

Aus dem Institut für experimentelle pädiatrische Endokrinologie  
der Medizinischen Fakultät Charité – Universitätsmedizin Berlin

DISSERTATION

**Expression und funktionelle Charakterisierung des  
orphanen murinen und humanen Taar8**

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

vorgelegt der Medizinischen Fakultät  
Charité – Universitätsmedizin Berlin

von

Daniela Elke Angelika Nürnberg

aus Erlangen

Datum der Promotion: 26.02.2016



# Inhaltsverzeichnis

	<u>Seite</u>
<b>Inhaltsverzeichnis .....</b>	<b>I</b>
<b>Abstrakt (deutsch).....</b>	<b>IV</b>
<b>Abstract (englisch).....</b>	<b>V</b>
<b>1 Einleitung.....</b>	<b>1</b>
1.1 Allgemeine Prinzipien der zellulären Signalverarbeitung .....	1
1.2 Rezeptor-vermittelte zelluläre Signaltransduktion .....	2
1.2.1 Klassifizierung und Struktur der G-Protein-gekoppelten Rezeptoren .....	2
1.2.2 Signaltransduktion durch G $\alpha$ -Untereinheiten .....	5
1.3 Trace amine-associated Rezeptoren.....	7
1.3.1 Physiologische Effekte von Spurenaminen.....	8
1.3.2 Pathophysiologische Effekte von Spurenaminen.....	10
1.3.3 Effekte von 3-Iodothyronamin .....	11
1.3.4 Die TAAR- Familie .....	14
1.3.5 TAAR8 in der Rattenherzphysiologie.....	16
1.3.6 Effekte von 3-Iodothyronamin am Herzen .....	17
1.4 Zielsetzung der Arbeit.....	19
<b>2 Material und Methoden.....</b>	<b>21</b>
2.1 Material.....	21
2.1.1 Geräte .....	21
2.1.2 Chemikalien und Substanzen .....	23
2.1.3 Auswertungssoftware.....	23
2.1.4 Antibiotika .....	23
2.1.5 Antikörper.....	23
2.1.6 Bakterien und Säugerzellen.....	24
2.1.7 Verwendete Assay-Systeme.....	25
2.1.8 Verwendete Enzyme.....	25

---

2.1.9	Verwendete Enzym-Puffer .....	26
2.1.10	Verwendete Primer .....	26
2.1.11	Expressionsvektoren.....	26
2.1.12	Liganden .....	26
2.1.13	Sonstige Reagenzien.....	27
2.1.14	Häufig verwendete Medien und Puffer.....	27
2.1.15	Sonstige verwendete Materialien.....	31
2.2	Methoden.....	31
2.2.1	Molekularbiologische Methoden .....	31
2.2.2	Zellbiologische Methoden .....	52
2.2.3	Biochemische Methoden.....	54
2.2.4	Funktionelle Untersuchung von GPCRs .....	56
2.2.5	Sonstige verwendete Methoden .....	60
<b>3</b>	<b>Ergebnisse.....</b>	<b>62</b>
3.1	Endogene Expression des murinen Taar8b im Herzen.....	62
3.1.1	Ergebnisse der RT-Polymerasekettenreaktion .....	62
3.1.2	Ergebnisse der Real-Time-quantitative-PCR.....	64
3.1.3	Ergebnisse der <i>in-situ</i> -Hybridisierung .....	67
3.1.4	Funktionelle Charakterisierung .....	69
<b>4</b>	<b>Diskussion.....</b>	<b>81</b>
4.1	Hintergrund der Expressionsuntersuchungen .....	81
4.2	Experimentelle Herausforderung der Taars .....	82
4.3	Expressionsergebnisse mittels verschiedener PCR-Techniken .....	83
4.4	Expressionsergebnisse der <i>in-situ</i> -Hybridisierung .....	85
4.5	Einordnung der eigenen Expressionsergebnisse in die Literatur .....	85
4.6	Erklärung der Expressionsergebnisse.....	87
4.7	Bewertung und Einordnung der Ergebnisse zur Signaltransduktion .....	88
4.8	Fazit.....	91
	<b>Literatur.....</b>	<b>94</b>

---

<b>Anhang .....</b>	<b>103</b>
Abkürzungen .....	103
Allgemeine Abkürzungen.....	103
Abkürzungen der Basen .....	106
Abkürzungen der Aminosäuren .....	106
Abbildungsverzeichnis.....	108
Tabellenverzeichnis.....	109
mTaar8b-Sequenz.....	111
hTAAR8-Sequenz .....	112
Bovine Rhodopsin-Sequenz.....	113
<b>Danksagungen.....</b>	<b>114</b>
<b>Curriculum Vitae und eigene Publikationen .....</b>	<b>116</b>
<b>Eidesstattliche Versicherung .....</b>	<b>121</b>

## Abstrakt (deutsch)

Im Rahmen von genomweiten Screenings nach weiteren Serotonin-Rezeptor-Subtypen wurde 2001 eine neue Gruppe an G-Protein koppelnden Rezeptoren kloniert. Diese als trace amine-associated receptors (Taar) bezeichnete Rezeptoren gehören zur Familie A innerhalb der GPCRs und werden sowohl durch Spurenamine als auch durch Thyronamine aktiviert. Eine der bekanntesten Thyronamine ist das 3-Iodothyronamin (T<sub>1</sub>AM), welches am murinen Herzen negativ chronotrope und negativ inotrope Effekte zeigte. Es stellte sich also die Frage, ob und welcher Taar diese Effekte vermittelt haben konnte. Bis zum damaligen Zeitpunkt waren lediglich G $\alpha_s$ -koppelnde Taar-Subtypen wie der Taar1 und der Taar4 bekannt, welche diese negativ modulierenden Effekte nicht hervorrufen konnten. Ebenso wenig konnte der G $\alpha_{q/11}$ -koppelnde Taar5 als ursächlich für die beobachteten Effekte angenommen werden. Jedoch zeigte sich in ersten Expressionsstudien eine deutliche Expression des Taar8a in Herzen von Ratten, so dass die beobachteten Effekte möglicherweise durch diesen orphanen Rezeptor erklärt werden konnten; allerdings war der Signalweg noch nicht bekannt.

Im Rahmen dieser Arbeit wurden mithilfe verschiedener Techniken murine Herzen von C57BL/6J-Mäusen auf ihre Expression des homologen Taar8b hin untersucht. Letztendlich konnte mittels *in-situ*-Hybridisierung keine Detektion von Transkripten in diesen murinen Herzen erfolgen und somit eine Expression bei männlichen gesunden C57BL/6J-Mäusen ausgeschlossen werden. Weiterhin galt es jedoch, den Rezeptor zu deorphanisieren. Aus diesem Grund erfolgte eine funktionelle Charakterisierung inklusive der Generierung von verschiedenen Varianten, die zum einen die Bedingungen für Ligandenuntersuchungen verbessern und zum anderen die Identifizierung der G-Protein Kopplung erleichtern sollten. Diesbezüglich zeigte sich eine deutliche Basalaktivität der murinen und humanen Variante für die G $\alpha_{i/o}$ -Kopplung. Der Taar8 ist somit der erste G $\alpha_{i/o}$ -koppelnde Rezeptor innerhalb der Taars. Weiterhin konnte gezeigt werden, dass Liganden wie 3-Iodothyroamin (T1AM) oder  $\beta$ -Phenylethylamin (PEA) keine Liganden für die humane und murine Variante sind. Somit konnte zwar bisher noch kein Taar8-spezifischer Ligand gefunden werden, jedoch erwies sich dieser als basalaktiv; zudem wurde erstmals ein G $\alpha_{i/o}$ -koppelnder Rezeptor identifiziert.

## Abstract (englisch)

In the context of genome wide screenings for more subtypes of the serotonin receptor, a new group of g-protein coupling receptors was cloned in 2001. These receptors called trace amine-associated receptors (taar) belong to the family A within the GPCRs and are activated of both trace amines and thyronamines. One of the most well known thyroanimnes is 3-iodothyronamine (T<sub>1</sub>AM), which is known to induce negative chronotropic and negative inotropic effects on murine hearts. So the question was, if and which taar is responsible for inducing these effects. At that point only Gα<sub>s</sub>-coupling taars as the Taar1 and the Taar4 were known, which obviously could not be responsible for these negative modulating effects in heart physiology. Even the Gα<sub>q/11</sub>-coupling Taar5 could not have been responsible for the observed results. However, a clear preponderance of Taar8a transcripts was found in first expression profile analyses in rat hearts, so that this orphan receptor could possibly be the explanation for the cardial effects; however signal transduction was not identified yet.

Within the scope of this work several techniques were used to analyze the expression pattern of the homologue Taar8b in murine hearts of C57BL/6J-mice. Eventually, there was absolutely no detection of Taar8b transcripts in these murine hearts with the help of *in-situ*-hybridization and we could exclude an expression in male healthy C57BL/6J-mice. Furthermore, it was an aim to deorphanize this receptor. This is the reason why we performed functional characterization including generation of several variants which should be helpful on the one hand for ligand-stimulation analyses and on the other hand for the identification of the G-protein coupling. Within these investigations a significant basal activity for Gα<sub>i/o</sub>-protein coupling for the human and the murine receptor. So, Taar8 is the first identified Gα<sub>i/o</sub>-coupling receptor within the Taars. Furthermore, there was no activation in any G-protein coupling for the human or murine Taar8b after the stimulation with 3-iodothyronamine (T<sub>1</sub>AM) or β-phenylethylamine (PEA). So in conclusion, there is no taar8 specific ligand identified so far but the receptor was shown to be basal active; additionally it was the first time ever to identify a Gα<sub>i/o</sub>-protein coupling receptor.

# 1 Einleitung

Im Rahmen genomweiter Screenings nach neuen Rezeptoren und deren Aufgabe stieß man 2001 auf eine neue Gruppe von G-Protein koppelnden Rezeptoren. Ihre teilweise hohe Affinität zu Spurenaminen (trace amines) führte zu dem Namen „trace amine-associated receptors“ (TAARs). Zusätzlich konnten auch Derivate der Schilddrüsenhormone als Liganden identifiziert werden. Diese zeigten verschiedene Physiologiemojulierende Effekte bei Nagetieren in *in vivo*- und *in vitro*-Studien.

## 1.1 Allgemeine Prinzipien der zellulären Signalverarbeitung

Für einen funktionierenden, gesunden Organismus ist eine zelluläre Kommunikation die Grundvoraussetzung: Es müssen verschiedenste chemische und physikalische Reize erfasst und interpretiert werden, damit der Organismus entsprechend darauf reagieren kann. Die Schnittstelle zu einem derartigen zellulären Metabolismus bilden Rezeptoren, welche an der Zelloberfläche lokalisiert sind (Lefkowitz 2007). Über diese wird das Signal erkannt und kann koordiniert intrazellulär weitergeleitet werden. Die Kommunikation zwischen benachbarten Zellen oder zum Extrazellulärraum kann durch direkten Kontakt mittels Adhäsions-, Verschluss- oder Kommunikationskontakte erfolgen. Zellen können jedoch auch ohne direkten Kontakt miteinander kommunizieren. Hierfür dienen ihnen Hormone [ $\acute{o}\rho\mu\acute{\alpha}\nu$  *hormān*: antreiben, erregen] bzw. Neurotransmitter, wenn diese von einer Nervenzelle abgegeben werden. Diese Botenstoffe gehören unterschiedlichen chemischen Stoffgruppen an, so sind sie u. a. (Poly)peptide (z. B. Insulin), Glykoproteine (z. B. Gonadotropine), biogene Amine (z. B. Adrenalin) oder Steroide (z. B. Progesteron). Die meisten lipophilen Stoffe – wie z. B. die Steroidhormone – können dabei die Zellmembran leichter permeieren und binden intrazellulär an spezifische Rezeptoren. Für hydrophile Stoffe, welche die Zellmembran nicht passiv überwinden können, finden sich an der Zelloberfläche Rezeptoren. Diese regen nach der Ausbildung des Ligand-Rezeptor-Komplexes eine intrazelluläre Kaskade an und setzen so die Weiterleitung des Signals in Gang. Diesen Mechanismus bezeichnet man als transmembranäre Signaltransduktion.



## 1.2 Rezeptor-vermittelte zelluläre Signaltransduktion

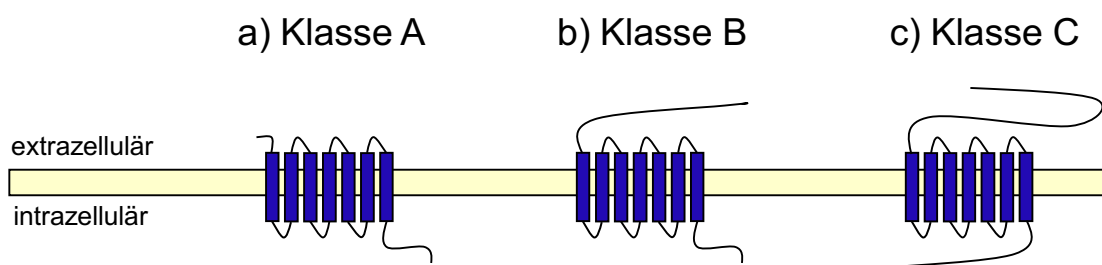
Man unterscheidet grundsätzlich drei verschiedene Klassen von Zelloberflächen-Rezeptoren:

- a) Die Liganden-gesteuerten Ionenkanäle (ionotrope Rezeptoren) sorgen charakteristischerweise für eine schnelle, kurzwirksame synaptische Transmission. Dabei wird die Permeabilität für bestimmte Ionen verändert und so eine Signalweiterleitung garantiert. Ein Beispiel hierfür ist der nikotinerge Acetylcholinrezeptor, welcher nach Binden von Acetylcholin einen Kationenkanal öffnet.
- b) Enzym-gekoppelte Rezeptoren sind Transmembranproteine mit intrazellulärer enzymatischer Aktivität. Zu ihnen gehören Tyrosinkinase-gekoppelte Rezeptoren, Tyrosin-Phosphatasen, Rezeptor-Serin/Threoninkinasen, Rezeptor-Guanylyl-Cyclasen und Histidinkinase-gekoppelte Rezeptoren.
- c) Die dritte Klasse von Zelloberflächen-Rezeptoren bilden die metabotropen G-Protein-koppelnden Rezeptoren (G-protein coupled receptors; GPCR). Dabei koppeln diese Rezeptoren intrazellulär an heterotrimere Guaninnukleotid-bindende Proteine (G-Proteine) (Rosenbaum, Rasmussen et al. 2009). Die extrazelluläre Bindung eines Agonisten führt über eine Konformationsänderung des Rezeptors zur Aktivierung des gebundenen G-Proteins, welches weitere intrazelluläre Effektorproteine moduliert (Nürnberg, Gudermann et al. 1995). Auf diese Art und Weise werden unterschiedliche Signale wie z. B. Licht, Geruchs- und Geschmacksstoffe, Aminosäuren, biogene Amine, Peptide und Proteine über GPCRs vermittelt.

### 1.2.1 Klassifizierung und Struktur der G-Protein-gekoppelten Rezeptoren

Den G-Protein koppelnden Rezeptoren, auch als 7-Helix-Rezeptoren bezeichnet, kommt eine entscheidende Rolle hinsichtlich der Kommunikation der Zellen zu. Sie bilden die größte Gruppe der transmembranären Rezeptoren, wobei über 90 % im Gehirn exprimiert sind (Vassilatis, Hohmann et al. 2003). Sind Liganden der Rezeptoren noch nicht bekannt und/oder deren Funktion noch nicht hinreichend geklärt, werden sie als sog. orphane („verwaiste“) Rezeptoren bezeichnet (Lefkowitz 2007). GPCRs lassen sich bei den Vertebraten, basierend auf ihrer Sequenz und ihren strukturellen

Merkmale, in fünf sog. Familien einteilen: Rhodopsin (Familie A), Secretin (Familie B), Glutamat (Familie C), Adhesion und Frizzles/Taste2 (Rosenbaum, Rasmussen et al. 2009). Dabei zeichnet sich die Familie der B-Rezeptoren durch einen langen extrazellulären Aminoterminus aus. Als bekannte Vertreter können beispielsweise der Calcitonin- und der Glucagonrezeptor angeführt werden. Im Gegensatz dazu besitzt die Familie C einen noch längeren Aminoterminus mit ca. 600 Aminosäuren; zusätzlich verfügt sie über einen langen intrazellulären Carboxyterminus. Wichtige Vertreter innerhalb dieser Familie sind z. B. GABA- und Glutamatrezeptoren.



**Abbildung 1:** Schematische Darstellung der Klassen A, B & C innerhalb der GPCR-Superfamilie.

Die Rezeptoren der Klasse A, die bei weitem größte Gruppe, mit relativ kurzem extrazellulärem Amino- und intrazellulärem Carboxyterminus. Bei der Klasse der B-Rezeptoren imponiert der lange extrazelluläre Aminoterminus. Die Klasse C der Rezeptoren besitzt neben einem sehr langen Aminoterminus mit ca. 600 Aminosäuren ebenfalls einen sehr langen intrazellulären Carboxyterminus.

Die Rezeptoren der Familie A bilden jedoch mit über 800 Vertretern die bei weitem größte und am besten charakterisierte Unterklasse mit einer reichen Vielfalt innerhalb der Familie (Stevens, Cherezov et al. 2012). Aus diesem Grund bilden sie auch einen wichtigen Ansatzpunkt für die Entwicklung von Arzneistoffen. 30–40 % der Wirkstoffe wirken dabei direkt an GPCRs (Vassilatis, Hohmann et al. 2003; Lefkowitz 2007; Stevens, Cherezov et al. 2012).

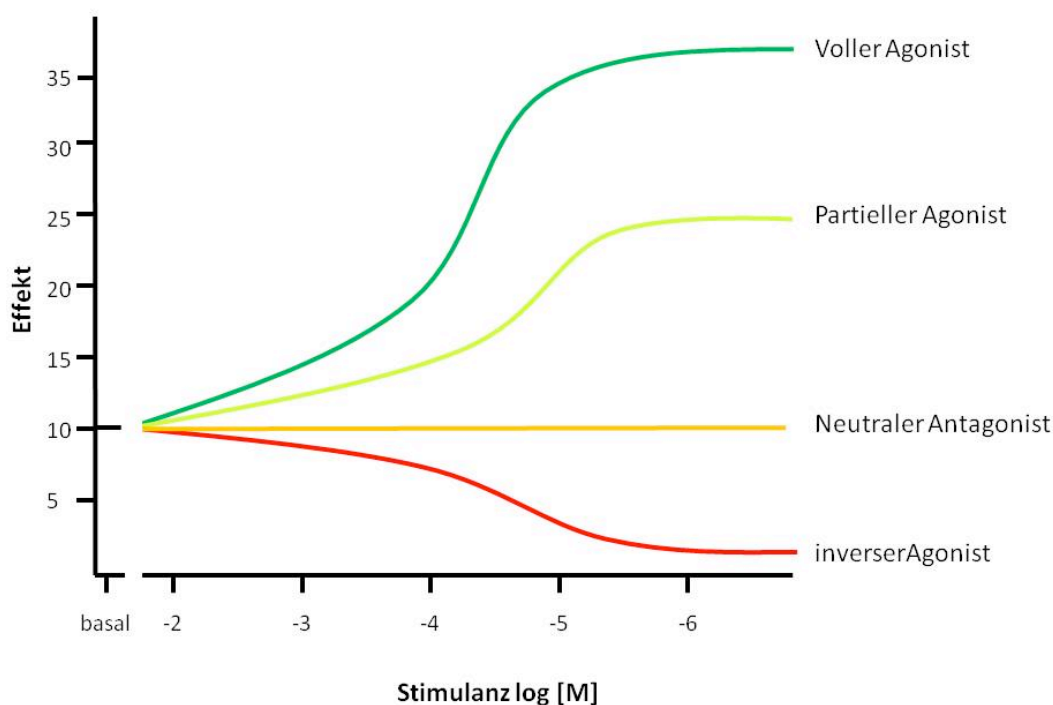
Da die Rezeptoren bestimmte strukturelle Merkmale teilen, sind die Aktivierungsmechanismen ähnlich. Zur gemeinsamen Grundstruktur gehören der extrazellulär gelegene Aminoterminus, die sieben transmembran gelegenen  $\alpha$ -Helices (TM1-7) sowie ein intrazellulär gelegener Carboxyterminus. Die Transmembranregionen werden

über extra- und intrazelluläre Schleifen (Loops, ecl bzw. icl 1–3) miteinander verbunden und sind aus intrazellulärer Sicht kreisförmig im Uhrzeigersinn angeordnet. Diesbezüglich unterscheiden sich die verschiedenen Rezeptoren v. a. in der Struktur der extrazellulären Schleifen und der Ligandenbindungsregion, was wiederum die funktionellen Unterschiede der Rezeptoren erklärt (Rosenbaum, Rasmussen et al. 2009).

Die Zuordnung der Rezeptoren zu dieser Familie erfolgt unter anderem aufgrund charakteristischer Aminosäuren-Motive, welche sich bei fast allen Vertretern innerhalb dieser Gruppe wiederfinden lassen – wie beispielsweise das hochkonservierte NPXXY-Motiv. Es ist am Ende der Transmembranregion 7 (TM7) gelegen und spielt eine entscheidende Rolle hinsichtlich der Rezeptoraktivierung. In diesen Strukturen ist das Prolin verantwortlich für einen Knick in der  $\alpha$ -helikalen Struktur; dadurch wird das Tyrosin in Richtung einer Tasche gewendet, welche von den TM2, TM3, TM6 und TM7 gebildet wird. Diese strukturelle Veränderung innerhalb des Rezeptors wird durch geordnete Wassermoleküle in dieser Region gestützt und wurde zuallererst beim Rhodopsin-Rezeptor beobachtet. Eine Folge dieser Anordnung ist, dass hierdurch polare Seitenketten zur Interaktion bereitgestellt werden. Weiterhin stabilisiert diese „Wasser-Tasche“ („water pocket“) den inaktiven Zustand des Rezeptors, wenngleich dieser Zustand durch die Bindung eines Agonisten einfach geändert werden kann (Rosenbaum, Rasmussen et al. 2009). Ebenfalls zur Stabilisierung des inaktiven Zustandes eines Rezeptors tragen die polaren Interaktionen zwischen einem Glutamat innerhalb der TM6 und dem hochkonservierten E(D)RY-Motiv in TM3 bei. Bei Letzterem handelt sich um eine Glutamat- (Aspartat) Arginin-Tyrosin-Sequenz, wobei das Glu134 mit dem benachbarten Arg135 eine intrahelikale Salzbrücke (Ionische Paarbindung) ausbildet. Dieses Netzwerk aus ionischen Bindungen wird weitgehend als *ionic lock* bezeichnet. Sowohl partielle als auch volle Agonisten modulieren diese Struktur zur Aktivierung eines Rezeptors (Yao, Parnot et al. 2006). Weiterhin ist bekannt, dass z. B. beim  $\beta$ -2-Rezeptor Mutationen der entsprechenden Aminosäuren eine konstitutive Aktivierung zur Folge hat (Rasmussen, Jensen et al. 1999; Ballesteros, Jensen et al. 2001).

### 1.2.2 Signaltransduktion durch $G\alpha$ -Untereinheiten

Natürliche und synthetische Liganden sind in der Lage, Rezeptoren zu aktivieren. Sie können in vier Gruppen eingeteilt werden: volle Agonisten, welche die maximale Rezeptorstimulation hervorrufen; partielle Agonisten, die selbst bei maximaler Sättigung nicht in der Lage sind, die volle Rezeptoraktivität zu evozieren; neutrale Antagonisten, welche keinen Effekt auf die Rezeptoraktivität haben, jedoch durch Bindung an den Rezeptor eine Blockade der Bindungsstelle bewirken und somit die Bindung anderer Liganden verhindern; und inverse Agonisten, die eine vorhandene Basalaktivität reduzieren (Rosenbaum, Rasmussen et al. 2009).



**Abbildung 2:** Schematische Darstellung der Wirkung von den vier Gruppen der Liganden an einem G-Protein koppelnden Rezeptor (GPCR) mit Basalaktivität. Ein voller Agonist (dunkelgrün) ruft durch Bindung die maximale Rezeptorstimulation hervor. Der partielle Agonist (hellgrün) hingegen ist selbst bei maximaler Sättigung nicht imstande, die volle Rezeptoraktivität zu evozieren. Im Fall des neutralen Antagonisten (orange) wird kein Effekt auf die Rezeptoraktivität erzielt, jedoch erfolgt durch die Bindung an den Rezeptor eine Blockade der Bindungsstelle, wodurch die Bindung anderer Liganden verhindert wird. Erfolgt die Bindung eines inversen Agonisten (rot) wird eine vorhandene Basalaktivität durch Hemmung der Interaktion mit dem G-Protein reduziert.

Grundsätzlich lassen sich innerhalb einer GPCR-Maschinerie drei Bereiche unterscheiden: den Rezeptor in seinem üblichen Aufbau, einen Überträger (Transducer) und den Effektor. Als Transducer sei in diesem Fall z. B. das zu koppelnde zytoplasmatische G-Protein genannt und als Effektor z. B. Enzyme wie die Proteinkinase A (Gilman 1987; Nürnberg, Gudermann et al. 1995). Die sog. Guaninnukleotid-bindenden Proteine (G-Proteine) gehören zu der Superfamilie der GTP-bindenden Proteine bzw. der GTPasen und haben eine hochkonservierte Sequenz. G-Proteine sind Heterotrimere, welche aus einer  $\alpha$ -,  $\beta$ - und  $\gamma$ -Untereinheit bestehen. Dabei ist die  $G\alpha$ -Untereinheit in der Lage, Guanosintriphosphat (GTP) bzw. Guanosindiphosphat (GDP) zu binden; außerdem klassifiziert sie das jeweilige G-Protein (Birnbaumer 1990). Mehr als 20 verschiedene  $G\alpha$ -Subtypen sind in Säugetieren bekannt. Diese werden aufgrund ihrer Aminosäuresequenz in vier verschiedene Subfamilien gegliedert:  $G\alpha_s$ ,  $G\alpha_{i/o}$ ,  $G\alpha_{q/11}$  und  $G\alpha_{12/13}$ . Ausgehend von ihrer Nukleotidsequenz weisen zwei dieser Subfamilien,  $G\alpha_{i/o}$  und  $G\alpha_{12/13}$ , einen hohen Verwandtschaftsgrad auf. Jeder Vertreter dieser Subfamilie übt eine GTPase-Aktivität aus. Die Aktivierung dieser G-Proteine erfolgt durch die Interaktion mit spezifischen intrazellulären Segmenten eines durch Liganden aktivierten Rezeptors. Dadurch wird das GDP durch GTP an der  $G\alpha$ -Untereinheit ausgetauscht und diese trennt sich vom  $G\beta\gamma$ -Komplex (Nürnberg, Gudermann et al. 1995). Diese Aktivierung ist ein Magnesium-abhängiger Prozess (Birnbaumer 1990). Letztendlich führt die GTPase-Aktivität des G-Proteins zur GTP-Hydrolyse; dabei dissoziiert die GDP-gebundene  $G\alpha$ -Untereinheit vom Effektor und bildet erneut das heterotrimere G-Protein. Dieses steht nun einem erneuten Zyklus zur Verfügung.

Die  $G\alpha_s$ -Proteine aktivieren die membranständige Adenylatzyklase (adenylyl cyclase, AC). Diese ist in der Lage, aus intrazellulärem Adenosintriphosphat (ATP) das zyklische Adenosin-3'-5'-monophosphat (cyclic adenosin-3'-5'monophosphate, cAMP) zu bilden, welches die Proteinkinase A (PKA) aktiviert. Diese Kinase reguliert durch Phosphorylierung die Aktivität einer Reihe von zellulären Proteinen (Rosenbaum, Rasmussen et al. 2009). Im Sinne einer negativen Rückkopplung ist es ebenfalls die  $G\alpha_s$ -Untereinheit, welche eine Phosphodiesterase (PDE) aktiviert. Dadurch kann der second messenger cAMP wieder zu Adenosin-3'-5'-monophosphat (AMP) abgebaut werden (Birnbaumer 1990).

Wird jedoch ein  $G\alpha_{i/o}$ -koppelnder Rezeptor aktiviert, so dissoziiert  $G\alpha_{i/o}$  auf dieselbe Art und Weise wie  $G\alpha_s$ , und es kommt zur Hemmung der AC mit erniedrigten cAMP-Mengen. Eine wesentliche Rolle innerhalb dieser Signalkaskade spielt die  $G\beta\gamma$ -Untereinheit, die ebenfalls imstande ist, die AC zu inhibieren. Weiterhin ist sie z. B. in der Lage, einwärtsgerichtete  $K^+$ -Kanäle zu öffnen bzw. zwei Isoenzyme der PLC- $\beta$  zu aktivieren. Eine irreversible Blockierung der  $G\alpha_{i/o}$ -koppelnden Rezeptoren kann mithilfe des Pertussistoxins erfolgen. Es ist das Toxin des gramnegativen Bakteriums *Bordetella pertussis*, dem Erreger des Keuchustens (Gilman 1987; Birnbaumer 2007; Birnbaumer 2007).

Bindet ein Ligand und es kommt zur Aktivierung eines  $G\alpha_{q/11}$ -Proteins, aktiviert dieses seinerseits die Phospholipase C- $\beta$  (PLC- $\beta$ ). Diese Familie der Phospholipasen wird nicht nur direkt durch die  $G\alpha$ -Untereinheit aktiviert, sondern auch durch die  $G\beta\gamma$ -Untereinheit oder durch zweiwertige Calciumionen. Einige Unterformen der Phospholipase C- $\beta$  können ebenfalls durch das GTP-bindende Protein Rac, eine Phosphatidsäure, reguliert werden (Kadamur and Ross 2012). Grundsätzlich konvertieren jedoch alle Mitglieder der verschiedenen Familien der Phospholipase C- $\beta$  membranständiges Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat (PIP2) in Diacylglycerin (DAG) und Inositol-1,4,5-trisphosphat (IP3), welche beide als second messenger wirken. DAG seinerseits stimuliert eine Reihe verschiedener Enzyme wie z. B. die Proteinkinase C (PKC). Zudem ist es Substrat für die Bildung der regulatorischen Phosphatidsäure. IP3 öffnet die am Endoplasmatischen Retikulum gelegenen  $Ca^{2+}$ -Kanäle und erhöht damit die zytosolische Calciumkonzentration. Außerdem dient dieser second messenger als Substrat für die Synthese von Inositolpolyphosphat, welches verschiedene Proteinkinasen, die Transkription und auch die mRNA-Prozessierung stimuliert (Kadamur and Ross 2012).

Welches G-Protein letztendlich an einen Rezeptor gekoppelt wird, ist abhängig von der Sequenz des dritten intrazellulären Loops (icl3) (Lefkowitz 2007).

### 1.3 Trace amine-associated Rezeptoren

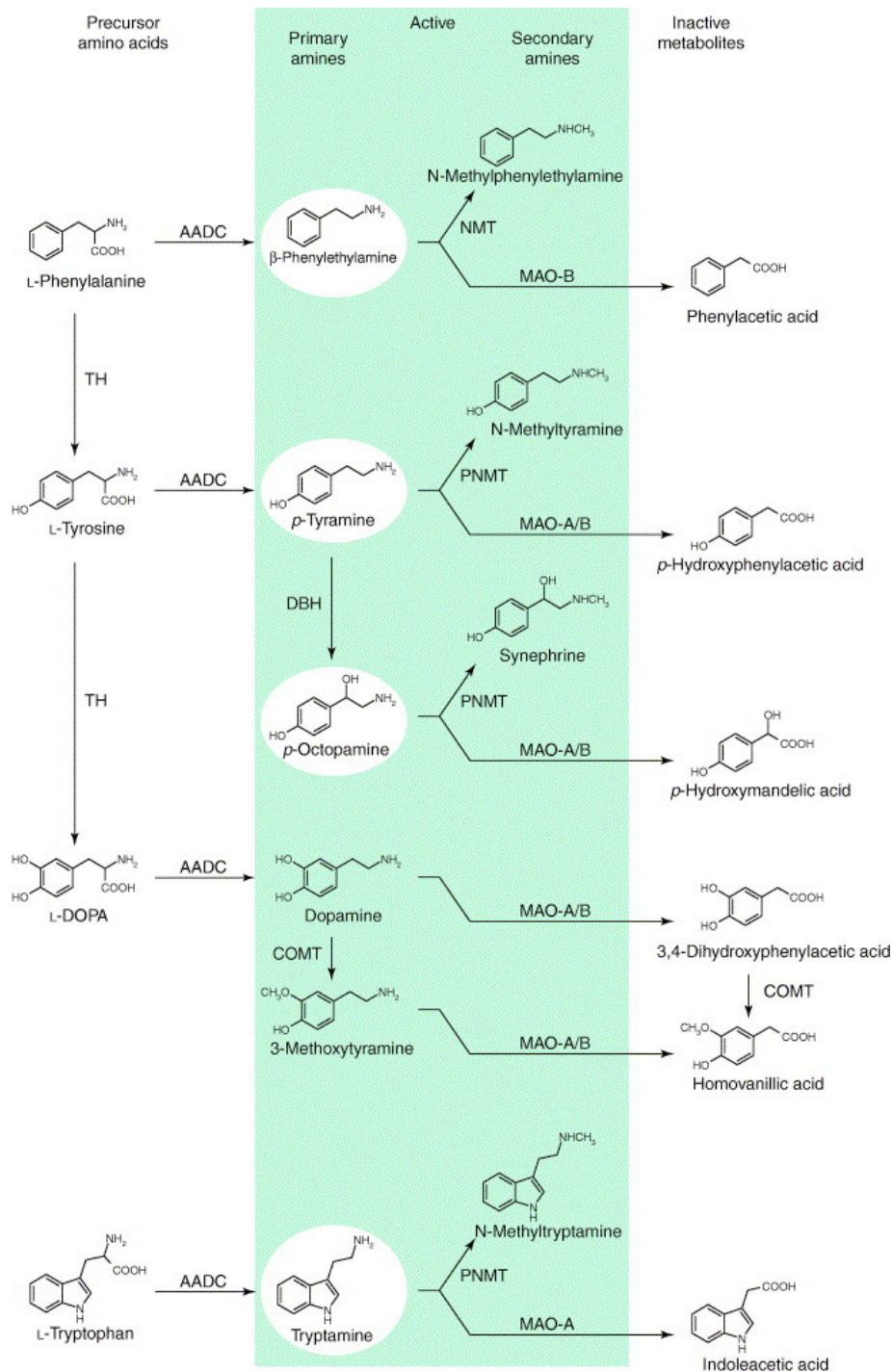
Auf der Suche nach weiteren Serotonin-Rezeptor-Subtypen wurde 2001 ein neuer G-Protein-koppelnder Rezeptor kloniert, welcher eine im Nanobereich liegende hohe Affinität zu Spurenaminen zeigte (trace amines). Aufgrund dieser Eigenschaft wurde der

---

Rezeptor „trace amine receptor 1“ (TA<sub>1</sub>) genannt. Im Folgenden wurden weitere Mitglieder dieser neuen Familie der trace amine receptors kloniert. Dies führte zu der Erkenntnis, dass nicht jeder Rezeptor eine Affinität zu den Spurenaminen aufwies, weshalb die Nomenklatur geändert wurde und die im Menschen bekannten neun Subtypen seitdem als „trace amine-associated receptors“ (TAARs) bezeichnet werden (Borowsky, Adham et al. 2001; Lindemann, Ebeling et al. 2005). Da die Entdeckung und Charakterisierung der TAARs vor allem durch die Liganden erfolgte, werden diese zunächst näher untersucht.

### 1.3.1 Physiologische Effekte von Spurenaminen

Trace amines (Spurenamine) sind hinsichtlich ihrer Struktur, dem Metabolismus und ihrer zellulären Lokalisation ähnlich den biogenen Aminen. Zu den biogenen Aminen zählen u. a. Serotonin, Noradrenalin, Adrenalin, Dopamin und Histamin. Die wichtigsten Vertreter der trace amines sind p-Tyramin,  $\beta$ -Phenylethylamin, Tryptamin und Octopamin. Sie alle kommen im zentralen Nervensystem von Säugetieren vor und wurden in einen Zusammenhang mit verschiedenen psychischen Erkrankungen wie z. B. Schizophrenie, Depression, Migräne und Parkinson gebracht (Lindemann and Hoener 2005). Um diese Erkrankungen besser therapieren zu können, liegt ein besonderer Schwerpunkt auf dem Verstehen der physiologisch ablaufenden Prozesse im Gehirn, so dass den trace amines und möglichen Rezeptoren ein immer größer werdendes Interesse zukommt. Trace amines werden durch direkte enzymatische Decarboxylierung ihrer zugehörigen Aminosäure gebildet bzw. – wie im Fall von Octopamin – durch zusätzliche Konversion durch die Dopamin  $\beta$ -Hydroxylase (DBH) (Lindemann and Hoener 2005). Die Bildung ihrer inaktiven Metaboliten erfolgt über den Abbau durch die Monoaminoxidase A und B (MAO-A bzw. MAO-B) (Lindemann and Hoener 2005).



**Abbildung 3:** Bildung und enzymatischer Abbau der trace amines.

Sie werden durch direkte enzymatische Decarboxylierung ihrer zugehörigen Aminosäure gebildet. Im Fall von Octopamin ist zusätzlich eine Konversion durch die Dopamin β-Hydroxylase vonnöten (DBH).

Quelle: (Lindemann and Hoener 2005)

Da die endogenen Liganden nur eine sehr kurze Halbwertszeit von ca. 30 Sekunden haben (Durden and Philips 1980), liegen extrazelluläre Konzentrationen im Gehirn im



niedrigen Nanomolar-Bereich und somit deutlich unter dem Niveau der klassischen biogenen Amine (Lindemann and Hoener 2005).

Interessanterweise aktivieren sowohl  $\beta$ -Phenylethylamin als auch Tyramin den TAAR1 in Mensch, Maus und Ratte. Tryptamin hingegen ist zwar imstande, die Nagetier-Varianten, jedoch nicht den humanen TAAR1 anzuregen. Octopamin zeigt mit einer deutlich verringerten Potenz ebenfalls veränderte Eigenschaften hinsichtlich der Aktivierung des humanen TAAR1 (Lindemann and Hoener 2005). Insgesamt konnte gezeigt werden, dass Spurenamine nur in der Lage sind, den TAAR1, TAAR2 und TAAR4 als Agonisten anzuregen (Borowsky, Adham et al. 2001; Lindemann and Hoener 2005).

Somit ist es vor allem die Polypharmakologie, welche das Verständnis der Rolle der Liganden, aber auch der TAARs mit ihrer Biologie so schwer macht.

### 1.3.2 Pathophysiologische Effekte von Spurenaminen

Trace amines wurden in Zusammenhang mit verschiedenen Erkrankungen gebracht. So zeigten sich deutlich erniedrigte Konzentrationslevel an Octopamin sowie merklich erhöhte Konzentrationen an Tyramin in weiblichen bulimischen Patienten. Bei anorektischen Patientinnen schienen die Plasmakonzentrationen an Octopamin und Tyramin in normalen Bereichen zu liegen, jedoch ließ sich hier eine antiproportionale Korrelation zwischen den Octopaminkonzentrationen und dem Körpergewicht finden. Es wird vermutet, dass höhere Octopaminkonzentrationen mit einer deutlicheren Schwere der Anorexie einhergehen (D'Andrea, Ostuzzi et al. 2008). Beide Moleküle sind Bestandteile des Tyrosin-Metabolismus und scheinen indirekt Einfluss auf den BMI (Body Mass Index) zu nehmen. Die psychische Komponente dieser Erkrankungen ist erheblich und wahrscheinlich in einer Neuromodulation begründet. Es ist daher plausibel, dass auch die weitverbreitete Erkrankung der Migräne, in deren Ätiologie ebenfalls der Tyrosin-Metabolismus eine Rolle spielt, gleichermaßen im Zusammenhang mit erhöhten Plasmakonzentrationen von Octopamin gesehen wird (D'Andrea, Nordera et al. 2007). Es ist in diesem Fall unerheblich, ob sich die Migräne mit oder ohne eine vorhergehende Aura präsentierte. Auch bei Patienten mit Cluster-Kopfschmerzen ließen sich erhöhte Konzentrationen an Octopamin und Tyramin finden (D'Andrea, Nordera et al. 2007).

Zusätzlich konnte gezeigt werden, dass sowohl Tyramin als auch  $\beta$ -Phenylethylamin in der Lage sind, den Blutdruck zu steigern und eine Vasokonstriktion der Aorta hervorzurufen (Broadley 2010; Fehler, Broadley et al. 2010). Dabei konnte ein zunächst angenommener, indirekt sympathomimetischer Effekt ausgeschlossen werden. Da sowohl der Taar1 als auch der Taar4 in der Aorta von Ratten nachgewiesen wurden, werden diese möglicherweise durch die trace amines aktiviert (Fehler, Broadley et al. 2010).

Des Weiteren konnten Effekte am isolierten Rattenherzen belegt werden. Hierbei wurden diese mit verschiedenen Spurenaminen-haltigen Lösungen künstlich durchblutet. Im Fall von Octopamin,  $\beta$ -Phenylethylamin und Tryptamin konnte ein dosisabhängiger, negativ inotroper Effekt am Herzen beobachtet werden, erkennbar am reduzierten Schlagvolumen. Weiterhin waren bis auf Tryptamin alle trace amines in der Lage, einen positiv chronotropen Effekt, also eine Steigerung der Herzfrequenz, hervorzurufen (Frascarelli, Ghelardoni et al. 2008). Diese Versuche wurden auch bei Blockade der  $\beta$ -adrenergen Rezeptoren durchgeführt. Interessanterweise war hier der positiv chronotrope Effekt nicht mehr zu beobachten, weiterhin jedoch der negativ inotrope. Dies lässt die Autoren vermuten, dass die positiv chronotropen Effekte ein durch trace amines vermittelter adrenerger Effekt sind. Zusätzlich könnte der negativ inotrope Effekt direkt durch trace amine-associated receptors vermittelt sein (Frascarelli, Ghelardoni et al. 2008).

### 1.3.3 Effekte von 3-Iodothyronamin

Thyronamine wurden von verschiedenen Arbeitsgruppen in den 1930er–1970er-Jahren initial synthetisiert und auf ihren Metabolismus hin untersucht (TOMITA and LARDY 1956; Meyer and Hesch 1983; Han, Gordon et al. 1987). Dennoch war es erst die Arbeitsgruppe um Thomas Scanlan, welche sich – unter der Annahme, dass die Aromatische-L-Aminosäure-Decarboxylase (AADC) fähig ist, die Alanin-Seitengruppe der Schilddrüsenhormone zu decarboxylieren – dieser Thyronaminen im Besonderen annahm (Scanlan, Suchland et al. 2004). Sie waren auch diejenigen, welche den entscheidenden Beweis erbrachten, dass Thyronamine tatsächlich endogene Moleküle sowohl in Nagetier- als auch in humanen Geweben sind (Zucchi, Chiellini et al. 2006; Scanlan 2009). Die Synthese der Thyronamine ist nicht hinreichend geklärt, jedoch erscheinen Thyronamine als decarboxylierte und deiodinierte Schilddrüsenhormone. Es

ist die Alanin-Seitenkette, welche decarboxyliert ist. In diesem Zusammenhang wird vermutet, dass die Deiodinasen I–III ebenfalls beteiligt sind (Scanlan, Suchland et al. 2004; Piehl, Hoefig et al. 2010).

Ein sehr wichtiger Vertreter ist das 3-Iodothyronamin (3-T<sub>1</sub>AM), welches nicht nur in humanem Blut nachgewiesen werden konnte, sondern auch in verschiedenen murinen Organen wie Herz, Leber, dem weißen Fettgewebe oder dem Gehirn (Piehl, Hoefig et al. 2010; Galli, Marchini et al. 2012). Inwieweit jedoch 3-T<sub>1</sub>AM wirklich mithilfe der momentanen Methoden quantifiziert werden kann, ist umstritten. Die gemessenen Level bewegen sich im Rahmen von 60 nM. 3-T<sub>1</sub>AM liegt dabei im humanen Serum nicht nur frei vor, sondern auch gebunden an das in der Leber synthetisierte Apolipoprotein B100 (Piehl, Hoefig et al. 2010; Saba, Chiellini et al. 2010). Eine genaue physiologische Funktion dieser Moleküle ist noch nicht hinreichend geklärt, sodass auch eine wichtige intrazelluläre Rolle nicht auszuschließen ist. Mittels welchen Transporters die Thyronamine in die Zelle gelangen könnten, ist bislang ebenfalls nicht abschließend erforscht. Nichtsdestotrotz konnte gezeigt werden, dass die Aufnahme von 3-T<sub>1</sub>AM Natrium- und Chlorid-unabhängig, jedoch pH-abhängig ist. Letzteres lässt vermuten, dass die 3-T<sub>1</sub>AM-Aufnahme von einem auswärtsgerichteten Protonen-Gradienten bzw. von einem einwärtsgerichteten Hydroxid-Gradienten gesteuert ist (Ianculescu, Giacomini et al. 2009). Allerdings lässt die Natrium- und Chlorid-unabhängige Aufnahme die Beteiligung von verschiedenen Transportern wie z. B. des MCT8 (Monocarboxylat-Transporter 8) vermuten, einem Schilddrüsenhormontransporter. Im Rahmen dieser Untersuchungen konnte keinem der Proteine die 3-T<sub>1</sub>AM-Aufnahme in die Zelle wirklich nachgewiesen werden (Ianculescu, Giacomini et al. 2009). Im Rahmen eines mathematischen Modells, basierend auf den dynamischen Transporten von Hormonen wie z. B. Insulin, wurde versucht, den Transport und die Konversion von T<sub>1</sub>AM zu identifizieren (Orsi, Ghelardoni et al. 2014). Dabei scheinen vor allem eine Downregulierung der Rezeptoren an der Zelloberfläche eine besondere Rolle zu spielen.

Als Abbauprodukte kommen verschiedene Thyronamine in Betracht. 3-T<sub>1</sub>AM ist Substrat für die Deiodinase Typ III, die Monoaminooxidase (MAO) sowie die Semicarbazid-sensitive Aminooxidase (SSAO) (Piehl, Hoefig et al. 2010). Eine durch die beiden zuletzt genannten Enzyme katalysierte oxidative Desaminierung, gefolgt von

einer Oxidation, würde zu einer Produktion von 3-Iodothyroacetic acid ( $TA_1$ ) führen. Lediglich eine einfache Deiodierung von 3- $T_1AM$  würde Thyronamin ( $T_0AM$ ) bilden, konnte jedoch nicht detektiert werden (Saba, Chiellini et al. 2010).

Um zu sehen, welchen Effekt 3- $T_1AM$  auf die Physiologie hat, wurden ausgewachsenen männlichen C57BL/6J-Mäusen intraperitoneal verschiedene Dosen injiziert. Dabei fielen insbesondere eine ausgeprägte Hypothermie sowie eine zunehmende Inaktivität der Tiere auf. Der Temperaturabfall erwies sich in diesem Zusammenhang als dosisabhängig. Erstaunlicherweise zeigten die Tiere weder Shivering, d. h. ein Zusammendrängen mit anderen Tieren, um sich zu wärmen, noch ein Aufrichten der Haare. Des Weiteren fiel eine Ptosis auf, ein herunterhängendes Augenlid (Scanlan, Suchland et al. 2004).

Vor allem die Hypothermie ist im Kontext von neuroprotektiven Maßnahmen nach Ischämie bedeutend. Der protektive Effekt ist dabei abhängig von der Dauer und der Intensität sowie dem Zeitpunkt relativ zum Apoplex. So konnte gezeigt werden, dass die Infarktareale im Mausmodell nach Okklusion der Arteria cerebri media wesentlich kleiner waren, wenn 3- $T_1AM$  direkt nach dem ischämischen Ereignis appliziert oder auch schon prophylaktisch eingesetzt wurde. Eine mögliche pharmakologische Anwendung als kryogene Substanzen in der Akutbehandlung von Schlaganfällen ist zu überprüfen (Doyle, Suchland et al. 2007). Neben diesen neuroprotektiven Eigenschaften zeigte sich 3- $T_1AM$  gleichermaßen kardioprotektiv, ebenfalls ein möglicher pharmakologischer Ansatzpunkt (Frascarelli, Ghelardoni et al. 2011). Auch für Trijodthyronin konnten protektive Mechanismen, allerdings bei Myokardinfarktmodellen bei chronischem Diabetes, nachgewiesen werden (Weltman, Ojamaa et al. 2014).

Weiterhin wurde nach intraperitonealer Injektion von 50 mg/kg 3- $T_1AM$  in Wildtyp-Mäusen eine massive Hyperglykämie festgestellt, welche zwei Stunden nach Applikation ihren Höhepunkt mit 250 % des basalen Levels erreichte und sich nach acht Stunden wieder auf normale Werte herunterregulierte. Zudem waren ebenfalls nach zwei Stunden nur 40 % des normalen Insulin-Levels im Blut zu messen. Erstaunlicherweise führte die Gabe von exogenem Insulin rasch zu normalen Blutglucosewerten, sodass die Sensitivität der peripheren Gewebe gegenüber Insulin auch nach der 3- $T_1AM$ -Behandlung noch erhalten war (Regard, Kataoka et al. 2007). Da nicht klar ist, ob es sich hierbei um eine Änderung der Insulin- und/oder Glukagon-

Sekretion handelt, wurde die T<sub>1</sub>AM-Aufnahme in Hepatozyten untersucht. Interessanterweise zeigte sich eine signifikante Aufnahme von Thyronines und Thyronamines in Hepatozyten. Außerdem konnte eine Stimulation der Glukoneogenese und Ketogenese durch mikromolare Dosen von T<sub>1</sub>AM beobachtet werden (Ghelardoni, Chiellini et al. 2014). Diese Effekte waren unabhängig von hormonellen Regulationsmechanismen und könnten somit eine bedeutende physiologische Rolle spielen. Eine intracerebrale Infusion von T<sub>1</sub>AM wurde ebenfalls untersucht. Hierbei zeigte sich eine Regulierung im Zusammenhang mit Lernen und Gedächtnis, eine Modulation des Schlafrhythmus und der Fütterung sowie eine erniedrigte Schmerzschwelle (Zucchi, Accorroni et al. 2014).

3-Iodothyronamin scheint somit nicht nur hinsichtlich der Regulation von Glucose und Fettstoffwechsel eine Rolle zu spielen. So zeigt sich unter anderem eine gesteigerte Nahrungsaufnahme in Nagetieren nach 3-T<sub>1</sub>AM-Applikation (Dhillon, Bewick et al. 2009). Weiterhin konnte in Dschungarischen Hamstern (*Phodopus sungorus*) nach Applikation von 50 mg/kg 3-T<sub>1</sub>AM nicht nur ein Abfall der Körpertemperatur gezeigt werden, sondern ebenfalls ein Abfall der metabolischen Rate (VO<sub>2</sub>) und des respiratorischen Quotienten von ca. 0,9 auf ca. 0,7. Zudem wurden nach der Gabe von 3-T<sub>1</sub>AM eine Ketonurie und eine signifikante Reduktion des Körpergewichtes beobachtet. In der Zusammenschau dieser Ergebnisse lässt dies eine Blockade des Kohlenhydratstoffwechsels vermuten, weshalb eine verstärkte Fettstoffwechselaktivität notwendig ist (Bräulke, Klingenspor et al. 2008).

#### 1.3.4 Die TAAR- Familie

Die TAARs gehören zur GPCR-Superfamilie und zählen hier aufgrund ihrer Sequenzhomologien und strukturellen Eigenschaften zu der Familie der A-Rezeptoren. Im Rahmen von genomweiten Forschungen nach weiteren Serotonin-Rezeptor-Subtypen wurden sie zum ersten Mal 2001 von Borowsky und Mitarbeitern erkannt. Es konnte gezeigt werden, dass unter anderem trace amines in der Lage sind, als deren Aktivatoren zu fungieren (Borowsky, Adham et al. 2001). Im Menschen sind bis auf Rezeptor 2 alle Rezeptoren single-exon genes mit einer Größe von ca. 1 kb. TAAR2 bildet mit zwei Exons und verschiedenen Splicingvarianten eine Ausnahme. Der humane TAAR1 enthält 339 Aminosäuren mit kurzen Amino- und Carboxytermini (Lindemann, Ebeling et al. 2005; Lindemann and Hoener 2005). Es finden sich alle

Rezeptoren gebündelt auf Chromosom 6q23.1 in einer Region von 100–200 kb. Eine mögliche Erklärung dafür ist die Annahme, dass sie als Duplikationen entstanden sind. Aufgrund seiner hohen Homologie sieht man den humanen Serotonin-Rezeptor 4 (5-HT<sub>4</sub>) als Ursprung an (Lindemann and Hoener 2005). Im Menschen sind es neun verschiedene Gene für die TAARs, wobei davon mindestens drei Pseudogene sind (TAAR3, TAAR4 und TAAR7), deren genaue Funktion noch nicht geklärt ist. Im direkten Vergleich hat der Mensch gegenüber der Maus und der Ratte die meisten Pseudogene. Die Maus verfügt über 16 TAAR-Gene mit einem Pseudogen und die Ratte über 19 TAAR-Gene mit zwei Pseudogenen (Lewin 2006).

Mensch	Maus	Ratte
hTAAR1	mTaar1	rTaar1
hTAAR2	mTaar2	rTaar2
hTAAR3 Pseudogen	mTaar3	rTaar3
hTAAR4 Pseudogen	mTaar4	rTaar4
hTAAR5	mTaar5	rTaar5
hTAAR6	mTaar6	rTaar6
hTAAR7 Pseudogen	mTaar7a,b,d-f mTaar7c Pseudogen	rTaar7a-e,g rTaar7f P, 7i Pseudogen
hTAAR8	mTaar8 a-c	rTaar8 a-c
hTAAR9 Pseudogen?	mTaar9	rTaar9
Σ 9 genes, 3-4 Pseudogene	Σ 16 genes, 1 Pseudogen	Σ 19 genes, 2 Pseudogene

**Abbildung 4:** Übersicht über die Rezeptoren der TAAR-Familie in den drei verschiedenen Spezies.

Grundsätzlich gibt es neun verschiedene Rezeptoren in allen drei Spezies. Jedoch lassen sich bei den Nagetieren teilweise noch Subtypen identifizieren. Beim Menschen finden sich drei bzw. vier Pseudogene. Im Fall von TAAR9 kam es bisher zu keiner eindeutigen Identifizierung, ob dieser ein Pseudogen ist. Interessanterweise sind die TAARs 3 und 4 nur im Menschen Pseudogene und bei den Nagetieren funktionstüchtig, wobei deren genaue Aufgabe und Funktion noch nicht hinreichend geklärt ist. Im Vergleich dazu ist der humane

TAAR7, welcher ein Pseudogen ist, beim Nagetier nur mit einigen Subtypen als Pseudogen identifiziert worden.

TAARs sind sehr niedrig-exprimierte Gene, so konnten z. B. für den hTAAR1 nur 15–100 copies/ng cDNA in der Amygdala nachgewiesen werden bzw. <15 copies/ng cDNA im Kleinhirn, dem Hippocampus und dem Hypothalamus (Lewin 2006).

Bislang kennt man lediglich von sehr ausgewählten Rezeptoren die Art der G-Protein-Kopplung. So ist, wie bereits erwähnt, bekannt, dass der TAAR1 sowohl in der murinen als auch in der humanen Variante  $G\alpha_s$  koppelt und somit eine aktivierende Funktion innehat (Borowsky, Adham et al. 2001; Scanlan, Suchland et al. 2004). Auch für den Taar4 konnte dieser Weg der Signaltransduktion nachgewiesen werden (Stäubert, Bösel et al. 2010). Weiterhin ist für den murinen Taar5 eine geringe Basalaktivität für  $G\alpha_s$  bekannt, jedoch zeigte der humane Rezeptor keinerlei Aktivität für diesen Signalweg. Interessanterweise konnte jedoch für beide Varianten eine hohe Basalaktivität für  $G\alpha_{q/11}$  nachgewiesen werden (Dinter, Muhlhaus et al. 2015). Bis heute ließ sich kein weiterer Subtyp identifizieren, der  $G\alpha_{q/11}$  koppelt.

### 1.3.5 TAAR8 in der Rattenherzphysiologie

Nach Applikation von 3-Iodothyronamin (3-T<sub>1</sub>AM) wurden negativ chronotrope sowie negativ inotrope Effekte an Nagetierherzen beobachtet. Obwohl man im Rahmen dieser Untersuchungen feststellte, dass 3-T<sub>1</sub>AM ein potenter Agonist für den Ratten- und murinen Taar1 ist, kam dieser – wie unten ausgeführt – nicht als Erklärung für die induzierten Effekte in Betracht.

Interessanterweise zeigten sich die durchschnittlichen 3-T<sub>1</sub>AM-Konzentrationen von 68 pmol/g in Rattenherzen korrespondierend zu den Konzentrationen von anderen klassischen Modulatoren der Herzphysiologie, wie z. B. Adrenalin, Dopamin und Adenosin (Chiellini, Frascarelli et al. 2007). Auch sind damit die Konzentrationen von den klassischen Schilddrüsenhormonen Trijodthyronin (T3) und Thyroxin (T4) um den Faktor 20 und 2 deutlich überschritten (Chiellini, Frascarelli et al. 2007). Mittlerweile konnte mithilfe einer neuen Liquid-Chromatographie-Tandem Massenspektrometrie-Methode eine Erhöhung der Konzentration von Schilddrüsenhormonen in Kardiomyozyten nach exogener Applikation ins Serum nachgewiesen werden, was eine lokale

Aktivität dieser Moleküle und ihrer Derivate, wie z. B. T<sub>1</sub>AM, sehr wahrscheinlich macht (Saba, Donzelli et al. 2014).

Die am Herzen hervorgerufenen Effekte von 3-T<sub>1</sub>AM zeigten in ihrer Reihenfolge der Potenziale und Affinitäten aus Ligandenbindungsstudien eine andere Auflistung im Vergleich zu der Aktivierung des TAAR1, was vermuten ließ, dass ein anderer Rezeptor für diese induzierten Effekte innerhalb der TAAR-Familie verantwortlich sein musste (Frascarelli, Ghelardoni et al. 2008). Es ist bekannt, dass negative Modulierungen der Herzphysiologie nur durch eine G $\alpha_{i/o}$ -Aktivierung erklärbar sind. Innerhalb der TAAR-Familie war ein solcher in der Literatur nicht bekannt. Aus diesem Grund stellte sich die Frage, ob es in der Literatur Hinweise bzgl. der Expression von einem oder mehreren dieser Rezeptoren gab. Im Jahr 2007 veröffentlichte die Arbeitsgruppe um Riccardo Zucchi in Pisa eine Arbeit, in der sie mithilfe quantitativer PCR zeigen konnten, dass von den Rezeptoren innerhalb der TAAR-Familie hauptsächlich der Taar8a im Rattenherzen exprimiert ist. Transkripte fanden sich in einer 35- bis zu 116-fachen Konzentration im Vergleich zu anderen TAARs (Chiellini, Frascarelli et al. 2007). Es ist bis heute der einzige Nachweis für eine signifikante Expression von TAARs im Herzen.

Da sowohl die eigentlichen Liganden nicht bekannt sind als auch die ursprüngliche Funktion von Taar8b noch nicht hinreichend geklärt ist, wird der Rezeptor als sog. orphaner Rezeptor beschrieben. Erst im Jahr 2012 wurden mithilfe quantitativer Real-Time PCR mRNA Transkripte von Taar8 in Milz, Darm und Hoden der Maus nachgewiesen. Eine Expression des Taar8a im Rattenherzen wurde bestätigt; zudem konnte die Expression auf Transkriptionsebene u. a. in verschiedenen Gehirnarealen, Lunge, Muskel und Hoden gezeigt werden (Chiellini, Erba et al. 2012).

### 1.3.6 Effekte von 3-Iodothyronamin am Herzen

3-T<sub>1</sub>AM führt somit zu einem Hypometabolismus, in dem der Organismus in einen quasi ruhenden, fastenden Zustand überführt wird; hierbei wird überdies nicht nur die Körpertemperatur, sondern auch die Herzphysiologie herunterreguliert. So konnten in Studien am Nagetierherzen nach einer 3-T<sub>1</sub>AM-Applikation vornehmlich zwei verschiedene Effekte beobachtet werden: Zum einen zeigte sich nach intraperitonealer Injektion von 50 mg/kg 3-T<sub>1</sub>AM ein negativ chronotroper Effekt an erwachsenen männlichen C57BL/6J-Mäusen. Diese Bradykardie hielt für 6–8 Stunden an und normalisierte sich ohne weitere Zugabe von pharmakologisch wirksamen Substanzen



(Scanlan, Suchland et al. 2004). Zusätzlich wurden Untersuchungen an *ex vivo*-Herzpräparaten der Ratte durchgeführt, die mit 3-T<sub>1</sub>AM-haltigen Lösungen perfundiert wurden. Es zeigten sich bei einer Konzentration zwischen 20–38 µM an 3-T<sub>1</sub>AM negativ inotrope Effekte, nachgewiesen durch einen reduzierten systolischen Aortendruck und ein vermindertes Schlagvolumen (Scanlan, Suchland et al. 2004). Thyronamine haben also im Vergleich zu Schilddrüsenhormonen einen gegenteiligen Effekt. Sie beeinflussen am Herzen vor allem die Kontraktilität, den peripheren Widerstand, also die Nachlast, und die Ejektionsfraktion (Weltman, Ojamaa et al. 2014). Davon ausgehend wird vermutet, dass die Schilddrüsenhormonderivate die direkten Gegenregulatoren seien, zumal Thyronamine direkt am Herzgewebe synthetisiert werden können (Zucchi, Ghelardoni et al. 2010).

Da die zusätzliche Gabe von sympathomimetischem Isoproterenol weiterhin positiv chronotrope und inotrope Effekte zeigte, konnten diese Effekte nicht durch adrenerge Rezeptoren vermittelt worden sein.

Strukturelle Gemeinsamkeiten mit verschiedenen biogenen Aminen legten den Schluss nahe, dass 3-T<sub>1</sub>AM in der Lage sein könnte, einen biogenen Amin-ähnlichen GPCR wie den TAAR1 zu aktivieren (Scanlan, Suchland et al. 2004). In nachfolgenden Experimenten wurde in *in-vitro*-Studien der TAAR1 der Ratte exprimiert und verschiedene synthetisierte Thyronamine auf ihre Fähigkeit untersucht, diesen Rezeptor zu aktivieren. Tatsächlich konnte in diesen Studien in HEK-Zellen gezeigt werden, dass 3-Iodothyronamin ebenfalls als Ligand am Taar1 von Ratte und Maus wirkt (Scanlan, Suchland et al. 2004; Hart, Suchland et al. 2006). Zusätzlich war 3-T<sub>1</sub>AM der potenteste Agonist am Taar1 mit einem EC<sub>50</sub>-Wert von 14 nM bei der Ratte und 112 nM beim murinen Rezeptor (Scanlan, Suchland et al. 2004). Obwohl TAAR1-Transkripte in der Ventrikelwand bei Ratten gefunden wurden (Chiellini, Frascarelli et al. 2007), steht fest, dass dieser nicht für die am Herzen induzierten Effekte in Frage kommt:

Zum einen zeigte die TAAR1-knockout-Maus keine signifikanten Veränderungen bzgl. Gesundheitszustand, Lebenserwartung, Fertilität, Körpergewicht oder Körpertemperatur (Lindemann, Meyer et al. 2008). Als einziges fiel ein gemindertensensomotorisches Gating auf. Hierbei handelt es sich um ein neurologisches Phänomen, in welchem ein schwacher Prästimulus, genannt prepulse, die Reaktion eines Organismus auf einen stärkeren Stimulus inhibiert. Des Weiteren schienen die Mäuse aktiver zu sein und

zeigten eine gesteigerte Sensitivität auf Amphetamine (Wolinsky, Swanson et al. 2007; Lindemann, Meyer et al. 2008). Überdies konnten sowohl im Rahmen der Expression von Taar1 in HEK- als auch in COS7-Zellen gezeigt werden, dass dieser Rezeptor eine  $G\alpha_s$ -Aktivierung bedingt (Borowsky, Adham et al. 2001; Lindemann, Ebeling et al. 2005). Somit aktiviert der Rezeptor die Adenylatzyklase und hat damit nur aktivierende Effekte auf die Zelle. Im Rahmen der Herzphysiologie würden also positiv inotrope oder chronotrope Effekte beobachtet werden. Weiterhin ist bekannt, dass die negativen Modulationen der Herzaktionen nur durch eine  $G\alpha_{i/o}$ -Aktivierung erklärt werden können. Nach Zusammenschau der in der Literatur veröffentlichten Fakten stellte sich die Frage nach einem  $G\alpha_{i/o}$ -koppelnden TAAR.

#### 1.4 Zielsetzung der Arbeit

Die trace amine-associated receptors werden aufgrund ihrer Sequenzhomologien und strukturellen Eigenschaften zu der Familie A innerhalb der GPCRs gezählt und werden durch Spurenamine und Thyronamine aktiviert. Sie wurden 2001 im Rahmen genomweiter Recherchen nach weiteren Serotonin-Rezeptor-Subtypen identifiziert. Diesbezüglich zeigte sich zunächst vor allem eine hohe Affinität zu Spurenaminen. Die Expression und Funktion dieser Rezeptoren ist bislang nicht hinreichend geklärt.

Im Rahmen dieser medizinischen Doktorarbeit sollten vornehmlich zwei Dinge untersucht werden:

- eine mögliche Expression des murinen Taar8b im gesunden Mausherzen und
- die funktionelle Charakterisierung des murinen Taar8b und des homologen humanen TAAR8.

Hierbei wurde das Augenmerk auf den Taar8b gelegt, da die durch  $T_1AM$ -induzierten Effekte am Herzen in einen ursächlichen Zusammenhang mit den trace amine-associated receptors gestellt wurden. Insofern diese negativen Effekte am Herzen nur durch einen  $G\alpha_{i/o}$ -koppelnden Rezeptor erklärt werden können, wurde ein solcher innerhalb der TAAR-Familie gesucht. Jedoch waren alle bislang bekannten de-orphanisierten Rezeptoren  $G\alpha_s$ -koppelnd. Der einzige Hinweis auf einen möglichen Zusammenhang zwischen Herz und TAAR fand sich in der Literatur im Nachweis des rTaar8a im Rattenherzen (Chiellini, Frascarelli et al. 2007). Aus diesem Grund wurde die Expression des homologen mTaar8b im murinen Herzen mittels verschiedener Verfahren wie der quantitativen PCR und der *in-situ*-Hybridisierung überprüft. Im

---

Rahmen der funktionellen Charakterisierung wurden die Oberflächenexpression und die Art der G-Protein-Kopplung der generierten Rezeptoren mit ihren Varianten untersucht.

## 2 Material und Methoden

### 2.1 Material

#### 2.1.1 Geräte

Übersicht über die im Laufe der Laborarbeiten genutzten Geräte:

Gerät	Bezeichnung und Hersteller
Bioruptor	Bioruptor Next Gen, Diagenode, Seraing (Ougrée), Belgium
Brutschrank	CO <sub>2</sub> -Inkubator Typ BB 6220 O2, Heraeus Instruments
Geldokumentationssystem	GeneFlash, Syngene Bio Imaging, Cambridge, UK
Gelkammern und Power Supply	Biometra, Göttingen, DE
Großraum Schüttelinkubator	Certomat <sup>®</sup> BS-1, B. Braun Biotech Internat. GmbH, Melsungen, DE
Heizblock	Thermomixer compact, Eppendorf, Hamburg, DE
iCycler	MyiQ™ Single Color Real-Time PCR Detection System, Bio-Rad Laboratories, Hercules, California, USA  Software:  Bio-Rad iCycler iQ 3.0, Bio-Rad Laboratories, Hercules, California, USA
Konfokalmikroskop	Zeiss-LSM710, Carl Zeiss AG, Oberkochen, DE
Multiplaterereader	Mithras LB 940, Berthold Technologies, Regensdord, CH

<b>Gerät</b>	<b>Bezeichnung und Hersteller</b>
Neubauer-Zählkammer	Hecht-Assistant, Sondheim, DE
Photometer	BioPhotometer, Eppendorf, Hamburg, DE Anthos reader 2001, Anthos Microsysteme GmbH, Krefeld, DE MRX Mikroplatten Reader, Dynex Technologies GmbH, Denkendorf, DE
pH-Meter	SevenEasy pH, Mettler Toledo, Gießen
Sequenzier	ABI PRISM 3130xl, Applied Biosystems®, Warrington, UK
Sterilbank	Lamin Air HBB 2448, Heraeus Instruments, Hanau, DE
Thermocycler	Eppendorf Mastercycler ep gradient S und gradient, Eppendorf AG, Hamburg, DE
Tischzentrifugen	Centrifuge 5417R/C, Eppendorf, Hamburg, DE Laborfuge 200, Heraeus Instruments, Hanau, DE
UV-Tisch	Vilber Lourmat GmbH, Eberhardzell, DE
Vakuumpumpe	2522C-02, Welch, Wisconsin, USA
Varioklav Dampfsterilisator	HP Medizintechnik GmbH, Oberschleißheim, DE
Waage	Präzisionswaage CPA 223S-OCE, Sartorius, Göttingen, DE LC 2200
Wasseranlage	Millipore Milli-Q® Biocel, Merck Millipore, Darmstadt, DE

Gerät	Bezeichnung und Hersteller
Zentrifuge	Sorvall RC 6 Plus, Thermo Scientific, Waltheim, USA

Die Geräte für die Versuche wurden vom Institut für experimentelle pädiatrische Endokrinologie (IEPE, Charité Campus Virchow Klinikum, Berlin), dem Institut für experimentelle Endokrinologie (Charité Campus Virchow Klinikum, Berlin) sowie dem Metabolic Disease Institute, Div. Of Endocrinology, Department of Medicine, University of Cincinnati (Cincinnati, USA) bereitgestellt.

### 2.1.2 Chemikalien und Substanzen

Die im Rahmen dieser Arbeit verwendeten Chemikalien wurden, wenn nicht anders vermerkt, von den Firmen Carl Roth (Karlsruhe), Merck (Darmstadt) und Sigma-Aldrich (Taufkirchen) bezogen. Sämtliche auf Wasser (im Folgenden nur noch mit H<sub>2</sub>O bezeichnet) basierenden Lösungen und Puffer wurden, sofern nicht anders angegeben, mit Reinstwasser aus der Millipore Milli-Q® Biocel von Merck Millipore (Darmstadt) hergestellt.

### 2.1.3 Auswertungssoftware

Die Auswertung der Daten sowie die Erstellung der Diagramme erfolgte mithilfe von Microsoft Word 2007, Microsoft Power Point 2007 und GraphPad Prism 5.

### 2.1.4 Antibiotika

Ampicillin	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, DE
Penicillin G	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, DE
Streptomycin	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, DE

### 2.1.5 Antikörper

Anti-Hämagglutinin (HA)-Biotin-Konjugat	Roche, Mannheim, DE
Streptavidin-Peroxidase (POD)-Konjugat	Dianova, Hamburg, DE
Goat-anti-DIG-IgG	Jackson ImmunoResearch Laboratories, West, Grove, PA, USA
Biotin-labelled Anti-goat-IgG	Jackson ImmunoResearch Labo-

---

<u>A</u> vidin- <u>B</u> iotin- <u>P</u> eroxidase- <u>C</u> omplex (ABC)	ratories, West, Grove, PA, USA Jackson ImmunoResearch Laboratories, West, Grove, PA, USA
Streptavidin-DY488	Jackson ImmunoResearch Laboratories, West, Grove, PA, USA

### 2.1.6 Bakterien und Säugerzellen

DH5 $\alpha$ ( <i>E. Coli</i> -Stamm: F-, $\Phi$ 80 <i>dlacZ</i> _M15, <i>lacZYA-argF</i> ) U169, <i>deoR</i> , <i>recA1</i> , <i>endA1</i> , <i>phoA</i> , <i>hsdR17</i> (rk-, mk+), <i>supE44</i> , $\lambda$ -, <i>thi-1</i> , <i>gyrA96</i> , <i>relA1</i> )	Life Technologies, Berlin, DE
COS-7 (Fibroblasten aus der Niere der grünen Meerkatze, mit einer T-Antigen produzierenden Mutante des SV40-Virus transformiert, ATCC)	American Type Culture Collection (ATCC), Manassas, VA, USA
HEK-293 („ <u>H</u> uman <u>e</u> mbrionic <u>K</u> idney“-Zellen sind hypotriploide Epithelzellen, deren Erbgut Teile des menschlichen Adenovirus 5 enthalten)	American Type Culture Collection (ATCC), Manassas, VA, USA

### 2.1.7 Verwendete Assay-Systeme

Folgende vorgefertigte Reaktionssysteme wurden verwendet:

Name	Verwendung	Hersteller
RNeasy <sup>®</sup> Plus Micro Kit (50)	RNA-Isolation aus dem Gewebe	Qiagen, Hilden, DE
iScript <sup>™</sup> cDNA Synthesis Kit	cDNA-Synthese	Bio-Rad, Hercules, California, USA
ABsolute QPCR SYBR Green Fluorescein Mix; Cat 1219/B	qPCR	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
Wizard <sup>®</sup> SV Gel and PCR Clean Up System	Aufreinigung von DNA	Promega, Medison, USA
PureYield <sup>™</sup> Plasmid Miniprep System	Plasmidisolierung (Minipräp)	Promega, Medison, USA
NucleoBond <sup>®</sup> Xtra Midi	Plasmidisolierung (Midipräp)	Macherey-Nagel, Düren, DE
ABI Prism <sup>®</sup> Big Dye <sup>®</sup> Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit	Sequenzierung	Applied Biosystems, Forster City, USA
Alphascreen <sup>®</sup> cAMP Assay Kit	cAMP-Akkumulationsmessung	Perkin Elmer, Boston, USA
Luciferase Assay-System	IP3-Akkumulationsmessung	Promega, Medison, USA

### 2.1.8 Verwendete Enzyme

MangoTaq<sup>™</sup> DNA Polymerase

Bioline, Berlin, DE

PfuTurbo<sup>®</sup>-DNA Polymerase

Stratagene, La Jolla, USA

T4 DNA Ligase

New England Biolabs, Schwalbach, DE

Meerrettichperoxidase (POD) gekoppelt

Jackson ImmunoResearch Laboratories,



an Streptavidin	Inc, West Grove, USA
Restriktionsendonukleasen ( <i>AatII</i> , <i>DpnI</i> , <i>NotHF</i> , <i>SpeI</i> )	New England Biolabs, Schwalbach, DE

### 2.1.9 Verwendete Enzym-Puffer

BSA (100x)	New England Biolabs, Schwalbach, DE
NEBuffer 4 (10x)	New England Biolabs, Schwalbach, DE
Pfu-Reaction Buffer (10x)	Stratagene, La Jolla, USA
T4 DNA Ligase Reaction Buffer (10x)	New England Biolabs, Schwalbach, DE

### 2.1.10 Verwendete Primer

Sofern nicht anders vermerkt, wurden die Oligonukleotide von Invitrogen oder TIB MOLBIOL bezogen. Sie werden mit Sequenz an entsprechender Stelle in den molekularbiologischen Methoden genannt.

Die LNA<sup>TM</sup>-Sonden (Locked Nucleic Acid) wurden bezogen von Exiqon Inc, Woburn, MA, USA.

### 2.1.11 Expressionsvektoren

hcpcDps	Prof. Dr. Torsten Schöneberg, Institut für Biochemie, Medizinische Fakultät, Universität Leipzig, DE
---------	--

### 2.1.12 Liganden

bovines TSH	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, DE
Isoproterenol	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, DE
Forskolin	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, DE
β-Phenylethylamin	Sigma Aldrich, Taufkirchen, DE
3-Iodothyronamin	freundlicherweise bereitgestellt von Thomas Scanlan, Departments of Physiology & Pharmacology and Cell & Developmental Biology, Oregon Health & Science University, Portland, OR, USA und

der Arbeitsgruppe um Herrn Josef Köhrle, Institut für Experimentelle Endokrinologie, Charité-Universitätsmedizin Berlin

### 2.1.13 Sonstige Reagenzien

Ethidiumbromid	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, DE
4 % Formaldehyd	Herbeta, Berlin, DE
IBMX (100 mM)	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, DE
Metafectene <sup>®</sup>	Biontex, München, DE
Poly-L-Lysin	Biochrom, Berlin, DE

### 2.1.14 Häufig verwendete Medien und Puffer

#### 2.1.14.1 Puffer für die Gelelektrophorese

##### 5x TBE:

Tris	54 g/l
H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	27,5 g/l
EDTA 80,5M)	20 ml/l
in H <sub>2</sub> O; pH 8,0	

##### Loading-DYE für Agarosegele:

Bromphenolblau	0,25 %
Xylencyanol	0,25 %
Glycerol	25 %
in H <sub>2</sub> O	

#### 2.1.14.2 Kulturmedien zur Bakterienaufzucht

##### LB-Flüssigmedium:

Trypton	10 g/l
Hefeextrakt	5 g/l
NaCl	5 g/l
in H <sub>2</sub> O, pH 7,4	
+ 0,1 mg/ml des jeweiligen Antibiotikums	

##### LB-Agarplatten:

Trypton	10 g/l
Hefeextrakt	5 g/l
NaCl	5 g/l
Agar-Agar 1,5% (w/v)	
+ 0,1 mg/ml des jeweiligen Antibiotikums	

SOB-Medium:

Trypton	20 g/l
Hefeextrakt	5 g/l
NaCl	0,5 g/l
KCl	2,5 mM

in H<sub>2</sub>O; pH 7,4

SOC-Medium:

MgCl <sub>2</sub> (sterilfiltriert)	20 mM
Glucose (sterilfiltriert)	20 mM
in hitzesterilisiertem SOB-Medium	

*2.1.14.3 Kulturmedien zur Zellaufzucht*Transfektionsmedien:

MEM Earle's-Medium (für HEK-293-Zellen)	Biochrom, Berlin, DE
<u>D</u> ulbecco's <u>M</u> odified <u>E</u> agle <u>M</u> edium (DMEM) (für COS-7-Zellen)	Biochrom, Berlin, DE

Vollmedien:

MEM Earle's- Medium (für HEK-293-Zellen) bzw. DMEM (für COS-7-Zellen) versetzt mit jeweils:

Fetales Kälberserum (FKS)	10 %
L-Glutamin	10 %
Penicillin	100 U/ml
Streptomycin	100 µg/ml

Sonstige:

PBS (Phosphat-gepufferte Kochsalzlösung)-Dulbecco's w/o Ca <sup>2+</sup> , Mg <sup>2+</sup>	Biochrom, Berlin, DE
Trypsin/EDTA-Solution (0,5/0,2 % w/v in PBS)	Biochrom, Berlin, DE

#### 2.1.14.4 Puffer für Oberflächenexpressionsanalyse mittels ELISA

##### Substratpuffer:

Citronensäure	0,1 M
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	0,1 M
in H <sub>2</sub> O; pH 5,2	

##### Substratlösung:

Substratpuffer	25 ml
Orthophenylendiamin	10 mg
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> (30 %)	20 µl

##### Stopplösung:

HCl	1 M
Na <sub>2</sub> SO <sub>3</sub>	0,05 M

##### PBS (1x):

NaCl	150 mM
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	8,4 mM
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	1,6 mM
in H <sub>2</sub> O; pH 7,4	

#### 2.1.14.5 Puffer für cAMP-Akkumulationsassay

##### Lysispuffer (LO):

Hepes	5 nM
BSA	0,1 %
Tween20	0,3 %
in H <sub>2</sub> O; pH 7,4	

##### SO-Puffer:

HBSS	1x
Hepes	1 M
BSA	0,1 %
in H <sub>2</sub> O, pH 7,4	

#### 2.1.14.6 Puffer für IP3-Akkumulationsassay

Passive Lysis Buffer (1 x)

Promega, Medison, USA

## Puffer für die in-situ-Hybridisierung

Paraformaldehyd 4 % (PFA):Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 5,75 g

Paraformaldehyd 20 g

NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 1,31 gin 500 ml H<sub>2</sub>O; pH 7,2-7,6PBS (1x):

NaCl 150 mM

Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 8,4 mMKH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 1,6 mMin H<sub>2</sub>O; pH 7,41x TBS (Tris-buffered saline):

Tris 0,05 M

NaCl 0,15 M

in H<sub>2</sub>O; pH 7,6Hybridisierungspuffer (SUMI):

1x TBS 50 ml

Triton-X-100 0,25 ml

Gelatine 0,125 g

Cryoprotectant:

Saccharose 150 g

Glycerol 125 ml

Ethylenglykol 125 ml

1x TBS 250 ml

0,2 % Glycin:

Glycin 100 mg

1x PBS 50 ml

0,1 % Triton X-1000,2 M HCl-Lösung20x SSC (saline-sodium citrate)3,3'-Diaminobenzidin (DAB)-Färbung:

DAB 7,5 mg

0,05 % NiSO<sub>4</sub> 1 ml

1x TBS 13 ml

H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 5 µl

## Sonstige verwendete Materialien

Material	Hersteller
Hank's Balanced Salt Solution (HBSS)	GIBCO <sup>®</sup> , Invitrogen, Karlsruhe, DE
Tissue-Tek <sup>®</sup> OCT <sup>™</sup> Compound	Sakura, Alphen aan den Rijn, Niederlande
2x Prehybridisierungspuffer	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, DE
Fisher Scientific PermOUNT <sup>™</sup> Mounting Medium	Fisher Scientific, Schwerte, DE

## 2.2 Methoden

### 2.2.1 Molekularbiologische Methoden

#### 2.2.1.1 Isolation von Gesamt-RNA aus Mausgewebe

Für die Isolation der Gesamt-RNA aus murinen Herzen wurde das RNeasy<sup>®</sup> Plus Micro Kit genutzt, wobei das angegebene Standardprotokoll des Herstellers modifiziert wurde. Diesbezüglich wurde 5 mg murines Herzgewebe abgewogen und 350 µl des mit β-Mercaptoethanol vorbereiteten Puffer RLT Plus hinzugefügt. Um letztendlich höhere RNA-Mengen zu erzielen, wurden vier Ansätze vom gleichen Herzen bearbeitet. Mithilfe des Bioruptors wurde das Gewebe aufgeschlossen. Die Ultraschallbehandlung fand in fünf Zyklen à 40 sec statt, mit jeweils 40 sec Pause zwischen zwei Behandlungen. Die Effektivität dieser Behandlungen wurde optisch überprüft und gegebenenfalls ein weiterer Zyklus angeschlossen. Im Folgenden wurden alle Schritte gemäß RNeasy Plus Micro Handbook 07/2007 durchgeführt. Das von Qiagen mitgelieferte RNase-free water wurde vor dem Einsatz auf 60 °C erwärmt, um die Löslichkeit der RNA aus der Membran der Säule zu erhöhen. Die Aliquots der einzelnen RNA-Ansätze von einem Herzen wurden zum Schluss vereinigt und die Konzentration fotometrisch bestimmt.

#### 2.2.1.2 Reverse Transkription

Die Umschreibung der gewonnenen RNA in complementary DNA (cDNA) erfolgte mittels des iScript<sup>™</sup> cDNA Synthesis Kits von Bio-Rad. Dabei wurde die Synthese

gemäß dem Protokoll durchgeführt, indem 500 ng der RNA mit 4 µl des 5x iScript reaction mix und 1 µl der iScript reverse transcriptase angesetzt wurden. Zuletzt wurde mit Nuklease-freiem Wasser auf ein Gesamtvolumen von 20 µl aufgefüllt. Es folgten diverse Inkubationsschritte bei verschiedenen Temperaturen, wie in Tabelle 1 aufgelistet. Die so generierte cDNA wurde anschließend bei -20 °C gelagert.

**Tabelle 1:** Inkubationsprogramm für die cDNA Generierung mittels iScript™ cDNA Synthesis Kits

Temperatur	Zeit
25 °C	5 min
42 °C	30 min
85 °C	5 min
4 °C	Bis Ende

### 2.2.1.3 Polymerase-Kettenreaktion

Die Polymerase-Kettenreaktion (Polymerase Chain Reaction; PCR) dient dazu, ausgewählte Fragmente der DNA durch die Verwendung zweier sequenzspezifischer Oligonukleotid-Primer und einer thermostabilen DNA-Polymerase (Thermus aquaticus; TAQ) exponentiell zu amplifizieren (Erich 1989).

Bei der PCR wird zunächst die Doppelstrang-DNA für fünf Minuten bei 95 °C denaturiert. Folgend wiederholen sich für 40 Zyklen folgende drei Schritte:

- Denaturierung der DNA (45 sec, 95 °C)
- Annealing der Primer (45 sec, Temperatur abhängig vom Primer:  
mTaar8b 55,7 °C bzw. mβ-Aktin 58,3 °C)
- Elongation durch die MangoTaq™ DNA Polymerase (90 sec, 72 °C)

Schlussendlich folgte eine finale Elongation bei 72 °C für zehn Minuten. Die Tabelle 3 gibt einen Überblick über das genutzte Pipettierschema.

**Tabelle 2:** Primer für die PCR

Name	Sequenz (5' nach 3')
mTaar8b_F	CCTGTGTAGAACAACACTGCACTGC
mTaar8b_R	GAGAGCTGCTGGTACTTTGG
mβ-Aktin_F	GATCTGGCACCCACACCTTCT
mβ-Aktin_R	AAGGAAGGCTGGAAAAGAGC

**Tabelle 3:** Pipettierschema für die PCR

Reagenz	Finale Konzentration
5x Mango Taq reaction Buffer	1x
50 mM MgCl <sub>2</sub>	3 mM
10 mM dNTP Mix	80 µM
Primer F 50 µM	0,25 µM
Primer R 50 µM	0,25 µM
Mango Taq Polymerase	2 U
Template	100 ng
dH <sub>2</sub> O	auf 25 µl

#### 2.2.1.4 Real-Time-quantitative-PCR

Die Real-Time-quantitative-PCR (RT-qPCR) ist eine Erweiterung der herkömmlichen PCR, wobei die Vermehrung der Amplifikate mithilfe von Fluoreszenzstoffen beobachtet wird. Die Technik wird als eine robuste Methode beschrieben, deren Risiko einer Kontamination durch ein geschlossenes System sehr gering ist (Wilhelm and Pingoud 2003).

Detektiert werden die Amplifikate über interkalierende Farbstoffe (SYBR<sup>®</sup> Green I), welche sich in die doppelsträngige DNA einlagern und eine 100-fach stärkere Bindung



als Ethidiumbromid aufweisen (Wilhelm and Pingoud 2003). Dabei verhält sich die Fluoreszenzstärke proportional zur Amplifikatmenge. Die Quantifizierung der Amplifikate erfolgt über die Bestimmung des CT-Wertes (Cycle of Threshold). Hierbei handelt es sich um denjenigen Wert, bei dem sich das Fluoreszenzsignal deutlich von dem des Hintergrundes abhebt, weil sich zu diesem Zeitpunkt der Übergang eines exponentiellen Wachstums in ein lineares vollzieht (Wilhelm and Pingoud 2003). Mithilfe dieses Wertes lassen sich Rückschlüsse auf die ursprüngliche DNA-Konzentrationen ziehen. Der CT-Wert und die Ausgangskonzentration verhalten sich hier antiproportional, d. h. je kleiner der CT-Wert, desto höher war die ursprüngliche Konzentration der DNA (Wilhelm and Pingoud 2003).

### Durchführung

Der Reaktionsansatz wurde mit den hier aufgeführten Primern gemäß unten stehendem Pipettierschema angesetzt. Dabei dienten als Template sowohl die zuvor generierte cDNA als auch die ursprüngliche RNA in Sechsfachbestimmungen.

Als Kontrollen wurden zum einen erneut das ubiquitär exprimierte  $\beta$ -Aktin und dann als Myokard-spezifische Kontrolle der  $\beta$ -1-adrenerge Rezeptor (Adrenoceptor beta 1, Adrb1) verwendet.

**Tabelle 4:** Primer für die RT-qPCR

<b>Name</b>	<b>Sequenz (5' nach 3')</b>
mTaar8b_F_qPCR	GCCCCTGGTATACAGCAGTGC
mTaar8b_R_qPCR	TGACAACGATTTGGCAGCCCC
m $\beta$ -Aktin_F_qPCR	GATCTGGCACCACACCTTCT
m $\beta$ -Aktin_R_qPCR	GGGGTGTTGAAGGTCTCAA
mAdrb1_F_qPCR	AGCGCTGATCTGGTCATGG
mAdrb1_R_qPCR	CCAGAGCTCGCAGAAGAAGG

**Tabelle 5:** Pipettierschema für die Real-Time-quantitative-PCR

Reagenz	Menge
Template	25 ng
Primer vorwärts 10 $\mu$ M	0,25 $\mu$ l
Primer rückwärts 10 $\mu$ M	0,25 $\mu$ l
ABsolute QPCR SYBR Green Fluorescein Mix	12,5 $\mu$ l
dH <sub>2</sub> O	auf 25 $\mu$ l

In der nachfolgenden Tabelle ist das PCR-Programm aufgeführt. Diesbezüglich erfolgte der Schritt von der Denaturierung zur Annealing Temperatur über eine Rampe, um eine bessere Anlagerung des Primers zu gewährleisten.

**Tabelle 6:** PCR-Programm für die Real-Time-quantitative-PCR

	Temperatur	Zeit
Denaturierung	95 °C	10 min
Denaturierung	95 °C	5 min
Denaturierung	95 °C	15 sec
Annealing	58 °C	30 sec
Elongation	72 °C	30 sec
Elongation	72 °C	3 min
	55 °C	1 min

} x 50

### 2.2.1.5 *in-situ*-Hybridisierung

Um die durch Polymerase-Kettenreaktion und Real-Time-quantitative PCR gewonnenen Daten zu überprüfen bzw. zu ergänzen, wurde zusätzlich eine *in-situ*-Hybridisierung durchgeführt. Hierbei erfolgte der Nachweis der Expression eines Gens auf mRNA-Ebene mittels LNA<sup>TM</sup>-Sonden (Locked Nucleic Acid), welche eine hohe Spezifität und hohe Affinität aufweisen.

#### 2.2.1.5.1 Verwendete Sonden

Die Sonden wurden mithilfe der Firma Exiqon (Vedbæk, Dänemark) designed und hergestellt. Dabei wurde die Sequenz des jeweiligen Gens genannt sowie die Schmelztemperatur und die zweifache Kopplung zu Digoxigenin (DIG) festgelegt. Diese LNA<sup>TM</sup>-Sonden zeichneten sich durch eine besonders hohe Spezifität und Affinität aus, welche auf ihrer speziellen Konformität beruhte. Dabei bildete der Ribosering eine Methylenbrücke zwischen dem 2'-O Atom und dem 4'-C Atom. Die komplementären Nukleotide konnten weiterhin Wasserstoffbrückenbindungen gemäß den Watson-Crick-Paarungsregeln eingehen.

Die Sequenzen der LNA<sup>TM</sup>-Sonden sind in der nachfolgenden Tabelle aufgelistet. Als Negativkontrolle diente eine von der Firma mitgelieferte Scramble-ISH, welche ebenfalls zweifach DIG-markiert war.

**Tabelle 7:** LNA<sup>TM</sup>-Sonden für die *in-situ*-Hybridisierung

Name	Sequenz (5' nach 3')
mGata4	ATCTCTTCACTGCTGCTGCT
mTaar8b	ACTCATGGTAGATGAATGACT
Scramble-ISH	GTGTAACACGTCTATACGCCCA

#### 2.2.1.5.2 Durchführung

Die murinen Herzen wurden vor der Entnahme mit 4-prozentigem Paraformaldehyd (PFA) gespült und nach der Entnahme für ca. 20 Stunden ebenfalls in 4-prozentigem Paraformaldehyd bei 4 °C gelagert. Danach wurden die Organe in 30-prozentiger

Saccharose-Lösung für ca. 24 Stunden bei ebenfalls 4 °C gelagert. Danach wurden die Herzen in Tissue-Tek® OCT™ Compound eingebettet und mithilfe eines Kryostats bei einer Temperatur von -20 °C 25 µm dicke Schnitte angefertigt. Bis zur weiteren Verwendung wurden die Schnitte in Cryoprotectant bei -80 °C gelagert .

Die bei verschiedenen Temperaturen durchgeführten Inkubationsschritte erfolgten fortan, sofern nicht anders vermerkt, stets im Shake 'N Bake Digital Incubator.

Gestartet wurde die *in-situ*-Hybridisierung mit der Deproteinierung. Dabei wurden die Schnitte vom Cryoprotectant mit 1x PBS vollständig befreit und danach zweimal für fünf Minuten mit 7 ml 1x PBS inkubiert. Es folgte ein fünfminütiger Inkubationsschritt mit 0,2 M HCl-Lösung und ein erneutes Waschen mit 1x PBS, und zwar drei Mal mit 7 ml für fünf Minuten. Nach einer 30-sekündigen Inkubation in 0,2-prozentigem Glycin erfolgte erneut eine zweimalige Waschung mit 7 ml 1x PBS für jeweils fünf Minuten. Daran schlossen sich die Inkubation in 0,1-prozentigem Triton X-100 für zehn Minuten und ein erneuter Waschschrift in 1x PBS für fünf Minuten an, gefolgt von einer einstündigen Inkubation bei 55 °C in 500 µl 1x Prehybridisierungspuffer mit 50 % Formamid.

Als nächstes erfolgte die Hybridisierung, wobei die LNA™-Sonden mit einer finalen Konzentration von 200 nM in dem Hybridisierungspuffer angesetzt wurden. Dabei wurde die Lösung zunächst in einem Volumen von 500 µl für zehn Minuten bei 95 °C und danach für fünf Minuten auf Eis inkubiert. Erst anschließend wurden die Schnitte hinzugefügt. Schließlich folgte eine achtstündige Inkubation bei 57 °C.

An diese Inkubation schloss sich der sog. „Stringency Wash“ mit verschiedenen Verdünnungen von SSC (saline-sodium citrate) an. Die Waschritte erfolgten jeweils für eine Minute mit 5x SSC, 2x SSC und 0,2x SSC bei 60 °C, abschließend noch einmal für eine Minute mit 0,2x SSC bei Raumtemperatur.

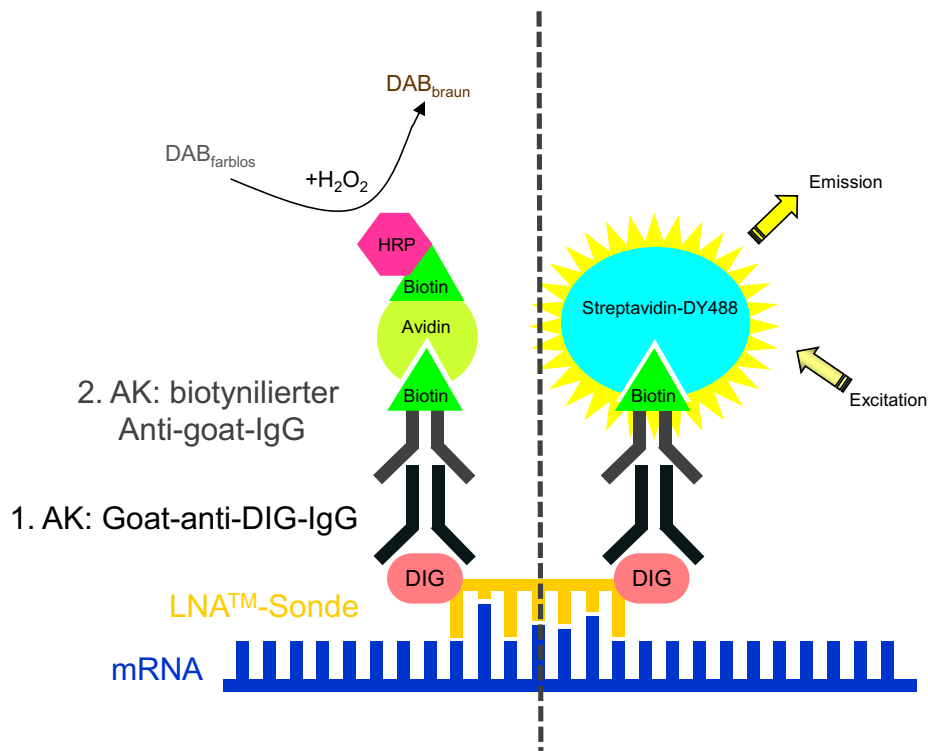
Die immunologische Detektion wurde mit dreimaligem Waschen für jeweils fünf Minuten mit 1x TBS begonnen, bevor über Nacht (mind. 12 h) mit dem ersten Antikörper bei 4 °C inkubiert wurde. Dieser ist ein Goat-anti-DIG-IgG und wurde mit dem Hybridisierungspuffer 1:500 verdünnt. Am nächsten Tag fand wiederum ein dreimaliger Waschgang für fünf Minuten mit 1x TBS statt. Darauf folgte eine einstündige Inkubation bei RT mit dem zweiten Antikörper, Biotin-labelled Anti-goat-IgG. Auch dieser wurde mit dem Hybridisierungspuffer im Verhältnis 1:400 verdünnt. Zur Visualisierung erfolgte

nach erneutem dreimaligem Waschen für fünf Minuten mit 1x TBS die Inkubation mit dem Avidin-Biotin-Peroxidase-Complex (ABC) bei RT für eine Stunde. Dieser wurde ebenfalls in Hybridisierungspuffer 1:800 verdünnt. Erneut wurde dreimal mit 1x TBS für jeweils fünf Minuten gewaschen und dann eine 3,3'-Diaminobenzidin- (DAB) Färbung für ca. fünf Minuten bis maximal zehn Minuten durchgeführt. Diese wurde wiederum durch dreimaliges Waschen mit 1x TBS für jeweils fünf Minuten beendet.

Die Gewebe wurden nun auf die Objektträger aufgezogen, und es erfolgte die Dehydratation bei Raumtemperatur mit jeweils zwei Minuten unter Bewegung in 60-prozentigem, 75-prozentigem, 80-prozentigem, 95-prozentigem und zweimal in 100-prozentigem Ethanol. Über Nacht wurden die Objektträger in Xylen inkubiert. Am nächsten Tag fanden zwei erneute Inkubationen in Xylen für jeweils zehn Minuten statt. Zum Covern der Gewebe wurde Permount<sup>TM</sup> Mounting Medium genutzt, dann erfolgte eine Trocknung und schließlich die Mikroskopie.

Im Rahmen der Kontrollen wurden transient transfizierte COS-7-Zellen auf die gleiche Weise wie die Gewebeschnitte behandelt. Im Folgenden werden die abweichenden Stellen im Protokoll angegeben:

Die Zellen wurden ca. 40 Stunden nach Transfektion für 15 min in 4-prozentigem PFA inkubiert, mit 1x PBS gewaschen und für ca. sieben Minuten in Methanol inkubiert. Die weiteren Schritte erfolgten genauso wie bereits beschrieben. Für die Visualisierung wurde jedoch Streptavidin-DY488 verwendet. Dieser ist im Hybridisierungspuffer 1:200 verdünnt, und die Inkubation erfolgte ebenfalls für eine Stunde bei Raumtemperatur. Auch hier wurde danach erneut dreimal für fünf Minuten mit 1x TBS gewaschen. Daran schlossen sich die Dehydratation und sämtliche weitere Schritte wie oben beschrieben an.



**Abbildung 5:** Gezeigt ist die schematische Darstellung der *in-situ*-Hybridisierung mit den verschiedenen Antikörpern.

Die zweifach DIG-gekoppelte LNA<sup>TM</sup>-Sonde geht Wasserstoffbrückenbindungen mit der mRNA ein. Der Goat-anti-DIG-Antikörper erkennt das DIG und geht eine Verbindung ein. Der zweite biotynilierte Anti-goat-Antikörper erkennt den ersten und geht seinerseits eine Verbindung mit diesem ein.

Auf der linken Seite ist gezeigt, wie die Visualisierung für die murinen Herzen funktioniert. Das Avidin aus dem Avidin-Biotin-Peroxidase-Complex erkennt das Biotin und bindet daran. Die HRP ist nun in der Lage, unter H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Verbrauch DAB als braunen Farbstoff zu synthetisieren. Da ebenfalls Nickelsulfat zugesetzt ist, erscheint der Farbstoff fast schwarz.

Auf der rechten Seite ist das weitere Vorgehen für die transient transfizierten COS-7-Zellen aufgezeigt. Hier bindet an den zweiten Antikörper Streptavidin-DY488, welches nach Anregung zu leuchten beginnt und damit in der Mikroskopie sichtbar wird.

(AK: Antikörper; DIG: Digoxigenin; HRP: horse-radish-peroxidase; DAB: 3,3'-Diaminobenzidin; IgG: Immunglobulin G)

### 2.2.1.6 Agarose-Gelelektrophorese

Zur Beurteilung der Effizienz oder zur Aufreinigung nach einer PCR- oder DNA-Restriktion wurde eine Agarose-Gelelektrophorese (1 % Agarose in 0,5x TBE-Puffer) durchgeführt. Dabei handelt es sich um ein Verfahren, bei dem DNA-Fragmente

entsprechend ihrer Größe aufgetrennt werden (Aaij and Borst 1972). Dafür wurde die zu untersuchende DNA mit 10 % Loading Dye versetzt auf das Agarosegel aufgetragen. Dieses Gel enthält Ethidiumbromid, welches mit den Nukleinsäuren der DNA interagiert und diese unter UV-Licht sichtbar macht. Ein elektrisches Feld von 80–90 V führt zur Auftrennung der Fragmente entsprechend ihrer Größe. Dabei gilt, dass sich kürzere Fragmente von geringerer Basenpaarzahl schneller durch die Matrix des Gels bewegen als die größeren. Zur Beurteilung wird zusätzlich ein standardisierter Marker mit bekannten DNA-Fragment-Größen aufgetragen. Die Auswertung erfolgte mithilfe des Geldokumentationssystem GeneFlash.

#### 2.2.1.7 DNA-Aufarbeitung

Die Aufreinigung der DNA aus den Agarosegelen erfolgte unter Zuhilfenahme des Wizard® SV Gel and PCR Clean Up System von Promega, wobei hier stets das angegebene Standardprotokoll befolgt wurde.

#### 2.2.1.8 Restriktionsverdau

##### Prinzip

Bei der Restriktion schneiden temperaturspezifische Restriktionsendonukleasen an spezifischen Stellen in der Basensequenz (Roberts 2005). Dabei kann je nach Bedarf die Restriktion zur Analyse oder aber für eine Umklonierung genutzt werden.

##### Durchführung

Um ein erfolgreich amplifiziertes Insert in den gewünschten Vektor zu integrieren, wurden die Schnittränder mithilfe des gleichen Enzyms vorbereitet. Geschnitten wurde bei der murinen DNA mit *AatII* (20.000 U/ml) und *SpeI* (10.000 U/ml), bei der humanen mit *AatII* (20.000 U/ml) und *NotI HF* (20.000 U/ml). In beiden Fällen wurde das vom Hersteller zur Verfügung gestellte 100x BSA und der 10x Puffer 4 verwendet und die Restriktionsendonukleasen mit 10 Units pro 10 µl Gesamtvolumen eingesetzt, aufgefüllt wurde mit H<sub>2</sub>O. Die Beurteilung der Effizienz der Restriktion erfolgte durch Auftragen des Gesamtansatzes auf ein 1-prozentiges Agarosegel.

### 2.2.1.9 Ligation

#### Prinzip

Im Rahmen der Ligation werden mithilfe einer Ligase zwei freie DNA-Enden miteinander verbunden, indem eine Phosphodiesterbindung zwischen der 3'-Hydroxylgruppe des einen Fragmentes und dem 5'-Phosphat des anderen Fragmentes entsteht.

#### Durchführung

Zunächst wird rechnerisch das beste Verhältnis zwischen Vektor- und Insertmasse ermittelt. Nachstehende Formel gibt den Rechenweg an. Die so ermittelten Massen werden in einem Gesamtvolumen von 10 µl angesetzt mit 400 U der T4 DNA-Ligase (cohesive end) und dem vom Hersteller beigefügten 10x T4 DNA Ligase Reaction Buffer; aufgefüllt wurde mit H<sub>2</sub>O.

$$Masse_{Insert} (ng) = 4x(Masse_{Vektor})x \left[ \frac{Fragmengröße_{Insert} (bp)}{Fragmengröße_{Vektor} (bp)} \right]$$

**Tabelle 8:** Pipettierschema für die Ligation

Reagenz	Menge
Vektor	60–80 ng
Insert	Masse wird berechnet nach o. g. Formel
1x Ligase Puffer	1 µl
T4 Ligase	200 U
dH <sub>2</sub> O	auf 10 µl

Die Inkubation des Reaktionsansatzes erfolgte bei Raumtemperatur für eine Stunde mit anschließender Transformation in Bakterien.



### *2.2.1.10 Transformation und Bakterienanzucht*

#### Prinzip

Bei der Transformation werden kompetente Zellen verwendet, welche sich durch die Fähigkeit auszeichnen, freie, in dem umgebenen Medium vorhandene DNA aufzunehmen. Die generierten Plasmiden werden von den Bakterienzellen aufgenommen und durch Vermehrung vervielfältigt. Um jeweils nur die eigens ausgewählte und mit einer Antibiotika-Resistenz versehene DNA zu amplifizieren, wird das Wachstum auf bzw. im Nährmedium mittels Antibiotikum selektiert (Mülhardt 2009).

#### Durchführung

Die bei -80 °C gelagerten kompetenten Zellen wurden vor Zugabe des Ligationsansatzes für 15 min auf Eis aufgetaut. Nach einer Inkubationszeit von 30 min erfolgte der Hitzeschock bei 42 °C für 90 sec. Mithilfe dieses Hitzeschocks wird die Membran der Bakterien permeabel, so dass die DNA in das Bakterium integriert werden kann. Eine erneute Inkubation auf Eis für zwei Minuten sollte die Permeabilität der Bakterien beenden. Dem Ansatz wurden 250 µl SOC-Medium hinzugefügt; danach wurde dieser Ansatz für 45 min schüttelnd bei 37 °C inkubiert. Da die Plasmide eine Antibiotika-Resistenz enthielten, wurde anschließend auf antibiotikahaltigen Agarplatten (Ø 10cm) ausgestrichen und diese über Nacht im Brutschrank bei 37 °C inkubiert. Am folgenden Tag können im besten Fall einzelne Kolonien „gepickt“ und die Bakterien in Flüssigmedium zu 4 ml angezüchtet werden.

### *2.2.1.11 Plasmidpräparation*

#### Mini-Präparation

Zur Gewinnung kleinerer Plasmid DNA-Mengen wurde eine 4 ml-Kultur angesetzt. Die Bakterienkultur wurde zunächst zentrifugiert (zehn Minuten, 5300 rpm) und der Überstand verworfen. Anschließend wurde die Plasmid-DNA gemäß dem Herstellerstandardprotokoll des PureYield™ Plasmid Miniprep System (Promega) präpariert.

## Maxi-Präparation

Zur Gewinnung größerer Plasmid-DNA-Mengen wurde eine Kultur von 250 ml angesetzt. Präpariert wurde gemäß dem Herstellerstandardprotokoll des NucleoBond® Xtra Midi (Macherey-Nagel).

### *2.2.1.12 Herstellung von Rezeptormutanten*

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurden verschiedene Variationen generiert. Zum einen wurden am N-terminalen Ende des Rezeptors die ersten 20 Aminosäuren des bovinen Rhodopsin-Rezeptors hinzugefügt; zusätzlich wurden teilweise einzelne Aminosäuren mutiert bzw. addiert.

**Tabelle 9:** Übersicht über die verschiedenen Rezeptormutanten

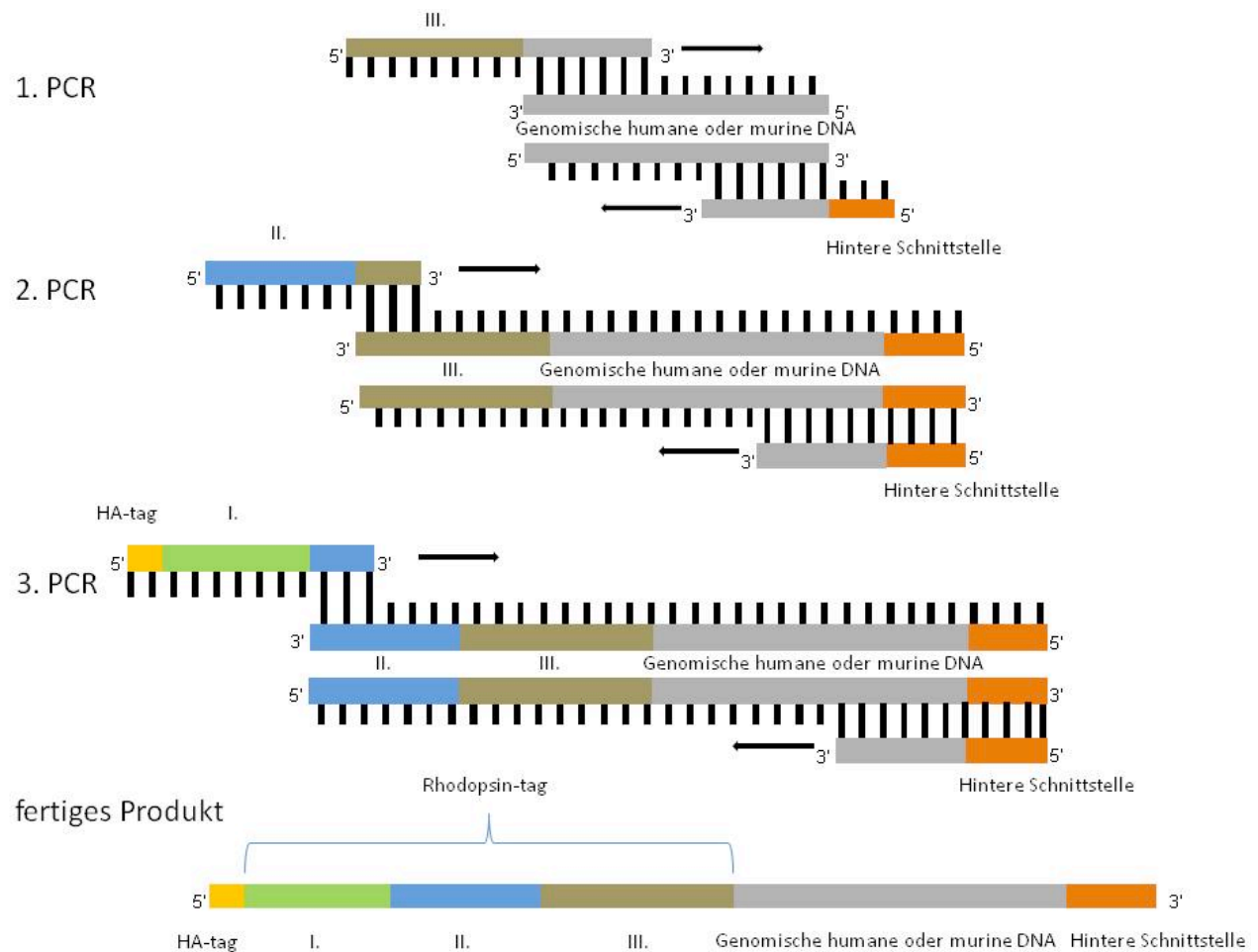
<b>Rezeptor</b>	<b>Rereptormutanten</b>
mTaar8b-WT-HA	Rho-mTaar8b-HA-WT
	Rho-mTaar8b-HA-S274W
	Rho-mTaar8b-HA-P274GinsG
hTAAR8-HA-WT	Rho-hTAAR8-HA-WT
	Rho-hTAAR8-HA-S269W

#### *2.2.1.12.1 Rhodopsin-tag*

Da in den ersten Experimenten eine niedrige Oberflächenexpression der TAAR-Proteine festzustellen war, mussten N-terminal die ersten 20 Aminosäuren des bovinen Rhodopsins hinzugefügt werden (nachfolgend nur noch als Rho-tag bezeichnet). In der Forschungsliteratur wurde bereits beschrieben, dass dieser Rho-tag in der Lage ist, die Oberflächenexpression zu steigern (Liberles and Buck 2006) und somit bessere Voraussetzungen für die funktionelle Charakterisierung zu schaffen. Die Sequenz des bovinen Rhodopsins ist im Anhang aufgeführt.

Das Einfügen erfolgte mithilfe von drei „hintereinandergeschalteten“ PCRs, wobei zunächst der zum 3'-Ende gerichtete Teil des Rho-tags hinzugefügt wurde. Als

Ausgangsprodukt diente hierbei für die erste PCR eine genomische humane bzw. murine DNA und dann folgend das entsprechende Produkt der vorausgegangenen Amplifikation.



**Abbildung 6:** Übersicht über die drei PCRs zur Generierung des Rhodopsin-tags. In der ersten PCR wurde ein Vorwärts-Primer verwendet, der human- oder murin-spezifisch ist und sich darüber an das Template anlagern kann. Weiterhin enthält er einen Teil des Rhodopsin-tags. Das Produkt diente als Template für die zweite PCR. Dieser Primer enthielt nun den mittleren Teil des Rhodopsin-tags und einen Teil des zuvor neu eingebrachten Abschnittes, worüber die Anlagerung erfolgen kann. Für die dritte PCR wurde als Template wiederum das Ausgangsprodukt der zweiten PCR genutzt; der in dieser Reaktion eingesetzte Primer enthielt den HA-tag sowie den ersten Teil des Rhodopsin-tags, sodass dieser nun komplett war. Als Rückwärts-Primer diente in jedem Schritt derselbe. Dieser enthielt Teile der genomischen DNA inklusive Stopp-Codon sowie eine Schnittstelle. Für die murine Variante wurde eine *SpeI*-Schnittstelle und für die humane Variante eine *NotI*-Schnittstelle generiert. Das

Endprodukt besteht also als HA-tag, welcher die Schnittstelle *AatII* enthält, den kompletten Rhodopsin-tag, der genomischen humanen bzw. murinen DNA und einer hinteren Schnittstelle.

Die schwarzen Balken zeigen lediglich die Möglichkeit zu Wasserstoffbrückenbindungen bzw. ausgebildete Verbindungen an.

Die Primer für speziesunabhängige Bereiche innerhalb des Rhodopsin-tags im Rahmen der zweiten und dritten PCR konnten für Maus und Mensch gleichermaßen benutzt werden.

### Durchführung

Nach der in Tabelle 12 aufgeführten ersten PCR wurden 5 µl des PCR-Produkts mit 3 µl Dye und 2 µl TBE auf ein 1-prozentiges Agarose-Gel aufgetragen. Der Erfolg der PCR wurde dabei überprüft. Bei erfolgreicher Generierung des Amplifikats wurde das PCR-Produkt aus dem Gel ausgeschnitten und unter Zuhilfenahme von Wizard<sup>®</sup> SV Gel and PCR Clean-Up System von Promega aufgereinigt. Danach wurde mit 30 µl H<sub>2</sub>O eluiert. Im Anschluss diente das erste PCR-Produkt als Template für die zweite PCR; Tabelle 12 beschreibt den PCR-Ansatz hierfür. Auch nach dieser zweiten PCR wurde der Erfolg mittels Gelelektrophorese wie oben beschrieben überprüft und aufgereinigt. In der dritten und letzten PCR wurde das Amplifikat der zweiten PCR genutzt, wobei das verwendete Pipettierschema identisch ist. Der Erfolg dieser dritten PCR wurde ebenfalls wieder mittels Gelelektrophorese überprüft und anschließend – wie bereits beschrieben – aufgereinigt. Das PCR-Programm ist für die drei Reaktionen identisch (s. u.).

**Tabelle 10:** Vorwärts-Primer zum Einfügen des Rhodopsin-tags

<b>Name</b>	<b>Sequenz (5' nach 3')</b>
P1-mRho-F	ACGTTCTCCAACAAGACGGGCGTGGTGC GCACCAGCAACTTTTC CCAACC
P1-hRho-F	ACGTTCTCCAACAAGACGGGCGTGGTGC GCACCAGCAATTTTTC CCAACC
P2-m/hRho-F	TCAGGACCGAGGGCCCAA ACTTCTACGTCCCTTTCTCCAACAAG ACGGGCGTG
P3-m/hRho-F	ACGGACGTCCCCGACTACGCCAACGGGACCGAGGGCCCAA ACT TCTACG

**Tabelle 11:** Rückwärts-Primer zum Einfügen des Rhodopsin-tags

<b>Name</b>	<b>Sequenz (5' nach 3')</b>
mTaar8b-SpeI-R	ACTAGTTAATACTTACTCTGAAAACAAACTCATGG
hTAAR8-NotI-R	GCGGCCGCTTAAACTTATTCTAAAAATAAACTAATGG

**Tabelle 12:** Pipettierschema für das Einfügen des Rhodopsin-tags

	<b>1. PCR</b>	<b>2. &amp; 3. PCR</b>
<b>Reagenz</b>	<b>Menge</b>	<b>Menge</b>
Template-genom. DNA	300 ng	1 µl des Eluats
Primer vorwärts	125 ng	125 ng
Primer rückwärts	125 ng	125 ng
Pfu-Reaction Buffer (10x)	1x	1x
dNTPs	10 mM	10 mM
Pfu-Polymerase	2,5 U	2,5 U
dH <sub>2</sub> O	auf 50 µl	auf 25 µl

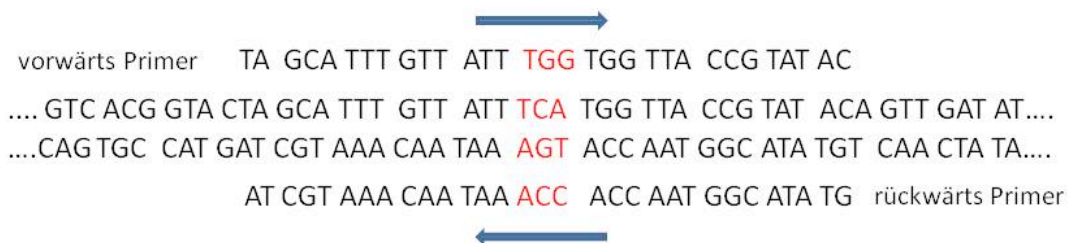
**Tabelle 13:** PCR-Programm für die Mutagenese mit anschließendem *DpnI*-Verdau

	<b>Temperatur</b>	<b>Zeit</b>	
Denaturierung	95 °C	1 min	} x 50
Denaturierung	95 °C	30 sec	
Annealing	55 °C	1 min	
Elongation	72 °C	4 min	
Elongation	72 °C	10 min	
	4 °C	Bis Ende	

Das weitere Vorgehen sieht die Restriktion des gesamten PCR-Produkts mit *AatII* im 5'-Bereich und *SpeI* für die murine bzw. *NotI HF* für die humane Variante im 3'-Bereich vor. Danach erfolgt die Ligation in den Zielvektor sowie die Transformation in Bakterien.

### 2.2.1.12.2 Mutagenese

Die Rezeptorvarianten der TAAR8-Konstrukte wurden durch zielgerichtete Mutagenese generiert. Dabei wurde die Mutation direkt in den, im Expressionsvektor vorliegenden, TAAR8 mittels zielgerichteter Mutagenese eingebaut und anschließend die Template-DNA mithilfe des Restriktionsenzym *DpnI* verdaut. Ein Nachteil dieser Technik besteht in der Fehlerrate, da hierbei das gesamte Plasmid inklusive Insert amplifiziert wird. Aus diesem Grund war eine anschließende Überprüfung der Sequenz mittels Sequenzierung dringend notwendig.



**Abbildung 7:** Übersicht über die Mutagenese am Beispiel des humanen TAAR8 von Wildtyp zur Variante S269W.

Die im Rahmen der Mutagenese eingesetzten Primer enthalten die neue Nukleotidsequenz. Somit impliziert das neu generierte Plasmid die gewünschte Variante und kann zur Transformation eingesetzt werden. Um die Transformation des als Template verwendeten Plasmids zu verhindern, folgt auf den Mutagenese-Schritt ein *DpnI*-Verdau.

#### 2.2.1.12.2.1 Mutagenese über *DpnI*-Verdau

Bei der Mutagenese wird zielgerichtet ein Basenaustausch induziert, wobei die Template-DNA im Anschluss während eines *DpnI*-Verdau abgebaut wird. Zunächst wurde ein reverses Primerpaar generiert, welches die gewünschte Mutation enthielt. Mit deren Hilfe wurde während der PCR das gesamte Plasmid inklusive Insert amplifiziert. Anschließend wurde mit dem gesamten PCR-Ansatz ein *DpnI*-Verdau durchgeführt. Dabei wurde die methylierte Template-DNA vom Restriktionsenzym erkannt und abgebaut, so dass letztlich nur noch amplifizierte Plasmid-DNA erhalten blieb, welche die Mutation in sich trug. Diese war dann bereit, in *E. coli* transformiert zu werden, welche die PCR-bedingten Schnittstellen reparierte und so ein funktionsfähiges Plasmid entstehen ließ.

Durchführung

Ziel ist die Generierung von TAAR8-Konstrukten, wobei die humane Variante eine S269W-Mutation ist; die murinen Mutationen sind zum einen S271W und P274GinsG. Dabei wurde eine zielgerichtete Mutagenese durchgeführt mit anschließendem *DpnI*-Verdau. Die dafür entworfenen Primerpaare sind in Tabelle 14 dargestellt:

**Tabelle 14:** Primer für die zielgerichtete Mutagenese

Name	Sequenz (5' nach 3')
hT8 S269 <b>W</b> -F	TAGCATTTGTATT <b>TGG</b> TGGTTACCGTATAC
hT8 S269 <b>W</b> -R	GTATACGGTAACCAC <b>CA</b> AATAACAAATGCTA
mT8b S271 <b>W</b> -F	ACTGTGGTGGCTTTTATGGT <b>CTGG</b> TGGCTCCCATACAC
mT8b S271 <b>W</b> -R	GTGTATGGGAGCCAC <b>CA</b> GACCATAAAAGCCACCACAGT
mT8b P274 <b>G+G</b> -F	ATGGTCTCGTGGCT <b>CGGAGG</b> ATACACAATTGACTCATTG
mT8b P274 <b>G+G</b> -R	CAATGAGTCAATTGTGTAT <b>CCTCC</b> GAGCCACGAGACCAT

Die veränderten Nukleotide sind durch Fettdruck hervorgehoben

**Tabelle 15:** Pipettierschema für die Mutagenese

Reagenz	Menge
Template-DNA	10 ng, 20 ng bzw. 50 ng
Primer vorwärts	125 ng
Primer rückwärts	125 ng
Pfu-Reaction Buffer (10x)	1x
dNTPs	10 mM
Pfu-Polymerase	2,5 U
dH <sub>2</sub> O	auf 50 µl



Nach der in Tabelle 16 aufgeführten PCR wurde der *DpnI*-Verdau für 45 min bei 37 °C durchgeführt, indem zu jedem Ansatz 1 µl des Enzyms hinzugefügt wurde. Danach folgte die Transformation in DH5α-Zellen. Im Anschluss wurden der Transformationsansatz auf ampicillinhaltigen Agarplatten ausgestrichen und ü. N. bei 37 °C inkubiert.

**Tabelle 16:** PCR-Programm für die Mutagenese

	Temperatur	Zeit
Denaturierung	95 °C	30 sec
Denaturierung	95 °C	30 sec
Annealing	55 °C	1 min
Elongation	68 °C	7 min
Elongation	72 °C	10 min
	4 °C	Bis Ende

} x 18

### 2.2.1.13 Sequenzierung

Zur Analyse von DNA wurde mithilfe der Didesoxymethode nach Sanger sequenziert (Sanger, Nicklen et al. 1977). Die nachfolgende Auswertung erfolgte nach dem Prinzip der Fluoreszenzdetektion mittels des 3130xL Genetic Analyzers. In der zunächst durchgeführten PCR wurden nicht nur Desoxyribonukleotide (dNTPs), sondern auch je nach Base mit vier verschiedenen Farbstoffen markierte Didesoxyribonukleotide (ddNTPs) verwendet. Dies hatte zur Folge, dass nach dem zufälligen Einbau die Synthese abbrach. Das Resultat bestand aus vielen verschieden langen DNA-Abschnitten, die jeweils mit einem Farbstoff-markierten Didesoxyribonukleotid endeten. Diese DNA-Abschnitte wurden unter Zuhilfenahme des 3130xL Genetic Analyzers durch eine Kapillare geschickt, wobei sowohl die Stranglänge als auch der jeweilige Farbstoff gemessen wurden.

So konnten Chromatogramme erstellt werden, aus dem sich die Nukleotidsequenz ablesen ließ (Stryer L 2007).

### Durchführung

Die Sequenzierung wurde zur Überprüfung der Sequenz nach Ligation oder Mutagenese im Vektor angewendet.

Die dafür genutzten Primerpaare sind in Tabelle 17 dargestellt. Pipettierschema und Sequenzierungsprogramm sind ebenfalls in den folgenden Tabellen angegeben.

**Tabelle 17:** Primer für die Sequenzierung des Konstruktes im Vektor

<b>Name</b>	<b>Sequenz (5' nach 3')</b>
CD-F für Vektor	TAGGCCTGTACGGAAGTG
CD-R für Vektor	GTCCAAACTCATCAATGTATC

**Tabelle 18:** Pipettierschema für die Sequenzierungs-PCR

<b>Reagenz</b>	<b>Menge</b>
Sequenzierungspuffer	1x
ABI Prism <sup>®</sup> Big Dye <sup>®</sup> v3.1 Ready Reaction mix	0,75 µl
Primer	5 pM
DNA	200 ng
dH <sub>2</sub> O	auf 10 µl

**Tabelle 19:** PCR-Programm für die Sequenzierungs-PCR

	Temperatur	Zeit	
Denaturierung	95 °C	5 min	} x 30
Denaturierung	95 °C	30 sec	
Annealing	55 °C	15 sec	
Elongation	60 °C	4 min	
Elongation	60 °C	7 min	

Nach der Sequenzierungs-PCR erfolgte eine Natriumacetat/Ethanol-Fällung (NaAc/EtOH-Fällung). Dabei wurden dem Ansatz zunächst 2 µl NaAc (1,5 M; pH 5,5) und 20 µl 96-prozentiger EtOH hinzugefügt. Es folgte eine 30-minütige Zentrifugation mit 10500 U/min bei 15 °C. Nachfolgend wurden der Überstand abgesaugt und 200 µl 70-prozentiger EtOH hinzugefügt. Darauf folgte eine zweite Zentrifugation von 15 min mit 10500 U/min bei 15 °C. Nach erneutem Absaugen des Überstandes wurde das Pellet für zehn Minuten bei 60 °C getrocknet und auf -20 °C bis zur Analyse durch den Kapillarsequencer gelagert.

## 2.2.2 Zellbiologische Methoden

Zur Untersuchung der generierten Rezeptoren und Rezeptormutanten wurden diese transient in HEK-293-Zellen transfiziert. Die Kultivierung sowie die Transfektion dieser Zelllinie werden im Folgenden beschrieben.

### 2.2.2.1 Zelllinien und Kultivierung

Die HEK-293-Zellen sind menschliche embryonale Nierenzellen (human emryonic kidney-cells). Sie wurden in MEM Earle's-Vollmedium in Brutschränken bei 37 °C mit feuchter Atmosphäre und einem CO<sub>2</sub>-Gehalt von 5 % kultiviert. Durch ihre hohe Teilungsrate konnten sie leicht in großen Mengen kultiviert werden. Die Zellen wurden durchschnittlich zweimal wöchentlich oder zum Aussäen abtrypsiniert und im Verhältnis 1:10 subkultiviert. Dabei wurden die Zellen ca. vier Minuten bei 37 °C in einer Trypsin/EDTA-Lösung inkubiert. Nachfolgend wurden die abgelösten Zellen in frischem

Vollmedium aufgenommen, ggf. verdünnt und in die entsprechenden Gefäße ausgesetzt.

HEK-293-Zellen sind im Vergleich zu anderen Zelllinien – wie den oft genutzten COS-7-Zellen – relativ klein und vor allem auch wenig adhärent, weshalb der Untergrund vor dem Aussäen mithilfe von Poly-L-Lysin beschichtet wurde.

#### 2.2.2.2 *Transiente Transfektion*

Die transiente Transfektion, welche im Rahmen der vorliegenden Arbeit eingesetzt wurde, unterscheidet sich von einer stabilen Transfektion dahingehend, dass die DNA hierbei nicht direkt in das Wirtsgenom eingebaut wird, sondern in einem zugefügten Plasmid in der Zelle vorherrscht (Zabner, Fasbender et al. 1995). Das Rezeptorprotein wird somit zeitlich begrenzt, jedoch in größeren Mengen synthetisiert.

Die hier verwendete Technik ist die Lipofektion (Mülhardt 2009), welche mithilfe des Transfektionsreagenz Metafectene<sup>®</sup> realisiert wurde. Dabei bildet das kationische, lipophile Metafectene<sup>®</sup> einen Komplex mit der negativ geladenen DNA und befördert die Plasmid-DNA somit durch die Zellmembran in die Zelle.

#### Durchführung

Die HEK-293-Zellen wurden am Vortag mittels der oben beschriebenen Technik in gewünschter Dichte in geeignete Gefäße ausgesetzt. Da diese Zellen wenig adhärent wachsen, wurde das verwendete Material vorher mit Poly-L-Lysin (1:2 mit PBS) für ca. 30 min inkubiert und danach mit PBS gewaschen. Ungefähr 30 Stunden nach Zellaussaat fand die Transfektion statt. Diesbezüglich wurde zunächst das Metafectene<sup>®</sup> in MEM Earle's-Medium für fünf Minuten bei Raumtemperatur inkubiert und anschließend mit der zu transfizierenden DNA, die ebenfalls im Nährmedium vorlag, vereinigt (vgl. Tabelle 20). Dieser Ansatz inkubierte für ca. 30 min, um eine Komplexierung des Transfektionsreagenz mit der DNA zu gewährleisten. Danach wurde das DNA-Metafectene<sup>®</sup>-Gemisch den Zellen zugefügt, die weiterhin bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub> kultiviert wurden. Der Mediumwechsel erfolgt ca. 20 Stunden nach Transfektion. Die funktionellen Assays erfolgten ca. 40 Stunden (cAMP- und IP3-Akkumulationsassay) bzw. 65 Stunden (Oberflächenexpressionanalyse mittels ELISA) nach transientser Transfektion.

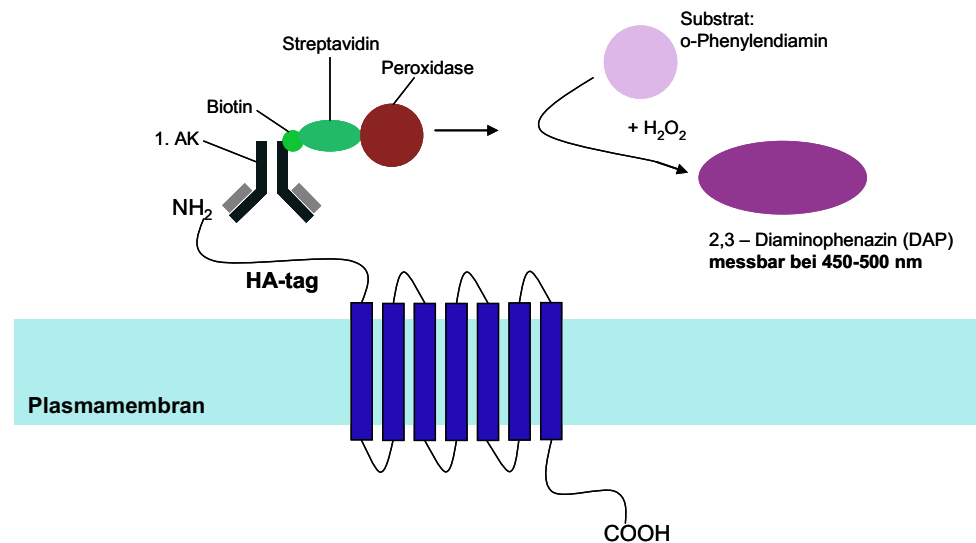
**Tabelle 20:** Transfektionsschema der verschiedenen Assays zur funktionellen Charakterisierung der generierten Rezeptorvarianten

Assay	Zellzahl	Zelllinie	Plasmid/Transfektionsmedium	Metafectene®/Transfektionsmedium	Transfektionsmedium (gesamt)
Oberflächenexpression	1,5x10 <sup>5</sup> Zellen/ml	COS-7	1,0 µg / 750 µl	6 µl / 750 µl	1500 µl
cAMP-Akkumulation	1,5x10 <sup>5</sup> Zellen/ml	HEK-293	1,5 µg / 1800 µl	16,8 µl / 1800 µl	3600 µl
P3-Akkumulation	2x10 <sup>5</sup> Zellen/ml	HEK-293	1,5 µg / 1800 µl + 1,5 µg NFAT / 1800 µl	16,8 µl / 1800 µl	3600 µl

## 2.2.3 Biochemische Methoden

### 2.2.3.1 Ermittlung der Oberflächenexpression mittels ELISA

Die Oberflächenexpression der verschiedenen Rezeptoren wurde mittels eines kompetitiven Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA) durchgeführt (Goldsby et al. 2003). Dies ist ein immunologisches Verfahren, bei dem ein Enzymreaktionbedingter Farbumschlag gemessen wird (Abbildung 8). Dafür wurden vorab die Rezeptorkonstrukte mit einem Hämagglutinin (HA)-tag am N-Terminus versehen. Bei membranständigen Rezeptoren liegt dieser Aminoterminus extrazellulär und ermöglicht die indirekte Detektion an der Zelloberfläche gelegener GPCRs.



**Abbildung 8:** Gezeigt ist die schematische Darstellung zur Messung der Oberflächenexpression eines Rezeptors.

Dabei ist die Grundvoraussetzung für diesen ELISA, dass der an der Oberfläche befindliche Rezeptor über einen N-terminalen HA- (Hämaggglutinin) tag verfügt. An diesen bindet der erste Antikörper, welcher biotinyliert ist. Der zweite Antikörper bindet mittels Streptavidin, welches eine hohe Affinität zu Biotin hat, an den ersten. Außerdem enthält er zusätzlich eine Peroxidase (POD). Diese ist in der Lage, das farblose o-Phenylendiamin (OPD) unter Zugabe von H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> in gelb erscheinendes 2,3-Diaminophenazin (DAP) umzuwandeln. Dieses ist fotometrisch messbar und lässt eine Quantifizierung der Oberflächenexpression zu.

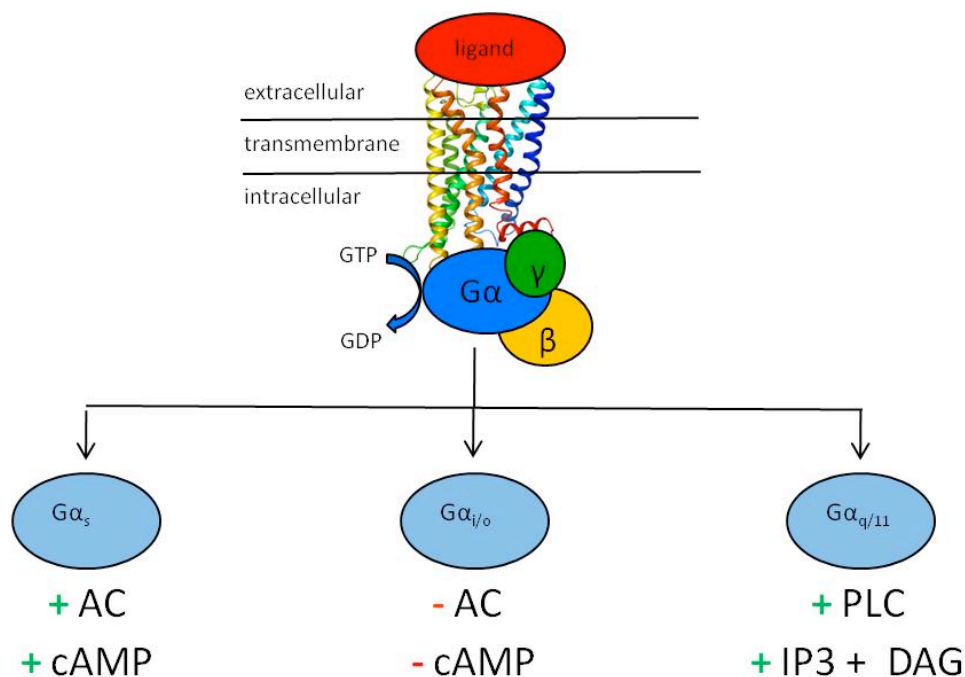
### Durchführung

COS-7-Zellen wurden – wie bereits beschrieben – transient transfiziert. Die Messung erfolgte ca. 60 Stunden nach der transienten Transfektion. Dabei wurden die Zellen zunächst für 30 min bei Raumtemperatur mit 4 % Formaldehyd fixiert. Unspezifische Bindungsstellen wurden mithilfe der Inkubation mit dem Vollmedium (enthält 10 % FKS) für eine Stunde bei 37 °C abgesättigt. Als nächstes erfolgte die Inkubation mit dem 1:200 verdünnten 1. AK (Anti-HA-Biotin) für zwei Stunden bei 37 °C. Dieser Antikörper kann nur an den HA-tag oberflächlich gelegener Rezeptoren binden. Um diesen nachzuweisen, bedient man sich eines Streptavidin-Peroxidase- (POD) Konjugats, welches an das Biotin binden kann. Dieses Konjugat wurde 1:2500 verdünnt und über Nacht bei 4 °C inkubiert. Am folgenden Tag konnte das Peroxidase Substrat o-Phenylendiamin (OPD) zugeführt werden, woraufhin eine Gelbfärbung zu beobachten

war. Um eine spezifische Gelbfärbung zu einem bestimmten Zeitpunkt vergleichbar quantifizieren zu können, wurde diese Reaktion nach fünf Minuten mittels Stopplösung (enthält 1 M HCl und 0,05 M Na<sub>2</sub>SO<sub>3</sub>) beendet. Die Intensität der Färbung wurde fotometrisch bei 492 nm gemessen. Als Positivkontrolle wurde der HA-getagte humane TSH-Rezeptor eingesetzt, als Negativkontrolle ebenfalls der humane TSH-Rezeptor, jedoch ohne HA-tag.

#### 2.2.4 Funktionelle Untersuchung von GPCRs

Da nicht bekannt war, welches G-Protein an den humanen und murinen TAAR8 gekoppelt ist, wurde sowohl ein cAMP- als auch IP3-Akkumulationsassays durchgeführt.



**Abbildung 9:** Gezeigt ist die schematische Darstellung der verschiedenen Wege der Signaltransduktion.

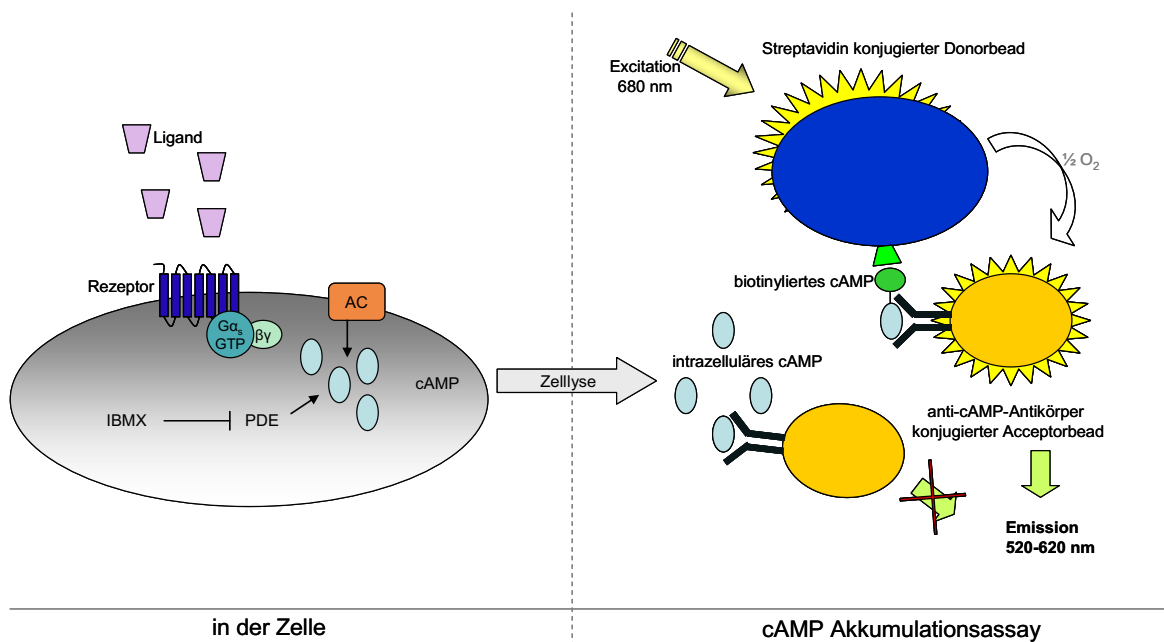
Lagert sich ein Ligand an einen G-Protein-koppelnden Rezeptor im extrazellulären Bereich an, vollzieht sich eine Konformationsänderung des Rezeptors. Überdies kommt es zum Austausch von GDP durch GTP an der Gα-Untereinheit, woraufhin sich diese vom Gβγ-Komplex trennt. In Abhängigkeit von der Art des Gα-Proteins erfolgt bei Gα<sub>s</sub> die Aktivierung bzw. bei Gα<sub>i/o</sub> die Hemmung der Adenylatzyklase mit daraus resultierenden erhöhten bzw. erniedrigten cAMP-Mengen; bei Gα<sub>q</sub> erfolgt die Aktivierung der Phospholipase C, was zu einer Erhöhung der DAG und IP3-Konzentrationen führt.

(GTP: Guanosintriphsphat; GDP: Guanosindiphosphat; AC: Adenylatzyklase; cAMP: zyklisches Adenosin-3'-5'-monophosphat; PLC: Phospholipase C; DAG: Diacylglycerin; IP3: Inositol-1,4,5-trisphosphat)

Der Ablauf dieser verschiedenartigen Untersuchungen wird im Folgenden beschrieben.

#### 2.2.4.1 cAMP-Akkumulationsassay

Um die Rezeptoren auf eine  $G\alpha_s$ -Kopplung hin zu untersuchen, wurde die intrazelluläre cAMP-Akkumulation mithilfe eines Kompetitionsassays (AlphaScreen<sup>®</sup>, PerkinElmer; Boston, USA) überprüft. Hierbei kann eine Bindung von Streptavidin konjugierte Donorbeads zu biotinyliertem cAMP aufgebaut werden, welches um die Bindung am anti-cAMP-Antikörper gebundenen Acceptorbead mit intrazellulärem cAMP konkurriert. Kommt es zu einer Verbindung, so kann der Donorbead mittels eines Laserimpulses (680 nm) die Energie auf den Acceptorbead übertragen; zudem kann von diesem emittiertes Licht bei einer Wellenlänge von 520–620 nm fotometrisch gemessen werden (Abbildung 10). Verhindert zelluläres cAMP diesen Komplex erfolgreich, so kommt es zu keiner Lichtemission. Diese ist also abhängig von dem Verhältnis des biotinylierten zu dem zellulären cAMP.



**Abbildung 10:** Gezeigt ist die schematische Darstellung zur Messung der cAMP-Akkumulation.

links: Abgebildet ist die Anreicherung von intrazellulärem cAMP nach



Aktivierung eines  $G\alpha_s$ -koppelnden Rezeptors durch Ligandenaktivierung. Dieses cAMP würde unter normalen Umständen von der Phosphodiesterase (PDE) im Zytosol abgebaut werden. Durch das Hinzufügen von IBMX (3-isobutyl-1-methylxanthin) wird dieser Prozess jedoch gehemmt, und das zelleigene cAMP bleibt erhalten.

rechts: Abgebildet ist das Prinzip der cAMP-Akkumulationsmessung. Sind sowohl der Streptavidin-gekoppelte Donorbead als auch der anti-cAMP-Antikörper-gekoppelte Acceptorbead in der Lage, das biotinylierte cAMP zu binden, so kann die laserangeregte Energieübertrag vom Donorbead auf den Acceptorbead stattfinden, so dass eine Emission fotometrisch gemessen werden kann. Wird stattdessen zelluläres cAMP am Acceptorbead gebunden, so kommt es nicht zu einer Energieübertragung und die Emissionswerte verringern sich.

(GTP: Guanosintriphosphat; AC: Adenylatzyklase)

### Durchführung

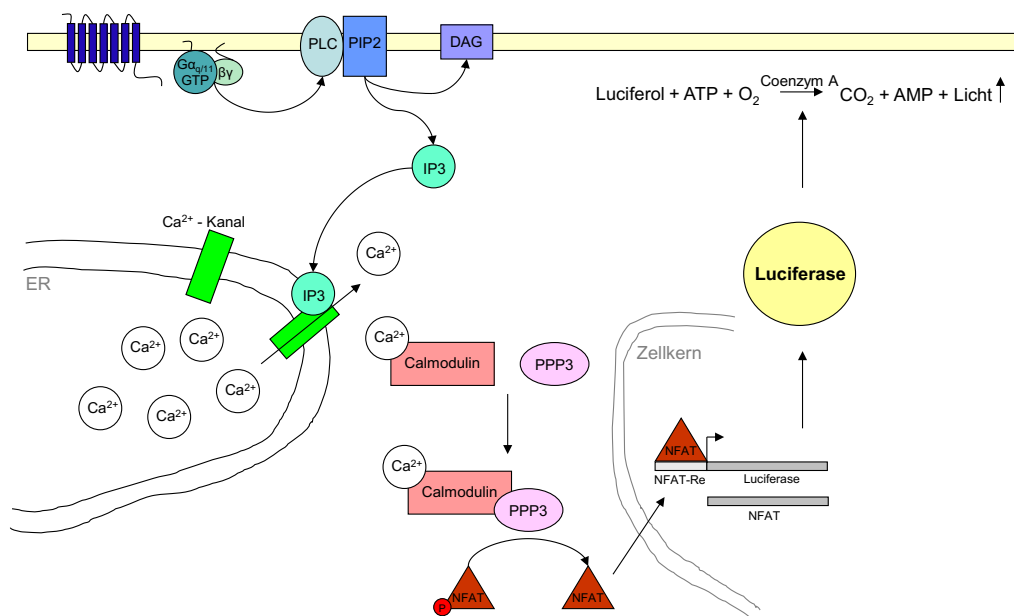
Die verschiedenen TAAR-Konstrukte sollten auf ihre mögliche Basalaktivität sowie auf eine Liganden-induzierte Stimulierbarkeit untersucht werden. Die Messung erfolgte jeweils in Triplikaten; als Positivkontrolle diente der humane trace amine-associated receptor 1 (hTAAR1) bei einer maximalen Stimulation von 10  $\mu\text{M}$  von 3-Iodothyronamin (3-T<sub>1</sub>AM) bzw.  $\beta$ -Phenylethylamin (PEA).

Die Messung erfolgte ca. 41 Stunden nach transienter Transfektion in HEK-293-Zellen. Zunächst wurde mit 1 nM IBMX (3-isobutyl-1-methylxanthin) für fünf Minuten bei 37 °C präinkubiert, um eine Blockade der zellulären Phosphodiesterase (PDE) zu bewirken. Sämtliche eingesetzten Liganden (z. B. 3-T<sub>1</sub>AM oder PEA) wurden ebenfalls in IBMX-haltigem Stimulationsmedium mit einer finalen Konzentration von 10  $\mu\text{M}$  angesetzt und den Zellen nach der Präinkubation hinzugefügt. Im Fall von Basalaktivitätsmessungen wurde ein äquivalentes Volumen von 100  $\mu\text{l}$  an IBMX-haltigem Stimulationsmedium hinzugesetzt. Die Stimulation erfolgte über 45 min bei ebenfalls 37 °C. Anschließend wurden die Zellen in IBMX-haltigem Lysispuffer (Verhältnis 1:500) bei 4 °C über drei Stunden lysiert. Sollte die  $G\alpha_{i/o}$ -Aktivität eines Rezeptors ermittelt werden, so wurde mit Forskolin in einer Konzentration von 50  $\mu\text{M}$  co-stimuliert. Danach erfolgte die Messung mithilfe des AlphaScreen<sup>®</sup> cAMP-Assay Kit gemäß Herstellerstandardprotokoll.

### 2.2.4.2 IP3-Reporter-gen-Assay

#### Prinzip

Um die Rezeptoren auf eine vermutliche  $G\alpha_{q/11}$ -Kopplung zu untersuchen, wurde indirekt die intrazelluläre Inositol-1,4,5-trisphosphat (IP3)-Konzentration gemessen. Wird ein  $G\alpha_{q/11}$ -koppelnder Rezeptor durch seinen Liganden aktiviert, regt das G-Protein die membranständige Phospholipase C- $\beta$  (PLC- $\beta$ ) an, welche Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat (PIP2) zu Diacylglycerin (DAG) und IP3 umwandelt. Dieses diffundiert im Zytosol und öffnet Calciumkanäle des Endoplasmatischen Retikulums (ER), sodass Calcium vermehrt ins Zytosol gelangt. Dieses bewirkt zusammen mit Calmodulin eine Aktivierung von Calcineurin (auch genannt Protein Phosphatase 3, PPP3), welches das zuvor co-transfizierte nuclear factor of activated T-cells (NFAT) dephosphoryliert. NFAT gelangt in den Zellkern und bewirkt dort durch Bindung an sein response-Element die Expression der Luciferase (Garcia-Cozar, Okamura et al. 1998; Im and Rao 2004). Diese kann Luciferol, welches in der Substratlösung enthalten ist, unter ATP-Verbrauch so umzusetzen, dass dabei ein zu messendes Lichtsignal entsteht und eine Quantifizierung der Aktivität möglich ist (Abbildung 11).



**Abbildung 11:** Gezeigt ist die schematische Darstellung zur Messung des IP3-Reporter-gen-Assay.

Wird ein  $G\alpha_{q/11}$ -koppelnder Rezeptor durch Ligandenstimulation aktiviert, führt dies zur Spaltung von Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat (PIP2) durch die

Phospholipase C- $\beta$  (PLC- $\beta$ ). Produkte sind das Diacylglycerin (DAG) und das Inositol-1,4,5-trisphosphat (IP3). Letzteres diffundiert durch das Zytosol und öffnet Calciumkanäle am Endoplasmatischen Retikulum (ER), was zur Erhöhung des zytosolischen Calciumspiegels führt. Calcineurin (auch genannt Protein Phosphatase 3, PPP3) ist – aktiviert durch Calmodulin und Calcium – in der Lage, den co-transfizierten nuclear factor of activated T-cells (NFAT) zu dephosphorylieren. NFAT bewirkt im Zellkern die Translation einer Luciferase, welche einen fotometrisch messbaren Substratumsatz bewirkt. Auf diese Art und Weise kann ein Rückschluss auf die zellulär gebildete IP3-Konzentration gezogen werden.

(GTP: Guanosin triphosphat; ATP: Adenosin triphosphat; AMP: Adenosin monophosphat)

## Durchführung

Die verschiedenen TAAR-Konstrukte sollten auf ihre mögliche Basalaktivität sowie auf eine Liganden-induzierte Stimulierbarkeit untersucht werden. Die Messung erfolgte in Vier- bzw. Sechsfachbestimmung; als Positivkontrolle diente der  $G\alpha_{q/11}$ -koppelnde humane TSH-Rezeptor (Thyroidea stimulierendes Hormon) bei einer maximalen Stimulation von 100 mU/ml bovines TSH, als Negativkontrolle der Leervektor (mock).

Die Messung erfolgte ca. 41 Stunden nach transienter Transfektion in HEK-293-Zellen. Sämtliche Liganden wurden steril angesetzt, das bovine TSH in einer Konzentration von 100 mU/ml, alle weiteren Liganden wie 3-T<sub>1</sub>AM oder  $\beta$ -Phenylethylamin in einer Konzentration von 10  $\mu$ M in Nährmedium. Sollte der basale Wert bestimmt werden, so wurde nur steriles Nährmedium hinzugefügt. Stimuliert wurde für sechs Stunden bei 37 °C. Beendet wurde die Reaktion durch Zugabe von passivem Lysis-Puffer (Promega). Lysiert wurde für 15 min bei Raumtemperatur. Danach erfolgte die Messung nach Überführung in eine 96-Well-Platte mithilfe des Luciferase Assay-Systems gemäß Herstellerstandardprotokoll.

## 2.2.5 Sonstige verwendete Methoden

### 2.2.5.1 Fotodokumentation

Die Bilder der Agarosegele wurden mithilfe des Sony, GeneFlash Printer (Sony Corporation, Tokio) angefertigt.

Die Bilder der *in-situ*-Hybridisierung wurden mit Unterstützung von Frau Dr. Chun-Xia Yi am Konfokalmikroskops (Zeiss-LSM710, Germany) im Metabolic Disease Institute, University of Cincinnati, OH, USA erstellt.

#### 2.2.5.2 *Aktenzeichen der Tierversuche*

Die in Cincinnati durchgeführten Versuche wurden in Übereinstimmung mit den Richtlinien des Institutional Animal Care and Use Committee (IACUC) of the University of Cincinnati durchgeführt und liefen unter der folgenden Tierversuchsnummer:

Protokol Nummer 06-08-07-01, genehmigt am 28. Januar 2010.

### 3 Ergebnisse

Nachdem im Rahmen genomweiter Untersuchungen die trace amine-associated receptors, welche zur Familie A der GPCRs gehören, identifiziert worden waren, stellte man fest, dass sie sich durch Spurenamine und Thyronamine aktivieren lassen. Vor allem zeigten sich bestimmte kardiogene Effekte in der Rattenherzphysiologie nach Stimulation mit dem Thyronamin 3-T<sub>1</sub>AM, welche dem Subtyp Taar8 zugeschrieben wurden. Im Rahmen der vorliegenden Arbeit sollten die These der Expression des homologen Taar8 im murinen Herzen überprüft sowie seine funktionelle Charakterisierung vorgenommen werden. Dabei wurden vornehmlich folgende Aspekte untersucht:

- die endogene Expression des murinen Taar8b im Herzen
- die heterologe Expression des murinen Taar8b zur funktionellen Charakterisierung
- die heterologe Expression des humanen TAAR8 zur funktionellen Charakterisierung

Im Folgenden werden die Ergebnisse der durchgeführten Versuche dargestellt.

#### 3.1 Endogene Expression des murinen Taar8b im Herzen

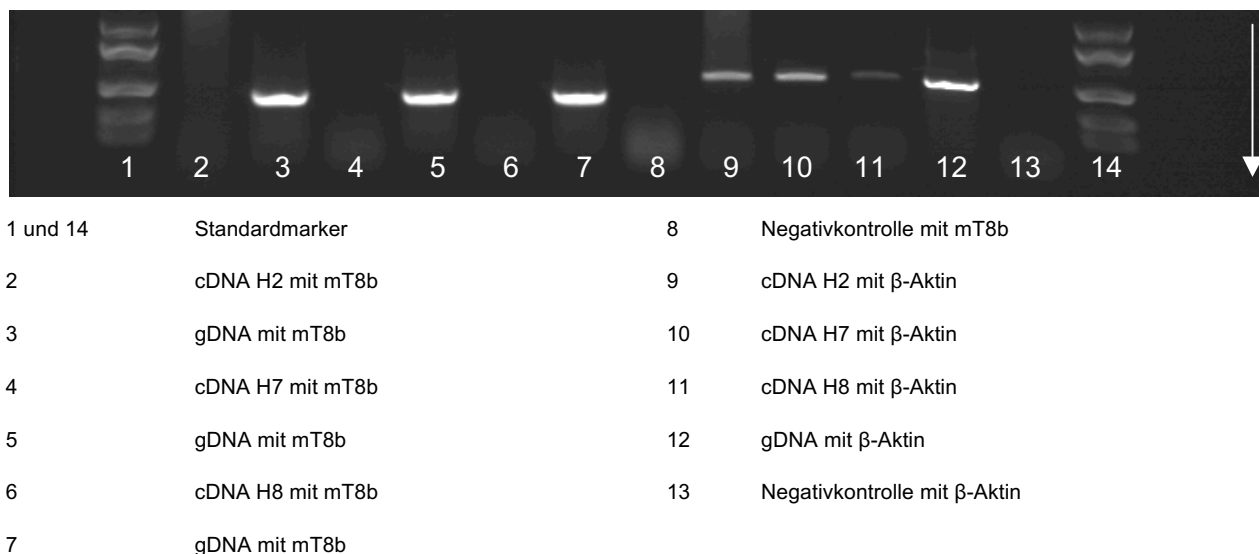
Um die endogene Expression des murinen Taar8b im Herzen zu ermitteln, wurden drei verschiedene Verfahren mit je unterschiedlicher Sensitivität und Spezifität angewandt. Die *in-situ*-Hybridisierung war die sensitivste und spezifischste Methode, sodass in der Zusammenschau der Ergebnisse eine klare Aussage bezüglich der endogenen Expression getroffen werden konnte.

##### 3.1.1 Ergebnisse der RT-Polymerasekettenreaktion

Die einfachste Möglichkeit zum Nachweis der Expression eines Gens in einem bestimmten Gewebe ist die RT-Polymerasekettenreaktion (PCR). Dafür muss die aus dem Gewebe aufbereitete mRNA in cDNA umgeschrieben werden; diese dient dann als Ausgangsprodukt für die PCR. Nach der PCR wurden Proben auf ein 1-prozentiges Agarose-Gel aufgetragen. Um die Bindung der Primer für den mTaar8b zu überprüfen,

wurde eine PCR unter genau denselben Bedingungen mit genomischer DNA als Ausgangsprodukt durchgeführt. Eine Besonderheit des Taar8b ist nicht nur, dass die Rezeptoren zu sehr niedrigen Leveln exprimiert werden, sondern auch dass er ein single-exon Gen ist. Anhand der Sequenz und Produktlänge des generierten PCR-Produktes ist demnach das Ausgangsprodukt nicht zu erkennen. Dies macht Expressionsstudien der TAARs so schwierig und Kontrollen im Rahmen dieser Untersuchungen so wichtig. Es ist daher essenziell, eine Verunreinigung durch genomische DNA auszuschließen. In einer weiteren Kontrolle wurde geprüft, ob sich die generierte cDNA und die verwendete genomische DNA auch als Ausgangsprodukt für die PCR unter den gegebenen Bedingungen wirklich nutzen lassen. Dafür wurden Primer für das sog. house-keeping gene  $\beta$ -aktin eingesetzt. Weiterhin wurden beide Reaktionsansätze der verschiedenen Primer ohne Template mitgeführt. Im Rahmen dieser Kontrolle lässt sich nachweisen, dass zum einem die Proben nicht durch genomische DNA verunreinigt sind; außerdem kann eine Reaktion der Primer untereinander ausgeschlossen werden.

Die Ansätze mit der generierten cDNA von drei verschiedenen gesunden Wildtyp-Mäuseherzen (C57BL/6J-Mäuse) zeigten in keinem Fall ein Amplifikat. Damit konnte keine Expression des mTaar8b in den genutzten Mäuseherzen nachgewiesen werden. Wurde jedoch genomische DNA als Template eingesetzt, konnten Banden in der gewünschten Höhe von 500 bp belegt werden, womit die Funktionalität der genutzten Primer für den mTaar8b nachgewiesen war. Um die Stabilität der generierten cDNA zu überprüfen, wurden Primer für das house-keeping gene  $\beta$ -Aktin verwendet; auch hier zeigte sich die gewünschte Bande in der entsprechenden Größe. Die Negativkontrollen, die jeweils kein Template beinhalten, waren wie erwartet jeweils ohne Amplifikat.



**Abbildung 12:** Fotodokumentation einer exemplarischen PCR nach Reverse Transkription.

Als Template für die PCR diente die zuvor generierte cDNA, welche aus der RNA der gesunden Wildtyp-Mäuseherze stammte. In diesen Fällen wurde kein Amplifikat detektiert (Reihen 2, 4, 6). Um sicherzustellen, dass sich regelrechte cDNA gebildet hat, wurden Primer für das sog. house-keeping gene  $\beta$ -Aktin genutzt. Die Banden im Bereich der 500 bp-Bande des Markers lassen stabile und regelrechte cDNA vermuten (Reihen 9, 10, 11). Als Positivkontrolle für die Funktionalität der Primer für beide Primerpaare wurde genomische Maus-DNA eingesetzt. Auch hier zeigen Banden im Bereich der 500 bp-Bande des Markers an, dass die PCR für diese Primerpaare unter den genannten Bedingungen erfolgreich ist (Reihen 3, 5, 7, 12). Die Negativkontrolle zeigt wie zu erwarten jeweils keine Bande, da sie kein Template enthält (Reihen 8, 13). (H2: Herz einer C57BL/6J-Maus mit der Nummer zwei; H7: Herz einer C57BL/6J-Maus mit der Nummer sieben; H8: Herz einer C57BL/6J-Maus mit der Nummer acht; gDNA: genomische DNA; cDNA: complementary DNA)

### 3.1.2 Ergebnisse der Real-Time-quantitative-PCR

Die Analysen der PCR zeigten keinerlei Expression des mTaar8b in gesunden Mäuseherzen von C57BL/6J-Mäusen. Jedoch lag die Vermutung nahe, dass mithilfe dieser Untersuchungsmethoden die bekanntermaßen niedrigen Expressionslevel der TAARs nicht detektiert wurden. Aus diesem Grund wurde als weitere und sensitivere Methode die Real-Time-quantitative-PCR (RT-qPCR) genutzt. Dabei wurden zum einen Fluoreszenzstoffe verwendet; zum anderen wurde das PCR-Programm an die besondere Situation eines Gens, welches in sehr geringen Mengen von 15–100 copies/ng cDNA transkribiert wird (Borowsky, Adham et al. 2001), angepasst.

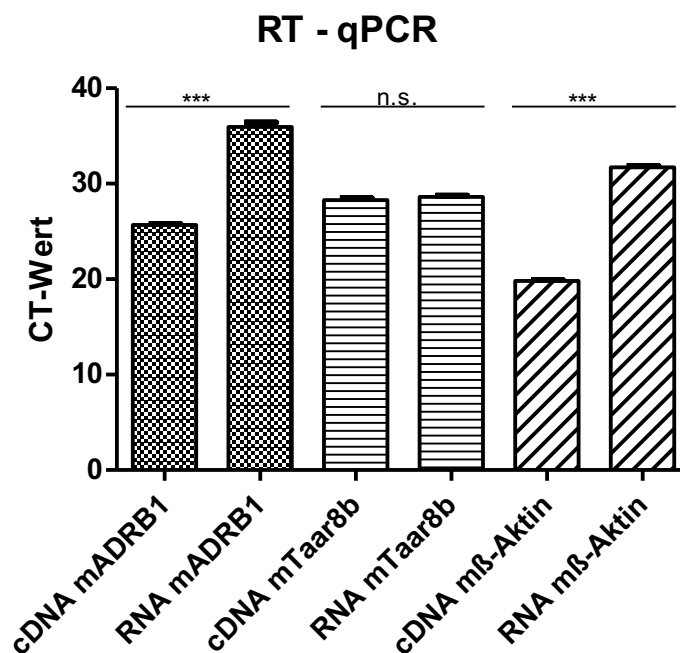
Diesbezüglich erfolgte der Schritt der Denaturierung zum Annealing der Primer über eine Rampe; damit vollzog sich eine schrittweise Annäherung der Temperatur über einen längeren Zeitraum, was deren verbesserte Anlagerung ermöglichen sollte. Die RT-qPCR erfolgte zur besseren Auswertung mit sechsfacher Bestimmung. Den Wert, welchen man im Rahmen dieser Untersuchung erhebt, ist der sogenannte Cycle of Threshold (CT). Dies ist derjenige Wert, bei dem sich das Fluoreszenzsignal deutlich von dem des Hintergrundes abhebt, weil zu diesem Zeitpunkt der Übergang eines exponentiellen Wachstums in ein lineares stattfindet (Wilhelm and Pingoud 2003). Dies bedeutet, dass ein niedriger CT-Wert für hohe DNA-Konzentrationen spricht. Gibt es jedoch eine nur sehr geringe Expression, so fällt der CT-Wert deutlich höher aus. Für die Interpretation ist ein Vergleich zu den CT-Werten bei eingesetzter RNA als Template wichtig, um eine Signifikanz zu erkennen.

Im Rahmen der Untersuchung wurden als Template die aus den Herzen aufgereinigte, in cDNA umgeschriebene RNA sowie die reine RNA eingesetzt. Einerseits erfolgte dies zur Kontrolle, ob es zu einer Kontamination mit genomischer DNA gekommen ist, dies nämlich würde einem deutlich erniedrigten CT-Wert entsprechen, da es hierbei zu erheblichen Mengen an Amplifikaten kommen würde. Andererseits konnte so eine möglicherweise bestehende Signifikanz im Unterschied der CT-Werte der eingesetzten cDNA nachgewiesen werden. Diese ist im Normalfall zu erwarten, da sich RNA aufgrund seiner thermoinstabilen Eigenschaften nicht als Ausgangsprodukt für die PCR eignet. Es gibt in diesem Reaktionsansatz also kein geeignetes Template, sodass sehr hohe CT-Werte zu erwarten sind. Sind jedoch die Werte nicht signifikant höher als beim Reaktionsansatz der cDNA, so kann man davon ausgehen, dass es zu keiner Bildung der erwünschten Amplifikate kam. Weiterhin wurde zur Überprüfung der Funktionalität des Reaktionsansatzes unter den gewünschten Bedingungen als Primerpaar das house-keeping gene  $\beta$ -Aktin bei der generierten cDNA verwendet. Um einen Eindruck für die Expression eines obligatorischen Rezeptors des Herzen zu bekommen, wurden die CT-Werte für den  $\beta$ -1-adrenergen Rezeptor bestimmt.

In der beispielhaften Abbildung 13 für die Real-Time-quantitative-PCR ist zunächst einmal zu erkennen, dass sie prinzipiell positiv verlief, da für das house-keeping gene  $\beta$ -Aktin und die eingesetzte cDNA ein CT-Wert von ca. 20 erzielt wurde. Dieser Wert ist für ein house-keeping gene als realistisch zu betrachten, so konnten z. B. ähnliche CT-



Werte für die ebenfalls als house-keeping gene angesehene Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase in verschiedenen Geweben nachgewiesen werden (Livak and Schmittgen 2001). Des Weiteren unterscheidet sich dieser ermittelte CT-Wert signifikant von dem des Reaktionsansatzes, welcher RNA als Template hatte. Wurden Primer für den  $\beta$ -1-adrenergen Rezeptor eingesetzt, so fanden sich bei der cDNA CT-Werte von ca. 26, welche als plausibel zu betrachten sind. Im Vergleich wurden für den Transkriptionsfaktor TATA-binding protein im Herzen ebenfalls CT-Werte von ca. 26 ermittelt (Wiedemann C 10. Jahrgang ). Außerdem ist ein deutlich signifikanter Unterschied zur eingesetzten RNA zu erkennen. Die Untersuchung des mTaar8b ergab sowohl für cDNA als auch für RNA CT-Werte von ca. 28. Aufgrund der Größe dieses Wertes und der fehlenden signifikanten Differenz zwischen den beiden Werten kann man davon ausgehen, dass keinerlei Amplifikate gebildet wurden. Es gibt somit keine Expression des Taar8b in gesunden Mäuseherzen.



**Abbildung 13:** Die Grafik zeigt eine beispielhafte Auswertung einer durchgeführten RT-qPCR mit sechsfacher Bestimmung.

Dabei wurde als Template nicht nur die generierte cDNA eingesetzt, sondern auch die reine RNA. Grund hierfür ist die Tatsache, dass RNA grundsätzlich nicht als Template für eine PCR geeignet ist, da sie durch die in der Reaktion

benötigte hohe Temperatur sofort denaturieren würde. Es ist daher kein Produkt zu erwarten und die CT-Werte müssen vergleichsweise höher sein, als wenn cDNA als Template dient. Dieses Phänomen ist bei den Ansätzen mit m $\beta$ -Aktin als Primerpaar besonders gut zu beobachten. Dient cDNA muriner Herzen als Template, wird ein CT-Wert von 20 erreicht. Dieser Wert ist für ein house-keeping gene als realistisch und plausibel zu betrachten. Ist jedoch RNA das Ausgangsmaterial, so ist der CT-Wert 33, was signifikant höher ist. Die RT-qPCR ist somit unter diesen Bedingungen erfolgreich. Als zweites house-keeping gene speziell für das Herz wurde ein Primerpaar für den  $\beta$ -1-adrenergen Rezeptor gewählt. Der CT-Wert der cDNA ist mit ca. 26 als realistisch einzustufen und ist somit signifikant niedriger als der CT-Wert der RNA von 36. Bei der Untersuchung des mTaar8b wurden CT-Werte von jeweils ca. 28 für cDNA und RNA erzielt. Diese beiden Werte sind ohne signifikanten Unterschied und müssen in der Zusammenschau der Ergebnisse als Nachweis keiner Bildung von Amplifikaten gewertet werden.

Dargestellt im Diagramm ist der Mittelwert mit dem Standardfehler ( $\pm$ S.E.M.). Die drei \*\*\* kennzeichnen eine Signifikanz von  $p < 0,001$ .

(mADRB1: muriner adrenoceptor beta 1/  $\beta$ -1-adrenerger Rezeptor)

### 3.1.3 Ergebnisse der *in-situ*-Hybridisierung

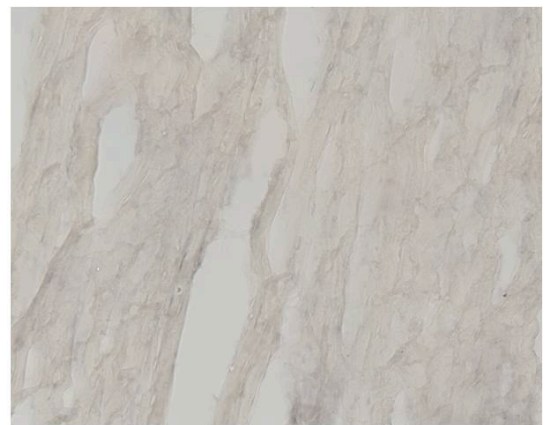
Zur Bestätigung der Ergebnisse der RT-PCR und der Real-Time-quantitative-PCR, wurde außerdem eine *in-situ*-Hybridisierung durchgeführt. Bei dieser Methode erfolgt der Nachweis der Expression auf Ebene der mRNA mittels LNA<sup>TM</sup>-Sonden (Locked Nucleic Acid), welche sich durch eine hohe Spezifität und Affinität auszeichnen.

Um die Aussagekraft der Ergebnisse besser zu beurteilen und deren Richtigkeit zu überprüfen, wurden verschiedene Kontrollen durchgeführt. Zum einen musste gezeigt werden, dass die angefertigten Schnitte der Herzen für den Prozess der *in-situ*-Hybridisierung funktionstüchtig und geeignet sind. Hierfür wurden Sonden für den Transkriptionsfaktor Gata4 genutzt, welcher eine entscheidende Rolle in der Entwicklung und Differenzierung von Herzgewebe spielt, also ubiquitär exprimiert wird (Molkentin, Lin et al. 1997). Wie in Bild a) der Abbildung 14 zu erkennen ist, findet sich eine deutliche Färbung sowohl des Nukleus als auch der perinukleären Region in den Kardiomyozyten. Die Methode der *in-situ*-Hybridisierung und auch das eingesetzte und behandelte kardiale Gewebe sind somit funktionstüchtig. Um eine Färbung dieser Regionen durch die bloße Behandlung mit den im Rahmen der *in-situ*-Hybridisierung genutzten Reagenzien auszuschließen, wurde eine Negativkontrolle durchgeführt.

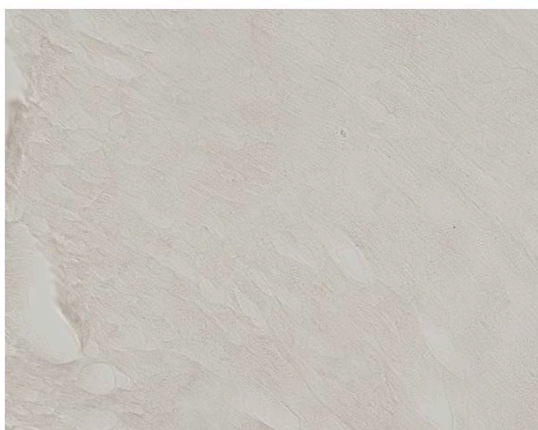
Hierbei wurde keine Sonde eingesetzt, woraufhin das Gewebe wie in Bild b) als homogen graugefärbt erschien. Wurde dagegen die Methode mit der mTaar8b angewandt, so zeigte sich, wie in Bild c) deutlich wird, keine Färbung. Das Gewebe erscheint teilweise sogar heller als in der Negativkontrolle. Somit ist auch im Rahmen dieser Untersuchungen eine Expression des mTaar8b in kardialen Geweben nicht nachzuweisen. Um die Möglichkeit einer funktionslosen mTaar8b-Sonde auszuschließen, wurden ebenfalls mit mTaar8b transient transfizierte COS-7-Zellen untersucht. Da es sich hierbei um eine entscheidende Kontrolle handelte und die Färbung deutlich zu erkennen sein sollte, wurde im Rahmen der *in-situ*-Hybridisierung der COS-7-Zellen als zweiter Antikörper Streptavidin-DY488 genutzt. Wie das Bild d) deutlich zeigt, bindet die Sonde für den mTaar8b ordnungsgemäß und ist somit funktionstüchtig.



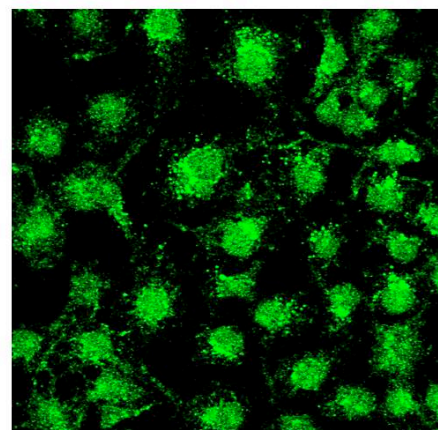
a) mGata4 – Herz – 40x



b) negativ Kontrolle – Herz – 40x



c) mTaar8b – Herz – 40x



d) mTaar8b – COS-7 – 40x

**Abbildung 14:** Gezeigt sind Darstellungen einer exemplarischen *in-situ*-Hybridisierung.

- a) Im Fall der verwendeten mGata4-Sonde ist eine deutliche Färbung des Nukleus und der perinukleären Umgebung der Kardiomyozyten zu erkennen. b)

Im direkten Vergleich erscheint das mit der Negativkontrolle behandelte Herzgewebe als homogen graugefärbt. Daraus lässt sich schließen, dass die Methode der *in-situ*-Hybridisierung erfolgreich verläuft und eine klar zur Negativkontrolle abgrenzbare Färbung zu erwarten ist. c) Wurde die mTaar8b-Sonde im Rahmen der Untersuchung verwendet, so ist es zu keiner Färbung gekommen. Im direkten Vergleich erscheint das Gewebe durchaus heller als die Negativkontrolle. Um spezifisch die Funktionalität der mTaar8b-Sonde zu überprüfen, wurden COS-7-Zellen mit dem mTaar8b transient transfiziert. Nach Adaptation des Protokolls an diese Zelllinie konnte mithilfe des genutzten Streptavidin-DY488-Antikörpers eine erfolgreiche Bindung der Sonde an die mRNA nachgewiesen werden.

### 3.1.4 Funktionelle Charakterisierung

Um einen Rezeptor funktionell zu charakterisieren, werden zwei verschiedene Eigenschaften herangezogen: Zum einen wird seine Präsenz an der Zelloberfläche beurteilt, zum anderen wird der Signaltransduktionsweg ermittelt. Dabei werden die Rezeptoren heterolog in Zellkultur exprimiert.

#### 3.1.4.1 Oberflächenexpression

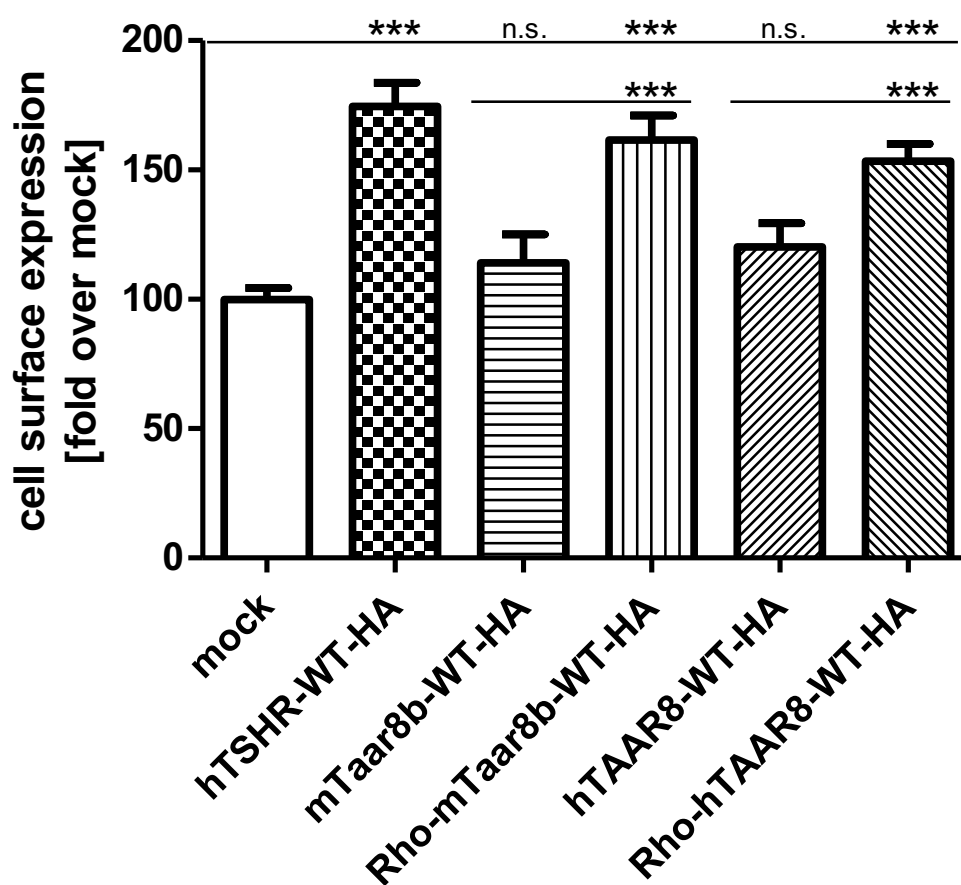
Bevor ein Rezeptor im Rahmen einer heterologen Expression auf den Mechanismus seiner Signaltransduktion hin untersucht werden kann, muss zunächst seine ausreichende Oberflächenexpression gewährleistet sein. Dies ist insbesondere dann notwendig, wenn Liganden geprüft werden, welche aufgrund ihrer chemischen Eigenschaften nicht in der Lage sind, an mögliche intrazelluläre Rezeptoren zu binden, und es auch keine spezifischen Transporter gibt – so wie im Fall der im Rahmen dieser Arbeit verwendeten Liganden.

Das genutzte Verfahren zur Überprüfung der Oberflächenexpression ist ein Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA), wobei die Grundvoraussetzung für dieses Verfahren ist, dass der Rezeptor über einen N-terminalen HA- (Hämagglutinin) tag verfügt. Als Referenzrezeptor wurde der humane Thyreoidea-Stimulierendes-Hormon-Rezeptor (TSHR) verwendet, der für eine ausreichende Oberflächenexpression bekannt war. Hierbei wurden sämtliche Werte auf mock-transfizierte Zellen bezogen (mock = Leervektor).

In Abbildung 15 ist zu erkennen, dass es zu einer nicht signifikanten Oberflächenexpression des mTaar8b kommt. Nach Einfügen der ersten 20 Aminosäuren des

bovinen Rhodopsins (Rho-tag) steigerte sich diese um ca. 50 %. Somit findet sich eine signifikante Expression des Rezeptors an der Zelloberfläche, die sich mit der des TSHR vergleichen lässt.

Weiterhin ist eine nicht signifikante Oberflächenexpression des hTAAR8 zu erkennen. Nach Einfügen der ersten 20 Aminosäuren des bovinen Rho-tag ist diese um ca. 30 % gesteigert; folglich findet sich eine signifikante Expression des Rezeptors an der Zelloberfläche.



**Abbildung 15:** Die Grafik zeigt die Oberflächenexpression zweier verschiedener mTaar8b-Varianten.

Gemessen wurde die Oberflächenexpression verschiedener Rezeptoren mithilfe eines ELISA. Eine Grundvoraussetzung ist, dass die Rezeptoren über einen N-terminalen HA- (Hämaggglutinin) tag verfügen. Bezogen sind die Werte auf mock-transfizierte Zellen (mock = Leervektor). Als Positivkontrolle diente der humane Thyreoidea-Stimulierendes-Hormon-Rezeptor (hTSHR), welcher deutlich an der Zelloberfläche exprimiert ist. COS-7-Zellen wurden mit den verschiedenen Rezeptoren transient transfiziert und nach drei Tagen mit 4-

prozentigem Formaldehyd fixiert. Der extrazellulär gelegene HA-tag konnte mit einem Anti-HA-Biotin Antikörperkonjugat gebunden und durch den Substratumsatz einer an Streptavidin gekoppelten Peroxidase fotometrisch detektiert werden. Die Daten sind gemittelt und stammen aus drei unabhängigen Versuchen, die jeweils als Sechsfachbestimmung angesetzt wurden. Dargestellt im Diagramm ist der Mittelwert mit dem Standardfehler ( $\pm$ S.E.M.). Die drei \*\*\* kennzeichnen eine Signifikanz von  $p < 0,001$ ; n.s. ist hingegen nicht signifikant mit  $p > 0,05$ .

### 3.1.4.2 *Signaltransduktion*

Da es keinen Hinweis gab, an welches G-Protein der murine und humane Taar koppeln, wurde die Kopplung an den verschiedenen G-Protein-Familien untersucht. Dabei wurde zum einen auf eine mögliche Basalaktivität geachtet, also eine Aktivität des Rezeptors ohne Ligandenstimulation. Diesbezüglich wurden verschiedene Liganden ausprobiert, von denen eine Aktivierung des TAAR1 bereits bekannt war. Zusätzlich wurden zwei verschiedene Varianten getestet, welche bekanntermaßen zu einer konstitutiven Basalaktivität einzelner Rezeptoren geführt haben. Zum einen wurde durch zielgerichtete Mutagenese Serin (S) durch Tryptophan (W) ersetzt. Diese Variante ist bekannt durch eine Patienten-Mutation im TSH-Rezeptor, bei welchem es eine Steigerung der Aktivität durch Stimulation der Adenylatzyklase bewirkt (Winkler, Kleinau et al. 2010). Sie ist innerhalb eines CWXP- (Cystein-Tryptophan-nicht näher benannt-Prolin) bzw. in einem SWXP- (Serin-Tryptophan-nicht näher benannt-Prolin) Motiv in der Transmembran Helix sechs (TMH6). Daher wurden auch diese Taar-Varianten auf eine mögliche konstitutive Basalaktivität untersucht.

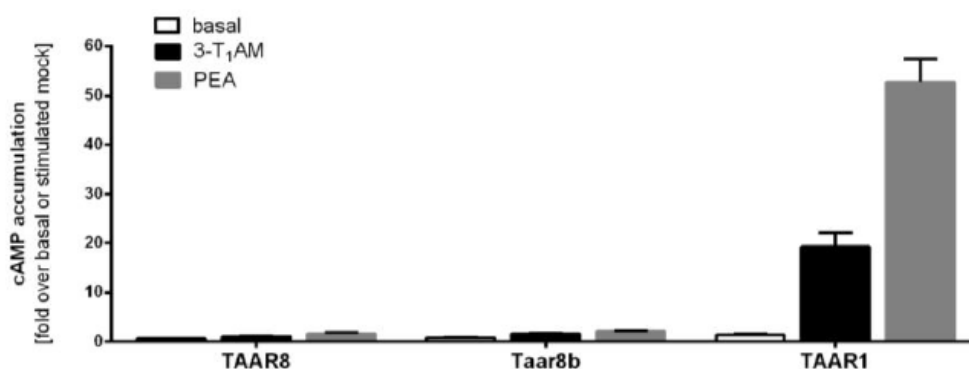
Weiterhin wurde für den murinen Taar8b die Variante P274GinsG konstruiert. Das bedeutet, dass das Prolin an Stelle 274 durch ein Glycin ausgetauscht und ein zusätzliches Glycin eingefügt wurde. Auch diese liegt in einer hoch konservierten Aminosäuren-Region in der TMH6 und führte im Falle des TSH-Rezeptors zu einer konstitutiven Basalaktivität (Biebermann, Winkler et al. 2012).

#### 3.1.4.2.1 *cAMP-Akkumulation*

##### 3.1.4.2.1.1 *G $\alpha_s$ -Aktivierung*

Koppelt ein GPCR an G $\alpha_s$ -Proteine, so kommt es durch Aktivierung der Adenylatzyklase zu einer intrazellulären Akkumulation von cAMP. Dieses wurde mithilfe eines

Kompetitionsassays einer als AlphaScreen® benannten Methode bestimmt. Es zeigt sich in der folgenden Abbildung eine deutliche Stimulation des hTAAR1 sowohl durch 3-Iodothyroanmin (3-T<sub>1</sub>AM) bzw. Phenylethylamin (PEA) und somit die Funktionalität des Assays. Wie in Abbildung 16 weiterhin zu erkennen ist, kommt es zu keiner basalen Aktivität sowohl des murinen als auch des humanen TAAR8. Weiterhin zeigte sich keine Aktivierung nach Stimulation mit 10 µM 3-T<sub>1</sub>AM bei murinem und humanem Wildtyp. Auch die Stimulation mit PEA erwies sich bei diesen beiden Rezeptoren als nicht erfolgreich.



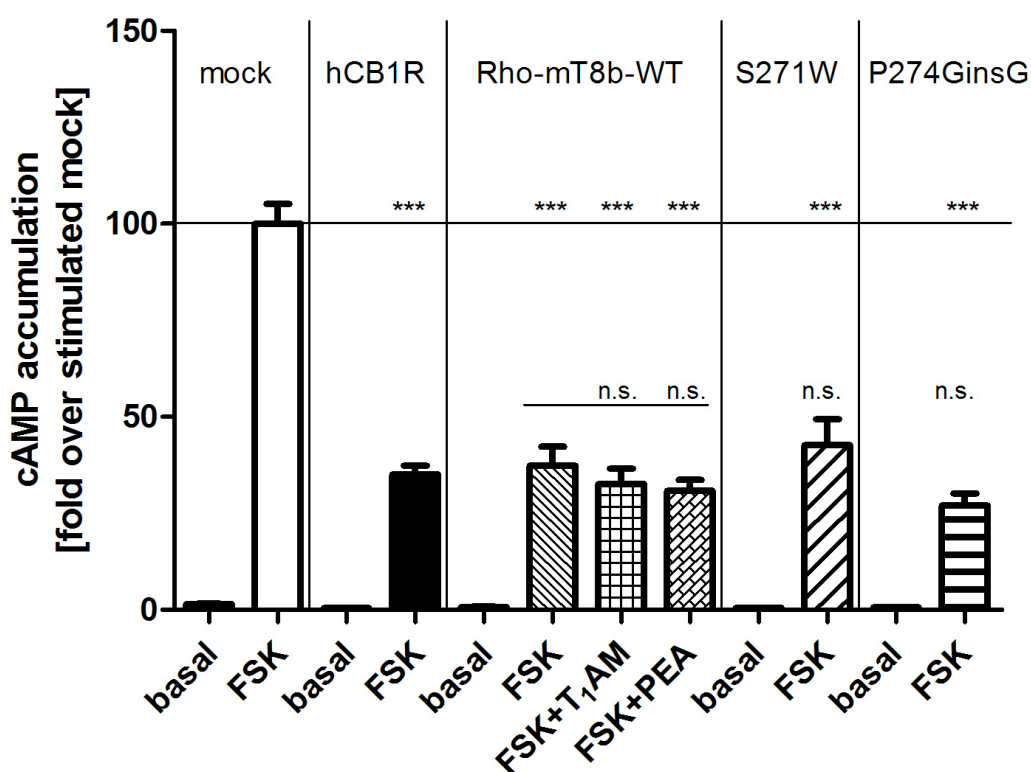
**Abbildung 16:** Untersuchung einer möglichen G $\alpha_s$ -Aktivierung.

Zwei Tage nach der transienten Transfektion mit den Rezeptoren wurden die HEK-293-Zellen mit den verschiedenen Liganden stimuliert bzw. der Basalwert ermittelt und die zyklische Adenosin-3'-5'-monophosphat- (cyclic adenosin-3'-5'monophosphate, cAMP) Akkumulation in der Zelle gemessen. Als Positivkontrolle diente der humane trace amine-associated receptor 1 (hTAAR1), welcher durch Bindung seiner Liganden 3-T<sub>1</sub>AM bzw. PEA das G $\alpha_s$ -Protein aktiviert. Bezogen sind die Werte auf die basale bzw. stimulierte Aktivität von mock-transfizierten Zellen (mock = Leervektor). Basal bedeutet, dass kein Ligand hinzugefügt wurde. Die Daten sind gemittelt aus drei unabhängigen Versuchen, die jeweils eine Dreifachbestimmung waren. Dargestellt im Diagramm ist der Mittelwert mit dem Standardfehler ( $\pm$ S.E.M.). Die zwei \*\* kennzeichnen eine Signifikanz von  $p < 0,01$ , drei \*\*\* kennzeichnen eine Signifikanz von  $p < 0,001$ .

(T<sub>1</sub>AM: 3-Iodothyronamin; PEA:  $\beta$ -Phenylethylamin)

### 3.1.4.2.1.2 $G\alpha_{i/o}$ -Aktivierung

Mithilfe der AlphaScreen<sup>®</sup> Methode wurde weiterhin eine mögliche  $G\alpha_{i/o}$ -Aktivierung bestimmt. Dabei zeigten sich signifikant reduzierte cAMP-Konzentrationen des als Positivkontrolle genutzten humanen Cannabinoid-Rezeptor 1 (hCB1R) nach Stimulation von Forskolin Stimulation (Turu, Simon et al. 2007). Für den mTaar8b Wildtyp zeigte sich eine ausgeprägte Basalaktivität in der  $G\alpha_{i/o}$ -Aktivierung, denn die cAMP-Konzentrationen sind nach Stimulation mit Forskolin auf ca. 40 % reduziert. Die zusätzliche Stimulation mit TAAR-Liganden wie 3-T<sub>1</sub>AM oder PEA haben auf diesen jedoch keinen weiteren signifikanten Effekt. Die hier verwendeten Varianten des mTaar8b S271W & P247GinsG zeigen ebenfalls eine deutliche Basalaktivität für die Signaltransduktion, vermittelt durch ein  $G\alpha_{i/o}$ -Protein. Diese ist jedoch nicht signifikant höher als die Basalaktivität des Wildtyp-Rezeptors.



**Abbildung 17:** Untersuchung einer möglichen  $G\alpha_{i/o}$ -Aktivierung des mTAAR8b.

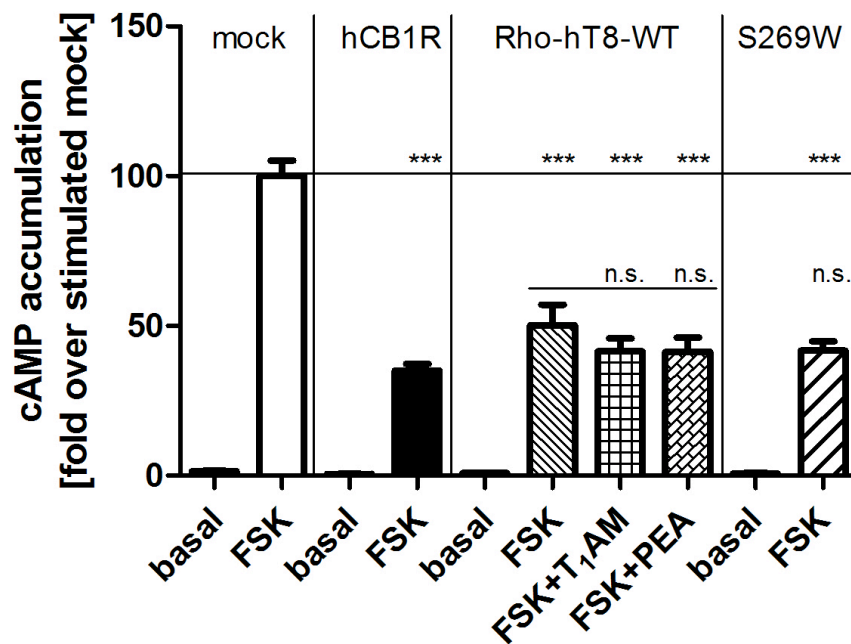
Zwei Tage nach der transienten Transfektion mit den Rezeptoren wurden die HEK-293-Zellen mit den verschiedenen Liganden stimuliert bzw. der Basalwert ermittelt und die zyklische Adenosin-3'-5'-monophosphat- (cyclic adenosin-3'-5'-monophosphate, cAMP) Akkumulation in der Zelle gemessen. Als



Positivkontrolle diente der humane Cannabinoid-Rezeptor 1 (hCB1R), welcher als basal aktiv für die Aktivierung des  $G\alpha_{i/o}$ -Proteins beschrieben ist (Turu, Simon et al. 2007). Eine solche  $G\alpha_{i/o}$ -Aktivierung wird nach Stimulation mit Forskolin gemessen, welches in der Lage ist, die Adenylatzyklase (AC) direkt anzuregen. Dadurch wird cAMP gebildet. Eine  $G\alpha_{i/o}$ -Aktivierung führt seinerseits durch Inhibierung der AC zu erniedrigten cAMP-Konzentrationen. Bezogen sind die Werte auf die durch Forskolin stimulierte Aktivität von mock-transfizierten Zellen (mock = Leervektor). Die Daten sind gemittelt aus drei unabhängigen Versuchen, die jeweils eine Vierfachbestimmung waren. Dargestellt im Diagramm ist der Mittelwert mit dem Standardfehler ( $\pm$ S.E.M.). Die drei \*\*\* kennzeichnen eine Signifikanz von  $p < 0,001$ ; n.s. ist hingegen nicht signifikant mit  $p > 0,05$ .

(FSK: Forskolin; PEA:  $\beta$ -Phenylethylamin; 3-T<sub>1</sub>AM: 3-Iodothyronamin)

Für den hTAAR8 Wildtyp zeigt sich eine ausgeprägte Basalaktivität in der  $G\alpha_{i/o}$ -Aktivierung, denn die cAMP-Konzentrationen sind nach Stimulation mit Forskolin auf ca. 50 % reduziert. Die zusätzliche Stimulation mit TAAR-Liganden wie 3-T<sub>1</sub>AM oder PEA haben auf diesen jedoch keinen weiteren signifikanten Effekt. Die hier verwendete Variante des hTaar8 S269W zeigt ebenfalls eine deutliche Basalaktivität für die Signaltransduktion vermittelt durch ein  $G\alpha_{i/o}$ -Protein. Diese ist jedoch nicht signifikant höher als die Basalaktivität des Wildtyp Rezeptors.



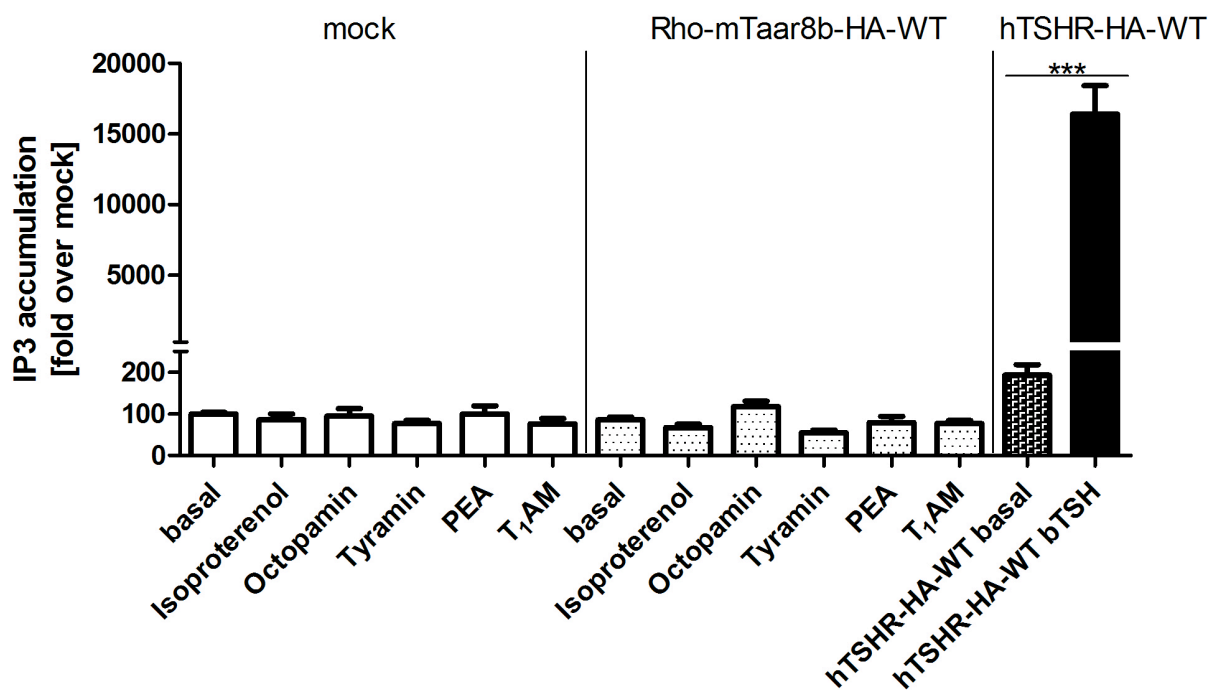
**Abbildung 18:** Untersuchung einer möglichen  $G\alpha_{i/o}$ -Aktivierung des hTAAR8.

Zwei Tage nach der transienten Transfektion mit den Rezeptoren wurden die HEK-293-Zellen mit den verschiedenen Liganden stimuliert bzw. der Basalwert ermittelt und die zyklische Adenosin-3'-5'-monophosphat- (cyclic adenosin-3'-5'-monophosphate, cAMP) Akkumulation in der Zelle gemessen. Als Positivkontrolle dient der humane Cannabinoid-Rezeptor 1 (hCB1R), welcher als basal aktiv für die Aktivierung des  $G\alpha_{i/o}$ -Proteins beschrieben ist. Eine solche  $G\alpha_{i/o}$ -Aktivierung wird nach Stimulation mit Forskolin gemessen, welches in der Lage ist die Adenylatzyklase (AC) direkt anzuregen. Dadurch wird cAMP gebildet. Eine  $G\alpha_{i/o}$ -Aktivierung führt seinerseits durch Inhibierung der AC zu erniedrigten cAMP- Konzentrationen. Bezogen sind die Werte auf die durch Forskolin stimulierte Aktivität von mock-transfizierten Zellen (mock = Leervektor). Die Daten sind gemittelt aus drei unabhängigen Versuchen, die jeweils eine Vierfachbestimmung waren. Dargestellt im Diagramm ist der Mittelwert mit dem Standardfehler ( $\pm$ S.E.M.). Die drei \*\*\* kennzeichnen eine Signifikanz von  $p < 0,001$ ; n.s. ist hingegen nicht signifikant mit  $p > 0,05$ . (FSK: Forskolin; PEA:  $\beta$ -Phenylethylamin; 3-T<sub>1</sub>AM: 3-Iodothyronamin)

### 3.1.4.2.2 IP3-Reportergen-Assay

#### 3.1.4.2.2.1 $G\alpha_{q/11}$ -Aktivierung

Um eine mögliche Aktivierung des  $G\alpha_{q/11}$ -Proteins nachzuweisen, wurde die intrazelluläre IP3-Konzentration in transient transfizierten HEK-293-Zellen ermittelt, wie bereits unter Punkt 2.2.4.2 beschrieben. In der folgenden Abbildung ist deutlich zu erkennen, dass eine signifikante Stimulation des hTSHR durch bovines TSH stattfand; damit ist die Funktionalität des Assays nachgewiesen. Alle im Rahmen dieser Untersuchung am mTaar8b genutzten Liganden wurden ebenfalls an mock-transfizierten Zellen (mock = Leervektor) getestet, um eine mögliche Aktivierung besser beurteilen zu können. Sie führten in diesem Fall nicht zu einer IP3-Formation. Für den mTaar8b zeigte sich keinerlei Basalaktivität; außerdem ist keiner der Liganden in der Lage, durch Bindung eine  $G\alpha_{q/11}$ -Aktivierung nach sich zu ziehen.

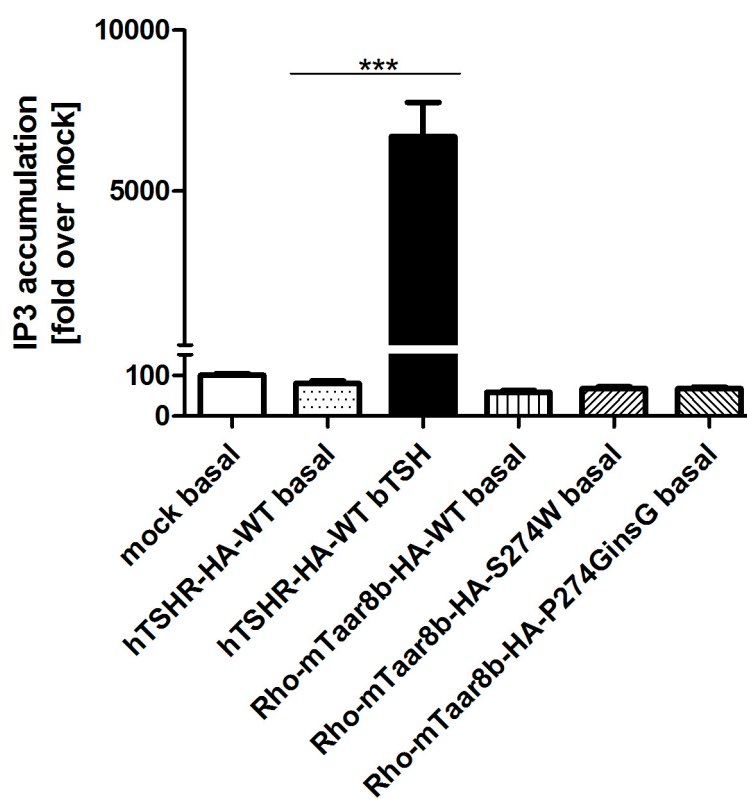


**Abbildung 19:** Untersuchung einer möglichen  $G\alpha_{q/11}$ -Aktivierung des mTAAR8b durch verschiedene Liganden.

Zwei Tage nach der transienten Transfektion der Rezeptoren wurden die HEK-293-Zellen mit den verschiedenen Liganden stimuliert bzw. der Basalwert ermittelt und die Inositol-1,4,5-trisphosphat (IP3) Formation über einen Reportergern-Assay in der Zelle gemessen. Bezogen sind die Werte auf die basale Aktivität von mock-transfizierten Zellen (mock = Leervektor). Basal bedeutet, dass kein Ligand hinzugefügt wurde. Als Positivkontrolle diente der

humane Thyreoidea-Stimulierendes-Hormon-Rezeptor (hTSHR), welcher durch Bindung von bovinem Thyreoidea-Stimulierenden-Hormon (bTSH) das  $G\alpha_{q/11}$ -Protein aktiviert wird. Die Daten sind ermittelt aus zwei unabhängigen Versuchen, die jeweils als Vierfachbestimmungen angesetzt wurden. Dargestellt im Diagramm ist der Mittelwert mit dem Standardfehler ( $\pm$ S.E.M.). Die drei \*\*\* kennzeichnen eine Signifikanz von  $p < 0,001$ . (PEA:  $\beta$ -Phenylethylamin; 3-T<sub>1</sub>AM: 3-Iodothyronamin)

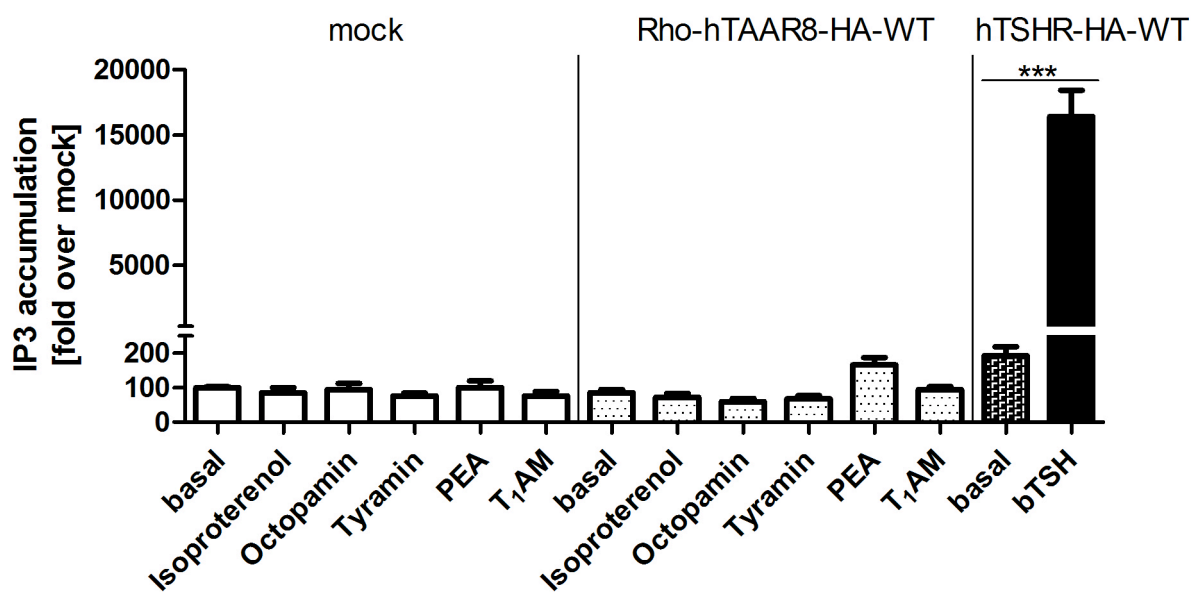
Da sich der Rhodopsin-getaggte murine Wildtyp-Rezeptor für diesen Signalweg weder basal noch unter Zuhilfenahme der getesteten Liganden aktiv zeigte, wurden die generierten Varianten auf eine mögliche konstitutive Basalaktivität hin untersucht. Auch hier erfolgte die Kontrolle der Funktionalität des Assays mithilfe des hTSHR, der eine signifikante Stimulation aufwies. Weiterhin ist in der folgenden Abbildung zu erkennen, dass die hier verwendeten Varianten des mTaar8b keine konstitutive Basalaktivität für die Signaltransduktion, vermittelt durch ein  $G\alpha_{q/11}$ -Protein, erkennen lassen.



**Abbildung 20:** Untersuchung einer möglichen  $G\alpha_{q/11}$ -Aktivierung verschiedener mTaar8b-Varianten.

Zwei Tage nach der transienten Transfektion der Rezeptoren wurden die HEK-293-Zellen stimuliert bzw. der Basalwert ermittelt und die Inositol-1,4,5-trisphosphat (IP3) Formation über einen Reporter-gen-Assay in der Zelle gemessen. Bezogen sind die Werte auf die basale Aktivität von mock-transfizierten Zellen (mock = Leervektor). Basal bedeutet, dass kein Ligand hinzugefügt wurde. Als Positivkontrolle diente der humane Thyreoidea-Stimulierendes-Hormon-Rezeptor (hTSHR), welcher durch Bindung von bovinem Thyreoidea-Stimulierenden-Hormon (bTSH) das  $G\alpha_{q/11}$ -Protein aktiviert. Die Daten sind ermittelt aus zwei unabhängigen Versuchen, die jeweils als Sechsfachbestimmungen angesetzt wurden. Dargestellt im Diagramm ist der Mittelwert mit dem Standardfehler ( $\pm$ S.E.M.). Die drei \*\*\* kennzeichnen eine Signifikanz von  $p < 0,001$ .

Als nächstes wurde die humane Variante ebenfalls auf eine mögliche  $G\alpha_{q/11}$ -Protein-Kopplung hin untersucht. Es zeigte sich auch in diesem Reaktionsansatz eine signifikante Stimulation des hTSHR durch bovines TSH und somit die Funktionalität des Assays. Alle im Rahmen dieser Untersuchung am hTAAR8 genutzten Liganden wurden ebenfalls an mock-transfizierten Zellen (mock = Leervektor) getestet, um eine mögliche Aktivierung besser beurteilen zu können. Sie führten in diesem Fall nicht zu einer IP3-Formation. Für den hTAAR8 zeigte sich keinerlei Basalaktivität; zudem war keiner der Liganden in der Lage, durch Bindung eine  $G\alpha_{q/11}$ -Aktivierung nach sich zu ziehen.

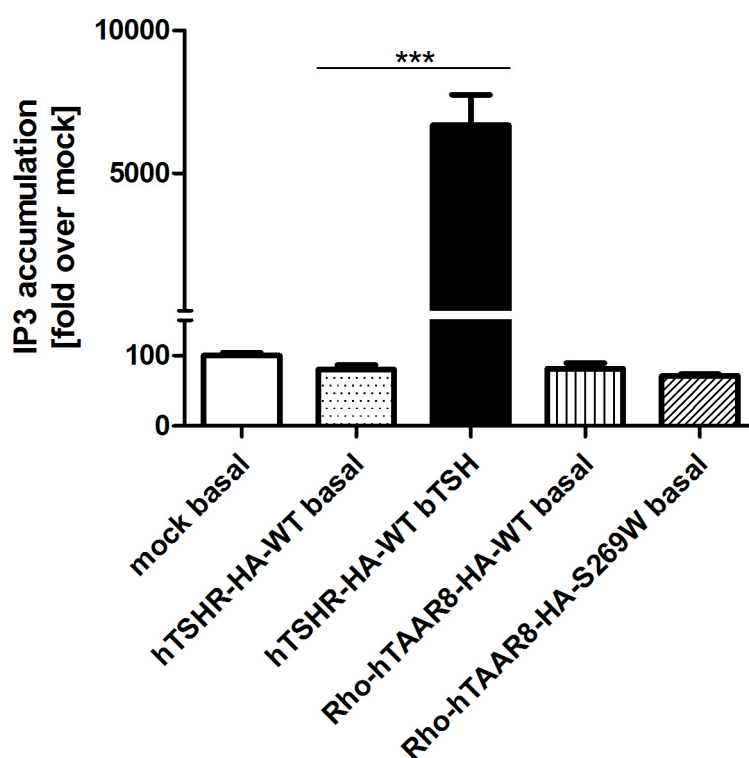


**Abbildung 21:** Untersuchung einer möglichen  $G\alpha_{q/11}$ -Aktivierung des hTAAR8 durch verschiedene Liganden.

Zwei Tage nach der transienten Transfektion der Rezeptoren wurden die HEK-293-Zellen mit den verschiedenen Liganden stimuliert bzw. der Basalwert ermittelt und die Inositol-1,4,5-trisphosphat (IP3) Formation über einen Reporter-gen-Assay in der Zelle gemessen. Bezogen sind die Werte auf die basale Aktivität von mock-transfizierten Zellen (mock = Leervektor). Basal bedeutet, dass kein Ligand hinzugefügt wurde. Als Positivkontrolle diente der humane Thyreoidea-Stimulierendes-Hormon Rezeptor (hTSHR), welcher durch Bindung von bovinem Thyreoidea-Stimulierenden-Hormon (bTSH) das  $G\alpha_{q/11}$ -Protein aktiviert. Die Daten sind ermittelt aus zwei unabhängigen Versuchen, die jeweils als Vierfachbestimmungen angesetzt wurden. Dargestellt im Diagramm ist der Mittelwert mit dem Standardfehler ( $\pm$ S.E.M.). Die drei \*\*\* kennzeichnen eine Signifikanz von  $p < 0,001$ .

(PEA:  $\beta$ -Phenylethylamin; 3-T<sub>1</sub>AM: 3-Iodothyronamin)

Da sich keinerlei Basalaktivität oder Stimulation durch die genutzten Liganden zeigte, wurde der durch zielgerichtete Mutagenese erzeugte hTAAR8 auf eine mögliche konstitutive Basalaktivität hin untersucht. Erkennbar war eine signifikante Stimulation des hTSHR durch bovines TSH und somit auch die Funktionalität des Assays. Die hier verwendeten Varianten des hTAAR8 wiesen keine konstitutive Basalaktivität für die Signaltransduktion, vermittelt durch ein  $G\alpha_{q/11}$ -Protein, auf.



**Abbildung 22:** Untersuchung einer möglichen  $G_{\alpha_{q/11}}$ -Aktivierung verschiedener hTAAR8-Varianten.

Zwei Tage nach der transienten Transfektion der Rezeptoren wurden die HEK-293-Zellen stimuliert bzw. der Basalwert ermittelt und die Inositol-1,4,5-trisphosphat (IP3) Formation über einen Reporter-gen-Assay in der Zelle gemessen. Bezogen sind die Werte auf die basale Aktivität von mock-transfizierte Zelle (mock: Leervektor). Basal bedeutet, dass kein Ligand hinzugefügt wurde. Als Positivkontrolle dient der humane Thyreoidea-Stimulierendes-Hormon Rezeptor (hTSHR), welcher durch Bindung von bovinem Thyreoidea-Stimulierenden-Hormon (bTSH) das  $G_{\alpha_{q/11}}$ -Protein aktiviert. Die Daten sind ermittelt aus zwei unabhängigen Versuchen, die jeweils als Sechsfachbestimmungen angesetzt wurden. Dargestellt im Diagramm ist der Mittelwert mit dem Standardfehler ( $\pm$ S.E.M.). Die drei \*\*\* kennzeichnen eine Signifikanz von  $p < 0,001$ .

## 4 Diskussion

Im Rahmen dieser Arbeit sollten zwei grundlegende Fragen geklärt werden: Zum einen sollte eine mögliche Expression des mTaar8b im murinen Herzen nachgewiesen werden. Zum anderen sollte geklärt werden, an welches G-Protein der murine Taar8b und der humane TAAR8 koppeln.

Im Folgenden sollen die erhobenen Daten kritisch betrachtet und in die bestehende Forschungsliteratur eingeordnet werden.

### 4.1 Hintergrund der Expressionsuntersuchungen

Da 3-T<sub>1</sub>AM negativ chronotrope wie auch negativ inotrope Effekte an Nagetierherzen hervorrief, stellte sich die Frage, welcher Rezeptor für diese Effekte verantwortlich sein könnte (Scanlan, Suchland et al. 2004). Dass dieser Effekt nicht adrenerg vermittelt sein kann, zeigte die zusätzliche Applikation von sympathomimetischem Isoproterenol (Scanlan, Suchland et al. 2004). Aufgrund von strukturellen Gemeinsamkeiten mit verschiedenen biogenen Aminen, lag der Schluss nahe, dass der gesuchte Rezeptor innerhalb der TAARs zu finden ist. Schließlich konnte in Studien mit HEK-Zellen gezeigt werden, dass 3-T<sub>1</sub>AM als Ligand für Taar1 von Maus und Ratte wirkt (Scanlan, Suchland et al. 2004). Da negativ inotrope und negativ chronotrope Effekte ausschließlich von G<sub>α<sub>i/o</sub></sub>-koppelnden Rezeptoren vermittelt sein können, kam der ausschließlich G<sub>α<sub>s</sub></sub>-koppelnde Taar1 als verantwortlicher Rezeptor nicht in Frage, auch wenn dessen Transkripte in der Ventrikelwand bei Ratten nachgewiesen werden konnten (Chiellini, Frascarelli et al. 2007). Weiterhin konnten bei der TAAR1-knockout-Maus keine signifikanten Veränderungen bzgl. Gesundheitszustand, Lebenserwartung, Fertilität oder Körpergewicht belegt werden (Lindemann, Meyer et al. 2008). Auch wenn es Vermutungen gab, dass ein G<sub>α<sub>s</sub></sub>-koppelnder Rezeptor, welcher negativ inotrope und negativ chronotrope Effekte hervorruft, auf bisher unbekannte Weise aktiviert werden würde, wurde nach weiteren Alternativen gesucht (Chiellini, Frascarelli et al. 2007). Diesbezüglich wurde vermutet, dass es einen weiteren Rezeptor innerhalb der TAAR-Familie geben könnte, der G<sub>α<sub>i/o</sub></sub> koppelt und im murinen Herzen exprimiert wird. In der Literatur ließ sich kein Hinweis auf einen solchen Rezeptor finden, da alle bis dato bekannten Rezeptoren G<sub>α<sub>s</sub></sub> oder G<sub>α<sub>q/11</sub></sub> koppelten. Jedoch zeigten qPCR-Daten, dass



von den Rezeptoren innerhalb der TAAR-Familie insbesondere TAAR8a in Rattenherzen vorhanden war. Transkripte fanden sich in einer 35- bis zu 116-fachen Konzentration im Vergleich zu anderen TAARs (Chiellini, Frascarelli et al. 2007). In der Zusammenschau dieser Daten konnte die Hypothese einer Expression des bis dahin orphanen Taar8b im murinen Herzen aufgestellt werden, welcher möglicherweise in der Lage ist,  $G\alpha_{i/o}$ -Protein zu koppeln.

Da sowohl die eigentlichen Liganden nicht bekannt sind als auch die ursprüngliche Funktion von Taar8b nicht geklärt ist, wird der Rezeptor als sog. orphaner Rezeptor beschrieben.

## 4.2 Experimentelle Herausforderung der Taars

Natürlich wurden im Rahmen der Vorbereitungen für die Expressionsstudien auch Expressions-Datenbanken – wie der online verfügbare SymAtlas – zurate gezogen. Dieser ließ eine minimale Expression von Taar8b im murinen Herzen vermuten. Jedoch sind solche Daten insofern als kritisch zu bewerten, als es hier um eine genomweite Detektion von Genen geht. Im Rahmen solcher Studien ist demzufolge keine explizite Anpassung der Untersuchungsbedingungen an die besonderen Gegebenheiten und Eigenschaften von verschiedenen Rezeptorfamilien vorgesehen. Man muss solche Daten daher grundsätzlich mit Vorsicht genießen und darf nicht vergessen, dass sie lediglich einen Hinweis auf eine mögliche Expression geben können.

Bei der Planung der Expressionsstudien dieser Arbeit ergaben sich zwei wesentliche Besonderheiten: Zum einen sind die TAARs in sehr geringen Mengen von 15–100 copies/ng cDNA transkribiert (Borowsky, Adham et al. 2001). Dies sollte die Detektion von einzelnen Kopien sehr schwierig machen und es musste letztendlich eine sehr sensitive Methode gewählt werden. Zum anderen sind im Menschen bis auf TAAR2 alle TAARs single-exon Gene von einer Größe von ca. 1 kb. Dies bedeutet, dass sie lediglich aus einem Exon bestehen und keine Introns beinhalten. Auch der TAAR8 ist sowohl im Menschen als auch in der murinen Version lediglich ein single-exon Gen von einer Größe von ca. 1030 bp.

Im Rahmen von experimentellen Untersuchungen kommt den richtigen Kontrollen eine entscheidende Schlüsselfunktion zu: Die Methode muss stets auf ihre Funktionalität hin untersucht werden, genauso muss eine Verunreinigung der Proben ausgeschlossen

werden. In dem besonderen Fall von Expressionsuntersuchungen von single-exon Genen ist sicherzustellen, dass tatsächlich eine Detektion von transkribierter mRNA stattfindet. Aus diesem Grund ist eine vollständige Entfernung von genomischer DNA von zentraler Bedeutung.

Enthält das gesuchte Gen ein Intron, so gibt es eine einfache Möglichkeit, die Herkunft der Amplifikate zu überprüfen. Hierfür ist es ausreichend, ein Primerpaar für das gewünschte PCR-Produkt zu wählen, welches Intron-überspannend ist, sodass sich die Produkte aus genomischer DNA und der transkribierten mRNA hinsichtlich ihrer Basenpaar-Anzahl erheblich unterscheiden. Wäre die genomische DNA Ursprung der Transkripte, würde auch die Intron-Region mit transkribiert werden; dann wiederum wäre das Produkt – im Vergleich zu dem Fall, in dem die mRNA als Template dient – deutlich größer.

Diese Art der Kontrolle fiel im Rahmen meiner Untersuchungen jedoch weg, da der Taar8 weder in der murinen noch in der humanen Variante ein Intron enthält. Aus diesem Grund mussten Strategien entwickelt werden, die sicherstellten, dass meine Amplifikate tatsächlich mRNA als Ursprung hatten. Es wurde daher im Rahmen der vorliegenden Untersuchungen ein besonderes Augenmerk auf die Kontrollen gelegt.

### **4.3 Expressionsergebnisse mittels verschiedener PCR-Techniken**

In den ersten Untersuchungen mittels einfacher PCR ließen sich keine Transkripte detektieren. Dies hatte zwei mögliche Ursachen: Zum einen konnte es sein, dass es keine Transkription des Taar8 in den Herzen von gesunden C57BL/6J-Mäusen gibt; zum anderen wäre es denkbar, dass die verwendete Methode nicht sensitiv genug war. Auf jeden Fall zeigte dies jedoch, dass sich keine genomischen DNA-Moleküle mehr in der aufgereinigten mRNA befanden. Eine Verunreinigung mit genomischer DNA war somit ausgeschlossen und unsere Art der Aufreinigung der mRNA-Transkripte aus murinem kardialen Gewebe erfolgreich.

Da es weiterhin galt, die Hypothese einer Expression von Taar8b im murinen Herzen zu überprüfen, wurden weitere Versuchsreihen mittels qPCR durchgeführt. Diese Methode gilt als genauer, vor allem in der Interpretation der Ergebnisse, da sich anhand der Cycle of Threshold- (CT) Werte die Plausibilität der Ergebnisse einordnen lässt. Dieser Wert zeigt den Übergang eines exponentiellen in ein lineares Wachstum an (Wilhelm

and Pingoud 2003). Damit spricht ein niedriger CT-Wert für eine hohe Ausgangskonzentration des gewünschten Template, weshalb bereits sehr früh ein lineares Wachstum beginnen kann. Im Falle des murinen Taar8b war mit relativ hohen CT-Werten zu rechnen, da eine im Vergleich zu anderen Rezeptoren sehr geringe Expression bekannt war. Folglich waren auch hier wieder entsprechende Kontrollen entscheidend. Zunächst musste diesbezüglich die Funktionalität der qPCR geklärt sein. Zur Kontrolle wurde dabei das ubiquitär hoch exprimierte  $\beta$ -Aktin verwendet, woraufhin plausible CT-Werte von ca. 20 nachgewiesen werden konnten. Zum Vergleich lassen sich andere house-keeping genes – wie z. B. die Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase – in verschiedenen Geweben ebenfalls mit analogen CT-Werten nachweisen (Livak and Schmittgen 2001). Als zweites speziell kardiales Kontrollgen wurde der  $\beta$ -1-adrenerge Rezeptor gewählt. Auch hier konnten plausible CT-Werte von ca. 26 nachgewiesen werden. Für den Transkriptionsfaktor TATA-binding protein lassen sich im Vergleich hierzu im Herzen ebenfalls CT-Werte von ca. 26 ermitteln (Wiedemann C 10. Jahrgang ).

Ein weiterer Kontrollmechanismus stellte der Einsatz von RNA als Template in den qPCR-Untersuchungen da, zumal RNA von der Polymerase nicht als Ausgangspunkt genutzt werden kann. Eine Reinheit der Proben von genomischer DNA war bereits zuvor erwiesen. Hier waren demnach im Vergleich deutlich höhere CT-Werte zu erwarten, sodass für die Interpretation der CT-Werte mit einer deutlichen Signifikanz zu rechnen war. In unseren Untersuchungen ließen sich für den Taar8b CT-Werte von ca. 28 finden. Dies allein könnte als Nachweis eines sehr niedrig exprimierten Gens interpretieren werden. Überprüft man jedoch die Signifikanz dieses Wertes im Vergleich zu dem CT-Wert, bei dem RNA als Template eingesetzt wurde, so stellt man fest, dass dieser ebenfalls bei ca. 28 liegt. Infolgedessen lässt sich hier nicht von einem Nachweis von Transkripten sprechen. Es ist vielmehr wahrscheinlicher, dass sich irrelevante Amplifikate gebildet haben und detektiert wurden.

Es ließen sich also mithilfe der qPCR keine Taar8b-Transkripte in Herzen von gesunden Wildtyp-Mäusen nachweisen. Interessanterweise konnte im Jahr 2012 auch die Gruppe um Chiellini et al. in Pisa mittels qPCR ebenfalls keine Taar8b-Transkripte im Herzen von gesunden Wildtyp-Mäusen detektieren (Chiellini, Erba et al. 2012).

Da noch immer nicht ausgeschlossen werden konnte, dass die fehlende Detektion von Taar8b-Transkripten an der mangelnden Sensitivität der Technik der qPCR lag, war es notwendig, die bis dato erhobenen Ergebnisse erneut mit einer weiteren Technik zu überprüfen.

#### **4.4 Expressionsergebnisse der *in-situ*-Hybridisierung**

Im Rahmen einer Kooperation mit Prof. Matthias Tschöp, der zum damaligen Zeitpunkt an der University of Cincinnati einen Lehrstuhl innehatte, konnten *in-situ*-Hybridisierungen durchgeführt werden. Hierbei wurden spezielle Sonden benutzt, welche eine sehr hohe Spezifität und Affinität aufweisen. Auch hier mussten bestimmte Kontrolluntersuchungen mit eingeplant werden: Zum einen galt es, die Funktionalität der Methode der *in-situ*-Hybridisierung an sich zu überprüfen, wofür eine Sonde für den murinen Gata4 genutzt wurde – ein Transkriptionsfaktor, welcher ubiquitär im Herzen exprimiert wird. Wie auf Abbildung 14a) zu erkennen ist, konnte die Funktionalität dieser Methode durch eindeutige Anfärbung des Nukleus und der perinukleären Umgebung der Kardiomyozyten nachgewiesen werden. Jedoch zeigte das Myokard keinerlei Anfärbung im Fall der Sonde für Taar8b. Es konnten somit auch mittels *in-situ*-Hybridisierung keine Taar8b-Transkripte detektiert werden. Hierfür waren zwei Ursachen denkbar: Die Tatsache, dass keine Taar8b-Transkripte nachzuweisen waren, konnte zum einen darin begründet sein, dass das Gen nicht transkribiert wird; zum anderen war es möglich, dass die Sonde nicht funktionstüchtig war. Um nun noch die Funktionalität dieser Sonde im Detail nachzuvollziehen, wurden COS-7-Zellen transient mit dem murinen Taar8b transfiziert und ebenfalls einem angepassten Protokoll mit der Sonde unterzogen. In diesem Fall wurde das Protokoll etwas verändert, um auf die spezielle Situation von transient transfizierten Zellen einzugehen. Wie in Abbildung 14d) eindeutig zu erkennen ist, ist die Sonde funktionstüchtig.

#### **4.5 Einordnung der eigenen Expressionsergebnisse in die Literatur**

In der Zusammenschau der Ergebnisse sind die durch 3-T<sub>1</sub>AM induzierten Effekte in Wildtyp-Mäusen höchst wahrscheinlich nicht durch Taar8b vermittelt. Daraus ergibt sich die Frage nach der eigentlichen Funktion dieses Rezeptors.

Erst im Jahr 2012 wurden mithilfe von quantitativer Real-Time-PCR mRNA-Transkripte von Taar8 in Milz, Darm und Hoden der Maus nachgewiesen. Eine Expression des

Taar8a im Rattenherzen wurde bestätigt und die Expression auf Transkriptionsebene – u. a. in verschiedenen Gehirnarealen, in Lunge, Muskeln und Hoden – belegt (Chiellini, Erba et al. 2012).

Niedrige Expressionen von Taar8 wurden weiterhin bereits für das olfaktorische Gewebe beschrieben (Liberles and Buck 2006). Im Rahmen dieser Studien konnte die Expression aller murinen Taars – ausgenommen von Taar1 – in murinem olfaktorischem Gewebe nachgewiesen werden. Welche Aufgabe diese Taars bei der dortigen Expression übernehmen, konnte bislang nicht hinreichend geklärt werden. Da sich Taars durchaus als sensibel für volatile Amine zeigen, vermuteten die Autoren, dass sie möglicherweise bei der Detektion von Pheromonen beteiligt sind und damit auch soziale Interaktionen mitsteuern (Liberles and Buck 2006). Neben dem Nachweis von Taar8 in murinem olfaktorischem Gewebe konnten niedrige Expressionslevel von mRNA des Taar8 in Astrogliazellen der Ratte belegt werden. Interessanterweise konnte auch eine Transkription des murinen Taar5 in neuronalen Geweben – insbesondere der Amygdala und dem ventromedialen Hypothalamus – aufgezeigt werden (Dinter, Muhlhaus et al. 2015). Dies ist im Kontext der Hypothermie-induzierenden Effekte durch  $T_1AM$  besonders bedeutsam, insofern im ventromedialen Teil des Hypothalamus die Regulierung der Temperatur und die Gewichtsregulation stattfinden.

Weiterhin zeigte sich eine Steigerung der Transkriptionslevel von Taar8-Leveln durch Lipopolysaccharide in Astrogliazellen, weshalb der Verdacht nahe liegt, dass diesem Rezeptor und der Familie der TAARs eine gewisse Funktionalität in neuronalem Gewebe zukommen (D'Andrea, D'Arrigo et al. 2012).

Überdies stellte sich vor diesem Hintergrund die Frage, welcher Rezeptor für die 3- $T_1AM$ -induzierten Effekte am Herzen von gesunden Wildtyp-Mäusen verantwortlich ist. Diesbezüglich wäre es denkbar, dass es sich hierbei um einen anderen Subtyp innerhalb der TAAR-Familie handelt, der vornehmlich in murinen Herzen exprimiert wird. In weiteren Expressionsstudien müsste diese These überprüft werden. Des Weiteren wäre es interessant, zu klären, ob dabei wirklich ein  $G\alpha_{i/o}$ -koppelnder TAAR oder ein anderer Rezeptor eine Rolle spielt. Es könnte nämlich sein, dass 3- $T_1AM$  an einen primär  $G\alpha_s$ -koppelnden Rezeptor bindet; dieser wiederum könnte in seiner aktivierenden Eigenschaft zur Aktivierung eines  $G\alpha_{i/o}$ -koppelnden Rezeptors führen und so die negativ inotropen und chronotropen Eigenschaften vermitteln.

## 4.6 Erklärung der Expressionsergebnisse

Bei den Untersuchungen bzgl. der Identifizierung jener Rezeptoren, die für die inotropen und chronotropen Effekte nach 3-T<sub>1</sub>AM-Gabe verantwortlich sind, müssen überdies die Homo- und Heterodimerisierung von Rezeptoren berücksichtigt werden. Diese Eigenschaft eröffnet ein breites Spektrum an möglichen Konstellationen, wobei sich die Affinität zu Liganden und Signaltransduktionseigenschaften durch die Dimerisierung durchaus ändern kann (Park, Jiang et al. 2012).

Die Gründe hierfür sind ganz unterschiedlicher Natur. So ist es möglich, dass die Konformationen der interagierenden Rezeptoren die Liganden- oder die G-Protein-Bindungen wesentlich beeinflussen. Des Weiteren könnten sich Bindungsstellen für alternative Liganden bilden und das Spektrum an Bindungsproteinen deutlich erweitert werden. So führt im Falle des  $\alpha$ 2A-AR/MOR-Heterodimers ( $\alpha$ 2A-AR,  $\alpha$ 2A-adrenerger Rezeptor; MOR,  $\mu$ -Opioid-Rezeptor) die gleichzeitige Bindung des  $\alpha$ 2A-AR-Liganden Norepinephrin und des MOR-Liganden Morphin zu einer wesentlichen Konformationsänderung. Das entsprechende Resultat besteht in einer Entkopplung vom Signalweg (Vilardaga, Agnati et al. 2010). Weiterhin konnte gezeigt werden, dass die G $\alpha_{i/o}$ -Aktivität des CB1R von zweierlei abhängig ist: zum einen von der Heterodimerisierung mit dem  $\alpha$ 2A-AR, zum anderen von dem Vorhandensein der Liganden beider Rezeptoren (Carriba, Ortiz et al. 2007).

Überdies gibt es natürlich im Rahmen von Expressionsstudien verschiedene Limitationen, welche in der Interpretation der Ergebnisse unbedingt Beachtung finden müssen. Im Rahmen unserer Untersuchungen wurden nur die Herzen von gesunden Mäusen untersucht. Zwar gibt es zurzeit keinen Hinweis darauf, dass z. B. Entzündungen oder Stresssituationen zu einer vermehrten Transkription von Taar8b oder anderen Taars führen, allerdings wurden solche vorbelasteten Herzen nicht überprüft. Es ist nicht leicht, Expressionanalysen für die verschiedenen *in vivo*-Situationen durchzuführen; vielmehr sind lediglich Momentaufnahmen möglich.

Zusätzlich hat jede Methode, welche im Rahmen von Expressionsuntersuchungen angewandt wird, eine gewisse Nachweisgrenze. Sollten Gene deutlich niedriger exprimiert sein, könnte diese Menge unterhalb jener Grenze liegen und damit einen Nachweis deutlich erschweren oder sogar unmöglich machen. Zudem wäre es möglich,

dass die zu kurze Präsenz von Taar8b-Transkripten im Zytosol deren Detektion verhindert.

Leider ist derzeit ein Nachweis auf Proteinebene bei fehlenden zuverlässigen Antikörpern, welche im Rahmen von Western Blots genutzt werden könnten, immer noch nicht möglich. Damit kann lediglich eine Transkription, jedoch keine Translation nachgewiesen werden; auch eine Lokalisation der Rezeptoren innerhalb der Zellen oder an der Zelloberfläche ist nicht möglich.

#### **4.7 Bewertung und Einordnung der Ergebnisse zur Signaltransduktion**

Wird ein Rezeptor funktionell charakterisiert, so werden zwei wesentliche Eigenschaften beurteilt: Zum einen wird die Oberflächenexpression ermittelt, zum anderen sollen im Fall von G-Protein-koppelnden Rezeptoren das oder die gekoppelten G-Proteine identifiziert werden. In den ersten Untersuchungen, in denen die Rezeptoren heterolog im Zellsystem exprimiert wurden, konnte eine niedrige Oberflächenexpression festgestellt werden. Um diese zu steigern, wurden – wie bereits in der gängigen Forschungsliteratur vorgeschlagen – die ersten 20 Aminosäuren des bovinen Rhodopsins hinzugefügt (Liberles and Buck 2006). Dies sollte die Voraussetzung für die funktionelle Charakterisierung verbessern; denn nur bei einer ausreichenden Oberflächenexpression können Liganden geprüft werden, die aufgrund ihrer Eigenschaften nicht in der Lage sind, die Zellmembran zu passieren oder für die es keine spezifischen Transporter gibt.

In unseren Versuchen wurde als Vergleichsrezeptor der TSHR gewählt. Von diesem war eine hinreichende, wenn auch schwache Oberflächenexpression bekannt. In unseren Versuchen konnte die Expression sowohl der murinen als auch der humanen Variante des Taar8 um ca. 50 % bzw. 30 % gesteigert werden und es zeigten sich annäherungsweise ähnliche Expressionsniveaus wie beim TSHR. Damit waren die Grundvoraussetzungen vor allem für Liganden-induzierende Effekte geschaffen.

Doch zunächst einmal sollten die Rezeptoren auf eine mögliche Basalaktivität hin überprüft werden. Diese ist z. B. für den Ghrelin-Rezeptor bekannt und sollte auch in diesem Fall gemessen werden (Mear, Enjalbert et al. 2013). Weder die humane noch die murine Variante zeigten eine Basalaktivität für den  $G\alpha_{q/11}$ - oder  $G\alpha_s$ -Signalweg.

Jedoch ergab sich interessanterweise eine starke basale Aktivierung für die  $G\alpha_{i/o}$ -Kopplung – sowohl für den murinen Taar8b als auch für den humanen TAAR8. Das bedeutet, dass der Rezeptor auch ohne Ligandenstimulation schon eine Eigenaktivität aufweist. Bisher konnte in der Literatur noch kein anderer TAAR nachgewiesen werden, der  $G\alpha_{i/o}$  koppelt und zudem auch noch eine Basalaktivität für diesen Signalweg zeigt.

Zum Zeitpunkt meiner Untersuchungen galt der Taar8 sowohl in seiner humanen als auch in der murinen Variante als orphan. Es war also weder die Art der G-Protein-Kopplung noch seine Liganden bekannt. Um die Identifizierung der G-Protein-Kopplung zu erleichtern, wurden verschiedene Varianten angefertigt, von denen eine konstitutive Basalaktivität zu erwarten war: Zum einen wurde durch zielgerichtete Mutagenese Serin (S) durch Tryptophan (W) ersetzt. Bekannt ist diese Variante als eine Patienten-Mutation im TSH-Rezeptor, bei dem es eine Steigerung der Aktivität durch Stimulation der Adenylatzyklase bewirkt (Winkler, Kleinau et al. 2010). Sie ist innerhalb eines CWXP- (Cystein-Tryptophan-nicht näher benannt-Prolin) bzw. in einem SWXP- (Serin-Tryptophan-nicht näher benannt-Prolin) Motiv in der Transmembran Helix sechs (TMH6).

Weiterhin wurde für den murinen Taar8b die Variante P274GinsG konstruiert. Das bedeutet, dass das Prolin an Stelle 274 durch ein Glycin ausgetauscht und ein zusätzliches Glycin eingefügt wurde. Auch diese liegt in einer hoch konservierten Aminosäuren-Region in der TMH6 und führte bereits im Falle des TSH-Rezeptors zu einer konstitutiven Basalaktivität (Biebermann, Winkler et al. 2012). Diese Varianten sollten bei der Identifizierung der G-Protein-Kopplung unterstützen.

Interessanterweise zeigte sich keine dieser generierten Varianten in einem der Signalwege aktiv, jedoch erwies sich die Basalaktivität im  $G\alpha_{i/o}$ -Signalweg als etwas verringert. Es konnte somit ein geringer Effekt der Varianten im Signalweg belegt werden. Andererseits wird hierdurch deutlich, wie verschieden die Mechanismen der Signaltransduktion und der Rezeptorkonformationen sind, wenn es um die Kopplung von G-Proteinen geht. Denn in diesem Fall scheint eine Modifikation der hoch konservierten Region in TMH6 zunächst einmal zu keiner wesentlichen Veränderung im Hinblick auf die Signaltransduktionseigenschaften zu führen.

In weiteren Untersuchungen konnten wir für den  $G\alpha_s$ -Signalweg keine signifikante Aktivierung nach Applikation von 3-T<sub>1</sub>AM und PEA als Liganden bei murinem und



humanem Taar8 feststellen. Überdies zeigte sich in unseren Untersuchungen keine Aktivierung durch 3-T<sub>1</sub>AM oder PEA bei den generierten Varianten. Somit scheint die Veränderung in der TMH6 in diesem Fall weder einen wesentlichen Effekt auf die Ligandenbindung noch auf die nachfolgende Affinität zu den einzelnen G-Proteinen zu haben.

In der Zusammenschau der Ergebnisse können folgende Eigenschaften bzgl. der Signaltransduktion des Taar8 festgehalten werden:

Einerseits konnte eine ausgeprägte Basalaktivität für die G $\alpha_{i/o}$ -Kopplung festgestellt werden, welche sich durch die getesteten Liganden weder steigern noch reduzieren ließ. Auch die generierten Varianten zeigten in diesem Zusammenhang keinen Effekt. Andererseits konnte im Gegensatz zum Taar1 keine Kopplung von G $\alpha_s$ -Proteinen nachgewiesen werden, auch nicht nach Stimulation mit 3-T<sub>1</sub>AM oder PEA.

Grundsätzlich ist zu erwähnen, dass es mit dem entsprechenden Liganden möglich wäre, einen Subtyp der G-Proteine zu binden und damit den jeweiligen Signaltransduktionsweg zu aktivieren. Dies ist auch schon für andere Rezeptoren beschrieben worden. So wurde bereits für den klassischerweise G $\alpha_{i/o}$ -koppelnden  $\alpha_2$ -adrenergen Rezeptor gezeigt, dass dieser in Kardiomyozyten exprimierte Rezeptor zugleich auch in der Lage ist, G $\alpha_s$  zu koppeln. Dominant ist dennoch weiterhin die G $\alpha_{i/o}$ -koppelnde Eigenschaft (Eason, Kurose et al. 1992). Auch der in Kardiomyozyten exprimierte  $\beta_2$ -adrenerge Rezeptor ist in der Lage, G $\alpha_s$  und G $\alpha_{i/o}$  zu koppeln (Xiao, Zhu et al. 2006). Welches G-Protein die Rezeptoren in dem jeweiligen physiologischen Umfeld präferieren, scheint abhängig von der Konzentration der Agonisten, der Stärke der Expression des Rezeptors und dem Zelltyp zu sein (Jones, Heilman et al. 1991; Eason, Kurose et al. 1992; Raymond 1995; Wess 1998). Interessanterweise konnte die Kopplung von zwei verschiedenen G-Proteinen – wie bereits erwähnt – auch schon innerhalb der TAAR-Familie für den murinen Taar5 nachgewiesen werden (Dinter, Muhlhaus et al. 2015). Dieser ist in der Lage, sowohl G $\alpha_s$  als auch G $\alpha_{q/11}$  zu koppeln und zeigt für beide Signaltransduktionswege eine Basalaktivität.

Im Rahmen der getätigten Untersuchungen sollen die Ergebnisse auch kritisch betrachtet werden. Die Untersuchungen fanden alle in überexprimierten Zellsystemen statt. Damit liegen keine physiologischen Bedingungen vor, weshalb die Signalweg-Eigenschaften lediglich in diesem künstlich erzeugten System betrachtet und

ausgewertet werden konnten. Wie bereits erwähnt, können sowohl die genutzten Zellarten als auch das Expressionsniveau die Wahl des G-Proteins beeinflussen. Der eigentliche physiologische Signaltransduktionsweg kann somit unter diesen *in vitro*-Bedingungen nicht ermittelt werden. Selbst eine Expression in dem Zellsystem, in dem eine Expression *in vivo* nachgewiesen werden konnte, ist kein Garant für die Identifizierung der physiologischen Signaltransduktionseigenschaften, da das zellumgebende Milieu nicht der Physiologie entspricht.

Weiterhin wurden die zu testenden Rezeptoren in einen Leervektor kloniert, um den Effekt dann in den verschiedenen Signalwegen zu testen und zu analysieren. Dies wurde immer bezogen auf den alleinigen Effekt des Leervektors in dem jeweiligen Bezugssystem. Es ist jedoch vorstellbar, dass sich die Effekte des genutzten Leervektors bereits verändern, sobald ein weiteres Gen hinein kloniert wird. Somit hätte eigentlich als weitere Kontrolle eine „tote“ Variante durchgeführt werden müssen. Diesbezüglich hätte ein Gen kloniert werden müssen, das bekanntermaßen nicht imstande ist, ein G-Protein zu koppeln. Auf diese Weise wäre es möglich gewesen, zwischen dem Effekt des Leervektors auf ein Bezugssystem und dem induzierten Ergebnis, dass dieser Leervektor ein weiteres Gen beinhaltet, zu unterscheiden. Erst mithilfe dieser Daten hätte man den Roheffekt des zu untersuchenden Rezeptors im Zellsystem feststellen können.

#### 4.8 Fazit

Im Rahmen dieser Arbeit sollten zwei wesentliche Fragen geklärt werden: Zum einen sollten die bis dato orphanen murinen und humanen Varianten des TAAR8 in Bezug auf seine Signalisierung deorphanisiert werden; zum anderen ging es darum, eine mögliche Expression des Taar8b in gesunden Herzen von Wildtyp-Mäusen zu überprüfen.

Nach Anwendung der beschriebenen Methoden zur Überprüfung der Expression von Taar8b in murinen Herzen lässt sich sagen, dass mittels dieser Maßnahmen keine Detektion von Transkripten gelang. Es scheint somit keine Transkription von Taar8b in Herzen von gesunden C57BL6/J-Mäusen zu geben. Somit lassen sich die durch 3-T<sub>1</sub>AM induzierten Effekte an murinen Herzen nicht durch den Taar8b erklären. Dabei ist nicht ausgeschlossen, dass ein anderer TAAR die Effekte vermittelt. So konnten auch Taar1-Transkripte in der Ventrikelwand bei Ratten nachgewiesen werden (Chiellini,

Frascarelli et al. 2007). Es ist vorstellbar, dass Taar1 nicht nur selektiv an  $G\alpha_s$ , sondern vielleicht auch an  $G\alpha_{i/o}$  koppelt. Schließlich handelt es sich hierbei um *in vitro*-Daten und – wie bereits ausgeführt – kann die *in vivo*-Wirklichkeit durchaus anders aussehen. Außerdem könnte der aktivierende Effekt von Taar1 inhibitorische Zellen aktivieren, womit auch die negativen Modulationen erklärt werden könnten. Schlussendlich käme sogar ein weiterer  $G\alpha_{i/o}$ -koppelnder TAAR infrage, der diese Effekte vermitteln könnte (Scanlan, Suchland et al. 2004). Andererseits könnte es aber auch sein, dass der Taar8b in einer veränderten Physiologie, z. B. im Entzündungszustand, transkribiert wird. Weitere Untersuchungen könnten diese Thesen überprüfen. Leider liegt noch keine Möglichkeit vor, das Taar8b-Protein nach Translation nachzuweisen, da es noch keine zuverlässigen Antikörper für sämtliche TAARs gibt. Es ist also noch immer fraglich, ob in den Geweben, in denen die Transkripte nachgewiesen wurden, auch tatsächlich eine Translation erfolgt und ein funktionstüchtiges Protein entsteht.

Als zweiter Forschungsgegenstand sollten sowohl die murine als auch die humane Variante des Taar8 auf ihrem Weg der Signaltransduktion untersucht werden. Da im Rahmen dieser Untersuchungen auch die Stimulierbarkeit mit ausgewählten TAAR-Liganden erfolgen sollte, musste eine ausreichende Expression an der Oberfläche gewährleistet sein. Da in ersten Voruntersuchungen eine nur unzureichende Oberflächenexpression aufgezeigt werden konnte, war es notwendig, N-terminal die ersten 20 Aminosäuren des bovinen Rhodopsins (Rho-tag) hinzuzufügen. In der entsprechenden Forschungsliteratur wurde bereits belegt, dass dieser Rho-tag zu einer deutlichen Steigerung der Oberflächenexpression führt (Liberles and Buck 2006).

Im Rahmen der Untersuchungen konnte eine ausgeprägte Basalaktivität sowohl der humanen als auch der murinen Variante für den  $G\alpha_{i/o}$ -Signalweg festgestellt werden. Diese Basalaktivität ließ sich weder durch Stimulation mit 3-T<sub>1</sub>AM noch mit PEA steigern oder reduzieren. Auch die generierten Varianten zeigten keinen signifikanten Effekt auf diese Basalaktivität bzw. auf die Stimulation dieser Varianten mit den eben genannten Liganden. Interessanterweise zeigte sich weiterhin keine signifikante Stimulation der humanen und murinen Variante durch 3-T<sub>1</sub>AM und PEA. Es ist jedoch grundsätzlich möglich, zwei Subtypen der G-Proteine zu koppeln, vielleicht sogar simultan. Wie oben schon erwähnt, ist diese Eigenschaft bereits für andere Rezeptoren beschrieben (Eason, Kurose et al. 1992; Xiao, Zhu et al. 2006; Dinter, Muhlhaus et al.

2015). Auch die Möglichkeit von Heterodimer-Formationen kann nur auf hypothetische Annahmen hin untersucht werden. Diese sind aber Grundvoraussetzung, um physiologische Prozesse zu verstehen, denn unter *in vivo*-Bedingungen finden sich in der Regel keine isolierten Ligand-Rezeptor-Prozesse. Folglich handelt es sich um ein Zusammenspiel eines gesamten Systems – und um dieses zu verstehen ist es hilfreich, die Geschehnisse in *in vitro*-Situationen zu kennen.

Es konnte bisher kein ursprünglicher bzw. spezifischer Ligand für die TAARs identifiziert werden. Jedoch gab es diesbezüglich einen Ansatz, indem zumindest für den TAAR1 Thyronamin-Derivate als selektive Liganden kreiert worden sind (Chiellini, Nesi et al. 2015). Dies lieferte erste Anhaltspunkte, um die physiologische Rolle nicht nur des murinen Taar1, sondern auch weiterer selektiver Liganden zu verstehen.

Zusammenfassend lässt sich festhalten, dass *in vitro*-Studien lediglich einen Hinweis für Signaltransduktionseigenschaften geben und zuvor aufgestellte Hypothesen in eine Richtung bestätigen oder eher abschwächen können. Eindeutige Aussagen über die G-Protein-Kopplung, den genutzten Signalweg und vermeintliche simultane Kopplungen im physiologischen Rahmen können also mithilfe der durchgeführten Untersuchungen nicht getroffen werden. Jedoch helfen sie grundsätzlich dabei, *in vivo*-Verhältnisse z. B. bei einer noch zu kreierenden Taar8b-knockout-Maus zu verstehen und sind somit entscheidend für die weitere kreative Betrachtung und Untersuchung zellulärer Prozesse. Demzufolge liegt hier zwar kein eindeutiger Beweis vor, die Ergebnisse sind aber doch richtungsweisend und bilden eine Grundlage für Verständnis und Identifizierung von orphanen Rezeptoren.

## Literatur

1. Aaij, C. and P. Borst (1972). "The gel electrophoresis of DNA." Biochim Biophys Acta **269**(2): 192-200.
2. Ballesteros, J. A., Jensen, A. D., Liapakis, G., Rasmussen, S. G., Shi, L., Gether, U., Javitch, J. A. (2001). "Activation of the beta 2-adrenergic receptor involves disruption of an ionic lock between the cytoplasmic ends of transmembrane segments 3 and 6." J Biol Chem **276**(31): 29171-7.
3. Biebermann, H., Winkler, F., Handke, D., Teichmann, A., Gerling, B., , Cameron, F., Eichhorst, J., Grüters, A., Wiesner, B., Kühnen, P., Krude, H., Kleinau, G. (2012). "New pathogenic thyrotropin receptor mutations decipher differentiated activity switching at a conserved helix 6 motif of family A GPCR." J Clin Endocrinol Metab **97**(2): E228-32.
4. Birnbaumer, L. (1990). "Transduction of receptor signal into modulation of effector activity by G proteins: the first 20 years or so ..." FASEB J **4**(14): 3178-88.
5. Birnbaumer, L. (2007). "The discovery of signal transduction by G proteins: a personal account and an overview of the initial findings and contributions that led to our present understanding." Biochim Biophys Acta **1768**(4): 756-71.
6. Birnbaumer, L. (2007). "Expansion of signal transduction by G proteins. The second 15 years or so: from 3 to 16 alpha subunits plus betagamma dimers." Biochim Biophys Acta **1768**(4): 772-93.
7. Borowsky, Beth, Adham, Nika, Jones, Kenneth A., Raddatz, Rita, Artymyshyn, Roman, Ogozalek, Kristine L., Durkin, Margaret M., Lakhiani, Parul P., Bonini, James A., Pathirana, Sudam, Boyle, Noel, Pu, Xiaosui, Kouranova, Evguenia, Lichtblau, Harvey, Ochoa, F. Yulina, Branchek, Theresa A., Gerald, Christophe, (2001). "Trace amines: Identification of a family of mammalian G protein-coupled receptors." Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America **98**(16): 8966-8971.
8. Braulke, L., Klingenspor, M., DeBarber, A., Tobias, S., Grandy, D., Scanlan, T., Heldmaier, G. (2008). "3-Iodothyronamine: a novel hormone controlling the balance between glucose and lipid utilisation." Journal of Comparative

- Physiology B: Biochemical, Systemic, and Environmental Physiology **178**(2): 167-177.
9. Broadley, K. J. (2010). "The vascular effects of trace amines and amphetamines." Pharmacol Ther **125**(3): 363-75.
  10. Carriba, P., Ortiz, O., Patkar, K., Justinova, Z., Stroik, J., Themann, A., Muller, C., Woods, A. S., Hope, B. T., Ciruela, F., Casado, V., Canela, E. I., Lluís, C., Goldberg, S.R., Moratalla, R., Franco, R., Ferre, S. (2007). "Striatal adenosine A2A and cannabinoid CB1 receptors form functional heteromeric complexes that mediate the motor effects of cannabinoids." Neuropsychopharmacology **32**(11): 2249-59.
  11. Chiellini, G., Erba, P., Carnicelli, V., Manfredi, C., Frascarelli, S., Ghelardoni, S., Mariani, G., Zucchi, R. (2012). "Distribution of exogenous [<sup>125</sup>I]-3-iodothyronamine in mouse in vivo: relationship with trace amine-associated receptors." J Endocrinol **213**(3): 223-30.
  12. Chiellini, G., Frascarelli, S., Ghelardoni, S., Carnicelli, V., Tobias, S. C., DeBarber, A., Brogioni, S., Ronca-Testoni, S., Cerbai, E., Grandy, D. K., Scanlan, T. S., Zucchi, R. (2007). "Cardiac effects of 3-iodothyronamine: a new aminergic system modulating cardiac function." FASEB J **21**(7): 1597-608.
  13. Chiellini, G., Nesi, G., Digiacomò, M., Malvasi, R., Espinoza, S., Sabatini, M., Frascarelli, S., Laurino, A., Cichero, E., Macchia, M., Gainetdinov, R. R., Fossa, P., Raimondi, L., Zucchi, R., Rapposelli, S. (2015). "Design, Synthesis, and Evaluation of Thyronamine Analogues as Novel Potent Mouse Trace Amine Associated Receptor 1 (mTAAR1) Agonists." J Med Chem **58**(12): 5096-107.
  14. D'Andrea, G., D'Arrigo, A., Facchinetti, F., Del Giudice, E., Colavito, D., Bernardini, D., Leon, A. (2012). "Octopamine, unlike other trace amines, inhibits responses of astroglia-enriched cultures to lipopolysaccharide via a  $\beta$ -adrenoreceptor-mediated mechanism." Neurosci Lett **517**(1): 36-40.
  15. D'Andrea, G., Nordera, G. P., Perini, F., Allais, G., Granella, F. (2007). "Biochemistry of neuromodulation in primary headaches: focus on anomalies of tyrosine metabolism." Neurol Sci **28 Suppl 2**: S94-6.

- 
16. D'Andrea, G., Ostuzzi, R., Bolner, A., Francesconi, F., Musco, F., d'Onofrio, F., Colavito, D. (2008). "Study of tyrosine metabolism in eating disorders. Possible correlation with migraine." Neurol Sci **29 Suppl 1**: S88-92.
  17. Dhillon, W. S., Bewick, G. A., White, N. E., Gardiner, J. V., Thompson, E. L., Bataveljic, A., Murphy, K. G., Roy, D., Patel, N. A., Scutt, J. N., Armstrong, A., Ghatei, M. A., Bloom, S. R. (2009). "The thyroid hormone derivative 3-iodothyronamine increases food intake in rodents." Diabetes, Obesity and Metabolism **11**(3): 251-260.
  18. Doyle, K. P., Suchland, K. L., Ciesielski, T. M., Lessov, N. S., Grandy, D. K., Scanlan, T. S., Stenzel-Poore, M. P. (2007). "Novel thyroxine derivatives, thyronamine and 3-iodothyronamine, induce transient hypothermia and marked neuroprotection against stroke injury." Stroke **38**(9): 2569-76.
  19. Durden, D. A. and S. R. Philips (1980). "Kinetic measurements of the turnover rates of phenylethylamine and tryptamine in vivo in the rat brain." J Neurochem **34**(6): 1725-32.
  20. Eason, M. G., Kurose, H., Holt, B. D., Raymond, J. R., Liggett, S. B. (1992). "Simultaneous coupling of alpha 2-adrenergic receptors to two G-proteins with opposing effects. Subtype-selective coupling of alpha 2C10, alpha 2C4, and alpha 2C2 adrenergic receptors to Gi and Gs." J Biol Chem **267**(22): 15795-801.
  21. Erlich, H. A. (1989). "Polymerase chain reaction." J Clin Immunol **9**(6): 437-47.
  22. Fehler, M., Broadley, K. J., Ford, W. R., Kidd, E. J. (2010). "Identification of trace-amine-associated receptors (TAAR) in the rat aorta and their role in vasoconstriction by beta-phenylethylamine." Naunyn Schmiedeberg's Arch Pharmacol **382**(4): 385-98.
  23. Frascarelli, S., Ghelardoni, S., Chiellini, G., Galli, E., Ronca, F., Scanlan, T. S., Zucchi, R. (2011). "Cardioprotective effect of 3-iodothyronamine in perfused rat heart subjected to ischemia and reperfusion." Cardiovasc Drugs Ther **25**(4): 307-13.
  24. Frascarelli, S., Ghelardoni, S., Chiellini, G., Vargiu, R., Ronca-Testoni, S., Scanlan, T. S., Grandy, D. K., Zucchi, R. (2008). "Cardiac effects of trace amines:

- Pharmacological characterization of trace amine-associated receptors." European Journal of Pharmacology **587**(1-3): 231-236.
25. Galli, E., Marchini, M., Saba, A., Berti, S., Tonacchera, M., Vitti, P., Scanlan, T. S., Iervasi, G., Zucchi, R. (2012). "Detection of 3-iodothyronamine in human patients: a preliminary study." J Clin Endocrinol Metab **97**(1): E69-74.
26. Garcia-Cozar, F. J., Okamura, H., Aramburu, J. F., Shaw, K. T., Pelletier, L., Showalter, R., Villafranca, E., Rao, A. (1998). "Two-site interaction of nuclear factor of activated T cells with activated calcineurin." J Biol Chem **273**(37): 23877-83.
27. Ghelardoni, S., Chiellini, G., Frascarelli, S., Saba, A., Zucchi, R. (2014). "Uptake and metabolic effects of 3-iodothyronamine in hepatocytes." J Endocrinol **221**(1): 101-10.
28. Gilman, A. G. (1987). "G proteins: transducers of receptor-generated signals." Annu Rev Biochem **56**: 615-49.
29. Han, S. Y., Gordon, J. T., Bhat, K., Dratman, M. B., Joullié, M. M. (1987). "Synthesis of side chain-modified iodothyronines." Int J Pept Protein Res **30**(5): 652-61.
30. Hart, M. E., Suchland, K. L., Miyakawa, M., Bunzow, J. R., Grandy, D. K., Scanlan, T. S. (2006). "Trace Amine-Associated Receptor Agonists: Synthesis and Evaluation of Thyronamines and Related Analogues." Journal of Medicinal Chemistry **49**(3): 1101-1112.
31. Ianculescu, A. G., Giacomini, K. M., Scanlan, T. S. (2009). "Identification and characterization of 3-iodothyronamine intracellular transport." Endocrinology **150**(4): 1991-9.
32. Im, S. H. and A. Rao (2004). "Activation and deactivation of gene expression by Ca<sup>2+</sup>/calcineurin-NFAT-mediated signaling." Mol Cells **18**(1): 1-9.
33. Jones, S. V., Heilman, C. J., Brann, M. R. (1991). "Functional responses of cloned muscarinic receptors expressed in CHO-K1 cells." Mol Pharmacol **40**(2): 242-7.
34. Kadamur, G. and E. M. Ross (2012). "Mammalian Phospholipase C." Annu Rev Physiol.



- 
35. Lefkowitz, R. J. (2007). "Seven transmembrane receptors: something old, something new." Acta Physiol (Oxf) **190**(1): 9-19.
  36. Lewin, A. (2006). "Receptors of mammalian trace amines." The AAPS Journal **8**(1): E138-E145.
  37. Liberles, S. D. and L. B. Buck (2006). "A second class of chemosensory receptors in the olfactory epithelium." Nature **442**(7103): 645-650.
  38. Lindemann, L., Ebeling, M., Kratochwil, N.A., Bunzow, J.R., Grandy, D.K., Hoener, M.C. (2005). "Trace amine-associated receptors form structurally and functionally distinct subfamilies of novel G protein-coupled receptors." Genomics **85**(3): 372-385.
  39. Lindemann, L. and M. C. Hoener (2005). "A renaissance in trace amines inspired by a novel GPCR family." Trends in Pharmacological Sciences **26**(5): 274-281.
  40. Lindemann, L., Meyer, C.A., Jeanneau, K., Bradaia, A., Ozmen, L., Bluethmann, H., Bettler, B., Wettstein, J.G., Borroni, E., Moreau, J., Hoener, M.C. (2008). "Trace Amine-Associated Receptor 1 Modulates Dopaminergic Activity." Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics **324**(3): 948-956.
  41. Livak, K. J. and T. D. Schmittgen (2001). "Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method." Methods **25**(4): 402-8.
  42. Mear, Y., Enjalbert, A., Thirion, S. (2013). "GHS-R1a constitutive activity and its physiological relevance." Front Neurosci **7**: 87.
  43. Meyer, T. and R. D. Hesch (1983). "Triiodothyronamine--a beta-adrenergic metabolite of triiodothyronine?" Horm Metab Res **15**(12): 602-6.
  44. Molkenin, J. D., Lin, Q., Duncan, S. A., Olson, E. N. (1997). "Requirement of the transcription factor GATA4 for heart tube formation and ventral morphogenesis." Genes Dev **11**(8): 1061-72.
  45. Mülhardt, C. (2009). "Der Experimentator: Molekularbiologie/Genomics." Spektrum Akademischer Verlag.

- 
46. Nürnberg, B., Gudermann, T., Schultz, G. (1995). "Receptors and G proteins as primary components of transmembrane signal transduction. Part 2. G proteins: structure and function." J Mol Med (Berl) **73**(3): 123-32.
  47. Orsi, G., Ghelardoni, S., Saba, A., Zucchi, R., Vozzi, G. (2014). "Characterization of 3-iodothyronamine in vitro dynamics by mathematical modeling." Cell Biochem Biophys **68**(1): 37-47.
  48. Park, S., Jiang, H., Zhang, H., Smith, R. G. (2012). "Modification of ghrelin receptor signaling by somatostatin receptor-5 regulates insulin release." Proc Natl Acad Sci U S A **109**(46): 19003-8.
  49. Piehl, S., Hoefig, C. S., Scanlan, T. S., Kohrle, J. (2010). "Thyronamines--Past, Present, and Future." Endocr Rev: er.2009-0040.
  50. Rasmussen, S. G., Jensen, A. D., Liapakis, G., Ghanouni, P., Javitch, J. A., Gether, U. (1999). "Mutation of a highly conserved aspartic acid in the beta2 adrenergic receptor: constitutive activation, structural instability, and conformational rearrangement of transmembrane segment 6." Mol Pharmacol **56**(1): 175-84.
  51. Raymond, J. R. (1995). "Multiple mechanisms of receptor-G protein signaling specificity." Am J Physiol **269**(2 Pt 2): F141-58.
  52. Regard, J. B., Kataoka, H., Cano, D. A., Camerer, E., Yin, L., Zheng, Y. W., Scanlan, T. S., Hebrok, M., Coughlin, S. R. (2007). "Probing cell type-specific functions of Gi in vivo identifies GPCR regulators of insulin secretion." J Clin Invest **117**(12): 4034-43.
  53. Roberts, R. J. (2005). "How restriction enzymes became the workhorses of molecular biology." Proc Natl Acad Sci U S A **102**(17): 5905-8.
  54. Rosenbaum, D. M., Rasmussen, S. G., Kobilka, B. K. (2009). "The structure and function of G-protein-coupled receptors." Nature **459**(7245): 356-63.
  55. Saba, A., Chiellini, G., Frascarelli, S., Marchini, M., Ghelardoni, S., Raffaelli, A., Tonacchera, M., Vitti, P., Scanlan, T.S., Zucchi, R. (2010). "Tissue Distribution and Cardiac Metabolism of 3-Iodothyronamine." Endocrinology **151**(10): 5063-5073.

- 
56. Saba, A., Donzelli, R., Colligiani, D., Raffaelli, A., Nannipieri, M., Kusmic, C., Dos Remedios, C. G., Simonides, W. S., Iervasi, G., Zucchi, R. (2014). "Quantification of thyroxine and 3,5,3'-triiodo-thyronine in human and animal hearts by a novel liquid chromatography-tandem mass spectrometry method." Horm Metab Res **46**(9): 628-34.
57. Sanger, F., Nicklen, S., Coulson, A. R. (1977). "DNA sequencing with chain-terminating inhibitors." Proc Natl Acad Sci U S A **74**(12): 5463-7.
58. Scanlan, T. S. (2009). "Minireview: 3-Iodothyronamine (T1AM): a new player on the thyroid endocrine team?" Endocrinology **150**(3): 1108-11.
59. Scanlan, T.S., Suchland, K.L., Hart, M.E., Chiellini, G., Huang, Y., Kruzich, P.J., Frascarelli, S., Crossley, D.A., Bunzow, J.R., Ronca-Testoni, S., Lin, E.T., Hatton, D., Zucchi, R., Grandy, D.K. (2004). "3-Iodothyronamine is an endogenous and rapid-acting derivative of thyroid hormone." Nat Med **10**(6): 638-642.
60. Stäubert, C., Bösel, I., Bohnkamp, J., Römler, H., Enard, W., Schöneberg, T. (2010). "Structural and Functional Evolution of the Trace Amine-Associated Receptors TAAR3, TAAR4 and TAAR5 in Primates." PLoS ONE **5**(6): e11133.
61. Stevens, R. C., Cherezov V., Katritch, V., Abagyan, R., Kuhn, P., Rosen, H., Wüthrich, K. (2012). "The GPCR Network: a large-scale collaboration to determine human GPCR structure and function." Nat Rev Drug Discov **12**(1): 25-34.
62. Stryer L, B. J. M., Tymoczko J L (2007). "Biochemie " Elsevier GmbH **6**.
63. Tomita, K. and H. A. Lardy (1956). "Synthesis and biological activity of some triiodinated analogues of thyroxine." J Biol Chem **219**(2): 595-604.
64. Turu. G., Simon A., Gyombolai, P., Szidonya, L., Bagdy, G., Lenkei, Z., Hunyady, L. (2007). "The role of diacylglycerol lipase in constitutive and angiotensin AT1 receptor-stimulated cannabinoid CB1 receptor activity." J Biol Chem **282**(11): 7753-7.
65. Vassilatis, D. K., Hohmann J. G., Zeng, H., Li, F., Ranchalis, J. E., Mortrud, M. T., Brown, A., Rodriguez, S. S., Weller, J. R., Wright, A. C., Bergmann, J. E.,

- Gaitanaris, G. A. (2003). "The G protein-coupled receptor repertoires of human and mouse." Proc Natl Acad Sci U S A **100**(8): 4903-8.
66. Vilardaga, J. P., Agnati L. F., Fuxe, K., Ciruela, F. (2010). "G-protein-coupled receptor heteromer dynamics." J Cell Sci **123**(Pt 24): 4215-20.
67. Weltman, N. Y., Ojamaa, K., Schlenker, E. H., Chen, Y. F., Zucchi, R., Saba, A., Colligiani, D., Rajagopalan, V., Pol, C. J., Gerdes, A. M. (2014). "Low-dose T(3) replacement restores depressed cardiac T(3) levels, preserves coronary microvasculature and attenuates cardiac dysfunction in experimental diabetes mellitus." Mol Med **20**: 302-12.
68. Wess, J. (1998). "Molecular basis of receptor/G-protein-coupling selectivity." Pharmacol Ther **80**(3): 231-64.
69. Wiedemann C, S. H. L., Weber B.H.F (10. Jahrgang ). "Quantitative Real-Time PCR – Eine Frage der Normalisierung." BIOSpektrum **1/04** p99ff.
70. Wilhelm, J. and A. Pingoud (2003). "Real-time polymerase chain reaction." Chembiochem **4**(11): 1120-8.
71. Winkler, F., Kleinau, G., Tarnow, P., Rediger, A., Grohmann, L., Gaetjens, I., Krause, G., L'Allemand, D., Grüters, A., Krude, H., Biebermann, H. (2010). "A new phenotype of nongoitrous and nonautoimmune hyperthyroidism caused by a heterozygous thyrotropin receptor mutation in transmembrane helix 6." J Clin Endocrinol Metab **95**(8): 3605-10.
72. Wolinsky, T. D., Swanson, C. J., Smith, K. E., Zhong, H., Borowsky, B., Seeman, P., Branchek, T., Gerald, C. P. (2007). "The Trace Amine 1 receptor knockout mouse: an animal model with relevance to schizophrenia." Genes, Brain and Behavior **6**(7): 628-639.
73. Xiao, R. P., Zhu, W., Zheng, M., Cao, C., Zhang, Y., Lakatta, E. G., Han, Q. (2006). "Subtype-specific alpha1- and beta-adrenoceptor signaling in the heart." Trends Pharmacol Sci **27**(6): 330-7.
74. Yao, X., Parnot, C., Deupi, X., Ratnala, V. R., Swaminath, G., Farrens, D., Kobilka, B. (2006). "Coupling ligand structure to specific conformational switches in the beta2-adrenoceptor." Nat Chem Biol **2**(8): 417-22.

- 
75. Zabner, J., Fasbender, A. J., Moninger, T., Poellinger, K. A., Welsh, M. J. (1995). "Cellular and molecular barriers to gene transfer by a cationic lipid." J Biol Chem **270**(32): 18997-9007.
76. Zucchi, R., Chiellini, G., Scanlan, T. S., Grandy, D. K. (2006). "Trace amine-associated receptors and their ligands." British Journal of Pharmacology **149**(8): 967-978.
77. Zucchi, R., Ghelardoni, S., Chiellini, G. (2010). "Cardiac effects of thyronamines." Heart Failure Reviews **15**(2): 171-176.
78. Zucchi, R., Accorroni, A., Chiellini, G. (2014). "Update on 3-iodothyronamine and its neurological and metabolic actions." Front Physiol **5**: 402.

## Anhang

### Abkürzungen

#### Allgemeine Abkürzungen

Im Abkürzungsverzeichnis sind die im Rahmen der vorliegenden Arbeit verwendeten Abkürzungen aufgelistet. Auf die Auflistung von allgemein üblichen Abkürzungen wurde verzichtet. Des Weiteren wurde auch die Auflistung von chemischen Elementen und Summenformeln, Puffernamen (sofern im Methodenteil erläutert) sowie von offiziellen Symbolen von Genen verzichtet.

®	Amtlich registrierte Marke
∅	Durchmesser
°C	Grad Celcius
µg	Mikrogramm (entspricht 10 <sup>-6</sup> g)
µl	Mikroliter (entspricht 10 <sup>-6</sup> l)
µM	Mikromolar (entspricht 10 <sup>-6</sup> M)
µm	Mikrometer (entspricht 10 <sup>-6</sup> m)
1x bzw. 10x	1-fach bzw. 10-fach konzentriert
AG	Arbeitsgruppe
C57BL/6J-Maus	Black-6-Wildtyp Mausstamm
bp	Basenpaar(e)
cDNA	< engl. complementary DNA >, komplementäre DNA
d.h.	das heißt
DE	Deutschland
dH <sub>2</sub> O	Destilliertes Wasser

DIG	Digoxigenin
DNA	< engl. Deoxyribonucleid acid >, Desoxyribonukleinsäure
DNase	Desoxyribonuklease
dNTP(s)	Didesoxyribonukleosidtriphosphat(e)
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
et al.	< lat. et alii >, und andere
F	< engl. forward >, Vorwärts-Primer
g	Gramm
H <sub>2</sub> O	Verwendet im Sinne von Wasser
kb	Kilobasen
kg	Kilogramm (entspricht 10 <sup>3</sup> Gramm)
l	Liter
m	murin (von der Maus stammend)
M	Molar
mg	Milligramm (entspricht 10 <sup>-3</sup> g)
min	Minute(n)
ml	Mililiter (entspricht 10 <sup>-3</sup> l)
mol	Molar
mM	Milimolar (entspricht 10 <sup>-3</sup> M)
mRNA	< engl. messenger RNA >, Boten-RNA
PBS	< engl. phosphate buffered saline >, Phosphat-gepufferte Salzlösung
PCR	< engl. Polymerase chain reaction >, Polymerasekettenreaktion
PFA	Paraformaldehyd

---

p	piko-(entspricht 10 <sup>-12</sup> )
pH	pH-Wert
R	< engl. Reverse >, Rückwärts-Primer
r	von der Ratte stammend
RNA	< engl. Ribonucleid acid >, Ribonukleinsäure
RNase	Ribonuklease
rpm	< engl. Rounds per minute >, Umdrehungen pro Minute
RT	Reverse Transkription
rt	< engl. room temperature >, Raumtemperatur
sec	Sekunde
SSC	< engl. standard saline citrate >, Standard Saline Citrat
Std.	Stunde
Taq	Thermus aquaticus, Bakterienstamm
TM	< engl. Trademark >, Marke
U	< engl. Unit >, Einheit
o/n	< engl. over night >, über Nacht
USA	< engl. United States of America >, Vereinigte Staaten von Amerika
z.B.	zum Beispiel



## Abkürzungen der Basen

<b>Einbuchstabencode</b>	<b>Base</b>
A	Adenosin
C	Cytosin
G	Guanin
T	Thymin

## Abkürzungen der Aminosäuren

<b>Einbuchstabencode</b>	<b>Dreibuchstabencode</b>	<b>Aminosäure</b>
A	Ala	Alanin
C	Cys	Cystein
D	Asp	Asparaginsäure
E	Glu	Glutaminsäure
F	Phe	Phenylalanin
G	Gly	Glycin
H	His	Histidin
I	Ile	Isoleucin
K	Lys	Lysin
L	Leu	Leucin
M	Met	Methionin
N	Asn	Asparagin

---

P	Pro	Prolin
Q	Gln	Glutamin
R	Arg	Arginin
S	Ser	Serin
T	Thr	Threonin
V	Val	Valin
W	Trp	Tryptophan
Y	Tyr	Tyrosin

## Abbildungsverzeichnis

	<u>Seite</u>
<b>Abbildung 1:</b> Schematische Darstellung der Klassen A, B & C innerhalb der GPCR-Superfamilie..	3
<b>Abbildung 2:</b> Schematische Darstellung der Wirkung von den vier Gruppen der Liganden an einem G-Protein koppelnden Rezeptor (GPCR) mit Basalaktivität.....	5
<b>Abbildung 3:</b> Bildung und enzymatischer Abbau der trace amines.....	9
<b>Abbildung 4:</b> Übersicht über die Rezeptoren der TAAR-Familie in den drei verschiedenen Spezies.....	15
<b>Abbildung 5:</b> Gezeigt ist die schematische Darstellung der <i>in-situ</i> -Hybridisierung mit den verschiedenen Antikörpern. ....	39
<b>Abbildung 6:</b> Übersicht über die drei PCRs zur Generierung des Rhodopsin-tags. ..	44
<b>Abbildung 7:</b> Übersicht über die Mutagenese am Beispiel des humanen TAAR8 von Wildtyp zur Variante S269W. ....	48
<b>Abbildung 8:</b> Gezeigt ist die schematische Darstellung zur Messung der Oberflächenexpression eines Rezeptors. ....	55
<b>Abbildung 9:</b> Gezeigt ist die schematische Darstellung der verschiedenen Wege der Signaltransduktion. ....	56
<b>Abbildung 10:</b> Gezeigt ist die schematische Darstellung zur Messung der cAMP-Akkumulation. ....	57
<b>Abbildung 11:</b> Gezeigt ist die schematische Darstellung zur Messung des IP3-Reporter-Gen-Assay.....	59
<b>Abbildung 12:</b> Fotodokumentation einer exemplarischen PCR nach Reverse Transkription. ....	64
<b>Abbildung 13:</b> Die Grafik zeigt eine beispielhafte Auswertung einer durchgeführten RT-qPCR mit sechsfacher Bestimmung. ....	66

<b>Abbildung 14:</b> Gezeigt sind Darstellungen einer exemplarischen <i>in-situ</i> -Hybridisierung. ....	68
<b>Abbildung 15:</b> Die Grafik zeigt die Oberflächenexpression zweier verschiedener mTaar8b-Varianten. ....	70
<b>Abbildung 16:</b> Untersuchung einer möglichen $G\alpha_s$ -Aktivierung. ....	72
<b>Abbildung 17:</b> Untersuchung einer möglichen $G\alpha_{i/o}$ -Aktivierung des mTAAR8b. ....	73
<b>Abbildung 18:</b> Untersuchung einer möglichen $G\alpha_{i/o}$ -Aktivierung des hTAAR8. ....	75
<b>Abbildung 19:</b> Untersuchung einer möglichen $G\alpha_{q/11}$ -Aktivierung des mTAAR8b durch verschiedene Liganden. ....	76
<b>Abbildung 20:</b> Untersuchung einer möglichen $G\alpha_{q/11}$ -Aktivierung verschiedener mTaar8b-Varianten. ....	78
<b>Abbildung 21:</b> Untersuchung einer möglichen $G\alpha_{q/11}$ -Aktivierung des hTAAR8 durch verschiedene Liganden. ....	79
<b>Abbildung 22:</b> Untersuchung einer möglichen $G\alpha_{q/11}$ -Aktivierung verschiedener hTAAR8-Varianten. ....	80

## Tabellenverzeichnis

	<u>Seite</u>
<b>Tabelle 1:</b> Inkubationsprogramm für die cDNA Generierung mittels iScript™ cDNA Synthesis Kits .....	32
<b>Tabelle 2:</b> Primer für die PCR .....	33
<b>Tabelle 3:</b> Pipettierschema für die PCR .....	33
<b>Tabelle 4:</b> Primer für die RT-qPCR .....	34
<b>Tabelle 5:</b> Pipettierschema für die Real-Time-quantitative-PCR .....	35
<b>Tabelle 6:</b> PCR-Programm für die Real-Time-quantitative-PCR .....	35
<b>Tabelle 7:</b> LNA™-Sonden für die <i>in-situ</i> -Hybridisierung .....	36
<b>Tabelle 8:</b> Pipettierschema für die Ligation .....	41

---

<b>Tabelle 9:</b>	Übersicht über die verschiedenen Rezeptormutanten .....	43
<b>Tabelle 10:</b>	Vorwärts-Primer zum Einfügen des Rhodopsin-tags .....	46
<b>Tabelle 11:</b>	Rückwärts-Primer zum Einfügen des Rhodopsin-tags.....	46
<b>Tabelle 12:</b>	Pipettierschema für das Einfügen des Rhodopsin-tags .....	47
<b>Tabelle 13:</b>	PCR-Programm für die Mutagenese mit anschließendem <i>DpnI</i> -Verdau ..	47
<b>Tabelle 14:</b>	Primer für die zielgerichtete Mutagenese.....	49
<b>Tabelle 15:</b>	Pipettierschema für die Mutagenese.....	49
<b>Tabelle 16:</b>	PCR-Programm für die Mutagenese.....	50
<b>Tabelle 17:</b>	Primer für die Sequenzierung des Konstruktes im Vektor .....	51
<b>Tabelle 18:</b>	Pipettierschema für die Sequenzierungs-PCR.....	51
<b>Tabelle 19:</b>	PCR-Programm für die Sequenzierungs-PCR.....	52
<b>Tabelle 20:</b>	Transfektionsschema der verschiedenen Assays zur funktionellen Charakterisierung der generierten Rezeptorvarianten .....	54

## mTaar8b-Sequenz

### cDNA NM\_001010837

```
ATGACCAGCA ACTTTTCCCA ACCAGCCCTG CAGCTCTGCT ATGAGAACAC 50
GAATGGATCC TGTATTAAAA CTCCTTATTC TCCAGGGCCC CGGGTCATCC 100
TGTACATGGT CTTTGGCTTT GGGGCTGTGC TGGCAGTGTG TGGGAACCTC 150
CTGGTGGTGA TTTTCAGTTCT CCATTTCAAG CAGCTGCACT CTCCAGCCAA 200
TTTTCTCATC GCCTCTCTGG CCAGCGCTGA CTTCTTGGTG GGCATCTCTG 250
TGATGCCCTT CAGCATGGTC AGGTCCATTG AGAGCTGCTG G TACTTTGGA 300
GATGCATTTT GTAGCCTTCA CAGTTGCTGT GATGTGGCTT TTTGTTACTC 350
TTCTGCCCTC CACCTGTGCT TCATCTCAGT GGACAGGTAC ATTGCTGTCA 400
CAGACCCTCT GGTCTATCCC ACCAAGTTCA CAGTGTCTGT GTCTGGAATT 450
TGCATCAGCA TCTCCTGGAT TCTGCCCTG GTATACAGCA GTGCAGTGTT 500
CTACACAGGC ATCAGTGCTA AGGGGATTGA AAGCTTAGTA AGTGCTCTGA 550
ATTGTGTAGG GGGCTGCCAA ATCGTTGTCA ATCAAGACTG GGTTTTGATA 600
GATTTTCTTC TATTTTTCAT ACCTACCCTT GTTATGATCA TTCCTTACAG 650
CAAAATATTT TTGGTAGCCA AACAGCAAGC TGTA AAAAATT GAAACTTCTG 700
TAAGTGACAA CAGAGGTGAA TCATCCTCAG AGAGTCACAA AGCCAGAGTG 750
GCCAAGAGAG AGAGGAAGGC TGCAAAAACC TTGGGGGTCA CTGTGGTGGC 800
TTTTATGGTC TCGTGGCTCC CATAACAAT T GACTCATTG GTTGATGCTT 850
TCGTGGGCTT CATTACTCCT GCCTATGTCT ATGAAATCTG TTGCTGGAGT 900
GCCTATTATA ACTCAGCCAT GAACCCTTTG ATTTATGCTT TCTTTTATCC 950
TTGGTTTAGG AAAGCCATAA AGCTTATTTT AAGTGGGGAG ATTCTAAAGA 1000
GTCATTCATC TACCATGAGT TTGTTTTTCAG AGTAA
```

## hTAAR8-Sequenz

### cDNA NM\_053278

```
ATGACCAGCA ATTTTTCCCA ACCTGTTGTG CAGCTTTGCT ATGAGGATGT 50
GAATGGATCT TGTATTGAAA CTCCTATTTC TCCTGGGTCC CGGGTAATTC 100
TGTACACGGC GTTTAGCTTT GGGTCTTTGC TGGCTGTATT TGGAAATCTC 150
TTAGTAATGA CTTCTGTTCT TCATTTTAAG CAGCTGCACT CTCCAACCAA 200
TTTTCTCATT GCCTCTCTGG CCTGTGCTGA CTTCTTGGTA GGTGTGACTG 250
TGATGCTTTT CAGCATGGTC AGGACGGTGG AGAGCTGCTG GTATTTTGGA 300
GCCAAATTTT GTACTCTTCA CAGTTGCTGT GATGTGGCAT TTTGTTACTC 350
TTCTGTCCCT CACTTGTGCT TCATCTGCAT CGACAGGTAC ATTGTGGTTA 400
CTGATCCCCT GGTCTATGCT ACCAAGTTCA CCGTGTCTGT GTCGGGAATT 450
TGCATCAGCG TGTCCTGGAT TCTGCCTCTC ACGTACAGCG GTGCTGTGTT 500
CTACACAGGT GTCAATGATG ATGGGCTGGA GGAATTAGTA AGTGCTCTCA 550
ACTGCGTAGG TGGCTGTCAA ATTATTGTAA GTCAAGGCTG GGTGTTGATA 600
GATTTTCTGT TATTCTTCAT ACCTACCCTT GTTATGATAA TTCCTTACAG 650
TAAGATTTTT CTTATAGCTA AACACAAGC TATAAAAATT GAAACTACTA 700
GTAGCAAAGT AGAATCATCC TCAGAGAGTT ATAAAATCAG AGTGGCCAAG 750
AGAGAGAGGA AAGCAGCTAA AACCCCTGGG GTCACGGTAC TAGCATTTGT 800
TATTTTCATGG TTACCGTATA CAGTTGATAT ATTAATTGAT GCCTTTATGG 850
GCTTCCTGAC CCCTGCCTAT ATCTATGAAA TTTGCTGTTG GAGTGCTTAT 900
TATAACTCAG CCATGAATCC TTTGATTTAT GCTCTATTTT ATCCTTGGTT 950
TAGGAAAGCC ATAAAACCTA TTTTAAGTGG AGATGTTTTA AAGGCTAGTT 1000
CATCAACCAT TAGTTTATTT TTAGAATAA
```

## Bovine Rhodopsin-Sequenz

### cDNA NM\_001014890

```
ATGAACGGGA CCGAGGGCCC AACTTCTAC GTGCCTTTCT CCAACAAGAC 50
GGGCGTGGTG CGCAGCCCCT TCGAGGCCCC GCAGTACTAC CTGGCGGAGC 100
CATGGCAGTT CTCCATGCTG GCCGCCTACA TGTTCTTGCT GATCATGCTT 150
GGCTTCCCCA TCAACTTCCT CACGCTGTAC GTCACAGTCC AGCACAAGAA 200
GCTGCGCACA CCCCTCAACT ACATCCTGCT CAACCTGGCC GTGGCCGACC 250
TCTTCATGGT CTTGCGGGGC TTCACCACCA CCCTCTACAC CTCTCTGCAC 300
GGGTACTTCG TCTTTGGGCC CACGGGCTGC AACCTGGAGG GCTTCTTTGC 350
CACCTTGGGC GGTGAAATTG CACTGTGGTC CTTGGTGGTC CTGGCCATCG 400
AGCGGTACGT GGTGGTGTGC AAGCCCATGA GCAACTTCCG CTTGCGGGAG 450
AACCACGCCA TCATGGGCGT CGCCTTCACC TGGGTCATGG CTCTGGCCTG 500
TGCCGCGCCC CCCCTCGTCG GCTGGTCCAG GTACATCCCG GAGGGCATGC 550
AGTGCTCGTG CGGGATTGAC TACTACACGC CCCACGAGGA GACCAACAAT 600
GAGTCGTTTCG TCATCTACAT GTTCGTGGTC CACTTCATCA TCCCCCTGAT 650
TGTCATATTC TTCTGCTACG GGCAGCTGGT GTTCACCGTC AAGGAGGCGG 700
CTGCCAGCA GCAGGAGTCG GCCACCACTC AGAAGGCCGA GAAGGAGGTC 750
ACCCGCATGG TGATCATCAT GGTCATCGCT TTCCTAATCT GCTGGCTGCC 800
CTACGCTGGG GTGGCGTTCT ACATCTTCAC CCATCAGGGC TCTGACTTTG 850
GCCCCATCTT CATGACCATC CCGGCTTTCT TTGCCAAGAC TTCTGCCGTC 900
TACAACCCCG TCATCTACAT CATGATGAAC AAGCAGTTCC GGAAGTGCAT 950
GGTCACCACT CTCTGCTGTG GCAAGAACCC GCTGGGTGAC GACGAGGCCT 1000
CCACCACCGT CTCCAAGACA GAGACCAGCC AAGTGGCGCC TGCCTAA
```



## Danksagungen

An dieser Stelle möchte ich die Möglichkeit nutzen, um mich bei den Menschen zu bedanken ohne die diese Arbeit nicht zu Stande gekommen wäre.

Einen speziellen Dank an Frau Prof. Dr. Annette Grüters-Kieslich für die herzliche Aufnahme in ihrer Arbeitsgruppe.

Mein besonderer Dank gilt PD Dr. Heike Biebermann für die Bereitstellung des Themas und die intensive Betreuung, die ständige Diskussionsbereitschaft und für unzählige Ideen und Anregungen.

Ich danke Frau Prof. Dr. Annette Schürmann (Deutsches Institut für Ernährungsforschung, Potsdam), die mir während der gesamten Zeit als Co-Mentorin zur Seite stand und mit Rat und Tat weiter half.

Prof. Dr. Joseph Köhrle danke ich für die Aufnahme im Graduiertenkolleg 1208 und das vermittelte endokrinologische Grundlagenwissen.

Ich möchte zudem Herrn Prof. Dr. Torsten Schöneberg (Institut für Biochemie, Universität Leipzig) danken, der uns mit hilfreichen Ideen geholfen hat.

Ich danke Herrn Prof. Dr. Matthias Tschöp und Frau Dr. Chun-Xia Yi für die Aufnahme und herzliche Betreuung in Cincinnati (ehemals Metabolic Disease Institute, Div. of Endocrinology, Department of Medicine, University of Cincinnati).

Für die Bereitstellung und Hilfe bei der Organentnahme möchte ich mich bei Frau Prof. Dr. Gudrun Brockmann (Albrecht Daniel Thaer - Institut für Agrar- und Gartenbauwissenschaften, Humboldt Universität zu Berlin) und der Arbeitsgruppe um Frau Dr. Petra Wiedmar (ehemals Deutsches Institut für Ernährungsforschung, Potsdam).

Lieben Dank meiner Familie und vor allem meinen Freunden, die mir während dieser Zeit zur Seite gestanden haben, wenn ich dachte, dass sich Studium und Doktorarbeit nicht unter einen Hut bringen lassen.

Einen herzlichen Dank auch an meine jetzige Klinikdirektorin Frau Prof. Dr. Antonia Jossen, die mir in der Endphase der Fertigstellung dieser Arbeit zur Seite stand.

Einen ganz besonderen Dank möchte ich auch an Herrn Prof. Dr. Günter Schultz richten, der für zahlreiche Diskussionen offen war.

---

Außerdem bedanken möchte ich mich bei allen ehemaligen und derzeitigen Mitarbeitern des Instituts für experimentelle pädiatrische Endokrinologie für die freundliche Aufnahme in die Arbeitsgruppe und die gute Atmosphäre, mein besonderer Dank gilt Frau Dipl.-Ing. Juliane Pratzka für die Einarbeitung zu Beginn der Arbeit. Weiterhin möchte ich mich bei ihr und Frau Dr. Jessica Mühlhaus für die außerordentlich tatkräftige Unterstützung bei der Erstellung des Papers bedanken.

## **Curriculum Vitae und eigene Publikationen**

Curriculum Vitae und eigene Publikationen werden aus datenschutzrechtlichen Gründen in der elektronischen Version der Arbeit nicht veröffentlicht.









## Eidesstattliche Versicherung

„Ich, Daniela Elke Angelika Nürnberg, versichere an Eides statt durch meine eigenhändige Unterschrift, dass ich die vorgelegte Dissertation mit dem Thema: *Expression und funktionelle Charakterisierung des orphanen murinen und humanen Taar8* selbstständig und ohne nicht offengelegte Hilfe Dritter verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel genutzt habe.

Alle Stellen, die wörtlich oder dem Sinne nach auf Publikationen oder Vorträgen anderer Autoren beruhen, sind als solche in korrekter Zitierung (siehe „Uniform Requirements for Manuscripts (URM)“ des ICMJE -[www.icmje.org](http://www.icmje.org)) kenntlich gemacht. Die Abschnitte zu Methodik (insbesondere praktische Arbeiten, Laborbestimmungen, statistische Aufarbeitung) und Resultaten (insbesondere Abbildungen, Grafiken und Tabellen) entsprechen den URM (s.o) und werden von mir verantwortet.

Meine Anteile an etwaigen Publikationen zu dieser Dissertation entsprechen denen, die in der untenstehenden gemeinsamen Erklärung mit der Betreuerin, angegeben sind. Sämtliche Publikationen, die aus dieser Dissertation hervorgegangen sind und bei denen ich Autor bin, entsprechen den URM (s.o) und werden von mir verantwortet.

Die Bedeutung dieser eidesstattlichen Versicherung und die strafrechtlichen Folgen einer unwahren eidesstattlichen Versicherung (§156,161 des Strafgesetzbuches) sind mir bekannt und bewusst.“

Datum

Unterschrift



Anteilserklärung an etwaigen erfolgten Publikationen

Daniela Elke Angelika Nürnberg hatte folgenden Anteil an den folgenden Publikationen:

Publikation 1: Kleinau G, Pratzka J, **Nürnberg D**, Grüters A, Führer-Sakel D, Krude H, Köhrle J, Schöneberg T, Biebermann H: *Differential Modulation of Beta-Adrenergic Receptor Signaling by Trace Amine-Associated Receptor 1 Agonists*. 2011: *PLoS One*. 6(10):e27073

Beitrag im Einzelnen: beteiligt in Planung und an der Durchführung der Experimente, Beteiligung am Verfassen des Manuskriptes

Publikation 2: Mühlhaus J<sup>†</sup>, Dinter J<sup>†</sup>, **Nürnberg D<sup>†</sup>**, Rehders M, Depke M, Golchert J, Homuth G, Yi C-X, Morin S, Köhrle J, Brix K, Tschöp M, Kleinau G, Biebermann H. *Analysis of Human TAAR8 and Murine Taar8b Mediated Signaling Pathways and Expression Profile*. *International Journal of Molecular Sciences*. 2014; 15(11):20638-20655

<sup>†</sup>These authors contributed equally to this work.

Beitrag im Einzelnen: beteiligt in Planung und an der Durchführung der Experimente, Auswertung der Ergebnisse, Beteiligung am Verfassen des Manuskriptes

Publikation 3: Dinter J, Mühlhaus J, Wienchol CL, Yi C-X, **Nürnberg D**, Morin S, Grüters A, Köhrle J, Schöneberg T, Tschöp M, Krude H, Kleinau G, Biebermann H. (2015) *Inverse Agonistic Action of 3-Iodothyronamine at the Human Trace Amine-Associated Receptor 5*. *PLoS ONE* 10(2): e0117774. doi:10.1371/journal.pone.0117774

Beitrag im Einzelnen: beteiligt an der Durchführung der Experimente

Unterschrift, Datum und Stempel des betreuenden Hochschullehrers/der betreuenden Hochschullehrerin

Unterschrift des Doktoranden/der Doktorandin