

Die physiologische Relevanz des G-Protein-gekoppelten Rezeptors GPR34

Dissertation

zur Erlangung des akademischen Grades
Dr. med.

an der Medizinischen Fakultät
der Universität Leipzig

eingereicht von: Ines Liebscher
Geburtsdatum: 1. September 1983 in Dresden

angefertigt im: Institut für Biochemie
 Abteilung Molekulare Biochemie

Betreuer: Prof. Dr. med. T. Schöneberg

Leipzig, den 02.08.2010

Beschluss über die Verleihung des Doktorgrades vom: 18.01.2011

Bibliographische Beschreibung

Liebscher, Ines

Die Physiologische Relevanz des G-Protein-gekoppelten Rezeptors GPR34

Universität Leipzig, Dissertation
117 Seiten, 141 Lit., 17 Abb., 9 Tab., 13 Anlagen

Referat:

Die Familie der G-Protein-gekoppelten Rezeptoren (GPCRs) bildet die größte Gruppe von Membranrezeptoren im menschlichen Organismus. Für viele GPCRs sind bisher die physiologischen Funktionen nicht bekannt. Das biologische Verständnis der Funktionen im menschlichen Organismus dieser sogenannten „orphan“ GPCRs (oGPCRs) hat, aufgrund möglicher kausaler Beteiligung an der Pathogenese von Erkrankungen sowie deren therapeutische Beeinflussbarkeit, hohe medizinische Relevanz.

Die GPCRs der P2Y₁₂-ähnliche Rezeptorgruppe besitzen eine große physiologische Bedeutung bei der Thrombozytenaggregation und der Induktion der Migration von immunokompetenten Zellen in Schädigungsgebiete. Der ADP-Rezeptor P2Y₁₂ kann durch verschiedene pharmakologische Wirkstoffe beeinflusst werden, was bereits klinisch-therapeutisch genutzt wird. Diese Gruppe von GPCRs enthält jedoch auch Mitglieder, deren Funktionen völlig unbekannt sind. Einer dieser oGPCRs ist der GPR34. Ziel dieser Arbeit war es, mittels verschiedener *in-vitro*-Methoden und anhand eines GPR34-defizienten Mausstamms die physiologische Relevanz dieses P2Y₁₂-ähnlichen Rezeptors zu analysieren. Dazu wurde ein GPR34-Knockout-Mausmodell etabliert. Die GPR34-Defizienz hatte keinen wesentlichen Einfluss auf die Entwicklung, Morphologie, das Wachstum oder die Fertilität bei Mäusen. Die Ergebnisse aus Immunisierungs- und Infektionsstudien zeigten jedoch, dass dieser evolutionär hoch konservierte Rezeptor eine wichtige Funktion in der Feinkontrolle der zellulären Immunabwehr ausübt. Neben einer verstärkten Antwort im Delayed-type Hypersensitivity (DTH)-Test war die Abwehr einer *Cryptococcus*-Infektion in diesem GPR34-defizienten Tiermodell beeinträchtigt. Signifikant erhöhte Zytokinspiegel nach Antigen- bzw. Pathogenexposition deuteten auf eine gestörte Immunregulation in GPR34-defizienten Mäusen hin. Weiterführende Untersuchungen sollten sich der Identifizierung des endogenen Agonisten und der Funktion des GPR34 bei der Koordinierung der zellulären Immunreaktion widmen.

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis.....	3
Abbildungsverzeichnis	6
Tabellenverzeichnis.....	6
Abkürzungsverzeichnis	7
1 Einleitung	11
1.1 Das Repertoire von GPCR im humanen Genom.....	11
1.2 Orphan GPCR, Rezeptoren mit unbekannter Funktion.....	12
1.3 Die Gruppe von P2Y ₁₂ -ähnlichen GPCRs	14
1.4 Der P2Y ₁₂ -ähnliche Rezeptor GPR34	16
1.4.1 Genomische Struktur des GPR34-Gens	17
1.4.2 Genomische und strukturelle Evolution des GPR34.....	17
1.4.3 Gewebeexpression des GPR34.....	20
1.4.4 Bekannte Funktionen des GPR34	21
2 Ziele und Fragestellungen	23
3 Materialien und Methoden	24
3.1 Chemikalien, Materialien, Plasmide, Primer	24
3.2 Molekularbiologische Standardmethoden.....	24
3.3 Verwendete Mikroorganismen und Zellen.....	25
3.4 Funktionelle in vitro-Charakterisierung des GPR34.....	25
3.4.1 Herstellung und Reinigung von <i>Lyso-PS</i>	25
3.4.2 Expression und Funktionsanalyse von GPR34-Orthologen in Säugerzellen.....	26
3.4.3 Expression und Funktionsanalyse von GPR34-Orthologen in Hefen.....	28
3.5 Tierhaltung und Genotypisierung.....	31
3.5.1 Generierung GPR34-defizienten Mauslinie	31
3.5.2 Tierhaltung	31
3.5.3 Genotypisierung der Mäuse	32
3.6 Morphometrische, histologische und laborchemische Charakterisierung von GPR34-defizienten Tieren.....	33
3.6.1 Reproduktionsrate und Genotypverteilung	33

3.6.2	Wachstum und morphometrische Charakterisierung	33
3.6.3	Hämatologische und histologische Untersuchungen.....	33
3.6.4	Laborchemische Analyse von Serum und Urin.....	34
3.7	SHIRPA-Protokoll und andere Verhaltensuntersuchungen	34
3.7.1	SHIRPA-Protokoll	34
3.7.2	<i>Open-Field-Test, Light-Dark-Test, Hot-Plate-Test</i>	35
3.8	Immunologische und infektionsbiologische Untersuchungen	36
3.8.1	Untersuchung der Mastzellaktivierung	36
3.8.2	Migration von peritonealen Zellen.....	38
3.8.3	Delayed-type Hypersensitivity (DTH)-Test.....	39
3.8.4	Infektionsversuche mit <i>Cryptococcus neoformans</i>	39
3.9	Genexpressionsanalysen im Myocard von Wildtyp- und GPR34-defizienten Mäuse	40
3.9.1	RNA-Isolierung.....	40
3.9.2	Microarray-basierte Expressionsanalyse.....	40
3.9.3	Statistische Auswertung der Microarraydaten	41
3.9.4	Sortierung regulierter Gene in biologische Systeme und Funktionen.....	41
3.9.5	Quantitative Echtzeit-PCR (Echtzeit-qPCR)	42
3.10	Statistische Auswertung der Daten.....	44
4	Ergebnisse	45
4.1	Funktionelle Untersuchungen zur Aktivierbarkeit von GPR34-Orthologen durch lyso-PS	45
4.2	Basale Charakterisierung von GPR34-defizienten Mäusen	48
4.3	Lyso-PS aktiviert Mastzellen nicht über den GPR34.....	51
4.4	Peritonealen monozytäre Zellen aus GPR34-defizienten Mäusen zeigen eine verstärkte basale Migration	52
4.5	Verstärkte DTH-Reaktion in GPR34-defizienten Mäusen.....	53
4.6	Erhöhte Pathogenität von <i>C. neoformans</i> in GPR34-defizienten Mäusen	54
4.7	Differenzielle Genexpression im Myokard GPR34-defizienter Mäuse	57
4.7.1	Validierung der <i>Microarray</i> -Daten	58
4.7.2	Genomweite Expressionsunterschiede im Myokard von KO- und WT-Tieren.....	59
4.7.3	Klassifizierung differentiell regulierter Gene im Myocard von KO- und WT-Tieren..	59
4.7.4	Charakterisierung und Validierung einer Auswahl differentiell regulierter Gene	63
5	Diskussion	67

5.1	Palmityl-lyso-PS ist nicht der endogene Agonist des humanen und murinen GPR34.....	67
5.2	GPR34-Defizienz hat keinen Einfluss auf die Vitalität SPF-gehaltener Mäuse	71
5.3	Diskrete myocardiale Genexpressionsveränderungen bei GPR34-defizienten Mäusen	73
5.4	GPR34-defiziente Mäuse zeigen eine pathologische Immunreaktion	74
5.5	Ausblick	80
6	Zusammenfassung und Schlussfolgerungen	83
7	Literaturverzeichnis.....	86
	Erklärung über die eigenständige Abfassung der Arbeit	97
	Lebenslauf	98
	Veröffentlichungen.....	100
	Danksagungen	101
	Anhang	102

Abbildungsverzeichnis

- Abb. 1 Phylogenetische Verwandtschaft von P2Y Rezeptoren
- Abb. 2 Phylogenetische Verwandtschaft von P2Y₁₂-ähnlichen Rezeptoren
- Abb. 3 Metabolismus und Funktion von Serinphospholipiden
- Abb. 4 Heterologe Expression von GPCR in einem genetisch modifizierten Hefesystem
- Abb. 5 Genomischer Locus des murinen GPR34 vor und nach der Rekombination des Gen-Target-Konstruktes
- Abb. 6 Untersuchung der Wirkung von *lyso*-Phosphatidylserinen auf verschiedene GPCR
- Abb. 7 Aktivierung eines Rezeptorsubtyps des Karpfens durch *lyso*-PS
- Abb. 8 Expression des humanen GPR34 im Hefesystem
- Abb. 9 Herstellung von chimären Männchen für eine GPR34-defiziente Mauslinie
- Abb. 10 Genotypverteilung der GPR34-cre Mauslinie
- Abb. 11 Vergleich der Körpergewichte und der Blutglukose bei 4-Wochen-alten Mäusen
- Abb. 12 Histaminfreisetzung aus peritonealen Mastzellen
- Abb. 13 Chemotaxis von Peritoneallavagezellen
- Abb. 14 DTH-Test an methylBSA-immunisierten Mäusen
- Abb. 15 Kryptokokkose bei *C. neoformans*-infizierten Mäusen
- Abb. 16 Expression von A) Hsd17b7 und B) Epha4 in verschiedenen Geweben im Vergleich zur Microarray-Analyse nach MAS5
- Abb. 17 Übersicht einiger wichtiger Interaktionen der zellulären Immunabwehr
- Abb. S1 Expressionsvektor p416GPD für GPCR in Hefen
- Abb. S2 Expressionsvektor pcDps für GPCR in Säugerzellen

Tabellenverzeichnis

- Tab. 1 Liste der verwendeten molekularbiologischen Standardmethoden
- Tab. 2 Grundcharakterisierung von GPR34-defizienten Mäusen
- Tab. 3 Quantifizierung verschiedener Zytokine in Milzzellkulturüberständen
- Tab. 4 Quantifizierung verschiedener Zytokine in der Lungenlavage naiver Mäuse
- Tab. 5 Quantifizierung verschiedener Zytokine in der Lungenlavage infizierter Mäuse
- Tab. 6 Validierung der Microarray-Daten

Tab. 7	Onto-Express-Analyse der signifikant regulierten Gene im Myocard GPR34-defizienter im Vergleich zu WT-Mäusen
Tab. 8	Auswertung der Gene Set Enrichment Analysis (GSEA) der signifikant regulierten Gene im Myocard GPR34-defizienter Mäuse
Tab. 9	RNA-Expressionsanalyse ausgewählter Transkripte mittels quantitativer Echtzeit-PCR und Microarray
Tab. S1	Zusammenstellung der für die Genotypisierung verwendeten Primer
Tab. S2	Zusammenstellung der für die quantitative Echtzeit-PCR verwendeten Primer
Tab. S3	Organgewichte
Tab. S4	Differenzialblutbild
Tab. S5	Klinisch-chemische Laboruntersuchungen von Serum und Urin
Tab. S6	Bestimmung von Aminosäuren und Acylcarnitinen im Blut
Tab. S7	SHIRPA-Protokoll
Tab. S8	PLC Bedingungen der Messung der Histaminfreisetzung
Tab. S9	Ergebnisse der SHIRPA Untersuchungen
Tab. S10	Open-Field-Test und Light-Dark-Test
Tab. S11	Microarray-Daten signifikant regulierter Gene im Herzmuskel von GPR34-defizienten Mäusen im Vergleich zu WT-Mäusen

Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
ADP	Adenosin-5'-diphosphat
AG	Arbeitsgruppe
Aqua dest.	<i>aqua destillata</i> (destilliertes Wasser)
ATP	Adenosin-5'-triphosphat
methylBSA	methyliertes bovines Serumalbumin
Bp	Basenpaare
BRET	Biolumineszenz-Resonanz-Energie-Transfer
<i>C. neoformans</i>	<i>Cryptococcus neoformans</i>
cAMP	cyclisches Adenosin-5'-monophosphat
CASK	Calcium/Calmodulin-abhängige Serine-Proteinkinase
CD	cluster of differentiation

CFU	colony forming unit
CMF	Calcium- und Magnesium-frei
CHO-Zellen	Epithelzelllinie aus Ovarien des Chinesischen Hamsters (<i>Cricetulus griseus</i>)
COS-7-Zellen	Fibroblastenzelllinie aus Nieren der Grünen Meerkatze (<i>Cercopithecus aethiops</i>)
CRE	cAMP Responsive Element
CRH	Corticotrophin-releasing Hormon
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle's Medium
DNP	2, 4-Dinitrophenol
dsDNA	doppelsträngige DNA
DTH-Test	delayed-type hypersensitivity Test
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EC ₅₀	benötigte Konzentration für eine 50% Aktivierung
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EMPreSS	Europäische Maus Phänotypisierungsquelle für standardisierte Screens
Epha4	Ephedrin Rezeptor A4
ERK	extracellular signal-regulated kinases
ES-Zellen	embryonale Stammzellen
ESI-MS/MS	Elektrosprayionisation-Tandemmassenspektrometrie
EST	expressed sequence tag
FACS	fluorescence-activated cell sorting (Durchflusszytometrie)
FDR	false discovery rate
FBS	fetales bovines Serum
FWER	familiywise-error rate corrected p-value
GenMAPP	Gene Map Annotator and Pathway Profiler
GFP	grün-fluoreszierendes Protein
GO	Gene Ontology
GPCR	G-Protein-gekoppelter Rezeptor
GSEA	Gene Set Enrichment Analysis
HBSS	Hank's Buffered Salt Solution
hiCap	Hitze inaktivierter <i>C. neoformans</i> -Stamm CAP67
HL-60-Zellen	humane promyelozytische Leukämiezellen

HPTLC	high planar thin layer chromatographie
HPT	Hot Plate Test
Hsd17b7	17- β Hydroxysteroiddehydrogenase
ID	identification
IL	Interleukin
INF- γ	Interferon gamma
IP	Inositolphosphat
IP ₃	Inositoltriphosphat
K562-Zellen	erste humane immortalisierte myelogene Leukämiezelllinie
KEGG	Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes Database
KO	Knockout
<i>lyso</i> -PS	<i>lyso</i> -Phosphatidylserin
LDT	Light-Dark-Test
MAS5	Microarray Suite 5
MHC	Major Histocompatibility Complex
MeS-ADP	2-(Methylthio) adenosin-5'-diphosphat
MPI	Max-Planck-Institut
MSigDB2.0	Molecular Signatures Database
n	number (Anzahl)
n.m.	nicht messbar
NKT-Zellen	natural killer T-Lymphozyten
NTC	no template control
OD _{600 nm}	Optische Dichte bei einer Wellenlänge von 600 nm
OFT	Open Field-Test
oGPCR	„orphan“ G-Protein-gekoppelter Rezeptor, Rezeptor ohne bekannte Funktion
PBS	phosphate buffered saline (Phosphat-gepufferte Salzlösung)
PCR	Polymerase Chain Reaction
PLA	Phospholipase A
<i>P-lyso</i> -PS	1-Palmityl- <i>lyso</i> -Phosphatidylserin
PS	Phosphatidylserin
PTX	Pertussistoxin

RAW264.1-Zellen	murine Makrophagen-Zelllinie
RMA	Robust Multi-Array Analysis
RPMI-1640	Royal Park Memorial Institute, Zellkulturmedium benannt nach dem Ort seiner Entwicklung
RT-PCR	'realtime' Echtzeit-PCR
<i>S. cerevisiae</i>	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
<i>S-lyso-PS</i>	1-Stearyl- <i>lyso</i> -Phosphatidylserin
SD	standard deviation (Standardabweichung)
SDS	Sodium Dodecyl Sulfate (Natriumdodecylsulfat)
SEAP	secreted alkaline phosphatase (Sekretierte alkalische Phosphatase)
SEM	standard error of the mean (Standardfehler des Mittelwerts)
SHIRPA	S mith K line B eecham P harmaceuticals, H arwell, I mperial College School of Medicine at St. Mary`s, R oyal London Hospital, St. Bartholomew`s and the Royal London School of Medicine, P henotype A ssessment
SPF	spezifisch pathogenfrei
SV-40	Simian Virus 40
Tab.	Tabelle
<i>Taq</i>	<i>Thermus aquaticus</i>
Th	T-Helferzelle
TNF- α	Tumornekrosefaktor alpha
T _{reg}	regulatorische T-Lymphozyten
Tris	Tris (hydroxymethyl)-aminomethan
Triton-X	Octylphenolpoly (ethyleneglycolether)
U/H - Medium	Uracil- bzw Histidin-defizientes Medium
URA3	Orotidine-5'-phosphat-Decarboxylase
UDP / UTP	Uridin-5'-diphosphat / Uridin-5'-triphosphat
UTR	untranslatierte Region
YPD	Yeast extract peptone dextrose
WEHI-Zellen	IL-3 produzierende Lymphomzelllinie aus Balb/c Mäuse thymus
WT	Wildtyp
ZNS	Zentralnervensystem

1 Einleitung

Die zelluläre Kommunikation wird über verschiedene Familien von zytosolischen und membranären Rezeptoren gewährleistet. Die Familie der G-Protein-gekoppelten Rezeptoren (GPCRs) bildet mit über 900 Mitgliedern die größte Gruppe von Membranrezeptoren im menschlichen Organismus (Fredriksson et al., 2005). Auf Grund ihrer Transmembrantopologie werden GPCRs auch als Sieben-Transmembrandomänen-Rezeptoren bezeichnet. GPCRs sind für die Signaltransduktion von Licht-, Geruchs- und Geschmacksreizen, Hormonen und Neurotransmittern verantwortlich. Sie spielen auch eine entscheidende Rolle bei Entzündungsprozessen, Chemotaxis sowie beim Zellwachstum und bei der Zelldifferenzierung. Nach Bindung eines Agonisten an seinem spezifischen Rezeptor erfolgt eine Konformationsänderung, die auf ein intrazelluläres heterotrimeres G-Protein übertragen wird. In Abhängigkeit von der G-Protein-Selektivität des GPCR werden verschiedene intrazelluläre Signalwege und Second messenger-Systeme moduliert (Wess, 1998).

Über 200 GPCRs konnten bisher Transmitter- und Hormonsystemen zugeordnet werden und stellen für ungefähr 60 % der gegenwärtig verordneten Pharmaka den Hauptangriffspunkt dar. Jedoch ist für viele GPCRs weder die Funktion noch der endogene Bindungspartner (Ligand) bekannt. Diese Rezeptoren werden als sogenannte „orphan“ GPCRs (oGPCRs) bezeichnet. In den vergangenen 15 Jahren sind GPCRs nicht nur als therapeutisches Ziel sondern auch als Ursache für verschiedene Erkrankungen in den Fokus wissenschaftlicher Untersuchungen geraten. So verursachen Mutationen in GPCRs eine Vielzahl an Erkrankungen, unter ihnen Wachstums-, Differenzierungs-, Fertilitäts- und Sehstörungen sowie maligne Tumoren (Schöneberg et al., 2004). Es ist zu erwarten, dass durch die „Deorphanisierung“ von GPCRs neue Phänotypen und Erkrankungen des Menschen verschiedenen Mutationen in diesen oGPCRs zugeordnet werden können.

1.1 Das Repertoire von GPCR im humanen Genom

Nach der Aufklärung und Validierung der Sequenz des Rhodopsins durch Nathans und Hogness Anfang der 80er Jahre des letzten Jahrhunderts (Ferretti et al., 1986; Nathans and Hogness, 1983) wurden nachfolgend weitere bis dato bereits bekannte GPCRs, wie beispielsweise aminerge Rezeptoren, kloniert und sequenziert (Kobilka et al., 1987a; Kobilka et al., 1987b). Jedoch erst mit der Sequenzierung des menschlichen Genoms durch das Human Genome Sequencing consortium (Lander, 2004) und anderer Säugetiere (beispielsweise durch das Chimpanzee

Genome Sequencing consortium (Mikkelsen et al., 2005; Waterston et al., 2002)) konnte das komplette Repertoire an GPCRs beschrieben werden (Foord et al., 2005).

Olfaktorische Rezeptoren bilden mit ca. 900 Genen die größte Gruppe von GPCRs in Vertebraten. Dabei kodieren im menschlichen Genom nur ein Drittel der Gene für intakte Rezeptoren, der weitaus größere Anteil (63%) kodiert für Pseudogene (Gilad et al., 2003; Mombaerts, 2001). Innerhalb der Gruppe der nicht-olfaktorischen GPCRs konnte gegenwärtig für ca. 215 Rezeptoren der natürliche Agonist identifiziert werden. Die Agonisten und die Physiologie von weiteren 155 oGPCRs sind bisher unbekannt (Wigglesworth et al., 2006).

Auf der Basis von strukturellen Ähnlichkeiten und evolutionären Aspekten werden die humanen GPCRs in fünf Familien eingeteilt (sogenannte GRAFS Klassifizierung): die Glutamat-, Rhodopsin-, Adhesion-, Frizzled/Taste2- und Sekretinfamilie (Fredriksson et al., 2003; Fredriksson et al., 2005). Die Rhodopsin-ähnlichen Rezeptoren bilden hierunter die größte Familie im Menschen und anderen Vertebraten. Da alle GPCR-Familien nur eine geringe Sequenzhomologie untereinander aufweisen, wird ihr gemeinsamer, ca. 600 Millionen Jahre alter evolutionärer Ursprung weiterhin kontrovers diskutiert (Römpler et al., 2007).

1.2 Orphan GPCR, Rezeptoren mit unbekannter Funktion

In den letzten Jahren sind für über 30 oGPCRs die endogenen Agonisten gefunden worden, wobei mehrheitlich die Physiologie dieser kürzlich identifizierten Rezeptor/Transmittersysteme noch völlig unbekannt ist. Hierzu gehören z.B. das Ghrelin, Apelin, die Orexine und das Orphanin. Jedoch konnten auch bekannte Transmitter wie das Motilin, Urotensin II, ADP, Leukotriene und das Histamin neu beschriebenen GPCRs zugeordnet werden (Civelli et al., 2006). Die Methoden zur Identifizierung und Charakterisierung neuer Liganden/Rezeptorsysteme und deren physiologische Bedeutung haben sich in den letzten Jahren gewandelt und werden mit dem Begriff der „Reversen Pharmakologie“ beschrieben (Civelli et al., 1999). Am Beginn dieses Prozesses stehen Sequenzinformationen aus Homologieklonierungsanalysen, und genomischen oder sogenannten expressed sequence tag (EST) (cDNA)-Datenbanken. Mithilfe eines Vergleiches der resultierenden Aminosäuresequenz mit bekannten GPCRs ist eine Einordnung in bestehende GPCR-Gruppen, und damit eventuell auch die Identifizierung eines möglichen Liganden - wie im Falle der Sphingosin-1-Phosphat- und Lysophosphatidylsäure-Rezeptoren - möglich (Im et al., 2000a; Im et al., 2000b). Gewöhnlich liegt die Gleichheit nicht-verwandter GPCRs auf Aminosäureebene unter 20 %, wobei Subtypen jedoch Identitäten zwischen 40-98 %

aufweisen können. Ausnahmen existieren z.B. im Fall der Histamin-Rezeptoren, bei denen Subtypen auch weit geringere Übereinstimmungen zeigen können. Ein weiterer wichtiger Schritt in der Analyse eines oGPCR ist die Identifizierung der genomischen Lokalisation. Viele GPCRs liegen in Clustern vor, d.h. GPCRs mit gleichem oder strukturell ähnlichem Liganden sind genomisch auf engem Raum lokalisiert. Beispiele hierfür sind die Chemokin-Rezeptoren oder die Formylpeptid-Rezeptoren (Gao et al., 1998). Über die Analyse der Gewebeexpression und die Expressionsregulation mittels Northern Blots, RT-PCR, *in situ*-Hybridisierung und immunologischer Techniken sind Hinweise auf eine mögliche gewebespezifische Funktion ableitbar. Wichtige Anhaltspunkte über strukturelle Merkmale und deren Konservierung sowie die evolutionäre Bedeutung eines oGPCR ergeben sich aus phylogenetischen Studien. Mittels degenerierter Primer lassen sich Rezeptorfragmente aus anderen, auch entfernten Spezies amplifizieren und so die Existenz eines gegebenen oGPCR nachweisen. Die Identifizierung einer Inaktivierung eines oGPCR in einer anderen Spezies, im Sinne einer Pseudogenbildung, lässt eventuell Rückschlüsse auf dessen Funktion zu. Eine hohe evolutionäre Konservierung und das Fehlen von Pseudogenen in unterschiedlichen Spezies weisen dabei auf eine existentielle physiologische Funktion hin. Des Weiteren bildet die Identifizierung von konservierten und nicht-konservierten Rezeptorbereichen eine wichtige strukturelle Basis für eine spätere Ligandentwicklung. Um sich der physiologischen Funktion eines oGPCR zu nähern, nimmt neben der Identifizierung des Liganden auch die Untersuchung der Physiologie nach Inaktivierung des Rezeptors *in vivo*, d.h. die Generation eines Knock-out-Modells, eine Schlüsselstellung ein und wurde bisher schon bei vielen oGPCRs erfolgreich zu Analysen der physiologischen Relevanz eingesetzt (Offermanns, 2000; Siegel, 1999).

Ein wesentlicher Meilenstein in der Charakterisierung von oGPCRs ist die Suche nach dem natürlichen Agonisten. Ein Problem bei dieser Ligandidentifizierung ist die Unkenntnis der Signaltransduktionswege des oGPCR. Eine Möglichkeit Letztere auch ohne die Kenntnis des Agonisten zu charakterisieren, besteht in der Tatsache, dass GPCRs in einem Gleichgewicht zwischen aktiver und inaktiver Konformation vorliegen (Lefkowitz et al., 1993). Bei manchen GPCRs wie z.B. den Histamin-Rezeptoren (H₂, H₃, H₄) beobachtet man nach Überexpression bereits ohne Agonisten eine hohe Aktivierung ihres nachgeschalteten Signaltransduktionsweges. Orphan GPCRs, die diese Eigenschaft nicht zeigen, lassen sich häufig durch Einführung von Mutationen aktivieren. Bei der Agonistsuche werden grundsätzlich zwei Wege beschritten (Howard et al., 2001). (1) Beim sog. „Reversen Pharmakologieansatz“ werden genomische

Bibliotheken mit möglichen Transmittern (und zum Teil auch kombinatorische Bibliotheken) auf ihre agonistische Funktion an oGPCRs getestet. (2) Die „orphan GPCR-Strategie“ geht von Gewebeextrakten und entsprechenden Reinigungsfraktionen aus und überprüft deren agonistische Eigenschaften an einem oGPCR. Der Vorteil der erstgenannten Methode besteht darin, dass eine nachfolgende Strukturanalyse aufgrund der Kenntnis der Substanz nicht mehr notwendig ist. Bei der oGPCR-Strategie können im Gegensatz zum vorherigen Ansatz auch völlig neue Strukturen identifiziert werden.

Das Design der Read-out-Systeme ist der kritische Faktor im Prozess der Identifikation eines neuen Agonisten. Um die oGPCRs an praktikable Read-out-Systeme (Ca^{++} , cAMP, IP) koppeln zu können, werden die promiskuitiven G-Proteine G_{15} oder G_{16} sowie chimäre G-Proteine eingesetzt (Offermanns and Simon, 1995). Zunehmend kommen auch Systeme, die auf der Internalisierung von GPCRs beruhen, zur Anwendung. Hierzu werden oGPCRs z.B. mit Luciferase C-terminal fusioniert und in Zellen exprimiert, die Green Fluorescence Protein (GFP)-markiertes Arrestin enthalten. Nach Aktivierung mit dem spezifischen Agonisten erfolgt die Arrestin-vermittelte Inaktivierung des oGPCR. Diese Interaktion zwischen Arrestin und dem oGPCR wird dann über „Biolumineszenz-Resonanz-Energie-Transfer“ (BRET) gemessen (Angers et al., 2000).

1.3 Die Gruppe von P2Y₁₂-ähnlichen GPCRs

Die Rhodopsin-ähnlichen Rezeptoren lassen sich in weitere 4 Subfamilien (α , β , γ , δ) unterteilen (Fredriksson et al., 2003). Die δ -Subklasse, enthält die Gruppe von P2Y₁₂-ähnlichen GPCRs. Nahe Verwandte dieser Rezeptorgruppe sind die Leukotrien-Rezeptoren, GPCRs für kurzkettige Fettsäuren und vor allem die schon lange bekannten metabotropen Nukleotid-Rezeptoren. Pyrimidin- und Purinnukleotide modulieren eine Vielzahl von physiologischen Funktionen über zwei grundsätzlich verschiedene Rezeptorfamilien, die P2X- und P2Y-Rezeptoren. P2X-Rezeptoren sind Liganden-gesteuerte Ionenkanäle, während die metabotropen P2Y-Rezeptoren zur Familie der GPCRs gehören. Ursprünglich wurden fünf verschiedene P2Y-Rezeptoren kloniert und funktionell charakterisiert. P2Y₁, P2Y₂ und P2Y₁₁ werden selektiv durch ATP, P2Y₆ durch UTP und P2Y₄ durch ATP und UTP aktiviert (Di Virgilio et al., 2001). Alle diese Rezeptoren zeigen eine hohe Identität auf der Aminosäureebene.

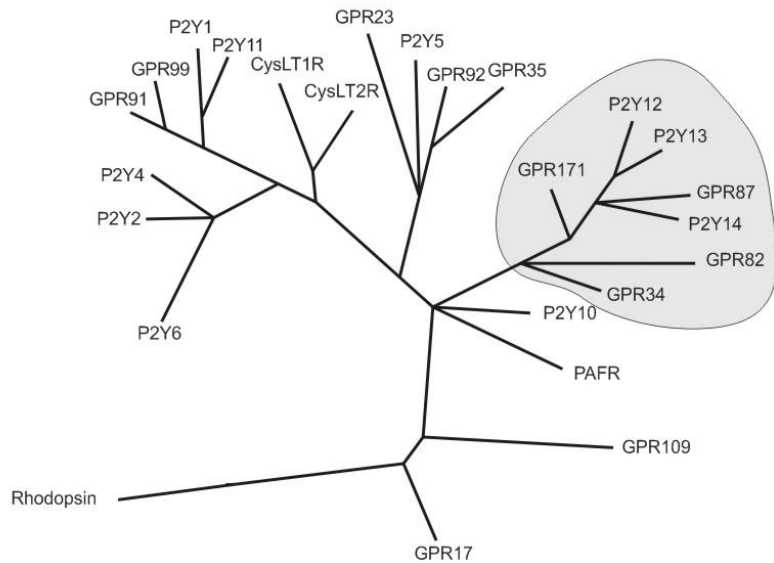


Abb. 1 Phylogenetische Verwandtschaft von P2Y-Rezeptoren.

Aufgrund struktureller Ähnlichkeiten clustern metabotrope Nukleotidrezeptoren (P2Y) in einer Subfamilie Rhodopsin-ähnlicher GPCRs. Innerhalb dieser Gruppe lässt sich weiterhin die Gruppe der P2Y₁₂-ähnlichen GPCRs abgrenzen.

Anfang dieses Jahrhunderts wurden drei strukturell neue P2Y-Rezeptoren identifiziert, deren Agonisten ADP (P2Y₁₂, P2Y₁₃) und UDP-Glucose (P2Y₁₄) sind (Abb. 1). Diese Rezeptoren sind G_i-gekoppelte GPCRs (Chambers et al., 2000; Hollopeter et al., 2001; Zhang et al., 2001; Zhang et al., 2002). Über die physiologische Funktion des UDP-Glucose-Rezeptors (P2Y₁₄) ist bisher nur sehr wenig bekannt. Die ubiquitäre Verteilung von UDP-Glucose und des P2Y₁₄ könnte auf autokrine und parakrine Funktionen in der lokalen Regulation des Energiehaushaltes hindeuten. Demgegenüber ist die physiologische Funktion des thrombozytären ADP-Rezeptors (P2Y₁₂) seit langem bekannt; die molekulare Identifizierung des ADP-Rezeptors gelang jedoch erst kürzlich. Irreversibel bindende Antagonisten (Metabolite von Ticlopidin und Clopidogrel) werden bereits in großem Umfang therapeutisch genutzt. Inaktivierende Mutationen des ADP-Rezeptors haben eine pathophysiologische Bedeutung bei der erblichen Blutungsneigung (Cattaneo et al., 2003; Shiraga et al., 2005).

Zur Gruppe der P2Y₁₂-ähnlichen Rezeptoren gehören die weiteren Vertreter GPR34 (Marchese et al., 1999; Schöneberg et al., 1999), GPR82 (Lee et al., 2001), GPR87 (Wittenberger et al., 2001) and GPR171 (Jacobs et al., 1997) (Abb. 1). Mit Ausnahme des GPR34, zu dem kürzlich das *lyso*-Phosphatidylserin (*lyso*-PS) als Agonist beschrieben wurde (Sugo et al., 2006) und dem GPR87, der wahrscheinlich durch *lyso*-Phosphatidylsäure aktiviert wird (Tabata et al., 2007), sind alle anderen P2Y₁₂-ähnlichen Rezeptoren weiterhin oGPCRs.

Die Gruppe der P2Y₁₂-ähnlichen Rezeptoren lässt sich aufgrund von Sequenzhomologien ihrerseits in zwei Untergruppen einteilen. Eine Untergruppe umfasst die Rezeptoren P2Y₁₂, P2Y₁₃, P2Y₁₄, GPR87 und GPR171; die andere Untergruppe enthält den GPR34, GPR34-like

(nicht in Säugetieren) und GPR82 (Abb. 2). Beide Gruppen clustern an den humanen Gen-Loci 3q24-3q25 (P2Y₁₂, P2Y₁₃, P2Y₁₄, GPR87, GPR171) und Xp11.4 (GPR34, GPR82). Dieses chromosomale Clustern der P2Y₁₂-ähnlichen Rezeptoren ist konserviert und u.a. auch im Zebrafischgenom zu finden. Da Vertreter beider Untergruppen schon in Knochen und Knorpelfischen vorhanden sind, kann davon ausgegangen werden, dass beide Subgruppen durch eine Genduplikation in der frühen Vertebratenevolution vor über 450 Millionen Jahren entstanden sind (Schöneberg et al., 2007).

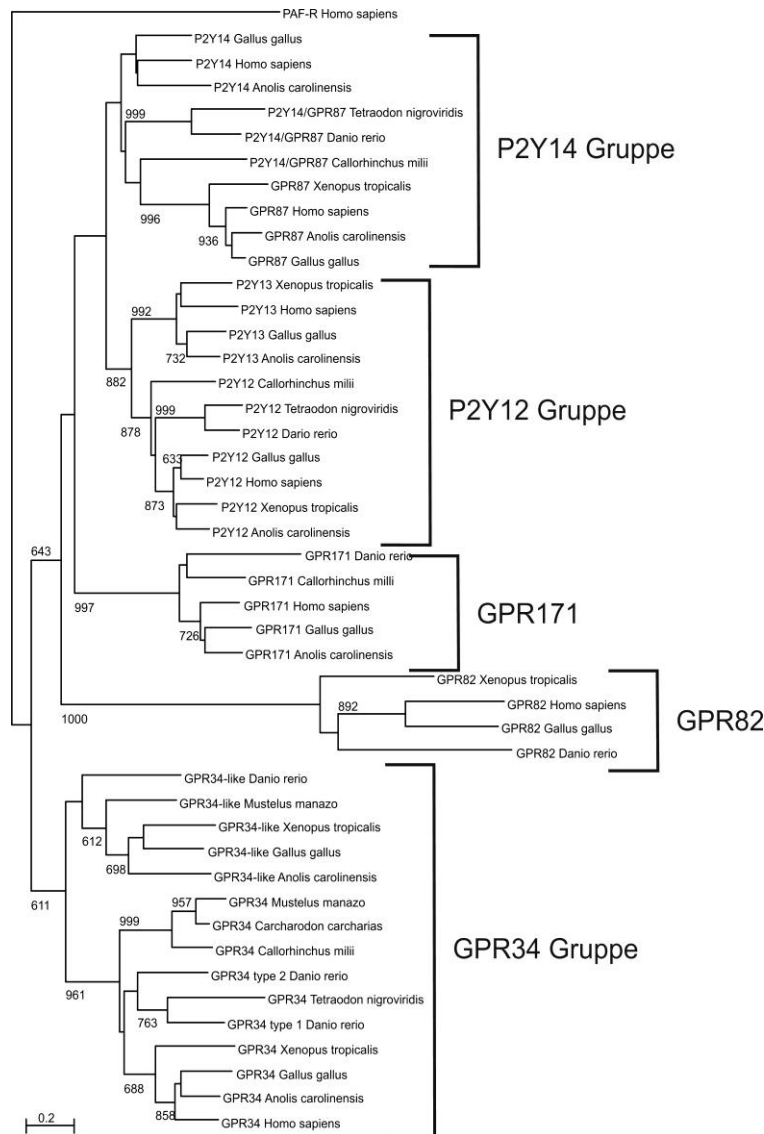


Abb. 2 Phylogenetische Verwandtschaft von P2Y₁₂-ähnlichen Rezeptoren.

Die Gruppe der P2Y₁₂-ähnlichen Rezeptoren umfasst die Rezeptoren P2Y₁₂, P2Y₁₃, P2Y₁₄, GPR87 und GPR171, P2Y₁₂-ähnlichen Rezeptoren (nicht in Säugern) und GPR82. Viele Orthologe finden sich in evolutionär alten Vertebratenklassen wie Knorpel- und Knochenfischen.

1.4 Der P2Y₁₂-ähnliche Rezeptor GPR34

Im Jahre 1999 gelang zwei unabhängigen Gruppen die Isolierung eines unbekanntes Rezeptors (später als GPR34 bezeichnet) aus cDNA-Banken (Marchese et al., 1999; Schöneberg et al.,

1999). Die genomische Lokalisation dieses Gens auf dem X-Chromosom, seine strukturelle Ähnlichkeit zu metabotropen Nukleotidrezeptoren und die Expression im ZNS und kardiovaskulären System machten den GPR34 für Studien mit dem Ziel der Aufklärung seiner physiologischen Relevanz besonders interessant.

1.4.1 Genomische Struktur des GPR34-Gens

Das Gen des humanen GPR34 ist auf dem X-Chromosom am Locus Xp11.4 zu finden (Schöneberg et al., 1999). Interessanterweise befinden sich die Gene für den GPR34 und GPR82 evolutionär konserviert im Intron einer Calcium/Calmodulin-abhängigen Serine-Proteinkinase (CASK) und sind in diesem Intron in antisense-Richtung orientiert. Die kodierende Region des GPR34-Gens ist intronlos, jedoch zeigt die nicht-kodierende 5'-Region eine recht komplexe Exon-Intron-Struktur. Mit Hilfe der 5'-RACE-Technik konnten die Transkriptionsstartpunkte im GPR34-Gen von Mensch, Maus und Ratte bestimmt werden (Engemaier et al., 2006). Hierbei wurde in allen drei Spezies die gleiche Exon-Intron-Struktur im 5'-Bereich der kodierenden Region des GPR34 gefunden. Auch im Schwein war diese Exon-Intron-Struktur erhalten, allerdings lagen hier die nicht-kodierenden Exons nicht soweit vom kodierenden Exon entfernt. Neben verschiedenen Splicevarianten konnte beim Menschen ein kryptisches Intron im kodierenden Bereich detektiert werden, welches zu einer Verkürzung des N-Terminus im entsprechenden Rezeptorprotein führt. In den bisher untersuchten Nagerspezies wurden ein zweiter Transkriptionsstart und damit ein zweiter möglicher Promotor detektiert, der nicht beim Menschen nachweisbar war (Engemaier et al., 2006).

Wenngleich für einige Proteine, u.a. auch GPCRs, als posttranskriptionelle Modifikation RNA-Editing nachgewiesen worden ist (Niswender et al., 1999; Seeburg and Hartner, 2003), zeigten Sequenzuntersuchungen von genomischer DNA und von GPR34-Transkripten keinen Hinweis auf ein entsprechendes RNA-Editing bei humanen und murinen GPR34-Transkripten (Engemaier et al., 2006).

1.4.2 Genomische und strukturelle Evolution des GPR34

Phylogenetische Studien an einem GPCR helfen Fragen zum evolutionären Ursprung des Rezeptors, dessen biologischer Relevanz und der Konservierung strukturell wichtiger Elemente auch ohne die Kenntnis des Agonisten zu adressieren. Somit sind Aussagen über funktionsrelevante Strukturen wie konservierte Motive, die erforderliche Länge der Schleifen,

des N- und C-Terminus, und die Konservierung von Glycosylierungs- und Phosphorylierungsstellen möglich. Bisher sind Kristallstrukturen nur für wenige GPCRs gelöst worden (Cherezov et al., 2007; Palczewski et al., 2000; Rasmussen et al., 2007). Die Kenntnis hoch konservierter und variabler Bereiche eines spezifischen GPCR auf der Basis von Sequenzdaten möglichst vieler verschiedener Spezies kann sowohl gezielte Mutagenesestrategien als auch das Modellierung dieses GPCR auf der Basis der verfügbaren GPCR-Kristallstrukturen (Kobilka and Schertler, 2008) vorantreiben.

In einer vorhergehenden Studie wurden mehr als 100 GPR34-Orthologe aus allen acht Wirbeltierklassen einschließlich der Knochen- und Knorpelfischen amplifiziert und sequenziert (Schulz and Schöneberg, 2003). Bis auf die evolutionär alten Vertebratenspezies wie beispielsweise die Agnatha, zu denen das Neunauge (*Petromyzontida*) und der Schleimaal (*Myxini*) als letzte lebende Exemplare gehören, wiesen alle bisher untersuchten Wirbeltiere ein intaktes GPR34-Gen auf. Wahrscheinlich ist in diesen frühen Formen die GPR34-Funktion (noch) nicht notwendig. Diese Befunde und das Fehlen GPR34-ähnlicher Sequenzen in Genomen der bisher sequenzierten Invertebraten legen nahe, dass der GPR34 seit ca. 450 Millionen Jahren, d.h. seit der frühen Wirbeltierentstehung existieren könnte. Diese phylogenetische Analyse zeigte, dass in allen Tetrapoden-Sequenzen der GPR34 als „Einzelkopie Gen“ ohne weitere Subtypen vorkommt. Eine Ausnahme bilden Knochenfische; hier fand man bis zu drei verschiedene Subtypen (z.B. in Karpfen und Lachsen). Die Untersuchung unterschiedlicher Fisch-Spezies zeigte, dass die Subtypentstehung schon zu einem sehr frühen Zeitpunkt in den Knochenfischen stattfand. Diese Hypothese wird gestützt durch die Existenz von GPR34-Subtypen in evolutionär alten Knochenfischen wie z.B. verschiedenen Aalen (Engemaier, Schulz, Schöneberg, unveröffentlichte Daten). Neben der Identifizierung von Subtypen amplifizierte man auch Sequenzen, die sowohl Sequenzmerkmale des GPR34 als auch Merkmale des nächstverwandten Rezeptors P2Y₁₂ aufwiesen. Diese Rezeptorgruppe wird als „GPR34-like Rezeptoren“ bezeichnet und nimmt evolutionär eine Zwischenstellung zwischen GPR34 und P2Y₁₂ ein (siehe Abb. 2). Vertreter der GPR34-like Gruppe konnten auch schon in Knorpelfischen identifiziert werden. Das Vorhandensein dieser GPR34-ähnlichen Rezeptoren konnte bis zu den Vögeln, z.B. im Huhn (*Gallus gallus*) verfolgt werden. Mit der Säugetierentstehung scheint dieser Rezeptor pseudogenisiert worden zu sein, so dass man im Schnabeltier (*Ornithorhynchus*) nur noch Reste der GPR34-like Sequenz identifizieren kann. In allen anderen Säugetierordnungen, inklusive den

Beutelsäugern, sind Sequenzreste des GPR34-like-Rezeptors nicht mehr auffindbar (Engemaier, Schulz, Schöneberg, unveröffentlichte Daten).

Ein weiterer interessanter Befund bei Fischen war die Detektion eines Introns im kodierenden Bereich des GPR34 (Schulz and Schöneberg, 2003). Bei höheren Wirbeltieren besitzt der GPR34 einen intronlosen, offenen Leserahmen. Neben der Entstehung von Subtypen z.B. durch Genomduplikation, wie sie für Fische beschrieben ist, kam es auch zur Insertion eines Introns. Da intronhaltige Subtypensequenzen nicht in Knorpelfischen und älteren Fischarten (Karpfen, Zebrafisch) detektiert werden konnten, diese Arten aber Subtypen besitzen, scheint eine Intronentstehung erst nach der Genomduplikation stattgefunden zu haben. Da die Introngröße und Position zwischen den Fischarten wenig variiert und sehr ähnliche Splice-site-Sequenzen gefunden wurden, spricht dies für einen gemeinsamen Ursprung dieses Introns (Schulz and Schöneberg, 2003).

Die Aminosäuresequenzinformation von über 100 Orthologen ermöglichte es, strukturelle Parameter der GPR34-Rezeptorgruppe herauszuarbeiten, die für die Architektur des Rezeptors, dessen Agonistbindung und die Signaltransduktion von Bedeutung sein können. So ergab beispielweise die Hydrophobizitätsanalyse des GPR34 im Vergleich zu Rhodopsin nur geringe Unterschiede in den Transmembranregionen. Der Vergleich der Konservierung aller Positionen in den Transmembranregionen stimmte größtenteils mit Rhodopsin überein. Kleinere Differenzen in der Feinstruktur (z.B. das Fehlen eines Prolins in Transmembranregion 5) des GPR34 geben Hinweise auf mögliche Unterschiede zum Rhodopsin z.B. in der Relativorientierung von Helices zueinander (Schulz and Schöneberg, 2003).

Der offene Leserahmen eines Gens wird nach gängiger Lehrmeinung mit dem längsten translatierbaren Polypeptid gleichgesetzt, d.h. das erste AUG im Leserahmen determiniert den Translationsstart (Kozak, 2002). Einige wenige Arbeiten stellen dieses Grundprinzip in Frage und gehen von mehreren Translationsstartpunkten aus (Engemaier et al., 2006). Die Analyse der phylogenetischen Daten ergab ebenfalls Hinweise auf alternative Translationsstartpunkte im GPR34. So zeigten dann auch quantitative Analysen, dass das zweite AUG im humanen GPR34-Transkript bei der Translation bevorzugt wird (Engemaier et al., 2006).

Die Auswertung des umfangreichen Datensets von Orthologsequenzen hat neben der Aussage zu konservierten und variablen Rezeptorbereichen für den GPR34 auch zur Entdeckung interessanter Sequenzmotive geführt (Schulz and Schöneberg, 2003). Durch Sequenzalignments aller kompletten Rezeptoren konnte im Rezeptor-C-Terminus ein konserviertes putatives

Phosphorylierungsmotiv identifiziert werden. Dieses Motiv bildet die Erkennungssequenz für eine Serin/Threonin-Kinase. Die Validierung der Phosphorylierung dieses Motivs und dessen Einfluss auf die Rezeptorfunktion sowie die Identifizierung der entsprechenden Kinase stehen derzeit noch aus.

1.4.3 Gewebeexpression des GPR34

Initiale Untersuchungen zur Expression des GPR34 in humanen und murinen Geweben ergaben ein ubiquitäres Verteilungsmuster in allen untersuchten Geweben, einschließlich peripherer Leukozyten (Schöneberg et al., 1999). Dies konnte durch weitere Untersuchungen, einschließlich Northern Blot- und Dot-Blot-Analysen, und mit Hilfe von PCRs in humanen und murinen cDNA-Panels (Clontech) bestätigt werden (Engemaier et al., 2006). Um neben der qualitativen Aussage der ubiquitären Expression auch eine Aussage über die Quantität der Expression zu erhalten, wurden verschiedene Gewebe von Maus, Ratte und Huhn mittels quantitativer RT-PCR analysiert. Hier zeigte sich, dass der GPR34 stark neuronal und in lymphatischen Geweben exprimiert wird, aber auch im Herzen in relevanten Expressionsspiegeln vorkommt. Zusätzlich wurde der GPR34 auch in allen anderen untersuchten Geweben nachgewiesen. Ein solches Expressionsmuster ist in der Regel bei „house-keeping“-Proteinen oder bei einer Expression im Gefäßsystem und in Blutzellen zu beobachten. Eine nähere Analyse verschiedener Zelllinien zeigte eine Expression in den prämyeloischen Zelllinien HL-60, K562-Zellen, WEHI-Zellen und den makrophagozytären RAW264.1-Zellen (Engemaier et al., 2006). Die Inkubation von HL-60-Zellen mit Retinolsäure (Induktion der Differenzierung zu Granulozyten) führte zu einer deutlichen Zunahme der GPR34-mRNA-Menge. Unter diesem Ergebnis könnte das oben erwähnte ubiquitäre Verteilungsmuster auch als granulozytäre/monozytäre „Kontamination“ der mRNA in humanen und murinen Geweben interpretiert werden. Unterstützt wird die potentiell funktionelle Relevanz in Zellen des monozytären Systems durch den Befund, dass der GPR34 in Mikroglia und Astrozyten hoch exprimiert wird (Schulz, Schöneberg, nicht-publizierte Daten). Die Aktivierung von Mikroglia mittels des Neurotoxins Cuprizin führte zu einem Anstieg von GPR34-mRNA (Bedard et al., 2007).

Der Nachweis von zwei Transkriptionsstartpunkten in Maus und Ratte und damit von zwei möglichen Promotoren, warf die Frage auf, ob gewebespezifische Unterschiede zwischen beiden Promotoren vorliegen. Eine umfassende Analyse verschiedener Gewebe von Ratte und Maus

ergab das Vorhandensein beider Transkripte, jedoch in unterschiedlicher Quantität (Engemaier et al., 2006).

Die ubiquitäre Expression des GPR34 legt eine konstitutive oder Zelltyp-unabhängige Promotorfunktion nahe. Die bioinformatische Analyse der putativen Promotorsequenz ergab weder substantielle Hinweise auf Bindungsstellen für ubiquitär aktive noch gewebs- und funktionsspezifische Transkriptionsfaktoren. Um die Promotoraktivität genauer zu untersuchen, wurden verschiedene Bereiche 5' vom Transkriptionsstart in entsprechende Vektoren kloniert und Luciferase als Reportergen für die Transkription genutzt. Trotz Identifizierung des Transkriptionsstarts und der Untersuchung der Promotoraktivität in verschiedenen Vektoren und Zelllinien (COS-7, RAW264.1) konnte keine eindeutige Promotoraktivität der untersuchten Regionen nachgewiesen werden (Engemaier et al., 2006).

1.4.4 Bekannte Funktionen des GPR34

Die Identifizierung des natürlichen Agonisten und seiner Signaltransduktion ist eine wesentliche Voraussetzung für die Klärung der physiologischen Funktion des GPR34. In initialen Untersuchungen konnte der humane GPR34 als glykosyliertes Protein in der Plasmamembran nachgewiesen werden. Durch Überexpression dieses Rezeptors sowie durch Coexpression mittels chimärer G-Proteine (siehe 1.2) konnte eine erhöhte Basalaktivität im G_i -Signaltransduktionsweg festgestellt werden. Diese Eigenschaft besitzen auch GPR34-Orthologe (z.B. aus Fischen) und der nahe verwandte P2Y₁₂. Daher scheint es sich hierbei um eine evolutionär konservierte Signaltransduktionseigenschaft zu handeln.

Alle Versuche der gerichteten Deorphanisierung mit Substanzbibliotheken (Nukleotide, Phospholipide, Leukotriene, Hydroxyeicosatetraensäuren und Peptide) waren zunächst erfolglos (Schöneberg et al., 1999; Schulz and Schöneberg, 2003). Im April 2006 wurde von Mori et al. *lyso*-PS als natürlicher Agonist für den GPR34 publiziert (Sugo et al., 2006). Sie konnten an stabil-transfizierten CHO-Zellen durch Palmityl-*lyso*-PS (*P-lyso*-PS) eine konzentrationsabhängige Aktivierung des GPR34 zeigen. Wie zuvor schon gezeigt, signalisierte der GPR34 nach Aktivierung durch *P-lyso*-PS über G_i -Proteine. Es ist seit langem bekannt, dass *lyso*-PS peritoneale Mastzellen aktiviert und z.B. eine Histaminfreisetzung induziert (Bellini et al., 1990). Das für die Aktivierung des GPR34 identifizierte *P-lyso*-PS besaß ebenfalls diese Eigenschaften an Mastzellen (Sugo et al., 2006). Auch wurde in verschiedenen Publikationen *lyso*-PS als Agonist für einen Pertussistoxin (PTX)-sensitiven GPCR und als chemotaktische

Substanz für Fibroblasten und Tumorzellen beschrieben (Lee et al., 2008; Park et al., 2005; Park et al., 2006). *Lyso*-PS wird durch die Phospholipasen A1 und A2 aus Membranlipiden gebildet und z.B. bei der Zerstörung von Zellen freigesetzt (Aoki et al., 2002). Die entstehenden *lyso*-PS haben in Abhängigkeit von der Phospholipase eine unterschiedliche Struktur und funktionelle Relevanz (Abb. 3).

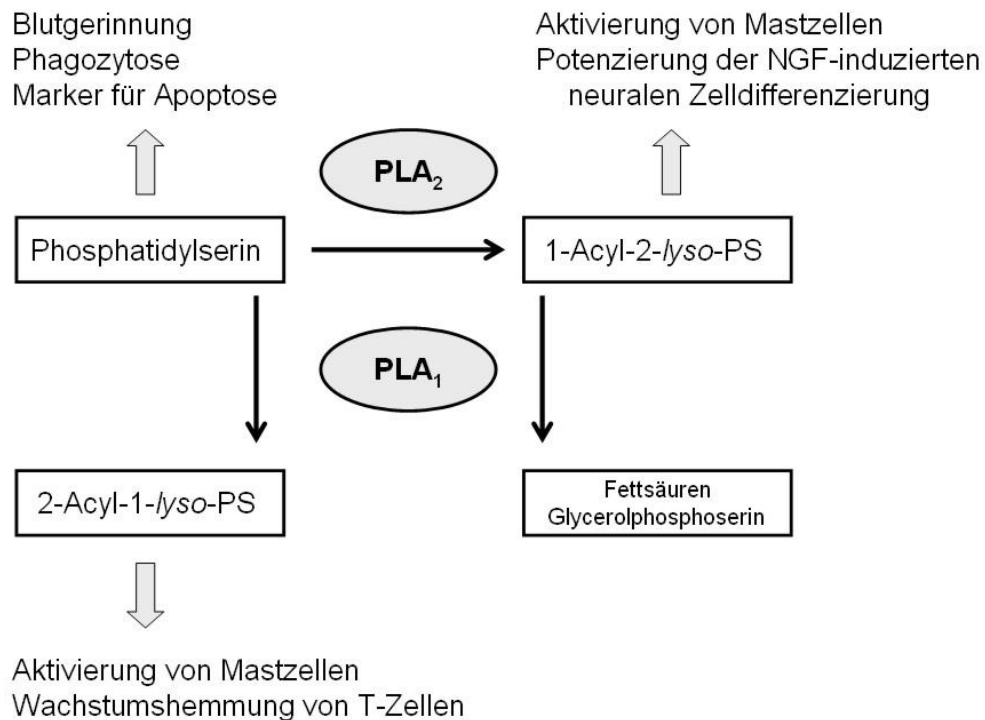


Abb. 3 Metabolismus und Funktion von Serinphospholipiden.

Phosphatidylserin (PS) wird durch die Phospholipase A1 (PLA₁) zu 2-Acyl-1-*lyso*-PS und durch die Phospholipase A2 zu 1-Acyl-2-*lyso*-PS umgesetzt. Für einige dieser PS sind biologische Funktionen beschrieben. Abbildung nach (Aoki et al., 2002).

Es wäre daher denkbar, dass der GPR34 bei der chemotaktischen Rekrutierung von Makrophagen, Granulozyten und Mikroglia in z.B. Ischämiegebiete eine entscheidende Rolle spielt. Das Fehlen von Antagonisten für den GPR34 sowie eines GPR34-defizienten Mausmodells belassen die Funktion des *lyso*-PS jedoch auf einer hypothetischen Ebene.

2 Ziele und Fragestellungen

Ziel dieser Arbeit war es, mittels verschiedener *in-vitro*- als auch *in vivo*- Methoden und anhand eines GPR34-defizienten Mausstamms die physiologische Relevanz dieses P2Y₁₂-ähnlichen Rezeptors zu klären. Die Aufgabenstellung zu dieser Studie wurde in nachfolgende Teilprojekte untergliedert:

- 1) Verifizierung des *lyso*-Phosphatidylserins als endogener Agonist des GPR34
- 2) Histologische, laborchemische und verhaltensphysiologische Grundcharakterisierung des GPR34-defizienten Mausstamms im Vergleich zu Wildtyp-Mäusen
- 3) Untersuchung GPR34-defizienter Mäuse in immunologischen „Challenge“-Modellen
- 4) Vergleichende Genexpressionsarray-Untersuchungen zur kardialen Relevanz des GPR34

3 Materialien und Methoden

3.1 Chemikalien, Materialien, Plasmide, Primer

Wenn nicht anders angegeben, wurden alle Standardchemikalien von Sigma Aldrich (Taufkirchen, Deutschland), Merck (Darmstadt, Deutschland) oder C. Roth GmbH (Karlsruhe, Deutschland) erworben. Labor und Zellkulturplastikmaterialien wurde von Sarstedt (Nümbrecht, Deutschland) und Primer von Invitrogen (Karlsruhe, Deutschland) bezogen. Die Sequenzen der verwendeten Primer und die Karten der verwendeten Plasmide sind im Anhang zusammengestellt (suppl. Tab. S1–S2 bzw. suppl. Abb. S1-S2). Für die Expression von Rezeptoren in Hefe wurde das Plasmid p416GPD (Mumberg et al., 1995), für die Expression in Säugerzellen das Plasmid pcDps (Okayama and Berg, 1983) verwendet. Die im Rahmen dieser Arbeit verwendeten Enzyme, sowie DNA-Größenstandards wurden von New England Biolabs GmbH (Frankfurt am Main, Deutschland) bezogen.

3.2 Molekularbiologische Standardmethoden

Die molekularbiologischen Standardmethoden wurden im Rahmen dieser Arbeit entsprechend den nachfolgenden Protokollen durchgeführt (Tab. 1) und sind nicht weiter im Detail erklärt.

Tab. 1 Liste der verwendeten molekularbiologischen Standardmethoden

Methode	Protokoll	Firma / System
Nukleinsäurekonzentrationsbestimmung	(Sambrook and Maniatis, 1989)	Spektrophotometer, NanoDrop ND100, PeqLab (Erlangen)
Agarosegelelektrophorese	(Sambrook and Maniatis, 1989)	Horizontalgelelektrophorese-Systeme, PeqLab (Nürnberg)
Präparation von DNA	(Sambrook and Maniatis, 1989)	Phenol-Chloroform-Extraktion und anschließende DNA-Fällung
Restriktionsverdau	nach Angaben des Herstellers	NEB (Ipswich, USA)
Gelextraktion	nach Angaben des Herstellers	Qiaquick® Gelextraction Kit , Qiagen (Hilden)
Polymerasekettenreaktion	(Sambrook and Maniatis, 1989)	Detaillierte Informationen in den entsprechenden Kapiteln
Sequenzierung	(Sanger et al., 1977)	Big-Dye® Terminator Cycle Sequencing Kit, Sequenziergerät ABI 3730, Applied Biosystems

3.3 Verwendete Mikroorganismen und Zellen

- *E. coli* DH5 α (Invitrogen)

Genotyp: F⁻, ϕ 80 *dlac* Z Δ M15, Δ (*lacZYA-argF*) U169, *deoR*, *recA1*, *endA1*, *hsdR17*(rk-, mk+), *phoA*, *supE44*, λ^- , *thi-1*, *gyrA96*, *relA1*

- *S. cerevisiae* MPY578t5 (Dr. Mark Pausch, Wyeth Research, Princeton, USA)

Genotyp: MATa *gpa1::Gai5* *far1::LYS2* *fus1::FUS1-HIS3* *sst2::SST2-G418^r* *ste2::LEU2* *fus2::FUS2-CAN1* *ura3* *lys2* *ade2* *his3* *leu2* *trp1* *can1*

- *C. neoformans* Stamm 1841 Serotyp D (Prof. Dr. Gottfried Alber, Veterinärmedizin, Universität Leipzig)

- COS-7-Zellen (ATCC, African green monkey, kidney)

ECACC 87021302, Fibroblast, CV1 Origin SV40 transformed

3.4 Funktionelle in vitro-Charakterisierung des GPR34

3.4.1 Herstellung und Reinigung von Lyso-PS

1-Palmityl-lyso-Phosphatidylserin (P-lyso-PS) wurde als Agonist für den human GPR34 beschrieben (Sugo et al., 2006). Diese Substanz konnte jedoch nicht mehr kommerziell bezogen werden und wurde deshalb in der eigenen Abteilung durch Dr. J. Kirchberger auf der Grundlage eines Protokolls der Abteilung von Prof. H. Fuhrmann (Veterinärmedizin, Universität Leipzig) hergestellt. Hierbei wird 1,2-Dipalmitoyl-sn-glycero-3-phospho-L-serin in Anwesenheit von Phospholipase A2 in 1-Palmitoyl-sn-glycero-3-phospho-L-serin (P-lyso-PS) umgesetzt. Die Trennung und Reinigung des P-lyso-PS vom Substrat erfolgte mittels Extraktion und Dünnschichtchromatografie.

Für den Reaktionsansatz wurden folgende Reagenzien in einem 100 ml Erlenmeyerkolben zusammengefügt:

- 25 mg 1,2-Dipalmitoyl-sn-glycero-3-phospho-L-serin-Na (i)
- 250 μ l Phospholipase A2 (Schweine Pankreas, Sigma, 10.000 U/ml)
- 250 μ l Tris pH 7,4; 1 M
- 500 μ l Natriumcholat 3,5 % (in Aqua dest.)
- 625 μ l Aqua bidest.

Das Reaktionsgemisch wurde für 3 h bei 37 °C inkubiert und 31,25 ml CH₃OH, 12,5 ml CH₃OH, 31,25 ml CHCl₃, 21,9 ml 0,1 M KCl-Lsg. nacheinander zugeben. Nach 10 min Stehen auf Eis

bildeten sich zwei Phasen und nach zweiminütiger Erwärmung im Wasserbad auf 60 °C wurde die obere Phase abgenommen und mit 4500 rpm für 20 min. bei 4°C zentrifugiert. Die obere Phase wurde wiederum abgetrennt, mit N₂ getrocknet und dann 3 h bei 1 mbar lyophilisiert.

Die Trennung und Reinigung des *P-lyso*-PS vom Substrat erfolgte mittels Dünnschichtchromatografie auf PSC-Platten (10x10 cm, Kieselgel 60F254; 0,5 mm, Merck) mit einem Laufmittelgemisch aus CHCl₃/CH₃OH/NH₃ (50 ml/50 ml/8 ml). Die getrennten Substanzen wurden mit einer Lösung von 200 mg Bromthymolblau und 400 mg KOH in 1000 ml Aqua dest. sichtbar gemacht. Nach Trocknung wurde die *P-lyso*-PS-Fraktion ausgekratzt und aus dem Kieselgel mit einem Gemisch CHCl₃/CH₃OH (1/1) eluiert. Die Eluate wurden im N₂-Strom getrocknet. Die Qualitätskontrolle der Präparationen erfolgte wiederum durch Dünnschichtchromatografie auf HPTLC-Platten (5x5 cm, Kieselgel 60, Merck) anhand mitgeführter Referenzsubstanzen.

3.4.2 Expression und Funktionsanalyse von GPR34-Orthologen in Säugerzellen

Zellkultur und Transfektion

Die funktionelle Analyse von Substanzen und GPR34-Orthologen erfolgte heterolog in Säugerzellen. Dazu wurden *COS-7*-Zellen (*CV1 Origin SV40*) verwendet. Diese Zellen sind adhärenente Nierenfibroblastenzellen der Grünen Meerkatze (*Cercopithecus aethiops*). *COS-7*-Zellen wurden von der CV-1 Zelllinie durch Transformation mit einer replikationsdefizienten Simian-Virus 40 (SV40)-Mutante abgeleitet, welche das Wildtyp T-Antigen trägt. Das T-Antigen wird stabil in *COS-7*-Zellen exprimiert. Dies führt nach Transfektion mit dem eukaryotischen Expressionsplasmid pcDps (Okayama and Berg, 1983), welches den SV40-Promotor trägt, zur Überexpression der 3' davon liegenden cDNA.

COS-7-Zellen wurden in DMEM mit 10 % FBS und einem Streptomycin/Penicillin-Zusatz (100 units/ml Penicillin, 100 µg/ml Streptomycin) bei 7 % CO₂ und 37 °C kultiviert. Vor dem Passagieren wurden die Zellen mit PBS gewaschen, anschließend mit Trypsin/EDTA-Lösung versetzt und 5 min. bei 37 °C inkubiert. Die abgelösten Zellen wurden in DMEM aufgenommen und in der entsprechenden Verdünnung ausgesetzt. Die Zellzahl wurde mit einer Neubauer-Zählkammer bestimmt.

Ein Tag vor der Transfektion wurden 3x10⁶ Zellen in 75 cm²-Zellkulturflaschen, 1x10⁶ Zellen in 6-cm-Schalen bzw. 4-5x10⁵ Zellen in 48-well-Platten ausgesetzt. Eine Stunde vor der

Transfektion wurde das Medium abgesaugt und stattdessen das jeweilige Serum- und Antibiotika-freie Medium zu den Zellen gegeben. Die transiente Transfektion der Zellen wurde mittels Lipofectamine™ 2000 (Invitrogen) und der jeweiligen Plasmid-DNA nach Herstellerprotokoll durchgeführt. Nach 5 Stunden erfolgte der Wechsel zu Vollmedium. Zur Kontrolle der Transfektionseffizienz wurde mit einem GFP-Expressionsplasmid transfiziert und die Expression des GFP 24 h nach der Transfektion mit Hilfe eines Fluoreszenzmikroskops untersucht. Achtundvierzig Stunden nach Transfektion wurden die Akkumulationsassay durchgeführt.

Inositolphosphat (IP)-Akkumulationsassay

Die Aktivierung von GPCRs, die an die G-Proteine G_q und G_i gekoppelt sind, führt zu einer Stimulation der Phospholipase C und damit zu einer Bildung von Diacylglycerol und Inositol-1,4,5-triphosphat aus Membranlipiden. Werden Zellen mit ^3H -markiertem *myo*-Inositol vorinkubiert, wird dieses in Form von Inositolphospholipiden in die Plasmamembran eingebaut. Nach Aktivierung des Rezeptors erfolgt die Bildung von ^3H -markiertem Inositoltriphosphat (IP_3). Die Blockade IP_3 -metabolisierender Enzyme (IMPasen) durch Lithiumionen führt zu einer, der Rezeptoraktivierung proportionalen, Akkumulation der gebildeten IPs. Nach Zelllyse erfolgt die Messung der IPs durch sequentielle Ionenaustauschchromatographie. Im basischen Milieu binden IPs an die Ionenaustauschermatrix und werden durch schrittweise Erhöhung der Ionenstärke und Verminderung des pH-Wertes der Elutionsmittel fraktioniert von der Matrix eluiert und können aufgrund ihrer radioaktiven Markierung scintillatorisch quantifiziert werden (Berridge, 1983).

Für die Assaydurchführung wurden die Zellen 24 h nach Transfektion mit $2 \mu\text{Ci/ml}$ *myo*- ^3H -Inositol über Nacht inkubiert. Am folgenden Tag wurden die Zellen mit 1 ml serumfreien DMEM mit 1 mM LiCl gewaschen. Die Stimulation der Zellen erfolgte mit unterschiedlichen Konzentrationen der zu testenden Substanz. Nach einer Stunde wurden die Zellen nach Absaugen des Stimulationsmediums und Zugabe von $300 \mu\text{l}$ 0,1 M NaOH lysiert. Die Proben wurden mit $100 \mu\text{l}$ 0,2 M Formsäure und 2 ml Verdünnungspuffer versetzt und das Zelldebris entfernt.

Für die IP-Trennung an Dowexsäulen (AG 1-X8, 2 g / Säule, Säulendurchmesser 8 mm) wurden diese zunächst regeneriert und dann die IPs fraktioniert eluiert. Das ausführliche Protokoll und die Pufferzusammensetzungen sind der Publikation von (Berridge, 1983) entnommen. Die Eluate wurden in Scintillatorgefäßen aufgefangen und mit 15 ml LumaSafe Plus versetzt. Die Quantifizierung der Radioaktivität erfolgte in einem β -Counter (Beckmann).

3.4.3 Expression und Funktionsanalyse von GPR34-Orthologen in Hefen

Prinzip

Für die Regulation von Pheromon- und Glucosestoffwechselweg exprimieren viele Hefespezies natürlicherweise GPCRs. Das Grundprinzip der GPCR-Aktivierung ist ähnlich wie bei Säugerzellen. Vorteilhaft ist jedoch, dass sich Hefezellen im Gegensatz zu Säugerzellen leicht genetisch modifizieren lassen. Dadurch können die vorhandenen GPCRs der Hefe durch Säuger-GPCRs ersetzt werden (Ladds et al., 2005). Durch die Verwendung eines LacZ- oder HIS3-Reportergens sind die Screening-Assays wenig störanfällig und auch im Hochdurchsatzverfahren gut durchführbar (Pausch, 1997).

Für die funktionellen Untersuchungen wurde ein *Saccharomyces cerevisiae*-Stamm verwendet, der keine endogenen GPCRs mehr besitzt (Abb. 4). An der α -Untereinheit des G-Proteins wurden C-terminal die letzten fünf Aminosäuren mit denen des humanen $G_{\alpha i}$ -Proteins ausgetauscht, wodurch eine Interaktion mit G_i -Protein-gekoppelten Rezeptoren ermöglicht wird. Weiterhin wurde der Signalweg so modifiziert, dass die Rezeptoraktivierung letztendlich zu einer Histidinproduktion führt (Pausch, 1997). Aktiviert der Agonist seinen Rezeptor, führt dies zur Produktion von Histidin und Wachstum der Hefen in Histidin-freiem Medium. Das Wachstum lässt sich durch Bestimmung der Zelldichte photometrisch bei 600 nm quantifizieren.

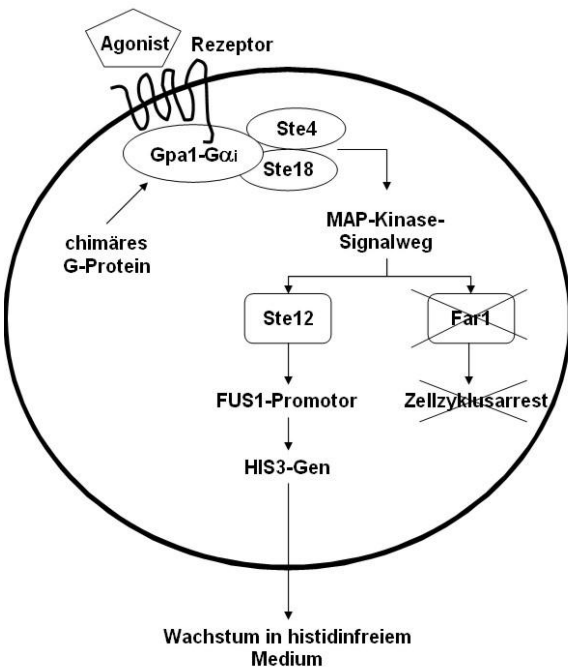


Abb. 4 Heterologe Expression von GPCR in einem genetisch modifizierten Hefesystem

Hefezellen werden mit einem GPCR transformiert. Durch Rezeptoraktivierung wird ein chimäres G-Protein, das C-terminal fünf Aminosäuren des humanen $G_{\alpha i}$ -Proteins enthält, aktiviert. Durch genetische Manipulation führt die Aktivierung des MAP-Kinase-Signalwegs zu einer Histidinproduktion, wodurch die Hefezellen auch in histidinfreiem Medium wachsen können. Gpa1: G-Protein α -Untereinheit, Ste4: G-Protein β -Untereinheit, Ste18: G-Protein γ -Untereinheit, Ste12: Transkriptionsfaktor, Far1: Regulator des Zellzyklus

Herstellung der GPR34-Expressionsplasmide

Zur Herstellung von GPR34-Plasmiden für die Expression in *S. cerevisiae* wurden cDNAs verschiedener GPR34-Orthologe (Karpfen, Zebrafisch, Maus, Mensch) durch PCR aus vorhandenen Vektoren (Schulz and Schöneberg, 2003) bzw. aus genomischer DNA amplifiziert. Die entsprechenden Primer trugen spezifische Schnittstellen, die eine Klonierung in den mit entsprechenden Restriktionsendonukleasen (*Xba*I, *Spe*I) geöffneten Hefe-Expressionsvector p416GPD (von Dr. M. Pausch zur Verfügung gestellt) erlaubte. Die Authentizität aller Konstrukte wurde durch Restriktionsanalyse und Sequenzierung sichergestellt.

Transformation der GPR34-Plasmide und Hefekultivierung

Der haploide *S. cerevisiae* Hefestamm MPY578t5 (freundlicherweise von Dr. M. Pausch zur Verfügung gestellt) wurde für die Expression von GPR34-Orthologen benutzt. Die Hefezellen wurden durch Elektroporation mit Plasmid-DNA transformiert. Dazu wurde eine Übernacht-Kultur in YPAD-Medium auf eine $OD_{600\text{ nm}}$ von 0,2 in 50 ml YPAD verdünnt. Diese Kultur wurde bei 30 °C inkubiert bis diese eine $OD_{600\text{ nm}}$ von 1,2-1,5 erreicht hatte. Die Zellen wurden durch Zentrifugation (4.000 rpm, 5 min, 4 °C) geerntet, zunächst einmal mit 50 ml, dann mit 25 ml eiskaltem Aqua dest. und nochmals mit 2 ml eiskalter Sorbitollösung gewaschen. Das verbliebene Pellet wurde im selben Volumen Sorbitollösung aufgenommen. Die Transformation der Hefezellen, gemischt mit der Plasmid-DNA erfolgte durch Elektroporation.

Für die Selektion von Transformanten wurden die Zellen auf Agar-Platen mit U-Medium (Uracil-defizient) ausgebracht. Nach 3-4 Tagen Inkubation bei 30 °C konnten individuelle Klone in 96-well Platten transferiert und das agonist- und konzentrationsabhängige Wachstum untersucht werden. Dazu wurden 100 µl einer doppelt-konzentrierten Substanzlösung in jede Kavität pipettiert. Die Hefezellen wurden auf eine $OD_{600\text{ nm}}$ von 0,2 verdünnt mit U/H-Medium und 100 µl der Zellsuspension in jede Kavität gegeben, so dass die Endkonzentration eine $OD_{600\text{ nm}}$ von 0,1 betrug. Das basale Wachstum der Hefen wurde durch die Zugabe von 20 mM 3-Amino-1,2,4-triazol unterdrückt. Aus den in einem Mikrotiterplatten-Reader (Sunrise™-Absorbance Microplate-Reader, Firma Tecan) gemessenen OD-Werten wurden die Wachstumskurven erstellt und mit Hilfe der Software GraphPad Prism 4 (GraphPad Software Inc.) die EC_{50} Werte berechnet.

Medien für Hefezellkultur

- YPD-Agar
- 20 g Trypton
 - 20 g Agar-Agar
 - 10 g Hefeextrakt
 - ad 950 ml H₂O, autoklavieren
 - 50 ml 40 % Glucoselösung (steril)
- UH-Medium (10x)
- 2 g L-Threonin
 - 1,5 g L-Valin
 - 1 g L-Leucin
 - 500 mg L-Phenylalanin
 - 300 mg L-Isoleucin
 - 300 mg L-Lysin
 - 300 mg L-Tyrosin
 - 200 mg L-Adenin Hemisulfat
 - 200 mg L-Arginin HCl
 - 200 mg L-Methionin
 - 200 mg L-Tryptophan
 - ad 1 l H₂O, autoklavieren
- UH-Medium (1x)
- 100 ml UH-Medium (10x)
 - 100 ml SD-Medium (10x)
 - 20 ml Aminotriazolösung (1 M)
 - ad 1 l H₂O
- UH-Agar
- 10 g Agar-Agar in 390 ml H₂O autoklavieren
 - 50 ml UH-Medium (10x)
 - 50 ml SD-Medium (10x)
 - 10 ml Aminotriazolösung (1 M)
- U-Medium (10x)
- 2 g L-Threonin
 - 1,5 g L-Valin
 - 1 g L-Leucin
 - 500 mg L-Phenylalanin
 - 300 mg L-Lysin
 - 300 mg L-Tyrosin
 - 200 mg L-Adenin Hemisulfat
 - 200 mg L-Arginin HCl
 - 200 mg L-Histidin HCl Monohydrat
 - 200 mg L-Methionin
 - 200 mg L-Tryptophan
 - ad 1 l H₂O, autoklavieren
- U-Medium (1x)
- 100 ml U-Medium (10x)
 - 100 ml SD-Medium (10x)
 - ad 1 l H₂O

3.5 Tierhaltung und Genotypisierung

3.5.1 Generierung GPR34-defizienten Mauslinie

Die GPR34-defiziente Mauslinie, mit der im Rahmen dieser Studie gearbeitet wurde, ist kurz vor Beginn dieser Arbeiten von Dr. Angela Schulz und Kollegen generiert worden. Das GPR34-Gen wurde in embryonalen Stammzellen durch die Deletion der kodierenden Region des Gens inaktiviert (Abb. 5). Für die Selektion der GPR34-defizienten ES-Zell-Rekombinanten wurde eine Neomycin-Resistenz-Kassette in den GPR34-Locus mit integriert.

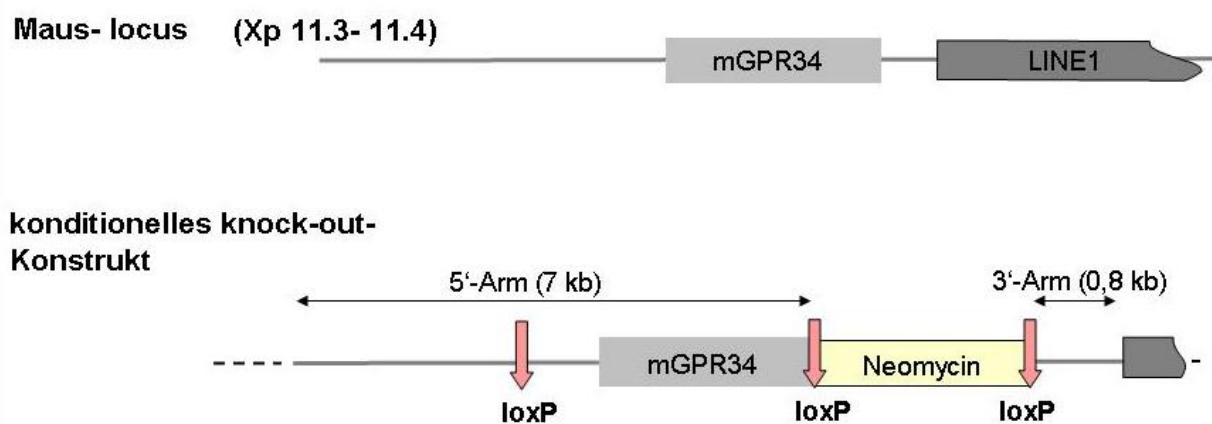


Abb. 5 Genomischer Locus des murinen GPR34 vor und nach der Rekombination des Gen-Target-Konstruktes.

Der GPR34 der Maus liegt auf dem X-Chromosom am Locus A1.1/1.2. Im 3'-Bereich des GPR34 befindet sich ein LINE1-Element (repetitives genomisches Element), das die Effizienz einer homologen Rekombination des Gen-Target-Konstruktes deutlich reduzierte. Nach der Rekombination war die kodierende Sequenz des GPR34 und der Neomycin-Resistenzkassette durch loxP-Sequenzen flankiert. Dies ermöglichte die konditionale Deletion des GPR34 und Eliminierung der Selektionskassette aus diesem genomischen Bereich.

Für diese initialen Charakterisierungsuntersuchungen wurden die loxP-flankierte Neo-Kassette und die kodierende Sequenz des GPR34 durch Kreuzung der GPR34-Locus-mutierten heterozygoten weiblichen Mäusen mit homozygoten *EIIa-cre* Mäusen entfernt. Die korrekte Deletion des GPR34 wurde mittels PCR und Locus-Sequenzierung verifiziert. Die resultierenden GPR34-defizienten Mäuse wurden für zwölf Generationen auf einen C57/Bl6 Hintergrund gekreuzt.

3.5.2 Tierhaltung

Die Wildtyp (WT)- und GPR34-defizienten Mäuse wurden im Tierstall des Max-Planck-Instituts für Evolutionäre Anthropologie in Leipzig bei 23 °C Raumtemperatur, 60 % Luftfeuchtigkeit und

in einem 12 h-Tag- und 12 h-Nachtrhythmus spezifiziert pathogenfrei (SPF) gehalten. Das Futter und Wasser stand den Mäusen *ad libitum* zur Verfügung. Zur Sicherstellung der kompletten Genotypvarianten (X-chromosomaler Erbgang) wurden die Versuchstiere durch Verpaarung von heterozygoten bzw. homozygoten weiblichen Tieren mit WT- bzw. hemizygoten männlichen Tieren erhalten. Wenn nicht anders beschrieben, wurden 3-Monate-alte Tiere verwendet. Entnommen Organe wurden in flüssigem Stickstoff eingefroren und bis zu ihrer Verwendung bei $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ gelagert. Für die Tierhaltung und alle Tierversuche lagen die Genehmigungen der Landesbehörde vor.

3.5.3 Genotypisierung der Mäuse

Für die Isolierung der genomischen DNA wurde eine Schwanzbiopsie über Nacht in 300 μl Proteinase K-Puffer mit 0,5 mg/ml Proteinase K (Roche) bei $55\text{ }^{\circ}\text{C}$ verdaut. Anschließend erfolgte die Präparation der DNA nach dem Protokoll von (Sambrook und Maniatis, 1989).

Zur Mausgenotypisierung wurden in dieser Arbeit zwei verschiedene PCRs angewandt, die sowie zum Nachweis des WT- als auch des GPR34-defizienten-Allels dienen. Der Ansatz pro Probe bestand aus 2 μl genomischer DNA (ca. 200 ng), 1 μl pro Genotypisierungsprimer (20 μM), 2 μl dNTPs (2,5 mM), 5 μl Taq-Puffer (10x), 1 μl Taq-Polymerase (5 U/ μl) und 38 μl Aqua dest.. Die Sequenzen für die Primer sind im Anhang (suppl. Tab. S1) aufgelistet. Für die Genotypisierung wurde folgendes PCR-Protokolle verwendet: $95\text{ }^{\circ}\text{C}$ für 3 min, für jeweils 35 Zyklen: $95\text{ }^{\circ}\text{C}$ für 45 sec, $60\text{ }^{\circ}\text{C}$ für 45 sec, $72\text{ }^{\circ}\text{C}$ für 45 sec und anschließend $72\text{ }^{\circ}\text{C}$ für 10 min.

Proteinase K-Puffer (1x)

Tris 0,05 M; EDTA 0,1 M; SDS 17,4 mM; Proteinase K 0,5 % (m/V) in Aqua dest. gelöst. Die Lagerung erfolgte bei $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$.

Taq-Reaktionspuffer (10x)

Tris/HCl 200 mM; KCl 100 mM; $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 100 mM; MgSO_4 20 mM; Triton-X 100 1 % (m/V); BSA, nukleasefrei 0,1 % (m/V) in Aqua dest. gelöst. Die Aufbewahrung erfolgte bei $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$.

3.6 Morphometrische, histologische und laborchemische Charakterisierung von GPR34-defizienten Tieren

3.6.1 Reproduktionsrate und Genotypverteilung

Zur Untersuchung der Reproduktionsfähigkeit und Genotypverteilung wurden unter Beachtung des X-chromosomalen Erbgangs Verpaarungen angesetzt und die Parameter Wurfzahlen, und Geschlecht der Tiere erfasst und die postnatale Vitalität zunächst täglich und nach einem Monat wöchentlich beobachtet. Da keine erhöhte postnatale Mortalität in der Zucht festgestellt wurde, erfolgte die Genotypisierung (→3.5.3) der Tiere zum Zeitpunkt des Absetzens der Jungtiere von den Müttern.

3.6.2 Wachstum und morphometrische Charakterisierung

Zur Beurteilung des Körperwachstums, Gewichtsentwicklung und für morphometrische Organuntersuchungen wurden Verpaarungen angesetzt und zunächst täglich und ab einem Monat wöchentlich das Körpergewicht, die Körperlänge und die Schwanzlänge erfasst. Nach drei Monaten wurden die Tiere nach Anästhesie mit CO₂ durch zervikale Dislokation getötet und verschiedene Organe entnommen. Die Organe wurden gewogen und für weitere molekularbiologische und histologische Untersuchungen bei -80 °C eingefroren.

3.6.3 Hämatologische und histologische Untersuchungen

Für diese Untersuchungen wurden Mäuse im Alter von drei Monaten rekrutiert und zwischen 8 und 10 Uhr vormittags (Hellphase) nach Anästhesie mit CO₂ durch zervikale Dislokation getötet. Das Blut wurde sofort nach dem Tod durch Punktion der *Vena cava inferior* gewonnen und das Serum nach der kompletten Gerinnung durch Zentrifugation abgetrennt. Die Seren wurden bis zur Verwendung (→3.6.4) bei -20 °C gelagert.

EDTA-Blut bzw. Blutausrichungen wurden für hämatologische Untersuchungen entnommen. Die Auswertung des Differenzialblutbildes erfolgte durch Färbung nach Pappenheim (May-Grünwald-Giemsa) unter einem Mikroskop. Zusätzliche wurde eine differenzielle Zellzählung aus EDTA-Blut am Scil Vet abc (Firma scil GmbH, Viernheim) im Medizinisch-Experimentellen-Zentrum der Medizinischen Fakultät der Universität Leipzig durchgeführt.

Von einigen Tieren wurden Organe entnommen, in 4 % Paraformaldehyd-Lösung fixiert und nach Parafineinbettung Gewebeschnitte (5 µm) für die histologische Untersuchung angefertigt. Die Herstellung und Durchführung der histologischen Untersuchungen von Hämatoxylin-

gefärbten Organschnitten erfolgte in Zusammenarbeit mit Herrn Dr. A. Ricken am Anatomischen Institut der Medizinischen Fakultät der Universität Leipzig.

3.6.4 Laborchemische Analyse von Serum und Urin

Elektrolyte, Metabolite, Proteine und Enzyme wurden mit dem Hitachi PPE-Modular Analyzer und Accu-Check[®] blood glucose measurement device (beide Roche Diagnostics, Mannheim, Deutschland) im Institut für Klinische Chemie und Laboratoriumsdiagnostik der Medizinischen Fakultät der Universität Leipzig durch Herrn Prof. Dr. D. Teupser und Herrn Prof. Dr. J. Thiery analysiert. Weiterhin wurde ein Aminosäure- und Acylcarnitin-Profil aus getrockneten Blutproben mittels Elektrosprayionisation-Tandemmassenspektrometrie (ESI-MS/MS) (API 2000, Applied Biosystems, Darmstadt, Deutschland) für WT- und GPR34-defiziente Tiere erstellt (Ceglarek et al., 2002; Mueller et al., 2003).

Die Urinosmolalität wurde mit Hilfe eines Dampfdruck-Osmometers (Wescor[®]) nach Angaben des Herstellers bestimmt. Dazu wurde der Urin von WT- und GPR34-defizienten Tieren aus der Harnblase entnommen. Das Osmometer erlaubt die Bestimmung der Urinosmolalität im Bereich von 100 mmol/kg bis 3.000 mmol/kg.

3.7 SHIRPA-Protokoll und andere Verhaltensuntersuchungen

3.7.1 SHIRPA-Protokoll

SHIRPA (SmithKline Beecham Pharmaceuticals, Harwell, Imperial College School of Medicine at St. Mary`s, Royal London Hospital, St. Bartholomew`s and the Royal London School of Medicine, Phenotype Assessment) ist ein Protokoll für eine umfassende Verhaltens- und Funktionsanalyse des Phänotyps von Mäusen (Rogers et al., 1997; Rogers et al., 2001). Es besteht aus drei Teilen mit ca. 40 zum Teil semi-quantitativen Tests und gibt einen schnellen Überblick über motorische, sensorische und autonome Funktionen der Maus. Im ersten Teil wird das allgemeine Erscheinungsbild der Tiere, zu dem auch der Gang und das Pflegeverhalten gehören, beobachtet. Im zweiten Teil werden unter anderem die lokomotorische Aktivität, die Futter- und Wasseraufnahme sowie die Balance und die Koordination der Mäuse mit Hilfe spezifischer Tests geprüft. Der dritte Teil befasst sich mit der neurologischen Untersuchung der Tiere, um die Eignung einer mutanten Mauslinie als Modell für neurologische Erkrankungen zu beurteilen.

Aus dem SHIRPA-Protokoll wurden nachfolgende Tests an 10 männlichen WT- und 9 männliche GPR34-defizienten Mäusen durchgeführt. Eine Aufschlüsselung der Score Skala befindet sich im Anhang (suppl. Tab. S7).

Verhalten im Käfig

Körperposition (0-5)
Spontanaktivität (0-4)
Atemfrequenz (0-3)
Tremor (0-2)

Verhalten in der Arena

Verhalten nach Transfer (0-6)
Lokomotorische Aktivität (Quadrat)
Lidschluss (0-2)
Haarsträubung (0-1)
Schreckreaktion (0-3)
Gang (0-3)
Beckenhebung (0-3)
Schwanzhebung (0-2)
Flucht vor Berührung (0-3)
Abwehrverhalten (0-4)

Verhalten auf oder über der Arena

Aufrollen des Körpers (0-1)
Greifen der Extremitäten (0-1)
Optische Lokalisierung (0-4)
Griffstärke (0-4)
Körpertonus (0-2)
Ohrmuschelreflex (0-2)
Cornealreflex (0-2)
Zehkniff (0-4)
Draht-Manöver (0-4)

Beobachtungen in Rückenlage

Körperlänge (mm)
Hautfarbe (0-2)
Herzfrequenz (0-2)
Tonus der Extremitäten (0-4)
Bauchtonus (0-2)
Lakrimation (0-1)
Speichelfluss (0-2)
Provoziertes Beißen (0-1)
Aufrichtreflex (0-3)
Kontakt-Aufrichtreflex (0-1)
neg. Geotaxis (0-4)
Angst (0-1)
Reizbarkeit (0-1)
Aggression (0-1)
Vokalisation (0-1)
Körpertemperatur (°C)

sonstige Auffälligkeiten

Bizarres Verhalten
Krämpfe

Das SHIRPA-Protokoll wurde zeitlich und örtlich standardisiert durch die gleichen Personen durchgeführt und auf ein Videoband aufgezeichnet. Die Beurteilung erfolgte unabhängig auf der Basis der Videoaufzeichnungen durch eine zweite Person.

3.7.2 Open-Field-Test, Light-Dark-Test, Hot-Plate-Test

Open-field-Test (OFT)

Der OFT und LDT (siehe unten) wurden in einem Verhaltenstestsystem der Firma TSE Systems (Bad Homburg, Germany) durchgeführt, das Computer-gestützt Laufstrecken und Zeiten

zweidimensional erfassen kann. Der OFT wurde in der oben genannten Apparatur mit je 9 männlichen WT- und GPR34-defizienten Mäusen durchgeführt. Die Tiere wurden einzeln in die Arena (quadratisch, Breite = 45 cm) platziert. Die Aktivität der Tiere wurde über 5 min erfasst und die Tiere danach in ihren Käfig zurückgesetzt. Als Ecke wurden die Areale 11,25 cm vom Eckpunkt und als Zentrum das mittige Quadrat (Breite = 22,5 cm) definiert.

Light-Dark Test (LDT)

Der LDT wurde mit je 9 männlichen WT- und GPR34-defizienten Mäusen durchgeführt. Die Tiere wurden einzeln in den hellen Teil der Apparatur platziert. Die Arena war quadratisch (Breite = 45 cm) und in eine dunkle und eine stark beleuchtete Seite unterteilt. Öffnungen zwischen beiden Seiten erlaubten eine freie Passage der Tiere. Die Aktivität der Tiere wurde über 5 min erfasst und die Tiere danach in ihren Käfig zurückgesetzt.

Hot plate-Test

Im Hot-Plate-Test wird die Nozizeption des Tieres auf einer 52 °C heißen Platte getestet, einer Temperatur, die, obwohl unangenehm, jedoch keine ernsthaften Schäden hervorruft. Messparameter sind das Vorder- oder Hinterpfotenlecken und das Fluchtspringen. Dabei werden die Latenzzeiten bis zum Auftreten dieser Verhaltensweisen gemessen. Für die Testdurchführung wurden 9 männliche WT- und GPR34-defiziente Mäuse einzeln auf die 52 °C heiße Platte des Messsystems der Firma gesetzt.

3.8 Immunologische und infektionsbiologische Untersuchungen

3.8.1 Untersuchung der Mastzellaktivierung

Zur Gewinnung von Mastzellen aus der Maus eignet sich besonders die Peritoneallavage, da sich in der Bauchhöhle besonders viele Mastzellen des Bindegewebstyps (CTMC- connective tissue-type mast cells) befinden. Diese Mastzellen bilden insgesamt 7-8 % der gesamten zellulären Komponenten in der Peritoneallavage (Horigome et al., 1994). Die murinen Mastzellen wurden aus 3-Monate-alten Tieren nach Tötung durch zervikale Dislokation unter CO₂-Anästhesie und zweimaliger Spülung der Bauchhöhle mit je 5 ml PBS gewonnen. Die Lavageflüssigkeit wurde Genotyp-entsprechend gepoolt und die Zellen nach einem Zentrifugationsschritt (1.200 U/min, 6 min, 4 °C) in RPMI-1640-Medium (10% FBS, Histidin (1,6 mM), Penicillin (100 units/ml)/ Streptomycin (100 µg/ml)) resuspendiert. Die Kultivierung der Mastzellen, sowie die Messung

der Histaminfreisetzung erfolgten nach einem Protokoll der AG Fuhrmann (Physiologisch-Chemischen Instituts der Veterinärmedizinischen Fakultät, Universität Leipzig). Nach zweimaliger Passage der Zellen im selben Medium wurden die Mastzellen nach 6 h geerntet. Nach Waschen und Einstellung gleicher Zellzahlen mit CMF-Tyrodes-Puffer (Sigma Aldrich, Taufkirchen, Deutschland) wurden verschiedene Stimulationsansätze (siehe nachstehendes Schema) mit den WT- bzw. KO-Mastzellen in einem Endvolumen von 150 µl pipettiert.

Basal

Mastoparan (25 µM)

P-*lyso*-PS (10 µM)

Anti-DNP-IgE (10 µg/ml)

Anti-DNP-IgE (10 µg/ml) + DNP-BSA (100 ng/ml)

Anti-DNP-IgE (10 µg/ml) + DNP-BSA (100 ng/ml) + P-*lyso*-PS (10 µM)

Anti-DNP-IgE (10 µg/ml) + DNP-BSA (100 ng/ml) + P-*lyso*-PS (10 µM) + PTX

Die Ansätze mit PTX wurden bereits 4 h vor der Zellernte mit dem Toxin inkubiert. Die Sensitivierung mit Anti-DNP-IgE erfolgte vor der Zugabe der Stimulantien bei 4 °C über einen Zeitraum von 30 min. Diese Proben wurden dann zunächst mehrfach mit PBS gewaschen bevor sie in 150 µl CMF-Tyrodes-Puffer aufgenommen und dann, wie die anderen Ansätze, für 20 min nach Pipettierschema bei 37 °C stimuliert wurden. Anschließend wurde durch Zentrifugation (1.200 U/min, 6 min, 4°C) der Überstand vom Zellpellet abgetrennt. Das Pellet und der Überstand wurden jeweils mit 1 ml CMF-Tyrodes-Puffer aufgenommen und bis zur Histamin-Messungen bei -20 °C gelagert.

Zur Messung der Histaminkonzentrationen in den Überständen und Pellets von Peritonealmastzellen wurde ein Hochleistungsflüssigkeitschromatographie- (HPLC) Verfahren angewendet (KNAUER, Berlin, Deutschland). Diese Methode wurde in Anlehnung an die Versuche von Miranda (Miranda, 1993) durchgeführt. Bevor die Proben jedoch auf die Säule gebracht wurden, musste das Histamin aus der Untersuchungssubstanz extrahiert werden. Dies geschah mittels Bis-(2-ethylhexyl)-phosphorsäure in Heptan. Die anschließende Derivatisierung mit *ortho*-Phthaldialdehyd ermöglicht die spätere Quantifizierung über einen Fluoreszenzdetektor. Die spezifischen Bedingungen der HPLC sind im Anhang (suppl. Tab. S8) aufgelistet. Die stationäre Phase der Trennsäule bestand aus einer PhenylPhase auf Kieselgel Nucleosil® (MACHEREY-NAGEL GmbH & Co. KG, Düren, Deutschland). Das Trennmittel war ein

Natriumdihydrogenphosphat-Puffer/Acetonitril-Gradient (5-50 %). Die einzelnen Extrakte wurden zunächst über einen Membranfilter aus regenerierter Cellulose mit einer Porengröße von 0,2 µm gefiltert und dann entgast. Die Chromatogramme wurden durch die Software Chromgate® V3.1 (KNAUER, Berlin - basierend auf EZChrom Elite®) aufgezeichnet und ausgewertet. Zur Quantifizierung der Proben wurden Standardlösungen in verschiedenen Konzentrationen von 0,5-4,0 µg Histamin/ml in HBSS Puffer eingesetzt. Auch die Standardlösungen wurden analog derivatisiert und extrahiert.

3.8.2 Migration von peritonealen Zellen

Die zur Durchführung des Migrationsassays verwendeten Zellen wurden mittels Peritoneallavage von 3-Monate-alten Mäusen gewonnen. Die Peritoneallavage wurde analog der Präparation der Peritonealmastzellen →3.8.1 durchgeführt, jedoch erfolgte keine weitere Selektion der Zellen. Unter der Verwendung von Transwell-Platten (Greiner Bio-One, Solingen, Deutschland) wurden die Migrationstest in Anlehnung an publizierte Methoden durchgeführt (Bae et al., 2003; Park et al., 2006). Nach Gewinnung der Zellen wurden diese individuell für jedes Tier durch Zentrifugation (1.200 U/min, 6 min, 4 °C) vom PBS der Lavage getrennt und in 1-2 ml DMEM (plus 0,5 % FBS, Penicillin/Streptomycin) aufgenommen. Ein trockener, unbeschichteter Polycarbonat-Filter (8 µm Porengröße) wurde in je eine der Kavitäten der 24-Well Platte gesetzt und die obere Kammer mit 150 µl einer Zellsuspension ($3,3 \times 10^6$ Zellen/ml) gefüllt. Die Zellen wurden über Nacht bei 37 °C inkubiert, um ihnen die Anheftung an die Membran zu ermöglichen. Am nächsten Tag wurden unterschiedliche Konzentrationen an *S-lyso*-PS in einem Volumen von 800 µl in die unteren Kammern pipettiert und der Ansatz für 4 h bei 37 °C inkubiert. Anschließend wurden die nicht-migrierten Zellen von der Oberseite der Filter durch Kratzen entfernt und die Filterunterseiten, an denen sich die adhärenen gewanderten Zellen befanden, mit dem HEMACOLOR Set (Merck, Darmstadt) fixiert und gefärbt. Die Quantifizierung der so angefärbten, mit Zellen gefüllten Poren erfolgte durch Auszählung von vier zufällig ausgewählten Gesichtsfeldern bei 40facher Vergrößerung unter einem Lichtmikroskop. Die Anzahl der migrierten nicht-adhärenen Zellen, die sich im Medium in der unteren Kammer befanden, wurde mit einer Neubauer Zählkammer bestimmt. Die Auszählungen fanden für jedes Well einzeln statt.

3.8.3 Delayed-type Hypersensitivity (DTH)-Test

Die allergische Reaktion vom verzögerten Typ (Delayed-type Hypersensitivity (DTH)-Reaktion) wurde mittels Messung der Pfotenschwellung nach Immunisierung mit methyliertem Rinderserumalbumin (methylBSA; Sigma Aldrich, Taufkirchen) bestimmt. Dazu wurden WT- und GPR34-defiziente Mäuse zunächst mit einer 2 mg/ml methylBSA-Lösung/Freund'sches Adjuvanz-Suspension (1:1 gemischt) subkutan mit jeweils 200 µl immunisiert. Nach 8 Tagen wurden jeder Maus 20 µl einer Lösung aus 5 mg/ml methylBSA in 0,9 % Kochsalzlösung in die Fußsohle der rechten Hinterpfote und 20 µl reine 0,9 % Kochsalzlösung (Kontrolle) in die linke Hinterpfote injiziert. Die Schwellung beider Pfoten wurde mit einer Millimeterschraube alle 12 h über einen Zeitraum von 72 h gemessen. Die DTH-Reaktion wurde als Differenz der Schwellung (in mm) zwischen methylBSA- und kontrollinjizierter Pfote definiert.

Drei Wochen nach Abschluss des Versuchs wurde eine erneute Schwellungsreaktion provoziert mit 20 µl methylBSA und 0,9 % Kochsalzlösung in die entsprechende Pfote. Nach 48 h, dem Zeitraum der größten gemessenen Schwellung, wurde die Milz der Tiere entnommen und primäre Milzzellkulturen angelegt. Hierfür wurden 65 mg Milzgewebe eines jeden Tiers in PBS mittels eines Gewebenetzes (100-µm mesh) desintegriert und so eine Einzelzellsuspension hergestellt. Nach der Lyse der Erythrozyten mit Gey's Lösung wurden die Zellen gezählt, resuspendiert in Iscove-Medium (mit Glutamin, 10 % FBS, 100 U/ml Penicillin, 100 µg/ml Streptomycin) und auf eine Zelldichte von 5×10^6 /ml eingestellt. In den Überständen von unbehandelten und mit methylBSA (20 µg/ml) stimulierten Zellen wurden nach 72 h die Konzentrationen verschiedener Zytokine in einem Multiplex-Ansatz (Th1/Th2-Kit, Bio-Rad Laboratories GmbH) nach Herstellerangaben bestimmt.

3.8.4 Infektionsversuche mit *Cryptococcus neoformans*

Um die Reaktion von WT- und GRP34-defizienten Mäusen gegenüber einer systemischen Infektion zu untersuchen, wurden diese mit *Cryptococcus neoformans*, dem Erreger der Kryptokokkose, nach einem am Institut für Immunologie der Veterinärmedizinischen Fakultät der Universität Leipzig entwickelten Protokoll infiziert (Kleinschek et al., 2006; Muller et al., 2007). Dazu wurde der bekapselte *C. neoformans*-Stamm 1841, Serotype D in Sabouraud-Dextrose-Medium (2 % Glucose, 1 % Pepton; Sigma-Aldrich) über Nacht in einem Schüttler bei 30 °C kultiviert. Die Zellen wurden zweimal mit sterilem PBS gewaschen, in PBS resuspendiert und in einem Hämatocytometer gezählt. Die Administration der Zellen erfolgte intranasal mit 10 µl pro Nasenloch einer $2,5 \times 10^4$ Zellen/ml Lösung (entspricht 500 CFU). Für die intranasale

Infektion wurden die Mäuse mit einer 1:1 Mischung von 10 % Ketamin (100 mg/ml; Ceva Tiergesundheit, Düsseldorf, Deutschland) und 2 % Xylazine (20 mg/ml; Ceva Tiergesundheit) intraperitoneal anästhesiert.

Die infizierten Mäuse wurden täglich in Hinblick auf Vitalität und Morbidität untersucht. Nach drei Monaten wurden alle Tiere getötet und unter sterilen Bedingungen die Lunge, Milz und das Gehirn entnommen. Alle Organe wurden gewogen und gleiche Teile mit dem Ultra-Turrax (T8; Ika-Werk Instruments) in 1 ml PBS homogenisiert. Serielle Verdünnungen der Homogenate wurden auf Sabouraud-Dextrose-Agar-Platten ausgestrichen und die Kolonien nach einer Inkubationszeit von 72 h bei 30 °C ausgezählt.

In diesem Versuchsansatz wurden die Zytokine untersucht, die von Abwehrzellen innerhalb der Lunge gebildet wurden. Verwendet wurden neben den Tieren aus dem Cryptococccenversuch auch jeweils drei Tiere pro Genotyp, die zuvor nicht infiziert worden waren. Hierfür wurde kurz nach Eintritt des Todes eine Lungenlavage durchgeführt, die Zellen gezählt, in Iscove-Medium (mit Glutamin, 10 % FBS, 100 U/ml Penicillin, 100 µg/ml Streptomycin) resuspendiert und auf eine Zelldichte von 5×10^6 /ml eingestellt. Die Zellen wurden dann mit Medium (Kontrolle) und mit 1×10^7 Zellen/ml des Hitze-inaktivierten acapsulären *C. neoformans*-Stamm CAP67 (hiCap) inkubiert. Nach 72 h wurden die Zellkulturüberstände abgenommen und die Konzentration von verschiedenen Zytokinen in einem Multiplex-Ansatz (Th1/Th2-Kit, Bio-Rad Laboratories GmbH) nach Herstellerangaben bestimmt.

3.9 Genexpressionsanalysen im Myocard von Wildtyp- und GPR34-defizienten Mäuse

3.9.1 RNA-Isolierung

Die Gesamt-RNA aus dem Myokard von jeweils fünf männlichen 3-Monate-alten WT- und GPR34-defizienten Mäusen wurde mit Trizol[®] Reagenz (Invitrogen, USA) nach Angaben des Herstellers extrahiert. Eine weitere Reinigung der RNA erfolgte mit dem RNeasy[®] Mini Kit (Qiagen, Hilden, Deutschland) anhand des Protokolls zur Reinigung von RNA aus Gewebe. Die gewonnene Gesamt-RNA wurde sowohl für die *Microarray*-basierte Expressionsanalyse als auch für die quantitative Echtzeit-PCR (qPCR) eingesetzt.

3.9.2 Microarray-basierte Expressionsanalyse

Die Integrität und Konzentration der Gesamt-RNA wurde mittels eines Agilent 2100 Bioanalyser (Agilent Technologies, Palo Alto, USA) mit Hilfe des 6000 LabChip-Kits (Agilent Technologies)

nach Angaben des Herstellers ermittelt. Die *Microarray*-basierte Expressionsanalyse erfolgte in der Microarray Core Unit des IZKF Leipzig (IZKF Leipzig, Dr. Knut Krohn). Zehn Mikrogramm der Gesamt-RNA aus dem Myokard eines jeden Tieres wurden mit Hilfe eines T7-oligo-dT Primers revers transkribiert (SuperScript II, Invitrogen, USA). Die erhaltene cDNA wurde einer Phenol-Chloroform-Extraktion unterzogen und mit dem ENZO BioArray RNA Transcript Labelling Kit (Affymetrix) *in vitro* transkribiert. Die mittels T7-RNA-Polymerase-basierter *in vitro*-Transkription gewonnene cRNA wurde durch biotinylierte Ribonukleotidanaloga markiert. Anschließend wurde die cRNA fragmentiert und dann auf dem *GeneChip® Mouse Genome Arrays 430A 2.0* (Affymetrix, Santa Clara, USA) hybridisiert. Die weiteren Arbeitsschritte erfolgten nach Angaben des Herstellers.

3.9.3 Statistische Auswertung der Microarraydaten

Die Expressionsdaten wurden basierend auf zwei Algorithmen normiert: Microarray Suite 5 (MAS5) und Robust Multi-Array Analysis (RMA) (Irizarry et al., 2003). Die Normierung erfolgte mit Hilfe der Software „R“ (<http://www.r-project.org>). Basierend auf der MAS5-Normierung wurden den *Probe Sets* sogenannte *Calls* in den Abstufungen „*Present*“, „*Medium*“ und „*Absent*“ in Abhängigkeit von der Signalintensität zugewiesen. Die Annotation der *Probe Sets* wurde der Affymetrix-Homepage entnommen. Die Datensätze wurden gefiltert und nur solche *Probe Sets* in die statistische Analyse eingeschlossen, die in mindestens vier der fünf Arrays in mindestens einer Gruppe der beiden Gruppen (WT, KO) als *Present* detektiert wurden. Die \log_2 -transformierten Datensätze wurden mit einem zweiseitigen t-Test statistisch ausgewertet.

3.9.4 Sortierung regulierter Gene in biologische Systeme und Funktionen

Um die erhobenen Microarraydaten in einen biologischen Kontext einordnen zu können, wurden die MAS5-normierten Datensätze sowohl mit dem *Onto Express* Algorithmus (<http://vortex.cs.wayne.edu/projects.htm>) (Draghici et al., 2003) als auch mit Hilfe einer *Gene Set Enrichment Analysis* (GSEA, <http://www.broad.mit.edu/gsea/>) (Subramanian et al., 2005) ausgewertet. Die entsprechenden Einstellungen für die *Onto Express* Analyse waren: „hypergeometrische Verteilung“ und „Korrektur für die Falsch-Positiv-Rate“ (*false discovery rate*). Für die GSEA Auswertung wurden neben den MAS5-normierten, auch die RMA-normierten Datensätze herangezogen. Die analysierten Sets von Genen wurden aus folgenden Datenbanken bezogen: *Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes Database* (KEGG)

(<http://www.genome.jp/kegg/>) (Kanehisa et al., 2006; Kanehisa et al., 2002), *Molecular Signatures Database* (MSigDB2.0) des GSEA sowie Schlüsselwort-basierend gefilterte Datensätze der Annotationsdatei des *Mouse Genome 430A Arrays* (Affymetrix) innerhalb der *Gene Ontology*. Diese ermöglichten die Zuordnung der molekularen Funktion bzw. der Gentitel. Die GSEA Parameter waren: „500 Phänotypmutationen“, „Datensätze auf die Gensymbole vereinfachen“ und „gewichtete Anreicherung mit Signal-Rausch-Verhältnis“.

3.9.5 Quantitative Echtzeit-PCR (Echtzeit-qPCR)

Ausgewählte Transkripte, die in den Microarray-Analysen differentiell reguliert waren, wurden mittels quantitativer PCR (qPCR) verifiziert. Der qPCR ging eine reverse Transkription der Gesamt-RNA in cDNA voraus. Diese erfolgte mit dem gebrauchsfertigen Kit SuperScript II[®] RNase H, Reverse Transkriptase von Invitrogen. Das Protokoll wurde nach Angaben des Herstellers durchgeführt. Pro Ansatz wurden jeweils 1 µg Herz-, 3 µg Milz- und 1,5 µg Gehirn-Gesamt-RNA mit 5 µM oligo-dT-Primer umgeschrieben. Für die quantitative Echtzeit-PCR wurde die cDNA zuvor für Herz 1:2 und für Milz und Gehirn 1:3 mit Aqua dest. verdünnt.

Das Design der Primer für die qPCR wurde mit Primer3 (Version 0.3.0) durchgeführt (<http://frodo.wi.mit.edu>). Die zu amplifizierenden DNA-Fragmente sollten eine Länge zwischen 100 bp und 200 bp besitzen. Bei der Primerauswahl wurde darauf geachtet, dass möglichst eine *Annealing*-Temperatur von 61 ± 1 °C gewährleistet war. Die Primer wurden wenn möglich so positioniert, dass sie in der genomischen DNA ein Intron flankieren. Demzufolge unterschieden sich die Längen der Amplifikate, die aus mRNA und eventueller genomischer DNA-Kontaminationen hervorgingen und konnten per Agarosegelelektrophorese identifiziert werden.

Die Echtzeit-qPCR geht auf Higuchi und Mitarbeiter zurück (Higuchi et al., 1993). Das Prinzip der Quantifizierung beruht auf der Interkalierung des Fluoreszenzfarbstoffes *SYBR-Green* mit doppelsträngiger DNA (dsDNA). *SYBR-Green* verstärkt im gebundenen Zustand seine Fluoreszenz nach Anregung mit ultraviolettem Licht. Da *SYBR-Green* zufällig interkaliert, nimmt die Zahl der interkalierten *SYBR-Green*-Moleküle direkt proportional mit der Menge an dsDNA mit jedem PCR-Zyklus zu. Die Anregung mit ultraviolettem Licht und die Detektion des vom *SYBR-Green*-dsDNA-Komplex abgegebenen Fluoreszenzsignals erfolgt jeweils am Ende der Elongationsphase der PCR.

Der Punkt der PCR, bei dem die Amplifikation der *Template*-DNA in die exponentielle Phase übergeht, wird als sogenannter Schwellenwert (engl. *threshold*) bezeichnet. Der Zyklus, an dem

die Fluoreszenz der Probe diesen Schwellenwert überschreitet, wird als c_T -Wert (engl. *cycle threshold*) bezeichnet (Livak and Schmittgen, 2001). Ab diesem Punkt korreliert das *SYBR-Green*-Fluoreszenzsignal mit der Produktmenge. Das Signal wird zusätzlich anhand eines internen Fluoreszenzstandards, der nicht mit der dsDNA interkaliert, (z.B. Rox^{TM} , ein Rhodaminderivat) normiert. Mit Hilfe dieser Methode kann die Produktmenge und damit die relative Ausgangskonzentration an *Template*-DNA quantifiziert werden.

Die Echtzeit-qPCR erfolgte in einem 25 μl Ansatz mit je 3 μl cDNA (80 ng Herz, 112 ng Milz, 56 ng Gehirn), 1,5 μl je Primer (10 μM), 12,5 μl SYBR[®]Green Supermix (Platinum SYBR Green Supermix UDG, Invitrogen), 1 μl Rox^{TM} (1:10 verdünnt in Aqua dest.) und 5,5 μl Aqua dest.. In den Kontrollen (*no template control*, NTC) wurde anstelle von cDNA das gleiche Volumen Aqua dest. eingesetzt. Die verwendeten Primerpaare sind im Anhang in suppl. Tab. S2 aufgelistet. Die Echtzeit-qPCR wurde auf dem Gerät MxPro3000 (Stratagene, Santa Clara, USA) durchgeführt. Es wurden folgende PCR-Bedingungen gewählt: 50 °C für 2 min, 95 °C für 2 min, 50 Zyklen: 95 °C für 15 sec, 60 °C für 30 sec. Der PCR schloss sich eine Schmelzkurvenanalyse an: 95 °C für 30 sec, 60 °C für 30 sec, 95 °C für 30 sec, 25 °C für 30 sec. Die Schmelzkurvenanalyse diente der Bestimmung der Schmelztemperatur des PCR-Produktes und gestattet zusätzlich die Existenz von Primerdimeren oder unspezifischen Amplifikationsprodukten nachzuweisen oder auszuschließen, da die Schmelztemperatur für jedes Amplikon spezifisch ist. Alle Proben wurden jeweils in Doppelbestimmungen analysiert. Für die Auswertung der Daten wurde die $2^{-\Delta\Delta C_T}$ Transformation verwendet (Livak and Schmittgen, 2001). Dabei wurden die ermittelten c_T -Werte an einem konstant exprimierten Gen (engl. *house keeping gene* = Haushaltsgen), $\beta 2$ -Mikroglobulin normiert, indem die Differenz aus diesem und dem c_T -Wert des Zielgens (Δc_T) gebildet wurde. Anschließend wurde die Differenz ($\Delta\Delta c_T$) zwischen dem Δc_T des GPR34-defizienten Tier mit dem WT-Tier ermittelt. Die Negative der Differenz zur Basis zwei ($2^{-\Delta\Delta C_T}$) gab den so genannten *Fold Change*, das Verhältnis der Genexpression zwischen GPR34-defizienten Tieren und WT-Tieren, wieder. Die mRNA-Expression aller Gene wurde an mindestens fünf WT- und fünf GPR34-defizienten Tieren untersucht, wobei nur Wurfgeschwister miteinander verglichen wurden. Die Unterschiede der Expression wurden auf ihre statistische Signifikanz überprüft. In einer anschließenden Agarosegelelektrophorese wurden die berechneten Größen der Echtzeit-qPCR-Amplikons überprüft und die Identität der Produkte mittels Sequenzierung oder Restriktionsverdau verifiziert.

3.10 Statistische Auswertung der Daten

Die Analysen der morphometrischen und laborchemischen Daten wurden mit Hilfe des t-Test nach Student (zweiseitig, ungepaart) auf signifikante Unterschiede untersucht.

Die mittels *Echtzeit-qPCR* erhobenen Daten wurden auf Basis der $\Delta\Delta c_T$ -Werte statistisch miteinander verglichen. Unter der Annahme einer gleichen Varianz der Δc_T -Werte WT- und GPR34-defizienten Tiere, wurde mittels U-Test nach Mann-Whitney der p-Wert bestimmt. Die ermittelten Expressionsunterschiede wurden ab einer Irrtumswahrscheinlichkeit von $\leq 5\%$ ($p \leq 0,05$) als signifikant betrachtet.

4 Ergebnisse

4.1 Funktionelle Untersuchungen zur Aktivierbarkeit von GPR34-Orthologen durch lyso-PS

Von Mori und Kollegen wurde während der laufenden Arbeiten zu dieser Promotion *lyso-PS* als Agonist für den humanen und murinen GPR34 publiziert (Sugo et al., 2006). Sie konnten an stabil transfizierten CHO-Zellen durch *P-lyso-PS* eine konzentrationsabhängige Aktivierung des GPR34 zeigen. Wie zuvor schon nachgewiesen (Schulz and Schöneberg, 2003), signalisiert der GPR34 über G_i -Proteine.

Da der in der Publikation beschriebene Agonist kommerziell nicht mehr erhältlich war, stellten wir in Zusammenarbeit mit der AG von Prof. Fuhrmann (Veterinärmedizin, Universität Leipzig) das *P-lyso-PS* enzymatisch aus 1,2-*Di*-Palmityl-Phosphatidylserin her (\rightarrow 3.4.1).

Das präparierte *P-lyso-PS* wurde zunächst an COS-7-Zellen getestet, die mit dem humanen und murinen GPR34 sowie mit einem chimären G-Protein (ΔG_{qi4}) kotransfizierten wurden. Die Aktivierbarkeit des GPR34 durch *P-lyso-PS* wurde in einem IP-Akkumulationsassay (\rightarrow 3.4.2) untersucht. Eine agonistische Wirkung von *P-lyso-PS* konnte jedoch nicht nachgewiesen werden (Abb. 6).

Um auszuschließen, dass das selbstpräparierte *P-lyso-PS* eventuell biologisch unwirksam ist, wurden diese Versuche mit „Brain“-*lyso-PS* (Avantilipids, USA) wiederholt. Hauptbestandteil dieser Präparation ist das Stearyl-*lyso-PS* (*S-lyso-PS*). Mori und Kollegen (Sugo et al., 2006) hatten eine Abhängigkeit der Aktivierung von GPR34 von der Kettenlänge der Fettsäure gezeigt und postuliert, dass der GPR34 auch durch *lyso-PS* mit Myristyl- oder längere Acylgruppen aktiviert werden kann. Wiederum konnten wir in transfizierten COS-7-Zellen keine spezifische GPR34-Aktivierung durch *S-lyso-PS* messen.

Daraufhin wurden die Untersuchungen auf weitere GPR34-Orthologe ausgedehnt. Interessanterweise aktivierten sowohl *P-lyso-PS* als auch *S-lyso-PS* einen GPR34-Subtypen des Karpfens (Abb. 6).

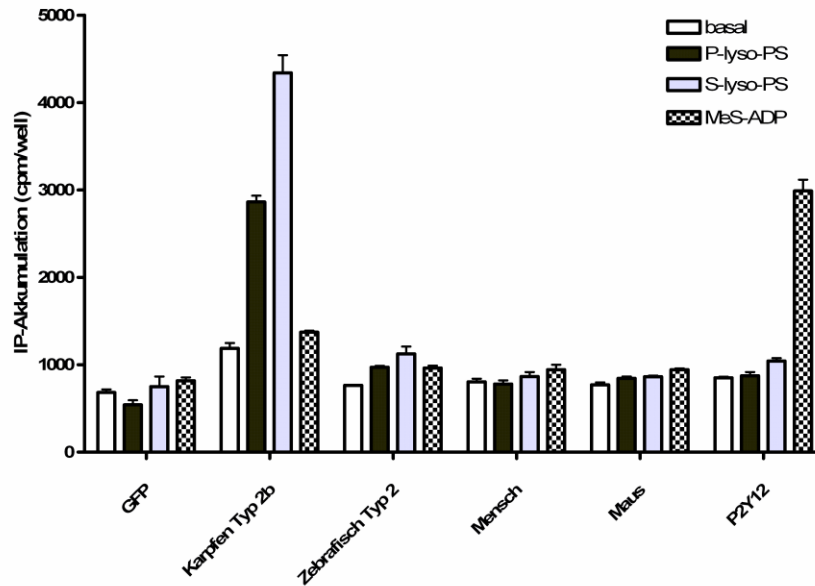
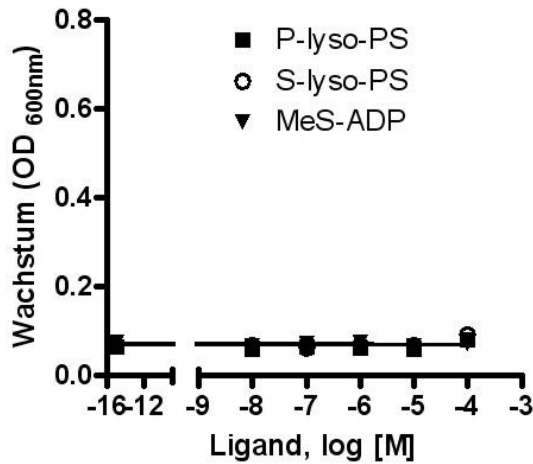


Abb. 6 Untersuchung der Wirkung von *lyso-PS* auf verschiedene GPCR.

COS-7-Zellen wurden transient mit verschiedenen GPR34-Orthologen und dem P2Y₁₂ transfiziert. Die Stimulierbarkeit der einzelnen GPR34-Orthologe wurde mit den angegebenen Substanzen (alle 10 μM) untersucht. Als Negativkontrolle dienten mit GFP transfizierte Zellen. Als Positivkontrolle wurde der ADP-sensitive P2Y₁₂ mit Methyl-S-Adenosindiphosphat (MeS-ADP) stimuliert. Es ist ein repräsentativer Assay mit Mittelwerten ± SEM aus einer Dreifachbestimmung dargestellt.

Neben der Expression in Säugerzellen stand ein weiteres, sehr sensibles und effizientes heterologes Expressionssystem von Vertebraten-GPCR in Hefezellen zur Verfügung (→3.4.3, siehe Abb. 2). Diese Hefen wurden so verändert, dass ein in der Hefe exprimierter GPCR über ein chimäres Hefe/Säuger-G-Protein an den modifizierten *Mating*-Signalweg der Hefe gekoppelt ist. Die Hefezelle kann nur nach Aktivierung des Rezeptors auf Selektionsmedium wachsen. Die Expression der GPR34-Orthologe im Hefesystem bestätigte die Befunde aus dem heterologen COS-7-Zell-Expressionssystem. Auch hier zeigte der humane GPR34 keine Aktivierung durch *lyso-PS*, wohingegen das Ortholog aus dem Karpfen (Subtyp 2b) eine konzentrationsabhängige Stimulierung durch beide *lyso-PS* aufwies (Abb. 7).

A



B

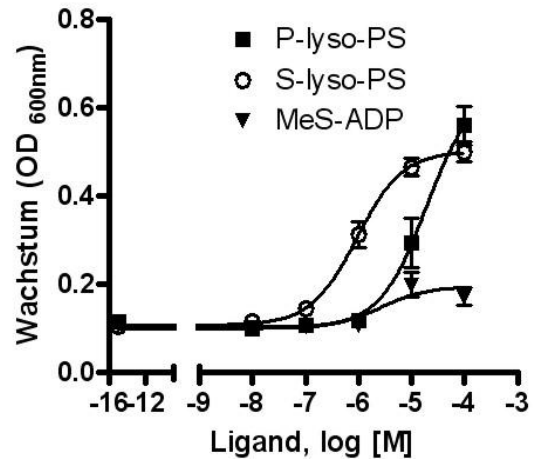


Abb. 7 Aktivierung eines Rezeptorsubtyps des Karpfens durch *lyso*-PS.

Hefezellen wurden mit Plasmiden transformiert (siehe 3.4.3), die den human GPR34 (A) und den Karpfen GPR34 Typ 2b (B) exprimieren. Die Hefen wurden mit verschiedenen Konzentrationen von *S-lyso*-PS, *P-lyso*-PS und dem stabilen Agonisten des P2Y₁₂ (MeS-ADP) inkubiert und nach 46 Stunden die OD bei 600 nm gemessen. Es ist ein repräsentativer Assay mit Mittelwerten \pm SEM aus einer Dreifachbestimmung dargestellt.

Um sicherzustellen, dass auch der humane GPR34 an das modifizierte Mating-Signalsystem der Hefe koppelt, wurde eine den Rezeptor konstitutiv aktivierenden Mutante (T²⁶⁴A (Schulz and Schöneberg, 2003)) in den Hefezellen exprimiert. Wie in der Abb. 8 dargestellt, führt diese Mutation im humanen GPR34 auch im Hefeexpressionssystem zu einer Agonist-unabhängigen Aktivierung des G_i-Signalwegs.

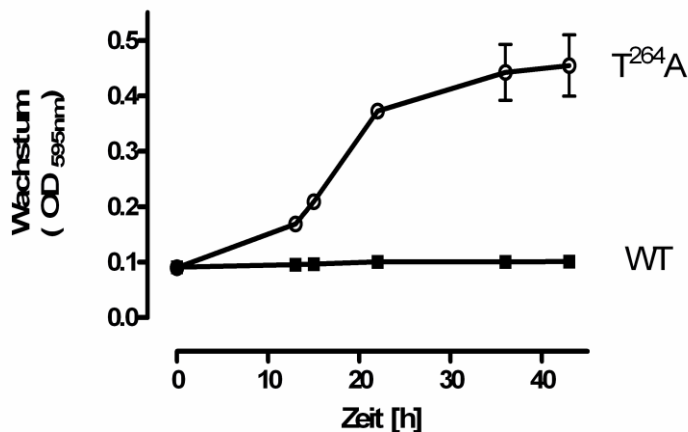


Abb. 8 Expression des humanen GPR34 im Hefesystem.

Der humane GPR34 und eine konstitutiv aktive Mutante (T²⁶⁴A) wurden in einen Hefe-Stamm transformiert, der ein chimäres G_i-Protein exprimiert, und auf Uracil-defizientem Medium ausplattiert. Die wachsenden Klone enthielten das entsprechende GPR34-Plasmid. Wachstumskurven wurden als Triplikate in Microtiterplatten mit Uracil-Histidin-freiem Medium angesetzt. Ein Wachstum ist nur bei Aktivierung des modifizierten Mating-Signalwegs der Hefe (z.B. durch konstitutive Aktivität – T²⁶⁴A) messbar. Es ist ein repräsentativer Assay mit Mittelwerten \pm SEM aus einer Dreifachbestimmung dargestellt.

4.2 Basale Charakterisierung von GPR34-defizienten Mäusen

Für die Etablierung einer GPR34-defizienten Mauslinie wurden zunächst aus chimären Männchen (Abb. 9) zwei verschiedene Mauslinien generiert. Zum einen wurde durch direkte Verpaarung mit einer ubiquitär Cre-exprimierenden Mauslinie ein klassischer Gen-KO hergestellt, zum anderen wurde eine gefloxtete Mauslinie für spätere konditionelle GPR34-defiziente-Linien etabliert. Beide Mauslinien wurden anschließend auf einen C57/Bl6-Hintergrund gezüchtet.



Abb. 9 Herstellung von chimären Männchen für eine GPR34-defiziente Mauslinie.

Aus mehreren positiven Klonen wurden zwei ES-Zellklone ausgewählt und in Zusammenarbeit mit Herrn Naumann, MPI Dresden in Blastozysten reimplantiert. Es konnten mehrere chimäre Mäuse generiert werden.

Die Mauslinien wurden mittels PCR und Southern Blot verifiziert und zunächst die Zucht der „klassischen“ KO-Linie für eine initiale Phänotypcharakterisierung ausgebaut. Die hemi- und homozygoten GPR34-defizienten Nachkommen waren lebensfähig und fertil. Die Wurfzahlen und Genotypen aus den bisher angesetzten Verpaarungen zeigten keinen Anhalt für eine erhöhte prä- oder postpartale Mortalität von KO-Mäusen (Abb. 10).

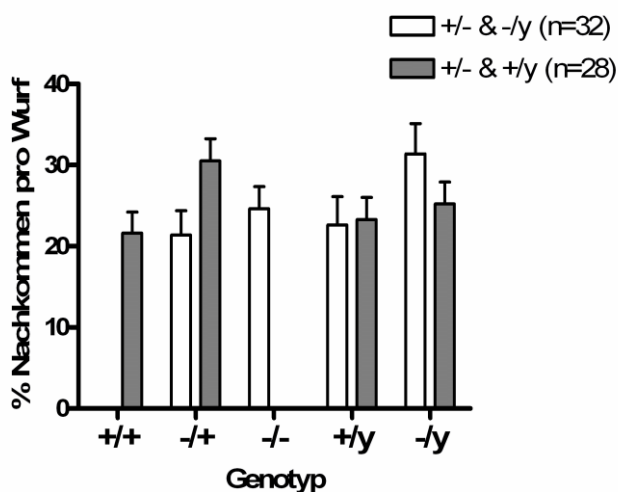


Abb. 10 Genotypverteilung der GPR34-cre Mauslinie.

Aufgrund der X-chromosomalen Lokalisation des GPR34 wurden die verschiedenen Genotypen durch zwei unterschiedliche Verpaarungen erhalten. Einmal wurden heterozygote Weibchen mit WT-Männchen verpaart (n=28 Würfe, graue Balken), um WT- und heterozygote Weibchen zu züchten. Um homozygote Weibchen zu erhalten, wurden Verpaarungen von heterozygoten Weibchen mit hemizygoten Männchen (n=32 Würfe, weiße Balken) angesetzt. Die Genotypverteilung in den jeweiligen 4-Wochen-alten Würfen zeigte eine Normalverteilung. Es sind die Mittelwerte \pm SEM dargestellt.

Zur Beurteilung des Körperwachstums und der Gewichtsentwicklung wurden die Nachkommen aus den Verpaarungen zunächst täglich, später wöchentlich gewogen und die Körper- und Schwanzlänge erfasst. Dabei wurde kein signifikanter Unterschied zwischen WT- und GPR34-defizienten Jungtieren beobachtet. Exemplarisch ist das Körpergewicht von 4-Wochen-alten Tieren in Abb. 11A dargestellt. Zu diesem Zeitpunkt wurde eine Schwanzbiopsie entnommen und dabei gleichzeitig die erste Blutglukosebestimmung durchgeführt. Auch hierbei waren keine signifikanten Unterschiede zwischen den Genotypen messbar (Abb. 11B).

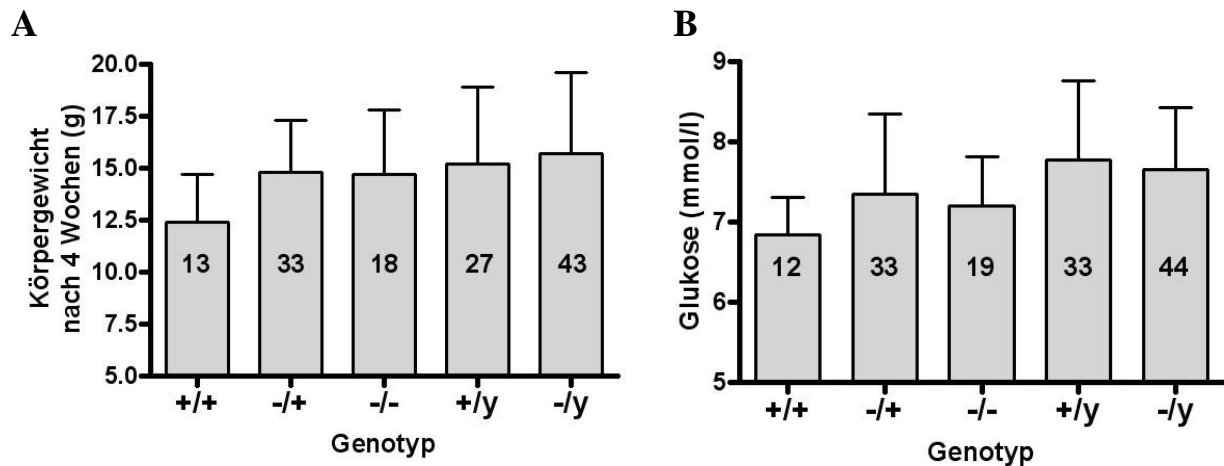


Abb. 11 Vergleich der Körpergewichte und der Blutglukose bei 4-Wochen-alten Mäusen.

4-Wochen-alte Mäuse eines jeden möglichen Genotyps wurden gewogen (A) und die Blutglukosekonzentration gemessen. Die Anzahl der untersuchten Mäuse pro Genotyp ist in den Balken angegeben. Dargestellt sind die Mittelwerte \pm SD.

Für eine detaillierte Grundcharakterisierung der Mäuse wurden entsprechende Tierzahlen der verschiedenen Genotypen gezüchtet und diverse Parameter untersucht, die in der Tabelle 2 zusammengestellt sind.

Tab. 2 Grundcharakterisierung von GPR34-defizienten Mäusen

Für die Grundcharakterisierung der GPR34-defizienten Mäuse wurden verschiedenste in dieser Tabelle aufgelistete Parameter im Vergleich zu gleichgeschlechtlichen und gleichaltrigen WT-Mäusen untersucht.

Parameter	Ergebnis	Kooperation
Morphologie und Histologie		
Gewichtsentwicklung, Körperlänge, Schwanzlänge, Fellentwicklung, Ohren aufstellen, Zähne, äußere Merkmale, Extremitäten, Organgewichte	keine Auffälligkeiten siehe suppl. Tab. S3	
HE-Färbung u. Toluidinblaufärbung wesentlicher Organe von WT- und KO-Mäusen	keine Auffälligkeiten (mündl. Mitteilung Dr. A. Ricken)	Dr. A. Ricken
Laborklinische Untersuchungen		
verschiedene Serumparameter (Elektrolyte, Enzyme), Blutglucose, Urinosmolalität, Differentialblutbild, AS/AC-Screening	siehe suppl. Tabs. S4-S6	Prof. J. Thiery

Verhalten		
SHIRPA-Protokoll, Verhalten im Käfig, Verhalten in der Arena, Verhalten bei Transfer, Positionspassivität, negative Geotaxis, Vokalisierung, Hörtest, Tag-Nacht-Rhythmus, Sozialverhalten, Reflexe etc.	keine signifikanten Unterschiede siehe suppl. Tab. S9	
Hot Plate-Test	keine signifikanten Unterschiede siehe suppl. Tab. S9	
Open Field-Test	siehe suppl. Tab. S10	
Light-Dark-Test	siehe suppl. Tab. S10	
Immunologische und Infektionsbiologische Tests		
DTH-Versuch (mit methyliertem BSA)	→4.4	
<i>Cryptococcus</i> -Infektion	→4.5	Dr. U. Müller,
FACS-Analyse Milzzellen	keine Unterschiede (mündl. Mitteilung Dr. U. Müller)	Dr. U. Müller

GPR34-defiziente Tiere entwickelten sich im Vergleich zu WT-Wurfgeschwistern in allen gemessenen Parametern morphologisch unauffällig. So gab es keine signifikanten Organgewichtsunterschiede zwischen adulten (3-Monate-alten) männlichen WT- und GPR34-defizienten Tieren (suppl. Tab. S3). Auch die histologische Untersuchung aller wesentlichen Gewebe und Organe zeigte in der HE- und Toluidinblau (Mastzellen)-Färbung keine signifikanten Unterschiede zwischen den Genotypen.

Blut, Serum und Urin adulter (3-Monate-alter) männlicher WT- und GPR34-defizienter Tiere wurde in Hinblick auf verschiedene Parameter im Institut für Laboratoriumsmedizin, Klinische Chemie und Molekulare Diagnostik des Universitätsklinikums Leipzig untersucht. Die initialen Untersuchungen von Serumparametern und des Differenzialblutbildes ergaben keine signifikanten Unterschiede zwischen WT- und GPR34-defizienten Tieren (suppl. Tabs. S4 und S5). Zwar zeigten einige Aminosäuren und Acylcarnitine signifikante Konzentrationsunterschiede (Ornithin, Threonin, C16:1, C18:1), jedoch waren diese geschlechtsspezifisch und erbrachten keine Hinweis auf eine definierte metabolische Störung (suppl. Tab. S6).

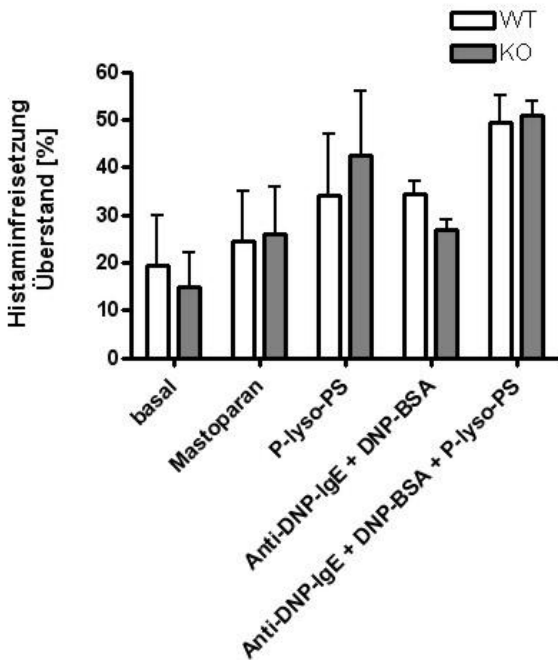
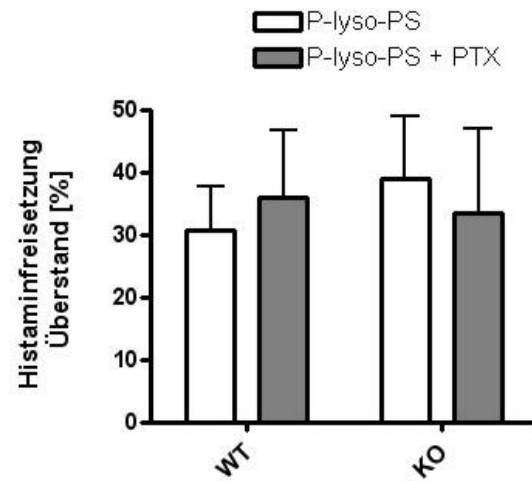
Mit 3-Monate-alten männlichen WT- und GPR34-defizienten Tieren wurden ausgiebige Verhaltens- und motorische, sensorische und autonome Funktionsanalysen (modifiziertes SHIRPA-Protokoll) (Rogers et al., 1997; Rogers et al., 2001) durchgeführt. In keinem dieser Tests konnte ein auffälliger Unterschied zwischen den beiden Genotypen identifiziert werden. Auch die Ergebnisse aus dem HPT waren identisch zwischen den beiden Gruppen (suppl. Tab. S9).

Im OFT zeigten die WT-Mäuse eine signifikant höhere Aktivität als die KO-Mäuse und suchten häufiger die Randbereiche der Arena auf (suppl. Tab. S10). Im LDT waren die GPR34-defizienten Tiere im hellen Bereich der Arena aktiver und hielten sich tendenziell im dunklen Bereich länger auf (suppl. Tab. S10). Insgesamt war jedoch kein konsistenter Verhaltensphänotyp in diesen Untersuchungen erkennbar.

4.3 Lyso-PS aktiviert Mastzellen nicht über den GPR34

Mit der Etablierung des GPR34-defizienten Mausmodells bestand erstmals die Möglichkeit, auch auf zellulärer Ebene WT- und GPR34-defiziente Zellen miteinander in ihren Funktionen zu vergleichen. Die Arbeitsgruppe von Mori hatte mittels RT-PCR eine starke Expression des GPR34 vor allem in Mastzellen nachgewiesen (Sugo et al., 2006). *Lyso-PS* ist seit langem als Substanz bekannt, die zu einer Potenzierung der Histaminfreisetzung aus Mastzellen führt (→1.4.4). Deshalb wurde vermutet, dass der GPR34 der gesuchte G_i -gekoppelte GPCR ist, über den dieser Effekt vermittelt wird.

Diese Hypothese wurde an Peritoneal-Mastzellen überprüft, die aus WT- und GPR34-defizienten Mäusen durch eine Peritoneallavage (→3.8.1) gewonnen wurden. Die Messung der Histaminfreisetzung aus Mastzellen war in der AG von Prof. H. Fuhrmann (Veterinärmedizin, Universität Leipzig) etabliert und konnte durch die Zusammenarbeit mit dieser Gruppe für die Fragestellung an GPR34-defizienten Mastzellen genutzt werden. Wie in Abbildung 12 gezeigt, konnte zwar eine *lyso-PS*-induzierte Potenzierung der IgE-vermittelten Histaminfreisetzung bestätigt werden, jedoch war diese unabhängig von der Präsenz des GPR34. Dieser Effekt war auch nicht PTX-sensitiv (Abb. 12).

A**B****Abb. 12 Histaminfreisetzung aus peritonealen Mastzellen.**

(A) Peritoneale Mastzellen wurden aus Wildtyp (WT)- und GPR34-defizienten (KO) Mäusen durch Peritoneallavage und kurzzeitige Kultivierung gewonnen. Für die IgE-vermittelte Histaminfreisetzung wurden die Zellen mit anti-DNP-BSA-IgE und DNP-BSA inkubiert. Zur Potenzierung der Histaminfreisetzung wurden die Zellen zusätzlich mit P-lyso-PS (10 μ M) stimuliert. Mastoparan wurde als Positivkontrolle eingesetzt. (B) Mastzellen von Wildtyp- und KO-Tieren wurden 4 h mit PTX vorbehandelt und anschließend mit P-lyso-PS stimuliert. Diesen Untersuchungen liegen drei Experimente (Mittelwert \pm SEM) zugrunde, für die Zellen aus jeweils 6 Mäusen jedes Genotyps gepoolt wurden. Die basale Histaminfreisetzung lag bei diesen Experimenten genotypunabhängig bei $6,0 \pm 2,3$ %.

4.4 Peritonealen monozytäre Zellen aus GPR34-defizienten Mäusen zeigen eine verstärkte basale Migration

Verschiedene Studien berichteten, dass lyso-PS chemotaktisch auf migrationsfähige Zellen wirken kann (Lee et al., 2008; Park et al., 2005; Park et al., 2006). Um dies zu testen, wurden aus WT- und KO-Mäusen Peritonealzellen mittels Lavage gewonnen und die chemotaktische Wirkung von S-lyso-PS auf diese Zellen untersucht. Wie erwartet, wirkte lyso-PS chemotaktisch auf Peritonealzellen aus WT-Tieren (Abb. 13A). Dieser Effekt war bei Zellen aus KO-Mäusen nicht zu sehen. Jedoch muss hier die sehr hohe basale Migration der GPR34-defizienten Zellen im Vergleich zum WT in Betracht gezogen werden (Abb. 13B). So wiesen GPR34-defiziente Zellen eine 1,8-fach höhere Basalmigration auf, während die Liganden-vermittelte Chemotaxis bei den WT-Zellen lediglich eine 1,4-fache Steigerung der Migrationsrate bei maximaler

Stimulation zeigte. Es ist deshalb davon auszugehen, dass die hohe basale Migration der GPR34-defizienten Zellen eine mögliche *lyso*-PS-vermittelte Chemotaxis maskierte.

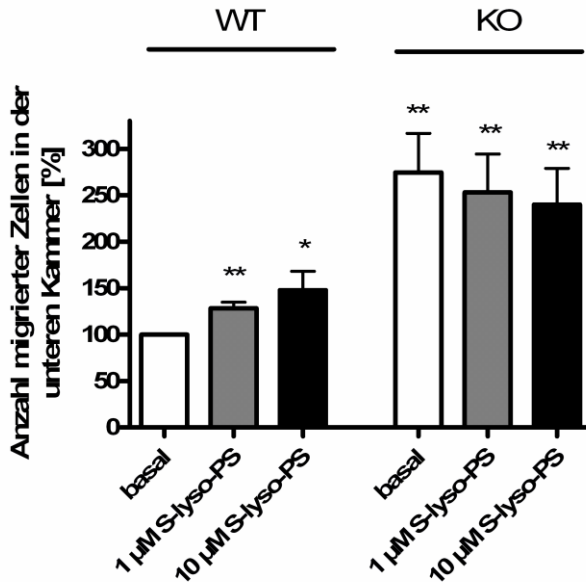


Abb.13 Chemotaxis von Peritoneallavagezellen. Monozyten wurden mit verschiedenen Konzentrationen von *S-lyso*-PS inkubiert. Der Prozentteil, der in die untere Kammer migrierten Zellen wurde in Bezug auf den Basalwert der migrierten WT Zellen angegeben (100% = $5,6 \times 10^5$ Zellen). Dargestellt sind Mittelwerte \pm S.E.M der Versuche mit jeweils 5 Tieren pro Gruppe, jedes Experiment wurde in Duplikaten durchgeführt. Die Unterschiede, in Bezug auf die basale Migration von Zellen aus WT-Tieren, wurde auf ihre Signifikanz, mittels Student's t-Test untersucht: * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$.

4.5 Verstärkte DTH-Reaktion in GPR34-defizienten Mäusen

Im DTH-Test werden das Ausmaß und der zeitliche Ablauf vor allem der immunologischen Th1-Antwort untersucht. In diesem Test zeigten die GPR34-defizienten Tiere nach 24 h eine signifikant stärkere Schwellung der methylBSA-injizierten Pfote als die WT-Tiere (Abb. 14). Dieser signifikante Unterschied war auch noch nach 50 h (Abbruch des Versuchs) bei den KO-Tieren zu beobachten.

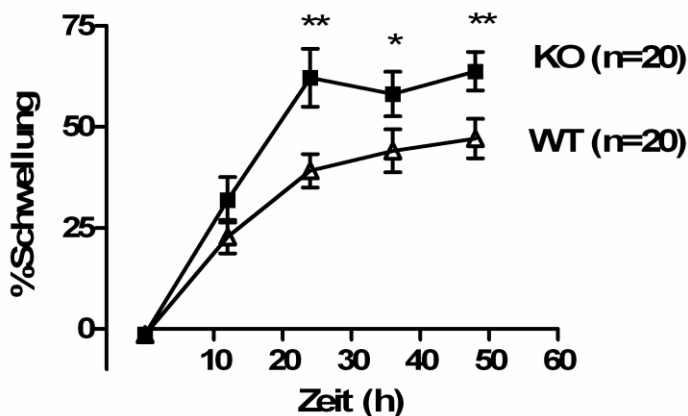


Abb. 14 DTH-Test an methylBSA-immunisierten Mäusen.

Mäuse wurden mit methylBSA s.c. immunisiert und nach 8 Tagen erfolgte die Injektion von methylBSA in die linke Hinterpfote und in die rechte Hinterpfote (Referenz) wurde nur die Trägerlösung injiziert. Die Messung der Pfootenschwellung erfolgte mit einer Millimeterschraube und ist in Prozent in Relation zur Referenzpfote über die Zeit angegeben. Dargestellt sind die Mittelwerte \pm SEM aus zwei unabhängigen Versuchen mit je 10 Tieren. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$

Die verstärkte DTH-Reaktion bei den GPR34-defizienten Tieren war verbunden mit einer signifikant erhöhten basalen Konzentration aller untersuchten Zytokine im Überstand der angelegten Milzzellkultur (Tab. 3). Die methylBSA-Stimulation der kultivierten Zellen aus den Milzen von WT- und KO-Tieren führte bei den meisten Zytokinen zu einer Konzentrationszunahme (Tab. 3). Auch hier war die Konzentration vieler Zytokine bei den GPR34-defizienten Tieren signifikant höher als bei den WT-Tieren. Betrachtet man jedoch die relativen Veränderungen, so waren diese bei den Zytokinen aus den WT-Tieren deutlich höher.

Tab. 3 Quantifizierung verschiedener Zytokine in Milzzellkulturüberständen.

Am Ende eines DTH-Versuchs (siehe oben in diesem Abschnitt) wurden die Milzen der Versuchstiere (n=10 pro Genotyp) entnommen und die Milzzellen kultiviert (→3.8.4). In den Überständen der unbehandelten und methylBSA behandelten Milzzellen wurden die gelisteten Zytokine in einem Multiplextest quantifiziert. Dargestellt sind die Mittelwerte ± SD. Signifikante Unterschiede zwischen den WT- und KO-Tieren in den jeweiligen Gruppen: *p < 0,05; **p < 0,01

	Basal		methylBSA (20 µg/ml)		Ratio methylBSA/Basal	
	WT (pg/ml)	KO (pg/ml)	WT (pg/ml)	KO (pg/ml)	WT	KO
TNF-α	19,5 ± 0,8	48,7 ± 3,8**	69,7 ± 1,5	103 ± 5,7**	3,6	2,1
IFN-γ	76,0 ± 25	329 ± 56,5*	366 ± 55,3	735 ± 89,5*	4,8	2,2
GM-CSF	31,8 ± 4,2	128,0 ± 9,7**	228 ± 2,5	402 ± 62,8	7,1	3,1
IL-2	558 ± 90	2290 ± 86**	557 ± 6,1	2684 ± 317**	1	1,2
IL-4	12,0 ± 1,0	58,4 ± 3,3**	43,2 ± 2,6	38,2 ± 3,4	3,6	0,6
IL-5	9,9 ± 2,2	47,1 ± 8,9*	47,5 ± 1,7	122 ± 8,2**	4,8	2,6
IL-10	24,8 ± 4,4	127 ± 5,5**	18,3 ± 0,8	48,2 ± 4,6*	0,7	0,4
IL-12	3,3 ± 0,2	11,4 ± 0,7**	18,0 ± 2,3	17,1 ± 0,8	5,4	1,5

4.6 Erhöhte Pathogenität von *C. neoformans* in GPR34-defizienten Mäusen

Cryptococcus neoformans ist ein bekapselter Hefe-ähnlicher Pilz und der wichtigste Erreger der Kryptokokkose. Nach inhalativer Aufnahme des Erregers bilden sich Lungenrundherde (Kryptokokkome). Im Krankheitsverlauf breitet sich der Pilz bis ins Zentralnervensystem aus. Die Geschwindigkeit und das Ausmaß der hämatogenen Streuung der Kryptokokkose werden bestimmt von der zellulären Infektabwehr. So erleichtert z.B. eine Immundefizienz die Generalisierung der Kryptokokkose.

WT- und KO-Mäuse wurden intranasal mit *C. neoformans* infiziert und der Erkrankungsverlauf beobachtet. Nach drei Monaten wurden die Tiere getötet und die Lungen, die Milz und das Gehirn entnommen. Bereits makroskopisch war bei den meisten KO-Tieren ein massiver Befall der Organe zu beobachten (Abb. 15A), aber auch in den WT-Tieren fanden sich sichtbare Kryptokokkome. Deshalb war eine Quantifizierung der Erregerlast notwendig. In allen drei Organen fanden sich signifikant höhere Erregerzahlen (Abb. 15B).

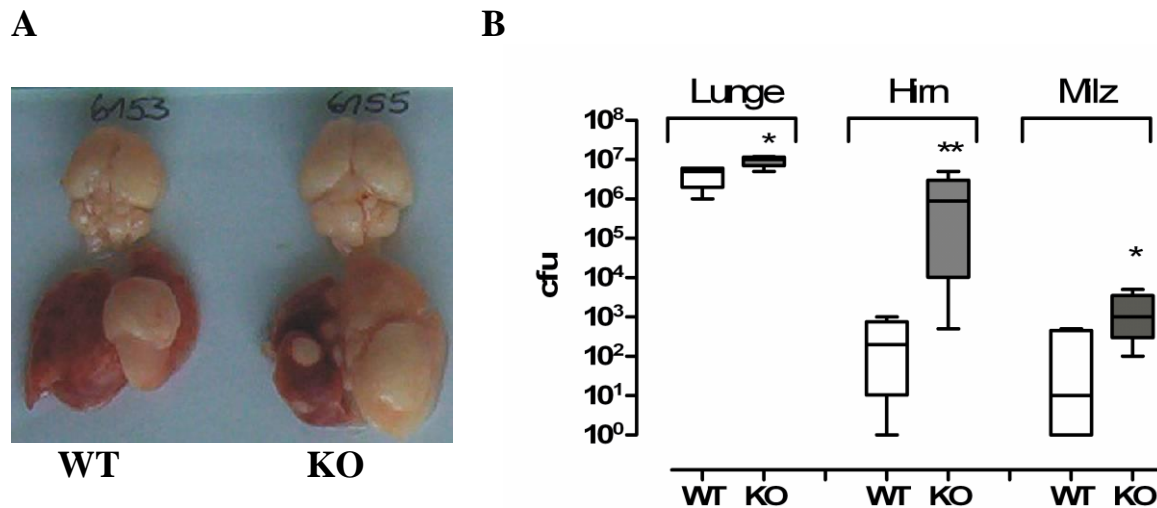


Abb. 15 Kryptokokkose bei *C. neoformans*-infizierten Mäusen.

A) WT- und KO-Mäuse wurden mit *C. neoformans* intranasal infiziert, die Tiere nach drei Monaten getötet und die Lungen, die Milz und das Gehirn entnommen. A) In den Lungen und Gehirnen der Tiere fanden sich makroskopisch sichtbare Kryptokokkome. B) Die Organlast mit dem Pilz wurde durch Ausplattieren von verdünnten Organsuspensionen und Auszählen der Kolonien quantifiziert. Dargestellt sind die Mittelwert, 95 % Perzentilen und Ranges von je 5 Tieren. *p < 0,05; **p < 0,01

Die Untersuchung der Zytokinkonzentration in naiven und *Cryptococcus*-exponierten Tieren zeigte ein gegensätzliches Bild. Naive Zellpopulationen aus WT- und KO-Tieren, die nicht zuvor in Kontakt mit dem Erreger gekommen waren, produzierten größtenteils sehr geringe Mengen an Zytokinen (Tab. 4). Eine Ausnahme bildete IL-2, welches mit >40 pg/ml in wesentlich höherer Konzentration vertreten war als alle anderen Zytokine. GPR34-defiziente Zellen zeigten fast immer eine geringere Zytokinkonzentration als WT-Tiere. Nach Exposition mit dem attenuierten *Cryptococcus*-Stamm CAP67 kam es bei den naiven Zellen beider Genotypen zu einer Reduktion der Zytokine. Ausnahmen bildeten lediglich IL-4 und TNF- α .

In Zellpopulationen aus infizierten Tieren zeigte sich eine starke basale Erhöhung der Zytokinkonzentration bei KO-Zellen, während die basale Zytokinkonzentration der WT-Zellen

größtenteils ähnlich gering blieb wie bei naiven Zellen. Eine erneute Exposition mit dem *Cryptococcus*-Antigen verursachte beim Wildtypen eine Steigerung der Zytokinkonzentration. Diese blieb jedoch immer noch niedriger als die Zytokinkonzentration der GPR34-defizienten Zellen, welche im Gegensatz zu den basalen Werten, mit Ausnahme von TNF- α und IL-12, sogar geringer wurden (Tab. 5).

Tab. 4 Quantifizierung verschiedener Zytokine in Lungenlavage naiver Mäuse.

Am Ende eines Infektionsversuchs mit *Cryptococcus* wurden pulmonale Zellen mittels Lavage aus nicht-infizierten Tieren gewonnen (n=3 pro Genotyp) und kultiviert (\rightarrow 3.8.5). In den Überständen der unstimulierten und mit dem attenuierten *Cryptococcus*-Stamm CAP67 (hiCap) behandelten pulmonalen Zellen wurden die gelisteten Zytokine in einem Multiplextest quantifiziert. Dargestellt sind die Mittelwerte \pm SD. Signifikante Unterschiede zwischen den WT und KO-Tieren in den jeweiligen Gruppen: *p < 0,05; **p < 0,01; n.m.= nicht messbar da unterhalb der Nachweisgrenze.

	Basal		hiCap		Ratio hiCap/Basal	
	WT (pg/ml)	KO (pg/ml)	WT (pg/ml)	KO (pg/ml)	WT	KO
TNF- α	3,5 \pm 2,5	2,7 \pm 0,7	24,4 \pm 4,5	n.m.**	7,0	0,3
IFN- γ	9,8 \pm 8,7	n.m.**	n.m.	n.m.	0	1
GM-CSF	7,5 \pm 0,7	3,7 \pm 1,7*	5,6 \pm 1,9	n.m.**	0,8	0
IL-2	43,9 \pm 3,0	43,7 \pm 9,7	22,6 \pm 0,8	9,5 \pm 1,1**	0,5	0,2
IL-4	13,8 \pm 0,4	15,1 \pm 1,0	28,6 \pm 3,0	22,8 \pm 0,9*	2,1	1,5
IL-5	2,0 \pm 0,3	2,3 \pm 1,1	1,2 \pm 0,2	1,0 \pm 0,5	0,6	0,5
IL-10	11,4 \pm 2,3	4,3 \pm 1,3**	8,7 \pm 1,0	n.m.**	0,8	0
IL-12	3,4 \pm 0,7	1,1 \pm 0,6*	3,8 \pm 1,0	1,7 \pm 0,9	1,1	1,5

Tab. 5 Quantifizierung verschiedener Zytokine in Lungenlavage infizierter Mäuse.

Am Ende eines Infektionsversuchs mit *Cryptococcus* wurden pulmonale Zellen mittels Lavage aus infizierten Tieren gewonnen (n=3 pro Genotyp) und kultiviert (→3.8.5). In den Überständen der unstimulierten und mit dem attenuierten *Cryptococcus*-Stamm CAP67 (hiCap) behandelten pulmonalen Zellen wurden die gelisteten Zytokine in einem Multiplextest quantifiziert. Dargestellt sind die Mittelwerte ± SD. Signifikante Unterschiede zwischen den WT und KO-Tieren in den jeweiligen Gruppen: *p < 0,05; **p < 0,01; n.m.= nicht messbar, unterhalb der Nachweisgrenze.

	Basal		hiCap		Ratio hiCap/Basal	
	WT (pg/ml)	KO (pg/ml)	WT (pg/ml)	KO (pg/ml)	WT	KO
TNF- α	1,9 ± 0,7	12,7 ± 1,9**	362,0 ± 33,5	794,8 ± 175,2*	188,5	62,8
IFN- γ	n.m.	62,4 ± 7,9**	n.m.	18,5 ± 12,7	1	0,3
GM-CSF	10,1 ± 2,5	24,8 ± 1,9**	15,9 ± 1,4	20,2 ± 0,9**	1,6	0,8
IL-2	25,7 ± 2,8	135,8 ± 3,8**	28,3 ± 2,6	48,5 ± 0,6**	1,1	0,4
IL-4	9,0 ± 0,4	19,6 ± 0,8**	18,7 ± 1,2	39,3 ± 4,2**	2,1	2
IL-5	35,5 ± 5,1	115,5 ± 1,2**	49,9 ± 6,2	81,7 ± 6,0**	1,4	0,7
IL-10	15,4 ± 2,6	72,3 ± 10,1**	25,6 ± 5,3	38,6 ± 6,6	1,7	0,5
IL-12	1,1 ± 1,3	4,6 ± 1,8	2,8 ± 0,2	7,0 ± 1,5**	2,6	1,5

4.7 Differenzielle Genexpression im Myokard GPR34-defizienter Mäuse

Die genomweite Expressionsanalyse von RNA mittels der *Microarray*-Technologie ermöglicht einen parallelen und effizienten Vergleich von Genexpressionsmustern in Organen, Geweben und Zellen, z.B. zwischen WT- und KO-Tieren. Damit lassen sich auch komplexe Veränderungen erfassen und oft auch erstmals erkennen. Da Organe und Gewebe meist aus einer Vielzahl verschiedener Zelltypen und aus Zellen mit unterschiedlichen Funktionen bestehen, können Expressionsveränderungen, die durch die Gendefizienz in einigen wenigen Zellen auftreten, aufgrund ihrer zu geringen Quantität unentdeckt bleiben. Deshalb eignen sich für genomweite Expressionsanalyse besonders Zelllinien oder Organe/Gewebe mit einer geringen Zelldiversität.

Transkripte des GPR34 wurden in allen bisher untersuchten Organen und Geweben der Maus, der Ratte und des Menschen gefunden (→1.4.3). Die Expression des GRPR34 wurde im Herzmuskel von Nagern besonders gut untersucht und zeigte dort im Vergleich zu anderen Geweben durchschnittliche Transkriptmengen, die von beiden GPR34-Promotoren ausgehen (Engemaier et al., 2006). Da das Ventrikelmyocard den GPR34 exprimiert und im Wesentlichen nur aus Myozyten aufgebaut ist, eignete es sich besonders gut für die Beantwortung der Frage, welche

molekularen Folgen eine GPR34-Defizienz hat. Für eine genomweite Expressionsanalyse wurden aus dem Ventrikelmyocard von je 5 männlichen WT- und GPR34-defizienten Mäusen die Gesamt-RNA präpariert und mittels der *Microarray*-Technologie untersucht.

4.7.1 Validierung der *Microarray*-Daten

Um die Qualität der RNA-*Microarray*-Daten zu validieren, wurde zunächst überprüft, ob die GPR34-Expression den Genotypen entsprach. Sowohl nach der RMA- als auch nach der MAS5-Datenanalyse erhielt keine der KO-Mäuse für das GPR34-Transkript eine Zuordnung „*Present*“ wohingegen vier der fünf WT-Mäuse für das GPR34-Transkript die Zuordnung „*Present*“ erhielten. Auch die quantitative Analyse bestätigte die GPR34-Defizienz als hoch signifikant ($p < 0,0001$) (Tab. 6). Als nächstes wurde die Quantität von Myokard-spezifischen Transkripten untersucht. So fanden sich unter den 20 höchst exprimierten Transkripten Komponenten des kontraktiven Apparates des Herzmuskels, wie die schwere Kette des kardialen Myosins (Myh6), das kardiale α -Actin (ACTC1), die leichten Ketten des kardialen Myosins (Myl2, Myl3), das kardiale Troponin 2 (Tnnt2) sowie das kardiale Phospholamban (Pln). Diese nahezu ausschließlich kardial hoch exprimierten Gene belegen die Authentizität des untersuchten Gewebes. Sogenannte „House-keeping genes“ wie das β 2-Mikroglobulin (B2m) und Clathrin (Clta, Cltc) zeigten im Myokard keine signifikant unterschiedlichen Expressionsspiegel zwischen KO- und WT-Mäusen.

Tab. 6 Validierung der *Microarray*-Daten.

Die Daten wurden MAS5-normiert und die Mittelwerte von je 5 Tieren pro Genotyp dargestellt.

Probe Set ID	Gensymbol	Protein	MAS5	MAS5	Fold Change	p-Wert
			KO	WT		
1422542_at	GPR34	G-Protein-gekoppelter Rezeptor 34	8	169	0,05	<0,0001
1448826_at	Myh6	kardiales Myosin, schwere Kette	42962	48236	0,89	0,15
1448394_at	Myl2	kardiales Myosin, leichte Kette	34284	41500	0,83	0,06
1427768_s_at	Myl3	kardiales Myosin, leichte Kette	37491	42256	0,89	0,15
1415927_at	ACTC1	kardiales α -Actin	35675	44088	0,81	0,07
1424967_x_at	Tnnt2	kardiale Troponin 2	40008	46013	0,87	0,07
1460332_at	Pln	Phospholamban	37918	45005	0,84	0,02
1449289_a_at	B2m	β 2-Mikroglobulin	12692	11989	1,06	0,58
1449289_a_at	Clta	Clathrin, leichte Kette	4448	4167	1,07	0,53
1449289_a_at	Cltc	Clathrin, schwere Kette	5909	5725	1,03	0,78

4.7.2 Genomweite Expressionsunterschiede im Myokard von KO- und WT-Tieren

In dieser Studie wurde zur Genexpressionsanalyse der *GeneChip® Mouse Genome Array 430A 2.0* von Affymetrix verwendet. Er repräsentiert 45.037 *Probe Sets*, die die parallele Analyse von mehr als 14.000 murinen Genen erlauben. *Probe Sets* sind ein Satz von Oligonukleotidsonden, die komplementär zur Sequenz des zu untersuchenden Transkripts sind. Dabei besteht jedes *Probe Set*, dem jeweils eine ID zugeordnet wird, aus 11 solcher Oligonukleotidsonden. Zur Datenquantifizierung wird die Fluoreszenzintensität der an die Sonden gebundenen cRNA ausgewertet. Diese Rohdaten werden nach Algorithmen, wie z.B. MAS5, auf Chip-interne Standards normiert und die *Probe Sets* zunächst in so genannte „*Present*“ und „*Absent*“ *Calls* gruppiert. Für diese Studie wurde ein Transkript (bzw. *Probe Set*) als 'exprimiert' definiert, wenn es in mindestens drei der fünf Tiere eines Genotyps die Zuordnung „*Present*“ erhalten hat. Nur solche Transkripte sind in der nachfolgenden Auswertung berücksichtigt worden. Basierend auf dieser Prämisse konnten im Myokard der männlichen WT- und GPR34-defizienten Tiere 18.265 *Probe Sets* als 'exprimiert' detektiert werden. Diese korrespondieren mit ca. 8.660 annotierten Genen. Die statistische Auswertung ergab, dass 0,8 % der *Probe Sets* (362, ~ 170 annotierte Gene) mit $p \leq 0,01$ (suppl. Tab. S11) bzw. 3,5 % (1591, ~750 annotierte Gene) mit $p \leq 0,05$ signifikant zwischen den beiden Genotypen reguliert waren.

4.7.3 Klassifizierung differentiell regulierter Gene im Myocard von KO- und WT-Tieren

In einem nächsten Schritt wurde versucht, die signifikant regulierten Transkripte ($p < 0,01$) Datenbank- und Computer gestützt in einen zellbiologischen, biochemischen und physiologischen Kontext zustellen. Verschiedene Programme sortieren regulierte Gene beispielsweise anhand ihrer Funktion oder Lokalisation innerhalb der Zelle. Solche Programme sind *Onto-Express* (Draghici et al., 2003), *Gene Set Enrichment Analysis* (GSEA) (Subramanian et al., 2005) oder auch *Gene Map Annotator and Pathway Profiler* (GenMAPP). Im Rahmen dieser Arbeit wurden vorrangig *Onto-Express* und GSEA genutzt. Diese Programme greifen auf Datenbanken wie Biocarta oder *Gene Ontology* (GO, <http://www.geneontology.org/index.shtml>) zurück. GO ordnet Genprodukte anhand drei definierter Kategorien (Ontologien): *biological processes*, *cellular components* und *molecular function*. Die Ontologie 'biological process' zum Beispiel unterteilt sich dann weiter die Gruppen 'binding, enzyme activity, receptor activity und transporter activity'.

Um die signifikant regulierten Gene des Myokards von WT- und GPR34-defizienten Tieren in funktionelle Systeme einzuordnen, wurden diese zunächst mit dem *Onto-Express* Programm (Draghici et al., 2003) analysiert (Tab. 7). Signifikante Unterschiede zwischen WT- und KO-Mäusen wurden in den Kategorien „Translationsinitiierung“ und „Prostaglandinstoffwechsel“ sowohl in der RMA- als auch MAS5-Analyse gefunden. Alle anderen signifikanten Unterschiede waren zwischen den beiden Analyseverfahren nicht deckungsgleich.

Die Untersuchung der regulierten Gene mittels GSEA zeigte lediglich 3 funktionelle Systeme, die sich signifikant zwischen den Genotypen unterschieden (Tab. 8). Dies waren Signalkaskaden der Apoptose, Mitose und MAP-Kinasen, welche sich in der RMA Analyse als herunterreguliert darstellten. Die MAS5 Analyse konnte diese Befunde allerdings nicht bestätigen.

Eine klare molekulare Hypothese zur Relevanz der GPR34-Funktion im Myokard konnte somit weder mit der *Onto-Express*- noch mit der Gene Set Enrichment-Methode formuliert werden.

Tab. 7 Onto-Express-Analyse der signifikant regulierten Gene im Myocard GPR34-defizienter Mäuse im Vergleich zu WT-Tieren.

Die Analyse erfolgte auf Basis der RMA- und MAS5-normierten Datensätzen, die nur solche *Probe Sets* enthielten, die mindestens in einer Gruppe (KO oder WT) dreimal als *Present* detektiert wurden. Es wurden nur *Probe Sets* mit einer statistisch signifikanten Regulation von $p \leq 0,01$ in die GO-Analyse einbezogen. Die Tabelle zeigt die GO-Gruppen aus der Kategorie *biological process* und *molecular function* die eine statistisch signifikante Anzahl differentiell exprimierter Transkripte aufweist ($p \leq 0,01$). Weiterhin ist die absolute Anzahl der regulierten Gene angegeben.

RMA-Analyse		
GO biological process	N	p-Wert
Calcium ion transport	8	0,0020
DNA replication	7	0,0092
nuclear mRNA splicing, via spliceosome	4	0,0014
regulation of cell shape	5	0,0040
cytokine and chemokine mediated signaling pathway	4	0,0094
translational initiation	4	0,0022
nucleotide-excision repair	3	0,0084
ER to Golgi vesicle-mediated transport	3	0,0084
respiratory gaseous exchange	3	0,0084
vacuole organization and biogenesis	2	0,0030
regulation of epithelial cell differentiation	2	0,0030
glutathione biosynthetic process	2	0,0099
positive regulation of inflammatory response	2	0,0049
prostaglandin metabolic process	2	0,0072
cortical actin cytoskeleton organization and biogenesis	2	0,0099
blastocyst growth	2	0,0030
response to bacterium	2	0,0099
SRP-dependent cotranslational protein targeting to membrane	2	0,0049
regulation of mitotic metaphase/anaphase transition	2	0,0049
GO molecular function		
DNA binding	55	0,0014
molecular_function	38	0,0065
Binding	25	0,0042
GTP binding	16	0,0017
ubiquitin-protein ligase activity	8	0,0022
translation initiation factor activity	7	0,0013
transcription corepressor activity	6	0,0016
heat shock protein binding	5	0,0037
RNA splicing factor activity, transesterification mechanism	3	0,0022
histone-lysine N-methyltransferase activity	3	0,0098
AU-rich element binding	2	0,0030
phosphoinositide 3-kinase regulator activity	2	0,0049
7S RNA binding	2	0,0030
mannosyl-oligosaccharide 1,2-alpha-mannosidase activity	2	0,0099

MAS5-Analyse		
GO biological process	N	p-Wert
regulation of transcription, DNA-dependent	42	0,0023
Transcription	35	0,0061
Translation	10	0,0069
mRNA processing	9	0,0089
protein targeting	6	0,0018
in utero embryonic development	6	0,0070
regulation of cell growth	5	0,0038
translational initiation	3	0,0069
prostaglandin metabolic process	2	0,0036
GO molecular function		
zinc ion binding	41	0,0080
transferase activity	33	0,0076
actin binding	11	0,0023
methyltransferase activity	8	0,0011
isomerase activity	7	0,0028
transcription coactivator activity	5	0,0034
microtubule plus-end binding	2	0,0015
anion transmembrane transporter activity	2	0,0083

Tab. 8 Auswertung der Gene Set Enrichment Analysis (GSEA) der signifikant regulierten Gene im Myocard GPR34-defizienter Mäuse.

Angegeben sind die Anzahl der regulierten Transkripte innerhalb der Gensets (N), der nominale p-Wert, der q-Wert für die Falschpositivrate (*false discovery rate*; FDR q) sowie der korrigierte p-Wert (*familywise-error rate corrected p-value*; FWER p). Der Schwellenwert für Gensets von relevanter Bedeutung ist $p \leq 0,05$ bzw. $FDR \leq 0,25$. Die Auswertung erfolgte sowohl für die MAS5- als auch für die RMA-normierten Datensätze der *Microarrays*. Ausgewählte KEGG (*Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes*) Signal- und Stoffwechselwege, GSEA-interne Datensätze (MsigDB), sowie Gensets aus *Gene Ontology*-basierter „*molecular function*“ Schlüsselwortsuche bildeten die Grundlage der Analyse mit der GSEA Software.

NAME	N	p-Wert	FDR q	FWER p
RMA down-regulated				
APOPTOSIS	47	0,021	0,101	0,088
MOTOR SIGNALLING PATHWAY	22	0,035	0,053	0,094
GEN MAPP G-PROTEIN SIGNALLING PATHWAY	67	0,038	0,204	0,338
LONG TERM POTENTIATION	44	0,124	0,419	0,620
LONG TERM DEPRESSION	45	0,105	0,352	0,634
ABC TRANSPORTER	23	0,159	0,333	0,660
INSULIN SIGNALLING PATHWAY	140	0,111	0,326	0,708
MAPK SIGNALLING PATHWAY	152	0,133	0,369	0,754
ERBB SIGNALLING PATHWAY	30	0,309	0,455	0,842
REGULATION OF ACTIN CYTOSKELETON	125	0,302	0,479	0,878
WNT SIGNALLING PATHWAY	92	0,414	0,538	0,914
ADIPOCYTOKINE SIGNALLING	45	0,650	0,788	0,984
TIGHT JUNCTION	76	0,705	0,731	0,984
JAK STAT SIGNALLING PATHWAY	18	0,827	0,909	0,996
PPAR SIGNALLING PATHWAY	49	0,970	0,992	1,000

RMA upregulated				
NEUROACTIVE LIGAND REZEPTOR INTERACTION	58	0,268	1,000	0,922
ARACHIDONIC ACID METABOLISM	20	0,367	1,000	0,940
EICOSANOIDSYNTHESES	41	0,444	0,928	0,958
PROSTAGLANDIN SYNTHESIS REGULATION	21	0,522	0,892	0,978
CELL HOMEOSTASIS	50	0,810	1,000	0,992
GAP JUNCTION	25	0,747	1,000	0,992
CELL CYCLE	78	0,822	0,976	0,998
TYROSIN METABOLISM	30	0,927	0,928	0,998
MAS5 down-regulated				
MOTOR SIGNALLING PATHWAY	22	0,44	1,00	0,96
ABC TRANSPORTER	23	0,41	1,00	0,96
LONG TERM DEPRESSION	45	0,48	1,00	0,99
INSULIN SIGNALLING PATHWAY	140	0,53	1,00	0,99
ERBB SIGNALLING PATHWAY	30	0,56	1,00	0,99
LONG TERM POTENTIATION	44	0,64	1,00	0,99
GEN MAPP G-PROTEIN SIGNALING PATHWAY	67	0,77	1,00	1,00
REGULATION OF ACTIN CYTOSKELETON	125	0,86	1,00	1,00
APOPTOSIS	47	0,74	1,00	1,00
NEUROACTIVE LIGAND REZEPTOR INTERACTION	58	0,79	1,00	1,00
CELL CYCLE	78	0,75	0,95	1,00
TIGHT JUNCTION	76	0,93	1,00	1,00
WNT SIGNALLING PATHWAY	92	0,98	0,94	1,00
MAS5 upregulated				
GAP JUNCTION	25	0,23	1,00	0,94
EICOSANOIDSYNTHESES	41	0,26	1,00	0,96
ADIPOCYTOKINE SIGNALLING	45	0,30	1,00	0,97
ARACHIDONIC ACID METABOLISM	20	0,39	0,99	0,97
CELL HOMEOSTASIS	50	0,56	1,00	0,99
CALCIUM SIGNALLING PATHWAY	86	0,81	1,00	0,99
MAPK SIGNALLING PATHWAY	152	0,79	1,00	1,00
JAK STAT SIGNALLING PATHWAY	18	0,70	1,00	1,00
PPAR SIGNALLING PATHWAY	49	0,91	1,00	1,00
TYROSIN METABOLISM	30	0,88	1,00	1,00
PROSTAGLANDIN SYNTHESIS REGULATION	21	0,95	0,96	1,00

4.7.4 Charakterisierung und Validierung einer Auswahl differentiell regulierter Gene

Auf der Basis ihrer Präsenz und der Signifikanz einer differentiellen Expression zwischen KO- und WT-Tieren wurde eine Rangliste von Transkripten erstellt (suppl. Tab. S11). Für eine Verifizierung der Expressionsunterschiede wurde eine qPCR-Analyse ausgewählter Transkripte dieser Liste durchgeführt. Hierzu wurden cRNA-Proben von zwei WT und fünf KO-Tieren noch einmal einer Microarray-Analyse unterzogen. Transkripte, die in beiden unabhängigen Tests signifikant unterschiedlich zwischen WT- und KO-Tieren reguliert waren, wurden dann in der qPCR näher untersucht (Tab. 9). Die Validität der Methode der qPCR wurde durch die

hochsignifikante Herunterregulation des GPR34 in den KO-Herzen bestätigt. Von den restlichen 21 untersuchten Genen waren lediglich Hsd17b7 und Epha4 signifikant in die gleiche Richtung wie im Microarray reguliert. Vier weitere Gene erwiesen sich in der qPCR-Untersuchung als signifikant reguliert, jedoch mit Ausprägung zur entgegengesetzten Regulationsrichtung verglichen mit den Affymetrix-Chip-Analysen.

Tab. 9 RNA-Expressionsanalyse ausgewählter Transkripte mittels Echtzeit-qPCR und Microarray.

In der Tabelle sind die Transkripte mit ihren zugehörigen *Probe Set IDs* und die Expressionsveränderungen in der qPCR und aus den RMA- und MAS5-normierten Microarray-Datensätzen nur im Vergleich zum WT angegeben (Mittelwert \pm SEM). Ein aufgeführtes Transkript musste mindestens bei drei der fünf Tiere eines Genotyps die Zuordnung „Present“ erhalten haben. Die N-Zahl der qPCR-Experimente ist in Klammern angegeben. Die entsprechenden ΔC_T -Werte sind im Anhang in suppl. Tab. S11 aufgeführt. Signifikante Veränderungen sind markiert mit: * $p \leq 0,05$; ** $p \leq 0,01$; *** $p \leq 0,001$.

Genname	Gensymbol	Probe Set ID	qPCR	RMA/MAS5
Hydroxysteroid (17-beta) dehydrogenase 7	Hsd17b7	1417871_at	2,0 \pm 1,2 (8)*	1,94* / 2,61**
		1457248_x_at		1,53 / 1,50
Prostaglandin I Rezeptor (IP)	Ptgir	1427313_at	1,5 \pm 0,7 (9)	1,07 / 0,82
Prostaglandin E Rezeptor 4 (subtype EP4)	Ptger4	1421073_a_at	1,2 \pm 0,6 (9)	1,02 / 1,05
		1424208_at		1,16 / 0,99
Calcium/Calmodulin-abh. Serin Proteinkinase	CASK	1445152_at	1,0 \pm 0,5 (9)	0,98 / 0,77
		1422519_at		1,06 / 0,91
Zinkfinger, DHHC domain containing 14	Zdhhc14	1437614_x_at	1,0 \pm 0,5 (7)	1,99* / 1,63*
		1437616_x_at		1,05 / 1,09
		1438619_x_at		0,81 / 0,84
		1438975_x_at		1,47 / 1,52*
		1423668_at		0,86 / 1,06
neural precursor cell expressed, developmentally down-regulated gene 4	NEDD4	1421955_a_at	1,2 \pm 0,4 (9)	2,18* / 3,28*
		1451109_a_at		0,91 / 1,00
		1450431_a_at		0,87 / 0,93
Eph Rezeptor A4	Epha4	1439757_s_at	2,1 \pm 0,7 (9)**	1,40 / 1,79**
		1429021_at		0,99 / 1,00
		1421928_at		0,98 / 1,27
		1421929_at		1,27 / 1,52
Na ⁺ /K ⁺ -ATPase, Alpha 2 Polypeptid	ATP1a2	1455136_at	1,4 \pm 0,8 (9)	0,48* / 0,45**
		1427465_at		1,34 / 1,66*
		1443823_s_at		1,18 / 1,11
		1452308_a_at		0,99 / 1,21
		1434893_at		1,21 / 1,55
		1424737_at		1,25 / 1,31
Regulator des G-Protein signaling 5	Rgs5	1420940_x_at	1,2 \pm 0,6 (9)	3,09* / 2,63*
		1420941_at		0,49 / 0,63
Asporin	Aspn	1416652_at	1,1 \pm 0,3 (8)	0,50* / 0,60*
		1448421_s_at		0,60* / 0,61*
Cholinphosphotransferase 1	Chpt1	1426146_a_at	1,3 \pm 0,3 (9)	0,82 / 0,87
		1435446_a_at		0,93 / 1,00
		1455901_at		0,46* / 0,60

Dynein, light chain Tctex-type 3	Dynlt3	1459854_s_at	1,6 ± 0,5 (9)*	0,47* / 0,59
		1420614_at		0,50 / 0,68
		1449928_a		0,48** / 0,50*
		1449929_at		0,42* / 0,56
Zinkfinger-Protein 386 (Krüppel-like)	Zfp386	1451146_at	1,7 ± 0,6 (8)*	0,45* / 0,49*
		1421139_a_at		0,42* / 0,50*
GPR 34	Gpr34	1422542_at	0,02 ± 0,02 (9)***	0,63*** / 0,05***
RIKEN cDNA 2610024A01 gene	Tmem163	1428077_at	1,3 ± 0,2 (9)*	0,09** / 0,02***
D site albumin promoter binding protein	Dbp	1418174_at	1,4 ± 0,7 (8)	2,09* / 2,23**
		1438211_s_at		3,62*** / 3,33***
serine/threonine kinase 39, STE20/SPS1 homolog (yeast)	Stk39	1419550_a_at	1,6 ± 0,8 (9)	1,43*** / 1,25
		1419551_s_at		1,01 / 0,99
Thyroid responsive spot 14	Spot14	1422973_a_at	1,0 ± 0,6 (8)	1,55* / 1,14
		1424737_at		1,31 / 1,25
5' nucleotidase, ecto	Nt5e	1428547_at	1,7 ± 0,7 (9)**	0,50*** / 0,54***
Phosphodiesterase 7A	Pde7a	1423313_at	1,6 ± 0,7 (7)	0,78 / 0,82**
		1423314_s_at		0,77 / 0,73
		1450933_at		0,61* / 0,66
		1451839_a_at		0,72* / 0,96
		1458218_s_at		0,71*** / 0,69***
THAP domain containing 4	Thap4	1424052_at	1,0 ± 0,5 (9)	1,17 / 1,04
		1447754_x_at		1,77** / 1,29
		1458185_at		1,00 / 0,93

Um zu überprüfen, ob die gefundenen Expressionsunterschiede spezifisch für das untersuchte Myocard sind, wurde eine qPCR-Untersuchung für die beiden Gene, deren signifikant unterschiedliche Regulation im Microarray durch qPCR bestätigt werden konnte, auch für die Milz und das Gehirn durchgeführt. Für Epha4 konnten keine signifikanten Expressionsunterschiede in diesen Organen gefunden werden. Im Gegensatz zu einer erhöhten Expression im Herzen, zeigte sich für Hsd17b7 eine deutliche Herunterregulation im Herz und im Gehirn (Abb. 16)

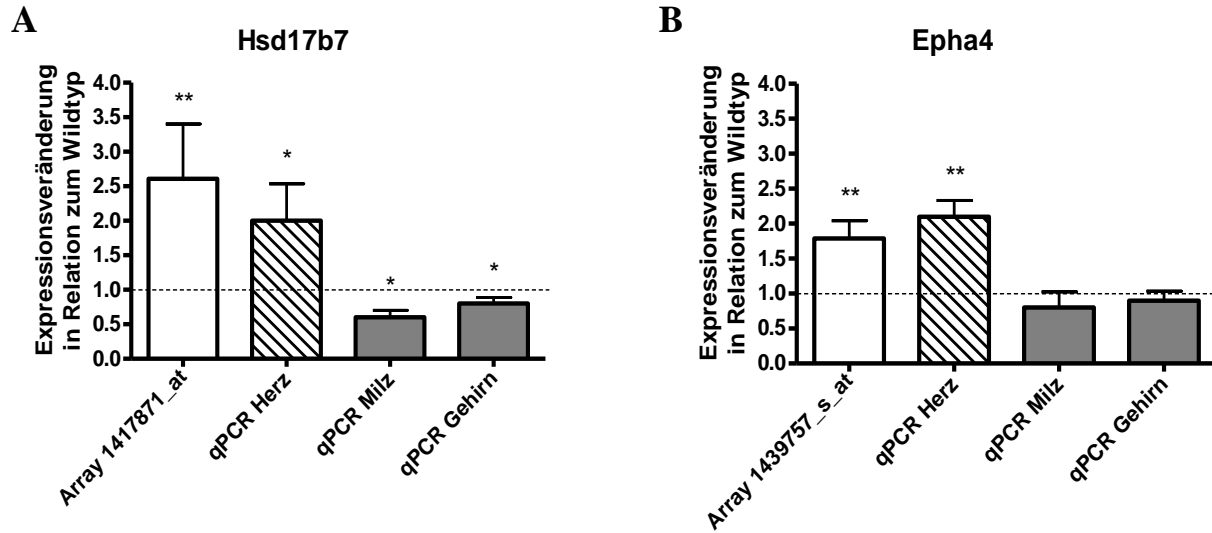


Abb. 16 Expression von A) Hsd17b7 und B) Epha4 in verschiedenen Geweben im Vergleich zur Microarray-Analyse nach MAS5.

Die qPCR Daten für beide Gene wurden aus Herz-, Milz- und Gehirngewebe ermittelt. Es wurden jeweils fünf Tiere pro Genotyp verwendet. Die Expressionsveränderung ist als relative Änderung des KO-Gewebes im Vergleich zu WT dargestellt. Signifikante Veränderungen sind markiert mit: * $p \leq 0,05$; ** $p \leq 0,01$

5 Diskussion

Die vollständige Sequenzierung des menschlichen Genoms und einer Reihe anderer Säugergenome ermöglicht tiefe Einblicke in das Repertoire von GPCRs (Bjarnadottir et al., 2004; Gloriam et al., 2007; Haitina et al., 2009; Vassilatis et al., 2003). Von den ca. 360 GPCRs (ohne Riechrezeptoren) des menschlichen Genoms sind der natürliche Agonist und die Physiologie von ca. 150 Rezeptoren bisher nicht bekannt (Wise et al., 2004). Eine große Anzahl von orphan GPCRs ist in der Gruppe der P2Y-ähnlichen Rezeptoren zu finden. Einer dieser, dem ADP-Rezeptor P2Y₁₂ strukturell sehr ähnlichen GPCRs, ist der GPR34. Dieser orphan GPCR wurde erstmals 1999 beschrieben (Marchese et al., 1999; Schöneberg et al., 1999) und sieben Jahre später *lyso*-PS als endogener Agonist identifiziert (Sugo et al., 2006). *Lyso*-PS scheint vor allem bei der Migration von mononukleären Zellen (Bedard et al., 2007; Lee et al., 2008; Park et al., 2006), der Degranulation von Mastzellen (Bellini et al., 1990; Kim et al., 2008; Sugo et al., 2006), der Tumorigenese (Kim et al., 2008; Lee et al., 2007) und bei verschiedenen metabolischen Funktionen (Cho et al., 2008; Yea et al., 2009) eine regulatorische Rolle zu spielen. Bis *dato* konnte jedoch eine kausale Beziehung der beobachteten biologischen Wirkungen von *lyso*-PS und dem GPR34 nicht bewiesen bzw. die Aktivierung des GPR34 durch *lyso*-PS reproduziert werden. Ziel dieser Arbeit war es deshalb, an verschiedenen *in vitro*-GPR34-Expressionssystemen als auch einem GPR34-defizienten Mausmodell die Funktion dieses oGPCR zu studieren.

5.1 Palmityl-lyso-PS ist nicht der endogene Agonist des humanen und murinen GPR34

Zunächst wurde in verschiedenen *in vitro*-Expressionssystemen überprüft, ob *lyso*-PS ein Agonist am humanen und murinen GPR34 ist. Hierzu wurden verschiedene GPR34-Säugerorthologe in COS-7-Zellen zusammen mit einem chimären G-Protein (G_{q/i5}) exprimiert und nachfolgend die Agonist-induzierte intrazelluläre IP-Bildung quantifiziert. In einem weiteren Expressionssystem wurde die Rezeptoraktivierung über das Wachstum von Hefezellen bestimmt (→3.4.3). Sowohl im IP-Akkumulationsassay in Säugerzellen als auch im Hefesystem konnte keine Aktivierung des humanen oder murinen GPR34 durch verschiedene *lyso*-PS gezeigt werden (→4.1, Abb. 6). Die einzige Ausnahme machte der GPR34-Subtyp 2b des Karpfens, der sowohl im IP-

Akkumulationsassay (Abb. 6) als auch im heterologen Hefe-Expressionssystem durch *P-lyso-PS* und *S-lyso-PS* konzentrationsabhängig aktivierbar war (Abb. 7). Aufgrund der funktionellen Äquivalenz des GPR34-Subtyps 2b in beiden Tests und den mitgeführten Kontrollen (P2Y₁₂, konstitutiv aktiver humaner GPR34) ist von einer korrekten Funktionalität der Assays auszugehen.

Die offensichtliche Diskrepanz zwischen den bereits publizierten (Sugo et al., 2006) und unseren funktionellen Daten zum humanen GPR34 kann unterschiedliche Ursachen haben. Zunächst wurde versucht, das von Sugo et al. eingesetzte *P-lyso-PS* bei der Firma Sigma zu erwerben. Die Firma führt diese Präparation jedoch nicht mehr, sodass die Herstellung in Kooperation (AG Prof. Fuhrmann, Universität Leipzig) und später im eigenen Labor erfolgte. Damit ist ein physikochemischer Vergleich der eingesetzten Substanzen nicht möglich und Differenzen in der Substanzqualität können nicht ausgeschlossen werden.

Ein weiterer Unterschied liegt in den verwendeten Expressionssystemen und funktionellen Tests. Die Arbeitsgruppe von Sugo et al. nutzte Chinese Hamster Ovary Zellen (CHO-Zellen, Fibroblasten) und testete die GPR34-vermittelte cAMP-Inhibition einer Forskolin-Vorstimulation sowie die [³⁵S]GTPγS-Bindung nach *lyso-PS*-Applikation. Sowohl die weiterhin durchgeführten Hemm-Experimente mit PTX im cAMP-Assay, als auch die ERK-Phosphorylierungsuntersuchungen belegen die GPR34-vermittelte G_i-Signaltransduktion von *lyso-PS* in der publizierten Studie (Sugo et al., 2006). Es ist sicherlich nicht auszuschließen, dass Unterschiede in den Zell- und Expressionssystemen die Diskrepanz zwischen unseren und den publizierten Daten erklären könnten. So fanden sich bei der transienten Transfektion von CHO- und COS-7-Zellen mit Corticotrophin-releasing Hormon (CRH) precursor cDNA quantitative Unterschiede in der Proteinsekretion zwischen den beiden Zelltypen (Perone et al., 1998). Jedoch fehlt in unseren Untersuchungen jeglicher Hinweis auf eine Aktivierung von Säuger-GPR34 in allen verwendeten Systemen und mit allen applizierten *lyso-PS*-Derivaten bei vorhandener Funktion aller Transfektions- und Assay-Kontrollen. Zweifelsohne ist die Verwendung von chimären G-Proteinen im IP-Akkumulationsassay und Hefesystem eine indirekte Methode der Messung von G_i-gekoppelten GPCRs. Es konnte gezeigt werden, dass der Einsatz von chimären G-Proteine nicht immer eine Kopplung eines GPCR an eine gewünschte Signalkette vermitteln muss (Kostenis et al., 2005). Verschiedene eigene Daten sprechen jedoch gegen eine ineffektive Kopplung der Säuger-GPR34 an das chimäre G_i-Protein. So ist die natürliche Basalaktivität des

humanen GPR34 im transienten COS-7-Zell-Expressionssystem sowohl im IP-Akkumulationsassay (Kotransfektion mit chimärem $G_{q/15}$ -Protein) als auch in cAMP-Inhibitionsexperimenten nachzuweisen (Schulz and Schöneberg, 2003). Weiterhin zeigte eine daueraktive humane GPR34-Mutante eine funktionelle Kopplung an das Signaltransduktionssystem der Hefe (Abb. 8).

Ein interessanter Befund war die singuläre Aktivierung des Subtypen 2b in Karpfen durch *lyso*-PS. Dieses Ergebnis lässt vermuten, dass innerhalb der Gruppe von GPR34-Orthologen zumindest eine gewisse Affinität zu *lyso*-PS vorhanden sein muss. Agonist-Promiskuität ist für verschiedene GPCRs beschrieben worden (Civelli et al., 2006; Wellendorph et al., 2005) und innerhalb der Gruppe von P2Y-ähnlichen durchaus häufig anzutreffen (Schöneberg et al., 2007). Auf der Grundlage aller bisherigen *in-vitro* Testergebnisse ist eine eindeutige Entscheidung, ob *lyso*-PS einen endogenen Agonisten von GPR34 darstellt, nicht endgültig zu treffen. Unsere eigenen Daten konnten die Aussagen von Sugo et al. somit bisher nicht belegen. Nach dem Abschluss der experimentellen Arbeiten zu dieser Promotionsarbeit wurden weitere Untersuchungen mit anderen read-out Systemen, wie z.B. Corning Epic® Biosensor Measurements an HEK293-Zellen, die mit humanem GPR34 transfiziert worden sind (AG von Prof. E. Kostenis, Universität Bonn) durchgeführt. Dieses System misst zelluläre Strukturänderungen ‚label-free‘ und eignet sich daher besonders für die Untersuchung G_i -gekoppelter Rezeptoren (Schroder et al., 2009). Auch in diesem System konnte bisher keine Aktivierung des humanen GPR34 mittels *lyso*-PS gezeigt werden (persönliche Mitteilung, Prof. E. Kostenis).

Eine Schlüsselaussage der Studie von Sugo et al. ist die Beteiligung des GPR34 bei der Degranulation von Mastzellen (Sugo et al., 2006). Es war schon aus früheren Untersuchungen bekannt, dass *lyso*-PS über einen IP- und Ca^{2+} -abhängigen Prozess Histamin aus Mastzellen der Maus freisetzen kann (Bellini et al., 1990). Konsistent mit den Ergebnissen von Sugo et al. konnten in unserer Arbeitsgruppe hohe mRNA-Expressionsspiegel des GPR34 in humanen und Mauszelllinien, die sich von Makrophagen (U937, RAW264.1) und Mastzellen (P815) ableiteten, nachgewiesen werden (unpublizierte Daten, Dr. A. Schulz). Mit der Verfügbarkeit eines GPR34-defizienten Mausmodells bestand nun erstmalig die Möglichkeit, die Frage nach einem kausalen Zusammenhang zwischen GPR34 und der *lyso*-PS-induzierten Histaminfreisetzung experimentell

zu beantworten. Wie die Arbeitsgruppe von Sugo et al. Konnten wir eine verstärkte DNP-induzierte Histaminfreisetzung aus Peritonealmastzellen mittels unserer *lyso*-PS-Präparate nachweisen (→4.3, Abb. 12A). Dieser Effekt war jedoch unabhängig von der Präsenz des GPR34. Dieser Befund spricht klar gegen eine GPR34-vermittelte Signaltransduktion des *lyso*-PS. Ob die *lyso*-PS-induzierte Histaminfreisetzung in der Tat PTX-insensitiv ist (Abb. 12B), kann nicht abschließend beurteilt werden. Hierbei entspricht die der schwierigen Kultivierung von Peritonealmastzellen geschuldete, nur vierstündige Inkubation mit PTX, zwar der minimalen beschriebenen Zeit um G_i-Proteine zu inaktivieren, jedoch wäre für eine vollständige Inhibition des G_i-Signalweges eine 24-stündige PTX-Vorinkubation ideal. Da aber nach vier Stunden keine Tendenz zur Inhibition der Histaminausschüttung zu sehen war, ist eine PTX-Sensitivität der *lyso*-PS-induzierten Histaminfreisetzung aus Peritonealmastzellen eher unwahrscheinlich.

In verschiedenen Arbeiten wird eine *lyso*-PS-induzierte Migration von Fibroblasten und Gliazellen beschrieben (Lee et al., 2008; Park et al., 2006). Aus diesem Grund wurden Peritoneallavage-Zellen von KO- und WT-Mäusen auf ihre basale und *lyso*-PS-induzierte Migrationsfähigkeit hin untersucht. Die in den Migrationsexperimenten eingesetzten Zellen aus der Peritoneallavage enthielten vorwiegend Makrophagen, Lymphozyten und Mastzellen. Diese Zellen wurden zuvor auf die Expression von GPR34 positiv getestet (nicht gezeigte Daten). Die Zellen aus den WT-Tieren zeigten eine *lyso*-PS-induzierte Migration. Dies bestätigt die oben erwähnten Befunde, dass *lyso*-PS chemotaktisch auf migrationsfähige Zellen wirken kann. Die Peritoneallavage-Zellen aus KO-Mäusen fielen durch eine signifikant erhöhte Migration, bereits ohne Stimulation auf. Durch Applikation von *lyso*-PS konnte diese basale Migration nicht weiter erhöht werden, so dass eine Aussage, ob die *lyso*-PS-induzierte Migration GPR34-abhängig ist, final nicht beantwortet werden kann. Auch kann die erhöhte basale Migration der GPR34-defizienten Peritoneallavage-Zellen derzeit mechanistisch nicht interpretiert werden.

Die seit längerer Zeit beschriebenen Effekte von *lyso*-PS an verschiedenen Zellen ergeben ein uneinheitliches Bild über die Involvierung eines G_i-gekoppelten Rezeptors. So haben Park und Mitarbeiter (Park et al., 2006) die Signalwege durch *lyso*-PS eingehend untersucht und zwei unabhängige Wege postuliert. Ein Weg ist PTX-insensitiv und resultiert in einer Aktivierung der Phospholipase C und nachfolgender Ca²⁺-Erhöhung, die dann zur beobachteten Histaminfreisetzung in z.B. Mastzellen führen kann. Ein weiterer Weg ist PTX-sensitiv und verläuft über einen unbekanntes GPCR (eventuell GPR34), der durch ERK-Aktivierung die

Migration entsprechend responsibler Zellen ermöglicht. Die derzeitigen Ergebnisse aus den Mastzellversuchen stützen eher den von Park et al. postulierten, nicht GPCR-vermittelten Signalweg der Histaminausschüttung durch *lyso*-PS.

In der Summe widerlegen unsere eigenen Daten *lyso*-PS als biologisch relevanten Agonisten am Säuger-GPR34. Die Ergebnisse des GPR34 Subtyp 2b des Karpfens suggerieren jedoch, dass zumindest die Stoffgruppe der Phospholipide als Agonisten weiterhin in Betracht gezogen werden muss und zusätzlich zu den bisher getesteten Substanzen (Schöneberg et al., 1999) weitere Vertreter untersucht werden sollten. Es kann auch nicht ausgeschlossen werden, dass der GPR34, ähnlich wie andere GPCRs (Civelli et al., 2006), durch mehrere Agonisten aktiviert werden kann. Eine Agonisten-Promiskuität wurde dementsprechend für den GPRC6A (Wellendorph et al., 2005) und oGPCR P2Y₁₀ (Murakami et al., 2008) beschrieben. Speziell für die Gruppe der P2Y-ähnlichen Rezeptoren, zu denen auch der GPR34 gehört, ist eine Aktivierung durch strukturell unterschiedliche Liganden wie Leukotriene, organische Säuren oder Phospholipide nicht ungewöhnlich (Schöneberg et al., 2007). Es ist durchaus möglich, dass *P-lyso*-PS bzw. *S-lyso*-PS als Liganden am GPR34 wirken, jedoch mit sehr unterschiedlicher Affinität zu den verschiedenen Subtypen dieses Rezeptors. Auch ist bisher nicht auszuschließen, dass für eine biologische Funktionalität z.B. Heterodimerisierungen mit anderen GPCRs notwendig sind (Nelson et al., 2001) oder oGPCRs sogar Ligand-unabhängige Funktionen besitzen (Levoye et al., 2006).

5.2 GPR34-Defizienz hat keinen Einfluss auf die Vitalität SPF-gehaltener Mäuse

Da der GPR34 ein evolutionär alter und hoch konservierter Rezeptor ist (Schulz und Schöneberg, 2003), muss davon ausgegangen werden, dass ein Fehlen dieses GPCR Konsequenzen auf die Physiologie von Vertebraten hat. Die ubiquitäre Expression des GPR34 lässt nur schwer Vermutungen zu seiner spezifischen physiologischen Relevanz zu, so dass ein entsprechendes GPR34-defizientes Mausmodell sehr umfassend untersucht werden musste.

Ausgehend von den bisherigen Experimenten ist es sicher, dass eine GPR34-Defizienz keinen wesentlichen Einfluss auf Entwicklung, Wachstum oder Fertilität bei Mäusen hat. Allerdings muss einschränkend bemerkt werden, dass diese Befunde unter SPF-Bedingungen erhalten

wurden und damit apathogene und alimentäre *ad libitum* Bedingungen bei der Tierhaltung vorlagen.

Dass eine Rezeptor-Defizienz bei hoher struktureller und evolutionärer Konservierung nicht zwangsläufig zu einem primär sichtbaren Phänotyp führen muss, zeigte die Metaanalyse von mehr als 160 GPCR-defizienten Mausmodellen (Schöneberg et al., 2004). Lediglich 8 % der KO-Mausmodelle zeigen eine erhöhte intrauterine oder perinatale Mortalität und bei weniger als der Hälfte aller GPCR-KO-Mäuse konnte ein offensichtlicher Phänotyp unter SPF-Bedingungen identifiziert werden. Oftmals (in 41 % der 160 untersuchten GPCR-KO-Linien) war es notwendig, die Tiere spezifischen Stressoren, wie Pathogenen oder Pharmaka auszusetzen, um einen Unterschied zwischen KO- und Wildtyptieren zu detektieren. Bei 6-15 % aller GPCR-defizienten Mauslinien konnte kein definierter Phänotyp gefunden werden (Barbaric et al., 2007; Schöneberg et al., 2004).

Der Phänotyp einer KO-Maus kann mitunter sehr subtil und oftmals unerwartet sein. Beispielsweise zeigt die adrenerge α_{1A} -Rezeptor-defiziente Maus lediglich einen verminderten Ruheblutdruck als ihr Wildtypäquivalent (Rokosh and Simpson, 2002). Die Melanocortin-5-Rezeptor-KO-Maus wiederum zeichnet sich durch eine verminderte Synthese von Sterinestern in der Harderschen Drüse (*Glandulae palpebrae tertiae*) aus, was dadurch auffällig wurde, dass die Mäuse nach einem Schwimmversuch längere Zeit brauchten um trocken zu werden (Chen et al., 1997). Anhand dieser Beispiele wird deutlich, wie wichtig die Grundcharakterisierung einer KO-Mauslinie nach standardisierten Protokollen ist. Hierdurch wird sichergestellt, dass die Phänotypisierung vergleichbar und weitestgehend vollständig ist. Ein Beispiel für solch eine Plattform ist die Europäische Maus Phänotypisierungsquelle für standardisierte Screens (EMPreSS), welche unter diversen Protokollen zur systematischen Charakterisierung auch das von uns angewandte SHIRPA Protokoll nennt. Die Untersuchungen der GPR34-defizienten Tiere nach einem modifizierten SHIRPA-Protokoll (\rightarrow 3.7) zeigten keine genotypspezifischen Unterschiede. Es muss jedoch angemerkt werden, dass die verwendeten Tierzahlen nur die Identifizierung offensichtlicher Unterschiede zulassen.

5.3 Diskrete myocardiale Genexpressionsveränderungen bei GPR34-defizienten Mäusen

Die initialen Untersuchungen der GPR34-defizienten Tiere auf morphologischer, histologischer, laborchemischer und verhaltensbiologischer Ebene erbrachten keinen robusten Phänotyp. Deshalb wurde nachfolgend ein Gewebe, in dem der GPR34 physiologisch exprimiert wird, in GPR34-defizienten Mäusen auf molekulare Veränderungen hin untersucht. Mittels Microarray-Untersuchungen kann das gesamte Transkriptom einer Zelle oder eines Gewebes analysiert und quantifiziert werden. Der Vergleich der Transkriptome von Geweben aus WT- und KO-Tieren ermöglicht eine hypothesenfreie Detektion von Unterschieden (Bellazzi and Zupan, 2007) bzw. hilft z.B. bei der Objektivierung phänotypischer Verhaltensveränderungen (Singh et al., 2007).

Die Rationale für die Auswahl von Myocard für die Microarrayuntersuchung bildete die zelluläre Homogenität des Gewebes (bestehend fast ausschließlich aus Myozyten) und die hohe Expression des GPR34 in diesem Gewebe (Engemaier et al., 2006). Die Ergebnisse der Arrayuntersuchungen ergaben valide Daten zur Expression klassischer myokardialer Gene und bestätigten auch auf der Transkriptionsebene die Defizienz an GPR34 (→4.7.1). Zwischen den WT- und KO-Tieren waren ca. 360 Gene signifikant differentiell reguliert, jedoch ergab die Einordnung dieser in einen biologischen oder physiologischen Kontext (→4.7.3) kein klares Bild über eine Veränderung einer bekannten zellulären Funktion. Es muss allerdings in Betracht gezogen werden, dass bisher weniger als die Hälfte aller auf dem Mikroarray analysierten Transkripte funktionell annotiert sind (Cahan et al., 2007). Da frühere Arbeiten ebenfalls zeigten, dass die Übereinstimmung bei Analyse des gleichen Datensatzes mittels zweier Datentransformationen lediglich bei 30 % liegt (Gagarin et al., 2005), wurden die Analyseverfahren MAS5 und RMA angewendet. Auch die weitere Analyse der Schnittmenge aus beiden Verfahren ergab keine signifikant unterschiedlich regulierten, bekannten Zellfunktionen. Deshalb wurde eine Rangliste differentiell regulierter Gene aus den Ergebnissen beider Analyseverfahren erstellt und zur Validierung der Mikroarray-Daten 21 Transkripte mittels qPCR quantifiziert. Lediglich für zwei Gene (Hsd17b7, Epha4) konnten die mittels Mikroarray gefundenen Expressionsveränderungen zwischen KO- und WT-Tieren bestätigt werden. Diese erhebliche Differenz zwischen den Ergebnissen aus Mikroarray und qPCR-Messungen ist auch in anderen Studien beschrieben worden. Laut Cahan und Mitarbeitern (Cahan et al., 2007) ist ein Rate von 5 % an falsch positiven Ergebnissen anzunehmen. Bei einer Anzahl von 45.000 auf

einem Mikroarray untersuchten Transkripten ist somit von 2.250 falsch signifikant identifizierten Transkripten auszugehen. Weitere Studien fand mit über 30 % einen deutlich höheren Anteil an falsch positiven Daten (Busse et al., 2009; Schliebe et al., 2008). Als Ursachen für diese Diskrepanzen werden die uniforme Annealing-Temperatur auf den Arrays, die geringere Sensitivität von Arrays, Unterschiede im Primerdesign zwischen beiden Methoden und das unterschiedliche Erfassen von Splicevarianten angesehen.

Wie oben beschrieben, konnte für zwei Gene (Epha4 und Hsd17b7) die differentielle Expression zwischen KO und WT im Myocard mittels qPCR verifiziert werden. Epha4 wird mit der synaptischen Plastizität im Bereich der Amygdala (Deininger et al., 2008), der Axon-Axon Interaktion (Gallarda et al., 2008) und der korrekten Formierung neuronaler Strukturen (Hippocampus, Motoneurone des Rückenmarks) während der Embryogenese (Coonan et al., 2003; Murai et al., 2003) in Verbindung gebracht. Neben diesen neuronalen Aufgaben ist außerdem ein Einfluss auf die Entwicklung von T-Lymphozyten (Munoz et al., 2006) und die Ossifikation beschrieben worden (Kuroda et al., 2008). Hsd17b7, eine 17- β -Hydroxysteroiddehydrogenase, ist an der Cholesterolsynthese (Ohnesorg and Adamski, 2006; Ohnesorg et al., 2006) beteiligt und beeinflusst die Embryonalentwicklung von Mäusen (Shehu et al., 2008). Eine Einordnung beider Gene in die bekannte G_i -Signalkaskade des GPR34 bleibt offen. Auch scheinen die gefundenen Expressionsveränderungen von Epha4 und Hsd17b7 Herzmuskel-spezifisch zu sein, da Epha4 in der Milz und im Gehirn von GPR34-defizienten Mäusen nicht und Hsd17b7 in diesen Geweben gegensätzlich reguliert sind (Abb. 16).

Zusammenfassend lassen die Microarray- und qPCR-Untersuchungen auf dem derzeitigen Wissensstand keine Schlussfolgerungen hinsichtlich der Relevanz des GPR34 im Herzmuskel von SPF-gehaltenen Mäusen zu.

5.4 GPR34-defiziente Mäuse zeigen eine pathologische Immunreaktion

Vorangegangene Untersuchungen haben gezeigt, dass der GPR34 vor allem in neuronalen und lymphozytären Zellen, und hierin spezifisch auf Mikroglia und makrophagozytären RAW264.1-Zellen exprimiert wird (Engemaier et al., 2006). Es lag daher nahe, eine mögliche physiologische Funktion des Rezeptors im Bereich der Immunantwort auf verschiedene Pathogene zu untersuchen. Die Haltung der Mauslinien unter SPF-Bedingungen dient einer möglichst geringen Exposition der Tiere mit pathogenen Erregern, jedoch könnten diese apathogenen

Haltungsbedingungen einen Phänotyp bei der Infektionsabwehr maskieren. Auf der anderen Seite ermöglichen diese standardisierten Bedingungen die Durchführung gezielter Immunisierungs- und Infektionsstudien.

Der DTH-Versuch wird als typischer Indikator für die Reaktionsfähigkeit des Organismus auf die Sekundärexposition auf ein Antigen angesehen. Dabei werden als Maß die lokale Schwellung eines sekundär exponierten Körperareals (z.B. Pfote) und die Menge an ausgeschütteten Zytokinen gemessen, wobei immunsupprimierte Organismen typischerweise kaum eine Schwellung zeigen. Andererseits kann aber auch eine verstärkte Schwellung auf eine pathologische Immunreaktion hindeuten.

In unseren Untersuchungen zeigten die GPR34-defizienten Tiere eine signifikant verstärkte Schwellung der Pfoten nach Sekundärexposition mit dem verwendeten Antigen methylBSA (\rightarrow 4.5, Abb. 14). Dies kann als eine erhöhte Aktivierung der Immunabwehr interpretiert werden. Diese Ergebnisse werden gestützt durch die Messung von Zytokinen in den Überständen der Milzzellkulturen. Alle gemessenen Zytokine der Zellkulturen aus KO-Tieren waren sowohl im basalen als auch im re-stimulierten Ansatz mit 20 μ g/ml methylBSA höher konzentriert als bei den WT-Zellen (Tab. 3). Im Falle des IL-2 erreichten die stimulierten Zellen der WT-Zellen nur ein Viertel der Menge der basalen Zytokinausschüttung der KO-Zellen. Auffällig erschien weiterhin, dass die basal erhöhten Zytokinwerte der GPR34-defizienten Zellen bei erneuter Antigenpräsentation einen viel geringeren Anstieg zeigten als der WT. IL-2 blieb dabei weitestgehend gleich, die IL-10 und IL-4 Konzentrationen stellten sich sogar niedriger dar (Tab. 3).

Die DTH-Reaktion wurde lange Zeit als klassische Th1-Antwort interpretiert. Die Reaktion wird von aktivierten CD4⁺ und CD8⁺ T-Lymphozyten initiiert und wird dann hauptsächlich von Makrophagen getragen (Black, 1999). Als klassische Zytokine der Th1-Antwort wurden neben INF- γ und TNF- α , als typische Aktivatoren von Makrophagen, auch IL-12 und IL-2 angesehen. Jedoch zeigten Untersuchungen mit verschiedenen Mauslinien, dass eine strikte Trennung, z.B. zwischen der Th1- und Th2-Antwort, kaum möglich ist. So zeigten Mäuse, die defizient für den INF- γ - oder TNF- α -Rezeptor waren, weiterhin eine Schwellung in diesem DTH-Versuch (Dalton et al., 1993; Huang et al., 1993; Kondo et al., 1995). Interessanterweise erlischt die Schwellung dagegen bei Mäusen, die defizient für IL-4 sind (Asherson et al., 1996). Dieses Zytokin ist neben IL-5, IL-6 und IL-10 für eine Th2 Antwort charakteristisch. Scheinbar

beeinflussen die Art des Immunisierungsantigens (Xu et al., 1997) sowie die Menge und Art das Adjuvanz entweder die Ausprägung einer inflammatorischen Th1- oder die Toleranz-induzierende Th2-Antwort (Berke, 1993).

Betrachtet man das Zytokinmuster des DTH-Versuchs bei den GPR34-defizienten und WT-Tieren auf der quantitativen Ebene, so entsprach dieses im Wesentlichen einer Th1-Antwort. Jedoch war die gebildete Menge an IL-12, welches das entscheidende Chemokin zur Umwandlung von Th0-Zellen zu Th1-Zellen ist (Trinchieri, 1995), in beiden Genotypen sehr gering. Weiterhin stiegen die Th2-Marker IL-4 und IL-5 bei der Restimulation der WT-Zellen genauso stark an wie die Th1-typischen Chemokine INF- γ und TNF- α . Die DTH-Reaktion ist demnach nicht eindeutig einem der beiden Reaktionswege zuzuordnen.

In einem zweiten Modell wurde die systemische Reaktion der Mauslinien auf eine zunächst pulmonale und im Verlauf systemische Infektion mit *C. neoformans* und, in Anlehnung an die DTH-Versuche, Zytokinkonzentrationen in den Überständen von Bronchiallavagezellen untersucht. Die Freisetzung von Zytokinen aus Bronchiallavagezellen der naiven KO-Tiere war im Vergleich zu den Daten aus WT-Tieren unauffällig oder eher geringer (Tab. 4). Für die Infektionsversuche wurde der pathogene Pilz *C. neoformans* gewählt, da er sich nach zunächst pulmonaler Infektion systemisch bis ins ZNS ausbreitet. Im ZNS sind für die Infektionsabwehr und Defektheilung vor allem Gliazellen verantwortlich. Der GPR34 ist im ZNS (Engemaier et al., 2006; Marchese et al., 1999; Schöneberg et al., 1999), vor allem in Mikroglia (Bedard et al., 2007) hoch exprimiert. Ziel war es hierbei zu überprüfen, ob GPR34-defiziente Mäuse Unterschiede in der Infektabwehr zeigen. Erste Untersuchungen ergaben eine signifikant höhere Keimlast in den GPR34-defizienten Tieren (Abb. 15). Ähnlich wie im DTH-Versuch (siehe oben) waren bei den *C. neoformans*-infizierten GPR34-defizienten Tieren die Zytokine signifikant erhöht im Vergleich zu äquivalenten WT-Tieren.

Unsere Daten aus den DTH- und Infektionsversuchen legen nahe, dass GPR34-defiziente Mäuse funktionelle Defekte in der Regulation der zellulären Immunantwort zeigen. In den Untersuchungen zur Migrationsfähigkeit von mononukleären Zellen konnte eine erhöhte basale Zellmigration gezeigt werden (\rightarrow 5.1), was auf Störungen der Funktion von Abwehrzellen hinweisen könnte. Bei Betrachtung der Zytokinprofile der Mäuse aus dem Infektionsversuch zeigte sich vor allem, dass bereits die nicht restimulierten Zytokinkonzentrationen, mit Ausnahme von TNF- α , in den Überständen aus Zellen von KO-Tiere nach Pathogenexposition

gegenüber dem WT signifikant erhöht waren. Markant waren dabei in den DTH- und *Cryptococcus*-Infektionsversuchen die stark erhöhten Konzentrationen von IL-2. Eine zusätzliche Stimulierung der Zytokinsekretion durch Exposition der Bronchiallavage-Zellen mit einem attenuierten *C. neoformans* konnte im Gegensatz zu den WT-Zellen nicht erzielt werden. Auch die auf molekularer Ebene erhobenen Befunde unterstützen die Hypothese einer gestörten Regulation der zellulären Immunantwort in GPR34-defizienten Mäusen.

Die pulmonale Infektion mit *C. neoformans* stellt für einen immunkompetenten Organismus keine große Gefahr dar und verläuft meist selbstlimitierend. Besteht jedoch eine Abwehrschwäche, kann die Infektion nicht eingedämmt werden und der Erreger streut in verschiedene andere Organe. Am häufigsten ist hierbei das Gehirn betroffen. Die Abwehr des Organismus gegenüber dieser Infektion wird vor allem durch die zellulären Immunzellen gewährleistet, wobei CD4⁺ T-Lymphozyten eine zentrale Rolle spielen (Mody et al., 1990). Weiterhin kann ein quantitatives Zytokinprofil für die Prognose des klinischen Verlaufs herangezogen werden. Während ein Überwiegen von Zytokinen der proinflammatorischen Th1-Antwort die Voraussetzung für eine effiziente Bekämpfung der Infektion darstellt, kommt es unter einer vorwiegenden Th2-Antwort zu einer Toleranz gegenüber dem Pathogen, was dessen Disseminierung im Organismus fördert (Koguchi and Kawakami, 2002). Die massive Übersekretion von Zytokinen der Th1- und Th2-Antwort nach Antigen- bzw. Pathogen-Kontakt im DTH- und *Cryptococcus*-Infektionsversuchen ist somit ein klares Zeichen für gestörte Regulationsmechanismen der zellulären Immunantwort.

Ein ausgewogenes Verhältnis der T-Zell-Systeme, vorwiegend Th1- und Th2-Zellen, mit Priorisierung im richtigen Maß und zur richtigen Zeit ist der Kern einer effektiven Infektabwehr. Das Zusammenspiel beider Systeme ist eng miteinander verknüpft und sehr komplex reguliert. Beteiligt sind verschiedene Immunzellen, die je nach Gegebenheit die Auslenkung zwischen Th1- und Th2-Antwort in beide Richtungen zu steuern vermögen. Ein Beispiel ist das Zusammenspiel von natural killer (NK) T-Lymphozyten und $\gamma\delta$ -T-Lymphozyten, welche einen entscheidenden Einfluss auf die Ausbildung einer Immunreaktion bei Infektion mit Erregern wie z.B. *Listeria monocytogenes*, *Streptococcus pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Borrelia burgdorferi* und *C. neoformans* (Kawakami, 2004) ausüben. NKT-Zellen als auch $\gamma\delta$ -T-Zellen stellen Subtypen der T-Lymphozyten dar, die dadurch gekennzeichnet sind, dass sie zur Gruppe

der angeborenen zellulären Immunantwort gehören und damit ohne vorhergehende Interaktion mit Molekülen der MHC Klasse I oder II direkt eine Reihe an Zytokinen freisetzen können. Ihre Aufgabe scheint insbesondere die Bestimmung der Ausrichtung der Immunantwort in Richtung Th1 bzw Th2 zu sein (Kawakami, 2004). NKT-Zellen sekretieren nach Antigenkontakt sowohl IFN- γ als auch IL-4 und scheinen daher eine duale Rolle in der Ausbildung der Immunantwort zu spielen (Godfrey et al., 2000). Die Art des Erregers entscheidet, ob Th1- oder Th2-Zytokine initiiert werden. Bei einer Infektion mit *Listerien* wirkt die Depletion der NKT-Zellen protektiv mit einer verstärkten Produktion von Th1-Zytokinen (Szalay et al., 1999). Im Gegensatz dazu ist die Abwehr einer *Cryptococcus*-Infektion bei Mangel an NKT-Zellen stark beeinträchtigt (Kawakami et al., 2001). Eine ähnlich duale Funktion haben $\gamma\delta$ -T-Zellen. Während sie bei der Erkrankung mit *Toxoplasma gondii* die Abwehr unterstützen (Hisaeda et al., 1995), können sie eine immunsuppressive Funktion bei der Infektion mit *C. neoformans* vermitteln (Kawakami, 2004).

Der Erfolg der Immunabwehr eines Organismus wird von der Balance zwischen Inflammation und Toleranz bestimmt. Eine Toleranz des Erregers führt zu dessen Ausbreitung im Organismus, was eine Zunahme von dessen schädlicher Wirkung (Zerstörung von Wirtszellen) als auch eine ungehinderte Freisetzung von pathogenen Substanzen (z.B. Toxine) zur Folge hat. Eine zu stark ausgeprägte Inflammation, wie im Falle der Sepsis, kann durch Temperaturerhöhung und Freisetzung von vasoaktiven Substanzen zu konsekutivem Multiorgansversagen und zum Tod des Individuums führen. Wichtige Koordinatoren dieses Systems sind die Zytokine der Th1- und Th2-Antwort. Dem IL-2, welches sowohl im DTH- als auch im *Cryptococcus*-Infektionsversuch nach vorangegangenem Kontakt zum Antigen bereits unter basalen Bedingungen in Zellüberständen von GPR34-defizienten Tieren sehr stark erhöht war, kommt vor allem auf der Ebene der Lymphozyten eine bedeutende Funktion zu. Die Hauptmenge an IL-2 wird von aktivierten CD4⁺ T-Lymphozyten produziert. IL-2 kontrolliert die Proliferation und Differenzierung von B- und T-Lymphozyten (Olejniczak and Kasprzak, 2008) und kann als Maß für die Aktivierung des lymphozytären Abwehrsystems angenommen werden. Weiterhin ist es das Hauptchemokin zur Differenzierung von regulatorischen T-Zellen (siehe Abb. 17). Es ist deshalb anzunehmen, dass eine unregelmäßige IL-2-Produktion wichtige zelluläre Komponenten der Immunabwehr in ihrer Differenzierung und Funktion stört.

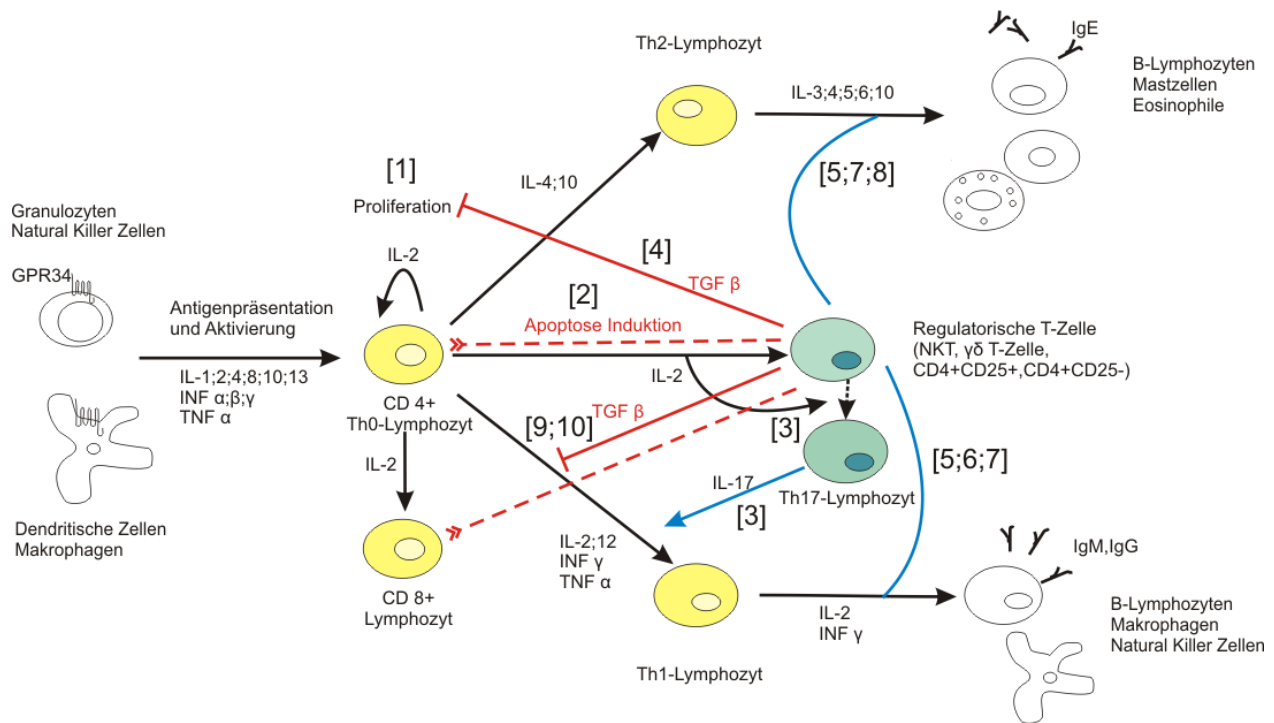


Abb. 17 Übersicht einiger wichtiger Interaktionen zwischen den Zellen der Th1- und Th2-Antwort.

GPR34-tragende monozytäre Zellen präsentieren die von ihnen aufgenommenen Antigene den undifferenzierten T-Helfer-Zellen und aktivieren diese über die Freisetzung mehrerer Zytokine. Daraufhin sekretieren diese Th0-Zellen zunächst IL-2, welches die CD4+-Zelle selbst, die CD8+ zytotoxischen T-Zellen und regulatorische T-Zellen zur Proliferation und Differenzierung anregt. Je nach vorherrschendem Zytokinprofil kommt es anschließend zur Ausbildung einer inflammatorischen Th1-Antwort, die im besten Fall zur Eradikation des Pathogens führt oder zur Induktion einer Th2-Antwort, die eine Toleranz gegenüber dem Erreger und eventuell eine allergische Reaktion auf diesen hervorruft. Regulatorische T-Zellen haben einen entscheidenden Einfluss darauf, welcher der beiden Reaktionswege eingeschlagen wird. Zusätzlich limitieren sie die Dauer der antigenspezifischen Abwehrreaktion, obwohl sie unter Umständen diese auch prolongieren können. Die schwarzen Pfeile geben die Differenzierungsrichtung an. Rot steht für Inhibition und blau für Aktivierung. Auf die jeweilige Referenzliteratur zu den dargestellten Signalwegen wird durch die Zahlen in Klammern verwiesen: [1] (Olejniczak and Kasprzak, 2008) [2] (Malek and Bayer, 2004) [3] (Deknuydt et al., 2009) [4] (Han et al., 2009) [5] (Godfrey et al., 2000) [6] (Szalay et al., 1999) [7] (Ferrick et al., 1995) [8] (Wesch et al., 2001) [9] (Nagaeva et al., 2002) [10] (Letterio and Roberts, 1998)

In welchem Maße und an welcher Stelle der GPR34 in diesen Kaskaden einen Einfluss ausübt, bleibt zum jetzigen Wissensstand noch spekulativ. Eine Zusammenstellung der wichtigsten Interaktionen zwischen den Zellen der Th1- und Th2-Antwort ist in der Abbildung 17 gezeigt. Hieraus wird ersichtlich, dass für eine Interpretation des gemessenen Zytokinmusters bei den GPR34-defizienten Mäusen eine dezidierte Untersuchung einzelner T-Zell-Populationen notwendig wäre (siehe Ausblick →5.5). Zweifelsohne haben unsere bisherigen immunologischen Untersuchungen gezeigt, dass der Feinabgleich zwischen Th1- und Th2-Antwort in der GPR34-defizienten Tieren nicht ausreichend gegeben ist. Beide Systeme waren nach einmaligem

Antigenkontakt bereits maximal aktiviert und damit ursächlich für die beobachteten Unterschiede von KO- und WT-Mäusen im DTH- und *Cryptococcus*-Infektionsversuchen.

Einen Hinweis hinsichtlich der Rolle des GPR34 im Rahmen einer Infektion ergibt sich eventuell aus präliminären experimentellen Befunden, in denen durch die Aktivierung der Toll-like Rezeptor-Signalkaskade mit Lipopolysaccharid die Expression von GPR34 in Mikroglia signifikant herabreguliert wurde (Dr. Angela Schulz, persönliche Mitteilung). Im Gegensatz dazu findet sich bei chronischer Inflammation nach Gabe des demyelinisierenden Toxins Cuprizone eine Expressionserhöhung dieses Rezeptors in Mikroglia (Bedard et al., 2007). Aus diesen beiden Ergebnissen in Zusammenhang mit unseren Befunden lässt sich die Hypothese aufstellen, dass über den GPR34 eine funktionelle Immunsuppression vermittelt werden kann. Nach einer Infektion oder Antigenkontakt wird die immunsuppressive Funktion des GPR34 durch verminderte Expression abgeschaltet. Ist der Erreger jedoch erfolgreich abgewehrt bzw. ein Antigen eliminiert, erfolgt durch seine erneute Expression die Beendigung der Inflammationsreaktion. Bei einer chronischen Infektion/Entzündung könnte die Präsenz des GPR34 von Vorteil sein, da mit seiner immunsuppressiven Funktion reaktive und autoimmunologische Schäden für den Organismus begrenzt werden könnten. Diese Hypothese müsste mit weiteren zellulär-experimentellen Ansätzen überprüft werden. Zudem wäre es interessant, die endogenen Signale für die Aktivierung der GPR34-Transkription zu identifizieren.

5.5 Ausblick

Diese Studie umfasste die Etablierung und Primärcharakterisierung eines GPR34-defizienten Mausmodells, erhebt jedoch aufgrund der Fülle der experimentellen Möglichkeiten keinen Anspruch auf Vollständigkeit. Ein zentraler Punkt war die Verifizierung des durch Sugo und Mitarbeiter beschriebenen Agonisten *lyso*-PS (Sugo et al., 2006). Die Mehrzahl unserer eigenen Daten konnte *lyso*-PS als Agonist an humanen und murinen GPR34 nicht bestätigen, jedoch ließ sich ein GPR34-Subtyp durch verschiedene *lyso*-PS aktivieren. Wenngleich *lyso*-PS auch nicht der endogene Ligand von Säuger GPR34-Orthologen zu sein scheint, so rückt dieser Befund die Gruppe von Phospholipiden in den näheren Fokus möglicher Agonisten. Dafür spricht auch, dass andere Mitglieder dieser Gruppe von P2Y₁₂-ähnlichen GPCRs Lipide als endogene Agonisten erkennen. So lässt sich beispielweise der P2Y₁₂ durch Cys-Leukotrien E (Nonaka et al., 2005)

und der GPR87 durch Lysophosphatidylsäure (Tabata et al., 2007) aktivieren. Es wäre deshalb sinnvoll, verschiedene GPR34-Orthologe auf die agonistische Aktivität weiterer Lipide zu testen. Auch ist bekannt, dass die Stimulation von G_i-koppelnden Rezeptoren nicht mit jedem Assay in gleicher Sensitivität gemessen werden kann. Weiterführende Studien zur Agonist-Deorphanisierung sollten daher zusätzliche Assaysysteme wie den CRE (cAMP Responsive Element) –SEAP (secreted alkaline phosphatase)-Reporterassay rekrutieren, die in einigen Fällen eine höhere Sensitivität besitzen können (Hill et al., 2001).

Die Primärcharakterisierung der GPR34-defizienten Mäuse ergab keinerlei pathologische oder sonstige wesentliche Auffälligkeiten unter SPF-Haltungsbedingungen. Es ist also davon auszugehen, dass die GPR34-Funktion erst unter bestimmten Stressbedingungen relevant wird. In unseren initialen Untersuchungen konnte klar gezeigt werden, dass die erfolgreiche Auseinandersetzung mit Antigenen und Pathogenen von einem funktionellen GPR34 profitiert. Diese Untersuchungen sollten die Rationale für weiterführende Untersuchungen zur immunologischen Relevanz des GPR34 bilden. So wäre denkbar, die mikrogliale Funktion des auf diesen Zellen exprimierten GPR34 in entsprechenden ZNS-Mikroläsionsexperimenten zu untersuchen. Hierzu wurden GPR34-defiziente Mäuse bereits auf einen Mausstamm gekreuzt, in welchem die Mikroglia mittels eines transgenen GFP-Konstrukts (CX3CR1 (Fractalkin-Rezeptor-Promotor)-GFP knock-in) fluoreszenzmarkiert ist (Jung et al., 2000). Die Migration von Mikroglia, z.B. zu Läsionen, lässt sich in diesem Mausmodell dann leicht mittels Vitalmikroskopie beobachten.

Zur weiteren Feincharakterisierung der Funktion des GPR34 im Immunsystem ist eine differenzielle Analyse der beobachteten Zytokinerhöhung nach Immunstimulation durch Antigene bzw Pathogene notwendig. Es wäre sinnvoll, ausgewählte Zellen des Immunsystems sowohl im Blut, als auch in der lokalen Immunreaktion mittels FACS und Immunfluoreszenzhistologie zu quantifizieren. Außerdem sollte eine Analyse der Funktionsfähigkeit der phagozytierenden Zellen durchgeführt werden. Dabei gilt es die Phagozytoseleistung von Monozyten und Granulozyten quantitativ und qualitativ zu untersuchen, indem einerseits die stattgefundene Phagozytose quantifiziert und andererseits die Effektivität des „oxidativen burst“ nachgewiesen werden sollte. Es gilt auch die Hypothese zu überprüfen, ob der GPR34 nach erfolgter Aktivierung der T-lymphozytären Differenzierung und Proliferation sich inhibitorisch auf diese Prozesse auswirkt, d.h. immunsuppressiv wirkt. Sehr interessant wäre

dabei einerseits das Verhalten von GPR34-defizienten Mäusen in chronischen Entzündungsmodellen wie z.B. der Kollagen-induzierten Arthritis (Pierer et al., 2009) und andererseits die Untersuchung der Abwehrleistung infolge Sekundärinfektion nach vorhergehender subletaler Infektion.

Auch die Mikroarray-Expressionsuntersuchungen an Herzmuskelgeweben lassen vermuten, dass unter normalen Maushaltungsbedingungen die GPR34-Funktion offenbar untergeordnet ist. Es scheint daher sinnvoll, diese Untersuchungen mit den genomweiten Expressionsdaten unter pathophysiologischen Bedingungen wie z.B. aus myocardialen Ischämie-Modellen (Vidavalur et al., 2009) zu vergleichen. Sollte der GPR34 und sein endogener Agonist für makrophagozytäre Funktionen eine Rolle spielen, ist es in diesem Modell sehr wahrscheinlich, dass Unterschiede in den Expressionsprofilen des geschädigten Myocards und eingewanderter Zellen zwischen WT- und KO-Tieren sichtbar werden. Weiterhin könnte die Untersuchung von Expressionsunterschieden im Herzen nach einer bakteriellen Endokarditis interessant sein.

Aber auch andere Challenging-Modelle von Geweben und Organen, in denen der GPR34 exprimiert wird, könnten zum Verständnis der Relevanz des GPR34 beitragen. Präliminäre Daten an Modellen zum Retinaödem (Wurm et al., 2008) legen nahe, dass das Fehlen des GPR34 zu einem pathologischen Schwellungsverhalten von Gliazellen der Retina (Müllerzellen) führt (A. Wurm, A. Reichenbach, T. Schöneberg, A. Schulz, nichtpublizierte Daten). Diesen Untersuchungen muss nun detaillierter, z.B. an isolierten Müllerzellen und cerebralen Gliazellen, nachgegangen werden.

Das Fehlen des GPR34 im KO-Mausmodell entspricht einer lebenslangen Behandlung der Tiere mit einem Rezeptorantagonisten. Es ist denkbar, dass sich über die Ontogenese in den KO-Tieren Kompensationsmechanismen entwickelt haben könnten, die damit die eigentliche Funktion des GPR34 maskieren. Das GPR34-defiziente Tiermodell wurde jedoch in einer Weise konstruiert (→3.5.1), die es prinzipiell ermöglicht, die GPR34-Funktion zu jeder Zeit und/oder in jedem Organ selektiv mittels einer entsprechenden Cre-Rekombinase zu inaktivieren. Es wäre daher sinnvoll, die GPR34-Funktion akut z.B. im ZNS, im Herzmuskel oder in Zellen des Immunsystems auszuschalten. Aufgrund des Fehlens spezifischer Liganden für den GPR34 wäre perspektivisch auch die Herstellung eines transgenen Tiermodells für einen konstitutiv aktiven Rezeptor hilfreich. Hiermit könnte die Überfunktion des GPR34 detailliert studiert werden.

6 Zusammenfassung der Arbeit und Schlussfolgerungen

Dissertation zur Erlangung des akademischen Grades

Dr. med.

Titel: Die Physiologische Relevanz des G-Protein-gekoppelten Rezeptors GPR34

eingereicht von: Ines Liebscher

angefertigt im: Institut für Biochemie
Abteilung Molekulare Biochemie

betreut von: Prof. Dr. med. T. Schöneberg

Leipzig, den 02.08.2010

Die Familie der G-Protein-gekoppelten Rezeptoren (GPCR) bildet mit über 900 Mitgliedern die größte Gruppe von Membranrezeptoren im menschlichen Organismus. Diese Rezeptoren sind in nahezu alle physiologischen Prozesse eingebunden und stellen die bedeutendste Gruppe von pharmakologischen Angriffspunkten dar. Für etwa die Hälfte aller nicht-olfaktorischen GPCR sind bisher die physiologischen Funktionen und/oder der endogene Agonist nicht bekannt. Das biologische Verständnis der Funktionen im menschlichen Organismus dieser sogenannten „orphan“ GPCR (oGPCR) hat hohe medizinische Relevanz und birgt ein enormes Potential für mögliche therapeutische Interventionen bei Erkrankungen.

In der Gruppe von P2Y₁₂-ähnlichen Rezeptoren befinden sich Mitglieder (P2Y₁₂, P2Y₁₃), die von physiologischer Bedeutung bei der Thrombozytenaggregation und Migration von Zellen in Schädigungsgebiete sind und durch verschiedene pharmakologische Wirkstoffe bereits klinisch-therapeutisch beeinflusst werden. Diese Gruppe von GPCR enthält jedoch auch Mitglieder, deren Funktionen völlig unbekannt sind. Einer von diesen oGPCR ist der GPR34. Ziel dieser Arbeit war es, mittels verschiedener *in vitro*-Methoden und anhand eines GPR34-defizienten

Mausstamms die physiologische Relevanz dieses P2Y₁₂-ähnlichen Rezeptors zu analysieren. Bei diesen Untersuchungen wurden die folgenden wesentlichen Ergebnisse erzielt:

- 1) Wir konnten anhand von *in vitro*-Untersuchungen in heterologen Hefe- und Säugerzellexpressionssystemen mit verschiedenen *lyso*-PS-Derivaten nicht bestätigen, dass diese Agonisten für den humanen und murinen GPR34 darstellen. Nur ein Subtyp des Karpfen GPR34-Orthologs zeigte in allen untersuchten Expressionssystemen eine robuste Signaltransduktion nach Applikation von *lyso*-PS-Derivaten. Eine weitere Suche nach Agonisten des humanen GPR34 innerhalb biologisch-aktiver Lipide scheint daher sinnvoll.
- 2) Es konnte ein Mausmodell mit einer GPR34-Defizienz generiert und etabliert werden. Die GPR34-Defizienz hat keinen wesentlichen Einfluss auf Entwicklung, Wachstum oder Fertilität bei Mäusen. Allerdings muss einschränkend bemerkt werden, dass diese Befunde unter SPF-Bedingungen erhoben wurden und damit apathogene und alimentäre *ad libitum*-Bedingungen bei der Tierhaltung vorlagen. Auch morphologisch und laborchemisch fanden sich keine Auffälligkeiten bei GPR34-defizienten Tieren.
- 3) Genomweite Expressionsuntersuchungen am Myocard, einem Gewebe mit hoher GPR34-Expression, wurden durchgeführt, um auf molekularer Ebene Funktionsunterschiede zwischen WT- und KO-Tieren zu identifizieren. Zwischen den WT- und KO-Tieren waren ca. 360 Gene signifikant differenziell reguliert, jedoch ergab die Einordnung dieser in einen biologischen oder physiologischen Kontext kein klares Bild über eine Veränderung einer bekannten zellulären Funktion. Mittels qPCR konnten bisher für zwei Gene (Epha4 und Hsd17b7) die differenzielle Expression zwischen KO- und WT-Tieren im Myocard verifiziert werden.
- 4) Aus früheren Untersuchungen ist bekannt, dass *lyso*-PS über einen IP- und Ca²⁺-abhängigen Prozess Histamin aus Mastzellen der Maus freisetzen kann. Die Untersuchungen von Peritonealmastzellen aus WT- und KO-Mäusen zeigten, dass dieser Effekt nicht durch den GPR34 vermittelt wird.
- 5) In verschiedenen Studien wurde über die chemotaktische Wirkung von *lyso*-PS auf migrationsfähige Zellen berichtet. Diese Befunde konnten an Zellen aus der Peritoneallavage bestätigt werden. Jedoch ist diese chemotaktische Wirkung von *lyso*-PS wahrscheinlich unabhängig von der Präsenz des GPR34. Peritoneallavage-Zellen aus

GPR34-defizienten Tieren zeigten eine verstärkte basale Migration, die durch *lyso*-PS nicht weiter gesteigert werden konnte.

- 6) Im Delayed-type Hypersensitivity (DTH)-Test zeigten die GPR34-defizienten Tiere eine signifikant stärkere Schwellung der methylBSA-injizierten Pfote als die WT-Tiere. Die verstärkte DTH-Reaktion bei GPR34-defizienten Tieren war verbunden mit einer signifikant erhöhten basalen Konzentration aller untersuchten Zytokine im Überstand der aus den Tieren angelegten Milzzellkultur. Bei Re-Exposition mit dem Antigen konnte bei WT-Tieren eine wesentlich stärkere Erhöhung der Zytokinkonzentrationen beobachtet werden als bei GPR34-defizienten Tieren. Diese Untersuchungen sprechen für eine stärkere und länger andauernde Aktivierung der Th1- und Th2 Antwort in GPR34-defizienten Tieren, die mit einer eingeschränkten Reaktivierung einhergeht.
- 7) Wildtyp- und GPR34-defiziente Mäuse wurden mit dem pathogenen Pilz *Cryptococcus neoformans* infiziert und der Erkrankungsverlauf beobachtet. Nach drei Monaten war die Keimlast in den Lungen, der Milz und im Gehirn von GPR34-defizienten Tieren im Vergleich zu WT-Tieren signifikant höher. Ähnlich wie im DTH-Test fanden sich nach der Infektion mit *C. neoformans* im Vergleich zum WT signifikant erhöhte Zytokinspiegel im Überstand von Pulmonallavage-Zellen.

Momentan muss der GPR34 als orphan GPCR angesehen werden, da sowohl unsere eigenen Studien, als auch die Arbeiten anderer Gruppen die agonistische Wirkung von *lyso*-PS am humanen GPR34 nicht bestätigen konnten. Die Funktion des GPR34 ist für grundlegende Funktionen, wie z.B. Wachstum und Fertilität nicht notwendig. Jedoch scheint dieser evolutionär hoch konservierte Rezeptor eine wichtige Funktion in der Feinregulation der zellulären Immunabwehr auszuüben. Weiterführende Untersuchungen sollten sich der Identifizierung des endogenen Agonisten und der Funktion des GPR34 bei der Koordinierung der zellulären Immunreaktion widmen.

7 Literaturverzeichnis

- Angers, S., Salahpour, A., Joly, E., Hilairet, S., Chelsky, D., Dennis, M. and Bouvier, M. (2000) Detection of beta 2-adrenergic receptor dimerization in living cells using bioluminescence resonance energy transfer (BRET). *Proc Natl Acad Sci U S A*, **97**, 3684-3689.
- Aoki, J., Nagai, Y., Hosono, H., Inoue, K. and Arai, H. (2002) Structure and function of phosphatidylserine-specific phospholipase A1. *Biochim Biophys Acta*, **1582**, 26-32.
- Asherson, G.L., Dieli, F., Sireci, G. and Salerno, A. (1996) Role of IL-4 in delayed type hypersensitivity. *Clin Exp Immunol*, **103**, 1-4.
- Bae, Y.S., Yi, H., Lee, H., Jo, E., Kim, J., Lee, T., Ye, R., Kwak, J. and Ryu, S. (2003) Differential activation of formyl peptide receptor-like 1 by peptide ligands. *J Immunol*, **171**, 6807-6813.
- Barbaric, I., Miller, G. and Dear, T.N. (2007) Appearances can be deceiving: phenotypes of knockout mice. *Brief Funct Genomic Proteomic*, **6**, 91-103.
- Bedard, A., Tremblay, P., Chernomoretz, A. and Vallieres, L. (2007) Identification of genes preferentially expressed by microglia and upregulated during cuprizone-induced inflammation. *Glia*, **55**, 777-789.
- Bellazzi, R. and Zupan, B. (2007) Towards knowledge-based gene expression data mining. *J Biomed Inform*, **40**, 787-802.
- Bellini, F., Viola, G., Menegus, A.M., Toffano, G. and Bruni, A. (1990) Signalling mechanism in the lysophosphatidylserine-induced activation of mouse mast cells. *Biochim Biophys Acta*, **1052**, 216-220.
- Berridge, M.J. (1983) Rapid accumulation of inositol trisphosphate reveals that agonists hydrolyse polyphosphoinositides instead of phosphatidylinositol. *Biochem J*, **212**, 849-858.
- Bjarnadottir, T.K., Fredriksson, R., Hoglund, P.J., Gloriam, D.E., Lagerstrom, M.C. and Schioth, H.B. (2004) The human and mouse repertoire of the adhesion family of G-protein-coupled receptors. *Genomics*, **84**, 23-33.
- Black, C.A. (1999) Delayed type hypersensitivity: current theories with an historic perspective. *Dermatol Online J*, **5**, 7.
- Busse, K., Strotmann, R., Strecker, K., Wegner, F., Devanathan, V., Gohla, A., Schöneberg, T. and Schwarz, J. (2009) Adaptive gene regulation in RGS9 knock-out mice. *Mol Psychiatry*.
- Cahan, P., Rovegno, F., Mooney, D., Newman, J.C., St Laurent, G., 3rd and McCaffrey, T.A. (2007) Meta-analysis of microarray results: challenges, opportunities, and recommendations for standardization. *Gene*, **401**, 12-18.
- Cattaneo, M., Zighetti, M.L., Lombardi, R., Martinez, C., Lecchi, A., Conley, P.B., Ware, J. and Ruggeri, Z.M. (2003) Molecular bases of defective signal transduction in the platelet P2Y12 receptor of a patient with congenital bleeding. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **100**, 1978-1983.
- Ceglarek, U., Muller, P., Stach, B., Buhrdel, P., Thiery, J. and Kiess, W. (2002) Validation of the phenylalanine/tyrosine ratio determined by tandem mass spectrometry: sensitive newborn screening for phenylketonuria. *Clin Chem Lab Med*, **40**, 693-697.
- Chambers, J.K., Macdonald, L.E., Sarau, H.M., Ames, R.S., Freeman, K., Foley, J.J., Zhu, Y., McLaughlin, M.M., Murdock, P., McMillan, L., Trill, J., Swift, A., Aiyar, N., Taylor, P.,

- Vawter, L., Naheed, S., Szekeres, P., Hervieu, G., Scott, C., Watson, J.M., Murphy, A.J., Duzic, E., Klein, C., Bergsma, D.J., Wilson, S. and Livi, G.P. (2000) A G protein-coupled receptor for UDP-glucose. *J Biol Chem*, **275**, 10767-10771.
- Chen, W., Kelly, M.A., Opitz-Araya, X., Thomas, R.E., Low, M.J. and Cone, R.D. (1997) Exocrine gland dysfunction in MC5-R-deficient mice: evidence for coordinated regulation of exocrine gland function by melanocortin peptides. *Cell*, **91**, 789-798.
- Cherezov, V., Rosenbaum, D.M., Hanson, M.A., Rasmussen, S.G., Thian, F.S., Kobilka, T.S., Choi, H.J., Kuhn, P., Weis, W.I., Kobilka, B.K. and Stevens, R.C. (2007) High-resolution crystal structure of an engineered human beta2-adrenergic G protein-coupled receptor. *Science*, **318**, 1258-1265.
- Cho, E.Y., Yun, C.H., Chae, H.Z., Chae, H.J. and Ahn, T. (2008) Lysophosphatidylserine-induced functional switch of human cytochrome P450 1A2 and 2E1 from monooxygenase to phospholipase D. *Biochem Biophys Res Commun*, **376**, 584-589.
- Civelli, O., Reinscheid, R.K. and Nothacker, H.P. (1999) Orphan receptors, novel neuropeptides and reverse pharmaceutical research. *Brain Res*, **848**, 63-65.
- Civelli, O., Saito, Y., Wang, Z., Nothacker, H.P. and Reinscheid, R.K. (2006) Orphan GPCRs and their ligands. *Pharmacol Ther*, **110**, 525-532.
- Coonan, J.R., Bartlett, P.F. and Galea, M.P. (2003) Role of EphA4 in defining the position of a motoneuron pool within the spinal cord. *J Comp Neurol*, **458**, 98-111.
- Dalton, D.K., Pitts-Meek, S., Keshav, S., Figari, I.S., Bradley, A. and Stewart, T.A. (1993) Multiple defects of immune cell function in mice with disrupted interferon-gamma genes. *Science*, **259**, 1739-1742.
- Deininger, K., Eder, M., Kramer, E.R., Zieglgansberger, W., Dodt, H.U., Dornmair, K., Colicelli, J. and Klein, R. (2008) The Rab5 guanylate exchange factor Rin1 regulates endocytosis of the EphA4 receptor in mature excitatory neurons. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **105**, 12539-12544.
- Deknuydt, F., Bioley, G., Valmori, D. and Ayyoub, M. (2009) IL-1beta and IL-2 convert human Treg into T(H)17 cells. *Clin Immunol*.
- Di Virgilio, F., Chiozzi, P., Ferrari, D., Falzoni, S., Sanz, J.M., Morelli, A., Torboli, M., Bolognesi, G. and Baricordi, O.R. (2001) Nucleotide receptors: an emerging family of regulatory molecules in blood cells. *Blood*, **97**, 587-600.
- Draghici, S., Khatri, P., Bhavsar, P., Shah, A., Krawetz, S. and Tainsky, M.A. (2003) Onto-Tools, The toolkit of the modern biologist: Onto-Express, Onto-Compare, Onto-Design and Onto-Translate. *Nucleic Acids Res*, **31**, 3775-3781.
- Engemaier, E., Römpler, H., Schöneberg, T. and Schulz, A. (2006) Genomic and supragenomic structure of the nucleotide-like G-protein-coupled receptor GPR34. *Genomics*, **87**, 254-264.
- Ferretti, L., Karnik, S.S., Khorana, H.G., Nassal, M. and Oprian, D.D. (1986) Total synthesis of a gene for bovine rhodopsin. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **83**, 599-603.
- Ferrick, D.A., Schrenzel, M.D., Mulvania, T., Hsieh, B., Ferlin, W.G. and Lepper, H. (1995) Differential production of interferon-gamma and interleukin-4 in response to Th1- and Th2-stimulating pathogens by gamma delta T cells in vivo. *Nature*, **373**, 255-257.
- Foord, S.M., Bonner, T.I., Neubig, R.R., Rosser, E.M., Pin, J.P., Davenport, A.P., Spedding, M. and Harmar, A.J. (2005) International Union of Pharmacology. XLVI. G protein-coupled receptor list. *Pharmacol Rev*, **57**, 279-288.

- Fredriksson, R., Lagerstrom, M.C., Lundin, L.G. and Schioth, H.B. (2003) The G-protein-coupled receptors in the human genome form five main families. Phylogenetic analysis, paralogon groups, and fingerprints. *Mol Pharmacol*, **63**, 1256-1272.
- Fredriksson, R., Lagerstrom, M.C. and Schioth, H.B. (2005) Expansion of the superfamily of G-protein-coupled receptors in chordates. *Ann N Y Acad Sci*, **1040**, 89-94.
- Gagarin, D., Yang, Z., Butler, J., Wimmer, M., Du, B., Cahan, P. and McCaffrey, T.A. (2005) Genomic profiling of acquired resistance to apoptosis in cells derived from human atherosclerotic lesions: potential role of STATs, cyclinD1, BAD, and Bcl-XL. *J Mol Cell Cardiol*, **39**, 453-465.
- Gallarda, B.W., Bonanomi, D., Muller, D., Brown, A., Alaynick, W.A., Andrews, S.E., Lemke, G., Pfaff, S.L. and Marquardt, T. (2008) Segregation of axial motor and sensory pathways via heterotypic trans-axonal signaling. *Science*, **320**, 233-236.
- Gao, J.L., Chen, H., Filie, J.D., Kozak, C.A. and Murphy, P.M. (1998) Differential expansion of the N-formylpeptide receptor gene cluster in human and mouse. *Genomics*, **51**, 270-276.
- Gilad, Y., Bustamante, C.D., Lancet, D. and Paabo, S. (2003) Natural selection on the olfactory receptor gene family in humans and chimpanzees. *Am J Hum Genet*, **73**, 489-501.
- Gloriam, D.E., Fredriksson, R. and Schioth, H.B. (2007) The G protein-coupled receptor subset of the rat genome. *BMC Genomics*, **8**, 338.
- Godfrey, D.I., Hammond, K.J., Poulton, L.D., Smyth, M.J. and Baxter, A.G. (2000) NKT cells: facts, functions and fallacies. *Immunol Today*, **21**, 573-583.
- Haitina, T., Fredriksson, R., Foord, S.M., Schioth, H.B. and Gloriam, D.E. (2009) The G protein-coupled receptor subset of the dog genome is more similar to that in humans than rodents. *BMC Genomics*, **10**, 24.
- Han, Y., Guo, Q., Zhang, M., Chen, Z. and Cao, X. (2009) CD69+ CD4+ CD25- T cells, a new subset of regulatory T cells, suppress T cell proliferation through membrane-bound TGF-beta 1. *J Immunol*, **182**, 111-120.
- Higuchi, R., Fockler, C., Dollinger, G. and Watson, R. (1993) Kinetic PCR analysis: real-time monitoring of DNA amplification reactions. *Biotechnology (N Y)*, **11**, 1026-1030.
- Hill, S.J., Baker, J.G. and Rees, S. (2001) Reporter-gene systems for the study of G-protein-coupled receptors. *Curr Opin Pharmacol*, **1**, 526-532.
- Hisaeda, H., Nagasawa, H., Maeda, K., Maekawa, Y., Ishikawa, H., Ito, Y., Good, R.A. and Himeno, K. (1995) Gamma delta T cells play an important role in hsp65 expression and in acquiring protective immune responses against infection with *Toxoplasma gondii*. *J Immunol*, **155**, 244-251.
- Hollopeter, G., Jantzen, H.M., Vincent, D., Li, G., England, L., Ramakrishnan, V., Yang, R.B., Nurden, P., Nurden, A., Julius, D. and Conley, P.B. (2001) Identification of the platelet ADP receptor targeted by antithrombotic drugs. *Nature*, **409**, 202-207.
- Horigome, K., Bullock, E.D. and Johnson, E.M., Jr. (1994) Effects of nerve growth factor on rat peritoneal mast cells. Survival promotion and immediate-early gene induction. *J Biol Chem*, **269**, 2695-2702.
- Howard, A.D., McAllister, G., Feighner, S.D., Liu, Q., Nargund, R.P., Van der Ploeg, L.H. and Patchett, A.A. (2001) Orphan G-protein-coupled receptors and natural ligand discovery. *Trends Pharmacol Sci*, **22**, 132-140.
- Huang, S., Hendriks, W., Althage, A., Hemmi, S., Bluethmann, H., Kamijo, R., Vilcek, J., Zinkernagel, R.M. and Aguet, M. (1993) Immune response in mice that lack the interferon-gamma receptor. *Science*, **259**, 1742-1745.

- Im, D.S., Heise, C.E., Ancellin, N., O'Dowd, B.F., Shei, G.J., Heavens, R.P., Rigby, M.R., Hla, T., Mandala, S., McAllister, G., George, S.R. and Lynch, K.R. (2000a) Characterization of a novel sphingosine 1-phosphate receptor, Edg-8. *J Biol Chem*, **275**, 14281-14286.
- Im, D.S., Heise, C.E., Harding, M.A., George, S.R., O'Dowd, B.F., Theodorescu, D. and Lynch, K.R. (2000b) Molecular cloning and characterization of a lysophosphatidic acid receptor, Edg-7, expressed in prostate. *Mol Pharmacol*, **57**, 753-759.
- Irizarry, R.A., Hobbs, B., Collin, F., Beazer-Barclay, Y.D., Antonellis, K.J., Scherf, U. and Speed, T.P. (2003) Exploration, normalization, and summaries of high density oligonucleotide array probe level data. *Biostatistics*, **4**, 249-264.
- Jacobs, K.A., Collins-Racie, L.A., Colbert, M., Duckett, M., Golden-Fleet, M., Kelleher, K., Kriz, R., LaVallie, E.R., Merberg, D., Spaulding, V., Stover, J., Williamson, M.J. and McCoy, J.M. (1997) A genetic selection for isolating cDNAs encoding secreted proteins. *Gene*, **198**, 289-296.
- Jung, S., Aliberti, J., Graemmel, P., Sunshine, M.J., Kreutzberg, G.W., Sher, A. and Littman, D.R. (2000) Analysis of fractalkine receptor CX(3)CR1 function by targeted deletion and green fluorescent protein reporter gene insertion. *Mol Cell Biol*, **20**, 4106-4114.
- Kanehisa, M., Goto, S., Hattori, M., Aoki-Kinoshita, K.F., Itoh, M., Kawashima, S., Katayama, T., Araki, M. and Hirakawa, M. (2006) From genomics to chemical genomics: new developments in KEGG. *Nucleic Acids Res*, **34**, 354-357.
- Kanehisa, M., Goto, S., Kawashima, S. and Nakaya, A. (2002) The KEGG databases at GenomeNet. *Nucleic Acids Res*, **30**, 42-46.
- Kawakami, K. (2004) Regulation by innate immune T lymphocytes in the host defense against pulmonary infection with *Cryptococcus neoformans*. *Jpn J Infect Dis*, **57**, 137-145.
- Kawakami, K., Kinjo, Y., Uezu, K., Yara, S., Miyagi, K., Koguchi, Y., Nakayama, T., Taniguchi, M. and Saito, A. (2001) Monocyte chemoattractant protein-1-dependent increase of V alpha 14 NKT cells in lungs and their roles in Th1 response and host defense in cryptococcal infection. *J Immunol*, **167**, 6525-6532.
- Kim, K., Kim, H.L., Lee, Y.K., Han, M., Sacket, S.J., Jo, J.Y., Kim, Y.L. and Im, D.S. (2008) Lysophosphatidylserine induces calcium signaling through Ki16425/VPC32183-sensitive GPCR in bone marrow-derived mast cells and in C6 glioma and colon cancer cells. *Arch Pharm Res*, **31**, 310-317.
- Kleinschek, M.A., Muller, U., Brodie, S.J., Stenzel, W., Kohler, G., Blumenschein, W.M., Straubinger, R.K., McClanahan, T., Kastelein, R.A. and Alber, G. (2006) IL-23 enhances the inflammatory cell response in *Cryptococcus neoformans* infection and induces a cytokine pattern distinct from IL-12. *J Immunol*, **176**, 1098-1106.
- Kobilka, B. and Schertler, G.F. (2008) New G-protein-coupled receptor crystal structures: insights and limitations. *Trends Pharmacol Sci*, **29**, 79-83.
- Kobilka, B.K., Frielle, T., Collins, S., Yang-Feng, T., Kobilka, T.S., Francke, U., Lefkowitz, R.J. and Caron, M.G. (1987a) An intronless gene encoding a potential member of the family of receptors coupled to guanine nucleotide regulatory proteins. *Nature*, **329**, 75-79.
- Kobilka, B.K., Matsui, H., Kobilka, T.S., Yang-Feng, T.L., Francke, U., Caron, M.G., Lefkowitz, R.J. and Regan, J.W. (1987b) Cloning, sequencing, and expression of the gene coding for the human platelet alpha 2-adrenergic receptor. *Science*, **238**, 650-656.
- Koguchi, Y. and Kawakami, K. (2002) Cryptococcal infection and Th1-Th2 cytokine balance. *Int Rev Immunol*, **21**, 423-438.

- Kondo, S., Wang, B., Fujisawa, H., Shivji, G.M., Echtenacher, B., Mak, T.W. and Sauder, D.N. (1995) Effect of gene-targeted mutation in TNF receptor (p55) on contact hypersensitivity and ultraviolet B-induced immunosuppression. *J Immunol*, **155**, 3801-3805.
- Kostenis, E., Waelbroeck, M. and Milligan, G. (2005) Techniques: promiscuous Galpha proteins in basic research and drug discovery. *Trends Pharmacol Sci*, **26**, 595-602.
- Kozak, M. (2002) Pushing the limits of the scanning mechanism for initiation of translation. *Gene*, **299**, 1-34.
- Kuroda, C., Kubota, S., Kawata, K., Aoyama, E., Sumiyoshi, K., Oka, M., Inoue, M., Minagi, S. and Takigawa, M. (2008) Distribution, gene expression, and functional role of EphA4 during ossification. *Biochem Biophys Res Commun*, **374**, 22-27.
- Ladds, G., Goddard, A. and Davey, J. (2005) Functional analysis of heterologous GPCR signalling pathways in yeast. *Trends Biotechnol*, **23**, 367-373.
- Lander, E., Linton LM, Birren B, Nusbaum C, Zody MC, Baldwin J, Devon K, Dewar K, Doyle M, FitzHugh W, Funke R, Gage D, Harris K, Heaford A, Howland J, Kann L, Lehoczky J, LeVine R, McEwan P, McKernan K, Meldrim J, Mesirov JP, Miranda C, Morris W, Naylor J, Raymond C, Rosetti M, Santos R, Sheridan A, Sougnez C, Stange-Thomann N, Stojanovic N, Subramanian A, Wyman D, Rogers J, Sulston J, Ainscough R, Beck S, Bentley D, Burton J, Clee C, Carter N, Coulson A, Deadman R, Deloukas P, Dunham A, Dunham I, Durbin R, French L, Grafham D, Gregory S, Hubbard T, Humphray S, Hunt A, Jones M, Lloyd C, McMurray A, Matthews L, Mercer S, Milne S, Mullikin JC, Mungall A, Plumb R, Ross M, Shownkeen R, Sims S, Waterston RH, Wilson RK, Hillier LW, McPherson JD, Marra MA, Mardis ER, Fulton LA, Chinwalla AT, Pepin KH, Gish WR, Chisoe SL, Wendl MC, Delehaunty KD, Miner TL, Delehaunty A, Kramer JB, Cook LL, Fulton RS, Johnson DL, Minx PJ, Clifton SW, Hawkins T, Branscomb E, Predki P, Richardson P, Wenning S, Slezak T, Doggett N, Cheng JF, Olsen A, Lucas S, Elkin C, Uberbacher E, Frazier M, Gibbs RA, Muzny DM, Scherer SE, Bouck JB, Sodergren EJ, Worley KC, Rives CM, Gorrell JH, Metzker ML, Naylor SL, Kucherlapati RS, Nelson DL, Weinstock GM, Sakaki Y, Fujiyama A, Hattori M, Yada T, Toyoda A, Itoh T, Kawagoe C, Watanabe H, Totoki Y, Taylor T, Weissenbach J, Heilig R, Saurin W, Artiguenave F, Brottier P, Bruls T, Pelletier E, Robert C, Wincker P, Smith DR, Doucette-Stamm L, Rubenfield M, Weinstock K, Lee HM, Dubois J, Rosenthal A, Platzer M, Nyakatura G, Taudien S, Rump A, Yang H, Yu J, Wang J, Huang G, Gu J, Hood L, Rowen L, Madan A, Qin S, Davis RW, Federspiel NA, Abola AP, Proctor MJ, Myers RM, Schmutz J, Dickson M, Grimwood J, Cox DR, Olson MV, Kaul R, Raymond C, Shimizu N, Kawasaki K, Minoshima S, Evans GA, Athanasiou M, Schultz R, Roe BA, Chen F, Pan H, Ramsier J, Lehrach H, Reinhardt R, McCombie WR, de la Bastide M, Dedhia N, Blöcker H, Hornischer K, Nordsiek G, Agarwala R, Aravind L, Bailey JA, Bateman A, Batzoglou S, Birney E, Bork P, Brown DG, Burge CB, Cerutti L, Chen HC, Church D, Clamp M, Copley RR, Doerks T, Eddy SR, Eichler EE, Furey TS, Galagan J, Gilbert JG, Harmon C, Hayashizaki Y, Haussler D, Hermjakob H, Hokamp K, Jang W, Johnson LS, Jones TA, Kasif S, Kasprzyk A, Kennedy S, Kent WJ, Kitts P, Koonin EV, Korf I, Kulp D, Lancet D, Lowe TM, McLysaght A, Mikkelsen T, Moran JV, Mulder N, Pollara VJ, Ponting CP, Schuler G, Schultz J, Slater G, Smit AF, Stupka E, Szustakowski J, Thierry-Mieg D, Thierry-Mieg J, Wagner L, Wallis J, Wheeler R, Williams A, Wolf YI, Wolfe KH, Yang SP, Yeh RF, Collins F, Guyer MS, Peterson J, Felsenfeld A, Wetterstrand KA, Patrinos A, Morgan MJ, de Jong P, Catanese JJ, Osoegawa K, Shizuya H, Choi S, Chen

- YJ; International Human Genome Sequencing Consortium. (2004) Finishing the euchromatic sequence of the human genome. *Nature*, **431**, 931-945.
- Lee, D.K., Nguyen, T., Lynch, K.R., Cheng, R., Vanti, W.B., Arkhitko, O., Lewis, T., Evans, J.F., George, S.R. and O'Dowd, B.F. (2001) Discovery and mapping of ten novel G protein-coupled receptor genes. *Gene*, **275**, 83-91.
- Lee, S.Y., Lee, H.Y., Kim, S.D., Jo, S.H., Shim, J.W., Lee, H.J., Yun, J. and Bae, Y.S. (2008) Lysophosphatidylserine stimulates chemotactic migration in U87 human glioma cells. *Biochem Biophys Res Commun*, **374**, 147-151.
- Lee, Y.K., Kim, K., Kim, H.L., Sacket, S.J., Han, M., Jo, J.Y. and Im, D.S. (2007) Lysophosphatidylserine increases membrane potentials in rat C6 glioma cells. *Arch Pharm Res*, **30**, 1096-1101.
- Lefkowitz, R.J., Cotecchia, S., Samama, P. and Costa, T. (1993) Constitutive activity of receptors coupled to guanine nucleotide regulatory proteins. *Trends Pharmacol Sci*, **14**, 303-307.
- Letterio, J.J. and Roberts, A.B. (1998) Regulation of immune responses by TGF-beta. *Annu Rev Immunol*, **16**, 137-161.
- Levoye, A., Dam, J., Ayoub, M.A., Guillaume, J.-L. and Jockers, R. (2006) Do orphan G-protein-coupled receptors have ligand-independent functions? New insights from receptor heterodimers. *EMBO reports*, **7**, 1094-1098.
- Livak, K.J. and Schmittgen, T.D. (2001) Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. *Methods*, **25**, 402-408.
- Malek, T.R. and Bayer, A.L. (2004) Tolerance, not immunity, crucially depends on IL-2. *Nat Rev Immunol*, **4**, 665-674.
- Marchese, A., Sawzdargo, M., Nguyen, T., Cheng, R., Heng, H.H., Nowak, T., Im, D.S., Lynch, K.R., George, S.R. and O'Dowd B, F. (1999) Discovery of three novel orphan G-protein-coupled receptors. *Genomics*, **56**, 12-21.
- Mikkelsen, T.S., Hillier, L.W., Eichler, E.E., Zody, M.C., Jaffe, D.B., Yang, S.P., Enard, W., Hellmann, I., Lindblad-Toh, K., Altheide, T.K., Archidiacono, N., Bork, P., Butler, J., Chang, J.L., Cheng, Z., Chinwalla, A.T., deJong, P., Delehaunty, K.D., Fronick, C.C., Fulton, L.L., Gilad, Y., Glusman, G., Gnerre, S., Graves, T.A., Hayakawa, T., Hayden, K.E., Huang, X., Ji, H.W., Kent, J., King, M.C., Kulbokas, E.J., Lee, M.K., Liu, G., Lopez-Otin, C., Makova, K.D., Man, O., Mardis, E.R., Mauceli, E., Miner, T.L., Nash, W.E., Nelson, J.O., Pääbo, S., Patterson, N.J., Pohl, C.S., Pollard, K.S., Prüfer, K., Puente, X.S., Reich, D., Rocchi, M., Rosenbloom, K., Ruvolo, M., Richter, D.J., Schaffner, S.F., Smit, A.F.A., Smith, S.M., Suyama, M., Taylor, J., Torrents, D., Tuzun, E., Varki, A., Velasco, G., Ventura, M., Wallis, J.W., Wendl, M.C., Wilson, R.K., Lander, E.S. and Waterston, R.H. (2005) Initial sequence of the chimpanzee genome and comparison with the human genome. *Nature*, **437**, 69-87.
- Miranda, R.D.V. (1993) Experimentelle Untersuchungen über die Entfernung von Histamin und Leukotrienen aus wässrigen Lösungen und aus Plasma zur Anwendung in einem extrakorporalen Entgiftungssystem. *Univ.Medical School*, Hanover, Germany.
- Mody, C.H., Lipscomb, M.F., Street, N.E. and Toews, G.B. (1990) Depletion of CD4+ (L3T4+) lymphocytes in vivo impairs murine host defense to *Cryptococcus neoformans*. *J Immunol*, **144**, 1472-1477.
- Mombaerts, P. (2001) The human repertoire of odorant receptor genes and pseudogenes. *Annu Rev Genomics Hum Genet*, **2**, 493-510.

- Mueller, P., Schulze, A., Schindler, I., Ethofer, T., Buehrdel, P. and Ceglarek, U. (2003) Validation of an ESI-MS/MS screening method for acylcarnitine profiling in urine specimens of neonates, children, adolescents and adults. *Clin Chim Acta*, **327**, 47-57.
- Muller, U., Stenzel, W., Kohler, G., Werner, C., Polte, T., Hansen, G., Schutze, N., Straubinger, R.K., Blessing, M., McKenzie, A.N., Brombacher, F. and Alber, G. (2007) IL-13 induces disease-promoting type 2 cytokines, alternatively activated macrophages and allergic inflammation during pulmonary infection of mice with *Cryptococcus neoformans*. *J Immunol*, **179**, 5367-5377.
- Mumberg, D., Muller, R. and Funk, M. (1995) Yeast vectors for the controlled expression of heterologous proteins in different genetic backgrounds. *Gene*, **156**, 119-122.
- Munoz, J.J., Alfaro, D., Garcia-Ceca, J., Alonso, C.L., Jimenez, E. and Zapata, A. (2006) Thymic alterations in EphA4-deficient mice. *J Immunol*, **177**, 804-813.
- Murai, K.K., Nguyen, L.N., Irie, F., Yamaguchi, Y. and Pasquale, E.B. (2003) Control of hippocampal dendritic spine morphology through ephrin-A3/EphA4 signaling. *Nat Neurosci*, **6**, 153-160.
- Murakami, M., Shiraiishi, A., Tabata, K. and Fujita, N. (2008) Identification of the orphan GPCR, P2Y(10) receptor as the sphingosine-1-phosphate and lysophosphatidic acid receptor. *Biochem Biophys Res Commun*, **371**, 707-712.
- Nagaeva, O., Jonsson, L. and Mincheva-Nilsson, L. (2002) Dominant IL-10 and TGF-beta mRNA expression in gammadeltaT cells of human early pregnancy decidua suggests immunoregulatory potential. *Am J Reprod Immunol*, **48**, 9-17.
- Nathans, J. and Hogness, D.S. (1983) Isolation, sequence analysis, and intron-exon arrangement of the gene encoding bovine rhodopsin. *Cell*, **34**, 807-814.
- Nelson, G., Hoon, M.A., Chandrashekar, J., Zhang, Y., Ryba, N.J. and Zuker, C.S. (2001) Mammalian sweet taste receptors. *Cell*, **106**, 381-390.
- Niswender, C.M., Copeland, S.C., Herrick-Davis, K., Emeson, R.B. and Sanders-Bush, E. (1999) RNA editing of the human serotonin 5-hydroxytryptamine 2C receptor silences constitutive activity. *J Biol Chem*, **274**, 9472-9478.
- Nonaka, Y., Hiramoto, T. and Fujita, N. (2005) Identification of endogenous surrogate ligands for human P2Y12 receptors by in silico and in vitro methods. *Biochem Biophys Res Commun*, **337**, 281-288.
- Offermanns, S. (2000) Mammalian G-protein function in vivo: new insights through altered gene expression. *Rev Physiol Biochem Pharmacol*, **140**, 63-133.
- Offermanns, S. and Simon, M.I. (1995) G alpha 15 and G alpha 16 couple a wide variety of receptors to phospholipase C. *J Biol Chem*, **270**, 15175-15180.
- Ohnesorg, T. and Adamski, J. (2006) Analysis of the 5' flanking regions of human and murine HSD17B7: identification of a cholesterol dependent enhancer region. *Mol Cell Endocrinol*, **248**, 164-167.
- Ohnesorg, T., Keller, B., Hrabe de Angelis, M. and Adamski, J. (2006) Transcriptional regulation of human and murine 17beta-hydroxysteroid dehydrogenase type-7 confers its participation in cholesterol biosynthesis. *J Mol Endocrinol*, **37**, 185-197.
- Okayama, H. and Berg, P. (1983) A cDNA cloning vector that permits expression of cDNA inserts in mammalian cells. *Mol Cell Biol*, **3**, 280-289.
- Olejniczak, K. and Kasprzak, A. (2008) Biological properties of interleukin 2 and its role in pathogenesis of selected diseases--a review. *Med Sci Monit*, **14**, RA179-189.

- Palczewski, K., Kumasaka, T., Hori, T., Behnke, C.A., Motoshima, H., Fox, B.A., Le Trong, I., Teller, D.C., Okada, T., Stenkamp, R.E., Yamamoto, M. and Miyano, M. (2000) Crystal structure of rhodopsin: A G protein-coupled receptor. *Science*, **289**, 739-745.
- Park, K.S., Lee, H.Y., Kim, M.K., Shin, E.H. and Bae, Y.S. (2005) Lysophosphatidylserine stimulates leukemic cells but not normal leukocytes. *Biochem Biophys Res Commun*, **333**, 353-358.
- Park, K.S., Lee, H.Y., Kim, M.K., Shin, E.H., Jo, S.H., Kim, S.D., Im, D.S. and Bae, Y.S. (2006) Lysophosphatidylserine stimulates L2071 mouse fibroblast chemotactic migration via a process involving pertussis toxin-sensitive trimeric G-proteins. *Mol Pharmacol*, **69**, 1066-1073.
- Pausch, M.H. (1997) G-protein-coupled receptors in *Saccharomyces cerevisiae*: high-throughput screening assays for drug discovery. *Trends Biotechnol*, **15**, 487-494.
- Perone, M.J., Windeatt, S., Morrison, E., Shering, A., Tomasec, P., Linton, E., Lowenstein, P.R. and Castro, M.G. (1998) Intracellular retention of the corticotrophin-releasing hormone (CRH) precursor within COS-7 cells. *J Histochem Cytochem*, **46**, 1193-1197.
- Pierer, M., Schulz, A., Rossol, M., Kendzia, E., Kyburz, D., Haentzschel, H., Baerwald, C. and Wagner, U. (2009) Herpesvirus entry mediator-Ig treatment during immunization aggravates rheumatoid arthritis in the collagen-induced arthritis model. *J Immunol*, **182**, 3139-3145.
- Rasmussen, S.G., Choi, H.J., Rosenbaum, D.M., Kobilka, T.S., Thian, F.S., Edwards, P.C., Burghammer, M., Ratnala, V.R., Sanishvili, R., Fischetti, R.F., Schertler, G.F., Weis, W.I. and Kobilka, B.K. (2007) Crystal structure of the human beta2 adrenergic G-protein-coupled receptor. *Nature*, **450**, 383-387.
- Rogers, D.C., Fisher, E.M., Brown, S.D., Peters, J., Hunter, A.J. and Martin, J.E. (1997) Behavioral and functional analysis of mouse phenotype: SHIRPA, a proposed protocol for comprehensive phenotype assessment. *Mamm Genome*, **8**, 711-713.
- Rogers, D.C., Peters, J., Martin, J.E., Ball, S., Nicholson, S.J., Witherden, A.S., Hafezparast, M., Latcham, J., Robinson, T.L., Quilter, C.A. and Fisher, E.M. (2001) SHIRPA, a protocol for behavioral assessment: validation for longitudinal study of neurological dysfunction in mice. *Neurosci Lett*, **306**, 89-92.
- Rokosh, D.G. and Simpson, P.C. (2002) Knockout of the alpha 1A/C-adrenergic receptor subtype: the alpha 1A/C is expressed in resistance arteries and is required to maintain arterial blood pressure. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **99**, 9474-9479.
- Römpler, H., Stäubert, C., Thor, D., Schulz, A., Hofreiter, M. and Schöneberg, T. (2007) G protein-coupled time travel: evolutionary aspects of GPCR research. *Mol Interv*, **7**, 17-25.
- Sambrook, J.F. and Maniatis, T. (1989) Molecular cloning, a laboratory manual. *Cold Spring Harbor Press*.
- Sanger, F., Nicklen, S. and Coulson, A.R. (1977) DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **74**, 5463-5467.
- Schliebe, N., Strotmann, R., Busse, K., Mitschke, D., Biebermann, H., Schomburg, L., Kohrle, J., Bar, J., Römpler, H., Wess, J., Schöneberg, T. and Sangkuhl, K. (2008) V2 vasopressin receptor deficiency causes changes in expression and function of renal and hypothalamic components involved in electrolyte and water homeostasis. *Am J Physiol Renal Physiol*, **295**, F1177-1190.

- Schöneberg, T., Hermsdorf, T., Engemaier, E., Engel, K., Liebscher, I., Thor, D., Zierau, K., Römpler, H. and Schulz, A. (2007) Structural and functional evolution of the P2Y(12)-like receptor group. *Purinergic Signal*, **3**, 255-268.
- Schöneberg, T., Schulz, A., Biebermann, H., Hermsdorf, T., Römpler, H. and Sangkuhl, K. (2004) Mutant G-protein-coupled receptors as a cause of human diseases. *Pharmacol Ther*, **104**, 173-206.
- Schöneberg, T., Schulz, A., Grosse, R., Schade, R., Henklein, P., Schultz, G. and Gudermann, T. (1999) A novel subgroup of class I G-protein-coupled receptors. *Biochim Biophys Acta*, **1446**, 57-70.
- Schroder, R., Merten, N., Mathiesen, J.M., Martini, L., Kruljac-Letunic, A., Krop, F., Blaukat, A., Fang, Y., Tran, E., Ulven, T., Drewke, C., Whistler, J., Pardo, L., Gomeza, J. and Kostenis, E. (2009) The C-terminal tail of CRTH2 is a key molecular determinant that constrains Galphai and downstream signaling cascade activation. *J Biol Chem*, **284**, 1324-1336.
- Schulz, A. and Schöneberg, T. (2003) The structural evolution of a P2Y-like G-protein-coupled receptor. *J Biol Chem*, **278**, 35531-35541.
- Seeburg, P.H. and Hartner, J. (2003) Regulation of ion channel/neurotransmitter receptor function by RNA editing. *Curr Opin Neurobiol*, **13**, 279-283.
- Shehu, A., Mao, J., Gibori, G.B., Halperin, J., Le, J., Devi, Y.S., Merrill, B., Kiyokawa, H. and Gibori, G. (2008) Prolactin receptor-associated protein/17beta-hydroxysteroid dehydrogenase type 7 gene (Hsd17b7) plays a crucial role in embryonic development and fetal survival. *Mol Endocrinol*, **22**, 2268-2277.
- Shiraga, M., Miyata, S., Kato, H., Kashiwagi, H., Honda, S., Kurata, Y., Tomiyama, Y. and Kanakura, Y. (2005) Impaired platelet function in a patient with P2Y12 deficiency caused by a mutation in the translation initiation codon. *J Thromb Haemost*, **3**, 2315-2323.
- Siegel, J.M. (1999) Narcolepsy: a key role for hypocretins (orexins). *Cell*, **98**, 409-412.
- Singh, S.M., Treadwell, J., Kleiber, M.L., Harrison, M. and Uddin, R.K. (2007) Analysis of behavior using genetical genomics in mice as a model: from alcohol preferences to gene expression differences. *Genome*, **50**, 877-897.
- Subramanian, A., Tamayo, P., Mootha, V.K., Mukherjee, S., Ebert, B.L., Gillette, M.A., Paulovich, A., Pomeroy, S.L., Golub, T.R., Lander, E.S. and Mesirov, J.P. (2005) Gene set enrichment analysis: a knowledge-based approach for interpreting genome-wide expression profiles. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **102**, 15545-15550.
- Sugo, T., Tachimoto, H., Chikatsu, T., Murakami, Y., Kikukawa, Y., Sato, S., Kikuchi, K., Nagi, T., Harada, M., Ogi, K., Ebisawa, M. and Mori, M. (2006) Identification of a lysophosphatidylserine receptor on mast cells. *Biochem Biophys Res Commun*, **341**, 1078-1087.
- Szalay, G., Ladel, C.H., Blum, C., Brossay, L., Kronenberg, M. and Kaufmann, S.H. (1999) Cutting edge: anti-CD1 monoclonal antibody treatment reverses the production patterns of TGF-beta 2 and Th1 cytokines and ameliorates listeriosis in mice. *J Immunol*, **162**, 6955-6958.
- Tabata, K., Baba, K., Shiraishi, A., Ito, M. and Fujita, N. (2007) The orphan GPCR GPR87 was deorphanized and shown to be a lysophosphatidic acid receptor. *Biochem Biophys Res Commun*, **363**, 861-866.

- Trinchieri, G. (1995) Interleukin-12: a proinflammatory cytokine with immunoregulatory functions that bridge innate resistance and antigen-specific adaptive immunity. *Annu Rev Immunol*, **13**, 251-276.
- 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. and Gaitanaris, G.A. (2003) The G protein-coupled receptor repertoires of human and mouse. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **100**, 4903-4908.
- Vidavalur, R., Penumathsa, S.V., Thirunavukkarasu, M., Zhan, L., Krueger, W. and Maulik, N. (2009) Sildenafil augments early protective transcriptional changes after ischemia in mouse myocardium. *Gene*, **430**, 30-37.
- Waterston, R.H., Lindblad-Toh, K., Birney, E., Rogers, J., Abril, J.F., Agarwal, P., Agarwala, R., Ainscough, R., Andersson, M., An, P., Antonarakis, S.E., Attwood, J., Baertsch, R., Bailey, J., Barlow, K., Beck, S., Berry, E., Birren, B., Bloom, T., Bork, P., Botcherby, M., Bray, N., Brent, M.R., Brown, D.G., Brown, S.D., Bult, C., Burton, J., Butler, J., Campbell, R.D., Carninci, P., Cawley, S., Chiaromonte, F., Chinwalla, A.T., Church, D.M., Clamp, M., Clee, C., Collins, F.S., Cook, L.L., Copley, R.R., Coulson, A., Couronne, O., Cuff, J., Curwen, V., Cutts, T., Daly, M., David, R., Davies, J., Delehaunty, K.D., Deri, J., Dermitzakis, E.T., Dewey, C., Dickens, N.J., Diekhans, M., Dodge, S., Dubchak, I., Dunn, D.M., Eddy, S.R., Elnitski, L., Emes, R.D., Eswara, P., Eyraes, E., Felsenfeld, A., Fewell, G.A., Flicek, P., Foley, K., Frankel, W.N., Fulton, L.A., Fulton, R.S., Furey, T.S., Gage, D., Gibbs, R.A., Glusman, G., Gnerre, S., Goldman, N., Goodstadt, L., Grafham, D., Graves, T.A., Green, E.D., Gregory, S., Guigo, R., Guyer, M., Hardison, R.C., Haussler, D., Hayashizaki, Y., Hillier, L.W., Hinrichs, A., Hlavina, W., Holzer, T., Hsu, F., Hua, A., Hubbard, T., Hunt, A., Jackson, I., Jaffe, D.B., Johnson, L.S., Jones, M., Jones, T.A., Joy, A., Kamal, M., Karlsson, E.K., Karolchik, D., Kasprzyk, A., Kawai, J., Keibler, E., Kells, C., Kent, W.J., Kirby, A., Kolbe, D.L., Korf, I., Kucherlapati, R.S., Kulbokas, E.J., Kulp, D., Landers, T., Leger, J.P., Leonard, S., Letunic, I., Levine, R., Li, J., Li, M., Lloyd, C., Lucas, S., Ma, B., Maglott, D.R., Mardis, E.R., Matthews, L., Mauceli, E., Mayer, J.H., McCarthy, M., McCombie, W.R., McLaren, S., McLay, K., McPherson, J.D., Meldrim, J., Meredith, B., Mesirov, J.P., Miller, W., Miner, T.L., Mongin, E., Montgomery, K.T., Morgan, M., Mott, R., Mullikin, J.C., Muzny, D.M., Nash, W.E., Nelson, J.O., Nhan, M.N., Nicol, R., Ning, Z., Nusbaum, C., O'Connor, M.J., Okazaki, Y., Oliver, K., Overton-Larty, E., Pachter, L., Parra, G., Pepin, K.H., Peterson, J., Pevzner, P., Plumb, R., Pohl, C.S., Poliakov, A., Ponce, T.C., Ponting, C.P., Potter, S., Quail, M., Reymond, A., Roe, B.A., Roskin, K.M., Rubin, E.M., Rust, A.G., Santos, R., Sapojnikov, V., Schultz, B., Schultz, J., Schwartz, M.S., Schwartz, S., Scott, C., Seaman, S., Searle, S., Sharpe, T., Sheridan, A., Shownkeen, R., Sims, S., Singer, J.B., Slater, G., Smit, A., Smith, D.R., Spencer, B., Stabenau, A., Stange-Thomann, N., Sugnet, C., Suyama, M., Tesler, G., Thompson, J., Torrents, D., Trevaskis, E., Tromp, J., Ucla, C., Ureta-Vidal, A., Vinson, J.P., Von Niederhausern, A.C., Wade, C.M., Wall, M., Weber, R.J., Weiss, R.B., Wendl, M.C., West, A.P., Wetterstrand, K., Wheeler, R., Whelan, S., Wierzbowski, J., Willey, D., Williams, S., Wilson, R.K., Winter, E., Worley, K.C., Wyman, D., Yang, S., Yang, S.P., Zdobnov, E.M., Zody, M.C. and Lander, E.S. (2002) Initial sequencing and comparative analysis of the mouse genome. *Nature*, **420**, 520-562.

- Wellendorph, P., Hansen, K.B., Balsgaard, A., Greenwood, J.R., Egebjerg, J. and Brauner-Osborne, H. (2005) Deorphanization of GPRC6A: a promiscuous L-alpha-amino acid receptor with preference for basic amino acids. *Mol Pharmacol*, **67**, 589-597.
- Wesch, D., Glatzel, A. and Kabelitz, D. (2001) Differentiation of resting human peripheral blood gamma delta T cells toward Th1- or Th2-phenotype. *Cell Immunol*, **212**, 110-117.
- Wess, J. (1998) Molecular basis of receptor/G-protein-coupling selectivity. *Pharmacol Ther*, **80**, 231-264.
- Wigglesworth, M.J., Wolfe, L.A. and Wise, A. (2006) Orphan seven transmembrane receptor screening. *Ernst Schering Found Symp Proc*, 105-143.
- Wise, A., Jupe, S.C. and Rees, S. (2004) The identification of ligands at orphan G-protein coupled receptors. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*, **44**, 43-66.
- Wittenberger, T., Schaller, H.C. and Hellebrand, S. (2001) An expressed sequence tag (EST) data mining strategy succeeding in the discovery of new G-protein coupled receptors. *J Mol Biol*, **307**, 799-813.
- Wurm, A., Iandiev, I., Hollborn, M., Wiedemann, P., Reichenbach, A., Zimmermann, H., Bringmann, A. and Pannicke, T. (2008) Purinergic receptor activation inhibits osmotic glial cell swelling in the diabetic rat retina. *Exp Eye Res*, **87**, 385-393.
- Xu, H., Heeger, P.S. and Fairchild, R.L. (1997) Distinct roles for B7-1 and B7-2 determinants during priming of effector CD8+ Tc1 and regulatory CD4+ Th2 cells for contact hypersensitivity. *J Immunol*, **159**, 4217-4226.
- Yea, K., Kim, J., Lim, S., Kwon, T., Park, H.S., Park, K.S., Suh, P.G. and Ryu, S.H. (2009) Lysophosphatidylserine regulates blood glucose by enhancing glucose transport in myotubes and adipocytes. *Biochem Biophys Res Commun*, **378**, 783-788.
- Zhang, F.L., Luo, L., Gustafson, E., Lachowicz, J., Smith, M., Qiao, X., Liu, Y.H., Chen, G., Pramanik, B., Laz, T.M., Palmer, K., Bayne, M. and Monsma, F.J., Jr. (2001) ADP is the cognate ligand for the orphan G protein-coupled receptor SP1999. *J Biol Chem*, **276**, 8608-8615.
- Zhang, F.L., Luo, L., Gustafson, E., Palmer, K., Qiao, X., Fan, X., Yang, S., Laz, T.M., Bayne, M. and Monsma, F., Jr. (2002) P2Y(13): identification and characterization of a novel Galpha-i-coupled ADP receptor from human and mouse. *J Pharmacol Exp Ther*, **301**, 705-713.

Erklärung über die eigenständige Abfassung der Arbeit

Hiermit erkläre ich, dass ich die vorliegende Arbeit selbständig und ohne unzulässige Hilfe oder Benutzung anderer als der angegebenen Hilfsmittel angefertigt habe. Ich versichere, dass Dritte von mir weder unmittelbar noch mittelbar geldwerte Leistungen für Arbeiten erhalten haben, die im Zusammenhang mit dem Inhalt der vorgelegten Dissertation stehen, und dass die vorgelegte Arbeit weder im Inland noch im Ausland in gleicher oder ähnlicher Form einer anderen Prüfungsbehörde zum Zweck einer Promotion oder eines anderen Prüfungsverfahrens vorgelegt wurde. Alles aus anderen Quellen und von anderen Personen übernommene Material, das in der Arbeit verwendet wurde oder auf das direkt Bezug genommen wird, wurde als solches kenntlich gemacht. Insbesondere wurden alle Personen genannt, die direkt an der Entstehung der vorliegenden Arbeit beteiligt waren.

Datum

Unterschrift

Lebenslauf

Ines Liebscher

Heinrichstr. 41

04317 Leipzig

Telefon:

0176/20546805

Ines_mi@yahoo.de

Geburtsdatum: 1. September 1983

Geburtsort: Dresden

Nationalität: deutsch

Schulbildung

08/1994 – 07/2003

Gymnasium Dresden Cotta
Abschluss: Abitur mit Note 1,1

08/2000 – 06/2001

Huron High School, Ann Arbor, Michigan, USA
Abschluss: High School Diploma
Grade average: A

Studium

Seit WS 2005

Arbeit an Promotion inklusive 2 Freisemester (WS 06/07 und SS 07)
am Institut für Biochemie der Universität Leipzig

Seit WS 2003/2004

Studium der Humanmedizin
Physikum mit Note 2,0
Universität Leipzig

Praktika und Nebentätigkeiten

Famulaturen

09/2008

Fachrichtung : Neurologie
Normah Medical Specialist Centre, Kuching, Malaysia

08/2008

Fachrichtung: Viszeralchirurgie
Hôpital Universitaire Paul Brousse, Paris, Frankreich

08/2007

Fachrichtung : Pädiatrie
Bustamante Hospital for Children, Kingston, Jamaika

08/2006

Fachrichtung : Hämatologie/ Onkologie
Charite Berlin – Virchow Klinikum, Berlin

Praktisches Jahr

04/2010 – 07/2010

Fachrichtung: Neurologie
Universitätsklinikum Leipzig

12/2009 – 04/2010

Fachrichtung: Chirurgie
Helios Klinikum, Borna

08/2009 – 12/2009

Fachrichtung: Innere Medizin
Helios Klinikum, Borna

Wissenschaftliche Weiterbildung

WS 2007/2008 und
SS 2008

Teilnahme an der Lehrveranstaltung Neurobiologie der
biowissenschaftlichen Fakultät der Universität Leipzig
Abschluss mit Note 1,0

WS 2007/2008

erfolgreiche Teilnahme an der Lehrveranstaltung Neurochemie der
biowissenschaftlichen Fakultät der Universität Leipzig

09/2005 – 04/2007

Teilnahme am 2-jährigen Wissenschaftlichen Kolleg Genetik /
Genomforschung der Studienstiftung des deutschen Volkes unter
Leitung von Professor Dr. Pühler

Sprachkenntnisse

Englisch (verhandlungssicher)
Unicert III Abschluss mit Note 1,3
Französisch (fließend)

Stipendium und Preise

2008

Mentoring Programm „EliMed“ der Universität Leipzig

2006

Promotionsstipendium der Universität Leipzig

Seit 2003/2004

Stipendium der Studienstiftung des deutschen Volkes

2003

Förderpreis des Bundesumweltwettbewerbs

2003

Sächsischer Jugendpreis der Technik und Wissenschaft

2003

Schulförderpreis des Gymnasium Dresden-Cotta

2001

Aufnahme in das “Who is Who among High School students” (erfolgt
bei Abschluss unter besten 5% des Jahrgangs in den USA)

Interessen

Reisen, Tauchen, Photographieren, Zeichnen, Musik

Veröffentlichungen

Originalarbeiten

Liebscher I, Müller U, Teupser D, Engemaier E, Ritscher L, Thor D, Sangkuhl K, Ricken A, Wurm A, Schmutzler S, Fuhrmann H, Albert FW, Reichenbach A, Thiery J, Schöneberg T, Schulz A. Altered immune response in GPR34-deficient mice. *J. Biol. Chem.* : in revision

Schöneberg T, Hermsdorf T, Engemaier E, Engel K, Liebscher I, Thor D, Zierau K, Römpler H, Schulz A (2007) Structural and functional evolution of the P2Y₁₂-like receptor group. *Purinergic Signal.* 3:255-68

Poster

Liebscher I, Engemaier E, Müller U, Ricken A, Schmutzler S, Fuhrmann H, Ceglarek U, Teupser D, Sangkuhl K, Schöneberg T, Schulz A (2008) Generation and characterization of a GPR34-deficient mouse model. *Keystone-Symposium, G-Protein-Coupled Receptors: New Insights in Functional Regulation in Clinical Applications. May 18-23, 2008, Killarney, Ireland*

Engel K, Schulz A, Liebscher I, Wurm A, Reichenbach A, Schöneberg T (2008) Functional relevance of P2Y₁₂-like receptors. *Neuronal and Glial P2 Receptors, Molecular Basis and Functional Significance: Progress Report Meeting. October 17th and 18th, 2008, University Hospital Aachen*

Danksagungen

Ich möchte mich bei allen bedanken, die an der Entwicklung dieses Projektes beteiligt waren.

Mein besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. Torsten Schöneberg, der mir als Doktorvater und Betreuer immer unterstützend, motivierend und geduldig zur Seite stand und entscheidend zur Vollendung dieser Arbeit beigetragen hat.

Ich danke Frau Dr. Angela Schulz, Fr. Dr. Katrin Sangkuhl und Fr. Eva Engemaier für die Vorarbeiten, welche die Basis dieser Promotion darstellen.

Ich danke allen unseren Kooperationspartnern für die Zusammenarbeit, insbesondere Herrn Dr. Uwe Müller für die Unterweisung und Hilfe bei den Tierexperimenten, Herrn Prof. Dr. Joachim Thiery, Herrn Prof. Dr. Daniel Teupser und Frau Dr. Uta Ceglarek für die Erstellung der laborchemischen Parameter, Herrn Dr. Albert Ricken für die Hilfe bei den histologischen Untersuchungen, Herr Prof. Dr. Herbert Furhmann sowie Frau Dr. Sandra Schmutzler für die Anleitung der Histamin-release Assays und Herrn Dr. Frank Albert für die Unterstützung der Microarrayauswertung.

Ich danke allen aktuellen und ehemaligen Mitgliedern der Arbeitsgruppe, die mir in diesen Jahren gute Freunde geworden sind, für die schöne Zeit. Mein besonderer Dank gilt Frau Dr. Doreen Thor für die fachliche und moralische Unterstützung bei allen großen und kleinen Problemen, die im Laboralltag so angefallen sind.

Ich danke der Medizinischen Fakultät der Universität Leipzig für die finanzielle Unterstützung meiner Arbeit.

Ich danke Sabine und Stephan für das kritische und detaillierte Gegenlesen dieser Dissertation.

Ich danke meiner Familie, die mich immer unterstützt und ermutigt hat zu Wagen, Hoffen, Niederlagen als Chance zu sehen und Erfolge zu teilen.

Anhang

Tab. S1 Zusammenstellung der für die Genotypisierung verwendeten Primer

Primer Name	Beschreibung	Sense primer (5'->3')	Antisense primer (3'->5')
LoxP-GP34-2 s	Sense Primer: liegt 120 Bp 5' der ersten loxP Stelle und bindet sowohl am WT- als auch am KO-Mausgenom	tccattgtgctgagatgtgattca	
LoxP-GP34-1-2 as	Antisense Primer: liegt 150 Bp 3' der letzten loxP Stelle und bildet mit dem sense Primer im KO-Mausgenom ein 270 Bp-Transkript		gtaagcttttcttctgttgaactac
LoxP-GP34-3 as	Antisense Primer: liegt 265 Bp 3' der ersten loxP Stelle und bindet nur im WT-Mausgenom, wo es zusammen mit dem sense Primer ein 385 Bp-Transkript ergibt		gaggactgtatgttgaaacctaa

Tab. S2 Zusammenstellung der für die quantitative Echtzeit-PCR verwendeten Primer

Transkript	Gensymbol	Sense primer (5'->3')	Antisense primer (3'->5')
Clathrin	Cla	acagagacacagcccattgtt	cccatacgggtggtcagat
Beta-2-Mikroglobulin	β 2m	gctatccagaaaaccctcaaa	ggcgggtggaactgtgtta
RIKEN cDNA 2610024A01	Tmem163	caaacacaacgcagcagtct	atgacgcgtctgtctcactct
Dynein light chain Tctex-type 3	Dynlt3	gaggagcccgtatggatttc	catggtacggttctccatc
Asporin	Aspn	cgtgtgagagagatacacttgaa	ttggcactgttgacagaag
Zinc Finger Protein 386	Zfp386	cgtgtttccagcttttga	catccggagagaagtaacg
G-Protein gekoppelter Rezeptor 34	GPR34	accggatggaagagcccagctg	cagtgtgacttcaacgtctct
choline phosphotransferase 1	Chpt	tgtgaatacagagaaaactctg aag	gtggggtgggtgttctagt
ATPase, Na/K transporting, alpha 2 polypeptide	ATP1a2	ttgggctgctagaagagacg	ggtaccgccgtaggatgagctt
5' nucleotidase, ecto	Nt5e	tgacctccaagctatctg	gagaactgatccgccctc
Phosphodiesterase 7A	Pde7a	accattgggtgtgagtcca	tgtccaagcatcgtctgtga
THAP domain containing 4	Thap4	gtggaggagggtgaagtga	tgccatagagaccgtctgttc
zinc finger , DHHC domain containing 14	Zdhhc14	agcaccatcaaatgggatca	gcaaacgaatttgggtctc
neural precursor cell expressed developmentally down-regulated gene 4	NEDD 4	tgggttctgactgaactctatgg	tcgtcaaggattcgtaggg
Regulator of G-Protein signaling 5	Rgs5	agttctgggtgctctgtgag	aagtcaaagctgcaggaga
D site albumin promoter binding protein	Dbp	acttttgacctcgagacac	cctctggctgcttctgtg

hydroxysteroid (17-beta) dehydrogenase 7	Hsd17b7	gtgtggctcttccacaaaa	acgctttccagctccagta
Eph receptor A4	Epha4	agtgggctgagacaatcctg	acgggtggagggtgtgttcta
serine/threonine kinase 39, STE20/SPS1 homolog (yeast)	Stk39	ggttgacggccatgatgtag	accgatcagcttcacttca
Casein Kinase	CASK	ctacatgagacacatactggaag	ccaagttaacaggtgccgagt
thyroid responsive spot 14	Spot14	gtggccacttctacacagatgct	ccaggaggagaggtcgtagaga
Prostaglandin E Rezeptor 4 (subtype EP4)	Ptger4	tctggtggctcatctgct	gcctgcaaatctgggttct
Prostaglandin I Rezeptor (IP)	Ptgir	ctgattctgctggccctcat	tccccatctctgctgctc

Tab. S3 Organgewichte

Aus 3-Monate-alten männlichen Tieren wurden die aufgelisteten Organe entnommen und die Feuchtgewichte prozentual zum jeweiligen Körpergewicht bestimmt. Dargestellt sind die Mittelwert \pm SD.

	WT (n=38)	KO (n=34)
Körpergewicht	33,6 \pm 5,5 g	34,0 \pm 7,0 g
Leber	4,70 \pm 0,21	4,90 \pm 0,70
Herz	0,46 \pm 0,08	0,46 \pm 0,07
Gehirn	1,41 \pm 0,21	1,42 \pm 0,27
Niere links	0,69 \pm 0,10	0,65 \pm 0,09
Niere rechts	0,68 \pm 0,10	0,68 \pm 0,11
Milz	0,28 \pm 0,05	0,31 \pm 0,13
Lunge	0,67 \pm 0,16	0,63 \pm 0,12

Tab. S4 Differenzialblutbild

Aus 3-Monate-alten männlichen Tieren wurde mittels eines automatischen Hämatocytometer (Institut für Laboratoriumsmedizin, Klinische Chemie und Molekulare Diagnostik) das Differenzialblutbild erstellt. Dargestellt sind die Mittelwert \pm SD.

	männlich		weiblich	
	WT (n=12)	KO (n=7)	WT (n=11)	KO (n=6)
WBC ($10^3/\text{mm}^3$)	9,9 \pm 3,6 (20)	9,9 \pm 4,6 (13)	11,2 \pm 2,5	10,1 \pm 2,3
RBC ($10^6/\text{mm}^3$)	9,9 \pm 0,8 (20)	9,6 \pm 0,9 (13)	9,4 \pm 0,4	9,1 \pm 0,8
HGB (g/dl)	15,8 \pm 1,1	15,8 \pm 1,1	16,2 \pm 0,6	17,1 \pm 1,4
HCT (%)	47,7 \pm 3,2	47,7 \pm 3,2	50,1 \pm 2,0	50,3 \pm 5,4
PLT ($10^3/\text{mm}^3$)	849 \pm 311 (20)	870 \pm 341 (13)	821 \pm 256	801 \pm 391
MCV (μm^3)	51,9 \pm 2,3	51,9 \pm 2,3	53,5 \pm 0,8	54,7 \pm 2,8
MCH (pg)	17,2 \pm 0,6	17,2 \pm 0,6	17,3 \pm 0,7	18,7 \pm 0,7
MCHC (g/dl)	33,1 \pm 1,1	33,1 \pm 1,1	32,3 \pm 1,1	34,1 \pm 1,8
RDW (%)	11,8 \pm 0,4	11,8 \pm 0,4	12,0 \pm 0,3	11,5 \pm 0,3
MPV (μm^3)	5,1 \pm 0,3	5,1 \pm 0,3	5,3 \pm 0,2	5,0 \pm 0,3
LYMPHO (%)	74,3 \pm 6,4	74,3 \pm 6,4	76,5 \pm 2,9	79,4 \pm 1,8
LYMPHO ($10^3/\text{mm}^3$)	8,3 \pm 3,1	8,3 \pm 3,1	8,5 \pm 1,8	9,0 \pm 1,6
MONO (%)	3,7 \pm 0,6	3,7 \pm 0,6	3,5 \pm 0,3	3,4 \pm 0,3
MONO ($10^3/\text{mm}^3$)	0,40 \pm 0,19	0,40 \pm 0,19	0,30 \pm 0,09	0,30 \pm 0,05
GRANULO (%)	22,0 \pm 5,9	22,0 \pm 5,9	19,9 \pm 2,7	17,2 \pm 1,5
GRANULO ($10^3/\text{mm}^3$)	3,0 \pm 2,2	3,0 \pm 2,2	2,3 \pm 0,6	2,0 \pm 0,1

Tab. S5 Klinisch-chemische Laboruntersuchungen von Serum und Urin

Im Institut für Laboratoriumsmedizin, Klinische Chemie und Molekulare Diagnostik wurden die aufgelisteten Serumparameter gemessen. Die Urinosmolalität wurde mittels eines Verdampfungsosmometers bestimmt (→3.6.4). Dargestellt sind die Mittelwert ± SD.

	WT (n=6)	KO (n=3)
ALAT μ kat/l	0,77 ± 0,36	0,55 ± 0,13
ASAT μ kat/l	2,0 ± 0,9	1,6 ± 0,1
AP μ kat/l	1,8 ± 0,3	1,9 ± 0,4
Cholinesterase μ kat/l	67,8 ± 21,8	64,0 ± 5,1
GLDH μ kat/l	0,25 ± 0,16	0,15 ± 0,05
CK μ kat/l	65,6 ± 58,2	23,7 ± 12,7
Amylase μ kat/l	52,7 ± 7,4	58,2 ± 18,9
Kreatinin μ kat/l	15,2 ± 3,3	16,0 ± 0,1
Harnstoff mmol/l	11,9 ± 0,9	13,2 ± 1,0
Calcium mmol/l	2,7 ± 0,2	3,0 ± 0,4
Phosphat mmol/l	4,1 ± 0,6	4,4 ± 0,5
Magnesium mmol/l	1,5 ± 0,3	1,7 ± 0,2
Protein g/l	55,5 ± 4,0	59,5 ± 3,4
Albumin g/l	32,6 ± 3,1	34,3 ± 3,0
Triglyceride	2,1 ± 0,4	2,1 ± 0,4
Cholesteroll mmol/l	3,6 ± 0,9	4,0 ± 0,2
GGT μ kat/l	<0	<0
LDH μ kat/l	12,9 ± 8,0	14,5 ± 8,6
Lipase μ kat/l	0,76 ± 0,18	0,91 ± 0,13
Bilirubin μ mol/l	5,9 ± 1,3	6,9 ± 2,7
Urinosmolalität (mmol/kg)	1.642 ± 504 (21)	1.486 ± 503 (15)

Tab. S6 Bestimmung von Aminosäuren und Acylcarnitinen im Blut

Im Institut für Laboratoriumsmedizin, Klinische Chemie und Molekulare Diagnostik wurden die aufgelisteten Aminosäuren und Acylcarnitine mittels ESI-MS/MS in getrockneten Blutproben gemessen (→3.6.4). Dargestellt sind die Mittelwert ± SD. *p < 0,05

	männlich		weiblich	
	WT (n=35)	KO (n=37)	WT (n=17)	KO (n=12)
Aminosäuren				
Alanin μ mol/l 1	370 ± 123	352 ± 109	341 ± 82	367 ± 54
Arginin μ mol/l 1	113 ± 29	108 ± 24	116 ± 20	116 ± 22
Aspartat μ mol/l 1	96 ± 30	96 ± 35	94 ± 17	83 ± 30
Citrulin μ mol/l 1	65 ± 11	64 ± 12	78 ± 16	70 ± 13
Glutaminsäure μ mol/l 1	332 ± 116	320 ± 109	256 ± 56	306 ± 83
Glycin μ mol/l 1	377 ± 86	357 ± 81	381 ± 48	346 ± 58
Methionin μ mol/l 1	46 ± 17	42 ± 20	55 ± 28	40 ± 22
Ornithin μ mol/l 1	58 ± 21	47 ± 9*	51 ± 13	51 ± 12
Phenylalanin μ mol/l 1	70 ± 22	64 ± 24	67 ± 21	62 ± 17
Prolin μ mol/l 1	338 ± 116	294 ± 100	309 ± 121	277 ± 68
Serin μ mol/l 1	69 ± 22	62 ± 17	64 ± 44	67 ± 30
Threonin μ mol/l 1	99 ± 39	105 ± 58	151 ± 89	86 ± 22*
Tryptophan μ mol/l 1	15 ± 6	14 ± 5	11 ± 4	14 ± 4
Tyrosin μ mol/l 1	101 ± 30	90 ± 24	97 ± 29	94 ± 18
Valin μ mol/l 1	155 ± 30	146 ± 34	177 ± 45	151 ± 30

Acylcarnitine				
C16 $\mu\text{mol/l}$ 1	$1,4 \pm 0,3$	$1,2 \pm 0,3$	$1,2 \pm 0,3$	$1,4 \pm 0,3$
C16:1 $\mu\text{mol/l}$ 1	$0,12 \pm 0,08$	$0,10 \pm 0,06$	$0,07 \pm 0,05$	$0,13 \pm 0,05^*$
C18 $\mu\text{mol/l}$ 1	$0,28 \pm 0,09$	$0,31 \pm 0,11$	$0,24 \pm 0,10$	$0,28 \pm 0,07$
C18:1 $\mu\text{mol/l}$ 1	$0,42 \pm 0,13$	$0,40 \pm 0,16$	$0,27 \pm 0,12$	$0,43 \pm 0,16^*$

Tab. S7 Qualitative und quantitative Parameter des verwendeten SHIRPA-Protokoll

Verhalten im Käfig

	0	1	2	3	4	5
Körperhaltung	flach	Auf Seite liegend	Vornüber-geneigt liegend	Sitzend oder stehend	Aufgerichtet auf Hinterpfoten	Wiederholtes vertikales Springen
Spontanaktivität	Keine, ruhend	Gelegentlich kratzen, putzen, langsame Bewegung	Heftiges Kratzen, Putzen, moderate Bewegung	Heftig, schnelle Bewegung	Sehr heftig, sehr schnelle Bewegung	
Atemfrequenz	Keuchen, unregelmäßig	Langsam, flach	normal	Hyper-Ventilation		
Tremor	keiner	mild	merklich			

Verhalten in der Arena

	0	1	2	3	4	5	6
Verhalten nach Transfer	Koma	Ausgedehnte Starre, dann leichte Bewegung	Verlängerte Starre, dann moderate Bewegung	Kurze Starre (Sekunden), dann aktive Bewegung	Momentane Starre, dann flinke Bewegung	Keine Starre, sofortige Bewegung	Extrem aufgeregt („manisch“)
Lidschluss	Augen weit offen	Augen halb offen	Augen geschlossen				
Haarsträubung	keine	vorhanden					
Startle Response	keiner	Preyer Reflex (Zucken der Ohrmuschel)	Sprung <1 cm	Sprung >1 cm			
Gang	Normal	Flüssig aber unnormal	Nur eingeschränkte Bewegung	Unfähigkeit zu laufen			
Beckenhebung	Ausgeprägt flach	Kaum berührend	Normal (3 mm Hebung)	Erhöht (>3mm)			
Schwanzhebung	schleppend	Horizontal gestreckt	Angehoben (Straub Schwanz)				
Touch escape	Keine Reaktion	mild	moderate	heftig			
Abwehrverhalten	Bei Halten am Schwanz	Bei Halten am Nacken	Bei Halten auf Rücken	Bei Halten am Hinterbein	Nicht vorhanden		

Verhalten auf oder über der Arena

	0	1	2	3	4
Trunc Curl	Nein	Ja			
Limb grasping	Nein	Ja			
Optische Lokalisierung	Keine	Bei Kontakt mit Nase	Bei Kontakt mit Tastaaren	Vor Tastaarkontakt (18 mm)	Zeitiges heftiges Ausstrecken der Vorderpfoten
Griffstärke	Keine	Leichter Griff, semi effektiv	Moderater Griff, effektiv	Aktiver Griff, effektiv	Ungewöhnlich effektiv
Körpertonus	Nachgiebig	Leichte Resistenz	Extreme Resistenz		
Ohrmuschelreflex	Keiner	Aktive Retraktion	Hyperaktiv, wiederholtes Zucken		
Zehkniff	Nicht vorhanden	Leichtes Wegziehen	Moderates Wegziehen	Brüsk, rapides Wegziehen	Sehr brüske wiederholte Extension und Flexion
Draht Manöver	Aktiver Griff mit Hinterpfoten	Schwierigkeiten mit Hinterpfoten zu greifen	Unfähig mit Hinterpfoten zu greifen	Unfähig Hinterpfoten zu heben, fällt innerhalb von Sekunden	Fällt unmittelbar

Beobachtungen in Rückenlage

	0	1	2	3	4
Hautfarbe	weißlich	rosa	gerötet		
Herzfrequenz	bradykard	normal	tachykard		
Tonus der Extremitäten	Keiner	Leicht	Moderat	Spürbar	Extrem
Bauchtonus	Nachgiebig	Leicht	Extrem (bretthart)		
Lakrimation	Nein	Ja			
Speichelfluss	Nein	Leicht (kleiner Randsaum an Unterkiefer)	Stark (ganzer Unterkiefer)		
Provoziertes Beißen	Nein	Ja			
Aufrichtreflex nach Rückwärtsflip	Keine Beeinträchtigung bei Landung	Landet auf Seite	Landet auf Rücken	Unfähig sich aus Rückenlage zu drehen	
Kontaktaufrichtreflex	Nein	Ja			
Negative Geotaxis am unvermittelt gekippten Gitter	Drehung und Aufwärtsklettern	Drehung und Stop Bewegung	Bewegung aber unfähig zur Drehung	Keine Bewegung für 30 Sekunden	Fällt runter
Angst	Nein	Ja			
Reizbarkeit	Nein	Ja			
Aggression	Nein	Ja			
Vokalisation	Nein	Ja			

Tab. S8 HPLC Bedingungen der Messung der Histaminfreisetzung

Stationäre Phase:

Vorsäule: 14 x 4 mm, Nucleosil 120-7 C₆H₅, Fa. Latek
 Trennsäule: ET, 250 x 4 mm, Nucleosil 100-7 C₆H₅,
 Fa. Macherey-Nagel

Mobile Phase:

Eluent A: 5 mM NaH₂PO₄ in 5% Acetonitril
 Eluent B: 25 mM NaH₂PO₄ in 50% Acetonitril

Flow: 1,5 ml/min
 Temperatur: isotherm, 20°C
 Injektionsvolumen: 50 µl

Detektion:

Retentionszeit Histamin: 6,1 min
 Gesamtzeit des HPLC-Laufs
 (incl. Re-Äquilibration der Säule): 14 min
 Fluoreszenzmessung: Excitation: 350 nm; Emission: 450 nm

Tab. S9 Ergebnisse der SHIRPA-Untersuchungen

Aus dem SHIRPA-Protokoll wurden nachfolgende Tests an männlichen WT- und GPR34-defizienten Mäusen durchgeführt. Dargestellt sind die Mittelwert der Scores (→3.7.1) ± SD.

	WT (n=10)	KO (n=9)
Körperhaltung	3,77 ± 0,46	3,37 ± 0,48
Spontanaktivität	1,09 ± 0,41	0,88 ± 0,50
Tremor	0,17 ± 0,17	0
Lidschluss	0	0
Fell	0	0
Schnurrhaare	0	0
Defäkation	2,60 ± 1,80	2,11 ± 1,52
Transfer arousal	1,18 ± 0,36	0,98 ± 0,32
Gang	0,50 ± 0,34	0,49 ± 0,28
Schwanzhebung	1,20 ± 0,40	1,67 ± 1,12
Touch escape	1,35 ± 0,34	1,33 ± 0,58
Trunk curl	1	0,93 ± 0,14
Limb grasping	1	1
Griffstärke	3,23 ± 0,66	3,30 ± 0,60
Abwehr bei Halten an Schwanz	100 %	100 %
Abwehr bei Halten am Nacken	90 %	90 %
Abwehr bei Halten auf Rücken	30 %	11 %
Corneal Reflex	0	0
Zehkniff	1,11 ± 1,07	1,44 ± 1,21
Ohrmuschelreflex	0,43 ± 0,34	0,30 ± 0,29
Kontakt Aufricht-Reflex	0,28 ± 0,38	0,22 ± 0,22
Draht Manöver	1,83 ± 1,38	2,00 ± 1,17
Negative Geotaxis	0	0
Hot Plate (s)	3,44 ± 2,59	2,56 ± 1,07
Beißen	50 %	100 %
Krämpfe	0 %	0 %

Tab. S10 Open-Field-Test und Light-Dark-Test

3-Monate-alte männliche Tiere wurden im OFT und LDT untersucht. Die Aufzeichnung und Auswertung des Verhaltens erfolgte automatisiert (→3.7.2). Dargestellt sind die wesentlichen Parameter als Mittelwerte ± SD. Die jeweiligen Einheiten sind in Klammern dargestellt.*<0,05, **<0,01

	WT (n=9)	KO (n=9)
Open-Field-Test		
Aktivität (s)	166 ± 31	132 ± 25*
Aktivität (%)	55 ± 10	44 ± 8*
Weg (m)	63 ± 10	50 ± 11*
Weg Rand (m)	58 ± 9	44 ± 9***
Weg Mitte (m)	5,8 ± 2,9	6,0 ± 3,7
Weg Ecken (m)	30 ± 5	23 ± 5***
Aufenthalt Mitte (%)	5,1 ± 4,1	5,7 ± 5,9
Aufenthalt Rand (%)	94,9 ± 4,1	94,3 ± 6,0
Light-Dark-Test		
Gesamt Aktivität (s)	141 ± 80	173 ± 55
Gesamt Aktivität (%)	47 ± 27	58 ± 18
Aktivität im Hellen (s)	36 ± 29	65 ± 24*
Aktivität im Hellen (%)	12 ± 10	22 ± 8*
Aktivität im Zwischenbereich (s)	13 ± 16	23 ± 13
Aktivität im Dunkeln (s)	105 ± 86	110 ± 66
Gesamt Weg (m)	54 ± 34	68 ± 26
Weg im Hellen (m)	11 ± 8	22 ± 8*
Weg im Zwischenbereich (m)	4 ± 4,5	9 ± 5*
Weg im Zwischenbereich (%)	7 ± 3	14 ± 3***
Weg im Dunkeln (m)	40 ± 35	45 ± 27
Besuche im Hellen	11 ± 14	22 ± 13
Besuche im Zwischenbereich	43 ± 41	63 ± 34
Besuche im Dunkeln	10 ± 12	23 ± 14*

Tab. S11 Microarray-Daten signifikant regulierter Gene im Herzmuskel von GPR34-defizienten Tieren im Vergleich zu Wildtyptieren.

Die Daten sind MAS5-normiert und gefiltert im Hinblick auf Probe Sets, die mindestens in drei aus fünf Microarrays in mindestens einer Gruppe als Present detektiert wurden. Der p-Wert ist $p \leq 0,01$.

Probe Set ID	Gensymbol	Fold Change	p-Wert	Present Calls	
				WT	Ko
1422542_at	Gpr34	0,533	0,000	4	0
1452795_at	1110008B24Rik	1,107	0,000	5	5
1459868_x_at	Il11ra1 /// Il11ra2	1,404	0,000	4	5
1458218_s_at	Pde7a	0,820	0,000	5	5
1427287_s_at	Itpr2	0,924	0,000	5	5
1426808_at	Lgals3	1,132	0,000	0	5
1435360_at	Zfp651	1,213	0,000	5	5
1442732_at	---	0,767	0,000	5	4
1452057_at	Actr1b	1,096	0,000	5	5
1438211_s_at	Dbp	3,156	0,000	5	5
1428295_at	Synpo2l	1,123	0,000	5	5
1426381_at	Pprc1	1,084	0,000	5	5
1455153_at	Zfp236	0,930	0,000	5	5
1448667_x_at	Tob2	1,310	0,000	5	5
1426266_s_at	Zbtb8os	0,955	0,000	5	5

1422629_s_at	Shroom3	1,163	0,000	5	5
1416260_a_at	Snx1	1,030	0,000	5	5
1435561_at	Erf	1,111	0,000	5	5
1426779_x_at	Dag1	1,023	0,000	5	5
1425991_a_at	Ankrd25	1,067	0,000	5	5
1438843_x_at	Mtch2	1,130	0,000	4	4
1422609_at	Arpp19	0,903	0,000	5	5
1433697_at	AV312086	1,017	0,000	5	5
1440219_at	4930413O22Rik	0,756	0,000	4	4
1433776_at	Lhfp	0,946	0,000	5	5
1434180_at	Plekhc1	0,911	0,000	5	5
1428547_at	Nt5e	0,697	0,001	5	5
1428116_a_at	Dynlt1	0,852	0,001	5	5
1458217_s_at	2210018M11Rik	0,928	0,001	5	3
1428077_at	Tmem163	0,517	0,001	4	0
1455968_x_at	Tmed2	0,958	0,001	5	5
1451606_at	A530016L24Rik	1,276	0,001	5	5
1454109_a_at	Ptdsr	1,118	0,001	5	5
1455558_at	Gm114	0,992	0,001	5	5
1425385_a_at	Igh-6	0,848	0,001	4	2
1434692_at	1110034B05Rik	0,839	0,001	5	5
1453473_a_at	Dynlt1 /// LOC671261	0,870	0,001	5	5
1438104_at	---	0,985	0,001	5	5
1419577_at	A530089I17Rik	1,108	0,001	5	5
1418038_s_at	Dusp19	1,078	0,001	5	5
1420543_at	ORF28	0,972	0,001	5	5
1441160_at	D330050G23Rik	0,752	0,001	3	3
1435472_at	Kremen1	1,026	0,001	5	5
1423583_at	Fem1a	1,065	0,001	5	5
1455700_at	Mterfd3	1,000	0,001	5	5
1429526_at	Brd8	0,800	0,001	3	3
1455405_at	Pstpip2	0,791	0,001	5	5
1415765_at	Hnrpu12	1,046	0,001	5	5
1437092_at	Rsnl2	1,225	0,001	5	5
1449339_at	D10Ertd641e	0,953	0,001	4	2
1453310_at	Ppil6	0,816	0,001	5	4
1434740_at	Scarf2	0,987	0,001	5	1
1432029_a_at	Smap1	0,843	0,001	5	4
1417291_at	Tnfrsf1a	1,104	0,001	5	5
1418329_at	Pgpep1	1,167	0,001	1	4
1437812_x_at	Ganab	1,045	0,001	5	3
1418338_at	Wdr33	1,143	0,001	5	4
1425201_a_at	Hyi	1,189	0,001	4	2
1453321_at	Fndc1	1,913	0,001	3	5
1452884_at	Sfrs2ip	0,845	0,001	5	5
1455706_at	Stxbp4	0,978	0,001	3	1
1451387_s_at	Cuta	1,061	0,001	5	5
1416371_at	Apod	0,932	0,001	3	3
1416152_a_at	Sfrs3	0,993	0,001	5	5

1426240_at	Chmp4b	1,009	0,001	5	5
1439124_at	9530020G05Rik	0,981	0,001	4	0
1454880_s_at	Bmf	1,007	0,001	4	4
1449002_at	Phlda3	1,275	0,002	5	5
1448647_at	Man2a1	0,707	0,002	5	5
1424135_at	Rspry1	0,861	0,002	5	5
1457054_a_at	D130020L05Rik	1,050	0,002	2	4
1435414_s_at	Dctn1	1,181	0,002	5	5
1424834_s_at	Itpr2	0,854	0,002	5	5
1435637_at	Itfg1	0,880	0,002	5	5
1417565_at	Abhd5	0,904	0,002	5	5
1416655_at	C1galt1c1	0,835	0,002	5	5
1427097_at	Wwp1	0,774	0,002	5	5
1430149_at	Ndufa3	1,556	0,002	0	5
1431020_a_at	Fgfr1op2	0,861	0,002	5	5
1429306_at	Lzic	1,057	0,002	5	5
1456831_at	Arid5b	1,049	0,002	3	3
1422548_at	Dhdds	1,450	0,002	5	5
1451197_s_at	Gatad2a	0,888	0,002	5	5
1437548_at	Bicd1	0,732	0,002	5	4
1450560_a_at	Ppp2r5d	1,142	0,002	5	5
1423850_at	Nsun2	1,117	0,002	5	5
1416409_at	Acox1	1,040	0,002	5	5
1428099_a_at	Sfrs1	0,792	0,002	5	5
1455849_at	---	1,484	0,002	1	4
1451459_at	Ahctf1	0,839	0,002	5	5
1437948_x_at	Eif3s6ip	0,893	0,002	4	5
1431098_at	Rsn	1,148	0,002	5	5
1431997_at	3000002C10Rik	0,972	0,002	5	5
1423482_at	Uros	0,982	0,002	5	5
1433671_at	A130022J15Rik	0,987	0,002	5	5
1442222_at	Ifnar1	0,772	0,002	4	2
1417757_at	Unc13b	1,071	0,002	5	2
1418975_at	Nckipsd	1,073	0,002	3	2
1419988_at	Map3k7	1,088	0,002	5	4
1456308_x_at	Trim28	0,961	0,002	5	5
1427729_at	Ehd2	0,710	0,002	4	4
1433879_a_at	C130032J12Rik	0,997	0,002	5	5
1416867_at	Bet1	1,050	0,002	5	1
1455863_at	Spata511	2,135	0,002	0	3
1443307_at	Psmc2	0,831	0,002	4	1
1426481_at	Klhl22	1,065	0,002	5	5
1429501_s_at	Ppm1a	0,811	0,002	5	5
1450478_a_at	Ptpn12	0,838	0,002	5	5
1447725_at	C030034E14Rik	1,383	0,002	2	4
1435391_at	Prr8	0,691	0,003	5	2
1446807_at	Usp8	0,909	0,003	2	3
1458351_s_at	Klhl2	0,712	0,003	5	5
1457070_at	Uhrf2	0,865	0,003	3	0

1442148_at	Psip1	1,006	0,003	5	1
1441986_at	Zcchc6	1,142	0,003	5	4
1426180_a_at	Smr2	1,317	0,003	5	5
1420665_at	Itgb3bp	1,151	0,003	5	0
1455078_at	Hsp90aa1	0,937	0,003	5	5
1451552_at	EG623661	0,956	0,003	5	5
1449102_at	Ebf2	2,256	0,003	1	5
1438094_x_at	Gtpbp9	0,958	0,003	5	5
1452375_at	Aldh4a1	0,981	0,003	5	5
1441807_s_at	---	0,826	0,003	5	4
1451211_a_at	Lgtn	1,067	0,003	5	5
1437432_a_at	Trim12	1,011	0,003	5	2
1438188_x_at	Slc25a29	1,009	0,003	2	3
1426851_a_at	Nov	0,961	0,003	5	5
1440836_at	Setd1b	1,217	0,003	5	5
1434359_at	6330500D04Rik	1,044	0,003	5	4
1425771_at	Akr1d1	1,285	0,003	2	5
1426759_at	Map4k3 /// LOC675560	0,902	0,003	5	5
1437841_x_at	Csdc2	1,057	0,003	5	5
1445271_at	9230105E10Rik	0,995	0,003	3	0
1425942_a_at	Gpm6b	0,821	0,003	5	5
1432416_a_at	Npm1	0,890	0,003	5	5
1421612_a_at	H2afy3 /// H2afy2	0,958	0,003	4	5
1455293_at	Leo1	1,032	0,003	5	4
1424129_at	Mfsd1	1,090	0,003	5	5
1436209_at	Dnajc16	0,956	0,003	5	5
1426831_at	Ahcyl1	1,025	0,003	5	5
1429279_at	Wars2	1,065	0,003	5	5
1447320_x_at	Rpo1-3	1,044	0,003	5	5
1435545_at	BC032203	1,713	0,003	5	5
1439748_at	Dpp6	1,057	0,003	4	0
1447219_at	---	1,317	0,003	2	5
1437743_at	Aebp2	0,996	0,004	4	2
1417433_at	Lypla2	0,986	0,004	5	5
1426962_at	Phf20	0,897	0,004	5	5
1449745_at	---	1,095	0,004	4	4
1449351_s_at	Pdgfc	0,834	0,004	5	5
1434901_at	Zbtb2	1,068	0,004	5	5
1416838_at	Mut	0,897	0,004	5	5
1440343_at	Rps6ka5	0,815	0,004	5	5
1426084_a_at	Tor1aip1	1,196	0,004	5	5
1426613_a_at	Snrpb2	1,001	0,004	5	5
1430577_at	Cep27	1,231	0,004	5	5
1450052_at	Kif2a	0,829	0,004	3	2
1416077_at	Adm	0,857	0,004	5	3
1415746_at	Cic	1,027	0,004	4	5
1429529_at	Tsen54	1,047	0,004	4	1
1416866_at	Bet1	1,060	0,004	5	5
1459679_s_at	Myo1b	1,225	0,004	5	4

1427028_at	Lgr6	1,204	0,004	3	5
1436057_at	Gtl2	1,031	0,004	3	0
1430995_at	---	0,926	0,004	5	3
1428052_a_at	Zmym1	0,871	0,004	5	5
1423099_a_at	Mettl3	1,046	0,004	5	5
1415706_at	Copa	1,074	0,004	5	5
1415961_at	Itm2c	1,141	0,004	5	5
1457250_x_at	Nr1d2	1,025	0,004	5	5
1428615_at	P2ry5	0,804	0,004	5	5
1456611_at	D430015B01Rik	1,031	0,004	5	5
1419012_at	Zfpm2	1,013	0,004	4	4
1439511_at	---	1,224	0,004	5	5
1426432_a_at	Slc4a4	1,025	0,004	1	4
1419905_s_at	Hpgd	0,859	0,004	5	5
1420062_at	---	1,255	0,004	2	3
1438110_at	Zbtb1	0,798	0,004	4	1
1435546_a_at	1810013L24Rik	0,978	0,004	5	5
1456746_a_at	Cd99l2	0,551	0,004	5	4
1437198_at	Lig3	1,008	0,004	5	5
1429800_at	9130221H12Rik	1,032	0,004	5	5
1430999_a_at	Scoc	0,807	0,005	5	5
1429469_at	A930013F10Rik	0,854	0,005	5	4
1416103_at	Ywhaz	0,942	0,005	5	5
1438627_x_at	Pgd	0,979	0,005	5	5
1455323_at	Rbak	0,965	0,005	5	5
1429092_at	Vkorc11l	1,063	0,005	3	4
1416425_at	Pex19	1,255	0,005	5	5
1417871_at	Hsd17b7	1,844	0,005	2	4
1415701_x_at	Rpl23	0,907	0,005	5	5
1448516_at	Tsn	1,090	0,005	5	5
1436859_at	2700007P21Rik	0,930	0,005	5	5
1424366_at	Tmem15	1,081	0,005	5	5
1435161_at	D5Ert135e	1,039	0,005	5	5
1427446_s_at	Ttn	0,970	0,005	5	5
1420924_at	Timp2	1,016	0,005	5	5
1429390_at	Acpl2	0,933	0,005	5	2
1425726_x_at	Ppp2r5c	0,909	0,005	5	5
1449660_s_at	Coro1c	1,283	0,005	1	5
1436540_at	6720427I07Rik	0,783	0,005	5	4
1428848_a_at	Macf1	0,941	0,005	5	5
1451508_at	Larp2	0,927	0,005	5	5
1450015_x_at	Sgpp1	0,867	0,005	5	5
1450013_at	2900073G15Rik	1,059	0,005	5	5
1436600_at	Tnrc9	0,992	0,005	5	5
1417866_at	Tnfaip1	1,029	0,005	5	5
1449557_at	1600012F09Rik /// EG624446	0,800	0,005	5	5
1435782_at	LOC668206	1,074	0,005	1	4
1424193_at	Pwp2	1,100	0,005	5	5
1438563_s_at	Mrps24	1,171	0,005	5	5

1451628_a_at	Ank3	1,076	0,005	5	5
1447851_x_at	---	0,936	0,005	4	4
1428819_at	Mapre1	0,980	0,005	5	4
1422538_at	Extl2	1,119	0,005	5	5
1452422_a_at	Snrpb2	0,864	0,005	5	5
1427730_a_at	Zfp148	0,952	0,005	5	5
1438153_x_at	Coq10a	0,857	0,005	2	3
1416082_at	Rab1	0,911	0,005	5	5
1436360_at	Zscan22	0,923	0,005	0	3
1455674_at	Wdr76	0,844	0,005	1	4
1456887_at	Cmklr1	1,148	0,005	0	3
1430875_a_at	Pak1ip1	0,969	0,005	4	5
1453165_at	Mettl4	1,072	0,005	3	5
1450295_s_at	Pvr	1,117	0,006	1	3
1426777_a_at	Wasl	1,039	0,006	5	5
1422880_at	Sypl	0,809	0,006	5	5
1446147_at	C79248	1,059	0,006	5	4
1425830_a_at	2810452K22Rik	1,130	0,006	5	5
1445012_at	Nek11	1,805	0,006	0	3
1416257_at	Capn2	1,025	0,006	5	5
1427077_a_at	Ap2b1	1,061	0,006	5	5
1423960_at	Mboat5	1,093	0,006	5	5
1418749_at	Psd3	0,837	0,006	5	5
1419550_a_at	Stk39	1,244	0,006	5	5
1425287_at	Zfp189	0,939	0,006	4	4
1418521_a_at	Mtx1	1,140	0,006	5	5
1438157_s_at	Nfkbia	1,057	0,006	5	5
1434207_at	2900057K09Rik	0,993	0,006	4	2
1424333_at	Rg9mtd1	0,857	0,006	5	5
1416177_at	Rbmxrt	0,962	0,006	5	5
1420075_at	Atp8b1	1,266	0,006	5	3
1426852_x_at	Nov	1,045	0,006	5	5
1420058_s_at	2410166I05Rik	0,977	0,006	5	5
1421972_s_at	Hcfc1	1,037	0,006	4	5
1458439_a_at	2310047C04Rik	0,809	0,006	5	3
1436145_at	Igf2bp3	0,923	0,006	5	3
1424577_at	Msto1	1,008	0,006	5	5
1440721_at	5930433N17Rik	0,799	0,006	4	0
1437591_a_at	Wdr1	1,008	0,006	5	5
1437840_s_at	LOC673662	1,480	0,006	5	5
1431057_a_at	Prss23	0,850	0,006	5	5
1455964_at	Crkrs	0,906	0,006	4	4
1428433_at	Hipk2	0,911	0,006	5	5
1459760_at	Ndufs4	1,011	0,007	4	4
1439757_s_at	Epha4	1,695	0,007	3	5
1422862_at	LOC669660	1,101	0,007	0	4
1426314_at	Ednrb	0,951	0,007	5	5
1423992_at	Gatad2a	0,968	0,007	5	5
1424716_at	Retsat	1,129	0,007	5	5

1428997_at	Phf23	1,198	0,007	5	5
1433768_at	Palld	0,956	0,007	5	5
1456365_at	LOC629750 /// LOC639383	1,299	0,007	1	5
1451076_s_at	Gal7	0,953	0,007	5	5
1450959_at	D930014E17Rik	1,208	0,007	5	5
1419647_a_at	Ier3	1,469	0,007	5	5
1434773_a_at	Slc2a1	1,208	0,007	5	5
1417862_at	A830059I20Rik	1,086	0,007	3	2
1452594_at	Dusp11	0,910	0,007	5	5
1435260_at	---	1,074	0,007	5	5
1426940_at	Sidt2	1,091	0,007	5	5
1448173_a_at	Top3b	1,047	0,007	3	4
1452850_s_at	Brms11	0,854	0,007	5	5
1423727_at	Cnih	1,100	0,007	5	5
1450392_at	Abca1	0,721	0,007	3	3
1429160_at	Mtif3	1,288	0,007	5	4
1419176_at	Vps37a	0,789	0,007	5	4
1429327_at	Sdccag1	0,888	0,007	4	5
1418168_at	Zcchc14	1,001	0,008	5	5
1450187_a_at	Galt	1,086	0,008	5	5
1424288_at	Bcdin3	1,125	0,008	5	5
1455702_at	---	1,027	0,008	5	5
1428496_at	Secisbp2	0,920	0,008	4	5
1423461_a_at	Ubl3	1,047	0,008	5	5
1438504_x_at	Tm7sf3	1,726	0,008	5	5
1436618_at	Sfxn5	1,303	0,008	3	5
1426769_s_at	Maml1	1,279	0,008	5	5
1447865_x_at	Pdxd11	0,906	0,008	5	5
1425541_at	Ddx27	0,719	0,008	3	2
1428634_at	Twistnb	0,915	0,008	5	4
1460578_at	Fgd5	1,058	0,008	5	5
1434880_at	Etv6	1,039	0,008	5	5
1435056_x_at	Pofut2	1,178	0,008	5	5
1436351_at	Coq3	1,059	0,008	5	5
1428233_at	Cpsf6	0,843	0,008	5	5
1420381_a_at	Rpl31	0,850	0,008	5	5
1439452_x_at	Dnpep	1,041	0,008	5	5
1450129_a_at	Socs6	0,963	0,008	5	5
1449041_a_at	Trip6	1,275	0,008	5	5
1448688_at	Podxl	0,989	0,008	5	5
1458302_at	---	0,908	0,008	4	5
1447754_x_at	Thap4	1,554	0,008	5	5
1451216_at	Zfp330	0,998	0,008	5	5
1418337_at	Rpia	1,010	0,008	5	5
1417389_at	Gpc1	1,035	0,008	5	5
1437643_at	Cenpj	0,839	0,008	4	4
1433589_at	D6Wsu116e	1,186	0,008	5	5
1416197_at	Snrpc	1,062	0,008	5	5
1436572_at	Ccdc45	0,811	0,008	5	5

1440972_at	Nsd1	1,762	0,008	3	5
1442786_s_at	Rufy3	1,354	0,008	4	5
1426618_a_at	Pomgnt1	0,989	0,008	5	5
1451754_a_at	Wdr45	1,158	0,009	4	5
1427240_at	Dock6 /// LOC670024	1,069	0,009	3	0
1441767_at	Zfp142	0,882	0,009	3	2
1423206_s_at	2310003F16Rik	0,974	0,009	5	5
1435869_s_at	Ap2a2	1,106	0,009	5	5
1423044_at	Prosc	1,054	0,009	5	5
1444640_at	Pigg	0,796	0,009	5	4
1451624_a_at	Phospho2	0,949	0,009	5	5
1445693_at	Araf	0,857	0,009	4	1
1454116_a_at	Mterfd1	0,953	0,009	5	5
1417190_at	Pbef1	0,977	0,009	5	5
1448917_at	Thrap6	1,004	0,009	5	5
1453300_at	Slc35d2	0,890	0,009	5	3
1415794_a_at	Spin	1,225	0,009	5	5
1429516_at	Ubr2	1,260	0,009	3	0
1430668_a_at	Ankra2	0,960	0,009	5	5
1439859_at	9630033F20Rik	1,080	0,009	5	5
1417348_at	2310039H08Rik	1,060	0,009	5	5
1447629_at	1810020G14Rik	1,013	0,009	4	0
1440334_at	Zfp90	1,259	0,009	1	3
1424237_at	Zfp639	0,982	0,009	4	3
1421969_a_at	Faah	1,099	0,009	5	5
1418302_at	Ppt2	1,049	0,009	5	5
1417902_at	Slc19a2	1,059	0,009	4	4
1452000_s_at	Sars	1,386	0,009	5	5
1452160_at	Tiparp	0,881	0,009	5	5
1447900_x_at	Entpd4	0,995	0,009	5	5
1427411_s_at	Dleu2	1,021	0,009	5	5
1421236_at	Ripk2	1,062	0,009	4	4
1457666_s_at	Ifi202b	0,547	0,009	5	3
1424133_at	Tmem98	1,400	0,009	5	5
1423105_a_at	Yeats4	0,993	0,009	5	5
1455050_at	E130203B14Rik	1,066	0,009	5	5
1419736_a_at	Eif1ay	1,000	0,009	5	5
1424843_a_at	Gas5	1,006	0,009	5	4
1431285_at	Mgrn1	1,062	0,009	5	5
1426129_at	Brms1	1,170	0,009	3	0
1431054_at	Lsm6	1,046	0,009	5	5
1434732_x_at	Tomm7	1,237	0,009	5	5
1436174_at	Atad2	0,918	0,009	5	5
1452152_at	F630206G17Rik	1,181	0,010	5	5
1418387_at	4930548G07Rik	0,955	0,010	5	4
1416563_at	Ctps	0,866	0,010	5	5
1430757_at	A330102H22Rik	0,851	0,010	0	3
1422644_at	Sh3bgr	0,955	0,010	5	5
1431381_at	3110005L24Rik	0,919	0,010	5	5

1418926_at	Zfhx1a	0,933	0,010	5	5
1451144_at	Bxdc2	0,860	0,010	5	5
1430604_a_at	Dab2	0,943	0,010	4	4
1434587_x_at	Ptdss2	1,119	0,010	5	2

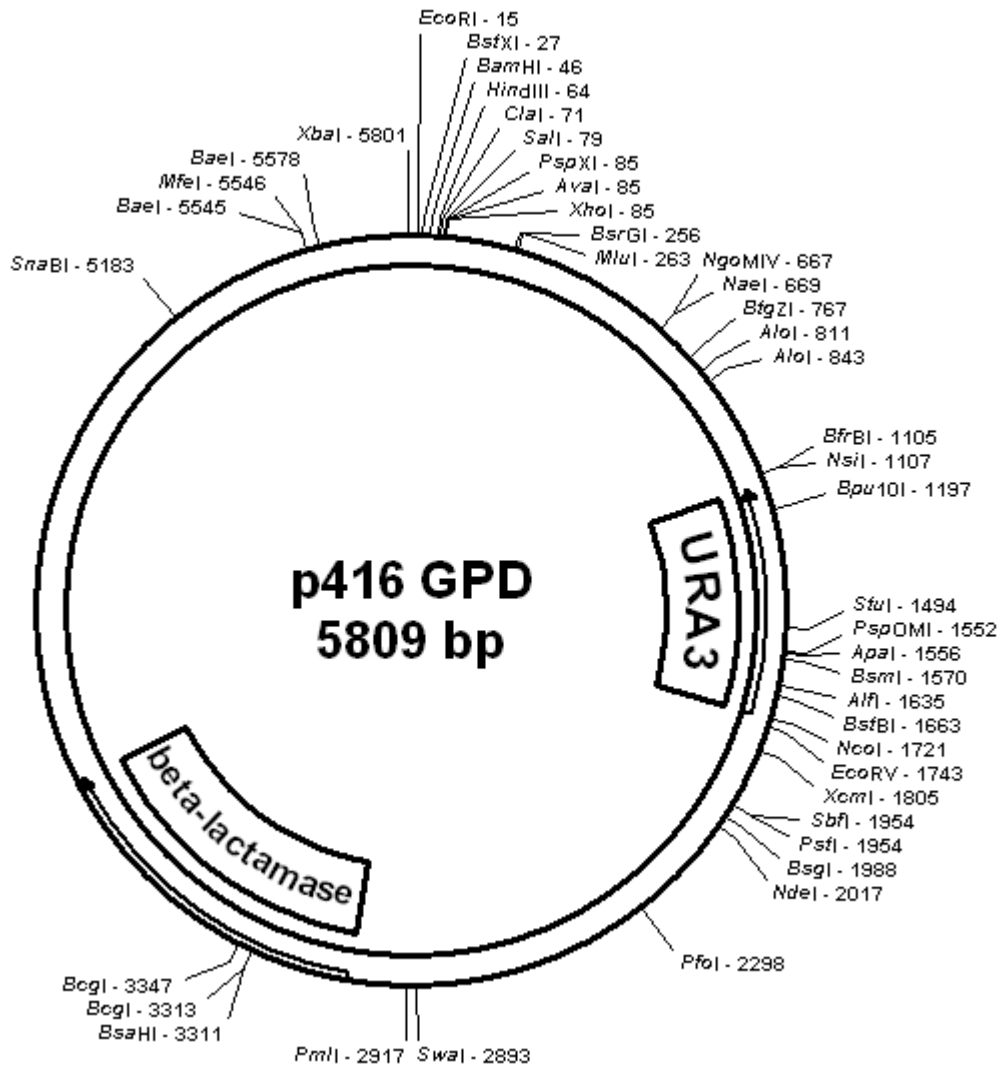


Abb. S1 Expressionsvektor p416 GPD für GPCR in Hefen

Dargestellt sind der verwendete Hefe-Expressionsvektor p416GPD und die singulären Restriktionsenzym-Schnittstellen. Die URA3-Sequenz ermöglicht nur erfolgreich transfizierten Hefezellen das Wachstum in Uracil-defizientem Medium. Durch Einführen einer β -Laktamase-Sequenz in den Vektor ist eine weitere Selektion in Ampicillin-versetztem Medium möglich. Abkürzungen: URA3: Orotidine-5'-Phosphat-Decarboxylase

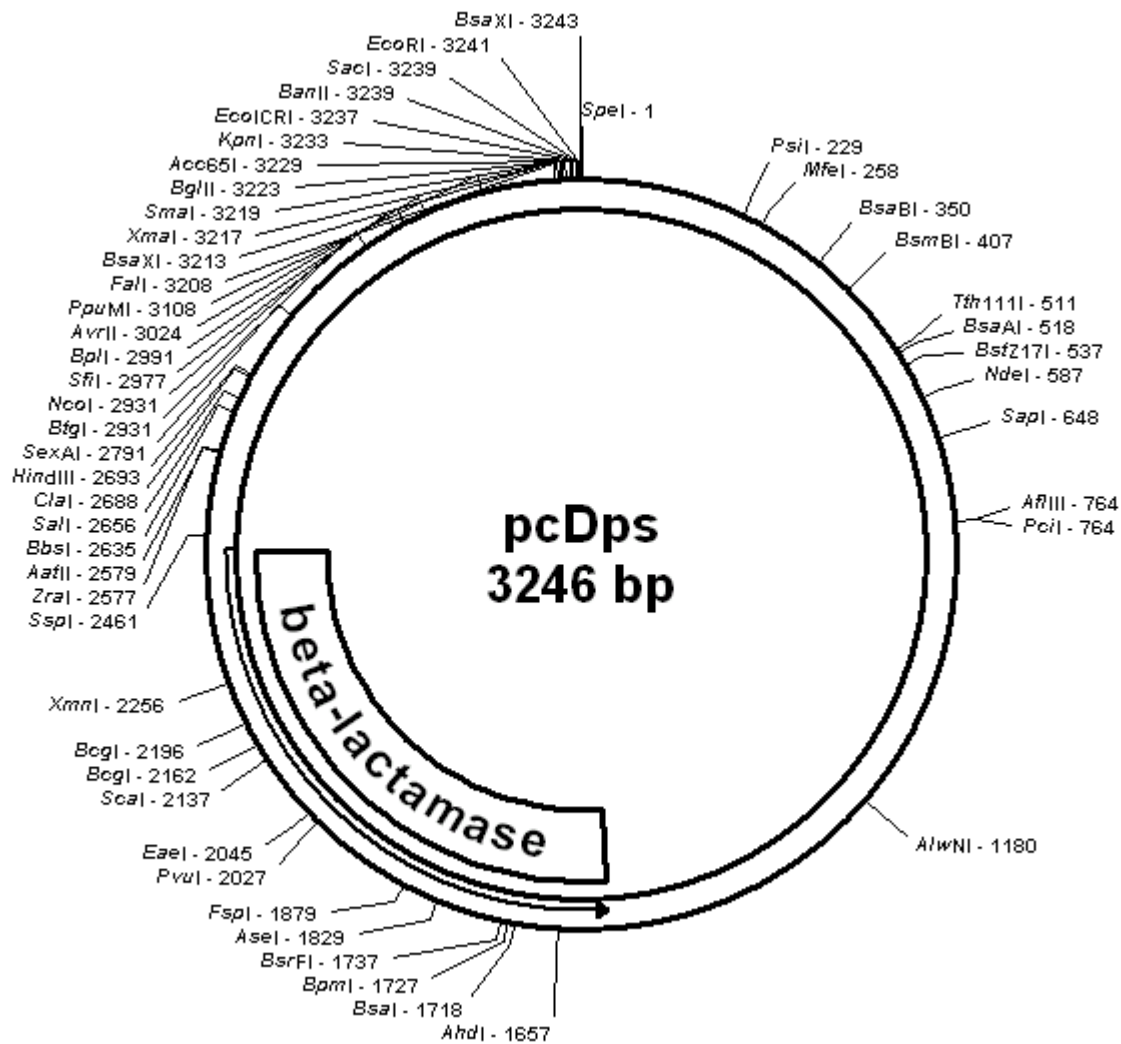


Abb. S2 Expressionsvektor pcDps für GPCR in Säugierzellen

Dargestellt sind der Säugierzell-Expressionsvektor pcDps und die singulären Restriktionsenzym-Schnittstellen. Die eingefügte β -Laktamase Sequenz ermöglicht ein selektives Wachstum der transformierter *E. coli*-Zellen in Ampicillin-versetztem Medium.