

Aus der Klinik für Kardiologie und Pulmologie
der Medizinischen Fakultät Charité – Universitätsmedizin Berlin

DISSERTATION

Liganden-abhängige und -unabhängige
Signalübertragungswege von G-Protein gekoppelten
Rezeptoren der Mrg-Familie

zur Erlangung des akademischen Grades
Doctor medicinae dentariae (Dr. med. dent.)

vorgelegt der Medizinischen Fakultät
Charité – Universitätsmedizin Berlin

von

Sonja Grajewski

aus Berlin

Gutachter: 1. Prof. Dr. Thomas Walther
2. Prof. Dr. Holger Stepan
3. PD Dr. Doris Albrecht

Datum der Promotion: 21. November 2008

*Meinen
Lieben
Eltern*

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

AA	Arachidonsäure
AC	Adenylatcyclase
ACE	Angiotensin-Konversionsenzym
ACE2	„ACE-related Carboxypeptidase“
Akt	Proteinkinase B
Ala	Alanin
Amp	Ampicillin
AngI/II/III/IV	Angiotensin I/II/III/IV
Ang-(1-5)	Angiotensin-(1-5)
Ang-(1-7)	Angiotensin-(1-7)
Ang-(1-9)	Angiotensin-(1-9)
AOGEN	Angiotensinogen
APA	Aminopeptidase
APN	Aminopeptidase N
Arg	Arginin
AS	Aminosäure
Asn	Aspargin
Asp	Asparginsäure
ATP	Adenosintriophosphat
AT ₁	Angiotensin-II-Rezeptor-Subtyp-1-Antagonist
AT ₂	Angiotensin-II-Rezeptor-Subtyp-2-Antagonist
B	Basalwert
BAE-Zellen	„bowine aortic endothelial“-Zellen
Balb3T3	murine Fibroblasten Zelllinie
BAM22	„bovine adrenal medulla 22“
Basal	Basalwert
bidest	bidestilliertes Wasser
bp	Basenpaare
BPV	Blutdruckvariabilität
C	Cystein
Ca ²⁺	Calcium ²⁺ -Ionen
cAMP	cyclo-Adenosinmonophosphat
cGMP	cyclo-Guanosinmonophosphat
cDNA	komplementäre (copy) DNA
CHO	„Chinese hamster ovary“
CO ₂	Kohlenstoffdioxid
COS	„African green monkey kidney“-Zellen
cPLA ₂	zytosolische Phospholipase A ₂
CST-14	Cortistatin-14
DAG	Diacylglycerol
D-AMP	Dipeptidyl-Aminoepitidase
dATP	Desoxyadenosintriophosphat
dCTP	Desoxycytosintriophosphat
dGTP	Desoxyguanosintriophosphat
D-MEM	Dulbecco's modifiziertes Eagle's Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid

DNA	Desoxyribonukleinsäure
DNase	Desoxyribonuklease
dNTP	Desoxynukleotidtriphosphate
DRG	dorsale Ganglienwurzel
DTT	Dithiothreitol
dTTP	Desoxythymidintriphosphat
ECL	extrazelluläre Schleife
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EKR	„extracellular-regulated kinase“
eNOS	endotheliale NO-Synthase
FBS	Fötale Kälberserum
FF	„Firefly“
FLAG	„fluorescent amplicon generation“
Flp-In T-Rex	„Tetracyclin related expression“ Zellsystem
FMRFamid	Phenylalanin-Methionin-Arginin-Phenylalanin-Amid
GABA	γ -Aminobuttersäure
GDP	Guanosindiphosphat
Glu	Glutaminsäure
Gly	Glycin
GPCR	G-Protein gekoppelter Rezeptor
GTE	Glukose-Tris-EDTA
GTP	Guanosintriphosphat
HBSS	Hank`s Buffered Salt Solution
HCl	Chlorwasserstoff
HEPES	N-2-hydroxyethylpiperazin-N'-2-ethanolsulfonsäure
HEK293A-Zellen	„Human embryonic kidney“ Zellen
His	Histidin
H ₂ O	Wasser
HRV	Herzrhythmusvariabilität
HS	Homo sapiens
I	Isoleucin
IEG	„Immediate Early Gene“
Ile	Isoleucin
Il-1	Interleukin 1
IP ₃	Inositol-1,4,5-Trisphosphat
IPTG	Isopropyl- β -Thioalactopyranoside
IRAP	Insulin regulierte Aminopeptidase
K ⁺	Kaliumion
kb	Kilo-Basenpaare
kDa	kiloDalton
LB-Medium	„Luria Broth“-Medium
Leu	Leucin
LPA	Lysophosphatidsäure
LPS	Lipopolysaccharid
Lsg	Lösung
LTP	Langzeit-Potenzierung
M	Marker
MAP	„mitogen-activated protein“
MgCl ₂	Magnesiumchlorid

mGPR90	„murine g-proteine receptor 90 gene“
MM	Mus musculus
Mrg	„Mas related gene“
mRNA	„messenger“-RNA“
γ_2 -MSH	„ γ_2 -melanocyte-stimulating hormone“
Na ⁺	Natriumion
NaCl	Natriumchlorid
NaHCO ₃	Natriumhydrogenkarbonat
NaOH	Natriumhydroxid
NEP	Neutrale Endopeptidase
NFAT	nukleärer Faktor aktivierter T-Lymphozyten
NF κ B	Nukleärer Faktor κ B
NIH	Zelllinie aus den embryonalen Fibroblasten der Maus
NO	Stickstoffmonoxid
NPAF	Neuropeptid AF
NPFF	Neuropeptid FF
ORF	„open reading frame“
PAMP	Proadrenomedullin N-terminal Peptide
PCR	Polymerase-Ketten-Reaktion
PCP	Prolyl-Carboxypeptidase
PDE	Phosphodiesterase
Pen	Penicillin
PEP	Prolyl-Endopeptidase
Phe	Phenylalanin
PLC	Phospholipase C
PLA ₂	Phospholipase A ₂
PI ₃ K	Phosphatidylinositol-3-Kinase/
PIP ₃	Phosphoinositol-3,4,5-trisphosphat
PKC	Proteinkinase C
Pro	Prolin
PTX	Pertussistoxin
PTZ	Pentylentetrazol
P ₂ X ₃	Purinrezeptor Subtyp 3
RAS	Renin-Angiotensin-System
RE	Restriktionsenzym
RL	„Renilla Luciferase“
RLU	„relative light units“
RN	Rattus Norwegicus
RNA	Ribonukleinsäure
RNase	Ribonuklease
rpm	Umdrehungen pro Minute
RTA	„Rat thoracic aoHSMrgF“
S	Serin
Sar	Sarcosin
SDS	Natruimdodecylsulfat
Ser	Serin
SNSR	„sensory neuron-specific G-protein receptor“
SRE	Serum Response Element
SRF	Serum Response Factor
SSTR1-5	Somatostatin-Rezeptoren

Strep	Streptomycin
Sbjct	Subjekt
TAE	Tris-Acetat-EDTA-Puffer
TE	Tris-EDTA-Puffer
TMD	transmembrane Domäne
TMH	transmembrane Helix
TCF	„Ternery Complex Factor“
TNF α	Tumor-Nekrose-Faktor α
TPA	Tetradecanoyl-Phorbolacetat
Tris	Trishydroxymethylaminomethan
Tyr	Tyrosin
UUO	unilateral Ureta-Obstruktion
UV	Ultraviolett
Val	Valin
VSMC	„vascular smooth muscle cell“
X-Gal	5-Brom-4-Chlor-3-indoyl- β -D-galaktosid
ZNS	Zentrales Nervensystem

Die Abkürzungen zur Bezeichnung der Aminosäuren und Nukleotide entsprechen der Drei- bzw. Einbuchstaben-Nomenklatur.

Inhaltsverzeichnis

1.	Einleitung	1
1.1	Das <i>Mas</i> -Protoonkogen	1
1.1.1	Die Identifizierung des <i>Mas</i> -Protoonkogens	1
1.1.2	Der Sequenzvergleich auf mRNA und Proteinebene	1
1.1.3	Die Expression von <i>Mas</i>	2
1.1.4	Der <i>Mas</i> -Rezeptor innerhalb der Familie G-Protein gekoppelter Rezeptoren	3
1.1.5	Die Wege der Signaltransduktion G-Protein gekoppelter Rezeptoren	3
1.1.6	<i>Mas</i> als Teil des Renin-Angiotensin-Systems	5
1.1.6.1	Der allgemeine Aufbau des Systems	6
1.1.6.2	Biologisch aktive Angiotensin-Metabolite	7
1.1.6.3	Assoziation von <i>Mas</i> mit dem Ang-(1-7)-Signalweg	9
1.1.6.4	Interaktion von <i>Mas</i> mit dem AngiotensinII-Rezeptor AT ₁	10
1.1.7	Die Bedeutung von <i>Mas</i> unter physiologischen und pathophysiologischen Bedingungen	11
1.2	Die Familie der „ <i>Mas</i> -Related-Genes“	12
1.2.1	Die Klassifizierung der <i>Mrg</i> -Familie	13
1.2.2	Der MRG-Rezeptor	14
1.2.3	Der <i>MrgF</i> -Rezeptor	14
1.2.4	Der murine <i>MrgH</i> -Rezeptor	15
1.2.5	Der humane <i>MrgX1</i> -Rezeptor	15
1.2.6	Der humane <i>MrgX2</i> -Rezeptor	15
1.2.7	Der humane <i>MrgX3</i> -Rezeptor	16
1.2.8	Der <i>MrgD</i> -Rezeptor	17
1.2.9	Interaktionen von <i>Mrgs</i>	17
1.3	Signaltransduktion und Transkriptionsfaktoren	17
1.3.1	Das „Serum Response Element“	18
1.3.2	Der Transkriptionfaktor NFκB	19
1.4	Ziel dieser Arbeit	20
2.	Material	21
2.1	Bakterien- und Zelllinien	21
2.2	Vektoren	21
2.2.1	Vektoren zur Klonierung	21

2.2.2	Vektoren mit klonierten Fragmenten.....	23
2.2.3	Reportervektoren	23
2.3	Enzyme	23
2.4	Oligonukleotide (Primer).....	23
2.5	Chemikalien.....	24
2.6	Peptide und ihre Sequenzen.....	25
2.7	Medien für Bakterienkulturen	25
2.8	Medien für Zellkulturen.....	26
2.9	Stammlösungen, Puffer und Gele	27
2.9.1	Stammlösungen und Puffer	27
2.9.2	Gele.....	28
2.10	Gebrauchsfertige Reaktionssysteme.....	29
2.11	Geräte.....	29
3.	Methoden.....	30
3.1	DNA.....	30
3.1.1	Polymerase-Kettenreaktion	30
3.1.2	Agarosegel-Elektrophorese	31
3.1.3	DNA-Isolierung aus einem präparativen Gel	31
3.1.4	DNA-Konzentrationsbestimmung	32
3.1.5	Dephosphorylierung von Vektorenden.....	32
3.1.6	Ligation von DNA-Fragmenten.....	32
3.1.7	DNA-Transformation in Bakterien.....	33
3.1.8	Präparation von Plasmid-DNA	33
3.1.8.1	Mini-Präparation.....	34
3.1.8.2	Maxi-Präparation	34
3.1.9	Restriktionsverdau	34
3.1.10	DNA-Sequenzierung und Sequenzanalyse	35
3.1.10.1	Sequenzierung	35
3.1.10.2	Sequenzanalyse.....	35
3.2	Zellkultur	36
3.2.1	Das Auftauen der Zellen.....	36
3.2.2	Kultivierung der HEK-, NIH- und Endothel-Zellen.....	36
3.2.2.1	Die Kultivierung der HEK293A-Zelllinie	36
3.2.2.2	Kultivierung der NIH3T3-Zelllinie	36

3.2.2.3	Die Kultivierung der BAE-Zellen	36
3.2.3	Trypsinisieren der Zellen.....	37
3.2.4	Einfrieren der Zellen.....	37
3.2.5	Das Dual-Luciferase® Reporter Assay System	37
3.2.6	Die Transfektion	38
3.2.7	Stimulation der HEK293A-Zelllinie mit Angiotensin-Metaboliten.....	39
3.2.8	Die Messung	39
3.3	Statistische Auswertung	40
4.	Ergebnisse.....	41
4.1	Konstitutive Rezeptoraktivität in der Mrg-Rezeptor-Familie	41
4.1.1	Nachweis der konstitutiven Aktivität des humanen Mas-Rezeptors und des Mas-Rezeptors der Ratte in HEK293A-Zellen.....	42
4.1.2	Untersuchung zur konstitutiven Aktivität der humanen MRG-, MrgD-, MrgF-, MrgX1-, MrgX2-, MrgX3-, und MrgX4- und des murinen MrgH-Rezeptors in HEK293A-Zellen.....	43
4.1.3	Dosis-Wirkungs-Kurve für die HSMrgD- und HSMrgX4-Rezeptoren in HEK293A-Zellen.....	44
4.1.4	Klonierung von cDNA anderer Mitglieder der Mrg-Familie	45
4.1.4.1	Die Amplifikation von cDNA anderer Mitglieder der Mrg-Familie	46
4.1.4.2	Klonierung von humanen MrgE- und MrgG-Fragmenten in Expressions-Vektoren	48
4.1.4.3	Klonierung der MrgE- und MrgG-Fragmente der Ratte in Expressions-Vektoren	56
4.1.5	Untersuchung zur konstitutiven Aktivität der neu isolierten Rezeptoren.....	59
4.1.6	Untersuchung zur konstitutiven Aktivierung des Transkriptions-faktors NFκB... 60	
4.1.7	Untersuchung zur konstitutiven Aktivität der humanen MRG-, MrgD-, MrgE-, MrgF-, MrgG-, MrgX1-, MrgX2-, MrgX3- und MrgX4-Rezeptoren, des murinen MrgH-Rezeptors und der Mas-, MrgE- und MrgG-Rezeptoren der Ratte in NIH3T3-Zellen	61
4.1.8	Untersuchung zur konstitutiven Aktivität der humanen Mas-, MrgD-, MrgE-, MrgG- und MrgX4-Rezeptoren in BAE-Zellen	63
4.2	Identifizierung von Angiotensin-Metaboliten als mögliche Rezeptorliganden....	64
4.2.1	Interaktion der Angiotensin-Metabolite mit dem humanen Mas-Rezeptor.....	64

4.2.2	Interaktion der Angiotensin-Metabolite mit dem humanen MrgD- und MrgX4-Rezeptor.....	66
4.2.3	Interaktion der Angiotensin-Metabolite mit dem humanen MrgE- und MrgG-Rezeptor.....	67
4.3	Rezeptor/Rezeptor-Interaktionen.....	69
4.3.1	Interaktion der humanen Mas- und MrgD-Rezeptoren	69
4.3.2	Interaktion der humanen Mas- und MrgX4-Rezeptoren	70
4.3.3	Interaktion der humanen Mas- und MrgE-Rezeptoren.....	70
4.3.4	Interaktion der humanen Mas- und MrgG-Rezeptoren	71
4.3.5	Interaktion der humanen MrgD- und MrgX4-Rezeptoren.....	72
4.3.6	Interaktion der humanen MrgD- und MrgE-Rezeptoren	72
4.3.7	Interaktion der humanen MrgD- und MrgG-Rezeptoren.....	73
4.3.8	Interaktion der humanen MrgX4- und MrgE-Rezeptoren	74
4.3.9	Interaktion der humanen MrgX4- und MrgG-Rezeptoren.....	74
4.3.10	Interaktion der humanen MrgE- und MrgG-Rezeptoren	75
4.3.11	Dosisabhängiger Effekt von HSMrgE auf die konstitutive Aktivität von HSMas	76
4.3.12	Dosisabhängiger Effekt von HSMrgE auf die konstitutive Aktivität von HSMrgD	76
5.	Diskussion.....	78
5.1	Die Vielfalt der Signalwege des G-Protein gekoppelten Rezeptors Mas.....	78
5.2	Angiotensin-Metabolite als mögliche Liganden des Mas-Rezeptors	80
5.3	Mögliche Liganden und intrazelluläre Signalwege der Mrg-Rezeptorfamilie.....	83
5.4	Rezeptor-/Rezeptor-Interaktion innerhalb der Mrg-Familie	88
6.	Zusammenfassung	94
7.	Literaturverzeichnis	96
8.	Anlage	108
9.	Danksagung.....	117
10.	Eidesstattliche Erklärung	118
11.	Curriculum vitae.....	119

1. Einleitung

1.1 Das *Mas*-Protoonkogen

1.1.1 Die Identifizierung des *Mas*-Protoonkogens

Erstmalig wurde das *Mas*-Protoonkogen von Young *et al.* (1986) beschrieben und aus einem menschlichen Epidermalkarzinom isoliert. Dabei konnte gezeigt werden, dass das *Mas*-Gen nach Transfektion in NIH3T3-Fibroblasten und nachfolgender Injektion der transfizierten Zellen in Nacktmäuse Tumore auslösen konnte. Dieses Phänomen wurde durch einen Transfektionseffekt initiiert, bei dem es zu einer Neuordnung von DNA-Elementen im 5'-Bereich des Gens kam. Der Vergleich von nicht transfizierter mit transfizierter DNA ließ auf ein Rekombinationselement schließen, welches nach Induktion durch Transformation aus dem Protoonkogen-Promotorbereich deletiert wurde. Folglich kam es zur unkontrollierten Expression des Gens. Zusätzlich fand man in vier weiteren unabhängigen Transfektionsexperimenten bei isolierten und veränderten *Mas*-Genen eine in dem unveränderten *Mas*-Gen nicht vorhandene Sequenz, die als ein „alpha-satellite repeat“ identifiziert wurde (van 't Veer *et al.*, 1993), das vom Chromosom 3 stammt. Diese Erweiterung wurde 2-3kb vor der kodierenden Region des *Mas*-Gens beschrieben. Allerdings ist bis heute keine Mutation in der 5'-flankierenden Region des *Mas*-kodierenden Exons für einen Primärtumor beschrieben.

Das menschliche *Mas*-Gen konnte durch *in-situ*-Hybridisierung auf dem distalen Arm des Chromosom 6q nachgewiesen werden (Rabin *et al.*, 1987). Walther *et al.* (unpubliziert) konnten das *Mas*-Gen der Ratte dem Chromosom 1 zuordnen. Bei der Maus ist das Gen auf dem proximalen Arm des Chromosoms 17 lokalisiert (Cebra-Thomas *et al.*, 1992), in direkter Nachbarschaft zum *Igf2r*-Gen (Insulin-like growth factor type 2 receptor). Interessanterweise liegt damit das *Mas*-Gen in unmittelbarer Nachbarschaft von Genorten, die Leukämie auslösen können. Nach struktureller Deletion dieses Chromosomenabschnittes kam es zur malignen Transformation und zur Tumorbildung. Ein Nachweis der *Mas*-Expression war in untersuchten Leukämie-Zelllinien allerdings nicht möglich (Jucker *et al.*, 1990).

1.1.2 Der Sequenzvergleich auf mRNA und Proteinebene

Der kodierende Bereich des *Mas*-Gens konnte beim Menschen (Young *et al.*, 1986), der Ratte (Young *et al.*, 1988) und der Maus (Metzger *et al.*, 1995) isoliert und sequenziert werden. In der abgeleiteten AS-Sequenz fand man 7 hydrophobe Domänen, die als Transmembrandomänen

eines membranständigen Rezeptors identifiziert werden konnten. Dieses Muster ist für die Familie der G-Protein gekoppelten Rezeptoren (GPCR) charakteristisch (Probst *et al.*, 1992). Die Sequenz des Mas-Proteins ist beim Menschen 325 AS lang (Young *et al.*, 1986) und bei Maus und Ratte jeweils um eine AS kürzer (Abb.1.1; 324 AS). Diese zusätzliche AS beim humanen Mas-Protein befindet sich an Position 11. Das Maus-Mas-Protein zeigt 97% Homologie zum Ratten- und 91% Homologie zum humanen Mas-Protein (Young *et al.*, 1988; Metzger *et al.*, 1995). Dabei treten die größten Sequenzunterschiede in den ersten 20 AS des Amino-terminalen Endes auf. Bezüglich der GPCR gibt es weitere Homologien, so wird der „open reading frame“ (ORF) von Mas wie bei 90% der GPCR von Säugetieren nicht durch ein Intron unterbrochen (Gentles *et al.*, 1999).

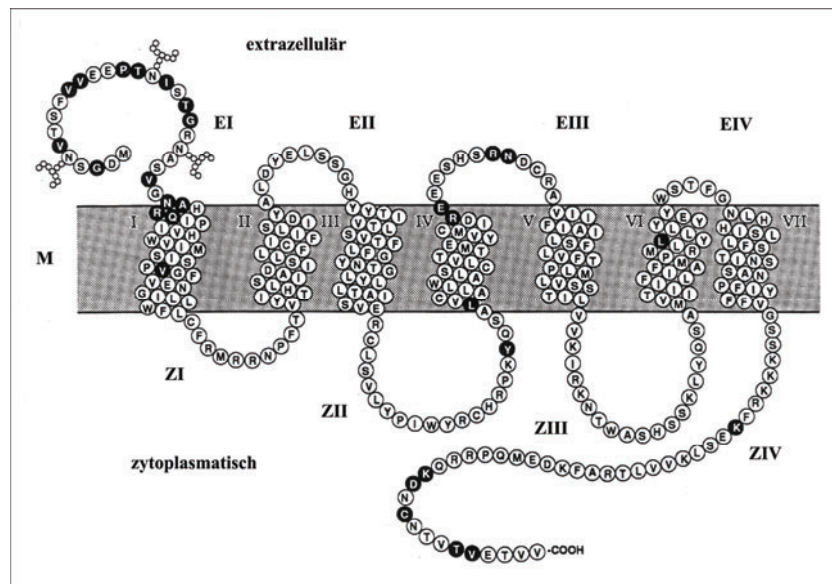


Abb.1.1: Die Aminosäuresequenz des Mas-Genprodukts der Ratte und seine mögliche Faltung in der Zellmembran. Die schwarz unterlegten Aminosäuren sind zwischen humanen und Ratten-Rezeptor verschieden (Hanley *et al.*, 1989).

1.1.3 Die Expression von Mas

Das *Mas*-Gen wird vornehmlich im Vorderhirn und Hoden und in geringen Konzentrationen auch im Herzen und der Niere exprimiert (Young *et al.*, 1988; Metzger *et al.*, 1995; Alenina *et al.*, 2002). Im Hoden fand man durch *in-situ*-Hybridisierung eine deutliche *Mas*-Expression in Leydig-Zellen, die in Sertoli-Zellen schon weniger und in primären Spermatozyten nur noch schwach lokalisiert werden konnte. *Mas* ist nicht in Leber, Milz, Skelettmuskel, Zunge, Kleinhirn, Uterus und in Embryos an den Tagen 11,5, 13,5 und 15,5 nach der Befruchtung detektierbar (Alenina *et al.*, 2002). Im Gehirn ist *Mas*-mRNA vornehmlich in Neuronen der

Hippocampusformation, den olfaktorischen Tuberkeln, dem piriformen Kortex und in der Amygdala lokalisiert (Bunnemann *et al.*, 1990; Martin *et al.*, 1992; Metzger *et al.*, 1995). Nach neuronaler Aktivierung nimmt die *Mas*-Expression vornehmlich im Hippocampus, aber auch im Kortex und Thalamus zu (Martin *et al.*, 1992). Demnach wird *Mas* eine Rolle in der synaptischen Plastizität und dem Gedächtnis zugesprochen. Kitaoka *et al.* (1994) wiesen das *Mas*-Gen in der Retina von Rhesus-Affen nach.

1.1.4 Der Mas-Rezeptor innerhalb der Familie G-Protein gekoppelter Rezeptoren

Der Mas-Rezeptor gehört zur Familie der transmembranen Rezeptoren mit sieben hydrophoben Domänen. Bis heute sind mehr als 800 humane unterschiedliche GPCR bekannt, die somit eine der größten Rezeptorenfamilien ausmachen (Fredriksson *et al.*, 2003). GPCR sind Membranproteine und können durch exogene und endogene Liganden aktiviert werden. Zu den exogenen Liganden gehören Geschmack- und Duftstoffe und zu den endogenen Liganden Neurotransmitter und Hormone (Ji *et al.*, 1998). Die humanen GPCRs können in fünf eindeutige Familien eingeteilt werden (Familie G: Glutamat Rezeptor, 15 Mitglieder; Familie R: Rhodopsin, 701 Mitglieder; Familie A: Adhäsions-Rezeptoren, 24 Mitglieder; Familie F: „frizzled“/Geschmack Rezeptoren, 24 Mitglieder; Familie S: Sekretin Rezeptoren, 15 Mitglieder). Diese Klassifikation basiert auf Charakteristika der transmembranen Domänen, die anhand von phylogenetischen Analysen identifiziert wurden. Die Rhodopsin-Familie ist mit ihren 701 Mitgliedern die größte der fünf Familien und wird weiter in vier Untergruppen (α , β , γ , δ) unterteilt. Der HSMas-Rezeptor gehört in die δ -Gruppe der Rhodopsin-Familie (Fredriksson *et al.*, 2003).

1.1.5 Die Wege der Signaltransduktion G-Protein gekoppelter Rezeptoren

Viele Hormone, Wachstumsfaktoren oder Neurotransmitter können ihre Wirkung nicht direkt an der Zelle auslösen. Nach der Bindung an einen spezifischen Rezeptor wird eine mehrschichtige Signalkette in Gang gesetzt. Es erfolgt eine intrazelluläre Konzentrationsänderung eines so genannten „second messenger“, wie z.B. AA, cAMP, cGMP, DAG, IP₃, PIP₃ oder Phosphat Säure, der dann Informationen auf die regulierenden Prozesse in der Zelle überträgt. Diese Interaktionen führen zu einer enormen Verstärkung des extrazellulären Signals in der Zelle.

Die heterotrimeren G-Proteine sind membranständige Moleküle; sie bestehen aus drei unterschiedlichen Proteinketten, den α -, β - und γ -Untereinheiten. Von den einzelnen Untereinheiten existieren mehrere Isoformen. Bisher sind 21 unterschiedliche G_α -Proteinuntereinheiten, 5 β -Untereinheiten und 12 γ -Untereinheiten bekannt (Hamm, 1998). Die α -Untereinheit bindet GTP, das zu GDP hydrolysiert wird. Die Untereinheiten α_s und α_q wirken stimulierend, die Untereinheit α_i und α_o inhibierend auf den Folgeprozess. Im inaktiven Zustand hat der trimere Komplex GDP gebunden. Nach Bindung eines Agonisten wird GDP zu GTP und der $G_{\alpha\beta\gamma}$ -GTP-Komplex dissoziiert in die G_α -GTP-Untereinheit und in die $G_{\beta\gamma}$ -Untereinheit, die jeweils unabhängig verschiedene Effektoren aktivieren. So kann über die Aktivierung der Adenylatcyclase (AC) der „second messenger“ cAMP gebildet werden.

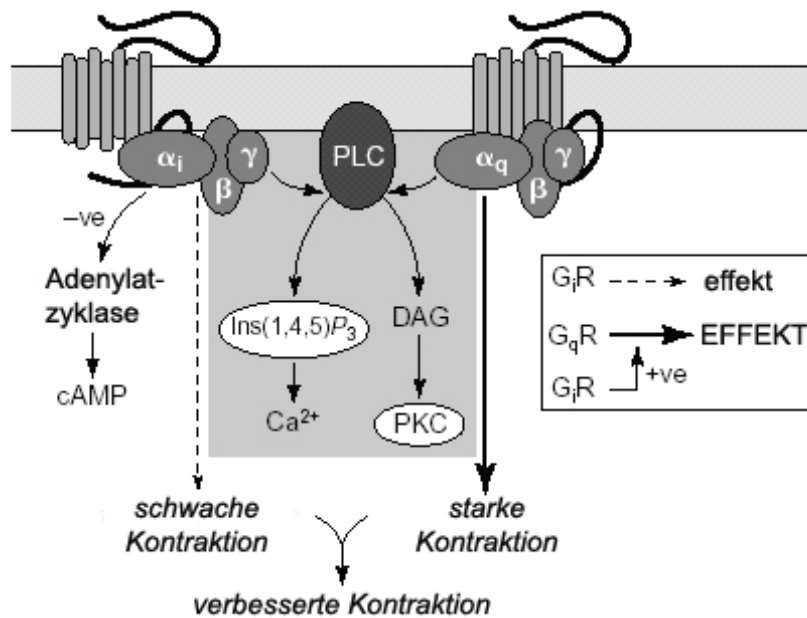


Abb. 1.2 Schematische Darstellung möglicher Signaltransduktionswege nach GPCR-Aktivierung durch Bindung eines Liganden. Sowohl G_i - als auch G_q -gekoppelte Rezeptoren stimulieren Phospholipase C (PLC), wodurch Inositol-(1,4,5)-Triphosphat (IP_3) und Diacylglycerol (DAG) freigesetzt werden (Selbie et al., 1998; Takai et al., 2001).

Eine Aktivierung der Phospholipase C (PLC) führt nach Phosphorylierung zur Umwandlung von Phosphatidylinositol in zwei „second messenger“: IP_3 und DAG. IP_3 bewirkt im Zytosol eine Freisetzung von Ca^{2+} . DAG verbleibt in der Zellmembran und aktiviert dort eine Ca^{2+} -Phospholipid-abhängige Proteinkinase C, die zur Modifikation biologisch wichtiger Proteine beiträgt (Abb1.2). Damit ist das Ca^{2+} -Ion neben cAMP, cGMP, DAG, IP_3 , NO usw. eines der wichtigsten „second messenger“-Moleküle für die Signalübertragung in allen Zellen von Prokaryonten bis

hin zu Kardiomyozyten und spezialisierten Neuronen (Davis, 1992; Berridge, 1993). Neben diesen verschiedenen Signalwegen können die heterotrimeren G-Proteine ihr Signal zusätzlich mittels der Aktivierung kleiner G-Proteine (monomere G-Proteine) weiterleiten (Bhattacharya *et al.*, 2004). Sie sind meist monomere GTP-bindende Proteine mit einer Molekülmasse von 20-30kDa. Derzeit sind über 100 verschiedene kleine G-Proteine bekannt, die auf Grund phylogenetischer Gemeinsamkeiten und Unterschiede in 5 Familien unterteilt werden: Ras, Rho/Rac/cdc42, Rab, Sar1/Arf und Ran (Takai *et al.*, 2001). Sie sind im Zellzyklus an der Regulation zahlreicher Zellfunktionen beteiligt, z.B. der Regulation der Gentranskription (Ras und Rho), der Regulation des Zytoskeletts (Rho), der Regulation des Vesikeltransports (Rab und Sar1/Arf) sowie der Regulation des Transports zwischen Zytoplasma und Zellkern (Ran).

1.1.6 Mas als Teil des Renin-Angiotensin-Systems

Das Renin-Angiotensin-System (RAS) ist ein hochkomplexes und aus einer Reihe von Peptiden und Rezeptoren bestehendes Netzwerk mit ebenso vielen verschiedenen Funktionen. Im klassischen Sinne spaltet Angiotensinogen (AOPEN), das hauptsächlich in der Leber synthetisiert wird, das aus den juxtaglomerulären Zellen der Niere sezernierte Renin zu Angiotensin (Ang)I. AngI ist ein Dekapeptid, das selbst offenbar keine biologische Aktivität besitzt. Es kann durch verschiedene Proteasen in biologisch aktive Peptide umgewandelt werden, wie AngII [Ang-(1-8)], AngIII [Ang-(2-8)], AngIV [Ang-(3-8)], Ang-(1-7) und Ang-(1-9).

Die ersten Schritte zur Identifikation der Funktion des *Mas*-Gens haben Jackson *et al.* (1988) unternommen. Menschliche *Mas*-mRNA wurde in Frosch-Oozyten transfiziert und mit AngI, AngII und AngIII stimuliert. Bei der Stimulation mit AngII und AngIII konnte ein intrazellulärer Ca^{2+} -Anstieg festgestellt werden und eine Aktivierung der DNA-Synthese. Aus diesem Grund wurde postuliert, dass das Mas-Protein als AngII-Rezeptor fungiert. Auf diese Weise wurde auch gezeigt, dass AngII und AngIII eine [3H]Thymidin-Aufnahme in *Mas*-exprimierenden Zellen auslösen können (Jackson *et al.*, 1989). Weiterhin konnte eine Anreicherung von Inositolphosphat nach Stimulation mit AngII und AngIII in Nervenzellen, die mit Mas transfiziert worden waren, beobachtet werden (Jackson *et al.*, 1989; Poyner *et al.*, 1990). Eine vergleichbare Antwort wies man in Mas-transfizierten COS-7-Zellen (McGillis *et al.*, 1989) und Balb3T3-Zellen (Andrawis *et al.*, 1991) nach. Allerdings ließ sich der Ca^{2+} -Anstieg nicht mit den klassischen AngII-Antagonisten [Sar1, Val5, Ala8]-AngII und [Sar1, Val5]-AngII blockieren, wodurch Zweifel entstanden, ob der Mas-Rezeptor wirklich ein AngII-Rezeptor ist. Anfang der 90er-Jahre wurden die Hauptrezeptoren für AngII isoliert und charakterisiert, AT₁- und AT₂.

Dabei hat die humane Mas-Sequenz nur 8% Homologie zum AT₁- (Sasaki *et al.*, 1991) und 9% zum AT₂-Rezeptor (Mukoyama *et al.*, 1993).

1.1.6.1 Der allgemeine Aufbau des Systems

Das RAS ist eine Kaskade von verschiedenen Hormonen und Enzymen und spielt eine wichtige Rolle in der Regulation der kardiovaskulären Physiologie, der Homöostase und Zellfunktion. Am Anfang spaltet Renin das in der Leber gebildete AOPEN zu AngI. AngI ist selbst weitgehend inaktiv. In Gegenwart von ACE, Chymase oder Cathepsin A wird AngI in das Oktapeptid AngII gespalten. Zirkulierendes AngII entfaltet seine Wirkung über AT₁- und AT₂- Rezeptoren und kann einmal über ein „systemisches“ RAS oder über ein „lokales“ RAS, welches

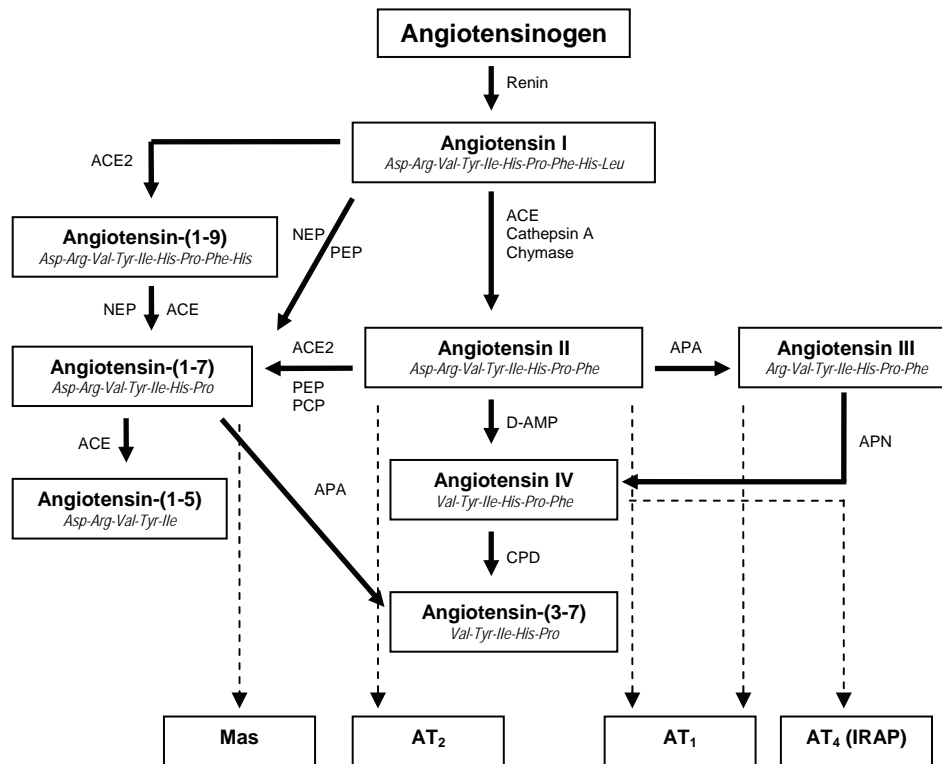


Abb. 1.3 Schematische Darstellung des Renin-Angiotensin-Systems. Von Bedeutung ist, dass die bioaktiven Ang-Metabolite Ang-(1-7) und AngIV ihre Wirkung über eigene Rezeptoren initiieren. A-779=Ang-(1-7)-Rezeptor-Antagonist, ACE=Angiotensin-Converting-Enzyme, APN=AminopeptidaseN, APA=AminopeptidaseA, D-AMP=Dipeptidyl-Amino-peptidase, IRAP=„insulin-regulated aminopeptidase“, NEP=Neutrale Endopeptidase24.11, PCP=Prolyl-Carboxypeptidase, PEP=Prolyl-Endopeptidase.

in der Niere (Griendling *et al.*, 1993), im Gehirn (Dzau *et al.*, 1986; Lynch *et al.*, 1987; Hellmann *et al.*, 1988), Herz und Hoden (Lindpaintner *et al.*, 1991b, a) lokalisiert ist, seine

physiologischen Funktionen ausüben. Über die Prolylendopeptidase (PEP) oder das Nephrylin (NEP) wird AngI zu Ang-(1-7) konvertiert. Aus AngII kann durch ACE2, PEP oder Prolyl-Carboxypeptidase (PCP) Ang-(1-7), durch Aminopeptidase A (APA) AngIII und durch die Dipeptidyl-Aminopeptidase (D-AMP) AngIV gebildet werden. AngIII wird durch Deletion des Arginin vom N-Terminus über eine Aminopeptidase N (APN) in AngIV konvertiert (Abb.1.3). Ang-(3-7) kann einerseits aus AngIV über Carboxypeptidasen gebildet werden, andererseits aus Ang-(1-7) über Aminopeptidasen. Trotz der Tatsache, dass AngII als das wichtigste bioaktive Peptid des RAS gilt und in der Pathogenese des arteriellen Hochdrucks, der renalen Dysfunktion und des kongestiven Herzinfarkts eine wichtige Rolle spielt, wurde inzwischen die Bedeutung anderer Metabolite wie AngIII, AngIV und Ang-(1-7) entdeckt und charakterisiert (Ferrario, 2002; Ferrario *et al.*, 2002). Die klassische Sicht auf das RAS als ein einfaches biologisch aktives Hauptendproduktsystem hat sich damit in ein flexibles Konzept eines Multi-Mediator-systems umgewandelt.

1.1.6.2 Biologisch aktive Angiotensin-Metabolite

Das Oktapeptid Angiotensin II

AngII [Ang-(1-8)] wirkt über zwei verschiedene Rezeptoren: die AT₁- und AT₂-Rezeptoren, die pharmakologisch unterschiedlich beeinflussbar sind. Beide sind, wie auch der Mas-Rezeptor, zellmembrangebundene GPCRs. Zwischen den beiden Rezeptoren besteht eine Sequenzhomologie von 34% (Ichiki *et al.*, 1995). Der AT₁-Rezeptor wird in den Blutgefäßen, in der Niere und schwach im Herzen exprimiert (Sechi *et al.*, 1992; Zhuo *et al.*, 1992; Saavedra *et al.*, 1993; Ichiki *et al.*, 1995; Zhuo *et al.*, 1996), wohingegen der AT₂-Rezeptor überwiegend im Herzen, Gehirn, in der Niere, Nebenniere und reproduktiven Organen nachgewiesen wurde (Ozono *et al.*, 1997; Tsutsumi *et al.*, 1998; Wang *et al.*, 1998).

Das Oktapeptid AngII hat eine systemische und lokale Wirkung. Systemisch wirkt AngII einerseits über die direkte Aktivierung der AT₁-Rezeptoren an der glatten Gefäßmuskulatur und direkt über renale AT₁-Rezeptoren (Cogan, 1990) und andererseits indirekt durch verstärkte Na⁺-Resorption im distalen Nierentubulus (Yamaguchi *et al.*, 1990). Diese direkten und indirekten Wirkungen des AngII führen zu einem Blutdruckanstieg. Außerdem kann zirkulierendes AngII seine Wirkung auch auf zentrale Strukturen des Gehirns, deren Rezeptoren außerhalb der Blut-Hirn-Schranke liegen, ausüben. Dazu zählen das subfornikale Organ, das Organum vasculosum, die Lamina terminalis und die Area postrema.

Lokal wirkt AngII am Herzen positiv ino- und chronotrop (Lindpaintner *et al.*, 1991a, b). Auch eine Beteiligung des lokal gebildeten AngII bei der Entstehung der kardialen Hypertrophie, dem

ventrikulären Remodellieren nach Myokard-Infarkt und die Ausprägung einer hypertensionsbedingten Fibrose wird diskutiert (Dostal *et al.*, 1992). Dabei scheint der AT₁-Rezeptor die meisten kardiovaskulären Effekte des AngII zu vermitteln (Murphy *et al.*, 1991; de Gasparo *et al.*, 2000; Touyz *et al.*, 2002; Carey *et al.*, 2003).

Das AngiotensinIII

AngIII [Ang-(2-8)] spielt eine wichtige Rolle bei Blutdruckantworten im Gehirn, die über den AT₁-Rezeptorsubtyp vermittelt werden (Wright *et al.*, 1996), und ruft eine Freisetzung von Vasopressin hervor. In der Peripherie hat AngIII einen wesentlich schwächeren Pressoeffekt als AngII, allerdings ist AngIII potenter bei iontophoretischer Applikation in die paraventriculären Neurone (Harding *et al.*, 1986); beide Peptide stimulieren den Salzzappetit und die Drüsenhormonproduktion (Wright *et al.*, 1992).

AngIII gilt als ein potentes Hormon in der Aldosteron-Freisetzung und in der Ca²⁺-Freisetzung Mas-transfizierter Zellen (Jackson *et al.*, 1988; Janssen *et al.*, 1988). Lin *et al.* (2001) konnten zeigen, dass eine intrazerebroventrikuläre Injektion von AngIII eine Reduktion des Barorezeptor-Reflexes, der Herzrate und eine Erhöhung des mittleren arteriellen Drucks generiert. Des Weiteren agiert AngIII auf hypothalamischer Ebene über den AT₁-Phospholipase C-Signaltransduktionsweg als ein Modulator noradrenerger Transmission (Rodriguez-Campos *et al.*, 2000).

Das AngiotensinIV und der AngIV-Rezeptor

AngIV [Ang-(3-8)] ist ein echtes Hormon. Es wurden spezifische Bindungsstellen gefunden, die strukturell vom klassischen AT₁- und AT₂-Rezeptor verschieden sind (Swanson *et al.*, 1992; Hall *et al.*, 1993; Hall *et al.*, 1995). AngIV stimuliert den Anstieg der intrazellulären Ca²⁺-Konzentration. In der Nierenarterie induziert es einen Anstieg des Blutflusses (Harding *et al.*, 1994) und in den Lungengefäßen wirkt AngIV vasokonstriktorisch (Cheng *et al.*, 1994; Nossaman *et al.*, 1995). Bis heute konnte man dem AngIV mehrere Wirkungen nachweisen, die denen des AngII entgegengesetzt oder gleichgerichtet sind (Kramar *et al.*, 1997; Wayner *et al.*, 2001). AngIV bindet an einen Rezeptor, bei dem eine in der Membran ansässige durch Insulin-regulierte Aminopeptidase (IRAP) identifiziert wurde. Der AngIV-Rezeptor gehört somit nicht zu den GPCRs (Albiston *et al.*, 2001). Durch IRAP werden Funktionen des Gedächtnisses (Wright *et al.*, 1992), der Niere, der Blutdruckregulation, des Neuritenwachstums und der Angiogenese vermittelt. Er wird im Gehirn (Neokortex, Hippocampus, Cerebellum und Basalganglien) sowie in den Nieren, dem Herzen, der Lunge, der Prostata und dem Darm exprimiert (Miller-Wing *et al.*, 1993; Roberts *et al.*, 1995).

Das Heptapeptid Angiotensin-(1-7)

Ang-(1-7) ist ein Amino-terminales Fragment des AngII und ein biologisch aktives RAS-Peptid (Santos *et al.*, 2000), dessen Konzentration im zirkulierenden humanen Blutplasma 1,0–9,9pmol/l beträgt (Nussberger *et al.*, 2001). Das Peptid wird in großer Menge produziert und übt mögliche selektive zentrale und periphere Wirkungen aus (Chappell *et al.*, 1990; Kohara *et al.*, 1991; Santos *et al.*, 1992; Santos *et al.*, 2000). Die Signaltransduktionsmechanismen für Ang-(1-7) und AngII wurden in glatten Muskelzellen der Kaninchenaorta untersucht. Beide Peptide wirken auf die Calmodulin-abhängige Proteinkinase II, die die Aktivität der zytosolischen Phospholipase A₂ (cPLA₂) beeinflusst. Die Aktivierung der cPLA₂ führte zu einem Arachidonsäure (AA)-Anstieg und damit zur Prostaglandinsynthese (Muthalif *et al.*, 1998). Die Daten belegten, dass die Freisetzung von AA zur Prostaglandinproduktion über verschiedene Ang-Rezeptortypen erfolgen kann. Nach Mikroinjektion von Ang-(1-7) in die dorsomediale Medulla von Ratten kam es zu vasodepressorischen und bradykarden Wirkungen (Campagnole-Santos *et al.*, 1989; Campagnole-Santos *et al.*, 1990). Brosnihan *et al.* (1996) konnten zeigen, dass Ang-(1-7) vasodilatatorisch in die Druckregulation der Koronararterien bei Hunden eingreift, ganz im Gegensatz zum konstriktorisch wirkenden AngII. Des Weiteren stellte diese Arbeitsgruppe erstmals auch die Bindung von Ang-(1-7) an einen AT₁/AT₂-unabhängigen Rezeptor zur Diskussion (Brosnihan *et al.*, 1996). Ferrario *et al.* (1997) beschrieben für Ang-(1-7) gegenregulatorische Effekte zu AngII hinsichtlich der Blutdruckregulation. Mittlerweile ist bekannt, dass Ang-(1-7) als ein gegenregulatorisches Hormon zu AngII agiert und so die durch AngII induzierten Blutdruck-steigernden, proliferativen und Blutgefäß-bildenden Aktionen limitiert (Machado *et al.*, 2000). Die Hypothese bestätigten Collister *et al.* (2003) indem sie zeigten, dass der andauernde hypotensive Effekt von Losartan bei Ratten zum Teil durch die vasodilatatorische Wirkung und die erhöhte Freisetzung von Ang-(1-7) während der ACE-Hemmung bedingt ist. In einer später erschienenen Studie wurde die antihypertensive Wirkung von Ang-(1-7) bei hypertensiven Ratten auf die Hemmung der durch AngII hervorgerufenen Norepinephrin-Freisetzung zurückgeführt (Gironacci *et al.*, 2004). In der Niere bewirkt Ang-(1-7) eine Änderung der tubulären Na⁺- und NaHCO₃-Resorption, reduziert die Aktivität der Na⁺-K⁺-ATPase und induziert Diurese und Natriurese (Hilchey *et al.*, 1995).

1.1.6.3 Assoziation von Mas mit dem Ang-(1-7)-Signalweg

Die Arbeitsgruppe von Santos und Walther fand heraus (Santos *et al.*, 2003), dass die Bindung von iodiniertem Ang-(1-7) an Nierenabschnitte bei *Mas*-Knockout Mäusen im Vergleich zu dem Wildtyp verhindert wurde. Der antidiuretische Effekt des Ang-(1-7)-Peptids wurde in *Mas*-

defizienten Tieren vollkommen aufgehoben. Des Weiteren konnten sie in Zellexperimenten zeigen, dass Ang-(1-7) an Mas-transfizierte CHO- und COS-Zellen bindet und AA freisetzt, welches mit dem Ang-(1-7)-Antagonisten A-779 vollständig aufgehoben werden konnte. In diesen jüngeren Bindungsstudien gelang es damit zum ersten Mal zu zeigen, dass Ang-(1-7) ein funktioneller und endogener Ligand für den Mas-Rezeptor ist (Santos *et al.*, 2003). Aorten von *Mas*-defizienten Tieren verloren die Fähigkeit, nach Zugabe von Ang-(1-7) zu relaxieren (Santos *et al.*, 2003). Das Heptapeptid Ang-(1-7) konnte unabhängig von der klassischen ACE-Kaskade aus AngI generiert werden (Santos, 1990). Man beobachtete einen Anstieg der Ang-(1-7)-Konzentration nach Inhibition von ACE. Dies konnte durch den Konzentrationsanstieg von AngI erklärt werden, aber auch durch die verminderte Katabolisierung des Heptapeptids durch ACE (Chappell *et al.*, 1998; Iyer *et al.*, 1998). Ein paar Jahre später wurde zusätzlich gezeigt, dass Ang-(1-7) direkt aus AngII gebildet werden kann durch die „neu“ identifizierte ACE2 Peptidase (Donoghue *et al.*, 2000; Tipnis *et al.*, 2000). Mittlerweile wird ein „neues“ Konzept diskutiert, welches das ACE2-Ang-(1-7)-Mas-System als den hauptgeenregulatorischen Mechanismus der ACE-AngII-AT₁-Axis beschreibt (Santos *et al.*, 2007).

1.1.6.4 Interaktion von Mas mit dem AngiotensinII-Rezeptor AT₁

Nachdem Anfang der 90er-Jahre der AT₁-Rezeptor als Hauptrezeptor für AngII ausgemacht wurde, konnten Ambroz *et al.* (1991) zeigen, dass der Ca²⁺-Anstieg in Mas-transfizierten Zellen nach der Stimulation mit AngII nur stattfand, wenn gleichzeitig der AT₁-Rezeptor exprimiert wurde. Damit schien Mas, nicht wie zuvor postuliert, per se ein Rezeptor für AngII zu sein. Es gab klare Anzeichen, die auf eine physiologische Rolle von Mas bei der Signaltransduktion von AngII hinwiesen. Zum Beispiel wurde in Mäusen, bei denen das *Mas*-Protoonkogen genetisch inaktiviert wurde, eine Änderung der AT₁-Rezeptoraktivierung nach AngII-Stimulation festgestellt (Von Bohlen und Halbach *et al.*, 2000). Darüber hinaus konnte in Mäusen mit einem genetisch inaktivierten *Mas*-Protoonkogen eine Veränderung der Herzfrequenz- und der Blutdruckregulation gezeigt werden (Walther *et al.*, 1998; Walther *et al.*, 2000b). Später fanden Kostenis *et al.* (2005) heraus, dass die Expression von Mas die funktionelle Aktivität des AT₁-Rezeptors in transfizierten Säugetierzellen *in-vitro* behindert, obwohl die maximale Zelloberflächen-Expression des AT₁-Rezeptors erhöht wird. Dieser Mechanismus ist voraussichtlich die Folge der konstitutiven physikalischen Verbindung beider Rezeptoren in der Zellmembran. Der Mas-Rezeptor agiert damit als funktioneller Antagonist des AT₁-Rezeptors durch die Bildung eines heterooligomeren Komplexes (Kostenis *et al.*, 2005).

1.1.7 Die Bedeutung von Mas unter physiologischen und pathophysiologischen Bedingungen

Es wurde vermutet, dass *Mas* an der Entwicklung bestimmter Regionen im ZNS beteiligt ist (Altman *et al.*, 1990a, b). Ebenso beobachteten Martin und Hockfield (1993) nach Gabe von Pentylentetrazol (PTZ) an Ratten eine Hochregulierung der *Mas*-Expression. Diese Erkenntnis lässt auf eine Hochregulierung der *Mas*-Expression bei verstärkter ZNS-Aktivität schließen. Im Gehirn konnte bei *Mas*-defizienten Mäusen eine verbesserte Langzeit-Potenzierung festgestellt werden, welche als biochemische Grundlage für Lernen und Gedächtnis diskutiert wird. Des Weiteren kam es im Gyrus dentatus sechs Stunden nach tetanischer Stimulierung dieser Mäuse zu keiner Reduktion des Anstiegs der „field excitatory postsynaptic potentials“ (Walther *et al.*, 1998). Gleichzeitig wurde im „Morris Water Maze“ (MWM)-Test bei Knockout-Männchen ein signifikant verstärktes Angstverhalten nachgewiesen. Diese Veränderung wurde bei den homozygoten Weibchen nicht gefunden (Walther *et al.*, 1998; Walther *et al.*, 2000a). Zur weiteren Verifizierung dieser Angst diente der „Elevated Plus Maze“ (EPM)-Test (Walther *et al.*, 2000a). Das geschlechts-spezifische Angstverhalten konnte bestätigt werden.

Kitaoka *et al.* (1994) konnten *Mas*-mRNA in der Retina von Rhesus-Affen nachweisen, was im Weiteren durch Herstellung eines transgenen Mausmodells untersucht wurde. Mit Hilfe eines Rot/Grün Opsin Promoter wurde *Mas* in Zapfen-Photorezeptoren überexprimiert. Bei diesen transgenen Tieren gab es keine Auffälligkeiten in der Retina im Vergleich zu nicht-transgenen Mäusen (Xu *et al.*, 2000). Allerdings zeigte sich, dass die durch Zapfen-Photorezeptoren vermittelten Elektoretinogramme im Vergleich zu den Stäbchen-Photorezeptoren eine verminderte Antwort aufwiesen. Eine genauere Analyse ergab, dass diese Minderreaktivität der UV- und Grün-sensitiven Zapfen durch eine signifikante Verminderung der Zapfen-Photorezeptoren-Dichte in transgenen Mäusen ausgelöst wurde. Die Überexpression von *Mas* in Zapfen-Photorezeptoren induziert damit deren Zelltod, aber nicht eine Tumorbildung (Xu *et al.*, 2000).

In *Mas*-transfizierten COS-Zellen führt die Stimulation von *Mas* mit Ang-(1-7) zu einer AA-Freisetzung. Um herauszufinden, welche Signalübertragungswege involviert sind, wurden HEK293-Zellen mit *Mas*-cDNA in steigender Konzentration transfiziert. Mit Hilfe des „Dual-Luciferase-Assay“ wurde die Luciferase-Produktion, die durch das SRE („Serum Response Element“) initiiert wird, ermittelt. Das SRE kann sowohl von Rac als auch von Rho aktiviert werden. Die Untersuchung ergab, dass die Luciferase-Produktion dosisabhängig zunahm und nicht durch Ang-(1-7) und A779 beeinflusst wurde. In weiteren Experimenten konnte die

Involvierung von G_{α} in den konstitutiv aktiven Übertragungsweg gezeigt werden. Diese Daten demonstrieren den Mas-Rezeptor als konstitutiv aktiv (Gembardt *et al.*, 2005.), welches zu den mitogenen Eigenschaften von Mas beiträgt.

Weitere Experimente untersuchten die Interaktionen von AngII in *Mas*-Knockout-Mäusen. Anhand der Änderung des Blutdruck und des Herzrhythmus wurde die Beeinflussung getestet. Dank hoch auflösender Aufzeichnungstechniken konnte ein prägnanter Unterschied bezüglich der Blutdruck- (BPV) und Herzrhythmusvariabilität (HRV) festgestellt werden (Walther *et al.*, 2000a; Walther *et al.*, 2000b). Bei den weiblichen und männlichen *Mas*-defizienten Tieren fiel eine fehlende Regulation dieser beiden Parameter und ein erhöhter Sympathikotonus auf (Walther *et al.*, 2000b). Die männlichen Knockout-Mäusen hatten eine signifikant erhöhte BPV, wohingegen die HRV denen der Kontrollen entsprach. Im Gegensatz dazu war bei weiblichen *Mas*-Knockout-Tieren die HRV signifikant reduziert (Walther *et al.*, 2000a). Des Weiteren wird Mas eine wichtige Rolle in der Relaxation der Aorta und der Beeinflussung der Diurese zugeschrieben (Santos *et al.*, 2003).

1.2 Die Familie der „Mas-Related-Genes“

In den letzten Jahren wurde eine Familie G-Protein gekoppelter Rezeptoren (GPCR) entdeckt, deren Gene eine hohe Sequenzhomologie zum *Mas*-Protoonkogen (Young *et al.*, 1986) aufweist (Dong *et al.*, 2001; Lembo *et al.*, 2002). Die Genprodukte zeigen die charakteristischen Merkmale der sieben transmembranären Regionen mit einem extrazellulär gelegenen N-Terminus und dem intrazellulär gelegenen C-Terminus.

Zwei unterschiedliche Arbeitsgruppen identifizierten unabhängig voneinander diese große Rezeptorfamilie. Die erste Gruppe (Dong *et al.*, 2001) nannte sie „Mas-related-Genes“ (Mrgs) und isolierte die Gene aus Maus und Mensch. Die zweite Arbeitsgruppe (Lembo *et al.*, 2002) identifizierte die Gene in Ratten und Menschen und nannte sie „sensory neuron-specific G-protein coupled receptors“ (SNSR). In dieser Doktorarbeit wird die Nomenklatur der Mrgs verwendet. Die Mrg-Rezeptoren umfassen eine Familie von > 50 GPCR und werden vor allem in sensiblen Schmerzneuronen der dorsalen Gliawurzeln exprimiert. Das Expressionsbild der Mrg-Rezeptoren zeigt große Ähnlichkeit zwischen Mäusen und Ratten. Die Mitglieder der Mrgs können teilweise durch Peptidliganden, wie RF-Amide (FMRFamid, FLRFamid, NPFF, NPAF), und Opioidpeptide, wie BAM22 und γ_2 -MSH, aktiviert werden (Dong *et al.*, 2001; Han *et al.*, 2002; Lembo *et al.*, 2002). Es wird angenommen, dass sie am Modellieren der

Schmerzsensitivität und –selektivität durch die Interaktion mit Peptidliganden beteiligt sind (Dong *et al.*, 2001; Han *et al.*, 2002; Lembo *et al.*, 2002).

Die Superfamilie der GPCR ist zurzeit die meist genutzte Rezeptorengruppe für die Entdeckung neuer Medikamente. Dennoch sind über 50% der GPCR-Familie noch nicht klassifiziert und werden als „orphan“ Rezeptoren bezeichnet. Das sind Rezeptoren, deren Funktion und Liganden noch weitestgehend unbekannt sind (Civelli, 2005).

1.2.1 Die Klassifizierung der Mrg-Familie

Die murine Mrg-Familie wird aufgrund von Sequenzhomologien in drei bedeutende Subfamilien geteilt: MrgA, MrgB und MrgC (Dong *et al.*, 2001). Eine Computeranalyse (Anlage 1) machte 14 Gene in der murinen MrgA-Subfamilie aus (MrgA1-14). In den letzten Jahren wuchs diese Familie bis auf 22 Mitglieder heran. Die MrgB-Subfamilie beinhaltet 13 Mitglieder und die MrgC-Subfamilie 14 Mitglieder (Dong *et al.*, 2001). Unter den 14 Mitgliedern der murinen MrgC-Subfamilie scheint es mit vielleicht einer Ausnahme nur Pseudogene zu geben (Han *et al.*, 2002), wohingegen die anderen Familien sowohl funktionierende Gene als auch Pseudogene enthalten. Die Sequenzhomologie innerhalb jeder dieser drei Subfamilien beträgt >50%. Im Gegensatz zu der umfangreichen Sequenzvielfalt der Maus-Subfamilien wurden nur maximal sieben intakte humane MrgX-Sequenzen (MrgX1-7) identifiziert (1.2.5). Neun weitere MrgX-Sequenzen scheinen Pseudogene zu sein. Die humanen MrgX und die murinen MrgA zeigen im phylogenetischen Baum die größte Sequenzhomologie im Vergleich zu MrgB und MrgC (Dong *et al.*, 2001; Lembo *et al.*, 2002; Choi *et al.*, 2003). Zusätzlich zu den drei großen murinen Mrg-Subfamilien wurden sechs weitere Mrg-Gen-Einzelkopien beschrieben: *MrgD*, *MrgE*, *MrgF* (*RTA*), *MrgG*, *MrgH* (*GPR90*) und *Mas* (Dong *et al.*, 2001; Lembo *et al.*, 2002; Choi *et al.*, 2003). Die meisten dieser Sequenzen haben humane Homologien (Dong *et al.*, 2001). Um herauszufinden, ob diese Vielfalt in der murinen Mrg-Familie typisch für alle Nagetiere ist, charakterisierten Zylka *et al.* (2003) Mrg-Gene für zwei weitere Nagetierspezies, die Ratte und die Wüstenmaus (*Meriones unguiculatus*). Sie fanden in der Ratte jeweils nur einen einzigen Vertreter der *RNMrgA*- und *RNMrgC*-Subfamilie und 10 *RNMrgB*-Gene, von denen mehrere zu mindestens zwei *MMMrgB*-Genen ortholog sind. Außerdem beinhaltet die genomische Datenbank die vollständigen Sequenzen der *RNMrgD*-, *RNMrgE*-, *RNMrgF*-, *RNMrgG*-, *RNMrgH*- und *RNMas*-Gene. Diese Gene haben alle, mit Ausnahme des *RNMrgH*, Homologien in der Maus und im Menschen. In der Wüstenmaus fanden sie nur ein *MrgA*-, *MrgC*- und *MrgD*-Gen und maximal zwei bis drei *MrgB*-Gene.

Eine große Einschränkung für das Verständnis der humanen MrgX-Rezeptoren-Funktionen ist, dass für viele MrgX-Rezeptoren keine Homologien in Nagetieren existieren. Trotzdem wurde bereits teilweise über die funktionelle Charakterisierung dieser Gene berichtet (Dong *et al.*, 2001; Bender *et al.*, 2002; Han *et al.*, 2002; Lembo *et al.*, 2002; Robas *et al.*, 2003), obgleich funktionelle Eigenschaften und physiologische Funktionen noch größtenteils unbekannt sind. Vor kurzem isolierten Zhang *et al.* (2005) MrgX-Rezeptoren aus Affen (*M. fascicularis*). Eine phylogenetische Analyse dieser isolierten Affengene zeigte die Existenz von Genen, die homolog zu den humanen *MrgD*-, *MrgE*- und *MrgX2*-Genen sind. Außerdem fanden sie ein weiteres Gene, das sehr verwandt mit dem humanen *MrgX1* (87% der AS) und dem humanen *MrgX7* (90% der AS) ist und aus diesem Grund als *MrgX1/7* bezeichnet wird. Eine andere Arbeitsgruppe isolierte aus Rhesus-Affen MrgX-Rezeptoren (Burstein *et al.*, 2006). Diese Gene zeigen im Durchschnitt 87%-93% Sequenzgleichheit zu ihren humanen Homologien, mit Ausnahme des Rhesus-MrgX4 (80%). Auch funktionell ähneln sie den bekannten humanen MrgX-Rezeptoren.

In dieser Doktorarbeit werden folgende Rezeptoren verwendet: die humanen Mas-, MRG-, MrgE-, MrgF-, MrgG-, MrgX1-, MrgX2-, MrgX3- und MrgX4-Rezeptoren, der murine MrgH-Rezeptor und die Mas-, MrgE- und MrgG-Rezeptoren der Ratte.

1.2.2 Der MRG-Rezeptor

Die Proteinsequenz des MRG-Rezeptors ist zu 35% identisch mit der des Mas-Produkt (Monnot *et al.*, 2001). Aufgrund dieser Sequenzhomologie zu Mas wurden der MRG-Rezeptor wie auch der Mas-Rezeptor hinsichtlich ihrer Antwort auf Ang-Peptide untersucht. In CHO-Zellen, COS-Zellen und *Xenopus*-Oozyten, die mit *MRG*-mRNA transfiziert wurden, konnte keine Bindung von AngII an der Zelloberfläche nachgewiesen werden (Monnot *et al.*, 1991). Ein endogener Ligand wurde für MRG bis dato nicht identifiziert.

1.2.3 Der MrgF-Rezeptor

Der MrgF-Rezeptor (Dong *et al.*, 2001), nach alter Nomenklatur „Rat thoracic aorta“-Rezeptor (RTA-Rezeptor; Ross *et al.*, 1990), ist ein Mitglied der GPCR-Familie und wurde aus genomischer Ratten- und thorakalen Aorten-cDNA isoliert. Es handelt sich um ein aus 343 AS bestehendes Protein. Der MrgF-Rezeptor der Ratte zeigt eine relativ nahe Verwandtschaft zum Mas- (34%) und MRG-(29%) Protein (Ross *et al.*, 1990). Eine hohe Expression von *MrgF*-mRNA wurde im Kleinhirn von Ratten und eine hohe Konzentration im Darm, im Vas deferens,

im Uterus und der Aorta nachgewiesen. Ein Beweis für eine Interaktion mit AngII konnte bisher weder nach Einbringen von Rezeptor-cDNA bzw. Rezeptor-mRNA in COS-Zellen oder Xenopus-Oozyten noch durch elektrophysiologische Antworten in transfizierten Oozyten nach Behandlung mit Ang-Peptiden erbracht werden (Ross *et al.*, 1990). Bis zum heutigen Zeitpunkt wurden keine Liganden für den MrgF-Rezeptor identifiziert.

1.2.4 Der murine MrgH-Rezeptor

Die Gensequenz des murinen MrgH-Rezeptors, der früher als muriner GPR90 beschrieben wurde (Wittenberger *et al.*, 2001), ist auf dem Chromosom 17 der Maus lokalisiert und kodiert für ein Genprodukt aus 321 AS. Die mRNA des Gens wurde in hohen Konzentrationen im Herzen und in niedrigerer Konzentration in der Niere der Maus detektiert und konnte aus einer Neuroblastom-Gliom-Zelllinie isoliert werden (Wittenberger *et al.*, 2001). Das *mGPR90*-Gen zeigt eine relativ nahe Verwandtschaft zum *Mas*-Protoonkogen der Ratte (43%), der Maus und des Menschen, jeweils 42% (Wittenberger *et al.*, 2001). Bislang wurden noch kein Ligand und humaner homologer MrgH-Rezeptor beschrieben (Zylka *et al.*, 2003).

1.2.5 Der humane MrgX1-Rezeptor

Vor einigen Jahren zeigte die Studie von Lembo *et al.* (2002), dass der humane MrgX1-Rezeptor in den dorsalen Ganglienwurzel exprimiert und durch das Proenkephalin-Produkt Bam-22 (Adrenal Medulla Peptid 22) aktiviert wird. Er unterscheidet sich von klassischen Opioid-Rezeptoren, indem er insensitiv für den Opioid-Antagonisten Naloxon ist und nur eine geringe Aktivierung durch Opioid-Liganden zeigt. Dem MrgX1-Rezeptor wird eine Funktion in der Schmerzregulation zugesprochen (Lembo *et al.*, 2002). Chen und Ikeda (2004) konnten die Bindung von MrgX1 an zwei G-Proteine ermitteln: PTX-sensitive ($G_{i/o}$ -Proteine) und PTX-insensitive ($G_{q/11}$ -Protein). Als Folge werden neuronale Ca^{2+} -Kanäle, K^+ -Kanäle und die synaptische Transmission moduliert.

1.2.6 Der humane MrgX2-Rezeptor

Das humane *MrgX2*-Gen ist auf dem Chromosomen 11p15 lokalisiert und kodiert auf zwei Exons die 330 AS des Rezeptors. Der Rezeptor wird in den sensorischen Nervenzellen des menschlichen peripheren Nervensystems exprimiert und ist beteiligt an dem Signalübertragungsweg des Schmerzes (Robas *et al.*, 2003). Aus diesem Grund könnte MrgX2 für die Entwicklung neuer Schmerzmedikamente wichtig sein. In einer Studie von Robas *et al.* (2003)

wurden MrgX2 transfizierte HEK293-Gα15-Zellen mit 1200 bekannten GPCR-Liganden mittels Messung der intrazellulären Ca²⁺-Konzentration auf eine Rezeptoraktivierung getestet. In Zellen, die mit Cortistatin-14 (CST-14) stimuliert wurden, konnte der höchste Ca²⁺-Anstieg gemessen und ihnen somit die stärkste Affinität zum MrgX2-Rezeptor zugesprochen werden. Bei Menschen spielt CST-14 in der Induktion von „slow waves sleep“, der Hemmung von lokomotorischer Aktivität und der Inhibition der Zellproliferation eine Rolle (de Lecea *et al.*, 1996; Cassoni *et al.*, 2002). Vor kurzem wurde MrgX2 auch als Rezeptor für das Proadrenomedullin N-terminal 20 Peptid (PAMP[1-20]/PAMP-20) und sein gekürztes Analog PAMP[9-20]/PAMP-12 identifiziert (Kamohara *et al.*, 2005). Diese beiden Peptide, abgeleitet von dem „post-translational processing“ Preproadrenomedullin (Kitamura *et al.*, 1993; Ishimitsu *et al.*, 1994; Kitamura *et al.*, 1994) aus dem ein weiteres effektives hypotensives Peptid Adrenomedullin produziert wird, sind endogene Peptide. PAMP-12 und PAMP-20 lösen durch die Inhibition der Katecholaminsekretion aus sympathischen Nervenenden und adrenalen Chromaffin-Zellen eine Blutdrucksenkung aus. Kamohara *et al.* (2005) zeigten, dass MrgX2 ein Rezeptor für PAMP-12 und PAMP-20 ist, wobei die Affinität zum PAMP-20 um das zehnfache geringer als die zum PAMP-12 ist, und dass MrgX2 nicht nur in den dorsalen Ganglienwurzeln sondern auch in den adrenalen Chromaffin-Zellen exprimiert wird.

1.2.7 Der humane MrgX3-Rezeptor

Kaisho *et al.* (2005) erforschten das *MrgX3*-Gen, indem sie in allen Zellen transgener Ratten das humane *MrgX3*-Gen überexprimierten und die Tiere phenotypisierten. Nach fünf Wochen stellten sie eine Verflüssigung, Degeneration und Schwellung der Linsenfaserzellen fest. Die Überexpression führte zu einer Erhöhung der Anzahl proliferierender Zellen, aber nicht zur Aktivierung der Apoptose. Diese Beobachtung lässt eine Beeinträchtigung der normalen Zelldifferenzierung durch eine Überexpression des Gens vermuten. Außerdem zeigte die Epidermis histo-pathologisch eine Akantosis und fokale Parakeratose (Kaisho *et al.*, 2005). Das humane *MrgX3*-Gen wurde hauptsächlich in der Basalzellschicht und Suprabasalzellschicht der Rattenepidermis gefunden. Wie auch schon für die Linse wurde eine Erhöhung der Anzahl proliferierender Zellen, aber nicht apoptotischer Zellen festgestellt. In den transgenen Ratten beobachtete man mit Hilfe einer immunhistochemischen Analyse in der Epidermis einen Anstieg an Markerproteinen wie Keratin 6, Keratin 10, Keratin 14 und Loricrin (Kaisho *et al.*, 2005). Diese Ergebnisse zeigen, dass eine Überexpression von *MrgX3* zu einer Überaktivierung der Zellsignale oder zu einer hohen Zellproliferation führt. Hiermit ist allerdings noch nicht geklärt,

ob diese Reaktion alleine durch *MrgX3* ausgelöst wird oder ob andere Proteine in diesen Prozess involviert sind.

1.2.8 Der MrgD-Rezeptor

Der MrgD-Rezeptor, auch TGR7 genannt, wird auf einem einzigen Exon kodiert. Dieser Rezeptor konnte vornehmlich in den dorsalen Ganglienwurzeln der Ratte detektiert und dort überwiegend in den Schmerzneuronen exprimiert werden (Dong *et al.*, 2001; Zylka *et al.*, 2003). Außerdem ist MrgD in den dorsalen Ganglienwurzeln der Ratte und der Maus mit P_2X_3 kolokalisiert (Dong *et al.*, 2001; Zylka *et al.*, 2003). In Versuchen mit CHO-Zellen, die den MrgD-Rezeptor überexprimieren, zeigte sich, dass β -Alanin den Ca^{2+} -Influx in Zellen erhöht (Shinohara *et al.*, 2004). β -Alanin ist eine kleine Aminosäure, die strukturverwandt zu GABA und Glycin ist. Damit gilt β -Alanin als ein spezifischer Ligand des MrgD-Rezeptors und partizipiert funktionell an der Modulation des neuropathischen Schmerzes (Shinohara *et al.*, 2004).

1.2.9 Interaktionen von Mrgs

Mittlerweile ist es größtenteils akzeptiert, dass GPCRs Homodimere/-oligomere oder Heterodimere/-oligomere bilden können (Milligan *et al.*, 2003; Milligan, 2004; Milligan *et al.*, 2004; Milligan, 2006). Milasta *et al.* (2006) koexprimierten als erste Arbeitsgruppe zwei Rezeptoren der Ratten-Mrg-Familie, MrgD (1.2.5.4) und MrgE, die eine große Sequenzhomologie teilen und in den dorsalen Gliawurzeln einiger Spezies koexprimiert werden, in ein HEK293-Flp-In-T-Rex-Zell-System. Sie konnten zeigen, dass bei gleichzeitiger Expression der Rezeptoren die RNMRgD-Internalisation verlangsamt, was zu einer verstärkten β -Alanin-RNMRgD-induzierten Phosphorylierung von ERK1 und ERK2 („extracellular-regulated kinase 1 und 2“) und zu einem verstärkten Ca^{2+} -Signal führt. Diese Studie ist die erste Demonstration einer Heterodimerization zwischen zwei verschiedenen, aber verwandten Mitgliedern der Mrg-Familie und hebt hervor, dass viele Perspektiven der Rezeptorfunktion wie Agonisten-vermittelte Internalization, Details der Wirkstärke von Agonisten und deren Funktionsgröße verändert werden können durch deren Koexpression und Heterodimerization (Milasta *et al.*, 2006).

1.3 Signaltransduktion und Transkriptionsfaktoren

Die Transkription bezeichnet die Informationsübertragung von der DNA auf ein RNA-Molekül. An diesem Prozess sind mehrere Proteine beteiligt, wie z.B. RNA-Polymerasen und Trans-

kriptionsfaktoren (Roeder, 1996). Die Transkriptionsfaktoren sind regulatorische Proteine, die bestimmte Sequenzabschnitte der DNA erkennen und durch Bindung an diese eine hohe Rate an mRNA-Synthese erreichen oder selektiv entweder bestimmte Gene stimulieren oder inhibieren (Latchman, 1997). Damit sind sie von grundlegender Bedeutung für das Verständnis regulatorischer Prozesse innerhalb von Zellen und Zellverbänden.

1.3.1 Das „Serum Response Element“

Das „Serum Response Element“ (SRE) wurde als ein essentielles Regulationselement des *c-fos* Protoonkogen-Promotors beschrieben. Ursprünglich galt das SRE als ein Oligonukleotid, welches die Bindungseinheit des Transkriptionsfaktors „Serum Response Factors“ (SRF) definiert; eine AT-reiche CC(A/T)₆GG Nukleotidsequenz auch CArG Box genannt (Treisman, 1990; Huet *et al.*, 2005). Die terminalen Guaninreste der CArG Box sind für die Bindung des SRF obligatorisch (Treisman, 1990). Der SRF ist ein ubiquitärer Transkriptionsfaktor, der die Genexpression im Rahmen von Muskelzellendifferenzierung und Zellwachstum koordiniert und durch eine Vielzahl von Faktoren, wie zum Beispiel LPA, LPS, TPA, Zytokine, TNF α , aktiviert wird (Chai *et al.*, 2002). Die Aktivierung von LPA kann auf zwei unterschiedlichen Signalwegen erfolgen. Erstens sind sogenannte TCFs (Ternery Complex Factors) beteiligt, die durch MAP-Kinase Signalwege kontrolliert werden (Johansen *et al.*, 1995). Zweitens ist der andere Signalweg unabhängig von TCFs und wird durch Rho GTPasen induziert (Hill *et al.*, 1995). Die beiden Signalwege zur Aktivierung des SRF teilen sich das SRE als gemeinsames Regulationselement und konkurrieren um die Bindung und die Induktion ihrer Zielgene.

Mittlerweile ist bekannt, dass das SRE auf den Promotoren einer Vielzahl von Genen, wie „Immediate Early Genes“ (IEGs) *c-fos*, *fosB*, *junB*, *egr-1* und *-2*, neuronalen Genen, wie *nurr1* und *nurr77*, und Muskelgenen, wie Actin und Myosins, lokalisiert ist (Chai *et al.*, 2002). Die SRE-Sequenz vom *c-fos* Gen und anderen Promotoren reagieren auf eine Vielzahl von Signalen, ausgelöst durch eine diverse Anzahl an Wachstumsfaktoren, die über verschiedene Rezeptortypen agieren, wie PKC-abhängige oder -unabhängige Signalwege. Durch intrazelluläres cAMP kann die Aktivität des SRE reguliert werden. Einige Studien konnten demonstrieren, dass die Aktivität des SRE durch einige intrazelluläre Signalmoleküle potenziert werden kann, wie durch aktivierte, membran-assoziierte Tyrosinkinase (Src und Fps) und aktivierte Formen kleiner G-Proteine, wie c-Raf und Ras (Jamal *et al.*, 1990; Qureshi *et al.*, 1991; Alexandropoulos *et al.*, 1992).

1.3.2 Der Transkriptionsfaktor NFκB

NFκB ist unter den die Transkription regulierenden Proteinen besonders wichtig für die Modulation der Expression von immunregulierenden Genen, die bei Entzündungsprozessen und bei Tumorerkrankungen eine Schlüsselfunktion haben (Sun *et al.*, 2002). Weiter spielt es eine Rolle bei der Regulation der Zellproliferation und der Apoptose (Sun *et al.*, 2002) und ist an der Regulation der Transkription von Zytokinen, Adhäsionsmolekülen und anderen Mediatoren beteiligt. In den meisten Zelltypen existiert NFκB als Homodimer oder Heterodimer einer Familie strukturverwandter Proteine (Baldwin, 1996; Ghosh *et al.*, 1998). Jedes Familienmitglied beinhaltet eine terminale Aminoregion, die auch Rel-homologe Region genannt wird. Innerhalb dieser Region liegen die DNA-bindende-, die Dimerisations-Domäne und das „nuclear localization signal“ (NLS). Zurzeit sind fünf Proteine in Säugetieren identifiziert worden, die zur NFκB-Familie gehören: RelA (p65), c-Rel, RelB, NFκB1 (p50/p105) und NFκB2 (p52/p100). Verschiedene Kombinationen von homo- und heterodimeren Zusammensetzungen sind derzeit bekannt. Am häufigsten findet man das NFκB-Dimer aus RelA und NFκB1 (May *et al.*, 1998). Im Zytoplasma liegt NFκB in einer inaktiven Form vor, die mit einem inhibitorischen Protein, I-κB, verbunden ist. Das I-κB-Protein verdeckt dabei die Kernlokalisationssequenz der Rel-Proteine und verhindert so das Eindringen des Transkriptionsfaktors in den Zellkern. Die wichtigsten inhibitorischen Proteine der I-κB-Familie sind I-κBα, I-κBβ und I-κBε (Whiteside *et al.*, 1997). Eine Vielzahl von Stimuli aktiviert NFκB: zu den potentesten gehören Zytokine, wie TNFα und IL-1 und das Endotoxin LPS gramnegativer Bakterien. Die Aktivierungskaskade verläuft in mehreren Schritten im Zytoplasma stimulierter Zellen ab. Die unterschiedlichen Stimuli aktivieren einen I-κB-Kinase-komplex (IKK), welcher als Hauptregulator eine Schlüsselfunktion in der Signalkaskade einnimmt. Der Komplex phosphoryliert die I-κB-Proteine. Es folgt die Ubiquitination von I-κB und dessen Proteolyse. Das freigesetzte NFκB kann in den Nukleus translozieren und die Transkription induzieren (Sun *et al.*, 2002).

1.4 Ziel dieser Arbeit

Das *Mas*-Protoonkogen wurde aufgrund seiner onkogenen Aktivität in Tumorgenese-Assays entdeckt (Young *et al.*, 1986). Es kodiert für ein Protein mit sieben transmembranen Domänen und gehört somit in die Klasse der G-Protein gekoppelten Rezeptoren (GPCR) (Probst *et al.*, 1992). In früheren Studien wurde darüber spekuliert, inwieweit *Mas* als ein Rezeptor für AngII fungiert (Jackson *et al.*, 1988). Erst 16 Jahre später konnte gezeigt werden, dass *Mas* nicht direkt den intrazellulären Signalweg von AngII vermittelt, sondern vielmehr die Signalstärke von AngII durch eine Heterooligomerisation mit dem AT₁-Rezeptor inhibieren kann (Kostenis *et al.*, 2005). *Mas* ist damit nicht per se ein Rezeptor für AngII, beeinflusst aber die AngII/AT₁-Signalkasade. Außerdem konnte der *Mas*-Rezeptor mit einigen Signaleigenschaften des AngII-Metaboliten Ang-(1-7) assoziiert werden, die in ihrer Mehrzahl den Effekten von AngII entgegenwirken. Darüber hinaus wurde entdeckt, dass der *Mas*-Rezeptor als ein konstitutiv aktiver Rezeptor wirken kann (Gembardt *et al.*, 2005). Vor einigen Jahren identifizierten zwei Arbeitsgruppen unabhängig voneinander eine Familie von GPCRs, genannt „Mas-Related Genes“ (Mrg) (Dong *et al.*, 2001) bzw. „sensory neuron-specific G-protein coupled receptors“ (SNSR) (Lembo *et al.*, 2002), die eine nahe Verwandtschaft zur Proteinsequenz des *Mas*-Rezeptors aufweisen. Ziel dieser Arbeit war es deshalb:

- einen möglichst großen Pool an GPCRs der Mrg-Familie zu klonieren, die in phylogenetischen Analysen eine nahe Verwandtschaft zur *Mas*-Proteinsequenz aufweisen.
- andere Familienmitglieder der *Mas*-ähnlichen Rezeptoren zu identifizieren, die eine konstitutive Aktivierung intrazellulärer Signalwege zeigen.
- neben Ang-(1-7) weitere biologisch aktive Ang-Metabolite zu identifizieren, die mit dem *Mas*-Rezeptor direkt interagieren können.
- GPCRs zu identifizieren, die aufgrund ihrer hohen Sequenzhomologie zu *Mas* möglicherweise auch mit intrazellulären Signalwegen von Ang-(1-7) oder anderen Ang-Peptiden assoziiert sind oder die als neue klassische Rezeptoren für einige Ang-Metabolite charakterisiert werden können (AngII und AngIII teilen sich zwei unabhängige Rezeptoren, AT₁ und AT₂, die eine Sequenzhomologie von >34% haben).
- unter den Mrgs solche zu identifizieren, die mit dem *Mas*-Rezeptor Heterooligomere bilden und so dessen Peptid-initiierte oder konstitutive Aktivität beeinflussen.
- aus den erlangten Ergebnissen mögliche Rückschlüsse auf phylogenetische Zusammenhänge zu ziehen und Vorhersagen für konstitutive Aktivität, Peptid/Rezeptor- bzw. Rezeptor/Rezeptor-Interaktionen innerhalb der Mrg-Familie abzuleiten.

2. Material

2.1 Bakterien- und Zelllinien

Bakterienstamm:	<i>E.coli DH5α</i>	Invitrogen	Karlsruhe, Deutschland
Zelllinien:	HEK293A -Zellen	MP Biomedicals	Heidelberg, Deutschland
	NIH3T3 -Zellen	ein Geschenk von Dr. Uwe Vinkemeier; Leibniz-Institut für molekulare Pharma-kologie; Berlin, Deutschland	
	BAE-Zellen	von Dr. Consepción Peiró; Departamento de Farmacología y Terapéutica, Universidad Autónoma de Madrid, Spanien	

2.2 Vektoren

2.2.1 Vektoren zur Klonierung

Zur Klonierung der PCR-Produkte von HSMrgE und HSMrgG wurde der pGEM-T Easy Vektor verwendet und für RNMrge und RNMrge der pGEM-T Vektor.

<u>Produkt</u>	<u>Firma</u>	<u>Firmenort</u>
pGEM-T Vektor	Promega	Mannheim, Deutschland

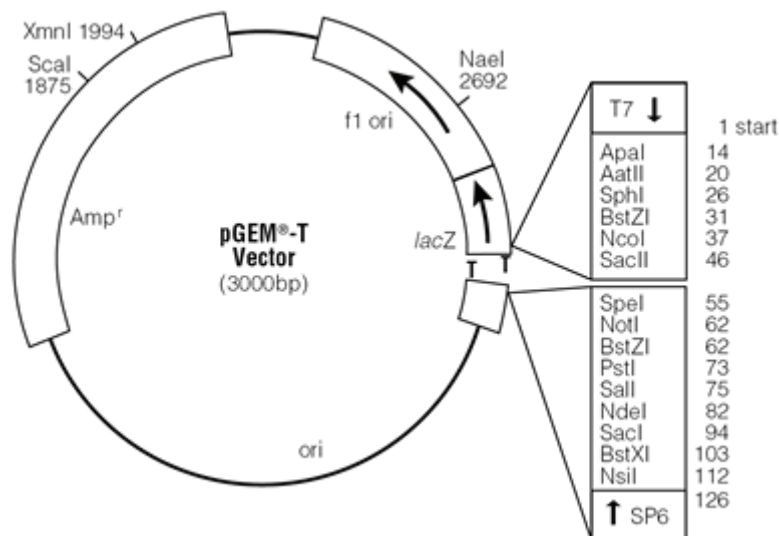


Abb. 2.1: pGEM-T Vektor und seine Restriktionenzymstimmungen zur Klonierung. Die Skizze wurde aus dem Promega-Katalog (2007) entnommen.

pGEM-T Easy Vektor

Promega

Mannheim, Deutschland

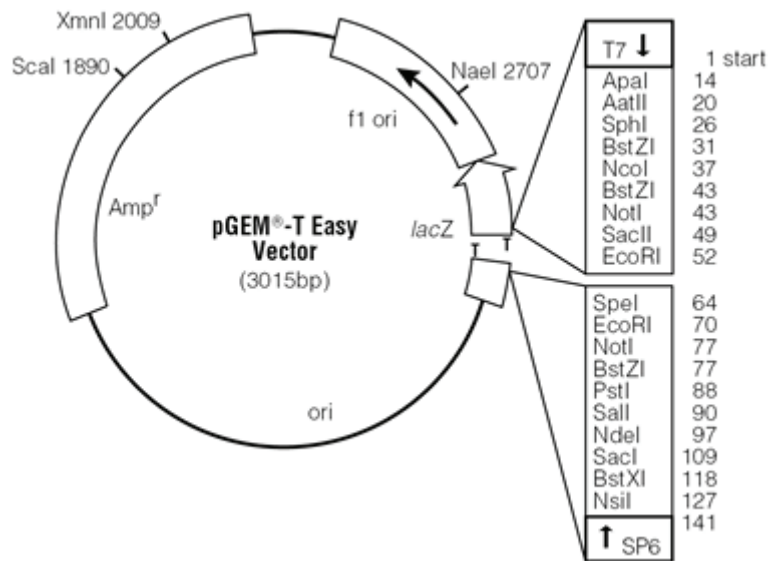


Abb.2.2: pGEM-T Easy Vektor und seine Restriktionenzyschnittstellen. Die Skizze wurde aus dem Promega-Katalog (2007) entnommen.

Für die Expression von HSMrgE, HSMrgG, RNMrgeE und RNMrgeG in den unterschiedlichen Zelllinien (2.1) wurde der pcDNA3.1(-)-Vektor verwendet.

pcDNA3.1(-)-Vektor

Invitrogen

Karlsruhe, Deutschland

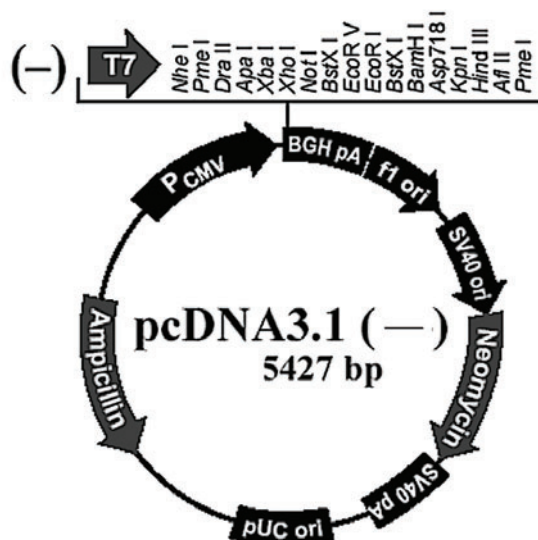


Abb.2.3: Der pcDNA3.1(-)-Vektor und seine Restriktionenzyschnittstellen. Die Skizze wurde aus dem Invitrogen-Katalog (2007) entnommen.

2.2.2 Vektoren mit klonierten Fragmenten

Die Klonierung der HSMas-Genfragmente und der Fragmente von HSMRG HSMrgD, HSMrgX1, HSMrgX2, HSMrgX3, HSMrgX4, HSMrgF, MMRgH und RNMas wurden in Frankfurt von der Firma Sanofi-Aventis (Dr. Evi Kostenis) durchgeführt und mir freundlicher Weise für weitere Experimente zur Verfügung gestellt. Die Klonierung der HSMrgE-, HSMrgG-, RNMrge- und RNMrgeG-Fragmente in den pcDNA3.1(-)-Vektor ist in 4.1.3 und 4.1.4 dargestellt.

2.2.3 Reportervektoren

Diese drei Vektoren wurden für die Messung der Transkriptionsintensität benutzt.

pNFκB-TA-Luc	BD Biosciences	Heidelberg, Deutschland
pRL-TK pSRE-L	Beide Vektoren sind ein Geschenk von Herrn Prof. Wieland (Ruprecht-Karls-Universität, Heidelberg; Institut für Pharmakologie und Toxikologie, Mannheim; Deutschland)	

2.3 Enzyme

Alkalische Phosphatase	Promega	Mannheim, Deutschland
Restriktionsenzyme (mit den jeweiligen vom Hersteller vorgesehenen Puffersystemen):		
Apal	Roche	Basel, Schweiz
BamHI	Roche	Basel, Schweiz
BstZI	Promega	Mannheim, Deutschland
KpnI	Roche	Basel, Schweiz
NotI	Roche	Basel, Schweiz
RNase A	Roche	Basel, Schweiz
T4-DNA Ligase	Promega	Mannheim, Deutschland
BioTherm™ DNA-Polymerase	Rapidozym	Berlin, Deutschland

2.4 Oligonukleotide (Primer)

Die Oligonukleotide wurden von der Firma Biotex (Berlin-Buch, Deutschland) bezogen. Die Darstellung der Primer erfolgt 5' nach 3'.

Primersequenzen:

HSMRGE31	GCT CAG GCT GCT ATG TCC ACC AG
HSMRGE51	GAG GCC ATG ATG GAG CCC AGA
HSMRGG32	GCC CAC TTA TAG GAG ACC CAT GGG
HSMRGG52	CCA TGG ATG CCA CTC CCT GTG CCC
RNMRGE3	CTT AGA CAG TCA TGT CCA CAA GTC C
RNMRGE5	GAG GCC ATG TCC CTG AGA GTG CAC
RNMRGG3	GTC ACT CTT TAC ACT CGG CTC ATG
RNMRGG5	GAG GCC ATG CTC TCC ATA TTC AAT ATC TGG

2.5 Chemikalien

<u>Produkt</u>	<u>Firma</u>	<u>Firmenort</u>
Agar	Difco	Heidelberg, Deutschland
Agarose	Invitrogen	Karlsruhe, Deutschland
Ammoniumacetat	Sigma	München, Deutschland
Ampicillin	Serva	Heidelberg, Deutschland
Bromphenolblau	Sigma	München, Deutschland
Chloroform	Sigma	München, Deutschland
DMSO	Merck	Darmstadt, Deutschland
DNA-Längenmarker (Anlage 3):		
λ EcoR I/HindIII	Promega	Mannheim, Deutschland
Φ X174 DNA/BsuRI	Roche	Basel, Schweiz
O`GeneRuler™ 1kb DNA Ladder	Fermentas	St.Leon-Rot, Deutschland
dNTP	Rapidozym	Berlin, Deutschland
Ethanol	Merck	Darmstadt, Deutschland
Ethidiumbromid	Serva	Heidelberg, Deutschland
FBS	Invitrogen	Karlsruhe, Deutschland
GlutaMAX™-I	Invitrogen	Karlsruhe, Deutschland
HBSS	Invitrogen	Karlsruhe, Deutschland
HEPES Pufferlsg. 1M	Invitrogen	Karlsruhe, Deutschland
IPTG	Biomol	Hamburg, Deutschland
Isoamylalkohol	Sigma	München, Deutschland
Isopropanol	Sigma	München, Deutschland

Isotonische Kochsalzlösung	Fresenius Kabi	Bad Homburg, Deutschland
Lipofectamin™2000	Invitrogen	Karlsruhe, Deutschland
Mineralöl	Sigma	München, Deutschland
Natriumhydrogenkarbonat 7,5%	Invitrogen	Karlsruhe, Deutschland
Penicillin/Streptomycin	Invitrogen	Karlsruhe, Deutschland
Phenol	Sigma	München, Deutschland
Polyfect®	Qiagen	Hilden, Deutschland
SDS	Serva	Heidelberg, Deutschland
Sucrose	Sigma	München, Deutschland
Tris	Sigma	München, Deutschland
Trypsin-EDTA	Invitrogen	Karlsruhe, Deutschland
X-Gal	Biomol	Hamburg, Deutschland

2.6 Peptide und ihre Sequenzen

Angiotensin II Bachem Weil am Rhein, Deutschland
 AngII-(1-8): Asp1 - Arg2 - Val3 - Tyr4 - Ile5 - His6 - Pro7- Phe8

Angiotensin III Bachem Weil am Rhein, Deutschland
 AngIII-(2-8): Arg2 - Val3 - Tyr4 - Ile5 - His6 - Pro7- Phe8

Angiotensin IV Bachem Weil am Rhein, Deutschland
 AngIV-(3-8): Val3 - Tyr4 - Ile5 - His6 - Pro7- Phe8

Angiotensin-(1-5) Bachem Weil am Rhein, Deutschland
 Ang-(1-5): Asp1 - Arg2 - Val3 - Tyr4 - Ile5

Angiotensin-(1-7) Bachem Weil am Rhein, Deutschland
 Ang-(1-7): Asp1 - Arg2 - Val3 - Tyr4 - Ile5 - His6 - Pro7

Angiotensin-(1-9) Bachem Weil am Rhein, Deutschland
 Ang-(1-9): Asp1 - Arg2 - Val3 - Tyr4 - Ile5 - His6 - Pro7- Phe8 - His9

2.7 Medien für Bakterienkulturen

Agar-Platten: LB-Medium 1l
 Agar 15g (= 1,5%)

Ampicillin-Platten:	LB-Medium	1l
	Agar	15g (= 1,5%)
	Ampicillin	100µg/ml
LB-Medium:	Hefeextrakt	5g
	Bacto-Tryptone	10g
	NaCl	5g
	NaOH (2M)	1,78ml
	Auffüllen mit H ₂ O _{bidest}	ad 1l
X-Gal/IPTG-Platten:	LB-Medium	1l
	Agar	15g (= 1,5%)
	Ampicillin	2,3ml
	X-Gal	1,6ml
	IPTG	400µl

2.8 Medien für Zellkulturen

Allgemein:

Einfriermedium FBS, D-MEM, DMSO (1: 8: 1, v/v/v)

Für HEK293A- und BAE-Zellen:

Basalmedium Invitrogen Karlsruhe, Deutschland
 D-MEM, flüssig (4500mg/l D-Glucose, L-Glutamin, ohne Natriumpyruvat)

Komplettmedium: D-MEM 500ml D-MEM
 + Pen/Strep 5ml Pen/Strep
 + 10% FBS 50ml FBS
 5ml Glutamax

Transfektionsmedium: D-MEM 500ml D-MEM
 + 10% FBS 50ml FBS
 5ml Glutamax

Starvingmedium: D-MEM 50ml D-MEM
 + Pen/Strep 5ml Pen/Strep
 + 0,5% FBS 250µl FBS

Für NIH3T3-Zellen:

Basalmedium Invitrogen Karlsruhe, Deutschland
 D-MEM, Pulver (4500mg/l D-Glucose, L-Glutamin, 110mg/l Natriumpyruvat, ohne Natriumbikarbonat)

Komplettmedium:	D-MEM	6,8g D-MEM/500ml H ₂ O
	+ Pen/Strep	5ml Pen/Strep
	+ 10% FBS	50ml FBS
	NaHCO ₃	10ml NaHCO ₃

Starvingmedium:	D-MEM	50ml D-MEM
	+ 0,5% FBS	250µl FBS

2.9 Stammlösungen, Puffer und Gele

2.9.1 Stammlösungen und Puffer

Ampicillin:	Ampicillin	2,5g
	NaOH-Lsg.	3ml
	Auffüllen mit H ₂ O _{bidest} ad 50ml	

dNTP-Mix:	dATP	20µl
	dCTP	20µl
	dGTP	20µl
	dTTP	20µl
	1x TE-Puffer	320µl

Ethidiumbromid:	1mg Ethidiumbromid/ml H ₂ O _{bidest}	
------------------------	--	--

GTE-Puffer	2N Tris/HCl-Lsg.	6,25ml
	Glukose	4,504g
	2N EDTA-Lsg.	10ml
	Auffüllen mit H ₂ O _{bidest} ad 500ml; pH 8,0	

IPTG:	200mg IPTG/ml H ₂ O _{bidest}	
--------------	--	--

Laufpuffer:	Sucrose	4g
	Bromphenolblau	2,5mg
	1x TE-Puffer	10ml

Ligationspuffer:	Tris-HCl	60mM
	MgCl ₂	20mM
	DTT	20mM
	ATP	2mM
	10% Polyethylenglycol; pH 7,8	

Marker:

Φ-Marker	Φ-DNA	50µl
	1x TE-Puffer	100µl
	Laufpuffer	20µl

λ -Marker	λ -DNA	80 μ l
	1x TE-Puffer	100 μ l
	Laufpuffer	20 μ l
Natriumacetat:	3M Na-Acetat; pH5,5	
Primer-Stammlösung:	Je μg Oligonucleotide :	
	1x TE-Puffer	1 μ l
	Verdünnung für PCR-Einsatz:	
	Stammlösung	10 μ l
	1x TE-Puffer	190 μ l
RNase A		
Für Minis:	4mg RNase/ml H ₂ O _{bidest}	
Für Maxis:	10mg RNase/100ml H ₂ O _{bidest}	
SDS/NaOH-Lösung:	10%iges SDS	25 μ l
	2M NaOH	25 μ l
	H ₂ O _{bidest}	200 μ l
TAE 50x:	Tris	242g
	Na-Acetat	68g
	EDTA	18,5g
	Auffüllen mit H ₂ O _{bidest} ad 1000ml, pH = 7,8	
TE 10x:	Tris/HCl	100mM
	EDTA pH 8,0	10mM
X-Gal-Lösung:	50mg X-Gal/800 μ l DMSO	

2.9.2 Gele

Agarosegel

Je nach Grösse der erwarteten Fragmente:

1%: 2g Agarose ad 200ml 1x TAE-Puffer

2%: 4g Agarose ad 200ml 1x TAE-Puffer

Um die Fragmente sichtbar zu machen, wurden auf 30ml Agarose-Lösung 1,7 μ l Ethidiumbromid-Stammlösung (2.9.1) gegeben.

2.10 Gebrauchsfertige Reaktionssysteme

DNA Gel Extraction Kit	Millipore	Schwalbach, Deutschland
Dual-Luciferase® Reporter Assay System	Promega	Mannheim, Deutschland
Plasmid Maxi Kit	Qiagen	Hilden, Deutschland

2.11 Geräte

<u>Gerät</u>	<u>Name</u>	<u>Firma</u>	<u>Firmenort</u>
CO₂-Inkubator	BB16	Heraeus	Hanau, Deutschland
Elektrophoresen	Maxigel G48	Biometra	Göttingen, Deutschland
Agagel Mini		Biometra	Göttingen, Deutschland
Heizbad	GFL 1083	Zeiss	Burgwedel, Deutschland
Inkubatoren	Function line	Heraeus	Hanau, Deutschland
Luminometer	Orion	Berthold DS GmbH	Pfordsheim, Deutschland
Mikrobiologische Sicherheitsbank	Hera Safe	Heraeus	Hanau, Deutschland
Mikroskop	DMIL	Leica	Wetzlar, Deutschland
PCR-Maschinen	Mastercycler Masterc. pers. Masterc. Grad.	Eppendorf	Hamburg, Deutschland
Spektralphotometer	DU 640i	Beckman	Lohof, Deutschland
Thermomixer	Ther. comp. Ther. comf.	Eppendorf Eppendorf	Hamburg, Deutschland Hamburg, Deutschland
Geldokumentationsanlage	BioDoc Analyse	Biometra	Göttingen, Deutschland
Vortex	MS1 VF2	IKA Werke Jenke&Kunke	Staufen, Deutschland
Waage	SBC 21	l Scaltec	Heiligenstadt, Deutschland
Zentrifugen	5415 D 3200 1.0R	Eppendorf Eppendorf Heraeus	Hamburg, Deutschland Hamburg, Deutschland Hanau, Deutschland

3. Methoden

3.1 DNA

3.1.1 Polymerase-Kettenreaktion

Die Polymerase-Kettenreaktion (PCR; modifiziert nach Mullis und Faloona, 1987) ist eine Methode zur Amplifizierung eines definierten DNA-Abschnitts. Es werden dabei neben der Zielsequenz, dem sogenannten „Template“, zwei Primer (2.4) mit einer Länge von ca. 20-30 Nukleotiden benötigt, die komplementär zu den 3'-Enden des Templates sind und somit den zu amplifizierenden Bereich eingrenzen. Die Gradienten-PCR dient dazu, zunächst den Temperaturbereich zu identifizieren indem sich die Primer am besten an den Genabschnitt anlagern. Demzufolge wurde als erstes die DNA bei 94°C internalisiert (Trennung der DNA-Doppelstränge) und anschließend bei 94°C denaturiert. Dann wurden die Primer bei 50-64°C am Anfang und Ende des zu amplifizierenden Genabschnittes in der „Annealing“-Reaktion gebunden und folgend bei 72°C neue DNA synthetisiert. Für die Synthese wurde die thermostabile DNA-Polymerase (2.3) verwendet. Dieser dreiphasische Zyklus führte zu einer neu synthetisierten doppelsträngigen DNA der gewünschten Sequenz. Zur Amplifizierung wurde der Zyklus bis zu 35-mal durchlaufen. Jeder Zyklus resultiert in einer Verdoppelung der Zielsequenz, so dass diese exponentiell amplifiziert wird und durch Ethidiumbromidfärbung im Agarosegel (2.9.2) sichtbar und isolierbar gemacht werden kann.

PCR-Ansatz

Für HSMrgE und HSMrgG:

4,50µl	PCR-Puffer
2,00µl	MgCl ₂
4,00µl	DMSO
1,80µl	3`-Primer
1,80µl	5`-Primer
2,40µl	dNTP-Mix
0,25µl	DNA-Polymerase
3,00µl	DNA-Probe
25,25µl	H ₂ O _{bide} st
45,00µl	Endvolumen

Für RNMrGE und RNMrGG:

4,50µl	PCR-Puffer
2,40µl	MgCl ₂
1,80µl	3`-Primer
1,80µl	5`-Primer
2,4µl	dNTP-Mix
0,30µl	DNA-Polymerase
2,00µl	DNA-Probe
29,80µl	H ₂ O _{bide} st
45,00µl	Endvolumen

Temperaturbedingungen

- 1) 94°C 2:00min
- 2) 94°C 0:30min
- 3) 50°C-64°C 0:30min
- 4) 72°C 0:30min

Anzahl der Zyklen von Schritt 2) bis 4): 34 Zyklen

Da die verwendeten Enzyme temperaturinstabil sind, wurde auf Eis pipettiert. Zum Schluss wurde zu jeder Probe ein Tropfen Mineralöl (2.5) gegeben, das Programm „hot start“ zum Vorwärmen der Maschine gestartet und die Proben für ca. 2 Stunden in die PCR-Maschine (2.11) gestellt. Nach Abkühlung des PCR-Gemisches wurden 10µl zur Überprüfung des Amplifikationserfolges elektrophoretisch auf einem Agarosegel (3.1.2) aufgetrennt.

3.1.2 Agarosegel-Elektrophorese

Die Agarosegel-Elektrophorese ist eine simple und effektive Methode, um DNA-Fragmente einer Länge von 0,5–25kb zu trennen, zu identifizieren und zu reinigen. Ein Gel (2.9.2) wird in einer Konzentration für das entsprechende Fragment, das aufgetrennt werden soll, vorbereitet. Für Fragmente einer Länge bis zu 500bp werden Gele einer Konzentration von 1% verwendet, für Fragmente über 500bp eine Konzentration von 2%. Der Ansatz (2.9.2) wurde in der Mikrowelle bei 750W für ca. zwei bis fünf Minuten erhitzt. Für eine Agarosegel-Elektrophorese wurden 30ml flüssiges Agarosegel (2.5; 2.9.2) mit 1,7µl Ethidiumbromid (2.5) gemischt. Die Elektrophorese (2.11) erfolgte bei einer Ladung von 100V und 20mA für 20min, die eine optimale Trennung garantiert. Durch die Zugabe von Ethidiumbromid (2.5) in das Agarosegel (2.9.1) war die Detektion der DNA-Moleküle mit der Geldokumentationsanlage (2.11) im Anschluss an den Gellauf möglich.

3.1.3 DNA-Isolierung aus einem präparativen Gel

Ein mit der PCR amplifiziertes DNA-Fragment wurde unter Verwendung der Geldokumentationsanlage (2.11) aus dem verwendeten 1%igem (bei Fragmenten ≥ 500 bp) Agarose-Gel (2.9.2) herausgeschnitten, das ein Gewicht unter 100mg haben sollte. Das Gelstück wurde in eine vorbereitete Säule des DNA Gel Extraction Kit (2.10) gesteckt und zentrifugiert (nach den Angaben des Herstellers). Das entstandene DNA enthaltende Filtrat wurde in ein frisches Reaktionsgefäß pipettiert und das Volumen abgemessen. Es folgte die Zugabe des gleichen

Volumens an gesättigter Phenollösung (2.5) und des gleichen Volumens eines Chloroform/Isoamylalkohol-Gemisches (24 Teile Chloroform/1Teil Isoamylalkohol; 2.5). Nach 5min zentrifugieren bei 15000rpm und Raumtemperatur wurde nur die obere Phase abgenommen und beim Überführen in ein neues Reaktionsgefäß abgemessen. Diesem wurde ein Zehntel des Volumens an 3M Natrium-Acetat (pH 5,5) (2.9.1) und das 2,5fache Volumen an 99%igem und gekühltem Ethanol (-20°C; 2.5) zugegeben und alles durch Kippen vermischt. Es folgte über 30min die Fällung bei -20°C. Nach 15min zentrifugieren bei 15000rpm und 4°C wurde der Überstand verworfen und das Pellet nach Waschen mit 70%igem Ethanol (2.5) luftgetrocknet. Die DNA wurde durch Zugabe von 20-30µl 1 x TE (2.9.1) bei 37°C im Thermomixer (2.11) gelöst und anschließend die Konzentration bestimmt (3.1.4).

3.1.4 DNA-Konzentrationsbestimmung

Eine 1:100 Verdünnung der Probe wurde hergestellt, 198µl TE (2.9.1) + 2µl Probe, 100µl davon wurden zur photometrischen Konzentrationsbestimmung der DNA verwendet. Die optische Dichte von DNA-Lösungen wird in einem Spektralphotometer (2.11) bei 260nm gegen 280nm gemessen. Der Quotient 260nm/280nm sollte im Idealfall für DNA bei 2,0 liegen. Abweichungen lassen somit Rückschlüsse auf Verunreinigungen der Nukleinsäuren durch z.B. Phenol (>2,0) oder Protein (<1,8) machen.

3.1.5 Dephosphorylierung von Vektorenden

Zur Verhinderung intramolekularer Religation wurden vor der Ligation die 5'-Phosphatgruppen des Vektors enzymatisch entfernt. Dazu wurden die DNA-Fragmente nach der Restriktionsspaltung und der Inaktivierung der Restriktionsendonukleasen durch die Zugabe von einer Einheit alkalischer Phosphatase (2.3) 30min bei 37°C dephosphoryliert. Der Reaktionsansatz wurde zur Inaktivierung der alkalischen Phosphatase für 10min bei 70°C erhitzt. Die enthaltenen DNA-Fragmente wurden anschließend über ein Agarosegel aufgereinigt (3.1.3).

3.1.6 Ligation von DNA-Fragmenten

Ein Aliquot des Polymerasekettenreaktions-Produktes (3.1.1) wurde zuerst auf einem Agarosegel (3.1.2) analysiert, bevor es für eine Ligation eingesetzt wurde. Um ein DNA-Fragment in das pGEM-T bzw. pGEM-T Easy Vektor-System (2.2.1) oder in pcDNA3.1(-)-Vektor (2.2.1) zu klonieren, wurde in einem 0,5ml Tube ein Ansatz aus:

1µl Vektor (2.2.1)
4µl Fragment
6µl 2x Ligationspuffer
1µl Ligase (3units/µl)
12µl Endvolumen

hergestellt und durch pipettieren gemischt. Die Ligase (2.3) wurde zum Schluss hinzupipettiert und der Ansatz über Nacht im Kühlschrank bei 4°C inkubiert. Generell erhöht eine längere Inkubationszeit die Anzahl der Transformanten. Am darauf folgenden Tag wurde der Ansatz aus T-Vektor und Fragment bzw. pcDNA3.1(-)-Vektor und Fragment in kompetente Bakterienzellen (2.1) transformiert (3.1.7).

3.1.7 DNA-Transformation in Bakterien

In diesem Schritt (modifiziert nach Sambrook *et al.*, 1989) wurde das in den Vektor integrierte DNA-Fragment in ein Bakterium aufgenommen. Zur Transformation wurden kompetente Zellen des Bakterienstamms *E. coli* DH5α (2.1) verwendet. Nach langsamem Auftauen auf Eis wurde den Zellen vorsichtig der gesamte Ligationsansatz (3.1.6) zugegeben und 30min auf Eis inkubiert. Nach einer Hitzeschockbehandlung für 30s bei 37°C und weiteren 3min auf Eis wurden 800µl vorgewärmtes LB-Medium (2.7) zugesetzt. LB-Medium ist ein komplexes Medium, bestehend aus Trypton und Hefeextrakt. Trypton liefert im Wesentlichen Aminosäuren und kleine Peptide, und Hefeextrakt liefert den erforderlichen Stickstoff, Zucker sowie anorganische und organische Nährstoffe. Der Ansatz bei 37°C und 1000rpm für 50min auf einem Thermomixer (2.11) inkubiert. Danach wurden auf zwei Agar-Platten (2.5, 2.7) je 135µl der Zellsuspension ausplattiert und über Nacht bei 37°C inkubiert.

3.1.8 Präparation von Plasmid-DNA

Es können bei der Präparation (modifiziert nach Sambrook *et al.*, 1989) von Plasmid-DNA grundsätzlich zwei Methoden unterschieden werden, abhängig von der DNA-Ausbeute und der Qualität. Zur schnellen Beurteilung von Plasmid-DNA wird die „Mini-Präparation“ (3.1.8.1) verwendet. Die Ausbeute ist geringer und die DNA von minderer Qualität. Bei der „Maxi-Präparation“ (3.1.8.2) gewinnt man im Gegensatz dazu eine größere Menge DNA mit hohem Reinheitsgrad.

3.1.8.1 Mini-Präparation

Mit den nach der Transformation gewachsenen positiven Bakterien-Kolonien wurden je 3ml ampicillinhaltiges LB-Medium (2.7) angeimpft und über Nacht bei 37°C und konstantem Schütteln (200rpm) inkubiert. Am Folgetag wurden 1,5ml der Kultur in ein 2ml-Reaktionsgefäß überführt und 20s bei 15000rpm und Raumtemperatur anzentrifugiert. Nach Verwerfen des Überstandes wurde das Bakterienpellet in 225µl GTE-Puffer (2.9.1.) und 25µl RNase (2.3, 2.9.1.) durch Vortexen (2.11) gelöst. Zu dieser Suspension wurden 250µl SDS/NaOH-Lösung (2.9.1.) zugegeben und nach kurzem Schütteln und 10min Entspannung mit 250µl Ammoniumacetat (2.5) pH 5,5 neutralisiert. Anschließend wurde der Zelldebris zur Abtrennung 10min bei 14000rpm und 4°C zentrifugiert. Dem Überstand wurden nach der Überführung in ein neues Reaktionsgefäß 500µl Isopropanol (2.5) zugegeben, leicht gemischt und 5min bei Raumtemperatur stehen gelassen. Die anschließende Fällung erfolgte durch 20min Zentrifugation bei 4°C und 14000rpm. Danach wurde das entstandene DNA-Pellet gewaschen (200µl 70% Ethanol), nochmals zentrifugiert (2min bei 14000rpm und 4°C) und nach dem Trocknen an der Luft in 30µl TE-Puffer (2.9.1) im Thermomixer (Stufe 7; 2.11) bei 37°C aufgenommen. Eine Überprüfung des Klonierungserfolges erfolgte durch Restriktionsverdau (3.1.9) mit 3-10µl Probeneinsatz.

3.1.8.2 Maxi-Präparation

Konnte durch Restriktionsverdau (3.1.9) der Mini-Präparation ein positiver Zellklon identifiziert werden, wurden 200ml LB-Medium (2.5, 2.7; mit Ampicillin) mit 100µl des Miniansatzes angeimpft und über Nacht unter Schütteln bei 37°C inkubiert. Die Isolierung der DNA erfolgte mit Qiagen-Säulen des Plasmid Maxi Kits (2.10), welches nach den Angaben des Herstellers verwendet wurde. Eine Überprüfung des Klonierungserfolges erfolgte ebenfalls durch Restriktionsverdau (3.1.9).

3.1.9 Restriktionsverdau

Der Restriktionsverdau wird zum Überprüfen des Klonierungserfolges herangezogen. Dabei wird mit Hilfe spezifischer und vom Hersteller empfohlener Enzyme und Reaktionspuffer (2.3), das Plasmid jeweils an der T7- und SP6-Seite (Anlage 2B und 2C) des eingeschlossenen DNA-Fragmentes geschnitten.

Kontrollverdau:	1-8µl Probe (je nach Konzentration) 1µl Restriktionspuffer je 1µl Enzym (ApaI, NotI, BstZ I, KpnI, BamHI) xµl H ₂ O _{bidest} (auf ein Endvolumen von 10µl)
Präparativer Verdau:	3-10µl Probe (je nach Konzentration) 3µl Restriktionspuffer je 2µl Enzym (ApaI, NotI, BstZ I) xµl H ₂ O _{bidest} (auf ein Endvolumen von 30µl)

Dieser Ansatz wurde eine Stunde bei 37°C inkubiert. Zur gelelektrophoretischen Auftrennung wurden 10µl auf ein 1%iges oder 2%iges Agarose-Gel (2.9.2) aufgetragen, beim präparativen Verdau die gesamte Menge mit anschließender Säulenelektion. Das Ergebnis des Verdau wurde als positiv bewertet, wenn das herausgeschnittene Fragment die erwartete Basenpaarlänge zeigte. Zur Bestätigung wurde die Probe zur DNA-Sequenzierung an die Invitek GmbH, Berlin-Buch geschickt (3.1.10).

3.1.10 DNA-Sequenzierung und Sequenzanalyse

3.1.10.1 Sequenzierung

Die enzymatische Sequenzierung am automatisierten Sequenziergerät der Firma Amersham Buchler (Braunschweig, Deutschland) wurde unter Verwendung von fluoreszenz-markierten „Primern“ im Sequenzlabor der Invitek GmbH in Berlin-Buch durchgeführt.

3.1.10.2 Sequenzanalyse

Für die Analyse der Sequenzhomologien der genutzten humanen Rezeptoren der Mrg-Familie wurden deren Proteinsequenzen MRG („Accession number“ NP 443199), MrgD (NP 944605), MrgE (NP 001034254), MrgF (NP 659452), MrgG (AA 085095), MrgX1 (NP 671732), MrgX2 (NP 473371), MrgX3 (NP 473372) und MrgX4 (NP 473373) und die Proteinsequenz des murine MrgH-Rezeptor (NP 109651) mit dem humanen Mas-Rezeptor (NP 002368) mittels des blastp-Moduls des BLAST-Computerprogramms (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast>) verglichen. Mit Hilfe des Computerprogramms ClustalW2 (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/clustalw2/index.html>) wurde der phylogenetische Stammbaum der Mrg-Familie erstellt. Die Translation der DNA-Sequenz und die Suche nach Sequenzhomologien sowohl auf DNA- als auch auf Proteinebene

erfolgte mit Hilfe von BLAST (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>; link: Standard nucleotide-nucleotide BLAST) und den Datenbanken des „National Center for Biotechnology Information“ (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>).

3.2 Zellkultur

3.2.1 Das Auftauen der Zellen

Die Kryo-Röhrchen (1,8ml) wurden in ein 37°C-Bad für ca. 30s oder in der Hand aufgetaut. Dann wurde das Zellmedium in 9ml D-MEM Komplettmedium (2.8) resuspendiert und bei 1000rpm für 5min zentrifugiert. Der Überstand wurde abgesaugt und dem gewonnenen Zellpellet 10ml D-MEM Komplettmedium (2.8) hinzugefügt. Anschließend wurden die Zellen auf einer Platte ausgesät.

3.2.2 Kultivierung der HEK-, NIH- und Endothel-Zellen

3.2.2.1 Die Kultivierung der HEK293A-Zelllinie

Die Kultivierung der HEK293A-Zelllinie (2.1) erfolgte in Komplettmedium (2.8). Dazu wurde Dulbecco's MEM Medium (D-MEM, 2.8) mit 10% FBS (2.5), 1% Penicillin/Streptomycin (Pen/Strep, 2.5) und 1% Glutamax I (2.5) ergänzt. Anschließend wurden die HEK293A-Zellen bei 37°C im CO₂-Inkubator (5%, 2.11) inkubiert. Das Zellkultur-Mediumwechsel und die Teilung der Zellen im Verhältnis 1:3 (106 Zellen/80cm²) erfolgte alle 2-3 Tage. Die Verdopplungszeit der Zellen betrug ca. 35-48 Stunden.

3.2.2.2 Kultivierung der NIH3T3-Zelllinie

Zellen der NIH3T3-Zelllinie (2.1) wurden auf 10cm²-Petrischalen in Komplettmedium (2.8) kultiviert. Zur Herstellung des Komplettmediums wurde Dulbecco-MEM Pulver (2.8) verwendet. Dazu wurden 6,7-6,8g Pulver in ca. 25ml H₂O (Ampuwa®) gelöst. Anschließend wurde das gelöste Pulver steril filtriert, 10ml Natriumhydrogenkarbonat (2.5), 5ml Pen/Strep (2.5) und 50ml FBS (10% FBS, 2.5) hinzugefügt und mit H₂O auf 500ml aufgefüllt. Alle 2-3 Tage wurde die konfluente Kulturschale 1:3 (106 Zellen/80cm²) gesplittet und im CO₂-Inkubator (5%, 2.11) bei 37°C weiter inkubiert. Die Verdopplungszeit der Zellen betrug ca. 35-48 Stunden.

3.2.2.3 Die Kultivierung der BAE-Zellen

Mit den BAE-Zellen (2.1, Endothelzellen) wurde verfahren wie für die HEK293A-Zellen (3.2.2.1).

3.2.3 Trypsinisieren der Zellen

Die konfluenten Platten wurden 1x mit HBSS (2.5) gewaschen. Anschließend wurde 1ml einer bei 37°C vorgewärmten 0,25%igen Trypsin-EDTA Lösung (2.5) auf die Platte gegeben und für 1min zurück in den Inkubator gestellt. Die gelösten Zellen wurden auf 40ml mit frischem Komplettmedium (2.8) aufgefüllt.

3.2.4 Einfrieren der Zellen

Die Zellen wurden trypsinisiert (3.2.3) und anschließend für 5min bei 1000rpm zentrifugiert. Das so gewonnene Zellpellet wurde in Einfriermedium (2.8) resuspendiert (D-MEM + 20% FBS). Davon wurden 0,9ml in ein Kryo-Röhrchen, das zuvor mit Zelltyp, Passagenummer und Datum beschriftet wurde, pipettiert und mit DMSO (2.5) auf 1ml aufgefüllt. Anschließend wurden die Tubes sofort auf Trockeneis (-80°) gelegt und später in der -80°-Gefriertruhe verstaut.

3.2.5 Das Dual-Luciferase® Reporter Assay System

Das „Dual Luciferase Reporter Assay“ System (2.10) ist ein einfache Methode zur Analyse der relativen transkriptionellen Aktivität von Transkriptionsfaktoren. Dazu werden die Zellen mit einem chimären Konstrukt, bestehend aus dem zu untersuchenden Gen und einem Luziferase-Gen transfiziert. Das Luziferase-Gen kodiert für ein Enzym, das durch Oxidation von Luziferin Lichtquanten erzeugt. Dieses Phänomen wird als Biolumineszenz bezeichnet. Die Menge des ermittelten Lichtes ist dabei proportional zu der Aktivierung des Transkriptionsfaktors. Unter dem Begriff „Dual Reporter“ versteht man die Expression und Messung zweier voneinander unabhängiger Reporterenzyme in einem System. Dabei korreliert einer der beiden Reporter mit dem Effekt der spezifischen experimentellen Bedingungen, während die Aktivität des zweiten kotransfizierten Reporters eine interne Kontrolle darstellt, welche die Basalaktivität repräsentiert. Durch die Normalisierung des experimentellen Rezeptors zur Aktivität des Kontrollrezeptors können interne Schwankungen minimiert werden, wie z.B. durch Unterschiede in der Zellviabilität oder der Transfektionseffizienz entstehen können. Der „Dual Reporter“ ermöglicht eine verbesserte experimentelle Genauigkeit durch seinen gleichzeitigen Ausdruck und Messung von zwei selbstständigen Reporterenzymen innerhalb eines Systems. Zur Auswertung der Transkriptionsfaktor-Aktivierung wurde als experimenteller Reporter hauptsächlich der pSRE-L-Vektor (2.2.3) verwendet. Dieser Vektor kodiert für das Luziferase-Gen des Leuchtkäfers *Photinus pyralis* (Firefly). Dessen Luziferase-Produktion ist abhängig von der Aktivierung des Transkriptionsfaktors „Serum Response Faktor“. In 4.1.6 dieser Arbeit wurde ein anderer

experimenteller Reporter, pNF κ B-TA-Luc-Vektor (2.2.3), benutzt. Der pNF κ B-TA-Luc-Vektor wurde entworfen zur Beobachtung der Signaltransduktionswege des Transkriptionsfaktors NF κ B. Anhand der ermittelten Luziferase-Produktion kann dessen Aktivität ermittelt werden. Als Kontrollreporter wurde der pRL-TK-Vektor (2.2.3) verwendet. Er kodiert für das Luziferase-Gen der Weichkoralle *Renilla reniformis* und seine Luziferase-Produktion ist abhängig von der Transfektionseffizienz. Der korrelierende cDNA-Abschnitt sitzt hinter dem konstitutiv veränderten Thymidin-Kinase- (TK) Promotor.

3.2.6 Die Transfektion

3.2.6.1 Erster Tag

Die HEK293A-, NIH3T3- und BAE-Zellen (2.1) wurden gewaschen, trypsinisiert (3.2.3), mit Komplettmedium (2.8) resuspendiert und zum Kultivieren je 200ml in ein Well einer 48 Well-Platte pipettiert. Anschließend wurden die Zellen für ca. 12-24 Stunden zurück in den CO₂-Inkubator (2.11) gestellt bis die Konfluenz ca. 70-80% betrug.

3.2.6.2 Zweiter Tag

3.2.6.2.1 HEK293A-Zellen:

Vorab wurde in einer 96 Well-Platte die gewünschte Konzentration pcDNA3.1(-) (5ng, 10ng, 20ng, 25ng, 30ng, 50ng, 70ng, 75ng, 100ng) der Rezeptoren (HSMas, HSMRG, HSMrgX1, HSMrgX2, HSMrgX3, HSMrgX4, HSMrgE, HSMrgF, HSMrgG, MMMrgH, RNMas, RNMrge, RNMrgeG), pipettiert und mit dem Leervektor [pcDNA3.1(-) ohne kloniertes Fragment] auf eine Endkonzentration von 200ng cDNA pro Well ergänzt. In der Zellkultur wurde in jedes Well weitere 50ng/ μ l eines Gemisches aus 25ng/ μ l pSRE-L oder pNF κ B-TA-Luc, 25ng/ μ l pRL-TK-Vektor (2.2.3) und D-MEM HEPES (2.5) hinzupipettiert. Das pSRE-L-, pNF κ B-TA-Luc- und der pRL-TK-Vektor (2.2.3) kodieren für unterschiedliche Luziferase-Enzyme, die zur Ermittlung der transkriptionellen Aktivierung von Genen dienen (3.2.5). Anschließend wurde, nach den Angaben des Herstellers, Polyfect (2.5) als Transfektionsreagenz hinzugeführt. Nach 10-15min Ruhe bei Raumtemperatur wurden die am Tag zuvor ausgesäten HEK293A-Zellen unter Austausch des Komplettmediums in Starvingmedium (2.8) transfiziert. Die 48 Well-Platten kamen für weitere 24 Stunden in den CO₂-Inkubator (2.11).

3.2.6.2.2 NIH3T3-Zellen:

Die Zellen wurden wie in 3.2.6.2.1 nur unter Verwendung des Starvingmediums für NIH3T3-Zellen (2.8) transfiziert.

3.2.6.2.3 BAE-Zellen:

Die Transfektion der Endothelzellen wurde statt mit PolyFect® als Transfektionsreagenz Lipofectamin™2000 (2.5) nach Angaben des Herstellers verwendet. Nach ca. 4 Stunden im CO₂-Inkubator (2.11) musste das Starvingmedium (2.8) gewechselt werden. Sonst wurde wie in 3.2.6.2.1 verfahren.

3.2.7 Stimulation der HEK293A-Zelllinie mit Angiotensin-Metaboliten

Die verwendeten Ang-Peptide wurden in physiologischer Kochsalzlösung (2.5) auf eine Konzentration von 10⁻³ M gelöst und in dieser Konzentration bei -80°C verstaut. Für die Stimulation, 16-18 Stunden nach der Transfektion (3.2.6), mussten die Ang-Peptide mit D-MEM Basalmedium (2.8) auf eine Konzentration von 10⁻⁶M verdünnt werden. Anschließend wurden die transfizierten HEK293A-Zellen mit den Ang-Metaboliten AngII, AngIII, AngIV, Ang-(1-5), Ang-(1-7), Ang-(1-9) oder der Kontrolle, nur physiologischer Kochsalzlösung, stimuliert (2.5, 2.6). Danach wurden die Zellen für weitere sechs bis acht Stunden in den CO₂-Inkubator (2.11) gestellt.

3.2.8 Die Messung

Für die Durchführung des „Luciferase-Assays“ wurde ein komerteller Kit „Dual-Luciferase® Reporter Assay System“ (2.10) verwendet und nach den Angaben des Herstellers verfahren. Zur Messung der Transkriptionsfaktor-Aktivierung wurde zunächst das Kulturmedium entfernt und die transfizierten Zellen einmalig mit HBSS (2.5) gewaschen. Anschließend wurden die Zellen durch Zugabe von 100µl eines Gemisches aus Passiv Lysis Buffer (2.10) und Wasser (1:5) lysiert und für ca. 10min auf den Rüttler gestellt bis sich alle Zellen von dem Boden der Platte gelöst hatten. Der Passiv Lysis Buffer (PLB) wurde speziell für den „Luciferase® Reporter Assay“ entworfen um die schnelle Zelllyse zu begünstigen. Er bietet ein Optimum an Leistungsfähigkeit und Stabilität für die Firefly- (FF) und das Renilla-Luziferase- (RL) Enzyme. Im Gegensatz zu anderen Zelllyse Produkten, löst das PLB nur eine geringe Eigenlumineszenze aus. Zur Messung der Luziferaseaktivität wurden 5µl des Zelllysats in jedes Well einer 96 Well-Platten pipettiert. Der Platte wurde im Luminometer (2.11) 100µl „Luciferase Assay Reagenz“

(LabII) zugesetzt und nach einer Verzögerung von 2s wurde für 10s die Lichtreaktion luminometrisch gemessen. Der so gemessene Wert entsprach der Aktivität des experimentellen Reporters. Nach Abschluss der Messung injiziert die Maschine automatisch „Stop and Glo Reagenz“ und führt erneut nach einer Verzögerung von 2s eine Messung von 10s durch. Dieser Messwert repräsentiert die Aktivität des Kontrollreporters. Die ermittelten Messwerte werden in „relativ light units“ (RLU) angegeben. Dabei setzt sich RLU zusammen aus dem Quotienten von RLU (FF)/ RLU (RL). Jedes Transfektionsexperiment wurde in Triplikaten durchgeführt und die gemessenen relativen Lichtwerte gemittelt.

3.3 Statistische Auswertung

Zur statistischen Analyse der Ergebnisse wurde das „GraphPad Prism“ (Version 4.00 für Windows; Graph Pad Software Inc., San Diego, California, USA) verwendet. Die Ergebnisse der Messreihen sind als Mittelwerte (MEAN) \pm Standardabweichung (S.E.M.) angegeben und sind in Referenz zu den unbehandelten Kontrollzellen zu interpretieren. Bei gleichen Varianzen wurde der Student's T-Test angewendet. Für die Bewertung mehrerer experimenteller Ansätze gegen eine Kontrolle wurde eine Bonferroni-Korrektur für multiple Testung durchgeführt. Multiple Vergleiche wurden mittels einer zweiseitiger Varianzanalyse, Two-way-ANOVA, auf signifikante Unterschiede untersucht. In die statistische Analyse wurden nur Messwerte einbezogen, die im Luziferase-Assay größer 2 „relativ light units“ (RLU) waren. Bei allen statistischen Tests wurde eine Irrtumswahrscheinlichkeit von $P < 0,05$ als signifikant angenommen.

4. Ergebnisse

4.1 Konstitutive Rezeptoraktivität in der Mrg-Rezeptor-Familie

Die Mrg-Familie wurde von zwei Arbeitsgruppen unabhängig voneinander identifiziert (Dong *et al.*, 2001; Lembo *et al.*, 2002). In dieser Doktorarbeit wird ausschließlich die Nomenklatur von Dong *et al.* (2001) verwendet, die erstmals beschrieben, dass die Mrgs eine signifikante Homologie zum *Mas*-Protoonkogen aufweisen. Frühere Ergebnisse der Arbeitsgruppe Walther (Gemhardt *et al.*, 2005) konnten zeigen, dass der *Mas*-Rezeptor, der durch das *Mas*-Protoonkogen kodiert wird (Young *et al.*, 1986), durch eine konstitutive Aktivierung von Rho mitogene Eigenschaften aufweist. Aus diesem Grund sollte zuerst geprüft werden, ob sich diese konstitutive Aktivität auch für andere Mitglieder der Mrg-Familie nachweisen lässt. Vorab wurde von den in dieser Arbeit mir zur Verfügung gestellten Rezeptoren (HSMas, HSMRG, HSMrgD, HSMrgF, HSMrgX1, HSMrgX2, HSMrgX3, HSMrgX4, MMMrgH; 2.2.2) ein Stammbaum erstellt, der die Verwandtschaft der Mrgs zu dem *Mas*-Protein widerspiegelt, um später mögliche phylogenetische Zusammenhänge erkennen zu können. Für die phylogenetische

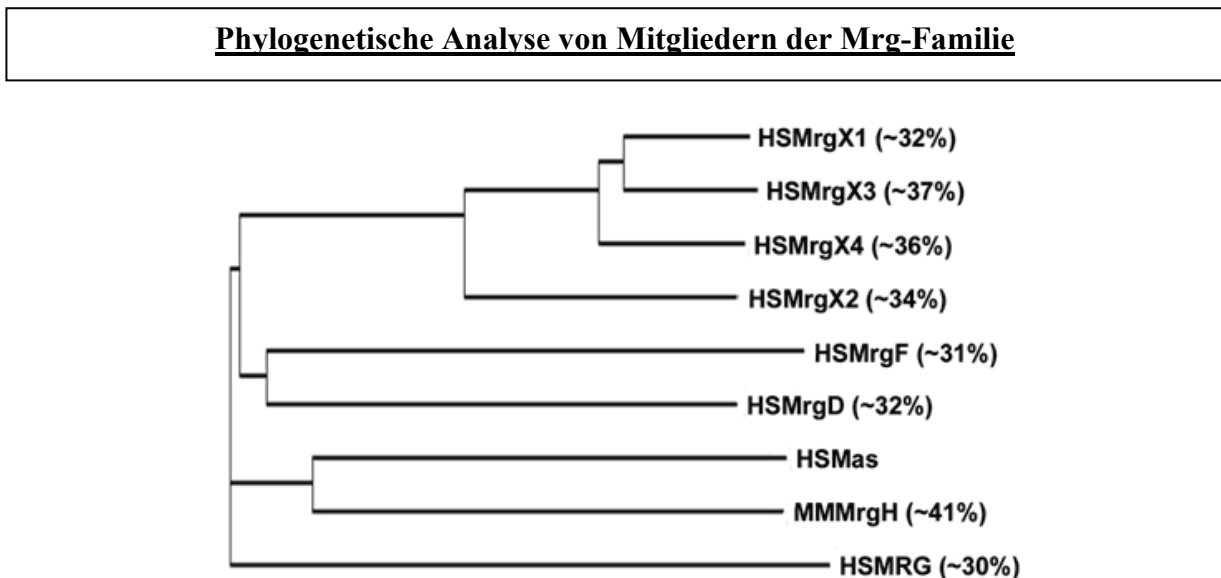


Abb.4.1: Phylogenetische Analyse der Proteinsequenz humaner (HS) und muriner (MM) G-Protein gekoppelter Rezeptoren der Mrg-Familie. Gezeigt sind die Rezeptoren, die in dieser Arbeit verwendet wurden. Mittels „ClustalW2“ und „blastp“ wurden die Proteinsequenzen der Mrg-Rezeptoren verglichen. Die Sequenzhomologie der Mrg-Rezeptoren zu HSMas ist in Klammern hinter den jeweiligen Rezeptoren geschrieben.

Analyse der Proteinsequenzen der humanen Mrg-Familienmitglieder und des murinen Mrg-Mitgliedes wurde deren Sequenzhomologie zu HSMas mittels „blastp“ (3.1.10.2) errechnet und mit „ClustalW2“ (3.1.10.2) der Stammbaum erstellt (Abb.4.1).

4.1.1 Nachweis der konstitutiven Aktivität des humanen Mas-Rezeptors und des Mas-Rezeptors der Ratte in HEK293A-Zellen

Zunächst galt es, die konstitutive Aktivität des Mas-Rezeptors durch eigene Versuche zu bestätigen. Dazu wurden HEK293A-Zellen mit dem humanen (HS) Mas-Rezeptor bzw. mit dem Ratten (RN)-Mas-Rezeptor transfiziert (2.2.2; 3.2.6). Der RNMas-Rezeptor, der eine Sequenzhomologie von 90% zum HSMas-Rezeptor hat, wurde verwendet, um mögliche Speziesunterschiede aufzuzeigen. Über die Aktivierung des „Serum Response Factors“ (SRF), dessen Transkription mittels eines „Serum Response Element“ (SRE) gesteuert wird, wurde die Aktivierung des Transkriptionsfaktors mit dem „Dual-Luciferase Reporter Assay System“ (2.2.3; 2.10) unter Verwendung eines Luziferase-Plasmids ermittelt. Das Luziferase-Plasmid enthält ein SRE, dessen Aktivität über die Familie der Rho-GTPasen induziert wird. Das Luziferase-Gen kodiert für ein Enzym, das durch Oxidation von Luziferin Lichtquanten erzeugt (3.2.5). Mit Hilfe des Luminometers (2.11) konnte die Luziferase-Produktion in den transfizierten

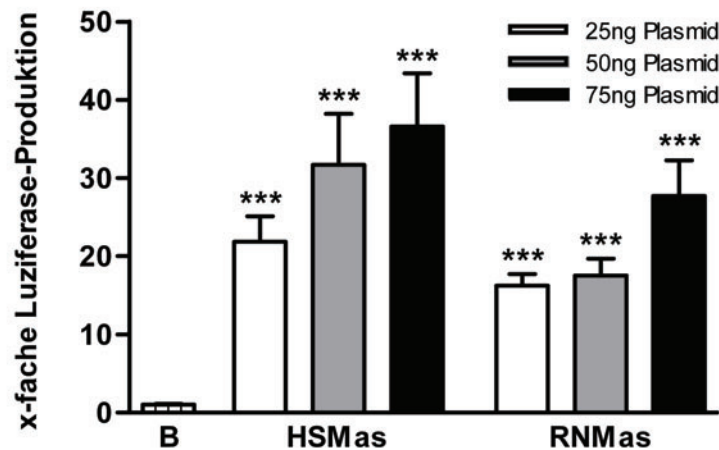


Abb.4.2: Die SRF-Aktivierung nach Transfektion mit den Plamiden pcDNA3.1(-)HSMas und pcDNA3.1(-)RNMas in aufsteigenden Konzentrationen (25ng, 50ng, 75ng) in HEK293A-Zellen. Der Basalwert (B), nur pcDNA3.1(-)-transfizierte Zellen, wurde gleich eins gesetzt; ***P<0,001 vs. Basalwert; n ≥ 2×3.

HEK293A-Zellen gemessen werden (3.2.8). Verglichen wurden die Werte in HSMas- und RNMas-transfizierten Zellen mit dem Basalwert aus pcDNA3.1(-)-transfizierten Zellen (Abb.4.2).

Es konnte gezeigt werden, dass die Transfektion des HSMas-Rezeptors, wie auch die Transfektion des RNMas-Rezeptors, zu einer signifikanten Erhöhung der Luziferase-Produktion führt (Abb.4.2), was für eine konstitutive Aktivität beider Rezeptoren spricht. Der t-Test ergab keinen signifikanten Unterschied in der Luziferase-Produktion zwischen HSMas und RNMas.

4.1.2 Untersuchung zur konstitutiven Aktivität der humanen MRG-, MrgD-, MrgF-, MrgX1-, MrgX2-, MrgX3-, und MrgX4- und des murinen MrgH-Rezeptors in HEK293A-Zellen

Wie unter 4.1 erwähnt, wurde eine „neue“ Rezeptorfamilie G-Protein gekoppelter Rezeptoren (GPCR) identifiziert, die eine nahe Verwandtschaft zum Mas-Rezeptor aufwies. Auf der Suche nach weiteren Rezeptoren, die eine mögliche konstitutive Aktivität zeigen könnten, wurden verschiedene humane Rezeptoren (HSMas, HSMRG, HSMrgD, HSMrgF, HSMrgX1, HSMrgX2, HSMrgX3 und HSMrgX4; 2.2.2) und der murine MrgH-Rezeptor in steigender pcDNA3.1(-)-Konzentration (25ng, 50ng, 75ng), die für die humane und die murine Form der Rezeptoren kodiert, in HEK293A-Zellen (2.1) transfiziert (3.2.6). Der murine MrgH-Rezeptor wurde verwendet, weil zurzeit kein bekanntes humanes Homolog existiert. Wieder wurde mit Hilfe des „Dual-Luciferase Reporter Assay Systems“ (2.10; 3.2.5) und des Luminometers (2.11) die konstitutive Aktivierung des SRF gemessen (3.2.8) und die gewonnenen Daten anschließend mit dem Basalwert, nur mit pcDNA3.1(-)-transfizierte Zellen, verglichen.

Es konnte gezeigt werden, dass der HSMas-Rezeptor wie erwartet konstitutiv aktiv ist (Abb.4.3). Außerdem wurden zwei weitere Rezeptoren der Mrg-Familie, HSMrgD und HSMrgX4, identifiziert, die eine signifikante Erhöhung in der Luziferase-Produktion aufweisen und somit konstitutiv aktiv sind (Abb.4.3). Für HSMrgD konnte sogar eine weitaus höhere Luziferase-Produktion im Vergleich zum HSMas festgestellt werden (Abb.4.3). HSMrgX4 zeigte im Vergleich zu HSMas eine signifikant geringfügigere Luziferase-Produktion (Abb.4.3). Damit weist der HSMrgD-Rezeptor von den drei identifizierten, konstitutiv aktiven Rezeptoren in HEK293A-Zellen die stärkste konstitutive Aktivität auf. Die anderen untersuchten humanen Rezeptoren HSMRG, HSMrgF, HSMrgX1, HSMrgX2, HSMrgX3 und der untersuchte MMRgH-Rezeptor zeigten keinen signifikanten Anstieg der Luziferase-Produktion (Abb.4.3).

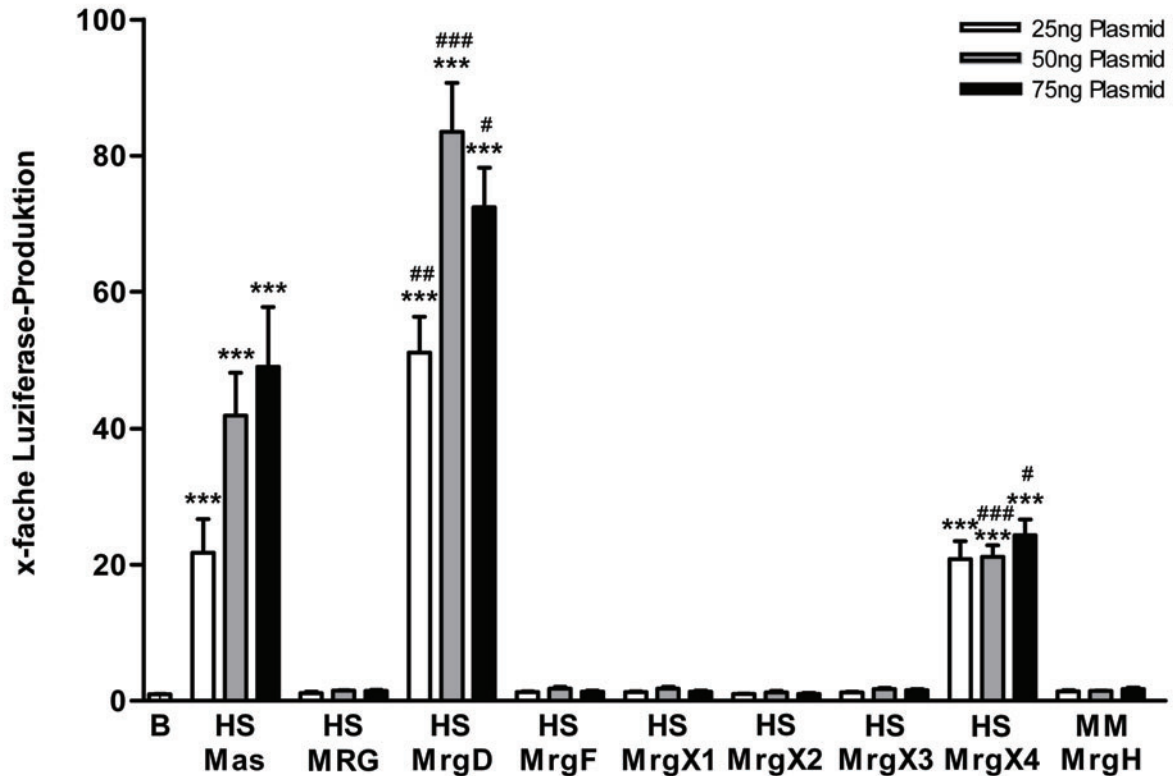


Abb.4.3: Die SRF-Aktivierung nach Transfektion mit verschiedenen humanen Mrg-Rezeptoren und dem murinen MrgH-Rezeptor in aufsteigenden Plasmid-Konzentrationen (25ng, 50ng, 75ng) in HEK293A-Zellen. Der Basalwert (B): nur pcDNA3.1(-)-transfizierte Zellen, wurde gleich eingesetzt; ***P<0,001 vs. Basalwert; #P<0,05, ##P<0,01, ###P<0,001 vs. HSMas-transfizierten Zellen, n ≥ 2×3.

4.1.3 Dosis-Wirkungs-Kurve für die HSMrgD- und HSMrgX4-Rezeptoren in HEK293A-Zellen

Die neu identifizierten, konstitutiv aktiven Rezeptoren wurden in HEK293-Zellen (2.1) mit steigender Konzentration (5ng, 10ng, 20ng, 30ng, 50ng, 70ng, 100ng) pcDNA3.1(-), die für die humanen Formen des MrgD- und des MrgX4-Rezeptors kodieren, transfiziert (3.2.6). Die Messung der Aktivierung beider Rezeptoren erfolgte wie in 4.1.1 (3.2.8). Es konnte demonstriert werden, dass die Luziferase-Produktion von HSMrgD und HSMrgX4 dosisabhängig bis zu einer Plateau-Phase signifikant gesteigert wird (Abb.4.4). Die Luziferase-Produktion von HSMrgD ist im Vergleich zu HSMrgX4 signifikant höher (Abb.4.4).

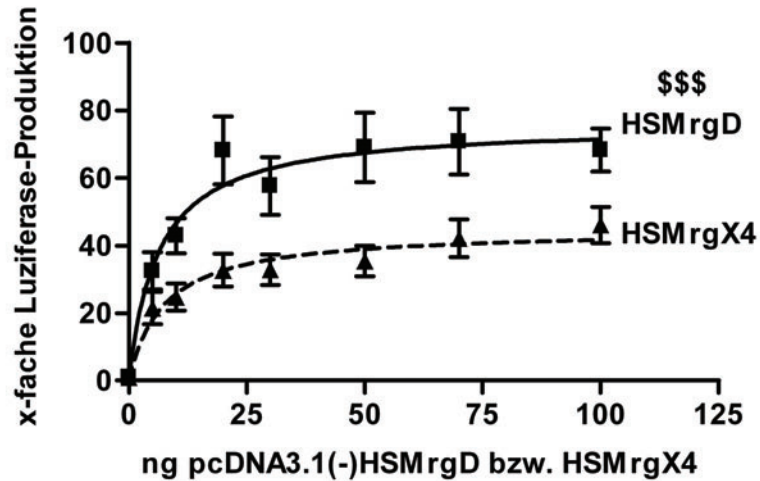


Abb.4.4: Dosis-Wirkungs-Kurve der SRF-Aktivierung in HEK293A-Zellen nach Transfektion mit dem humanen MrgD- und MrgX4-Rezeptor in aufsteigenden Konzentrationen (5ng, 10ng, 20ng, 30ng, 50ng, 70ng, 100ng); \$\$\$ $P < 0,01$ vs. HSMrgX4 (Two-way-ANOVA; 3.3); $n \geq 8 \times 3$.

4.1.4 Klonierung von cDNA anderer Mitglieder der Mrg-Familie

Phylogenetische Analyse von Mitgliedern der Mrg-Familie

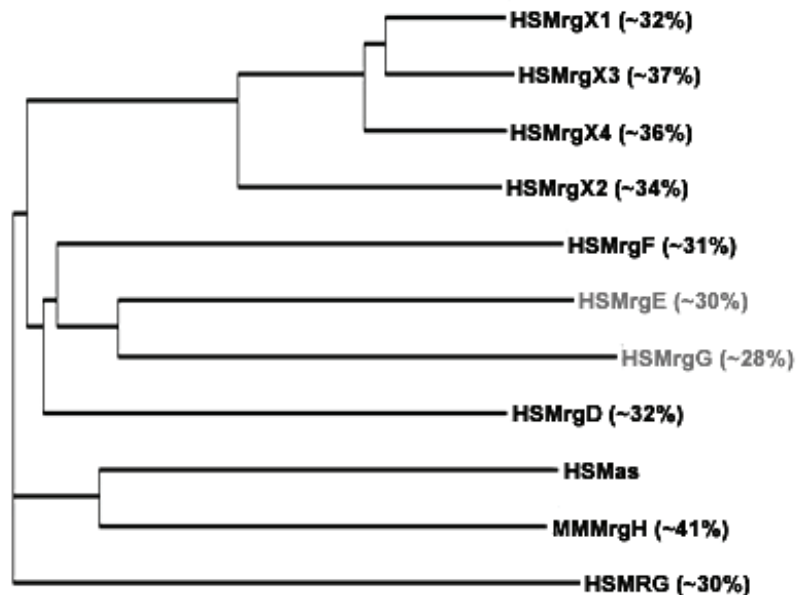


Abb.4.5: Phylogenetische Analyse der Proteinsequenz humaner und muriner G-Protein gekoppelter Rezeptoren der Mrg-Familie. Mittels „ClustalW2“ und „blastp“ wurden die Proteinsequenzen der Mrg-Rezeptoren verglichen. Die Sequenzhomologie der Mrg-Rezeptoren zu HSMas ist in Klammern hinter den jeweiligen Rezeptoren; grau sind die „neu“ klonierten humanen MrgE- und MrgG-Rezeptoren.

Auf der Suche nach weiteren Rezeptoren der Mrg-Familie, die konstitutive Aktivität zeigen, fokussierte sich das Interesse auf die humanen MrgE- und MrgG-Rezeptoren, da sie in phylogenetischen Analysen (Dong *et al.*, 2001; Lembo *et al.*, 2002; Choi *et al.*, 2003) als nahe Verwandte des HSMas-Rezeptor identifiziert wurden und sich somit am ehesten konstitutive Aktivität vermuten lässt (Anlage 1). Der in Abb.4.1 gezeigte Stammbaum wurde um die Proteinsequenzen von HSMrgE und HSMrgG mittels „ClustalW2“ und „blastp“ (3.1.10.2) ergänzt (Abb.4.5), damit später phylogenetische Rückschlüsse gezogen werden können. Um deren mögliche konstitutive Aktivität überprüfen zu können, mussten die kodierenden Sequenzen (cDNA) von HSMrgE und HSMrgG erst amplifiziert und dann kloniert werden.

4.1.4.1 Die Amplifikation von cDNA anderer Mitglieder der Mrg-Familie

Zur Klonierung der MrgE- und MrgG- kodierenden Fragmente in einem geeigneten Vektor war die Amplifizierung der Fragmente durch PCR notwendig (3.1.1). Das HSMrgE-Fragment wurde mit den Primern HSMRGE31 und HSMRGE51 (2.4) und das HSMrgG-Fragment mit den Primern HSMRGG32 und HSMRGG52 (2.4) aus genomischer DNA der humanen Plazenta amplifiziert (Länge der kodierenden HSMrgE-Sequenz lt. Datenbank: 903bp; „Gen-Bank accession“ Nummer: BC 112203; Länge der kodierenden HSMrgG-Sequenz lt. Datenbank: 936bp; „Gen-Bank accession“ Nummer: AY 255583).

Die spezifischen PCR-Bedingungen wurden entsprechend zu 3.1.1 gewählt. Klare Banden (Abb.4.6 und 4.7) wurden anschließend aus einem präparativen Gel durch Elution isoliert (3.1.3). Die isolierten Fragmente hatten die erwartete Länge von: HSMrgE 947bp und HSMrgG 984bp. Bei der PCR stieg die Fragmentlänge der HSMrgE- und HSMrgG-Sequenz um die Fragmentlänge der verwendeten Primer (2.4) an. So ist die erhöhte Fragmentlänge der „neu“ isolierten Fragmente im Vergleich zur kodierenden HSMrgE- und HSMrgG-Sequenz der Datenbank zu erklären. Anschließend fanden die isolierten Fragmente weitere Verwendung für die Klonierung.

Neben den humanen Fragmenten wurden noch die cDNA von MrgE und MrgG aus der Ratte amplifiziert. Die RNMrge-Fragmente wurde mit den Primern RNMRGE3 und RNMRGE5 (2.4) und die RNMrge-Fragmente mit den Primern RNMRGG3 und RNMRGG5 (2.4) aus genomischer DNA des Rattenschwanzes amplifiziert (Länge der kodierenden RNMrge-Sequenz lt. Datenbank: 930bp; „Gen-Bank accession“ Nummer: AF518247; Länge der kodierenden RNMrge-Sequenz lt. Datenbank: 870bp; „Gen-Bank accession“ Nummer: AF518248).

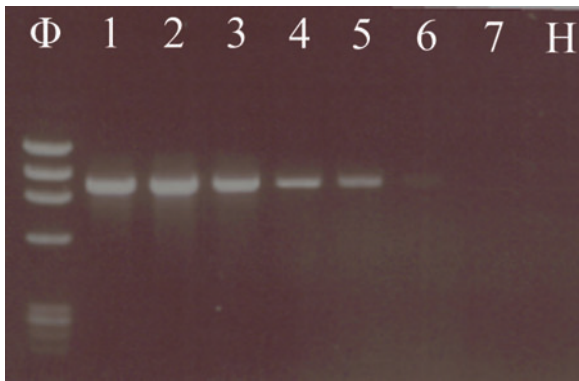


Abb.4.6: Amplifikation des HSMrgE-Fragmentes (Temperaturanstieg von links nach rechts 55°C [Spur1] bis 65°C [Spur7]). Folgende Primer-Paare wurden verwendet: HSMRGE31, HSMRGE51; Φ =Marker (Anlage 3C), H=H₂O-Kontrolle.

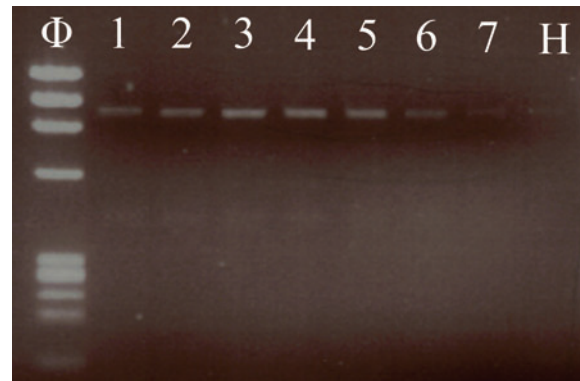


Abb.4.7: Amplifikation des HSMrgG-Fragmentes (Temperaturanstieg von links nach rechts 50°C [Spur1] bis 65°C [Spur7]). Folgende Primer-Paare wurden verwendet: HSMRGG32, HSMRGG52; Φ =Marker (Anlage 3C), H=H₂O-Kontrolle.

Klare Banden (Abb.4.8 und 4.9) wurden anschließend aus einem präparativen Gel durch Elution isoliert (3.1.3). Die isolierten Fragmente hatten eine Länge von: 937bp für RNMrge bzw. 884bp für RNMrgeG und wurden weiterverwendet. Auch hier ist die veränderte Fragmentlänge der RNMrge- und RNMrgeG-Sequenzen im Vergleich zur kodierenden Sequenzlänge der Datenbank durch die verwendeten Primer (2.4) zu erklären, die außerhalb von Start- bzw. Stoppkodon gewählt werden mussten.

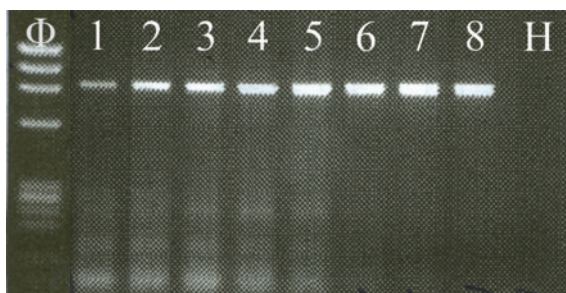


Abb.4.8: Amplifizierung des RNMrgeE-Fragmentes (Temperaturanstieg von links nach rechts 50°C [Spur1] bis 64°C [Spur8]). Folgende Primer-Paare wurden verwendet: RNMRGE3, RNMRGE5; Φ =Marker (Anlage 3C), H=H₂O.

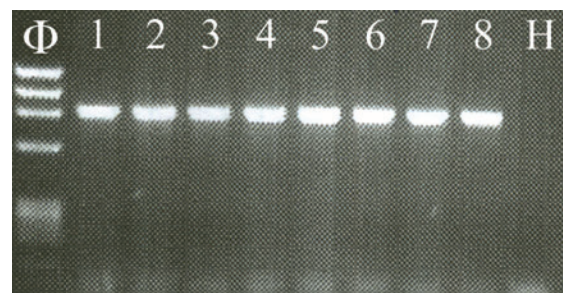


Abb.4.9: Amplifizierung des RNMrgeG-Fragmentes (Temperaturanstieg von links nach rechts 50°C [Spur1] bis 64°C [Spur8]). Folgende Primer-Paare wurden verwendet: RNMRGG3, RNMRGG5; Φ =Marker (Anlage 3C), H=H₂O.

4.1.4.2 Klonierung von humanen MrgE- und MrgG-Fragmenten in Expressions-Vektoren

4.1.4.2.1 Klonierung von humanen MrgE- und MrgG-Fragmenten in den T Easy-Vektor

Die Klonierung der isolierten Fragmente erfolgte durch Ligation (3.1.6) in den T Easy-Vektor (2.2.1 und Anlage 2C) und Transformation des Ligationsansatzes in kompetente Zellen des Bakteriums *E.coli* (2.1, 3.1.7). Bakterien, die nach Transformation eines Plasmids das integrierte PCR-Fragment tragen, wachsen als weiße Kolonien. Bei Transformation eines „leeren“ T Easy-Vektors dagegen verfärbten sich die Kolonien blau. Nach Ligation der isolierten PCR-Fragmente HSMrgE und HSMrgG mit dem T Easy-Vektor und Transformation wuchsen die weißen und blauen Kolonien auf dem mit dem Transformationsansatz ausplattierten X-Gal/IPTG-Agarplatten (2.7). Die weißen Kolonien wurden gepickt und in der Minipräparation (3.1.8.1) die Plasmid-DNA aus den Bakterien isoliert. Die blauen Kolonien wurden verworfen.

Im anschließenden Kontrollverdau (3.1.9) mit dem Restriktionsenzym *ApaI* und Puffer A (2.3) für HSMrgE und HSMrgG wurde der Klonierungserfolg überprüft (Abb.4.10). Positiv waren Mini 1, 2, 3 (Teasy-HSMrgE) und 4, 5, 6 (Teasy-HSMrgG). Da die Bandenlänge des Verdaus der Länge der zur erwarteten Fragmentlängen entsprach, wurde die Mini 2 für Teasy-HSMrgE und die Mini 6 für Teasy-HSMrgG zur exakten Bestimmung der inserierten cDNA sequenziert (3.1.10.1).

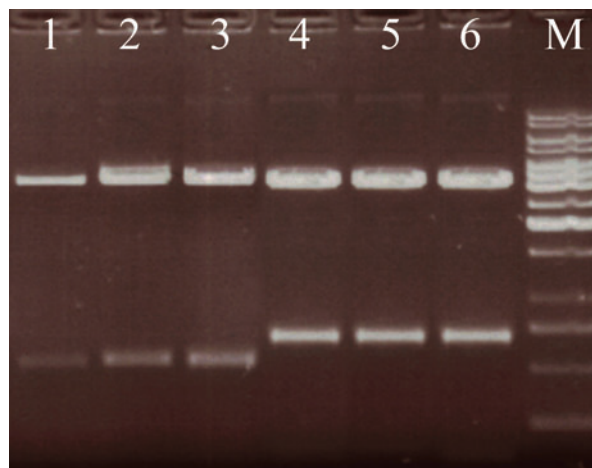


Abb.4.10 : Kontrollverdau von Teasy-HSMrgE und Teasy-HSMrgG mit dem Enzym *ApaI*. Überprüfung des Klonierungserfolges der isolierten PCR-Fragmente (Abb.4.6, 4.7): 1, 2, 3=HSMrgE-Klone; 4, 5, 6=HSMrgG-Klone; M=O`GeneRuler™ 1kb DNA Ladder (Anlage 3B). Positive Klone für Teasy-HSMrgE: 1, 2 und 3 und für Teasy-HSMrgG: 4, 5, 6.

4.1.4.2.2 Die Sequenzanalyse der klonierten HSMrgE- und HSMrgG-Fragmente

Die ausgewählten Minipräparationen wurden zur Sequenzierung an die Invitek GmbH geschickt (3.1.10.1). Die Sequenzierungsergebnisse und das Ergebnis der Sequenzierung mit Hilfe des Computerprogramms BLAST sind in Abb.4.11 und Abb.4.12 aufgeführt (3.1.10.2).

Zum Vergleich wurden HSMrgE- und HSMrgG-Gensequenzen aus der Datenbank (HSMrgE: „Gen-Bank accession“ Nummer: BC 112203; HSMrgG: „Gen-Bank accession“ Nummer: AY 255583) ausgewählt und als Referenzsequenz genutzt.

Sequenzierungsergebnis von Teasy-HSMrgE

```

Query ATGATGGAGCCCAGAGAAGCTGGACAGCACGTGGGGGCCGCCAACGGCGCCCAGGAGGAT 60
|
Sbjct ATGATGGAGCCCAGAGAAGCTGGACAGCACGTGGGGGCCGCCAACGGCGCCCAGGAGGAT 2037208

Query GTGGCCTTCAACCTCATCATCCTGTCCCTCACCGAGGGGCTCGGCCTCGGTGGGCTGCTG 120
|
Sbjct GTGGCCTTCAACCTCATCATCCTGTCCCTCACCGAGGGGCTCGGCCTCGGTGGGCTGCTG 2037148

Query GGAATGGGGCAGTCTCTGGCTGCTCAGCTCCAATGTCTACAGAAACCCCTTCGCCATC 180
|
Sbjct GGAATGGGGCAGTCTCTGGCTGCTCAGCTCCAATGTCTACAGAAACCCCTTCGCCATC 2037088

Query TACCTCCTGGACGTGGCCTGCGCGGATCTCATCTTCTTGGCTGCCACATGGTGGCCATC 240
|
Sbjct TACCTCCTGGACGTGGCCTGCGCGGATCTCATCTTCTTGGCTGCCACATGGTGGCCATC 2037028

Query GTCCCCGACTTGCTGCAAGGCCGGCTGGACTTCCCGGGCTTCGTGCAGACCAGCCTGGCA 300
|
Sbjct GTCCCCGACTTGCTGCAAGGCCGGCTGGACTTCCCGGGCTTCGTGCAGACCAGCCTGGCA 2036968

Query ACGCTGCGCTTCTTCTGCTACATCGTGGGCCTGAGTCTCCTGGCGGCCGTACAGCTGGAG 360
|
Sbjct ACGCTGCGCTTCTTCTGCTACATCGTGGGCCTGAGTCTCCTGGCGGCCGTACAGCTGGAG 2036908

Query CAGTGCCTGGCCGCCCTCTTCCCAGCCTGGTACTCGTGCCGCCGCCACGCCACCTGACC 420
|
Sbjct CAGTGCCTGGCCGCCCTCTTCCCAGCCTGGTACTCGTGCCGCCGCCACGCCACCTGACC 2036848

Query ACCTGTGTGTGCGCCCTCACCTGGGCCCTCTGCCTGCTGCTGCACCTGCTGCTCAGCAGC 480
|
Sbjct ACCTGTGTGTGCGCCCTCACCTGGGCCCTCTGCCTGCTGCTGCACCTGCTGCTCAGCAGC 2036788
Ser
AGC
GGC
Gly

Query GCCTGCACCCAGTTCTTCGGGGAGCCAGCCGCCACTTGTGCCGGACGCCGTGGCTGGTG 540
|
Sbjct GCCTGCACCCAGTTCTTCGGGGAGCCAGCCGCCACTTGTGCCGGACGCCGTGGCTGGTG 2036728
Pro
CTG
Leu

Query GCAGCGGTGCTGCTGGCTCTGCTGTGTTGCACCATGTGTGGGGCCAGCCTTATGCTGCTG 600
|
Sbjct GCAGCGGTGCTGCTGGCTCTGCTGTGTTGCACCATGTGTGGGGCCAGCCTTATGCTGCTG 2036668
    
```

```

Query CTGCGGGTGGAGCGAGGCCCGCCAGCGGGCCCGCCACCCCGGGGCTTCCCTGGGCTCATCCTC 660
      |
Sbjct CTGCGGGTGGAGCGAGGCCCGCCAGCGGGCCCGCCACCCCGGGGCTTCCCTGGGCTCATCCTC 2036608

Query CTCACCGTCTCCTCTTCTCCTCTTCTGCGGCCTGCCCTTCGGCATCTACTGGCTGTCCCGG 720
      |
Sbjct CTCACCGTCTCCTCTTCTCCTCTTCTGCGGCCTGCCCTTCGGCATCTACTGGCTGTCCCGG 2036548

Query AACCTGCTCTGGTACATCCCCACTACTTCTACCACTTCAGCTTCTCATGGCCGCGTG 780
      |
Sbjct AACCTGCTCTGGTACATCCCCACTACTTCTACCACTTCAGCTTCTCATGGCCGCGTG 2036488

Query CACTGCGCGGCCAAGCCCGTCGTCTACTTCTGCCTGGGCAGTGCCAGGGCCGAGGCTG 840
      |
Sbjct CACTGCGCGGCCAAGCCCGTCGTCTACTTCTGCCTGGGCAGTGCCAGGGCCGAGGCTG 2036428

Query CCCCTCCGGCTGGTCTCCAGCGAGCGCTGGGAGACGAGGCTGAGCTGGGGCCGTCAGG 900
      |
Sbjct CCCCTCCGGCTGGTCTCCAGCGAGCGCTGGGAGACGAGGCTGAGCTGGGGCCGTCAGG 2036368

Query GAGACCTCCCGCCGGGGCCTGGTGGACATAGCAGCCTGA 939
      |
Sbjct GAGACCTCCCGCCGGGGCCTGGTGGACATAGCAGCCTGA 2036332
    
```

Abb.4.11: Sequenzierungsergebnis durch das BLAST-Programm nach Eingabe der Mini-Sequenz, Vergleich des Plasmids Teasy-HSMrgE mit der Referenzsequenz BC 112203; Query = Mini; Subjekt (Sbjct) = BC 112203; Fett gedruckt und grau hinterlegt: Aminosäureaustausch aufgrund von Basenpaarveränderung; Fett gedruckt und unterstrichen: Startcodon+Primer oder Stopcodon+Primer.

Sequenzierungsergebnis von Teasy-HSMrgG

```

Query ATGCCACTCCCTGTGCCCGCCAGCGGGGGCACAAAAGACTCCTGAGGACCATGTCTGTCTC 60
      |
Sbjct ATGCCACTCCCTGTGCCCGCCAGCGGGGGCACAAAAGACTCCTGAGGACCATGTCTGTCTC 2027327

      Glu
Query CATCTTGAAGGTCCCTCGCCAGCACCCCTCTGAGCCGGCCAGGATGTTGGGCTGTTCCGGC 120
      |
Sbjct CATCTTGCAGGTCCCTCGCCAGCACCCCTCTGAGCCGGCCAGGATGTTGGGCTGTTCCGGC 2027267
      Ala

Query CTCTGGAGAACCTTCGACAGTGTGGTCTTCTACCTGACGCTGATCGTGGGCCTCGGGGGA 180
      |
Sbjct CTCTGGAGAACCTTCGACAGTGTGGTCTTCTACCTGACGCTGATCGTGGGCCTCGGGGGA 2027207

Query CCGGTAGGTAACGGGCTGGTGTCTGGAACCTCGGCTTCCGCATCAAGAAGGGCCCTTC 240
      |
Sbjct CCGGTAGGTAACGGGCTGGTGTCTGGAACCTCGGCTTCCGCATCAAGAAGGGCCCTTC 2027147

Query TCCATCTACCTGCTGCACCTGGCCGCCGCCACTTCCTGTTCCCTCTCCTGCCGTGTGGGC 300
      |
Sbjct TCCATCTACCTGCTGCACCTGGCCGCCGCCACTTCCTGTTCCCTCTCCTGCCGTGTGGGC 2027087
    
```

```

Query  TTCTCCGTGGCTCAGGCTGCCCTGGlyGGTGCCCAGGACACACTCTACTTCGTGCTCACCTTC 360
      |||
Sbjct  TTCTCCGTGGCTCAGGCTGCCCTGGlyGGCGCCCAGGACACACTCTACTTCGTGCTCACCTTC 2027027

Query  CTGTGGTTCGCGGTGGGGCTCTGGCTGCTGGCGGCCCTTCAGCGTGGAGCGCTGCCTCTCC 420
      |||
Sbjct  CTGTGGTTCGCGGTGGGGCTCTGGCTGCTGGCGGCCCTTCAGCGTGGAGCGCTGCCTCTCC 2026967

Query  GACCTCTTCCCCGCCTGCTACCAGGGCTGCCGGCCCAGACACGCCTCGGCCGTCCTCTGC 480
      |||
Sbjct  GACCTCTTCCCCGCCTGCTACCAGGGCTGCCGGCCCAGACACGCCTCGGCCGTCCTCTGC 2026907

Query  GCCCTGGTGTGGACCCCGACCCTGCCGGCCGTGCCGCTGCCCGCCAACGCCTGCGGCCCTG 540
      |||
Sbjct  GCCCTGGTGTGGACCCCGACCCTGCCGGCCGTGCCGCTGCCCGCCAACGCCTGCGGCCCTG 2026847

Query  CTGCGCAACAGCGCGTGCCCCCTGGTCTGCCCGCGCTACCACGTGGCCAGCGTCACCTGG 600
      |||
Sbjct  CTGCGCAACAGCGCGTGCCCCCTGGTCTGCCCGCGCTACCACGTGGCCAGCGTCACCTGG 2026787

Query  TTCCTGGTGTGGCCCGCGTCGCCTGGACGGCTGGCGTGGTCCTCTTTGTCTGGGTGACC 660
      |||
Sbjct  TTCCTGGTGTGGCCCGCGTCGCCTGGACGGCTGGCGTGGTCCTCTTTGTCTGGGTGACC 2026727

Query  TGCTGCTCCACTArgCGCCCGCGGCCAGGCTCTACGGCATCGTCCTGGGCGCGCTGCTCCTG 720
      |||
Sbjct  TGCTGCTCCACTArgCGCCCGCGGCCAGGCTCTACGGCATCGTCCTGGGCGCGCTGCTCCTG 2026667

Query  CTCTTCTTCTGTGGCCTGCCCTCGGTCTTCTACTGGAGCCTGCAGCCCCTGCTGAACTTC 780
      |||
Sbjct  CTCTTCTTCTGTGGCCTGCCCTCGGTCTTCTACTGGAGCCTGCAGCCCCTGCTGAACTTC 2026607

Query  CTGCTGCCCCTGTTTTTCCCCGCTGGCCACGCTGCTGGCCTGCGTCAACAGCAGCTCCAAG 840
      |||
Sbjct  CTGCTGCCCCTGTTTTTCCCCGCTGGCCACGCTGCTGGCCTGCGTCAACAGCAGCTCCAAG 2026547

Query  CCCCTCATCTACTCGGGGTTGGGCCGACAGCCCGGAAGCGGGAGCCGCTGAGGTCGGTA 900
      |||
Sbjct  CCCCTCATCTACTCGGGGTTGGGCCGACAGCCCGGAAGCGGGAGCCGCTGAGGTCGGTA 2026487

Query  CTGCGGAGGGCCArgCGGGGGGAGGGCGCCGAGCTGGGTGCCAGGGGACAGTCCCTGCCCATG 960
      |||
Sbjct  CTGCGGAGGGCCLeuCTGGGGGAGGGCGCCGAGCTGGGTGCCAGGGGACAGTCCCTGCCCATG 2026427

Query  GGTCTCCTATAA 972
      |||
Sbjct  GGTCTCCTATAA 2026415

```

Abb.4.12: Sequenzierungsergebnis durch das BLAST-Programm nach Eingabe der Mini-Sequenz, Vergleich des Plasmids Teasy-HSMrgG mit der Referenzsequenz AY 255583; Query = Mini; Subjekt (Sbjct) = AY 255583. Fett gedruckt und grau hinterlegt: Aminosäureaustausch aufgrund von Basenpaarveränderung; Fett gedruckt und unterstrichen: Startcodon+Primer oder Stopcodon+Primer.

Die verglichenen Gensequenzen stimmten für HSMrgE bzw. für HSMrgG zu 99% mit denen aus der Datenbank überein (Abb.4.11 und 4.12). Für das HSMrgE-Fragment wurden zwei Punktmutationen in der Nukleotidsequenz an Position Gly160Ser und Leu177Pro festgestellt (Abb.4.11 und Anlage 6), die zu einer Veränderung in der Aminosäuresequenz führen (Abb.4.11 und Anlage 6).

Vier Basenpaaraustausche konnten für das HSMrgG-Fragment identifiziert werden (Abb.4.12 und Anlage 6), wobei zwei zu keiner Änderung in der Aminosäuresequenz führten. Die beiden anderen Mutationen führten zu einem Aminosäureaustausch von Ala23Glu und Leu305Arg (Abb.4.12 und Anlage 6). Die neu gewonnenen Fragmente des HSMrgE- bzw. HSMrgG-Rezeptors wurden daraufhin mit den Aminosäuresequenzen der anderen verwendeten GPCR verglichen (Anlage 6). Nach dem Einzeichnen der transmembranen Domänen (TMD) für jeden Rezeptor konnte die räumliche Lokalisation der Mutationen im den G-Protein gekoppelten Rezeptoren ausfindig gemacht werden (Abb.4.13 und Anlage 6).

Es zeigte sich, dass die Mutationen von HSMrgE im extrazellulären Bereich zwischen TMD4 und TMD5 liegen (zweites extrazelluläres Loop). Um ausschließen zu können, dass möglicherweise der Bereich verändert ist, der bei den aktiven Rezeptoren (HSMas, HSMrgD, HSMrgX4) für die konstitutive Aktivität verantwortlich ist, wurden die mutierten Aminosäurepositionen von HSMrgE mit den jeweiligen Aminosäurepositionen von HSMas, HSMrgD und HSMrgX4 verglichen (Anlage 6). Es zeigte sich, dass an der HSMrgE-Aminosäureposition Gly160Ser im Sequenzvergleich für HSMas Valin (Val, V), für HSMrgD Serin (Ser, S) und für HSMrgX4 Arginin (Arg, R) stehen. An der HSMrgE-Aminosäureposition Leu177Pro ergab sich für HSMas Serin (Ser, S), für HSMrgD Isoleucin (Ile, I) und für HSMrgX4 Asparginsäure (Asp, D). Da in den verdächtigen Positionen somit für die konstitutiv aktiven Rezeptoren jeweils eine andere Aminosäure stand, war es folglich unwahrscheinlich, dass die vorhandenen Mutationen von HSMrgE für Veränderungen in einer möglichen konstitutiven Aktivität des Rezeptors verantwortlich waren. Somit wurde das klonierte HSMrgE-Fragment weiter verwendet.

Die Mutationen des HSMrgG-Fragmentes liegen einmal im extrazellulären N-terminalen und zum anderen im intrazellulären C-terminalen Bereich (Abb.4.13 und Anlage 6). Auch hier wurden die Mutationsstellen mit den entsprechenden Positionen von HSMas, HSMrgD bzw. HSMrgX4 verglichen. Die Aminosäureposition Ala23Glu des HSMrgG-Fragmentes entspricht in HSMas Arginin (Arg, R), in HSMrgD Arginin (Arg, R) und in HSMrgX4 Glutaminsäure (Glu, E). An der Position Leu305Arg im HSMrgG-Fragment existiert an der korrelierenden Stelle in HSMas Phenylalanin (Phe, F), in HSMrgD Leucin (Leu, L) und in HSMrgX4 Leucin (Leu, L). Es zeigte sich somit auch hier, dass die Aminosäuren bei den drei konstitutiv aktiven Rezeptoren

in den verdächtigen Positionen unterschiedlich waren und somit erschien es als unwahrscheinlich, dass die vorhandenen Mutationen von HSMrgG für Veränderungen in einer möglichen konstitutiven Aktivität des Rezeptors verantwortlich sind. Folglich wurde auch das klonierte HSMrgG-Fragment weiter verwendet.

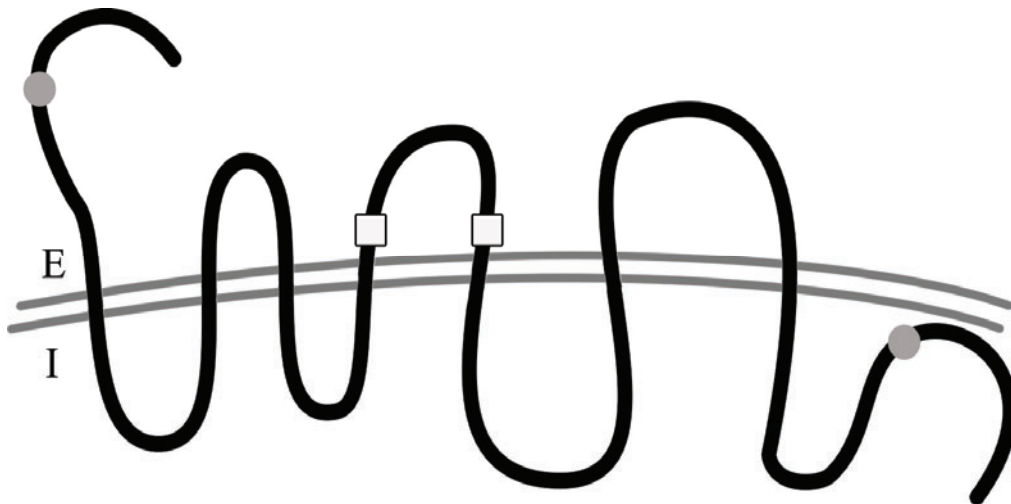


Abb.4.13: Schematische Darstellung der ungefähren Lokalisation der Mutationen von den klonierten HSMrgE- bzw. HSMrgG-Fragmenten; E=extrazellulär, I=intrazellulär; weißes Rechteck: Mutationen in HSMrgE; grauer Kreis: Mutationen in HSMrgG.

4.1.4.2.3 Klonierung der HSMrgE- und HSMrgG-Fragmente in den pcDNA3.1(-)-Vektor

Um die Expression von HSMrgE- und HSMrgG in verschiedene Zellgruppen (2.1) zu erreichen, musste eine Klonierung der cDNA in den Expressionsvektor pcDNA3.1(-) erfolgen (2.1.1; Anlage 2A). Dazu wurden die Proben 1, 2, 3 und 4, 5, 6 jeweils mit dem Enzym NotI und dem Puffer H (2.3) für 1h verdaut. Auf dem Kontrollgel erschien eine der Länge des Fragments entsprechende Bande von 982bp Länge für HSMrgE und 1019bp für HSMrgG. Die Basenpaaranzahl der HSMrgE- und HSMrgG-Fragmente setzte sich zusammen aus dem klonierten cDNA-Fragment und den T Easy-Vektor-Resten von klonierter cDNA bis zu den NotI-Schnittorten. Anschließend wurde das Fragment eluiert (3.1.3) und in den mit NotI linearisierten pcDNA3.1(-)-Vektor ligiert. Zur Vermeidung der Religation des linearisierten Vektors wurden die Phosphatenden durch alkalische Phosphatase (2.3) abgespalten (3.1.5). Nach Ligation (3.1.6) und Transformation in *E.coli*-Bakterien (3.1.7) erfolgte die Minipräparation (3.1.8) der gepickten weißen Kolonien (Abb.4.14).

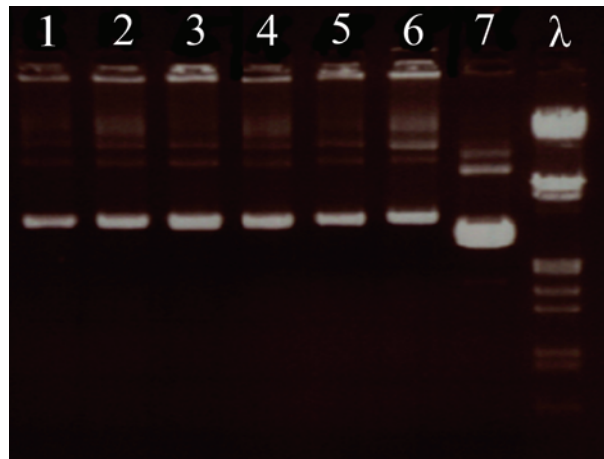


Abb.4.14: Minipräparation von *pcDNAHSMrgE* bzw. *pcDNAHSMrgG*. 1-3= *pcDNAHSMrgE*, 4-6=*pcDNAHSMrgG*, 7=*pcDNA3.1(-)* und λ =Marker (Anlage 3A). Alle Plasmide wurden unverdaut aufgetragen.

Der anschließende Kontrollverdau der Minis 1-6 mit dem Restriktionsenzym *ApaI* für *pcDNAHSMrgE*- bzw. *pcDNAHSMrgG* zeigte, dass sowohl die Mini 2 und 3 mit dem *HSMrgE*-Fragment als auch die Mini 5 und 6 mit dem *HSMrgG*-Fragment in richtiger Richtung im *pcDNA3.1(-)*-Vektor lagen (Abb.4.15). Für die richtige Lage musste das durch *ApaI* generierte *HSMrgE*-Fragment eine Länge von 485bp und das durch *ApaI* generierte *HSMrgG*-Fragment eine Länge von 950bp aufweisen (Abb.4.15). Bei Fragmentlängen von 522bp für *HSMrgE* und 94bp für *HSMrgG* lag das kodierende Fragment in falscher Orientierung im *pcDNA3.1(-)*-Vektor.

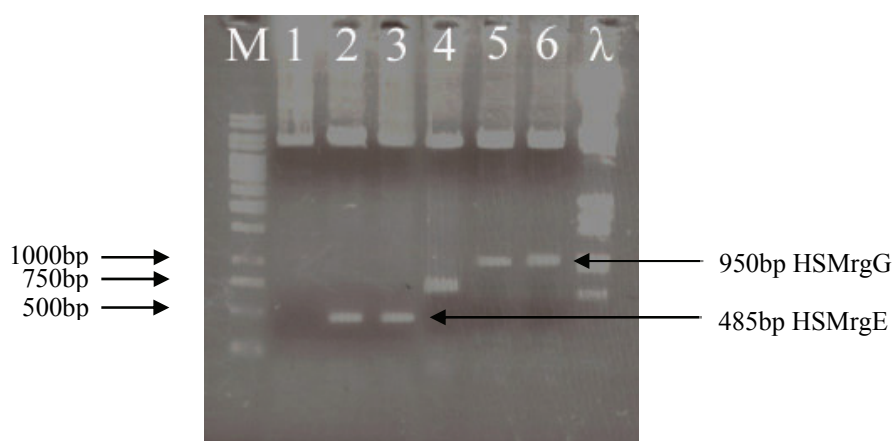


Abb.4.15: Kontrollverdau von *pcDNAHSMrgE* und *pcDNAHSMrgG* mit dem Enzym *ApaI*. Überprüfung des Klonierungserfolges in den *pcDNA3.1(-)*-Vektor: 1-3= *pcDNAHSMrgE*; 4-6= *pcDNAHSMrgG*; M=O`GeneRuler™ 1kb DNA Ladder (Anlage 3B); λ =Marker.

Zur Maxi-Präparation (3.1.9.2) wurden die Kulturen der Mini 2 (HSMrgE) und Mini 6 (HSMrgG) weiter genutzt (Abb.4.16), um eine große Menge an qualitativ hochwertiger DNA zu gewinnen. Es wurde die Mini 2 für den Maxi-Ansatz des pcDNAHSMrgE und für den Maxi-Ansatz des pcDNAHSMrgG die Mini 6 verwendet. Zur Kontrolle wurden die Maxis ebenfalls sequenziert (Abb.4.17 und 4.18).

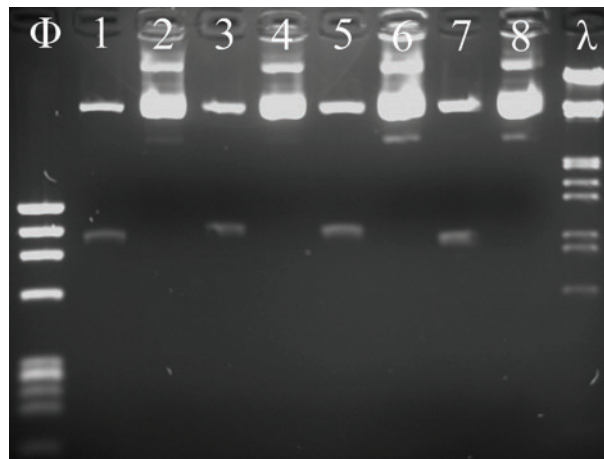


Abb.4.16: Maxipräparation von pcDNAHSMrgE, pcDNAHSMrgG, pcDNARNMrgE bzw. pcDNARNMrgG; 1/2=pcDNAHSMrgE, 3/4=pcDNAHSMrgG, 5/6=pcDNARNMrgE, 7/8=pcDNARNMrgG; 1,3,7=geschnitten mit NotI; 5=geschnitten mit NotI und ApaI; 2, 4, 6, 8=unverdaut; Φ=Marker, λ=Marker (Anlage 3A und 3C). Die Beschreibung der Maxi-präparation von pcDNARNMrgE und pcDNARNMrgG wurde in 4.1.4.3.2 beschrieben.

Die Sequenzierung des Maxi-Ansatzes (Abb.4.17 und 4.18) zeigte 99% Übereinstimmung mit den zuvor sequenzierten HSMrgE- bzw. HSMrgG-Fragmenten (4.1.4.2.2) und bestätigte die exakte Klonierung in den pcDNA3.1(-)-Vektor.

```

                                NotI                                HSMrgE51
AAGCTGGCTAGCGTTTTAAACGGGCCCTCTAGACTCGAGC↓GGCCGCGAATTCACTAGTGATGAGGCCATGATGGAGC
CCAGAGAAGCTGGACAGCACGTGGGGGCCGCCAACGGCGCCCAG Δ822bp AGGCTGAGCTGGGGCCGTCGGGAG
ACCTCCCGCCGGGGCCTGGTGGACATAGCAGCCTGAGCAATCGAATTCCCGC↓GGCCGCCACTGTGCT
                                HSMrgE31                                NotI
GGATATCTGCAGAATTCCACCACACTGGACTAGTG
    
```

Abb.4.17: Ausschnitt aus dem Sequenzierungsergebnis der Maxi pcDNAHSMrgE; kursiv: Teile des pcDNA3.1(-)-Vektors (Anlage 2); fett: Reste der T Easy-Vektors (Anlage 2); hellgrau hinterlegt: Primer HSMrgE51 und HSMrgE31; dunkelgrau hinterlegt: NotI-Schnittstellen (Klonierungsstellen); normal: 5`- und 3`-Enden der HSMrgE-Sequenz.

```

                                NotI                                HSMrgG52
AAGCTGGCTAGCGTTTAAACGGGCCCTCTAGACTCGAGC↓GGCCGCGAATTCCTAGTGATTCCATGGATGCCACTCC
CTGTGCCCCAGCGGGGGCACAAAAGA Δ906bp GACAGTCCTGCCCATGGGTCTCCTATAAGTGGGC AATCGAAT
                                HSMrgG32
TCCC↓GGCCGCGCCACTGTGCTGGATATCTGCAGAATTCCACCACACTGGACTAGTGG
                                NotI
    
```

Abb.4.18: Ausschnitt aus dem Sequenzierungsergebnis der Maxi pcDNAHSMrgG; kursiv: Teile des pcDNA3.1(-)-Vektors (Anlage 2); fett: Reste der T Easy-Vektors (Anlage 2); hellgrau hinterlegt: Primer HSMrgG52 und HSMrgG32; dunkelgrau hinterlegt: NotI-Schnittstellen (Klonierungsstellen); normal: 5`- und 3`-Enden der HSMrgG-Sequenz.

4.1.4.3 Klonierung der MrgE- und MrgG-Fragmente der Ratte in Expressions-Vektoren

4.1.4.3.1 Klonierung der MrgE- und MrgG-Fragmente der Ratte in den T Vektor

Die Klonierung der isolierten PCR-Fragmente von RNMrge und RNMrgeG (Abb.4.8, Abb.4.9) erfolgte durch Ligation (3.1.6) in den T Vektor (2.2) und Transformation des Ligationsansatzes in kompetente Zellen des Bakteriums *E. coli* (2.1, 3.1.7). Anschließend wurden wie in 4.1.4.2 die weißen Kolonien für die Minipräparation (3.1.8.1) verwendet. Im folgenden Kontrollverdau (Abb.4.19; 3.1.9) wurde die Mini 2 (TV-RNMrge) mit den Restriktionsenzymen ApaI/NotI (2.3) und die Mini 6 (TV-RNMrgeG) mit BstZ I geschnitten (2.3) und so der Klonierungserfolg überprüft (Abb.4.19). Die Länge des Kontrollverdaus entsprach in etwa der Bandenlänge der isolierten PCR-Fragmente, folglich wurden die Mini 2 und Mini 6 zur exakten Bestimmung der RNMrge- und RNMrgeG-Fragmente sequenziert (Anlage 4 und 5).

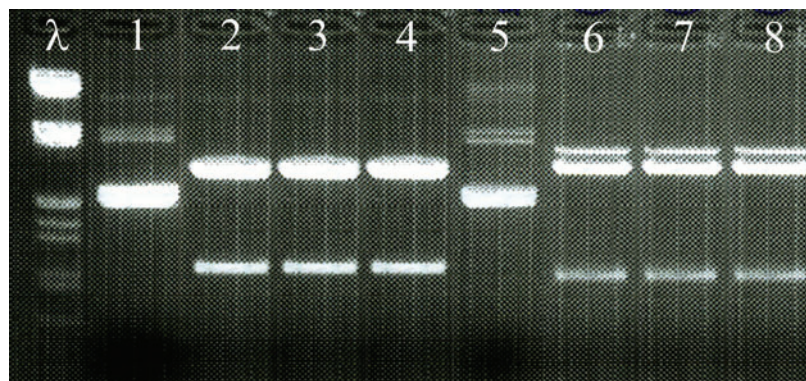


Abb.4.19: Kontrollverdau von TV-RNMrge und TV-RNMrgeG mit dem Enzym NotI/ApaI bzw. BstZ I. Überprüfung des Klonierungserfolges der isolierten PCR-Fragmente: 1= TV-RNMrge unverdaut; 2-4= TV-RNMrge verdaut; 5= TV-RNMrgeG unverdaut; 6-8= TV-RNMrgeG verdaut (Abb.4.8 und Abb.4.9); λ=Marker (Anlage 3A).

4.1.4.3.2 Die Sequenzanalyse der isolierten RNMrge- und RNMrgeG-Fragmente

Die beiden Miniansätze wurden zur Sequenzierung an die Invitek GmbH geschickt (3.1.10.1). Das Ergebnis der Sequenzierung konnte wie in 4.1.4.2.1 mittels des BLAST-Search Programms (3.1.10.2) auf Homologien mit der RNMrge-Sequenz und der RNMrgeG-Sequenz der Datenbank (RNMrge: „Gen-Bank accession“ Nummer: AF518247; RNMrgeG: „Gen-Bank accession“ Nummer: AF518248) verglichen werden (Anlage 4 und 5).

Das Sequenzierungsergebnis für TV-RNMrge (Anlage 4) zeigt zwei Punktmutationen an Aminosäureposition 164 und 223, die zu einem Austausch der Aminosäure führten (Pro164Leu und Phe223Leu; Anlage 4 und 7). Genauere Analysen, analog derer in 4.1.4.2.2 für TV-HSMrge bzw. TV-HSMrgeG, ergaben, dass die erste Mutation im Bereich zwischen TM4 und TM5 (zweite extrazelluläre Schlaufe) und die zweite Mutation in der sechsten transmembranen Domäne (TM6) liegt (Anlage 7). Der Vergleich mit den korrelierenden Stellen im konstitutiv aktiven RNMas-Rezeptor zeigte, dass RNMas an diesen Stellen weder die originale RNMrge-Aminosäure noch die Mutierte trug. Somit scheinen beide Aminosäureaustausche an Stellen zu liegen, die nicht für die konstitutive Aktivierung verantwortlich sind (Anlage 7). Dementsprechend wurde das RNMrge-Fragment weiter verwendet. Die Rezeptor cDNA-Sequenz von TV-RNMrgeG stimmte zu 100% mit der RNMrgeG-Sequenz aus der Datenbank überein (Anlage 5 und 7).

4.1.4.3.3 Klonierung der RNMrge- und RNMrgeG-Fragmente in den pcDNA3.1(-)-Vektor

Anschließend erfolgte die Umklonierung der Fragmente in den pcDNA3.1(-)-Vektor (2.1.1). Die Minis 2-4 (TV-RNMrge) wurden mit den Enzymen ApaI und NotI (2.3) und die Minis 6-8 (TV-RNMrgeG) mit BstZ I (2.3) verdaut (3.1.9). Die gewonnenen RNMrge- und RNMrgeG-Fragmente wurden in den pcDNA3.1(-)-Vektor ligiert, der zuvor mit dem Restriktionsenzym NotI verdaut worden war. Zur Vermeidung von Religation wurden die Phosphatenden der Vektormoleküle durch alkalische Phosphatase (2.3; 3.1.5) abgespalten. Nach Ligation (3.1.6) und Transformation (3.1.7) erfolgte die Mini-Präparation der gepickten weißen Kolonien (Abb.4.20; 3.1.8.1).

Der folgende Kontrollverdau (3.1.9) mit dem Enzym KpnI für pcDNARNMrge bzw. BamHI für pcDNARNMrgeG zeigte, dass sowohl die Minis 1 und 2 mit dem RNMrge-Fragment als auch die Minis 4,5 und 6 mit dem RNMrgeG-Fragment in richtiger Orientierung im pcDNA3.1(-)-Vektor lagen (Abb.4.21). Für die richtige Lage musste das durch KpnI generierte RNMrge-Fragment eine Länge von 636bp und das durch BamHI generierte RNMrgeG-Fragment eine von 329bp

haben (Abb.4.21). Bei einer Fragmentlänge von 492bp für RNMrgeE und 691bp für RNMrgeG lag das kodierende Fragment in falscher Orientierung im pcDNA3.1(-)-Vektor.

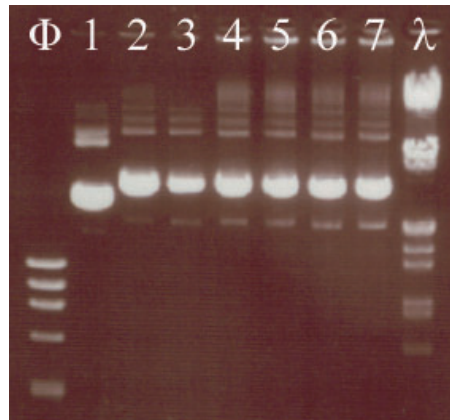


Abb.4.20 Minipräparation von pcDNARNMrgeE und pcDNARNMrgeG; 1=pcDNA3.1(-), 2-4=pcDNARNMrgeE; 5-7=pcDNARNMrgeG; Φ=Marker; λ=Marker (Anlage 3A und 3C).

Zur Maxi-Präparation (3.1.8.2) wurden die Kulturen der Mini 1 (RNMrgeE) und Mini 6 (RNMrgeG) weiter genutzt, um eine große Menge an qualitativ hochwertiger DNA zu gewinnen. Es wurde die Mini 1 für die pcDNARNMrgeE-Maxi und für die pcDNARNMrgeG-Maxi die Mini 6 verwendet (Abb.4.20). Die Abbildung hierzu befindet sich in Kapitel 4.1.4.2.3. Zur Kontrolle wurden die Maxis (Abb.4.16 in 4.1.4.2.3) ebenfalls sequenziert (Sequenzierungsergebnis nicht gezeigt, sondern nur für die humanen Fragmente; Abb.4.17, Abb.4.18).

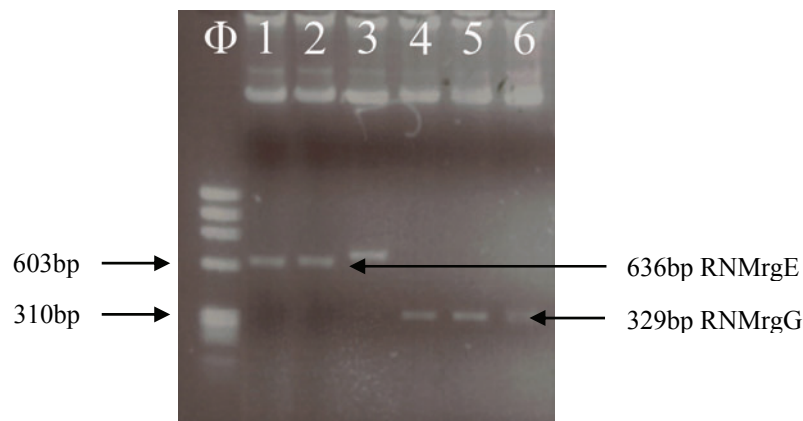


Abb.4.21: Kontrollverdau von pcDNARNMrgeE und pcDNAHSRNMrgeG mit dem Enzym KpnI bzw. BamHI. Überprüfung des Klonierungserfolges in den pcDNA3.1(-)-Vektor: 1=pcDNARNMrgeE; 2-5=pcDNARNMrgeG; Φ=Marker (Anlage 3C).

4.1.5 Untersuchung zur konstitutiven Aktivität der neu isolierten Rezeptoren

Die neu gewonnenen Plasmide von pcDNA3.1(-)HSMrgE, pcDNA3.1(-)HSMrgG, pcDNA3.1(-)RNMrgE und pcDNA3.1(-)RNMrgG wurden, wie unter 4.1.1 beschrieben, in HEK293A-

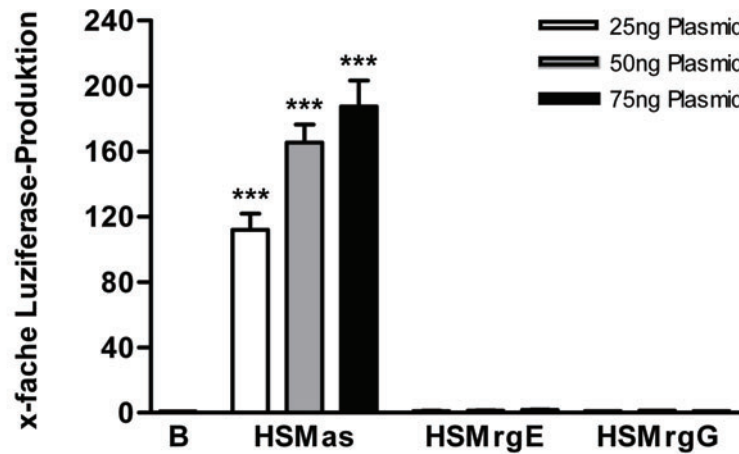


Abb.4.22: Die SRF-Aktivierung in HEK293A-Zellen nach Transfektion der humanen Mas-, MrgE- und MrgG-Rezeptoren in steigender Plasmid-Konzentration (25ng, 50ng, 75ng). Der Basalwert (B), nur pcDNA3.1(-)-transfizierte Zellen, wurde gleich eins gesetzt; ***P<0,001 vs. Basalwert; n ≥ 3×3.

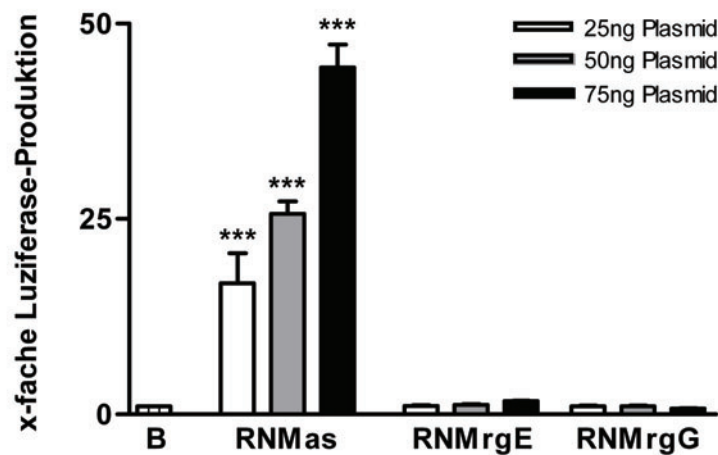


Abb.4.23: Die SRF-Aktivierung in HEK293A-Zellen nach Transfektion der Ratten-Mas-, MrgE- und MrgG-Rezeptoren in steigender Plasmid-Konzentration (25ng, 50ng, 75ng). Der Basalwert (B): nur pcDNA3.1(-)-transfizierte Zellen, wurde gleich eins gesetzt; ***P<0,001 vs. Basalwert; n ≥ 3×3.

Zellen transfiziert und die Luziferase-Produktion gemessen. Es konnte weder für die neu klonierten humanen noch für die Rezeptoren aus der Ratte ein signifikanter Anstieg in der Luziferase-Produktion im Vergleich zum Basalwert gemessen werden (Abb.4.22, Abb.4.23). Die Plasmide von pcDNA3.1(-)HSMas bzw. pcDNA3.1(-)RNMas wurden als Positiv-Kontrollen mitgeführt.

4.1.6 Untersuchung zur konstitutiven Aktivierung des Transkriptionsfaktors NFκB

Bisher wurde ausschließlich die Aktivierung des Transkriptionsfaktors SRF ermittelt. Um zu zeigen, ob auch andere Transkriptionsfaktoren durch Mitglieder der Mrg-Familie konstitutiv aktiviert werden, wurde die Aktivierung von NFκB untersucht. NFκB ist ein wichtiger Transkriptionsfaktor, der von großer Bedeutung für die Regulation der Immunantwort, der Zellproliferation und des Zelltodes ist (Sun *et al.*, 2002). HEK293A-Zellen wurden wie in 4.1.1 mit steigenden Konzentrationen pcDNA3.1(-) der unterschiedlichen Rezeptoren der Mrg-Familie transfiziert (3.2.6). Die Aktivierung des NFκB-Signalweges wurde mit Hilfe des „Dual-Luciferase Assay“ ermittelt (2.10; 3.2.5) und anschließend die mit dem Luminometer (2.11,

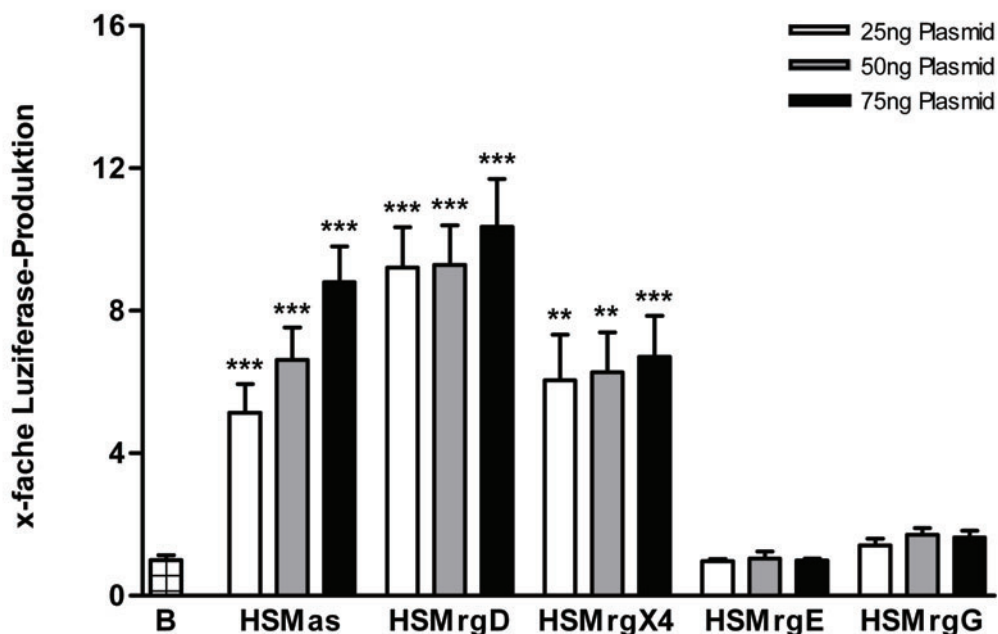


Abb.4.24: Die NFκB-Aktivierung in HEK293A-Zellen nach Transfektion mit den humanen Mas-, MrgD-, MrgX4-, MrgE- und MrgG-Rezeptoren in steigender Plasmid-Konzentration (25ng, 50ng, 75ng). Der Basalwert (B), nur pcDNA3.1(-)-transfizierte Zellen, wurde gleich eingesetzt; **P=0,05, ***P<0,001 vs. Basalwert; n ≥ 3×3.

3.2.8) gemessenen Werte mit dem Basalwert aus nur pcDNA3.1(-)-transfizierten Zellen verglichen.

Eine signifikante Erhöhung in der Luziferase-Produktion konnte, wie zuvor für SRF, bei dem HSMas-, dem HSMrgD- und dem HSMrgX4-Rezeptor demonstriert werden (Abb.4.24). Die beiden Negativ-Kontrollen, HSMrgE- und HSMrgG-, zeigten keine signifikante Steigerung der Luziferase-Produktion (Abb.4.24).

4.1.7 Untersuchung zur konstitutiven Aktivität der humanen MRG-, MrgD-, MrgE-, MrgF-, MrgG-, MrgX1-, MrgX2-, MrgX3- und MrgX4-Rezeptoren, des murinen MrgH-Rezeptors und der Mas-, MrgE- und MrgG-Rezeptoren der Ratte in NIH3T3-Zellen

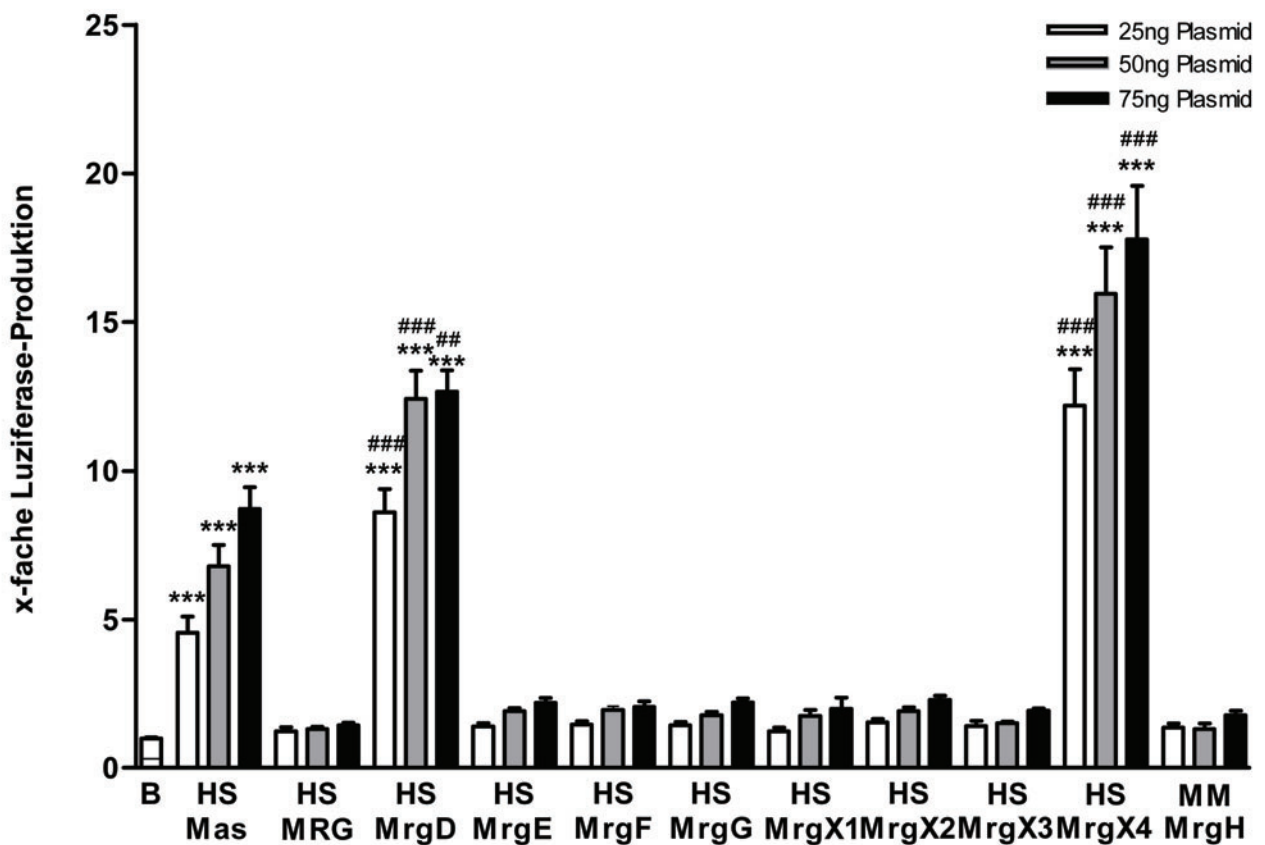


Abb.4.25: Die SRF-Aktivierung in NIH3T3-Zellen nach Transfektion mit humanen Rezeptoren der Mrg-Familie und dem murinen MrgH-Rezeptor in steigender Plasmid-Konzentration (25ng, 50ng, 75ng); Der Basalwert (B), nur pcDNA3.1(-)-transfizierte Zellen, wurde gleich eins gesetzt; ***P<0,001 vs. Basalwert; ###P<0,01; ###P<0,001 vs. Mas-transfizierten Zellen; n ≥ 3 × 3.

Ein weiterer Zelltyp, NIH3T3-Zellen (2.1), wurde herangezogen, um herauszufinden, ob auch in diesen die zuvor identifizierten konstitutiv aktiven Rezeptoren, HSMas, HSMrgD und HSMrgX4, eine erhöhte Luziferase-Produktion generieren. Als Transkriptionsfaktor wurde wie in 4.1.1 der SRF verwendet (3.2.5). Verglichen wurden die Werte mit dem Basalwert (nur pcDNA3.1(-)-transfizierte Zellen). Es konnte gezeigt werden, dass der Mas-Rezeptor konstitutiv aktiv ist (Abb.4.25). Die weiteren in HEK293A-Zellen konstitutiv aktiven Rezeptoren, HSMrgD- und HSMrgX4, zeigen auch in den NIH3T3-Zellen eine erhöhte Luziferase-Produktion (Abb.4.25). In HEK293A-Zellen hat der HSMrgD-Rezeptor im Vergleich zu den beiden anderen konstitutiv aktiven Rezeptoren signifikant die höchste Luziferase-Produktion (Abb.4.3), wohingegen in den NIH3T3-Zellen der HSMrgX4-Rezeptor die höchste Luziferase-Produktion aufweist (Abb.4.25). Für die anderen untersuchten Rezeptoren der Mrg-Familie, HSMRG, HSMrgF, HSMrgX1, HSMrgX2 und HSMrgX3, ließ sich keine signifikante konstitutive Aktivität nachweisen (Abb.4.25). Auch die „neu“ klonierten HSMrgE- und HSMrgG-Rezeptoren sowie der murine MrgH-Rezeptor (Abb.4.25) zeigten keine signifikante Erhöhung der Luziferase-Produktion.

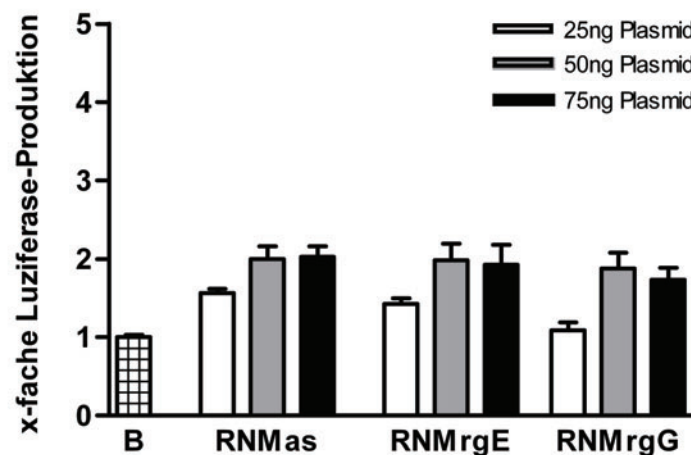


Abb.4.26: Die SRF-Aktivierung in NIH3T3-Zellen nach Transfektion mit den RNMas-, RNMrge- und RNMrge-Rezeptoren in steigender Plasmid-Konzentration (25ng, 50ng, 75ng). Der Basalwert (B), nur pcDNA3.1(-)-transfizierte Zellen, wurde gleich eins gesetzt; $n \geq 3 \times 3$.

Eine signifikante Erhöhung der Luziferase-Produktion des RNMas-Rezeptors in NIH3T3-Zellen konnte nicht nachgewiesen werden. Somit scheint die konstitutive Aktivität des Mas-Rezeptors der Ratte, die in den HEK293A-Zellen gemessen wurde (Abb.4.2), nicht in NIH3T3-Zellen zu funktionieren (Abb.4.26). Für die neu klonierten RNMrge- und RNMrge-Rezeptoren konnte,

wie erwartet, keine signifikante Veränderung der Luziferase-Produktion festgestellt werden (Abb.4.26).

4.1.8 Untersuchung zur konstitutiven Aktivität der humanen Mas-, MrgD-, MrgE-, MrgG- und MrgX4-Rezeptoren in BAE-Zellen

Um die mögliche physiologische Bedeutung der konstitutiven Aktivierung von Mrg-Rezeptoren zu untersuchen, wurden als weiterer Zelltyp bovine Aorten-Endothelzellen (BAE-Zellen; 2.1) mit dem humanen Mas-, MrgD-, MrgE-, MrgG- und MrgX4-Rezeptor transfiziert. Anhand der Aktivierung des SRF-Transkriptionsfaktors wurde die konstitutive Aktivität der verschiedenen Rezeptoren ermittelt (3.2.5), mit Hilfe des „Dual-Luciferase Reporter Assay Systems“ (2.10, 3.2.5) die Luziferase-Produktion gemessen (2.11; 3.2.8) und die Ergebnisse wurden mit dem Basalwert verglichen. Die BAE-Zellen wurden ausgewählt, weil sie leichter zu transfizieren sind als vaskuläre glatte Muskelzellen (VSMC) (Peiró et al., 1995) und der HSMas-Rezeptor in diesen exprimiert wird (Peiró et al., 2007). Des Weiteren sind bovine Aorten-Endothelzellen (BAE-Zellen) humanen BAE-Zellen sehr ähnlich.

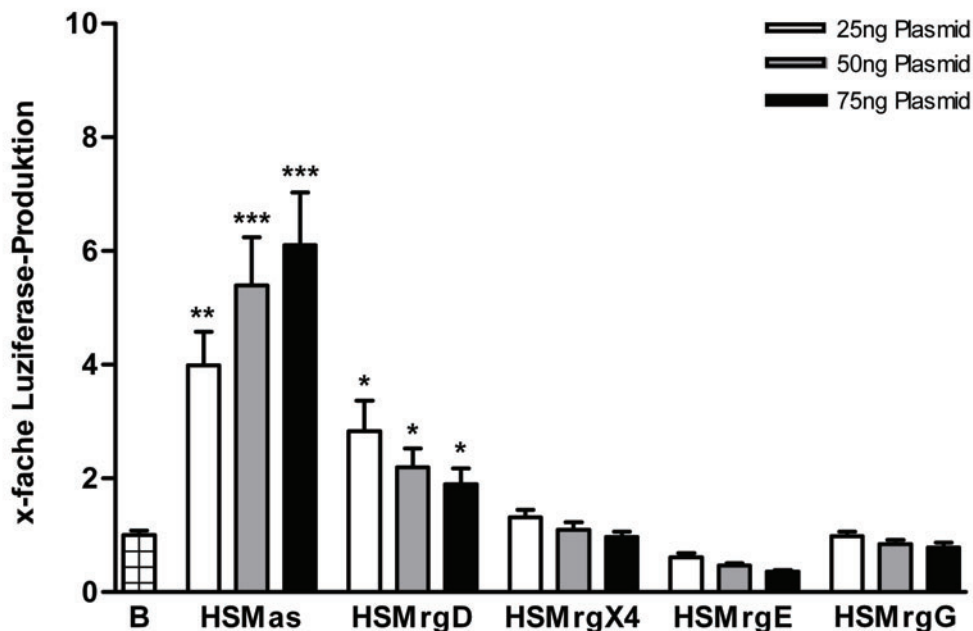


Abb.4.27: Die SRF-Aktivierung in BAE-Zellen nach Transfektion mit den humanen Mas-, MrgD-, MrgX4-, MrgE- und MrgG-Rezeptoren in steigender Plasmid-Konzentration (25ng, 50ng, 75ng); Der Basalwert (B), nur pcDNA3.1(-)-transfizierte Zellen, wurde gleich eins gesetzt; *P<0,01, **P<0,05, ***P<0,001 vs. Basalwert; n ≥ 3×3.

Die konstitutive Aktivität des HSMas-Rezeptors bestätigte sich, da eine signifikante Erhöhung der Luziferase-Produktion gemessen wurde (Abb.4.27). Für den HSMrgD konnte ebenfalls eine signifikante Luziferase-Produktion festgestellt werden, wohingegen für den HSMrgX4-, HSMrgE- und HSMrgG Rezeptor keine signifikante konstitutive Aktivität nachgewiesen wurde (Abb.4.27).

4.2 Identifizierung von Angiotensin-Metaboliten als mögliche Rezeptorliganden

Das Renin-Angiotensin-System (RAS) spielt eine wichtige Rolle in der Regulation des Blutdruckes und in der Pathogenese kardiovaskulärer Krankheiten (Burnier *et al.*, 2000; Kim *et al.*, 2000). In früheren Studien konnte gezeigt werden, dass das Mas-Protein als ein potentieller Rezeptor für AngII fungiert. Im Jahre 2005 gelang es Kostenis *et al.* zu zeigen, dass der Mas- und der AT₁-Rezeptor interagieren und so die die physiologischen Effekte von AngII beeinflussen. Lange Zeit galt das Oktapeptid AngII als das einzige aktive Peptid des RAS, bis erkannt wurde, dass auch andere Ang-Metabolite, wie AngIII [Ang-(2-8)], AngIV [Ang-(3-8)] oder Ang-(1-7), Effekte des RAS vermitteln (Ardaillou, 1997). Des Weiteren zeigte die Arbeitsgruppe von Prof. Walther, dass der AngII-Metabolit Ang-(1-7) als ein funktioneller Agonist der Mas-Rezeptors agiert (Santos *et al.*, 2003). Daraus ergab sich die Überlegung, dass Ang-(1-7)-ähnliche Peptide Liganden für Rezeptoren sein könnten, die der Mas-Sequenz ähneln. Deshalb wird in dieser Arbeit auch die Interaktion verschiedener Ang-Peptide mit den Rezeptoren der Mrg-Familie untersucht. Verwendet wurden folgende Peptide: AngII, AngIII, Ang-(1-7) und Ang-(1-9) und folgende humane Rezeptoren der Mrg-Familie: HSMas, HSMrgD, HSMrgX4, HSMrgE und HSMrgG (2.2.2, 2.6). Um die Gruppe der Ang-Peptide zu vervollständigen, sind nachfolgend zwei weitere Metabolite, AngIV und Ang-(1-5), hinzugekommen und auf mögliche Interaktionen mit den humanen Mrg-Rezeptoren untersucht worden. Anhand der Luziferase-Produktion, die durch das SRE initiiert wird, wurde die mögliche Stimulation (3.2.7) intrazellulärer Signalwege nach Ligand/Rezeptor-Interaktion in HEK293A-Zellen gemessen (3.2.8).

4.2.1 Interaktion der Angiotensin-Metabolite mit dem humanen Mas-Rezeptor

HEK293A-Zellen wurden mit dem humanen Mas-Rezeptor transfiziert und 6-8 Stunden später mit den Angiotensinen AngII, AngIII, Ang-(1-7) und Ang-(1-9) in einer Konzentration von 10⁻⁶ M stimuliert (3.2.7). Die Kontrollzellen (Kontrolle) wurden nur mit isotonischer

Kochsalzlösung (2.5) stimuliert. Die Messung der Luziferase-Produktion ergab keinen signifikanten Effekt der Ang-Peptide auf die konstitutive Aktivität des HSMas-Rezeptors (Abb.4.28). Um fehlerhafte Transfektion oder Stimulation ausschließen zu können, wurde als Positivkontrolle der AT₁-Rezeptor transfiziert und diese Zellen mit AngII stimuliert. Seit langem ist bekannt, dass AngII via AT₁ das SRE stimulieren kann. HEK293A-Zellen, die nur mit pcDNA3.1(-) und den Luziferase-Plasmiden transfiziert worden waren(3.2.6), zeigten nach Stimulation mit AngII keine signifikante Veränderung in der Luziferase-Produktion, wohingegen AT₁-transfizierte Zellen mit einem signifikanten Luziferase-Anstieg auf AngII-Stimulation reagierten. Damit konnte nun auch ausgeschlossen werden, dass HEK293A-Zellen endogen bereits AT₁-Rezeptoren exprimieren (Abb.4.28).

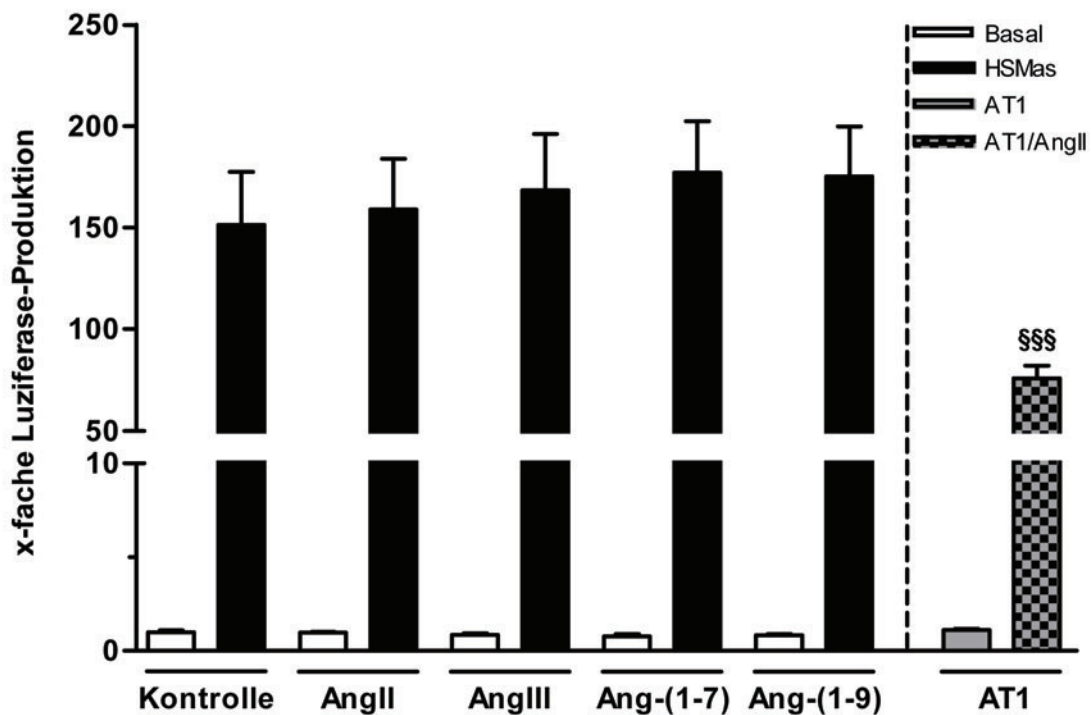


Abb.4.28: Stimulation des SRE durch AngII, AngIII, Ang-(1-7), Ang-(1-9) in pcDNA3.1(-)- und Mas-transfizierten HEK293A-Zellen. Die Kontrollzellen (Kontrolle) wurden nur mit isotonomischer Kochsalzlösung stimuliert. Als Positivkontrolle galt die Stimulation von AT₁ mit AngII (rechts im Bild); Konzentration der Ang-Peptide: 10⁻⁶ M. §§§P<0,001 vs. AT₁; n ≥ 3×3.

Für die zwei weiteren Peptide, Ang-(1-5) und AngIV, konnte in einem zusätzlichen Versuch im Vergleich zum unstimulierten HSMas-Rezeptor ebenfalls keine signifikante Erhöhung in der Luziferase-Produktion gemessen werden (Abb.4.29).

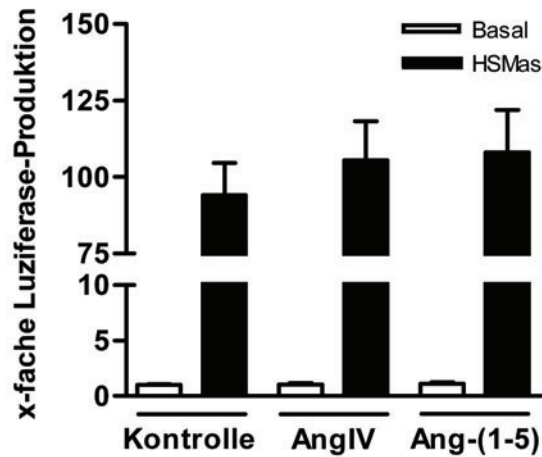


Abb.4.29: Stimulation des SRE durch Ang-(1-5) und AngIV in pcDNA3.1(-)- und HSMas-transfizierten HEK293A-Zellen. Die Kontrollzellen (Kontrolle) wurden nur mit isotonischer Kochsalzlösung stimuliert; Konzentration der Ang-Peptide: 10^{-6} M; $n \geq 2 \times 3$.

4.2.2 Interaktion der Angiotensin-Metabolite mit dem humanen MrgD- und MrgX4-Rezeptor

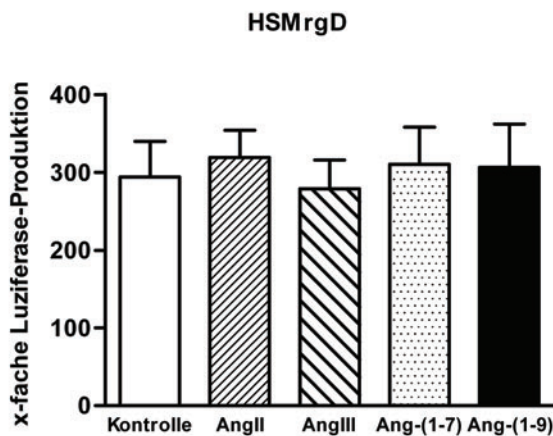


Abb.4.30: Stimulation des SRE durch die Ang-Peptide AngII, AngIII, Ang-(1-7) und Ang-(1-9) in HSMrgD-transfizierten HEK-293A-Zellen. Die Kontrollzellen (Kontrolle) wurden nur mit isotonischer Kochsalzlösung stimuliert; Konzentration der Ang-Peptide: 10^{-6} M; $n \geq 4 \times 3$.

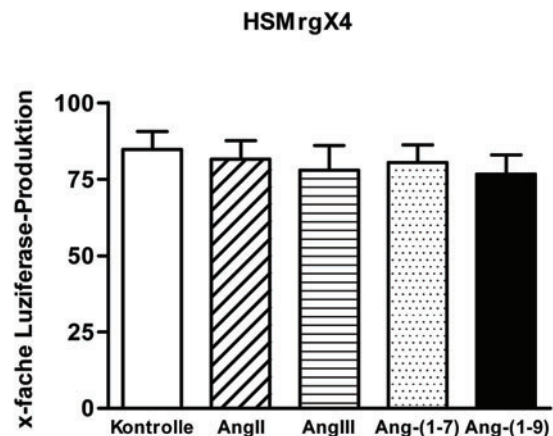


Abb.4.31: Stimulation des SRE durch die Ang-Peptide AngII, AngIII, Ang-(1-7) und Ang-(1-9) in HSMrgX4-transfizierten HEK-293A-Zellen. Die Kontrollzellen (Kontrolle) wurden nur mit isotonischer Kochsalzlösung stimuliert; Konzentration der Ang-Peptide: 10^{-6} M; $n \geq 4 \times 3$.

Die funktionelle Interaktion von HSMrgD und HSMrgX4 mit den Ang-Peptiden wurde wie in 4.1.2 anhand der Änderung der Luziferase-Produktion bestimmt. In 4.1.1 wurde gezeigt, dass HSMrgD konstitutiv aktiv ist. Diese konstitutive Aktivität ließ sich nach der Stimulation mit AngII, AngIII, Ang-(1-7) und Ang-(1-9) nicht signifikant verändern (Abb.4.30). Auch die Stimulation des konstitutiv aktiven HSMrgX4-Rezeptors mit diesen Ang-Peptiden (Abb.4.31) ergab keinen signifikanten Effekt auf die Luziferase-Produktion im Vergleich zum unstimulierten HSMrgX4-Rezeptor. Die beiden anderen Ang-Peptide, Ang-(1-5) und AngIV, wiesen im Vergleich zum unstimulierten HSMrgD-Rezeptor bzw. HSMrgX4-Rezeptor ebenfalls keinen signifikanten Effekt auf die Luziferase-Produktion auf (Abb.4.32 und Abb.4.33).

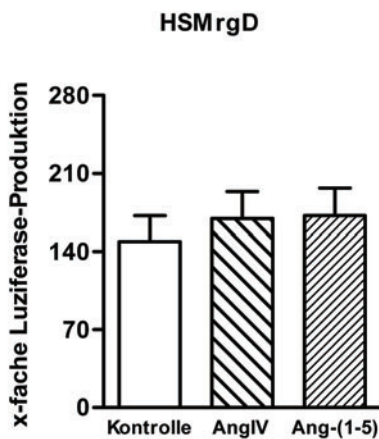


Abb.4.32: Stimulation des SRE durch Ang-(1-5) und AngIV in HSMrgD-transfizierten HEK293A-Zellen. Die Kontrollzellen (Kontrolle) wurden nur mit isotonischer Kochsalzlösung stimuliert; Konzentration der Ang-Peptide: 10^{-6} M; $n \geq 2 \times 3$.

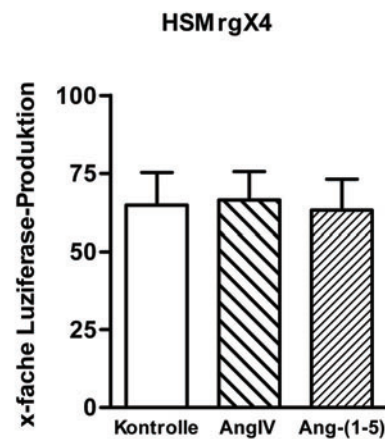


Abb.4.33: Stimulation des SRE durch Ang-(1-5) und AngIV in HSMrgX4-transfizierten HEK293A-Zellen. Die Kontrollzellen (Kontrolle) wurden nur mit isotonischer Kochsalzlösung stimuliert; Konzentration der Ang-Peptide: 10^{-6} M; $n \geq 2 \times 3$.

4.2.3 Interaktion der Angiotensin-Metabolite mit dem humanen MrgE- und MrgG-Rezeptor

Die Interaktion von Ang-(1-7), Ang-(1-9), AngII und AngIII mit den HSMrgE- und HSMrgG-Rezeptoren zeigt keine signifikante Steigerung in der Luziferase-Produktion im Vergleich zu den nicht stimulierten HSMrgE- und HSMrgG-Rezeptoren (Abb.4.34 und Abb.4.35). Auch Ang-(1-5) und AngIV veränderten die Luziferase-Produktion im Vergleich zu den unstimulierten HSMrgE- und HSMrgG-Rezeptoren nicht (Abb.4.36 und Abb.4.37).

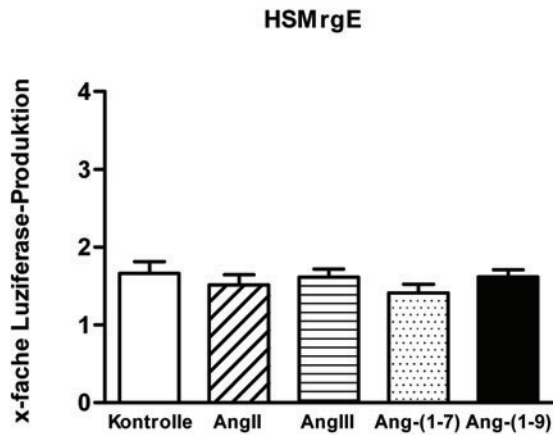


Abb.4.34: Stimulation des SRE durch AngII, AngIII, Ang-(1-7) und Ang-(1-9) in HSMrgE-transfizierten HEK293A-Zellen. Die Kontrollzellen (Kontrolle) wurden nur mit isotonischer Kochsalzlösung stimuliert; Konzentration der Ang-Peptide: 10^{-6} M; $n \geq 3 \times 3$.

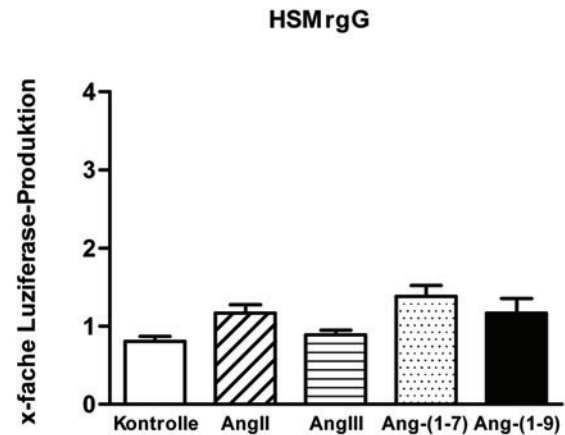


Abb.4.35: Stimulation des SRE durch AngII, AngIII, Ang-(1-7) und Ang-(1-9) in HSMrgG-transfizierten HEK293A-Zellen. Die Kontrollzellen (Kontrolle) wurden nur mit isotonischer Kochsalzlösung stimuliert; Konzentration der Ang-Peptide: 10^{-6} M; $n \geq 3 \times 3$.

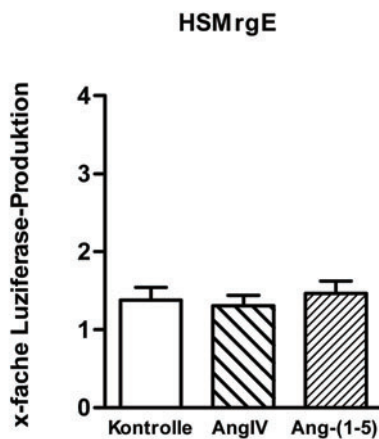


Abb.4.36: Stimulation des SRE durch Ang-(1-5) und AngIV in HSMrgE-transfizierten HEK293A-Zellen. Die Kontrollzellen (Kontrolle) wurden nur mit isotonischer Kochsalzlösung stimuliert; Konzentration der Ang-Peptide: 10^{-6} M; $n \geq 3 \times 3$.

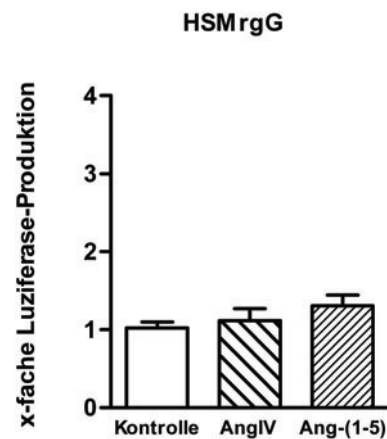


Abb.4.37: Stimulation des SRE durch Ang-(1-5) und AngIV in HSMrgG-transfizierten HEK293A-Zellen. Die Kontrollzellen (Kontrolle) wurden nur mit isotonischer Kochsalzlösung stimuliert; Konzentration der Ang-Peptide: 10^{-6} M; $n \geq 3 \times 3$.

4.3 Rezeptor/Rezeptor-Interaktionen

Lange Zeit wurden die GPCRs als eine monomere Einheit angesehen, bis vor einiger Zeit gezeigt werden konnte, dass GPCRs als Homo- oder Heterodimere existieren können und ihre Funktion möglicherweise als Homooligomer (Bouvier, 2001) oder Heterooligomer ausüben (Milligan *et al.*, 2003; Milligan *et al.*, 2004). Daraus ergab sich für diese Arbeit die Überlegung, dass möglicherweise durch die Bildung eines Heterooligomere Komplexes die konstitutive Aktivität der in 4.1 identifizierten Rezeptoren beeinflusst wird. Zur Auswahl standen die drei humanen konstitutiv aktiven Rezeptoren (Mas, MrgD und MrgX4) und die beiden in 4.1 „neu“ klonierten humanen MrgE- und MrgG-Rezeptoren, die mit gleicher Konzentration (50ng) in HEK293A-Zellen transfiziert wurden (3.2.5). Mit Hilfe des „Dual-Luciferase Reporter Assay System“ (2.10; 3.2.5) wurde anhand der Luziferase-Produktion, die durch das SRE initiiert wird, die möglichen Effekte einer Interaktion der verschiedenen Rezeptorkombinationen auf intrazelluläre Signalwege gemessen (3.2.8).

4.3.1 Interaktion der humanen Mas- und MrgD-Rezeptoren

Die beiden konstitutiv aktiven HSMas- und HSMrgD-Rezeptoren zeigten in Kombination keinen additiven bzw. inhibitorischen Effekt im Vergleich zu den allein exprimierten HSMas- und HSMrgD-Rezeptoren, da es zu keiner weiteren Erhöhung/Minimierung der maximalen HSMrgD

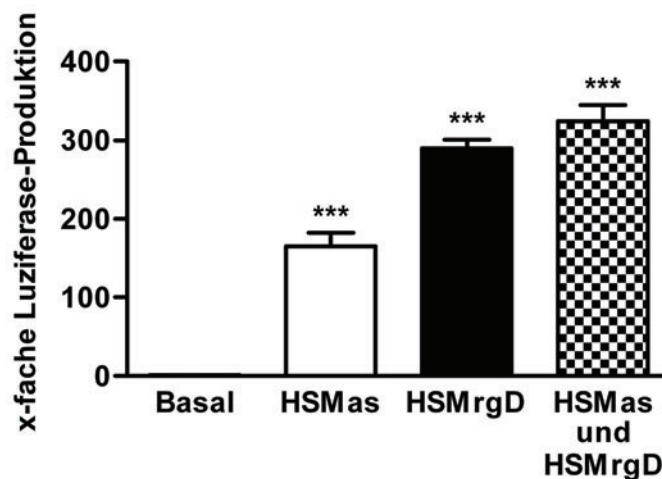


Abb.4.38: Die SRF-Aktivierung nach Koexpression von HSMas und HSMrgD (50ng) in HEK293A-Zellen im Vergleich zum Basalwert (Basal) und den beiden einzeln exprimierten Rezeptoren. Der Basalwert, nur pcDNA3.1(-)-transfizierte Zellen, wurde gleich eins gesetzt; ***P<0,001 vs. Basalwert; n ≥ 3×3.

-Aktivität durch HSMas-Koexpression kam (Abb.4.38). Im Vergleich zum Basalwert (Basal) ist die Luziferase-Produktion von HSMas und HSMrgD wie erwartet signifikant erhöht (Abb.4.38).

4.3.2 Interaktion der humanen Mas- und MrgX4-Rezeptoren

Wie in 4.3.1 wurden der HSMas- und der HSMrgX4-Rezeptor (50ng) koexprimiert. Es konnte gezeigt werden, dass die gemeinsame Expression im Vergleich zu den einzeln exprimierten HSMas und HSMrgX4 keinen signifikanten Anstieg der Luziferase-Produktion bewirkt (Abb.4.39).

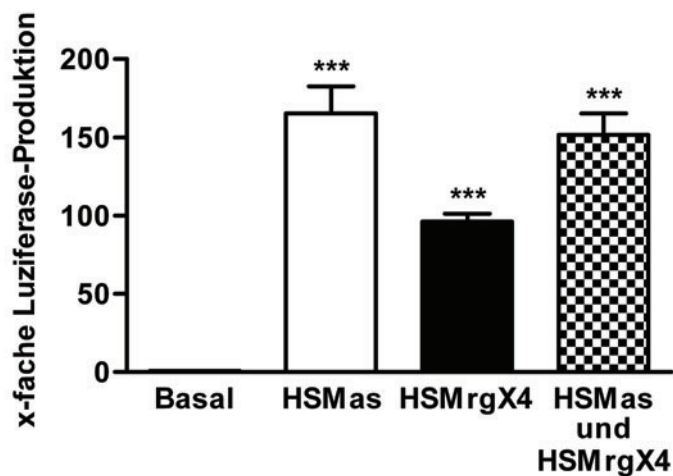


Abb.4.39: Die SRF-Aktivierung nach Koexpression von HSMas und HSMrgD (50ng) in HEK293A-Zellen im Vergleich zum Basalwert (Basal) und den beiden einzeln exprimierten Rezeptoren. Der Basalwert, nur pcDNA3.1(-)-transfizierte Zellen, wurde gleich eins gesetzt; ***P<0,001 vs. Basalwert; n ≥ 3×3.

4.3.3 Interaktion der humanen Mas- und MrgE-Rezeptoren

Bekannt ist, dass der Mas-Rezeptor mit dem AT₁-Rezeptor einen heterooligomeren Komplex bildet und so die Eigenschaften von AngII beeinflusst (Kostenis *et al.*, 2005). Auf der Suche nach weiteren Rezeptoren, die durch eine mögliche Heterooligomerisation die Signaleigenschaften von Mas verändern könnten, wurde der HSMas-Rezeptor mit dem HSMrgE-Rezeptor koexprimiert. Der HSMas-Rezeptor zeigt allein exprimiert, wie erwartet, eine konstitutive Aktivität (Abb.4.40). Für den HSMrgE-Rezeptor ließ sich kein signifikanter Effekt feststellen. Allerdings konnte bei gemeinsamer Expression von HSMrgE mit dem konstitutiv aktiven HSMas-Rezeptor die Luziferase-Produktion des HSMas-Rezeptors signifikant um mehr als 85% gesenkt werden (HSMas+HSMrgE: 21,2±3,22RLU vs. Mas: 165,3±17,17RLU; Abb.4.40).

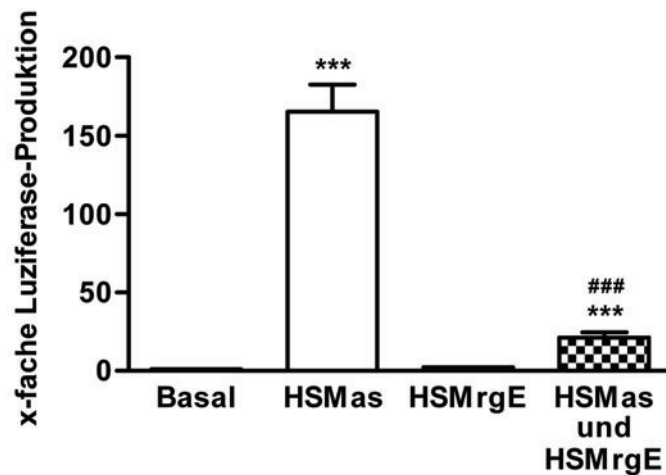


Abb.4.40: Die SRF-Aktivierung nach Koexpression von HSMas und HSMrgE (50ng) in HEK293A-Zellen im Vergleich zum Basalwert (Basal) und den beiden einzeln exprimierten Rezeptoren. Der Basalwert, nur pcDNA3.1(-)-transfizierte Zellen, wurde gleich eins gesetzt; ***P<0,001 vs. Basalwert; ###P<0,001 vs. HSMas; n ≥ 3×3.

4.3.4 Interaktion der humanen Mas- und MrgG-Rezeptoren

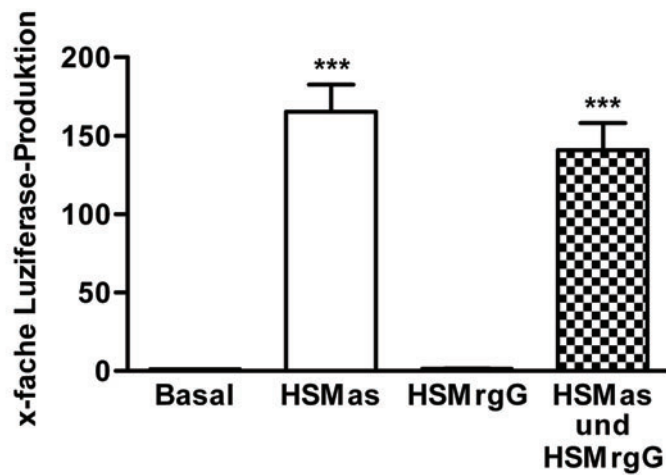


Abb.4.41: Die SRF-Aktivierung nach Koexpression von HSMas und HSMrgG (50ng) in HEK293A-Zellen im Vergleich zum Basalwert (Basal) und den beiden einzeln exprimierten Rezeptoren. Der Basalwert, nur pcDNA3.1(-)-transfizierte Zellen, wurde gleich eins gesetzt; ***P<0,001 vs. Basalwert; n ≥ 3×3.

Im Gegensatz zu HSMrgE konnte HSMrgG in Koexpression mit dem HSMas-Rezeptor zu keiner signifikanten Steigerung oder Reduktion der Luziferase-Produktion führen, da im Vergleich zu dem allein exprimierten HSMas-Rezeptor die maximale HSMas-Aktivität nicht weiter verändert wurde (Abb.4.41).

4.3.5 Interaktion der humanen MrgD- und MrgX4-Rezeptoren

In den HEK293A-Zellen zeigen die beiden konstitutiv aktiven humanen MrgD- und MrgX4-Rezeptoren in Kombination keinen additiven Effekt im Vergleich zu den allein exprimierten HSMrgD- und HSMrgX4-Rezeptoren, da es zu keiner weiteren Erhöhung der maximalen HSMrgD-Aktivität durch HSMrgX4-Koexpression kam (Abb.4.42).

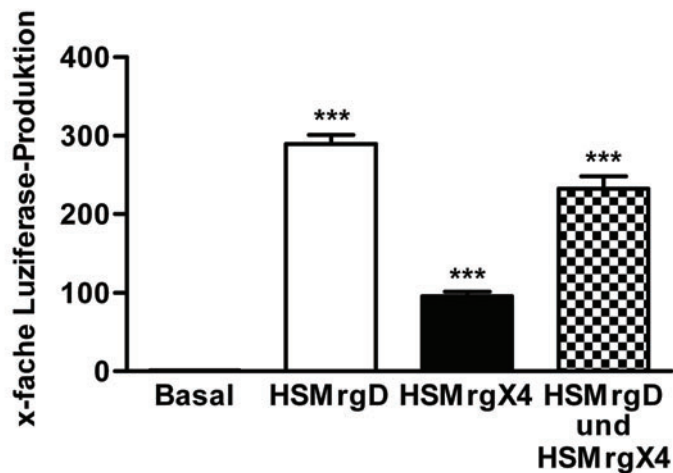


Abb.4.42: Die SRF-Aktivierung nach Koexpression von HSMrgD und HSMrgX4 in HEK293A-Zellen im Vergleich zum Basalwert (Basal) und den beiden einzeln exprimierten Rezeptoren. Der Basalwert, nur pcDNA3.1(-)-transfizierte Zellen, wurde gleich eins gesetzt; ***P<0,001 vs. Basalwert; n ≥ 3×3.

4.3.6 Interaktion der humanen MrgD- und MrgE-Rezeptoren

Die gemeinsame Expression von HSMrgD und HSMrgE weist, wie zuvor auch schon in 4.4.3 für HSMas und HSMrgE gezeigt, eine signifikante Reduktion der Luziferase-Produktion im Vergleich zum allein exprimierten HSMrgD-Rezeptor auf (HSMrgD/HSMrgE: 189,6±14,07RLU vs. HSMrgD: 289,4±11,31RLU; Abb.4.43).

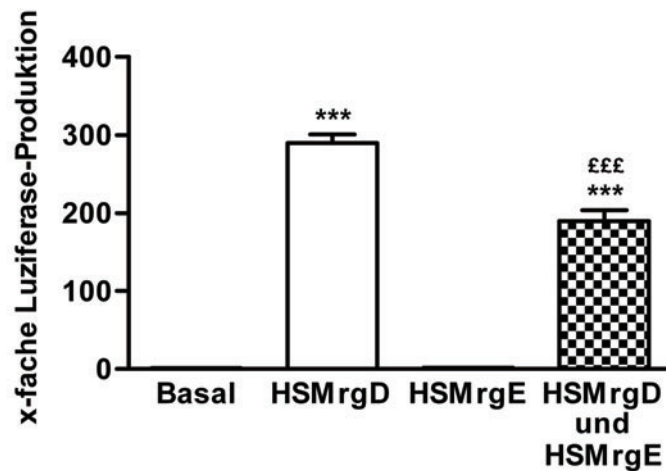


Abb.4.43: Die SRF-Aktivierung nach Koexpression von HSMrgD und HSMrgE (50ng) in HEK293A-Zellen im Vergleich zum Basalwert (Basal) und zu den beiden einzeln exprimierten Rezeptoren. Der Basalwert, nur pcDNA3.1(-)-transfizierte Zellen, wurde gleich eins gesetzt; ***P<0,001 vs. Basalwert, £££P<0,001 vs. HSMrgD; n = 3×4.

4.3.7 Interaktion der humanen MrgD- und MrgG-Rezeptoren

Im Gegensatz zu HSMrgE konnte HSMrgG in Koexpression mit dem HSMrgD-Rezeptor, wie zuvor auch schon in 4.4.4 für HSMas und HSMrgG nachgewiesen, zu keiner signifikanten

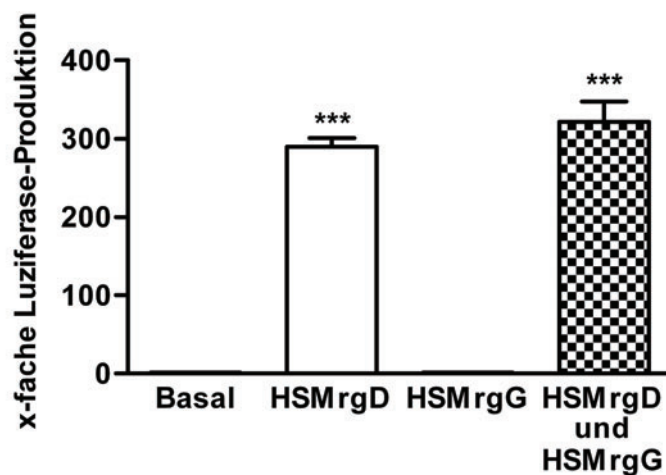


Abb.4.44: Die SRF-Aktivierung nach Koexpression von HSMrgD und HSMrgG in HEK293A-Zellen im Vergleich zum Basalwert (Basal) und den beiden einzeln exprimierten Rezeptoren. Der Basalwert, nur pcDNA3.1(-)-transfizierte Zellen, wurde gleich eins gesetzt; ***P<0,001 vs. Basalwert; n ≥ 3×3.

Steigerung oder Reduktion der Luziferase-Produktion führen, da im Vergleich zu dem allein exprimierten HSMrgD-Rezeptor die maximale HSMrgD-Aktivität nicht weiter verändert wurde (Abb.4.44).

4.3.8 Interaktion der humanen MrgX4- und MrgE-Rezeptoren

Im Gegensatz zu HSMas (4.3.3) und HSMrgD (4.3.6) konnte HSMrgE die konstitutive Aktivität von HSMrgX4 nicht hemmen, weil die maximale Luziferase-Produktion von HSMrgX4 in Koexpression mit HSMrgE nicht signifikant verändert wurde (Abb.4.45).

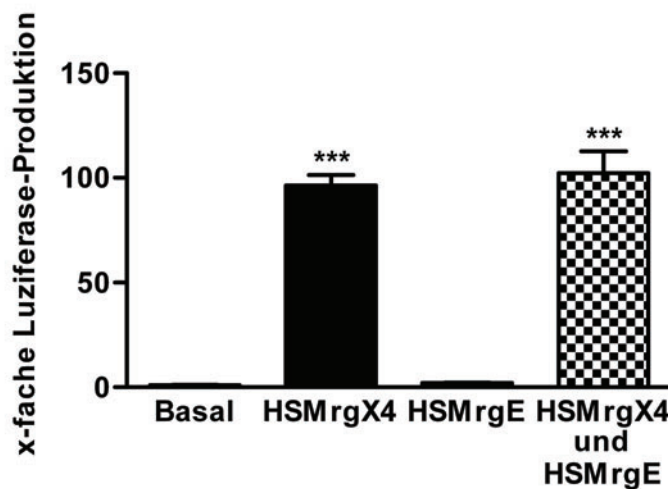


Abb.4.45: Die SRF-Aktivierung nach Koexpression von HSMrgX4 und HSMrgE (50ng) in HEK293A-Zellen im Vergleich zum Basalwert (Basal) und den Rezeptoren einzeln exprimiert. Der Basalwert, nur pcDNA3.1(-)-transfizierte Zellen, wurde gleich eins gesetzt; ***P<0,001 vs. Basalwert; n ≥ 3×3.

4.3.9 Interaktion der humanen MrgX4- und MrgG-Rezeptoren

Die zusätzliche Expression von HSMrgG weist keinen signifikanten Effekt auf die Luziferase-Produktion des allein exprimierten HSMrgX4-Rezeptors auf (Abb.4.46).

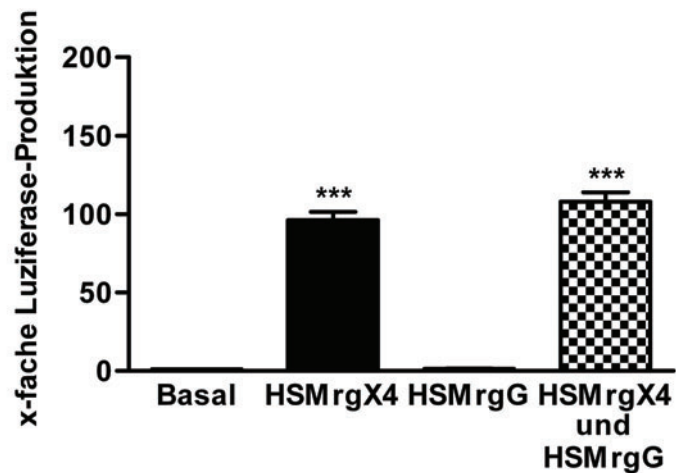


Abb.4.46: Die SRF-Aktivierung nach Koexpression von HSMrgX4 und HSMrgG in HEK293A-Zellen im Vergleich zum Basalwert (Basal) und den beiden einzeln exprimierten Rezeptoren. Der Basalwert, nur pcDNA3.1(-)-transfizierte Zellen, wurde gleich eins gesetzt; ***P<0,001 vs. Basalwert; n ≥ 3×3.

4.3.10 Interaktion der humanen MrgE- und MrgG-Rezeptoren

Die Kombination von HSMrgE und HSMrgG ergibt keine signifikante Veränderung der Luziferase-Produktion im Vergleich zur alleinigen Expression von HSMrgE und HSMrgG (Abb.4.47).

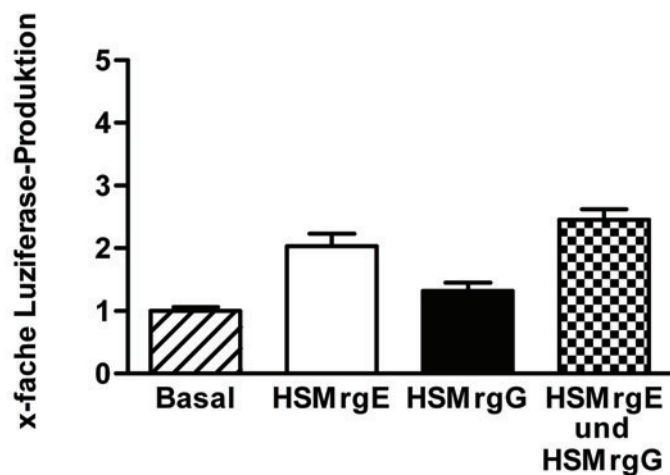


Abb.4.47: Die SRF-Aktivierung nach Koexpression von HSMrgE und HSMrgG (50ng) in HEK293A-Zellen im Vergleich zum Basalwert (Basal) und den beiden Rezeptoren einzeln exprimiert. Der Basalwert, nur pcDNA3.1(-)-transfizierte Zellen, wurde gleich eins gesetzt; n ≥ 3×3.

4.3.11 Dosisabhängiger Effekt von HSMrgE auf die konstitutive Aktivität von HSMas

Aufgrund der in 4.3.4 beschriebenen Reduktion der Luziferase-Produktion von HSMas bei Koexpression mit HSMrgE wurde der dosisabhängige inhibitorische Effekt von HSMrgE auf die HSMas-Aktivität untersucht. Es konnte demonstriert werden, dass bei steigender Konzentration des HSMrgE-Rezeptors (0ng, 5ng, 10ng, 25ng, 50ng, 75ng, 100ng) und gleich bleibender Konzentration von HSMas der inhibitorische Effekt auf die konstitutive Aktivität des HSMas-Rezeptors gesteigert wird (Abb.4.48). Für HSMas ohne HSMrgE-Koexpression wurde eine Luziferase-Produktion von $179,2 \pm 13,84$ RLU vs. Basal gemessen. Steigt also die Konzentration von HSMrgE, sinkt die Luziferase-Produktion von HSMas und somit dessen konstitutive Aktivität bis auf 4% bei 100ng HSMrgE $6,9 \pm 0,58$ RLU vs. HSMas (Abb.4.48).

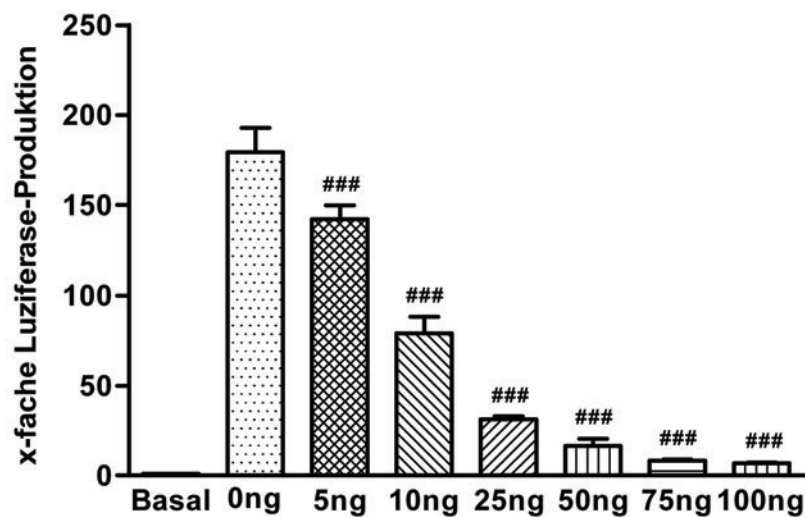


Abb.4.48: Die SRF-Aktivierung nach Koexpression von HSMas (50ng) und HSMrgE (0ng, 5ng, 10ng, 25ng, 50ng, 75ng, 100ng) in HEK293-Zellen. Der Basalwert (Basal), nur pcDNA3.1(-)-transfizierte Zellen, wurde gleich eins gesetzt; ###P<0,001 vs. HSMas; n ≥ 2×3.

4.3.12 Dosisabhängiger Effekt von HSMrgE auf die konstitutive Aktivität von HSMrgD

Milasta *et al.* (2006) beschrieben vor kurzem eine Interaktionen zwischen den Ratten-Mrg-Rezeptoren, MrgD und MrgE.. Sie konnten zeigen, dass die Koexpression der Rezeptoren die Fähigkeit von HSMrgD, auf β -Alanin anzusprechen, verringert, und so extra- und intrazelluläre Wirkungen von β -Alanin reduziert werden. Aufgrund der in 4.3.6 beschriebenen Reduktion der

Luziferase-Produktion von HSMrgD bei Koexpression mit HSMrgE wurde wie in 4.3.11 der dosisabhängige Effekt von HSMrgE auf die HSMrgD-Aktivität untersucht. Die Dosis-Wirkungs-Kurve demonstriert bei HSMrgD ohne Koexpression mit HSMrgE eine gemessene Luziferase-Produktion von $208,8 \pm 17,59$ RLU vs. Basal. Steigt die Konzentration von HSMrgE, sinkt die Luziferase-Produktion von HSMrgD bis auf 27% bei 100ng HSMrgE: $56,9 \pm 13,84$ RLU vs. HSMrgD; Abb.4.49). Der hemmende Effekt von HSMrgE auf HSMrgD ist um 23% geringer als der hemmende Effekt auf HSMas (Abb.4.3.11).

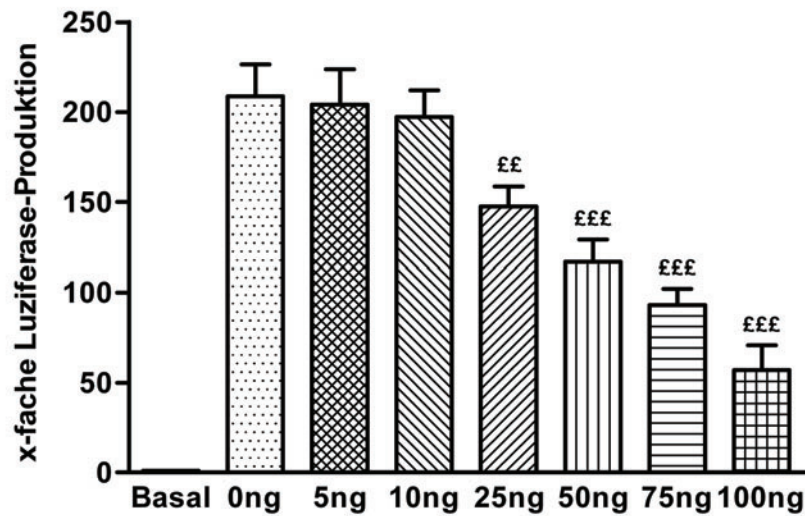


Abb.4.49: Die SRF-Aktivierung nach Koexpression von HSMrgD (50ng) und HSMrgE (0ng, 5ng, 10ng, 25ng, 50ng, 75ng, 100ng) in HEK293-Zellen. Der Basalwert (Basal), nur pcDNA3.1(-)-transfizierte Zellen, wurde gleich eins gesetzt; ££P<0,001 vs. HSMrgD; £££P<0,001 vs. MrgD; n ≥ 2×3.

5. Diskussion

Die humanen GPCRs können in fünf eindeutige Sub-Familien eingeteilt werden (Fredriksson *et al.*, 2003). Diese Klassifikation basiert auf Charakteristika der transmembranen Domänen, die anhand von phylogenetischen Analysen identifiziert wurden (Familie G, Glutamat Rezeptor, 15 Mitglieder; Familie R, Rhodopsin, 701 Mitglieder; Familie A, Adhäsions-Rezeptoren, 24 Mitglieder; Familie F, „frizzled“/Geschmack Rezeptoren, 24 Mitglieder; Familie S, Sekretin Rezeptoren, 15 Mitglieder; Fredriksson *et al.*, 2003). Die Rhodopsin-Familie ist mit ihren 701 Mitgliedern die größte der fünf Familien und wird nochmals in vier Untergruppen (α , β , γ , δ) unterteilt. Der HSMas-Rezeptor und die Rezeptoren der Mrg-Familie gehören in die δ -Gruppe (Fredriksson *et al.*, 2003). Die Rezeptor-Familie der Mrgs, deren Gene eine nahe Verwandtschaft zum *Mas*-Protoonkogen (Young *et al.*, 1986) aufweisen, wurde vor einigen Jahren entdeckt (Dong *et al.*, 2001). Für einige dieser Mrgs konnten bislang Liganden identifiziert werden (Dong *et al.*, 2001; Han *et al.*, 2002; Lembo *et al.*, 2002; Shinohara *et al.*, 2004). Allerdings sind für den größten Teil dieser Rezeptoren die physiologischen und pathophysiologischen Funktionen noch unbekannt (Civelli, 2005).

5.1 Die Vielfalt der Signalwege des G-Protein gekoppelten Rezeptors Mas

Um die Signalwege zu identifizieren, die die konstitutiven Eigenschaften des Mas-Rezeptors induzieren (Gemhardt *et al.*, 2005), wurde zum einen die Aktivierung des Transkriptionsfaktors SRF in drei verschiedenen Zelllinien (HEK293A-, NIH3T3-, BAE-Zellen), die mit Mas transfiziert wurden, und zum anderen die Aktivierung des Transkriptionfaktors NF κ B in Mas-transfizierten HEK293A-Zellen untersucht. In allen drei Zelllinien führte HSMas zu einer signifikanten Aktivierung des SRF (4.1). Die stärkste konstitutive Aktivität wurde in HEK293A-Zellen beobachtet (4.1). Die HEK293A-Zelllinie weist im Vergleich zu NIH- und BAE-Zellen die geringste Varianz von Gen-Aktivitäten auf. Dadurch können weniger Gen-Produkte die konstitutive Signalkaskade beeinflussen, was zu einem stärkeren Signal führt. Die geringere Aktivität in NIH- und BAE-Zellen zeigt aber auch, dass spezialisierte Zellen mit komplexer Vernetzung von Signalkaskaden die konstitutive Aktivierung von Mas inhibieren.

Die Resultate zeigen, dass Mas nicht nur, wie von Gemhardt *et al.* (2005) beschrieben, in HEK293A- bzw. COS-Zellen sondern in allen getesteten Zelllinien konstitutiv aktiv ist. Dementsprechend muss diese konstitutive Aktivierung unter physiologischen und/oder

pathophysiologischen Bedingungen von Bedeutung sein, da sie in allen Zellen, die endogen Mas exprimieren, auftritt. Auch wenn es bisher keine Daten zur Rolle dieser Mas-induzierten konstitutiven Aktivität gibt, können ganz aktuell neue experimentelle Ansätze initiiert werden, da seit kurzem ein Präparat von der Firma Arena (Patentnummer: PCT/US2006/02402) verfügbar ist, das zu einer spezifischen Blockade der konstitutiven Aktivität des Mas-Rezeptors führt.

HSMas zeigt auch eine konstitutive Aktivierung des zweiten getesteten Transkriptionsfaktors. NF κ B (Abb.4.24) ist der wichtigste Transkriptionsfaktor für die Aktivierung proinflammatorischer Gene bzw. Produkte (Sun *et al.*, 2002). Deshalb lassen die neu gezeigten Daten vermuten, dass Mas unter physiologischen oder pathophysiologischen Bedingungen eine proinflammatorische Komponente hat. Dieses Ergebnis unterstützt jüngste Studien der Arbeitsgruppe von Prof. Walther, die zeigen, dass Mas-Knockout-Mäuse in einem Nieren-Inflammations-Modell (UUO) eine geringere renale Inflammation aufweisen (unpubliziert).

Um mögliche Speziesunterschiede zu untersuchen, wurde neben dem humanen Mas-Rezeptor der Mas-Rezeptor der Ratte (Sequenzhomologie von 90%) in HEK293A- und NIH3T3-Zellen transfiziert und die Aktivierung des SRF gemessen. Die konstitutive Aktivität ließ sich mit dem Ratten-Mas-Rezeptor in HEK293A-Zellen bestätigen (Abb.4.2). Dies spricht für eine spezies-unabhängige SRF-Aktivierung via Mas und unterstützt die Hypothese, dass der konstitutiven Aktivität von Mas eine essentielle Bedeutung zukommt. Dass die konstitutive Aktivierung von SRF mit dem Ratten-Mas-Rezeptor in NIH3T3-Zellen nicht sichtbar wurde, mag mehrere Gründe haben (Abb.4.26). Ein methodischer Fehler sollte ausgeschlossen sein, da auf ein und derselben Platte der HSMas- und der RNMas-Rezeptor exprimiert wurden. Zum einen könnte die nicht 100%ige Sequenzhomologie zum HSMas-Rezeptor für eine Veränderung des konstitutiven Signalweges verantwortlich sein. Dies kann aber eigentlich ausgeschlossen werden, weil der Rezeptor per se in HEK293A-Zellen konstitutive Aktivität zeigt. Zum anderen kann die hohe Varianz von Gen-Aktivitäten in NIH3T3-Zellen den konstitutiven Signalweg des Ratten-Mas-Rezeptors besonders ungünstig beeinflussen und entsprechend die konstitutive Aktivierung bis in den Grenzbereich von 2 RLU reduzieren. Da NIH3T3-Zellen aus embryonalen Fibroblasten der Maus entstammen, wäre es auch denkbar, dass auf Grund der Speziesunterschiede von Maus-Zelle und Ratten-Rezeptor ein suboptimales Zusammenspiel von Mas und intrazellulären Molekülen zu einer Einschränkung des konstitutiven Signalweges führt. Deshalb widerspricht die gehemmte konstitutive Aktivierung in NIH3T3-Zellen nicht der allgemeinen Bedeutung der konstitutiven Mas-Aktivierung unter physiologischen und pathophysiologischen Bedingungen, die aufgrund aller bisher vorgelegten Daten postuliert werden muss.

Die Aktivierung des SRF kann sowohl durch Rac als auch durch Rho aktiviert werden (Hill *et al.*, 1995). Während Zohn *et al.* (1998) eine Aktivierung von c-Jun/ATF-2 und Cyclin-D1 über Mas zeigten und postulierten, dass Rac eine Schlüsselrolle in der Aktivierung dieser Transkriptionsfaktoren spielt, fanden Gembarde *et al.* (2005), dass Mas nicht Rac, sondern Rho aktiviert und diese Aktivierung durch $G_{\alpha q}$ induziert wird. Es ist bekannt, dass konstitutiv aktiviertes $G_{\alpha q}$ für mitogene Eigenschaften in NIH3T3-Zellen verantwortlich sein kann (De Vivo *et al.*, 1994). Dementsprechend sollte ein konstitutiv aktiver Mas-Rezeptor auch zu einer konstitutiven Aktivierung von $G_{\alpha q}$ und damit zu einer Stimulation von Zellteilungsprozessen führen. Auch durch genetische Untersuchungen wird angenommen, dass die konstitutive Aktivität von Mas für seine beschriebenen mitogenen Eigenschaften verantwortlich ist (Young *et al.*, 1986). Mas' mitogene Eigenschaften werden durch einen Transfektionseffekt initiiert, bei dem es zu einer Neuordnung von DNA-Elementen im 5'-Bereich des *Mas*-Gens kommt. Der Vergleich von nicht transfizierter mit transfizierter DNA läßt auf ein Rekombinationselement schließen, welches nach Induktion durch Transformation aus dem Protoonkogen-Promotorbereich deletiert wurde (Young *et al.*, 1986). Als Folge dieser Erscheinung kam es zur Onkogen-Aktivierung und zur unkontrollierten Expression des Gens und damit auch zur Akkumulation von konstitutiv aktiviertem Mas (Young *et al.*, 1986). Somit unterstützen die hier gezeigten Daten die Schlussfolgerung, dass die konstitutive Aktivität des Mas-Rezeptors verantwortlich für dessen mitogene Eigenschaften in NIH3T3-Zellen ist (Young *et al.*, 1986).

5.2 Angiotensin-Metabolite als mögliche Liganden des Mas-Rezeptors

Das Renin-Angiotensin-System (RAS) spielt eine wichtige Rolle in der Regulation des Blutdruckes und in der Pathogenese kardiovaskulärer Krankheiten (Burnier *et al.*, 2000; Kim *et al.*, 2000). Lange Zeit galt AngII als einziges aktives Peptid des RAS. Mittlerweile sind auch andere Peptide des RAS bekannt, wie AngIII, AngIV und Ang-(1-7), die biologische Wirkungen vermitteln (Ardaillou, 1997; Santos *et al.*, 2000).

Schon 1988 wurde postuliert, dass der GPCR Mas eine Rolle im RAS spielt und möglicherweise als ein Rezeptor für einige Ang-Peptide fungiert (Jackson *et al.*, 1988). Nach Untersuchungen in den letzten Jahren steht fest, dass der Mas-Rezeptor mit dem AT_1 -Rezeptor einen oligomeren Komplex bildet und so inhibitorisch die Eigenschaften von AngII beeinflussen kann (Kostenis *et al.*, 2005). Des Weiteren konnte gezeigt werden, dass der Mas-Rezeptor mit dem Signalweg von Ang-(1-7) assoziiert ist (Santos *et al.*, 2003).

Bekannt ist, dass AngII einen AA-Anstieg via AT_1 induziert (Kostenis *et al.*, 2005), aber auch Transkriptionsfaktoren wie NF κ B, NFAT (Suzuki *et al.*, 2003) und SRF (Godeny *et al.*, 2006) aktiviert. Eine kürzlich eingereichte Publikation der Arbeitsgruppe Walther zeigt, dass Mas auch einen Einfluß auf den AngII-induzierten AA-Anstieg hat (Gembardt & Grajewski *et al.*, 2008). Demzufolge wurde in dieser Arbeit untersucht, ob ausgewählte Transkriptionsfaktoren via Mas durch verschiedene Ang-Metabolite aktiviert werden können. Da die konstitutive Aktivität des Rezeptors zu einer SRF-Aktivierung führt (Abb.4.1), wurde für die Ermittlung des neuen Signalweges der Transkriptionsfaktor SRF ausgewählt. HSMas-transfizierte Zellen wurden mit verschiedenen Ang-Metaboliten, AngII, AngIII, AngIV, Ang-(1-5), Ang-(1-7) und Ang-(1-9), stimuliert (4.2). Als Positiv-Kontrolle wurde der AT_1 -Rezeptor mit AngII stimuliert. Es zeigte sich, dass keiner der Ang-Metabolite via HSMas den SRF aktiviert (Abb.2.28 und Abb.2.29), während AngII via AT_1 eine signifikante SRF-Aktivierung ergab. Damit haben die Ang-Metabolite keinen Einfluß auf die konstitutive Aktivierung des SRF durch den HSMas-Rezeptor. Diese Ergebnisse sind kongruent mit den bisher beschriebenen Signalwegen für Ang-(1-7), da dessen Effekte über AA-Freisetzung (Santos *et al.*, 2003) und NO-Generierung (Trask *et al.*, 2007) mediert werden, während Ca^{2+} -Ausschüttung und assoziierte Signale, wie z.B. die Aktivierung des Transkriptionsfaktors NFAT, bisher nicht beschrieben wurden. Außerdem könnten die negativen Ergebnisse auch ein Zeichen dafür sein, dass der Mas-Rezeptor nicht alleine bzw. nicht direkt für die Signalübertragung von Ang-(1-7) verantwortlich ist. Erwiesen ist jedoch, dass Ang-(1-7) in Mas-transfizierten COS- und CHO-Zellen einen signifikanten AA-Anstieg induziert (Santos *et al.*, 2003), der durch den Mas-Antagonisten A-799 gehemmt wird. AT_1 - und AT_2 -Rezeptorantagonisten beeinflussen die AA-Ausschüttung nicht. Auch der vasodilatatorische Effekt von Ang-(1-7) kann in Mas-Knockout Mäusen durch den Mas-Rezeptor-Antagonisten A-779 aufgehoben werden (Lemos *et al.*, 2005). Allerdings gilt das nicht für alle Blutgefäße, da z.B. in mesenterialen Zellen der vasodilatatorische Effekt von Ang-(1-7) zwar teilweise durch den Mas-Rezeptor-Antagonisten A779, aber nur komplett durch den nicht Mas-spezifischen Antagonisten D-Pro7-Ang-(1-7) blockiert wird (Santos *et al.*, 2007; Silva *et al.*, 2007). Auch hier konnten Silva *et al.* (2007) in Sprague–Dawley-Ratten zeigen, dass sich der vasodilatatorische Effekt von Ang-(1-7) nicht durch die AT_1 - und AT_2 -Antagonisten CV11974 und PD123319 beeinflussen lässt.

Das Ergebnis dieser Arbeit unterstützt letztendlich die Aussage, dass die Aktivität von Ang-(1-7) zurzeit nicht alleine durch die Interaktion mit dem Mas-Rezeptor erklärt werden kann, obwohl der Mas-Rezeptor eine entscheidende Rolle in der Übermittlung der Ang-(1-7)-Effekte spielt (Santos *et al.*, 2003). Es ist möglich, dass sich diese Effekte nicht durch einen einzigen

Mechanismus erklären lassen, sondern die vasodilatatorischen (Santos *et al.*, 2007) und auch weitere Eigenschaften von Ang-(1-7) von mehreren Faktoren abhängig sind, wie zum Beispiel der Zell- bzw. Tierart, dem Gefäßbett oder der Expression anderer Rezeptoren. Eine kürzlich erschienene Studie gibt möglicherweise erste detaillierte Hinweise auf eine von Ang-(1-7) induzierten Signalmechanismus. Sampaio *et al.* (2007) zeigten, dass die Ang-(1-7)-induzierte NO-Produktion in humanen BAE-Zellen durch einen PI3K/Akt-abhängigen Signalweg moduliert wird, der eine Änderung der eNOS-Phosphorylierung induziert. Die NO-Abgabe oder eNOS-Phosphorylierung findet nicht statt, wenn nicht gleichzeitig der Mas-Rezeptor exprimiert wird. Umgekehrt führte der Mas-Rezeptor-Antagonist A-779 zu einer Inhibition der eNOS-Phosphorylierung (Sampaio *et al.*, 2007).

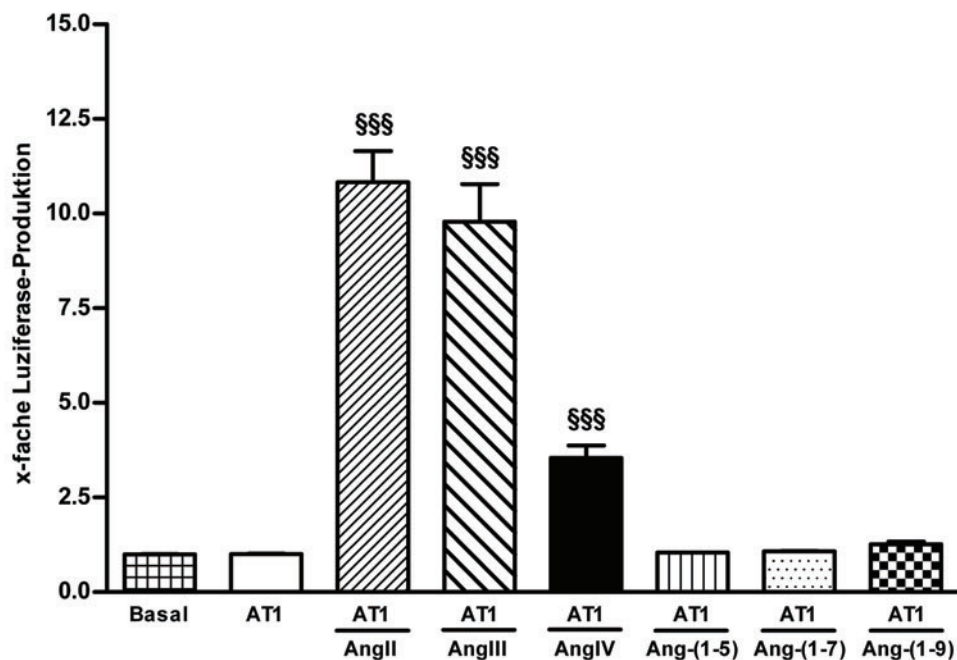


Abb.5.1: Stimulation des SRE durch die Ang-Peptiden, AngII, AngIII, AngIV, Ang-(1-5), Ang-(1-7) und Ang-(1-9) in pcDNA3.1(-)- und AT₁-transfizierten HEK293A-Zellen. Die Daten sind im Vergleich zum unstimulierten AT₁-Rezeptor zu sehen. Der Basalwert (Basal), nur pcDNA3.1(-)-transfizierte Zellen, wurde gleich eins gesetzt; Konzentration des AT₁-Rezeptors: 50ng; Konzentration der Peptide: 10⁻⁶ M; §§§P<0,001 vs. AT₁-Rezeptors; n = 3×3.

Im Gegensatz zu Mas reagiert der AT₁-Rezeptor auf die Stimulation mit verschiedenen Ang-Peptiden (Abb.5.1). Am deutlichsten kann der AT₁ von AngII und AngIII aktiviert werden; aber auch AngIV zeigt einen Effekt. Demzufolge sollte in weiteren Experimenten untersucht werden,

ob Mas zwar nicht direkt auf Ang-Metabolite mit der Aktivierung von SRF reagiert, aber durch die Interaktion mit dem AT₁-Rezeptor die AngII/III/IV medierte SRF-Aktivierung modulieren kann, bzw. ob es durch Konformationsänderungen des AT₁-Rezeptors durch die Mas-Kotransfektion zu einer Verschiebung des Ligandenmusters kommt.

5.3 Mögliche Liganden und intrazelluläre Signalwege der Mrg-Rezeptorfamilie

Die Klonierung von Mrg-Rezeptoren

Die Mrg-Familie (Anlage 1) wurde von zwei unabhängigen Arbeitsgruppen identifiziert (Dong *et al.*, 2001; Lembo *et al.*, 2002). Sie wird vornehmlich in den dorsalen Gliawurzeln von sensiblen Neuronen exprimiert (Dong *et al.*, 2001; Lembo *et al.*, 2002), wobei diskutiert wird, inwiefern sie eine Rolle in der Schmerzentscheidung bzw. -weiterleitung spielen (Dong *et al.*, 2001; Han *et al.*, 2002; Lembo *et al.*, 2002).

Verwendet wurden der humane Mas-Rezeptor (Kostenis *et al.*, 2005) und 7 Rezeptoren, die freundlicherweise von der Sanofi-Aventis GmbH zur Verfügung gestellt wurden (2.2.2). Dazu gehören der humane MrgD-, MrgF-, MrgX1-, MrgX2-, MrgX3 und MrgX4-Rezeptor und der murine MrgH-Rezeptor, der früher als GPR90-Rezeptor beschrieben wurde (Wittenberger *et al.*, 2001). Der murine MrgH-Rezeptor wurde verwendet, weil zurzeit kein humanes Analog existiert. Eine Sequenzanalyse der acht Rezeptoren ergab, dass sie eine Sequenzhomologie von 28%-41% zum humanen Mas-Rezeptor aufweisen (Abb.4.1). Für drei dieser GPCPs, MrgD, MrgX1 und MrgX2, konnten bereits Liganden identifiziert werden (Lembo *et al.*, 2002; Robas *et al.*, 2003; Shinohara *et al.*, 2004; Kamohara *et al.*, 2005), die anderen fünf GPCRs: Mrg, MrgX3, MrgX4, MrgF und MrgH gelten als „orphan“ Rezeptoren, d.h. sie sind Rezeptoren, deren Liganden zurzeit noch unbekannt sind.

Zur Vergrößerung des Rezeptor-Pools wurden vier weitere Rezeptoren der Mrg-Familie (HSMrgE, HSMrgG und RNMRgE, RNMRgG) amplifiziert und kloniert (4.1). Eine phylogenetische Analyse ergab eine Sequenzhomologie von 30% für HSMrgE bzw. von 28% für HSMrgG zu HSMas. In der aktuellen Literatur gelten die beiden Rezeptoren als „orphan“ Rezeptoren. Die Klonierungsergebnisse von MrgE und MrgG wurden mit dem BLAST-Programm auf Sequenzhomologien untersucht (4.1.4). Während die RNMRgG-Sequenz komplett übereinstimmte, ergab sich keine 100%ige Übereinstimmung zwischen den HSMrgE-, HSMrgG- und RNMRgE-Klonen und den vom BLAST-Programm erkannten homologen Sequenzen (4.1.4; Anlage 4, 6, 7). Um Mutationen, die in Sequenzbereichen liegen und für eine

mögliche konstitutive Aktivierung der Mrgs verantwortlich sind, ausschließen zu können, wurden die Proteinsequenzen der verwendeten GPCRs miteinander verglichen (4.1 und Anlage 6 bzw. 7). Dieser Vergleich zu den konstitutiv aktiven Rezeptoren (Mas, MrgD, MrgX4) zeigte, dass in allen verdächtigen Positionen eine andere Aminosäure steht. Folglich ist es unwahrscheinlich, dass die vorhandenen Mutationen von HSMrgE, HSMrgG und RNMRgE für eine Veränderung einer möglichen konstitutiven Aktivität der Rezeptoren verantwortlich sind.

Die Sequenzungenauigkeit könnte Folge einer fehlerhaften PCR-Amplifikation oder das Resultat einer Sequenzierungsungenauigkeit. Letzteres kann allerdings ausgeschlossen werden, da die Rezeptorsequenzen von beiden Seiten sequenziert wurden und die Ergebnisse identisch waren. Möglicherweise beruht der Sequenzunterschied auf einem Fehler der DNA-Polymerase, da diese statistisch auf 400 amplifizierte Basenpaare 1bp falsch abschreiben kann. Ebenso können aufgrund der genetischen Vielfalt zwischen verschiedenen Spezies (Menschen bzw. Ratte) unterschiedliche Proteinsequenzen für einen Rezeptor existieren. Beispielsweise existieren zwei unterschiedliche Proteinsequenzen („Accession“-Nummer: NP 473373 und AA I07101) des humanen MrgX4-Rezeptors, dabei unterscheiden sich beide Rezeptoren an Position Ala182Val. Inwieweit es sich aber um solche Varianten oder um PCR-Arbeitsfehler handelt, kann nicht abschließend beantwortet werden.

Die konstitutive Aktivität innerhalb der Familie der Mas-ähnlichen Rezeptoren

Eine konstitutive Signalübertragung ist von großer pathophysiologischer Bedeutung, weil einige GPCR-Mutationen, die zu konstitutiver Rezeptor-Aktivität führen, mit Krankheiten assoziiert sind (Schoneberg *et al.*, 2004). Die in dieser Arbeit identifizierte konstitutive Aktivität des Mas-Rezeptors (4.1) führte zu der Überlegung, dass möglicherweise einer oder mehrere der Mas-ähnlichen Rezeptoren aufgrund ihrer Sequenzhomologie zu Mas (28% bis 41%) ebenfalls eine konstitutive Aktivierung der intrazellulären Signalwege aufzeigen. Verwendet wurden, wie in 4.1 beschrieben, zehn Mas-ähnliche Rezeptoren. Die Ergebnisse zeigen eine signifikante konstitutive Aktivierung des SRF durch zwei weitere Rezeptoren, HSMrgD und HSMrgX4, wobei die SRF-Aktivierung von HSMrgD signifikant höher ist als die von HSMas und HSMrgX4 (Abb.4.3).

Eine Analyse der GPCRs ergab bei mehr als 91% eine Disulfidbrücke zwischen der dritten transmembranären Domäne (TMH) und der zweiten extrazellulären Schleife (ECL) (Karnik *et al.*, 2003). Mutationen, die diese Brücke zerstören, haben möglicherweise zur Folge, dass Aspekte der Rezeptorfunktion gestört werden (Karnik *et al.*, 2003). Aus diesem Grund war es interessant zu prüfen, ob evtl. diese Brücke speziell bei den konstitutiv aktiven Rezeptoren nicht

ausgebildet wird. Eine Analyse von Mas und ca. 80 Mrgs (Maus, Mensch, Ratte) zeigte allerdings, dass diese sonst so hoch konservierte Disulfidbrücke zwischen der dritten TMH und der zweiten ECL bei allen Familien-Mitgliedern fehlte. Zum Beispiel bildete der humane AT_{1a}-Rezeptor diese Disulfidbrücke an Position C101 und C180, während die korrespondierenden Positionen I105 und S180 im humanen Mas-Rezeptor keine Cysteine enthalten. Die in dieser Arbeit verwendeten konstitutiv aktiven Rezeptoren sind auch untereinander verglichen worden, um mögliche Gemeinsamkeiten in ihren Rezeptor-Strukturen zu identifizieren. Es zeigte sich eine natürliche Mutation zwischen der dritten TMH und der sechsten TMH für HSMas und HSMrgD. Mittlerweile ist etabliert, dass die Bindung zwischen der dritten TMH und der sechsten TMH eine wichtige Rolle in der Aktivierung von GPCPs spielt (Ballesteros *et al.*, 2001). Verantwortlich für diese Interaktion wird bei den Rhodopsin-ähnlichen Rezeptoren die konservierte Arg-131 am zytoplasmatischen Ende von der dritten TMH und Asp-130 und Glu-268 am zytoplasmatischen Ende von der sechsten TMH gemacht (Ballesteros *et al.*, 2001). Mutationen in diesem Bereich führen zu einer konstitutiven Rezeptor-Aktivität (Ballesteros *et al.*, 2001). Allerdings ist in der Sequenz des konstitutiv aktiven MrgX4-Rezeptors diese Disulfidbrücke zwischen der dritten TMH und der sechsten TMH nicht vorhanden, wohingegen der in dieser Arbeit als nicht konstitutiv aktiv identifizierter Rezeptor MMMrgH diese Disulfidbrücke ausbildet. Demzufolge läßt sich die gemeinsame konstitutive Aktivität der drei Rezeptoren nicht abschließend aufgrund einer bestimmten Strukturmutante erklären. Es bleibt in weiteren Versuchen zu prüfen, welcher spezielle Mechanismus hinter der konstitutiven Aktivität von HSMrgX4 steckt und welche Eigenschaften alle drei konstitutiv aktiven Rezeptoren gemeinsam haben.

Die in dieser Doktorarbeit identifizierte konstitutive Aktivität von HSMrgD und HSMrgX4 wurde, wie für Mas, in zwei weiteren Zelllinien untersucht, NIH3T3- und BAE-Zellen (Abb.4.24 und Abb.4.25). Auch die konstitutive Aktivität von HSMrgD muss unter physiologischen und/oder pathophysiologischen Bedingungen von signifikanter Bedeutung sein, da aufgrund der hier erbrachten Daten davon auszugehen ist, dass in allen Zellen, die endogen HSMrgD exprimieren, eine konstitutive Aktivierung von intrazellulären Signalwegen auftritt. Während in NIH-Zellen eine signifikante konstitutive Aktivierung von HSMrgX4 zu identifizieren ist, konnte keine konstitutive Aktivierung in BAE-Zellen nachgewiesen werden. Die fehlende ubiquitäre konstitutive Aktivität des Rezeptors könnte im Zusammenhang mit einer möglicherweise anderen Initiierung von Signalwegen durch HSMrgX4 als durch HSMas und HSMrgD stehen. Interessanterweise zeigte die Verwendung eines weiteren Transkriptionsfaktors, NFκB, dass sowohl HSMrgD als auch HSMrgX4, wie vorher schon für HSMas gezeigt, NFκB aktivieren

können und somit auch unter physiologischen oder pathophysiologischen Bedingungen eine proinflammatorische Komponente haben.

Für einige GPCRs konnten in den letzten Jahren Mutanten identifiziert werden, die zu einer konstitutiven Aktivität dieser Rezeptoren führen (Grobowski *et al.*, 1997). Im Zusammenhang mit dieser Arbeit ist dabei vor allem die AT₁-Mutante Asn¹¹¹ von Bedeutung (Grobowski *et al.*, 1997). Leider kann aufgrund der unterschiedlichen Signalwege für die AT₁-Mutante (NFAT/IP₃) und für die hier identifizierten konstitutiv aktiven Rezeptoren (SRF und NFκB) kein direkter Vergleich gezogen werden. Um trotzdem abschätzen zu können, in welcher Größenordnung die in dieser Arbeit identifizierte konstitutive Aktivität im Vergleich zur Aktivierung von Signalwegen durch Ligand/Rezeptor-Interaktion vorliegt, wurde die konstitutive Aktivierung von HSMrgD-stimulierten Signalwegen mit der von AngII-stimulierten, AT₁-Rezeptor medierten Signalen verglichen. Die in dieser Doktorarbeit quantifizierte konstitutive Aktivität von HSMrgD übersteigt das maximale Signal nach AT₁-Stimulation mit AngII um ca. 25% (Abb.5.2). Bekannt ist, dass AngII via AT₁ die glatte Gefäßmuskulatur kontrahiert, positiv chronotrop auf Herzmuskelzellen wirkt, die Aldosteron-Produktion und Katecholamin-Abgabe aus der adrenalen Medulla und sympathischen Nervenenden stimuliert sowie viele weitere wichtige Funktionen im menschlichen Körper induziert und/oder kontrolliert (Kobori *et al.*, 2007). Demzufolge ist AngII/AT₁ mit wichtigen Krankheiten des menschlichen Körpers

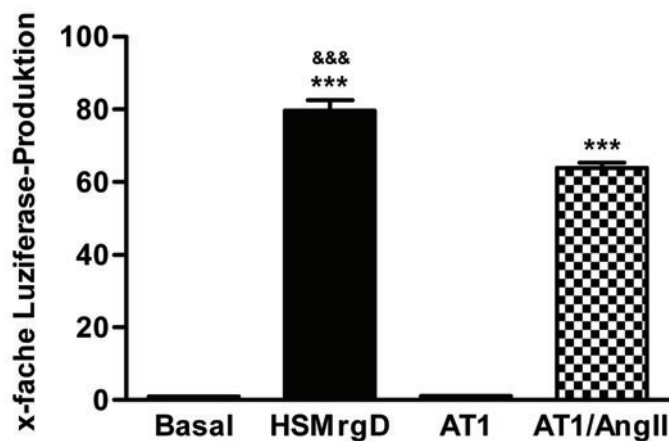


Abb.5.2: Die SRF-Aktivierung durch den konstitutiv aktiven HSMrgD-Rezeptor im Vergleich zur SRF-Aktivierung durch den AngII-stimulierten AT₁-Rezeptor in HEK293A-Zellen. Der Basalwert (Basal), nur pcDNA3.1(-)-transfizierte Zellen, wurde gleich eins gesetzt; Konzentration der Rezeptoren: 50ng; Konzentration des Peptides: 10⁻⁶ M; &&&P<0,001 vs. Basalwert; \$\$\$P<0,001 vs. AT1/AngII; n = 2×3.

assoziiert, wie z.B. Hypertonie, Nephropathie, Arteriosklerose, Herzhypertrophie, Thrombose und Gefäß-Dysfunktionen (Suzuki *et al.*, 2003). Da die konstitutive HSMrgD-Aktivität die Signalstärke nach AngII/AT₁-Interaktion noch übersteigt, muss von einer essentiellen Bedeutung des Rezeptors zumindest in den Zellen, die den MrgD-Rezeptor exprimieren, ausgegangen werden. Dementsprechend sollten transgene Tier-Modelle hergestellt werden, die MrgD entweder überexprimieren oder denen das Gen fehlt, um unter basalen, aber vor allem pathophysiologischen Bedingungen die Funktion von MrgD untersuchen zu können und damit die Bedeutung der konstitutiven Aktivität zu demaskieren. Aufgrund der Expression von MrgD in den dorsalen Gliawurzeln von sensiblen Schmerzneuronen kann man aber bereits postulieren, dass MrgD eine essenzielle Rolle in der Schmerzentstehung oder –weiterleitung spielt (Dong *et al.*, 2001; Milasta *et al.*, 2006). Auch wenn weitere Versuche diese Hypothese noch abschließend klären müssen, könnte die pharmakologische Blockade der konstitutiven Aktivität von MrgD, aber auch die der anderen konstitutiv aktiven Rezeptoren, ein völlig neuer Therapieansatz bei der Schmerzbekämpfung und auch bei anderen Erkrankungen sein. Dass die Blockade der konstitutiven Aktivität nicht nur eine Fiktion ist, zeigt das kürzlich entdeckte, die konstitutive Mas-Aktivierung hemmende Arena-Präparat (Patentnummer: PCT/US2006/02402).

Die Mas-ähnlichen Rezeptoren und deren mögliche Interaktion mit Angiotensin-Metaboliten

Die Assoziation von Mas mit der Ang-(1-7)-Signaltransduktion scheint unbestritten zu sein (Santos *et al.*, 2003; Tallant *et al.*, 2005). Die Tatsache, dass AngII und AngIII mit zwei Rezeptoren, AT₁ und AT₂, die eine Sequenzhomologie von 34% haben (Ichiki *et al.*, 1995), interagieren (Ardailou, 1999), wirft die Frage auf, ob möglicherweise Mrg-Rezeptoren, die eine Sequenzhomologie von 28%-41% mit dem Mas-Rezeptor teilen, auch als Rezeptoren für Ang-(1-7) oder einen der anderen genutzten Ang-Metabolite fungieren. Exemplarisch wurden hierfür die zwei identifizierten konstitutiv aktiven Mrg-Rezeptoren, HSMrgD und HSMrgX4, und die im Rahmen dieser Arbeit klonierten Rezeptoren HSMrgE und HSMrgG auf eventuelle Interaktionen mit verschiedenen Ang-Metaboliten in HEK293A-Zellen untersucht (4.2). Keiner der verwendeten Mrg-Rezeptoren zeigte eine signifikante Änderung der SRF-Aktivierung nach Stimulation mit den Ang-Metaboliten (Abb.4.30 bis Abb.4.37). Das deckt sich mit Daten zu HSMas (4.2.1), die zeigen, dass weder Ang-(1-7) noch andere Ang-Metabolite über HSMas den Transkriptionsfaktor SRF stimulieren können.

Dieses negative Ergebnis kann mehrere Ursachen haben. Erstens könnte es sein, dass in HEK293A-Zellen Komponenten der durch die untersuchten Rezeptoren stimulierbaren

intrazellulären Signalwege fehlen, und somit nur Zellen, die endogen die Rezeptoren und die notwendigen Signalmoleküle zusammen exprimieren, aktiviert werden können. Zweitens kann es, wie für die Mas/Ang-(1-7)-Achse gezeigt, sein, dass die Signaltransduktion via AA-Freisetzung (Santos *et al.*, 2003) und NO-Generierung vermittelt wird (Trask *et al.*, 2007), nicht aber über Transkriptionsfaktoren wie SRF. Auch wenn der erste Punkt theoretisch möglich ist, scheint der zweite wahrscheinlicher, da im Ergebnis dieser Arbeit gezeigt werden konnte, dass die konstitutive Aktivität bzw. die Liganden-Stimulation von Rezeptoren zu einer Aktivierung von SRF in HEK293A-Zellen führt und damit alle intrazellulären Komponenten zur Aktivierung des SRF vorhanden sein sollten.

5.4 Rezeptor-/Rezeptor-Interaktion innerhalb der Mrg-Familie

GPCRs werden durch eine große Anzahl an endogenen Liganden aktiviert und transduzieren dabei extrazelluläre Signale über die Plasmamembran, um anschließend eine Vielzahl von Effektoren zu aktivieren. Für einige der GPCRs der Mrg-Familie konnten mittlerweile agonistische Liganden gefunden werden. Auf der anderen Seite gibt es immer noch eine Vielzahl von Rezeptoren, deren Liganden bislang unbekannt sind, so genannte „orphan“ GPCRs (Civelli, 2005). Lange Zeit wurden die GPCRs als eine monomere-Einheit angesehen, bis vor einigen Jahren entdeckt wurde, dass GPCRs als Homodimere (Bouvier, 2001) oder Heterodimere (Milligan *et al.*, 2003; Milligan, 2004; Milligan *et al.*, 2004) existieren können. So wurde bereits für mehrere GPCRs beschrieben, dass sie durch Heterodimerisation zu einer Inhibition oder Aktivierung eines anderen Rezeptors führen, wie z.B. für die AT₁/AT₂- (AbdAlla *et al.*, 2001) oder die AT₁/Mas-Interaktion (Kostenis *et al.*, 2005) gezeigt. So kann beispielsweise der Mas-Rezeptor durch die Bildung eines heterooligomeren Komplexes mit dem AT₁-Rezeptor als funktioneller Antagonist des AngII-Rezeptors agieren (Kostenis *et al.*, 2005). Von besonderer Bedeutung sind diese Beispiele für ein besseres Verständnis der Rezeptor-Pharmakologie, des Rezeptor-Signalmusters und der Rezeptor-Internalisation. In humanen Koronarmikroarterien wurde von Batenburg *et al.* (2006) gezeigt, dass AngII eine Steigerung der Wirkung von α_1 -Adrenorezeptor-Agonisten induziert. Diese dosisabhängige AngII-induzierte Steigerung von Phenylephrin (α_1 -Adrenorezeptor-Agonist) wurde mittels eines AT₁-Antagonisten (Irbesartan) blockiert. Damit konnte innerhalb des Heterooligomerenkomplexes AT₁/ α_1 demonstriert werden, dass der Ligand/Antagonist nach Interaktion mit seinem Rezeptor das Signalverhalten des Partnerrezeptors nach dessen Interaktion mit seinem Liganden modellieren kann (Batenburg *et*

al., 2006). Auch dieses Beispiel macht die funktionelle Bedeutung der direkten Interaktion zwischen zwei Rezeptoren für die Ätiologie und dementsprechend für die Therapie kardiovaskulärer Krankheiten offensichtlich. Es verdeutlicht einmal mehr die Komplexität von Rezeptor/Rezeptor-Interaktionen und die essentielle Wichtigkeit der weiteren Erforschung von GPCR-Interaktionen und der davon abhängigen Aktivierung von Signalmustern.

Interaktionen zwischen den Rezeptoren der Mrg-Rezeptor Familie

In dieser Arbeit wurden die drei hier als konstitutiv aktiv identifizierten Rezeptoren, HSMas, HSMrgD und HSMrgX4, und zwei weitere Rezeptoren (Negativkontrollen), HSMrgE und HSMrgG, in unterschiedlichen Kombinationen gemeinsam in HEK293A-Zellen exprimiert (4.3). Die Ergebnisse zeigten, dass sich die konstitutiv aktiven Rezeptoren bei Koexpression nicht additiv oder inhibierend beeinflussen. Das lässt vermuten, dass die drei denselben oder ähnliche Signalwege mit gleichen intrazellulären Signalmolekülen verwenden. Der nicht-konstitutiv aktive HSMrgG-Rezeptor konnte keinen der drei getesteten konstitutiv aktiven Rezeptoren nach Koexpression beeinflussen, wohingegen HSMrgE, die konstitutive Aktivität von HSMrgD (Abb.4.36) und HSMas (Abb.4.33) beeinflussen konnte. In Anwesenheit des HSMrgE-Rezeptors konnte die konstitutive Aktivität der beiden konstitutiv aktiven Rezeptoren dosisabhängig signifikant gesenkt werden (4.3).

Die erste Beschreibung von Interaktionen zwischen zwei Rezeptoren der Mrg-Familie wurde von Milista *et al.* (2006) gezeigt. Sie koexprimierten Ratten-MrgD, für den β -Alanin als ein Ligand identifiziert werden konnte (Shinohara *et al.*, 2004), und Ratten-MrgE in HEK293-Zellen. In einem FLAG-Assay konnten sie zeigen, dass beide Rezeptoren physiologisch miteinander interagieren. Diese Interaktion verlangsamt die RNMRgD-Internalisation, was zu einer verstärkten β -Alanin-RNMRgD-induzierten Phosphorylierung von ERK1 und ERK2 („extracellular-regulated kinase 1 und 2“) und zu einem verstärkten Ca^{2+} -Signal führt (Milasta *et al.*, 2006). Die in dieser Doktorarbeit festgestellte Minderung der konstitutiven Aktivität von HSMas und HSMrgD bei Koexpression mit HSMrgE aufzeigt (4.3), ist damit nicht kongruent zu den Ergebnissen von Milista *et al.* (2006), die eine Signalverstärkung beschrieben. Ein möglicher Grund hierfür könnte sein, dass unterschiedliche Signalwege untersucht wurden. Während Milista *et al.* (2006) Liganden-stimulierte Signalwege, die zu einer Ca^{2+} -Freisetzung führten, untersuchten, wurde in dieser Arbeit die konstitutive Aktivierung von SRF durch HSMrgD untersucht. Der SRF-vermittelte Signalweg ist per se nicht mit einer Ca^{2+} -Ausschüttung assoziiert (Chai *et al.*, 2002). Da aber für Mas bekannt ist, dass sowohl SRF als auch NFAT, der mit der Ca^{2+} -Homöostasis assoziiert ist, konstitutiv aktiviert werden können (Gembardt *et al.*,

2005), muss auch für MrgD von einer konstitutiven Aktivierung von NFAT ausgegangen werden. Diese Annahme sollte dementsprechend dadurch getestet werden, dass in Zukunft die konstitutive NFAT-Aktivierung durch MrgD und der Einfluss von MrgE auf diese konstitutive Aktivierung untersucht wird.

Generell müssen die Ergebnisse von Milista *et al.* (2006) aus zwei Gründen kritisch hinterfragt werden. Zum einen hätten sie bereits eine konstitutive Aktivierung von NFAT (ohne Stimulation von β -Alanin) sehen müssen und zum anderen konnte in eigenen Versuchen gezeigt werden, dass es nach Stimulation mit β -Alanin zu keiner Steigerung der konstitutiven Aktivität von MrgD kommt (Abb.5.3). Sollte der Befund von Milista *et al.* (2006) stimmen, dass MrgE einen stabilisierenden Effekt auf MrgD in der Zellmembran ausübt, müsste eigentlich eine Signalverstärkung, d.h. Steigerung der konstitutiven Aktivität, sichtbar werden.

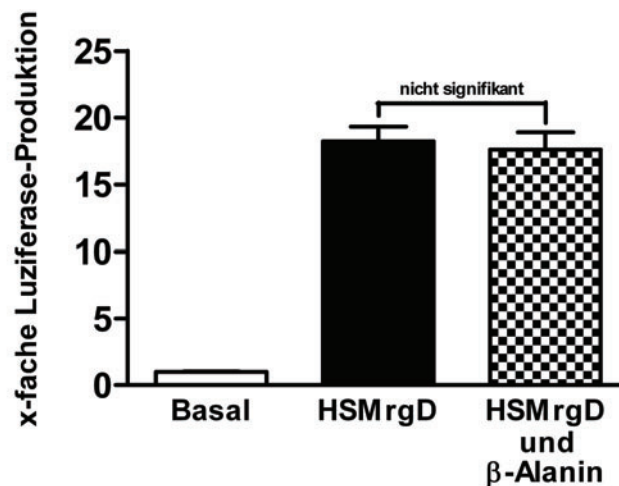


Abb.5.3: Stimulation des SRF durch β -Alanin in HSMrgD-transfizierten HEK293A-Zellen im Vergleich zum unstimulierten konstitutiv aktiven HSMrgD-Rezeptor. Der Basalwert (Basal), nur pcDNA3.1(-)-transfizierte Zellen, wurde gleich eins gesetzt; HSMrgD-Konzentration: 50ng; Konzentration des Peptides: 10^{-6} M; $n = 2 \times 3$.

Allerdings könnte es auch sein, wie von Canals *et al.* (2006) für die Interaktion von Mas und AT_1 beschrieben, dass der AT_1 -Rezeptor von Mas auf der Zellmembran stabilisiert wird und damit quantitativ akkumulieren kann. Obwohl sich aber mehr AT_1 -Moleküle in der Membran befinden, führt die Koexpression mit Mas zu einer Signalverschlechterung, da die konstitutive Aktivität von Mas zu einer Phosphorylierung von AT_1 führt (Canals *et al.*, 2006). Diese Phosphorylierung verschlechtert den intrazellulären Signalweg nach AngII-Stimulation (Canals

et al., 2006). Es könnte dementsprechend möglich sein, dass HSMrgE den HSMrgD zwar stabilisiert, die Interaktion aber zu einer Konformationsänderung oder Modulation (z.B. Phosphorylierung) von HSMrgD führt, die die konstitutive Aktivität des Rezeptors reduziert. Interessanterweise wurde der intrazelluläre Signalweg von HSMrgX4 durch HSMrgE nicht beeinträchtigt (4.3).

Dies lässt vermuten, dass HSMrgX4 möglicherweise andere Signalwege bzw. Effekte als HSMas und HSMrgD initiiert und könnte im Zusammenhang mit der gemeinsam korrelierenden natürlichen Mutation zwischen der dritten TMH und der sechsten TMH für HSMas und HSMrgD stehen (5.3), die in HSMrgX4 nicht vorhanden ist. Im Vergleich zu den beiden anderen konstitutiv aktiven Rezeptoren könnte dieser Strukturunterschied von HSMrgX4 eine Konformationsänderung zur Folge haben, die von HSMrgE nicht beeinflusst werden kann, oder dazu führt, dass andere G-Proteine oder Signal-assoziierte Moleküle mit dem Rezeptor interagieren bzw. nicht mehr interagieren können.

Dementsprechend könnte man postulieren, dass jeder Rezeptor, der diese Brücke aufweist, von MrgE inhibiert werden kann und alle anderen dementsprechend nicht von MrgE beeinflusst werden können. Diese Brücke tritt allerdings nicht nur bei den beiden konstitutiv aktiven Rezeptoren auf, sondern kommt auch bei dem nicht konstitutiv aktiven MMMrgH-Rezeptor vor. Demzufolge wäre es interessant zu untersuchen, ob HSMrgE auch den durch einen MMMrgH-spezifischen Liganden initiierten Signalweg inhibieren kann. Diese Untersuchungen sind im Moment noch nicht möglich, da kein endogener Ligand von MrgH beschrieben wurde. Ein nächster Schritt zum mechanistischen Hintergrund der Effekte von MrgE auf andere GPCRs wäre die Identifizierung von weiteren konstitutiv aktiven Rezeptoren innerhalb der Mrg-Familie. Sollte aber das Fehlen dieser Brücke im HSMrgX4 zur Folge haben, dass der Transkriptionsfaktor SRF durch andere Signalmoleküle als bei HSMas und HSMrgD aktiviert wird, die durch MrgE nicht beeinflusst werden können, ist es von großem wissenschaftlichem Interesse, diese Moleküle zu identifizieren, da sie Grundlage für neue spezifische Medikamente sein können.

Mögliche Liganden-unabhängige Funktion des „orphanen“ HSMrgE-Rezeptors durch Heterodimerisation mit Mitgliedern der Mrg-Familie

Zum jetzigen Zeitpunkt gibt es noch kein abschließendes Modell, um den möglichen Mechanismus für die Interaktion zweier GPCRs zu erklären. Allerdings liegen Anhaltspunkte vor, dass charakteristische Schnittflächen oder Domänen innerhalb der transmembranen Helix existieren, die für die Dimerisation der GPCRs verantwortlich sind (Breitwieser, 2004). Diese

Schnittstellen oder Domänen können sowohl im extrazellulären Amino-Terminus (Overton *et al.*, 2002) als auch im intrazellulären Karboxyl-Terminus (Calver *et al.*, 2001) liegen, abhängig vom GPCR. Die Mehrzahl der GPCRs wird allerdings als Dimere mittels nonkovalenten Wechselwirkungen gefestigt. Es existieren zurzeit zwei Modelle, die die Interaktionen der GPCRs widerspiegeln. Im ersten berühren sich die Oberflächen zweier monomerer GPCRs, was zu einem Kontakt der beiden eigenständigen Helices führt. Die andere Möglichkeit wäre, dass es zu einem Domänenaustausch kommt, d.h. dass einige Helices jedes Rezeptors innerhalb des Dimers tauschen, so dass der funktionelle Monomer innerhalb des Dimers Helices enthält, die von beiden GPCRs zur Verfügung gestellt wurden (Breitwieser, 2004).

Das Ergebnis dieser Doktorarbeit legt die interessante Vermutung nahe, dass einige der „orphanen“ GPCRs der Mrg-Familie möglicherweise nicht Liganden binden, sondern stattdessen die Rezeptorfunktion von „non-orphanen“-GPCRs durch eine Heterodimerisation beeinflussen.

Ein Vergleich der Expressionsmuster von HSMas, HSMrgD, HSMrgX4 und HSMrgE zeigt, dass die Mitglieder der Mrg-Familie vornehmlich in den dorsalen Gliawurzeln von sensiblen Neuronen (Dong *et al.*, 2001; Zhang *et al.*, 2007) und, wenn auch in geringerer Quantität, im Hoden exprimiert werden. Die Arbeit von Milista *et al.* (2006) weist, dass gleiche Expressionsmuster für MrgD und MrgE auf, was eine mögliche Interaktion dieser beiden Rezeptoren begünstigen würde. Das *Mas*-Gen wird vornehmlich im Vorderhirn und Hoden und in geringen Konzentrationen auch im Herzen und der Niere exprimiert (Young *et al.*, 1988; Metzger *et al.*, 1995; Alenina *et al.*, 2002). Im Gehirn ist *Mas*-mRNA in Neuronen der Hippocampusformation, den olfaktorischen Tuberkeln, dem piriformen Kortex und in der Amygdala lokalisiert (Bunnemann *et al.*, 1990; Martin *et al.*, 1992; Metzger *et al.*, 1995). Milista *et al.* (2006) konnten RNMRgE neben dessen Expression im Hoden und in den dorsalen Gliawurzeln auch im Gehirn nachweisen, ohne allerdings genauere Areale zu bestimmen. Demzufolge gibt es auch Gewebe, in denen HSMas und HSMrgE koexprimiert werden. Die Zellkultur-Ergebnisse dieser Doktorarbeit und die Überlappung von Expressionsmustern bedeuten damit möglicherweise, dass HSMrgE auch unter *in-vivo*-Bedingungen als ein endogener Antagonist für HSMrgD und HSMas fungiert. Neben direkten inhibitorischen Mechanismen (Abb.4.40 und Abb.4.43) sollte folglich auch die Stimulation von HSMrgE mit seinem (noch unbekanntem) Liganden zu einer Interaktion der Komplexe Mas/MrgE bzw. MrgD/MrgE führen, was dann eine Reduktion des konstitutiven Signals der beiden konstitutiv aktiven Rezeptoren zur Folge hat. Diesem Modellansatz folgend, könnte man auch postulieren, dass der HSMrgE-Rezeptor eine indirekte anti-inflammatorische Wirkung vermittelt, da die beiden von ihm negativ beeinflussten Rezeptoren über die Aktivierung von NFκB proinflammatorisch wirken (Abb.4.24).

Die Idee, dass „orphan“ Rezeptoren durch eine Dimerisation mit „non-orphan“-Rezeptoren eine Liganden-unabhängige Funktion ausüben, ermöglicht eine völlig neue Sicht auf die Rezeptorregulation und –funktion (Levoye *et al.*, 2006). Das Ergebnis dieser Arbeit unterstützt damit ein neues Konzept, welches impliziert, dass möglicherweise „orphan“ Rezeptoren, in diesem Fall HSMrgE, Liganden-unabhängige Eigenschaften besitzen können und so auf eine neue mechanistische Art Rezeptorfunktionen anderer assoziierter Rezeptoren beeinflussen können.

6. Zusammenfassung

Das *Mas*-Protoonkogen wurde aufgrund seiner Tumor-induzierenden Wirkung nach Transfektion von NIH3T3-Fibroblasten mit chromosomaler DNA aus humanen Epidermal-Karzinom-Zellen entdeckt. Es kodiert für ein Protein mit 7 transmembranären Domänen und gehört in die Klasse der G-Protein gekoppelten Rezeptoren (GPCR), ist mit der Aktivierung von Signalwegen durch den Angiotensin (Ang)II-Metaboliten Ang-(1-7) assoziiert.

In der vorliegenden Doktorarbeit wurde eine konstitutive Aktivierung der Transkriptionsfaktoren „Serum Response Factor“ (SRF) und dem Nukleärer Faktor κ B (NF κ B) durch den humanen *Mas*-Rezeptor gezeigt. Da die konstitutive Aktivität nicht nur für den humanen, sondern auch für den Ratten-*Mas*-Rezeptor gezeigt werden konnte, scheint diese eine ubiquitäre Bedeutung in allen Säugetierspezies zu haben. So impliziert die hier erstmals beschriebene konstitutive Aktivierung von NF κ B, einem der wichtigsten Regulatoren proinflammatorische Gene, eine starke proinflammatorische Komponente von *Mas*, die ganz aktuell in *in-vivo*-Experimenten bestätigt werden konnte. Damit kann die Identifizierung der *Mas*/NF κ B-Achse wesentlich zum Verständnis und zu der Behandlung Entzündungs-assoziiierter Erkrankungen beitragen.

Des Weiteren konnte im Vorfeld dieser Arbeit gezeigt werden, dass der *Mas*-Rezeptor zu einer konstitutiven Aktivierung von G $_{\alpha q}$ und in Folge zu einer Stimulation von Zellteilungsprozessen, wie den mitogenen Eigenschaften in NIH3T3-Zellen, beiträgt. Die hier identifizierte konstitutive Aktivierung von SRF vervollständigt damit die Signalkaskade, die zu den mitogenen Eigenschaften von *Mas* führt. Diese sind nicht Liganden-induziert, da die Stimulation von *Mas* mit Ang-(1-7) in dieser Arbeit zu keiner unabhängigen Aktivierung von SRF führt. Die mitogenen Eigenschaften von *Mas* können in der Pathogenese von Tumoren und anderen proliferativen Prozessen, wie die traumatische und operative Wundheilung, eine wichtige Rolle spielen. Die Regulation und Modulation solcher proliferativer Prozesse ist bislang weitestgehend unbekannt und keiner Therapie zugänglich. Demzufolge können die hier gezeigten Ergebnisse erste Hinweise für mögliche pharmakologische Therapieansätze liefern.

Mas ist Teil einer Rezeptor-Familie sequenzähnlicher Rezeptoren (*Mrg*-Familie). Im Rahmen dieser Arbeit wurde erstmalig eine signifikante konstitutive Aktivierung von SRF durch zwei humane Rezeptoren der *Mrg*-Familie, *MrgD* und *MrgX4*, nachgewiesen. Eine phylogenetische Analyse von *Mas*, *MrgD* und *MrgX4* zeigt eine Disulfidbrücke zwischen der dritten transmembranen Helix (TMH) und sechsten TMH für *Mas* und *MrgD*. Diese Brücke kann von essentieller Wichtigkeit für weitere Erforschung von GPCR-Interaktionen und der davon abhängigen Aktivierung von Signalmustern sein.

Die konstitutive Aktivität für MrgD in allen drei untersuchten Zelllinien zeigt, dass sie unter physiologischen und/oder pathophysiologischen Bedingungen von signifikanter Bedeutung sein muss. Des Weiteren übersteigt die maximale SRF-Aktivierung durch MrgD die von AngII über den AT₁-Rezeptor medierte um 25%. Dass die konstitutive Aktivität von MrgD die in einer Vielzahl von physiologischen und Krankheitszuständen essenzielle AngII/AT₁-Signalstärke übersteigt, lässt eine entscheidende Funktion von MrgD in biologischen Prozessen von Zellen/Geweben, die MrgD exprimieren, vermuten. So wird MrgD vorwiegend in den dorsalen Gliawurzeln von sensiblen Neuronen exprimiert und dementsprechend eine Bedeutung in der Noziception besitzen. Folglich kann die gezeigte konstitutive Aktivität von MrgD von klinischer Bedeutung für die Entwicklung neuer Medikamente in der Schmerztherapie sein. Die für MrgD bzw. MrgX4 gezeigte NFκB-Aktivierung lässt auch für diese Rezeptoren eine proinflammatorische Rolle vermuten, die vor allem bei Entzündungsreaktionen von Bedeutung sein kann.

Da in dieser Arbeit die direkte Stimulation von Mas und den untersuchten Mrg-Rezeptoren mit verschiedenen Ang-Peptiden keinen additiven bzw. inhibitorischen Effekt auf die konstitutive Aktivität bzw. Liganden-medierte Aktivierung in den nicht-konstitutiv aktiven Rezeptoren hat, scheint Mas und die verwendeten Mrg-Rezeptoren nicht alleine bzw. nicht direkt für die Signalübertragung von Ang-(1-7) und anderer Ang-Metabolite verantwortlich zu sein. Damit scheint die Assoziierung von Mas mit den durch Ang-(1-7) stimulierten Signalwegen von weiteren Faktoren abhängig zu sein, wie Zellart, Tierspezies, Art des Gefäßbetts oder Koexpression mit anderen Rezeptoren.

Die Koexpression von Mas bzw. MrgD mit MrgE reduziert signifikant die durch die konstitutiv aktiven Rezeptoren stimulierte SRF-Aktivierung. Damit liegt die Vermutung nahe, dass MrgE Liganden-unabhängig die Funktion anderer Rezeptoren durch eine Heterodimerisation beeinflussen kann. Diesem Modellansatz folgend, kann man postulieren, dass der MrgE-Rezeptor eine indirekte anti-inflammatorische Wirkung vermittelt, da die beiden von ihm negativ beeinflussten Rezeptoren über die Aktivierung von NFκB proinflammatorisch wirken. Dies ermöglicht eine völlig neue Sicht auf die Regulation von Rezeptorsignalen und die Funktion von Liganden-unabhängigen Rezeptorenassoziationen.

Die Ergebnisse dieser Doktorarbeit tragen essentiell zur Erklärung der mitogenen Eigenschaften und der inflammatorischen Wirkung von Mas bei, sie identifizieren zwei weitere konstitutiv aktive Rezeptoren innerhalb der Mrg-Familie und zeigt völlig neue funktionelle Rezeptorinteraktionen auf. Damit kann die Arbeit Grundlagen für das Verständnis von Ursachen und Pathophysiologie einer Vielzahl von Erkrankungen unterschiedlicher Ätiologie sein und völlig neue Therapieansätze aufzeigen.

7. Literaturverzeichnis

AbdAlla, S., Lothar, H., Abdel-tawab, A. M., et al. (2001). "The angiotensin II AT2 receptor is an AT1 receptor antagonist." J Biol Chem **276**(43): 39721-6.

Albiston, A. L., McDowall, S. G., Matsacos, D., et al. (2001). "Evidence that the angiotensin IV (AT(4)) receptor is the enzyme insulin-regulated aminopeptidase." J Biol Chem **276**(52): 48623-6.

Alenina, N., Bader, M. and Walther, T. (2002). "Imprinting of the murine MAS protooncogene is restricted to its antisense RNA." Biochem Biophys Res Commun **290**(3): 1072-8.

Alexandropoulos, K., Qureshi, S. A., Rim, M., et al. (1992). "v-Fps-responsiveness in the Egr-1 promoter is mediated by serum response elements." Nucleic Acids Res **20**(9): 2355-9.

Altman, J. and Bayer, S. A. (1990a). "Migration and distribution of two populations of hippocampal granule cell precursors during the perinatal and postnatal periods." J Comp Neurol **301**(3): 365-81.

Altman, J. and Bayer, S. A. (1990b). "Prolonged sojourn of developing pyramidal cells in the intermediate zone of the hippocampus and their settling in the stratum pyramidale." J Comp Neurol **301**(3): 343-64.

Ambroz, C., Clark, A. J. and Catt, K. J. (1991). "The mas oncogene enhances angiotensin-induced $[Ca^{2+}]_i$ responses in cells with pre-existing angiotensin II receptors." Biochim Biophys Acta **1133**(1): 107-11.

Andrawis, N. S., Brock, T. A., Dzau, V. J., et al. (1991). "Mas oncogene receptor coupling and peptide specificity in Balb 3T3 and vascular smooth muscle cells." Am J Med Sci **302**(6): 329-34.

Ardailou, R. (1997). "Active fragments of angiotensin II: enzymatic pathways of synthesis and biological effects." Curr Opin Nephrol Hypertens **6**(1): 28-34.

Ardailou, R. (1999). "Angiotensin II receptors." J Am Soc Nephrol **10 Suppl 11**: S30-9.

Baldwin, A. S., Jr. (1996). "The NF-kappa B and I kappa B proteins: new discoveries and insights." Annu Rev Immunol **14**: 649-83.

Ballesteros, J. A., Jensen, A. D., Liapakis, G., et al. (2001). "Activation of the beta 2-adrenergic receptor involves disruption of an ionic lock between the cytoplasmic ends of transmembrane segments 3 and 6." J Biol Chem **276**(31): 29171-7.

Batenburg, W. W., van Esch, J. H., Garrelds, I. M., et al. (2006). "Carvedilol-induced antagonism of angiotensin II: a matter of alpha1-adrenoceptor blockade." J Hypertens **24**(7): 1355-63.

Bender, E., Buist, A., Jurzak, M., et al. (2002). "Characterization of an orphan G protein-coupled receptor localized in the dorsal root ganglia reveals adenine as a signaling molecule." Proc Natl Acad Sci U S A **99**(13): 8573-8.

- Berridge, M. J.** (1993). "Inositol trisphosphate and calcium signalling." Nature **361**(6410): 315-25.
- Bhattacharya, M., Babwah, A. V. and Ferguson, S. S.** (2004). "Small GTP-binding protein-coupled receptors." Biochem Soc Trans **32**(Pt 6): 1040-4.
- Bouvier, M.** (2001). "Oligomerization of G-protein-coupled transmitter receptors." Nat Rev Neurosci **2**(4): 274-86.
- Breitwieser, G. E.** (2004). "G protein-coupled receptor oligomerization: implications for G protein activation and cell signaling." Circ Res **94**(1): 17-27.
- Brosnihan, K. B., Li, P. and Ferrario, C. M.** (1996). "Angiotensin-(1-7) dilates canine coronary arteries through kinins and nitric oxide." Hypertension **27**(3 Pt 2): 523-8.
- Bunnemann, B., Fuxe, K., Metzger, R., et al.** (1990). "Autoradiographic localization of mas proto-oncogene mRNA in adult rat brain using in situ hybridization." Neurosci Lett **114**(2): 147-53.
- Burnier, M. and Brunner, H. R.** (2000). "Angiotensin II receptor antagonists." Lancet **355**(9204): 637-45.
- Burstein, E. S., Ott, T. R., Feddock, M., et al.** (2006). "Characterization of the Mas-related gene family: structural and functional conservation of human and rhesus MrgX receptors." Br J Pharmacol **147**(1): 73-82.
- Calver, A. R., Robbins, M. J., Cosio, C., et al.** (2001). "The C-terminal domains of the GABA(b) receptor subunits mediate intracellular trafficking but are not required for receptor signaling." J Neurosci **21**(4): 1203-10.
- Campagnole-Santos, M. J., Diz, D. I., Santos, R. A., et al.** (1989). "Cardiovascular effects of angiotensin-(1-7) injected into the dorsal medulla of rats." Am J Physiol **257**(1 Pt 2): H324-9.
- Campagnole-Santos, M. J., Diz, D. I. and Ferrario, C. M.** (1990). "Actions of angiotensin peptides after partial denervation of the solitary tract nucleus." Hypertension **15**(2 Suppl): 134-9.
- Canals, M., Jenkins, L., Kellett, E., et al.** (2006). "Up-regulation of the angiotensin II type 1 receptor by the MAS proto-oncogene is due to constitutive activation of Gq/G11 by MAS." J Biol Chem **281**(24): 16757-67.
- Carey, R. M. and Siragy, H. M.** (2003). "Newly recognized components of the renin-angiotensin system: potential roles in cardiovascular and renal regulation." Endocr Rev **24**(3): 261-71.
- Cassoni, P., Muccioli, G., Marrocco, T., et al.** (2002). "Cortistatin-14 inhibits cell proliferation of human thyroid carcinoma cell lines of both follicular and parafollicular origin." J Endocrinol Invest **25**(4): 362-8.
- Cebra-Thomas, J. A., Tsai, J. Y., Pilder, S. H., et al.** (1992). "Localization of the Mas proto-oncogene to a densely marked region of mouse chromosome 17 associated with genomic imprinting." Genomics **13**(2): 444-6.

- Chai, J. and Tarnawski, A. S.** (2002). "Serum response factor: discovery, biochemistry, biological roles and implications for tissue injury healing." J Physiol Pharmacol **53**(2): 147-57.
- Chappell, M. C., Tallant, E. A., Brosnihan, K. B., et al.** (1990). "Processing of angiotensin peptides by NG108-15 neuroblastoma x glioma hybrid cell line." Peptides **11**(2): 375-80.
- Chappell, M. C., Pirro, N. T., Sykes, A., et al.** (1998). "Metabolism of angiotensin-(1-7) by angiotensin-converting enzyme." Hypertension **31**(1 Pt 2): 362-7.
- Chen, H. and Ikeda, S. R.** (2004). "Modulation of ion channels and synaptic transmission by a human sensory neuron-specific G-protein-coupled receptor, SNSR4/mrgX1, heterologously expressed in cultured rat neurons." J Neurosci **24**(21): 5044-53.
- Cheng, D. Y., DeWitt, B. J., Dent, E. L., et al.** (1994). "Analysis of responses to angiotensin IV in the pulmonary vascular bed of the cat." Eur J Pharmacol **261**(1-2): 223-7.
- Choi, S. S. and Lahn, B. T.** (2003). "Adaptive evolution of MRG, a neuron-specific gene family implicated in nociception." Genome Res **13**(10): 2252-9.
- Civelli, O.** (2005). "GPCR deorphanizations: the novel, the known and the unexpected transmitters." Trends Pharmacol Sci **26**(1): 15-9.
- Cogan, M. G.** (1990). "Angiotensin II: a powerful controller of sodium transport in the early proximal tubule." Hypertension **15**(5): 451-8.
- Collister, J. P. and Hendel, M. D.** (2003). "The role of Ang (1-7) in mediating the chronic hypotensive effects of losartan in normal rats." J Renin Angiotensin Aldosterone Syst **4**(3): 176-9.
- Davis, T. N.** (1992). "What's new with calcium?" Cell **71**(4): 557-64.
- de Gasparo, M., Catt, K. J., Inagami, T., et al.** (2000). "International union of pharmacology. XXIII. The angiotensin II receptors." Pharmacol Rev **52**(3): 415-72.
- de Lecea, L. and Sutcliffe, J. G.** (1996). "Peptides, sleep and cortistatin." Mol Psychiatry **1**(5): 349-51.
- De Vivo, M. and Iyengar, R.** (1994). "Activated Gq-alpha potentiates platelet-derived growth factor-stimulated mitogenesis in confluent cell cultures." J Biol Chem **269**(31): 19671-4.
- Dong, X., Han, S., Zylka, M. J., et al.** (2001). "A diverse family of GPCRs expressed in specific subsets of nociceptive sensory neurons." Cell **106**(5): 619-32.
- Donoghue, M., Hsieh, F., Baronas, E., et al.** (2000). "A novel angiotensin-converting enzyme-related carboxypeptidase (ACE2) converts angiotensin I to angiotensin 1-9." Circ Res **87**(5): E1-9.
- Dostal, D. E., Rothblum, K. N., Conrad, K. M., et al.** (1992). "Detection of angiotensin I and II in cultured rat cardiac myocytes and fibroblasts." Am J Physiol **263**(4 Pt 1): C851-63.
- Dzau, V. J., Ingelfinger, J., Pratt, R. E., et al.** (1986). "Identification of renin and angiotensinogen messenger RNA sequences in mouse and rat brains." Hypertension **8**(6): 544-8.

- Ferrario, C. M., Chappell, M. C., Tallant, E. A., et al.** (1997). "Counterregulatory actions of angiotensin-(1-7)." Hypertension **30**(3 Pt 2): 535-41.
- Ferrario, C. M.** (2002). "Angiotensin I, angiotensin II and their biologically active peptides." J Hypertens **20**(5): 805-7.
- Ferrario, C. M., Averill, D. B., Brosnihan, K. B., et al.** (2002). "Vasopeptidase inhibition and Ang-(1-7) in the spontaneously hypertensive rat." Kidney Int **62**(4): 1349-57.
- Fredriksson, R., Lagerstrom, M. C., Lundin, L. G., et al.** (2003). "The G-protein-coupled receptors in the human genome form five main families. Phylogenetic analysis, paralogon groups, and fingerprints." Mol Pharmacol **63**(6): 1256-72.
- Gembardt, F., Grajewski, S., Vahl, M., et al.** (2008). Angiotensin metabolites can stimulate receptors of the Mas-related genes family, Molecular and Cellular Biochemistry, revised submitted.
- Gembardt, F., Wieland, T., Zhang, J., et al.** (2005). The G protein-coupled receptor Mas encoded by the *Mas* proto-oncogene shows mitogenic properties through a constitutive activation of Rho. Archives of Pharmacol **371**(79): R19.
- Gentles, A. J. and Karlin, S.** (1999). "Why are human G-protein-coupled receptors predominantly intronless?" Trends Genet **15**(2): 47-9.
- Ghosh, S., May, M. J. and Kopp, E. B.** (1998). "NF-kappa B and Rel proteins: evolutionarily conserved mediators of immune responses." Annu Rev Immunol **16**: 225-60.
- Gironacci, M. M., Yujnovsky, I., Gorzalczany, S., et al.** (2004). "Angiotensin-(1-7) inhibits the angiotensin II-enhanced norepinephrine release in coarcted hypertensive rats." Regul Pept **118**(1-2): 45-9.
- Godeny, M. D. and Sayeski, P. P.** (2006). "ERK1/2 regulates ANG II-dependent cell proliferation via cytoplasmic activation of RSK2 and nuclear activation of elk1." Am J Physiol Cell Physiol **291**(6): C1308-17.
- Griendling, K. K., Murphy, T. J. and Alexander, R. W.** (1993). "Molecular biology of the renin-angiotensin system." Circulation **87**(6): 1816-28.
- Groblewski, T., Maigret, B., Larguier, R., et al.** (1997). "Mutation of Asn111 in the third transmembrane domain of the AT1A angiotensin II receptor induces its constitutive activation." J Biol Chem **272**(3): 1822-6.
- Hall, K. L., Hanesworth, J. M., Ball, A. E., et al.** (1993). "Identification and characterization of a novel angiotensin binding site in cultured vascular smooth muscle cells that is specific for the hexapeptide (3-8) fragment of angiotensin II, angiotensin IV." Regul Pept **44**(2): 225-32.
- Hall, K. L., Venkateswaran, S., Hanesworth, J. M., et al.** (1995). "Characterization of a functional angiotensin IV receptor on coronary microvascular endothelial cells." Regul Pept **58**(3): 107-15.
- Hamm, H. E.** (1998). "The many faces of G protein signaling." J Biol Chem **273**(2): 669-72.

- Han, S. K., Dong, X., Hwang, J. I., et al.** (2002). "Orphan G protein-coupled receptors MrgA1 and MrgC11 are distinctively activated by RF-amide-related peptides through the Galpha q/11 pathway." Proc Natl Acad Sci U S A **99**(23): 14740-5.
- Hanley, R. M. and Steiner, A. L.** (1989). "The second-messenger system for peptide hormones." Hosp Pract (Off Ed) **24**(8): 59-70.
- Harding, J. W., Yoshida, M. S., Dilts, R. P., et al.** (1986). "Cerebroventricular and intravascular metabolism of [¹²⁵I]angiotensins in rat." J Neurochem **46**(4): 1292-7.
- Harding, J. W., Wright, J. W., Swanson, G. N., et al.** (1994). "AT4 receptors: specificity and distribution." Kidney Int **46**(6): 1510-2.
- Hellmann, W., Suzuki, F., Ohkubo, H., et al.** (1988). "Angiotensinogen gene expression in extrahepatic rat tissues: application of a solution hybridization assay." Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol **338**(3): 327-31.
- Hilchey, S. D. and Bell-Quilley, C. P.** (1995). "Association between the natriuretic action of angiotensin-(1-7) and selective stimulation of renal prostaglandin I₂ release." Hypertension **25**(6): 1238-44.
- Hill, C. S., Wynne, J. and Treisman, R.** (1995). "The Rho family GTPases RhoA, Rac1, and CDC42Hs regulate transcriptional activation by SRF." Cell **81**(7): 1159-70.
- Huet, A., Parlakian, A., Arnaud, M. C., et al.** (2005). "Mechanism of binding of serum response factor to serum response element." Febs J **272**(12): 3105-19.
- Ichiki, T. and Inagami, T.** (1995). "Expression, genomic organization, and transcription of the mouse angiotensin II type 2 receptor gene." Circ Res **76**(5): 693-700.
- Ishimitsu, T., Kojima, M., Kangawa, K., et al.** (1994). "Genomic structure of human adrenomedullin gene." Biochem Biophys Res Commun **203**(1): 631-9.
- Iyer, S. N., Chappell, M. C., Averill, D. B., et al.** (1998). "Vasodepressor actions of angiotensin-(1-7) unmasked during combined treatment with lisinopril and losartan." Hypertension **31**(2): 699-705.
- Jackson, T. R., Blair, L. A., Marshall, J., et al.** (1988). "The mas oncogene encodes an angiotensin receptor." Nature **335**(6189): 437-40.
- Jackson, T. R. and Hanley, M. R.** (1989). "Tumor promoter 12-O-tetradecanoylphorbol 13-acetate inhibits mas/angiotensin receptor-stimulated inositol phosphate production and intracellular Ca²⁺ elevation in the 401L-C3 neuronal cell line." FEBS Lett **251**(1-2): 27-30.
- Jamal, S. and Ziff, E.** (1990). "Transactivation of c-fos and beta-actin genes by raf as a step in early response to transmembrane signals." Nature **344**(6265): 463-6.
- Janssen, J. W., Steenvoorden, A. C., Schmidtberger, M., et al.** (1988). "Activation of the mas oncogene during transfection of monoblastic cell line DNA." Leukemia **2**(5): 318-20.
- Ji, T. H., Grossmann, M. and Ji, I.** (1998). "G protein-coupled receptors. I. Diversity of receptor-ligand interactions." J Biol Chem **273**(28): 17299-302.

- Johansen, F. E. and Prywes, R.** (1995). "Serum response factor: transcriptional regulation of genes induced by growth factors and differentiation." Biochim Biophys Acta **1242**(1): 1-10.
- Jucker, M., Schaadt, M., Diehl, V., et al.** (1990). "Heterogeneous expression of proto-oncogenes in Hodgkin's disease derived cell lines." Hematol Oncol **8**(4): 191-204.
- Kaisho, Y., Watanabe, T., Nakata, M., et al.** (2005). "Transgenic rats overexpressing the human MrgX3 gene show cataracts and an abnormal skin phenotype." Biochem Biophys Res Commun **330**(3): 653-7.
- Kamohara, M., Matsuo, A., Takasaki, J., et al.** (2005). "Identification of MrgX2 as a human G-protein-coupled receptor for proadrenomedullin N-terminal peptides." Biochem Biophys Res Commun **330**(4): 1146-52.
- Karnik, S. S., Gogonea, C., Patil, S., et al.** (2003). "Activation of G-protein-coupled receptors: a common molecular mechanism." Trends Endocrinol Metab **14**(9): 431-7.
- Kim, S. and Iwao, H.** (2000). "Molecular and cellular mechanisms of angiotensin II-mediated cardiovascular and renal diseases." Pharmacol Rev **52**(1): 11-34.
- Kitamura, K., Sakata, J., Kangawa, K., et al.** (1993). "Cloning and characterization of cDNA encoding a precursor for human adrenomedullin." Biochem Biophys Res Commun **194**(2): 720-5.
- Kitamura, K., Kangawa, K., Ishiyama, Y., et al.** (1994). "Identification and hypotensive activity of proadrenomedullin N-terminal 20 peptide (PAMP)." FEBS Lett **351**(1): 35-7.
- Kitaoka, T., Sharif, M., Hanley, M. R., et al.** (1994). "Expression of the MAS proto-oncogene in the retinal pigment epithelium of the rhesus macaque." Curr Eye Res **13**(5): 345-51.
- Kobori, H., Nangaku, M., Navar, L. G., et al.** (2007). "The intrarenal renin-angiotensin system: from physiology to the pathobiology of hypertension and kidney disease." Pharmacol Rev **59**(3): 251-87.
- Kohara, K., Brosnihan, K. B., Chappell, M. C., et al.** (1991). "Angiotensin-(1-7). A member of circulating angiotensin peptides." Hypertension **17**(2): 131-8.
- Kostenis, E., Milligan, G., Christopoulos, A., et al.** (2005). "G-protein-coupled receptor Mas is a physiological antagonist of the angiotensin II type 1 receptor." Circulation **111**(14): 1806-13.
- Kramar, E. A., Harding, J. W. and Wright, J. W.** (1997). "Angiotensin II- and IV-induced changes in cerebral blood flow. Roles of AT1, AT2, and AT4 receptor subtypes." Regul Pept **68**(2): 131-8.
- Latchman, D. S.** (1997). "Transcription factors: an overview." Int J Biochem Cell Biol **29**(12): 1305-12.
- Lembo, P. M., Grazzini, E., Groblewski, T., et al.** (2002). "Proenkephalin A gene products activate a new family of sensory neuron--specific GPCRs." Nat Neurosci **5**(3): 201-9.

- Lemos, V. S., Silva, D. M., Walther, T., et al.** (2005). "The endothelium-dependent vasodilator effect of the nonpeptide Ang(1-7) mimic AVE 0991 is abolished in the aorta of mas-knockout mice." J Cardiovasc Pharmacol **46**(3): 274-9.
- Levoye, A., Dam, J., Ayoub, M. A., et al.** (2006). "Do orphan G-protein-coupled receptors have ligand-independent functions? New insights from receptor heterodimers." EMBO Rep **7**(11): 1094-8.
- Lin, K., Chan, S. H. and Chan, J. Y.** (2001). "Tonic suppression of spontaneous baroreceptor reflex by endogenous angiotensins via AT(2) subtype receptors at nucleus reticularis ventrolateralis in the rat." Synapse **40**(1): 85-94.
- Lindpaintner, K. and Ganten, D.** (1991a). "Tissue renin-angiotensin systems and their modulation: the heart as a paradigm for new aspects of converting enzyme inhibition." Cardiology **79 Suppl 1**: 32-44.
- Lindpaintner, K. and Ganten, D.** (1991b). "The cardiac renin-angiotensin system: a synopsis of current experimental and clinical data." Acta Cardiol **46**(3): 385-97.
- Lynch, K. R., Hawelu-Johnson, C. L. and Guyenet, P. G.** (1987). "Localization of brain angiotensinogen mRNA by hybridization histochemistry." Brain Res **388**(2): 149-58.
- Machado, R. D., Santos, R. A. and Andrade, S. P.** (2000). "Opposing actions of angiotensins on angiogenesis." Life Sci **66**(1): 67-76.
- Martin, K. A., Grant, S. G. and Hockfield, S.** (1992). "The mas proto-oncogene is developmentally regulated in the rat central nervous system." Brain Res Dev Brain Res **68**(1): 75-82.
- Martin, K. A. and Hockfield, S.** (1993). "Expression of the mas proto-oncogene in the rat hippocampal formation is regulated by neuronal activity." Brain Res Mol Brain Res **19**(4): 303-9.
- May, M. J. and Ghosh, S.** (1998). "Signal transduction through NF-kappa B." Immunol Today **19**(2): 80-8.
- McGillis, J. P., Sudduth-Klinger, J., Harrowe, G., et al.** (1989). "Transient expression of the angiotensin II receptor: a rapid and functional analysis of a calcium-mobilizing seven-transmembrane domain receptor in COS-7 cells." Biochem Biophys Res Commun **165**(3): 935-41.
- Metzger, R., Bader, M., Ludwig, T., et al.** (1995). "Expression of the mouse and rat mas proto-oncogene in the brain and peripheral tissues." FEBS Lett **357**(1): 27-32.
- Milasta, S., Pediani, J., Appelbe, S., et al.** (2006). "Interactions between the Mas-related receptors MrgD and MrgE alter signalling and trafficking of MrgD." Mol Pharmacol **69**(2): 479-91.
- Miller-Wing, A. V., Hanesworth, J. M., Sardinia, M. F., et al.** (1993). "Central angiotensin IV binding sites: distribution and specificity in guinea pig brain." J Pharmacol Exp Ther **266**(3): 1718-26.

- Milligan, G., Ramsay, D., Pascal, G., et al.** (2003). "GPCR dimerisation." Life Sci **74**(2-3): 181-8.
- Milligan, G.** (2004). "G protein-coupled receptor dimerization: function and ligand pharmacology." Mol Pharmacol **66**(1): 1-7.
- Milligan, G., Lopez-Gimenez, J., Wilson, S., et al.** (2004). "Selectivity in the oligomerisation of G protein-coupled receptors." Semin Cell Dev Biol **15**(3): 263-8.
- Milligan, G.** (2006). "G-protein-coupled receptor heterodimers: pharmacology, function and relevance to drug discovery." Drug Discov Today **11**(11-12): 541-9.
- Monnot, C., Weber, V., Stinnakre, J., et al.** (1991). "Cloning and functional characterization of a novel mas-related gene, modulating intracellular angiotensin II actions." Mol Endocrinol **5**(10): 1477-87.
- Mukoyama, M., Nakajima, M., Horiuchi, M., et al.** (1993). "Expression cloning of type 2 angiotensin II receptor reveals a unique class of seven-transmembrane receptors." J Biol Chem **268**(33): 24539-42.
- Murphy, T. J., Alexander, R. W., Griendling, K. K., et al.** (1991). "Isolation of a cDNA encoding the vascular type-1 angiotensin II receptor." Nature **351**(6323): 233-6.
- Muthalif, M. M., Benter, I. F., Uddin, M. R., et al.** (1998). "Signal transduction mechanisms involved in angiotensin-(1-7)-stimulated arachidonic acid release and prostanoid synthesis in rabbit aortic smooth muscle cells." J Pharmacol Exp Ther **284**(1): 388-98.
- Nossaman, B. D., Feng, C. J., Kaye, A. D., et al.** (1995). "Analysis of responses to ANG IV: effects of PD-123319 and DuP-753 in the pulmonary circulation of the rat." Am J Physiol **268**(2 Pt 1): L302-8.
- Nussberger, J., Brunner, D. B., Nyfeler, J. A., et al.** (2001). "Measurement of immunoreactive angiotensin-(1-7) heptapeptide in human blood." Clin Chem **47**(4): 726-9.
- Overton, M. C. and Blumer, K. J.** (2002). "The extracellular N-terminal domain and transmembrane domains 1 and 2 mediate oligomerization of a yeast G protein-coupled receptor." J Biol Chem **277**(44): 41463-72.
- Ozono, R., Wang, Z. Q., Moore, A. F., et al.** (1997). "Expression of the subtype 2 angiotensin (AT2) receptor protein in rat kidney." Hypertension **30**(5): 1238-46.
- Peiro, C., Redondo, J., Rodriguez-Martinez, M. A., et al.** (1995). "Influence of endothelium on cultured vascular smooth muscle cell proliferation." Hypertension **25**(4 Pt 2): 748-51.
- Peiro, C., Vallejo, S., Gembardt, F., et al.** (2007). "Endothelial dysfunction through genetic deletion or inhibition of the G protein-coupled receptor Mas: a new target to improve endothelial function." J Hypertens **25**(12): 2421-2425.
- Poyner, D. R., Hawkins, P. T., Benton, H. P., et al.** (1990). "Changes in inositol lipids and phosphates after stimulation of the MAS-transfected NG115-401L-C3 cell line by mitogenic and non-mitogenic stimuli." Biochem J **271**(3): 605-11.

- Probst, W. C., Snyder, L. A., Schuster, D. I., et al.** (1992). "Sequence alignment of the G-protein coupled receptor superfamily." DNA Cell Biol **11**(1): 1-20.
- Qureshi, S. A., Cao, X. M., Sukhatme, V. P., et al.** (1991). "v-Src activates mitogen-responsive transcription factor Egr-1 via serum response elements." J Biol Chem **266**(17): 10802-6.
- Rabin, B. M., Hunt, W. A. and Lee, J.** (1987). "Taste aversion learning produced by combined treatment with subthreshold radiation and lithium chloride." Pharmacol Biochem Behav **27**(4): 671-5.
- Robas, N., Mead, E. and Fidock, M.** (2003). "MrgX2 is a high potency cortistatin receptor expressed in dorsal root ganglion." J Biol Chem **278**(45): 44400-4.
- Roberts, K. A., Krebs, L. T., Kramar, E. A., et al.** (1995). "Autoradiographic identification of brain angiotensin IV binding sites and differential c-Fos expression following intracerebroventricular injection of angiotensin II and IV in rats." Brain Res **682**(1-2): 13-21.
- Rodriguez-Campos, M., Kadarian, C., Rodano, V., et al.** (2000). "AT-1 receptor and phospholipase C are involved in angiotensin III modulation of hypothalamic noradrenergic transmission." Cell Mol Neurobiol **20**(6): 747-62.
- Roeder, R. G.** (1996). "The role of general initiation factors in transcription by RNA polymerase II." Trends Biochem Sci **21**(9): 327-35.
- Ross, P. C., Figler, R. A., Corjay, M. H., et al.** (1990). "RTA, a candidate G protein-coupled receptor: cloning, sequencing, and tissue distribution." Proc Natl Acad Sci U S A **87**(8): 3052-6.
- Saavedra, J. M., Viswanathan, M. and Shigematsu, K.** (1993). "Localization of angiotensin AT1 receptors in the rat heart conduction system." Eur J Pharmacol **235**(2-3): 301-3.
- Sampaio, W. O., Souza dos Santos, R. A., Faria-Silva, R., et al.** (2007). "Angiotensin-(1-7) through receptor Mas mediates endothelial nitric oxide synthase activation via Akt-dependent pathways." Hypertension **49**(1): 185-92.
- Santos, R. A., Brosnihan, K. B., Jacobsen, D. W., et al.** (1992). "Production of angiotensin-(1-7) by human vascular endothelium." Hypertension **19**(2 Suppl): II56-61.
- Santos, R. A., Campagnole-Santos, M. J. and Andrade, S. P.** (2000). "Angiotensin-(1-7): an update." Regul Pept **91**(1-3): 45-62.
- Santos, R. A., Simoes e Silva, A. C., Maric, C., et al.** (2003). "Angiotensin-(1-7) is an endogenous ligand for the G protein-coupled receptor Mas." Proc Natl Acad Sci U S A **100**(14): 8258-63.
- Santos, R. A. and Ferreira, A. J.** (2007). "Angiotensin-(1-7) and the renin-angiotensin system." Curr Opin Nephrol Hypertens **16**(2): 122-8.
- Sasaki, K., Yamano, Y., Bardhan, S., et al.** (1991). "Cloning and expression of a complementary DNA encoding a bovine adrenal angiotensin II type-1 receptor." Nature **351**(6323): 230-3.

- Schoneberg, T., Schulz, A., Biebermann, H., et al.** (2004). "Mutant G-protein-coupled receptors as a cause of human diseases." Pharmacol Ther **104**(3): 173-206.
- Sechi, L. A., Griffin, C. A., Grady, E. F., et al.** (1992). "Characterization of angiotensin II receptor subtypes in rat heart." Circ Res **71**(6): 1482-9.
- Selbie, L. A. and Hill, S. J.** (1998). "G protein-coupled-receptor cross-talk: the fine-tuning of multiple receptor-signalling pathways." Trends Pharmacol Sci **19**(3): 87-93.
- Shinohara, T., Harada, M., Ogi, K., et al.** (2004). "Identification of a G protein-coupled receptor specifically responsive to beta-alanine." J Biol Chem **279**(22): 23559-64.
- Silva, D. M., Vianna, H. R., Cortes, S. F., et al.** (2007). "Evidence for a new angiotensin-(1-7) receptor subtype in the aorta of Sprague-Dawley rats." Peptides **28**(3): 702-7.
- Sun, Z. and Andersson, R.** (2002). "NF-kappaB activation and inhibition: a review." Shock **18**(2): 99-106.
- Suzuki, Y., Ruiz-Ortega, M., Lorenzo, O., et al.** (2003). "Inflammation and angiotensin II." Int J Biochem Cell Biol **35**(6): 881-900.
- Swanson, G. N., Hanesworth, J. M., Sardinia, M. F., et al.** (1992). "Discovery of a distinct binding site for angiotensin II (3-8), a putative angiotensin IV receptor." Regul Pept **40**(3): 409-19.
- Takai, Y., Sasaki, T. and Matozaki, T.** (2001). "Small GTP-binding proteins." Physiol Rev **81**(1): 153-208.
- Tallant, E. A., Ferrario, C. M. and Gallagher, P. E.** (2005). "Angiotensin-(1-7) inhibits growth of cardiac myocytes through activation of the mas receptor." Am J Physiol Heart Circ Physiol **289**(4): H1560-6.
- Tipnis, S. R., Hooper, N. M., Hyde, R., et al.** (2000). "A human homolog of angiotensin-converting enzyme. Cloning and functional expression as a captopril-insensitive carboxypeptidase." J Biol Chem **275**(43): 33238-43.
- Touyz, R. M. and Berry, C.** (2002). "Recent advances in angiotensin II signaling." Braz J Med Biol Res **35**(9): 1001-15.
- Trask, A. J. and Ferrario, C. M.** (2007). "Angiotensin-(1-7): pharmacology and new perspectives in cardiovascular treatments." Cardiovasc Drug Rev **25**(2): 162-74.
- Treisman, R.** (1990). "The SRE: a growth factor responsive transcriptional regulator." Semin Cancer Biol **1**(1): 47-58.
- Tsutsumi, Y., Matsubara, H., Ohkubo, N., et al.** (1998). "Angiotensin II type 2 receptor is upregulated in human heart with interstitial fibrosis, and cardiac fibroblasts are the major cell type for its expression." Circ Res **83**(10): 1035-46.
- van 't Veer, L. J., van der Feltz, M. J., van den Berg-Bakker, C. A., et al.** (1993). "Activation of the mas oncogene involves coupling to human aliphoid sequences." Oncogene **8**(10): 2673-81.

- Von Bohlen und Halbach, O., Walther, T., Bader, M., et al.** (2000). "Interaction between Mas and the angiotensin AT1 receptor in the amygdala." J Neurophysiol **83**(4): 2012-21.
- Walther, T., Balschun, D., Voigt, J. P., et al.** (1998). "Sustained long term potentiation and anxiety in mice lacking the Mas protooncogene." J Biol Chem **273**(19): 11867-73.
- Walther, T., Voigt, J. P., Fink, H., et al.** (2000a). "Sex specific behavioural alterations in Mas-deficient mice." Behav Brain Res **107**(1-2): 105-9.
- Walther, T., Wessel, N., Kang, N., et al.** (2000b). "Altered heart rate and blood pressure variability in mice lacking the Mas protooncogene." Braz J Med Biol Res **33**(1): 1-9.
- Wang, Z. Q., Moore, A. F., Ozono, R., et al.** (1998). "Immunolocalization of subtype 2 angiotensin II (AT2) receptor protein in rat heart." Hypertension **32**(1): 78-83.
- Wayner, M. J., Armstrong, D. L., Phelix, C. F., et al.** (2001). "Angiotensin IV enhances LTP in rat dentate gyrus in vivo." Peptides **22**(9): 1403-14.
- Whiteside, S. T. and Israel, A.** (1997). "I kappa B proteins: structure, function and regulation." Semin Cancer Biol **8**(2): 75-82.
- Wittenberger, T., Schaller, H. C. and Hellebrand, S.** (2001). "An expressed sequence tag (EST) data mining strategy succeeding in the discovery of new G-protein coupled receptors." J Mol Biol **307**(3): 799-813.
- Wright, J. W. and Harding, J. W.** (1992). "Regulatory role of brain angiotensins in the control of physiological and behavioral responses." Brain Res Brain Res Rev **17**(3): 227-62.
- Wright, J. W., Bechtholt, A. J., Chambers, S. L., et al.** (1996). "Angiotensin III and IV activation of the brain AT1 receptor subtype in cardiovascular function." Peptides **17**(8): 1365-71.
- Xu, X., Quiambao, A. B., Roveri, L., et al.** (2000). "Degeneration of cone photoreceptors induced by expression of the Mas1 protooncogene." Exp Neurol **163**(1): 207-19.
- Yamaguchi, T., Naito, Z., Stoner, G. D., et al.** (1990). "Role of the adrenal renin-angiotensin system on adrenocorticotrophic hormone- and potassium-stimulated aldosterone production by rat adrenal glomerulosa cells in monolayer culture." Hypertension **16**(6): 635-41.
- Young, D., Waitches, G., Birchmeier, C., et al.** (1986). "Isolation and characterization of a new cellular oncogene encoding a protein with multiple potential transmembrane domains." Cell **45**(5): 711-9.
- Young, D., O'Neill, K., Jessell, T., et al.** (1988). "Characterization of the rat mas oncogene and its high-level expression in the hippocampus and cerebral cortex of rat brain." Proc Natl Acad Sci U S A **85**(14): 5339-42.
- Zhang, L., Taylor, N., Xie, Y., et al.** (2005). "Cloning and expression of MRG receptors in macaque, mouse, and human." Brain Res Mol Brain Res **133**(2): 187-97.

Zhang, R., Yan, P. K., Zhou, C. H., et al. (2007). "Development of a homogeneous calcium mobilization assay for high throughput screening of mas-related gene receptor agonists." Acta Pharmacol Sin **28**(1): 125-31.

Zhuo, J., Song, K., Harris, P. J., et al. (1992). "In vitro autoradiography reveals predominantly AT1 angiotensin II receptors in rat kidney." Ren Physiol Biochem **15**(5): 231-9.

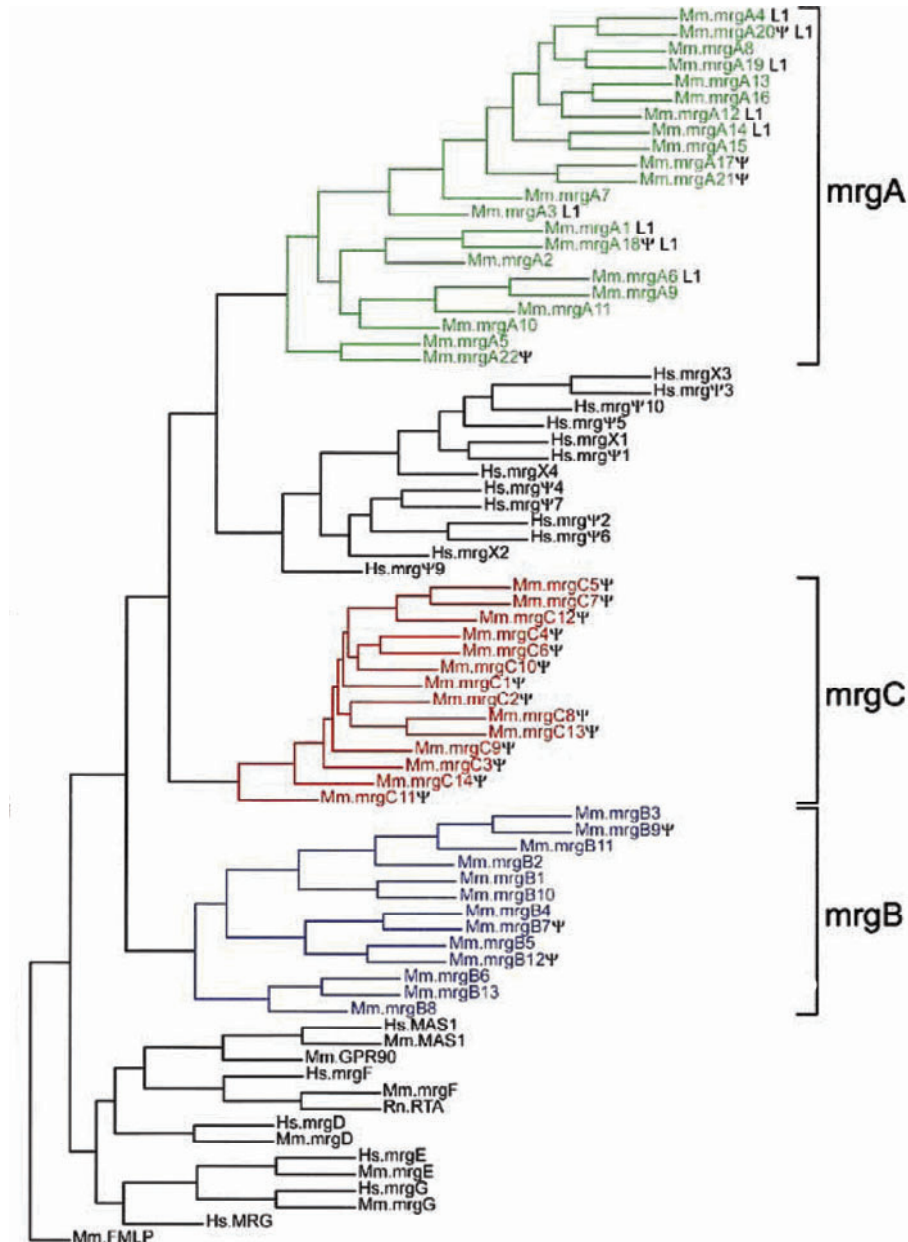
Zhuo, J., Dean, R., MacGregor, D., et al. (1996). "Presence of angiotensin II AT2 receptor binding sites in the adventitia of human kidney vasculature." Clin Exp Pharmacol Physiol Suppl **3**: S147-54.

Zohn, I. E., Symons, M., Chrzanowska-Wodnicka, M., et al. (1998). "Mas oncogene signaling and transformation require the small GTP-binding protein Rac." Mol Cell Biol **18**(3): 1225-35.

Zylka, M. J., Dong, X., Southwell, A. L., et al. (2003). "Atypical expansion in mice of the sensory neuron-specific Mrg G protein-coupled receptor family." Proc Natl Acad Sci U S A **100**(17): 10043-8.

8. Anlage

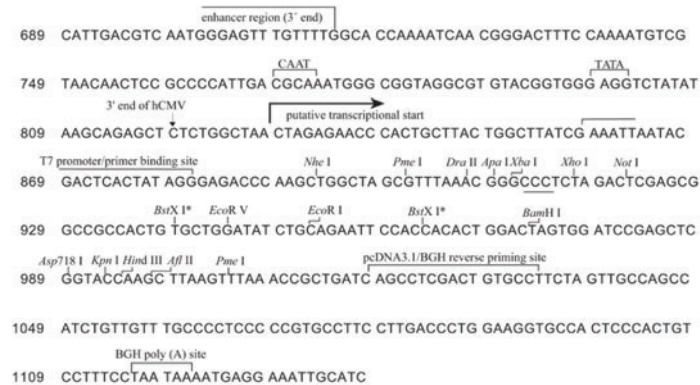
Anlage 1



Anlage 1: Phylogenetische Analyse von murinen (Mm) und humanen (Hs) Mitgliedern der Mrg-Familie. Die murine Mrg-Familie wird aufgrund von Sequenzhomologien in drei bedeutende Unterfamilien geteilt: MrgA, MrgB und MrgC, die in dieser Doktorarbeit allerdings nicht untersucht wurden (Dong et al., 2001).

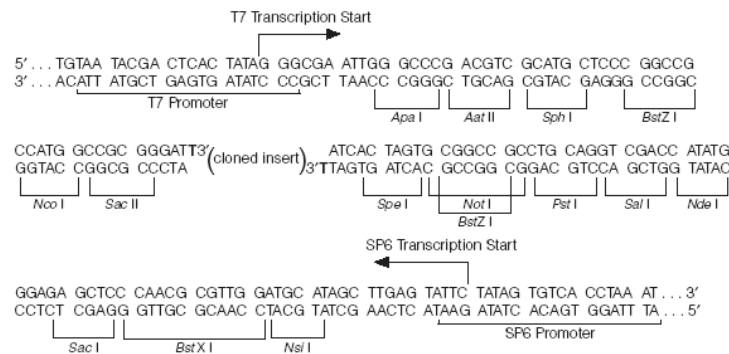
Anlage 2

A pcDNA3.1(-): „Multiple Cloning Site“:



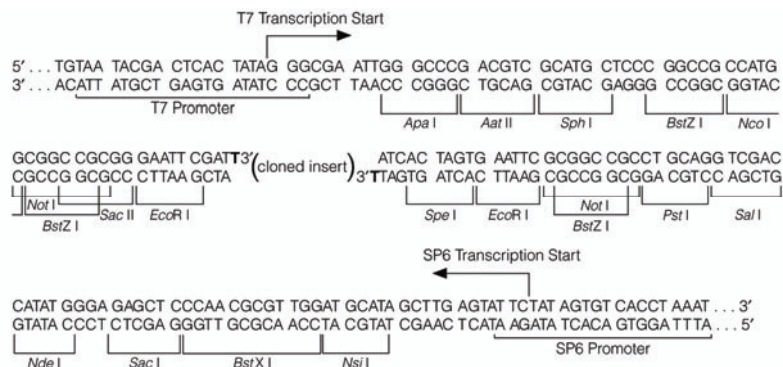
Anlage 2A: Die „Multiple Cloning Site“ von der pcDNA3.1(-) aus dem 2007-Bestellkatalog von Invitrogen (Karlsruhe, Deutschland).

B pGEM® T Vektor: „Multiple Cloning Site“:



Anlage 2B: Die „Multiple Cloning Site“ von dem pGEM® T Vektor aus dem Bestellkatalog von Promega (2007; Mannheim, Deutschland).

C pGEM® T Easy Vektor: „Multiple Cloning Site“:

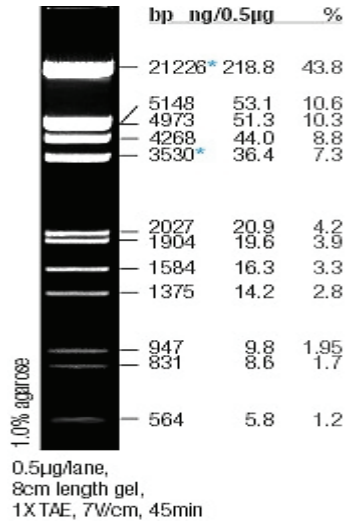


Anlage 2C: Die „Multiple Cloning Site“ von dem pGEM® T Easy Vektor aus dem 2007-Bestellkatalog von Promega (Mannheim, Deutschland).

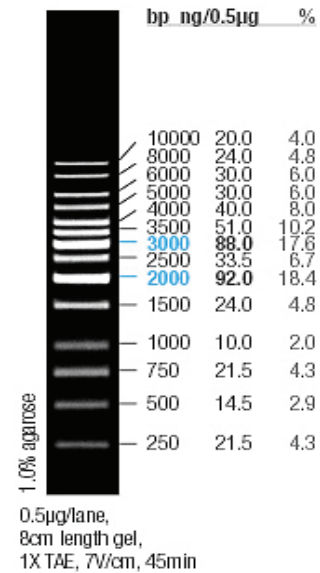
Anlage 3

DNA-Längenmarker:

A Lambda-Marker EcoR I/ Hind III



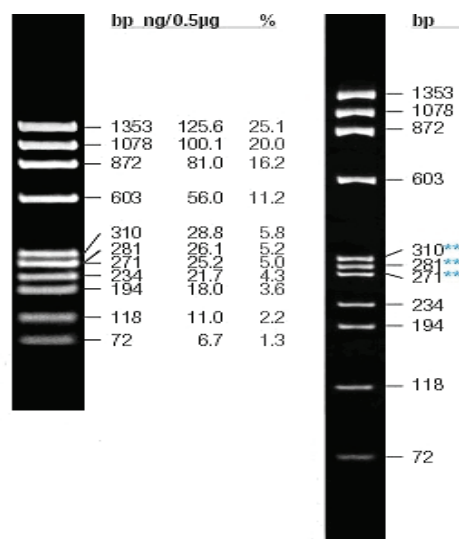
B O`GeneRuler™ 1kb DNA Ladder



Anlage 3A: Die Abbildung ist aus dem 2007-Bestellkatalog der herstellenden Firma Promega (Mannheim/Deutschland) entnommen; λ -Marker.

Anlage 3B: Die Abbildungen ist aus dem 2007-Bestellkatalog der Firma Fermentas (St.Leon-Rot/Deutsch-land) entnommen; O`GeneRuler™ 1kb DNA Ladder.

C PhiX 174 DNA/ BsUR I (Hae III) Marker



Anlage 3C: Die Abbildungen ist aus dem 2007-Bestellkatalog der herstellenden Firma Roche (Basel/Schweiz) entnommen; Φ -Marker.


```

Query CCTGCCATCTACTTTTTCTTAGGCAGCACACCTGGCCAGAGGTTTCAGGAACCCCTCCGG 840
      |
Sbjct CCTGCCATCTACTTTTTCTTAGGCAGCACACCTGGCCAGAGGTTTCAGGAACCCCTCCGG 12698408

Query CTGGTGCTCCAGCGGGCACTGGGGGATGAAGCTGAGCTGGGGGCTGTGAGAGAGGCTTCC 900
      |
Sbjct CTGGTGCTCCAGCGGGCACTGGGGGATGAAGCTGAGCTGGGGGCTGTGAGAGAGGCTTCC 12698348

Query CAAGGGGGACTTGTGGACATGACTGTATAA 930
      |
Sbjct CAAGGGGGACTTGTGGACATGACTGTCTAA 12698318

```

Anlage 4: Sequenzierungsergebnis durch das BLAST-Programm nach Eingabe der Mini-Sequenz, Vergleich des Plasmids TV-RNMrgE mit der Referenzsequenz AF 518247; Query=Mini; Subjekt (Sbjct)=AF 518247; Fett gedruckt und grau hinterlegt: Aminosäureaustausch oder Basenpaarveränderung; Fett gedruckt und unterstrichen: Start-codon+Primer oder Stopcodon+Primer.

Anlage 5

Sequenzierungsergebnis von TV-RNMrgG:

```

Query ATGCTCTCCATATTCAATATCTGGGGCACGTTCAACAGAGTGCTCTTCTTCTCAGCCTC 60
      |
Sbjct ATGCTCTCCATATTCAATATCTGGGGCACGTTCAACAGAGTGCTCTTCTTCTCAGCCTC 12682004

Query ACAGTCAGCCTTGCAGGGCTGGCGGGCAACACGCTGCTGCTCTGGCACCTCGGTCTGCGC 120
      |
Sbjct ACAGTCAGCCTTGCAGGGCTGGCGGGCAACACGCTGCTGCTCTGGCACCTCGGTCTGCGC 12681944

Query ATCAAGAAGGGCCCCTTCAACACCTACCTGCTGCACCTGGCCGCTGCTGATTTCTCTTC 180
      |
Sbjct ATCAAGAAGGGCCCCTTCAACACCTACCTGCTGCACCTGGCCGCTGCTGATTTCTCTTC 12681884

Query CTCTCCTGCCAAGTTGGCTTCTCTATTGCCAAGATCGCGTCGGGCTATGAGGACACACTC 240
      |
Sbjct TTCTCCTGCCAAGTTGGCTTCTCTATTGCCAAGATCGCGTCGGGCTATGAGGACACACTC 12681824

Query TACTTCCC GGTCACCTTCCTCTGGTTTGCTGTAGGGCTCTGGCTGCTGGCTGCCTTCATT 300
      |
Sbjct TACTTCCC GGTCACCTTCCTCTGGTTTGCTGTAGGGCTCTGGCTGCTGGCTGCCTTCATT 12681764

Query GTGGACTGCTGCCTCTCCTACATGTTCCCTCCTTTTGTGGCCCCAACTGCCGCCCCAGG 360
      |
Sbjct GTGGACTGCTGCCTCTCCTACATGTTCCCTCCTTTTGTGGCCCCAACTGCCGCCCCAGG 12681704

Query TACTTTCATTTGTCCTCTGCCTCGTGATCTGGGCCCTGACCATGCTGGCGGTGCTGCTG 420
      |
Sbjct TACTTTCATTTGTCCTCTGCCTCGTGATCTGGGCCCTGACCATGCTGGCGGTGCTGCTG 12681644

Query CCAGCCAATGCCTGTGGCCTGCTGTACAATAGAATGAGTCTGCTGGTTTGCTCAAGTAC 480
      |
Sbjct CCAGCCAATGCCTGTGGCCTGCTGTACAATAGAATGAGTCTGCTGGTTTGCTCAAGTAC 12681584

```

```

Query  CACTGGGTCAGCGTTGTCTGGCTAGGGGTGCTTGCTAGCACGGCGTGTGGTGCAAGCATG 540
      |||
Sbjct  CACTGGGTCAGCGTTGTCTGGCTAGGGGTGCTTGCTAGCACGGCGTGTGGTGCAAGCATG 12681524

Query  TTTCTCTTAGTCTTTGGGAACTGCTGTTCTTCACAGCCACCCTCCAAATTCTGCAAGTTG 600
      |||
Sbjct  TTTCTCTTAGTCTTTGGGAACTGCTGTTCTTCACAGCCACCCTCCAAATTCTGCAAGTTG 12681464

Query  GCCCAGTGCTCCGGGATCCTTCTGTTCTTCTGTGCGCTGCCCTGGTTTTCTACTGGTGC 660
      |||
Sbjct  GCCCAGTGCTCCGGGATCCTTCTGTTCTTCTGTGCGCTGCCCTGGTTTTCTACTGGTGC 12681404

Query  CTGCGGCCAGTCATAAAATTCTTGCTTCCCTTTTTCTTCCCCTGGCCACCCTCCTGGCC 720
      |||
Sbjct  CTGCGGCCAGTCATAAAATTCTTGCTTCCCTTTTTCTTCCCCTGGCCACCCTCCTGGCC 12681344

Query  TGCATTGACAGCAGTGCAAAGCCCCTCTTGTACTACCTGAAGGGCAGGCAGCTCAGGAAG 780
      |||
Sbjct  TGCATTGACAGCAGTGCAAAGCCCCTCTTGTACTACCTGAAGGGCAGGCAGCTCAGGAAG 12681284

Query  GAGCCACTGCAGGTAGCCCTAAACAGGGCTTTAGGGGAAGAGTCTCAGTCAAGTAGTGGG 840
      |||
Sbjct  GAGCCACTGCAGGTAGCCCTAAACAGGGCTTTAGGGGAAGAGTCTCAGTCAAGTAGTGGG 12681224

Query  GGGATATCCCTCCCATGAGCCGAGTTAA 870
      |||
Sbjct  GGGATATCCCTCCCATGAGCCGAGTTAA 12681194

```

Anlage 5: Sequenzierungsergebnis durch das BLAST-Programm nach Eingabe der Mini-Sequenz, Vergleich des Plasmids TV-RNMrgG mit der Referenzsequenz AF 518248; Query=Mini; Subjekt (Sbjct)= AF 518248; Fett gedruckt und grau hinterlegt: Aminosäureaustausch oder Basenpaarveränderung; Fett gedruckt und unterstrichen: Start-codon+Primer oder Stopcodon+Primer.

Anlage 6

Vergleich der verwendeten Rezeptoren auf Aminosäure-Ebene:

```

HS_MrgX1  -----MDPTLDTELTPINGTE---ETLCY
HS_MrgX3  -----MDSTIPVLGTELTPINGRE---ETPCY
HS_MrgX4  -----MDPTVPVFGTKLTPINGRE---ETPCY
HS_MrgX2  -----MDPTTPAWGTESTTVNGNDQALLLLCG
HS_Mas    -----MDGSNVTSEVVEEPTNISTGRNASVGNNAH
MM_MrgH   -----MEPLAMTLYPLESTQPTRNKTPNETTWSSEH
HS_RTA    -----MAGNCSWEAHPGNRNKMCPLSEAPELYS
HS_MrgD   -----MNQTLNSSGTVESALNYSRGSTVHTAY
HS_MrgE  -----MMEPREAQHVGAANGAQED
HS_MrgG  -----MPLPVPPAGAQKTPEDHVCLHLIGPSPAPSE
HS_Mrg    MVWGKICWFSQRAGWTVFAESQISLSCSLCLHSGDQEAQNPNLVSQLCGVFLQNETNETI

```

```

HS_MrgX1 K-----QTLSTVLTTCIVSLVGLTGNAVVLWLLGCRMRRNAFSIYILNLAAD
HS_MrgX3 K-----QTLSTVLTTCIVSLVGLTGNAVVLWLLGCRMRRNAFSIYILNLAAD
HS_MrgX4 N-----QTLSTVLTTCIISLVGLTGNAVVLWLLGYRMRRNAFSIYILNLAAD
HS_MrgX2 K-----ETLIPVFLILFIALVGLVGNFVFLWLLGFRMRRNAFSVYVLSLAGAD
HS_Mas R-----QIPIVHWVIMSISPVGFEVNGILLWFLCFMRRNPFVYITHLSIAD
MM_MrgH T-----DDHTYFLVSLVICSLGLAGNGLLIWFLIFCIKRPFTIYILHLAIAD
HS_RTA RGFLTIEQIAMLPPAVMNYIFLLCLCGLVGNGLVWFFGFSSIKRNPFSIYFLHLASAD
HS_MrgD L-----VLSSLAMFTCLCGMAGNSMVIWLLGFRMHRNPFYIYILNLAAD
HS_MrgE VA-----FNLIILSLTEGLGLGGLLGNFVFLWLLSSNVYRNPFYIYLLDVACAD
HS_MrgG PARMFGLFGLWRTFDSVVFYLTIVGLGGPVGNGLVWNLGFRIKKGFPSIYILHLAAD
HS_Mrg HMQMSMAVGQALPLNIIAPKAVLVSLCGVLLNGTVFWLLCCGATN-PYMVYILHLVAAD

```

. . : : . . : . :

```

HS_MrgX1 FLFLSGRLIYSLLSFISIPHTISK----ILYPVMMFSYFAGLSFLSAVSTERCLSVLWPI
HS_MrgX3 FLFLSGHIICSPLRLINIRHPISK----ILSPVMTFPYFIGLSMLSAISTERCLSVLWPI
HS_MrgX4 FLFLSFQIIRSPRLINISHLRK----ILVSVMTFPYFTGLSMLSAISTERCLSVLWPI
HS_MrgX2 FLFLCFQIINCLVYLSNFFCSISINFPSTVMTTCAYLAGLSMLSTVSTERCLSVLWPI
HS_Mas ISLLFCIFILSIDYALDYELSSGHYITVTLVTFVFLGYNTGLYLLTAISVERCLSVLYPI
MM_MrgH FMVLLCSSIMKLVNTFHIYN---MTLESYAILFMIFGYNTGLHLLTAISVERCLSVLYPI
HS_RTA VGYLFSKAVFSILNTGGFLGTAFYIRSVCRVLGLCMFLTGVSLLPAVSAEERCASVIFPA
HS_MrgD LLFLFSMASTLSLETQPLVN-TTDKVHELMKRLMYFAYTVGLSLLTAISTQRCLSVLWPI
HS_MrgE LIFLFGCHMVAIVPDLQGRDLDFPGFVQTSLATLRFYIVGLSLLAAVSVQCLAAALFPA
HS_MrgG FLFLSCRVGFSVAQAALGAQDTLYFVLT-----FLWFAVGLWLLAAFSVERCLSDLFPA
HS_Mrg VIYLCCSAVGFLQVTLTYHGTVFFIPDFLAILSPFSFEVCLCLLVAISTERCVCVLFPI

```

: : : . . : : . . :

```

HS_MrgX1 WYRCHRPHTLSAVVCVLLWALSLLRSILEWMLCGFLFSGADS--AWCQTSDFITVAWLIF
HS_MrgX3 WYHCRPRYLSSVMCVLLWALSLLRSILEWMLCDFLFGADS--VWCETSDFITIAWLVF
HS_MrgX4 WYRCHRPHTLSAVVCVLLWGLSLLFSMLEWRFCDFLFGADS--SWCETSDFIPVAWLIF
HS_MrgX2 WYRCHRPHTLSAVVCVLLWALSLLRSILEGKFCGFLFSDGDS--GWCQTFDFITAAWLIF
HS_Mas WYRCHRPKYQSALVCALLWALSCLVTTMEYVMCIDREEESHNRNDCRAVIFIAILSFLV
MM_MrgH WYQCQRPKHQSAVACMLLWALSVLVSGLENFFCILEVKPQFP--ECRYVYIFSCILTFV
HS_RTA WYWRRRPKRHSAVVCALLWVLSLLVTCLHNYFCVFLGRGA-PGAACRHMDIFLIGILLFLL
HS_MrgD WFKCHRPHTLSAVVCGLLWTLCLLMNGLTSSECSKFLKFED--RCFRVDMVQALIMGV
HS_MrgE WYSCRPRHTTTCVCAWTALCLLLHLLLSACTQFFGEPSP--HLCRTWLVAAVLLAL
HS_MrgG CYQGCPRRHASAVLCAVWTPPLPAVPLPANACGLLRNSACP--LVCPRYHVAVTWFV
HS_Mrg WYRCHRPKYTSNVVCTLIWGLPFCINIVKSLFLTYWKHVAC-----VIFLKLSSGLFHAI

```

: : : : :

```

HS_MrgX1 LCVVLCGSSVLVLLIRILCGSR--KIPLTRLYVTILLTVLVFLLCGLPFGIQWFFLFWIHV
HS_MrgX3 LCVVLCGSSVLVLLVRIILCGSR--KMPLTRLYVTILLTVLVFLLCGLPFGIQWALFSRIHL
HS_MrgX4 LCVVLCVSSVLVLLVRIILCGSR--KMPLTRLYVTILLTVLVFLLCGLPFGILGALIYRMHL
HS_MrgX2 LFMVLCGSSVALLVRIILCGSR--GLPLTRLYVTILLTVLVFLLCGLPFGIQWFLIILWIWK
HS_Mas FTPLMLVSSITLVVKIRKNTW-ASH-SSKLYIVIMVTIIIFLIFAMPMLLYLLYEEYWS
MM_MrgH FVPLMIFSNLILFIQVCCNLK-PRQ-PTKLYVIIMTTVILFLVFAMPKVVLLIIGYSSS
HS_RTA CCPLMVLPCALILHVECRAR-RRQRS AKLNHVILAMVSVFLVSSIYLGIDWFLWVQI
HS_MrgD LTPVMTLSSLTFLVWVRRSSQWRRQPTLRFVVVLA SVLVFLICSLPLSIYFVLYWLSL
HS_MrgE LCCTMCGASMLLLRVERGPQ--RPPRPFGLILLTVLLFLFCGLPFGIYWLSRNLLWY
HS_MrgG LARVAWTAGVFLVWVTCST--RPRPR-LYGIVLGALLLFFCGLPSVFYWSLQPLNLF
HS_Mrg LSLVMCVSSLTLLIRFLCCSQ--QQKATRVYAVVQISAPMFLWALPLSVAPLITDFKMF

```

: . . : . : : : . . :


```

HS_MrgX1  DREVLVFCVHVLVSIIFLSALNSSANPIIYFFVGSFRQRQNRQN--LKLVLQRALQDASEVD
HS_MrgX3  DWKVLVFCVHVLVSIIFLSALNSSANPIIYFFVGSFRQRQNRQN--LKLVLQRALQDTPEVD
HS_MrgX4  NLEVLYCHVYLVCMSSLNSSLNSSANPIIYFFVGSFRQRQNRQN--LKLVLQRALQDKPEVD
HS_MrgX2  DSDVLVFCVHVPVSVVLSLSSANPIIYFFVGSFRKQWRLQQPI LKLALQRALQDIAEVD
HS_Mas    TFG----NLHHISLLFSTINSSANPFIYFFVGS SK-KKRF-KESLKVVLTRAFKDEMQR
MM_MrgH   LDDSVW-DSLPLYLNMLSTINCSINPIVYFVVGSLR-RKRS-RKSLKEALQKVFEKPVVA
HS_RTA    PAP----FPEYVTDLCICINSSAKPIVYFLAGRDK-SQRL-WEPLRVVFQRALRDGAELG
HS_MrgD   PPEMQV-LCFSLSRSSSVSSANPVIYFVVGSR-SHRLPTRSLGTVLQQALREEPELE
HS_MrgE  IPH----YFYHFSFLMAAVHCAAKPVVYFCLGSAQGRRLP----LRLVLQRALGDEAELG
HS_MrgG  LLP----VFSPLATLLACVNSSSKPLIYSGLGRQPGKREP----LRSVLRRA GEGAEELG
HS_Mrg    VTT-----SYLISLFLIINSSANPIIYFFVGS LRKKRLKES--LRVILQRALADKPEVG
          : . : . :                               : . . :

```

```

HS_MrgX1  EGGGQLPEEILELSGSRLEQ-----
HS_MrgX3  EGGGWLPQETLELSGSRLEQ-----
HS_MrgX4  KEGGQLPEESLELSGSRLEGP-----
HS_MrgX2  HSEGCFRQGTPEMSRSLV-----
HS_Mas    RQKDNCNTVTVETVV-----
MM_MrgH   SRENTQFSLPS-----
HS_RTA    EAGGSTPNTVTMEMQCPPGNAS-----
HS_MrgD   GGETPTVGTNEMGA-----
HS_MrgE  AVRETSRRLVDIAA-----
HS_MrgG  ARGQSLPMGLL-----
HS_Mrg    RNKKAAGIDPMEQPHSTQHVENLLPREHRVDVET

```

Anlage 6: Der HSMas-Rezeptor, der murine MrgH-Rezeptor und die HSMrg-Familie im Sequenzvergleich. Dargestellt ist die Aminosäuresequenz der jeweiligen Rezeptoren. Fett gedruckt: übereinstimmende Aminosäuren. Die transmembranen Bereiche sind grau unterlegt. Dunkelgrau hinterlegt Punktmutation mit Aminosäureaustausch.

Anlage 7

Vergleich der verwendeten Rezeptoren der Ratte auf Aminosäure-Ebene

```

RN_MrgE   -----MSLRVHTHSPSTQGDMAFNLTILSLTELLSLGGLLGNVALWLLNQNV
RN_MrgG   -----MLSIFNIWG-----TFNXVLFFLSLTVSLAGLAGNTLLLWHLGLRI
RN_Mas    MDQSNMTSFAEEKAMNTSSRNASLGTSHPPPIVHWVIMSISPLGFVENGILLWFLEFRM
          : . . . : : : : : : : :

```

```

RN_MrgE   YRNPFSIYLLDVACADLIFLCCHMVAIIPPELLQDQLNFPFVHISLIMLRFFC-YIVGLS
RN_MrgG   KKGPFNTYLLHLAAADFLFLSCQVGFSAIKIASG-----YEDTLYFPVTFW-FAVGLW
RN_Mas    RRNPFTVYITHLSIADISLLFCIFILSIDYALDYELSSGHYYTIVTSLVTFLEFGYNTGLY
          : . . : : : : . . . : : : : .

```

```

RN_MrgE   LLVAISTEQCLATLFPSTGY-LCRRPRLYLTTCVCAFIWVLCLLDLLLSGACTQFFGA SY
RN_MrgG   LLAAFIIVDCCLSYMFPSPFCGPNCRPRYTSFVLCLVIWALTMLAVLLPANACGLLYNRMSL
RN_Mas    LLTAISVERCLSVLYPIWY-RCHRPKHQSAFVCALLWALSCLVTTMEYVMCIDSGEESH
          . : . : : : : : : : : :

```

```

RN_MrgE HLCGMLWLVVAVLLAALCCT--MCVTSLLLRLRVERGPERHQPRGFPTLVLLVILLFLIC
RN_MrgG LVCLKYHWVSVVWLVGLAST--ACGASMFLLVFGNCCSS-QPPSKFCKLAQC SGILLFFC
RN_Mas   QSDCRAVIFIAIILSFLVFTPLMLVSTILVVKIRKNTWASHSSKLYIVIMVTIIIFLIF
          : . . : : : . . : : : :

```

```

RN_MrgE GLPFGIFWLSKNLSWHTPLYFYHFSFFMASVHSAAKPAIYFFLGSTPGQRFQEPRLRLVLO
RN_MrgG RLPLVFIWCLRPVIKFLLPFFFPLATLLACIDSSAKPLLYLKG---RQLRKEPLQVALN
RN_Mas   AMPMRVLYLLYYEYWSTFGNLHNISLLFSTINSSANPFIYFFVGS SKKKRFRESLKVVLV
          : : . : : : : : : : : : : : : : : :

```

```

RN_MrgE RALGDEAELGAVREASQGGLVDMTV
RN_MrgG RALGEESQSSSGGISLPMSRV----
RN_Mas   RAFKDEMQRREQEGNGNTVSIETVV
          : : : :

```

Anlage 7: Der RNMas-Rezeptor, der RNMrge- und der RNMrgeG-Rezeptor im Sequenzvergleich. Dargestellt ist die Aminosäuresequenz der jeweiligen Rezeptoren. Fett gedruckt: übereinstimmende Aminosäuren. Die transmembranen Bereiche sind grau unterlegt. Dunkelgrau hinterlegt Punktmutation mit Aminosäureaustausch.

9. Danksagung

Mein Dank gilt Prof. Dr. Thomas Walther für die interessante Themenstellung sowie die stete Betreuung und Unterstützung. Durch sein Engagement, immerwährende Diskussionsbereitschaft, Übermittlung von Fachwissen und Schaffen von motivierendem Teamgeist in der Forschungsgruppe war ein kontinuierliches Wachsen der Arbeit gewährt. Herzlichen Dank auch für das zeitaufwendige, kritische Korrekturlesen.

Florian Gemhardt danke ich, da er mir bei der Aneignung neuer Techniken und Methoden mit seiner großen Erfahrung unterstützend zur Seite stand und wesentlich zur angenehmen Arbeitssphäre beitrug.

Alle anderen Mitarbeiter und Doktoranden, die parallel mit mir im Labor tätig waren, haben zu der vorliegenden Dissertationsarbeit beigetragen. Gute Zusammenarbeit, gegenseitige Hilfsbereitschaft, Vermittlung von Methoden und gemeinsame Unternehmungen in der Arbeitsgruppe waren stets aufbauend und haben zur Fortführung der Arbeit auch in kritischen Phasen ermuntert. Mein besonderer Dank gilt hierbei Herrn Helmut Würdemann.

Ein großes und herzliches Dankeschön gebührt meinen Eltern, die mich während der gesamten Zeit in jeglicher Form unterstützt haben. Auch meiner lieben Großmutter, meiner Schwester, meinem Bruder und meinem Freund, die alle auf ihre Weise zum Gelingen der Arbeit beigetragen haben, möchte ich danke sagen.

Gabi möchte ich für das ausführliche Korrekturlesen und die kritischen Anregungen danken. Denise, Christina, Christian, Rolf und Benjamin danke ich für Engagement, Unterstützung und Geduld beim Beibringen diverser Computerprogramme.

10. Eidesstattliche Erklärung

Erklärung

„Ich, Sonja, Grajewski, erkläre, dass ich die vorgelegte Dissertationsschrift mit dem Thema: Liganden-abhängige und -unabhängige Signalübertragungswege von G-Protein gekoppelten Rezeptoren der Mrg-Familie, selbst verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt, ohne die (unzulässige) Hilfe Dritter verfasst und auch in Teilen keine Kopien anderer Arbeiten dargestellt habe.“

Datum

Unterschrift

11. Curriculum vitae

„Mein Lebenslauf wird aus Datenschutzgründen in der elektronischen Version meiner Arbeit nicht mit veröffentlicht.“