinweise auf die Existenz eines hochaffinen Phosphatidsäure (PA)-GPCRs in HEK293-Zellen, der, verglichen mit LPA, zu einer 100-1000-fach potenteren Aktivierung des p42/p44 MAPK Signaltransduktionsweges führt.

Die Abb.61, S.118 zeigt die Strukturformeln einiger dieser bioaktiven Lipid-Mediatoren.

Bioaktive Lipide sind Derivate von Plasmamembrankomponenten und regulieren eine Reihe wichtiger biologischer Prozesse über die Wechselwirkung mit ihren entsprechenden Rezeptoren. S1P-Wirkungen an den Rezeptoren der *edg*-Familie regulieren zentrale physiologische Funktionen wie Zelldifferenzierung, Inhibierung/Aktivierung von Apoptosen, Stimulierung/Inhibierung der Proliferation, Chemotaxis, Expression von Adhäsionsmolekülen, morphologische Veränderungen etc. (siehe Reviews Pyne & Pyne, 2000a/b).

Gleichzeitig ist S1P für eine Vielzahl kardiovaskulärer Effekte verantwortlich, die die entsprechenden *edg*-Rezeptoren als *targets* für die Herz-Kreislauf-Forschung prädestinieren (siehe Reviews Levade *et al.*, 2001, Huwiler *et al.*, 2000).

Aufgrund der Vielzahl der biologischen Effekte, die durch S1P vermittelt werden, ist es nicht überraschend, daß mehrere S1P-Rezeptor-Subtypen existieren. Trotzdem lassen sich nicht alle S1P-Effekte mit den bisher bekannten S1P-Rezeptoren erklären (Dr. Kostenis, mündliche Auskunft). Deshalb ist zu vermuten, daß es noch weitere S1P-Subtypen gibt.

Anfang des Jahres 2002 ist eine neue Lysophospholipid-Rezeptor-Nomenklatur beschlossen worden, wonach die S1P-Rezeptoren der edg-Rezeptorfamilie zu S1P₁ (edg1), S1P₂ (edg5), S1P₃ (edg3), S1P₄ (edg6) und S1P₅ (edg8) umbenannt werden. Analog dazu werden die LPA-edgs nun als LPA₁ (edg2), LPA₂ (edg4) und LPA₃ (edg7) bezeichnet (Chun *et al.*, 2002).

In dieser Arbeit wird noch die alte Nomenklatur verwendet.

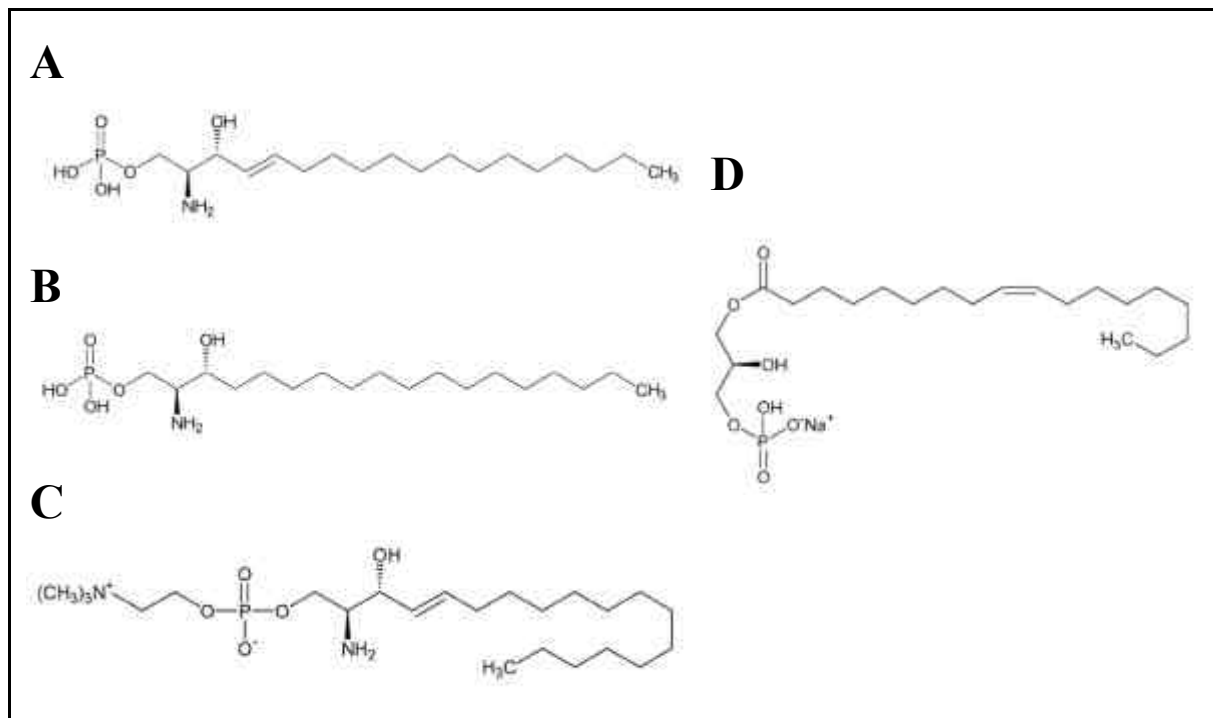


Abb.61 **Strukturformeln einiger bioaktiver Lipide.** A: S1P, B: DHS1P, C: LPC, D: LPA (aus: Informationen zur Biomol Lipidbibliothek).

Im Rahmen dieser Arbeit werden *orphan* gpr3, 6 und 12 als GPCRs identifiziert, deren konstitutive Aktivität in HEK293-Zellen durch die Lipide S1P und DHS1P moduliert werden kann. Beide Lipide bewirken Ca²⁺-Mobilisierung (2.2, S.65; 2.4, S.68; 2.5, S.71), Stimulation der Adenylat-Zyklase (2.6., S.72) und eine Steigerung der basalen Internalisierungsrate (2.7., S.74) nach transienter Transfektion in HEK293-Zellen, und das spricht für agonistische Wirkungen der Lipide an gpr3, 6 und 12.

Aufgrund fehlender Bindungsdaten oder Untersuchungen von [³⁵S]GTPγS-Bindung können S1P und DHS1P zum jetzigen Zeitpunkt nicht zweifelsfrei als physiologische Liganden dieser Rezeptorfamilie bezeichnet werden. Nicht zuletzt aufgrund fehlender Agonisten, Antagonisten bzw. inverser Agonisten stößt die funktionelle Charakterisierung hier an ihre Grenzen. Die modulierende Wirkung von S1P/DHS1P auf gpr3-, 6- und 12-aktivierte Signaltransduktionswege (Gα_i, Gα_s, SPHK) in HEK293-Zellen kann dagegen zweifelsfrei belegt werden (3., S.77).

2. Signaltransduktion und konstitutive Aktivität

Der durch einen Liganden angeschaltete Signaltransduktionsweg eines GPCRs ist neben dem Liganden selbst eine weitere Unbekannte von *orphan* GPCRs. Die Spezifität eines GPCRs für ein $G\alpha$ -Protein wird überwiegend durch die 2. und 3. intrazelluläre Schleife (C2 und C3) des Rezeptors und durch den C-Terminus der $G\alpha$ -Untereinheit bestimmt (Wess, 1998+1997, Näsman *et al.*, 1997, Eason & Liggett, 1996, Kostenis *et al.*, 1999).

Bioinformatische Algorithmen, mit deren Hilfe Vorhersagen über die Signaltransduktionswege eines GPCRs getroffen werden können, befinden sich in der Entwicklung (z.B. Möller *et al.*, 2001). Sie basieren weitestgehend auf Ergebnissen aus Mutagenese- und/oder $G\alpha$ -Chimären-Studien.

In Abb.62, S.119 sind die Signaltransduktionswege, so wie sie im Rahmen dieser Arbeit für die Rezeptoren *gpr3*, *6* und *12* in HEK293-Zellen ermittelt wurden, schematisch zusammengefasst (3., S.77). Nach dem aktuellen Kenntnisstand besteht kein Unterschied zwischen den Rezeptoren *gpr3*, *6* und *12*.

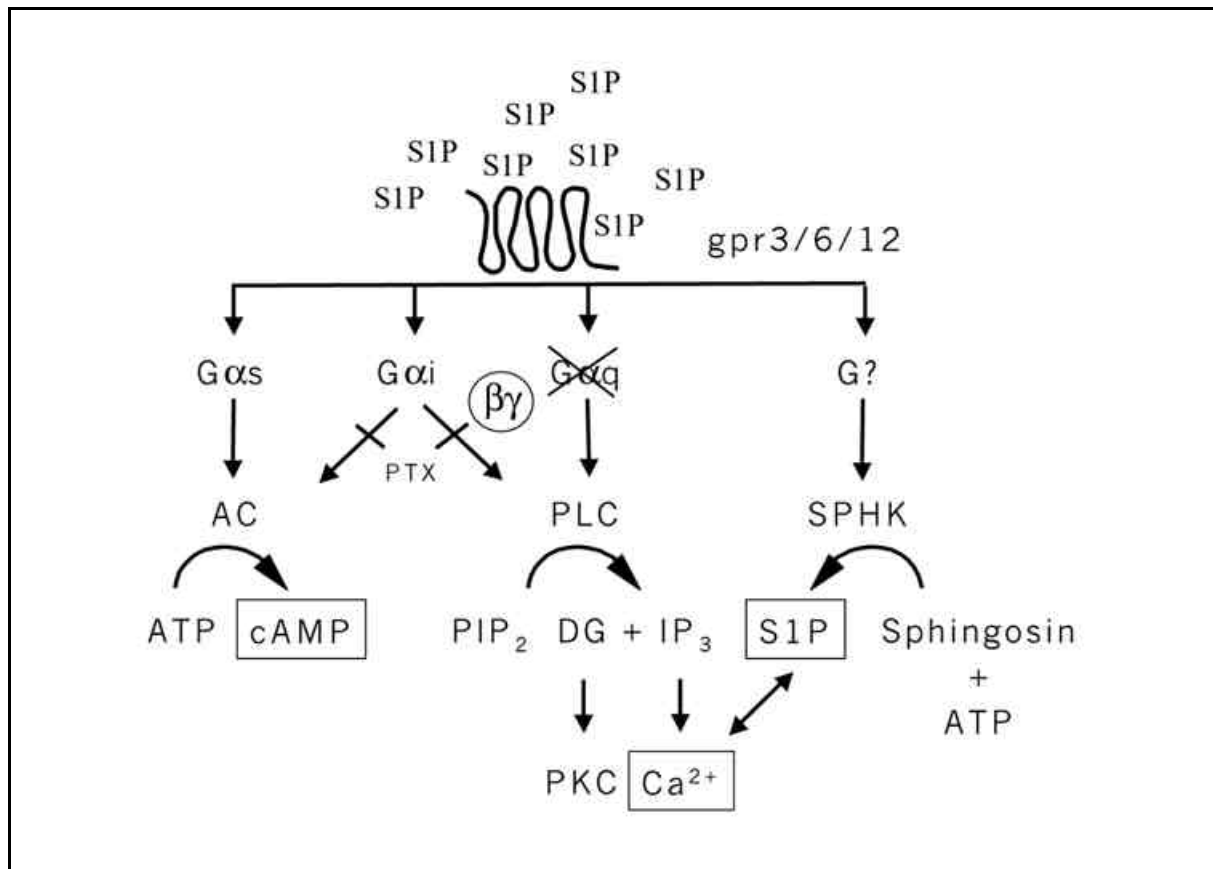


Abb.62 Schematische Darstellung des Signaltransduktionsweges von *gpr3*, *6* und *12* in HEK293-Zellen. Durch Wechselwirkung von *gpr3*, *6* und *12* mit Adenylat-Zyklase (AC), Phospholipase-C (PLC) und Sphingosin-Kinase (SPHK) über G-Proteine des Typs $G\alpha_i$ und $G\alpha_s$ kommt es zur Erhöhung von intrazellulären cAMP-, Ca^{2+} - und SIP-Spiegeln. Die Beteiligung von $G\alpha_q$ kann ausgeschlossen werden.

2.1. Duale Kopplung an $G\alpha_i$ und $G\alpha_s$

Aufgrund der Ergebnisse von Eggerickx *et al.*, 1995 und eigener Daten aus funktionellen cAMP-Assays (2.1., S.64) wird davon ausgegangen, daß es sich bei gpr3, 6 und 12 um eine Familie $G\alpha_s$ -koppelnder Rezeptoren handelt. Deshalb werden für FLIPR/ Ca^{2+} -Assays promiskuitive G-Protein-Untereinheiten eingesetzt (2.2., S.65), die $G\alpha_s$ -koppelnde Rezeptoren theoretisch an die PLC/ Ca^{2+} -Kaskade „umleiten“ können (Kostenis *et al.*, 1998, Kukkonen *et al.*, 2001).

Die $G\alpha_q$ -Proteinfamilie, der auch α -Untereinheiten des Typs $G\alpha_{11}$, $G\alpha_{14}$, $G\alpha_{15}$ und $G\alpha_{16}$ zugeordnet werden, reguliert die Stimulation der vier PLC- β -Isoformen. $G\alpha_{15}$ und $G\alpha_{16}$ zeichnen sich durch eine natürliche Promiskuität aus, da sie eine Reihe $G\alpha_i$ -, $G\alpha_s$ - und $G\alpha_q$ -koppelnder GPCRs an die PLC koppeln können (Offermanns & Simon, 1995). Kostenis, 2001 konnte jedoch zeigen, daß diese G-Proteine keine universellen Adapter für die intrazelluläre Ca^{2+} -Mobilisierung darstellen und sich nicht routinemäßig für Ligandenidentifizierungen im HTS-Format eignen. Tatsächlich existieren Beispiele für geförderte, gehemmte oder unbeeinflusste PLC-Kopplungen eines GPCRs nach Kotransfektion mit $G\alpha_{16}$ (siehe Review Kostenis, 2001).

Eine weitere Möglichkeit für die „Umkopplung“ von GPCRs ist der Einsatz von chimären G-Proteinen. So gelingt die effiziente Kopplung des $G\alpha_i$ -koppelnden Rezeptors edg1 (Windh *et al.*, 1999) an den PLC-Signaltransduktionsweg in HEK293-Zellen nur unter Kotransfektion mit $G\alpha_{q15}$ (Ancellin & Hla, 1999). Bei diesem chimären $G\alpha_q$ -Protein wurden die letzten 5 Aminosäuren des C-Terminus gegen die entsprechenden Aminosäuren von $G\alpha_i$ ausgetauscht und so die „Umkopplung“ $G\alpha_i$ -koppelnder GPCRs an die PLC/ Ca^{2+} -Kaskade ermöglicht (Conklin *et al.*, 1993).

Im Rahmen dieser Arbeit werden neben den nativen $G\alpha$ -Untereinheiten $G\alpha_q$ und $G\alpha_{16}$ die Chimären bzw. Mutanten der $G\alpha$ -Untereinheiten $G\alpha_{i4qs5}$ (Dr. Kostenis, Aventis Pharma, Patentanmeldung), $G\alpha_{16GCC}$ bzw. $G\alpha_{16GCCG69D}$ (beide Dr. Kostenis, unpubliziert) zur Kopplung der Rezeptoren gpr3, 6 und 12 an den PLC-Signaltransduktionsweg eingesetzt. Überraschenderweise erfolgt in HEK293-Zellen eine Kopplung der Rezeptoren an die PLC ohne die Kotransfektion promiskuitiver $G\alpha$ -Untereinheiten. Dieses Ergebnis liefert den Hinweis auf eine duale Kopplung dieser Rezeptorfamilie an $G\alpha_q$ oder $G\alpha_i$ - zusätzlich zu $G\alpha_s$ - über die Nutzung endogener G-Proteine (2.2., S.65).

Bei den Rezeptoren gpr3, 6 und 12 bewirkt die Kotransfektion von $G\alpha_{16}$ keine Verbesserung des Ca^{2+} -Signals gegenüber der Kontrolltransfektion ohne zusätzliches G-Protein (Abb.17, S.66). Im Gegensatz dazu führt die Kotransfektionen von edg1 oder edg3 mit $G\alpha_{16}$ in CHO-Zellen zu einer dramatischen Zunahme des unspezifischen S1P-Hintergrundes, der eine Quantifizierung der spezifischen edg1-Antwort unmöglich macht bzw. die Signaltransduktion des Rezeptors edg3 hinsichtlich Effizienz und Potenz hemmt (Kostenis, 2001).

Die Mutanten von $G\alpha_{16}$ und das chimäre $G\alpha_i/G\alpha_q$ -Protein zeigen insgesamt keine Verbesserung der gpr3-, 6- und 12-vermittelten Ca^{2+} -Freisetzung gegenüber den endogenen G-Proteinen des HEK293-Zellsystems (aus patentrechtlichen Gründen im Ergebnisteil nicht abgebildet).

Die Kotransfektion $G\alpha_q$ -gekoppelter GPCRs mit $G\alpha_q$ führt in der Regel zu einer Potenzierung des Ligand-induzierten Ca^{2+} -Signals (Dr. Kostenis, mündliche Mitteilung). Da dieser Effekt im Fall der Rezeptoren gpr3, 6 und 12 nicht beobachtet werden kann (Abb.17, S.66), wird vermutet, daß diese Rezeptoren nicht die $G\alpha_q$ -Signaltransduktionskaskade für die Ca^{2+} -Freisetzung nutzen. Bestätigt wird diese Vermutung durch PTX-Versuche, die eine totale Sensitivität der S1P-induzierten Ca^{2+} -Mobilisierungen durch gpr3, 6 und 12 zeigen (Abb.29A+B, S.78). Damit ist die Beteiligung von G-Proteinen des Typs $G\alpha_i$ an der Ca^{2+} -Freisetzung durch gpr3, 6 und 12 eindeutig belegt. $\beta\gamma$ -Untereinheiten von $G\alpha_i$ -Proteinen können auch intrazelluläre Ca^{2+} -Signale induzieren; sie fallen jedoch im Vergleich zur $G\alpha_q$ -vermittelten PLC-Aktivierung wesentlich schwächer aus (Steinweis, 1994).

Nach Kultivierung gpr3-, 6- und 12-transfizierter HEK293-Zellen im Standard-Medium mit 10% FCS kann keine Erhöhung des intrazellulären Ca^{2+} -Spiegels nach S1P-Stimulation ($1\mu M$) gemessen werden (keine Abb.). Parallel zeigt sich in einem cAMP-Assay eine dramatische Erhöhung des basalen cAMP-Spiegels durch gpr3, 6 oder 12 (Abb.16, S.64).

Das „Aushungern“ transfizierter HEK293-Zellen in serumreduziertem (1% FCS) bzw. lipidfreiem (10% FCSCS) Medium eröffnet dagegen ein Meßfenster für die S1P-induzierte Ca^{2+} -Mobilisierung (2.2., S.65) und reduziert die erhöhten cAMP-Spiegel (2.1., S.64).

Die Eliminierung von $G\alpha_i$ -Untereinheiten durch PTX fördert die Adenylat-Zyklase-Stimulation, während eine $G\alpha_i$ -Kotransfektion die Fähigkeit von gpr3, 6 und 12 zur Adenylat-Zyklase-Stimulation unterdrückt (3.1., S.77). Diese Ergebnisse liefern Hinweise auf eine gleichzeitig stimulatorische ($G\alpha_s$) und inhibitorische ($G\alpha_i$) Beeinflussung der Adenylat-Zyklase durch gpr3, 6 und 12 („*dual coupling*“): Die Reduktion Forskolin-erhöhter cAMP-Spiegel durch die Rezeptoren gpr3, 6 und 12 (inhibitorischer cAMP-Assay) ist nicht untersucht worden.

Zusammenfassend können folgende Schlußfolgerungen angestellt werden:

- 1.) gpr3, 6 und 12 sind bereits nach Kultivierung im Standard-Medium (10% FCS) maximal aktiviert und können im Ca^{2+} -Assay durch S1P nicht weiter stimuliert werden (und evtl. mangelnde Sensitivität des Fluoreszenzfarbstoffs fluo-4).
- 2.) Eine Serum- bzw. Lipidreduktion im Medium reduziert das Ausmaß der konstitutiven Aktivität und ermöglicht so die Messung weiterer Ca^{2+} -Freisetzung nach S1P-Stimulation.
- 3.) Die Adenylat-Zyklase-Stimulation über $G\alpha_s$ und die Ca^{2+} -Freisetzung über $G\alpha_i$ sind permanent angeschaltet.

Zhu *et al.*, 1994 zeigen, daß typische $G\alpha_s$ -gekoppelte Rezeptoren, wie z.B. β -adrenerge (Typ1 und Typ2)- oder Vasopressin-Rezeptoren, nach transienter Transfektion in L-Zellen, in Abhängigkeit von der Rezeptordichte, die Fähigkeit zur Stimulation der PLC erlangen können.

Zusätzlich zu transienten Überexpressionssystemen wird eine parallele Aktivierung verschiedener G-Protein-Kaskaden in nativen Geweben beobachtet: Humane β -Adrenozeptoren im Herzen koppeln beispielsweise funktionell an $G\alpha_i$ und $G\alpha_s$ (Kilts *et al.*, 2000, Xiao, 2001). Herrlich *et al.*, 1996 beschreiben die duale Kopplung des luteinisierenden Hormon (LH)-Rezeptors an Adenylat-Zyklase und PLC in nativen Gelbkörper-Membranen. Humane Thyrotropin-Rezeptoren primärer Schilddrüsenmembranen koppeln sogar funktionell an G-Proteine der Familien $G\alpha_s$, $G\alpha_{q/11}$, $G\alpha_i$ und $G\alpha_{12}$ (Laugwitz *et al.*, 1996).

Liu & Simon, 1996 beschreiben die funktionelle Interaktion von PLC- und Adenylat-Zyklase-Signaltransduktionskaskaden als feinreguliertes Gleichgewicht. So hemmt beispielsweise die cAMP-abhängige Protein Kinase-A (PKA) spezifisch die $\beta\gamma$ -aktivierte PLC- $\beta 2$ -Aktivität durch Phosphorylierung spezifischer Serine, nicht jedoch die $G\alpha$ -aktivierte PLC-Aktivität.

Natürliche Promiskuität von GPCRs muß folglich als Prinzip zur Erhöhung von Komplexität biologischer Signaltransduktion interpretiert werden; sie kann nicht nur auf transiente Überexpression zurückgeführt werden.

Die Kopplung von gpr3, 6 und 12 an G-Proteine des Typs $G\alpha_i$ bzw. den Ca^{2+} -Signaltransduktionsweg gelingt in HEK293-Zellen, nicht jedoch in CHO- oder HeLa-Zellen (keine Abb.). In CHO- und HeLa-Zellen ist nur die konstitutive Anschaltung des $G\alpha_s$ -Signaltransduktionsweges (Angaben Dr. S. Grüneberg, Aventis Pharma, unveröffentlicht) beobachtet worden. Diese Ergebnisse bestätigen zum einen die funktionelle Expression der Rezeptoren, liefern jedoch auch Hinweise auf zelltypspezifische Unterschiede der Signaltransduktionskaskaden. Ähnliche Befunde liegen für den Rezeptor edg1 vor, der nach transienter Transfektion in CHO- und HEL (*human erythroleukemia*)-, nicht aber in HEK293- oder Sf9-Zellen die S1P-induzierte Ca^{2+} -Mobilisierung über $G\alpha_i$ vermittelt (An *et al.*, 1999).

Es ist noch nicht bekannt, ob die „chaotische“ gpr3-, 6- und 12-Physiologie ebenfalls *in vivo* vorliegt.

2.2. Beteiligung der Sphingosin-Kinase

Die Aktivierung der G-Protein-gekoppelten Rezeptoren *edg3* und *edg5/H218* durch den extrazellulären Liganden S1P führt zur PLC-vermittelten Ca^{2+} -Freisetzung in stabil transfizierten HTC4-Ratten-Hepatomazellen und ist durch den PLC-Inhibitor U73122 komplett inhibierbar (An *et al.*, 1999). Parallel dazu zeigen Arbeiten von Meyer zu Heringdorf *et al.*, 1998, daß GPCR-vermittelte Ca^{2+} -Signale auch durch die intrazelluläre - Sphingosin-Kinase (SPHK)-katalysierte - Freisetzung von S1P induziert werden können (Abb.63, S.124). Die Mikroinjektion von S1P in Zellen, deren endogene $\text{G}\alpha_i$ -Proteine durch PTX-Vorbehandlung inaktiviert wurden, mobilisiert Ca^{2+} aus intrazellulären Speichern und liefert den bislang stärksten Beweis für eine intrazelluläre Wirkung von S1P als Ca^{2+} -mobilisierenden *second messenger* (Olivera & Spiegel, 2001, Spiegel & Milstien, 2000, Von Broocklyn *et al.*, 1998).

Gleichzeitig ist die Ca^{2+} -Freisetzung inhibierbar durch Behandlung der Zellen mit den plasmamembran-permeablen, kompetitiven SPHK-Inhibitoren Dimethylsphingosin (DMS) oder Dihydrosphingosin (DHS) (Meyer zu Heringdorf *et al.*, 1998).

Nach Klonierung der SPHK aus der Ratten-Niere (Olivera *et al.*, 1998) sowie der humanen Homologen SPHK1a und SPHK2b (Kohama *et al.*, 1998) haben bioinformatische Sequenzanalysen gezeigt, daß diese Kinasen Calmodulin/ Ca^{2+} -Bindungsstellen aufweisen, die auf eine Aktivierung/Regulation durch Ca^{2+} hinweisen.

Transiente bzw. stabile Überexpression der SPHK in HEK293- und NIH3T3-Zellen führt zu erhöhten basalen S1P-Spiegeln, fördert das Zellwachstum (DNA-Synthese, G₁/S-Übergänge bzw. Zellen in der S-Phase) und vermittelt Apoptoseschutz gegenüber Serumentzug und Ceramid-Behandlung. Alle diese Effekte sind PTX-insensitiv und durch DMS blockierbar (Olivera *et al.*, 1999).

Die Rezeptoren *gpr3*, 6 und 12 mobilisieren nach transienter Transfektion in HEK293-Zellen und exogener Gabe von S1P konzentrationsabhängig intrazelluläres Ca^{2+} (2.4., S.68). Diese S1P-induzierte Ca^{2+} -Mobilisierung kann durch PTX-Behandlung komplett aufgehoben werden, und sie wird folglich ausschließlich über G-Proteine des Typs $\text{G}\alpha_i$ bzw. deren $\beta\gamma$ -Untereinheiten vermittelt (3.1., S.77).

Das *gpr3*-, 6- und 12-vermittelte Ca^{2+} -Signal ist ferner zu 50-75% durch den kompetitiven SPHK-Inhibitor DMS hemmbar (3.3., S.80), und das freigesetzte Ca^{2+} stammt ausschließlich aus dem Thapsigargin-sensitiven Ca^{2+} -Speicher des Endoplasmatischen Retikulums (ER) (3.2., S.79).

Die partielle Beteiligung der SPHK an der Ca^{2+} -Mobilisierung durch die $\text{G}\alpha_i$ -koppelnden Rezeptoren *gpr3*, 6 und 12 deckt sich mit den Befunden von van Koppen *et al.*, 2001, wonach die SPHK-vermittelte Ca^{2+} -Freisetzung ein Modifikationssystem der Inositoltriphosphat (IP_3)-vermittelten Ca^{2+} -Mobilisierung darstellt. Die initiale IP_3 -Produktion durch die Rezeptor-vermittelte PLC-Aktivierung induziert einen geringen Ca^{2+} -Impuls, der zur SPHK-Aktivierung und somit zur Freisetzung des *second messengers* S1P führt. Die so stimulierte katalytische S1P-Bildung verstärkt das *gpr3*-, 6- und 12-vermittelte Ca^{2+} -Signal in HEK293-Zellen. Da diese Verstärkung jedoch sensitiv gegenüber PTX ist (Abb.29A+B, S.78), muß sie über G-Proteine des Typs $\text{G}\alpha_i$ getriggert werden.

Es kann z. Zt. nicht ausgeschlossen werden, daß weitere Faktoren zur Aktivierung der SPHK beitragen. So sind Prozesse beschrieben worden, die eine PLC-IP₃-unabhängige Ca²⁺-Mobilisierung von α 2-Adrenozeptoren (Michel *et al.*, 1989) oder m2-Azetylcholinrezeptoren (Schmidt *et al.*, 1995) vermitteln. Die molekularen Mechanismen, die zu einer Ca²⁺-unabhängigen SPHK-Aktivierung führen, sind jedoch bislang unbekannt.

Die IP₃-vermittelte Ca²⁺-Freisetzung aus intrazellulären Speichern erfolgt über spezifische IP₃-Kanäle, z.B. in Membranen des ER, und zwar unabhängig von einer SIP-vermittelten Ca²⁺-Freisetzung. Ein intrazellulärer Rezeptor für den *second messenger* SIP ist bislang unbekannt; es wird jedoch spekuliert, daß es sich um einen Sphingolipid-gesteuerten Ca²⁺-Kanal in der ER-Membran handeln könnte (Ghosh *et al.*, 1994).

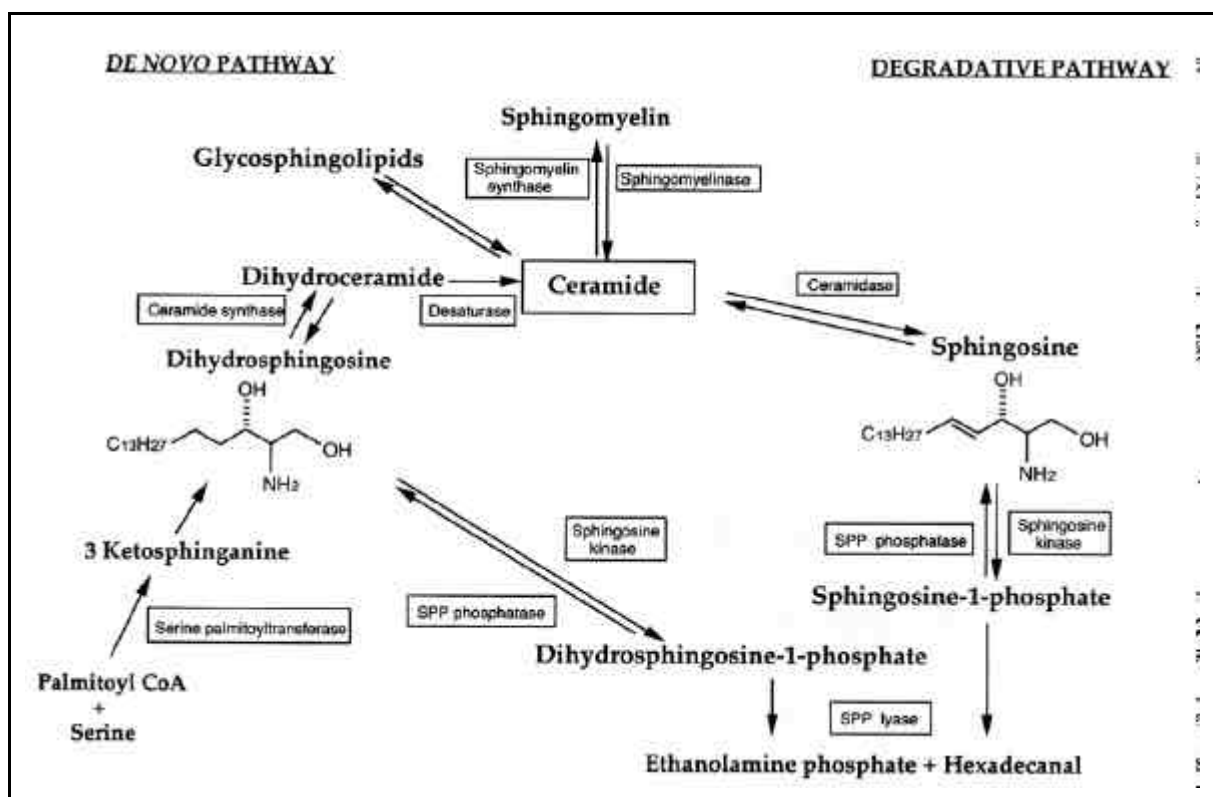


Abb.63 **Sphingolipid-Metabolismus.** Die intrazelluläre Synthese von SIP aus Sphingosin wird katalysiert von der Sphingosin-Kinase (SPHK). Das bioaktive Lipid SIP vermittelt zelluläre Effekte sowohl als extrazellulärer Ligand (Sekretion) als auch als intrazellulärer second messenger (aus: Olivera & Spiegel, 2001).

2.3. Basale Internalisierung als Folge von konstitutiver Aktivität

Der Transport von GPCRs zur Zelloberfläche, von wo aus die Signaltransduktion extrazellulärer Signale initiiert wird, ist ein hochregulierter Prozeß, und intrazelluläre GPCRs können die Folge unterschiedlicher zellulärer Mechanismen sein:

- 1.) Funktionelle Retention des Rezeptors im ER aufgrund eines spezifischen Signals
- 2.) Fehlfaltung und Aggregation im ER (z.B. durch die Addition von GFP)
- 3.) Fehlen von Transport-relevanten Interaktionspartnern
- 4.) Agonist-abhängige oder -unabhängige (konstitutive) Internalisierung

Margeta-Mitrovic *et al.*, 2000 zeigen, daß die GABA_{B1/B2}-Heterodimerisierung (Kaupmann *et al.*, 1998, Kuner *et al.*, 1999) und der intrazelluläre Transport von GABA_{B1/B2}-Heterodimeren durch die Anwesenheit eines C-terminalen ER-Retentions-Motivs „RSRR“ im GABA_{B1}-Rezeptor kontrolliert wird. Ein ähnliches Motiv „RKR“ ist in dem ATP-sensitiven K⁺ (K_{ATP})-Kanal gefunden worden, und es kontrolliert dort über ER-Retention den Assemblierungs-abhängigen Transport von Kanal-Oktameren zur Zelloberfläche (Zerangue *et al.*, 1999).

Offensichtlich benutzen verschiedene Proteinfamilien wie GPCRs und Ionen-Kanäle gemeinsame, konservierte Mechanismen, um die Lokalisation korrekt assemblierter Oligomere auf der Plasmamembran zu kontrollieren und um nicht-funktionelle Monomere zurückzuhalten. Das könnte bedeuten, daß noch weitere Proteine bzw. Proteinfamilien diesem Regulationsprinzip unterliegen.

Im Rahmen dieser Arbeit wird das „RXR“-Konsensus-Motiv im C-Terminus von gpr3, 6 und 12 identifiziert und die Bedeutung des Motivs für die intrazelluläre Lokalisation in HEK293-Zellen (4.2., S.82) per konfokaler Fluoresznmikroskopie untersucht. Dabei wird ein gpr6-GFP-Fusionsprotein verwendet, in dem das „RSR“-Motiv gegen drei Alanine ausgetauscht worden ist (gpr6(RSR->-AAA)-GFP) (4.4., S.84). Die Fähigkeit zur Stimulation der Adenylat-Zyklase wird von der Mutation nicht beeinflusst (Abb.36B, S.85).

Da die Substitution von „RSR“ zu „AAA“ keinen Einfluß auf die Lokalisation des gpr6-GFP-Fusionsproteins hat (Abb.36C+D, S.85), können folgende Schlußfolgerungen gezogen werden:

- 1.) Das „RSR“-Motiv in gpr6 ist kein funktionelles ER-Retentions-Motiv wie in GABA_{B1}-Rezeptoren oder K_{ATP}-Kanälen.
- 2.) Es fehlen weitere, bislang unbekannte Interaktionspartner in HEK293-Zellen.
- 3.) Die Lokalisation von gpr6-GFP in intrazellulären ER-Membranen ist nicht auf eine funktionelle Retention, sondern lediglich auf eine basale Internalisierung als Resultat der konstitutiven Aktivität zurückzuführen.

Die Rezeptor-Oligomerisierung über *coiled-coil* α -Helix-Interaktionen am C-Terminus von retinierten GPCRs (und K_{ATP}-Kanäle) fungiert als Befreiungs-Mechanismus und ermöglicht beispielsweise die Expression funktioneller GABA_{B1/B2}-Rezeptoren auf der Plasmamembran (Margeta-Mitrovic *et al.*, 2000, Pagano *et al.*, 2001).

Um eine mögliche Heterodimerisierung innerhalb der gpr3, 6 und 12-Rezeptorfamilie zu untersuchen, die - ähnlich wie bei GABA_B-Rezeptoren - den Transport zur Zelloberfläche reguliert, wird gpr6-GFP mit gpr3 und gpr12 kotransfiziert und die Lokalisation per konfokaler Fluoreszenzmikroskopie beurteilt (4.5., S.86). Nach dem Versuchsergebnis hat die Heterodimerisierung von gpr6-GFP mit den Familienmitgliedern gpr3 bzw. gpr12 keinen Einfluß auf den Transport zur Zelloberfläche.

GFP-Fusionsproteine werden häufig zur Analyse der Rezeptor-Lokalisation bzw. zu GPCR-Internalisierungsstudien verwendet (Kallal & Benovic, 2000, Milligan, 2000, Fergusson, 1998, Conway *et al.*, 1999). Allerdings muß bedacht werden, daß die Addition des 27kDa großen GFP-Proteins an den intrazellulären C-Terminus das Expressionsniveau sowie die Signaltransduktion bzw. die Interaktion des Rezeptors mit intrazellulären Proteinen beeinflussen oder schlimmstenfalls unterbrechen kann (McLean *et al.*, 1999, McLean & Milligan, 2000). Aus diesem Grund kann nicht ausgeschlossen werden, daß die Addition des GFP an den intrazellulären C-Terminus von gpr6 dessen Funktionalität, z.B. den Plasmamembran-Transport oder die Heterodimerisierungen mit gpr3 oder gpr12, negativ beeinflußt hat.

Da die transiente Transfektion von gpr3, 6 und 12 in HEK293-Zellen zu einer dramatischen Adenylat-Zyklase-Stimulation von ca. 400% über basal nach 24h, aber <300% nach 48h, führt, wird die Lokalisation von gpr6-GFP nach entsprechenden Zeiten analysiert (4.3., S.83). Die Kombination der Ergebnisse beider Analysen belegt, daß abnehmende cAMP-Bildung (entsprechend reduzierter konstitutiver Aktivität) mit der Expression des gpr6-GFP auf der Plasmamembran korreliert, d.h. abnehmende Präsenz des gpr6-GFP nach längeren Expressionszeiten (48h) entspricht einer weniger stark ausgeprägten konstitutiven Aktivität.

Diese funktionellen Daten zeigen eindeutig, daß die intrazelluläre Lokalisation der Rezeptoren in HEK293-Zellen nicht auf eine Fehlfaltung zurückzuführen ist. Da auch gpr6-GFP eine Agonist-unabhängige Aktivierung der Adenylat-Zyklase bewirkt, ebenso wie der Wild-Typ gpr6 (allerdings mit etwas reduzierter Effizienz), muß das Fusionskonstrukt folglich funktionell sein (4.1., S.81).

Die immunologische Färbung endogen exprimierter Rezeptoren gpr3, 6 und 12 in HEK293-Zellen (Abb.33, S.82), die unter Standard-Bedingungen (10% FCS) kultiviert worden sind, zeigt ebenfalls eine überwiegende Anhäufung der Rezeptoren in kleinen membranahen, möglicherweise endozytotischen Vesikeln, ähnlich dem gpr6-GFP-Konstrukt, und läßt die Schlußfolgerung zu, daß diese Verteilung die natürlichen Bedingungen dieser Rezeptoren in HEK293-Zellen widerspiegelt.

Fakt ist, daß die Präsenz des gpr6-GFP auf der Zelloberfläche nur sehr schwach ausgeprägt ist und nur unter speziellen Kultivierungs-Bedingungen in einem relativ geringen Teil der transfizierten Zellen detektiert werden kann (ca. 20%). Lipidfreies (10% FCSCS) und serumfreies Medium erhöht tendenziell die Präsenz von gpr6-GFP in der Plasmamembran und deutet auf einen Aktivator im Serum hin (Abb.34, S.83). Es ist darüber hinaus möglich, daß starke intrazelluläre GFP-Fluoreszenz schwächere Signale in der Plasmamembran überstrahlt und so die Detektion erschwert. Das stimmt mit der Beobachtung überein, daß Plasmamembran-Lokalisation vermehrt während schwacher gpr6-GFP-Expression festgestellt werden kann (4.3., S.83).

Da zur Detektion von gpr6-GFP-Signalen in der Plasmamembran meist deutlich höhere Belichtungszeiten von bis zu 300-700ms erforderlich sind, ist davon auszugehen, daß am Rande der optischen Nachweisgrenze gearbeitet wird.

Die Präsenz des gpr6-GFP auf der Zelloberfläche von HEK293-Zellen ist im Rahmen dieser Arbeit unter dem Mikroskop geschätzt worden. Zur exakten Quantifizierung der Oberflächenexpression könnte beispielsweise ein ELISA eingesetzt werden.

Fakt ist aber auch, daß die schwach ausgeprägte gpr6-GFP-Rezeptordichte auf der Zelloberfläche ausreicht, um $G\alpha_i$ - und $G\alpha_s$ -Signaltransduktionskaskaden zu aktivieren, und zwar sowohl konstitutiv als auch nach S1P-Stimulation. Das führt zu der Hypothese, daß diese Rezeptoren korrekt zur Plasmamembran transportiert werden, jedoch als Ergebnis der konstitutiven Aktivität internalisieren, sobald sie die Zelloberfläche erreichen. Die funktionelle Translokation membranständiger gpr6-GFP-Rezeptoren ins Zellinnere unter serumfreien Bedingungen kann durch die Gabe von S1P weiter gesteigert werden (2.7., S.74).

Die Abb. 64, S.128 stellt die konstitutive Internalisierung sowie intrazelluläre Transportvorgänge schematisch dar.

Aus der Literatur ist allgemein bekannt, daß konstitutiv aktive Rezeptoren (CARs) (Stevens *et al.*, 2000, Shapiro *et al.*, 1996, Tarasova *et al.*, 1997, McCune *et al.*, 2000) und konstitutiv aktive GPCR-Mutanten (CAMs) (Miserey-Lenkei *et al.*, 2002, Ferrari & Bisello, 2001) als direkte Folge der Agonist-Unabhängigkeit internalisieren können.

Antagonisten oder inverse Agonisten (Strange, 2002, Milligan *et al.*, 1995) sind geeignete Werkzeuge, um die konstitutive Internalisierung eines GPCRs abzuschalten. So blockieren inverse Agonisten beispielsweise die konstitutive Internalisierung und Runterregulation eines konstitutiv aktiven Ratten μ -Opioid-Rezeptors (Li *et al.*, 2001) und des $\alpha 1B$ -Adrenozeptors (Stevens *et al.*, 2000). Prazosin-Behandlung kann die Plasmamembran-Lokalisation eines konstitutiv internalisierten $\alpha 1D$ -Rezeptors wiederherstellen (McCune *et al.*, 2000). Miserey-Lenkei *et al.*, 2002 zeigen, daß CAMs des Angiotensin-II AT_{1A} -Rezeptors in intrazellulären Vesikeln lokalisiert sind, während der Wild-Typ-Rezeptor in der Plasmamembran exprimiert wird. Die Inkubation AT_{1A} CAM-exprimierender Zellen mit dem inversen Agonisten Losartan führt zur Translokation der Mutante zur Zelloberfläche. Dieser Prozeß entspricht hinsichtlich der Pharmakologie und Kinetik dem Recycling des Wild-Typ AT_{1A} nach AT-II-induzierter Internalisierung und ist komplett reversibel nach Auswaschen von Losartan.

Inverse Agonisten für die Rezeptoren gpr3, 6 und 12 sind derzeit nicht verfügbar. Arena Pharmaceuticals beansprucht in seinem Patent WO 01/62765 über 100 Substanzen mit potentiell invers-agonistischen Eigenschaften am Rezeptor gpr6. Zwei dieser Substanzen (A002649861/ARE-111 und A002649862/ARE-112) wurden Aventis-intern synthetisiert, führen jedoch zu keiner Reduktion der konstitutiv erhöhten cAMP-Spiegel in transient gpr6-transfizierten HEK293-Zellen (4.6., S.86). Es wird vermutet, daß unwirksame „Blindsubstanzen“ ausgewählt worden sind und nicht der tatsächlichen Wirkstoff.

Der Beweis für die basale Internalisierungs-Hypothese des gpr6 muß daher noch geführt werden.

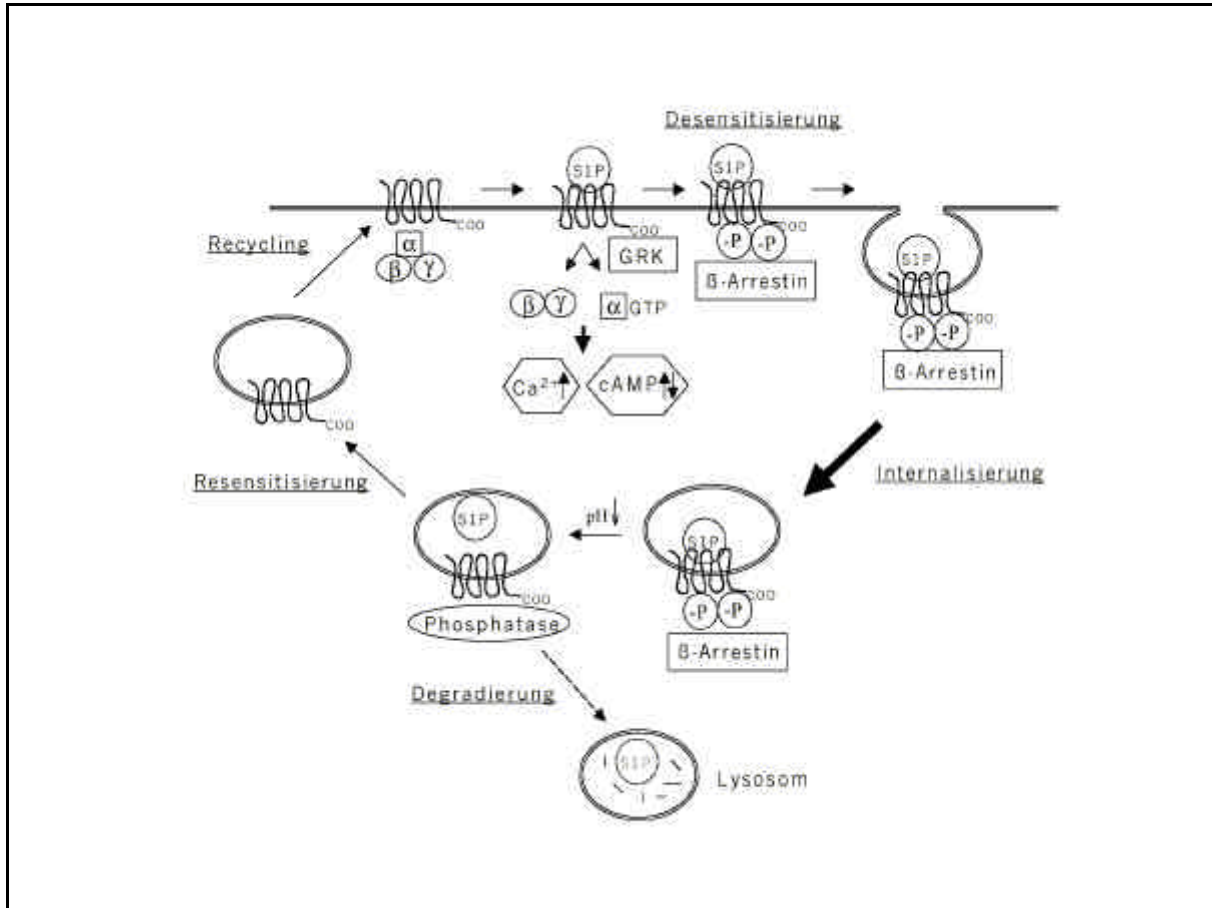


Abb.64 **Internalisierung und intrazelluläre Transportvorgänge.** Die konstitutive Aktivität von *gpr3*, *6* und *12* führt zu basalen Internalisierungen bzw. zu einer Verschiebung des Gleichgewichtes in Richtung der endosomalen Fraktion (siehe dicker Pfeil). Endosomen werden entweder der intrazellulären Degradierung in Lysosomen zugeführt oder zur Plasmamembran zurücktransportiert (Recycling), wo sie die konstitutive Aktivierung von Adenylat-Zyklase und PLC vermitteln (GRK: GPCR-Rezeptor-Kinase, -P: Phosphorylierung), modifiziert nach Saunders & Limbird, 1999.

2.4. Ursachen der konstitutiven Aktivität von gpr3, 6 und 12

Unter physiologischen Bedingungen beträgt der humane Plasma- und Serumspiegel für das Lipid S1P 0,2 bzw. 0,5 μ M (Pyne & Pyne, 2000b). Dennoch ist es unwahrscheinlich, in der Diskrepanz zwischen nanomolaren EC₅₀-Werten (2.4., S.68) und um den Faktor 5-10 höheren S1P-Serumspiegeln die Ursache für die konstitutive Aktivierung von gpr3, 6 und 12 zu suchen. Vergleichsweise ist für den Rezeptor edg1 ein EC₅₀-Wert von 8nM bestimmt worden (Lee *et al.*, 1998), der um ein Vielfaches unterhalb des Wertes für gpr3, 6 und 12 liegt. Dennoch wird für edg1 keine konstitutive Aktivierung beobachtet.

Murata *et al.*, 2000 konnten zeigen, daß Lipide im Serum und Blutplasma an Blutplasmaproteinen (z.B. Serumalbumin) gebunden sind bzw. als *low-density* (LDL)- und *high-density* (HDL)-Lipoproteine vorliegen, d.h. die effektive, freie Konzentration der Lipide im Serum ist deutlich geringer.

S1P-Sekretion aus Blutplättchen (Yatomi *et al.*, 1995), Erythrozyten, Neutrophilen und Monozyten (Yang *et al.*, 1999) oder Mast-Zellen (Prieschl *et al.*, 1999) vermittelt ihre physiologische Wirkung auf die Gefäßwand durch lokale S1P-Konzentrationserhöhung (siehe Review Pyne & Pyne, 2000b).

gpr3, 6 und 12 sind eine Familie von konstitutiv aktiven Rezeptoren, deren konstitutive Aktivität und intrazelluläre Verteilung durch das bioaktive Lipid S1P moduliert werden kann.

Der konsequente Lipidentzug reduziert zwar das Ausmaß der konstitutiven Aktivität gpr3-, 6- und 12-transfizierter HEK293-Zellen, kann sie jedoch nur partiell aufheben (2.1., S.64). Gleichzeitig führt Serumentzug im Medium nur zur tendenziellen Zunahme der gpr6-GFP-Plasmamembranlokalisation (4.2., S.82). Die Ergebnisse liefern Hinweise darauf, daß die ubiquitäre Präsenz des Lipides S1P nicht ausschließlich für die permanente Anschaltung dieser Rezeptoren verantwortlich sein kann.

Die Ursachen für die ständige Aktivierung der gpr3, 6 und 12-Rezeptorfamilie sind folglich mehr in einer dominanten Interaktion mit G-Proteinen oder regulatorischen Proteinen zu suchen als in der ständigen Präsenz des Liganden im Zellkulturmedium bzw. Serum.

Mit mathematischen Modellen wird versucht, den Prozeß der GPCR-Aktivierung als ein komplexes Gleichgewichts-System zwischen 1.) Agonist und Rezeptor, 2.) Rezeptor und G-Protein und 3.) Agonist/Rezeptor und G-Protein mit entsprechenden Dissoziationskonstanten zu beschreiben.

In diesem allosterischen Gleichgewichts-Modell (Abb.65, S.130) wird die konstitutive Aktivität eines Rezeptors als Verschiebung des chemischen Gleichgewichts in Richtung der aktiven Konformation (R*G) verstanden (Kenakin, 1995).

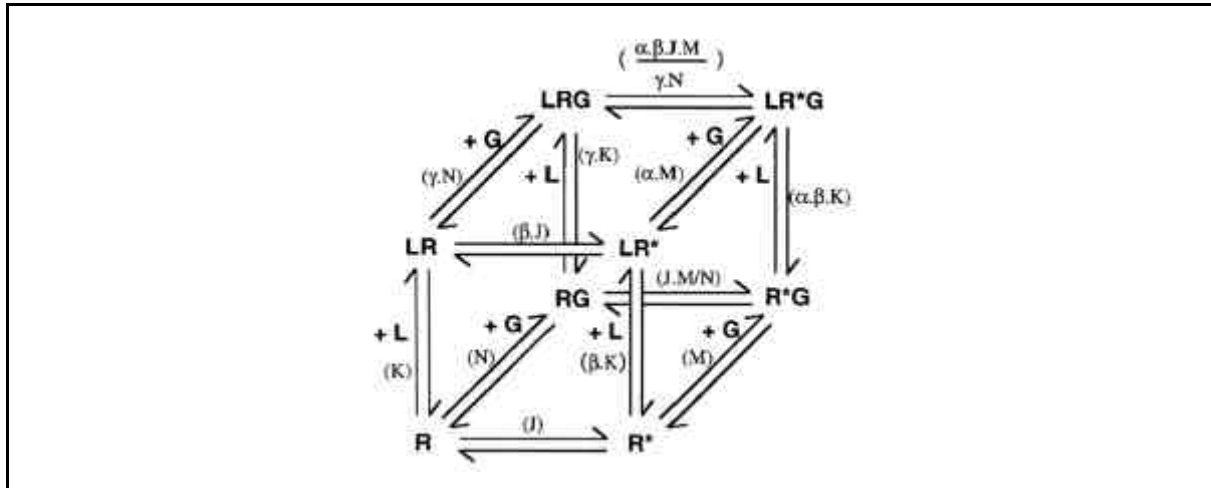


Abb.65 **Das allosterische Gleichgewichtsmodell der GPCR-Aktivierung.** Beschreibung im Text (L: Ligand, R: inaktive Rezeptorkonformation, R*: aktive Rezeptorkonformation, G: G-Protein) übernommen aus Groblewski *et al.*, 1997.

Konstitutive Aktivität von GPCRs wird meist durch Mutationen in konservierten Domänen verursacht, die für die spezifische Interaktion mit G-Proteinen verantwortlich sind (Leurs *et al.*, 1998, Scheer & Cotecchia, 1997). So induzieren Mutationen im hochkonservierten „DRY“ (Asp-Arg-Tyr)-Motiv im Bereich von TM-III und C2 von GPCRs der Familie 1 konstitutive Signaltransduktion, z.B. des Histamin H₂-Rezeptors (Alewijns *et al.*, 2000).

Die Bindung eines Liganden an die extrazelluläre Domäne eines GPCRs induziert Konformationsänderungen im gesamten Rezeptormolekül und bewirkt so eine Verschiebung von TM-VI ins Zytoplasma, wo die Interaktion mit G-Proteinen erfolgen kann (Gether *et al.*, 1997). Entsprechend werden die Bereiche zwischen TM-VI und dem Ende der C3-Schleife mit konstitutiver Aktivität in Verbindung gebracht (Huang *et al.*, 2001). Liu *et al.*, 1996 zeigen beispielsweise, daß die Insertion von 1-4 Alaninen N-terminal an ein „VTIL“ (Val-Thr-Ile-Leu)-Motiv am Übergang von TM-VI und C3 des muskarinischen M₂-Azetylcholinrezeptors zu konstitutiver Aktivität führt. Das „VTIL“-Motiv ragt durch die Verlängerung von TM-VI permanent ins Zytosol und dies verstärkt die Wechselwirkung mit G α -Proteinen. Umgekehrt zeigen Wonerow *et al.*, 1998, daß auch eine Verkürzung der C3-Schleife im TSH-Rezeptor zu einer Agonist-unabhängigen Aktivierung von G-Proteinen führt.

gpr3, 6 und 12 sind jedoch native Rezeptoren ohne offensichtliche Mutationen, die mit konstitutiver Aktivität in Verbindung gebracht werden. Darüber hinaus besteht die konstitutive Aktivierung unabhängig vom Rezeptor-Subtyp, der Spezies (Ratten- und Maus-Homologe des gpr3 (Eggerickx *et al.*, 1995)) oder dem Zelltyp (HEK293, CHO, HeLa etc.) und kann als Charakteristikum der gesamten Rezeptorfamilie angesehen werden.

Der Thrombin- (Shapiro *et al.*, 1996), der Calcitonin- (Cohen *et al.*, 1997), der Cholezystokinin (Typ A)- (Tarasova *et al.*, 1997) und der α 1D adrenerge Rezeptor (McCune *et al.*, 2000) sind Beispiele für konstitutiv aktive Wild-Typ GPCRs nach transients Transfektion.

Zelltypspezifische, regulatorische Proteine steuern GPCR-Funktionen in differenzierten Primärzellen und garantieren so die Physiologie dieser Zelle im Organismus. Entsprechende regulatorische Proteine fehlen meist in immortalisierten Zelllinien (HEK293, CHO, HeLa etc.) und es kommt infolgedessen zu Tumor-ähnlichen Proliferationseigenschaften. Folglich kann das Verhalten eines Rezeptors in einer immortalisierten Zelllinie nicht grundsätzlich indikativ für die *in vivo*-Situation angesehen werden.

In diesem Zusammenhang kann das Beispiel der metabotropen Glutamat-Rezeptoren mGluR1a und mGluR5 angeführt werden, welche in analoger Weise in HEK293-Zellen konstitutive Aktivität zeigen. Eine Arbeit von Ango *et al.*, 2001 zeigt eindeutig, daß diese Agonist-Unabhängigkeit nur in HEK293-Zellen vorliegt und nicht in primären Cerebellar Granule-Zellen bei endogen exprimierten mGluR1a- oder transient transfizierten mGluR5-Rezeptoren auftritt.

Beide mGlu-Rezeptoren interagieren intrazellulär mit Homer-Proteinen und werden so beispielsweise an Inositoltriphosphat (IP₃)-Rezeptoren (Xiao *et al.*, 1998, Tu *et al.*, 1998) und *shank* Proteine (Tu *et al.*, 1999) gekoppelt. Ango *et al.*, 2001 zeigen weiter, daß die intrazelluläre Wechselwirkung von Homer 3 (H3) mit mGluR1a dessen konstitutive Aktivität in primären Cerebellar Granule-Zellen unterbindet, und daß die Hemmung der H3-Expression durch Behandlung primärer Neuronen mit H3-Antisense-Oligonukleotiden in konstitutiver Signaltransduktion von mGluR1a resultiert. Gleichzeitig führt die Zerstörung eines spezifischen „Homer-Ligand“-Motivs (Tu *et al.*, 1998) in mGluR5a durch Mutagenese (mGlu5a F1128R) zu konstitutiver Aktivität und bestätigt zweifelsfrei die Regulation von mGluR1a/5 durch H3 in primären Neuronen.

Da mGluR1a/H3-Kotransfektion in HEK293-Zellen die Agonist-unabhängige Signaltransduktion unverändert bestehen läßt, postulieren Ango und Mitarbeiter, daß zusätzlich zu H3 weitere regulatorische Proteine bzw. Interaktionspartner erforderlich sind.

In dieser Arbeit wird die zelluläre Verteilung der endogenen Rezeptoren gpr3, 6 und 12 in HEK293-Zellen und in primären Endothelzellen (HUVEC) per Zytoimmunfluoreszenz untersucht. Die intrazelluläre Lokalisation in HEK293-Zellen (Abb.33, S.82) wird dabei einer Plasmamembran-Lokalisation in HUVECs (6.2., S.103), jeweils nach Kultivierung unter Standard-Bedingungen, gegenübergestellt. Gleichzeitig können gpr3, 6 und 12 immunologisch in fraktionierten Plasmamembranprotein-Präparationen von humanem Herz und humaner Niere nachgewiesen werden (6.1., S.103).

Der deutliche Unterschied zwischen der Lokalisation endogener Rezeptoren in HEK293- und Primärzellen liefert Hinweise darauf, daß ein putativer und bislang unbekannter Interaktionspartner der gpr3-, 6- und 12-Signaltransduktion - in Analogie zu mGlu1a und mGlu5 - in HEK293-Zellen möglicherweise nicht exprimiert wird. Eine bestehende konstitutive Signaltransduktion von gpr3, 6 und 12 in Primärzellen kann aufgrund des Fehlens inverser Agonisten im Rahmen dieser Arbeit nicht untersucht werden. Sie kann folglich nicht ausgeschlossen werden; es ist jedoch wahrscheinlicher, daß Interaktionspartner von gpr3, 6 und 12 existieren, die die Rezeptor-Funktion *in vivo* regulieren. Die Identifizierung dieser regulatorischen Proteine verbleibt als große Herausforderung bei der funktionellen Charakterisierung dieser kleinen Rezeptorfamilie.

Nichtsdestotrotz existieren Beispiele für konstitutiv aktive GPCRs in Primärzellen. Eine Arbeit von Morisset *et al.*, 2000 zeigt, daß konstitutiv aktive, native Histamin H₃-Rezeptoren im Ratten- und Maus-Hirn existieren und die Funktion histaminerger Neuronen regulieren.

Das Auftreten konstitutiver Aktivität *in vivo* wird jedoch meist mit Tumorgenese in Verbindung gebracht. Hellmich *et al.*, 2000 beschreiben einen Zusammenhang zwischen colorektalem Krebs und einer konstitutiv aktiven Spleißvariante des Cholecystokin B/Gastrin-Rezeptors (CCK-BR), der die Zellproliferation in einem Gastrin-unabhängigen Mechanismus triggert. Ein weiteres Beispiel stellt die onkogene Transformation durch das Kaposi's Sarcoma-assoziierte Herpesvirus (KSHV) dar. Dieses Virus kodiert für einen konstitutiv aktiven GPCR (KSHV-GPCR), der die Proliferation in NIH3T3-Zellen induziert, jedoch durch invers-agonistische Eigenschaften des humanen C-X-C Chemokins HuIP-10 gehemmt wird (Geras-Raaka *et al.*, 1998).

3. Physiologische Bedeutung von gpr3, 6 und 12

Neben der Verwandtschaft eines *orphan* GPCRs zu anderen Rezeptoren (1.1., S.60) ermöglicht eine charakteristische Gewebeverteilung des Rezeptors und/oder seines Liganden Vorhersagen über seine physiologische Funktion.

So ist beispielsweise die Identifizierung des *orphan* Rezeptors SKR6 als Cannabinoid-Rezeptor cb1 aufgrund von überlappender Präsenz der Rezeptor-mRNA und spezifischer Cannabinoid-Bindungsstellen in einem hirnspezifischen Zelltyp gelungen (Matsuda *et al.*, 1990). Auch das Expressionsprofil des *orphan* Calcitonin-Rezeptors stimmte mit dem Expressionsprofil des CGRP (*calcitonin gene-related peptide*)-Peptids überein und ermöglichte so die erfolgreiche Zuordnung von Ligand und Rezeptor (Njuki *et al.*, 1993). Die Identifizierung der Urotensin-II (UII)-mRNA im kardiovaskulären System führte zur Entdeckung von UII als bislang stärkster, bekannter Vasokonstriktor (Ames *et al.*, 1999).

Unterschiede in der Gewebeverteilung von Rezeptor-Subtypen eröffnen darüber hinaus die Möglichkeit zur Entwicklung von Wirkstoffen mit limitierten, spezifischen Wirkorten und folglich weniger Nebenwirkungen. Der Histamin H₄-Rezeptor ist z.B. ausschließlich in der Peripherie exprimiert, während Histamin H₃-Rezeptoren nur im ZNS vorkommen (Lovenberg *et al.*, 1999, Oda *et al.*, 2000).

3.1. Expression von gpr3, 6 und 12 im kardiovaskulären System

Veröffentlichungen zum humanen gpr3- und gpr6-Expressionsprofil beschränken sich größtenteils auf die Detektion von mRNA-Transkripten in verschiedenen Hirn-Arealen (Iismaa *et al.*, 1994, Heiber *et al.*, 1995, Eggerickx *et al.*, 1995). Literaturdaten zur Gewebeverteilung des humanen Rezeptors gpr12 sind nicht vorhanden. Darüber hinaus liegen teilweise Northern Blot- oder RT-PCR-Analysen der Ratten- und Maus-Homologen vor, welche in Analogie zu den humanen Rezeptoren größtenteils die Präsenz der Rezeptoren im ZNS untersuchen bzw. nachweisen (Marchese *et al.*, 1994b, Song *et al.*, 1994).

Die Expression dieser *orphans* in der Peripherie hat nicht im Vordergrund bisheriger Untersuchungen gestanden, da aufgrund der dominanten ZNS-Expression ein Ligand mit Neurotransmitterfunktion vermutet wurde. Diese Hypothese wird durch neuere Arbeiten von Chenn *et al.*, 2001 bestätigt, wonach Ratten-gpr6 (rCNL3) in einem PCR-*differential-display*-Ansatz während der cerebralen Cortextentwicklung im Ratten-Hirn als temporär hochreguliertes Gen entdeckt wurde.

Die Rezeptoren gpr3, 6 und 12 stellen die nächsten Verwandten der S1P- und LPA-Rezeptorfamilie der *edgs* dar (Abb.13A, S.61), und die Ergebnisse dieser Arbeit weisen darauf hin, daß sie das Lipid S1P als funktionellen Modulator mit den *edg*-Rezeptoren teilen (2., S.64). Die humanen S1P-Rezeptoren *edg*1, 3, 5, 6 und 8 (Fukushima *et al.*, 2001, Hla, 2001, Pyne & Pyne, 2001a, Hla *et al.*, 2001) sind im ZNS und in peripheren Organen exprimiert, und S1P-Wirkungen an diesen Rezeptoren regulieren viele biologische sowie kardiovaskuläre Prozesse, wie z.B. Plättchenaggregation (Yatomi *et al.*, 1995+1997), Protektion des Endothels vor Apoptose (Hisano *et al.*, 1999, Kwon *et al.*, 2001), Angiogenese (Lee *et al.*, 1999a, Wang *et al.*, 1999), negative Chronotropie (Himmel *et al.*, 2000) und kardiale Entwicklung (Kuppermann *et al.*, 2000) (siehe Reviews Pyne & Pyne, 2001b, Yatomi *et al.*, 2001, Augé *et al.*, 1999, Goetzl *et al.*, 2002, Huwiler *et al.*, 2000).

Die systematische Erstellung von gpr3-, 6- und 12-Expressionsprofilen in peripheren Organen bzw. isolierten Zellsystemen mittels Nachweismethoden auf mRNA- (RT-PCR, Echtzeit-Taqman-PCR, Northern Blot) und Protein-Ebene (Western Blot, Zytoimmunfluoreszenz) im Rahmen dieser Arbeit weist eindeutig auf zusätzliche, periphere Funktionen dieser Rezeptorfamilie hin (5., S.88). Darüber hinaus werden erstmals gpr3-, 6- und 12-Proteine mit in die Expressionsanalysen einbezogen.

Der Nachweis von gpr3-, 6- und 12-mRNA-Transkripten und Proteinen u.a. im humanen Herzen, in der Niere (Tabelle 43, S.98), in isolierten Endothel- und Gefäßmuskelzellen (gpr6 deutlich schwächer) (5.4.1., S.99) und Blutplättchen (gpr3 + gpr12) (5.4.2., S.101) untermauert eine periphere, kardiovaskuläre Relevanz dieser Rezeptorfamilie, die bereits aufgrund des Liganden S1P zu vermuten ist.

Die Studien der Gewebeverteilung werden ergänzt durch Informationen aus der LifeSpan Bioscience-Datenbank (www.isbio.com), die ein immunhistologisches Profil des humanen Rezeptors gpr12 im gesunden und kranken Gewebe zur Verfügung stellt, und die Befunde aus mRNA- und Protein-basierten Analysen bestätigt. Neben der Expression im ZNS werden die stärksten gpr12-Signale in Makrophagen, dendritischen Zellen, Endothelzellen der Herzklappen und Neutrophilen erhalten. Darüber hinaus zeigt sich eine Präsenz im Skelettmuskel, in Mastzellen, Lymphozyten, im Lymphknoten, den Tonsillen und dem Thymus. Es wird keine spezifische Immunfärbung in renalen Glomeruli oder Kardiomyozyten erhalten (keine Abb.).

Die Expression von gpr3, 6 und 12 in Organen bzw. isolierten Zellen des Immunsystems, wie Milz (gpr3, 6 und 12), Thymus (gpr12) und Leukozyten (gpr3 + gpr6) (Tabelle 43, S.98) kann teilweise durch eigene Daten bestätigt werden, immunhistologische Untersuchungen isolierter Entzündungszellen sind jedoch bislang nur für gpr12 verfügbar (LifeSpan Bioscience).

Die weit gestreute Gewebe- und Organverteilung von gpr3, 6 und 12 kann möglicherweise durch die Präsenz in ubiquitären Zelltypen des Gefäß- und Immunsystems erklärt werden, die zu relativ geringen Anteilen in allen Organen vorkommen. In Abhängigkeit von der verwendeten Methode kann der Nachweis dadurch verhindert sein, daß die Nachweisgrenze unterschritten wird. Gleichzeitig weist diese Gewebeverteilung auf Funktionen in kardiovaskulären Prozessen und in entzündlichen Reaktionen oder der Immunantwort hin.

Nach immunhistologischen Untersuchungen von LifeSpan Bioscience in humanen Herzwebeschnitten findet keine Expression des humanen Rezeptors gpr12 in gesunden, humanen Kardiomyozyten statt (keine Abb.). Diese Beobachtung stimmt mit den Ergebnissen aus RT-PCR-Analysen des gpr12-Homologen in Kardiomyozyten der Ratte überein (5.4.3., S.101). Tatsächlich kann der humane Rezeptor gpr12 aber per RT-PCR, Northern Blot, Taqman-PCR (Dr. Ardati, Aventis Pharma USA, 2000) und im Western Blot im Gesamt-Herzen nachgewiesen werden (Abb.47, S.96; Abb.48B, S.97; Tabelle 43, S.98). Da das Herz zum überwiegenden Teil aus Kardiomyozyten besteht, muß der positive Nachweis des gpr12 in diesem Organ auf die Präsenz im Gefäßsystem oder verbleibenden Blut- und Entzündungszellen zurückzuführen sein. Der Vergleich mit dem gpr12 Ratten-Homologen, das auch per RT-PCR im Gesamt-Herzen detektierbar ist (5.4.3., S.101), deutet darauf hin, daß sich die Gewebeverteilung im Herzen in beiden Spezies nicht unterscheidet.

rgpr3 kann, ähnlich wie rgpr12, nicht per RT-PCR in Ratten-Kardiomyozyten detektiert werden (5.4.3., S.101). Da der Nachweis des rgpr3 in Gesamt-Herz-cDNA der Ratte gelingt, und auch der humane gpr3 im Herzen mit verschiedenen Methoden nachgewiesen werden kann (Tabelle 43, S.98), ist es wahrscheinlich, daß der Nachweis des gpr3 in diesem Organ ebenfalls auf die Expression im Gefäßsystem zurückzuführen ist. Die Präsenz des gpr3 im humanen Gefäßsystem ist im Rahmen dieser Arbeit eindeutig belegt worden (5.4.1, S.99). Untersuchungen der gpr3-Expression in Kardiomyozyten ist bislang auf die Ratte beschränkt.

Im Gegensatz zu gpr3 und gpr12 ist die Präsenz des Rezeptors gpr6 im humanen Gefäßsystem deutlich reduziert bzw. nicht nachweisbar. Die Expression in HUVEC ist per Taqman-PCR nur schwach (ISIS Pharmaceuticals, USA) (keine Abb.) bzw. gar nicht (Dr. Ardati, Aventis Pharma USA, 2001) detektiert und führt auch per RT-PCR in verschiedenen RNA-Präparationen zu nur schwach ausgeprägten Signalen (Abb.50B, S.100). DNA-Sequenzanalysen belegen dennoch die spezifische Amplifikation des gpr6 aus cDNA dieser Zelltypen. Obwohl gpr6 per Zytoimmunfluoreszenzmikroskopie (6.2., S.103) eindeutig in HUVECs nachgewiesen werden kann, liefert die Western Blot-Analyse keine reproduzierbaren Signale in Endothelzellen (vgl. Abb.40, S.89; Abb.50A, S.100). Der Nachweis des gpr6 in glatten Gefäßmuskelzellen gelingt ebenfalls per RT-PCR (Abb.50C, S.100), nicht jedoch per Western Blot-Analyse (MusclePanel, keine Abb.). Da die Spezifität des gpr6-Antikörpers eindeutig durch die Absättigung mit dem Peptid P9611 in HEK293-Zellen (Abb.42B, S.91) belegt werden kann, zeigen diese Ergebnisse, daß die Affinitätschromatographie zwar zur Konzentrierung und Reinigung polyklonaler Peptidantikörper geeignet ist, allerdings auch zum Verlust der „besten“ Antikörper führen kann. Diese binden so hochaffin an das Anti-Peptid, daß sie durch die Elution nicht wieder abgespült werden können; darüberhinaus können sich Antikörper in ihrer Potenz für verschiedene Nachweismethoden unterscheiden (Dr. Kostenis, mündliche Angabe). Um auszuschließen, daß hochaffine gpr6-Antikörper während der affinitätschromatographischen Reinigung verloren gegangen sind, wird die Western Blot-Analyse in primären Endothelzellen mit dem bleed #3 der Immunisierung wiederholt; aufgrund der Vielzahl der Signale kann jedoch keine eindeutige Aussage getroffen werden (Abb.50A, S.100).

Der Rezeptor gpr6 ist deutlich auf mRNA- und Proteinebene im humanen Herzen nachweisbar (Abb.46, S.95; Tabelle 43, S.98). Es ist jedoch unklar, ob dieser Nachweis, ähnlich wie bei den Rezeptoren gpr3 und gpr12, auf die Präsenz im Gefäßsystem zurückzuführen ist, oder ob gpr6 zusätzlich in der Kardiomyozyte exprimiert wird. Zum jetzigen Zeitpunkt gibt es hierzu keine Daten in der LifeSpan Bioscience-Datenbank. Das gpr6 Ratten-Homologe kann in dieser Arbeit weder in Ratten-Herz-cDNA noch in Ratten-Kardiomyozyten-cDNA nachgewiesen werden (5.4.3., S.101). Dieses Ergebnis könnte darauf hindeuten, daß für den humanen und den Ratten-gpr6 ein unterschiedliches Expressionsprofil vorliegt. Es existieren mehrere Beispiele dafür, daß Nager- und humane Homologe eines Gens nicht zwangsläufig vergleichbare, physiologische Aufgaben übernehmen. So ist beispielsweise *edg8* in der Ratte ausschließlich im ZNS exprimiert (Im *et al.*, 2000), beim Menschen dagegen auch in der Peripherie (Im *et al.*, 2001a).

edg2-, edg4-, edg6- und edg7-mRNA ist in humanen Blutplättchen detektiert worden, und sowohl LPA als auch S1P induzieren edg-vermittelt die intrazelluläre Ca^{2+} -Mobilisierung in Blutplättchen und die Plättchenaggregation (Motohashi *et al.*, 2000). Das bioaktive Lipid S1P wird des weiteren aus aktivierten Blutplättchen sezerniert (Igarashi & Yatomi, 1998, Yatomi *et al.*, 2001) und übernimmt lokale, auto- und parakrine Funktionen auf Blutplättchen, Endothelzellen und glatten Gefäßmuskelzellen über dort exprimierte edg-Rezeptoren (Abb.66, S.137). Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen die Präsenz von gpr3 und gpr12 in Proteinpräparationen humaner Blutplättchen (5.4.2., S.101) und liefern damit Hinweise auf eine mögliche Beteiligung dieser Rezeptoren an der Blutgerinnungskaskade.

Neben kardiovaskulären S1P-Effekten werden Lysophospholipide, und u.a. auch S1P, mit einer Vielzahl immunologischer Prozesse in Verbindung gebracht (Gräler & Goetzl, 2002). Hornuß *et al.*, 2001 beschreiben die Expression von edg1, edg2, edg4, edg7 und, schwächer ausgeprägt edg3, in humanen alveolären Makrophagen und beobachten die funktionelle O_2^- -Bildung nach Stimulation dieser Zellen mit LPA und S1P. S1P wird ebenfalls nach IgE-Stimulation aus Mastzellen sezerniert (Prieschl *et al.*, 1999) und Idzko *et al.*, 2002 belegen, daß S1P chemotaktisch auf dendritische Zellen und modulierend auf die Zytokin-Freisetzungen aus Lymphozyten wirkt. Des weiteren sind Lysophospholipid-Spiegel in entzündlichen Geweben erhöht (Mukami *et al.*, 1997). Die Ergebnisse der Arbeit von Mandala *et al.*, 2000 weisen darauf hin, daß S1P immunsuppressive Effekte hat: Die Substanz FTY720 wird beispielsweise durch die SPHK phosphoryliert, wirkt in dieser Form als S1P-Agonist und eignet sich zur Behandlung chronischer Autoimmunkrankheiten (Brinkmann *et al.*, 2002, Okazaki *et al.*, 2002). Da der Rezeptor gpr12 u.a. auch in dendritischen Zellen, neutrophilen Granulozyten, Makrophagen, Mastzellen und Leukozyten exprimiert wird (LifeSpan Bioscience), kann vermutet werden, daß gpr12 insgesamt immunmodulierende Wirkungen über S1P vermittelt. Auch gpr3 und gpr6 können in der Milz im Thymus und in Leukozyten (Tabelle 43, S.98) nachgewiesen werden, immunhistologische Untersuchungen weiterer isolierter Entzündungszellen sind jedoch bislang nicht verfügbar.

Ross, 1999 beschreibt die Entwicklung atherosklerotischer Plaques bis hin zur Ischämie als einen chronisch entzündlichen Prozeß: Eine Verletzung des Endothels fördert die Einwanderung von Immunzellen in die Gefäßwand und die Proliferation der glatten Gefäßmuskulatur (Ross & Glomset, 1973, Spyridopoulos & Andrés, 1998, Taub & Berk, 1998). Mehrere Arbeiten deuten darauf hin, daß S1P in diesen Prozeß involviert ist und die Proliferation der glatten Gefäßmuskelzellen über dort exprimierte edg-Rezeptoren reguliert (Kluk & Hla, 2001, Tamama *et al.*, 2001).

Den S1P-edg-Rezeptoren kommt somit eine zentrale Bedeutung in der Atherogenese zu, und hier greifen Herz-Kreislauf-Forschung und Immunologie eindeutig ineinander. Die Expression des gpr12 in zentralen Zelltypen der Immunantwort (Lifespan Bioscience) sowie im Endothel und in glatten Gefäßmuskelzellen (Abb.51, S.100) liefert Hinweise auf eine physiologische Funktion im humanen Gefäßsystem und möglicherweise eine Relevanz dieses Rezeptors in der Atherosklerose.

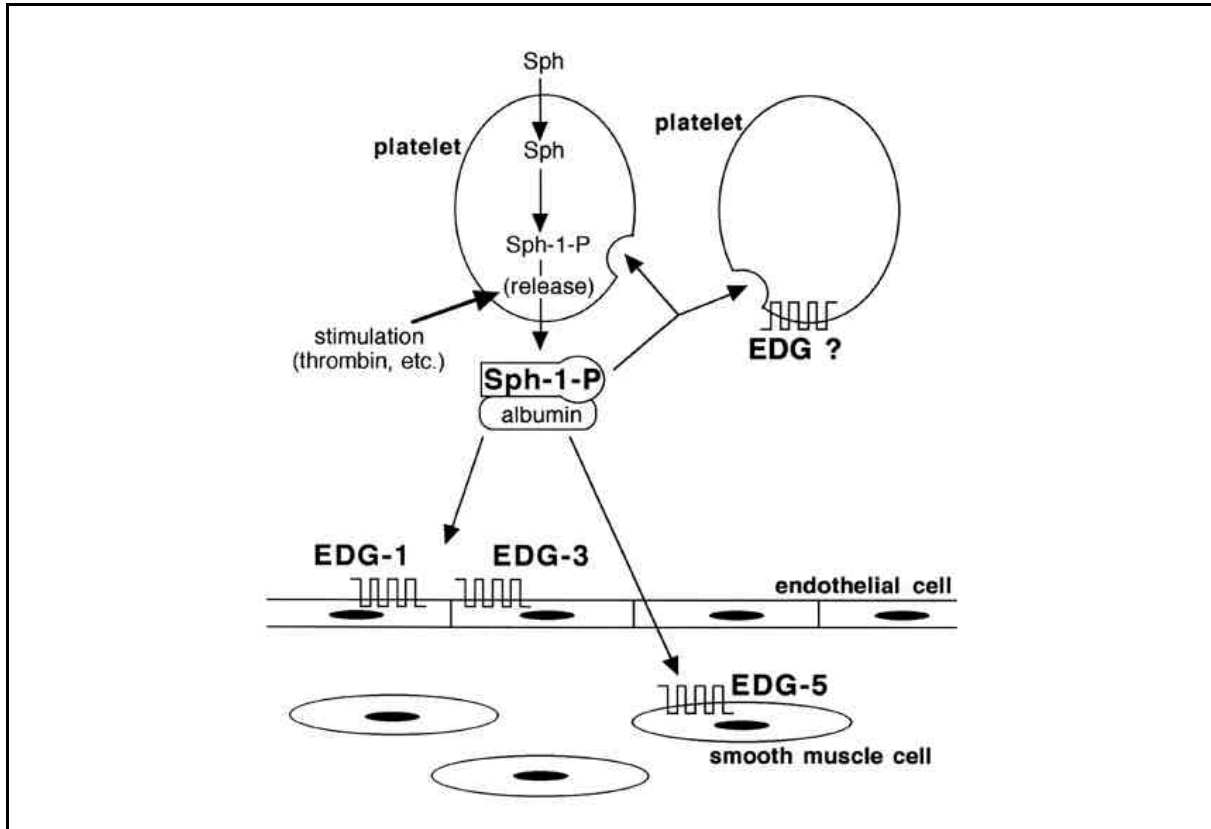


Abb.66 **Wirkmechanismus von S1P im Gefäßsystem.** Nach Sekretion aus Blutplättchen wirkt S1P über S1P-Rezeptoren (*edg1*, *edg3*) auf Endothelzellen, glatte Gefäßmuskulaturzellen (*edg5*) und auch autokrin auf Blutplättchen selbst (aus: Yatomi et al., 2001).

Die RNA-Chip-Hybridisierung (Labor Dr. Ivashchenko und Dr. Margerie, Aventis Pharma, DG Herz-Kreislauf, 2001, unveröffentlicht) im Rahmen der Expressionsanalysen im endothelialen Scherstress-Funktionsmodell (keine Abb.) führt zu dem falschen Ergebnis, daß *gpr3* und *gpr12* in HUVECs weder exprimiert noch reguliert sind, während die Western Blot-Analyse zu einer gegenteiligen Aussage führt (5.4.1, S.99; 6.3, S.104). Auch in einem RNA-Chip-Experiment, das regulierte Gene in TNF α -behandelten HUVECs untersucht (Dr. Ivashchenko, Aventis Pharma, DG Herz-Kreislauf, 2001, unveröffentlicht) liegen *gpr3*, 6 und 12 unterhalb der Nachweisgrenze (keine Abb.).

Der Vergleich zeigt, daß insbesondere bei niedrig exprimierten Genen, wie z.B. den meisten GPCRs (Dr. Kostenis, mündliche Auskunft) das Ergebnis in Abhängigkeit von der verwendeten Methode sehr unterschiedlich ausfallen kann. Probenqualität, Probenaufbereitung, Nachweisgrenze und nicht zuletzt die Spezifität und Sensitivität der verwendeten Sonden (DIG-RNA-Sonde, Peptidantikörper, *primer*-Paar etc.) bestimmt den Erfolg einer Nachweismethode.

Da das Protein letztendlich für die Vermittlung eines zellulären Effektes verantwortlich ist, ist der Nachweis gering exprimierter Gene auf der Proteinebene die Methode mit der höchsten Aussagekraft. Das erfordert allerdings die zeit- und arbeitsaufwendige sowie teure Entwicklung spezifischer Antikörper.

3.2. Hinweise auf *in vivo*-Krankheitsrelevanz

Die Ergebnisse des erstellten Expressionsprofils sind die Basis, den Rezeptoren gpr3, 6 und 12 eine physiologische bzw. pathophysiologische Funktion - insbesondere im Herz-Kreislauf-System - zuzuordnen. Dieser Prozeß der „Target Validierung“ nutzt verschiedene Techniken, z.B. Gen-Chip-Analysen, Antisense-Technologie, neutralisierende Antikörper, Knockout- oder transgene Mäuse, um einen Zusammenhang zwischen einem Gen (= *target*) und einem Krankheitsgeschehen (z.B. Ischämie, endotheliale Dysfunktion, Atherosklerose etc.) zu belegen.

Kriterien für eine Krankheitsrelevanz sind beispielsweise eine unterschiedliche Genexpression in gesundem und kranken Gewebe, funktionelle Regulation auf RNA- und Proteinebene in zellulären Funktions- oder Dysfunktionsmodellen (z.B. Scherstress- oder Hypoxie-Modelle) oder die Untersuchungen in Tiermodellen (z.B. hypertensive Ratten, ApoE-Knockoutmäuse etc.).

Das sogenannte „Rheostat-Modell“ beschreibt das feinregulierte Gleichgewicht zwischen Proliferation und Apoptose von Endothelzellen durch intrazelluläre S1P- und Ceramid-Spiegel (siehe Review Pyne & Pyne, 2000b). Mandala *et al.*, 2000 zeigen, daß die Erhöhung des intrazellulären S1P-Spiegels durch Überexpression der SPHK oder durch Agonist-Stimulation die Endothelzell-Proliferation stimuliert, während eine Überexpression der S1P-Phosphatase das Gleichgewicht in Richtung des Apoptose-Induktors Ceramid verschiebt.

Für einige edg-Rezeptoren ist bekannt, daß sie das Auftreten von Apoptosen im Endothel verhindern können und insofern protektive Wirkungen auf das Endothel ausüben (Hisano *et al.*, 1999, Kwon *et al.*, 2001). Aventis-interne Ergebnisse zeigen, daß edg1 und edg5 ASO-Experimente in HUVECs eine statistisch signifikante Zunahme von Apoptosen, basierend auf DNA-Fragmentierung und Caspase-Aktivierung, bewirken, und daß die kombinierte Ausschaltung der Gene edg1/edg5 den Apoptose-induzierenden Effekt verstärkt (Dr. Huber, Aventis Pharma, DG Herz-Kreislauf, 2000, unpubliziert).

Die laminare Schubspannung des fließenden Blutes, der sogenannte Scherstress, wird als einer der wichtigsten atheroprotektiven Faktoren im Gefäßsystem verstanden. Wie in Abb.67, S.139 dargestellt, wirkt der physiologische Blutstrom anti-thrombotisch, hemmt Zellmigration und -wachstum von Endothel- und glatten Gefäßmuskelzellen und übt insgesamt einen Schutzeffekt auf das intakte Endothel aus. Störungen des laminaren Blutstroms (z.B. durch Verletzungen des Endothels) führen dagegen zur Schädigung der Gefäßwand und langfristig zur Atherosklerose (Taub & Berk, 1998, Ross & Glomset, 1973). Die endotheliale und glatte Gefäßmuskel-Dysfunktion wird als das früheste Stadium der Atherogenese angesehen (Ross & Glomset, 1973, Rössig *et al.*, 2001, Celermajer, 1997, Spyridopoulos & Andrés, 1998).

Mehrere Gene wurden bislang identifiziert, die unter Scherstress in Endothelzellen reguliert sind und physiologische Schutzfunktionen wahrnehmen: Die eNOS (Davis *et al.*, 2001), die NADH-Oxidase (De Keulenaer *et al.*, 1998), Integrine (Urbich *et al.*, 2000) oder edg1 (Takada *et al.*, 1997) sind nur einige Beispiele.

Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen, daß gpr3, 6 und 12 im humanen Gefäßsystem exprimiert sind (gpr6 am schwächsten) (5.4.1., S.99) und durch S1P aktiviert werden können (2., S.64). Da der Rezeptor gpr3 in dem endothelialen Scherstress-Funktionsmodell in HUVECs, in Analogie zum S1P-Rezeptor edg1 (Takada *et al.*, 1997), um den Faktor zwei hochreguliert ist, kann postuliert werden, daß gpr3 eine Funktion im Endothel übernimmt (6.3., S.104). Ohne ASO-Experimente kann jedoch nicht eindeutig belegt werden, ob gpr3 eine Schutzfunktion zugeordnet werden kann, oder ob die Veränderung des Expressionsniveaus das Ergebnis einer Gegenregulation ist.

gpr3-ASO-Behandlung in HUVECs ist durchgeführt worden; es kann jedoch keine Reduktion der gpr3-Proteinexpression nachgewiesen werden (6.4., S.107), d.h. der eindeutige Beweis für eine endothelprotektive Wirkung durch den Rezeptor gpr3 kann nicht erbracht werden.

ASOs gegen den Rezeptor gpr12 werden derzeit von ISIS Pharmaceuticals entwickelt und standen für diese Arbeit nicht zur Verfügung.

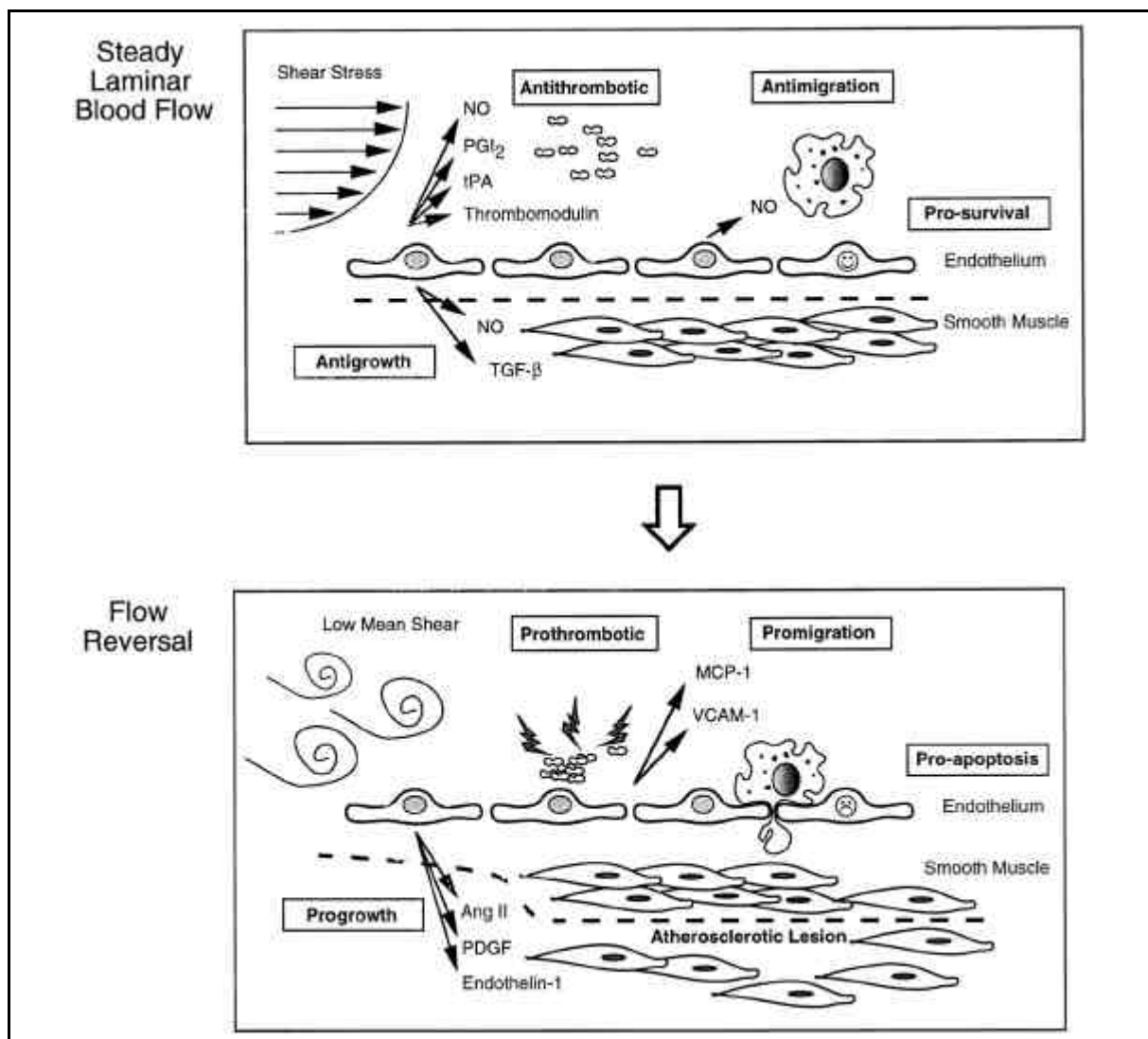


Abb.67 **Atheroprotektive Effekte von Scherstress auf Endothelzellen.** AngII: Angiotensin II, MCP-1: Monozyten Chemotaktisches Protein-1, NO: Stickstoffmonoxyd, PDGF: Plättchen-aktivierender Faktor, PGI₂: Prostacyclin, TGF- β : Transformierender Wachstumsfaktor- β , tPA: Gewebe Plasminogen-Aktiva-tor, VCAM-1: Gefäßzell-Adhäsionsmolekül -1 (aus: Traub & Berk, 1998).

Weitere Hinweise auf eine *in vivo*-Krankheitsrelevanz des Rezeptors gpr12 ergeben sich aus immunhistologischen Untersuchungen kardiovaskulärer Erkrankungen (Atherosklerose, Diabetes, Herzversagen, Herzinfarkt, Bluthochdruck) durch LifeSpan Bioscience.

So zeigt sich an Kalzifizierungen und Makrophagen atherosklerotischer Koronararterien eine gering erhöhte gpr12-Expression; glatte Gefäßmuskelzellen und atherosklerotische Plaques sind jedoch unauffällig. Diabetes-Patienten zeigen eine tendenzielle Hochregulation des Rezeptors gpr12 in Kardiomyozyten, verglichen mit gesunden Herzen. Kardiomyozyten bei Patienten mit Herzversagen zeigen keinen Unterschied zu gesunden Herzen, jedoch wird in Kardiomyozyten in direkter Nachbarschaft zu Infarkt-Arealen stärkere gpr12-Präsenz beobachtet. In Nierengewebe von Diabetes-Patienten wird eine gering hochregulierte Expression des gpr12 in den Sammelrohren, jedoch in keinem anderen Zelltyp gefunden. Hypertensive Nieren weisen eine leicht verstärkte Anhäufung des gpr12 in den proximalen, gewundenen Nierenkanälchen auf.

Die eindeutige Zuordnung von gpr3, 6 und 12 zu einer physiologischen Funktion bzw. einer manifestierten Krankheit ist im Rahmen dieser Arbeit aufgrund des Fehlens spezifischer gpr3-, 6- und 12-ASOs, spezifischer Agonisten, Antagonisten bzw. inverser Agonisten nicht möglich.

Die bekannten Wirkungen des bioaktiven Lipids S1P sowie die nachgewiesene Präsenz von gpr3, 6 und 12 in Herz und Niere sowie im Gefäß- und Immunsystem (insbesondere gpr12) impliziert allerdings relevante Effekte im Herz-Kreislauf-System hinsichtlich der Entwicklung von Atherosklerose und Ischämie.

VI Weiterführende Aspekte und Ausblick

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit identifizieren die humanen Rezeptoren gpr3, 6 und 12 als weitere Mitglieder einer kontinuierlich wachsenden GPCR-Lipidrezeptorfamilie. Aufbauend auf bioinformatischen Informationen und Literaturdaten (Eggerickx *et al.*, 1995) werden die modulierenden Eigenschaften der Lipide S1P und DHS1P entdeckt und mittels funktioneller *second messenger*-Assays in HEK293-Zellen charakterisiert. Nach dem aktuellen Wissensstand lassen sich die drei Rezeptoren weder durch ihre Aktivatoren (S1P und DHS1P), die EC_{50} -Werte gegenüber diesen Lipiden, die potenzierende Wirkung von Suramin noch über ihre Signaltransduktionswege signifikant unterscheiden. Spezifische Agonisten, Antagonisten bzw. inverse Agonisten hätten eine weitere funktionelle Charakterisierung ermöglicht; die entsprechenden Substanzen sind jedoch derzeit noch nicht verfügbar. Weitere Untersuchungen könnten die spezifischen Bindung von S1P und DHS1P an gpr3, 6 oder 12 beinhalten. Eine stabile gpr3-Zelllinie ist im Rahmen dieser Arbeit hergestellt worden, und die Verdrängung von [3 H]S1P durch S1P an Membranen dieser Zellen könnte zur Quantifizierung der Bindung verwendet werden. Da die stabile Überexpression des konstitutiv aktiven Rezeptors gpr3 prinzipiell möglich ist, könnten in analoger Weise stabile gpr6- und gpr12-Zelllinien hergestellt werden. Eine weitere Möglichkeit zur funktionellen Charakterisierung von GPCRs ist die Untersuchung der Ligand-induzierten G-Protein-Aktivierung über die [35 S]GTP γ S-Bindung; entsprechende Untersuchungen könnten wiederum mit der stabilen gpr3-Zelllinie durchgeführt werden.

Das Lipid LPA ist tendenziell in der Lage, gpr3-spezifische Signale in FLIPR/ Ca^{2+} - und cAMP-Assays in HEK293-Zellen zu induzieren, jedoch gegenüber einem dramatisch hohen, endogenen LPA-Hintergrund in diesen Zellen. Da zahlreiche Beispiele dafür existieren, daß Lipid-GPCRs durch mehrere Lipide aktiviert werden können, besteht ein möglicher experimenteller Ansatz darin, die LPA-induzierte Signaltransduktion von gpr3, 6 und 12 in einem Zellsystem mit einem geringeren endogenen LPA-Hintergrund zu überprüfen. Mammalische Rh7777- oder Insekten-Sf9-Zellen wären hierfür höchstwahrscheinlich geeignet.

Die Kreation eines Fusionskonstruktes mit einem PTX-insensitiven $G\alpha_i$ -Protein, wie sie McAllister *et al.*, 2000 beschreiben, wäre eine Alternative hierzu. Es wird vermutet, daß dieser Ansatz die nahezu hintergrundfreie Charakterisierung der gpr3-, 6- und 12-vermittelten Signaltransduktion zuläßt.

Es ist weiterhin unklar, ob die beobachtete konstitutive Aktivität von gpr3, 6 und 12 in HEK293-Zellen auf die Rezeptor-Physiologie oder auf das Fehlen eines Regulatorproteins zurückzuführen ist. Die basale, Agonist-unabhängige Internalisierung von gpr6-GFP und den endogenen Rezeptoren wird als Folge der konstitutiven Signaltransduktion interpretiert, und eine mögliche Strategie zur Klärung dieser Frage besteht in der Analyse der Rezeptor-Lokalisation nach Behandlung mit einem inversen Agonisten. Diese sind bereits mehrfach zur Untersuchungen von konstitutiver Aktivität *in vitro* und *in vivo* eingesetzt worden und wären wertvolle Werkzeuge zur Klärung dieser interessanten Fragestellung.

Ein weiterer Aspekt ist die Identifikation putativer Regulatorproteine *in vivo*. „Yeast Two Hybrid“-Systeme liefern verlässliche Aussagen über Protein-Interaktionspartner in einem Zellsystem, und Ergebnisse dieses Ansatzes könnten nicht nur Regulatorproteine, sondern möglicherweise auch andere GPCRs, die funktionelle Heterodimere mit gpr3, 6 oder 12 ausbilden, offenbaren.

Ebenso ist noch offen, ob die Kopplung an verschiedene G-Protein-Klassen ($G\alpha_i$ und $G\alpha_s$) in HEK293-Zellen *in vivo* bestätigt werden kann.

Die in dieser Arbeit erstellten Expressionsprofile von gpr3, 6 und 12 zeigen neben der Expression im ZNS die Präsenz in Herz und Niere sowie in isolierten Endothel- und glatten Muskelzellen des Gefäßsystems. Da dem Lipid S1P als physiologischer Ligand der edg-Familie bereits vielfältige Wirkungen im Herz-Kreislauf-System zugeordnet werden konnten (z.B. Plättchenaggregation, negative Chronotropie, Protektion des Endothels etc.), bestärkt das Expressionsmuster die Herz-Kreislauf-Relevanz von gpr3, 6 und 12, die bereits aufgrund des Liganden vermutet wurde.

Es ist ein wesentlicher Schwerpunkt zukünftiger Studien, diesen für die Herz-Kreislauf-Forschung interessanten Rezeptoren eine physiologische bzw. pathophysiologische Funktion zuzuordnen. Ansätze hierfür finden sich in der Hochregulation von gpr3 in einem endothelialen Funktionsmodell. Es ist jedoch unklar, ob diese Regulation auf eine Schutzfunktion im Endothel oder auf eine Gegenregulation zurückzuführen ist.

Im Zuge endothelialer Dysfunktion, bzw. nach der Ruptur eines atherosklerotischen Plaques im Gefäß, ist die glatte Gefäßmuskulatur direkt dem pulsierenden Blutstrom ausgesetzt und beginnt infolgedessen zu proliferieren. Eine gefährliche Verdickung der Gefäßwand an dieser Stelle und die Reduktion des Gefäßlumens sind die Folge. Es ist eine interessante Frage, ob gpr3, 6 und 12 in einem endothelialen Dysfunktionsmodell, in dem glatte Gefäßmuskelzellen unphysiologischem Scherstress ausgesetzt werden, reguliert sind.

Aufgrund überlappender Expressionsprofile der S1P-edg-Rezeptoren und gpr3, 6 und 12 in Herz-Kreislauf-relevanten Geweben und Zelllinien sowie redundanter Signaltransduktionskaskaden ist es momentan nicht möglich, die Funktionen einzelner S1P-Rezeptoren exakt zu bestimmen. Zentraler Bestandteil zukünftiger Forschungsarbeiten bildet daher die Zuordnung spezifischer Funktionen zu den einzelnen Rezeptoren. Die selektive Ausschaltung von gpr3, 6 und 12 in Primärzellen bzw. *in vivo* mittels Antisense-Oligonukleotid (ASO)-Technologie oder neutralisierenden Antikörpern ist hierfür das Mittel der Wahl. ASOs gegen den Rezeptor gpr3 sind in der vorliegenden Arbeit getestet worden, eine Reduktion des gpr3-Proteinniveaus kann jedoch nicht nachgewiesen werden.

Es ist eine interessante Frage, ob sich gpr6- und gpr12-ASOs anders verhalten. Untersuchungen von gpr3-, 6- und 12-Überexpressions- bzw. knock-out-Mäusen (Aventis Pharma, USA) hinsichtlich von *ex vivo*-Versuchen könnten in diese Arbeit mit einbezogen werden.

VII Anhang

1. Abkürzungsverzeichnis

Nicht angegebene Abkürzungen für physikalische Größen und deren Einheiten entsprechend dem SI-System.

Acc. Nr.	Nummer in der Genbank (engl.: <i>accession number</i>)
Amp	Ampicillin
AP	Alkalische Phosphatase
ASO	Antisense-Oligonukleotid
bp	Basenpaar
BSA, BSA-FAF	Rinderserumalbumin, Fettsäure-frei (engl.: <i>fatty acid free</i>)
Cam	Chloramphenicol
cb, cbr	Cannabinoid, Cannabinoid-Rezeptor
CHO	<i>chinese hamster ovary cells</i>
Da	Dalton
DEPC	Diethylpyrocarbonat
DHS1P	Dihydrosphingosin-1-Phosphat
DIG	Digoxygenin
DMS	Dimethylsphingosin
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure (eng.: <i>desoxyribonucleic acid</i>)
dNTPs	Sammelbegriff für Desoxynukleosidtriphosphate (dATP, dTTP, dCTP, dGTP, dUTP)
DTT	Dithiotreitol
<i>E.coli</i>	Escherichia coli
edg	<i>endothelial differentiation gene</i>
EDTA	Ethylendiaminetetraessigsäure
ELISA	<i>enzyme-linked-immunosorbent assay</i>
eNOS	endotheliale NO (Stickstoffmonoxid)-Synthase
ER	Endoplasmatisches Retikulum
<i>et al.</i>	et alii (und andere)
EtOH	Ethanol
FCS, FCSCS	fötales Kälberserum (engl.: <i>fetal calf serum</i>), aktivkohlebehandeltes FCS (engl.: <i>charcoal stripped</i>)
FITC	Fluoresceinisothiocyanat

FLIPR	<i>Fluorescent Imaging Plate Reader</i>
GAPDH	Glyzerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase
GFP, eGFP	Grün fluoreszierendes Protein (engl: <i>(enhanced) green fluorescence protein</i>)
GPCR	G-Protein-gekoppelter Rezeptor
GRK	GPCR-Rezeptor-Kinase
HAoEC, HAoSMC	<i>human aortic artery endothelial cells</i> bzw. <i>-smooth muscle cells</i>
HBSMC	<i>human bronchial smooth muscle cells</i>
HCAEC, HCASMC	<i>human coronary artery endothelial cells</i> bzw. <i>-smooth muscle cells</i>
HEK293	<i>human embryonic kidney cells</i>
HeLa	Zervixcarcinomzellen, Helen Lagrand
HEPES	N-2-Hydroxyethylpiperazin-N-2-ethansulfonsäure
HIAEC	<i>human iliac artery endothelial cells</i>
HMVEC-L, HMVEC-d	<i>human microvascular endothelial cells lung</i> bzw. <i>dermal</i>
HPAEC, HPASMC	<i>human pulmonary artery endothelial cells</i> bzw. <i>-smooth muscle cells</i>
HSKMC	<i>human skeletal muscle cells</i>
HTS	Hochdurchsatz-Screening (engl.: <i>high throughput screening</i>)
HUAEC, HUASMC	<i>human umbilical artery endothelial cells</i> bzw. <i>-smooth muscle cells</i>
HUtSMC	<i>human uterine smooth muscle cells</i>
HUVEC	<i>human umbilical vein endothelial cells</i>
Kan	Kanamycin
kb	Kilobasenpaare (10^3 Basenpaare)
kDa	Kilodalton
LB-Medium	Luria-Bertani Medium
LPA	Lysophosphatidsäure (engl.: <i>lysophosphatidic acid</i>)
mcr	Melanocortin-Rezeptor
MCS	<i>multiple cloning side</i>
M_r	relative Molekülmasse
NC-Membran	Nitrocellulose Membran
OD	optische Dichte
PAGE	P olyacrylamidgelelektrophorese
PBS	<i>phosphate buffered saline</i>

PCR	Polymerasekettenreaktion (engl.: <i>polymerase chain reaktion</i>)
Pen	Penicillin
PLC	Phospholipase C
PMA	<i>phorbol myristic acetate</i>
PKA, PKC	Protein Kinase A oder C
PTX	Pertussistoxin
PVDF	Polyvinylidendifluorid
rb	Kaninchen (engl.: <i>rabbit</i>)
RNA	Ribonukleinsäure (engl.: <i>ribonucleic acid</i>)
rpm	Umdrehungen per minute (engl.: <i>rounds per minute</i>)
rRNA	ribosomale RNA
RT	Raumtemperatur
SEM	Standardfehler des Mittelwertes (engl.: <i>standard error of the mean</i>)
SDS	Sodiumdodecylsulfat (=Laurylsulfat)
S1P	Sphingosin-1-Phosphat
SS	Scherstress
Strep	Streptomycin
TAE	TRIS-Azetat-EDTA-Lösung
TG	Thapsigargin
TRIS	Tris(hydroxymethyl)aminomethan
U	Units (Einheit der Enzymaktivität)
UZ	Ultrazentrifuge
wt	Wild Typ

2. Danksagung

Die vorliegende Arbeit wurde von März 2000 bis Juni 2002 in der Herz-Kreislauf-Forschung von Aventis Pharma durchgeführt und von den Herren Prof. Dr. Bernd Ludwig und Prof. Dr. Josef Pfeilschifter von Seiten der Uni Frankfurt betreut. Ich danke Prof. Ludwig und Prof. Pfeilschifter für die Unterstützung und das Interesse am Fortgang dieser extern durchgeführten Arbeit.

Prof. Dr. Andreas Busch danke ich für die Möglichkeit zur Promotion in der Herz-Kreislauf-Forschung von Aventis Pharma, die mir hervorragende Arbeitsbedingungen und einen lehrreichen Einblick in die Arbeitsweise der pharmazeutischen Industrie ermöglicht hat.

Meiner Betreuerin Frau Dr. Evi Kostenis gilt mein besonderer Dank für die Auswahl des Themas und die tutorale Anleitung. Ihre Kreativität und unendliche Erfahrung hat mir geholfen und diese Arbeit in zahlreichen Gesprächen maßgeblich vorangetrieben. Darüber hinaus danke ich ihr für souveräne Hilfestellungen beim Schreiben der „Erst“-Veröffentlichungen und so manche konstruktive Kritik.

Ein herzliches Dankeschön geht an die „Mädels“ des Labor Kostenis: Anke Niedernberg, Almut Hattenberger und Ursula Stillger für ihre Hilfsbereitschaft und die freundliche Arbeitsatmosphäre in einer nicht immer leichten Zeit.

Dr. Jochen Huber danke ich für das große Interesse an meiner Arbeit, seine Diskussionsbereitschaft und tatkräftige Hilfestellungen bei immunologischen/zellbiologischen Fragestellungen.

Dr. Hans Gassenhuber hat mit der Erarbeitung und Bereitstellung bioinformatischer Informationen einen großen Beitrag zum Fortschritt dieser Arbeit geleistet; auch hierfür möchte ich mich bedanken.

Bei Constanze Scherer möchte ich mich für ihre Hilfestellungen in Sachen Northern Blot-Analyse und der damit verbundenen Probleme bedanken.

Dr. Patrick Maier gilt mein Dank für die Einführung in die konfokale Fluoreszenzmikroskopie und die Geduld mit den Tücken der Technik.

Dr. Ingrid Wagner, Elke Kessler und Anke Hullmann gilt mein Dank für die Präparation bzw. Bereitstellung primärer HUVECs, ohne die so mancher Versuch nicht so ohne weiteres möglich gewesen wäre.

Dr. Carmen Urbich aus der Arbeitsgruppe PD Dr. S. Dimmeler des Uni-Klinikums Frankfurt danke ich für die Einführung in die Scherstress-Applikation sowie technische und methodische Hilfestellungen.

Dr. Ali Ardati, Aventis Pharma, USA danke ich für die Durchführung von gpr3, 6 and 12 Taqman-Analysen.

Allen Doktoranden und Post-Doktoranden des Herz-Kreislauf-Doktorandenprogramms danke ich für den Zusammenhalt und die Einblicke in komplett andere Arbeitsgebiete und nicht zuletzt für die schöne Zeit auf den Klausurtagungen 2000 und 2001. Allen weiteren namentlich nicht erwähnten - aber nicht vergessenen - Mitarbeitern von Aventis Pharma danke ich für die angenehme Arbeitsatmosphäre in den letzten 2,5 Jahren.

Bei meinen Eltern, meiner Schwester Inga sowie allen Freunden und Bekannten bedanke ich mich für die Anteilnahme und vielseitige Unterstützung während meines gesamten Studiums und während der Dissertation.

Mein größter Dank gilt meinem Ehemann Stefan Stoidtner, der während der letzten Jahre häufig auf meine ungeteilte Aufmerksamkeit verzichten mußte, dennoch immer zu mir gehalten und mir großes Selbstvertrauen gegeben hat.

VIII Literaturverzeichnis

- Abdel-Malek, Z.A.:** Melanocortin receptors: their function and regulation by physiological agonists and antagonists. *Cell Mol. Life Sci.* (2001) Vol. 58(3): 434-441
- Alderton, F., Sambhi, B., Tate, R., Pyne, N.J. & Pyne, S.:** Assessment of agonism at G-protein coupled receptors by phosphatidic acid and lysophosphatidic acid in human embryonic kidney 293 cells. *Br. J. Pharmacol.* (2001) Vol. 134: 6-9
- Alewijnse, A.E., Timmerman, H., Jacobs, E.H., Smit, M.J., Roovers, E., Cotecchia, S., Leurs, R.:** The effect of mutations in the DRY motif on the constitutive activity and structural instability of the histamine H2 receptor. *Mol. Pharmacol.* (2000) Vol. 57 (5): 8908
- Ames, R.S., Sarau, H.M., Chambers, J.K., Willette, R.N., Aiyar, N.V., Romanic, A.M., Loudon, C.S., Foley, J.J., Sauermelch, S.F., Coatney, R.W., Ao, Z., Disa, J., Holmes, S.D., Stadel, J.M., Martin, J.D., Liu, W.S., Glover, G.I., Wilson, S., McNulty, D.E., Ellis, C.E., Elshourbagy, N.A., Shabon, U., Trill, J.J., Hay, D.W., Douglas, S.A., et al.:** Human urotensin-II is a potent vasoconstrictor and agonist for the orphan receptor GPR14. *Nature* (1999) Vol. 410: 282-286
- An, S., Bleu, T., Zheng, Y.:** Transduction of intracellular calcium signals through G protein-mediated activation of phospholipase C by recombinant sphingosine 1-phosphat receptors. *Mol. Pharmacol.* (1999) Vol. 55: 787-794
- Ancellin, N. & Hla, T.:** Differential pharmacological properties and signal transduction of the sphingosine 1-phosphate receptors EDG-1, EDG-3 and EDG-5. *J. Biol. Chem.* (1999) Vol. 274 (27): 18997-19002
- Ango, F., Prézeau, Muller, T., Tu, J.C., Xiao, B., Worley, P.F., Pin, J.P., Bockaert, J. & Fagni, L.:** Agonist-independent activation of metabotropic glutamate receptors by the intracellular protein Homer. *Nature* (2001) Vol. 411: 962-5
- Augé, N., Nikolova-Karakashian, M., Carpentier, S., Parthasarathy, S., Nègre-Salvayre, A., Salvayre, R., Merrill, A.H. jr. & Levade, T.:** Role of sphingosin 1-phosphate in the mitogenesis induced by oxidized low density lipoprotein in smooth muscle cells via activation of sphingomyelinase, ceramidase and sphingosine kinase. *J. Biol. Chem* (1999) Vol. 274 (31): 21533-8
- Bailey, W.J., Vanti, W.B., George, S.R., Blevins, R., Swaminathan, S., Bonini, J.A., Smith, K.E., Weinshank, R.L., O'Dowd, B.F.:** Patent status of the therapeutically important G-protein-coupled receptors. *Expert Opin. Ther. Patents* (2001) Vol. 11 (12): 1861-1887
- Bargmann C.I.:** Neurobiology of the *Caenorhabditis elegans* genome. *Science* (1998) Vol. 282: 2028-2033
- Bermak, J.C., Li, M., Bullock, C. & Zhou, Q.-Y.:** Regulation of transport of the dopamine D1 receptor by a new membrane-associated ER protein. *Nature Cell Biol.* (2001) Vol. 2: 492-8
- Bermak, J.C., Li, M., Bullock, C., Weingarten, P., Zhou, Q.-Y.:** Interaction of gamma-COP with a transport motif in the D1 receptor C-terminus. *Eur. J. Cell Biol.* (2002) Vol. 81 (2): 77-85
- Birnbaumer, M.:** Mutations and diseases of G protein coupled receptors. *J. Receptor Signal Transduction Res.* (1995) Vol. 15: 131-160
- Bourne, H.R.:** How receptors talk to trimeric G proteins. *Curr. Opin. Cell Biol.* (1997) Vol. 9 (2): 134-42
- Bockaert, J. & Pin, J.P.:** Molecular tinkering of G protein-coupled receptors: an evolutionary success. *EMBO J.* (1999) Vol. 18 (7): 1723-1729

- Borowsky, B., Adham, N., Jones, K.A., Raddatz, R., Artymyshyn, R., Ogozalek, K.L., Durkin, M.M., Lakhilani, P.P., Bonini, J.A., Pathirana, S., Boyle, N., Pu, X., Kouranova, E., Lichtblau, H., Ochoa, F.Y., Branchek, T.A., Gerald, C.:** Trace amines: identification of a family of mammalian G protein-coupled receptors. *Proc. Natl. Acad. Sci.* (2001) Vol. 98 (16): 8966-71
- Brinkmann, V., Davis, M.D., Heise, C.H., Albert, R., Cottens, S., Hof, R., Bruns, C., Prieschl, E., Baumruker, T., Hiestand, P., Foster, C.A., Zollinger, M., Lynch, K.R.:** The immune modulator, FTY720, targets sphingosine 1-phosphate receptors. *J. Biol. Chem.* (2002) Vol. 277 (24): 21453-7
- Brismar, H., Asghar, M., Carey, R.M., Greengard, P. & Aperia, A.:** Dopamine-induced recruitment of dopamine D1 receptors to the plasma membrane. *Proc. Natl. Acad. Sci.* (1998) Vol. 95: 5573-8
- Bünemann, M. Lee, K.B., Pals-Rylaarsdam, R., Roseberry, A.G., Hosey, M.M.:** Desensitization of G-protein-coupled receptors in the cardiovascular system. *Annu. Rev. Physiol.* (1999) Vol. 61: 169-92
- Bunemann, M., Hosey, M.M.:** G-protein coupled receptor kinases as modulators of G-protein signaling. *J. Physiol.* (1999) Vol. 517: 5-23
- Bunzow, J.R., Van Tol, H.H., Grandy, D.K., Albert, R., Salon, J. Christie, M., Machida, C.A., Neve, K.A., Civelli, O.:** Cloning and expression of a rat D2 dopamine receptor cDNA. *Nature* (1988) Vol. 336: 783-7
- Burnette, W.N.:** Western Blotting: Electrophoretic transfer of proteins from sodium dodecyl sulfate-polyacrylamid gel to unmodified nitrocellulose and radiographic detection with antibody and radioiodinated protein A. *Anal. Biochem.* (1981) Vol. 112: 325-330
- Celermajer, D.S.:** Endothelial dysfunction: does it matter? Is it reversible? *J Am. Coll. Cardiol.* (1997) Vol. 30 (2): 325-333
- Chambers, J.K., Macdonald, L.E., Sarau, H.M., Ames, R.S., Freeman, K., Foley, J.J., Zhu, Y., McLaughlin, M.M., Murdock, P., McMillan, L., Trill, J., Swift, A., Aiyar, N., Taylor, P., Vawter, L., Naheed, S., Szekeres, P., Hervieu, G., Scott, C., Watson, J.M., Murphy, A.J., Duzic, E., Klein, C., Bergsma, D.J., Wilson, S. & Livi, G.P.:** A G protein-coupled receptor for UDP-Glucose. *J. Biol. Chem.* (2000) Vol. 275 (15): 10767-10771
- Chen, Z., Dupré, D.J., Le Gouill, C., Rola-Pleszczynski, M. & Stanková, J.:** Agonist-induced internalization of the platelet-activating factor receptor is dependent on arrestins but independent of G-protein activation. *J. Biol. Chem.* (2002) Vol. 277 (9): 7356-7362
- Chenn, A., Levin, M.E., McConnell, S.K.:** Temporally and spatially regulated expression of a candidate G-protein-coupled receptor during cerebral cortical development. *J. Neurobiol.* (2001) Vol. 46: 167-177
- Chun, J., Goetzl, E.J., Hla, T., Igarashi, Y., Lynch, K.R., Moolenaar, W., Pyne, S. & Tigyi, G.:** International union of pharmacology. XXXIV. Lysophospholipid receptor nomenclature. *Pharmacol. Rev.* (2002) Vol. 54: 265-269
- Cismowski, M.J., Ma, C., Ribas, C., Xie, X., Spruyt, M., Lizano, J.S., Lanier, S.M., Duzic, E.:** Activation of heterotrimeric G-protein signaling by a Ras-related protein. *J. Biol. Chem.* (2000) Vol. 275: 23421-4
- Civelli, O., Nothacker, H.-P., Saito, Y., Wang, Z., Lin, S.H.S., Reinscheid, R.K.:** Novel neurotransmitters as natural ligands of orphan G-protein-coupled receptors. *Trends Pharmacol. Sci.* (2001) Vol. 24 (4): 230-7
- Cohen, D.P., Thaw, C.N., Varma, A., Gershengorn, M.C. & Nussenzveig, D.R.:** Human calcitonin receptors exhibit agonist-independent (constitutive) signaling activity. *Endocrinology* (1997) Vol. 138 (4): 1400-5
- Conklin, B.R., Farfel, Z., Lustig, K.D., Julius, D., Bourne, H.R.:** Substitution of three amino acids switches receptor specificity of Gq to that of Gi alpha. *Nature* (1993) Vol. 363: 174-6

- Conway, B.R., Minor, L.K., Xu, J.Z., Gunnert, J.W., DeBasio, R., D'Andrea, M.R., Rubin, R., DeBasio, R., Giuliano, K., Zhou, L. & Demarest, K.T.:** Quantification of G-protein coupled receptor internalization using G-protein-coupled receptor-green fluorescent protein conjugates with the ArrayScanTM high-content screening system. *J. Biomolecular Screening* (1999) Vol. 4 (2): 75-86
- Cornea, A., Janovick, J.A., Lin, X. & Conn, M.:** Simultaneous and independent visualization of the gonadotropin-releasing hormone receptor and its ligand: evidence for independent processing and recycling in living cells. *Endocrinology* (1999) Vol. 140 (9): 4272-4280
- Coughlin, S.R.:** Expanding horizons for receptors coupled to G proteins: diversity and disease. *Curr. Opin. Cell Biol.* (1994) Vol. 6: 191-7
- Cvejic, S. & Devi, L.:** Dimerization of the δ opioid receptor. *J. Biol. Chem.* (1997) Vol. 272 (43): 26959-26964
- Daaka, Y., Luttrell, L.M., Ann, S., Della Rocca, G.J., Ferguson, S.S., Caron, M.G., Lefkowitz, R.J.:** Essential role for G protein-coupled receptor endocytosis in the activation of mitogen-activated protein kinase. *J. Biol. Chem.* (1998) Vol. 273 (2): 685-8
- Daub, H., Weiss, U., Wallasch, C., Ullrich, A.:** Role of transactivation of the EGF receptor in signaling by G-protein-coupled receptors. *Nature* (1996) Vol. 379: 557-560
- Davis, M.E., Cai, H., Drummond, G.R., Harrison, D.G.:** Shear stress regulates endothelial nitric oxide synthase expression through c-Src by divergent signaling pathways. *Circ. Res.* (2001) Vol. 89 (11): 1073-1080
- De Keulenaer, G.W., Chappell, D.C., Ishizaka, N., Nerem, R.M., Alexander, R.W., Griendling, K.K.:** Oscillatory and steady laminar shear stress differentially affect human endothelial redox state: role of superoxide-producing NADH oxidase. *Circ. Res.* (1998) Vol. 82 (10): 1094-1101
- De Vries, L. & Farquhar, M.G.:** RGS proteins: more than just GAPs for heterotrimeric G proteins. *Trends Cell Biol.* (1999) Vol. 9: 138-144
- Eason, M.G. & Liggett, S.B.:** Chimeric mutagenesis of putative G-protein coupling domains of the alpha-2A-adrenergic receptor. Localization of two redundant and fully competent G protein coupling domains. *J. Biol. Chem.* (1996) Vol. 271 (22): 12826-32
- Edwards, S.W., Tan, C.M., Limbird, L.E.:** Localization of G-protein-coupled receptors in health and disease. *Trends Pharmacol. Sci.* (2000) Vol. 21: 304-308
- Eggerickx, D., Deneff, J.F., Labbe, O., Hayashi, Y., Refetoff, S., Vassart, G., Parmentier, M., Libert, F.:** Molecular cloning of an orphan G-protein-coupled receptor that constitutively activates adenylate cyclase. *Biochem. J.* (1995) Vol. 309: 837-843
- Eidne, K.A., Zabavnik, J., Peters, T., Yoshida, S., Anderson, L., Taylor, P.L.:** Cloning, sequencing and tissue distribution of a candidate G protein-coupled receptor from rat pituitary gland. *FEBS Lett.* (1991) Vol. 292 (1,2): 243-8
- Erb, L., Liu, J., Ocherhausen, J., Kong, Q., Garrad, R.C., Griffing, K., Neal, C., Krugh, B., Santiago-Perez, L.I., Gonzalez, F.A., Gresham, H.D., Turner, J.T., Weisman, G.A.:** An RDG sequence in the P2Y₂ receptor interacts with $\alpha_v\beta_3$ integrins and is required for G_O-mediated signal transduction. *J. Cell Biol.* (2001) Vol. 153 (3): 491-502
- Fargin, A., Raymond, J.R., Lohse, M.J., Kobilka, B.K., Caron, M.G., Lefkowitz, R.J.:** The genomic clone G-21 which resembles a beta-adrenergic receptor sequence encodes the 5-HT_{1A} receptor. *Nature* (1988) Vol. 335: 358-60
- Farrens, D.L., Altenbach, C., Yang, K., Hubbell, W.L., Khorana, H.G.:** Requirement of rigid-body motion of transmembrane helices for light activation of rhodopsin. *Science* (1996) Vol. 274: 768-70

- Ferguson, S.S., Barak, L.S., Zhang, J., Caron, M.G.:** G-protein-coupled receptor regulation: role of G-protein-coupled receptor kinases and arrestins. *Can. J. Pharmacol.* (1996) Vol. 74 (10): 1095-110
- Ferguson, S.S.G.:** Using green fluorescent protein to understand the mechanisms of G-protein-coupled receptor regulation. *Braz. J. Med. Biol. Res.* (1998) Vol. 31 (11): 1471-7
- Ferguson, S.S.G.:** Evolving concepts in G protein-coupled receptor endocytosis: the role in receptor desensitization and signaling. *Pharmacol. Rev.* (2001) Vol. 53: 1-24
- Ferrari, S.L. & Bisello, A.:** Cellular distribution of constitutively active mutant parathyroid hormone (PTH)/PTH-related protein receptor and regulation of cyclic adenosine 3', 5'-monophosphate signaling by beta-arrestin2. *Mol. Endocrinol.* (2001) Vol. 15 (1): 149-163
- Fukushima, N., Ishii, I., Contos, J.J.A., Weiner, J.A., Chun, J.:** Lysophospholipid receptors. *Annu. Rev. Toxicol.* (2001) Vol. 41: 507-34
- Gabilondo, A.M., Hegler, J., Krasel, C., Boivin-Jahns, V., Hein, L & Lohse, M.J.:** A dileucine motif in the C-terminus of the β_2 -adrenergic receptor is involved in receptor internalization. *Proc. Natl. Acad. Sci.* (1997) Vol. 94 (23): 12285-12290
- Gether, U., Lin, S., Ghanouni, P., Ballesteros, J.A., Weinstein, H., Kobilka, B.K.:** Agonists induce conformational changes in transmembrane domains III and VI of beta2 adrenoceptor. *EMBO J.* (1997) Vol. 16 (22): 6737-47
- Geras-Raaka, E., Varma, A., Ho, H., Clark-Lewis, I. & Gershengorn, M.C.:** Human interferon- γ -inducible protein 10 (IP-10) inhibits constitutive signaling of Kaposi's Sarcoma-associated herpesvirus G protein-coupled receptor. *J. Exp. Med.* (1998) Vol. 188 (2): 405-9
- Goetzl, E.J. & An, S.:** Diversity of cellular receptors and functions for the lysophospholipid growth factors lysophosphatidic acid and sphingosine 1-phosphate. *FASEB J.* (1998) Vol. 12: 1589-1598
- Goetzl, E.J., Graeler, M., Huang, M.-C. & Shankar, G.:** Lysophospholipid growth factors and their G protein-coupled receptors in immunity, coronary artery disease, and cancer. *TheScientificWorld J.* (2002) Vol. 2: 324-338
- Ghosh, T.K., Bian, J. & Gill, D.L.:** Sphingosine 1-phosphate generated in the endoplasmic reticulum membrane activates release of stored calcium. *J. Biol. Chem.* (1994) Vol. 269: 22628-22635
- Gräler, M.H., Bernhardt, G., Lipp, M.:** EDG6, a novel G-protein-coupled receptor related to receptors for bioactive lysophospholipids, is specifically expressed in lymphoid tissue. *Genomics* (1998) Vol. 53 (2): 164-9
- Gräler, M.H., Bernhardt, G., & Lipp, M.:** A lymphoid tissue-specific receptor, EDG6, with potential immune modulatory functions mediated by extracellular lysophospholipids. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* (1999) Vol. 246: 131-6
- Gräler, M.H. & Goetzl, E.:** Lysophospholipids and their G protein-coupled receptors in inflammation and immunity. *Bioch. Biophys. Acta* (2002) Vol. 1582: 168-174
- Groblewski, T., Maigret, B., Larguier, R., Lombard, C., Bonnafous, J.-C. & Marie, J.:** Mutation of Asn¹¹¹ in the third transmembrane domain of the AT_{1A} angiotensin II receptor induces its constitutive activation. *J. Biol. Chem.* (1997) Vol. 272 (3): 1822-1826
- Hall, R., Premont, R.T., Chow, C.W., Blitzer, J.T., Pitcher, J.A., Claing, A., Stoffel, R.H., Barak, L.S., Shenolikar, S., Weinman, E.J., Grinstein, S.:** The β_2 -adrenergic receptor interacts with the Na⁺/H⁺-exchanger regulatory factor to control Na⁺/H⁺ exchange. *Nature* (1998) Vol. 392:626-630

- Hall, R.A., Premont, R.T. & Lefkowitz, R.J.:** Heptahelical receptors signaling: beyond the G protein paradigm. *J. Cell Biol.* (1999) Vol. 145: 927-932
- Hamm, H.E. & Gilchrist, A.:** Heterotrimeric G proteins. *Curr. Opin. Cell Biol.* (1996) Vol. 8: 189-196
- Hecht, J.H., Weiner, J.A., Post, S.R., Chun, J.:** Ventricular zone gene-1 (vzg-1) encodes a lysophosphatidic acid receptor expressed in neurogenic regions of the developing cerebral cortex. *J. Cell Biol.* (1996) Vol. 135: 1071-1083
- Heiber, M., Docherty, J.M., Shah, G., Nguyen, T., Cheng, R., Heng, H.H.Q., Marchese, A., Tsui, L.C., Shi, X., George, S.R., O'Dowd, B.F.:** Isolation of three novel human genes encoding G protein-coupled receptors. *DNA Cell Biol.* (1995) Vol. 14 (1): 25-35
- Hellmich, M.R., Rui, X.L., Hellmich, H.L., Fleming, R.Y., Evers, B.M., Townsend, C.M. jr.:** Human colorectal cancers express a constitutively active cholecystokinin-B/gastrin receptor that stimulates cell growth. *J. Biol. Chem.* (2000) Vol. 275 (41): 32122-8
- Herrlich, A., Kühn, B., Grosse, R., Schmid, A., Schultz, G. & Gudermann, T.:** Involvement of G_s and G_i proteins in dual coupling of the luteinizing hormone receptor to adenylate cyclase and phospholipase C. *J. Biol. Chem.* (1996) Vol. 271 (28): 16764-16772
- Hildebrandt, J.D.:** Role of subunit diversity in signaling by heterotrimeric G proteins. *Biochem. Pharmacol.* (1997) Vol. 54: 325-339
- Himmel, H.M., Meyer zu Heringdorf, D., Graf, E., Dobrev, D., Kortner, A., Schüler, S., Jakobs, K.H. & Ravens U.:** Evidence for Edg-3 receptor-mediated activation of I_{K,ACh} by sphingosine-1-phosphate in human atrial cardiomyocytes. *Mol. Pharmacol.* (2000) Vol. 58: 449-454
- Hisano, N., Yatomi, Y., Satoh, K., Akimoto, S., Mitsumata, M., Fujino, M.A., Ozaki, Y.:** Induction and suppression of endothelial cell apoptosis by sphingolipids: a role in vitro model for cell-cell interactions between platelets and endothelial cells. *Blood* (1999) Vol. 93: 4293-9
- Hla, T. & Maciag, T.:** An abundant transcript induced in differentiating human endothelial cells encodes a polypeptide with structural similarities to G-protein-coupled receptors. *J. Biol. Chem.* (1990) Vol. 265: 9308-9313
- Hla, T., Lee, M.-J., Ancellin, N., Paik, J.H., Kluk, M.J.:** Lysophospholipids-receptor relevations. *Science* (2001) Vol. 294: 1875-8
- Hla, T.:** Sphingosine 1-phosphate receptors. *Prostaglandins Other Lipid Mediat.* (2001) Vol. 64: 135-142
- Horn, F., & Vriend, G.:** G protein coupled receptors in silico. *J. Mol. Med* (1998) Vol 76: 464-468
- Hornuß, C., Hammermann, R., Fuhrmann, M., Juergens, U.R., Racké, K.:** Human and rat alveolar macrophages express multiple EDG receptors. *Europ. J. Pharmacol.* (2001) Vol. 429: 303-8
- Howard, A.D., McAllister, G., Feighner, S.D., Liu, Q., Nargund, R.P., van der Ploeg, L.H.T. & Patchett, A.A.:** Orphan G-protein-coupled receptors and natural ligand discovery. *Trends Pharmacol. Sci.* (2001) Vol. 22 (3): 132-140
- Huang, P., Li, J., Chen, C., Visiers, I., Weinstein, H., Li-Chen, L.-Y.:** Functional role of a conserved motif in TM6 of the μ opioid receptor: constitutively active and inactive receptors result from substitutions of Thr6.34(279) with Lys and Asp. *Biochemistry* (2001) Vol. 40: 13501-13509
- Huwiler, A., Kolter, T., Pfeilschifter, J., Sandhoff, K.:** Physiology and pathophysiology of sphingolipid metabolism and signaling. *Biochim. Biophys. Acta.* (2000) Vol. 1485: 63-99

- Idzko, M., Panther, E., Corinti S., Morelli, A., Ferrari, D., Herouy, Y., Dichmann, S., Mockenhaupt, M., Gebicke-Haerter, P., Di Virgilio, F., Girolomonti, G. & Norgauer, J.:** Sphingosine 1-phosphate induces chemotaxis of immature and modulates cytokine-release in mature human dendritic cells for emergence of Th2 immune response. *FASEB J.* (2002) Vol. 16: 625-627
- Igarashi, Y. & Yatomi, Y.:** Sphingosine 1-phosphate is a blood constituent released from activated platelets, possibly playing a variety of physiological and pathophysiological roles. *Acta Biochim. Polonica* (1998) Vol. 45: 299-309
- Iismaa, T.P., Kiefer, J., Liu, M.L., Baker, E., Sutherland, G.R., Shine, J.:** Isolation and chromosomal localisation of a novel human G-protein-coupled receptor (GPR3) expressed predominantly in the central nervous system. *Genomics* (1994) Vol. 24: 391-4
- Im, D.S., Heise, C.E., Ancellin, N., O'Dowd, B.F., Shei, G.J., Heavens, R.P., Rigby, M.R., Hla, T., Mandala, S., McAllister, G., George, S.R., Lynch, K.R.:** Characterization of a novel sphingosine 1-phosphate receptor, Edg-8. *J. Biol. Chem.* (2000) Vol. 275: 14281-6
- Im, D.S., Clemens, J., MacDonald, T.L., Lynch, K.R.:** Characterization of the human and mouse sphingosine 1-phosphate receptor, S1P5 (Edg-8): structure-activity relationship of sphingosine 1-phosphate receptors. *Biochemistry* (2001a) Vol. 40 (46): 14053-60
- Im, D.S., Heise, C.E., Nguyen, T., O'Dowd, B.F. & Lynch, K.R.:** Identification of a molecular target of psychosine and its role in globoid cell formation. *J. Cell Biol.* (2001b) Vol. 153 (2): 429-434
- Jazin, E.E., Yoo, H., Blomqvist, A.G., Yee, F., Weng, G., Walker, M.W., Salon, J., Larhammar, D. & Wahlestedt, C.:** A proposed bovine neuropeptide Y (NPY) receptor cDNA clone, or its human homologue, confers neither NPY binding sites nor NPY responsiveness on transfected cells. *Regulatory Peptides* (1993) Vol. 47: 247-258
- Jenkinson, K.M. & Reid, J.J.:** The P(2)-purinoceptor antagonist suramin is a competitive antagonist at vasoactive intestinal peptide receptors in the rat gastric fundus. *Br. J. Pharmacol.* (2000) Vol. 130 (7): 1632-1638
- Jordan, B.A. & Devi, L.A.:** G-protein-coupled receptor heterodimerization modulates receptor function. *Nature* (1999) Vol. 399: 697-700
- Kallal, L. und Benovic, J.:** Using green fluorescent proteins to study G-protein-coupled receptor localization and trafficking. *Trends Pharmacol. Sci.* (2000) Vol. 21: 175-180
- Kabarowski, J.H.S., Zhu, K., Le, L.Q., Witte, O.N., Xu, Y.:** Lysophosphatidylcholine as a ligand for the immunoregulatory receptor G2A. *Science* (2001) Vol. 293: 702-5
- Kaupmann, K., Malitschek, B., Schuler, V., Heid, J., Froestl, W., Beck, P., Mosbacher, J., Bichoff, S., Kulik, A., Shigemoto, R., Karashin, A., Bettler, B.:** GABA_B-receptor subtypes assemble into functional heterodimeric complexes. *Nature* (1998) Vol. 396: 683-7
- Kenakin, T. :** Pharmacological proteus? *Trends Pharmacol. Sci.* (1995) Vol. 16: 256-258
- Kilts, J.D., Gerhardt, M.A., Richardson, M.D., Sreeram, G., Mackensen, G.B., Grocott, H.P., White, W.D., Davis, R.D., Newman, M.F., Reves, J.G., Schwinn, D.A., Kwatra, M.M.:** β_2 -adrenergic and several other G protein-coupled receptors in human atrial membranes activate both G_s and G_i. *Circ. Res.* (2000) Vol. 87: 705-9
- Kimura, T., Watanabe, T., Sato, K., Kon, J., Tomura, H., Tamama, K., Kuwabara, A., Kanda, T., Kobayashi, I., Ohta, H., Ui, M., Okajima, F.:** Sphingosine 1-phosphate stimulates proliferation and migration of human endothelial cells possibly through the lipid receptors Edg-1 and Edg-3. *Biochem. J.* (2000) Vol. 348 Pt 1: 71-6

- Klein, U., Muller, C., Chu, P., Birnbaumer, M., von Zastrow, M.:** Heterologous inhibition of G protein-coupled receptor endocytosis mediated by receptor-specific trafficking of beta-arrestins. *J. Biol. Chem.* (2001) Vol. 276 (20): 17442-7
- Klinger, C., Ancellin, N., Barrault, M.B., Morel, A., Buhler, J.M., Elalouf, J.M., Clauser, E., Lugnier, C., Corman, B.:** Angiotensin II potentiates vasopressin-dependent cAMP accumulation in CHO transfected cells. Mechanisms of cross-talk between AT_{1A} and V₂ receptors. *Cell. Signal.* (1998) Vol. 10 (1): 65-74
- Kluk, M.J., Hla, T.:** Role of the sphingosine 1-phosphate receptor EDG-1 in vascular smooth muscle cell proliferation and migration. *Circ. Res.* (2001) Vol. 89: 496-502
- Kohama, T., Olivera, A., Edsall, L., Nagiec, M.M., Dickson, R., Spiegel, S.:** Molecular cloning and functional characterization of murine sphingosine kinase. *J. Biol. Chem.* (1998) Vol. 273: 23722-8
- Kostenis, E., Zeng, F.Y., Wess, J.:** Functional characterization of a series of mutant G protein alpha subunits displaying promiscuous receptor coupling properties. *J. Biol. Chem.* (1998) Vol. 273 (28): 17886-92
- Kostenis, E., Zeng, F.Y., Wess, J.:** Structure-function analysis of muscarinic receptors and their associated G proteins. *Life Sci.* (1999) Vol. 64 (6-7): 355-62
- Kostenis, E.:** Is G α_{16} the optimal tool for fishing ligands of orphan G-protein-coupled receptors? *Trends Pharmacol. Sci.* (2001) Vol. 22 (11): 560-4
- Kovoor, A., Celver, J., Abdryashitov, R.I., Chavkin, C., Gurevich, V.V.:** Targeted construction of phosphorylation-independent beta-arrestin mutants with constitutive activity in cells. *J. Biol. Chem.* (1999) Vol. 274 (11): 6831-4
- Kozak, M.:** Point mutations define a sequence flanking the AUG initiator codon that modulated translation by eukaryotic ribosomes. *Cell* (1986) Vol. 44: 283-292
- Kroeger, K.M., Hanyaloglu, A.C., Seeber, R.M., Miles, L.E.C. & Eidne, K.:** Constitutive and agonist-dependent homo-oligomerization of the thyrotropin-releasing hormone receptor. *J. Biol. Chem.* (2001) Vol. 276 (16): 12736-12743
- Krogh, A., Larsson, B., von Heijne, G., Sonnhammer, E.L.:** Predicting transmembrane protein topology with a hidden Markov model: application to complete genomes. *J. Mol. Biol.* (2001) Vol. 305 (3): 567-580
- Kukkonen, J.P., Näsman, J. & Akerman, K.E.O.:** Modelling of promiscuous receptor-G_i/G_s-protein coupling and effector response. *Trends Pharmacol. Sci.* (2001) Vol. 22 (12): 616-622
- Kuner, R., Köhr, G., Grünwald, S., Eisenhard, G., Bach, A. & Hornau, H.C.:** Role of heteromer formation in GABA_B receptor function. *Science* (1999) Vol. 283: 74-7
- Kupperman, E., An, S., Osborne, N., Waldron, S., Stainer, D.Y.:** A sphingosine-1-phosphate receptor regulates cell migration during vertebrate heart development. *Nature* (2000) Vol. 406: 192-5
- Kwon, Y.-G., Min, J.-K., Kim, K.-M., Lee, D.-J., Billiar, T.R. & Kim, Y.-M.:** Sphingosine 1-phosphate protects human umbilical vein endothelial cells from serum-deprived apoptosis by nitric oxide production. *J. Biol. Chem.* (2001) Vol. 276 (14): 10627-10633
- Laemmli, U.K.:** Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T₄. *Nature* (1970) Vol. 227: 680-685
- Lambright, D.G., Sondek, J., Bohm, A., Skiba, N.P., Hamm, H.E. & Sigler, P.B.:** The 2.0 Å crystal structure of a heterotrimeric G protein. *Nature* (1996) Vol. 379: 311-9
- Lander, E.S., Linton, L.M., Birren, B., et al.:** Initial sequencing and analysis of the human genome. *Nature* (2001) Vol. 409: 860-921

- Laugwitz, K.-L., Allgeier, A., Offermanns, S., Spicher, K., van Sande, J., Dumont, J.E. & Schultz, G.:** The human thyrotropin receptor: A heptahelical receptor capable of stimulating members of all four G protein families. *Proc. Natl. Acad. Sci* (1996) Vol. 93: 116-120
- Lee, M.-J., van Brocklyn, J.R., Thangada, S., Liu, C.H., Hand, A.R., Menzeleev, R., Spiegel, S., Hla, T.:** Sphingosine-1-phosphate as a ligand for the G protein-coupled receptor EDG-1. *Science* (1998) Vol. 279: 1552-1555
- Lee, O.-H., Kim, Y.-M., Lee, Y.M., Moon, E.-J., Lee, D.-J., Kim, J.-H., Kim, K.-W. & Kwon, Y.-G.:** Sphingosine 1-phosphate induces angiogenesis: its angiogenetic action and signaling mechanism in human umbilical endothelial cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* (1999) Vol. 264: 743-750
- Leurs, R., Smit, M.J., Alewijnse, A. Timmerman, H.:** Agonist-independent regulation of constitutively active G-protein-coupled receptors. *Trends Pharmacol. Sci.* (1998) Vol.23: 418-422
- Levade, T., Augé, N., Veldman, R.J., Cuvillier, O., Nègre-Salvayre, A., Salvayre, R.:** Sphingolipid mediators in cardiovascular cell biology and pathology. *Circ. Res.* (2001) Vol. 89: 957-968
- Li, J., Chen, C., Huang, P., Liu-Chen, L.-Y.:** Inverse agonist up-regulates the constitutively active D3.49(164)Q mutant of the rat mu-opioid receptor by stabilizing the structure and blocking constitutive internalization and down-regulation. *Mol. Pharmacol.* (2001) Vol. 60 (5): 1064-75
- Li, M., Bermak, J.C., Wang, Z.W., Zhou, Q.Y.:** Modulation of dopamine D(2) receptor signaling by actin-binding protein ABP-280. *Mol. Pharmacol.* (2000) Vol. 57 (3): 446-52
- Liu, C.H., Thangada, S., Lee, M.-J., Van Brocklyn, J.R., Spiegel, S., Hla, T.:** Ligand-induced trafficking of the sphingosine-1-phosphate receptor EDG-1. *Mol. Biol. Cell* (1999) Vol. 10: 1179-1190
- Liu, F., Wan, Q., Pristupa, Z.B., Yu, X.M., Wang, Y.T., Niznik, H.B.:** Direct protein-protein coupling enables cross-talk between dopamine D5 and GABA receptors. *Nature* (2000) Vol. 403: 274-280
- Liu, J., Blin, N., Conklin, B.R., Wess, J.:** Molecular mechanisms involved in muscarinic acetylcholine receptor-mediated G protein activation studied by insertion mutagenesis. *J. Biol. Chem.* (1996) Vol. 271 (11): 6172-8
- Liu, M. & Simon, M.I.:** Regulation by cAMP-dependent protein kinases of a G-protein-mediated phospholipase C. *Nature* (1996) Vol. 382: 83-7
- Lovenberg, T.W., Roland, B.L., Wilson, S.J., Jiang, X., Pyati, J., Huvar, A., Jackson, M.R., Erlander, M.G.:** Cloning and functional expression of the human histamine H3 receptor. *Mol. Pharmacol.* (1999) Vol. 55: 1101-7
- Mandala, S., Thornton, R., Galve-Roperh, I., Poulton, S., Peterson, C., Olivera, A., Bergstrom, J., Kurtz, M.B. & Spiegel, S.:** Molecular cloning and characterization of a lipid phosphohydrolase that degrades sphingosine-1-phosphate and induces cell death. *PNAS* (2000) Vol. 97 (14): 7859-7864
- Mandala, S., Hajdu, R., Bergstrom, J., Quackenbush, E., Xie, Jenny, Milligan, J., Thornton, R., Shei, Gan-Ju, Card, D., Keohane, C., Rosenbach, M., Hale, J., Lynch, C.L., Rupprecht, K., Parsons, W., Rosen, H.:** Alteration of lymphocyte trafficking by sphingosine-1-phosphate receptor agonists. *Science* (2002) Vol. 296: 346-9
- Marchese, A., Docherty, J.M., Nguyen, T., Heiber, M., Cheng, R., Heng, H.H.Q., Tsui, L.-C., Shi, X., George, S.R. & O'Dowd, B.F.:** Cloning of human genes encoding novel G protein-coupled receptors. *Genomics* (1994a) Vol. 23: 609-618
- Marchese, A., Cheng, R., Lee, M.C., Porter, C.A., Heiber, M., Goodman, M., George, S.R., O'Dowd, B.F.:** Mapping studies of two G protein-coupled receptor genes: an amino acid difference may confer a functional variation between a human and rodent receptor. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* (1994b) Vol. 205 (3): 1952-8

- Marchese, A., George, S.R., Kolakowski, L.F., Lynch, K.R., O'Dowd, B.F.:** Novel GPCRs and their endogenous ligands: expanding boundaries of physiology and pharmacology. *Trends Pharmacol. Sci.* (1999) Vol. 20: 370-375
- Margeta-Mitrovic, M., Jan, Y-N. & Jan, L.Y.:** A trafficking checkpoint controls GABA_B receptor heterodimerization. *Neuron* (2000) Vol. 27: 97-106
- Marinissen, M.J. & Gutkind, J.S.:** G-protein-coupled receptors and signaling networks: emerging paradigms. *Trends Pharmacol. Sci.* (2001) Vol. 22 (7): 368-376
- Marks, M.S., Woodruff, L., Ohno, H., Bonifacio, J.S.:** Protein targeting by tyrosine- and di-leucine-based signals: evidence for distinct saturable components. *J. Cell Biol.* (1996) Vol 135 (2): 341-54
- Matsuda, L.A., Lolait, S.J., Brownstein, M.J., Young, A.C., Bonner, T.I.:** Structure of a cannabinoid receptor and functional expression of the cloned cDNA. *Nature* (1990) Vol. 346: 561-4
- McAllister, G., Stanton, J.A., Salim, K., Handford, E.J. & Beer, M.S.:** Edg2 receptor functionality: Gi α 1 coexpression and fusion protein studies. *Mol. Pharmacol.* (2000) Vol. 58: 407-412
- McCune, D.F., Edelmann, S.E., Olges, J.R., Post, G.R., Waldrop, B.A., Waugh, D.J., Perez, D.M., Piascik, M.T.:** Regulation of cellular localization and signaling properties of the alpha(1B)- and alpha(1D)-adrenoceptors by agonists and inverse agonists. *Mol. Pharmacol.* (2000) Vol. 57 (4): 659-666
- McLatchie, L.M., Fraser, N.J., Main, M.J., Wise, A., Brown, J., Thompson, N., Solari, R., Lee, M.G., Foord, S.M.:** RAMPS regulate the transport and ligand specificity of the calcitonin-receptor-like receptor. *Nature* (1998) Vol. 393: 333-339
- Meunier, J.C., Mollereau, C., Toll, L., Suaudeau, C., Moisand, C., Alvinerie, P., Butour, J.L., Guillemont, J.C., Ferrara, P., Monsarrat, B., et al. :** Isolation and structure of the endogenous agonist of opioid receptor-like ORL1 receptor. *Nature* (1995) Vol. 377: 532-535
- McLean, A.J., Bevan, N., Rees, S. & Milligan, G.:** Visualizing differences in ligandregulation of wild-type and constitutively active mutant β_2 -adrenoceptor-green fluorescent protein fusion proteins. *Mol. Pharmacol.* (1999) Vol. 56: 1182-1191
- McLean, A.J. & Milligan, G.:** Ligand regulation of green fluorescent protein-tagged forms of the human β_1 - and β_2 -adrenoceptors; comparisons with the unmodified receptor. *Br. J. Pharmacol.* (2000) Vol. 130: 1825-1832
- Meyer zu Heringdorf, D., Lass, H., Alemany, R., Laser, K.T., Neumann, E., Zhang, C., Schmidt, M., Rauen, U., Jakobs, K.H., van Koppen, C.J.:** Sphingosine kinase-mediated Ca²⁺ signaling by G-protein-coupled receptors. *EMBO J.* (1998) Vol.17, No. 10: 2830-2837
- Michel, M.C., Brass, L.F., Williams, A., Bokoch, G.M., LaMorte, V.J. & Motulsky, H.J.:** α_2 -adrenergic receptor stimulation mobilizes intracellular Ca²⁺ in human erythroleukemia cells. *J. Biol. Chem.* (1998) Vol. 264: 4986-4991
- Milligan, G., Bond, R.A. & Lee, M.:** Inverse agonism: pharmacological curiosity or potential therapeutic strategy. *Trends Pharmacol. Sci.* (1995) Vol. 16: 10-3
- Milligan, G.:** Insights into ligand pharmacology using receptor-G protein fusion proteins. *Trends Pharmacol. Sci.* (2000) Vol. 21: 24-28
- Miserey-Leinkei, S., Parnot, C., Bardin, S., Corvol, P. & Clauser, E.:** Constitutive internalization of constitutively active angiotensin II AT_{1A} receptor mutants is blocked by inverse agonists. *J. Biol. Chem.* (2002) Vol. 277 (8): 5891-5901

- Möller, S., Vilo, J., Croning, M.D.R.:** Prediction of the coupling specificity of G protein coupled receptors to their G proteins. *Bioinformatics* (2001) Vol. 17, No.1: 1-8
- Moolenaar, W., Kranenburg, O., Postma, F.R., Zondag, G.C.M.:** Lysophosphatidic acid: G-protein signaling and cellular responses. *Curr. Opin. Cell Biol.* (1997) Vol. 9: 168-173
- Morrisset, S., Rouleau, A., Ligneau, X., Gbahou, F., Tardivel-Lacombe, J., Stark, H., Schunack, W., Ganellin, C.R., Schwartz, J.-C. & Arrang, J.-M.:** High constitutive activity of native H₃ receptors regulates histamine neurons in brain. *Nature* (2000) Vol. 408: 860-4
- Motohashi, K., Shibata, S., Ozaki, Y., Yatomi, Y., Igarashi, Y.:** Identification of lysophospholipid receptors in human platelets: the relation of two agonists, lysophosphatidic acid and sphingosine 1-phosphate. *FEBS Lett.* (2000) 468: 189-193
- Mullis, K.B., Faloona, F.A.:** Specific synthesis of DNA *in vitro* via a polymerase-catalysed chain reaction. *Meth. Enzymol.* (1987) Vol. 155: 335-350
- Munro, S., Thomas, K.L., Abu-Shaar, M.:** Molecular characteristics of a peripheral receptor for cannabinoids. *Nature* (1993) Vol. 365: 61-5
- Murata, N., Sato, K., Kon, J., Tomura, H., Yanagita, M., Kuwabara, A., Ui, M. & Okajima, F.:** Interaction of sphingosine 1-phosphate with plasma components, including lipoproteins, regulates the lipid mediated-action. *Biochem. J.* (2000) Vol. 352: 809-815
- Nakamura, K., Ascoli, M.:** A dileucine-based-motif in the C-terminal tail of the lutropin/choriogonadotropin receptor inhibits endocytosis of a agonist-receptor complex. *Mol. Pharmacol.* (1999) Vol. 56 (4): 728-36
- Näsman, J., Jansson, C.C., Akerman, K.E.:** The second intracellular loop of the alpha2-adrenergic receptors determines subtype-specific coupling to cAMP production. *J. Biol. Chem.* (1997) Vol. 272 (15): 9703-8
- Njuki, F., Nicholl, C.G., Howard, A., Mak, J.C., Barnes, P.J., Girgis, S.I., Legon, S.:** A new calcitonin-receptor-like sequence in rat pulmonary blood vessels. *Clin. Sci. (Lond.)* (1993) Vol. 85 (4): 385-8
- Noris, M., Morigi, M., Donadelli, R., Aiello, S., Foppolo, M., Todeschini, M., Orisio, S., Remuzzi, G., Remuzzi, A.:** Nitric oxide synthesis by cultured endothelial cells is modulated by flow conditions. *Circ. Res.* (1995) Vol. 76 (4): 536-543
- Nothacker, H.P., Wang, Z., McNeill, A.M., Saito, Y., Merten, S., O'Dowd, B., Duckles, S.P., Civelli, O.:** Identification of the natural ligand of an orphan G protein-coupled receptor involved in the regulation of vasoconstriction. *Nat. Cell Biol.* (1999) Vol. 1: 383-385
- Oda, T., Morikawa, N., Saito, Y., Masuho, Y., Matsumoto, S.:** Molecular cloning and characterization of novel type of histamine receptor preferentially expressed in leukocytes. *J. Biol. Chem.* (2000) Vol. 275 (47): 36781-36786
- Offermanns, S. & Simon, M.I.:** G α_{15} and G α_{16} couple via a wide variety of receptors to phospholipase C. *J. Biol. Chem.* (1995) Vol. 270: 15175-80
- Okazaki, H., Ishizaka, N., Sakurai, T., Kurokawa, K., Goto, K., Kamada, M., Takawa, Y.:** Molecular cloning of a novel putative G protein-coupled receptor expressed in the cardiovascular system. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* (1993) Vol. 190, No. 3: 1104-1109
- Okazaki, H., Hirata, D., Kamimura, T., Sato, H., Iwamoto, M., Yoshio, T., Masuyama, J., Fujimura, A., Kobayashi, E., Kano, S. & Minota, S.:** Effects of FTY720 in MRL-lpr/lpr mice: therapeutic potential in systemic lupus erythematosus. *J. Rheumatol.* (2002) Vol.29: 707-16
- Olivera, A., Kohama, T., Tu, Z., Milstien, S., Spiegel, S.:** Purification and characterization of rat kidney sphingosine kinase. *J. Biol. Chem.* (1998) Vol. 273: 12576-83

- Olivera, A., Kohama, T., Edsall, L., Nava, V., Cuvillier, O., Poulton, S., Spiegel, S.:** Sphingosine kinase expression increases intracellular sphingosine-1-phosphate and promotes cell growth and survival. *J. Cell Biol* (1999) Vol. 147, No. 3: 545-557
- Olivera, A. & Spiegel, S.:** Sphingosine kinase: a mediator of vital cellular functions. *Prostaglandins Other Lipid Mediat.* (2001): 123-134
- Pagano, A., Rovelli, G., Mosbacher, J., Lohmann, T., Duthey, B., Stauffer, D., Ristig, D., Schuler, V., Meigel, I., Lampert, C., Stein, T., Prézeau, L., Blahos, J., Pin, J.P., Froestl, W., Kuhn, R., Heid, J., Kaupmann, K. & Bettler, B.:** C-terminal interaction is essential for surface trafficking but not for heteromeric assembly of GABA_B receptors. *J. Neurosci.* (2001) Vol. 21 (4): 1189-1202
- Palczewski, K., Tumasaka, T., Hori, T., Behnke, C.A., Motoshima, H., Fox, B.A., Le Trong, I., Teller, D.C., Okada, T., Stenkamp, R.S., Yamamoto, M., Miyano, M.:** Crystal structure of rhodopsin: a G protein-coupled receptor. *Science* (2000) Vol. 289: 739-745
- Parrill, A.L., Wang, D.-A., Bautista, D.L., Van Brocklyn, J.R., Lorincz, Z., Fischer, D.J., Baker, D.L., Liliom, K., Spiegel, S. & Tigyi, G.:** Identification of Edg1 receptor residues that recognize sphingosine 1-phosphate. *J. Biol. Chem.* (2000) Vol. 275 (50): 39379-39384
- Postma, F.R., Jalink, K., Hengeveld, T., Moolenaar, W.H.:** Sphingosine-1-phosphate induces Rho-dependent neurite retraction: action through a specific cell surface receptor. *EMBO J.* (1996) Vol. 15: 2388-95
- Preissner, L., Ancellin, N., Michaelis, L., Creminon, C., Morel, A., Corman, B.:** Role of the carboxyl-terminal region, di-leucine motif and cysteine residues in signaling and internalization of vasopressin V1a receptor. *FEBS Lett.* (1999) Vol. 460 (2): 303-8
- Prieschl, E.E., Csonga, R., Novotny, V. & Baumruker, T.:** The balance between sphingosine and sphingosine 1-phosphate is decisive for mast cell activation after Fc epsilon receptor I triggering. *J. Exp. Med.* (1999) Vol. 190: 1-8
- Pyne S. & Pyne, N.:** Sphingosine 1-phosphate signaling via the endothelial differentiation gene family of G-protein coupled receptors. *Pharmacology & Therapeutics* (2000a) Vol. 88: 115-131
- Pyne, S. & Pyne, N.:** Sphingosine 1-phosphate signaling in mammalian cells. *Biochem. J.* (2000b) Vol. 349: 385-402
- Reinscheid, R.K., Nothacker, H.P., Bourson, A., Ardati, A., Henningsen, R.A., Bunzow, J.R., Grandy, D.K., Langen, H., Monsma, F.J., Civelli, O.:** Orphanin FQ: a neuropeptide that activates an opioid-like G protein-coupled receptor. *Science* (1995) Vol. 270: 792-4
- Roche, K.W., Tu, J.C., Petralia, R.S., Xiao, B., Wenthold, R.J. & Worley, P.F.:** Homer 1b regulates the trafficking of group I metabotropic glutamate receptors. *J. Biol. Chem.* (1999) Vol. 274 (36): 5953-7
- Rocheville, M., Lange, D.C., Kumar, U., Patel, S.C., Patel, R.C., Patel, Y.C.:** Receptors for dopamine and somatostatin: formation of hetero-oligomers with enhanced functional activity. *Science* (2000) Vol. 288: 154-7
- Ross, R., Glomset, J.A.:** Atherosclerosis and the arterial smooth muscle cell: proliferation of smooth muscle is a key event in the genesis of lesions of atherosclerosis. *Science* (1973) Vol. 180: 1332-9
- Ross, R.:** Atherosclerosis - an inflammatory disease. *N. Engl. J. Med.* (1999) Vol. 340: 115-126
- Roessig, L., Dimmeler, S., Zeiher, A.M.:** Apoptosis in the vascular wall and atherosclerosis. *Basic Res. Cardiol.* (2001) Vol. 96: 11-22

- Saeki, Y., Ueno, S., Mizuno, R., Nishimura, T., Fujimura, H., Nagai, Y., Yanagihara, T.:** Molecular cloning of an novel putative G protein-coupled receptor (GPCR21) which is expressed predominantly in mouse central nervous system. *FEBS Lett.* (1993) Vol. 336 (2): 317-322
- Sambrook, J., Fritsch, E.F., Maniatis, T.:** Molecular cloning: a laboratory manual. *Cold springs Harbor Laboratory Press* (1989) second edition
- Sanger, F., Nicklen, S., Coulson, A.R.:** DNA sequencing with chainterminating inhibitors. *Proc. Natl. Acad. Sci.* (1977) Vol. 74: 5463-5487
- Santagata, S., Boggon, T., Baird, C.L., Gomez, C.A., Zhao, J., Shan, W.S., Myszkowski, D.G., Shapiro, L.:** G-protein signaling through tubby proteins. *Science* (2001) Vol.292: 2041-2050
- Santini, F., Gaidarov, I., Keen, J.H.:** G protein-coupled receptor/arrestin3 modulation of the endocytic machinery. *J. Cell Biol.* (2002) Vol. 156 (4): 665-676
- Saunders, C. Limbird, L.E.:** Localization and trafficking of α_2 -adrenergic receptor subtypes in cells and tissues. *Pharmacology & Therapeutics* (1999) Vol. 84: 193-205
- Scheer, A. & Cotecchia, S.:** Constitutively active G protein-coupled receptors: potential mechanisms of receptor activation. *J. Receptor Signal Transduct. Res.* (1997) Vol. 17 (1-3): 57-73
- Schlador, M., Grubbs, R. D. & Nathanson, N.M.:** Multiple topological domains mediate subtype-specific internalization of the M₂ muscarinic acetylcholine receptor. *J. Biol. Chem.* (2000) Vol. 275 (30): 23295-23302
- Schmidt, M., Bieneck, C., van Koppen, C.J., Michel, M.C. & Jakobs, K.H.:** Differential calcium signaling by m2 and m3 muscarinic acetylcholine receptors in a single cell type. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol.* (1995) Vol. 352: 469-476
- Schulein, R., Hermosilla, R., Oksche, A., Dehe, M., Wiesner, B., Krause, G., Rosenthal, W.:** A dileucine sequence and an upstream glutamate residue in the intracellular carboxyl terminus of the vasopressin V2 receptor are essential for cell surface transport in COS.M6 cells. *Mol. Pharmacol.* (1998) Vol. 54 (3): 525-35
- Segredo, V., Burford, N.T., Lamah, J., Sadee, W.:** A constitutively internalizing and recycling mutant of the mu-opioid receptor. *J. Neurochem.* (1997) Vol. 68 (6): 2395-2404
- Selbie, L.A. & Hill, S.J.:** G protein-coupled-receptor cross-talk: the fine-tuning of multiple receptor-signaling pathways. *Trends Pharmacol. Sci.* (1998) Vol. 19: 87-93
- Sexton, P.M., Albiston, A., Morfis, M., Tilakaratne, N.:** Receptor activity modifying proteins. *Cell. Signal.* (2001) Vol. 13: 73-83
- Shapiro, M.J., Trejo, J., Zeng, D., Coughlin, S.R.:** Role of the thrombin receptor's cytoplasmic tail in intracellular trafficking: distinct determinants for agonist-triggered versus tonic internalization and intracellular localization. *J. Biol. Chem.* (1996) Vol. 271: 32874-80
- Shenoy, S.K., McDonald, P.H., Kohout, T.A., Lefkowitz, R.J.:** Regulation of receptor fate by ubiquitination of activated β_2 -adrenergic receptor and β -arrestin. *Science* (2001) Vol. 294: 1307-1313
- Shewan, A., Marsh, B.J., Melvin, D.R., Martin, S., Gould, G.W. & James, D.E.:** The cytosolic C-terminus of the glucose transporter GLUT4 contains an acidic cluster endosomal targeting motif distal to the dileucine signal. *Biochem. J.* (2000) Vol. 350: 99-107
- Shuster, S.J., Riedl, M., Li, X., Vulchanova, L. & Elde, R.:** Stimulus-dependent translocation of κ opioid receptors to the plasma membrane. *J. Neurosci.* (1999) Vol. 19 (7): 2658-2664

- Song, Z.H., Young 3rd, W.S., Brownstein, M.J., Bonner, T.I.:** Molecular cloning of novel candidate G protein-coupled receptor from rat brain. *FEBS Lett.* (1994) Vol. 315 (3): 375-9
- Song, Z.H., Modi, W., Bonner, T.I.:** Molecular cloning and chromosomal localization of human genes encoding three closely related G protein-coupled receptors. *Genomics* (1995) Vol. 28: 347-349
- Spiegel, S., Milstien, S.:** Sphingosine-1-phosphate: signaling inside and out. *FEBS Lett.* (2000) Vol. 476 (1-2): 55-57
- Sprang, S.R.:** G protein mechanisms: insights from structural analysis. *Annu. Rev. Biochem.* (1997) Vol. 66: 639-78
- Spyridopoulos, I. & Andrés, V.:** Control of vascular smooth muscle and endothelial cell proliferation and its implication in cardiovascular disease. *Frontiers Biosci.* (1998) Vol. 3: 269-287
- Sternweis, P.C.:** The active role of $\beta\gamma$ in signal transduction. *Curr. Opin. Cell. Biol.* (1994) Vol. 6 (2): 198-203
- Stevens, P., Bevan, N., Rees, S., Milligan, G.:** Resolution of inverse agonist-induced up-regulation from constitutive activity of mutants of the α_{1b} -adrenoceptor. *Mol. Pharmacol.* (2000) Vol. 58: 438-448
- Stosberg, A.D.:** Association of β_3 -adrenoceptor polymorphism with obesity and diabetes: current status. *Trends Pharmacol. Sci.* (1997) Vol. 18: 449-454
- Stous, G.J. & Govers, R.:** The ubiquitin-proteasome system and endocytosis. *J. Cell. Sci.* (1999) Vol. 112: 1417-1423
- Strange, P.G.:** Mechanisms of inverse agonism at G-protein-coupled receptors. *Trends Pharmacol. Sci.* (2002) Vol. 23 (2): 89-95
- Takada, Y., Kato, C., Kondo, S., Korenaga, R. & Ando, J.:** Cloning of cDNAs encoding G protein-coupled receptor expression in human endothelial cells exposed to fluid shear stress. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* (1997) Vol. 240: 737-741
- Tamama, K.-I., Kon, J., Sato, K., Tomura, H., Kuwabara, A., Kimura, T., Kanda, T., Ohta, H., Ui, M., Kobayashi, I. & Okajima.:** Extracellular mechanism through the Edg family of receptors might be responsible for sphingosine-1-phosphate-induced regulation of DNA synthesis and migration of rat aortic smooth-muscle cells. *Biochem. J.* (2001) Vol. 353: 139-146
- Tarasova, N.I., Stauber, R.H., Choi, J.K., Hudson, E.A., Czerwinski, G., Miller, J.L., Pavlakis, G.N., Michejda, C.J. & Wank, S.A.:** Visualization of G protein-coupled receptor trafficking with the aid of the green fluorescence protein: endocytosis and recycling of cholecystokinin receptor type A. *J. Biol. Chem.* (1997) Vol. 272: 14817-14824
- Taub, O., Berk, B.C.:** Laminar shear stress: mechanisms by which endothelial cells transduce an atheroprotective force. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* (1998) Vol. 18: 677-685
- Tsao, P., Cao, T., von Zastrow, M.:** Role of endocytosis in mediating downregulation of G-protein-coupled receptors. *Trends Pharmacol. Sci.* (2001) Vol. 22 (2): 91-6
- Tu, J.C., Xiao, B., Yuan, J.P., Lanahan, A.A., Leoffert, K., Li, M., Linden, D.J. & Worley, P.F.:** Homer binds a novel proline-rich motif and links group 1 metabotropic glutamate receptors with IP3 receptors. *Neuron* (1998) Vol. 21: 717-726
- Tu, J.C., Xiao, B., Naibitt, S., Yuan, J.P., Petralia, R.S., Brakeman, P., Doan, A., Aakalu, V.K., Lanahan, A.A., Sheng, M., Worley, P.F.:** Coupling of mGluR/Homer and PSD-95 complexes by the Shank family of postsynaptic density proteins. *Neuron* (1999) Vol. 23 (3): 583-592

- Unger, V.M., Hargrave, P.A., Baldwin, J.M., Schertler, G.F.:** Arrangement of rhodopsin transmembrane alpha-helices. *Nature* (1997) Vol. 389: 203-206
- Urbich, C., Walter, D.H., Zeiher, A.M., Dimmeler, S.:** Laminar shear stress upregulates integrin expression. *Circ. Res.* (2000) Vol. 87: 683-689
- Van Koppen, C.J., Meyer zu Heringdorf, D., Alemany, R., Jakobs, K.H.:** Sphingosin kinase-mediated calcium signaling by muscarinic acetylcholine receptors. *Life Sci.* (2001) Vol. 68: 2535-2540
- Van Brocklyn, J.R., Lee, M.-J., Menzeleev, R., Olivera, A., Edsall, L., Cuvillier, O., Thomas, D.M., Coopman, P.J.P., Thangada, S., Liu, C.H., Hla, T.:** Dual actions of sphingosine-1-phosphate: extracellular through the G α i-coupled receptor EDG-1 and intracellular to regulate proliferation and survival. *J. Cell Biol.* (1998) Vol. 142 (1): 229-240
- Van Brocklyn, J.R., Tu, Z., Edsall, L.C., Schmidt, R.R., Spiegel, S.:** Sphingosine 1-phosphate-induced cell rounding and neurite retraction are mediated by the G protein-coupled receptor H218. *J. Biol. Chem.* (1999) Vol.274 (8): 4626-4632
- Venter, J.C., Adams, M.D., Myers, E.W., et al.:** The sequence and analysis of the human genome. *Science* (2001) Vol. 291: 1304-1351
- Vilardaga, J.P., Frank, M., Krasel, C., Dees, C., Nissenson, R.A., Lohse, M.J.:** Differential conformational requirements for activation of G proteins and the regulatory proteins arrestin and G protein-coupled receptor kinase in the G protein-coupled receptor for parathyroid hormone (PTH)/PTH-related protein. *J. Biol. Chem.* (2001) Vol. 276 (36): 33435-43
- Wang, F., van Brocklyn, J.R., Hobson, J.R., Movafagh, S., Zukowska-Grojec, Z., Milstien, S. & Spiegel, S.:** Sphingosine 1-phosphate stimulates cell migration through a Gi-coupled receptor. *J. Biol. Chem.* (1999) Vol. 274 (50): 35343-35350
- Wedegaertner, P.B., Wilson, P.T., Bourne, H.R.:** Lipid modifications of trimeric G proteins. *J. Biol. Chem.* (1995) Vol. 270 (2): 503-6
- Wess, G., Urmann, M., Sickenberger, B.:** Medizinische Chemie: Herausforderungen und Chemie. *Angew. Chemie* (2001) Vol. 113, No.18: 3443-3453
- Wess, J., Liu, J., Blin, N., Lerche, C., Kostenis, E.:** Structural basis of receptor/G protein coupling selectivity studied with muscarinic receptors as model system. *Life Sci.* (1997) Vol. 60 (13-14): 1007-1014
- Wess, J.:** Molecular basis of receptor/G-protein coupling selectivity. *Pharmacol. Ther.* (1998) Vol. 80 (3): 231-64
- Wieland, T. & Chen, C.K.:** Regulators of G-protein signaling: a novel protein family involved in timely deactivation and desensitization of signaling via heterotrimeric G proteins. *Naunyn Schmiedebergs Arch. Pharmacol.* (1999) Vol. 360 (1): 14-26
- Wilson, S., Bergsma, D.J., Chambers, J.K., Muir, A.I., Fantom, K.G.M., Ellis, C., Murdock, P.R., Herrity, N.C., Stadel, J.M.:** Orphan G-protein-coupled receptors: the next generation of drug targets? *Br. J. Pharmacol.* (1998) Vol. 125: 1387-1392
- Windh, R.T., Lee, M.-J., Hla, T., An, S., Barr, A.J. & Maning, D.R.:** Differential coupling of the sphingosine 1-phosphate receptors Edg-1, Edg-3, and H218/Edg5 to the G $_i$, G $_q$, and G $_{12}$ families of heterotrimeric G proteins. *J. Biol. Chem.* (1999) Vol. 274 (39): 27351-27358
- Wise, A., Gearing, K., Rees, S.:** Target validation of G-protein coupled receptors. *Drug discovery today* (2002) Vol.7, No.4: 235-245
- Wonerow, P., Schöneberg, T., Schultz, G., Gudermann, T. & Paschke, R.:** Deletions in the third intracellular loop of the tyrotropin receptor. *J. Biol. Chem.* (1998) Vol. 273 (14): 7900-7905

- Xiao, B., Tu, J.C., Petralia, R.S., Yuan, J.P., Doan, A., Breder, C.D., Ruggiero, A., Lanahan, A.A., Wenthold, R.J. & Worley, P.F.:** Homer regulates the association of group 1 metabotropic glutamate receptors with multivalent complexes of homer-regulated, synaptic proteins. *Neuron* (1998) Vol. 21: 707-716
- Xiao, R.-P.:** β -Adrenergic signaling in the heart: dual coupling of the β_2 -adrenergic receptor to G_s and G_i proteins. *Sci. STKE* (2001) Vol. 104: RE15
- Xu, Y., Zhu, K., Hong, G., Wu, W., Baudhuin, L. M., Xiao, Y.-J. & Damron, D.S.:** Sphingosylphosphorylcholine is a ligand for ovarian cancer G-protein-coupled receptor 1. *Nature Cell Biol.* (2000) Vol. 2: 261-7
- Yamazaki, Y., Kon, J., Sato, K., Tomura, H., Sato, M., Yoneya, T., Okazaki, H., Okajima, F., Ohta, H.:** Edg-6 as putative sphingosine 1-phosphate receptor coupling to Ca^{2+} signaling pathway. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* (2000) Vol. 268 (2): 583-9
- Yang, L., Yatomi, Y., Miura, Y., Satoh, K. & Ozaki, Y.:** Metabolism and functional effects of sphingolipids in blood cells. *Br. J. Haematol.* (1999) Vol. 107: 282-293
- Yatomi, Y., Ruan, F., Hakomori, S. & Igarashi, Y.:** Sphingosine-1-phosphate: a platelet-activating sphingolipid released from agonist-stimulated human platelets. *Blood* (1995) Vol. 86: 193-202
- Yatomi, Y., Igarashi, Y., Yang, L., Hisano, N., Qi, R., Asazuma, N., Satoh, K., Ozaki, Y., Kume, S.:** Sphingosine 1-phosphate, a bioactive sphingolipid abundantly stored in platelets, is a normal constituent of human plasma and serum. *J. Biochem.* (1997) Vol. 121 (5): 969-973
- Yatomi, Y., Ozaki, Y., Ohmori, T., Igarashi, Y.:** Sphingosine 1-phosphate: synthesis and release. *Prostaglandins Other Lipid Mediat.* (2001) Vol. 64: 107-122
- Zerangue, N., Schwappach, B., Jan, Y.N. & Jan, L.Y.:** A new ER trafficking signal regulates the subunit stoichiometry of plasma membrane KATP channels. *Neuron* (1999) Vol. 22: 537-548
- Zhang, J., Barak, L.S., Anborgh, P.H., Laporte, S.A., Caron, M.G. & Ferguson, S.S.G.:** Cellular trafficking of G protein-coupled receptor/ β -arrestin endocytotic complexes. *J. Biol. Chem.* (1999) Vol. 274 (16): 10999-11006
- Zhu, K., Baudhuin, L.M., Hong, G., Williams, F.S. Cristina, K.L., Kabarowski, J.H., Witte, O.N. & Xu, Y.:** Sphingosylphosphorylcholine and lysophosphatidylcholine are ligands for the G protein-coupled receptor GPR4. *J. Biol. Chem.* (2001) Vol. 276 (44): 41325-41335
- Zhu, X., Gilbert, S., Birnbaumer, M. & Birnbaumer, L.:** Dual signaling potential is common among G_s -coupled receptors and dependent on receptor density. *Mol. Pharmacol.* (1994) Vol. 46: 460-9

IX Lebenslauf

Persönliche Daten

Kirsten Stoidtner (geb. Uhlenbrock)
Wendelsweg 93
60599 Frankfurt am Main
geboren am 14.03.75 in Köln

Schulbildung

1981-1985	Städtische Gemeinschaftsgrundschule Brühl-Badorf/ Rheinland
1985-1987	St.-Ursula-Gymnasium Brühl/ Rheinland
1987-1994	Pestalozzi-Gymnasium Idstein/ Taunus
16. Juni 1994	Abitur mit Note 2,2 (Leistungskurse: Biologie, Chemie)

Hochschulausbildung

WS 1994/95 - SS 1996	Philipps-Universität Marburg Studiengang: Diplom Biologie
23. Juli 1996	Vordiplom mit Note <i>gut</i>
WS 1996/97 - SS 1998	Johann Wolfgang Goethe-Universität Frankfurt am Main Studiengang: Diplom Biochemie
15. Dezember 1998	Diplomprüfung mit Note <i>sehr gut</i>
5. Januar - 5. Oktober 1999	Diplomarbeit am Max-Planck-Institut für Biophysik, Frankfurt am Main, Abteilung Molekulare Membranbiologie (Prof. H. Michel) zum Thema: “Produktion von Disulfidbrücken-stabilisierten Antikörper-Fv-Fragmenten in der methylotrophen Hefe <i>Pichia pastoris</i> : Klonierung, Expression und Charakterisierung.”
6. Oktober 1999	Diplom-Biochemiker-Hauptprüfung mit der Gesamtnote <i>sehr gut mit Auszeichnung</i>
1. März 2000 - 30. Juni 2002	Dissertation bei Aventis Pharma Deutschland GmbH, Frankfurt am Main, Abteilung Herz-Kreislauf zum Thema: “Funktionelle Charakterisierung der humanen <i>orphan</i> G-Protein-gekoppelten Rezeptoren <i>gpr3</i> , <i>gpr6</i> und <i>gpr12</i> : Ligandenidentifizierung, Expression und potentielle Bedeutung im Herz-Kreislauf-System.”
seit 15. Juli 2002	PostDoc im Uniklinikum Frankfurt am Main, Stiftung Immunpharmakologie (Prof. Pfeilschifter) zum Thema: „Die Rolle von Lipidmediatoren und Chemokinen für die Aktivierung und Migration von Entzündungszellen.“

Verzeichnis der akademischen LehrerMarburg

Botanik:	Prof. Throm, Prof. Galland
Zoologie:	Prof. Kirchner, Prof. Seiz
Chemie:	Prof. Aurich, Prof. Perst, Prof. Lorberth, Prof. Reichhardt
Physik:	Prof. Neumann, Prof. Fuß, Prof. Waßmuth
Mathematik:	Prof. Dressler
Genetik:	Prof. Klein
Mikrobiologie:	Prof. Buckel
Tierphysiologie:	Prof. Kalmring, Prof. Heldmair
Pflanzenphysiologie:	Prof. Senger

Frankfurt/Main

Biochemie:	Prof. Fasold, Prof. Kramer, Prof. Richter (Uni Homburg/Saar)
Molekularbiologie:	Prof. Ludwig
Mikrobiologie:	Prof. Pons, Prof. Kröger, Prof. Steiger
Biophysikalische Chemie:	Prof. Rüterjans, Prof. Bamberg, Prof. Michel
Pharmakologie:	Prof. Müller, Prof. Lambrecht, Prof. Pfeilschifter
Zoologie:	Prof. Bereiter-Hahn
Tierphysiologie:	Prof. Prinzing