

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

DISSERTATION

Identifizierung von Liganden des G-Protein gekoppelten
Rezeptors Mas und Mas-Sequenz-ähnlicher Rezeptoren

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

vorgelegt der Medizinischen Fakultät
Charité – Universitätsmedizin Berlin

von

Martin Vahl

aus Düsseldorf

Gutachter: 1. Prof. Dr. med. H.-P. Schultheiss
 2. Prof. Dr. med. W. M. Kübler
 3. Prof. Dr. rer. nat. Th. Wieland

Datum der Promotion: 16. Mai 2010

Verzeichnis der verwendeten Abkürzungen

AA	Arachidonsäure
ACE	Angiotensin-Konversionsenzym
ACE2	‚ACE-related Carboxypeptidase‘
ADH	Antidiuretisches Hormon
Akt	Proteinkinase B
Ala	Alanin
Amp	Ampicillin
Ang I/II/III/IV	Angiotensin I/II/III/IV
Ang-(1-7)	Angiotensin-(1-7)
Ang-(1-9)	Angiotensin-(1-9)
APA	Aminopeptidase
APN	Aminopeptidase N
Arg	Arginin
As	Aminosäure
ASIC	‚Acid sensing ion channels‘
Asn	Asparagin
Asp	Asparaginsäure
ATP	Adenosintriphosphat
AT1	Angiotensin-II-rezeptor-Subtyp-1-Antagonist
AT2	Angiotensin-II-Rezeptor-Subtyp-2-Antagonist
Balb3T3	murine Fibroblasten Zelllinie
BAM (1-22)/22	‚bovine adrenal medullary peptide (1-22)/22‘
BD	Blutdruck
bidest	bidistilliertes Wasser
Bp	Basenpaar
BPV	Blutdruck-Variabilität
Bq	Bequerel
BR	Baroreflex
BSA	Bovines (Rinder-) Serumalbumin
C	Cystein
Ca	Calcium ²⁺
CaM Kinase II	Calmodulin-aktivierte Kinase II
cAMP	cyclisches Adenomonophosphat
cDNA	Copy-Desoxyribonukleinsäure
CHO	‚Chinese hamster ovary‘
CO ₂	Kohlenstoffdioxid
Ci	Curie
CMV	Cytomegalovirus
COS	‚African green monkey kidney‘-Zellen
COX	Cyclooxygenase
CPA	‚Caudal pressor area‘

cPLA ₂	cytosolische Phospholipase A ₂
DAG	Diacylglycerol
D-AMP	Dipeptidyl-Aminopeptidase
dATP	Desoxyadenosintriphosphat
dCTP	Desoxycytosintriphosphat
dGTP	Desoxyguanosintriphosphat
DEPC	Diethylpyrokarbonat
DMEM	Dulbecco's modifiziertes Eagle's Medium
DMSO	Dimethylformamid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DNase	Desoxyribonuklease
dNTP	Desoxynukleotidtriphosphat
DRG	dorsale Ganglienwurzel
DTT	Dithiothreitol
dTTP	Desoxythymidintriphosphat
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
eNOS	endotheliale NO-Synthase
EPM	‚Elevated plus Maze‘
FCS	Fötales Kälberserum
fEPSP	‚field Excitatory Postsynaptic Potentials‘
FLRF	Neuro-Peptide: As-Sequenz: Phe-Leu-Arg-Phe-NH ₂
FMRFamid	Phenylalanin-Methionin-Arginin-Phenylalanin-Amid
GDP	Guanosindiphosphat
Glu	Glutaminsäure
Gly	Glycin
GPCR	‚G-proteine coupled receptor‘
GTE	Glukose-Tris-EDTA
GTP	Guanosintriphosphat
GTPase	Guanosintriphosphat spaltendes Enzym
[³ H] AA	Tritium-Arachidonsäure
HBSS	Hank's Buffered Salt Solution
HCL	Chlorwasserstoff
HEK-Gα ₁₅ -Zellen	‚Human embryonic kidney-Zellen‘
HEPES	N-2-hydroxyethylpiperazin-N'-2-ethanolsulfonsäure
HF	Herzfrequenz
His	Histidin
H ₂ O	Wasser
HS	Homo Sapiens
¹²⁵ I-Ang I/Ang II	Iod-125 markiertes Ang I/Ang II
Ile	Isoleucin
IP ₃	Inositol-1, 5-Triphosphat
IPTG	Isopropyl-beta-D-thiogalactopyranosid

IRAP	Insulin regulierte Aminopeptidase
K ⁺	Kaliumion
Kb	Kilobasenpaare
LB-Medium	‚Luria Broth‘-Medium
Leu	Leucin
LH	Luteinisierendes Hormon
Lsg	Lösung
LTP	Langzeit-Potenzierung
M	mol/l
MAP	‚Mean arterial pressure‘
MAPK	Mitogen-aktivierte Proteinkinase K
‚Mas-Like‘	Mas-ähnlich
Met	Methionin
MgCl ₂	Magnesiumchlorid
mGPR90	‚murine g-proteine receptor 90 gene‘
MM	Mus Musculus
Mrg	‚Mas related gene‘
mRNA	Boten-RNA
MW	Mittelwert
MWM	‚Morris water Maze‘
Na ⁺	Natriumion
NaCl	Natriumchlorid
NADH	Nicotinamidadenindinukleotid
NADPH	Nicotinamidadenindinukleotidphosphat
NaHCO ₃	Natriumhydrogenkarbonat
NaOH	Natriumhydroxid
NEP	Neutrale Endopeptidase
NIH	Zelllinie aus den embryonalen Fibroblasten der Maus
NK-Rezeptor	Neurokinin-Rezeptor
NMDA	N-Methyl-D-Aspartat
NO	Stickstoffmonoxid
NPAF	Neuropeptid AF
NPFF	Neuropeptid FF
NPFF 1	NPFF-1-Rezeptor
NPFF2	NPFF-2-Rezeptor
NPSF	Neuropeptid SF
nTS	‚Nucleus tractus solitarii‘
OD	Optische Dichte
PAMP	Proadrenomedullin N-terminal Peptide
PBS	Phosphat gepufferte Salzlösung
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
PCP	Prolyl-Carboxypeptidase
PD	PD123319

Pen	Penicillin
PEP	Prolyl-Endopeptidase
PGI ₂	Prostaglandin I ₂
Phe	Phenylalanin
PIP ₃	Phosphoinositol-3,4,5-triphosphat
PKC	Proteinkinase C
PLC	Phospholipase C
PLA ₂	Phospholipase A ₂
Pro	Prolin
PTX	Pertussistoxin
PTZ	Pentylentetrazol
RAS	Renin-Angiotensin-System
RFamid	Arginin-Phenylalanin-NH ₂
RM	Rückenmark
RN	Rattus Norwegicus
RNA	Ribonukleinsäure
RNase	Ribonuklease
rpm	Umdrehungen pro Minute
RT	Raumtemperatur
RTA	‚Rat thoracic aorta‘; ‚HSMrgF‘
RVLM	‚Rostral ventrolateral medulla‘
SCG	‚Superior cervical ganglion‘
SDS	Natriumdodecylsulfat
SEM	Standardabweichung
SNSR	‚sensory neuron specific receptor‘
Strep	Streptomycin
TAE	Tris-Acetat-EDTA-Puffer
TE	Tris-EDTA-Puffer
Tris	Trishydroxymethylaminomethan
Trp	Tryptophan
Tyr	Tyrosin
U	Unit(s)
UV	Ultraviolett
Val	Valin
VLM	‚ventrolateral Medulla‘
Vol	Volumen
VSMC	‚vascular smooth muscle cell‘
X-Gal	5-Bromo-4-chloro-3-indolyl-β-D-galactosid
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 Entdeckung des <i>Mas</i> -Protoonkogens	1
1.1.2	Die Proteinstruktur von <i>Mas</i>	1
1.1.3	Expression des <i>Mas</i> -Gens	2
1.1.4	<i>Mas</i> innerhalb der Familie der G-Protein gekoppelten Rezeptoren	3
1.1.5	Signaltransduktion des <i>Mas</i> -Rezeptors	4
1.1.6	<i>Mas</i> im Tiermodell	5
1.2	Die Rezeptoren der <i>Mrg</i> -Familie	6
1.2.1	Der MRG-Rezeptor	7
1.2.2	Der <i>MrgF</i> -Rezeptor	7
1.2.3	Die <i>MrgX2</i> -, <i>MrgX1</i> - und <i>MrgD</i> -Rezeptoren	8
1.2.4	Der <i>MrgH</i> -Rezeptor	9
1.3	Das Renin-Angiotensin-System	10
1.3.1	Der Aufbau des Renin-Angiotensin-Systems	10
1.3.2	Struktur und Funktion der beiden Ang II-Rezeptoren	11
1.3.2.1	Der AT1-Rezeptor	11
1.3.2.2	Der AT2-Rezeptor	12
1.3.3	Das Ang I und seine Aminoabkömmlinge	12
1.3.4	Das Ang II und seine Funktion	12
1.3.5	Das Ang III als vasopressorisches Peptid	13
1.3.6	Das Ang IV und der Ang IV-Rezeptor	13
1.3.7	Das Heptapeptid Ang-(1-7)	14
1.3.7.1	Die Entdeckung von Ang-(1-7) als endogenes Peptid	14
1.3.7.2	Die Arachidonsäure-Freisetzung durch Ang-(1-7)	15
1.3.7.3	Zentrale Wirkungen von Ang-(1-7)	15
1.3.7.4	Periphere Wirkungen von Ang-(1-7)	16
1.3.8	Der spezifische Ang-(1-7)-Antagonist A779	17
1.3.9	Das „neue“ Renin-Angiotensin-System	17
1.4	Mögliche Ang-(1-7)-unabhängige Liganden des <i>Mas</i> -Rezeptors	19
1.4.1	Die Interaktion von <i>Mas</i> mit Ang II und Ang III	19
1.4.2	Das Peptid Substanz P als möglicher Ligand am <i>Mas</i> -Rezeptor	20
1.4.3	Das Nicht-Peptid AVE0991 als <i>Mas</i> -Agonist	21
1.4.4	Die Neuro-Peptide NPFF, NPAF, NPSF als mögliche Liganden am <i>Mas</i> -Rezeptor	21
1.5	Ziel der Arbeit	24
2.	Material	25
2.1	Bakterienstämme und Zellen	25
2.2	Vektoren	25
2.2.1	Vektoren zur Klonierung	25
2.2.2	Vektoren mit klonierten Fragmenten	27
2.3	Enzyme	27
2.4	Oligonukleotide	28
2.5	Chemikalien	28
2.6	Medien für Bakterienkulturen	30
2.7	Medien für Zellkulturen	30

2.8	Stammlösungen, Puffer und Gele	31
2.8.1	Stammlösungen und Puffer	31
2.8.2	Gele	33
2.9	Gebrauchsfertige Reaktionssysteme	34
2.10	Geräte	34
2.11	Peptide/Nichtpeptide und Antagonisten und ihre Formeln	35
3.	Methoden	36
3.1	DNA	36
3.1.1	Polymerase-Kettenreaktion	36
3.1.2	Agarosegel-Elektrophorese	37
3.1.3	DNA-Isolierung mit einem präparativen Gel	38
3.1.4	DNA-Konzentrationsbestimmung	38
3.1.5	Ligation von DNA-Fragmenten	38
3.1.6	Herstellung von LB-Medium	39
3.1.7	DNA-Transformation in Bakterien	39
3.1.8	Präparation von Plasmid-DNA	39
3.1.8.1	Mini-Präparation	40
3.1.8.2	Maxi-Präparation	40
3.1.9	Restriktionsverdau	41
3.1.10	Präparativer Restriktionsverdau	42
3.1.11	DNA-Sequenzierung und Sequenzanalyse	42
3.1.11.1	DNA-Sequenzierung	42
3.1.11.2	Sequenzanalyse	42
3.2	Zellkultur	43
3.2.1	Herstellung kompetenter Zellen	43
3.2.2	Schnelles Auftauen der Zellen	43
3.2.3	Trypsinisieren	43
3.2.4	Transfektion	44
3.2.5	DNA-Isolierung	44
3.2.6	Kultivierung der COS-Zellen	45
3.2.7	Einfrieren der Zellen	45
3.2.8	Arachidonsäure-Freisetzung	45
3.3	Statistische Auswertung	46
4.	Ergebnisse	47
4.1	Klonierung von cDNA von Mitgliedern der Mrg-Familie	47
4.1.1	Klonierung von <i>MrgH</i> -cDNA	50
4.1.2	Klonierung von <i>MRG</i> -cDNA	51
4.2	Generierung der transfizierten Zellen	54
4.2.1	Linearisierung der Konstrukte	54
4.2.2	Transfektion und Selektion zum Transfektionsnachweis der integrierten cDNA	55
4.2.3	Nachweis der spezifischen Konstrukt-DNA	55
4.3	Die Interaktion von Ang-Metaboliten, Ang-Rezeptor-Blockern, AVE0991 und Substanz P mit dem humanen Mas-Rezeptor und Mas-Sequenz-ähnlichen Rezeptoren	58
4.3.1	Test von Agonisten und Antagonisten des Mas-, AT1- und AT2-Rezeptors an <i>Mas</i> -transfizierten Zellen	59

4.3.1.1	Arachidonsäure-Freisetzung nach Interaktion von Ang-(1-7), A779, Irbesartan und PD123319 mit dem humanen Mas-Rezeptor	59
4.3.1.2	Vergleich der Arachidonsäure-Freisetzung von AVE0991, Ang-(1-7) und A779 nach Interaktion mit dem humanen Mas-Rezeptor	61
4.3.1.3	Arachidonsäure-Freisetzung nach Interaktion von Ang-Metaboliten mit dem humanen Mas-Rezeptor	62
4.3.1.4	Arachidonsäure-Freisetzung nach Interaktion von Substanz P mit dem humanen Mas-Rezeptor	64
4.3.2	Test von möglichen Agonisten an Rezeptoren der Mrg-Familie in transfizierten Zellen	64
4.3.2.1	Vergleich der Arachidonsäure-Freisetzung nach Interaktion von Ang-(1-7) und AVE0991 mit dem murinen MrgH-Rezeptor	64
4.3.2.2	Arachidonsäure-Freisetzung nach Interaktion von Angiotensin-Metaboliten mit dem humanen MrgX2-Rezeptor	65
4.3.2.3	Arachidonsäure-Freisetzung nach Interaktion von Angiotensin-Metaboliten und AVE0991 mit dem humanen MrgX2-Rezeptor	66
4.3.2.4	Arachidonsäure-Freisetzung nach Interaktion von Angiotensin-Metaboliten und AVE0991 mit dem humanen MrgX1-Rezeptor	67
4.3.2.5	Arachidonsäure-Freisetzung nach Interaktion von Angiotensin-Metaboliten und AVE0991 mit dem humanen MrgD-Rezeptor	68
4.3.2.6	Arachidonsäure-Freisetzung nach Interaktion von Angiotensin-Metaboliten und AVE0991 mit dem humanen MrgF-Rezeptor	69
4.3.2.7	Arachidonsäure-Freisetzung nach Interaktion von Angiotensin-Metaboliten und AVE0991 mit dem humanen MRG-Rezeptor	70
4.3.2.8	Arachidonsäure-Freisetzung nach Interaktion von Substanz P mit Mas-Sequenz-ähnlichen-Rezeptoren	72
4.4.	Die Interaktion von Neuro-Peptiden und dem Ang-(1-7)-spezifischen-Rezeptor-Blocker mit dem humanen Mas-Rezeptor und Mas-Sequenz-ähnlichen Rezeptoren	72
4.4.1	Arachidonsäure-Freisetzung nach Interaktion von NPFF, NPAF, NPSF mit dem humanen Mas-Rezeptor und nach Antagonisierung mit A779	73
4.4.1.1	Arachidonsäure-Freisetzung nach Interaktion von NPFF mit dem humanen Mas-Rezeptor und nach Antagonisierung mit A779	73
4.4.1.2	Arachidonsäure-Freisetzung nach Interaktion von NPAF mit dem humanen Mas-Rezeptor und nach Antagonisierung mit A779	75
4.4.1.3	Arachidonsäure-Freisetzung nach Interaktion von NPSF mit dem humanen Mas-Rezeptor und nach Antagonisierung mit A779	76
4.4.2	Arachidonsäure-Freisetzung nach Interaktion von NPFF, NPAF, NPSF mit dem murinen MrgH-Rezeptor und nach Antagonisierung mit A779	77
4.4.2.1	Arachidonsäure-Freisetzung nach Interaktion von NPFF mit dem murinen MrgH-Rezeptor und nach Antagonisierung mit A779	77
4.4.2.2	Arachidonsäure-Freisetzung nach Interaktion von NPAF mit dem murinen MrgH-Rezeptor und nach Antagonisierung mit A779	78
4.4.2.3	Arachidonsäure-Freisetzung nach Interaktion von NPSF mit dem murinen MrgH-Rezeptor und nach Antagonisierung mit A779	80
4.4.3	Arachidonsäure-Freisetzung nach Interaktion von NPFF, NPAF, NPSF mit dem humanen MrgX1-Rezeptor und nach Antagonisierung mit A779	81
4.4.3.1	Arachidonsäure-Freisetzung nach Interaktion von NPFF mit dem humanen MrgX1-Rezeptor und nach Antagonisierung mit A779	81

4.4.3.2	Arachidonsäure-Freisetzung nach Interaktion von NPAF mit dem humanen MrgX1-Rezeptor und nach Antagonisierung mit A779	82
4.4.3.3	Arachidonsäure-Freisetzung nach Interaktion von NPSF mit dem humanen MrgX1-Rezeptor und nach Antagonisierung mit A779	84
4.5	Tabellarische Zusammenfassung der signifikanten Arachidonsäure-Freisetzung nach Agonist/Antagonist-Rezeptor-Interaktion	84
5.	Diskussion	88
5.1	Die Liganden des Mas-Rezeptors	89
5.1.1	Die Interaktion von Angiotensin-Metaboliten mit Mas	89
5.1.1.2	Die Interaktion von Nicht-Angiotensin-Metaboliten mit Mas	93
5.1.2	Die Interaktion von Substanz P mit Mas	94
5.1.3	Die Interaktion von Neuro-Peptiden mit Mas	95
5.2	Die Rezeptoren der Mrg-Familie	96
5.2.1	Die Interaktion von Angiotensin-Metaboliten mit Mas-Sequenz-ähnlichen Rezeptoren	97
5.2.1.2	Die Interaktion von AVE0991 mit Mas-Sequenz-ähnlichen Rezeptoren	101
5.2.1.3	Die Interaktion von Substanz P mit Mas-Sequenz-ähnlichen Rezeptoren	101
5.2.2	Die Interaktion von Neuro-Peptiden mit Mas-Sequenz-ähnlichen Rezeptoren	102
5.3	Ausblick	103
6.	Zusammenfassung	106
7.	Literaturverzeichnis	108
8.	Anlagen	124
9.	Curriculum vitae	131
10.	Publikationsliste	132
11.	Danksagung	133
12.	Eidesstattliche Erklärung	134

1.1 Einleitung

1.1 Das *Mas*-Protoonkogen

1.1.1 Die Entdeckung des *Mas*-Protoonkogens

Young und Mitarbeitern gelang 1986 erstmalig die Isolierung des humanen *Mas*-Protoonkogens aus einem Epidermalcarzinom. Durch die anschließende Transfektion in NIH3T3-Fibroblasten und Injektion der transfizierten Zellen in Nacktmäuse kam es dann bei den Tieren zur Tumorbildung (Young *et al.*, 1986). Die Autoren vermuteten deshalb, dass es sich bei dem *Mas*-Protein um einen Rezeptor handeln könnte, der nach Aktivierung in die Zell-Wachstumsregulation eingreift. Ein Vergleich von nicht transfizierter mit transfizierter DNA ließ auf ein Rekombinationselement schließen, welches nach Induktion durch Transformation aus dem Protoonkogen-Promotorbereich deletiert wurde und zu einer unkontrollierten Expression des Gens führte. Die für die onkogene Aktivität von *Mas* verantwortlichen Veränderungen lagen ca. 3,5kb vor dem Translationsstart und konnten auch in den Untersuchungen von Janssen *et al.* (1988) nach Transfektionsexperimenten in menschlicher myelotischer Leukämiezell-DNA nachgewiesen werden. Weitere Transfektionsexperimente bei isolierten und veränderten *Mas*-Genen dokumentierten eine in dem unveränderten *Mas*-Gen nicht vorhandene Sequenz, die als ein „alpha-satellite repeat“ vom Chromosom 3 identifiziert wurde (van 't Veer *et al.*, 1993). Diese ist 2-3kb vor der codierenden Region des *Mas*-Gens lokalisiert. Allerdings ist bis heute keine Mutation in der 5'-flankierenden Region des *Mas*-codierenden Exons für einen Primärtumor beschrieben worden. Mit Hilfe von *in-situ*-Hybridisierungen gelang die Lokalisation des humanen *Mas*-Gens auf dem distalen Arm des Chromosom 6q (Rabin *et al.*, 1987), während es bei der Ratte auf dem Chromosom 1 (Walther *et al.*, unpubliziert) und bei der Maus auf dem Chromosom 17 gefunden wurde (Al-Ubaida *et al.*, 1992; Cebra-Thomas *et al.*, 1992). 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 (Jücker *et al.*, 1990).

1.1.2 Die Proteinstruktur von *Mas*

Anhand von Sequenzanalysen der codierenden Bereiche beim Menschen (Young *et al.*, 1986), bei der Ratte (Young *et al.*, 1988) und bei der Maus (Metzger *et al.*, 1995) konnte gezeigt werden, dass das *Mas*-Protoonkogen für ein Proteinprodukt von 324 Aminosäuren (As) codiert

und 7 hydrophobe Domänen ausbildet. Diese Transmembrandomänen sind charakteristisch für membranständige Rezeptoren, insbesondere für die Familie der G-Protein gekoppelten Rezeptoren (GPCR, ‚*G-protein coupled receptor*‘) (Probst *et al.*, 1992). Im Gegensatz zu der Aminosäuresequenz von Maus und Ratte ist das humane Mas-Protein um eine As verlängert (Abb.1.1; zusätzliche As an Position 11). Insgesamt weisen die Genprodukte von Maus und Ratte mit 97% (Maus) und 91% (Ratte) hohe Sequenzhomologien zum humanen Mas-Protein auf (Young *et al.*, 1988; Metzger *et al.*, 1995). Die größten Sequenzunterschiede befinden sich dabei im Bereich der ersten 20 As des Amino-terminalen Endes.

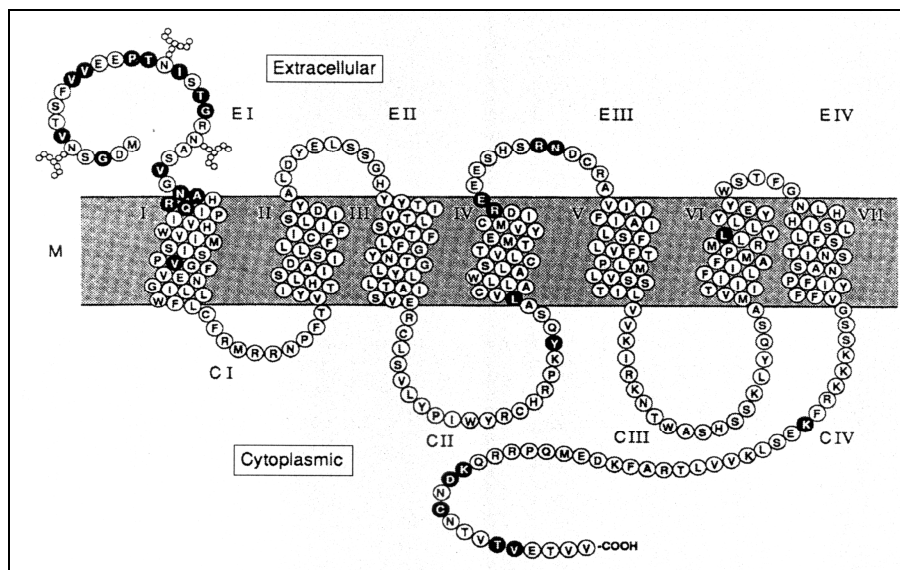


Abb. 1.1: Die Aminosäuresequenz des Mas-Genprodukts der Ratte und seine mögliche Faltung in der Zellmembran. Die schwarz unterlegten Aminosäuren sind zwischen humanen und Ratten-Rezeptor verschieden (aus: Hanley *et al.*, 1990).

1.1.3 Expression des Mas-Gens

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). Nicht nachweisbar ist das *Mas*-Genprodukt hingegen in Leber, Skelettmuskel, Zunge, Kleinhirn, Uterus und in Embryos an den Tagen 11,5, 13,5 und 15,5 nach der Befruchtung (Alenina *et al.*, 2002).

Im Hoden der Maus konnte mit Hilfe einer *in-situ*-Hybridisierung eine deutliche *Mas*-Expression in Leydig-Zellen, weniger ausgeprägt in Sertoli-Zellen und eine deutlich schwächere in primären Spermatozyten lokalisiert werden (Alenina *et al.*, 2002).

Im Gehirn wurde die *Mas*-mRNA überwiegend in den Neuronen der Hippocampusformation, den olfaktorischen Tuberkeln, dem piriformen Kortex und in der Amygdala detektiert (Bunnemann *et al.*, 1990; Martin *et al.*, 1992; Metzger *et al.*, 1995). Nach neuronaler Aktivierung nimmt die *Mas*-Expression insbesondere 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. Darüber hinaus wiesen Kitaoka *et al.* (1994) das *Mas*-Gen in der Retina von Rhesus-Affen nach und konnten zeigen, dass die Überexpression von *Mas*-mRNA im Auge zu einer Reduktion der Zapfen-Photorezeptoren führt.

1.1.4 Mas innerhalb der Familie G-Protein gekoppelter Rezeptoren

Wie unter 1.1.2 beschrieben gehört der Mas-Rezeptor mit den sieben hydrophoben As-Domänen strukturell zur Familie der transmembranären Rezeptoren. Bis heute konnten mehr als 800 unterschiedliche humane GPCRs dieser großen Rezeptorenfamilien identifiziert werden (Fredriksson *et al.*, 2003). Bei den GPCRs handelt es sich um Membranproteine, die durch exogene und endogene Liganden aktiviert werden. Zu den exogenen Liganden gehören Geschmack- und Duftstoffe, zu den endogenen Liganden Neurotransmitter und Hormone (Ji *et al.*, 1998). Chemisch betrachtet handelt es sich bei den Rezeptor-Liganden um Amine (z. B. Acetylcholin, Adrenalin, Dopamin und Serotonin), Aminosäurederivate (z. B. γ -Aminobuttersäure und Glutamate), Fettsäurederivate (z. B. Leukotriene, Prostaglandine und Thromboxane), Nukleotide (z. B. ADP und ATP), Peptide (z. B. Angiotensin II, Bradykinin und LH) und Phospholipide.

Die bislang identifizierten humanen GPCRs lassen sich fünf Familien zuordnen: Familie G: Glutamat-Rezeptoren (15 Mitglieder); Familie R: Rhodopsin-Rezeptoren (701 Mitglieder); Familie A: Adhäsions-Rezeptoren (24 Mitglieder); Familie F: „frizzled“/Geschmack-Rezeptoren (24 Mitglieder); Familie S: Sekretin-Rezeptoren (15 Mitglieder). Der humane Mas-Rezeptor gehört in die Rhodopsin-Familie (Untergruppe δ) (Fredriksson *et al.*, 2003). Mit Hilfe von DNA-Sequenzvergleichen ließ sich dokumentieren, dass sich bei der Evolution der GPCRs phylogenetisch zwei Arme entwickelten: zum einen die adrenergen und muskarinergen Rezeptoren, zum anderen das Gen des Rhodopsins und das *Mas*-Protoonkogen. Das *Mas*-Protoonkogen divergierte dann wahrscheinlich erst zu einem späteren (Entwicklungs-) Zeitpunkt von dem Rhodopsin (Yokoyama *et al.*, 1989, Peralta *et al.*, 1987).

1.1.5 Signaltransduktion des Mas-Rezeptors

Viele Hormone, Wachstumsfaktoren oder Neurotransmitter können ihre Wirkung nicht direkt an der Zelle auslösen, sondern müssen erst über Bindung an einen spezifischen Rezeptor eine Signalkette auslösen. Über eine Aktivierung von intrazellulären Effektormolekülen, wie Adenylatcyclase, Phospholipase C und Ionenkanäle, wie K^+ - und Ca^{2+} -Kanäle, werden Rezeptoren und Liganden zur Interaktion angeregt und so die Informationen auf die regulierenden Prozesse in der Zelle übermittelt (Review: Selbie & Hill, 1998).

Heterotrimere G-Proteine sind membranständige, Guanin-bindende Proteine, die aus drei unterschiedlichen Proteinketten, den α -, β - und γ -Untereinheiten, bestehen. Aufgrund ihrer Fähigkeit, Guanintriophosphat (GTP) zu hydrolysieren, werden sie der GTPase-Superfamilie zugeordnet, die sich wiederum in monomere GTPasen und heterotrimere G-Proteine unterteilen lässt. Von den einzelnen Untereinheiten existieren mehrere Isoformen. Bisher konnten 21 unterschiedliche G_α -Proteinuntereinheiten, 5 β -Untereinheiten und 12 γ -Untereinheiten identifiziert werden (Hamm, 1998). Die GDP-Hydrolyse erfolgt durch Bindung von GTP an die α -Untereinheiten. Während die Untereinheiten α_s und α_q stimulierend wirken, wirken die Untereinheiten 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).

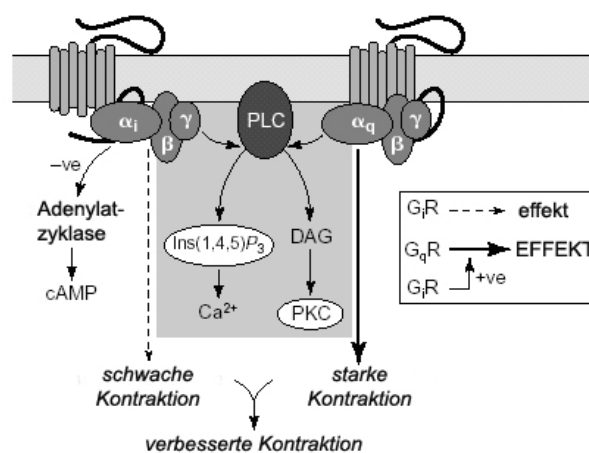


Abb. 1.2: Schematische Darstellung möglicher Signaltransduktionswege nach GPCR-Aktivierung durch Bindung eines Liganden. Sowohl G_i - als auch G_q -gekoppelte Rezeptoren stimulieren Phospholipase C (PLC), wodurch Inositol-(1,4,5)-Triphosphat (IP_3) und Diacylglycerol (DAG) freigesetzt werden (Selbie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

Experimentell konnte nachgewiesen werden, dass das Mas-Protein nach Stimulation durch einen Liganden (z. B. Ang II) zu einer Aktivierung der Phospholipase C (PLC) führt (Jackson *et al.*, 1988; Jackson & Hanley 1989; Poyner *et al.*, 1990). Diese wird dabei phosphoryliert und initiiert dann die Umwandlung von Phosphatidylinositol in die zwei „second messenger“: IP₃ und DAG. IP₃ bewirkt im Zytosol eine Freisetzung von Ca²⁺-Ionen. DAG verbleibt in der Zellmembran und aktiviert dort die Ca²⁺-Phospholipid-abhängige Proteinkinase C, die zur Modifikation biologisch wichtiger Proteine beiträgt (Davis, 1992; Berridge, 1993; Abb. 1.2).

Neben der oben beschriebenen Signalkaskade können die heterotrimeren G-Proteine ihr Signal zusätzlich mittels der Aktivierung kleiner G-Proteine (monomere G-Proteine) weiterleiten (Bhattacharya *et al.*, 2004). Diese zumeist monomeren GTP-bindenden Proteine mit einer Molekülmasse von 20-30kDa können phylogenetisch in 5 Familien unterteilt werden: Ras, Rho/Rac/cdc42, Rab, Sar1/Arf und Ran (Takai *et al.*, 2001) und sind im Zellzyklus an der Regulation zahlreicher Zellfunktionen beteiligt.

1.1.6 Mas im Tiermodell

Erste Untersuchungsergebnisse ließen vermuten, dass Mas an der Entwicklung bestimmter Regionen im ZNS beteiligt ist (Altman *et al.*, 1990a, b, Martin und Hockfeld, 1993). Dass Mas einen wichtigen modulierenden Faktor in der Elektrophysiologie des Hippocampus spielt und in Verhaltensmodifikationen bei Mäusen involviert ist, wurde von Walther *et al.* (1998) in Tieren gezeigt, bei denen das *Mas*-Protoonkogen ausgeschaltet war. *Mas*-defiziente Mäuse hatten eine verbesserte Langzeitpotenzierung (LTP) im Gyrus dentatus, die als biochemische Grundlage für Lernen und Gedächtnis diskutiert wird. Die ‚field Excitatory Postsynaptic Potentials‘ (fEPSP) wurden über einem Zeitraum von 6h nach Setzen eines tetanischen Stimulus aufgezeichnet. Beim ‚Morris Water Maze‘-Test (MWM-Test) wurden die Mäuse einem Schwimmtest unterzogen, bei dem die Tiere in einem Wasserbassin eine Plattform finden mussten, die unter der Wasseroberfläche lag. Die Plattform lag der Ecke genau gegenüber, in der die Tiere ins Wasser gesetzt wurden. Das Lernen der *Mas*-Knockout-Tiere im MWM-Test war nicht signifikant beeinflusst. Dagegen zeigten *Mas*-defiziente Mäuse erhöhte Angst im ‚Elevated Plus Maze-Test‘ (EPM). Dabei wurden Wildtyp- und *Mas*-defiziente Tiere auf einem überhöhten Kreuz beobachtet (eine Bahn mit 10 cm Randbegrenzung, die andere ohne Randbegrenzung), um die natürliche Aversion beider Gruppen vor dem offenen Feld zu testen. Die Anzahl der Eintritte in die Arme des offenen Kreuzes wurden gezählt. Es stellte sich heraus, dass die Verhaltens-

änderungen geschlechtsspezifisch waren und vornehmlich in männlichen *Mas*-defizienten Tieren verstärktes Angstverhalten beobachtet wurde (Walther *et al.*, 2000a).

In einer 2005 erschienen Studie wurde nachgewiesen, dass Ang-(1-7) die Induktion der LTP in der CA1-Region des Hippocampus beeinflusst. Hier wurde *Mas* auch erstmals als ein funktioneller Rezeptor im Gehirn identifiziert (Hellner *et al.*, 2005).

Im Jahre 2000 entdeckten Walther und Mitarbeiter auch, dass *Mas* offensichtlich eine wichtige Determinante in der Kontrolle der Herzrate und des Blutdrucks zu haben scheint. Dies konnte im *Mas*-knockout-Modell verifiziert werden. Insbesondere bei weiblichen Mäusen ließ sich eine deutliche Reduktion in der Variabilität der Herzrate erkennen. Ein erhöhter Sympathikus-Tonus war bei beiden Geschlechtern zu verzeichnen (Walther *et al.*, 2000b). *Mas*-defiziente Mäuse hatten deutliche kardiale Funktionseinschränkungen, die teilweise durch einen Wechsel der Kollagenexpression zu einem profibrotischen Profil erklärt werden konnten (Santos *et al.*, 2006).

1.2 Die Rezeptoren der Mrg-Familie

In den letzten Jahren wurde eine Familie G-Protein gekoppelter Rezeptoren (GPCR) in Mäusen, Ratten und Menschen entdeckt, deren Gene eine hohe Sequenzhomologie zum *Mas*-Protoonkogen aufwiesen (Dong *et al.*, 2001; Lembo *et al.*, 2002; Young *et al.*, 1986; Anlage 1). Die entsprechenden Genprodukte wiesen ebenfalls die sieben transmembranären Regionen mit einem extrazellulär gelegenen N-Terminus und dem intrazellulär gelegenen C-Terminus auf. Zu den Mrgs, gehören ca. 50 GPCRs, die in die Subfamilien MrgX, (MrgX1, MrgX2), MrgA, MrgB, MrgC und MrgD eingeteilt werden und zu denen der *Mas*-Rezeptor, der MRG-Rezeptor und der MrgF-Rezeptor (früher RTA-Rezeptor) gehören. Sie wurden in spezifischen Subpopulationen von sensorischen Neuronen gefunden (Dong *et al.*, 2001). Ein cDNA-Sequenz-Vergleich von *Mas*-Rezeptor und *Mas*-Sequenz-ähnlichen-Rezeptoren ist in den Anlagen 4 und 5 dargestellt.

Bei Mäusen und Ratten weist die Expression der Mrg-Rezeptoren eine große Homologie auf. Sie 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). 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).

Aufgrund von Sequenzhomologien wird die murine Mrg-Familie in drei bedeutende Subfamilien geteilt: MrgA, MrgB und MrgC (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. Im Gegensatz zu der umfangreichen Sequenzvielfalt der Maus-Subfamilien wurden nur maximal sieben intakte humane MrgX-Sequenzen (MrgX1-7) sowie neun Pseudogene identifiziert. Zusätzlich zu den drei großen murinen Mrg-Subfamilien wurden sechs weitere Mrg-Gen-Einzelkopien beschrieben: *MrgD*, *MrgE*, *MrgF* (RTA), *MrgG*, *MrgH* (GPR90) und *Mas* mit größtenteils humanen Homologien (Dong *et al.*, 2001; Lembo *et al.*, 2002; Choi *et al.*, 2003). Obwohl viele der humanen MrgX-Rezeptoren keine Homologien in Nagetieren aufweisen, konnte bereits teilweise eine funktionelle Charakterisierung dieser Gene erfolgen (Dong *et al.*, 2001; Bender *et al.*, 2002; Han *et al.*, 2002; Lembo *et al.*, 2002; Robas *et al.*, 2003).

1.2.1 Der MRG-Rezeptor

Der codierende Bereich des ‚*Mas-related-gene*‘ (MRG) ist intronlos und weist auf Proteinebene eine 35%ige Sequenzhomologie zu Mas auf (Monnot *et al.*, 2001). Der MRG-Rezeptor wurde analog zum Mas-Rezeptor (1.3.1) hinsichtlich seiner Antwort auf Angiotensine (Ang) untersucht. Es zeigte sich, dass sich die elektrophysiologischen Antworten auf Ang-Peptide bei *Xenopus*-Oozyten, in die MRG-mRNA injiziert worden war, erhöhten (Jackson *et al.*, 1988). Deshalb wurde eine funktionelle Ähnlichkeit zum Mas-Protein postuliert. Die mRNA von MRG wurde in CHO-Zellen, COS-Zellen und *Xenopus*-Oozyten nachgewiesen, konnte jedoch nicht in Geweben von Ratten und Menschen (Gehirn, Hypothalamus, Kleinhirn, Uterus, Hoden, Herz, Aorta, Lunge, Nebenniere und Leber) detektiert werden. Weder in transfizierten *Xenopus*-Oozyten noch in COS- oder CHO-Zellen konnte eine Bindung von Ang II an die Zelloberfläche nachgewiesen werden (Monnot *et al.*, 1991). Ein endogener Ligand ist für MRG bis dato nicht identifiziert worden.

1.2.2 Der MrgF-Rezeptor

Der MrgF-Rezeptor - früher RTA-Rezeptor (‚Rat thoracic aorta‘-Rezeptor) genannt - ist ein Mitglied der GPCR-Familie und wurde durch ‚Screening‘ genomischer Ratten- und thorakalen Aorten-cDNA isoliert (Ross *et al.*, 1990). Es handelt sich um ein aus 343 As bestehendes Protein mit einer relativ nahen Verwandtschaft zum Mas-Protein (34%) (Lipman & Pearson, 1985) und MRG-Protein (29%). Für den MrgF-Rezeptor wurde eine hohe mRNA-Expressionsrate im

Kleinhirn von Ratten und eine hohe Konzentration im Darm, im Vas deferens, im Uterus und der Aorta nachgewiesen. Dagegen ist *MrgF*-mRNA kaum in Leber, Niere, Lunge und den Speicheldrüsen detektierbar (Northern Blot-Analyse). Ein Nachweis für eine Interaktion mit Ang II 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.

1.2.3 Die MrgX2-, MrgX1- und MrgD-Rezeptoren

Inzwischen wurden Mas-ähnliche Rezeptoren entdeckt, zu denen der MrgX2, der MrgX1- und der MrgD-Rezeptor gehören, die von der Firma Aventis (Frankfurt, BRD) zunächst als ‚Mas-Like1‘-, ‚Mas-Like2‘- und ‚Mas-Like3‘-Rezeptor bezeichnet wurden und in dieser Nomenklatur nicht in der Literatur zu finden sind. Der ‚Mas-Like1‘-Rezeptor entspricht in der Literatur dem humanen MrgX2-Rezeptor (Robas *et al.*, 2003), der Mas-Like2‘ dem MrgX1-Rezeptor oder SNSR3/4 (Lembo *et al.*, 2002) und ‚Mas-Like3‘ dem MrgD (auch TGR7; Dong *et al.*, 2001, Shinohara *et al.*, 2004).

Von Lembo *et al.* (2002) konnte gezeigt werden, dass der MrgX1-Rezeptor in den sensorischen Neuronen des Menschen und der Ratte lokalisiert ist. Man spricht deshalb auch von der Familie der sensorisch Neuronen-spezifischen GPCRs (SNSRs). Sie werden durch das ‚bovine adrenal medulla peptide 22‘ (BAM22) aktiviert, einem Gen-Produkt des Proenkephalin A. Der MrgX1-Rezeptor unterscheidet sich von dem klassischen Opioid-Rezeptor dadurch, dass er nur eine geringe Aktivierung nach Opioid-Liganden-Stimulation aufweist und insensitive für den Opioid-Antagonisten Naloxon ist. Dem MrgX1-Rezeptor wird eine Funktion in der Schmerzregulation zugesprochen (Lembo *et al.*, 2002).

Das humane MrgX2-Gen ist auf dem Chromosom 11p15 lokalisiert und codiert auf zwei Exons die 330 Aa des Rezeptors. Der Rezeptor wird in den sensorischen Nervenzellen des menschlichen peripheren Nervensystems exprimiert und ist an der Signalübertragung des Schmerzes beteiligt (Robas *et al.*, 2003). 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. Zellen, die mit Cortistatin-14 (CST-14) stimuliert wurden, zeigten dabei die stärkste Affinität zum MrgX2-Rezeptor (höchster Ca²⁺-Anstieg). Bei Menschen spielt CST-14 in der Induktion von „slow waves sleep“, der Hemmung von lokomotorischer Aktivität und der Inhibition der Zell-

proliferation, eine Rolle (de Lecea *et al.*, 1996; Cassoni *et al.*, 2002). Des Weiteren wurde MrgX2 auch als Rezeptor für das Proadrenomedullin N-terminal 20 As 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 und 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 Ganglienzellen, sondern auch in den adrenalen Chromaffin-Zellen exprimiert wird.

Auch der MrgD-Rezeptor, der auf nur einem Exon codiert wird, konnte vornehmlich in den dorsalen Ganglienzellen der Ratte detektiert werden und wird dort überwiegend in den Schmerzneuronen exprimiert und mit P₂X₃ colokalisiert (Dong *et al.*, 2001, Zylka *et al.*, 2003). In Versuchen an CHO-Zellen, die den Rezeptor exprimieren, wurde gezeigt, dass β-Alanin offenbar den Ca-Influx in die Zellen erhöht (Shinohara *et al.*, 2004). Damit gilt β-Alanin als ein spezifischer Ligand des MrgD-Rezeptors und agiert funktionell bei der Modulation des neuropathischen Schmerzes.

1.2.4 Der *MrgH*-Rezeptor

Das murine GPR 90-Gen (*mGPR90*) wurde 2001 von Wittenberger und Mitarbeitern zusammen mit den GPCRs GPR84, GPR86, GPR87, GPR91 vorgestellt und ist auf Chromosom 17 der Maus lokalisiert. Es codiert für ein Genprodukt (MrgH, von der Firma Aventis ‘Mas-Like4’-Rezeptor genannt) aus 321 As. Die mRNA des Gens wurde in hohen Konzentrationen im Herzen, in niedrigerer Konzentration in der Niere der Maus detektiert (Northern Blot-Analyse) und konnte aus einer Neuroblastom-Gliom-Zelllinie amplifiziert werden. Das *mGPR90*-Gen zeigt eine relativ nahe Verwandtschaft zum *Mas*-Protoonkogen der Ratte (43% Übereinstimmung), der Maus und des Menschen (jeweils 42% Übereinstimmung) (Wittenberger *et al.*, 2001). Bislang wurde weder ein Ligand noch ein homologer humaner MrgH-Rezeptor identifiziert (Zylka *et al.*, 2003; Pena & Pereira-Smith, 2007).

1.3 Das Renin-Angiotensin-System

1.3.1 Der Aufbau des Renin-Angiotensin-Systems

Das Renin-Angiotensin-System (RAS) ist eine Kaskade von verschiedenen Hormonen und Enzymen, welches in die Regulation der kardiovaskulären Physiologie, der Homöostase und Zellfunktion involviert ist. Das aus den juxtaglomerulären Zellen der Niere sezernierte Renin spaltet zunächst das in der Leber gebildete Angiotensinogen (AOGEN) zu Angiotensin I (Ang I). Das entstehende Dekapeptid Ang I ist selbst offenbar weitgehend biologisch nicht aktiv, sondern wird nachfolgend durch verschiedene Proteasen in biologisch aktive Peptide wie Ang II [Ang-(1-8)], Ang III [Ang-(2-8)], Ang IV [Ang-(3-8)], Ang-(1-7) und Ang-(1-9) umgewandelt (Abb.1.3).

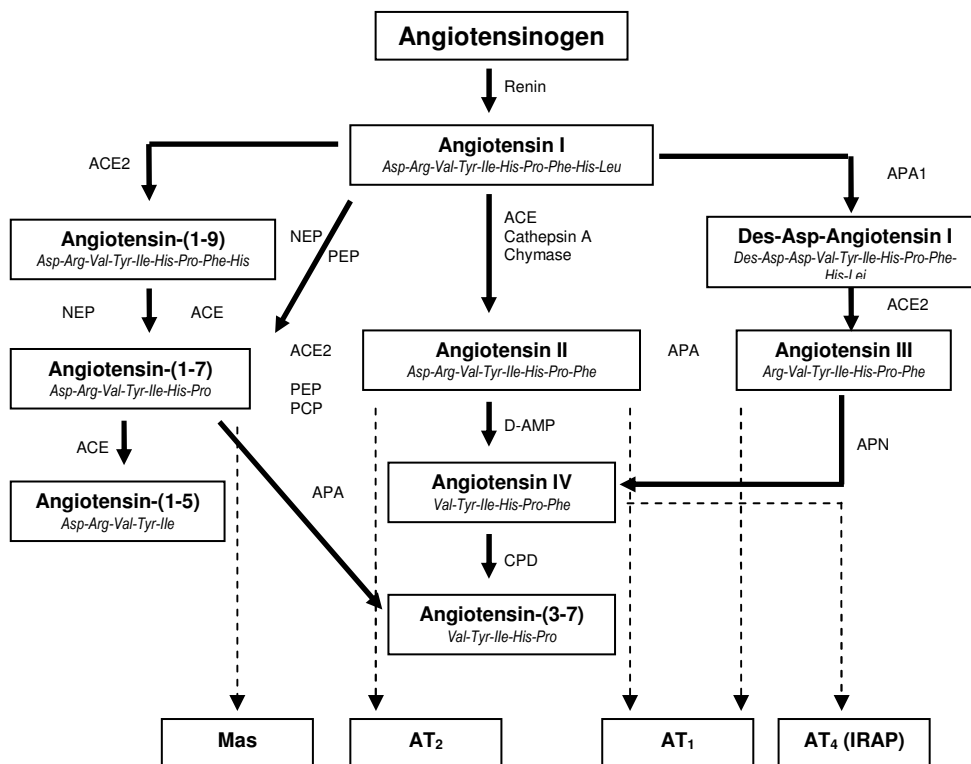


Abb. 1.3: Schematische Darstellung des Renin-Angiotensin-Systems. Von Bedeutung ist, dass die bioaktiven Ang-Metabolite Ang-(1-7) und Ang IV ihre Wirkung über eigene Rezeptoren initiieren. A-779=Ang-(1-7)-Rezeptor-Antagonist, ACE=Angiotensin-Converting-Enzyme, APN= AminopeptidaseN, APA=AminopeptidaseA,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

So wird Ang I z.B. in Gegenwart von dem Angiotensinkonversionsenzym (ACE) in das Oktapeptid Ang II überführt. Diese Konversion findet vornehmlich auf der vaskulären

endothelialen Oberfläche der Lungen und in geringerem Maße in den peripheren Gefäßen und anderen Geweben statt (Campbell *et al.*, 1987). Ang II galt lange als das einzige biologisch aktive Peptid des RAS, das bei der Pathogenese des arteriellen Hochdrucks, der renalen Dysfunktion und des kongestiven Herzinfarkts eine Rolle spielt. Es wirkt über die beiden Rezeptoren AT1 und AT2, welche pharmakologisch unterschiedlich beeinflussbar sind, jedoch eine 34%ige Sequenzhomologie aufweisen (Ichicki *et al.*, 1995).

1.3.2 Struktur und Funktion der beiden Ang II-Rezeptoren

1.3.2.1 Der AT1-Rezeptor

Wie in verschiedenen Untersuchungen gezeigt werden konnte, vermittelt der AT1-Rezeptor die meisten kardiovaskulären Effekte sowie die meisten peripheren und zerebralen Wirkungen des Ang II (Murphy *et al.*, 1991; Wright & Harding *et al.*, 1994, 1995; de Gasparo *et al.*, 2000; Touyz & Berry, 2002; Carey & Siragy, 2003, Review). Der AT1-Rezeptor weist ebenfalls die typische sieben-transmembranäre Struktur der GPCRs auf und durch eine Ang II-Bindung wird eine Konformationsänderung des Rezeptormoleküls induziert. Der veränderte Rezeptor kann dann mit G-Proteinen interagieren (Pobiner *et al.*, 1985), so dass intrazellulär die Tyrosinkinase (Tsuda *et al.*, 1991), die Serin/Threoninkinase (Robinson *et al.*, 1997) und die Proteinkinase C (Ushio-Fukai *et al.*, 1998) aktiviert werden. Durch die ebenfalls aktivierte membrangebundene NADH/NADPH-Oxidase kommt es in vaskulären glatten Muskelzellen (‘VSMCs’) (Griendling *et al.*, 1994; Ushio-Fukai *et al.* 1996) und Endothelzellen (Zhang *et al.*, 1999) zur Freisetzung von freien Radikalen (Superoxide), die an der Pathogenese der Hypertonie und Arteriosklerose beteiligt sind (Rajagopalan *et al.*, 1996). Nachgewiesen wurde der Rezeptor in Blutgefäßen, dem Herzen, der Niere, der Nebenniere, der Leber, dem Gehirn und der Lunge. Die Existenz zweier Subtypen des AT1-Rezeptors (AT1_a- und AT1_b) konnte bislang nur in Nagetieren anhand von pharmakologischen Daten (Ernsberger *et al.*, 1992; Zhou *et al.*, 1993) und molekularen Klonierungsergebnissen (Elton *et al.*, 1992; Iwai & Inagami, 1992; Kakar *et al.*, 1992a; Ye & Healy, 1992) erbracht werden.

Die Ergebnisse von *in-vitro*- und *in-vivo*-Studien unterstützten die Vorstellung, dass Ang II durch Vermittlung über den AT1-Rezeptor direkt an der Pathogenese von unterschiedlichen kardiovaskulären und renalen Krankheiten beteiligt ist. Viele selektive und potente AT1-Rezeptorantagonisten wurden entwickelt und einige bereits als Pharmaka, wie u.a. Losartan, Candesartan und Valsartan in den letzten Jahren klinisch zur Therapie des Bluthochdrucks eingesetzt.

1.3.2.2 Der AT2-Rezeptor

Der AT2-Rezeptorsubtyp wird während der Entwicklung von fetalem Gewebe und während der Organmorphogenese in hohem Maße exprimiert (Tsutsumi & Saavedra, 1991). Außerdem scheint er eine Rolle bei der Apoptose zu spielen. In verschiedenen Zelltypen wie Endothelzellen, neonatalen Kardiomyozyten, Fibroblasten und VSMCs sind antiproliferative Effekte des AT2-Rezeptors nach Ang II-Stimulation beschrieben worden (Stoll *et al.*, 1995; van Kesteren *et al.*, 1997; Horiuchi *et al.*, 1998; Unger *et al.*, 1999, Review). Von Matsukawa *et al.* (1997) wurde der AT2-Rezeptor als ein Inhibitor der Angiogenese diskutiert. Im Gegensatz zum AT1-Rezeptor hemmt der AT2-Rezeptor die Guanylatcyclase und aktiviert eine Phosphotyrosinphosphatase (Blume *et al.*, 1999; Horiuchi *et al.*, 1999; Millat. *et al.*, 1999). Als selektiver AT2-Rezeptoragonist gilt CGP42112, während PD123177, PD123319 (PD) und verwandte Analoge (Chiu *et al.*, 1989; Wong *et al.*, 1990; Bumpus *et al.*, 1991; Smith *et al.*, 1992; Bottari *et al.*, 1993) zu den Antagonisten zählen.

1.3.3 Das Angiotensin I und seine Aminoabkömmlinge

Angiotensin I (Ang I) ist ein Dekapeptid und Prohormon. Es wird im Organismus durch Renin enzymatisch aus Angiotensinogen gebildet. Ang I ist selbst weitgehend inaktiv, kann aber durch verschiedene Proteasen in biologisch aktive Peptide umgewandelt werden. Die biologisch aktiven Aminoabkömmlinge des Ang I sind: Ang II [(Ang-(1-8)], Ang III [Ang-(2-8)], Ang IV [Ang-(3-8)] und Ang-(1-7). Beteiligt sind dabei Enzyme wie ACEs, Prolylendopeptidasen, Carboxypeptidasen oder Aminopeptidasen. So entsteht Ang II z.B. mittels ACE oder Chymase aus Ang I (Abb. 1.3).

1.3.4 Das Angiotensin II und seine Funktion

Das Oktapeptid Ang II spielt eine wichtige Rolle in der Regulation der elektrolytischen und hämodynamischen Balance des RAS. Physiologisch wirkt Ang II [Ang-(1-8)] über die beiden Rezeptoren AT1 und AT2 und hat dabei eine systemische und lokale Wirkung. Systemisch wirkt Ang II einerseits über die direkte Aktivierung der AT1-Rezeptoren an der glatten Gefäßmuskulatur, 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 Ang II beeinflussen die normale und pathologische Physiologie der Gefäßwand (Dubey *et al.*, 1995; Kato *et al.*, 1991) und können Hypertonien induzieren. Die meisten Effekte von Ang II auf das kardiovaskuläre System und die Flüssigkeitshomöostase er-

folgen dabei über den AT1-Rezeptor (Smith *et al.*, 1992; Bottari *et al.*, 1993). Außerdem kann zirkulierendes Ang II 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 Ang II am Herzen positiv ino- und chronotrop (Lindpaintner *et al.*, 1991a, b). Auch eine Beteiligung des lokal gebildeten Ang II bei der Entstehung der kardialen Hypertrophie, dem ventrikulären Remodellieren nach Myokardinfarkt und die Ausprägung einer hypertensions-bedingten Fibrose wird diskutiert (Dostal *et al.*, 1992). Auch hierbei scheint der AT1-Rezeptor die meisten Effekte des Ang II zu vermitteln (Murphy *et al.*, 1991; de Gasparo *et al.*, 2000; Touyz *et al.*, 2002; Carey *et al.*, 2003).

1.3.5 Das Angiotensin III als vasopressorisches Peptid

Ang III [Ang-(2-8)] ist ein C-terminales Fragment des Ang II, das durch das Enzym Aminopeptidase A gebildet wird. Es spielt eine wichtige Rolle bei Ang-Blutdruckantworten im Gehirn, die über den AT1-Rezeptorsubtyp vermittelt werden (Wright *et al.*, 1996) und ruft eine Freisetzung von Vasopressin hervor. Dies führt zusätzlich zu einer Erhöhung des Blutdrucks. In der Peripherie hat Ang III in Hinblick auf den Pressoreffekt eine wesentlich schwächere Potenz als Ang II, jedoch gilt Ang III als potenter, wenn man es iontophoretisch in die paraventrikulären Neurone appliziert (Harding *et al.*, 1986). Beide Peptide stimulieren den Salzappetit und die Drüsenhormonproduktion (Wright *et al.*, 1992).

Ang III ist ein potentes Hormon der Aldosteronfreisetzung und führte von den ursprünglich untersuchten Angiotensinen zur signifikantesten Ca^{2+} -Freisetzung in *Mas*-transfizierten Zellen (Jackson *et al.*, 1988; Janssen *et al.*, 1988). Lin *et al.* (2001) konnten zeigen, dass intrazerebroventrikuläre (ICV) Injektion von Ang III eine Reduktion des Barorezeptorreflexes, der Herzrate und eine Erhöhung des mittleren arteriellen Drucks generierte. Im Jahr 2000 entdeckten Rodriguez-Campos und Mitarbeiter, dass Ang III auf hypothalamischer Ebene als ein Modulator noradrenerger Transmission agiert und dies über den AT1-Phospholipase C-Signaltransduktionsweg erfolgt. Ang III kann in Ang IV konvertiert werden und so den postulierten AT4-Rezeptorsubtyp aktivieren (Wright *et al.*, 1997).

1.3.6 Das Angiotensin IV und der Ang IV-Rezeptor

Bei Ang IV [Ang-(3-8)] handelt es sich nicht um ein inaktives Angiotensin II-Fragment, sondern um ein vollwertiges echtes Hormon. Als physiologische Wirkungen konnten für Ang IV eine

Stimulierung des Anstiegs der intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration sowie eine Induzierung des Anstiegs des Blutflusses in der Nierenarterie (Harding *et al.*, 1994) nachgewiesen werden. Darüber hinaus wirkt Ang IV in den Lungengefäßen vasokonstriktorisch (Cheng *et al.*, 1994; Nossaman *et al.*, 1995). Bis heute konnte man dem Ang IV mehrere Wirkungen nachweisen, die denen des Ang II entgegengesetzt oder gleichgerichtet sind (Kramar *et al.*, 1997; Wayner *et al.*, 2001).

Ang IV bindet an einen Rezeptor, der als ‚insuline regulated membrane aminopeptidase‘ (IRAP) beschrieben wurde und als der eigentliche AT4-Rezeptor gilt. Die identifizierten, spezifischen Bindungsstellen unterscheiden sich strukturell von den typischen AT1- und AT2-Rezeptoren (Swanson *et al.*, 1992; Hall *et al.*, 1993, 1995; Wyse *et al.*, 1995). Der Ang IV-Rezeptor gehört somit nicht zu den GPCRs (Albiston *et al.*, 2001). Strukturell handelt es sich bei diesem Rezeptor um eine in der Membran lokalisierte und durch Insulin regulierte Aminopeptidase (IRAP), über die Funktionen des Gedächtnisses (Wright *et al.*, 1992), der Niere, der Blutdruckregulation, des Neuritenwachstums und der Angiogenese vermittelt werden. Der Rezeptor 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).

Experimentell gelang der Nachweis, dass Ang IV und LVV-hemorphin-7 den Ang IV-Rezeptor durch Enzymhemmung ‚aktivieren‘ (Albiston *et al.*, 2001). Damit sind Ang IV und LVV-hemorphin-7 AT4-Rezeptor-Liganden. Ang IV ist jedoch nicht an der Interaktion von Ang-(1-7) und Mas oder Ang II und den AT1- und AT2-Rezeptoren beteiligt (Albiston *et al.*, 2001).

1.3.7 Das Heptapeptid Ang-(1-7)

1.3.7.1 Die Entdeckung von Ang-(1-7) als endogenes Peptid

Bei dem Ang-(1-7) handelt es sich um ein Amino-terminales Fragment des Ang II. Als biologisch aktives RAS-Peptid (Santos *et al.*, 2000) zählt es zu den pleiotropen Metaboliten des Ang II, dessen Wirkungen mit denen des Ang II identisch, gleichgerichtet oder konträr sind. Das Peptid wird in großen Mengen gebildet, so beträgt die Konzentration im zirkulierenden humanen Blutplasma 1,0–9,9pmol/l (Nussberger *et al.*, 2001), 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). Ang-(1-7) vermittelt seine Wirkung nach Interaktion mit seinem Rezeptor über die Freisetzung von Prostacyclin (Jaiswal *et al.*, 1992, 1993) oder/und NO (Brosnihan *et al.*, 1996, 1998; Heitsch *et al.*, 2001).

Durch Inkubation von Homogenaten der dorsomedialen und ventrolateralen Medulla von Kaninchen mit ^{125}I -Ang I oder ^{125}I -Ang II konnte zum einen nachgewiesen werden, dass Ang-(1-7) das entstehende Hauptprodukt war, zum anderen zeigte sich aber auch, dass die Generierung von Ang II *in vitro* bei Anwesenheit des ACE-Hemmers Enalaprilat verhindert wurde, während er auf die Ang-(1-7)-Konzentration keinen Effekt hatte.

1.3.7.2 Die Arachidonsäurefreisetzung durch Ang-(1-7)

Die genauen Signaltransduktionsmechanismen für Ang-(1-7) und Ang II 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).

AA wird in vaskulären glatten Muskelzellen durch eine Lipoxygenase zu Hydroxyeicosatetrasäure metabolisiert (Natarajan *et al.*, 1994). Experimentelle Daten belegen, dass die Freisetzung von AA zur Prostaglandinproduktion über verschiedene Ang-Rezeptortypen erfolgen kann. So konnten Jaiswal *et al.* (1993) zeigen, dass Ang-(1-7) die Synthese von Prostaglandin E₂ und Prostaglandin I₂ in aortalen Endothelzellen beim Schwein über einen bislang unbekanntem Rezeptorsubtyp stimuliert. Der Effekt konnte durch hohe Konzentrationen von Losartan (ein AT1-Rezeptorantagonist) geblockt werden. Ferner konnte nachgewiesen werden, dass Ang II und Ang-(1-7) bei Zellen, die mit Tritium-Arachidonsäure ($[^3\text{H}]$ AA) vorbehandelt waren, zu einem AA-Anstieg führten. Dieser konnte wiederum durch den AT2-Rezeptor-Antagonist PD123319 (PD) verhindert werden. Im Gegensatz dazu hemmte der Ang-(1-7)-Antagonist D-Ala-Ang-(1-7) (A779) die AA-freisetzenden Effekte von Ang-(1-7), nicht jedoch die von Ang II (Muthalif *et al.*, 1998).

Das ursprüngliche Konzept, welches Ang-(1-7) als ein inaktives Produkt des RAS ansah (Yang *et al.*, 1968; Greene *et al.*, 1982), wurde mittlerweile durch ein neues ersetzt, in dem Ang-(1-7) in großer Menge produziert und mögliche selektive zentrale und periphere Wirkungen ausübt (Chappell *et al.*, 1990; Santos *et al.*, 1990; Kohara *et al.*, 1991; Welches *et al.*, 1991; Santos *et al.*, 1992; Santos *et al.*, 2000, Review; Santos *et al.*, 2005).

1.3.7.3 Zentrale Wirkungen von Ang-(1-7)

Physiologisch handelt es sich bei Ang-(1-7) um ein regulatives Neuro-Peptid, welches in die neuroendokrine Kontrolle der Vasopressinfreisetzung eingreift (Felix *et al.*, 1991). Immuno-

reaktive Anreicherungen von Ang-(1-7) wurden im paraventrikulären, supraoptischen und supra-chiasmatischen Nucleus und in der Neurohypophyse gefunden (Block *et al.*, 1988). Nach Mikroinjektion von Ang-(1-7) in die dorsomediale Medulla von Ratten kam es zu vaso-depressorischen und bradykarden Wirkungen (Campagnole-Santos *et al.*, 1989, 1990). Darüber hinaus erhöhte Ang-(1-7) die neuronale Aktivität in medullären und hypothalamischen Nuclei (Barnes *et al.*, 1990; Felix *et al.*, 1991; Diz & Perro, 1992). Der exzitatorische Effekt auf paraventrikuläre Neurone (Ambuhl *et al.*, 1992) und die Freisetzung von Prostaglandinen in kultivierten Endothelzellen des Schweines durch Ang-(1-7) konnten total oder partiell durch PD gehemmt werden (Jaiswal *et al.*, 1992). Durch die Untersuchungen von Collister und Mitarbeitern (2003) wurde die Hypothese bestätigt, 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. Die antihypertensive Wirkung von Ang-(1-7) wurde von Gironacci *et al.* (2004) durch Untersuchungen an hypertensiven Ratten bestätigt.

1.3.7.4 Periphere Wirkungen von Ang-(1-7)

Experimentell bewirkte Ang-(1-7) eine Vasodilatation durch Stimulation der Produktion von Prostaglandinen und Stickstoffmonoxid (Osei *et al.*, 1993). Brosnihan *et al.* (1996) konnten zeigen, dass Ang-(1-7) vasodilatatorisch in die Druckregulation der Koronararterien bei Hunden eingreift und damit gegenläufige Wirkungen wie Ang II zeigte. Ferner konnten an Ratten hypotensive, Ang-(1-7)-vermittelte Effekte nicht durch AT1- und AT2-Antagonisten gehemmt werden (Benter *et al.*, 1993), so dass für Ang-(1-7) ein AT1- und AT2- unabhängiger Rezeptor vermutet wurde. Ferrario und Mitarbeiter beschrieben 1997 für Ang-(1-7) und Ang II hinsichtlich der Blutdruckregulation gegenläufige Effekte und konnten darüber hinaus zeigen, dass Ang-(1-7) an isolierten Rattenherzen protektiv gegenüber einer ischämieinduzierten kardialen funktionellen Dekompensation und kardialen Arrhythmien wirkt (Ferreira *et al.*, 2001). In der Niere bewirkt Ang-(1-7) eine Änderung der tubulären Natrium- und Bikarbonatresorption, reduziert die Aktivität der Na⁺-K⁺-ATPase und induziert Diurese und Natriurese. So fand die Arbeitsgruppe von Santos und Walther 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. Die natriuretischen Effekte von Ang-(1-7) sind assoziiert mit der Freisetzung von Prostaglandinen, insbesondere PGI₂ (Hilchey *et al.*, 1995).

Ferner kann Ang-(1-7) das Zellwachstum hemmen, so wurde u.a. durch Aktivierung eines Ang-Rezeptors das Tumorzellwachstum beim humanen Lungencarcinom inhibiert (Gallagher & Tallant, 2004) und durch Aktivierung des Mas-Rezeptors das Wachstum von Cardiomyozyten (Tallant *et al.*, 2005).

Entgegen ursprünglicher Annahmen konnte mittlerweile nachgewiesen werden, dass Ang-(1-7) durch die ACE2-Peptidase direkt aus Ang II gebildet werden kann (Donoghue *et al.*, 2000; Tipnis *et al.*, 2000). Aktuell wird auch diskutiert, ob das ACE2-Ang-(1-7)-Mas-System als der hauptgegenregulatorische Mechanismus der ACE-AngII-AT₁-Axis angesehen werden kann (Santos *et al.*, 2007).

1.3.8 Der spezifische Ang-(1-7)-Antagonist A779

Santos und Mitarbeiter (1994) konnten D-Ala⁷-Ang-(1-7) (A779) als einen potenten und selektiven Antagonisten von Ang-(1-7) identifizieren. A779 blockiert die antidiuretischen Effekte von Ang-(1-7) in Ratten und antagonisiert die Veränderungen des nach Injektion von Ang-(1-7) in die dorsomediale und ventrolaterale Medulla produzierten Blutdruckanstiegs (Abdul *et al.*, 1994; Fontes *et al.*, 1994). Auch die stimulatorischen Effekte von Ang-(1-7) auf die neuronale Aktivität im paraventriculären Kern des Hypothalamus werden durch A779 gehemmt. Dagegen zeigt A779 keine Wirkung auf die dipsogenen, pressorischen oder myotropen Effekte von Ang II oder auf die Effekte verwandter Peptide wie Ang III, Vasopressin, Bradykinin oder Substanz P in Ratten (Santos *et al.*, 1994; Santos *et al.*, 2000, Review). In weiterführenden Zellexperimenten konnte darüber hinaus gezeigt werden, dass Ang-(1-7) an Mas-transfizierte CHO- und COS-Zellen bindet und zu einer gesteigerten AA Freisetzung führte, welche wiederum durch die Inkubation mit dem Ang-(1-7)-Antagonisten A779 vollständig aufgehoben werden konnte. Damit gelang in diesen Bindungsstudien erstmalig der Nachweis, dass Ang-(1-7) ein funktioneller und endogener Ligand des Mas-Rezeptors ist (Santos *et al.*, 2003).

1.3.9 Das „neue“ Renin-Angiotensin-System

Aufgrund aktueller Forschungsergebnisse hat sich die ursprüngliche Sicht auf das RAS als ein einfaches biologisch aktives Hauptendprodukt-System grundlegend verändert. Heute geht man von einem flexiblen Konzept eines multiplen Mediator-Systems aus. Neben dem wichtigen biologisch aktiven Ang II-Peptid wurden inzwischen weitere, biologisch aktive Metabolite wie Ang III, Ang IV und Ang-(1-7) identifiziert und charakterisiert (Ferrario *et al.*, 2002).

Für erste funktionelle Untersuchungen des Systems wurden Frosch-Oozyten mit menschlicher *Mas*-mRNA transfiziert und mit Ang I, Ang II und Ang III stimuliert. Nach Stimulation mit Ang II und Ang III kam es zu einem intrazellulären Ca^{2+} -Anstieg und einer Aktivierung der DNA-Synthese, so dass für das Mas-Protein eine Ang II-Rezeptor-Funktion postuliert wurde. Diese Annahme wurde durch die weiteren Untersuchungen an Nervenzellen, COS-7-Zellen und Balb3T3-Zellen bestätigt (Jackson *et al.*, 1989; McGillis *et al.*, 1989; Andrawis *et al.*, 1991; Poyner *et al.*, 1990). Im Gegensatz dazu ließ sich der Ca^{2+} -Anstieg jedoch nicht mit den klassischen Ang II-Antagonisten [Sar1, Val5, Ala8]-Ang II und [Sar1, Val5]-Ang II blockieren. Als Hauptrezeptoren für Ang II konnten etwas später AT1- und AT2 isoliert und charakterisiert werden (Mukoyama *et al.*, 1993; Sasaki *et al.*, 1991).

Ferner dokumentierten die Arbeitsgruppen von Prof. Santos (Santos *et al.*, 2003) und Prof. Walther anhand von Zell- und Tierexperimenten, dass Ang-(1-7) ein funktioneller Ligand des Mas-Rezeptors ist. In *Mas*-transfizierten COS-Zellen führte die Stimulation von Mas mit Ang-(1-7) zu einer AA-Freisetzung. Für weiterführende Untersuchungen wurden HEK293-Zellen mit *Mas*-cDNA in steigender Konzentration transfiziert und die Luziferase-Produktion (Dual-Luciferase-Assay), die durch das SRE („Serum Response Element“) initiiert wird, ermittelt. Das SRE kann sowohl von Rac als auch von Rho aktiviert werden. Die Luziferase-Produktion nahm dosisabhängig zu und wurde nicht durch Ang-(1-7) und A779 beeinflusst. In weiteren Experimenten konnte die Involvierung von G_{α} in den konstitutiv aktiven Übertragungsweg nachgewiesen werden. Diese Daten belegen die konstitutive Aktivität des Mas-Rezeptors (Gembardt *et al.*, 2005), welche zu den mitogenen Eigenschaften von Mas beiträgt. Tierexperimentell konnte die Bindung von Ang-(1-7) an den Mas-Rezeptor im Knock-out-Modell bestätigt werden. Die Bindung von iodiniertem Ang-(1-7) an Nierenabschnitte bei *Mas*-Knockout-Mäusen wurde im Vergleich zu dem Wildtyp verhindert. Auch der anti-diuretische Effekt des Peptids wurde in *Mas*-defizienten Tieren vollkommen aufgehoben. Ferner verloren Aorten von *Mas*-defizienten Tieren die Fähigkeit, nach Hinzugabe von Ang-(1-7) zu relaxieren (Santos *et al.*, 2003).

Bei dem Enzym ACE wiederum handelt es sich um ein Glykoprotein, welches das inaktive Ang I in das biologisch aktive Ang II hydrolysiert. ACE existiert sowohl in einer löslichen als auch in einer membrangebundenen Form. Letztgenannte ist dabei auf verschiedenen Zelltypen wie vaskulären Endothelzellen, Epithelzellen (in der Niere) und neuroepithelialen Zellen begrenzt (de Gasparo *et al.*, 2000, Review).

Auch wenn das Heptapeptid Ang-(1-7) als ein Ang I-Hauptprodukt unabhängig von der klassischen Angiotension-Konversionsenzym (ACE)-Kaskade generiert wird (Santos *et al.*,

1990), konnte jedoch gezeigt werden, dass die Konzentration von Ang-(1-7) nach ACE-Inhibition anstieg (Lawrence *et al.*, 1990; Kohara *et al.*, 1991, 1993; Luque *et al.*, 1996; Yamada *et al.*, 1999). Die Autoren schlussfolgerten, dass der Anstieg zum einen durch einen Ang I-Konzentrationsanstieg, zum anderen durch die verminderte Katabolisierung des Peptids durch ACE hervorgerufen wurde (Iyer *et al.*, 1998; Chappell *et al.*, 1998). Somit scheint Ang-(1-7) sowohl ein Substrat als auch ein endogener Inhibitor der Carboxyldomäne des somatischen ACE zu sein (Erdös *et al.*, 1997). Bei der ACE2 handelt es sich um eine Zink-Metalloprotease mit signifikanter Homologie zu ACE, welche aus Ang I Ang-(1-9) und aus Ang II Ang-(1-7) formt und in der ACE2-Ang-(1-7)-Mas-Achse wirkt (Abb. 1.3). Diese Achse wirkt der klassischen ACE-Ang II-AT1-Achse innerhalb des RAS dadurch entgegen, dass die hervorgerufenen Effekte opponiert werden.

Neuere Studien befassen sich mit der Heterodimerisation von GPCRs. Die Heterodimerisation zwischen Rezeptoren bringt oft eine Veränderung von Rezeptoreigenschaften mit sich und lässt sich durch Bindung eines Liganden beeinflussen. So konnte zum Beispiel in den Untersuchungen von Kostenis und Mitarbeitern (2005) gezeigt werden, dass Mas mit dem AT1-Rezeptor einen hetero-oligomeren Komplex bildet und der Rezeptor dadurch die durch Ang II hervorgerufenen Aktivitäten hemmen kann. Damit kann Mas als physiologischer Antagonist für den AT1-Rezeptor agieren. Eine Heterodimerisation wird auch für den AT2-Rezeptor und Mas angenommen (Pinheiro *et al.*, 2004; Kostenis *et al.* 2005; Castro *et al.* 2005; Canals *et al.*, 2006).

1.4 Mögliche Ang-(1-7)-unabhängige Liganden des Mas-Rezeptors

1.4.1 Die Interaktion von Mas mit Ang II und Ang III

Durch Überexpression des *Mas*-Protoonkogens wurde in neuronalen Zelllinien NG115-401L und *Xenopus*-Oozyten eine funktionelle Antwort auf Angiotensine beobachtet; dies galt für Ang II und Ang III und manifestierte sich über eine Ca^{2+} -Freisetzung und Chloridkanalöffnung (Jackson *et al.*, 1989). So wurde postuliert, dass Ang II und Ang III Liganden des Mas-Rezeptors seien. Eine Bindung von diesen Angiotensinen an *Mas* überexprimierenden Zellen wurde jedoch nie bewiesen. Es konnte jedoch gezeigt werden, dass transfiziertes *Mas* den Effekt von Angiotensinen auf Zellen erhöht, die den AT1-Rezeptorsubtyp endogen exprimierten (Ambroz *et al.*, 1991). Damit schien Mas nur die Signalübertragung von Ang II nach Interaktion mit dem AT1-Rezeptor zu verstärken. Die Frage, ob Ang II direkt als Mas-Ligand fungiert oder

ob es nur die Bindungsstärke zwischen Ang II und AT1 verbessert, blieb allerdings unbeantwortet.

Andrawis *et al.* entdeckten 1992, dass Balb 3T3-Fibroblasten offenbar endogen einen Mas-Rezeptorliganden produzierten. Dies konnte weder Ang I, Ang II noch Ang III sein, da keines der Peptide eine Ca^{2+} -Freisetzung in den Zellen hervorrief. In der Studie wurden nicht-neuronale Zelltypen wie Balb 3T3-Fibroblasten und glatte Gefäßmuskelzellen untersucht und die Ca^{2+} -Freisetzung, Inositolphosphat-Freisetzung und der zytosolische pH-Wert der Zellen nach Behandlung mit Angiotensinen gemessen. Dabei fiel auf, dass nur nach hohen Konzentrationen von Ang II und Ang III (ED_{50} $4\text{-}6 \times 10^{-5}\text{M}$) eine Antwort ausgelöst wurde. Andere Experimente konnten zeigen, dass Mas die intrazelluläre Signaltransduktion des AT1-Rezeptors nach Ang II-Stimulation moduliert (von Bohlen & Halbach *et al.*, 2000). Obwohl das Mas-Protein nicht der Hauptrezeptor des Ang II ist, der durch Bindung von Ang II zur Kontraktion der Gefäßmuskulatur führt, konnte eine direkte oder indirekte Interaktion mit Ang II nicht ausgeschlossen werden.

1.4.2 Das Peptid Substanz P als möglicher Ligand am Mas-Rezeptor

Substanz P ist ein aus 11 As bestehendes Neuro-Peptid, welches zur Gruppe der Neurokinine gehört und von Nervenzellen (Nawa *et al.* 1983) und Leukozyten produziert wird. Substanz P entfaltet seine Wirkung durch Bindung an spezifische Rezeptoren, die Neurokinin (NK)-Rezeptoren, wobei Substanz P bevorzugt an den NK1-Rezeptor und mit geringerer Affinität an den NK-2- und NK-3-Rezeptor bindet. Substanz P wurde zunächst als Neurotransmitter bei Schmerzrezeptoren und schmerzleitenden C-Fasern angesehen, spielt aber auch als Modulator von Entzündungen eine Rolle. Sie bewirkt eine starke Erweiterung der Blutgefäße, steigert die Durchlässigkeit der Gefäßwand und bewirkt eine Steigerung der Sensitivität der Schmerzneurone im Rückenmark (Goetzl *et al.*, 1985; Holzer, 1988). Zudem zeigt Substanz P mitogene Effekte, die durch Aktivierung von Transduktionswegen wie etwa über Ras-, Raf-, Mek- und Mitogen-aktivierte Proteinkinase vermittelt werden (Yang *et al.*, 2002).

In elektrophysiologischen Studien und Verhaltensstudien wurde der Beweis geliefert, dass Substanz P und Glutamat synergistisch bei der Exzitation nozizeptiver Neurone des dorsalen Horns und der Erzeugung von Schmerz wirken (Dougherty *et al.*, 1991; Rusin *et al.*, 1993; Farber *et al.*, 2004, Review).

Andrawis *et al.* zeigten 1991 erstmalig, dass Substanz P in Mas-transfizierten Fibroblasten konzentrationsabhängige Anstiege in der Ca^{2+} -Freisetzung hervorrief. Damit konnte eine in-

direkte Interaktion zwischen Substanz P und Mas nachgewiesen werden. Interessanterweise zeigte unter den Agonisten Ang II, Ang III, Substanz P und Substanz P (2-11) das Substanz P-Analog [D-Arg¹, D-Pro², D-Trp^{7,9}, Leu¹¹] (Substanz P (2-11)) die höchste Ca²⁺-Freisetzung nach Behandlung der *Mas*-transfizierten Zellen (ED₅₀ 1x10⁻⁷M), während bei den Kontrollzellen keine Antwort auf die untersuchten Substanzen hervorgerufen werden konnte. In der Reihenfolge der höchsten zur niedrigsten Ca²⁺-Freisetzung folgten Substanz P (2-11)>Ang III>Substanz P>Ang II.

1.4.3 Das Nicht-Peptid AVE0991 als Mas-Agonist

AVE0991 ist ein Nicht-Peptid, welches ähnliche Effekte wie Ang-(1-7) in verschiedenen Organen wie den Gefäßen (Wiemer *et al.*, 2002), der Niere (Pinheiro *et al.*, 2004) und dem Herzen (Benter *et al.*, 2006) hervorruft. Im Gegensatz zu dem Peptid Ang-(1-7) ist AVE0991 oral aktiv, da es gegenüber dem proteolytischen Abbau von Enzymen resistent ist. Neben Ang-(1-7) setzt AVE0991 als Ang-(1-7)-Agonist NO und Superoxid in Endothelzellen frei. Dieser Effekt konnte durch den Ang-(1-7)-spezifischen Rezeptorantagonisten A779 partiell und durch Hemmung der NO-Synthase komplett aufgehoben werden (Wiemer *et al.*, 2002). In Studien an *Mas*-transfizierten CHO-Zellen wurde die Bindung von [¹²⁵I] Ang-(1-7) an Nierenzellen durch AVE0991 sogar verhindert. AVE0991 induzierte in diesen Experimenten eine hohe NO-Freisetzung und gilt daher als ein Agonist des Mas-Rezeptors (Pinheiro *et al.* 2004).

Die Studie konnte für AVE0991 signifikante antidiuretische Effekte in C57/BL6-Mäusen aufzeigen. AVE0991 potenziert vasodilatatorische, konzentrationsabhängige Effekte in isolierten Aortenringen in Mäusen (Pinheiro *et al.* 2004) und die durch Acetylcholin hervorgerufene Vasodilatation in Wistar-Ratten (Faria-Silva *et al.*, 2005).

1.4.4 Die Neuro-Peptide NPF, NPAF und NPSF als mögliche Liganden am Mas-Rezeptor

Die so genannten FMRFamid-verwandten Peptide (Phe-Met-Arg-Phe-NH₂) Neuropeptid FF (NPF; FLFQPQRF-NH₂), Neuropeptid AF (NPAF; AGEGLSSPFWSLAAPQRF-NH₂) und Neuropeptid SF (NPSF; SQAFLFQPQRF-NH₂) wurden ursprünglich aus Mollusken, aber auch aus anderen Spezies wie *Drosophila Caenorhabditis elegans* und Rindern isoliert. Das bovine und humane NPF besteht aus acht As, NPAF aus achtzehn As und NPSF hat eine Länge von 11 As.

Das Peptid NPFF wurde im ZNS, im dorsalen Horn des Rückenmarks (RM), im Hypothalamus, der Pons-Medulla und dem neuralen Lappen der Hypophyse gefunden und verfügt über Bindungsstellen in den oberflächlichen Schichten des Hinterhorns und in Arealen um den Zentralkanal.

Die FMRFamid-ähnlichen Peptide greifen sowohl in sensorische (Kavaliers *et al.*, 1990; Oberling *et al.*, 1993), endokrine (Boersma *et al.*, 1993; Majane *et al.*, 1993) und kardiovaskuläre Funktionen (Roth *et al.*, 1987; Kivipelto *et al.*, 1992), als auch in die Verhaltensmodifikationen (Raffa *et al.*, 1990) und die intestinale Motilität bei Säugetieren ein (Raffa *et al.*, 1990; Gicquel *et al.*, 1993; Million *et al.*, 1993).

NPAF und NPFF spielen eine bedeutende Rolle in der Schmerzkontrolle und Analgesie durch Interaktion mit dem Opioid-System (Panula *et al.*, 1996, 1999; Roumy *et al.*, 1998, Review). Elektrophysiologische Studien zeigten, dass NPFF exzitatorische Effekte an kultivierten Rückenmarksneuronen der Maus besitzt und die μ -opioid (Guzman *et al.*, 1989) oder α_2 -adrenerg-induzierte (Sullivan *et al.*, 1991) Inhibition der C-Faser-vermittelten Aktivität im dorsalen Horn der Ratte supprimiert. Perry *et al.* (1997) demonstrierten, dass bovines NPFF und humanes und bovines NPAF die neuronale Aktivität im RM der Ratte modulieren, während humanes NPSF keine Aktivität zeigte. Nachdem NPFF in den Nucleus tractus solitarii (nTS) injiziert wurde, führte es zu einer Senkung der Herzrate, erhöhten Blutdruck und inhibierte die kardiale Komponente des Barorezeptorreflexes. Im Rattenversuch stellte sich NPFF als kardioaktiv heraus: es führte nach intravenöser Gabe zu einer konzentrationsabhängigen Erhöhung des Blutdrucks und der Herzrate (Roth *et al.* 1987; Allard *et al.*, 1995). In Verhaltens-tests zeigte intrathekal verabreichtes NPFF einen lang andauernden antinozizeptiven Effekt, der nach Naloxongabe teilweise reversibel war (Gouarderes *et al.*, 1993). Ferner wird NPFF nach Kalium- oder Substanz P-Stimulation aus dem RM der Ratte freigesetzt (Zhu *et al.*, 1992). In Studien, die die Inhibierung der NPFF-Bindung im RM der Ratte und olfaktorischen Bulbus der Maus durch Guanin-Nukleotide untersuchten, wurde postuliert, dass der NPFF-Rezeptor ein GPCR sein muß (Payza & Yang *et al.*, 1993; Devillers *et al.*, 1994).

Die Rezeptoren NPFF1 und NPFF2 wurden von Elshourbagy *et al.* (2000), Bonini *et al.* (2000) und Kotani *et al.* (2001) identifiziert. Im ZNS der Ratte wird NPFF1 vor allem im limbischen System und dem Hirnstamm exprimiert. NPFF2 dagegen zeigt hohe Expression im RM der Ratte. Die Verteilung der Rezeptoren zwischen Ratte und Mensch ist sehr unterschiedlich. Beim Menschen ist NPFF1 im ZNS und RM vorhanden, NPFF2 in der Plazenta. In Rattenversuchen schien NPFF1 die anti-opioiden Effekte von NPFF nach intracerebroventrikulärer Gabe zu ver-

mitteln. NPSF hatte dabei eine hohe agonistische Aktivität am NPFF1-Rezeptor, aber nur schwache Aktivität am NPFF2-Rezeptor.

Neue Studien beschäftigen sich mit der Interaktion von RFamid-Peptiden und NPFF-verwandten Peptiden, die offenbar zu einer erhöhten Sensitivität, d.h. Offenwahrscheinlichkeit von säure-sensitiven Ionenkanälen (,ASIC‘, ,acid sensing ion channels‘) führen. Bei ASIC handelt es sich um Transduktionskanäle in Nozizeptoren, die bei einem pH-Wert von 7,4 geschlossen sind und bei einem pH-Wert unter 7,0 geöffnet werden, so dass Na⁺-Ionen in die Zelle einströmen und eine Depolarisation der Zelle hervorrufen können. Es wird vermutet, dass NPFF eine Rolle in der Schmerzregulation über ASIC spielt (Yang *et al.*, 2008).

1.5 Ziel der Arbeit

Das *Mas*-Protoonkogen kodiert für den Mas-Rezeptor, einem GPCR, der aus sieben hydrophoben Domänen besteht. Dieser wurde lange als ein Ang II-Rezeptor angesehen. Nach Identifizierung neuer aktiver Peptide des RAS konnte Ang-(1-7) als ein endogener Ligand des Mas-Rezeptors charakterisiert werden. Diese Forschungsergebnisse wurden durch Zellkultur-experimente und Tierversuche gewonnen. In der vorliegenden Arbeit sollen die Wirkungen verschiedener in Zusammenhang mit Mas diskutierter Peptide (Ang I, Ang II, Ang III, Ang IV, Substanz P), Nicht-Peptide (AVE0991, PD123319, Irbesartan) und dreier Neuro-Peptide (NPFF, NPAF, NPSF) auf Rezeptoren der Mrg-Familie beschrieben werden. Es war ein erklärtes Ziel, Liganden, d. h. Agonisten und Antagonisten des Mas-Rezeptors und Mas-Sequenz-ähnlicher Rezeptoren zu identifizieren. Als Marker für eine Interaktion von den untersuchten Substanzen mit den Rezeptoren war dabei immer die gemessene Veränderung der AA-Freisetzung in den transfizierten bzw. nicht transfizierten Zellen. Damit soll die molekular-zelluläre Grundlage gelegt werden, um die Rolle der Rezeptoren und ihrer Liganden bei der Blutdruck- und Schmerzregulation und unter physiologisch-pathophysiologischen Bedingungen an Gefäßen, Herz und Neuronen zu untersuchen, um langfristig neue Therapieansätze entwickeln zu können.

Ziel dieser Arbeit war somit:

1. den AA-Anstieg in unbehandelten vs. behandelten pcDNA-transfizierten Zellen für die Substanzen Ang-(1-7), A779, Irbesartan, PD123319, AVE0991, Ang I, Ang II, Ang III, Ang IV und Substanz P zu messen, um mögliche Peptid/Nicht-Peptidrezeptoren in COS-7-Zellen zu identifizieren.
2. die Peptide/Nicht-Peptide Ang-(1-7), AVE0991, Ang I, Ang II, Ang III, Ang IV und Substanz P als mögliche Liganden am Mas-Rezeptor und den Mas-Sequenz-ähnlichen-Rezeptoren (MMMrgh, HSMrgX2, HSMrgX1, HSMrgF und HSMRG) über den AA-Signaltransduktionsweg zu identifizieren.
3. durch Verwendung von den bekannten Rezeptor-Antagonisten A779 (Ang-(1-7)-spezifischer Rezeptorblocker), Irbesartan (ein AT1-Rezeptorblocker) und PD123319 (ein AT2-Rezeptorblocker) die antagonistische Wirkung auf die AA-Freisetzung für Ang-(1-7) und von A779 für AVE0991 darzustellen.
4. die Neuro-Peptide NPFF, NPAF und NPSF als mögliche Liganden am Mas-Rezeptor und den Mas-Sequenz-ähnlichen-Rezeptoren (MMMrgh und HSMrgX1) zu identifizieren.
5. festzustellen, ob A779 ein möglicher Antagonist von NPFF, NPAF und NPSF über den AA-Signaltransduktionsweg an den HSMas-, MMMrgH- und HSMrgX1-Rezeptoren ist.

2. Material

2.1 Bakterienstämme und Zellen

Bakterienstamm	<i>E.coli</i> DH5 α	Gibco	Bethesda, Maryland, USA
Zelllinie	COS-7-Zelllinie	DSMZ	Braunschweig, Deutschland

2.2 Vektoren

2.2.1 Vektoren zur Klonierung

Zur Klonierung der PCR-Produkte von MMMrgH wurde der pGEM-T-Easy-Vektor verwendet und für HSMRG der pGEM-T-Vektor. Alle Vektoren wurden nach Transfektion in Medien oder auf Platten mit 60 $\mu\text{g/ml}$ Ampicillin kultiviert.

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

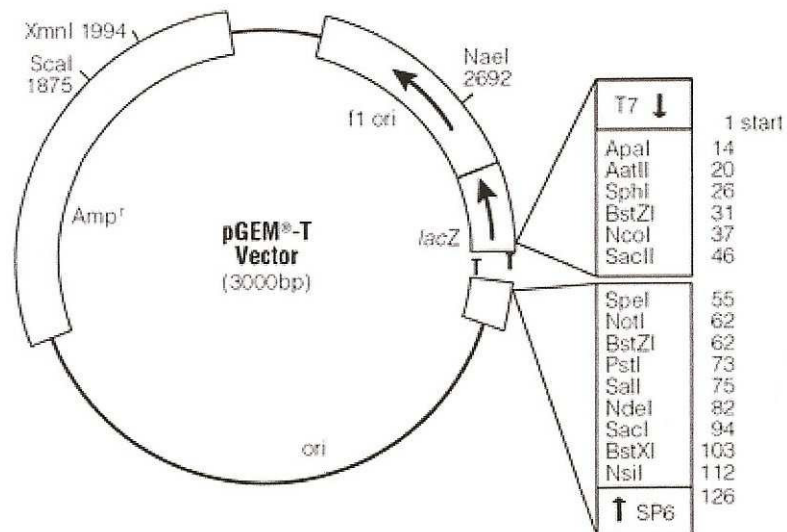


Abb.2.1: pGEM T-Vektor und seine Restriktionsschnittstellen zur Klonierung. Die Skizze wurde aus dem Promega-Katalog (2005) entnommen.

pGEM-T Easy-Vektor

Promega, GmbH

Mannheim, Deutschland

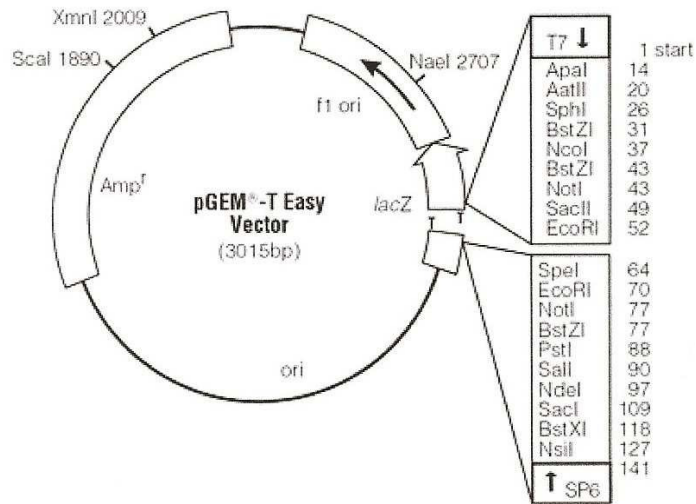


Abb.2.2: pGEM T-Easy-Vektor und seine Restriktionsstellen. Die Skizze wurde aus dem Promega-Katalog (2005) entnommen.

Für die Expression von MMMrgH und HSMRG in der COS-7-Zelllinie (2.1) wurde der pcDNA3.1(-)-Vektor verwendet.

pcDNA3.1(+/-)-Vektoren

Invitrogen Corp.

Karlsruhe, Deutschland

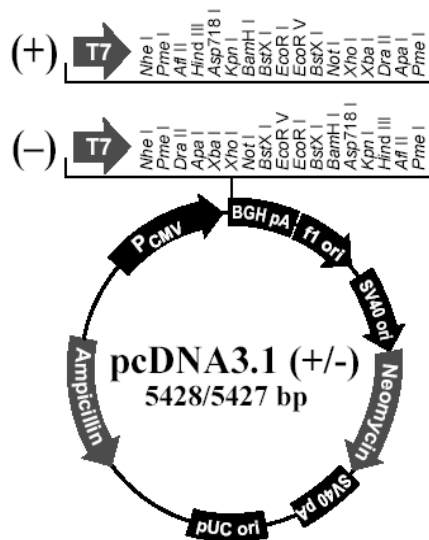


Abb.2.3: Die pcDNA3.1 (+/-)-Vektoren und ihre Restriktionsstellen. Die Skizze wurde aus dem Invitrogen-Katalog (2005) entnommen.

2.2.1 Vektoren mit klonierten Fragmenten

Die Klonierung der Fragmente für das humane Mas-Gen und die Fragmente HSMrgX2, HSMrgX1, HSMrgD und HSMrgF (von der Sanofi-Aventis GmbH *HS'Mas-Like1'*, *HS'Mas-Like2'*, *HS'Mas-Like3'* und *HS'RTA-Like'* genannt) wurde in Frankfurt am Main von der Sanofi-Aventis GmbH (Dr. Evi Kostenis) durchgeführt und freundlicherweise für weitere Experimente zur Verfügung gestellt. Die Klonierungen für MMMrgH (von der Sanofi-Aventis GmbH *MM'Mas-Like4'* genannt) und HSMRG sind unter 4.1 und 4.2 beschrieben.

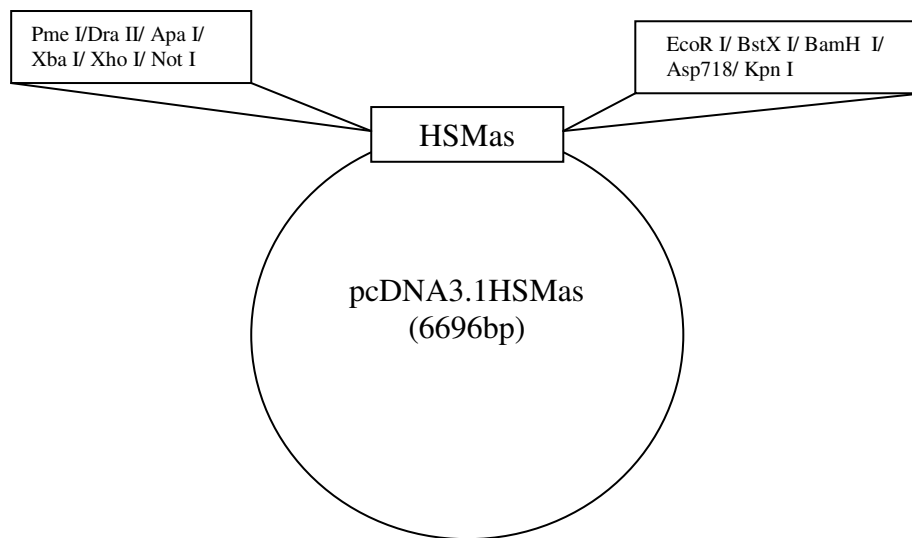


Abb.2.4: Das klonierte humane (HS)Mas-Fragment im pcDNA3.1(-)-Vektor (6696bp). Die Fragmente HSMrgX2 (993bp) HSMrgX1 (1039bp), HSMrgD (1029bp) und HSMrgF (972bp) wurden auch in den pcDNA3.1(-)-Vektor kloniert und besitzen die gleichen Schnittstellen wie das oben eingezeichnete HSMas-Fragment.

2.3 Enzyme

Alkalische Phosphatase	Promega	Mannheim, Deutschland
DNase A	Roche	Basel, Schweiz
DNase I (RNase-frei)	Roche	Basel, Schweiz
Proteinase K	Sigma	München, Deutschland
Restriktionsenzyme	Amersham	Braunschweig, Deutschland
RNase A	Roche	Basel, Schweiz
RNasin	Promega	Mannheim, Deutschland
T4-DNA Ligase	Promega	Mannheim, Deutschland
BioTherm™ DNA-Polymerase	Rapidozym	Berlin, Deutschland

2.4 Oligonukleotide

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

Sequenz der Primer:

Primer zur Amplifikation des MMMrgH-Rezeptor-Fragments und des HSMRG-Rezeptor-Fragments aus chromosomaler DNA.

```
GPR905      :   5' CCA CAG AGA AAG CCA TCT TCC 3'
GPR903      :   5' GGT CAT GAA GGC AGC GAG AAC TG 3'
HSMRG5      :   5' CCT GAC TGT GAT GTT GTG GCC 3'
HSMRG3      :   5' GTG TAC AAT TCC CCA GCT C 3'
```

Primer zur Amplifikation von HSMas-, MMMrgH-, HSMrgX2-, HSMrgX1, HSMrgD-, HSMrgF- und HSMRG-Rezeptor-Fragmenten aus dem pcDNA3.1-Vektor zum Nachweis der Integration der Rezeptor-DNA in den Zellen

```
CMV52       :   5' GGC GGT AGG CGT GTA CGG TGG 3'
HSMAS3F     :   5' CAG TTG AGA TGT TCG TGG 3'
HSMASL43F   :   5' GGT TGT GTG GAT TCC AGA G 3'
HSMASL13F   :   5' GCC ACA AAG CAG AAG AAG G 3'
HSMASL23F   :   5' CCT CAG TTC CGT TGA TTG G 3'
HSMASL33F   :   5' CAG GTA GGC CGT GTG CAC TG 3'
HSRTA3F     :   5' CTC GAT GGT CAG GAA GCC 3'
HSMRG3F     :   5' GTC CAT CCA GCC CTC TGG 3'
POLBGH32    :   5' GTG CCT TCC TTG ACC CTG GA 3'
T7          :   5' TTA ATA CGA CTC ACT ATA GGG 3'
BGH         :   5' CCT CGA CTG TGC CTT CTA 3'
```

2.5 Chemikalien

Agar	Difco	Kansas City, Missouri, USA
Agarose	Gibco	Bethesda, Maryland, USA
Ammoniumacetat	Sigma	München, Deutschland
Ampicillin	Serva	Heidelberg, Deutschland
Arachidonsäure	Biotrend	Köln, Deutschland
Bacto-Agar	Difco	Kansas City, Missouri, USA

Bacto-Trypton	Difco	Kansas City, Missouri, USA
Bacto-Yeast-Extrakt	Difco	Kansas City, Missouri, USA
Bisakrylamid	Serva	Heidelberg, Deutschland
Bromphenolblau	Sigma	München, Deutschland
Chloroform	Sigma	München, Deutschland
Diethylpyrocarbonat (DEPC)	Sigma	München, Deutschland
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Merck	Darmstadt, Deutschland
DNA-Längenmarker (Anlage 8.5)		
ΦX174 DNA/BsuRI	Fermentas	St. Leon-Rot, Deutschland
VIII	Roche	Basel, Schweiz
dNTP	Amersham	Braunschweig, Deutschland
EDTA	Sigma	Stenheim, Deutschland
Ethanol	Merck	Darmstadt, Deutschland
Ethidiumbromid 1%	Serva	Heidelberg, Deutschland
Formaldehyd	Merck	Darmstadt, Deutschland
HBSS	Gibco	Paisley, Schottland
IPTG	Biomol	Hamburg, Deutschland
Isopropanol	Sigma	München, Deutschland
Mineralöl	Sigma	München, Deutschland
Neomycin	Gibco	Paisley, Schottland
Penicillin/Streptomycin	Seromed-Biochrom	Berlin, Deutschland
Phenol	Sigma	München, Deutschland
Protease K	Sigma	München, Deutschland
SDS	Serva	Heidelberg, Deutschland
Sucrose	Sigma	München, Deutschland
Szintillationslösung	Packard	Groningen, Niederlande
Tris	Sigma	München, Deutschland
TRIZol Reagenz	Gibco	Bethesda, Maryland, USA
Trypsin-EDTA	Sigma	Stenheim, Deutschland
X-Gal	Biomol	Hamburg, Deutschland

2.6 Medien für Bakterienkulturen

LB-Medium	Hefeextrakt	5g
	Bacto-Tryptone	10g ad 1l
		pH 7,5 (NaOH)
	NaCl	5g
	NaOH (2M)	1,78ml
		Auffüllen mit H ₂ O _{bidest} ad 1l
Agarplatten	LB-Medium	1l
	Agar	15g [=1,5%]
Ampicillin-Platten	LB-Medium	1l
	Agar	15g [=1,5%]
	Ampicillin	100µg/ml
X-Gal/IPTG-Platten	LB-Medium	1l
	Agar	15g [=1,5%]
	Ampicillin	100µg/ml
	X-Gal	1600µl
		(100mg X-Gal/1600µl DMSO)
	IPTG	400µl
		(200mg IPTG/1ml H ₂ O)

2.7 Medien für Zellkulturen

DMEM Gibco BRL Paisley, Schottland

Für die COS-7-Zellen („African green monkey kidney“) wurde 90% DMEM (2.7)+10% FCS (2.7)+Penicillin/Streptomycin (2.5) verwendet. Dies entspricht nachfolgenden Volumina:

500ml Medium
55ml FCS
6ml Antibiotika

(Penicillin; 100IU/ml; Streptomycin; 100µg/ml)

Einfriermedium	FBS, DMEM, DMSO (1:8:1, v/v/v)	
FCS	Seromed-Biochrom	Berlin, Deutschland
Medium mit Arachidonsäure (AA)		
	DMEM+Pen/Strep	19,8µl
	Tritium AA	0,2µl AA (0,2µCi/well AA) (pro 24-well-Platte)
PBS Puffer 10x	H ₂ O	1l
	NaCl	80g
	KCl	2g
	Na ₂ HPO ₄	2g pH 7,2
Trypsin-EDTA-Lösung	HBSS	100ml
	Trypsin	0,05g
	EDTA	0,02g

2.8 Stammlösungen, Puffer und Gele

2.8.1 Stammlösungen und Puffer

Ampicillin	Ampicillin	2,5g
	2N NaOH-Lösung	3ml
	Auffüllen mit H ₂ O _{bidest}	ad 50ml
Arachidonsäure (AA)		50µCi/1,85MBq
DEPC-Wasser	Diethyl-Pyrocbonat	0,1g
	Auffüllen mit H ₂ O _{bidest}	ad 200ml
	über Nacht bei 37°C inkubieren und anschließend autoklavieren	
dNTP-Mix		20µl dATP
		20µl dCTP

	20µl dGTP
	20µl dTTP
	320µl 1x TE-Puffer
Ethidiumbromid	1mg/ml H ₂ O _{bidest}
GTE-Puffer	6,25ml 2N Tris/HCL-Lsg. 4,504g Glukose 10ml 2N EDTA-Lösung Auffüllen mit H ₂ O _{bidest} ad 500ml Einstellung: pH 8,0
IPTG	200mg/ml H ₂ O _{bidest}
Laufpuffer	4g Sucrose 2,5mg Bromphenolblau 10ml 1x TE-Puffer
Marker	
Φ-Marker	100µl 1x TE-Puffer 50µl Φ-DNA (verdaut mit BsuR I) 20µl Lauf-Puffer
λ-Marker	100µl 1x TE-Puffer 80µl λ-DNA (verdaut mit EcoR I/Hind III) 20µl Lauf-Puffer
Neomycin	10000µg/ml Neomycin-Lösung
Ohrlochpuffer	10mM Tris pH 8,5 5mM EDTA pH 8,0 0,2% SDS 200mM NaCl

PBS-Puffer 10x		80g NaCl	
		2g KCl	
		11,5g Na ₂ HPO ₄	
		2g KH ₂ HPO ₄	
	Auffüllen mit H ₂ O _{bidest} ad 1000ml, pH=7,2		
Primer-Stammlsg.	je µg Oligonucleotide 1µl 1x TE-Puffer		
	Einsatz für PCR 10µl Stammlösung		
	190µl 1x TE-Puffer		
Proteinase		10mg Proteinase K/ml	H ₂ O _{bidest}
RNase A	Für Minis	4mg RNase/ml	H ₂ O _{bidest}
	Für Maxis	10mg RNase/100ml	H ₂ O _{bidest}
SDS/NaOH-Lösung		25µl 10%iges SDS	
		25µl 2M NaOH	
		200µl H ₂ O _{bidest}	
TAE 50x		242g Tris	
		68g Na-Acetat	
		18,5g EDTA	
	Auffüllen mit H ₂ O _{bidest} ad 1000ml, pH=7,8		
TE Puffer 10x	H ₂ O	1l	
	Tris-Base	12,1g	
	EDTA	3,72g	pH 7,4

2.8.2 Gele

Agarosegel Je nach Größe der erwarteten Fragmente wurden 1%- oder 2%- Agarosegele verwendet

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

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

Um die Fragmente sichtbar zu machen, wurden zu der Agarose-Lösung 1,7µl Ethidiumbromid (2.8.1) gegeben.

2.9 Gebrauchsfertige Reaktionssysteme

Plasmid Maxi Kit	Quiagen	Hilden, Deutschland
Ultrafree DA-Tube	Milipore	Billerica, MA, USA

2.10 Geräte

Beta-Counter	WinSpectral 1414	Wallac	Freiburg, Deutschland
CO ₂ -Inkubator	BB16	Heraeus	Hanau, Deutschland
Elektrophoresen	Maxigel G48	Biometra	Göttingen, Deutschland
	Agagel Mini	Biometra	Göttingen, Deutschland
Gel-Trockner	Mididry D62	Biometra	Göttingen, Deutschland
Heizbad	GFL 1083	Zeiss	Burgwedel, Deutschland
Inkubatoren	Function line	Heraeus	Hanau, Deutschland
Mikroskop	DMIL	Leica	Wetzlar, Deutschland
PCR-Maschinen	Mastercycler	Eppendorf	Hamburg, Deutschland
	Mastercycler pers.	Eppendorf	Hamburg, Deutschland
	Mastercycler grad.	Eppendorf	Hamburg, Deutschland
Pipetten	Pipetman	Gilson	Villiers-le-Bel, Frankreich
Spektralphotometer	DU 640i	Beckman	Lohof, Deutschland
Thermomixer	Thermomixer comp.	Eppendorf	Hamburg, Deutschland
	Thermomixer comf.	Eppendorf	Hamburg, Deutschland
Transilluminator	BioDoc Analyse	Biometra	Göttingen, Deutschland
Vortex	MS1 Minishaker	IKA Werke	Staufen, Deutschland
Waage	Mikrowaage SBC 21	Scaltec	Heiligenstadt, Deutschland
Zellkulturflaschen	25cm ²	Nunc	Wiesbaden, Deutschland
Zentrifugen	Zentrifuge 5415 D	Eppendorf	Hamburg, Deutschland
	Zentrifuge 5403	Eppendorf	Hamburg, Deutschland
	Megafuge 1.0	Heraeus	Hanau, Deutschland

2.11 Peptide/Nichtpeptide und Antagonisten und ihre Formeln

Angiotensin I	Ang I-(1-10) Asp ¹ -Arg ² -Val ³ -Tyr ⁴ -Ile ⁵ -His ⁶ -Pro ⁷ -Phe ⁸ -His ⁹ -Leu ¹⁰	Bachem	Bubendorf, Schweiz
Angiotenin II	Ang II-(1-8) Asp ¹ -Arg ² -Val ³ -Tyr ⁴ -Ile ⁵ -His ⁶ -Pro ⁷ -Phe ⁸	Bachem	Bubendorf, Schweiz
Angiotensin III	Ang III-(2-8) Arg ² -Val ³ -Tyr ⁴ -Ile ⁵ -His ⁶ -Pro ⁷ -Phe ⁸	Bachem	Bubendorf, Schweiz
Angiotensin IV	Ang IV-(3-8) Val ³ -Tyr ⁴ -Ile ⁵ -His ⁶ -Pro ⁷ -Phe ⁸	Bachem	Bubendorf, Schweiz
Angiotensin-(1-7)	Ang-(1-7) Asp ¹ -Arg ² -Val ³ -Tir ⁴ -Ile ⁵ -His ⁶ -Pro ⁷	Bachem	Bubendorf, Schweiz
A779	D-Ala ⁷ -Ang-(1-7) Asp ¹ -Arg ² -Val ³ -Tir ⁴ -Ile ⁵ -His ⁶ -D-Ala ⁷	Bachem	Bubendorf, Schweiz
AVE0991	Nicht-Peptid 5-Formyl-4-methoxy-2-phenyl-1-[[4-2-(ethylaminocarbonylsulfonamido)-5-isobutyl-3-thienyl]-phenyl]-methyl]imidazol	Aventis	Frankfurt, Deutschland
Irbesartan	Nicht-Peptid Imidazolin (Biphenyl-Tetrazol-Struktur)	Aventis	Frankfurt, Deutschland
PD123319	Nicht-Peptid 1-[[4-(Dimethylamino)-3-methylphenyl]methyl]-5-(diphenylacetyl)-4,5,6,7-tetrahydro-1H-imidazol[4,5-c]pyrimidine-6-carboxylsäure	Bachem	Bubendorf, Schweiz
Substanz P	Peptid Arg ¹ -Pro ² -Lys ³ -Pro ⁴ -Gin ⁵ -Gin ⁶ -Phe ⁷ -Phe ⁸ -Gly ⁹ -Leu ¹⁰ -Met ¹¹ -NH ₂	Bachem	Bubendorf, Schweiz
Neuro-Peptid FF	NPFF Phe ¹ -Leu ² -Phe ³ -Gln ⁴ -Pro ⁵ -Gln ⁶ -Arg ⁷ -Phe ⁸ -NH ₂	Bachem	Bubendorf, Schweiz
Neuro-Peptid AF	NPAF Ala ¹ -Gly ² -Glu ³ -Gly ⁴ -Leu ⁵ -Ser ⁶ -Ser ⁷ -Pro ⁸ -Phe ⁹ -Trp ¹⁰ -Ser ¹¹ -Leu ¹² -Ala ¹³ -Ala ¹⁴ -Pro ¹⁵ -Gln ¹⁶ -Arg ¹⁷ -Phe ¹⁸ -NH ₂	Bachem	Bubendorf, Schweiz
Neuro-Peptid SF	NPSF Ser ¹ -Gln ² -Ala ³ -Phe ⁴ -Leu ⁵ -Phe ⁶ -Gln ⁷ -Pro ⁸ -Gln ⁹ -Arg ¹⁰ -Phe ¹¹ -NH ₂	Bachem	Bubendorf, Schweiz

3. Methoden

3.1 DNA

3.1.1 Polymerase-Kettenreaktion

(modifiziert nach Mullis und Faloona, 1987)

Die Polymerase-Kettenreaktion (PCR) ist eine Methode zur Amplifizierung eines definierten DNA-Abschnitts. Es werden dabei neben der Zielsequenz, dem so genannten Template, prinzipiell zwei Oligonukleotide 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. Darüber hinaus wird eine thermostabile DNA-Polymerase (2.3) mit Puffer (2.8.1) verwendet, die die angelagerten Primer an ihrer 3'-OH-Gruppe unter dem Einbau von Desoxyribonukleosidtriphosphaten (dNTP's) (2.8.1) verlängern.

Während der PCR werden fortlaufend Temperaturzyklen durchlaufen, wobei jeder Zyklus aus den Schritten Denaturierung (Trennung der DNA-Doppelstränge), Primeranlagerung (durch Absenken der Temperatur: Annealing) und Primerverlängerung (beim Temperaturoptimum der Polymerase: Elongation) besteht.

Jeder Zyklus resultiert in einer Verdoppelung der Zielsequenz, so dass diese exponentiell amplifiziert wird und durch Ethidiumbromidfärbung im Agarosegel (2.8.2) sichtbar und isolierbar gemacht werden kann. Zur Amplifikation der Gen-Fragmente mit einer Länge von ca. 1000-1200 Basenpaaren (bp) wurden spezifische Primer (2.4) entworfen.

PCR –Ansatz:

Temperaturbedingungen:

4,5µl PCR-Puffer	94°C 2:00
1,8µl MgCl ₂	94°C 0:30
1,8µl Primer 1	60°C 0:30
1,8µl Primer 1	72°C 0:30

12,3µl Mix pro Probe

34 Zyklen

Es wurden 0,3µl DNA-Polymerase zu dem Mix gegeben. Um die Menge an autoklaviertem Wasser zu berechnen, wurde folgende Formel angewandt:

Gesamtansatzmenge:	45,0µl
Mix Zugabemenge:	12,3µl
Probenzugabemenge:	-2,0µl

Errechnete H₂O-Zugabemenge: 30,7µl pro Probe

Da die verwendeten Enzyme temperaturinstabil sind, wurde auf Eis gearbeitet. Zum Schluß wurde zu jeder Probe ein Tropfen Mineralöl (2.5) dazugegeben, das Programm „hot Start“ zum Vorwärmen der Maschine angeschaltet und die Proben für ca. 2h nach dem oben genannten PCR-Programm in die PCR-Maschine (2.10) gestellt.

Die PCR-Bedingungen waren für die spezifischen Primer mit dem jeweiligen CMV52-Primer (2.4) wie folgt gewählt:

94° 2:00
94° 0:30
60° 0:30
72° 0:30

34 Replikationszyklen

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 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 wurde in der Mikrowelle bei 750W für ca. 2-5min erhitzt. Für eine Gelkammer wurden 30ml flüssiges Agarosegel+1,7µl Ethidiumbromid (2.5) in ein 50ml-Tube überführt.

Die Elektrophorese erfolgte bei einer Ladung von 100V und 20mA für 20min, die eine optimale Trennung garantiert. Durch die Zugabe von Ethidiumbromid in das Agarosegel war die

Detektion der DNA-Moleküle auf einem UV-Transilluminator (2.10) im Anschluss an den Gellauf möglich.

3.1.3 DNA-Isolierung mit einem präparativen Gel

Das Gel mit dem entsprechenden Fragment wurde aus dem Agarosegel mit einem Rasiermesser ausgeschnitten. Bei diesem Schritt musste darauf geachtet werden, die UV-Exposition so kurz wie möglich zu halten, um die Bildung von Pyrimidindimeren zu verhindern. Das DNA enthaltende Gel wurde anschließend in ein Ultrafree DA-Tube (2.9) überführt und bei Raumtemperatur (RT) und 15000rpm für 10min zentrifugiert.

Der obere Teil mit den Gelbestandteilen wurde verworfen und mit 10µl des Überstandes ein Kontrollgel bei 100V und 20mA für 20min laufen gelassen, in dem das gesuchte Fragment unter UV-Licht detektiert werden konnte (3.1.2). Die einzelnen Banden wurden so getrennt und die DNA-Konzentration des Überstandes zur Kontrolle mit dem Photometer bestimmt (3.1.4).

3.1.4 DNA-Konzentrationsbestimmung

Es wurde eine Verdünnung der Probe von 1:100, bestehend aus 198µl TE+2µl Probe, hergestellt. 100µl davon wurden zur photometrischen Konzentrationsbestimmung der DNA verwendet. Der Absorptionswert lag bei 260 Nanometer (nm), die Ratio sollte bei 2 liegen.

3.1.5 Ligation von DNA-Fragmenten

Ein Aliquot des Polymerasekettenreaktions-Produktes (3.1.1) wurde zuerst auf einem Agarosegel analysiert, bevor es für eine Ligation eingesetzt wurde. Um ein DNA-Fragment in das pGEM T-Vektor-System (2.2) zu klonieren, wurde in einem 0,5ml-Tube ein Ansatz aus:

1µl pGEM T-Vektor

4µl PCR-Produkt

5µl 2x Ligationspuffer (60mM Tris-HCL, 20mM MgCl₂, 20mM DTT

[Dithiothreitol], 2mM ATP [Adenosintriphosphat],

10% Polyethylenglycol, pH 7,8)

1µl Ligase (3 units/µl)

10µl Endvolumen

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

3.1.6 Herstellung von LB-Medium

Das 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.

Das LB-Medium wurde nach Beimpfung bei 37°C gehalten und bei 150-250 Umdrehungen pro min durchlüftet. Die E. coli-Zellen teilen sich alle 20min. Das Wachstum der Kultur wurde über die optische Dichte (OD) bei 600 nm gemessen, was einer OD von 0,8 entspricht.

3.1.7 DNA-Transformation in Bakterien

(modifiziert nach Sambrook *et al.*, 1989)

Bei diesem Verfahren wird das in den Vektor integrierte DNA-Fragment in ein Bakteriengenom aufgenommen. Die kompetenten Zellen wurden für ca. 5min auf Eis aufgetaut und 50µl der Bakterienlösung pro Ligation verwendet. LB-Medium ohne Ampicillin wurde bei RT warmgestellt, 10µl Plasmid zu den kompetenten Zellen gegeben, vorsichtig ohne Blasenbildung gemischt und 30min auf Eis stehen gelassen.

Die Platten wurden für 1h zum Trocknen in den Brutschrank gestellt. Nach 30s Hitzeschock bei 37°C und weiteren 3min Kälteschock auf Eis wurden 800µl LB-Medium ohne Ampicillin pro Probe dazupipettiert und dabei vom Eis genommen. Der Ansatz wurde 50min bei 37°C geschüttelt und pro Probe 135µl der Zellsuspension auf jeweils 2 Agarplatten (2.6) ausgespatelt.

3.1.8 Präparation von Plasmid-DNA

(modifiziert nach Sambrook *et al.*, 1989)

Es können bei der Präparation von Plasmid-DNA grundsätzlich zwei Methoden unterschieden werden, von denen die Ausbeute und die Qualität der DNA abhängt. Zur schnellen Beurteilung von Plasmid-DNA wird die „Mini-Präparation“ (3.9.1) verwendet, deren Ausbeute und Qualität geringer ist. Bei der „Maxi-Präparation“ (3.9.2) gewinnt man dagegen eine größere Menge DNA mit hohem Reinheitsgrad.

3.1.8.1 Mini-Präparation

Bakterien einer Flüssigkultur wurden lysiert und die Proteine durch Verdau mit Proteinase K (2.3) entfernt. Hochmolekulare DNA wurde durch Isopropanol-Präzipitation ausgefällt. Rekombinante Plasmid-DNA wurde durch Mini- und/oder Maxi-Extraktionsschritte aufbereitet. Der Mini-Ansatz wurde in 1,5ml-Tubes überführt, für 2min bei 15000rpm gevortext und 250µl eines entsprechend hergestellten RNase A/GTE-Mix, bestehend aus 225µl GTE-Puffer und 25µl RNase A, pro Probe dazugegeben. Die Probe wurde so lange gevortext, bis das Pellet aufgelöst war. Ebenfalls 250µl pro Probe eines NaOH/SDS-Mixes (200µl H₂O autoklaviert, 25µl 2M NaOH, 25µl 10% SDS) wurde in jede Probe dazugegeben und 5-10 mal vorsichtig umgekippt, so dass die Plasmide durch Denaturierung nicht zerstört werden und für 10min bei RT inkubiert.

Anschließend wurden 250µl Ammoniumacetat (pH 5,5) zur Renaturierung hinzugefügt, leicht geschüttelt und 10min bei 4°C und 14000rpm zentrifugiert. Das Pellet wurde verworfen und der Überstand in ein neues Eppendorf-Röhrchen überführt. Daraufhin wurde der letzte Zentrifugationsschritt wiederholt. Nun wurde erneut der Überstand verworfen und auf das Pellet 500µl Isopropanol (2.5) gegeben und für 5min inkubiert. Dann wurde 30min bei 4°C und 14000rpm zentrifugiert, der Überstand verworfen und 1ml einer eisgekühlten 70%igen Ethanol-Lösung (2.5) auf das Pellet gegeben.

Daraufhin wurde die Lösung 10min bei 4°C und 14000rpm zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und für 15min luftgetrocknet. Nach der Lufttrocknung wurden die Eppendorf-Röhrchen mit 30µl 1x TE-Puffer auf jedes Pellet aufgefüllt. Die Lösung wurde gevortext, zentrifugiert und 40min bei 37°C in den Thermomixer gestellt, wo sich schließlich die DNA im Puffer löst. Nach Kontrollverdau (3.1.10) konnte das Plasmid im Kontrollgel untersucht werden.

3.1.8.2 Maxi-Präparation

Zur Herstellung einer höheren Konzentration des Plasmids für die Transfektion, das sich bereits bei der Mini-Präparation und der Sequenzierung als richtig herausgestellt hat, wurde die Maxi-Präparation durchgeführt.

Dazu wurden 3ml des Mini-Ansatzes in einen Kolben mit 500ml Medium gegeben und über Nacht bei 37°C geschüttelt; in dieser Zeit vermehren sich Plasmide, was an der Eintrübung des Mediums erkennbar wird. Es wurde das Jetstar Maxikit (2.9) eingesetzt, bei dem sechs Lösungen verwendet werden. Im ersten Schritt wurde das Medium in 50ml-Tubes umgefüllt und bei RT zentrifugiert. Der Überstand wurde abgossen und 10ml eines Mixes aus E1 und RNase auf

jedes Pellet gegeben. Das Pellet wurde gevortext und 10ml der E2-Lösung dazugegeben, wobei das homogene Lysat leicht gemischt und 5min bei RT stehen gelassen wurde. Dann wurde 10ml von der E3-Lösung zugeführt und ca. 5mal umgeschüttelt; in diesem Schritt wird die chromosomale DNA entfernt. Die Lösung wurde 30min bei RT und 15000rpm zentrifugiert. Die in dem Set bereitgestellten Säulen wurden mit 30ml E4 aufgefüllt.

Der Überstand der letzten Zentrifugation wurde erneut 10min bei 22°C und 15000rpm zentrifugiert und über die Säulen gekippt. Um die Säulen auszuwaschen, wurde 60ml E5 auf die Säulen gegeben und danach 15ml der E6-Lösung, die in einem 50ml-Tube aufgefangen wurde. 10,5ml Isopropanol wurden dazugeben und bei RT 10min stehen gelassen. Anschließend wurde für 30min bei 4°C und 6000rpm zentrifugiert, der Überstand abgegossen und das Pellet mit 70%igem Ethanol gewaschen und entsalzt. Die Zentrifugation wurde für 10min wiederholt.

Das Pellet wurde für 20min an der Luft getrocknet und je nach Größe des Pellets in 50-300µl TE-Puffer (2.8.1) gelöst und gevortext. Das Homogenat wurde in ein 1,5ml-Eppendorf-Röhrchen überführt und 20min bei 37°C auf dem Thermomixer geschüttelt, zentrifugiert und die DNA-Konzentration bestimmt.

3.1.9 Restriktionsverdau

Der Restriktionsverdau wird zur Überprüfung des Klonierungserfolges herangezogen. Dabei wird das Plasmid aus T-Vektor (2.2) und DNA-Fragment jeweils an der T7- und SP6-Seite des integrierten DNA-Fragmentes mit Hilfe spezifischer Enzyme und Reaktionspuffer geschnitten. Für den Restriktionsverdau wurde ein Gesamtansatz von 10µl hergestellt aus:

- 1-8µl Probe, je nach Konzentration
- 1µl Restriktionspuffer
- 1µl Enzym (bei 2 Enzymen je 1µl)
- xµl autoklaviertes H₂O

Wasser und Probe wurden zuerst in das Eppendorf-Röhrchen gefüllt, danach wurden Puffer und Enzym dazugegeben. Da die Enzyme temperaturinstabil sind, wurde auf Eis gearbeitet und Probe und Enzym nach Vortexen und Zentrifugation 1h bei 37°C inkubiert.

Zu jeder Probe wurden 4µl Laufpuffer (2.8.1) dazugegeben, dann 7µl davon auf das Gel aufgetragen. Von dem Marker (2.8.1) wurde 1,5-3µl in die Tasche gefüllt und das Gel anschließend für 20min bei 90V laufen gelassen.

Das Ergebnis des Verdau wurde als positiv gewertet, wenn das herausgeschnittene Fragment die erwartete Basenlänge aufwies. Bestätigt wurde das Ergebnis durch die DNA-Sequenzierung, die von der Invitek GmbH in Berlin-Buch, Deutschland, vorgenommen wurde (3.1.11).

3.1.10 Präparativer Restriktionsverdau

Der präparative Restriktionsverdau unterscheidet sich vom Restriktionsverdau insofern, als dass ein Gesamtansatz von 30µl hergestellt wird:

- xµl H₂O
- 1-10µl Probe
- 3µl 10x Restriktionspuffer
- 2µl Enzym (bei zwei Enzymen je 2µl)

Zur Reinigung des Restriktionsansatzes wurde dieser für 20min auf eine Membran aufgetragen, die auf einer Wasseroberfläche (destilliertes Wasser) schwamm. Anschließend konnte die Probe mit einem zweiten Enzym geschnitten werden.

3.1.11 DNA-Sequenzierung und Sequenzanalyse

3.1.11.1 DNA-Sequenzierung

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

3.1.11.2 Sequenzanalyse

Die Translation der DNA-Sequenz, die Suche nach Sequenzhomologien auf DNA-Ebene und die Darstellung von Sequenzvergleichen erfolgte mit Hilfe der Datenbanken des ‚National Center for Biotechnology Information‘ (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) und dem Computerprogramm BLAST (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>).

3.2 Zellkultur

3.2.1 Herstellung kompetenter Zellen

50µl der *E. coli*-Zellen vom Bakterienstamm DH5α (2.1) wurden auf Eis aufgetaut und 50ml LB-Medium (2.6) ohne Ampicillin in einen 100ml-Kolben abgefüllt. Das LB-Medium mit den Zellen wurde beimpft und über Nacht bei 37°C und 200rpm inkubiert. 100ml frisches LB-Medium wurden dann mit 1ml der Übernachtskultur beimpft und bei 37°C und 200rpm geschüttelt, bis die optische Dichte (OD₅₉₀) 0,4 entsprach.

Die Kultur wurde in zwei 50ml-Tubes geteilt, 10min auf Eis gebracht, danach 7min bei 3000rpm (1600xg) und 4°C zentrifugiert und der Überstand daraufhin verworfen. Die Zellen wurden in 10ml eiskalter 0,1M CaCl₂ Lösung resuspendiert, anschließend 15min auf Eis gestellt.

Daraufhin wurden die Zellen 5min bei 2500rpm und 4°C zentrifugiert und der Überstand verworfen. Das Pellet wurde in 10ml eiskalter 0,1M CaCl₂-Lösung aufgenommen und 30min auf Eis gestellt, anschließend 5min bei 2500rpm und 4°C zentrifugiert. Der Überstand wurde erneut verworfen und das Pellet in 2ml eiskalter 0,1M CaCl₂-Lösung gegeben.

In jedes Tube wurden 0,2ml Glycerin gegeben, die Zellen in 1,5ml-Tubes mit je 50µl Zellen aliquotiert und sofort bei -80°C gelagert.

3.2.2 Schnelles Auftauen der Zellen

Die Kryo-Röhrchen wurden direkt aus dem flüssigen Stickstoff in ein 37°C-Bad getaucht. Dann wurden 1ml des Zellmediums in 9ml DMEM+10% FBS resuspendiert und bei 1000rpm für 10min zentrifugiert. Das Pellet wurde in DMEM+10% FBS resuspendiert, auf die Platte ausgesät und mit der Passagenummer (+1) bezeichnet.

3.2.3 Trypsinisieren

Die konfluenten Platten wurden 2x mit PBS gewaschen. 3ml einer bei 37°C vorgeheizten 0,05%igen Trypsinlösung (2.5) wurde auf jeweils eine Platte gegeben, schnell aspiriert und nochmals 1ml Trypsin dazugegeben.

Dann inkubierten die Zellen für ca. 5min und wurden, sobald alle Zellen von der Platte gelöst waren, in ein 50ml-Reaktionsgefäß gegeben, mit Medium versetzt und für 10min bei 1000rpm zentrifugiert.

3.2.4 Transfektion

Zur Integration von Fremdgenen bzw. DNA-Sequenzen in Zellen stehen verschiedene Verfahren zur Auswahl. Eine hocheffiziente Transfektion kann mit der Elektroporation oder der Calciumphosphat-DNA-Präzipitation erfolgen, durch die 10%-50% der Zellen die DNA stabil integrieren und exprimieren. Für die Experimente wurde die Calciumphosphatmethode angewandt, die mit einer Lösung aus Calciumchlorid, einer HPBS-Lösung und der DNA bei einem pH von 6,95 arbeitet. Dafür sollten die Platten mit den Zellen zu 80% konfluent sein. 1h vor der Transfektion wurde das Medium gewechselt und 3ml auf eine 10cm² Platte dazugegeben. Es wurden 0,5ml einer 20µg konzentrierten DNA-Suspension aufbereitet, auf die Zellen gegeben und 4h bei 37°C inkubiert. Die Platte wurde mit 6,5ml Medium aufgefüllt und nach 24h das Medium gewechselt. Am 1. Tag der Transfektion wurde die Hälfte der Zielmenge an Neomycin, d. h. 50µl einer 10000µg/ml Lösung, hinzugefügt. Am darauffolgenden Tag wurden alle 24h 100µl der Neomycin-Selektierlösung verabreicht.

Herstellung der DNA-Suspension:

2x HPBS	250µl
20µg DNA	xµl
H ₂ O	225-xµl
CaCl ₂ (2,5M)	25µl

Die Lösung wurde 20-30min bei 37°C inkubiert und anschließend auf die vorbereiteten Zellen gegeben.

3.2.5 DNA-Isolierung

Die Zellen wurden trypsinisiert und für 3min bei 800rpm zentrifugiert, der Überstand abgenommen und mit 200µl Ohrlochpuffer (2.8.1) versehen. Die Lösung wurde gevortext. Es wurden 15µl Proteinase K zu den Zellen gegeben und die Lösung 2h bei 55°C auf dem Thermomixer bei 300rpm geschüttelt. Zur Inaktivierung des Enzyms wurde das Zellysat 10min bei 95°C inkubiert und sofort auf Eis gegeben. Schließlich wurde 2µl RNase für 20min bei 37°C und für 10min bei 95°C inkubiert. Anschließend wurde die Probe auf Eis gekühlt. Zum Schluß wurden die Proben photometrisch vermessen (3.1.4) und 5µl davon auf ein 1%iges Agarosegel aufgetragen.

3.2.6 Kultivierung der COS-Zellen

Zellen der COS-7-Zelllinie (2.1), die fibroblastenähnlich als Monolayer wachsen, wurden auf 10cm²-Petrischalen angezüchtet. Als Medium wurde Dulbecco's MEM Medium (2.7), das zu 10% aus FBS (56,6ml FBS auf 500ml) und 6ml Penicillin/Streptomycin (Pen/Strep) bestand, gewählt. Alle 2-3 Tage wurde die konfluente Kulturschale 1:3 (10⁶ Zellen/80cm²) gesplittet und in einem Brutschrank mit 5% CO₂ (2.10) bei 37°C inkubiert. Die Verdopplungszeit der Zellen betrug ca. 35-48 Stunden. Die transfizierten Zellen wurden für zwei Wochen kultiviert und täglich mit 100µl Neomycin (2.8.1) selektiert.

3.2.7 Einfrieren der Zellen

Langsames Einfrieren: Die Zellen wurden trypsinisiert und in Einfriermedium resuspendiert: DMEM+10% FCS+7,5% DMSO. Sie wurden in Kryo-Röhrchen gegeben, die mit Zelltyp, Passagenummer und Datum versehen wurden. Zuerst wurden diese für 1h bei -20°C gelagert, anschließend über Nacht bei -80°C und dann in flüssigen Stickstoff überführt.

3.2.8 Arachidonsäure-Freisetzung

In Anlehnung an die Experimente von Santos *et al.* (2000) wurde der Wildtyp und *Mas*-transfizierte COS-Zellen auf 24-well Platten angezüchtet und für 18h mit 0,2µCi/well (³H) Arachidonsäure (AA) (2.5) vorbehandelt. Danach wurde pro well 3x mit 1000µl PBS-Lösung (2.7) gewaschen, die wells geschüttelt und die Lösung nach jedem Waschvorgang abgesaugt. Anschließend wurden 500µl einer Arachidonsäurelösung (2.7), bestehend aus 7,6µl AA und 9,5ml DMEM+Pen/Strep, dazugegeben, geschüttelt und im Brutschrank bei 37°C inkubiert. Die Zellen wurden erneut mit PBS-Lösung gewaschen, die Lösung abgesaugt und mit 500µl einer Ang-(1-7)/PBS-Lösung für 15min bei 37°C inkubiert (2.7). 500µl der inkubierten Lösung wurden daraufhin abgenommen und mit 10ml Szintillationslösung (2.5) versetzt. Der jeweilige Antagonist wurde 10min vor dem Agonisten dazugegeben. Die Radioaktivität wurde mit einem Beta-Counter (Flüssigkeits-Szintillationszähler) (2.10) ermittelt (Angaben in CPM, 'counts per minute', DPM, mit Hintergrundaktivität); jeweils für 5min pro Probe. Gemessen wurden H³ (12,43 y) und C¹⁴ (5730,00 y). Mit dieser Methode wurde der Betrag von AA, der ins Medium freigesetzt wird und derjenige, der in den Zellen verbleibt, ermittelt.

3.3 Statistische Auswertung

Zur statistischen Analyse der Ergebnisse wurde das Statistik-Programm Graph Pad Prism 4.00 (Graph Pad Software Inc., San Diego, Kalifornien, USA) verwendet. Einzelne Gruppen wurden durch den Student's T-Test für unverbundene Stichproben miteinander verglichen. Als statistisch signifikant unterschiedlich wurde eine Irrtumswahrscheinlichkeit von $p < 0,05$ angesehen. Die Meßwerte wurden als Mittelwert in Prozent \pm Standardfehler (SEM) angegeben und aus n unabhängigen Experimenten dargestellt.

4. Ergebnisse

4.1 Klonierung von cDNA von Mitgliedern der Mrg-Familie

4.1.1 Klonierung von *MrgH*-cDNA

Das murine (*MM*)*MrgH*-Fragment (von der Sanofi-Aventis GmbH ‚*Mas-Like4*‘ genannt) wurde nur in dem Herzen der Maus detektiert, für die Ratte oder den Menschen ist kein Homolog bekannt (Wittenberger *et al.*, 2001). Es wurde bisher nicht auf die Interaktion mit Angiotensinen untersucht. Zur Klonierung des kodierenden Bereichs des *MrgH*-Gens in einen geeigneten Expressions-Vektor waren die Amplifizierung des Fragments durch PCR (3.1.7) und zwei sich anschließende Klonierungsschritte notwendig. Es wurde mit den Primern GPR903 und GPR905 (2.4) aus einer Probe chromosomaler DNA aus dem Herzen der Maus (*Mus musculus*) amplifiziert. Der GPR905-Primer lag 25bp vor dem ATG-Start und das Ende des GPR903-Primers 2bp hinter dem Stopkodon (Länge der kodierenden GPR90-Sequenz lt. Datenbank: 966bp; ‚Gen-Bank accession‘-Nummer: NM 030726; Anlage 3A).

Die PCR-Bedingungen wurden, wie unter 3.1.1 beschrieben, gewählt. Die Probe wurde auf ein Agarosegel aufgetragen. Die erwartete Länge des Fragments betrug 993bp. Auf dem Agarosegel war ein ~1000bp langes Fragment sichtbar (Abb. 4.1).

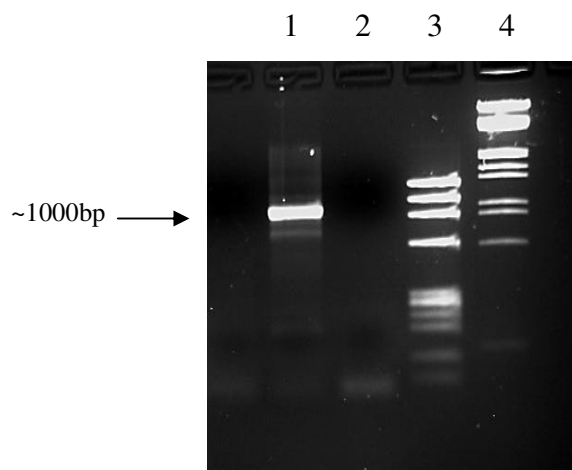


Abb. 4.1: Amplifikation des *MM*MrgH-Fragments durch PCR mit den Primern GPR905 und GPR903. Das amplifizierte Fragment war ~1000bp lang (Pfeil). Spur 1= Amplifiziertes *MM*MrgH-Fragment (993bp), Spur 2= Wasserprobe. Spur 3= Φ -Marker verdaut mit *BsuR I* (Anlage 6B) und Spur 4= λ -Marker verdaut mit *EcoR I/Hind III* (Anlage 6A).

Nach Amplifikation des PCR-Produktes wurde dieses über Nacht in den pGEM T-Easy-Vektor ligiert (3.1.5) und der Ansatz anschließend in kompetente Zellen transformiert (3.1.7).

Die transformierten Zellen wurden auf Agarplatten bebrütet. Es wurden 8 weiße Kolonien für die Mini-Präparation (3.1.8.1) verwendet. Alle 8 Minis wurden mit dem Enzym Apa I verdaut.

Nach Apa I-Verdau des Plasmids aus *MMMrghH*-Fragment und T-Easy-Vektor war ein 545bp langes Fragment zu erwarten, da das Enzym 46bp vor dem GPR903-Primer und an Position 499 im *MMMrghH*-Fragment schneidet bzw. ein 534bp langes Fragment, da das Enzym 46bp vor dem GPR905-Primer und an Position 488 im Fragment schneidet. Auf dem Agarosegel war bei Mini 5 ein ~550bp langes Fragment sichtbar (Abb. 4.2).

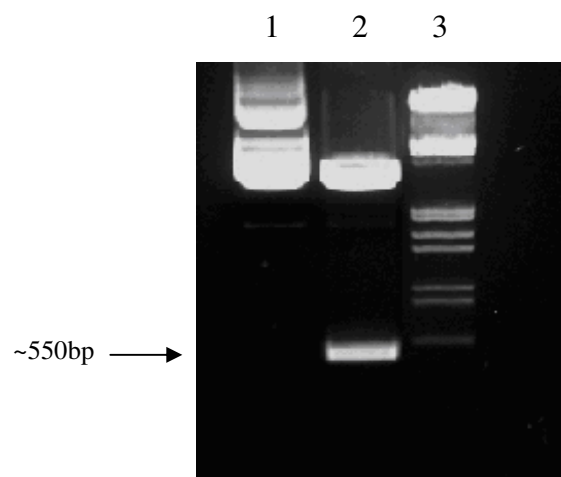


Abb. 4.2: Kontrollverdau, um das *MMMrghH*-Fragment im T-Vektor sichtbar zu machen. Nach Apa-Verdau entstand ein ~550bp langes Fragment. Zur Sequenzierung wurde Mini 5 verwendet (Spur2). Spur 1= Mini 5 unverdaut, Spur 2= Mini 5 nach Apa I-Verdau, Spur 3= λ -Marker verdaut mit *EcoR I/Hind III* (Anlage 6A).

Da nach Apa I-Verdau von Mini 5 ein Fragment der erwarteten Länge von ~550bp resultierte, wurde dieses sequenziert. Das Ergebnis der Sequenzierung wurde mittels BLAST-Search-Programm (3.1.11.2) auf Homologien mit der *MrgH*-Sequenz verglichen und stimmte mit der Datenbanksequenz NM030726 zu 100% überein. Allerdings zeigte sich, dass das Fragment in 3'-5'-Richtung im T-Easy-Vektor lag.

Um das Fragment in 5'-3'-Richtung in den pcDNA3.1-Vektor ligieren zu können, musste der pcDNA3.1(+)-Vektor (2.2.1) eingesetzt werden, bei dem die Enzyme Xba I und Not I in umgekehrter Reihenfolge im Polylinker wie im pcDNA3.1(-)-Vektor lagen.

Der Mini 5-Ansatz wurde daher mit den Enzymen BstZ I (D-Puffer) und Spe I (H-Puffer) verdaut und das *MMMrghH*-Fragment so aus dem T-Easy-Vektor geschnitten. Anschließend konnte das Fragment in den pcDNA3.1(+)-Vektor ligiert werden, der mit den Enzymen Not I und Xba I linearisiert wurde. Nach Transformation des Ansatzes wurden 8 weiße Kolonien gepickt. Es wurden 8 Minis mit dem Enzym Apa I verdaut. Beim Kontrollverdau des generierten Plasmids

aus *MMMrghH*-Fragment und pcDNA(-)-Vektor mit Apa I wurde ein 509bp langes Fragment erwartet, da das Enzym 10bp vor dem GPR903-Primer und an Position 499 im *MMMrghH*-Fragment schneidet. Nach Apa I-Verdau von Mini 5 erschien ein ~500bp langes Fragment, welches der Länge des erwarteten Fragments entsprach (Abb. 4.3).

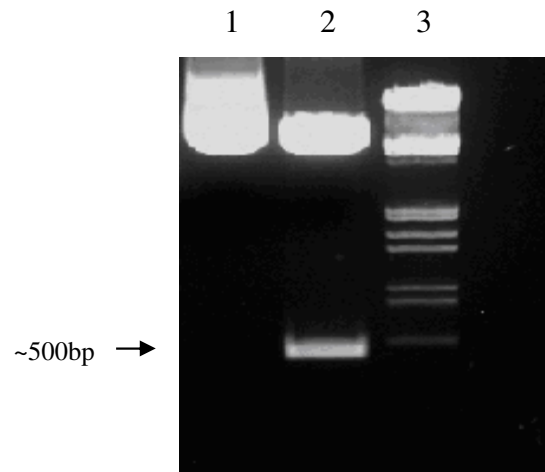


Abb. 4.3: Kontrollverdau, um das *MMMrghH*-Fragment im pcDNA3.1(-)-Vektor sichtbar zu machen. Nach Apa I-Verdau entstand ein ~500bp langes Fragment (Pfeil). Spur 1= Mini 5 unverdaut, Spur 2= Mini 5 nach Apa I-Verdau, Spur 3= λ -Marker verdaut mit EcoR I/Hind III (Anlage 6A).

Das Ergebnis der Sequenzierung mit den T7- und BGH-Primern von Mini 5 war positiv und das Plasmid wurde zur Maxi 5 weiterpräpariert (3.1.8.2). Es bestand eine Sequenzhomologie zwischen Maxi 5 und der GPR90-Datenbank-Sequenz (MrgH) NM030726 von 100% (Anlage 3A). Ein Ausschnitt der Sequenz von Maxi 5 nach Sequenzierung mit den Primern T7 und BGH ist in Abb. 4.4 dargestellt.

```

5'   T7-Primer →
TAATACGACTCACTATAGGGAGACCCAAGCTGGCTAGCGTTTAAACTTAAGCTTGGTACCGAGCTCGG
                                         Not I/BstZ I
ATCCACTAGTCCAGTGTGGTGGAATTCTGCAGATATCCAGCACAGTGGCGGCCGcggaattcgattCCACA
GPR905-Primer →                                     ← GPR903-Primer
GAGAAAGCCATCTTCCTGGAATG..... $\Delta$ 940bp.....GAATGTGACACAGTTCTCGCTGCC
← GPR903-Primer Spe I/Xba I Apa I                               ← BGH-Primer 3'
TTCAATGACCaatcactagtGGGCCCCGTTTAAACCCGCTGATCAGCCTCGACTGTGCCTTCTA

```

Abb. 4.4: Sequenz des *MMMrghH*-Fragments (993bp) nach Sequenzierung der Maxi 5 mit den T7- und BGH-Primern. Die Schnittstellen des T-Vektors sind klein gedruckt. Die Sequenz des pcDNA3.1(+)-Vektors ist unterstrichen. Das Startcodon ATG und das Stopcodon TGA sind eingerahmt. Die Primer sind kursiv gedruckt. Die Enzymschnittstellen sind grau untermalt.

Das generierte Plasmid der Maxi 5 wurde mit pcDNAMMMrgH bezeichnet und ist in Abb. 4.5 abgebildet:

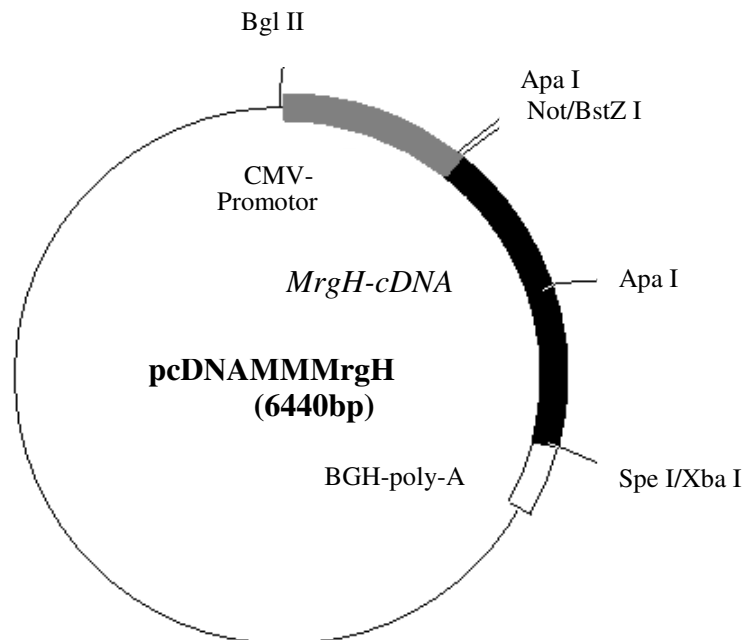


Abb. 4.5: Plasmidkarte des neu generierten Plasmids pcDNAMMMrgH. Eingezeichnet sind die Enzymschnittstellen, über die das MMMrgH-Fragment zwischen CMV-Promotor und BGH-poly-A des pcDNA-Vektors inkloniert wurde: Not/BstZ I und Spe I/Xba I. Es befindet sich eine Apa I-Schnittstelle in dem MMMrgH-Fragment (Position 499bp) und eine im pcDNA-Polylinker.

4.1.2 Klonierung von MRG-cDNA

Das MRG-Gen wurde durch Screening des humanen Genoms nach Entdeckung des *Mas*-Gens identifiziert und auf seine Interaktion mit Ang II hin untersucht (Monnot *et al.*, 1991). Das humane (*HS*)MRG-Fragment wurde, wie bereits für das MMMrgH-Fragment unter 4.1 beschrieben, durch PCR (3.1.1) amplifiziert und in zwei weiteren Klonierungsschritten in den Expressionsvektor pcDNA3.1(+) (2.2.1) kloniert.

Die MRG-cDNA wurde mit den Primern HSMRG5 und HSMRG3 (2.4) aus chromosomaler DNA des Menschen amplifiziert, wobei HSMRG5 41bp vor dem Start-ATG begann und HSMRG3 31bp hinter dem Stopkodon endete (Länge der kodierenden MRG-Sequenz lt. Datenbank: 1137bp; ‚Gen-Bank accession‘-Nummer: S78653; Anlage 3B). Die spezifischen PCR-Bedingungen wurden, wie unter 3.1.1 beschrieben, gewählt.

Das Fragment der erwarteten Länge von 1209bp wurde auf einem Agarosegel sichtbar gemacht (Abb. 4.6).

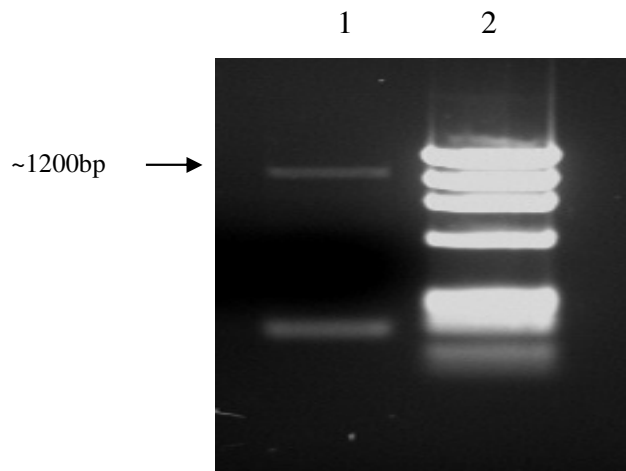


Abb. 4.6: Amplifikation des HSMRG-Fragments durch PCR mit den Primern HSMRG5 und HSMRG3. Das amplifizierte HSMRG-Fragment war ~1200bp lang (Pfeil). Spur 1= Amplifiziertes HSMRG-Fragment (1209bp), Spur 2= Φ -Marker verdaut mit BsuRI (Anlage 6B).

Danach erfolgte die Ligation (3.1.5) des isolierten Fragments in den T-Vektor, der aus 3003 bp besteht und an beiden Enden T-Überhänge besitzt. Anschließend erfolgte die Transformation des Ligationsansatzes in kompetente Zellen (3.1.7) des Bakteriums *E. coli* (2.1). Es wurden 16 weiße Kolonien für die Mini-Präparation (3.1.8.1) verwendet.

Nach Apa I-Verdau des Plasmids aus T-Vektor und HSMRG-Fragment wurden Fragmentgrößen von 904bp oder 372bp erwartet, je nachdem, ob das Fragment in 3'-5'-Richtung oder 5'-3'-Richtung im T-Vektor angeordnet war.

Es war ein 904bp langes Fragment zu erwarten, da das Enzym 37 bp vor dem Start des HSMRG5-Primers und im HSMRG-Fragment an Position 867bp schneidet bzw. ein 372bp langes Fragment, da das Enzym 37bp vor dem Start des HSMRG3-Primers und an Position 335bp im HSMRG-Fragment schneidet.

Nach Verdau von 12 Minis mit dem Enzym Apa I war auf dem Agarosegel bei allen 12 Minis ein ~900bp langes Fragment zu erkennen (Abb. 4.7).

Den Nachweis über die korrekte Ligation (3.1.5) lieferte die Sequenzierung (3.1.11) von Mini 4 mit dem T7-Primer. Das Ergebnis der Sequenzierung konnte mittels BLAST-Suchprogramm (3.1.11.2) auf Homologien mit der MRG-Sequenz verglichen werden und stimmte mit der Datenbanksequenz S78653 überein, so dass in der amplifizierten Sequenz mögliche Mutationen zu 100 % ausgeschlossen werden konnten.

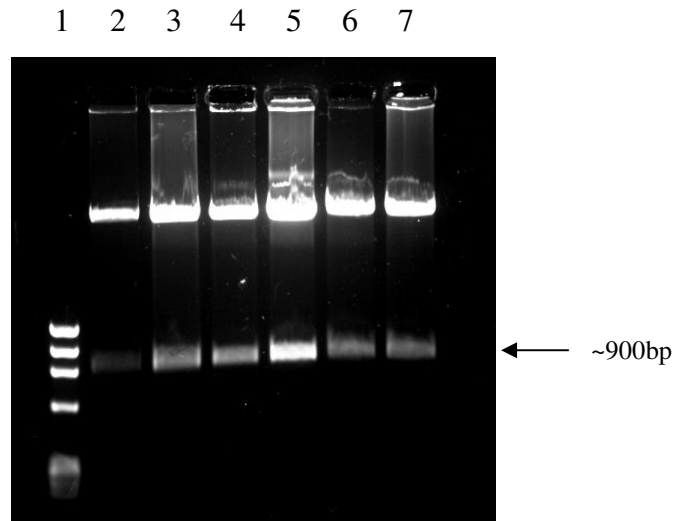


Abb. 4.7: Kontrollverdau, um die Integration des HSMRG-Fragments in den T-Vektor sichtbar zu machen. Nach *Apa I*-Verdau entstand ein ~900bp langes Fragment (Pfeil). Zur Sequenzierung wurde Mini 4 verwendet (Spur 5). 1= Φ -Marker verdaut mit *BsuR I* (Anlage 6B), Spur 2 - 7= Mini 1-6.

Um das Konstrukt in Zellen transkribieren zu können, erfolgte die Umklonierung des Fragments in den pcDNA3.1(-)-Vektor (2.2.1), der einen CMV-Promotor aufweist. Dazu wurde die Plasmid-DNA von Mini 4 mit dem Enzym *BstZ I* (D-Puffer) über 1h bei 50°C im Thermomixer verdaut. Auf dem Kontrollgel erschien eine der Länge des Fragments entsprechende Bande von ~1200bp (Daten nicht dargestellt).

Zur Reinigung des Restriktionsansatzes wurde dieser für 20min auf eine Membran aufgetragen (3.1.10), anschließend mit dem Enzym *Spe I* (H-Puffer) geschnitten und, wie in 3.1.3 beschrieben, eluiert. Parallel dazu wurde der pcDNA3.1(-)-Vektor mit dem Enzym *Xba I* und nach Aufreinigung mit dem Enzym *Not I* verdaut.

Im Anschluss erfolgte die Ligation des Fragments über Nacht (3.1.5). Dabei lagerten sich Vektor und DNA-Fragment durch Basenpaarung an den Restriktionsstellen *Xba I/Spe I* und *BstZ I/Not I* mit Hilfe der DNA-Ligase aneinander.

Der Ligationsansatz wurde in Bakterien transformiert und dann auf Agarplatten bebrütet. Es wurden 10 weiße Kolonien gepickt und 10 Minis mit *Apa I* verdaut. Das Enzym musste wieder an Position 867 im Fragment schneiden.

Ein weiterer Schnittort des Enzyms *Apa I* lag 10bp vor dem Beginn des HSMRG5-Primers, so dass die erwartete Länge des Fragments 877bp betrug.

Bei Mini 2 erschien eine Bande von ~900bp Länge, die somit der Länge des erwarteten Fragments entsprach (Abb. 4.8).

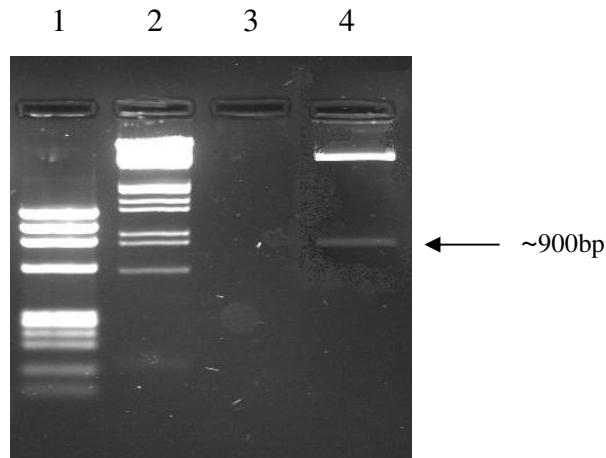


Abb. 4.8: Kontrollverdau des HSMRG-Fragments nach Klonierung in den pcDNA3.1(-)-Vektor. Nach Verdau des Plasmids pcDNAHSMRG mit *Apa I* entstand ein ~900bp langes Fragment (Pfeil). Spur 1= Φ -Marker verdaut mit *BsuR I* (Anlage 6B), Spur 2= λ -Marker verdaut mit *EcoR I/Hind III* (Anlage 6A), Spur 3= Wasserprobe, Spur 4= Mini 2 nach *Apa I*-Verdau (877bp).

Nach positivem Sequenzierungsergebnis wurde aus Mini 2 im weiteren Maxi 2 präpariert (3.1.8.2). Die Sequenzierung der Maxi 2 mit dem T7- und BGH-Primer zeigte eine Übereinstimmung mit der MRG-Datenbank-Sequenz S78653 von 100 % (Anlage 3B). Ein Ausschnitt der Sequenz von Maxi 2 nach Sequenzierung mit den Primern T7 und BGH wird in Abb. 4.9 gezeigt.

```

5'   T7-Primer →                                     Apa Xba I/Spe I
TTAATACGACTCACTATAGGGAGACCCAAGCTGGCTAGCGTTTAAACCGGGCCCTctagtgattCCTGACTGT
HSMRG5-Primer →
GATGTTGTGGCCCACTCAGGTCCCAGCACCCC[ATG].....Δ1110bp.....CACAGGGTCGATGTGG
                                     ← HSMRG3-Primer                               Sac II       BstZ I/Not I
AAACA[TAA]TTTCCCACATCTGAGCTGGGGAATTGTACACactgcagcaatcccgcggccatggCGGCCGCACT
GTGCTGGATATCTGCAGAATTCCACCACACTGGACTAGTGGATCCGAGCTCGGTACCAAGCTTAAGTT
CCACCACACTGGACTAGTGGATCCGAGCTCGGTACCAAGCTTAAGTTTAAACCGCTGATCAGCCTCGA
← BGH-Primer 3'
CTGTGCCTTCTA

```

Abb. 4.9.: Sequenz des HSMRG-Fragments (1209bp) nach Sequenzierung der Maxi 2 mit den T7- und BGH-Primern. Die Schnittstellen des T-Vektors sind klein gedruckt. Die Sequenz des pcDNA3.1(-)-Vektors ist unterstrichen. Das Startcodon ATG und das Stopcodon TAA sind eingerahmt. Die Primer sind kursiv gedruckt. Die Enzymschnittstellen sind grau untermalt.

Das generierte Plasmid der Maxi 2 wurde mit pcDNAHSMRG bezeichnet und ist in Abb. 4.10 abgebildet.

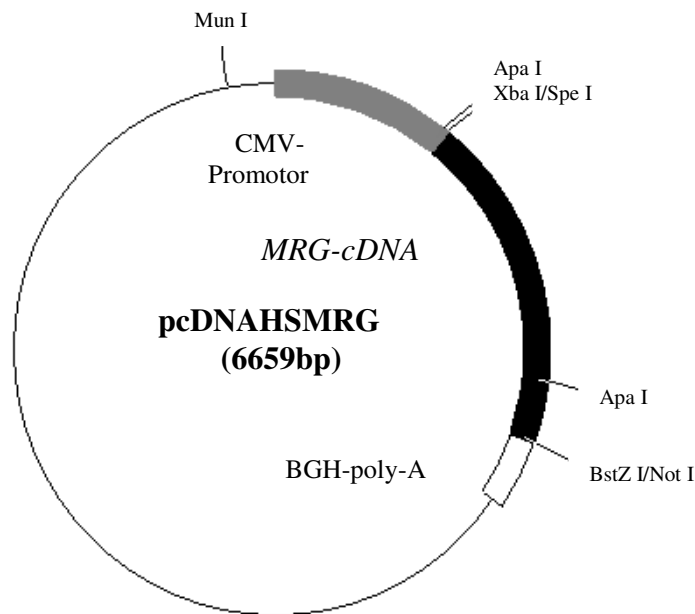


Abb. 4.10: Plasmidkarte des neu generierten Plasmids pcDNAHSMRG. Eingezeichnet sind die Enzymschnittstellen, über die das HSMRG-Fragment zwischen CMV-Promotor und BGH-Poly-A des pcDNA-Vektors einkloniert wurde: *Xba I/Spe I* und *BstZ I/Not I*. Es befindet sich eine *Apa I*-Schnittstelle im HSMRG-Fragment (Position 867bp) und eine im pcDNA-Polylinker.

4.2 Generierung der transfizierten Zellen

4.2.1 Linearisierung der Konstrukte

Die Konstrukte für die cDNA von *Mas*, *MrgX2* (HS‘Mas-Like1’), *MrgX1* (HS‘Mas-Like2’) und *MrgD* (HS‘Mas-Like3’) (2.2.2) wurden von der Firma Aventis (Frankfurt, Main, Deutschland) kloniert und freundlicherweise zur Verfügung gestellt. Für die Transfektion der Konstrukte in die Zellen musste die cDNA vorher linearisiert werden.

Die Plasmide pcDNAHSMRG und pcDNAMMMrgH wurden, wie in 4.1 beschrieben, kloniert. Die Plasmide pcDNAHSMrgX2, pcDNAHSMrgX1, pcDNAHSMrgD, pcDNAHSMrgF und pcDNAHSMRG wurden mit dem Enzym *Mun I* verdaut, das an Position 162 im pcDNA3.1(-)-Vektor und damit 70bp vor dem CMV-Promotor schneidet.

Die Plasmide pcDNAHSMas (2.2.2) und pcDNAMMMrgH (Abb. 4.5) dagegen mussten mit dem Enzym *Bgl II* linearisiert werden (Daten nicht dargestellt), da die cDNA von *Mas* zwei und die von *MrgH* eine *Mun I*-Schnittstelle in der kodierenden Sequenz aufwies. Die Schnittstelle des Enzyms befindet sich im Vektor an Position 13 und liegt 219bp vor dem CMV-Promotor.

4.2.2 Transfektion und Selektion zum Transfektionsnachweis der integrierten cDNA

Die linearisierten Konstrukte konnten nach Präparation in die COS-7-Zellen (2.1) transfiziert werden (3.2.4). Nach Selektion mit 100µl Neomycin/10cm² Platte (2.8.1) über ca. eine Woche erfolgte die DNA-Isolierung (3.2.5) aus einem Teil der Zellen. Um den Beweis zu liefern, dass die stabil transfizierten Zellen die gesamte interessierende DNA-Sequenz chromosomal integriert haben, wurden PCRs (3.1.1) durchgeführt.

Es wurden die Primer CMV52 (2.4) und POLBGH32 (2.4) eingesetzt, die im CMV52-Promotor und an der BGH-Poly-A-Seite des Vektors lagen.

Die Fragmente mussten daher eine Länge von ~1100-1200bp Länge aufweisen. Damit konnte gezeigt werden, dass die Transfektion erfolgreich war. Die Wasserprobe und die DNA von untransfizierten Zellen (Spur 11 und 12) zeigten keine Banden (Abb. 4.11).

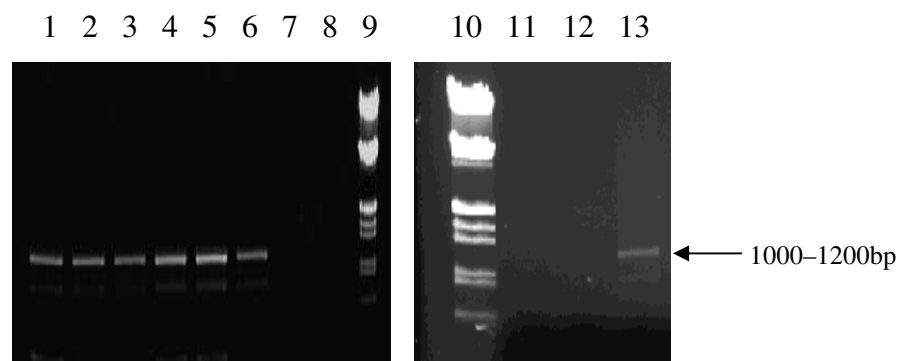


Abb. 4.11: Nachweis der integrierten cDNA nach Transfektion. Dargestellt sind die PCR-Produkte nach Verarbeitung der transfizierten Zell-DNA mit den Primern CMV52 und POLBGH32. Alle transfizierten Zellen waren Träger eines 1000-1200bp langen Fragments. Spur 1= HSMas-transfizierte Zellen, Spur 2= HSMrgX2-transfizierte Zellen, Spur 3= HSMrgX1-transfizierte Zellen, Spur 4= HSMrgD-transfizierte Zellen, Spur 5= MMMrgH-transfizierte Zellen, Spur 6= HSMRG-transfizierte Zellen, Spur 7= pcDNA3.1(-)-transfizierte Zellen, Spur 8= Wasserprobe, Spur 9 und 10= λ-Marker verdaut mit EcoR I/Hind III (Anlage 6A), Spur 11= Wasserprobe, Spur 12= pcDNA3.1(-)-transfizierte Zellen, Spur 13= HSMrgF-transfizierte Zellen.

4.2.3 Nachweis der spezifischen Konstrukt-DNA

Es wurde eine erneute Reihe von PCRs gestartet, bei denen wieder der CMV52-Primer (2.4), aber ein für die jeweilige spezifische cDNA-Sequenz entworfener Primer verwendet wurde, der hinter dem Startcodon der jeweiligen Sequenz lag.

Damit konnte aufgezeigt werden, dass die in den Zellen vorhandene Sequenz auch tatsächlich dem eingeführten Konstrukt entsprach und alle in den Versuchen verwendeten Zellen Träger der jeweils spezifischen Konstrukt-DNA waren (Abb.4.12).

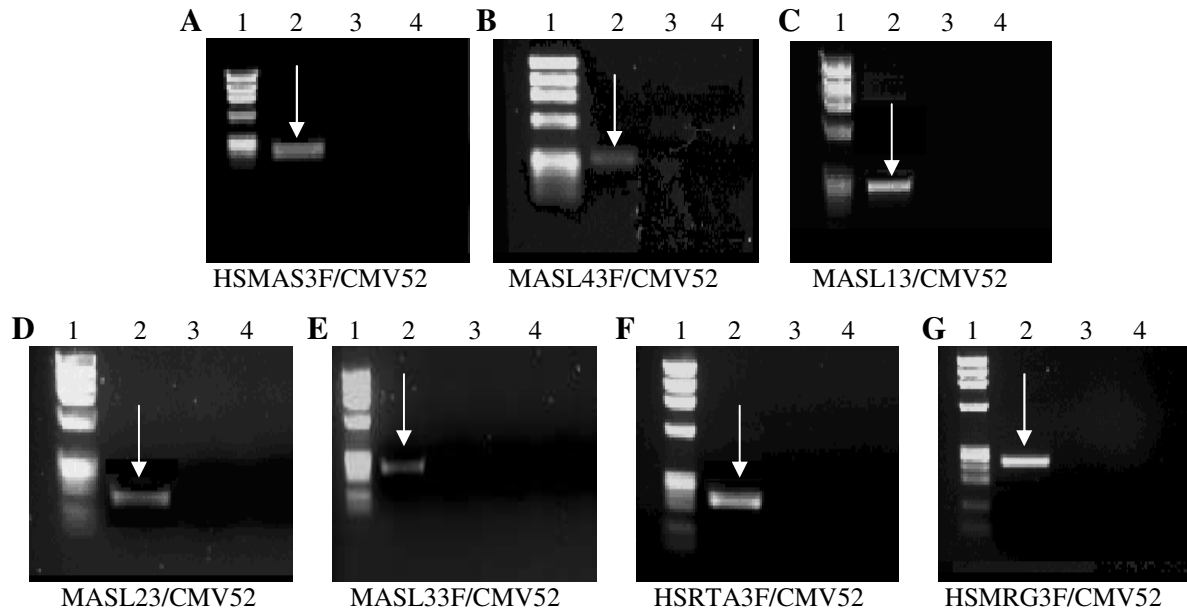


Abb. 4.12: Nachweis der Integration der spezifischen Konstrukt-DNA. Dargestellt sind die PCR-Produkte (weiße Pfeile) der jeweiligen transfizierten Zelllinie nach Verarbeitung der Zell-DNA mit dem CMV52-Primer und den cDNA-spezifischen Primern. Spur 1= Φ -Marker verdaut mit *BsuR I* (Anlage 6B), Spur 2= Mas-spezifisches Fragment, Spur 3= PCR-Produkt der mit dem pcDNA-Vektor als Kontrolle verwendeten transfizierten Zelllinie, Spur 4= Wasserprobe.

Bei HSMas war ein 212bp langes Fragment zu erwarten. Bei MMMrgH war das erwartete Fragment 293bp, bei HSMrgX2 244bp, bei HSMrgX1 211bp, bei HSMrgD 236bp, bei HSMrgF 213bp und bei HSMRG 239bp lang (Abb. 4.12).

Nach DNA-Isolierung (3.2.5) wurde die cDNA mit dem CMV52-Primer und einem jeweils für die cDNA-spezifisch entworfenen Primer amplifiziert.

Die Fragmente hatten eine Länge zwischen 200-300bp. Die Sequenzen sind nachfolgend dargestellt (Abb.4.13).

A
 5' **CMV52**
GGCGGTAGGCGTGTACGGTGGGAGGTCTATATAAGCAGAGCTCTCTGGCTAACTAGAGAACCCACTGCTTACTGGCTTATCGAAATTAATACGA
 CTCACTATAGGGAGACCCAAGCTGGCTAGCGTTTAAACGGGCCCTCTAGACTCGAGGCC**CATG**GATGGGTCAAACGTGACATCATTGTGTGTA
 HSMAS3F 3'
 GGAACCCACGAACATCTCAACTGG Amplifiziertes *HSMas*-spezifisches Fragment: 212bp.

B

5' **CMV52**
GGCGGTAGGCGTGTACGGTGGGAGGTCTATATAAGCAGAGCTCTCTGGCTAACTAGAGAACCCACTGCTTACTGGCTTATCGAAATTAATACGA
 CTCACTATAGGGAGACCCAAGCTGGCTAGCGTTTAAACTTAAGCTTGGTACCGAGCTCGGATCCACTAGTCCAGTGTGGTGAATCTGCAGAT
 ATCCAGCACAGTGGCGGCCGCGGAATTTCGATTCCACAGAGAAAGCCATCTTCTGGAA**ATG**GAGCCATTGGCAATGACCTTGTATCMASL43F
 3' CTCTGGAA
TCCACACAACC Amplifiziertes *MMMrgh*-spezifisches Fragment: 293bp.

C

5' **CMV52**
GGCGGTAGGCGTGTACGGTGGGAGGTCTATATAAGCAGAGCTCTCTGGCTAACTAGAGAACCCACTGCTTACTGGCTTATCGAAATTAATACGA
 CTCACTATAGGGAGACCCAAGCTGGCTAGCGTTTAAACGGGCCCTCTAGACTCGAGGCC**ATG**GATCCAACCCCGGCTGGGAACAGAAA
 GTACAACAGTGAATGAAATGACCAAGCMASL13F CCTTCTTCTGCTTTGTGGC 3' Amplifiziertes *HSMrgX2*-spezifisches Fragment: 244bp.

D

5' **CMV52**
GGCGGTAGGCGTGTACGGTGGGAGGTCTATATAAGCAGAGCTCTCTGGCTAACTAGAGAACCCACTGCTTACTGGCTTATCGAAATTAATACGA
 CTCACTATAGGGAGACCCAAGCTGGCTAGCGTTTAAACGGGCCCTCTAGACTCGAGGCC**ATG**GATCCAACCATCTCAACCTTGGACACAGAACT
 GACAMASL23F CCAATCAACGGA 3' Amplifiziertes *HSMrgX1*-spezifisches Fragment: 211bp.

E

5' **CMV52**
GGCGGTAGGCGTGTACGGTGGGAGGTCTATATAAGCAGAGCTCTCTGGCTAACTAGAGAACCCACTGCTTACTGGCTTATCGAAATTAATACGA
 CTCACTATAGGGAGACCCAAGCTGGCTAGCGTTTAAACGGGCCCTCTAGACTCGAGGCC**ATG**AACCAGACTTTGAATAGCAGTGGACCGTGGA
 GTCAGCCCTAACTATTCCAGAGGGAGMASL33F CACAGTGCACACGGCTACCT 3' Amplifiziertes *HSMrgD*-spezifisches Fragment: 236bp.

F

5' **CMV52**
GGCGGTAGGCGTGTACGGTGGGAGGTCTATATAAGCAGAGCTCTCTGGCTAACTAGAGAACCCACTGCTTACTGGCTTATCGAAATTAATACGA
 CTCACTATAGGGAGACCCAAGCTGGCTAGCGTTTAAACGGGCCCTCTAGACTCGAGGCC**ATG**TGCCCTGGCTGAGCGAGGCCCGGAACCTCA
 CAGCCGGGHSRTA3F GGCTTCTGACCATCGAG 3' Amplifiziertes *HSMrgF*-spezifisches Fragment: 213bp.

G

5' **CMV52**
GGCGGTAGGCGTGTACGGTGGGAGGTCTATATAAGCAGAGCTCTCTGGCTAACTAGAGAACCCACTGCTTACTGGCTTATCGAAATTAATACGA
 CTCACTATAGGGAGACCCAAGCTGGCTAGCGTTTAAACGGGCCCTCTAGACTCGATTCTGACTGTGATGTTGTGGCCCACTCAGGTCCCAGCA
 CCCC**ATG**GCTGGGGGAAAATTTGCTGGTTCAMRG3F CCAGAGGGCTGGATGGAC 3' Amplifiziertes *HSMRG*-spezifisches Fragment:
 239bp.

Abb. 4.13: Nachweis der spezifischen Konstrukt-DNA. Dargestellt sind die Sequenzen der amplifizierten spezifischen PCR-Konstrukte für Zellen transfiziert mit A: *pcDNAHSMas*, B: *pcDNAMMMrgH*, C: *pcDNAHSMrgX2*, D: *pcDNAHSMrgX1*, E: *pcDNAHSMrgD*, F: *pcDNAHSMrgF* und G: *pcDNAHSMRG*, beginnend mit dem CMV52-Primer, endend mit den entworfenen Primern für das HSMas-Fragment bzw. Mas-ähnliche Rezeptorsequenzen. Fett: ATG als Startcodon.

Aufgrund der Sequenzierung konnte nachgewiesen werden, dass die spezifische cDNA in die Zellen integriert war. Somit konnten die nachfolgenden Experimente zur Arachidonsäure-Freisetzung (3.2.8) nach Interaktion mit verschiedenen Peptiden und Nicht-Peptiden (4.3 und 4.4) mit den vorhandenen selektierten Zelllinien durchgeführt werden.

4.3 Die Interaktion von Angiotensin-Metaboliten, Angiotensin-Rezeptor-Blockern, AVE0991 und Substanz P mit dem humanen Mas-Rezeptor und Mas-Sequenz-ähnlichen Rezeptoren

In früheren Studien wurde der G-Protein gekoppelte Rezeptor (GPCR) Mas als ein Rezeptor für Ang II diskutiert, welches als das wichtigste Peptid innerhalb des Renin-Angiotensin-Systems (RAS) gilt (Jackson *et al.*, 1988). Jahre später konnte gezeigt werden, dass Mas nicht direkt Ang II-Signaling vermittelt, aber mit dem AT1-Rezeptor heterooligomerisiert und dadurch die Effekte von Ang II inhibiert (Kostenis *et al.*, 2005). Neben Ang II konnten mittlerweile weitere Peptide des RAS identifiziert werden, die ebenfalls regulatorisch auf den Blutdruck einwirken. In diesem Zusammenhang konnten Santos *et al.* (2003) experimentell für den Ang II-Metaboliten Ang-(1-7) seine Funktion als Mas-Rezeptor-Agonist belegen. Darüber hinaus konnten die Autoren zeigen, dass der Ang-(1-7)-spezifische Antagonist A779 zu einer vollständigen Hemmung der AA-Freisetzung in *Mas*-transfizierten Zellen führte, während durch die Rezeptorblocker AT1 und AT2 keine signifikanten Einflüsse dokumentiert werden konnten (Santos *et al.* 2003). Zwischenzeitlich wurde eine große Familie von GPCR gefunden, die eine hohe Sequenzhomologie zum Mas-Rezeptor aufweisen. Zwei unabhängige Arbeitsgruppen haben diese Familie beschrieben: die eine Gruppe nannte sie sensorisch Neuronen-spezifischen GPCRs (Lembo *et al.*, 2003), die andere ‚Mas-related genes‘-Familie (Mrg) (Dong *et al.*, 2001). In dieser Doktorarbeit wird die Nomenklatur der Mrg-Familie verwendet. Die meisten der GPCRs sind so genannte ‚orphan receptors‘, das heißt, ihre Liganden sind noch nicht bekannt. Einige Mitglieder der Mrg-Familie können jedoch durch Peptide wie RF-Amide oder Opioid-peptide aktiviert werden (Lembo *et al.*, 2002; Robas *et al.*, 2003; Santos *et al.*, 2003; Shinohara *et al.*, 2004; Kamohara *et al.*, 2005; 1.2).

Aufgrund der bislang vorliegenden Untersuchungsergebnisse sollte in dieser Arbeit erstmalig überprüft werden, ob neben Ang-(1-7) weitere Peptide, aber auch Nicht-Peptide, als Rezeptor-Liganden fungieren können. Untersucht wurde dabei nicht nur der Mas-Rezeptor selbst, sondern auch weitere Rezeptoren mit Sequenzhomologien zu diesem Rezeptor, um weitere mögliche Rezeptor-Liganden nachweisen zu können. Getestet wurden die Peptide Ang-(1-7), Ang I, Ang II, Ang III, Ang IV, Substanz P, die Antagonisten Irbesartan (ein AT1-Rezeptorblocker), PD123319 (PD; ein AT2-Rezeptorblocker), A779 (spezifischer Ang-(1-7)-Rezeptorblocker), und das Nicht-Peptid AVE0991 (2.11). Als Nachweis der Interaktion mit den untersuchten

Rezeptoren dient die Freisetzung von Arachidonsäure (AA), da eine Stimulation der AA-Abgabe über verschiedene Ang-Rezeptortypen erfolgen kann (Muthalif *et al.*, 1998). Als Rezeptoren wurden neben dem humanen Mas-Rezeptor der murine MrgH-Rezeptor, die humanen MrgX2-, MrgX1-, MrgD-, MrgF- und MRG-Rezeptoren verwendet und jeweils mit den genannten Peptiden bzw. Substanzen untersucht. Für die Untersuchungen wurden drei Versuchsgruppen gebildet: in der ersten Gruppe wurden mit dem Plasmidvektor pcDNA3.1(-) (2.2.1) transfizierte COS-7-(COS)-Zellen (2.1) (pcDNA-transfizierte Zellen) als Referenz nur mit PBS-Lösung (2.8.1) behandelt (unbehandelte Zellen), in der zweiten Gruppe wurden pcDNA-transfizierte Zellen mit dem jeweiligen Peptid/Nicht-Peptid (Kontrollgruppe) inkubiert und in der dritten Gruppe wurden Rezeptor-transfizierte Zellen mit dem jeweiligen Peptid/Nicht-Peptid behandelt und anschließend die veränderte Freisetzung der radioaktiv-markierten Arachidonsäure gemessen (3.2.8). Die mit dem Flüssigkeits-Szintillationszähler ermittelten Werte (CPM; DPM) (3.2.8) in den unbehandelten Zellen der ersten Gruppe wurden in Prozent umgerechnet und der Mittelwert \pm Standardfehler (SEM) bestimmt. Dieser Wert fungierte als Referenzwert (100%) für die Daten der Gruppe 2 und 3. Der prozentuale AA-Anstieg bzw. die AA-Reduktion zwischen den Gruppen wurde dann berechnet, auf Signifikanz ($p < 0,05$) getestet und als Nachweis einer Ligand-Rezeptor-Bindung verwendet.

4.3.1 Test von Agonisten des Mas-Rezeptors und Antagonisten des Mas-, AT1- und AT2-Rezeptors an Mas-transfizierten Zellen

4.3.1.1 Arachidonsäure-Freisetzung nach Interaktion von Ang-(1-7), A779, Irbesartan und PD123319 mit dem humanen Mas-Rezeptor

Zur Darstellung der spezifischen Bindung des Peptids Ang-(1-7) an den humanen (HS)Mas-Rezeptor wurde die AA-Freisetzung nach Zugabe von 10^{-8} M Ang-(1-7) zu pcDNA- und Mas-transfizierten COS-7-Zellen bestimmt. Bereits im Kontrollansatz (nur pcDNA-transfizierte Zellen) führte die Zugabe von 10^{-8} M Ang-(1-7) zu einem signifikanten AA-Anstieg (+ 50,9% \pm 1,3%; $p < 0,001$ versus (vs.) pcDNA3.1 ohne Behandlung). In den HSMas-transfizierten Zellen war der AA-Anstieg durch die Inkubation mit 10^{-8} M Ang-(1-7) noch einmal signifikant erhöht (+ 264,8 \pm 15,4%, $p < 0,001$ vs. pcDNA3.1+Ang-(1-7); Abb. 4.19). Bei den Aminosäurederivaten (Nicht-Peptiden) wurde der Ang-(1-7)-Rezeptor-Antagonist A779, der AT1-Rezeptor-Blocker Irbesartan und der AT2-Rezeptor-Blocker PD123319 (PD) (je 10^{-8} M) allein und in Kombination mit Ang-(1-7) getestet. Bei der alleinigen Behandlung der Zellen mit A779, Irbesartan oder PD123319 zeigten sich keine signifikanten Veränderungen bezüglich der

AA-Freisetzung in den *HSMas*-transfizierten Zellen vs. den behandelten pcDNA-transfizierten Zellen. Nur durch die PD-Gabe konnte ein geringer AA-Anstieg um $8,7 \pm 2,6\%$ ($p < 0,05$) in *HSMas*-transfizierten Zellen vs. PD-stimulierten-pcDNA-transfizierten Zellen dokumentiert werden (Abb. 4.19). Durch die kombinierte Inkubation von 10^{-8} M Ang-(1-7) mit den zu untersuchenden Antagonisten (A779, Irbesartan, PD) kam es durch die zusätzliche Gabe von A779 zu einer signifikant reduzierten AA-Freisetzung bei den pcDNA-transfizierten und den *HSMas*-transfizierten Zellen ($+44,8 \pm 1,9\%$; $p < 0,001$ vs. pcDNA3.1+Ang-(1-7) und $+306,8 \pm 15,6\%$; $p < 0,001$ vs. pcDNA3.1+Ang-(1-7)). Im Gegensatz dazu kam es weder durch die Kombination von Ang-(1-7) mit Irbesartan noch mit PD bei den *HSMas*-transfizierten Zellen zu einer signifikant reduzierten AA-Freisetzung im Vergleich zur Kontrolle. Wohingegen bei den nur pcDNA-transfizierten Zellen auch hier die Zugabe von Irbesartan ($19,6 \pm 2\%$; $p < 0,001$ vs. pcDNA+Ang-(1-7)) und PD ($47 \pm 3,9$; $p < 0,001$ vs. pcDNA+Ang-(1-7)) den Ang-(1-7)-vermittelten AA-Anstieg signifikant reduzierte (Abb. 4.19).

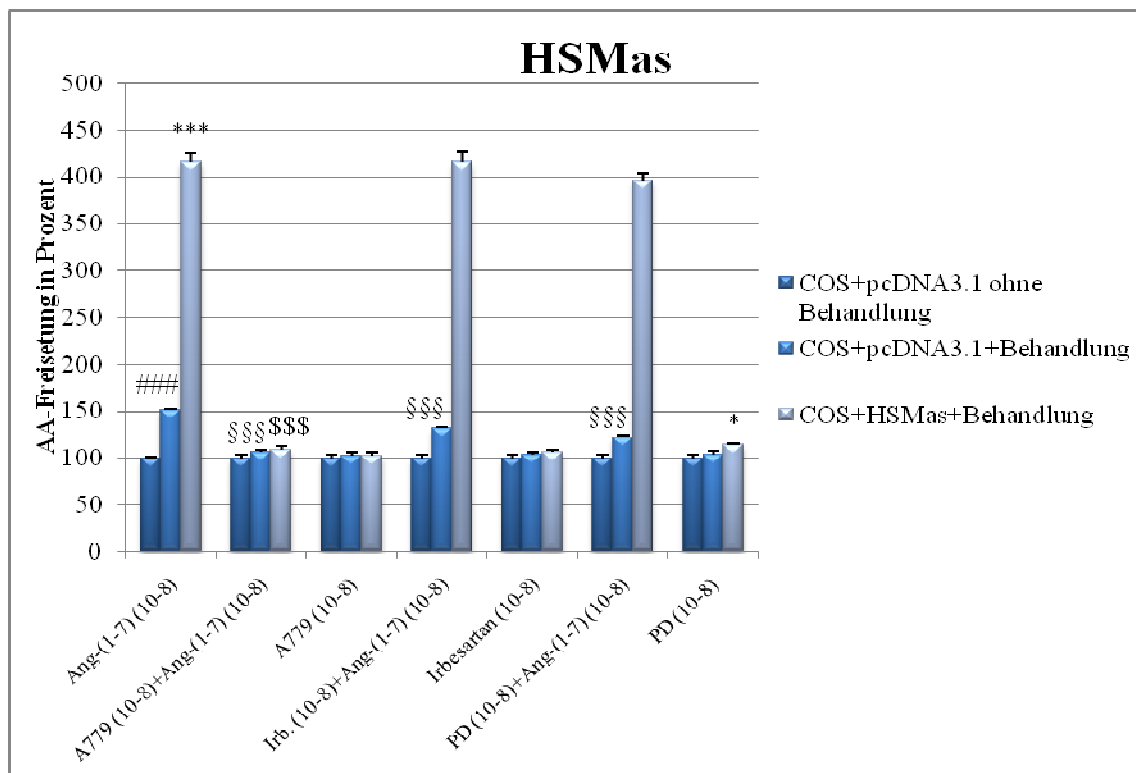


Abb. 4.19: Charakterisierung der AA-Freisetzung in pcDNA3.1- und *HSMas*-transfizierten COS-Zellen ohne Behandlung und nach Behandlung mit Ang-(1-7), A779, Irbesartan (Irb.) und PD123319 (PD) alleine und in Kombination (Mittelwert \pm SEM). ### $p < 0,001$, vs. pcDNA3.1 ohne Behandlung, * $p < 0,05$, *** $p < 0,001$ vs. pcDNA3.1+Behandlung; \$\$\$ $p < 0,001$ vs. pcDNA3.1+Antagonist (A779, Irb., PD)+Ang-(1-7); \$\$\$ $p < 0,001$ vs. *HSMas*+Antagonist (A779, Irb., PD)+Ang-(1-7). Die unbehandelten pcDNA3.1-transfizierten Zellen wurden als 100%-Wert festgelegt; $n \geq 4$.

Somit konnte anhand dieser Untersuchungen gezeigt werden, dass A779 antagonistisch auf den Ang-(1-7)-Rezeptor wirkt, während Irbesartan und PD123319 keinen Einfluss auf die Ang-(1-7)-vermittelte AA-Freisetzung haben. Daraus lässt sich schlussfolgern, dass Ang-(1-7) nicht mit den Ang II-Rezeptoren AT1 und AT2 interagiert. Ferner konnte die Mas-vermittelte Wirkung von Ang-(1-7) bestätigt werden, da die Behandlung mit A779 die AA-Freisetzung auf Kontrollwerte reduzierte.

4.3.1.2 Vergleich der Arachidonsäure-Freisetzung von AVE0991, Ang-(1-7) und A779 nach Interaktion mit dem humanen Mas-Rezeptor

AVE0991 ist ein Nicht-Peptid, welches nach Bindung an Mas eine hohe NO-Freisetzung hervorruft und daher als Ligand für diesen Rezeptor gilt (Pinheiro *et al.*, 2004).

In diesen Experimenten sollte überprüft werden, ob AVE0991 als Mas-Agonist ähnlich hohe AA-Freisetzung am Mas-Rezeptor hervorrufen kann wie Ang-(1-7). Darüber hinaus sollte dargestellt werden, ob der Ang-(1-7)-spezifische Antagonist A779 die Wirkung von AVE0991 auf die AA-Freisetzung in den *HSMas*-transfizierten Zellen blockieren kann. In Analogie zu den unter 4.3.1.1 beschriebenen Versuchen kam es durch die Inkubation mit 10^{-8} M Ang-(1-7) und 10^{-6} M Ang-(1-7) bei den unbehandelten Zellen zu einem signifikanten AA-Anstieg (10^{-8} M Ang-(1-7): $+50,9\% \pm 1,3\%$, $p < 0,001$ vs. pcDNA3.1 ohne Behandlung; 10^{-6} M Ang-(1-7): $+35,7 \pm 9,6\%$, $p < 0,001$ vs. pcDNA3.1 ohne Behandlung; Abb. 4.20).

Auch die Behandlung der pcDNA-transfizierten Zellen mit 10^{-8} M AVE0991 und 10^{-6} M AVE0991 ergab einen signifikanten AA-Anstieg (10^{-8} M AVE0991: $+ 62,3 \pm 1,9\%$, $p < 0,001$ vs. pcDNA 3.1 ohne Behandlung; 10^{-6} M AVE0991: $+ 67,1 \pm 1,2\%$, $p < 0,001$ vs. pcDNA 3.1 ohne Behandlung) und war somit in beiden getesteten Konzentrationen höher als der für Ang-(1-7) ermittelte prozentuale Anstieg.

Auch in den *HSMas*-transfizierten Zellen führte die alleinige Zugabe von Ang-(1-7) wiederum zu einer signifikant gesteigerten AA-Freisetzung (10^{-8} M Ang-(1-7): $+ 264,8 \pm 15,4\%$, $p < 0,001$; 10^{-6} M Ang-(1-7): $189 \pm 15,1\%$, $p < 0,001$; Abb. 4.20).

Ausgehend von den AVE0991-stimulierten pcDNA-transfizierten Zellen zeigte sich im Gegensatz dazu durch die Gabe von AVE0991 (10^{-6} und 10^{-8} M) keine signifikante Stimulation der AA-Freisetzung bei den *HSMas*-transfizierten Zellen (Abb. 4.20), vielmehr führte die Inkubation zu einer reduzierten AA-Freisetzung ($45,6 \pm 6,8\%$, $p < 0,01$ und $9,9 \pm 3,2\%$, $p < 0,05$).

Durch die kombinierte Behandlung mit 10^{-8} M A779 und 10^{-8} M AVE0991 kam es nur in den pcDNA-transfizierten Zellen zu einer signifikanten Differenz in Bezug auf die alleine Inkubation

der Zellen mit 10^{-8} M AVE0991 ($+34,9 \pm 2,3\%$, $p < 0,01$ vs. pcDNA3.1+ 10^{-8} M AVE0991), vergleichbare Effekte konnten jedoch nicht für die *HSMas*-transfizierte Zellen dokumentiert werden (Abb. 4.20). Somit ließ sich die eingangs angenommene Hypothese, dass A779 die durch AVE0991 hervorgerufene AA-Freisetzung am *HSMas*-Rezeptor antagonisiert, anhand der Untersuchungsergebnisse nicht verifizieren.

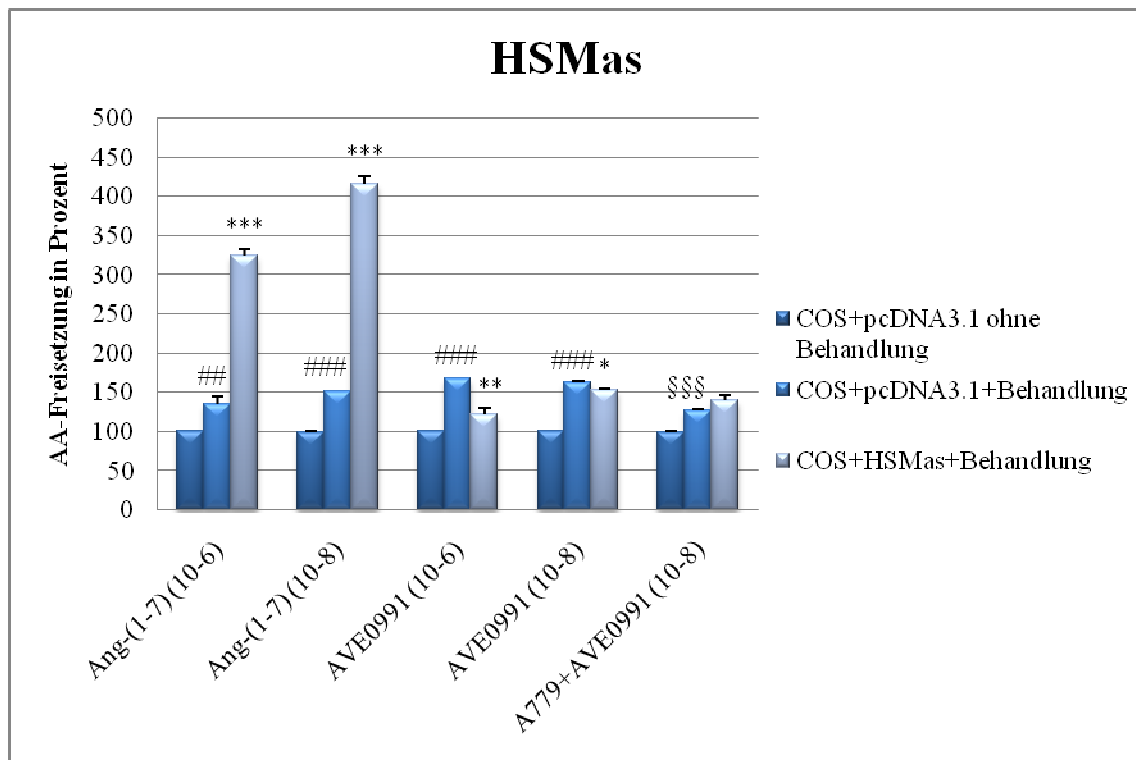


Abb. 4.20: Charakterisierung der AA-Freisetzung in pcDNA3.1- und *HSMas*-transfizierte COS-Zellen nach Behandlung mit Ang-(1-7), AVE0991 und A779+AVE0991 (Mittelwert \pm SEM). ## $p < 0,01$, ### $p < 0,001$ vs. pcDNA3.1 ohne Behandlung, * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$ vs. pcDNA3.1+Behandlung; §§§ $p < 0,001$ versus pcDNA3.1+A779+AVE0991; $n \geq 4$.

4.3.1.3 Arachidonsäure-Freisetzung nach Interaktion von Angiotensin-Metaboliten mit dem humanen Mas-Rezeptor

In mehreren Untersuchungen wurde die Beeinflussung der Ca^{2+} -Freisetzung in *Mas*-transfizierte Zellen nach Behandlung mit Ang I und Ang II dokumentiert (Jackson *et al.* 1989; McGillis *et al.*, 1989; Ambroz *et al.*, 1991; Andrawis *et al.*, 1992; 1.4.1, 1.4.2). Jackson und Mitarbeiter (1989) konnten beispielsweise in neuronalen Zelllinien eine Interaktion zwischen Ang II und Ang III mit dem *Mas*-Rezeptor über die Ca^{2+} -Freisetzung aufzeigen, nicht aber für Ang I. Kostenis und Mitarbeiter (2005) postulierten später, dass der *Mas*-Rezeptor nicht per se

ein Rezeptor für Ang II ist, aber die Signalkaskade beeinflusst, die über die Ang II/AT1-Achse aktiviert wird.

In der hier dargestellten Versuchsreihe wurden die Interaktionen von Ang I, Ang II, Ang III und Ang IV in pcDNA- und *HSMas*-transfizierten Zellen untersucht und wiederum die AA-Freisetzung gemessen (je 10^{-8} M), um zu prüfen, ob andere Ang-Metaboliten mit hoher Sequenzhomologie zu Ang-(1-7) ebenfalls intrazelluläres Signaling über den *HSMas*-Rezeptor stimulieren können.

Bei den Ang I-behandelten-pcDNA-transfizierten Zellen gab es gegenüber den unbehandelten Zellen keine signifikante AA-Freisetzung. Ang II, Ang III und Ang IV zeigten einen geringen signifikanten AA-Anstieg (Ang II: $16,7 \pm 9,4\%$, $p < 0,01$ vs. pcDNA3.1 ohne Behandlung; Ang III: $16,4 \pm 6,9\%$, $p < 0,001$ vs. pcDNA3.1 ohne Behandlung; Ang IV: $28 \pm 7,3\%$, $p < 0,001$ vs. pcDNA3.1 ohne Behandlung; Abb. 4.21).

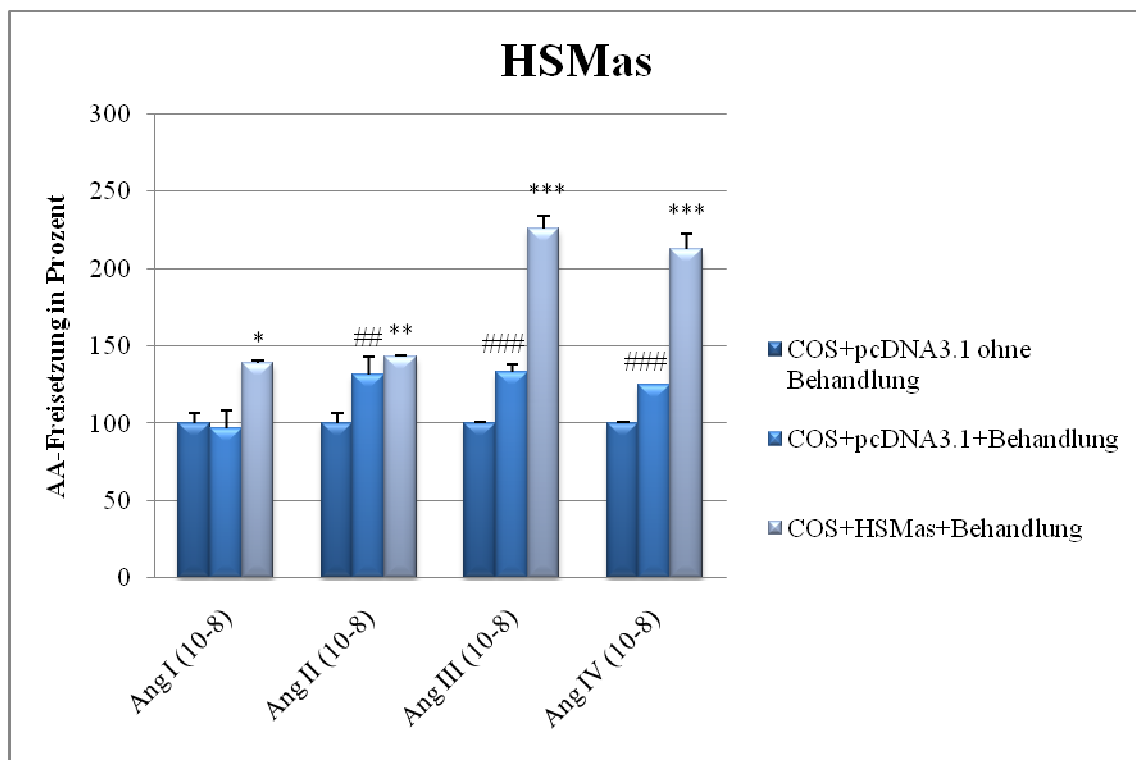


Abb. 4.21: Charakterisierung der AA-Freisetzung in pcDNA3.1- und *HSMas*-transfizierten COS-Zellen nach Behandlung mit Ang I, Ang II, Ang III und Ang IV (Mittelwert \pm SEM). ### $p < 0,001$ vs. pcDNA3.1 ohne Behandlung; * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$ vs. pcDNA3.1+Behandlung; $n \geq 4$.

Für alle untersuchten Angiotensin-Metaboliten (Ang I, Ang II, Ang III und Ang IV) konnte in den *HSMas*-transfizierten Zellen gegenüber den Kontrollen ein signifikanter AA-Anstieg beobachtet werden. Dieser war für die Peptide Ang I und Ang II gering (Ang I: $32,9 \pm 5,1\%$,

$p < 0,05$ vs. pcDNA3.1+Ang I; Ang II: $24,3 \pm 1\%$, $p < 0,01$ vs. pcDNA3.1+Ang II), für die Peptide Ang III und Ang IV hoch (Ang III: $92,5 \pm 13,1\%$, $p < 0,001$ vs. pcDNA3.1+Ang III; Ang IV: $87,7 \pm 15,6\%$, $p < 0,001$ vs. pcDNA3.1+Ang IV; Abb. 4.21).

4.3.1.4 Arachidonsäure-Freisetzung nach Interaktion von Substanz P mit dem humanen Mas-Rezeptor

In einer Studie von Ambroz *et al.* (1991) konnte eine signifikante Ca^{2+} -Freisetzung nach Behandlung von *Mas*-transfizierten Zellen mit der Substanz P aufgezeigt werden, so dass auch diese als ein möglicher Ligand am Mas-Rezeptor diskutiert wurde. Entsprechend den vorherigen Untersuchungen wurde auch für die Substanz P die AA-Freisetzung nach Behandlung der pcDNA- und *HSMas*-transfizierten Zellen bestimmt.

In den *HSMas*-transfizierten Zellen kam es nach Behandlung mit Substanz P zu einem signifikanten AA-Anstieg ($27 \pm 3,4\%$, $p < 0,01$ vs. pcDNA3.1+Substanz P) gegenüber den Kontrollzellen (Tab. 4.1).

Peptid/ Transfizierte Zellen	COS pcDNA3.1	HSMas
Substanz P	102,7 \pm 0,8	129,7 \pm 2,6 ($p < 0,01$)

Tab. 4.1: Dargestellt ist die AA-Freisetzung in pcDNA3.1- und HSMas-transfizierten COS-Zellen nach Behandlung mit Substanz P (10^{-8}M) (Mittelwert \pm SEM). $p < 0,01$ vs. pcDNA3.1+Substanz P. Die Werte sind in Prozent angegeben. Die unbehandelten pcDNA3.1-transfizierten Zellen wurden als 100%-Wert festgelegt; $n \geq 4$.

4.3.2 Test von möglichen Agonisten an Rezeptoren der Mrg-Familie in transfizierten Zellen

4.3.2.1 Arachidonsäure-Freisetzung nach Interaktion von Angiotensin-Metaboliten und AVE0991 mit dem murinen MrgH-Rezeptor

Der murine (MM)MrgH-Rezeptor (1.2.4) wurde von Wittenberger *et al.* 2001 entdeckt und weist die höchste Sequenzhomologie zu HSMas (41%) auf (Abb. 5.1; Anlage 4). Weiterführende Studien über die Interaktionen dieses Rezeptors mit Peptiden/Nicht-Peptiden bzw. Untersuchungen über mögliche Liganden sind bislang nicht publiziert worden. Daher wurde in dieser Arbeit für den MMMrgH-Rezeptor die AA-Freisetzung nach Interaktion des Rezeptors mit Ang-Metaboliten (Ang I, Ang II, Ang III, Ang IV) und AVE0991 (je 10^{-8}M) getestet.

Die Peptide Ang I, Ang II, Ang III und das Nicht-Peptid AVE0991 führten bei den *MMMrghH*-transfizierten Zellen zu keinem signifikanten AA-Anstieg im Vergleich zu den Kontrollen.

10^{-8} M Ang-(1-7) führte in den *MMMrghH*-transfizierten Zellen gegenüber den Ang-(1-7)-stimulierten pcDNA-transfizierten Zellen zu einer signifikanten AA-Reduktion ($19,6 \pm 1,8\%$, $p < 0,001$ vs. pcDNA3.1+ 10^{-8} M Ang-(1-7)). Bei 10^{-8} M Ang IV kam es dagegen in den *MMMrghH*-transfizierten Zellen zu einem signifikanten AA-Anstieg ($25,1 \pm 1,8\%$, $p < 0,001$ vs. pcDNA3.1+Ang IV) gegenüber der Kontrolle (Abb. 4.22).

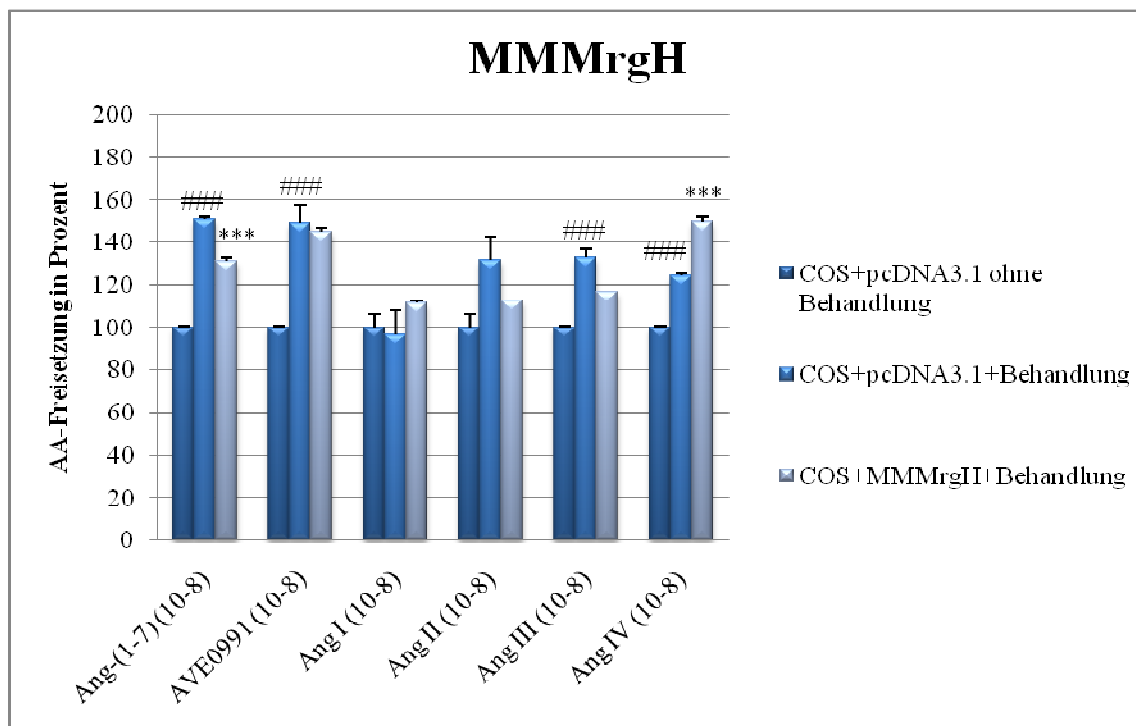


Abb. 4.22: Charakterisierung der AA-Freisetzung in pcDNA3.1- und *MMMrghH*-transfizierten COS-Zellen nach Behandlung mit Ang-(1-7), AVE0991, Ang I, Ang II, Ang III und Ang IV (Mittelwert \pm SEM). ### $p < 0,001$ vs. pcDNA3.1 ohne Behandlung; *** $p < 0,001$ vs. pcDNA3.1+Behandlung; $n \geq 4$.

4.3.2.2 Vergleich der Arachidonsäure-Freisetzung nach Interaktion von Ang-(1-7) und AVE0991 mit dem humanen MrgX2-Rezeptor

Der humane MrgX2-Rezeptor (1.2.3) gehört wie der humane MrgX1-Rezeptor zur MrgX-Subfamilie und wird in den dorsalen Ganglienzellen und den adrenalen Chromaffin-Zellen exprimiert. Bisher konnten das Neuro-Peptid Cortistan-14 (CST-14) und das Proadrenomedullin-Peptid (PAMP-12 und PAMP-20) als Liganden des Rezeptors identifiziert werden (Robas *et al.*, 2003; Kamohara *et al.*, 2005). Um weitere mögliche Liganden dieses Rezeptors zu finden, wurde hier erstmals die Interaktion von HSMrgX2 mit Ang-(1-7), AVE0991 und A779 in Hinblick auf

die AA-Freisetzung untersucht. Dabei wurde Ang-(1-7) und AVE0991 in den Konzentrationen 10^{-6} M und 10^{-8} M eingesetzt. Nach Behandlung der *HSMrgX2*-transfizierten Zellen mit 10^{-6} M Ang-(1-7), 10^{-8} M AVE0991 und 10^{-6} M AVE0991 kam es im Vergleich zu den behandelten pcDNA-transfizierten Kontrollzellen zu keinem signifikanten AA-Anstieg. Nur durch die Zugabe von 10^{-8} M Ang-(1-7) war die AA-Freisetzung in den *HSMrgX2*-transfizierten Zellen um $56 \pm 1,2\%$ ($p < 0,001$) signifikant geringer als bei den Ang-(1-7)-stimulierten pcDNA-transfizierten Zellen (Abb. 4.23).

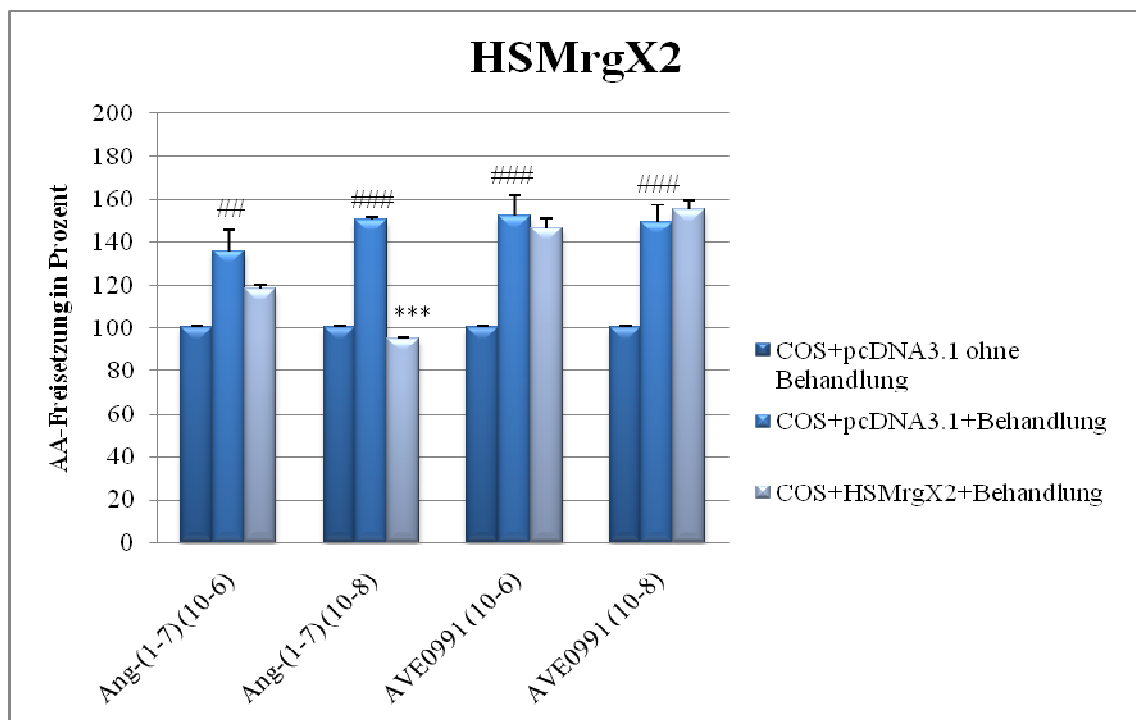


Abb. 4.23: Charakterisierung der AA-Freisetzung in pcDNA3.1- und *HSMrgX2*-transfizierten COS-Zellen nach Behandlung mit Ang-(1-7) und AVE0991 (Mittelwert \pm SEM). ## $p < 0,01$, ### $p < 0,001$ vs. pcDNA3.1 ohne Behandlung; *** $p < 0,001$ vs. pcDNA3.1+Behandlung; $n \geq 4$.

4.3.2.3 Arachidonsäure-Freisetzung nach Interaktion von Angiotensin-Metaboliten mit dem humanen MrgX2-Rezeptor

Ferner sollte die AA-Freisetzung nach Behandlung der pcDNA- und *HSMrgX2*-transfizierten Zellen mit Ang I, Ang II, Ang III und Ang IV (je 10^{-8} M) untersucht werden. Die Ergebnisse dieses Versuches sind in Abb. 4.24 dargestellt. Bei den *HSMrgX2*-transfizierten Zellen resultierte für 10^{-8} M Ang I kein signifikanter AA-Anstieg im Vergleich zur Kontrollgruppe.

10^{-8} M Ang II führte in den *HSMrgX2*-transfizierten Zellen zu einer signifikanten AA-Reduktion ($36,4 \pm 11,2\%$, $p < 0,05$ vs. pcDNA3.1+Ang II) im Vergleich zur Kontrolle. Für die Peptide Ang III und Ang IV konnte eine geringe, signifikante AA-Freisetzung in *HSMrgX2*-transfizierten Zellen gemessen werden (Ang III: $10,8 \pm 5,1$, $p < 0,05$ vs. pcDNA3.1+Ang III; Ang IV: $9,6 \pm 0,9\%$, $p < 0,001$ vs. pcDNA3.1+Ang IV; Abb. 4.24).

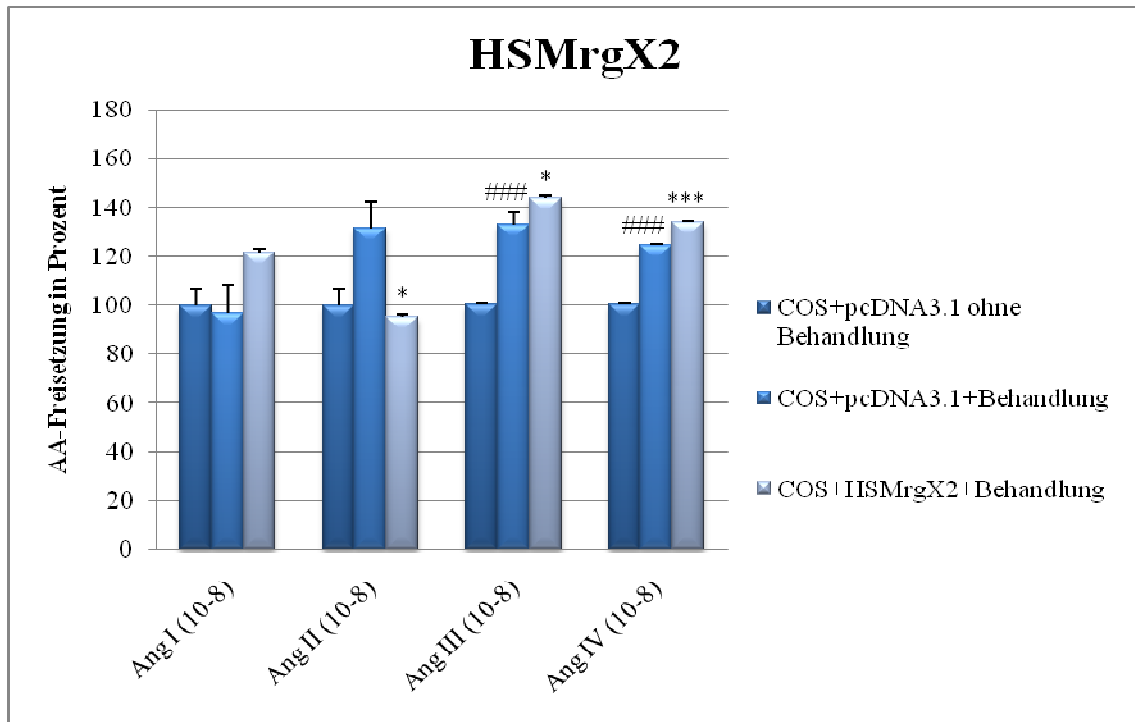


Abb. 4.24: Charakterisierung der AA-Freisetzung in pcDNA3.1- und *HSMrgX2*-transfizierten COS-Zellen nach Behandlung mit Ang I, Ang II, Ang III und Ang IV (Mittelwert \pm SEM). ### $p < 0,001$ vs. pcDNA3.1 ohne Behandlung, * $p < 0,05$, *** $p < 0,001$ vs. pcDNA3.1+Behandlung; $n \geq 4$.

4.3.2.4 Arachidonsäure-Freisetzung nach Interaktion von Angiotensin-Metaboliten und AVE0991 mit dem humanen MrgX1-Rezeptor

Der humane MrgX1-Rezeptor (1.2.3) gehört zu der Familie der sensorisch Neuronenspezifischen GPCRs und wird durch das Peptid BAM22 aktiviert (Lembo *et al.*, 2002). Zur Identifizierung weiterer möglicher Agonisten des Rezeptors wurde die AA-Freisetzung für die Peptide Ang-(1-7), Ang I, Ang II, Ang III und Ang IV sowie für das Nicht-Peptid AVE0991 (je 10^{-8} M) in *HSMrgX1*-transfizierten Zellen untersucht. Der *HSMrgX1*-Rezeptor zeigte für die Peptide Ang-(1-7), Ang I und Ang IV die gleichen Eigenschaften wie die *MMMrgh*- und *HSMrgX2*-Rezeptoren. Es kam zu keiner relevanten Interaktion mit dem Peptid 10^{-8} M Ang I und damit auch zu keinem relevanten AA-Anstieg in *HSMrgX1*-transfizierten Zellen gegenüber der

Kontrolle. 10^{-8} M Ang-(1-7) führte dagegen zu einer signifikanten AA-Reduktion ($51,9 \pm 1,5\%$, $p < 0,001$ vs. pcDNA3.1+Ang-(1-7); Abb. 4.25). Nach 10^{-8} M Ang II- und 10^{-8} M Ang III-Behandlung kam es beim Vergleich der pcDNA- und Rezeptor-transfizierten Zellgruppen zu keiner relevanten AA-Freisetzung. Aber 10^{-8} M AVE0991 und 10^{-8} M Ang IV führten zu einem signifikanten AA-Anstieg in *HSMrgX1*-transfizierten Zellen (AVE0991: $40,7 \pm 10,5\%$, $p < 0,01$ vs. pcDNA3.1+AVE0991; Ang IV: $11,3 \pm 0,8\%$, $p < 0,001$ vs. pcDNA3.1+Ang IV; Abb. 4.25).

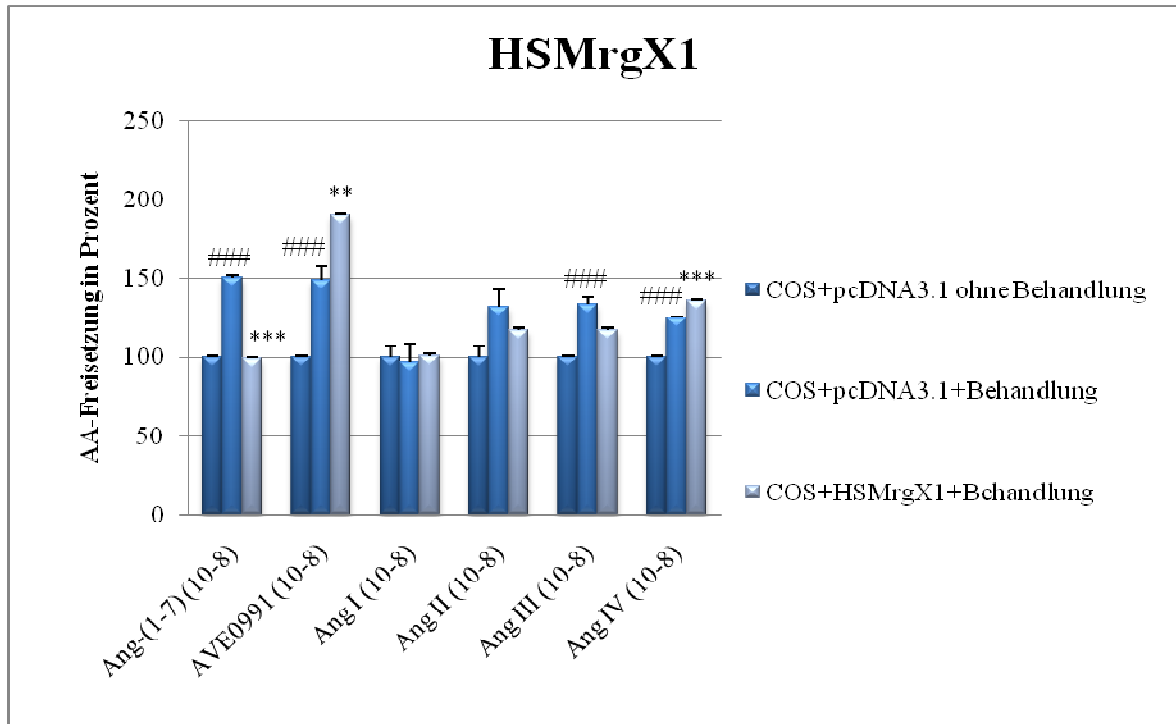


Abb. 4.25: Charakterisierung der AA-Freisetzung in pcDNA3.1- und HSMrgX1-transfizierten COS-Zellen nach Behandlung mit Ang-(1-7), AVE0991, Ang I, Ang II, Ang III und Ang IV (Mittelwert \pm SEM). ### $p < 0,001$ vs. pcDNA3.1 ohne Behandlung, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$ vs. pcDNA3.1+Behandlung; $n \geq 4$.

4.3.2.5 Arachidonsäure-Freisetzung nach Interaktion von Angiotensin-Metaboliten und AVE0991 mit dem humanen MrgD-Rezeptor

Als bisher einzig entdeckter spezifischer Ligand für den humanen MrgD-Rezeptor (1.2.3) gilt β -Alanin (Shinohara *et al.*, 2004). Wie beim HSMrgX1-Rezeptor wurden in der vorliegenden Arbeit erstmalig für den HSMrgD-Rezeptor die Interaktionen mit Ang-(1-7), AVE0991, Ang I, Ang II, Ang III und Ang IV (je 10^{-8} M) in *MrgD*-transfizierten Zellen untersucht, um eine mögliche Agonist/Rezeptor-Interaktion über AA-Freisetzung darzustellen.

In Bezug auf die Interaktion mit Ang I verhielt sich der HSMrgD-Rezeptor genauso wie die MMMrgH-, HSMrgX2- und HSMrgX1-Rezeptoren: Es kam in den behandelten *HSMrgD*-

transfizierten Zellen im Vergleich zu den Ang I-stimulierten pcDNA-transfizierten Zellen zu keinem signifikanten AA-Anstieg. Auch das Peptid Ang III und der Ang-(1-7)-Rezeptor-Agonist AVE0991 führten zu keiner signifikanten AA-Freisetzung in den *HSMrgD*-transfizierten Zellen, während die Inkubation mit Ang-(1-7) und Ang IV bei den *HSMrgD*-transfizierten Zellen in einer vermehrten AA-Freisetzung resultierte (+62,1±5,2%, $p < 0,001$ vs. pcDNA3.1+Ang-(1-7) und +64,5±1,3%, $p < 0,001$ vs. pcDNA3.1+Ang IV; Abb. 4.26).

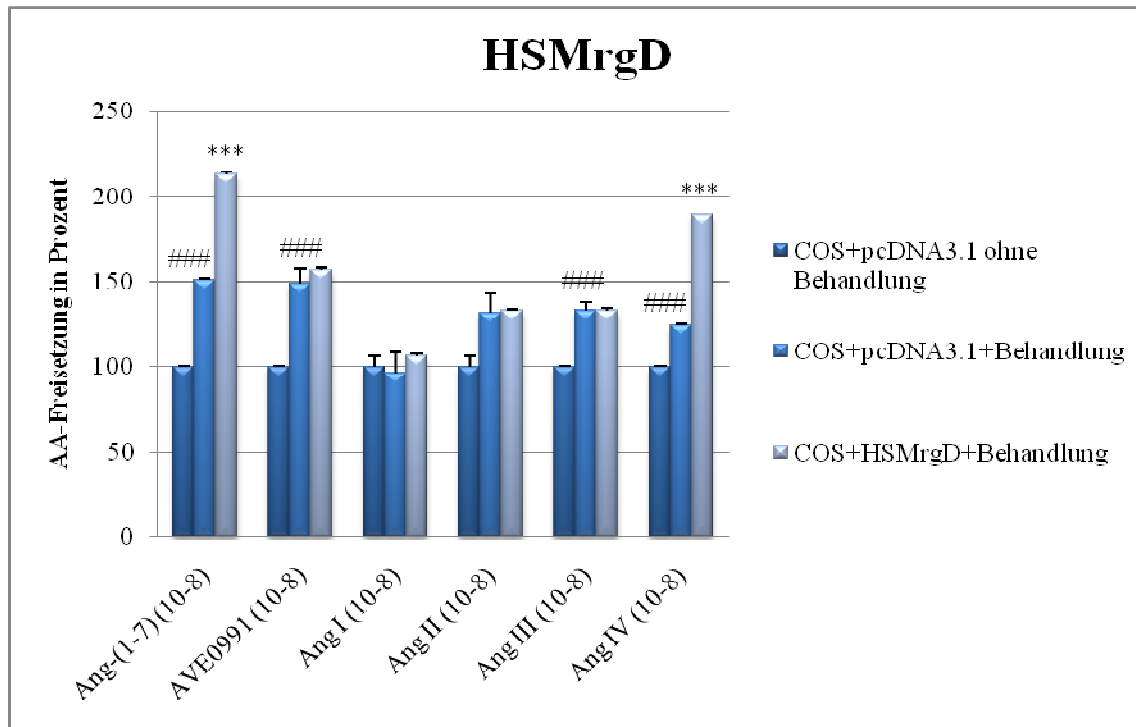


Abb. 4.26: Charakterisierung der AA-Freisetzung in pcDNA3.1- und HSMrgD-transfizierten COS-Zellen nach Behandlung mit Ang-(1-7), AVE0991, Ang I, Ang II, Ang III und Ang IV (Mittelwert±SEM). ### $p < 0,001$ vs. pcDNA3.1 ohne Behandlung; *** $p < 0,001$ vs. pcDNA3.1+Behandlung; $n \geq 4$.

4.3.2.6 Arachidonsäure-Freisetzung nach Interaktion von Angiotensin-Metaboliten und AVE0991 mit dem humanen MrgF-Rezeptor

In bisherigen Studien, die sich mit der Interaktion des humanen MrgF-Rezeptors (1.2.2) und Ang-Peptiden (vornehmlich Ang II) beschäftigt haben, konnte kein Nachweis einer Ligand/Rezeptor-Interaktion erbracht werden (Ross *et al.*, 1990).

Zur Identifizierung von Ligand/Rezeptor-Interaktionen wurden deshalb in dieser Arbeit *HSMrgF*-transfizierte Zellen wiederum mit den Substanzen Ang-(1-7), AVE0991, Ang I, Ang II, Ang III und Ang IV (je 10⁻⁸M) behandelt und das Maß einer möglichen Interaktion über die Veränderungen der AA-Freisetzung bestimmt.

Entsprechend führte die Ang-(1-7)-Behandlung in den *HSMrgF*-transfizierten Zellen zu einer signifikanten AA-Reduktion im Vergleich zu den Ang-(1-7)-stimulierten pcDNA-transfizierten Zellen ($35,4 \pm 6,1\%$, $p < 0,01$; Abb. 4.28) wie dieses bereits für die Rezeptoren MMRgH, HSMrgX2 und HSMrgX1 (Abb. 4.22, 4.23, 4.25) veranschaulicht wurde. Das Nicht-Peptid AVE0991 und die Peptide Ang I, Ang II, Ang III und Ang IV zeigten jedoch keine signifikante Beeinflussung der AA-Freisetzung in den *HSMrgF*-transfizierten Zellen (Abb. 4.28).

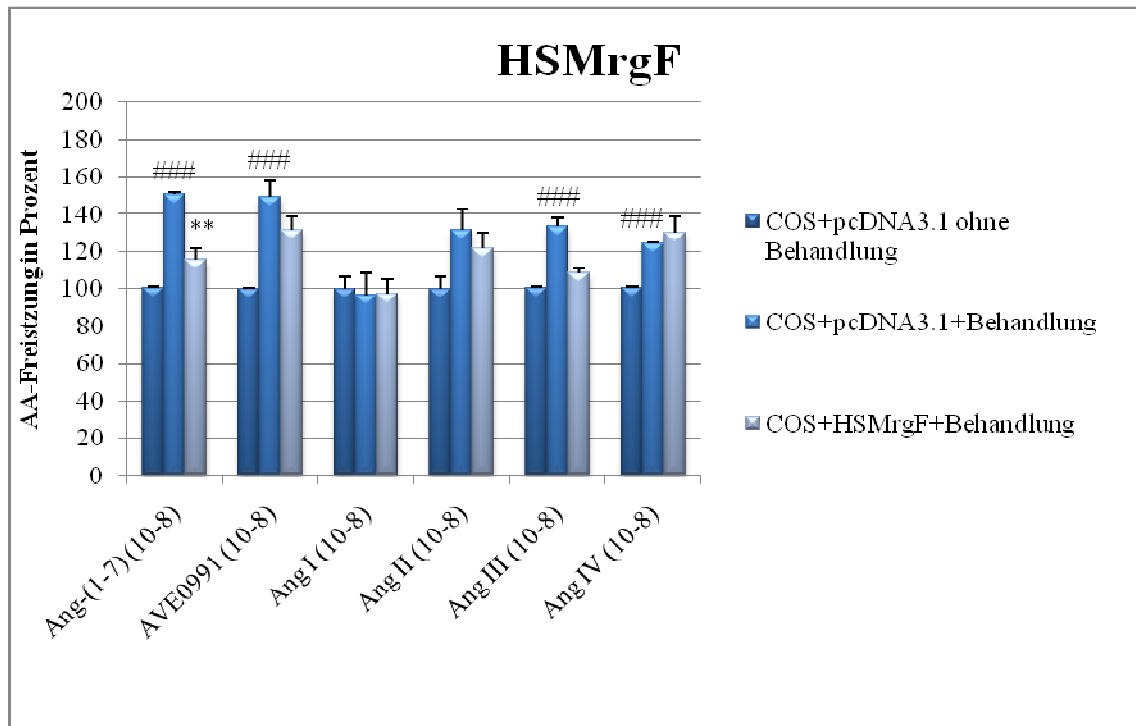


Abb. 4.28: Charakterisierung der AA-Freisetzung in pcDNA3.1- und HSMrgF-transfizierten COS-Zellen nach Behandlung mit Ang-(1-7), AVE0991, Ang I, Ang II, Ang III und Ang IV (Mittelwert \pm SEM). ### $p < 0,001$ vs. pcDNA3.1 ohne Behandlung. ** $p < 0,01$ vs. pcDNA3.1+Behandlung; $n \geq 4$.

4.3.2.7 Arachidonsäure-Freisetzung nach Interaktion von Angiotensin-Metaboliten und AVE0991 mit dem humanen MRG-Rezeptor

Auch für den humanen MRG-Rezeptor konnte bislang kein Ligand identifiziert werden. Vielmehr bestätigten die Untersuchungen von Monnot *et al.* (1991), dass Ang II nicht am Signaling beteiligt ist.

In der vorliegenden Arbeit sollten deshalb die möglichen Interaktionen der Substanzen Ang-(1-7), AVE0991, Ang I, Ang II, Ang III und Ang IV (je 10^{-8} M) über die AA-Freisetzung in pcDNA- und *HSMRG*-transfizierten Zellen getestet werden.

HSMRG war hinsichtlich der AA-Freisetzung nach Ang-(1-7)- und Ang IV-Stimulation mit dem HSMrgD-Rezeptor vergleichbar, obwohl es der Rezeptor mit der niedrigsten Homologie zu HSMas (30%) ist (Abb. 5.1).

Hierbei führte die Behandlung der *HSMRG*-transfizierten Zellen mit Ang-(1-7) zu einem signifikanten AA-Anstieg ($46,9 \pm 2,6\%$, $p < 0,001$ vs. *pcDNA3.1*+Ang-(1-7)) gegenüber der Kontrolle. Auch für Ang II und Ang IV resultierten signifikante AA-Anstiege (Ang II: $21,8 \pm 11,4$, $p < 0,05$ vs. *pcDNA3.1*+Ang II; Ang IV: $65,9 \pm 22,4\%$, $p < 0,01$ vs. *pcDNA3.1*+Ang IV) in *HSMRG*-transfizierten Zellen (Abb. 4.27).

Interessanterweise war HSMRG neben HSMas der einzige der hier untersuchten Rezeptoren, der nach Ang II-Behandlung eine signifikante AA-Freisetzung hervorrief. Zu keiner signifikanten AA-Freisetzung führten die Substanzen AVE0991, Ang I und Ang III in *HSMRG*-transfizierten Zellen gegenüber der Kontrolle (Abb. 4.27).

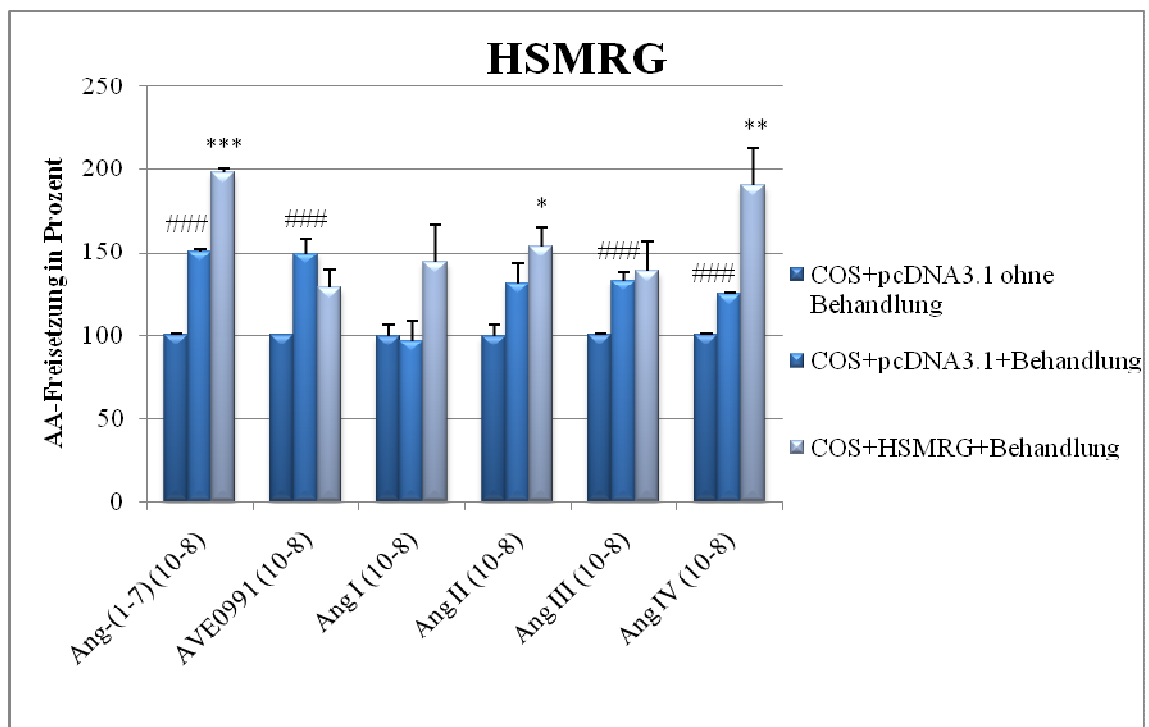


Abb. 4.27: Charakterisierung der AA-Freisetzung in *pcDNA3.1*- und *HSMRG*-transfizierten *COS*-Zellen nach Behandlung mit Ang-(1-7), AVE0991, Ang I, Ang II, Ang III und Ang IV (Mittelwert \pm SEM). ### $p < 0,001$ vs. *pcDNA3.1* ohne Behandlung, * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$ vs. *pcDNA3.1*+Behandlung; $n \geq 4$.

4.3.2.8 Arachidonsäure-Freisetzung nach Interaktion von Substanz P mit Mas-Sequenz-ähnlichen-Rezeptoren

Für die Mas-Sequenz-ähnlichen-Rezeptoren wurde die AA-Freisetzung nach Behandlung mit Substanz P (je 10^{-8} M) untersucht, da in der Studie von Andrawis *et al.* (1991) eine Interaktion zwischen Substanz P und dem Mas-Rezeptor beschrieben wurde und somit diese als mögliche funktionelle Rezeptoren für Substanz P in Frage kamen. Bei den pcDNA-transfizierten Zellen wurde für Substanz P im Vergleich zu den unbehandelten Zellen kein signifikanter AA-Anstieg festgestellt. Bei den *HSMrgD*-transfizierten Zellen vs. den pcDNA-transfizierten Zellen führte Substanz P zu einem Absinken der AA-Freisetzung um $8,2\pm 0,9\%$ ($p < 0,001$), während bei den *HSMrgX2*-, *HSMrgF*- und *HSMRG*-transfizierten Zellen keine signifikanten Veränderungen dokumentiert werden konnten. Allerdings kam es bei den *HSMrgX1*- und *MMMrgh*-transfizierten Zellen zu einem signifikanten AA-Anstieg um $57,3\pm 1,7\%$ ($p < 0,001$) und $8,2\pm 0,9\%$ ($p < 0,001$) im Vergleich zu den pcDNA-transfizierten Kontrollzellen (Tab. 4.2).

Peptid/ Transfizierte Zellen	COS pcDNA3.1	MMMrgh	HSMrgX2	HSMrgX1	HSMrgD	HSMrgF	HSMRG
Substanz P	102,7±0,8	110,9±0,4 ($p < 0,05$)	101,6±2	160±1,1 ($p < 0,001$)	94,5±0,5 ($p < 0,001$)	101,5±23,5	163,0±17,9

Tab. 4.2: Dargestellt ist die AA-Freisetzung in pcDNA3.1-, MMMrgH-, HSMrgX2-, HSMrgX1-, HSMrgD-, HSMrgF- und HSMRG-transfizierten COS-Zellen nach Behandlung mit Substanz P (je 10^{-8} M) (Mittelwert±SEM); $p < 0,05$, $p < 0,001$ vs. pcDNA3.1+Substanz P. Die Werte sind in Prozent angegeben. Die unbehandelten pcDNA3.1-transfizierten Zellen wurden als 100%-Wert festgelegt; $n \geq 4$.

4.4 Die Interaktion von Neuro-Peptiden und dem Angiotensin-(1-7)-spezifischen-Rezeptor-Blocker mit dem humanen Mas-Rezeptor und Mas-Sequenz-ähnlichen Rezeptoren

Die Expression von *Mas* im Hippokampus und im zerebralen Kortex hatte zu der Vermutung geführt, dass das Mas-Protein ein Neurotransmitter-Rezeptor sei, der spezifisch in diesen neuralen Regionen lokalisiert ist. Dies wurde durch die Beobachtung unterstützt, dass einige Onkogene für Neurotransmitter-Rezeptoren kodieren (Jackson *et al.* 1988; Andrawis *et al.*, 1991) und diverse Monoamine und Neuro-Peptide wie Serotonin, Substanz P und Substanz K

mitogen in der Kultur sind (Nilsson *et al.*, 1985, Nemecek *et al.*, 1986). Dong und Mitarbeiter (2001) untersuchten die Ca^{2+} -Freisetzung von Rezeptoren der Mrg-Familie, darunter u.a. die des humanen Mas-Rezeptors. Nach Interaktion mit FLRF, NPFF und NPAF in transfizierten HEK- $\text{G}\alpha_{15}$ -Zellen konnten signifikante Daten erhoben werden.

Auch der strukturelle Aufbau der GPCRs der Mrg-Familie ließ darauf zurückschließen, dass RFamid-verwandte Peptide wie NPFF und NPAF Liganden an diesen Rezeptoren sein könnten (Han *et al.*, 2002). Daher sollten in den hier vorliegenden Untersuchungen Anhaltspunkte für eine mögliche Agonismus/Antagonismus-Reaktion durch Neuro-Peptide bzw. durch A779 gefunden werden. Zu diesem Zweck wurden drei Rezeptor-transfizierte COS-Zelllinien (HSMas, MMMrgH und HSMrgX1) mit den Neuro-Peptiden NPFF, NPAF, NPSF (je 10^{-10} , 10^{-8} , 10^{-7} , 10^{-5}M) auf ihre AA-Freisetzung hin untersucht. Als zweiter Schritt wurde eine Doppelbehandlung der Zellen mit 10^{-8}M NPFF, 10^{-8}M NPAF, 10^{-8}M NPSF und dem Ang-(1-7)-spezifischen Antagonisten am Mas-Rezeptor 10^{-8}M A779 unter der Hypothese durchgeführt, dass der Antagonist A779 die Wirkung des Neurotransmitters aufhebt. Es wurden exemplarisch drei Rezeptoren untersucht: der HSMas-, der MMMrgH- und der HSMrgX1-Rezeptor. Für den humanen Mas-Rezeptor haben Dong und Mitarbeiter (2001) eine Ca^{2+} -Freisetzung durch NPFF und NPAF nachweisen können. Für den murinen MrgH-Rezeptor, der nur im Herzen exprimiert wird, konnte bis dato kein Ligand gefunden werden. Studien konnten belegen, dass die Neuro-Peptide NPFF und NPAF u.a. an kardialen Funktionen beteiligt sind (Roth *et al.*, 1987; Allard *et al.*, 1995), so dass diese als mögliche Liganden für diesen Rezeptor in Frage kamen. Sie führen durch Erhöhung der Katecholaminfreisetzung und durch andere noch nicht beschriebene Mechanismen zu einem erhöhten mittleren arteriellen Blutdruck (MAP). Der humane MrgX1-Rezeptor war von besonderem Interesse, da dieser in den sensorischen Neuronen vorkommt und möglicherweise in die Schmerzregulation involviert ist (Lembo *et al.*, 2002; Zhang *et al.*, 2007). Die Versuchsbedingungen wurden, wie in 4.3 beschrieben, gewählt.

4.4.1 Arachidonsäure-Freisetzung nach Interaktion von NPFF, NPAF, NPSF mit dem humanen Mas-Rezeptor und nach Antagonisierung mit A779

4.4.1.1 Arachidonsäure-Freisetzung nach Interaktion von NPFF mit dem humanen Mas-Rezeptor und nach Antagonisierung mit A779

Für das Neuro-Peptid NPFF konnte eine Interaktion mit Mas über die Ca^{2+} -Freisetzung nachgewiesen werden (Dong *et al.*, 2001), so dass in dieser Versuchsreihe auch eine mögliche

Interaktion von NPFF (in den Konzentrationen 10^{-10} , 10^{-8} , 10^{-7} , 10^{-5} M) mit dem HSMas-Rezeptor über die AA-Freisetzung untersucht wurde. Bei einer Konzentration von 10^{-10} M NPFF zeigten die behandelten pcDNA-transfizierten Zellen keinen AA-Anstieg im Vergleich zu den unbehandelten Zellen.

Bei geringeren Konzentrationen wurde dagegen ein signifikanter AA-Anstieg gemessen (Abb. 4.31).

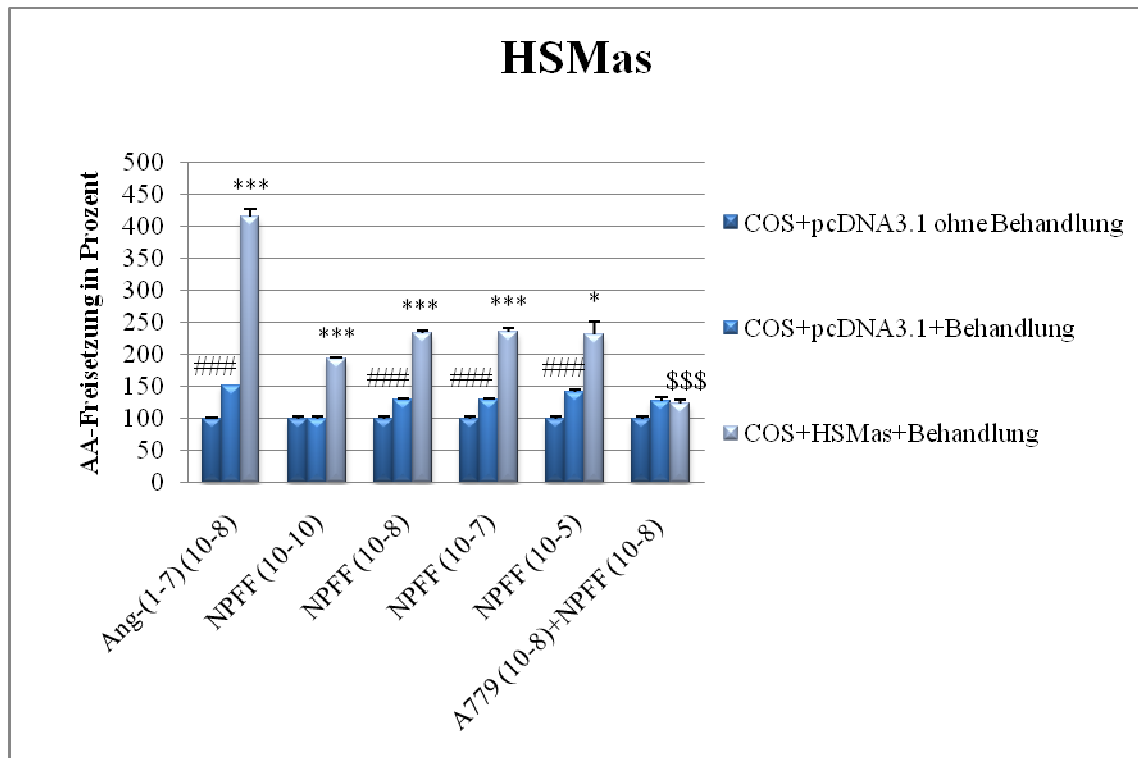


Abb. 4.29: Charakterisierung der AA-Freisetzung in pcDNA3.1- und HSMas-transfizierten COS-Zellen nach Behandlung mit Ang-(1-7), NPFF und A779+NPFF (Mittelwert \pm SEM). ### $p < 0,001$ vs. pcDNA3.1 ohne Behandlung; * $p < 0,05$, *** $p < 0,001$ vs. pcDNA3.1+Behandlung; \$\$\$ $p < 0,001$ vs. HSMas+NPFF (10^{-8} M); $n \geq 4$.

Im Einzelnen sind die Ergebnisse: Für 10^{-8} M NPFF wurde ein AA-Anstieg um $28,9 \pm 6\%$ ($p < 0,001$), für 10^{-7} M NPFF um $28,7 \pm 5,3\%$ ($p < 0,001$) und für 10^{-5} M NPFF um $41,4 \pm 6\%$ ($p < 0,001$) in pcDNA-transfizierten Zellen gegenüber unbehandelten Zellen festgestellt (Abb. 4.31). Bei der Behandlung der HSMas-transfizierten Zellen führten alle Konzentrationen von NPFF zu einem AA-Anstieg im Vergleich zu den NPFF-stimulierten pcDNA-transfizierten Zellen. Hierbei zeigte die Konzentration für 10^{-7} M NPFF den höchsten Anstieg ($106,5 \pm 3,8\%$, $p < 0,001$ vs. pcDNA3.1+ 10^{-7} M NPFF). Weiter wurden bei 10^{-8} M NPFF, 10^{-10} M NPFF und

10^{-5} M NPPF signifikante AA-Anstiege gemessen ($104,8 \pm 5,6\%$, $p < 0,001$; $93,2 \pm 5,1\%$ $p < 0,001$; $72,3 \pm 20,4\%$, $p < 0,05$ vs. pcDNA3.1+Behandlung mit dem gleichen Peptid).

Auch die Hypothese, dass bei einer Doppelbehandlung der *HSMas*-transfizierten Zellen mit 10^{-8} M A779 + 10^{-8} M NPPF die Ausschüttung von AA durch A779 unterbunden wird, konnte im Versuch bestätigt werden. Sie wurde komplett aufgehoben ($p < 0,001$; Abb. 4.29).

4.4.1.2 Arachidonsäure-Freisetzung nach Interaktion von NPAF mit dem humanen Mas-Rezeptor und nach Antagonisierung mit A779

Neben NPPF führte auch NPAF in der Studie von Dong und Mitarbeitern (2001) zu einer signifikanten Ca^{2+} -Freisetzung in *Mas*-transfizierten Zellen. Ob das Peptid auch über die AA-Freisetzung mit dem HSMas-Rezeptor interagiert, wurde in den folgenden Experimenten untersucht. Dazu wurden *HSMas*-transfizierte Zellen in vier verschiedenen Konzentrationen mit NPAF behandelt (10^{-10} , 10^{-8} , 10^{-7} und 10^{-5} M). Der Neurotransmitter NPAF verhielt sich sehr ähnlich zu NPPF.

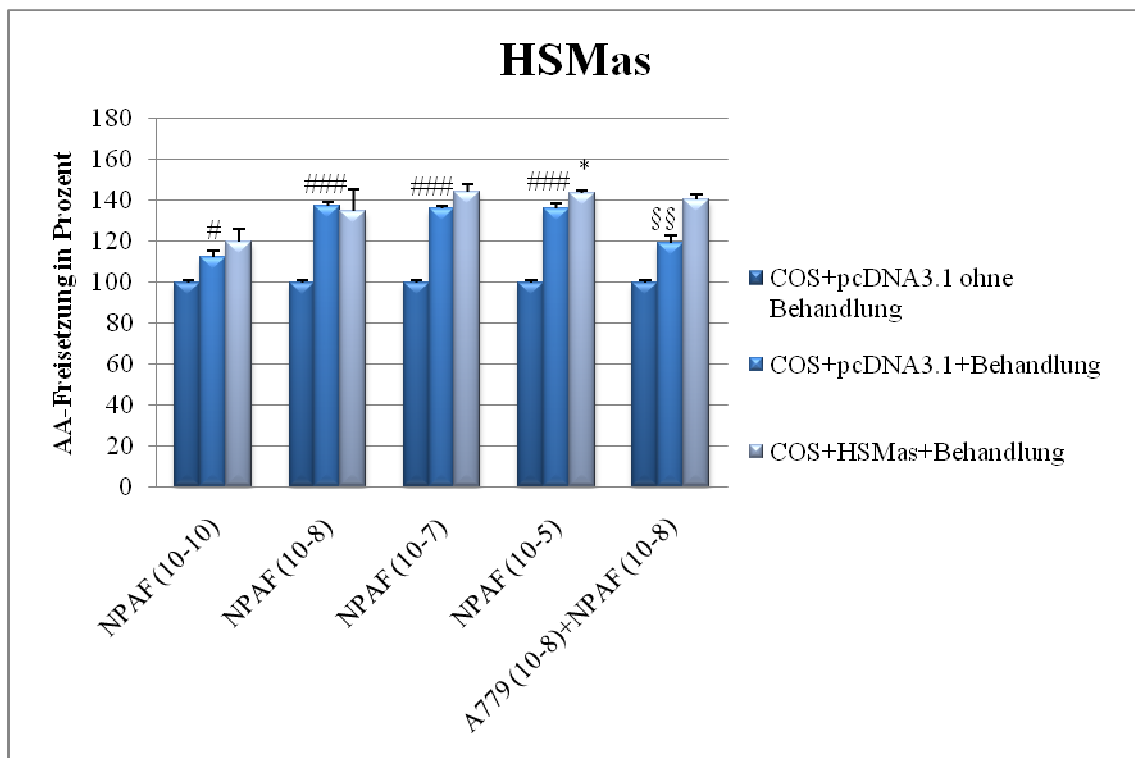


Abb. 4.30: Charakterisierung der AA-Freisetzung in pcDNA3.1- und HSMas-transfizierten COS-Zellen nach Behandlung mit NPAF und A779+NPAF (Mittelwert \pm SEM). # $p < 0,05$, ### $p < 0,001$ vs. pcDNA3.1 ohne Behandlung; * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ vs. pcDNA3.1+Behandlung mit dem gleichen Peptid; §§ $p < 0,01$ vs. pcDNA3.1+NPAF (10^{-8} M); $n = 4$.

Der Ligand NPAF entfaltet aber seine größte Wirkung in den pcDNA-transfizierten Zellen gegenüber den unbehandelten Zellen bei einer Konzentration von 10^{-8} M und seine kleinste Wirkung bei 10^{-10} M (10^{-10} M NPAF: $12,1 \pm 4,6\%$, $p < 0,05$; 10^{-8} M NPAF: $37,3 \pm 3,9\%$, $p < 0,001$; 10^{-7} M NPAF: $36 \pm 3,5\%$, $p < 0,001$; 10^{-5} M NPAF: $36,1 \pm 4,1\%$, $p < 0,001$ vs. pcDNA3.1 ohne Behandlung; Abb. 4.30).

Nach Doppelbehandlung mit 10^{-8} M A779 + 10^{-8} M NPAF in pcDNA-transfizierten Zellen kam es zu einer signifikanten AA-Reduktion um $18,3 \pm 4,4\%$ ($p < 0,01$) im Vergleich zur alleinigen Behandlung mit 10^{-8} M NPAF - und damit zu einer partiellen Antagonisierung der durch NPAF hervorgerufenen AA-Freisetzung durch A779.

Nach Behandlung der *HSMas*-transfizierten Zellen mit NPAF kam es lediglich bei einer Konzentration von 10^{-5} M zu einem geringen signifikanten Anstieg im Vergleich zur Kontrolle ($7,5 \pm 2,7\%$: $p < 0,05$ vs. pcDNA3.1 + 10^{-5} M NPAF).

Die Doppelbehandlung mit 10^{-8} M A779 + 10^{-8} M NPAF konnte die angenommene Hypothese der antagonistischen Reaktion nicht bestätigen. Das Ergebnis zeigte keine signifikante Differenz in Relation zur alleinigen Behandlung mit NPAF bei den *HSMas*-transfizierten Zellen (Abb. 4.30).

4.4.1.3 Arachidonsäure-Freisetzung nach Interaktion von NPSF und A779 mit dem humanen Mas-Rezeptor

Anders als NPAF und NPFF interagiert der Neurotransmitter NPSF in den applizierten Konzentrationen (10^{-10} , 10^{-8} , 10^{-7} , 10^{-5} M) in den pcDNA-transfizierten Zellen gegenüber den unbehandelten Zellen und führte somit zu keinem AA-Anstieg (Abb. 4.31).

Nach Behandlung der pcDNA-transfizierten Zellen mit 10^{-8} M A779 + 10^{-8} M NPSF kam es ebenfalls zu keiner signifikanten AA-Reduktion im Vergleich zur alleinigen Behandlung mit 10^{-8} M NPSF (Abb. 4.31).

Im Unterschied dazu führte die Behandlung mit NPSF in den *HSMas*-transfizierten Zellen in allen Konzentrationen zu einem signifikanten AA-Anstieg im Vergleich zur Kontrolle. Es stellte sich heraus, dass die AA-Freisetzung für 10^{-8} M NPSF und 10^{-7} M NPSF am höchsten war (10^{-10} M NPSF: $79,8 \pm 7,3\%$, $p < 0,001$; 10^{-8} M NPSF: $95,4 \pm 5,1\%$, $p < 0,001$; 10^{-7} M NPSF: $104,6 \pm 11,4\%$, $p < 0,001$; 10^{-5} M NPSF: $92,9 \pm 6,6\%$, $p < 0,001$ vs. pcDNA3.1 + NPSF + Behandlung mit dem gleichen Peptid; Abb. 4.31).

Der Antagonist A779 konnte mit NPSF über den *HSMas*-Rezeptor interagieren und bestätigte somit die Ausgangshypothese einer antagonistischen Wirkung von A779 auf die durch NPSF hervorgerufene AA-Freisetzung. Es kam zu einer signifikanten AA-Senkung in

HSMas-transfizierten Zellen nach Doppelbehandlung mit 10^{-8} M A779+ 10^{-8} M NPSF im Vergleich zur alleinigen Behandlung mit 10^{-8} M NPSF ($46,9 \pm 6,2\%$, $p < 0,001$ vs. pcDNA3.1+ 10^{-8} M NPSF; Abb. 4.31).

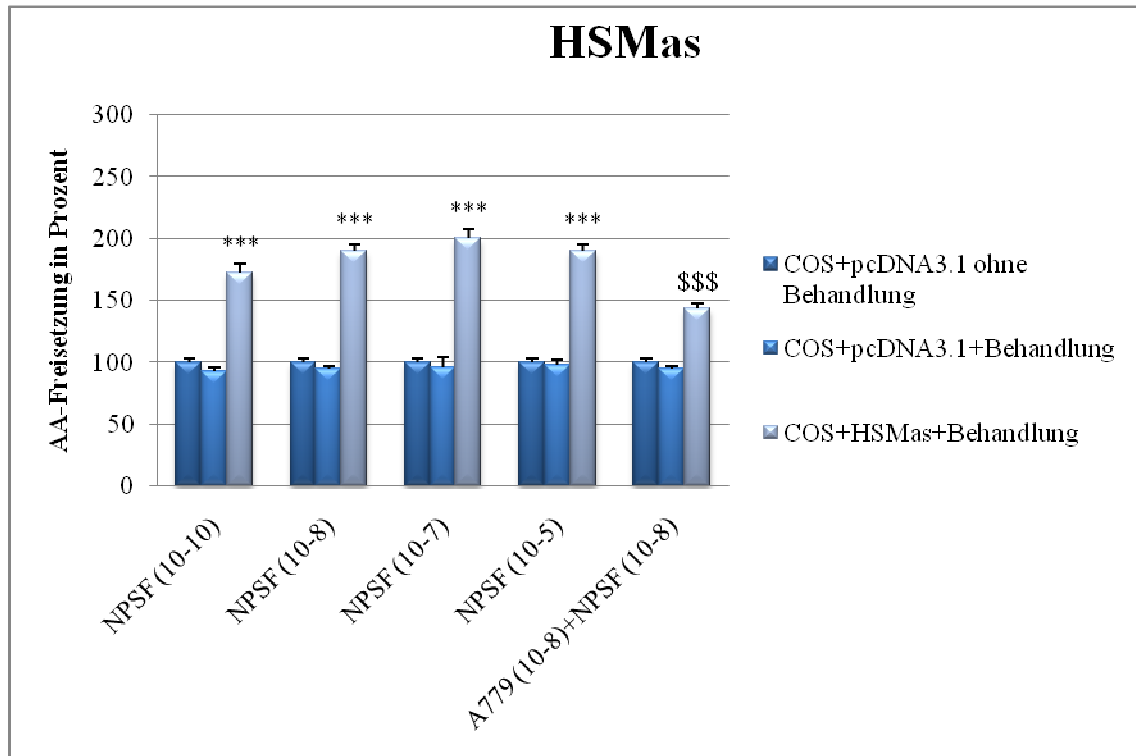


Abb. 4.31: Charakterisierung der AA-Freisetzung in pcDNA3.1- und HSMas-transfizierten COS-Zellen nach Behandlung mit NPSF und A779+NPSF (Mittelwert \pm SEM). *** $p < 0,001$ vs. pcDNA3.1+Behandlung mit dem gleichen Peptid; \$\$\$ $p < 0,001$ vs. HSMas+NPSF (10^{-8} M); $n = 4$.

4.4.2 Arachidonsäure-Freisetzung nach Interaktion von NPFF, NPAF, NPSF mit dem murinen MrgH-Rezeptor und nach Antagonisierung mit A779

4.4.2.1 Arachidonsäure-Freisetzung nach Interaktion von NPFF mit dem murinen MrgH-Rezeptor und nach Antagonisierung mit A779

Für den murinen MrgH-Rezeptor sind bis dato keine Aussagen zur Interaktion mit Neuro-Peptiden getroffen worden, und so wurde hier erstmals die AA-Freisetzung nach Interaktion mit dem Neuro-Peptid NPFF und A779 dargestellt.

Das Neuropeptid NPFF interagiert in den *MMMrgh*-transfizierten Zellen in ähnlicher Weise wie in *HSMas*-transfizierten Zellen, wenn auch in schwächerer Form. Bei zwei Konzentrationen 10^{-10} M und 10^{-8} M kam es zu einem signifikanten AA-Anstieg in *MMMrgh*-transfizierten Zellen

(10^{-10} M NPF: $26,6 \pm 4,2\%$, $p < 0,01$; 10^{-8} M NPF: $11,1 \pm 3,5\%$, $p < 0,05$ vs. pcDNA3.1+Behandlung mit dem gleichen Peptid). Nach Behandlung der *MMMrgh*-transfizierten Zellen mit NPF in den Konzentrationen von 10^{-7} M und 10^{-5} M kam es zu keiner signifikanten AA-Freisetzung im Vergleich zu den behandelten pcDNA-transfizierten Kontrollzellen (Abb. 4.32). Nach Behandlung der *MMMrgh*-transfizierten Zellen mit 10^{-8} M A779+ 10^{-8} M NPF war eine antagonistische Wirkung erkennbar, da eine signifikante AA-Reduktion im Vergleich zur alleinigen Behandlung mit 10^{-8} M NPF gemessen wurde ($21,8 \pm 7,6\%$, $p < 0,05$ vs. pcDNA3.1+ 10^{-8} M NPF; Abb. 4.32).

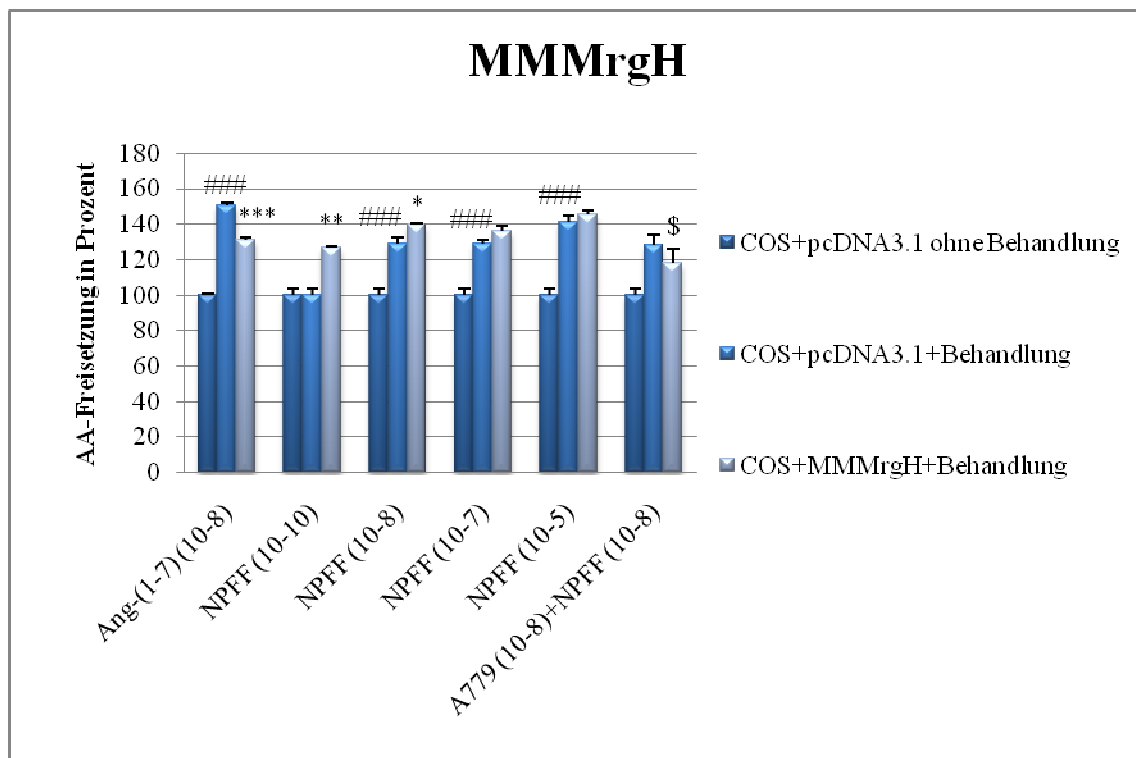


Abb. 4.32: Charakterisierung der AA-Freisetzung in pcDNA3.1- und *MMMrgh*-transfizierten COS-Zellen nach Behandlung mit Ang-(1-7), NPF und A779+NPF (Mittelwert \pm SEM). ### $p < 0,001$ vs. pcDNA3.1 ohne Behandlung; * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$ vs. pcDNA3.1+Behandlung mit dem gleichen Peptid; \$ $p < 0,05$ vs. *MMMrgh*+NPF (10^{-8} M); $n = 4$.

4.4.2.2 Arachidonsäure-Freisetzung nach Interaktion von NPAF mit dem murinen MrgH-Rezeptor und nach Antagonisierung mit A779

Das Neuropeptid NPAF interagiert auf sehr verschiedene Weise mit den Rezeptoren HSMas und *MMMrgh* über die AA-Freisetzung. Die Reaktionen decken die Bandbreite von Reduktion, fehlendem Anstieg und Anstieg der AA-Freisetzung ab. In der Behandlung der *MMMrgh*-transfizierten Zellen mit NPAF zeigte sich bei allen eingesetzten Konzentrationen (10^{-10} ,

10^{-8} , 10^{-7} und 10^{-5} M) ein Anstieg der AA-Freisetzung im Vergleich zu den NPAF-stimulierten pcDNA-transfizierten Zellen (Tab. 4.3).

Konzentration NPAF	HSMas	MMMrghH
10^{-10} M	kein Anstieg	Anstieg um $46,9 \pm 5,6\%$ ($p < 0,001$),
10^{-8} M	kein Anstieg	Anstieg um $39,3 \pm 3,1\%$ ($p < 0,001$)
10^{-7} M	kein Anstieg	Anstieg um $46,9 \pm 2,9\%$ ($p < 0,001$)
10^{-5} M	Anstieg um $7,5 \pm 2,7\%$ ($p < 0,05$)	Anstieg um $43,6 \pm 3\%$ ($p < 0,001$)

Tab. 4.3: Vergleich der AA-Freisetzung nach Behandlung der HSMas- und MMMrgH-transfizierten COS-Zellen mit dem Neuro-Peptid NPAF vs. pcDNA-transfizierte Zellen+Behandlung mit dem gleichen Peptid; $n = 4$.

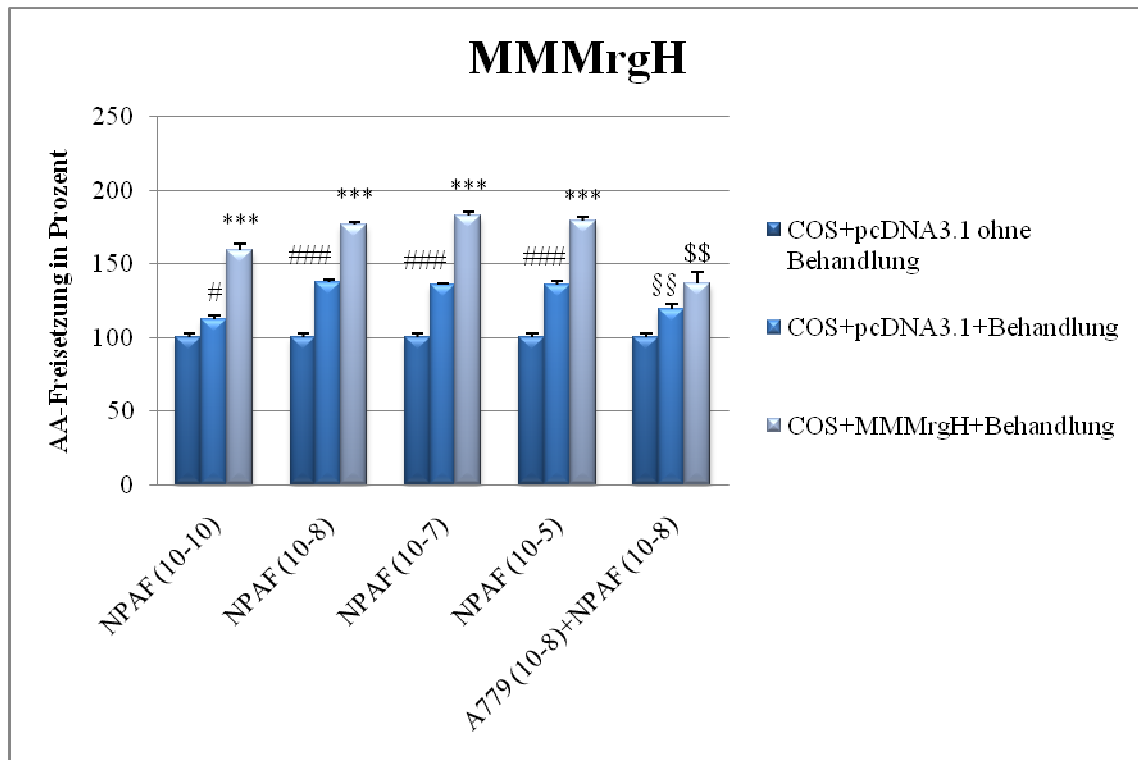


Abb. 4.33: Charakterisierung der AA-Freisetzung in pcDNA3.1- und MMMrgH-transfizierten COS-Zellen nach Behandlung mit NPAF und A779+NPAF (Mittelwert \pm SEM). # $p < 0,05$, ### $p < 0,001$ vs. pcDNA3.1 ohne Behandlung; *** $p < 0,001$ vs. pcDNA3.1+Behandlung; §§ $p < 0,01$ vs. pcDNA3.1+NPAF (10^{-8} M); §§ $p < 0,01$ vs. MMMrgH+NPAF (10^{-8} M); $n = 4$.

Der Antagonist A779 konnte seine Wirkung auf den Neurotransmitter NPAF entfalten. So kam es nach Behandlung der MMMrgH-transfizierten Zellen mit 10^{-8} M A779 + 10^{-8} M NPAF zu einer

signifikanten AA-Reduktion im Vergleich zur alleinigen Behandlung mit 10^{-8} M NPAF ($39,5\% \pm 7,5\%$, $p < 0,01$ vs. pcDNA3.1+ 10^{-8} M NPAF; Abb. 4.33).

4.4.2.3 Arachidonsäure-Freisetzung nach Interaktion von NPSF mit dem murinen MrgH-Rezeptor und nach Antagonisierung mit A779

Der Neurotransmitter NPSF interagiert in allen Konzentrationen mit den *MMMrghH*-transfizierten Zellen, was in jedem Versuch im Vergleich zu den NPSF-stimulierten pcDNA-transfizierten Zellen zu einem signifikanten AA-Anstieg führte.

Die AA-Freisetzung war für die Peptide 10^{-8} M NPSF, 10^{-7} M NPSF und 10^{-5} M NPSF nahezu gleich hoch und fiel nur für das Peptid 10^{-10} M NPSF geringer aus (10^{-10} M NPSF: $86,1 \pm 3,8\%$, $p < 0,001$; 10^{-8} M NPSF: $129,6 \pm 3,4\%$, $p < 0,001$; 10^{-7} M NPSF: $129,5 \pm 8,9\%$, $p < 0,001$; 10^{-5} M NPSF: $130,7 \pm 5,3\%$, $p < 0,001$ vs. pcDNA3.1+Behandlung mit dem gleichen Peptid; Abb. 4.34).

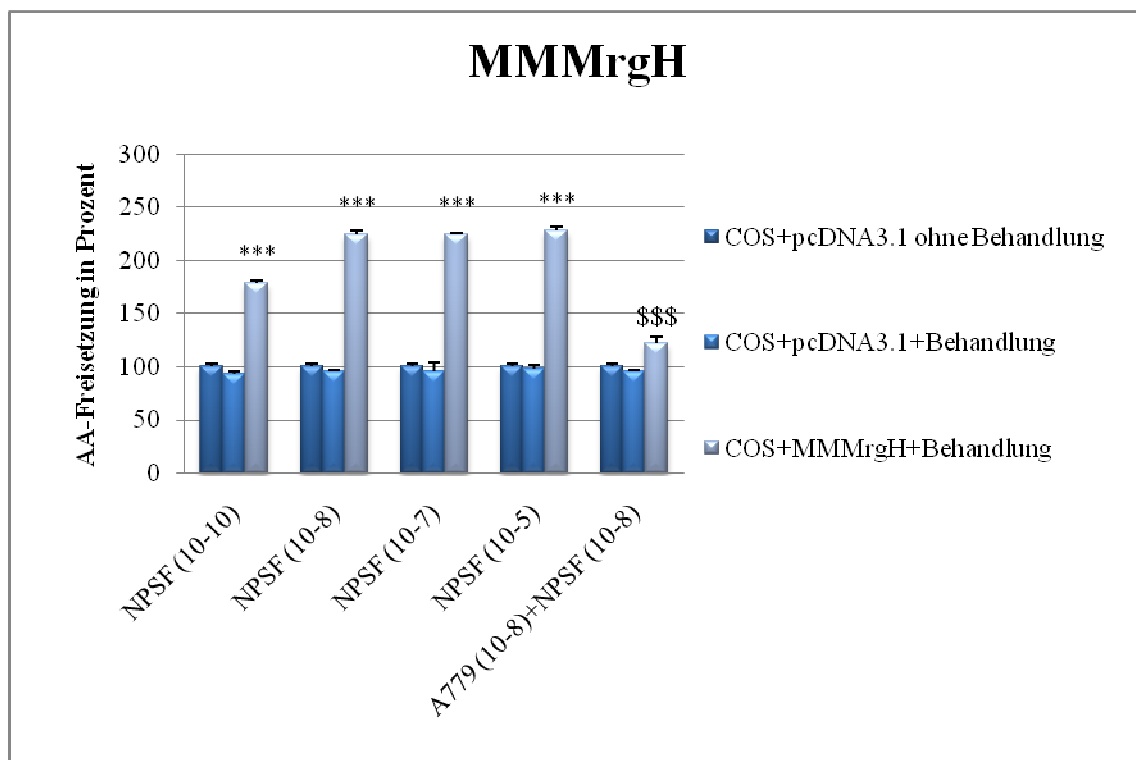


Abb. 4.34: Charakterisierung der AA-Freisetzung in pcDNA3.1- und *MMMrghH*-transfizierten COS-Zellen nach Behandlung mit NPSF und A779+NPSF (Mittelwert \pm SEM). *** $p < 0,001$ vs. pcDNA3.1+Behandlung mit dem gleichen Peptid; \$\$\$ $p < 0,001$ vs. *MMMrghH*+NPSF (10^{-8} M); $n = 4$.

In Verbindung mit NPSF konnte der Ang-(1-7)-spezifische Antagonist A779 seine Wirkung entfalten. Nach Doppelbehandlung mit 10^{-8} M A779+ 10^{-8} M NPSF kam es zu einer signifikanten

AA-Reduktion im Vergleich zur alleinigen Behandlung mit 10^{-8} M NPSF ($102,8 \pm 6,5\%$, $p < 0,001$ vs. pcDNA3.1+ 10^{-8} M NPSF; Abb. 4.34).

4.4.3 Arachidonsäure-Freisetzung nach Interaktion von NPFF, NPAF, NPSF mit dem humanen MrgX1-Rezeptor und nach Antagonisierung mit A779

4.4.3.1 Arachidonsäure-Freisetzung nach Interaktion von NPFF mit dem humanen MrgX1-Rezeptor und nach Antagonisierung mit A779

Das Neuropeptid NPFF interagiert in *HSMrgX1*-transfizierten Zellen in völlig anderer Weise als in *HSMas*-transfizierten Zellen im Vergleich zu den Kontrollen (Tab. 4.4).

Konzentration NPFF	HSMrgX1	HSMas
10^{-10} M	Kein Anstieg	Anstieg um $93,2 \pm 5,1\%$ ($p < 0,001$)
10^{-8} M	Reduktion um $26,7 \pm 3,7\%$ ($p < 0,001$)	Anstieg um $104,8 \pm 5,6\%$ ($p < 0,001$)
10^{-7} M	Reduktion um $32 \pm 3\%$ ($p < 0,001$)	Anstieg um $106,5 \pm 6,6\%$ ($p < 0,001$)
10^{-5} M	Reduktion um $26,7 \pm 3,7\%$ ($p < 0,001$)	Anstieg um $72,3 \pm 20,4\%$ ($p < 0,05$)

Tab. 4.4: Vergleich der AA-Freisetzung nach Behandlung der HSMrgX1- und HSMas-transfizierten COS-Zellen mit dem Neuro-Peptid NPFF vs. pcDNA-transfizierten Zellen+Behandlung mit dem gleichen Peptid; $n = 4$.

Im Gegensatz zu HSMas, wo in allen Konzentrationen in *HSMas*-transfizierten Zellen vs. behandelten pcDNA-transfizierten Kontrollzellen ein AA-Anstieg verzeichnet werden konnte, kam es bei HSMrgX1 entweder zu keinem AA-Anstieg oder einer AA-Reduktion (Tab. 4.4).

Bei der Doppelbehandlung von 10^{-8} M A779+ 10^{-8} M NPFF in *HSMrgX1*-transfizierten Zellen kam es zu keiner signifikanten Reduktion der AA-Freisetzung im Vergleich zur alleinigen Behandlung mit 10^{-8} M NPFF. Es wurde also keine antagonistische Wirkung entfaltet (Abb. 4.35).

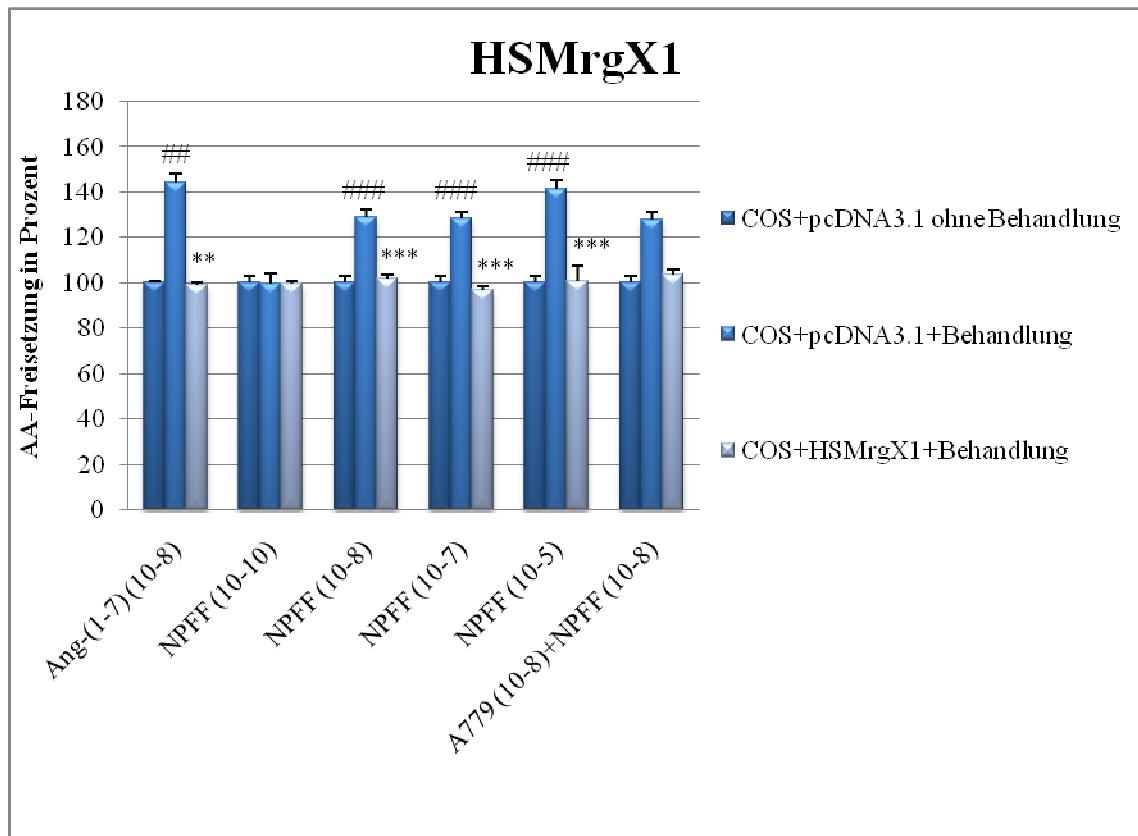


Abb. 4.35: Charakterisierung der AA-Freisetzung in pcDNA3.1- und HSMrgX1-transfizierten COS-Zellen nach Behandlung mit NPDF und A779+NPDF (Mittelwert \pm SEM). ### $p < 0,001$ vs. pcDNA3.1 ohne Behandlung; ** $p < 0,05$, *** $p < 0,001$ vs. pcDNA3.1+Behandlung mit dem gleichen Peptid; $n = 4$.

4.4.3.2 Arachidonsäure-Freisetzung nach Interaktion von NPAF mit dem humanen MrgX1-Rezeptor und nach Antagonisierung mit A779

Das Neuro-Peptid NPAF verhielt sich gegenüber dem humanen MrgX1-Rezeptor vollkommen anders als gegenüber dem Mas-Rezeptor (Tab. 4.5)

Konzentration NPAF	HSMrgX1	HSMas
10^{-10} M	Reduktion um $12,3 \pm 4,1\%$ ($p < 0,05$)	kein Anstieg
10^{-8} M	Reduktion um $36,2 \pm 3,3\%$ ($p < 0,001$)	kein Anstieg
10^{-7} M	Reduktion um $35,1 \pm 1,8\%$ ($p < 0,001$)	kein Anstieg
10^{-5} M	Reduktion um $35,0 \pm 3,7\%$ ($p < 0,001$)	Anstieg um $7,5 \pm 4,7\%$ ($p < 0,05$)

Tab. 4.5: Vergleich der AA-Freisetzung nach Behandlung der HSMrgX1- und HSMas-transfizierten COS-Zellen mit dem Neuro-Peptid NPAF vs. pcDNA-transfizierte Zellen+Behandlung mit dem gleichen Peptid; $n = 4$.

Es zeigte sich nach Behandlung der *HSMrgX1*-transfizierten Zellen mit NPAF in allen Konzentrationen eine signifikante AA-Reduktion im Vergleich zu den NPAF-stimulierten pcDNA-transfizierten Zellen.

Wohingegen in den *HSMAs*-transfizierten Zellen kein AA-Anstieg und nur für 10^{-5} M NPAF ein geringer signifikanter AA-Anstieg ($p < 0,05$) im Vergleich zu den behandelten pcDNA-transfizierten Kontrollzellen auftrat (Tab. 4.5).

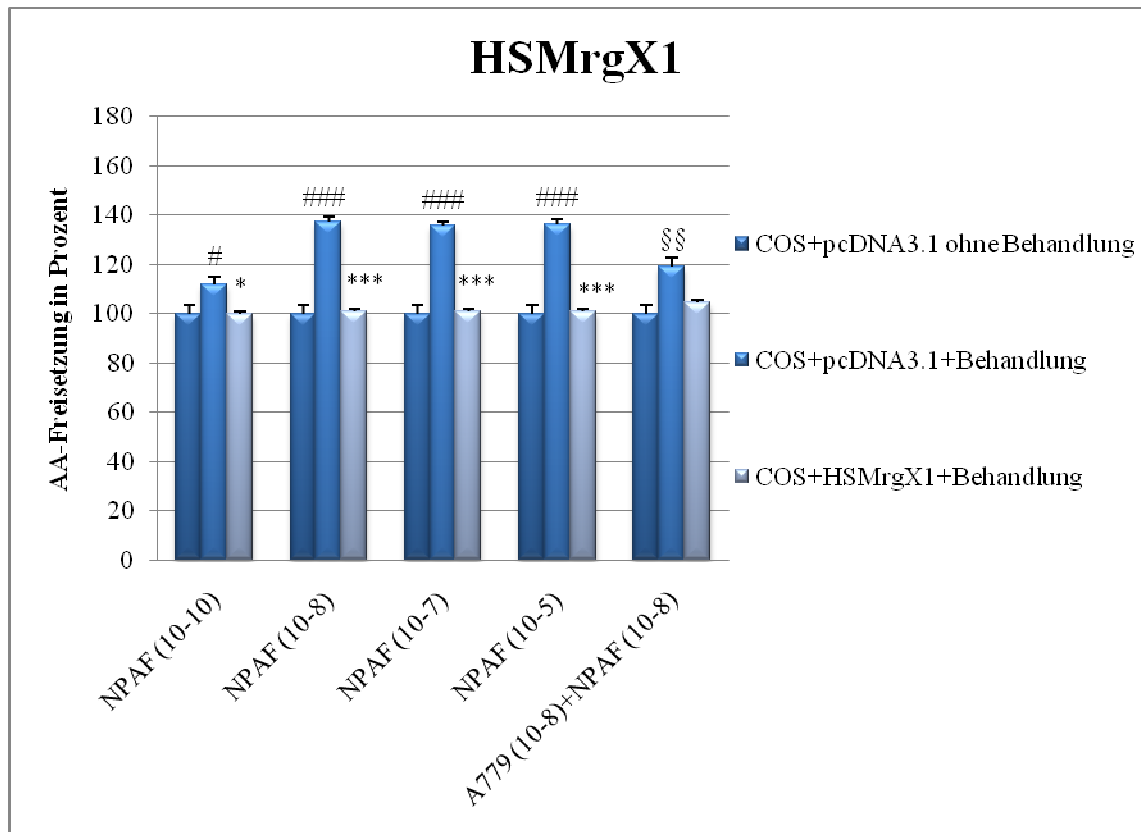


Abb. 4.36: Charakterisierung der AA-Freisetzung in pcDNA3.1- und HSMrgX1-transfizierten COS-Zellen nach Behandlung mit NPAF und A779+NPAF (Mittelwert \pm SEM). # $p < 0,05$, ### $p < 0,001$ vs. pcDNA3.1 ohne Behandlung; * $p < 0,05$, *** $p < 0,001$ vs. pcDNA3.1+Behandlung mit dem gleichen Peptid; §§ $p < 0,01$ vs. pcDNA3.1+NPAF (10^{-8} M); $n = 4$.

Nach Behandlung der *HSMrgX1*-transfizierten Zellen mit 10^{-8} M A779 + 10^{-8} M NPAF kam es zu keiner antagonistischen Wirkung, das heißt, es war im Vergleich zur alleinigen Behandlung mit 10^{-8} M NPAF kein signifikanter Unterschied hinsichtlich der AA-Freisetzung ermittelbar (Abb. 4.36).

4.4.3.3 Arachidonsäure-Freisetzung nach Interaktion von NPSF mit dem humanen MrgX1-Rezeptor und nach Antagonisierung mit A779

Das Peptid NPSF zeigte in den Konzentrationen 10^{-10} , 10^{-8} , 10^{-7} und 10^{-5} M in den *HSMrgX1*-transfizierten Zellen vs. den NPSF-stimulierten pcDNA-transfizierten Zellen keine signifikanten AA-Anstiege.

Auch nach Behandlung mit 10^{-8} M A779+ 10^{-8} M NPSF war keine signifikante AA-Reduktion im Vergleich zur alleinigen Behandlung mit 10^{-8} M NPSF nachweisbar (Abb. 4.37). Insgesamt konnte in den *HSMrgX1*-transfizierten Zellen weder eine agonistische Wirkung für NPSF beobachtet werden noch eine antagonistische Wirkung von A779 für NPSF.

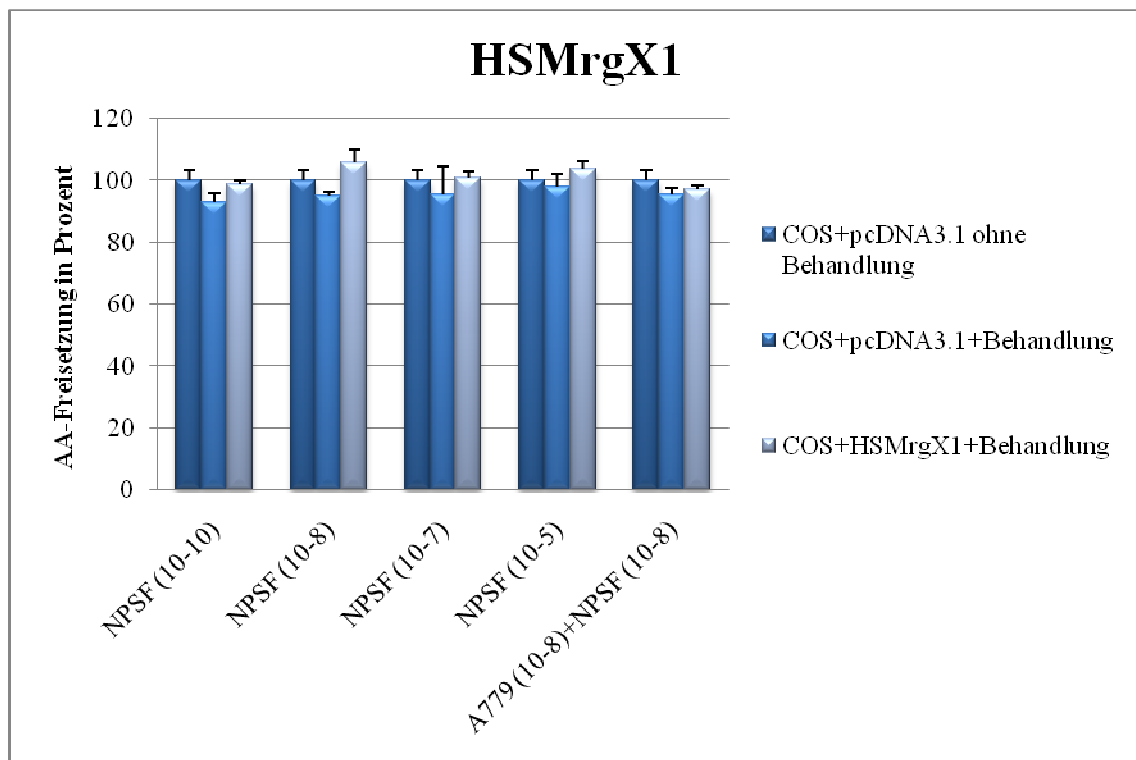


Abb. 4.37: Charakterisierung der AA-Freisetzung in pcDNA3.1- und HSMrgX1-transfizierten COS-Zellen nach Behandlung mit NPSF und A779+NPSF (Mittelwert \pm SEM); $n = 4$.

4.5 Tabellarische Zusammenfassung der signifikanten Arachidonsäure-Freisetzung nach Agonist/Antagonist-Rezeptor-Interaktion

Eine zusammenfassende Darstellung der transfizierten Zellen, die nach Peptid/Nicht-Peptid-Behandlung signifikante Veränderungen bezüglich ihrer AA-Freisetzung zeigten, ist in der

folgenden Tabelle (4.5.1) dargestellt. In COS-7-Zellen konnte experimentell für die getesteten Peptide eine Steigerung der AA-Freisetzung mit folgender Reihenfolge dokumentiert werden: AVE0991>Ang-(1-7)>Ang IV>Ang III>Ang II (höchster zu niedrigster AA-Freisetzung). Auch für den humanen Mas-Rezeptor konnte eine entsprechende Reihenfolge wie folgt nachgewiesen werden: Ang-(1-7)>Ang III>Ang IV>Substanz P>Ang II>Ang I. Beim MMRgH-Rezeptor ergab sich ein signifikanter AA-Anstieg für Ang IV>Substanz P. Beim HSMrgX2-Rezeptor resultierte ein Anstieg für Ang IV>Ang III. Die Reihenfolge der Wirksamkeit beim HSMrgX1-Rezeptor war folgendermaßen: Substanz P>Ang IV>AVE0991 und beim HSMrgD-Rezeptor: Ang IV>Ang-(1-7). Für den HSMrgF-Rezeptor zeigte sich kein AA-Anstieg bei den untersuchten Substanzen. Beim HSMRG-Rezeptor ergab sich folgende Reihenfolge: Ang-(1-7)>Ang IV>Ang II (Tab. 4.5.1).

Peptide, Nicht-Peptid/ Transfizierte Zellen	COS pcDNA3.1	HSMas	MMRgH	HSMrgX2	HSMrgX1	HSMrgD	HSMrgF	HSMRG
Ang-(1-7)	###	***	-	-	-	***	-	***
AVE0991	###	-	-	-	**	-	-	-
Ang I	-	*	-	-	-	-	-	-
Ang II	##	**	-	-	-	-	-	*
Ang III	###	***	-	*	-	-	-	-
Ang IV	###	***	***	***	***	***	-	**
Substanz P	-	**	*	-	***	-	-	-

Tab. 4.5.1: Signifikante AA-Freisetzung nach Peptid/Nicht-Peptid-Interaktion mit der cDNA von pcDNA3.1-, HSMas-, MMRgH-, HSMrgX2-, HSMrgX1-, HSMrgD-, HSMrgF- und HSMRG-transfizierten COS-Zellen. Die Konzentration der Peptide ist jeweils $10^{-8}M$. # $p < 0,05$, ## $p < 0,01$, ### $p < 0,001$ vs. pcDNA3.1 ohne Behandlung, * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$ vs. pcDNA3.1+Behandlung; - =nicht signifikant; $n \geq 4$.

Die signifikante AA-Reduktion für Ang-(1-7) durch A779, Irbesartan und PD123319 und für AVE0991 durch A779 in HSMas-transfizierten Zellen ist in Tabelle 4.5.2 dargestellt.

Antagonist+ Peptid, Nicht-Peptid/ Transfizierte Zellen	COS pcDNA3.1	HSMas
A779+Ang-(1-7)	§§§	§§§
Irbesartan+Ang-(1-7)	§§§	-
PD123319+Ang-(1-7)	§§§	-
A779+AVE0991	-	-

Tab. 4.5.2: Signifikante AA-Reduktion nach Behandlung der cDNA von pcDNA3.1- und HSMas-transfizierten COS-Zellen mit A779+Ang-(1-7), Irbesartan+Ang-(1-7), PD123319+Ang-(1-7) (je $10^{-8}M$) im Vergleich zur alleinigen Behandlung mit Ang-(1-7) ($10^{-8}M$) und von A779+AVE0991 (je $10^{-8}M$) im Vergleich zur alleinigen Behandlung mit AVE0991 ($10^{-8}M$). §§§ $p < 0,001$ vs. pcDNA3.1+Ang-(1-7) ($10^{-8}M$) bzw. AVE0991 ($10^{-8}M$); §§§ $p < 0,001$ vs. HSMas+Ang-(1-7) ($10^{-8}M$) bzw. AVE0991 ($10^{-8}M$), - =nicht signifikant; $n \geq 4$.

Nach Behandlung der pcDNA- und *HSMas*-transfizierten Zellen mit 10^{-8} M A779+ 10^{-8} M Ang-(1-7) war die AA-Reduktion signifikant im Vergleich zur alleinigen Behandlung mit 10^{-8} M Ang-(1-7) ($p < 0,001$ und $p < 0,001$). Irbesartan und PD123319 konnten die Wirkung von Ang-(1-7) bei den pcDNA-transfizierten Zellen antagonisieren, nicht aber bei den *HSMas*-transfizierten Zellen. Auch die Behandlung von *HSMas* mit 10^{-8} M A779+ 10^{-8} M AVE0991 im Vergleich zur alleinigen Behandlung mit 10^{-8} M AVE0991 zeigte keine signifikante AA-Reduktion (Tab. 4.5.2).

Die signifikante AA-Freisetzung der transfizierten Zellen nach Behandlung mit NPF, NPAF und NPSF ist in der folgenden Tabelle (4.5.3) dargestellt.

Neuro-Peptide/ Transfizierte Zellen	COS pcDNA3.1	HSMas	MMMrghH	HSMrgX1
NPF	###	***	*	-
NPAF	###	-	***	-
NPSF	-	***	***	-

Tab. 4.5.3: Signifikante AA-Freisetzung der Neuro-Peptide NPF, NPAF und NPSF nach Interaktion mit der cDNA von pcDNA3.1-, HSMas-, MMMrgH- und HSMrgX1-transfizierten COS-Zellen. Die cDNA von HSMrgX2, HSMrgD, HSMrgF und HSMRG wurde nicht auf ihre Interaktion mit den Neuro-Peptiden untersucht. Die Konzentration der Peptide ist jeweils 10^{-8} M. ### $p < 0,001$ vs. pcDNA3.1 ohne Behandlung; * $p < 0,05$, *** $p < 0,001$ vs. pcDNA3.1+Behandlung; - =nicht signifikant; $n = 4$.

Bei dem Kontrollplasmid führten NPAF und NPF (jeweils 10^{-8} M) zu signifikanter AA-Freisetzung im Vergleich zu den unbehandelten Zellen: Dabei resultierte folgende Reihenfolge von hoher zu niedriger AA-Freisetzung für die Neuro-Peptide: NPAF>NPF. Bei dem HSMas-Rezeptor ergab sich folgende Reihenfolge: NPF>NPSF und bei dem MMMrgH-Rezeptor: NPSF>NPAF>NPF. Bei dem HSMrgX1-Rezeptor kam es zu keinem signifikanten AA-Anstieg (Tab. 4.5.3).

Der signifikante Antagonismus durch den Ang-(1-7)-spezifischen Antagonisten A779 nach Behandlung mit NPF, NPAF und NPSF ist in der folgenden Tabelle (Tab. 4.5.4) dargestellt. Ein signifikanter Antagonismus wurde bei den pcDNA-transfizierten nur nach Doppelbehandlung mit A779+NPAF im Vergleich zu alleinigen Behandlung mit 10^{-8} M NPAF aufgezeigt ($p < 0,01$). Weiterhin wurde eine signifikante Antagonisierung für A779+NPF ($p < 0,001$) und A779+NPSF ($p < 0,001$) in *HSMas*-transfizierten Zellen sowie für A779+NPSF ($p < 0,001$), A779+NPAF ($p < 0,01$) und A779+NPF ($p < 0,05$) in *MMMrghH*-transfizierten Zellen nach-

gewiesen (Tab. 4.5.4). Für den HSMrgX1-Rezeptor zeigte sich für alle Neuro-Peptide kein Antagonismus durch A779.

Antagonist+Neuro-Peptide/ Transfizierte Zellen	COS pcDNA3.1	HSMas	MMMrgh	HSMrgX2
A779+NPFF	-	\$\$\$	\$	-
A779+NPAF	\$\$	-	\$\$	-
A779+NPSF	-	\$\$\$	\$\$\$	-

Tab. 4.5.4: Signifikante AA-Reduktion nach Behandlung der cDNA von pcDNA3.1-, HSMas-, MMMrgH- und HSMrgX1-transfizierten COS-Zellen mit A779+NPFF, A779+NPAF und A779+NPSF (je $10^{-8}M$) im Vergleich zur alleinigen Behandlung mit dem gleichen Neuro-Peptid (je $10^{-8}M$). Die cDNA von HSMrgX2, HSMrgD, HSMrgF und HSMRG wurde nicht auf ihre Interaktion mit den Neuro-Peptiden untersucht. \$\$ $p < 0,01$ vs. pcDNA3.1+Neuro-Peptid (NPFF, NPAF bzw. NPSF; je $10^{-8}M$); \$ $p < 0,05$; \$\$ $p < 0,01$, \$\$\$ $p < 0,001$ vs. Rezeptor-transfizierte Zellen (HSMas, MMMrgH bzw. HSMrgX2)+gleiches Neuro-Peptid (je $10^{-8}M$); - =nicht signifikant; $n = 4$.

5. Diskussion

Die humanen GPCRs können in fünf eindeutige Sub-Familien klassifiziert werden (Fredriksson *et al.*, 2003). Die Einteilung beruht auf Charakteristika der transmembranären 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 größte der fünf Familien ist mit ihren 701 Mitgliedern die Rhodopsin-Familie, welche nochmals in vier Untergruppen (α , β , γ , δ) unterteilt wird. Der HSMas-Rezeptor und die Rezeptoren der Mrg-Familie (Anlage 1) gehören in die δ -Gruppe (Fredriksson *et al.*, 2003). Die Rezeptor-Familie der Mrgs weisen eine nahe Verwandtschaft zum Mas-Protoonkogen auf (Young *et al.*, 1986) und wurden erst vor einigen Jahren entdeckt (Dong *et al.* 2001). Für einige Mrgs konnten bislang Liganden identifiziert werden (Dong *et al.*, 2001; Han *et al.*, 2002; Lembo *et al.*, 2001; Shinohara *et al.*, 2004). Allerdings sind für den größten Teil dieser Rezeptoren die Liganden bislang unbekannt und werden daher als so genannte „orphan receptors“ bezeichnet (Civelli, 2005).

In dieser Arbeit wurden verschiedene Peptide Ang-(1-7), Ang I, Ang II, Ang III, Ang IV, Substanz P, die Antagonisten Irbesartan (ein AT1-Rezeptorblocker), PD123319 (PD; ein AT2-Rezeptorblocker), A779 (Ang-1-7-spezifischer Rezeptorblocker) und Nicht-Peptide (AVE0991) am HSMas-Rezeptor und Rezeptoren der Mrg-Familie (MMMrgH, HSMrgX2, HSMrgX1, HSMrgD, HSMrgF und HSMRG) getestet, um mögliche Agonisten und Antagonisten für diese Rezeptoren identifizieren zu können. Für vier dieser GPCRs konnten bislang Liganden gefunden werden: HSMas, HSMrgD, HSMrgX1 und HSMrgX2 (Lembo *et al.*, 2002; Robas *et al.*, 2003; Santos *et al.*, 2003; Shinohara *et al.*, 2004; Kamohara *et al.*, 2005). Die anderen drei Rezeptoren: HSMRG, HSMrgF und MMMrgH gelten als „orphan“ Rezeptoren. Der murine MrgH-Rezeptor wurde verwendet, da zurzeit kein humanes Analog existiert.

Für die Experimente wurden COS-7-Zellen (2.1) mit der jeweiligen Rezeptor-DNA transfiziert. Als Kontrolle dienten die nur mit dem Plasmidvektor pcDNA3.1 (2.2.1) transfizierten Zellen, (Leervektor-transfizierte Zellen), welche mit dem jeweiligen Peptid/Nicht-Peptid behandelt wurden.

Experimentelle Grundlage dieser Arbeit war die Möglichkeit einer effektiven Zell-Transfektion. Mittlerweile existieren mehrere etablierte Verfahren, um Fremd-DNA in Zellkultur-Zellen zu übertragen, wie z.B. die Mikroinjektion oder Elektroporation. In der vorliegenden Arbeit wurde jedoch für die Transfektion der Zellen die Calcium-Phosphat-Präzipitation (3.2.4) verwendet.

Bei dieser Methode, die für adhärent wachsende Zelllinien wie die verwendeten COS-7-Zellen geeignet ist, können nach Optimierung der Versuchsbedingungen Transfektionsraten von bis zu 50% bei einem akzeptablen technischen Aufwand erreicht werden (Kingston *et al.* 2001; Sukharev *et al.* 1992, Klenchin *et al.* 1991) und stellen somit die geeignetste Methode für die durchzuführenden Untersuchungen dar. Die erfolgreiche Zell-Transfektion konnte anhand von PCR-Analysen überprüft werden und zeigte für alle getesteten Rezeptoren, dass die Konstrukt-DNA in den COS-7-Zellen vorhanden war (4.2.3, Abb. 4.12).

Ein weitere Grundvoraussetzung war die Möglichkeit des Expressionsnachweises bzw. des Nachweises einer Ligand-Rezeptor-Interaktion. In der vorliegenden Arbeit wurde hierfür der Nachweis der (radioaktiv markierten) Arachidonsäure-Freisetzung (3.2.8) gewählt (Muthalif *et al.* 1998). In physiologisch inaktiver Form liegt Arachidonsäure als Lipidbestandteil vor allem in Zellmembranen vor. Die Freisetzung erfolgt enzymatisch z.B. durch die Phospholipase A2 und kann wiederum durch andere Substanzen wie Kortison oder Vitamin E inhibiert werden. Somit bildet sie einen idealen Marker zellphysiologischer Regulationsmechanismen, mit denen sowohl stimulierende, aber auch inhibierende Prozesse untersucht werden können. Um nachweisen zu können, ob die in dieser Arbeit verwendeten COS-7-Zellen selbst den Mas-Rezeptor exprimieren, wurden alle Untersuchungen einer möglichen Ligand-Rezeptor-Interaktion jeweils auch an Zellen, die nur mit einem „leeren“ Plasmid transfiziert wurden, ebenfalls mittels AA-Freisetzung überprüft (Gembardt *et al.* 2008).

5.1 Die Liganden des Mas-Rezeptors

5.1.1 Die Interaktion von Angiotensin-Metaboliten mit Mas

In den letzten Jahren wurden mit Ang III, Ang IV und Ang-(1-7) Ang II-Metabolite mit eigenen signifikanten Effekten auf den Blutdruck identifiziert. In den Untersuchungen von Jaiswal *et al.* (1993) und Muthalif *et al.* (1998) konnte jedoch gezeigt werden, dass Ang-(1-7) nicht wie erwartet mit den Ang II-Rezeptoren AT1 und AT2 interagiert, so dass die Existenz eines spezifischen Rezeptor für dieses Peptid postuliert wurde. Bisher gelang es nicht, einen entsprechenden Rezeptor zu klonieren und seine Struktur bzw. Wirkungsweise zu erfassen. Erst in Untersuchungen unserer Arbeitsgruppe erfolgte der Nachweis, dass Ang-(1-7) als funktioneller Ligand mit dem Mas-Rezeptors, welcher durch das *Mas*-Protoonkogen kodiert wird, interagiert (Santos *et al.* 2003). Der Mas-Rezeptor gehört zu der Familie der GPCRs, die aus sieben hydrophoben Domänen bestehen. Einige der Rezeptoren aus der Gruppe der GPCRs wie der humane Mas-, der MRG- und der MrgF-Rezeptor sind bereits als Ang-Rezeptoren

diskutiert worden und phylogenetisch relativ nah miteinander verwandt (Jackson *et al.* 1989; Ross *et al.*, 1990; Ambroz *et al.*, 1991; Andrawis *et al.*, 1992; Anlage 1).

Um mögliche Rezeptorliganden zu identifizieren, sollte anhand der vorliegenden Experimente herausgefunden werden, ob sequenzähnliche Peptide wie Ang-(1-7), Ang I, Ang II, Ang III und Ang IV einen Effekt auf den HSMas-Rezeptor und die verwandten Rezeptoren MMMrgH, HSMrgX2, HSMrgX1, HSMrgF und HSMRG haben.

Ferner konnten Santos *et al.* (2003) erstmalig experimentell dokumentieren, dass Ang-(1-7) an *Mas*-transfizierte COS- und CHO-Zellen bindet und diese Bindung zu einer gesteigerten Arachidonsäure-Freisetzung führt. Dabei konnte die AA-Freisetzung durch einen spezifischen Ang-(1-7)-Antagonisten (A779) vollständig gehemmt werden, nicht jedoch durch die Rezeptorblocker AT1 oder AT2 (Santos *et al.*, 2003). Somit gelang der Nachweis, dass der *Mas*-Rezeptor mit Ang-(1-7)-Signaling assoziiert ist und es bleibt zu überprüfen, ob andere biologisch aktive Angiotensinpeptide wie Ang III und Ang IV auch mit dem *Mas*-Rezeptor interagieren, da diese Peptide mit Ang-(1-7) sequenz- und strukturverwandt sind.

In der vorliegenden Arbeit wurden daher COS-7-Zellen mit dem HSMas-Rezeptor und verwandten Rezeptoren transfiziert und mit sequenzähnlichen Peptiden behandelt, so dass mittels eines Radio-Assays (3.2.8) Veränderungen bei der AA-Freisetzung als Maß für die Ligand/Rezeptor-Interaktion untersucht werden konnten.

Ang-(1-7)

Das Angiotensin Ang-(1-7) führte bei den Leervektor-transfizierten COS-7-Zellen zu einem signifikanten Anstieg der AA-Freisetzung um etwa 50% (Abb. 4.19), so dass davon ausgegangen wurde, dass der HSMas-Rezeptor auch auf COS-7-Zellen exprimiert wird. Die Ergebnisse von Ambroz *et al.* (1991) werden damit bestätigt, die indirekte Effekte über die Ca^{2+} -Freisetzung des *Mas*-Rezeptors in COS-7-Zellen aufzeigten.

Nach Behandlung der *HSMas*-transfizierten Zellen mit Ang-(1-7) kam es zu einem signifikanten AA-Anstieg um 265%, der dokumentierte, dass Ang-(1-7) mit dem HSMas-Rezeptor interagiert und zu einer vermehrten AA-Freisetzung führt.

Neueste Studien geben Hinweise darauf, dass Ang-(1-7) die endotheliale NO-Synthese (‘Nitric oxide’) durch den *Mas*-Rezeptor und die NO-Produktion durch den Akt-abhängigen Transduktionsweg (über Proteinkinase B) stimuliert. Diese neuen Daten unterstreichen die Wichtigkeit der Ang-(1-7)/*Mas*-Achse als möglichen Regulator für endotheliale Funktionen (Sampaio *et al.*, 2007).

Ang I

Das Peptid Ang I rief bei den Leervektor-transfizierten Zellen keinen signifikanten AA-Anstieg hervor. Bei den *HSMas*-transfizierten Zellen kam es dagegen zu einem signifikanten AA-Anstieg um 35% (Abb. 4.21). Dieser zeigte, dass Ang I mit Mas über den AA-Transduktionsweg interagiert. Bei der Signaltransduktion über AA handelt es sich um eine direkte Interaktion des Peptids mit dem Mas-Rezeptor. Eine indirekte Interaktion konnte allerdings anhand der hier durchgeführten Experimente nicht ausgeschlossen werden.

Ang II

Für Ang II ließ sich in der vorliegenden Studie bei den Leervektor-transfizierten Zellen ein geringer aber signifikanter AA-Anstieg um 15% nachweisen. So ist zu vermuten, dass COS-7-Zellen Mas/AT1-Rezeptoren besitzen.

Bei den *HSMas*-transfizierten Zellen kam es nach Behandlung mit Ang II ebenfalls nur zu einem geringen AA-Anstieg um 25% (Abb. 4.21), der für eine direkte Interaktion zwischen Peptid und Rezeptor spricht. Da der Anstieg in den *HSMas*-transfizierten Zellen höher war als in den Leervektor-transfizierten Zellen, kann geschlussfolgert werden, dass Ang II ein AA-Signaling über den HSMas-Rezeptor unabhängig von den AT1- und AT2-Rezeptoren stimulieren kann.

Kostenis und Mitarbeiter (2005) postulierten, dass der Mas-Rezeptor kein direktes Ang II-Signaling vermitteln kann, sondern mit dem AT1-Rezeptor heterodimerisiert und dadurch die Wirkung von Ang II initiieren kann. Mas gilt somit nicht per se als Ang II-Rezeptor, beeinflusst aber die Signalkaskade, die durch die Ang II/AT1-Achse aktiviert wird.

Darüber hinaus legten die Ergebnisse der Untersuchungen von Bohlen *et al.* (2000) die Vermutungen nahe, dass Mas einerseits direkt mit dem AT1-Rezeptor über die Plasmamembran interagiert. Andererseits ist aber auch eine Beeinflussung der Expression der für das Ang II-Signaling relevanten Gene denkbar (Zohn *et al.*, 1998), ebenso wie die Funktion der Proteine über eine Phosphorylierung durch Mas moduliert werden könnte (von Bohlen *et al.*, 2000). Die Frage, ob Ang II direkt oder indirekt auf den AT1-Rezeptor wirkt, wird bis heute kontrovers diskutiert. In diesem Zusammenhang konnten Rao *et al.* (1994) verifizieren, dass Ang II am AT1-Rezeptor sowohl Ca^{2+} als auch AA freisetzt. Ebenso wiesen Jackson und Mitarbeiter (1989) in *Mas*-transfizierten neuronalen Zelllinien (NG115-401L) eine Ca^{2+} -Antwort auf Ang II und Ang III bereits bei einer Konzentration von $\text{ED}_{50} 3 \times 10^{-8} \text{M}$ nach. Die stärkere Ca^{2+} -Antwort auf Ang III-Stimulation gegenüber einer Ang II-Stimulation und die Präferenz für Ang III, im Gehirn Ang-Bindungsstellen aufzuweisen, hatte zu der Schlussfolgerung geführt, dass das *Mas*-Onkogen für einen neuronalen Ang-Rezeptor kodiert.

Ang III

Ang III rief in der vorliegenden Studie bei den Leervektor-transfizierten Zellen einen geringen, aber signifikanten Anstieg um 15% hervor. In den *HSMas*-transfizierten Zellen führte Ang III zu einer signifikanten AA-Freisetzung um 90% (Abb. 4.21), womit eine direkte Interaktion zwischen Ang III und dem HSMas-Rezeptor nachgewiesen werden konnte. Der Unterschied zwischen dem Ang II- und Ang III-Effekt auf Mas ist umso interessanter, da bekannt ist, dass Ang II und Ang III fast die gleiche Bindungsaffinität gegenüber ihren Rezeptoren AT1 und AT2 haben und häufig vergleichbare physiologische Effekte hervorrufen (Ardaillou, 1997). Anders als bei der klassischen AT1/AT2-Aktivierung werden hier unterschiedliche Wege der Rezeptor-Aktivierung für Ang II und Ang III beschrieben, so dass auch funktionelle Unterschiede angenommen werden. So könnten die dokumentierten Unterschiede in den Effekten von Ang II und Ang III auf einer kürzlich beschriebenen Interaktion zwischen Mas und AT1 (Kostenis *et al.*, 2005) beruhen, bei der es nach Mas-Transfektion und Heterodimerisation von Mas und AT1 zu einer Konformitätsänderung des endogenen AT1 kommt. In diesem Zusammenhang konnte gezeigt werden, dass die Effekte von Ang III in *HSMas*-transfizierten Zellen durch A779 blockiert werden können, während A779 die AT1-vermittelten Effekte durch Mas/AT1-Interaktion nicht modulieren kann. Aufgrund dessen gingen die Autoren davon aus, dass der AA-Anstieg nach Ang III-Behandlung ein AT1-unabhängiger Transduktionsweg ist (Gembardt *et al.*, 2008). Vergleichbares gilt auch für den Angiotensin-Metaboliten Ang IV.

Ang IV

Auch die Behandlung der Leervektor-transfizierten Zellen mit Ang IV führte zu einer signifikant gesteigerten AA-Freisetzung um etwa 30%, bei den *HSMas*-transfizierten Zellen betrug der Anstieg sogar ca. 90% (Abb. 4.21). Damit konnten in dieser Arbeit erstmalig Ang IV-induzierte Effekte beschrieben werden, die direkt über einen GPCR vermittelt werden und unabhängig von partiellen agonistischen Effekten auf den AT1-Rezeptor waren.

Der Mas-Rezeptor wurde bis dato als AT4-Rezeptor ausgeschlossen, da die Bindung von ¹²⁵I-Ang IV in Nierenabschnitten von *Mas*-defizienten- und Wildtyp-Mäusen keinen Unterschied zeigte (Santos *et al.*, 2003). Diese Annahme wurde in der Studie von Albiston *et al.* (2005) mit dem kürzlich identifizierten so genannten AT4-Rezeptor (IRAP) bestätigt, da in den Untersuchungen gezeigt werden konnte, dass der IRAP bereits durch indirekte Ang IV-Effekte stimuliert wird, welche auf endogener Enzymhemmung beruhen.

Zusammenfassend kann gesagt werden, dass zum einem eine Behandlung mit Ang-(1-7), Ang II, Ang III und Ang IV auch bei Leervektor-transfizierten COS-7-Zellen zu einer leicht gesteigerten AA-Freisetzung führte, zum anderen, dass neben Ang-(1-7) als spezifischen Mas-Liganden auch die Ang-Metaboliten Ang I, Ang II, Ang III und Ang IV über den AA-Signaltransduktionsweg mit Mas interagieren.

5.1.2 Die Interaktion von Nicht-Angiotensin-Metaboliten mit Mas

Durch Verwendung von den bekannten Rezeptor-Antagonisten A779 (spezifischer Ang-(1-7)-Rezeptorblocker), Irbesartan (ein AT1-Rezeptorblocker) und PD123319 (ein AT2-Rezeptorblocker) sollten mögliche antagonistische Effekte am HSMas-Rezeptor über die Veränderungen der AA-Freisetzung aufgezeigt werden.

PD123319 und Irbesartan

Die Versuchsreihen mit PD123319 und Irbesartan zeigten, dass diese Substanzen keine Wirkung auf Ang-(1-7) während der Interaktion mit den HSMas-Rezeptoren hatten. Weder konnten sie die AA-Freisetzung stimulieren noch vermindern oder aufheben. Auf der anderen Seite haben Studien von Castro *et al.* (2005) gezeigt, dass Ang-(1-7) auch über andere Mechanismen, an denen die AT1/AT2-Rezeptoren beteiligt sind, mit dem Mas-Rezeptor interagiert, die zu einer NO-Freisetzung führen. So kam es durch PD123319 in Kombination mit Ang-(1-7) zu einem signifikanten Anstieg des Perfusionsdrucks in Mas-Knockout-Mäusen. Dieses Ergebnis veränderte sich auch nicht mit der zusätzlichen Behandlung von A779. De Souza (2004) dokumentierte außerdem inhibitorische Effekte von Ang-(1-7) auf die Na⁺-ATPase des inneren Kortex der Schweineinier, welche auf der Interaktion mit dem AT2-Rezeptor beruhen.

A779

Nur der Ang-(1-7)-spezifische-Antagonist A779 blockierte in den Experimenten dieser Studie den durch Ang-(1-7) induzierten AA-Anstieg in *HSMas*-transfizierten Zellen vollständig. A779 blockierte aber auch die AA-Freisetzung in Leervektor-transfizierten Zellen, was auf eine basale Expression von Mas in COS-7-Zellen hinweist.

Tatsächlich geht dieses Ergebnis mit vielen anderen Studien konform, die die inhibitorischen Effekte von A779 für Ang-(1-7) aufzeigten (Fontes *et al.*, 1994; Santos *et al.*, 1994; Lima *et al.*, 1997; Santos *et al.*, 2003). Ebenso zeigten Abdühl *et al.* (1994) und Santos *et al.* (1994) umfassend, dass A779 sowohl periphere als auch zentrale Effekte des Ang-(1-7) blockiert. Auch

die Studie von Chaves *et al.* (2000) bestätigte, dass A779 die Effekte des Ang-(1-7) hemmt und zur Blockade der Baroreflexsensitivität führt, nachdem A779+Ang-(1-7) in den *Nucleus tractus solitarii* (nTS) injiziert wurden.

Eine neue Studie hat allerdings ergeben, dass die Wirkung von A779 nur bei Mechanismen greift, die endothelabhängig sind, wohingegen bei endothelunabhängigen Vorgängen keinerlei Beeinflussung durch A779 gegeben war (Lemos *et al.*, 2005; Peiro *et al.*, 2007).

AVE0991

In der vorliegenden Arbeit wurde als weiterer Nicht-Ang-Metabolit die Interaktion des Ang-(1-7)-Rezeptor-Agonisten AVE0991 am HSMas-Rezeptor untersucht. Das Nicht-Peptid AVE0991, welches neben Ang-(1-7) als Mas-Ligand beschrieben wurde (Pinheiro *et al.*, 2004), führte in den Leervektor-transfizierten COS-7-Zellen zu höheren AA-Anstiegen (+ 60%) im Vergleich zu Ang-(1-7) (+ 50%) (Abb. 4.20). Da die Behandlung der Leervektor-transfizierten COS-7-Zellen mit AVE0991 und Ang-(1-7) zu den signifikantesten AA-Freisetzungen führte, kann ein Vorliegen des Mas-Rezeptors in den COS-7-Zellen angenommen werden. Jedoch konnte experimentell nachgewiesen werden, dass die Behandlung der *HSMas*-transfizierten Zellen mit AVE0991 die AA-Freisetzung nicht steigerte, sondern vielmehr zu einer signifikanten AA-Reduktion führte. Aufgrund dessen kann angenommen werden, dass AVE0991 nicht direkt mit dem Mas-Rezeptor interagiert, sondern über indirekte Wirkungen die zellulären Prozesse beeinflusst.

In den letzten Jahren wurde ein neuer Signaltransduktionsweg für AVE0991 erforscht, der über die Stimulation des Ang-(1-7)-Rezeptors durch Ang-(1-7) und AVE0991 eine Freisetzung von NO bewirkt. Dabei reagiert der Ang-(1-7)-Rezeptor-Agonist AVE0991 in ähnlicher Weise wie der Ligand Ang-(1-7) in seiner Interaktion mit dem Mas-Rezeptor (Ferreira *et al.*, 2007).

Bereits 2002 zeigten die Ergebnisse in der Studie von Wiemer *et al.*, dass die Freisetzung des bioaktiven NO - bei gleicher Konzentration von AVE0991 und Ang-(1-7) - bei AVE0991 fünfmal höher war als bei Ang-(1-7). Dieser Effekt konnte zu etwa 50% durch A779 und zu 90% durch PD123177 (ein AT2-Rezeptorblocker) inhibiert werden. Weitere Studien belegen diese Ergebnisse (Pinheiro *et al.*, 2004; Faria-Silva *et al.*, 2005).

5.1.3 Die Interaktion von Substanz P mit Mas

Für die Substanz P konnte gezeigt werden, dass die Behandlung von Leervektor-transfizierten Zellen mit der Substanz P zu keinem relevanten AA-Anstieg führte, während es in den *HSMas*-

transfizierten Zellen zu einem signifikanten AA-Anstieg um 25% (Tab. 4.1) kam, der die Interaktion zwischen Peptid und Rezeptor verdeutlichte. In der Studie von Andrawis *et al.* (1991) war erstmalig gezeigt worden, dass Substanz P in *Mas*-transfizierten Fibroblasten konzentrationsabhängige Ca^{2+} -Freisetzung hervorrief (ED_{50} $1,3 \times 10^{-5} \text{M}$), nicht aber in den Kontrollzellen. In Ca^{2+} -Bindungsstudien konnte gezeigt werden, dass zwar der Ang-II-Rezeptor-Antagonist $[\text{Sar}^1, \text{Ala}^8]\text{Ang II}$ die Wirkungen von Ang II hemmen konnte, nicht aber der Substanz P-Rezeptor-Antagonist $[\text{D-Arg}^1, \text{D-Pro}^2, \text{D-Trp}^{7,9}, \text{Leu}^{11}]\text{Substanz P}$ (Ambroz *et al.*, 1991). Welche Funktion und Wirkungsweise Substanz P am *Mas*-Rezeptor ausübt, wird in weiterführenden Studien untersucht werden müssen.

5.1.4 Die Interaktion von Neuro-Peptiden mit Mas

Da experimentell nachgewiesen werden konnte, dass *Mas* im Hippokampus und zerebralen Kortex des Gehirns exprimiert wird und es sich auch bei anderen Onkogenen um Neurotransmitter handelt (Jackson *et al.* 1988; Andrawis *et al.*, 1991, Nilsson *et al.*, 1985; Nemecek *et al.*, 1986), sollten in den hier vorliegenden Untersuchungen Anhaltspunkte für eine mögliche Agonismus/Antagonismus-Reaktion durch Neuro-Peptide (NPFF, NPAF und NPSF) bzw. durch A779 gefunden werden.

Es zeigte sich, dass NPFF in den applizierten Konzentrationen von 10^{-8} -, 10^{-7} - und 10^{-5}M zu signifikanten AA-Anstiegen um 30-40% in den Leervektor-transfizierten Kontrollzellen führte (Abb. 4.29). Auch eine NPAF-Behandlung resultierte in den Leervektor-transfizierten Zellen in AA-Anstiegen um 10-35% (Abb. 4.30). Bonnard *et al.* (2003) bestätigten in einer Studie mit neuronalen und nicht-neuronalen Zellen, dass NPFF und NPAF eindeutig im humanen Neuroblastom identifiziert werden konnten. Dabei wurde NPFF als einziges der untersuchten Peptide eindeutig in COS-Zellen identifiziert.

Von großem Interesse sind in diesem Zusammenhang auch die Untersuchungen von Yang *et al.* (2007), die zeigten, dass RFamid-Peptide, zu denen NPFF gehört, den säurebezogenen Ionenhaushalt beeinflussen. Man könnte also auch die Möglichkeit in Betracht ziehen, dass NPFF über die so genannten ‚acid sensing ion channels‘ (ASIC) indirekt mit dem *Mas*-Rezeptor interagiert. Wahrscheinlich liegt hier eine indirekte Interaktion wie bei AVE0991 vor, die Annahme vorausgesetzt, dass COS-Zellen *Mas*-Rezeptoren besitzen.

Außerdem legte die Studie die wichtige Rolle von NPFF in der Schmerzregulation durch ASIC nahe.

NPFF führte darüber hinaus bei den *HSMas*-transfizierten Zellen in allen untersuchten Konzentrationen zu signifikanten Ergebnissen (+ 90-105%). Der Effekt von NPFF wurde durch Behandlung mit A779 komplett aufgehoben, so dass hier eine antagonistische Wirkung durch A779 postuliert werden kann (Abb. 4.29). Bei den *HSMas*-transfizierten Zellen zeigte sich für NPAF keine relevante AA-Freisetzung gegenüber der Kontrolle (Abb. 4.30), so dass NPAF offenbar nicht über eine AA-Freisetzung mit dem *HSMas*-Rezeptor interagiert.

In den Leervektor-transfizierten Zellen kam es nach Behandlung mit NPSF in den untersuchten Konzentrationen zu keinen signifikanten AA-Anstiegen. Bei den *HSMas*-transfizierten Zellen zeigten dagegen alle Versuche deutliche Signifikanz (+ 80-105%). NPSF ist damit ein möglicher Ligand am *HSMas*-Rezeptor. Nach Doppelbehandlung mit A779+NPSF kam es im Gegensatz zur alleinigen Behandlung mit NPSF zu einer AA-Reduktion um 50% (Abb. 4.31). Hier mag zumindest ein partieller Antagonismus für NPSF durch A779 vorliegen. Die vorliegenden Daten legen die Vermutung nahe, dass *Mas* als ein Rezeptor für die RFamid Neuro-Peptide (NPFF und NPSF) fungieren und die Nozizeption *in vivo* modulieren könnte. A779 antagonisierte die durch NPFF und NPSF hervorgerufene AA-Freisetzung am *HSMas*-Rezeptor.

Somit bestätigen die vorliegenden Ergebnisse dieser Arbeit die Resultate von Dong *et al.* (2001), die nachweisen konnten, dass keiner der Liganden eine Antwort bei den nicht-transfizierten Zellen zeigte, aber bei transfizierten HEK-G α_{15} -Zellen NPFF signifikante, FLRF und NPAF zumindest noch schwächere Signale hervorriefen.

5.2 Die Rezeptoren der *Mrg*-Familie

Für die *Mas*-Sequenz-ähnlichen-Rezeptoren *MMMrgH*, *HSMrgX2*, *HSMrgX1*, *HSMrgD*, *HSMrgF* und *HSMRG* konnte keine vergleichbar hohe AA-Freisetzung nach Peptid-Behandlung mit einem der verwendeten Ang-Peptide und Nicht-Peptide festgestellt werden, wie sie bei Ang-(1-7) und dem *HSMas*-Rezeptor (ca. 300-facher Anstieg) auftrat (Abb. 4.29; 5.1.1).

Allerdings waren auch hier deutliche Anstiege bezüglich der AA-Freisetzung nach Behandlung mit AVE0991, Ang I, Ang II, Ang III, Ang IV und Substanz P erkennbar, die zu signifikanten Ergebnissen führten. Die Unterschiede in der AA-Freisetzung bei den jeweiligen Rezeptoren für die Substanzen veranschaulichen deutlich die hohe Diversität für die Ligand/Rezeptor-Interaktion trotz relativ naher Sequenz-Verwandtschaft der Rezeptoren untereinander (Abb. 5.1; Anlage 4 und 5).

Basierend auf der Tatsache, dass die beiden Ang II-Rezeptoren (AT1 und AT2) eine DNA-Sequenzhomologie von 30% aufweisen, wurden die Rezeptoren der *Mrg*-Familie hinsichtlich

ihrer Sequenzähnlichkeit mit dem humanen Mas-Rezeptor verglichen. Die ermittelten Sequenzhomologien der untersuchten Rezeptoren zu HSMas betrug zwischen 30-41% (MMMrghH: 41%; HSMrgX2: 34%; HSMrgX1 und HSMrgD: 32%; HSMrgF: 31%; HSMRG: 30%) (Abb. 5.1).

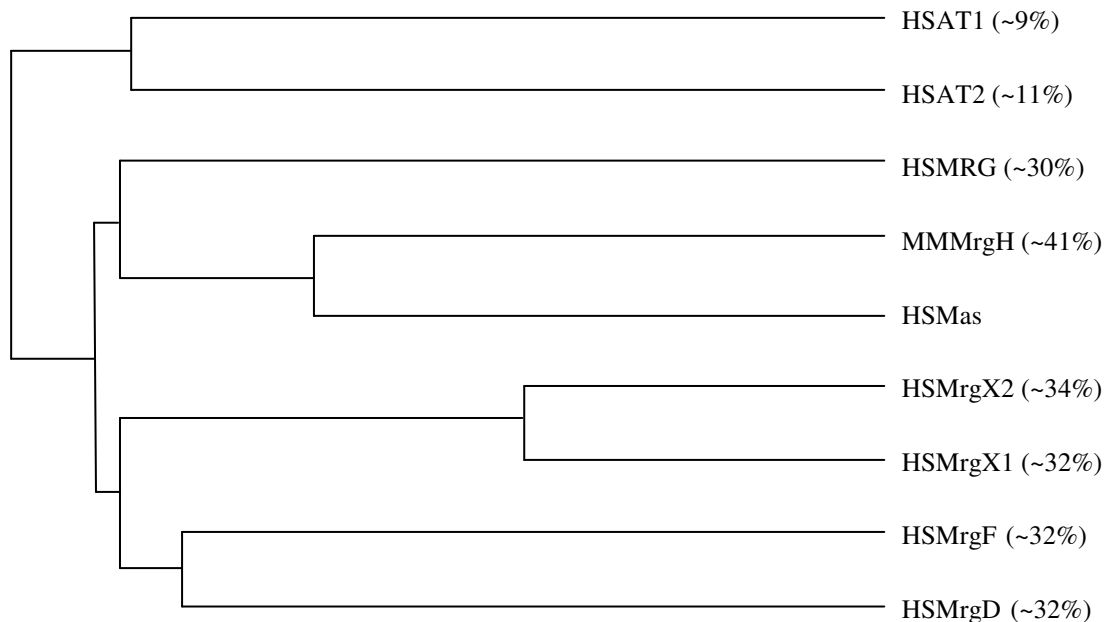


Abb. 5.1: Stammbaum der Mrg-Familie. Dargestellt ist die prozentuale Homologie von Rezeptoren der Mrg-Familie im Vergleich zum humanen Mas-Gen. Die Protein-Sequenzen wurden mit dem Programm CLUSTAL W miteinander verglichen (aus Gembardt et al., 2008). Die Sequenzhomologie der Mrg-Rezeptoren zu HSMas ist in Klammern hinter die jeweiligen Rezeptoren geschrieben.

5.2.1 Die Interaktion von Angiotensin-Metaboliten mit Mas-Sequenz-ähnlichen Rezeptoren

Die Rezeptoren MMMrgH, HSMrgX2, HSMrgX1 und HSMrgD (Shinohara *et al.*, 2004), die der Mas-Sequenz sehr ähnlich sind (Abb. 5.1), wurden erst vor kurzem entdeckt (Pena & Pereira-Smith, 2007).

Für die meisten dieser Rezeptoren konnten bereits Liganden identifiziert werden: Für den HSMrgX2-Rezeptor – Cortistatin-14 (CST-14) und das Proadrenomedullin-Peptid (PAMP-12 und PAMP-20), für den HSMrgX1-Rezeptor - ‚bovine adrenal medulla peptide 22‘ (BAM22) und für den HSMrgD-Rezeptor - β -Alanin (Lembo *et al.*, 2002; Robas *et al.*, 2003; Shinohara *et al.*, 2004; Kamohara *et al.*, 2005; 1.2.3). Eine Ausnahme bildet der MMMrgH-Rezeptor, der bis heute nur im murinen Herzgewebe nachgewiesen wurde und für den bislang kein Ligand identifiziert werden konnte (Wittenberger, *et al.*, 2001).

MMMrghH

Studien bezüglich möglicher Interaktionen des murinen MrgH-Rezeptors mit Peptiden oder Nicht-Peptiden wurden bislang nicht publiziert. Die erstmalig untersuchten Wechselwirkungen zwischen MMMrgH-Rezeptor und Ang-(1-7) führten nur zu einer geringen, aber signifikant reduzierten AA-Freisetzung (- 20%), aufgrund derer von einer indirekten Interaktion auszugehen ist. Da der MMMrgH-Rezeptor die höchste Sequenzhomologie zu dem HSMas-Rezeptor besitzt (Abb. 5.1), war dieses Ergebnis nicht zu erwarten und demonstriert, dass eine hohe Sequenzhomologie nicht zwangsläufig mit der Liganden-Spezifität korreliert ist.

Auch die anderen getesteten Angiotensine (Ang I, Ang II und Ang III) führten zu keiner gesteigerten AA-Freisetzung bzw. nur zu einer geringen Steigerung (Ang IV: + 25%), so dass sich vermuten lässt, dass der MMMrgH-Rezeptor nicht über eine Ang-Bindestelle verfügt.

Zum besseren Verständnis sollten weiterführende Untersuchungen erfolgen, um die Funktion und Wirkungsweise dieses Rezeptors, insbesondere im Hinblick auf sein Vorkommen im Herzen, darzulegen und den bzw. die Liganden für diesen Rezeptor zu identifizieren (Santos *et al.*, 2006).

HSMrgX2

Auch für die *HSMrgX2*-transfizierte Zellen konnte durch die Behandlung mit Ang-(1-7) im Vergleich zu den Leervektor-transfizierten Zellen kein signifikanter AA-Anstieg nachgewiesen werden (Abb. 4.23). Vielmehr wurde eine signifikante Reduktion der AA-Freisetzung (- 55% und - 35%) für Ang-(1-7) und Ang II beobachtet. Diese Ergebnisse lassen den Rückschluss zu, dass hier eine indirekte Interaktion des HSMrgX2-Rezeptors vorlag. Durch die Co-Expression des eingeschleusten HSMrgX2-Rezeptors wurde die Rezeptor-vermittelte AA-Freisetzung inhibiert. Da die Behandlung mit den Peptiden Ang III und Ang IV lediglich zu einem geringen AA-Anstieg (jeweils + 10%) bei den *HSMrgX2*-transfizierten Zellen führte, kann eine direkte Interaktion zwischen Ang III oder Ang IV mit dem HSMrgX2-Rezeptor über den AA-Signaltransduktionsweg ausgeschlossen werden (Abb. 4.23).

HSMrgX1

Der humane MrgX1-Rezeptor, in der Literatur auch SNSR3/4-Rezeptor genannt, wurde in den sensorischen Neuronen des Menschen gefunden. Die Ergebnisse neuerer Studien belegen, dass der HSMrgX1-Rezeptor durch die Peptidprodukte des Proenkephalin A, BAM (1-22) (,bovine adrenal medullary peptide' (1-22)) und BAM (8-22) stimuliert wird (Lembo *et al.*, 2002). Diese Peptide binden und aktivieren darüber hinaus auch die μ -, δ -, und κ -Opioid-Rezeptoren

(Mansour *et al.*, 1995; Henderson *et al.*, 1997). Chen und Ikeda (2004) untersuchten in diesem Zusammenhang die Modulation des Ca^{2+} -Ionen-Austausches und konnten zeigen, dass der Agonist BAM (8-22) den durch hohe Spannungen (aber nicht durch niedrige) induzierten Ca^{2+} -Austausch sowohl in DRG („dorsal root ganglion“)- als auch in SCG („superior cervical ganglion“)-Neuronen, die den humanen SNSR4-Rezeptor exprimierten, verminderte. Dieser Vorgang war abhängig von der Konzentration des Rezeptors und wurde teilweise durch die Gabe von Pertussistoxin (PTX) beeinflusst. Aktivitäten in den Kontrollneuronen konnten nicht gemessen werden (Chen und Ikeda, 2004).

Bei den entsprechenden Untersuchungen mit dem HSMrgX1-Rezeptor der hier vorliegenden Arbeit zeigte als einziges Peptid Ang-(1-7) deutliche Auswirkungen in den *HSMrgX1*-transfizierten Zellen. Es kam zu einer signifikanten Reduktion der AA-Freisetzung (- 50%) (Abb. 4.25), so dass gefolgert werden kann, dass es zu einer indirekten Interaktion zwischen Ang-(1-7) und dem HSMrgX1-Rezeptor kam. Für das Peptid Ang IV wurde ein niedriger AA-Anstieg gemessen (+ 10%) - eine direkte Interaktion zwischen Peptid und Rezeptor ist somit wohl eher unwahrscheinlich. Die anderen Peptide Ang I, Ang II und Ang III zeigten keine indirekte oder direkte Interaktion über den AA-Signaltransduktionsweg mit diesem Rezeptor.

HSMrgD

Für den humanen MrgD-Rezeptor konnte bisher nur β -Alanin als Ligand anhand eines erhöhten Ca^{2+} -Influges nach Behandlung in CHO-Zellen identifiziert werden (Shinohara *et al.*, 2004). In der vorliegenden Versuchsreihe mit dem HSMrgD-Rezeptor sollte herausgefunden werden, ob die Ang-Metaboliten als mögliche MrgD-Rezeptoren fungieren. Es zeigte sich, dass die Behandlung der transfizierten Zellen mit Ang-(1-7) und Ang IV zu einer signifikant erhöhten AA-Freisetzung (+ 65% und + 60%) führte (Abb. 4.26). Dieser Anstieg war unter den getesteten Rezeptoren der Mrg-Familie neben HSMas am höchsten, obwohl es ein Rezeptor mit geringer Homologie zu HSMas (30%) ist (Abb. 5.1).

Damit stehen vornehmlich Ang-(1-7) und Ang IV als mögliche Liganden am HSMrgD-Rezeptor zur Diskussion. Für Ang-(1-7) und Ang IV wird hier erstmals das Ergebnis einer AA-Freisetzung am HSMrgD-Rezeptor dargestellt. Offenbar scheint der HSMrgD-Rezeptor neben dem HSMas-Rezeptor eine Rolle in der Bindung und dem Signaling durch Ang-(1-7) und Ang IV über den direkten AA-Transduktionsweg zu spielen. Die Peptide Ang I, Ang II und Ang III zeigten keine relevante Interaktion über AA mit dem HSMrgD-Rezeptor.

HSMrgF

Für den humanen MrgF-Rezeptor (früher RTA genannt) wurde anhand der Ergebnisse von Ross *et al.* (1990) für COS-7-Zellen und Xenopus-Oozyten eine Ang II-Rezeptorbindung ausgeschlossen. Die Daten der vorliegenden Studie dokumentierten in diesem Zusammenhang für die *HSMrgF*-transfizierten Zellen eine signifikant reduzierte AA-Freisetzung (- 35%) nach einer Behandlung mit Ang-(1-7). Ähnlich wie beim HSMrgX1-Rezeptor wird in diesem Fall eine indirekte Interaktion vermutet. Für die Peptide Ang I, Ang II, Ang III und Ang IV konnte keine Beeinflussung der AA-Freisetzung nachgewiesen werden (Abb. 4.27). Somit konnte für den HSMrgF-Rezeptor kein Ligand nachgewiesen werden, und es kann gefolgert werden, dass HSMrgF für die getesteten Angiotensine kein direktes intrazelluläres Signaling über AA vermittelt.

HSMRG

Die humanen Rezeptoren MRG und MrgF sind in früheren Studien als Ang-Rezeptoren diskutiert worden (Jackson *et al.*, 1988; Ross *et al.*, 1990; Monnot *et al.* 1991). Dabei lag das Interesse insbesondere auf der Interaktion von Ang II mit HSMRG und HSMrgF.

In der Studie von Monnot *et al.* (1991) wurde die Interaktion von [¹²⁵I]Sar1Ang II und [³H]Ang II mit nicht-transfizierten COS- und CHO-Zellen untersucht. Beide Zellgruppen schienen eine geringe, aber detektierbare Zahl an hochaffinen Ang-Rezeptoren zu besitzen. Die Bindung von [¹²⁵I]Sar1Ang II an die Oberfläche von COS- und CHO-Zellen wich dabei zwischen den nicht-transfizierten Zellen und den *MRG*-transfizierten Zellen nicht deutlich voneinander ab. Auch stimulierte Ang II weder in nicht-transfizierten noch transfizierten COS-7-Zellen die Inositolphosphatproduktion (IP₃-Produktion). In dieser Hinsicht unterscheidet sich der MRG-Rezeptor also deutlich von Mas. In der *Mas*-transfizierten neuronalen Zelllinie (401L-C3) stimulierte Ang II die IP₃-Produktion, während in *Mas*-transfizierten 401L-C3-Zellen und COS-7-Zellen die zytoplasmatische Ca²⁺-Konzentration anstieg. Anhand der Ergebnisse wurde gefolgert, dass der MRG nicht als AT1- oder AT2-Rezeptor fungierte. Jedoch kam es in mit *MRG* injizierten Xenopus-Oozyten zu einer verstärkten zellulären Reaktion durch eine Inkubation mit 10⁻⁶M Ang II, die in den mit dem Rezeptor injizierten Zellen fünfmal stärker war als in den Kontrollzellen. Die Ergebnisse führten zu der Hypothese, dass durch die Interaktion von MRG mit Ang II die Synthese von Ang II-Rezeptoren in den Follikel-Zellen stimuliert wird. In den vorliegenden Experimenten wurde die Interaktion von Ang-(1-7), Ang I, Ang II, Ang III und Ang IV mit dem HSMRG-Rezeptor getestet. Es kam bei den Peptiden Ang-(1-7) und Ang IV zu signifikanten AA-Anstiegen (+ 45% und + 65%) in den Rezeptor-transfizierten

Zellen. Auch nach Ang II-Behandlung kam es zu einem geringen, aber signifikanten AA-Anstieg (+ 20%) (Abb. 4.28). Für HSMRG konnten somit Ang-(1-7), Ang IV und Ang II als mögliche Rezeptor-Liganden identifiziert werden und erlauben die Schlußfolgerung, dass HSMRG für Ang-(1-7), Ang IV und Ang II ein intrazelluläres Signaling über AA vermittelt und darüber hinaus möglicherweise aufgrund der nachgewiesenen Peptid-Interaktionen ein Teil des RAS ist.

5.2.2 Die Interaktion von AVE0991 mit Mas-Sequenz-ähnlichen Rezeptoren

Für den Mas-Agonisten AVE0991 sind bis heute keine Studien zur Interaktion mit Mas-Sequenz-ähnlichen Rezeptoren veröffentlicht worden. Deshalb wurden in der hier vorliegenden Arbeit mögliche Wechselwirkungen von AVE0991 mit verschiedenen Mas-Sequenz-ähnlichen Rezeptoren über eine Veränderung der AA-Freisetzung untersucht, und es konnte gezeigt werden, dass z.B. die Behandlung von *HSMrgX1*-transfizierten Zellen mit AVE0991 zu einem signifikanten AA-Anstieg um 40% (Abb. 4.25) führte. Für die Rezeptoren MMRgH, HSMrgX2, HSMrgD, HSMrgF und HSMRG konnten jedoch keine signifikanten, AVE0991-vermittelten Veränderungen nachgewiesen werden (Abb. 4.22, 4.23, 4.26, 4.27, 4.28).

Somit gelang also erstmalig unter den hier gewählten Versuchsbedingungen für das Nicht-Peptid AVE0991 eine HSMrgX1-Rezeptor-Interaktion nachzuweisen und AVE0991 als möglichen HSMrgX1-Liganden zu identifizieren. Für die weiteren getesteten Rezeptoren konnte darüber hinaus eine direkte Interaktion mit AVE0991 über das AA-Signaling ausgeschlossen werden.

5.2.3 Die Interaktion von Substanz P mit Mas-Sequenz-ähnlichen Rezeptoren

Die Interaktion von Substanz P mit dem humanen Mas-Rezeptor wurde bereits von Andrawis und Mitarbeitern (1991) anhand der veränderten Ca^{2+} -Freisetzung nach Peptid-Behandlung in *Mas*-transfizierten Zellen nachgewiesen. Die Autoren mutmaßten, dass die Substanz P als Neuro-Peptid eine Rolle in der Schmerzregulation an diesem Rezeptor spielt.

Auch für Substanz P wurde hier erstmalig die direkte Interaktion mit Mas-Sequenz-ähnlichen Rezeptoren über das AA-Signaling untersucht. Die Ergebnisse dokumentierten für HSMrgX2, HSMrgD, HSMrgF und HSMRG keine signifikante Interaktion zwischen Peptid und Rezeptor (fehlende AA-Freisetzung). Nach einer Behandlung von *HSMrgX1*-transfizierten Zellen mit der Substanz P kam es jedoch zu einem signifikanten AA-Anstieg um 55% (Tab. 4.2). Somit steht die Substanz P als möglicher Ligand am HSMrgX1-Rezeptor zur Diskussion.

Für den murinen MrgH-Rezeptor wurde ein niedriger AA-Anstieg nach Behandlung mit Substanz P (+ 10%) gemessen (Tab. 4.2). Eine tatsächliche Ligand/Rezeptor-Interaktion scheint aufgrund der geringen AA-Freisetzung unwahrscheinlich und bedarf zur Verifizierung weiterführender Experimente, z.B. durch Bindungs-Assays und Dose-Response-Kurven.

5.2.4 Die Interaktion von Neuro-Peptiden mit Mas-Sequenz-ähnlichen Rezeptoren

Dong und Mitarbeiter konnten 2001 in Experimenten mit *Mas*-transfizierten HEK-G α_{15} -Zellen nachweisen, dass NPFF und NPAF zu einer erhöhten Ca²⁺-Freisetzung in den Zellen führt. Um zu überprüfen, ob Mas-verwandte Rezeptoren ebenfalls als mögliche Liganden für Neuro-Peptide fungieren können, wurden die Rezeptoren MMMrgH und HSMrgX1 mit den Neuro-Peptiden NPFF, NPAF und NPSF behandelt. Zusätzlich wurde die antagonistische Wirkung des Ang-(1-7)-spezifischen Antagonisten A779 auf die durch die Neuro-Peptide hervorgerufene AA-Freisetzung untersucht. Die in der hier vorliegenden Studie untersuchten Interaktionen der Neuropeptide NPFF, NPAF und NPSF mit den Rezeptoren MMMrgH und HSMrgX1 veranschaulichten unterschiedliche Wirkungen der Neuro-Peptide.

MMMrgH

So führte die Behandlung mit NPFF in Konzentrationen von 10⁻⁶M und 10⁻⁸M beim MMMrgH-Rezeptor zu einem geringen, aber signifikanten AA-Anstieg (+ 25% und + 10%) (Abb. 4.32) und somit also zu einem Agonismus am MMMrgH-Rezeptor. Eine Doppelbehandlung von A779 mit NPFF führte dahingegen zu einem partiellen Antagonismus an diesem Rezeptor mit einer signifikanten AA-Reduktion um 20% gegenüber der alleinigen Behandlung mit 10⁻⁸M NPFF (Abb. 4.32).

Alle getesteten Konzentrationen von NPAF resultierten wiederum beim MMMrgH-Rezeptor in signifikanten AA-Anstiegen (+ 40-45%). Bei NPAF könnte es sich um einen MMMrgH-Liganden handeln. Eine kombinierte Behandlung von NPAF mit A779 führte zu einer AA-Reduktion um 40% und deutete somit auf einen partiellen Antagonismus am MMMrgH-Rezeptor hin (Abb. 4.33).

Die Behandlung der *MMMrgH*-transfizierten Zellen mit NPSF führte in allen Konzentrationen zu signifikanten AA-Anstiegen (+ 85-130%), also erscheint auch dieses Peptid als Ligand am MMMrgH-Rezeptor zu fungieren. Auch in dieser Versuchsreihe antagonisierte A779 die AA-Freisetzung von NPSF am MMMrgH-Rezeptor (Abb. 4.34).

Somit belegen die mittels AA-Freisetzung erstmalig gezeigten Wirkungen, dass die getesteten Neuro-Peptide mit dem MMRgH-Rezeptor interagieren und über diesen Wirkmechanismus an kardialen Funktionen beteiligt sein können, insbesondere auch unter Berücksichtigung, dass der MMRgH-Rezeptor primär im Herzen der Maus vorkommt. Welche Effekte die Interaktion zwischen Neuro-Peptid und Rezeptor hervorruft, wird in weiteren Studien untersucht werden müssen.

HSMrgX1

Da der HSMrgX1-Rezeptor in den sensorischen Neuronen lokalisiert ist, kam er als möglicher Neuro-Peptid-Rezeptor in Frage. Liganden konnten bislang für den HSMrgX1-Rezeptor nicht identifiziert werden, so dass der experimentelle Nachweis von Liganden auch zum besseren Verständnis der Wirkungsweise des Rezeptors beitragen würde.

Bei den *HSMrgX1*-transfizierten Zellen lag die AA-Reduktion für NPFf in den angewandten Konzentrationen von 10^{-8} , 10^{-7} und 10^{-5} M signifikant niedriger gegenüber der Kontrolle (- 25-30%) (Abb. 4.35). Für 10^{-10} M NPAF, 10^{-8} M NPAF und 10^{-7} M NPAF lagen die Werte für die AA-Freisetzung ebenfalls signifikant unter den Kontrollwerten (- 10-35%) (Abb. 4.36), so dass hier ein indirekter Effekt angenommen werden konnte.

Alle getesteten NPSF Konzentrationen erbrachten bei den *HSMrgX1*-transfizierten Zellen keine signifikanten AA-Anstiege. Insgesamt führten die Neuro-Peptide NPFf, NPAF und NPSF zu keiner AA-Stimulation am HSMrgX1-Rezeptor. Somit konnte unter den gewählten Bedingungen kein Ligand oder Antagonist für diesen Rezeptor nachgewiesen werden (Abb. 4.37).

5.3 Ausblick

Das Mas-Protonkogen wurde 1986 durch seine Tumoraktivität in einer *in vivo*-Studie entdeckt (Young *et al.*, 1986); seit dieser Zeit ist es Gegenstand intensiver Forschung mit verschiedenen Hauptaugenmerk. Zum besseren Verständnis der molekularen Wirkweise wird zum einen – wie auch in dieser Arbeit – versucht, mögliche Liganden des Mas-Rezeptors zu identifizieren. Zum anderen versucht man, weitere Erkenntnisse über die direkten oder indirekten Interaktionen von Liganden mit dem Rezeptor zu erlangen. Eine Nachweismöglichkeit der indirekten Interaktion ist über den Ca^{2+} -Signaltransduktionsweg (Ambroz *et al.*, 1991; Zhang *et al.*, 2007). Neuere Forschungen beschäftigen sich darüber hinaus mit dem NO-Signaltransduktionsweg oder dem Ionen-Austausch, an dem der Mas-Rezeptor beteiligt sein soll. So konnten Sampaio *et al.* (2007) zeigen, dass Ang-(1-7) über die Stimulation des Mas-Rezeptors zu einer Exprimierung

der eNOS („endothelial nitric oxide synthase“) führt und über diesen Weg auf die NO-Produktion durch den Akt-abhängigen-Transduktionsweg einwirkt (Sampaio *et al.*, 2007). Eine weitere Studie an Knockout-Mäusen unterstützte die These, dass Ang-(1-7) über eine Mas-Rezeptor-Stimulation die Freisetzung von NO aktiviert. Ebenso zeigte die Studie, dass der antithrombotische Effekt von Ang-(1-7) mit der NO-Freisetzung in Verbindung steht (Fraga-Silva *et al.*, 2008). Aktuell beschäftigen sich auch Studien mit dem Ionenhaushalt, der, vermittelt durch Neuro-Peptide, indirekt über den Mas-Rezeptor beeinflusst wird. Wie und in welcher Form dies geschieht, muss in weiteren Untersuchungen geklärt werden (Yang *et al.*, 2007).

Ein dritter Forschungsschwerpunkt ist auf die Anwendbarkeit im klinischen Alltag fokussiert. Die GPCRs zählen inzwischen zu Angriffspunkten für neue Pharmaka, die als Liganden am Rezeptor wirken. Seit längerer Zeit werden bereits Antagonisten des AT1-Rezeptors bei Hochdruckpatienten im klinischen Alltag eingesetzt. Die biologischen Aktivitäten von Ang-(1-7) am Mas-Rezeptor eröffnen neue Wege, pharmakologisch in die Homöostase und die Blutdruckregulation einzugreifen, insbesondere unter Berücksichtigung des akkumulierenden Effekts nach Inhibition durch ACE. Ähnliche Wirkungen sind auch für andere Agonisten am Mas-Rezeptor vorstellbar, die wie Ang-(1-7) blutdrucksenkend wirken könnten. Agonistische Pharmaka, die auf der Ang-(1-7)/Mas-Achse wirken, sind zukünftig denkbare Therapeutika kardiovaskulärer Erkrankungen. Bislang sind diese Peptide aufgrund der im Magen vorhandenen Peptidasen jedoch nicht oral applizierbar. Darüber hinaus rufen einige der möglicherweise als Liganden am Mas-Rezeptor fungierenden Peptide periphere Effekte hervor, die weiterer Erforschung bedürfen.

Zukünftig wird außerdem untersucht werden müssen, in welchem Maße Ang-(1-7) in die Baroreflexsensitivität (BRS) über die Interaktion mit Mas eingreift (Campagnole-Santos *et al.*, 1992) und wie sich die Herzrate (HR) sowie Blutdruckvariabilität (BPV) (Walther *et al.* 2000a & b) verändern. Über Untersuchungen bezüglich der Verhaltensweisen im MWM- und EPM-Test an Mas-Knockout Mäusen (Walther *et al.*, 1998, 2000a & b) könnten Aufschlüsse darüber gewonnen werden, welche entsprechenden Wirkmechanismen zugrunde liegen.

Aus den vorliegenden Ergebnissen lassen sich neue Ziele in der Pharmakotherapie kardiovaskulärer Erkrankungen durch Manipulation des Mas-Rezeptors ableiten. Auf der Basis der Daten dieser Arbeit erscheint es sinnvoll, die Reaktivität anderer Mitglieder der Mrg-Familie auf Angiotensine und andere mögliche Liganden hin zu untersuchen, insbesondere da bis heute nahezu 50% ‚verwaiste‘ Rezeptoren bei Menschen und Nagetieren beschrieben worden sind.

Da die spezifische Expression Mas-verwandter GPCRs wie die der Mrgs in Subpopulationen der sensorischen Neuronen erfolgt und durch RFamid Neuro-Peptide aktiviert werden, ist ihre

Funktion beim Schutz vor schmerzhaften Stimuli denkbar (Dong *et al.*, 2001; Zylka *et al.*, 2003). Es könnten sich zukünftig neue Möglichkeiten ergeben, auch hier pharmakologisch in die Schmerzkontrolle einzugreifen und neuronale Erkrankungen zu behandeln.

6. Zusammenfassung

Lange galt Angiotensin (Ang)II als einziges aktives Peptid des Renin-Angiotensin-Systems (RAS). Inzwischen sind weitere Peptide bekannt, deren Bedeutung in der Pathogenese von kardiovaskulären Erkrankungen bisher nur partiell beschrieben wurden und die durch hydrolytische Abspaltung zu Ang III [Ang-2-8], Ang IV [Ang-3-8] und Ang-(1-7) umgewandelt werden.

Die Aktivierung des G-Protein gekoppelten Rezeptors (GPCR) Mas führt über einen Signalweg zur Freisetzung von Arachidonsäure (AA). *Mas*-transfizierte COS-7-Zellen wurden hinsichtlich ihrer AA-Freisetzung nach Inkubation mit verschiedenen Peptiden, Nicht-Peptiden und Neuropeptiden untersucht. Als Kontrolle wurden COS-7-Zellen, die nur mit dem Kontrollplasmid pcDNA transfiziert wurden, verwendet. AA wurde 18 Stunden vor der Inkubation (15 Minuten) mit den Peptiden zu den stabil transfizierten Zellen zugefügt. Die daraufhin freigesetzte Menge an AA wurde über Flüssigszintigraphie ermittelt.

Es wurde die Funktion des Ang-(1-7) als ein Ligand des Mas-Rezeptors und ebenfalls des spezifischen Antagonisten A779 des Ang-(1-7) am Mas-Rezeptor erfasst. Bei den nur pcDNA-transfizierten Zellen (Leervektor) kam es nach Behandlung mit Ang-(1-7), AVE0991, Ang II, Ang III und Ang IV zu signifikanten AA-Anstiegen. Daraus lässt sich schließen, dass der Mas-Rezeptor auch in COS-7-Zellen exprimiert wird. Bei allen getesteten Konzentrationen von Ang-(1-7) kam es zu hochsignifikanter AA-Freisetzung. Nach Behandlung mit A779 kam es zu einer kompletten Hemmung der durch Ang-(1-7) hervorgerufenen AA-Freisetzung.

Die AT1- und AT2-Blocker PD123319 und Irbesartan konnten die Wirkung des Ang-(1-7) nicht antagonisieren, wodurch gezeigt werden konnte, dass der Ang-(1-7)-Rezeptor sich von den klassischen Ang II-Rezeptoren AT1 und AT2 deutlich unterscheidet. Das Nicht-Peptid AVE0991, welches als Mas-Rezeptor-Agonist gilt, führte bei den pcDNA-transfizierten Zellen im Vergleich zu den unbehandelten Zellen zu signifikanter AA-Freisetzung, nicht aber bei den *Mas*-transfizierten Zellen vs. den pcDNA-transfizierten Zellen. Auch Ang I und Ang II führten bei den *Mas*-transfizierten Zellen vs. den pcDNA-transfizierten Zellen nur zu geringen AA-Freisetzungen, während es Ang III-, Ang IV- und Substanz P-vermittelt zu höheren AA-Freisetzungen kam und sich anhand dessen eine direkte Interaktion nachweisen ließ. Eine indirekte Wirkung durch eine verstärkte Expression der Ang II- und Ang IV-Rezeptoren konnte anhand dieser Experimente jedoch nicht ausgeschlossen werden. Aufgrund ihrer Sequenzhomologien zu HSMas wurden auch die Rezeptoren MMMrgH, HSMrgX2, HSMrgX1, HSMrgD, HSMrgF und HSMRG in der hier vorliegenden Arbeit untersucht. Während Ang IV

beim MrgH-Rezeptor zu einem signifikanten AA-Anstieg führte, konnte am MrgX2-Rezeptor durch Ang IV und Ang III eine Interaktion über die AA-Freisetzung nachgewiesen werden. Am MrgX1-Rezeptor waren es Substanz P, AVE0991 und Ang IV, die als mögliche Liganden identifiziert werden konnten. Ang IV und Ang-(1-7) zeigten bei den *MrgD*-transfizierten Zellen hohe AA-Freisetzung. Im Gegensatz dazu kam es bei keinem der untersuchten Peptide zu signifikanter AA-Freisetzung nach Inkubation mit den *MrgF*-transfizierten Zellen. Für MRG konnte eine Interaktion mit Ang IV, Ang-(1-7) und Ang II über die AA-Freisetzung beobachtet werden, womit diese Peptide als mögliche Liganden zur Diskussion stehen. Die hier vorgelegte Studie liefert eine molekularbiologische Basis für die Interaktion zwischen Mas und Ang-(1-7) sowie des spezifischen Antagonisten A779. Die Ergebnisse eröffnen neue Wege in der Behandlung kardiovaskulärer Erkrankungen durch Manipulation des Mas-Rezeptors. Die Daten dieser Arbeit zeigen die Komplexität des RAS auf, bei dem Ang-Metaboliten und Nicht-Ang-Metaboliten mit verschiedenen Rezeptoren der Mrg-Familie interagieren und diverse, zum Teil gegensätzliche biologische Informationen übermittelt werden. Erstmals konnten direkte, Ang IV-induzierte Effekte über GPCRs beschrieben werden, welche unabhängig von den partiellen agonistischen Effekten auf den AT1-Rezeptor sind. Auch Ang II und Ang III vermitteln eine Rezeptoraktivierung unabhängig von ihren spezifischen Rezeptoren AT1 und AT2. Die Neuro-Peptide NPF und NPAF wurden in der Studie von Dong *et al.* bereits als Mas-Liganden diskutiert. In der hier vorliegenden Studie wurde die AA-Freisetzung nach Behandlung der HSMas-, MMMrgH- und HSMrgX1-Rezeptoren mit NPF, NPAF, NPSF und A779 untersucht. Das Neuro-Peptid NPF zeigte am humanen Mas-Rezeptor deutliche AA-Freisetzung. Auch die Kontrollzellen führten zu signifikanten AA-Anstiegen. Die AA-Freisetzung durch NPF wurde durch A779 aufgehoben. A779 ist damit ein möglicher Antagonist für NPF am Mas-Rezeptor. Nur NPAF lieferte in einer hohen Konzentration einen geringen AA-Anstieg. NPSF vermochte bei den *Mas*-transfizierten Zellen in allen Konzentrationen einen signifikanten AA-Anstieg zu bewirken und führte nach Behandlung mit A779 zu einer partiellen Antagonisierung. NPF und NPSF sind damit mögliche Liganden am Mas-Rezeptor. Am MMMrgH-Rezeptor führten NPF, NPAF und NPSF zu signifikanten AA-Anstiegen, die damit mögliche Liganden an diesem Rezeptor sind. Der durch NPF, NPAF und NPSF hervorgerufene AA-Anstieg wurde durch A779 partiell antagonisiert. Beim HSMrgX1-Rezeptor wurde keine Interaktion mit den Neuro-Peptiden NPF, NPAF und NPSF sowie kein Antagonismus durch A779 festgestellt. Die Daten zeigen, dass die Neuro-Peptide am Mas-Rezeptor wirken. Sie könnten die Nozizeption *in vivo* modulieren und bei neuronalen Erkrankungen eingesetzt werden.

7. Literaturverzeichnis

Ambühl P, Felix D, Khosla MC. [7-D-Ala]-Angiotensin: Selective antagonism of Angiotensin-(1-7) in the rat paraventricular nucleus. *Brain Res Bull* 1994; 35(4): 289-91.

Albiston AL, Mc Dowall SG, Matsacos D, et al. Evidence that the angiotensin IV (AT(4)) receptor is the enzyme insulin-regulated aminopeptidase. *J Biol Chem* 2001; 276(52): 48623-6.

Albiston AL, Fernando R, Ye S, Peck GR, Chai SY. Alzheimer's, angiotensin IV and an aminopeptidase. *Biol Pharm Bull* 2004; 27(6): 765-7.

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

Allard M, Labrousche S, Nosjean A, Laguzzi R. Mechanisms underlying the cardiovascular responses to peripheral administration of NPF in the rat. *J Pharmacol Exp Ther* 1995; 274(1): 577-83.

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

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

Al-Ubaidi MR, Brock D, Siciliano MJ. Assignment of the homolog of the Mas1 oncogene to mouse chromosome 17. *Genomics* 1992; 13(2):487.

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

Ambühl P, Felix D, Imboden H, Khosla MC, Ferrario CM. Effects of angiotensin analogues and angiotensin receptor antagonists on paraventricular neurons. *Regul Pept* 1992; 38(2): 111-20.

Andrawis NS, Brock TA, Dzau VJ, Pratt RE. Mas oncogene receptor coupling and peptide specificity in Balb 3T3 and vascular smooth muscle cells. *Am J Med Sci* 1991; 302(6): 329-34.

Andrawis NS, Dzau VJ, Pratt RE. Autocrine stimulation of Mas oncogene leads to altered growth control. *Cell Biol Int Rep* 1992; 16(6): 547-56.

Barnes KL, Knowles WD, Ferrario CM. Angiotensin II and angiotensin-(1-7) excite neurons in the canine medulla in vitro. *Brain Res Bull* 1990; 24(2):275-80.

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

Benter IF, Diz DI, Ferrario CM. Cardiovascular actions of angiotensin-(1-7). *Peptides* 1993; 14(4): 679-84.

- Berridge MJ.** Inositol trisphosphate and calcium signalling. *Nature* 1993; 361(6410): 315-25.
- Bhattacharya M, Babwah AV, Ferguson SS.** Small GTP-binding protein-coupled receptors. *Biochem Soc Trans* 2004; 32(Pt 6): 1040-4.
- Block CH, Santos RA, Brosnihan KB, Ferrario CM.** Immunohistochemical localization of angiotensin-(1-7) in the rat forebrain. *Peptides* 1988; 9(6): 1395-401.
- Blume A, Herdegen T, Unger T.** Angiotensin peptides and inducible transcription factors. *J Mol Med* 1999; 77(3): 339-57.
- Boersma CJ, Sonnemans MA, van Leeuwen FW.** Immunohistochemical localization of neuropeptide FF (FMRF amide-like peptide) in the hypothalamo-neurohypophyseal system of Wistar and Brattleboro rats by light and electron microscopy. *J Comp Neurol* 1993; 336(4): 555-70.
- Bonini JA, Jones KA, Adham N, et al.** Identification and characterization of two G protein-coupled receptors for neuropeptide FF. *J Biol Chem* 2000; 275(50): 39324-31.
- Bonnard E, Burlet-Schiltz O, Monsarrat B, Girard JP, Zajac JM.** Identification of proNeuropeptide FFA peptides processed in neuronal and non-neuronal cells and in nervous tissue. *Eur J Biochem* 2003; 270(20): 4187-99.
- Bonner TI, Buckley NJ, Young AC, Brann MR.** Identification of a family of muscarinic acetylcholine receptor genes. *Science* 1987(4814); 237: 527-32.
- Bottari SP, de Gasparo M, Steckelings UM, Levens NR.** Angiotensin II receptor subtypes: characterization, signalling mechanisms, and possible physiological implications. *Front Neuroendocrinol* 1993; 14(2): 123-71.
- Brosnihan KB, Li P, Ferrario CM.** Angiotensin-(1-7) dilates canine coronary arteries through kinins and nitric oxide. *Hypertension* 1996(3 Pt2); 27: 523-8.
- Brosnihan KB, Li P, Tallant EA, Ferrario CM.** Angiotensin-(1-7): a novel vasodilator of the coronary circulation. *Biol Res* 1998; 31(3): 227-34.
- Bumpus FM, Catt KJ, Chiu AT et al.** Nomenclature for angiotensin receptors. A report of the Nomenclature Committee of the council for High Blood Pressure Research. *Hypertension* 1991; 17(5): 720-1.
- Bunnemann B, Fuxe K, Metzger R, et al.** Autoradiographic localization of mas proto-oncogene mRNA in adult rat brain using in situ hybridization. *Neurosci Lett* 1990; 114(2): 147-53.
- Bunzow JR, van Tol HH, Grandy DK, et al.** Cloning and expression of a rat D2 dopamine receptor cDNA. *Nature* 1988; 336(6201): 783-7.
- Campagnole-Santos MJ, Diz DI, Santos RA, Khosla MC, Brosnihan KB, Ferrario CM.** Cardiovascular effects of angiotensin-(1-7) injected into the dorsal medulla of rats. *Am J Physiol* 1989; 257(1 Pt2): H324-9.
- Campagnole-Santos MJ, Diz DI, Ferrario CM.** Actions of angiotensin peptides after partial denervation of the solitary tract nucleus. *Hypertension* 1990; 15(2 Suppl): I34-9.

- Campagnole-Santos MJ, Heringer SB, Batista EN, Khosla MC, Santos RA.** Differential baroreceptor reflex modulation by centrally infused angiotensin peptides. *Am J Physiol* 1992; 263(1 Pt2): R89-94.
- Campbell DJ.** Tissue renin-angiotensin system: sites of angiotensin formation. *J Cardiovasc Pharmacol* 1987; 10 Suppl 7: S1-8.
- Canals M, Jenkins L, Kellett E, Milligan G.** 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* 2006; 281(24): 16757-67.
- Carey RM and Siragy HM.** Newly recognized components of the renin-angiotensin system: potential roles in cardiovascular and renal regulation. *Endocr Rev* 2003; 24(3): 261-71.
- Cassoni P, Muccioli G, Marrocco T, et al.** Cortistatin-14 inhibits cell proliferation of human thyroid carcinoma cell lines of both follicular and parafollicular origin. *J Endocrinol Invest* 2002; 25(4): 362-8.
- Castro CH, Santos RA, Ferreira AJ, Bader M, Alenina N, Almeida AP.** Evidence for a functional interaction of the angiotensin-(1-7) receptor Mas with AT1 and AT2 receptors in the mouse heart. *Hypertension* 2005; 46(4): 937-42.
- Cebra-Thomas JA, Tsai JY, Pilder SH, Copleand NG, Jenkins NA, Silver LM.** Localization of the Mas proto-oncogene to a densely marked region of mouse chromosome 17 associated with genomic imprinting. *Genomics* 1992; 13(2): 444-6.
- Chappell MC, Tallant EA, Brosnihan KB, Ferrario CM.** Processing of angiotensin peptides by NG108-15 neuroblastoma x glioma hybrid cell line. *Peptides* 1990; 11(2): 375-80.
- Chappell MC, Pirro NT, Sykes A, Ferrario CM.** Metabolism of angiotensin-(1-7) by angiotensin converting-enzyme. *Hypertension* 1998; 31(1 Pt2): 362-7.
- Chaves GZ, Caligiorne SM, Santos RA, Khosla MC, Campagnole-Santos MJ.** Modulation of the baroreflex control of heart rate by angiotensin-(1-7) at the nucleus tractus solitarii of normotensive and spontaneously hypertensive rats. *J Hypertens* 2000; 18(12): 1841-8.
- Chen H and Ikeda SR.** 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* 2004; 24(21): 5044-53.
- Cheng DY, DeWitt BJ, McMahan TS, Kadowitz PJ.** Comparison of pressor responses to angiotensin I, II and III in pulmonary vascular bed of cats. *Am J Physiol* 1994; 266(6 Pt2): H2247-55.
- Chiu AT, Herblin WF, McCall DE, et al.** Identification of angiotensin II receptor subtypes. *Biochem Biophys Res Commun* 1989; 165(1): 196-203.
- Choi SS and Lahn BT.** Adaptive evolution of MRG, a neuron-specific gene family implicated in nociception. *Genome Res* 2003; 13(10): 2252-9.
- Civelli, O.** GPCR deorphanizations: the novel, the known and the unexpected transmitters. *Trend Pharmacol Sci* 2005; 26(1): 15-9.

- Cogan MG.** Angiotensin II: a powerful controller of sodium transport in the early proximal tubule. *Hypertension* 1990; 5(5): 451-8.
- Collister JP and Hendel MD.** The role of Ang-(1-7) in mediating the chronic hypotensive effects of losartan in normal rats. *J Renin Angiotensin Aldosterone Syst* 2003; 4(3): 176-9.
- Davis TN.** What's new with calcium? *Cell* 1992; 71(4): 557-64.
- de Gasparo M, Catt KJ, Inagami T, Wright JW, Unger T.** International Union of pharmacology XXIII. The angiotensin II receptors. *Pharmacol Rev* 2000; 52(3): 415-72.
- de Lecea L and Sutcliffe JG.** Peptides, sleep and cortistatin. *Mol Psychiatry* 1996; 1(5): 349-51.
- de Souza AM, Lopes AG, Pizzino CP, et al.** Angiotensin II and angiotensin-(1-7) inhibit the inner cortex Na⁺-ATPase activity through AT₂ receptor. *Regul Pept* 2004; 120(1-3): 167-75.
- Devillers JP, Mazarguil H, Allard M, Dickenson AH, Zajac J-M, Simonnet G.** Characterization of a potent agonist for NPFF receptors: binding study on rat spinal cord membranes. *Neuropharmacology* 1994; 33(5): 661-9.
- Diz DI and Pirro NT.** Differential actions of angiotensin II and angiotensin-(1-7) on transmitter release. *Hypertension* 1992; 19(2 Suppl): II41-8.
- Dohlmann HG, Caron MG, Lefkowitz RJ.** Structure and function of the beta 2-adrenergic receptor -- homology with rhodopsin. *Kidney Int Suppl* 1987; 23: S2-13.
- Dong X, Han S, Zylka MJ, Simon MI, Anderson DJ.** A diverse family of GPCRs expressed in specific subsets of nociceptive sensory neurons. *Cell* 2001; 106(5): 619-32.
- Donoghue M, Hsieh F, Baronas E, et al.** A novel angiotensin-converting enzyme-related carboxypeptidase (ACE2) converts angiotensin I to angiotensin 1-9. *Circ Res* 2000; 87(5): E1-9.
- Dostal DE, Rothblum KN, Conrad KM, Cooper GR, Baker KM.** Detection of angiotensin I and II in cultured rat cardiac myocytes and fibroblasts. *Am J Physiol* 1992; 263(4 Pt 1): C851-63.
- Dougherty PM and Willis WD.** Enhancement of spinothalamic neuron responses to chemical and mechanical stimuli following combined micro-iontophoretic application of N-methyl-D-aspartic acid and substance P. *Pain* 1991; 47(1): 85-93.
- Dubey RK, Jackson EK, Lüscher TF.** Nitric oxide inhibits angiotensin II-induced migration of rat aortic smooth muscle cells: Role of cyclic nucleotides and angiotensin-1 receptors. *J Clin Invest* 1995; 96(1): 141-9.
- Elshourbagy NA, Ames RS, Fitzgerald LR, et al.** Receptor for the pain modulatory neuropeptides FF and AF is an orphan G protein-coupled receptor. *J Biol Chem* 2000; 275(34): 25965-71.
- Elton TS, Stephan CC, Taylor GR, et al.** Isolation of two distinct type I angiotensin II receptor genes. *Biochem Biophys Res Commun* 1992; 184(2): 1067-73.

- Erdös EG and Skidgel RA.** Metabolism of bradykinin by peptidases in health and disease. In Farmer; S.G., ed. The kinin system: handbook of immunopharmacology. *Academic Press* 1997: 112-41.
- Ernsberger P, Zhou J, Damon TH, Douglas JG.** Angiotensin II receptor subtypes in cultured rat renal mesangial cells. *Am J Physiol* 1992; 263(3 Pt2): F411-6.
- Farber L, Haus U, Späth M, Drechsler S.** Physiology and pathophysiology of the 5-HT₃ receptor: *Scand J Rheumatol Suppl* 2004; 119: 2-8.
- Fargin A, Raymond JR, Lohse MJ, Kobilka BK, Caron MG, Lefkowitz RJ.** The genomic clone G-21 which resembles a beta-adrenergic receptor sequence encodes the 5-HT_{1A} receptor. *Nature* 1988; 335(6188): 358-60.
- Faria-Silva R, Duarte FV, Santos RA.** Short-term angiotensin-(1-7) receptor MAS stimulation improves endothelial function in normotensive rats. *Hypertension* 2005; 46(4): 948-52.
- Felix D, Khosla MC, Barnes KL, Imboden H, Montani B, Ferrario CM.** Neurophysiological responses to angiotensin-(1-7). *Hypertension* 1991; 17(6 Pt2): 1111-4.
- Ferreira AJ, Santos RA, Almeida AP.** Angiotensin-(1-7): cardioprotective effect in myocardial ischemia/reperfusion. *Hypertension* 2001; 38(3 Pt2): 665-8.
- Ferreira AJ, Jacoby BA, Araújo CA, et al.** The nonpeptide angiotensin-(1-7) receptor Mas agonist AVE-0991 attenuates heart failure induced by myocardial infarction. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2007; 292(2): H1113-9.
- Ferrario CM, Chappel MC, Tallant EA, Brosnihan KB, Diz DI.** Counterregulatory actions of angiotensin-(1-7). *Hypertension* 1997; 30(3 Pt2): 535-41.
- Ferrario CM.** Angiotensin I, angiotensin II and their biologically active peptides: *J Hypertens* 2002; 20(5): 969-75.
- Fontes MA, Silva LC, Campagnole-Santos MJ, Khosla M, Guertzenstein PG, Santos RA.** Evidence that angiotensin-(1-7) plays a role in the central control of blood pressure at the ventro-lateral medulla acting through specific receptors. *Brain Res* 1994; 665(1): 175-80.
- Fraga-Silva RA, Pinheiro SV, Gonçalves AC, Alenina N, Bader M, Santos RA.** The antithrombotic effect of angiotensin-(1-7) involves mas-mediated NO release from platelets. *Mol Med* 2008; 14(1-2): 28-35.
- Fredriksson R, Lagerstrom MC, Lundin LG, et al.** The G-protein-coupled receptors in the human genome form five main families. Phylogenetic analysis, paralogon groups, and fingerprints. *Mol Pharmacol* 2003; 63(6): 1256-72.
- Gallagher PE and Tallant EA.** Inhibition of human lung cancer cell growth by angiotensin-(1-7). *Carcinogenesis* 2004; 25(11): 2045-52.
- Gembardt F, Wieland T, Zhang J, et al.** The G protein-coupled receptor Mas encoded by the *Mas* proto-oncogene shows mitogenetic properties through a constitutive activation of Rho. *Archives of Pharmacol* 2005; 371(79): R19.
- Gembardt F, Grajewski S, Vahl M, Schultheiss HP, Walther T.** Angiotensin metabolites can stimulate receptors of the Mas-related genes family. *Mol Cell Biochem* 2008; 319(1-2): 115-23.

- Giquel S, Fioramonti J, Bueno L, Zajac JM.** Effects of F8amide analogs on intestinal transit in mice. *Peptides* 1993; 14(4): 749-53.
- Gironacci MM, Yujnovsky I, Gorzalczany S, Taira C, Peña C.** Angiotensin-(1-7) inhibits the angiotensin II-enhanced norepinephrin release in coarcted hypertensive rats. *Regul Pept* 2004; 118(1-2): 45-9.
- Greene LJ, Spadaro AC, Martins AR, Perussi De Jesus WD, Camargo AC.** Brain endo-oligopeptidase B: a post-proline cleaving enzyme that inactivates angiotensin I and II. *Hypertension* 1982; 4(2): 178-84.
- Griendling KK, Minieri CA, Ollerenshaw JD, Alexander RW.** Angiotensin II stimulates NADH and NADPH oxidase activity in cultured vascular smooth muscle cells. *Circ Res* 1994; 74(6): 1141-8.
- Goetzl EJ; Chernov T, Renold F, Payan DG.** Neuropeptide regulation of the expression of immediate hypersensitivity. *J Immunol* 1985; 135(2 Suppl): 802s-805s.
- Gouardères C, Sutak M, Zajac JM, Jhamandas K.** Antinociceptive effects of intrathecally administered F8Famide and FMRFamide in the rat. *Eur J Pharmacol* 1993; 237(1): 73-81.
- Guzman A, Legendre P, Allard M, Geoffre S, Vincent JD, Simonnet G.** Electrophysiological effects of FLFQPQRFamide, an endogenous brain morphine modulating peptide, on cultured mouse spinal-cord neurons. *Neuropeptides* 1989; 14(4): 253-61.
- Han SK, Dong X, Hwang JI, Zylka MJ, Anderson DJ, Simon MI.** 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 USA* 2002; 99(23): 14740-5.
- Hall KL, Venkateswaran S, Hanesworth JM, Schelling ME, Harding JW.** Characterization of a functional angiotensin IV receptor on coronary microvascular endothelial cells. *Regul Pept* 1995; 58(3): 107-15.
- Hamm HE.** The many faces of G protein signaling. *J Biol Chem* 1998; 273(2): 669-72.
- Handa RK.** Angiotensin-(1-7) can interact with the rat proximal tubule AT(4) receptor system. *Am J Physiol* 1999; 277(1 Pt2): F75-83.
- Hanley MR, Cheung WT, Hawkins P, et al.** The mas oncogene as a neural peptide receptor: expression, regulation and mechanism of action. *Ciba Found Symp* 1990; 150: 23-38; discussion 38-46.
- Harding JW, Imboden H, Felix D.** Is angiotensin III the centrally active form of angiotensin? *Experientia* 1986; 42: 706.
- Harding JW, Wright JW, Swanson GN, Hanesworth JM, Krebs LT.** AT4 receptors: specificity and distribution. *Kidney Int* 1994; 46(6): 1510-2.
- Hayashida H, Kuma K, Miyata T.** Similarity of mas and rhodopsin gene products. *Nature* 1986; 323(6084): 116.
- Heitsch H, Brovkovich S, Malinski T, Wiemer G.** Angiotensin-(1-7)-Stimulated Nitric Oxide and Superoxide Release From Endothelial Cells. *Hypertension* 2001; 37(1): 72-6.

- Hellner K, Walther T, Schubert M, Albrecht D.** Angiotensin-(1-7) enhances LTP in the hippocampus through the G-protein-coupled receptor Mas. *Mol Cell Neurosci* 2005; 29(3): 427-35.
- Henderson G and McKnight AT.** The orphan opioid receptor and its endogenous ligand--nociceptin/orphanin FQ. *Trends Pharmacol Sci.* 1997; 18(8): 293-300.
- Hershey AD and Krause JE.** Molecular characterization of a functional cDNA encoding the rat substance P receptor. *Science* 1990; 247(4945): 958-62.
- Hilchey SD and Bell-Quilley CP.** Association between the natriuretic action of angiotensin-(1-7) and selective stimulation of renal prostaglandin I₂ release. *Hypertension* 1995; 25(6): 1238-44.
- Holzer P.** Local effector functions of capsaicin-sensitive sensory nerve endings: involvement of tachykinins, calcitonin gene-related peptide and other neuropeptides. *Neuroscience* 1988; 24(3): 739-68.
- Horiouchi M, Hayashida W, Akishita M, et al.** Stimulation of different subtypes of angiotensin II receptors, AT₁ and AT₂ receptors, regulates STAT activation by negative crosstalk. *Circ Res* 1998; 84(8): 876-82.
- Horiouchi M, Akishita M, Dzau VJ.** Recent progress in angiotensin II type 2 receptor research in the cardiovascular system. *Hypertension* 1999; 33: 613-21.
- Ichiki T, Labosky PA, Shiota C, et al.** Effects on blood pressure and exploratory behaviour of mice lacking angiotensin II type-2 receptor. *Nature* 1995; 377(6551): 748-50.
- Ishimitsu T, Kojima M, Kangawa K, et al.** Genomic structure of human adrenomedullin gene. *Biochem Biophys Res Commun* 1994; 203(1): 631-9.
- Iwai N and Inagami T.** Identification of two subtypes in the rat type I angiotensin II receptor. *FEBS Lett* 1992; 298(2): 257-60.
- Iyer SN, Chappell MC, Averill DB, Diz DI, Ferrario CM.** Vasodepressor actions of angiotensin-(1-7) unmasked during combined treatment with lisinopril and losartan. *Hypertension* 1998; 31(2): 699-705.
- Jackson TR, Blair LA, Marshall J, Goedert M, Hanley MR.** The mas oncogene encodes an angiotensin receptor. *Nature* 1988; 335(6189): 437-40.
- Jackson TR and Hanley MR.** 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* 1989; 251(1-2): 27-30.
- Jaiswal N, Diz DI, Chappell MC, Khosla MC, Ferrario CM.** Stimulation of endothelial cell prostaglandin production by angiotensin peptides. Characterization of receptors. *Hypertension* 1992; 19(2 Suppl): II49-55.
- Jaiswal N, Tallant EA, Jaiswal RK, Diz DI, Ferrario CM.** Differential regulation of prostaglandin synthesis by angiotensin peptides in porcine aortic smooth muscle cells: subtypes of angiotensin receptors involved. *J Pharmacol Exp Ther* 1993; 265(2): 664-73.

- Janssen JW, Steenvoorden AC, Schmidtberger M, Bartram CR.** Activation of the mas oncogene during transfection of monoblastic cell line DNA. *Leukemia* 1988; 2(5): 318-20.
- Ji TH, Grossmann M, Ji I.** G protein-coupled receptors. I. Diversity of receptor-ligand interactions. *J Biol Chem* 1998; 273(28): 17299-302.
- Jücker M, Schaadt M, Diehl V, Poppema S, Jones D, Tesch H.** Heterogenous expression of proto-oncogenes in Hodgkin's disease derived cell lines. *Hematol Oncol* 1990; 8(4): 191-204.
- Julius D, MacDermott AB, Axel R, Jessel TM.** Molecular characterization of a functional cDNA encoding the serotonin 1c receptor. *Science* 1988; 241(4865): 558-64.
- Kakar SS, Sellers JC, Devor DC, Musgrove LC, Neill JD.** Angiotensin II type-1 receptor subtype cDNAs: differential tissue expression and hormonal regulation. *Biochem Biophys Res Commun* 1992; 188(3): 1090-6.
- Kamohara M, Matsuo A, Takasaki J, et al.** Identification of MrgX2 as a human G-protein-coupled receptor for proadrenomedullin N-terminal peptides. *Biochem Biophys Res Commun* 2005; 330(4): 1146-52.
- Kato H, Suzuki H, Tajima S, et al.** Angiotensin II stimulates collagen synthesis in cultured vascular smooth muscle cells. *J Hypertens* 1991; 9(1): 17-22.
- Kavaliers M.** Inhibitory influences of mammalian FMRFamide (Phe-Met-Arg-Phe-amide)-related peptides on nociception and morphine- and stress-induced analgesia in mice. *Neurosci Lett* 1990; 115(2): 307-12.
- van Kesteren CA, van Heugten HA, Lamers JM, Saxena PR, Schalekamp MA, Danser AH.** Angiotensin II-mediated growth and antigrowth effects in cultured neonatal rat cardiac myocytes and fibroblasts. *J Mol Cell Cardiol* 1997; 29(8): 2147-57.
- Kingston RE, Chen CA, Okayama H.** Calcium phosphate transfection. *Curr Protoc Immunol* 2001; Chapter 10: Unit 10.13.
- Kitamura K, Sakata J, Kangawa K, Kojima M, Matsuo H, Eto T.** Cloning and characterization of cDNA encoding a precursor for human adrenomedullin. *Biochem Biophys Res Commun* 1993; 194(2): 720-5.
- Kitamura K, Kangawa K, Ishiyama Y, et al.** Identification and hypotensive activity of proadrenomedullin N-terminal 20 peptide (PAMP). *FEBS Lett* 1994; 351(1): 35-7.
- Kitaoka T, Sharif M, Hanley MR, Hjelmeland LM.** Expression of the MAS proto-oncogene in the retinal pigment epithelium of the rhesus macaque. *Curr Eye Res* 1994; 13(5): 345-51.
- Kivipelto L, Aarnisalo A, Panula P.** Neuropeptide FF is colocalized with catecholamine-synthesizing enzymes in neurons of the nucleus of the solitary tract. *Neurosci Lett* 1992; 143(1-2): 190-4.
- Klenchin VA, Sukharev SI, Serov SM, Chernomordik LV, Chizmadzhev YuA.** Electrically induced DNA uptake by cells is a fast process involving DNA electrophoresis. *Biophys J* 1991; 60(4): 804-11.

- Kohara K, Brosnihan KB, Chappell MC, Khosla MC, Ferrario CM.** Angiotensin-(1-7): A member of circulating angiotensin peptides. *Hypertension* 1991; 17(2): 131-8.
- Kohara K, Brosnihan KB, Ferrario CM.** Angiotensin(1-7) in the spontaneously hypertensive rat. *Peptides* 1993; 14(5): 883-91.
- Kostenis E, Milligan G, Christopoulos A, et al.** G-protein-coupled receptor Mas is a physiological antagonist of the angiotensin II type 1 receptor. *Circulation* 2005; 111(14): 1806-13.
- Kotani M, Mollereau C, Detheux M, et al.** Functional characterization of a human receptor for neuropeptide FF and related peptides. *Br J Pharmacol* 2001; 133(1): 138-44.
- Kramár EA, Harding JW, Wright JW.** Angiotensin II- and IV-induced changes in cerebral blood flow. Roles of AT1, AT2, and AT4 receptor subtypes. *Regul Pept* 1997; 68(2): 131-8.
- Kubo T, Fukuda K, Mikami A, et al.** Cloning, sequencing and expression of complementary DNA encoding the muscarinic acetylcholine receptor. *Nature* 1986; 323(6087): 411-6.
- Lawrence AC, Evin G, Kladis A, Campbell DJ.** An alternative strategy for the radio-immunoassay of angiotensin peptides using amino-terminal-directed antisera: measurement of eight angiotensin peptides in human plasma. *J Hypertens* 1990; 8(8): 715-24.
- Lembo PM, Grazzini E, Groblewski T, et al.** Proenkephalin A gene products activate a new family of sensory neuron-specific GPCRs. *Nat Neurosci* 2002; 5(3): 201-9.
- Lemos VS, Silva DM, Walther T, Alenina N, Bader M, Santos RA.** 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* 2005; 46(3): 274-9.
- Libert F, Parmentier M, Lefort A, et al.** Selective amplification and cloning of four new members of the G-protein coupled receptor family. *Science* 1989; 244(4904): 569-72.
- Lima CV, Paula RD, Resende FL, Khosla MC, Santos RA.** Potentiation of the hypotensive effect of bradykinin by short-term infusion of angiotensin-(1-7) in normotensive and hypertensive rats. *Hypertension* 1997; 30(3 Pt 2): 542-8.
- Lin K, Chan SH, Chan JY.** Tonic suppression of spontaneous baroreceptor reflex by endogenous angiotensins via AT(2) subtype receptors at nucleus reticularis ventrolateralis in the rat. *Synapse* 2001; 40(1): 85-94.
- Lindpaintner K and Ganten D.** Tissue renin-angiotensin systems and their modulation: the heart as a paradigm for new aspects of converting enzyme inhibition. *Cardiology* 1991a; 79 Suppl 1: 32-44.
- Lindpaintner K and Ganten D.** The cardiac renin-angiotensin system: a synopsis of current experimental and clinical data. *Acta Cardiol* 1991b; 46(3): 385-97.
- Lipman DJ and Pearson WR.** Rapid and sensitive protein similarity searches. *Science* 1985; 277(4693): 1435-41.

- Luque M, Martin P, Martell N, Fernandez C, Brosnihan KB, Ferrario CM.** Effects of captopril related to increased levels of prostacyclin and angiotensin-(1-7) in essential hypertension. *J Hypertens* 1996; 14(6): 799-805.
- Majane EA, Zhu J, Aarnisalo AA, Panula P, Yang HY.** Origin of neurohypophyseal neuropeptide-FF (FLFQPQRF-NH₂). *Endocrinology* 1993; 133(4): 1578-84.
- Mansour A, Hoversten MT, Taylor LP, Watson SJ, Akil H.** The cloned mu, delta and kappa receptors and their endogenous ligands: evidence for two opioid peptide recognition cores. *Brain Res* 1995; 700(1-2): 89-98.
- Martin KA, Grant SG, Hockfield S.** The mas proto-oncogene is developmentally regulated in the rat central nervous system. *Brain Res Dev Brain Res* 1992; 68(1): 75-82.
- Martin KA and Hockfield S.** Expression of the mas proto-oncogene in the rat hippocampal formation is regulated by neuronal activity. *Brain Res Mol Brain Res* 1993; 19(4): 303-9.
- Masu Y, Nakayama K, Tamaki H, Harada Y, Kuno M, Nakanishi S.** cDNA cloning of bovine substance-K receptor through oocyte expression system. *Nature* 1987; 329(6142): 836-8.
- Matsukaka T and Ichikawa I.** Biological functions of angiotensin and its receptors. *Annu Rev Physiol* 1997; 59: 395-412.
- McGillis JP, Sudduth-Klinger J, Harrowe G, Mitsuhashi M, Payan DG.** 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* 1989; 165(3): 935-41.
- Metzger R, Bader M, Ludwig T, Berberich C, Bunnemann B, Ganten D.** Expression of the mouse and rat mas proto-oncogene in the brain and peripheral tissues. *FEBS Lett* 1995; 357(1): 27-32.
- Millatt LJ, Abdel-Rahman EM, Siragy HM.** Angiotensin II and nitric oxide: a question of balance. *Regul Pept* 1999; 81(1-3): 1-10.
- Million M, Fioramonti J, Gicquel S, Zajac JM, Bueno L.** Comparative action of Phe-Leu-Phe-Gln-Pro-Gln-Arg-Phe-NH₂ analogs on intestinal motility and nociception in rats. *J Pharmacol Exp Ther* 1993; 265(1): 96-102.
- Miller-Wing AV, Hanesworth JM, Sardinia MF, et al.** Central angiotensin IV binding sites: distribution and specificity in guinea pig brain. *J Pharmacol Exp Ther* 1993; 266(3): 1718-26.
- Monnot C, Weber V, Stinnakre J, et al.** Cloning and functional characterization of a novel mas-related gene, modulating intracellular angiotensin II actions. *Mol Endocrinol* 1991; 5(10): 1477-87.
- Mukoyama M, Nakajima M, Horiuchi M, Sasamura H, Pratt RE, Dzau VJ.** Expression cloning of type 2 angiotensin II receptor reveals a unique class of seven-transmembrane receptors. *J Biol Chem* 1993; 268(33): 24539-42.
- Mullis KB and Faloona FA.** Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerase-catalyzed chain reaction. *Methods Enzymol* 1987; 155: 335-50.

- Murphy TJ, Alexander RW, Griendling KK, Runge MS, Bernstein KE.** Isolation of a cDNA encoding the vascular type-1 angiotensin II receptor. *Nature* 1991; 351(6323): 233-6.
- Muthalif MM, Benter IF, Uddin MR, Harper JL, Malik KU.** Signal transduction mechanisms involved in angiotensin-(1-7)-stimulated arachidonic acid release and prostanoid synthesis in rabbit aortic smooth muscle cells. *J Pharmacol and Exp Ther.* 1998; 284(1): 388-98.
- Nawa H, Hirose T, Takashima H, Inayama S, Nakanishi S.** Nucleotide sequences of cloned cDNAs for two types of bovine brain substance P precursor. *Nature* 1983; 306(5938): 32-6.
- Natarajan R, Gonzales N, Lanting L, Nadler J.** Role of the lipoxygenase pathway in angiotensin II-induced vascular smooth muscle cell hypertrophy. *Hypertension* 1994; 23 (1 Suppl): I142-7.
- Nemecek GM, Coughlin SR, Handley DA, Moskowitz MA.** Stimulation of aortic smooth muscle cell mitogenesis by serotonin. *Proc Natl Acad Sci USA* 1986; 83(3): 674-8.
- Nilsson J, von Euler AM, Dalsgaard CJ.** Stimulation of connective tissue cell growth by substance P and substance K. *Nature* 1985; 315(6014): 61-3.
- Nossaman BD, Feng CJ, Kaye AD, Kadowitz PJ.** Analysis of responses to ANG IV: effects of PD-123319 and DuP-753 in the pulmonary circulation of the rat. *Am J Physiol* 1995; 268(2 Pt 1): L302-8.
- Nussberger J, Brunner DB, Nyfeler JA, Linder L, Brunner HR.** Measurement of immunoreactive angiotensin-(1-7) heptapeptide in human blood. *Clin Chem* 2001; 47(4): 726-9.
- Oberling P, Stinus L, Le Moal M, Simonnet G.** Biphasic effect on nociception and antinociceptive activity of the neuropeptide FF (FLFQPQRamide) in the rat. *Peptides* 1993; 14(5): 919-24.
- Osei SY, Ahima RS, Minkes RK, Weaver JP, Khosla MC, Kadowitz PJ.** Differential responses to angiotensin-(1-7) in the feline mesenteric and hindquarters vascular beds. *Eur J Pharmacol* 1993; 234(1): 35-42.
- Panula P, Aarnisalo AA, Wasowicz K.** Neuropeptide FF, a mammalian neuropeptide with multiple functions. *Progr Neurobiol* 1996; 48(4-5): 461-87.
- Payza K and Yang HY.** Modulation of neuropeptide FF receptors by guanine nucleotides and cations in membranes of rat brain and spinal cord. *J Neurochem* 1993; 60(5): 1894-9.
- Peiró C, Vallejo S, Gembardt F, et al.** Endothelial dysfunction through genetic deletion or inhibition of the G protein-coupled receptor Mas: a new target to improve endothelial function. *J Hypertens* 2007; 25(12): 2421-5.
- Pena AN and Pereira-Smith OM.** The role of the MORF/MRG family of genes in cell growth, differentiation, DNA repair, and thereby aging. *Ann N Y Acad Sci* 2007; 1100: 299-305.
- Peralta EG, Winslow JW, Peterson GL, et al.** Primary structure and biochemical properties of an M₂ muscarinic receptor. *Science* 1987; 236(4801): 600-5.
- Perry SJ, Yi-Kung Huang E, Cronk D, et al.** A human gene encoding morphine modulating peptides related to NPF and FMRFamide. *FEBS Lett* 1997; 409(3): 426-30.

- Pinheiro SV, Simões e Silva AC, Sampaio WO, et al.** Nonpeptide AVE 0991 is an angiotensin-(1-7) receptor Mas agonist in the mouse kidney. *Hypertension* 2004; 44(4): 490-6.
- Pobiner BF, Hewlett EL, Garrison JC.** Role of Ni in coupling angiotensin receptors to inhibition of adenylate cyclase in hepatocytes. *J Biol Chem* 1985; 260(30): 16200-9.
- Poyner DR, Hawkins PT, Benton HP, Hanley MR.** 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* 1990; 271(3): 605-11.
- Pritchett DB, Bach AW, Wozny M, et al.** Structure and functional expression of cloned rat serotonin 5HT-2 receptor. *EMBO J* 1988; 7(13): 4135-40.
- Rabin M, Birnbaum D, Young D, Birchmeier C, Wigler M, Ruddle FH.** Human *ros1* and *mas1* oncogenes located in regions of chromosome 6 associated with tumorspecific rearrangements. *Oncogene Res* 1987; 1(2): 169-78.
- Raffa RB and Jacoby HI.** Effect of Phe-D-Met-Arg-Phe-NH₂ and other Phe-Met-Arg-Phe-NH₂-related peptides on mouse colonic propulsive motility: a structure-activity relationship study. *J Pharmacol Exp Ther* 1990; 254(3): 809-14.
- Raffa RB.** The actions of FMRF-NH₂ and FMRF-NH₂ related peptides on mammals. *NIDA Res Monogr* 1990; 105: 243-9.
- Rajagopalan S, Kurz S, Münzel T, et al.** Angiotensin II-mediated hypertension in the rat increases vascular superoxide production via membrane NADH/NADPH oxidase activation. Contribution to alterations of vasomotor tone. *J Clin Invest* 1996; 97(8): 1916-23.
- Rao GN, Lassègue B, Alexander RW, Griendling KK.** Angiotensin II stimulates phosphorylation of high-molecular-mass cytosolic phospholipase A₂ in vascular smooth-muscle cells. *Biochem J* 1994; 299(Pt1): 197-201.
- Robas N, Mead E, Fidock M.** MrgX2 is a high potency cortistan receptor expressed in dorsal root ganglion. *J Biol Chem* 2003; 278(45): 44400-4.
- Roberts KA, Krebs LT, Kramár EA, Shaffer MJ, Harding JW, Wright JW.** Autoradiographic identification of brain angiotensin IV binding sites and differential c-Fos expression following intracerebroventricular injection of angiotensin II and IV in rats. *Brain Research* 1995; 682(1-2): 13-21.
- Robinson MJ and Cobb MH.** Mitogen-activated protein kinase pathways. *Curr Opin Cell Biol* 1997; 9(2): 180-6.
- Rodriguez-Campos M, Kadarian C, Rodano V, Bianciotti L, Fernandez B, Vatta M.** AT-1 receptor and phospholipase C are involved in angiotensin III modulation of hypothalamic noradrenergic transmission. *Cell Mol Neurobiol* 2000; 20(6): 747-62.
- Ross PC, Figler RA, Corjay MH, et al.** RTA, a candidate G protein-coupled receptor: cloning, sequencing, and tissue distribution. *Proc Natl Acad Sci USA* 1990; 87(8): 3052-6.
- Roth BL, Disimone J, Majane EA, Yang HY.** Elevation of arterial pressure in rats by two new vertebrate peptides FLFQPQRF-NH₂ and AGEGLSSPFWSLAAPQRF-NH₂ which are immunoreactive to FMRF-NH₂ antiserum. *Neuropeptides* 1987; 10(1): 37-42.

- Roumy M and Zajac JM.** Effects of neuropeptide FF on intracellular Ca²⁺ in mouse spinal ganglion neurons. *Eur J Pharmacol* 1996; 306(1-3): 291-5.
- Roumy M and Zajac JM.** Neuropeptide FF, pain and analgesia: *Eur J Pharmacol* 1998; 345: 1-11.
- Rusin KI, Bleakman D, Chard PS, Randic M, Miller RJ.** Tachikinin potentiate N-methyl-D-aspartate responses in acutely isolated neurons from the dorsal horn. *J Neurochem* 1993; 60(3): 952-60.
- Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T.** Molecular cloning. A Laboratory Manual. 1989.
- Sampaio WO, Souza dos Santos RA, Faria-Silva R, da Mata Machado LT, Schiffrin EL, Touyz RM.** Angiotensin-(1-7) through receptor Mas mediates endothelial nitric oxide synthase activation via Akt-dependent pathways. *Hypertension* 2007; 49(1):185-92.
- Santos RA, Brum JM, Bronsnihan KB, Ferrario CM.** The renin-angiotensin system during acute myocardial ischemia in dogs. *Hypertension* 1990; 15(2 Suppl): I121-7.
- Santos RA and Baracho NC.** Angiotensin-(1-7) is a potent antidiuretic peptide in rats. *Braz J Med Biol Res* 1992; 25(6): 651-4.
- Santos RA, Campagnole-Santos MJ, Baracho NC, et al.** Characterization of a new angiotensin antagonist selective for angiotensin-(1-7): evidence that the actions of angiotensin-(1-7) are mediated by specific angiotensin receptors. *Brain Res Bull* 1994; 35(4): 293-8.
- Santos RA and Campagnole-Santos MJ.** Central and peripheral actions of angiotensin-(1-7). *Braz J Med Biol Res* 1994; 27(4): 1033-47.
- Santos RA, Campagnole-Santos MJ, Andrade SP.** Angiotensin-(1-7): an update. *Regul Pept* 2000; 91(1-3): 45-62.
- Santos RA, Simoes e Silva AC, Maric C, et al.** Angiotensin-(1-7) is an endogenous ligand for the G protein-coupled receptor Mas. *Proc Natl Acad Sci USA* 2003; 100(14): 8258-63.
- Santos RA, Frézard F, Ferreira AJ.** Angiotensin-(1-7): blood, heart, and blood vessels. *Curr Med Chem Cardiovasc Hematol Agents* 2005; 3(4): 383-91.
- Santos RA, Castro CH, Gava E, et al.** Impairment of in vitro and in vivo heart function in angiotensin-(1-7) receptor MAS knockout mice. *Hypertension* 2006; 47(5): 996-1002.
- Santos RA and Ferreira AJ.** Angiotensin-(1-7) and the renin-angiotensin system. *Curr Opin Nephrol Hypertens* 2007; 16(2): 122-8.
- Sasaki K, Yamano Y, Bardhan S, et al.** Cloning and expression of a complementary DNA encoding a bovine adrenal angiotensin II type-1 receptor. *Nature* 1991; 351(6323): 230-3.
- Selbie LA and Hill SJ.** G protein-coupled-receptor cross-talk: the fine-tuning of multiple receptor-signalling pathways. *Trends Pharmacol Sci* 1998; 19(3): 87-93.
- Shinohara T, Harada M, Ogi K, et al.** Identification of a G protein-coupled receptor specifically responsive to beta-alanine. *J Biol Chem* 2004; 279(22): 23559-64.

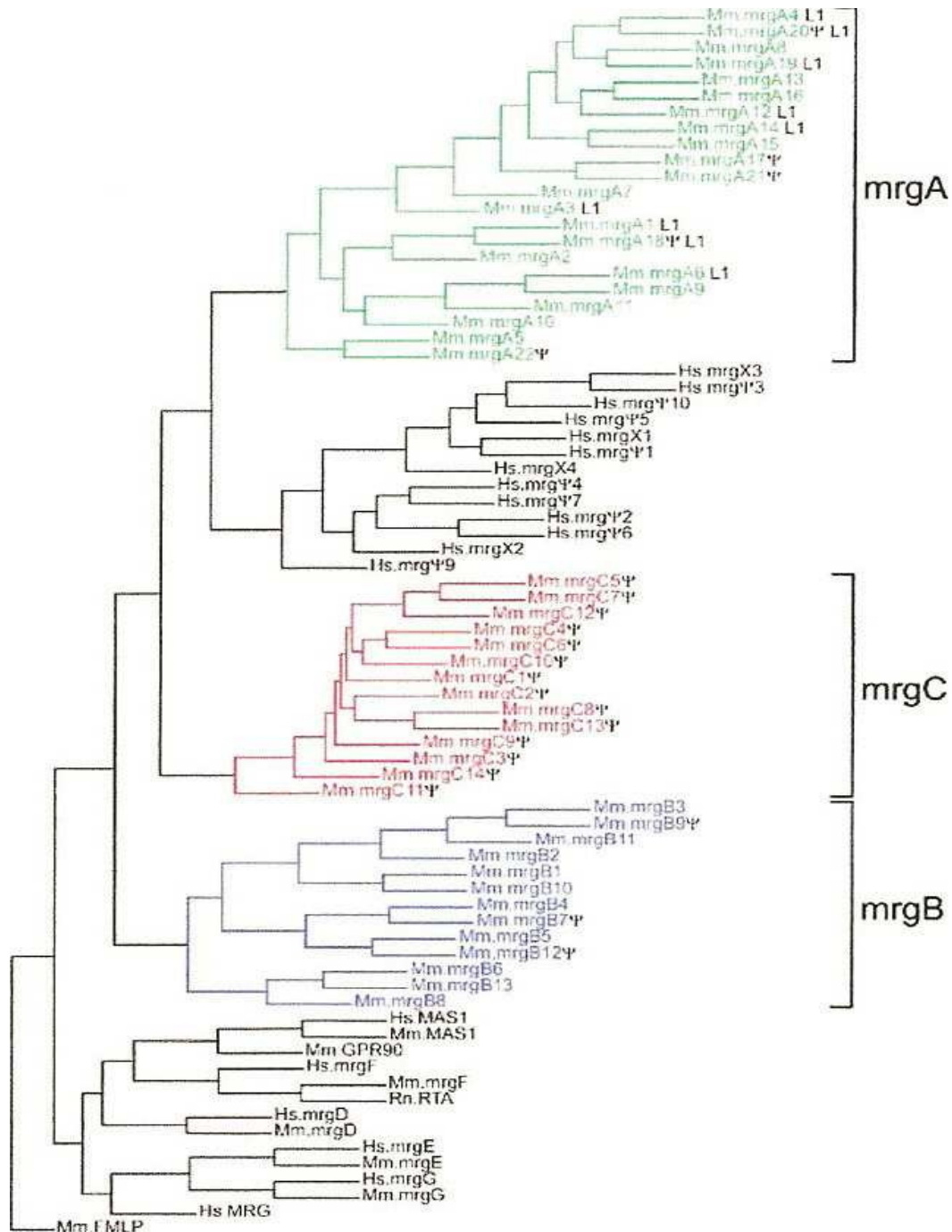
- Smith RD, Chiu AT, Wong PC, Herblin WF, Timmermans PB.** Pharmacology of nonpeptide angiotensin II receptor antagonists. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 1992; 32: 135-65.
- Stoll M, Steckelings UM, Paul M, Bottari SP, Metzger R, Unger T.** The angiotensin AT₂-receptor mediates inhibition of cell proliferation in coronary endothelial cells. *J Clin Invest* 1995; 95(2): 651-7.
- Sukharev SI, Klenchin VA, Serov SM, Chernomordik LV, Chizmadzhev YuA.** Electroporation and electrophoretic DNA transfer into cells. The effect of DNA interaction with electropores. *Biophys J* 1992; 63(5): 1320-7.
- Sullivan AF, Kalso EA, McQuay HJ, Dickenson AH.** FLFQPQRF-amide modulates alpha 2-adrenergic antinociception in the rat dorsal horn in vivo. *Brain Res* 1991; 562(2): 327-8.
- Swanson GN, Hanesworth JM, Sardinia MF, et al.** Discovery of a distinct binding site for angiotensin II (3-8), a putative angiotensin IV receptor. *Regul Pept* 1992; 40(3): 409-19.
- Takai Y, Sasaki T, Matozaki T.** Small GTP-binding proteins. *Physiol Rev* 2001; 81(1): 153-208.
- Tallant EA, Ferrario CM, Gallagher PE.** Angiotensin-(1-7) inhibits growth of cardiac myocytes through activation of the mas receptor. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2005; 289(4): H1560-6.
- Tipnis SR, Hooper NM, Hyde R, Karran E, Christie G, Turner AJ.** A human homolog of angiotensin-converting enzyme. Cloning and functional expression as a captopril-insensitive carboxypeptidase. *J Biol Chem* 2000; 275(43): 33238-43.
- Touyz RM and Berry C.** Recent advances in angiotensin II signaling. *Braz J of Med Biol Res* 2002; 35(9): 1001-15.
- Tsutsumi K and Saavedra JM.** Differential development of angiotensin II receptor subtypes in the rat brain. *Endocrinology* 1991; 128(1): 630-2.
- Tsutsumi K and Saavedra JM.** Characterization and development of angiotensin II receptor subtypes (AT₁ and AT₂) in rat brain. *Am J Physiol* 1991; 261(1 Pt2): 209-16.
- Unger T.** The angiotensin type 2 receptor: variations on an enigmatic theme. *J Hypertens* 1999; 17(12 Pt2): 1775-86.
- Ushio-Fukai M, Zafari AM, Fukui T, Ishizaka N, Griendling KK.** p22phox is a critical component of the superoxide-generating NADH/NADPH oxidase system and regulates angiotensin II-induced hypertrophy in vascular smooth muscle cells. *J Biol Chem* 1996; 271(38): 23317-21.
- Ushio-Fukai M, Griendling KK, Akers M, Lyons PR, Alexander RW.** Temporal dispersion of activation of phospholipase C-beta 1 and -gamma isoforms by angiotensin II in vascular smooth muscle cells. Role of alpha_q/11, alpha₁₂, and beta gamma G protein subunits. *J Biol Chem* 1998; 273(31): 19772-7.
- van 't Veer LJ, van der Feltz MJ, van den Berg-Bakker CA, et al.** Activation of the mas oncogene involves coupling to human aliphoid sequences. *Oncogene* 1993; 8(10): 2673-81.

- Von Bohlen und Halbach O, Walther T, Bader M, Albrecht D.** Interaction between Mas and the angiotensin AT1 receptor in the amygdala. *J Neurophys* 2000; 83(4): 2012-21.
- Walther T.** Charakterisierung des Mas-Protoonkogens. Dissertationsschrift 1997.
- Walther T, Balschun D, Voigt JP, et al.** Sustained long term potentiation and anxiety in mice lacking the Mas protooncogene. *J Biol Chem* 1998; 273(19): 11867-73.
- Walther T, Voigt JP, Fink H, Bader M.** Sex specific behavioural alterations in Mas-deficient mice. *Behav Brain Res* 2000a; 107(1-2): 105-9.
- Walther T, Wessel N, Kang N, et al.** Altered heart rate and blood pressure variability in mice lacking the Mas protooncogene. *Braz J Med Biol Res* 2000b; 33(1): 1-9.
- Walther T.** Der G-Protein gekoppelte Rezeptor Mas ist Teil des Renin-Angiotensin-Systems. Habilitationsschrift 2003.
- Wayner MJ, Armstrong DL, Phelix CF, Wright JW, Harding JW.** Angiotensin IV enhances LTP in rat dentate gyrus in vivo. *Peptides* 2001; 22(9): 1403-14.
- Welches WR, Santos RA, Chappell MC, Brosnihan KB, Greene LJ, Ferrario CM.** Evidence that prolyl endopeptidase participates in the processing of brain angiotensin. *J Hypertens* 1991; 9(7): 631-8.
- Wiemer G, Dobrucki LW, Louka FR, Malinski T, Heitsch H.** AVE 0991, a nonpeptide mimic of the effects of angiotensin-(1-7) on the endothelium. *Hypertension* 2002; 40(6): 847-52.
- Wittenberger T, Schaller HC, Hellebrand S.** An expressed sequence tag (EST) data mining strategy succeeding in the discovery of new G-protein coupled receptors. *J Mol Biol* 2001; 307(3): 799-813.
- Wong PC, Hart SD, Zaspel AM, et al.** Functional studies of nonpeptide angiotensin II receptor subtype-specific ligands: DUP 753 (AII-1) and PD 123177 (AII-2). *J Pharmacol Exp Ther* 1990; 255(2): 584-91.
- Wright JW and Harding JW.** Regulatory role of brain angiotensins in the control of physiological and behavioural responses. *Brain Res Revue* 1992; 17(3): 227-62.
- Wright JW and Harding JW.** Brain angiotensin receptor subtypes in the control of physiological and behavioral responses. *Neurosc Biobehav Rev* 1994; 18(1): 21-53.
- Wright JW and Harding JW.** Brain angiotensin receptor subtypes AT1, AT2, and AT4 and their functions. *Regul Pept* 1995; 59(3): 269-95.
- Wright JW, Bechtholt AJ, Chambers SL, Harding JW.** Angiotensin III and IV activation of the brain AT1 receptor subtype in cardiovascular function. *Peptides* 1996; 17(8): 1365-71.
- Wright JW and Harding JW.** Important role for angiotensin III and IV in the brain renin-angiotensin system. *Brain Res Brain Res Rev* 1997; 25(1): 96-124.
- Wyse B, Greenland K, Sernia C.** Specific binding sites for (3-8)angiotensin in C6 glioma cells. *Brain Res* 1995; 681(1-2): 41-6.

- Yamada K, Iyer SN, Chappell MC, Brosnihan KB, Fukuhara M, Ferrario CM.** Differential response of angiotensin peptides in the urine of hypertensive animals. *Regul Pept* 1999; 80(1-2): 57-66.
- Yang HY, Erdös EG, Chiang TS.** New enzymatic route for the inactivation of angiotensin. *Nature* 1968; 218(5148): 1224-6.
- Yang C, Hsiao LD, Chien CS, Lin CC, Luo SF, Wang CC.** Substance P-induced activation of p42/44 mitogen-activated protein kinase associated with cell proliferation in human tracheal smooth muscle cells. *Cell Signal* 2002; 14(11): 913-23.
- Yang HY, Tao T, Iadarola MJ.** Modulatory role of neuropeptide FF system in nociception and opiate analgesia. *Neuropeptides* 2008; 42(1): 1-18
- Ye MQ and Healy DP.** Characterization of an angiotensin type-1 receptor partial cDNA from rat kidney: evidence for a novel AT1B receptor subtype. *Biochem Biophys Res Commun* 1992; 185(1): 204-10.
- Yokota Y, Sasai Y, Tamaka K, et al.** Molecular characterization of a functional cDNA for rat substance P receptor. *J Biol Chem* 1989; 264(30): 17649-52.
- Yokoyama S, Isenberg KE, Wright AF.** Adaptive evolution of G-protein coupled receptor genes. *Mol Biol Evol* 1989; 6(4): 342-53.
- Young D, Waitches G, Birchmeier C, Fasano O, Wigler M.** Isolation and characterization of a new cellular oncogene encoding a protein with multiple potential transmembrane domains. *Cell* 1986; 45(5): 711-9.
- Young D, O'Neill K, Jessell T, Wigler M.** Characterization of the rat mas oncogene and its high-level expression in the hippocampus and cerebral cortex of rat brain. *Proc Natl Acad Sci USA* 1988; 85(14): 5339-42.
- Zhang H, Schmeisser A, Garlich CD, et al.** Angiotensin II-induced superoxide anion generation in human vascular endothelial cells: role of membrane-bound NADH-/NADPH-oxidases. *Cardiovasc Res* 1999; 44(1): 215-22.
- Zhang R, Yan PK, Zhou CH, Liao JY, Wang MW.** Development of a homogeneous calcium mobilization assay for high throughput screening of mas-related gene receptor agonists. *Acta Pharmacol Sin* 2007; 28(1): 125-31.
- Zhou J, Ernsberger P, Douglas JG.** A novel angiotensin receptor subtype in rat mesangium: Coupling to adenylyl cyclase. *Hypertension* 1993; 21(6 Pt2): 1035-8.
- Zhu J, Jhamandas K, Yang HY.** Release of neuropeptide FF (FLFQPQRF-NH₂) from rat spinal cord. *Brain Res* 1992; 592(1-2): 326-32.
- Zohn IM, Campbell SL, Khosravi-Far R, Rossman KL, Der CJ.** Rho family proteins and Ras transformation: the RHOad less traveled gets congested. *Oncogene* 1998; 17(17) (11 Reviews): 1415-38.
- Zylka MJ, Dong X, Southwell AL, Anderson DJ.** Atypical expansion in mice of the sensory neuron-specific Mrg G protein-coupled receptor family. *Proc Natl Acad Sci USA* 2003; 100(17): 10043-8.

8. Anlagen

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 eingeteilt: MrgA, MrgB und MrgC, die in dieser Doktorarbeit allerdings nicht untersucht wurden (Dong et al., 2001).

Anlage 2

pcDNA3.1(-)-Vektor-Sequenz

| 5'-Ende des hCMV-Promotors
 CAGATATACG↓CGTTGACATT GATTATTGAC TAGTTATTAA TAGTAATCAA TTACGGGGTC
 ATTAGTTCAT AGCCCATATA TGGAGTTCCG CGTTACATAA CTTACGGTAA ATGGCCCCGCC
 TGGCTGACCG CCCAACGACC CCCGCCATT GACGTCAATA ATGACGTATG TTCCCATAGT
 AACGCCAATA GGGACTTTCC ATTGACGTCA ATGGGTGGAG TATTTACGGT AAAGTCCCCA
 CTTGGCAGTA CATCAAGTGT ATCATATGCC AAGTACGCC CCTATTGACG TCAATGACGG
 TAAATGGCCC GCCTGGCATT ATGCCCAGTA CATGACCTTA TGGGACTTTC CTAATTGGCA
 GTACATCTAC GTATTAGTCA TCGCTATTAC CATGGTGATG CGGTTTTGGC AGTACATCAA
 TGGGCGTGGA TAGCGGTTTG ACTCACGGGG ATTTCCAAGT CTCCACCCCA TTGACGTCAA
 TGGGAGTTTG TTTTGGCACC AAAATCAACG GGGACTTTCCA AAATGTCGTA ACAACTCCGC
 CCCATTGACG CAAATG**GGCG GTAGGCGTGT ACGGTGG**GAG GTCTATATAA GCAGAGCTCT ↓
 CTGGCTAACT AGAGAACCCA CTGCTTACTG GCTTATCGAA ATTAATACGA CTCACTATAG
 GGAGACCCAA GCTGGCTAGC GTTTAAACGG *GCCCTCTAGA* CTCGAGCGGC CGCCACTGTG
 CTGGATATCT GCAGAATTCC ACCACACTGG ACTAGTGGAT CCGAGCTCGG TACCAAGCTT
 AAGTTTAAAC CGCTGATCAG CCTCGACTGT GCCTTCTAGT TGCCAGCCAT CTGTTGTTTG
 CCCCTCCCCC **GTGCCTTCCT TGACCCTGGA** AGGTGCCACT CCCACTGTCC TTTCTATAA
 Signal
AAATGAGGAA ATTGCATCGC ATTGTCTGAG TAGGTGTCAT TCTATTCTGG GGGGTGGGGT
 GGGGCAGGAC AGCAAGGGGG AGGATTGGGA AGACAATAGC AGGCATGCTG GGGATGCGGT

Anlage 2.: Die pcDNA3.1(-)-Sequenz aus dem 2005-Bestellkatalog von Invitrogen. CMV- Promotor: Basen 232-819. BGH Poly-A-Stelle: Basen 1028-1252. pcDNA3.1/BGH, Reverse-Primer-Stelle: Basen 1022-1039. Unterstrichen: CMV52-Primer, Primer, der im CMV-Promotor liegt, POLBGH32-Primer: entworfener Primer, der in der Poly-A-Seite des pcDNA-Vektors liegt. Kursiv gedruckt: Apa I-Enzym.

Anlage 3

Vergleich der Plasmide von pcDNAMMMrgH und pcDNAHSMRG mit den Datenbanksequenzen

A: pcDNAMMMrgH:

Mus musculus G-protein coupled receptor GPR90 mRNA, complete cds; Length=1809;
 Score = 1368 bits (690), Expect = 0.0; Identities = 694/694 (100%), Gaps = 0/694 (0%);
 Strand=Plus/Plu

```

Query 107 CCACAGAGAAAGCCATCTTCCTGGAATGGAGCCATTGGCAATGACCTTGTATCCTCTGGA 166
          |||
Sbjct 817 CCACAGAGAAAGCCATCTTCCTGGAATGGAGCCATTGGCAATGACCTTGTATCCTCTGGA 876
  
```

```

Query 167 ATCCACACAACCCACCAGAAACAAAACCCCAAATGAAACCACCTGGTCTTCAGAGCATA 226
          |||
Sbjct 877 ATCCACACAACCCACCAGAAACAAAACCCCAAATGAAACCACCTGGTCTTCAGAGCATA 936

Query 227 GGATGACCACACTTACTTCTTAGTCTCCCTGGTCATTTGTTCCCTGGGACTGGCTGGGAA 286
          |||
Sbjct 937 GGATGACCACACTTACTTCTTAGTCTCCCTGGTCATTTGTTCCCTGGGACTGGCTGGGAA 996

Query 287 TGGCCTTTTGGATATGGTTCCCTAATCTTCTGTATCAAGAGGAAGCCATTACCATCTACAT 346
          |||
Sbjct 997 TGGCCTTTTGGATATGGTTCCCTAATCTTCTGTATCAAGAGGAAGCCATTACCATCTACAT 1056

Query 347 CCTCCATCTCGCCATTGCAGACTTCATGGTCTCCTCTGTTCGTCCATCATGAAGCTAGT 406
          |||
Sbjct1057 CCTCCATCTCGCCATTGCAGACTTCATGGTCTCCTCTGTTCGTCCATCATGAAGCTAGT 1116

Query 407 GAACACTTTTTCACATCTACAATATGACCTTAGAGAGCTACGCCATCCTCTTCATGATCTT 466
          |||
Sbjct1117 GAACACTTTTTCACATCTACAATATGACCTTAGAGAGCTACGCCATCCTCTTCATGATCTT 1176

Query 467 TGGCTACAACACAGGGCTCCACCTCCTCACGGCCATCAGCGTAGAGCGGTGCCTCTCCGT 526
          |||
Sbjct1177 TGGCTACAACACAGGGCTCCACCTCCTCACGGCCATCAGCGTAGAGCGGTGCCTCTCCGT 1236

Query 527 GCTTTATCCAATCTGGTACCAGTGCCAACGCCAAAACACCAGTCCGCTGTGGCCTGTAT 586
          |||
Sbjct1237 GCTTTATCCAATCTGGTACCAGTGCCAACGCCAAAACACCAGTCCGCTGTGGCCTGTAT 1296

Query 587 GCTGCTGTGGGCCCTCTCTGTTCTCGTGTCTGGTTTGGAAAACCTTCTTCTGCATTCTGGA 646
          |||
Sbjct1297 GCTGCTGTGGGCCCTCTCTGTTCTCGTGTCTGGTTTGGAAAACCTTCTTCTGCATTCTGGA 1356

Query 647 AGTGAAGCCCAATTCCCAGAATGCCGATACGTGTACATATTCTCCTGTATCTTGACTTT 706
          |||
Sbjct1357 AGTGAAGCCCAATTCCCAGAATGCCGATACGTGTACATATTCTCCTGTATCTTGACTTT 1416

Query 707 CCTGGTCTTCGTTCCCTCTCATGATCTTCTCTAATTTGATCCTCTTCATCCAAGTCTGCTG 766
          |||
Sbjct1417 CCTGGTCTTCGTTCCCTCTCATGATCTTCTCTAATTTGATCCTCTTCATCCAAGTCTGCTG 1476

Query 767 TAACCTGAAGCCACGTCAACCGACCAAGCTCTAT 800
          |||
Sbjct1477 TAACCTGAAGCCACGTCAACCGACCAAGCTCTAT 1510

```

Anlage 3A: Ergebnis des Sequenzvergleichs durch das BLAST-Programm nach Eingabe der Maxi 5-Sequenz. Vergleich des Plasmids pcDNAMMMrgH mit der GPR90-Sequenz lt. Datenbank (NM030726) (4.1.1). Query= Maxi 5, Sbjct= NM030726.

B: pcDNAHSMRG:

mrg=mas-related [human, Genomic, 2416 nt]; Length=2416; Score = 1461 bits (737), Expect = 0.0; Identities = 773/773 (100%), Gaps = 0/773 (0%); Strand=Plus/Plus

```

Query 28 TCCTGACTGTGATGTTGTGGCCCACTCAGGTCCCAGCACCCCATGGTCTGGGGGAAAATT 87
          |||
Sbjct 955 TCCTGACTGTGATGTTGTGGCCCACTCAGGTCCCAGCACCCCATGGTCTGGGGGAAAATT 1014

```

```

Query 88  TGCTGGTTTCAGCCAGAGGGCTGGATGGACAGTGTGCTGAGTCACAGATATCTCTCTCA  147
          |
Sbjct1015 TGCTGGTTTCAGCCAGAGGGCTGGATGGACAGTGTGCTGAGTCACAGATATCTCTCTCA  1074

Query 148 TGTAGCCTTTGTCTCCACAGTGGTGACCAGGAGGCACAGAACCCAAACCTGGTATCTCAG  207
          |
Sbjct1075 TGTAGCCTTTGTCTCCACAGTGGTGACCAGGAGGCACAGAACCCAAACCTGGTATCTCAG  1134

Query 208 CTCTGTGGCGTCTTTCTTCAAATGAGACGAATGAAACCATACATATGCAGATGAGCATG  267
          |
Sbjct1135 CTCTGTGGCGTCTTTCTTCAAATGAGACGAATGAAACCATACATATGCAGATGAGCATG  1194

Query 268 GCAGTGGGACAGCAGGCCCTGCCCTTGAATATCATTGCCCCCAAGGCTGTGCTGGTCTCC  327
          |
Sbjct1195 GCAGTGGGACAGCAGGCCCTGCCCTTGAATATCATTGCCCCCAAGGCTGTGCTGGTCTCC  1254

Query 328 CTCTGTGGGGTCTTATTGAATGGCACTGTCTTCTGGCTGCTTTGCTGTGGGGCCACGAAT  387
          |
Sbjct1255 CTCTGTGGGGTCTTATTGAATGGCACTGTCTTCTGGCTGCTTTGCTGTGGGGCCACGAAT  1314

Query 388 CCCTACATGGTATAACATCCTCCACCTGGTCGCTGCTGACGTGATCTATCTTTGCTGCTCG  447
          |
Sbjct1315 CCCTACATGGTATAACATCCTCCACCTGGTCGCTGCTGACGTGATCTATCTTTGCTGCTCG  1374

Query 448 GCAGTGGGGTTCTTACAGGTGACTCTGCTAACTTATCATGGAGTCGTGTTTTTATCCCT  507
          |
Sbjct1375 GCAGTGGGGTTCTTACAGGTGACTCTGCTAACTTATCATGGAGTCGTGTTTTTATCCCT  1434

Query 508 GATTTCTGGCCATATTGTCTCCCTTCTCCTTTGAGGTGTGTCTCTGTCTCTGGTGGCC  567
          |
Sbjct1435 GATTTCTGGCCATATTGTCTCCCTTCTCCTTTGAGGTGTGTCTCTGTCTCTGGTGGCC  1494

Query 568 ATCAGCACAGAGCGnnnnnnnnnnnnCCTCTTCCCCATCTGGTACAGATGCCACCGCCCA  627
          |
Sbjct1495 ATCAGCACAGAGCGGTGTGTGTGTGTCTCTTCCCCATCTGGTACAGATGCCACCGCCCA  1554

Query 628 AAATACACATCTAATGTTGTCTGCACCCTCATCTGGGGCTGCCTTTTTGCATCAACATA  687
          |
Sbjct1555 AAATACACATCTAATGTTGTCTGCACCCTCATCTGGGGCTGCCTTTTTGCATCAACATA  1614

Query 688 GTAAAATCACTTTTCCTAACTTACTGGAAACATGTAAAGGCATGTGTCATATTTCTAAAG  747
          |
Sbjct1615 GTAAAATCACTTTTCCTAACTTACTGGAAACATGTAAAGGCATGTGTCATATTTCTAAAG  1674

Query 748 CTTTCTGGGCTCTTCCATGCTATCCTTTCACTTGTGATGTGTGTGTCGAGTCT  800
          |
Sbjct1675 CTTTCTGGGCTCTTCCATGCTATCCTTTCACTTGTGATGTGTGTGTCGAGTCT  172

```

Anlage 3B: Ergebnis des Sequenzvergleichs durch das BLAST-Programm nach Eingabe der Maxi 2-Sequenz. Vergleich des Plasmids pcDNAHSMRG mit der HSMRG-Sequenz lt. Datenbank (S78653) (4.1.2). Query= Maxi 2, Sbjct= S78653.

Anlage 4

Vergleich der verwendeten Rezeptoren auf Aminosäure-ebene

```

HS_MrgX1 -----MDP-----TLDTELPINGTE
HS_MrgX2 -----MDP----TTPAWGTESTTVNGN
HS_Mas -----MDG---SNVTSFVVEEPTNIST
MM_MrgH -----MEP---LAMTLYPLESTQPTRN
HS_MrgF -----MAGNCSWEAHPGNRNKMCPGLSEAPELYS
HS_MrgD -----MNQ---TLNSSGTVESALNYSR
HS_MRG MVWVGKICWFSQRAGWTVFAESQISLSCSLCLHSGDQEAQNPNLVSQLCGVFLQNETNETI

```

```

HS_MrgX1 ----ET---LCYKQTLSTVLTTCIVSLVGLTGNAVVLWLLGCRMRRNAFSIYILNLAAAD
HS_MrgX2 ---DQALLLLCGKETLIPVFLILFIALVGLVGNFVWLWLLGFRMRRNAFSVYVLSLAGAD
HS_Mas G--RNASVGNHRQIPIVHVIMSI SPVGFVENGILLWFLCFMRRNPFVYIITHLSIAD
MM_MrgH KTPNETTWSSEHTDDHTYFLVSLVICSLGLAGNGLLIWFLIFCIKRKPFYIYLHLAIAD
HS_MrgF RGFLTIEQIAMLPPAVMNYIFLLCLCGLVGNGLVWLWFFGF SIKRNPF SIFLHLASAD
HS_MrgD ----GS---TVHTAYLVLS SLAMFTCLCGMAGNSMVWLWLLGFRMHRNPF CIIYILNLAAAD
HS_MRG HMQMSMAVGQQALPLNIIAPKAVLVSLCGVLLNGTVFWLLCCGAT-NPYMVYIYLHLVAAD

```

```

HS_MrgX1 F-LFLSGRLIYSL--LS--FISIPHTISKILYPVMMFSYFAGLSFLSAVSTERCLSVLWLP
HS_MrgX2 F-LFLCFQIINCLVYLSNFFCSISINFPSFFTVMTCAYLAGLSMLSTVSTERCLSVLWLP
HS_Mas ISLLFCIFILSIDYALD-YELSSGHYTIIVTSLVTFLFGYNTGLYLLTAISVERCLSVLYP
MM_MrgH FMVLLCSSIMKLVN----TFHIYNMTLESYAILFMIFGYNTGLHLLTAISVERCLSVLYP
HS_MrgF VGYLFSKAVFSILNTGGFLGTFADYIRSVCRVLGLCM-FLTGVSLLPVAVSAERCASVIFP
HS_MrgD L--LFLFSMASTLSLETQPLVNTTDKVVHELMKRLMYFAYTVGLSLLTAISTQRCLSVLFP
HS_MRG VIYLCCSAVGFLQVTLTLL-TYHGCVFFIPDFLAILSPFSFEVCLCLLVAISTERCVLFP

```

```

HS_MrgX1 IWYRCHRPTHLSAVVCVLLWALSLLRSILEWMLCGFLFSGADS-AWCQTSDFITVAWLIF
HS_MrgX2 IWYRCRPRRHLSAVVCVLLWALSLLLSILEGKFCGFLFSDGDS-GWCQTFDFITAAWLIF
HS_Mas IWYRCHRPKYQSALVCALLWALSSCLVTTMEYVMCIDREEESHSRNDCRAV-IIFIAILSF
MM_MrgH IWYQCRPKHQSAVACMLLWALSSVLVSGLENFFCILEVKPQFP--ECRYV-YIFSCILTF
HS_MrgF AWYWRRPKRLSAVVCALLWALSSLVTLCHNYFCVFLGRGAPGAACRHMDFLGLLFL
HS_MrgD IWFKCHRPRHLSAVVCGLLWTLCLLMNGLTSSFCSKFLKFNED--RCFRV-DMVQAALIM
HS_MRG IWYRCHRPKYTSNVVCTLIWGLPFCINIVKSLFLT-YWKHVKA---CVIF--LKLSGLLFH

```

```

HS_MrgX1 LCV--VLCGSSLVLLIRILCGS--RKIPLTRLYVTILLTVLVFLLCGLPFGIQFFLFLWI
HS_MrgX2 LFM--VLCGSSLALLVRILCGS--RGLPLTRLYLTILLTVLVFLLCGLPFGIQWFLILWI
HS_Mas LVFTPLMLVSSILVVKIRKNT--WASHSSKLYIVIMVTIIIFLIFAMPMLLYLLEYEY
MM_MrgH LVFVPLMIFSNLILFIQVCCNL--KPRQPTKLYVIIMTTVILFVLVAMPKVLIIIGYYS
HS_MrgF CCPLMVLPCALILHVECRARRRQ--RSAKLNHVILAMVSVFVLVSSIYLGIDWFLFWVF
HS_MrgD GVLTPVMTLSSLTLFVWVRRSSQQWRRQPTRLFVVVLASVLVFLICSLPLSIYFVLYWL
HS_MRG AILSLVMCVSSLTLLIRFLCCS--QQQKATRVYAVVQISAPMFLLWALPLSVAPLITDFK

```

```

HS_MrgX1 HVDREVLVFCHVHLVSIFLSALNSSANPIIYFFVGSFRQRQRQRN--LKLVLQRALQDASE
HS_MrgX2 WKDSVDVLFCHIHPVSVVLSLNSSANPIIYFFVGSFRKQWRLQQPILKLALQRALQDIAE
HS_Mas WS----TFGNLHHISLLFSTINSANPFIYFFVGSSKKKRFKES--LKVVLTRAFKDEMQ
MM_MrgH SS-LDDSVWDSLPYLNMLSTINCSINPIYFFVGSSLRRKRSRKS-LKEALQKVFEEKPV
HS_MrgF QIPAPFPEYVTDL----CICINSSAKPIYFLAGRDKSQRLWEP--LRVVFQRALRDGAE
HS_MrgD SLP-PEMQVLCFSLSRLSSSVSSANPVIYFLVGS-RRSHRLPTRSLGTVLQQALREEPE
HS_MRG MF-----VT-TSYLISLFLIINSANPIIYFFVGSSLRKKRLKES--LRVILQRALADKPE

```

HS_MrgX1 VDEGGGQLPEEILELSGSRLEQ
 HS_MrgX2 VDHSEGCFRQGTPEMSRSSLV
 HS_Mas PRRQKDNCNTVTVETVV
 MM_MrgH VASRENTVQFSLPS
 HS_MrgF LGEAGGSTPNTVTMEMQCPPGNAS
 HS_MrgD LEGGE-TPTVGTNEMGA
 HS_MRG VGRNKAAGIDPMEQPHSTQHVENLLPREHRVDVET

Anlage 4.: Der HSMas-Rezeptor und die MMMrgH-, HSMrgX1-, HSMrgX2-, HSMrgD-, HSMrgF- und HSMRG-Rezeptoren im Sequenzvergleich. Dargestellt ist die Aminosäuresequenz der jeweiligen Rezeptoren. Fett gedruckt: übereinstimmende Aminosäuren. Die transmembranären Bereiche sind grau unterlegt.

Anlage 5

Vergleich der Rezeptor-Sequenzen auf DNA-Ebene

HS_MrgX1 GCCATGGATCCAACCATCTCAACCTTGGACACAGAAGTACACA**CCAATCAACGGA**ACTGAGGAGAC
 HS_MrgX2 GCGATGGATCCAACCAACCCCGGCTGGGGAACAGAAAGTACAACAGTGAATGGAAATGACCAAGC
 HS_Mas GCCCATGGATGGGTCAAACGTGACATCATTTGTTGTTGAGGAAC**CCACGAACATCTCAACTGG**CA
 MM_MrgH CCACAGAGAAAGCCATCTTCTGGAATGGAGCCATTGGCAATGACCTTGTACC**CTCTGGAATCCA**
 HS_MrgF GGCCATGTGCCCTGGCCTGAGCGAGGCCCGGAACTCTACAGCCGG**GGCTTCCTGACCATCGAGC**
 HS_MrgD GCCATGAACCAGACTTTGAATAGCAGTGGGACCGTGGAGTCAGCCCTAAACTATTCCAGAGGGAG
 HS_MRG ATGGTCTGGGGGAAAATTTGCTGGTTCAG**CCAGAGGGCTGGATGGAC**AGTGTGTTGCTGAGTCACA

HS_MrgX1 TCTTTGCTACAAGCAGACCTTGAGCCTCACGGTGCTGACGTGCATCGTTTTCCCTTGTCGGGGCTGA
 HS_MrgX2 **CCTTCTTCTGCTTTGTGGC**AAGGAGACCCCTGATCCCGGTCTTCTGATCCTTTTCATTGCCCTGG
 HS_Mas GGAACGCCTCAGTCGGGAATGCACATCGGCAAAATCCCATCGTGCACCTGGGTCAATTATGAGCATC
 MM_MrgH **CACAACC**CACCAGAAACAAAACCCCAAATGAAACCACCTGGTCTTCAGAGCATACGGATGACCAC
 HS_MrgF AGATCGCGATGCTGCCGCTCCGGCCGTCATGAACACTACATCTTCTGCTCCTCTGCCGTGTGGC
 HS_MrgD **CACAGTGCACACGGCCTACCT**GGTGTGAGCTCCCTGGCCATGTTACCTGCCTGTGCCGGGATGG
 HS_MRG GATATCTCTCTCATGTAGCCTTTGCTCCACAGTGGTGACCAGGAGGCACAGAACCCAAACCTGG

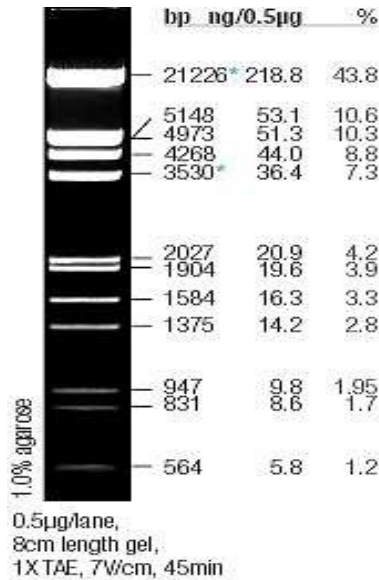
HS_MrgX1 ...+909bp.
 HS_MrgX2 ...+863bp.
 HS_Mas ...+1139bp.
 MM_MrgH ...+863bp.
 HS_MrgF ...+842bp.
 HS_MrgD ...+899bp.
 HS_MRG ...+1079bp.

Anlage 5: Vergleich der Rezeptor-Fragmente auf DNA-Ebene. Das HSMrgX1-Fragment besteht aus 1039bp, das HSMrgX2-Fragment aus 993bp, das HSMas-Fragment aus 1269bp, das MMMrgH-Fragment aus 993bp, das HSMrgF-Fragment aus 972bp, das HSMrgD-Fragment aus 1029bp und das HSMRG-Fragment aus 1209bp. Unterstrichen: Start-ATG. Fett unterstrichen: Entworfenene Primer für die jeweilige Mas-spezifische cDNA.

Anlage 6

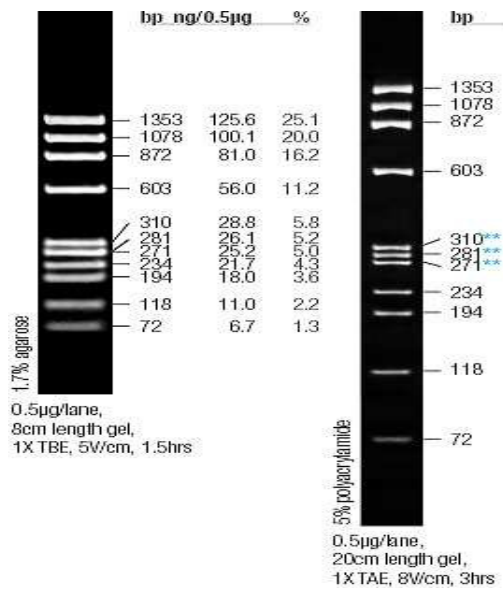
DNA-Längenmarker

A Lambda-Marker EcoR I/ Hind III



Anlage 6A: Lambda-Marker verdaut mit *EcoR I* und *Hind III*. Aus dem 2005-Bestellkatalog von Promega (Mannheim, Deutschland).

B PhiX 174 DNA/ BsuR I (Hae III) Marker, 9



Anlage 6B: Phi-X 174-Marker verdaut mit dem Enzym *BsuR I*. Aus dem 2005-Bestellkatalog von Promega (Mannheim, Deutschland).

9. Curriculum vitae

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

10. Publikationsliste

Publikationen

Santos RA., Simoes e Silva AC, Maric C, et al. Angiotensin-(1-7) is an endogenous ligand for the G protein-coupled receptor Mas. *Proc Natl Acad Sci USA* 2003; 100: 8258-63.

Gembardt F, Grajewski S, Vahl M, Schultheiss HP, Walther T. Angiotensin metabolites can stimulate receptors of the Mas-related genes family. *Mol Cell Biochem* 2008; 319: 115-23.

Poster

1. **Young Investigator Award.**

„Stimulation der Arachidonsäurefreisetzung aus *Mas*-transfizierten COS-Zellen ist nicht beschränkt auf Angiotensin-(1-7)“. Deutsche Liga zur Bekämpfung des hohen Blutdruckes. Deutsche Hypertoniegesellschaft. Hypertonie 2001 Kongress, Bielefeld, Deutschland.

2. „Stimulation of arachidonic acid release from *mas*-transfected COS cells is not restricted to angiotensin-(1-7) and does not involve AT1 and AT2 receptors“. ACC 2002, 51st Annual Scientific Sessions in Atlanta, Georgia.

11. Danksagung

Ich möchte Prof. Heinz-Peter Schultheiss, Direktor der Klinik für Kardiologie und Pulmologie, Campus Benjamin Franklin der Universitätsmedizin Charité, für die Ermöglichung dieser Arbeit danken.

Mein besonderer Dank gilt Prof. Thomas Walther für die Überlassung des interessanten Themas und seinem Engagement und die fortwährende Diskussionsbereitschaft. Seine Erfahrung und kritischen Hinweise trugen wesentlich zum Gelingen der Dissertation bei.

Dr. Insa de Buhr danke ich für ihre Hilfe bei der Entwicklung der Experimente in der Zellkultur und ihren fachlichen Rat. In diesem Zusammenhang danke ich Dr. Jianchang Yang für seine Ratschläge bei den Methoden in der Zellkultur.

Außerdem gilt mein Dank allen Mitarbeitern im Labor Walther, die parallel im Labor tätig waren und bei der Aneignung neuer Techniken und Methoden hilfreich zur Seite standen. An dieser Stelle möchte ich insbesondere Dr. Christine Altmann danken.

Ich danke vor allem herzlichst meinen Eltern für ihre immerwährende Unterstützung während des Studiums.

12. Eidesstattliche Erklärung

„Ich, Martin Vahl, erkläre hiermit, dass ich die vorliegende Dissertationsschrift mit dem Thema: ‚Identifizierung von Liganden des G-Protein gekoppelten Rezeptors Mas und Mas-Sequenz-ähnlicher Rezeptoren‘ selbst verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt, ohne die Hilfe Dritter verfasst und auch in Teilen keine Kopien anderer Arbeiten dargestellt habe.“

Datum

Unterschrift