

Aus dem Walther-Straub-Institut für Pharmakologie und Toxikologie
der Ludwig-Maximilians-Universität München
Vorstand: Prof. Dr. med. Thomas Gudermann

**Konformationsänderungen mechanosensitiver
G-Protein gekoppelter Rezeptoren mittels
intramolekularem dynamischem FRET**

Dissertation
zum Erwerb des Doktorgrades der Naturwissenschaften
an der Medizinischen Fakultät der
Ludwig-Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von
Serap Erdogmus
aus
Starnberg

2019

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München

Betreuer(in): Prof. Dr. Michael Mederos y Schnitzler

Zweitgutachter(in): Prof. Dr. rer. nat. Alexander Faußner

Dekan: Prof. Dr. med. dent. Reinhard HICKEL

Tag der mündlichen Prüfung: 07.10.2020

Für meine Eltern

Inhaltsverzeichnis

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1.1: Transduktion vom inaktiven zum aktiven Rezeptorzustand.....	20
Abbildung 1.2: Vergleich des inaktiven Rezeptorzustands mit dem aktiven Rezeptorzustand des β_2 AR....	21
Abbildung 1.3: Molekulare Konformationsänderungen – „microswitches“ – bei der Transduktion zum aktiven Rezeptorzustand des β_2 AR.....	22
Abbildung 1.4: Molekulare Konformationsänderungen des β_2 AR durch die Kopplung eines G_s -Proteins ...	23
Abbildung 1.5: Vergleich der inaktiven und aktiven G_s -Proteine	25
Abbildung 1.6: Allosterischer Effekt an der orthosterischen Ligandenbindestelle	26
Abbildung 1.7: Anabolismus und Katabolismus von Histamin.....	33
Abbildung 1.8: Funktionen von Histamin	35
Abbildung 1.9 2 ^D -Skelettstrukturen von Antihistaminika.....	38
Abbildung 1.10: Inaktiver Rezeptorzustand des H_1 -Rezeptors mit Doxepin.....	42
Abbildung 1.11: Aktiver Rezeptorzustand des H_1 -Rezeptors mit Histamin.....	43
Abbildung 1.12: Das Corti-Organ	47
Abbildung 1.13: Laterales Druck-Spannungsprofil mit Membranmodell.....	55
Abbildung 1.14: Rezeptormodell des All AT_1 -Rezeptors mit unterschiedlichen Rezeptorzuständen	57
Abbildung 1.15: Mechanische Aktivierung von $G_{q/11}$ -Protein gekoppelten Rezeptoren	59
Abbildung 2.1: Aufbau des Messstands für ratiometrische Kalziummessungen mit Fura-2	80
Abbildung 2.2: Aufbau des Messstands für ratiometrische Kalziummessungen mit Fura-2 für Fluss-induzierte Scherkräfte	82
Abbildung 2.3: Jabłoński-Diagramm für FRET	84
Abbildung 2.4: Die Anregungs- und Emissionsspektren der beiden Fluorochrome FIAsh und Cerulean unter Angabe der maximalen Exzitations- und Emissionswellenlängen.....	86
Abbildung 2.5: Schematische Darstellung der elektrischen Schwingungsfelder (Dipolachsen)	87
Abbildung 2.6: FRET-Effizienzen für die drei FRET-Paare ECFP-EYFP, Cerulean-FIAsh, mTFP1-mKO2	89
Abbildung 2.7: Eichgerade der applizierten Flussraten und Fluss-induzierten Scherkräften.....	91
Abbildung 2.8: Verwendete Filtersets.....	92
Abbildung 2.9: Strahlengang im Fluoreszenzmikroskop.....	93
Abbildung 2.10: Aufbau des Messstandes für die FRET-Photometrie.....	93
Abbildung 2.11: Anregungs- und Emissionsspektren der Fluorochrome FIAsh und mCerulean.....	94
Abbildung 2.12: Verwendete FRET- H_1 -Rezeptorkonstrukte.....	96
Abbildung 2.13: Agarose-Gelelektrophoresebilder der PCR-Reaktionsansätze zur Amplifikation des gpH ₁ -Rezeptors und des türkis fluoreszierenden Proteins mCerulean.....	112
Abbildung 3.1: Alle gpH ₁ R-Konstrukte verursachen transiente Kalziumzunahmen auf Agonistenstimulation mit Histamin	129
Abbildung 3.2: Membranlokalisation der gpH ₁ R-Konstrukte.....	130

Abbildung 3.3: Nicht-transfizierte HEK293-Zellen reagieren nicht auf mechanische Stimulation mit hypoosmotischer Lösung	130
Abbildung 3.4: Alle gpH ₁ -Rezeptorkonstrukte sind mechanosensitiv und nehmen bei der mechanischen Stimulation eine der Agonisten induzierten unterschiedlichen aktiven Rezeptorzustand an	132
Abbildung 3.5: Aktivierte Rezeptorkonformationsänderungen bei umgekehrter Stimulationsreihenfolge... 133	
Abbildung 3.6: Zusammenhang der mechanisch induzierten FRET-Signale mit der Stärke des mechanischen Stimulus	134
Abbildung 3.7: Der spezifische G $\alpha_{q/11}$ -Inhibitor YM 254890 verhindert mechanisch induzierte transiente Kalziumzunahmen.....	135
Abbildung 3.8: Die mechanische Aktivierung des gpH ₁ -Rezeptors erfolgt unabhängig von der Histaminbindung in der orthosterische Ligandenbindetasche	137
Abbildung 3.9: Die mechanische Aktivierung des gpH ₁ -Rezeptors ist unabhängig von der Agonistenbindung in die orthosterische Ligandenbindetasche	138
Abbildung 3.10: Hemmung der mechanischen Rezeptoraktivierung des gpH ₁ -Rezeptors mit dem spezifischen inversen Agonisten Mepyramin	141
Abbildung 3.11: Hemmung des mechanisch induzierten FRET-Signals durch den inversen Agonisten Mepyramin in der gpH ₁ -Rezeptormutante	142
Abbildung 3.12: Partielle Hemmung mechanisch induzierter FRET-Signale durch den inversen H ₁ -Rezeptoragonisten Desloratadin.....	144
Abbildung 3.13: Reduktion mechanisch induzierter FRET-Signale mit dem partiellen Agonisten Mizolastin	146
Abbildung 3.14: Übersicht über die 2 ^D -Skelettstrukturen der eingesetzten Zytoskelett-Modulatoren.....	147
Abbildung 3.15: Verstärkung mechanisch induzierter FRET-Signale unter Verwendung von Zytoskeletthinhibitoren	150
Abbildung 3.16: Der H ₁ -Rezeptor wird durch Fluss-induzierte Scherkräfte aktiviert.....	153
Abbildung 3.17: Im Endothel endogen exprimierter H ₁ -Rezeptor ist Mechanosensor für Fluss-induzierte Scherkräfte.....	155
Abbildung 3.18: Die räumliche Anordnung der Helix 8 in der Lipid-Doppelschicht (A) und die Aminosäuresequenzen der C-Termini untersuchter GPCR (B).....	157
Abbildung 3.19: Helix 8 als das entscheidende mechanosensorische Strukturelement von G $\alpha_{q/11}$ -gekoppelten Rezeptoren.....	159
Abbildung 3.20: PIP ₂ -Mangel der HEK293-Zellmembran reduziert die mechanische Rezeptoraktivierung	161
Abbildung 3.21: Mutationen in der C-terminalen Helix 8 des Histamin H ₁ -Rezeptors verringern die mechanische Rezeptoraktivierung	163
Abbildung 3.22: Alle in der C-terminalen Helix 8 mutierten gpH ₁ R-Konstrukte zeigen transiente Kalziumzunahmen auf Agonistenstimulation mit Histamin, wobei die Kalziumzunahmen unter mechanischer Stimulation signifikant reduziert sind	164
Abbildung 3.23: Cholesterolverarmung in der HEK293-Zellmembran reduziert die mechanische H ₁ -Rezeptoraktivierung	166
Abbildung 3.24: Vergleichbare maximale FRET-Abnahmen und FRET-Effizienzen aller gpH ₁ R-Konstrukte	168

Abbildung 3.25: Unterschiedliche Aktivierungskinetiken von Agonist - und hypoosmotisch induzierten Abnahmen des FRET-Signals	171
Abbildung 3.26: Änderungen des FRET-Signals beim Wechsel zwischen einer 55 mM NaCl haltigen isotonischen Badlösung und einer 140 mM NaCl haltigen Salzlösung.....	172
Abbildung 3.27: Kristallstrukturen der 4-Alanin-Insertionsvariante der an GTP γ S gebundenen G α_{i1} -Proteins und der oberen 50-kDa-Region des Myosin V Motorproteins.....	174
Abbildung 3.28: Bestimmung der maximalen FRET-Effizienz aus maximalen Abnahmen des FRET-Signals in Gegenwart von 10 mM BAL	175
Abbildung 3.29: Kompetitiver Histamin-Enzymimmunassay	176
Abbildung 3.30: Fluorimetrische Bestimmung der NO-Produktion in murinen Gefäßperfusaten.....	177
Abbildung 4.1: Phylogenetischer GPCR-Stammbaum	193
Abbildung 4.2: Aminosäuresequenzen der C-Termini vom humanen Dopamin D ₂ -Rezeptor (hD ₂ R), vom humanen Chemokinrezeptor CXCR ₄ (hCXCR ₄) und vom humanen Adenosin A _{2A} -Rezeptor (hA _{2A} R)	203
Abbildung 4.3: Mechanische Aktivierbarkeit von G _{i/o} -Protein gekoppelten Rezeptoren mit einer C-terminalen Helix 8	205
Abbildung 4.4: Der humane Adenosin A _{2A} -Rezeptor mit einer C-terminalen Helix 8 ist mechanosensitiv.....	207
Abbildung 4.5: Modell zur mechanischen Aktivierung von GPCR	208
Abbildung 4.6: Snakeplot-Diagramm des humanen Histamin H ₁ -Rezeptors mit den TM1-TM7 und der Helix8	214
Abbildung 4.7: Snakeplot-Diagramm des humanen GnRH-Rezeptors mit den TM1-TM7.....	216
Abbildung 4.8: Das relative mRNA Expressionsprofil von GPCR und Endothelzellmarkern in HUVEC	218
Abbildung 4.9: Histamin H ₁ -Rezeptoren vermitteln die endotheliale Fluss-induzierte Vasodilatation	223

Abkürzungsverzeichnis

[Ca ²⁺] _ifreie intrazelluläre Kalziumkonzentration/-en
[Pi]freies anorganisches Phosphatanion (HPO ₄ ²⁻ oder H ₂ PO ₄ ⁻)
ACAdenylylzyklase/-n (A denylyl c ylase)
A _{2A} RAdenosin A _{2A} -Rezeptor
AP-2Adapterprotein-2
ATPAdenosin-5'-triphosphat
β ₂ ARβ ₂ -Adrenozeptor
β ₁ ARβ ₁ -Adrenozeptor
Ca ²⁺freie/-s Kalziumion/-en
cAMPzyklisches Adenosin-3',5'-monophosphat
CCDoppelwendel (<i>coiled-coil</i>)
CO ₂Kohlenstoffdioxid (<i>carbon dioxide</i>)
C-TerminusTerminus mit freier Carboxygruppe (-COOH)
DAGDiazylglycerol (<i>Diacylglycerol</i>)
E3KARPNatrium-Protonen-Antipporter Isoform 3 (Na ⁺ /H ⁺ exchanger isoform 3 kinase A regulatory protein)
EBP50ERM-binding phosphoprotein 50
ECLextrazelluläre Schleife/-n (<i>extracellular loop</i>)
EC-Nummernumerisches Klassifizierungssystem für Enzyme (<i>Enzyme Commission number</i>)
EDTAEthylendiamintetraessigsäure (<i>Ethylenediaminetetraacetic acid</i>)
EGTAEthylenglycol-bis(aminoethylether)-N,N,N',N'-tetraessigsäure (E thylene g lycol-bis(2aminoethylether)-N,N,N',N'- t etraacetic a cid)
ERendoplasmatisches Retikulum
ERM E zrin- R adixin- M oesin-ähnliches Protein (Merlin) als Adapterprotein zwischen Zellmembran und Aktinzytoskelett fungierend
FKSfetales Kälberserum (<i>fetal calf serum</i>)
Fura-2-AMFura-2-Acetoxymethylester
GAPGTPase aktivierende/-s Protein/-e (G TPase a ctivating p rotein)
GDIGuanosindiphosphat-Dissoziationsinhibitor/-en
GDPGuanosin-5-diphosphat
GEFGuanosintriphosphat-Austauschfaktor/-en (G uanosin t riphosphate E xchange F actor)
GIRKG-Protein gekoppelte/-r einwärtsgleichrichtende/-r Kaliumkanal/-kanäle (G protein- <i>coupled inwardly-rectifying K⁺ channel</i>)
GPCRG-Protein gekoppelte/-r Rezeptor/-en (G protein- <i>coupled receptor</i>)
G-Protein/-eGuanosintriphosphat bindende/-s Protein/-e
GRKG-Protein gekoppelte Rezeptorkinase/-n
GTPGuanosin-5-triphosphat
GTPγSGuanosin-5-O-[gamma-thio]triphosphat ist ein nicht bzw. ein langsam hydrolysierbares Analogon von Guanosin-5-triphosphat
GasAHα-helikale Domäne der Gas-Untereinheit
GαsRasRas-artige GTPase-Domäne
HAoECmenschliche Endothelzellen aus der Aorta (H uman A ortic E ndothelial C ells)
HBSSHanks balancierte Salzlösung (H ank's B alanced S alt S olution)
HEPESPuffersystem, 2-(4-(2- H ydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure

HUVEC.....	menschliche Endothelzellen aus der Nabelschnurvene (H uman U mbilical V ein E ndothelial C ells)
ICL.....	intrazelluläre Schleife (<i>intracellular loop</i>)
IP ₃	Inositol-1,4,5-trisphosphat
LR3 IGF.....	Insulinähnlicher Wachstumsfaktor (<i>Long arginine 3 Insulin Like Growth Factor</i>)
M ₂ R.....	muskarinischer M ₂ -Rezeptor
Na ⁺	freie/-s Natriumion/-en
Nb.....	Nanoantikörper (Nanobody)
NHERF.....	Adapterprotein mit PDZ-Domänen (N a ⁺ / H ⁺ e xchange r egulatory c ofactor)
N-Terminus.....	Terminus mit einer freien Aminogruppe (-NH₂)
PDZ.....	Proteininteraktionsdomäne (P ost synaptic density 95 protein / <i>Drosophila melanogaster septate junction protein</i> D iscs large / tight junction protein Z onula occludens-1)
PECAM-1.....	Thrombozyten-Endothelzellen-Adhäsionsmolekül (p latelet e ndothelial c ell a dhesion m olecule 1), auch unter der Bezeichnung C luster of D ifferentiation 31 (CD31) bekannt
PH.....	Pleckstrin-Homologie-Domäne
PIP ₂	Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat
PIP ₃	Phosphatidylinositol-3,4,5-trisphosphat
PI3K.....	Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat-3-kinase
PIK4.....	Phosphoinositid-4-kinase
PKA.....	cAMP-abhängige Proteinkinase/-n vom Typ A
PKC.....	Proteinkinase C
PLC.....	Phosphoinositid-spezifische Phospholipase/-n C
PTX.....	Pertussistoxin
RhoA.....	intrazelluläre kleine GTPase (R as h omologue g ene f amily i soform A)
SCN.....	suprachiasmatischer Kern
SCAM.....	Methode zur Bestimmung von Aminosäuresequenzen von Transmembranproteinen (<i>substituted cysteine accessibility mapping</i>)
SEM.....	Standardfehler des arithmetischen Mittels (s tandard e rror of m ean)
t _{1/2}	Halbwertszeit
TM.....	Transmembrandomäne/-n
TRPC.....	nicht-selektive/-r Kationenkanal/-kanäle der Familie der transient receptor potential classical

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1.1: Vergleich der Aminosäuresequenzen der einzelnen Histaminrezeptorsubtypen	39
Tabelle 2.1: Übersicht über Parameter fluoreszierender Proteine und FIAsH	87
Tabelle 2.2: Die spektrale Überlappung $J(\lambda)$ [$\text{m}^6 \text{mol}^{-1}$]	88
Tabelle 2.3: Einwaagen für das SOB-Medium	100
Tabelle 2.4: Einwaagen für das TB-Medium	100-101
Tabelle 2.5: Charakterisierung der verwendeten Sequenzierungsprimer.....	106-107
Tabelle 2.6: Verwendete Vorwärts- und Rückwärtsprimer zur Amplifikation des gpH ₁ -Rezeptors und des türkis fluoreszierenden Proteins Cerulean um das Zielkonstrukt gpH ₁ R-Cerulean pcDNA3.1 (+) [131] zu erhalten	108-109
Tabelle 2.7: Verwendete Vorwärts- und Rückwärtsprimer zur Amplifikation des C-Terminus des gpH ₁ -Rezeptors für die Klonierung der Rezeptorchimäre aus dem hGnRHR und dem C-Terminus des gpH ₁ R	109
Tabelle 2.8: Verwendete Vorwärts- und Rückwärtsprimer zur Amplifikation des MV1IQ	109-110
Tabelle 2.9: Vergleich der Pfu-DNA-Polymerase mit oder ohne einer Sso7d Domäne	115
Tabelle 2.10: Mutageneseprimer (sense und antisense) die zum Verlust der Histaminbindung in der orthosterischen Ligandenbindetasche des gpH ₁ -Rezeptors führten.....	116
Tabelle 2.11: Mutageneseprimer (sense und antisense) zur Regeneration neuer Restriktionsschnittstellen im gpH ₁ -Rezeptor, um das FIAsH-Bindemotiv (CCPGCC) einzufügen	116-117
Tabelle 2.12: Mutageneseprimer, die zur Untersuchung der Helix 8 Struktur im gpH ₁ -Rezeptor und im hA _{2A} -Rezeptors verwendet wurden	117-119
Tabelle 2.13: Verwendete Mutageneseprimer für einen um den C-Terminus gekürzten gpH ₁ -Rezeptor..	119
Tabelle 2.14: Mutageneseprimer, die nach der Umklonierung des C-Terminus des gpH ₁ -Rezeptors an den hGnRH Rezeptor gebraucht wurden, um die durch die Restriktionsschnittstellen EcoRI und XhoI modifizierten Aminosäuren (StopEF und L) an die Aminosäuresequenz des gpH ₁ -Rezeptors anzugleichen	120
Tabelle 2.15: Verwendeten „FastDigest“-Restriktionsendonukleasen	120-121
Tabelle 2.16 Weitere verwendete Enzyme für molekularbiologische Zwecke	121
Tabelle 2.17: Restriktionsendonukleasen, die für den Einbau des FIAsH-Bindemotivs (CCPGCC) eingesetzt wurden	121-122
Tabelle 2.18: Sense und antisense Oligonukleotide für FRET-Konstrukte mit α -Helices definierter Länge zwischen dem CCPGCC FIAsH-Bindemotiv und dem türkis fluoreszierendem Protein mCerulean...	124-125
Tabelle 2.19: Auswahl der Signifikanztests	127
Tabelle 3.1: FRET-Konstrukte mit α -Helices definierter Länge zwischen dem türkis fluoreszierendem Donorfluorophor Cerulean und dem gelb fluoreszierendem Akzeptorfluorophor FIAsH.....	173
Tabelle 1 im Anhang: Übersicht über die Charakteristika von Histamin-Rezeptoren	228-230

Inhaltsverzeichnis	5
Abbildungsverzeichnis	5
Abkürzungsverzeichnis	8
Tabellenverzeichnis	10
1 Einleitung	14
1.1 GPCR	14
1.1.1 Klassifizierung der GPCR	14
1.1.2 Struktureller Aufbau der GPCR anhand der Klasse A	16
1.1.3 Perzeption von GPCR anhand der Klasse A	16
1.1.4 Transduktion bei GPCR anhand der Klasse A	18
1.1.5 Effektoreinheit von Klasse A GPCR	24
1.2 G-Proteine als erstes Effektorsystem	26
1.3 Klassifizierung der Proteinuntereinheiten von heterotrimeren G-Proteinen	28
1.4 Effektorsysteme von heterotrimeren G-Proteinen	29
1.4.1 G _s -Protein	29
1.4.2 G _i -Protein	30
1.4.3 G _q -Protein	30
1.4.4 G ₁₂ -Protein	31
1.5 Histamin und Histaminrezeptoren	33
1.5.1 Metabolismus und Funktion	33
1.5.2 H ₁ -Antihistaminika und Entdeckung der Histamin-Rezeptoren	36
1.5.3 Familie der Histaminrezeptoren	38
1.5.4 Effektorsysteme des H ₁ -Rezeptors	40
1.5.5 3 ^D -Strukturen des H ₁ -Rezeptors	41
1.6 Mechanosensorik	45
1.6.1 Fluss-induzierte Vasodilatation	51
1.6.2 Kriterien für die intrinsische Mechanosensitivität von Membranproteinen	52
1.6.3 Arten von äußeren mechanischen Krafteinwirkungen	52
1.6.4 Vorstellungsmodelle zur Kraftübertragung auf Membranproteine	53
1.6.5 Intrinsisches Kraftprofil mit lateralem Druck-Spannungsprofil in der Lipid-Doppelschicht	54
1.6.6 Myogener Tonus	55
1.6.7 Mechanosensitive GPCR	56
1.6.8 Adhäsions-G-Protein gekoppelte Rezeptoren	60
1.7 Zielsetzung	61
2 Material und Methoden	63
2.1 Kompetitiver Histamin-Enzymimmunassay	63
2.2 Kultivierung eukaryotischer Zellen	64
2.3 Transiente Transfektionen	67
2.3.1 Säugerzellenexpressionsvektoren-Plasmid-DNA	67
2.4 Generation stabiler monoklonaler HEK293-Zelllinien	70
2.4.1 Auszählen der HEK293-Zellen in einer Neubauer-Zählkammer	70
2.4.2 Elektroporation von HEK293-Zellen	70
2.5 Einfrieren und Auftauen von Zellen	72
2.6 Beschichtung mit Poly-L-Lysin	73
2.7 Herstellung einer Cholesterol-Methyl- β -cyclodextrin Einschlussverbindung	74
2.8 Anfärbung mit FIAsh	75
2.9 Ratiometrische Kamera-basierte Kalziummessungen mit Fura-2 an Einzelzellen	77

2.10 FRET-Photometrie	83
2.10.1 Bestimmung der FRET-Effizienz	94
2.10.2 Intramolekularer dynamischer FRET	95
2.10.3 Klonierung der FRET-H ₁ -Rezeptorkonstrukte	96
2.11 Konfokalmikroskopie	98
2.12 Kultivierung prokaryotischer Zellen	98
2.13 Herstellung kompetenter E.Coli DH5 α -Bakterien	99
2.14 Transformation von Plasmid-DNA in kompetente E. coli DH5 α -Bakterien	101
2.15 Mini-Präparation von Plasmid-DNA	101
2.16 Midi-Präparation von Plasmid-cDNA	103
2.17 Bestimmung der Plasmid-cDNA-Konzentration und –Reinheit	104
2.18 Sequenzierung von Plasmid-cDNA	105
2.19 Polymerase-Ketten-Reaktion	107
2.20 Agarose-Gelelektrophorese	110
2.20.1 Aufreinigung von Plasmid-cDNA aus Agarosegelen	111
2.21 Zielgerichtete Mutagenese	113
2.22 Präparativer Verdau von Plasmid-cDNA oder PCR-Produkten mit Restriktionsendonukleasen ..	120
2.23 Ligation mit der T4-DNA-Ligase	123
2.24 Fluorimetrisches Nitrat-Nitrit-Assay-Kit	126
2.25 Statistik	127
3 Ergebnisse	128
3.1 Alle verwendeten H ₁ -Rezeptorkonstrukte sind funktionell	128
3.2 Der mechanosensitive H ₁ -Rezeptor nimmt einen mechanisch induzierten Rezeptorzustand an ..	131
3.3 Intrinsische Mechanosensitivität des H ₁ -Rezeptors	133
3.4 Komplette Inhibition der mechanischen Rezeptoraktivierung durch einen spezifischen G _{aq/11} - Protein Inhibitor	134
3.5 Die mechanische Rezeptoraktivierung ist unabhängig von der Histaminbindung bzw. von der orthosterischen Ligandenbindetasche	136
3.6 Der inverse Agonist Mepyramin hemmt partiell die mechanische Rezeptoraktivierung des H ₁ - Rezeptors	139
3.7 Ein weiterer inverser H ₁ -Rezeptoragonist - Desloratadin hemmt partiell die mechanische Rezeptoraktivierung	143
3.8 Hemmung der mechanischen H ₁ -Rezeptoraktivierung mit dem partiellen H ₁ -Rezeptoragonisten Mizolastin	145
3.9 Membranmodell und Verankerungsmodell als Kraftübertragungsmodell für den H ₁ -Rezeptor	147
3.10 Der H ₁ -Rezeptor ist ein Mechanosensor für Fluss-induzierte Scherkräfte	151
3.11 Der endotheliale H ₁ -Rezeptor ist mechanosensitiv für Fluss-induzierte Scherkräfte	154
3.12 Die C-terminale Helix 8 als das entscheidende mechanosensorische Strukturelement von G _{q/11} - Protein gekoppelten Rezeptoren	156
3.13 PIP ₂ -Verarmung der Zellmembran reduziert die mechanische Rezeptoraktivierung des Histamin H ₁ -Rezeptors	160
3.14 Veränderungen in der C-terminalen Helix 8 des H ₁ -Rezeptors verringern die mechanische Rezeptoraktivierung	162
3.15 Cholesterolverarmung in der Zellmembran reduziert die mechanische H ₁ -Rezeptoraktivierung ..	165
3.16 Vergleichbare FRET-Effizienzen der H ₁ -Rezeptorkonstrukte	167
3.17 Langsame Aktivierungskinetik des H ₁ -Rezeptors bei mechanischer Stimulation	169
3.18 Inaktiverer Rezeptorzustand des H ₁ -Rezeptors in Gegenwart von 55 mM NaCl	171

3.19 Validierung der FRET-Messungen.....	173
3.20 Bestimmung der Histaminkonzentration in murinen Gefäßperfusaten.....	176
3.21 Bestimmung der NO-Produktion in Gefäßperfusaten.....	176
4 Diskussion	178
4.1 Mechanosensitive G-Protein gekoppelte Rezeptoren.....	178
4.2 Verankerungsmodell und Membranmodell	193
4.3 Einfluss der Membraneigenschaften auf die intrinsische Mechanosensitivität von GPCR.....	195
4.4 Beeinflussung der Mechanosensitivität durch C-Terminus Eigenschaften.....	199
4.5 PIP ₂ -Interaktion beeinflusst die mechanische Aktivierbarkeit des Histamin H ₁ -Rezeptors.....	208
4.6 Anbindung an das Aktin-Zytoskelett.....	209
4.7 Aktivierung von GPCR durch Transmembranpotential	211
4.8 Monovalente Natriumionen als allosterische Modulatoren von GPCR.....	212
4.9 Physiologische Relevanz von Histamin H ₁ -Rezeptoren	216
Ausblick	225
Zusammenfassung.....	226
Summary.....	227
Anhang	228
Literaturverzeichnis	237
Eigene Publikationen	295
Kongressbeiträge.....	296
Eidesstattliche Versicherung	298
Danksagung.....	299

1 Einleitung

Die Zellen eines Organismus besitzen molekulare Rezeptoren zum einen für die Reize aus der Umwelt, wie z. B. für Licht-, Schallwellen, Aroma-, Geschmacks-, Geruchsstoffe, mechanische Kräfte und Drehmomente und zum anderen für die intraorganismische Kommunikation, die durch chemische Botenstoffe wie Hormone (z. B. Glukagon und Insulin), Neurotransmitter (z. B. Acetylcholin und Noradrenalin) und Zytokine (z. B. Interferone und Interleukine) vermittelt wird. Diese molekularen Rezeptoren befinden sich einerseits intrazellulär und andererseits in der Zellmembran und sind stets funktionell dreiteilig aufgebaut mit dem eigentlichen Rezeptor, der die spezifische Perzeption vermittelt, mit dem Transduktor, der die Transformation durch eine molekulare Konformationsänderung durchführt und mit dem Effektor, der spezifische genetische, biochemische oder elektrische zelluläre Veränderungen hervorruft. Dieser Effektor kann strukturell an der Rezeptor-Transduktor-Einheit festgebunden sein wie bei den Tyrosin-, Serin/Threonin-Kinasen, den Kernrezeptoren und bei den ionotropen Rezeptoren, die Liganden-gesteuerten Ionenkanäle sind, oder an der Rezeptor-Transduktor-Einheit assoziiert vorliegen wie bei den metabotropen G-Protein gekoppelten Rezeptoren (GPCR)¹. Beide Typen von Effektoren aktivieren weitere zelluläre Effektoren, die wiederum andere weitere zelluläre Effektoren aktivieren können. Dieses kaskadenartig wirkende Effektorsystem kann kurz- und langanhaltende zelluläre Veränderungen verursachen. Somit handelt es sich bei den metabotropen GPCR genau genommen um die transmembranäre Rezeptor-Transduktor-Einheiten und bei den intrazellulären assoziierten heterotrimeren G-Proteinen um die Effektor-Einheiten. Bemerkenswert ist, dass 38% aller Arzneistoffe GPCR beeinflussen (Klabunde und Hessler, 2002; Davies et al., 2007; Santos et al., 2017; Sriram und Insel, 2018).

1.1 GPCR

1.1.1 Klassifizierung der GPCR

Die GPCR gehören zur größten Klasse von Membranproteinen im menschlichen Genom (Lander et al., 2001; Venter et al., 2001). Die Familie der GPCR umfasst 804 (Nordstrom et al., 2011) verschiedene humane Rezeptoren an der Zelloberfläche, denen allen eine Sekundärstruktur von sieben hoch konservierten α -helikalen Transmembrandomänen (TM1-TM7)² mit einem extrazellulären N- und intrazellulärem C-Terminus gemein ist. Die einzelnen α -helikalen Transmembrandomänen werden durch drei extrazelluläre (ECL1-ECL3)³ und drei intrazelluläre Schleifen (ICL1-ICL3)⁴ miteinander verknüpft. Die sieben Transmembrandomänen sind gegen den Uhrzeigersinn kreisförmig in der Zellmembran angeordnet (Palczewski et al., 2000; Lefkowitz, 2004; Fredriksson und Schioth, 2005; Lagerstrom und Schioth, 2008). Als vielseitige Sensoren in der

¹ Abkürzung GPCR vom Englischen **G** protein-coupled receptor

² Abkürzung TM vom Englischen **t**rans**m**embrane domain

³ Abkürzung ECL vom Englischen **e**xtrac**e**llular loop

⁴ Abkürzung ICL vom Englischen intrac**e**llular loop

Zellmembran, reagieren GPCR auf eine Vielzahl von extrazellulären Signalen wie Photonen, Ionen, Aroma-, Geschmacksstoffen, Pheromonen, Lipiden, Neurotransmittern, Hormonen, Peptiden und Proteinen (Katritch et al., 2013). Die Superfamilie der GPCR wird nach phylogenetischen und strukturellen Eigenschaften klassifiziert, obwohl die Phylogenese und die Struktur der GPCR noch nicht vollständig und nachvollziehbar entschlüsselt sind (Hu et al., 2017).

Zurzeit bestehen drei Klassifikationssysteme der GPCR. Das älteste System basiert auf einem nicht umfassenden Aminosäuresequenz-Vergleich von GPCR aus den wirbellosen Tiergruppen und aus der Wirbeltiergruppe (Attwood und Findlay, 1993; Findlay et al., 1993; Attwood und Findlay, 1994). Es werden sechs GPCR-Familien von Klasse A bis Klasse F (Kolakowski, 1994) unterteilt. Das zweitälteste Klassifikationssystem beruht auf den strukturellen Unterschieden in der Perzeption. Nach Größe der Liganden und Lokalisation der Ligandenbindung im Rezeptor werden die GPCR in die Familien 1 bis 5 aufgeteilt (Bockaert und Pin, 1999). Das jüngste Klassifikationssystem basiert auf der vollständigen Nukleotidsequenz des Menschen und betrachtet nur Wirbeltiere unter der Verwendung eines stochastischen Hidden-Markov-Modells (Fredriksson et al., 2003). Es werden fünf Familien mit **Glutamat**-, **Rhodopsin**-, **Adhäsion**-, „**Frizzled/Smoothened**“- und **Sekretin**-Familie unterschieden, das sogenannte GRAFS-System (Fredriksson et al., 2003; Fredriksson und Schiöth, 2005). Alle drei Klassifikationssysteme überlappen stark, denn die Klasse A oder Familie 1 ist die Rhodopsin-Familie des GRAFS-Systems, die Klasse B oder Familie 2 umfasst die Sekretin-Familie und die Adhäsion-Familie des GRAFS-Systems, die Klasse C oder Familie 3 die Glutamat-Familie und die Klasse F oder die Familie 5 die „Frizzled/Smoothened“-Familie. Die Klassen D und E, bei denen es sich um Pheromonrezeptoren von Pilzen und cAMP-Rezeptoren von Schleimpilzen handelt, existieren bei Wirbeltieren nicht (Flower, 1999; Fredriksson et al., 2003; Fredriksson und Schiöth, 2005; Davies et al., 2007). Alle drei Klassifikationssysteme sind unzureichend, da nicht genügend GPCR-Sequenzen und strukturelle Daten von den verschiedensten Tiergruppenvertretern vorliegen. Neueste Analysen zeigen mindestens 16 GPCR-Familien im gesamten Organismenreich und sogar 10 beim Menschen (Munk et al., 2016). Von den 804 GPCR beim Menschen (Hu et al., 2017) vermitteln 406 GPCR sensorische Informationen aus der Umwelt (Mombaerts, 2004). Die restlichen 398 GPCR übertragen intraorganismische Informationen (Pandy-Szekeres et al., 2018). Bei 148 GPCR sind weder die endogenen Liganden noch ihre natürlichen Funktionen bekannt (Alexander et al., 2017). Diese werden als die sogenannten orphan⁵-GPCR bezeichnet (Tang et al., 2012; Doi et al., 2016). Mit 687 GPCR ist die Klasse A, die größte Familie der GPCR-Superfamilie. Davon sind zurzeit 43 GPCR mit 287 Strukturen zum Teil mit Liganden und mit G-Proteinen strukturell aufgelöst⁶, so dass inzwischen valide

⁵ vom Altgriechischem ὀρφανός (orphanos) mit der Bedeutung „ohne Eltern, vaterlos“

⁶ siehe URL-Adresse: <http://www.gpcrdb.org/structure/statistics>. Aufruf erfolgte am 05.06.2018.

Struktur-Funktionsbeziehungen und molekularen Konformationsänderungen während der Transduktion gefolgert werden können.

1.1.2 Struktureller Aufbau der GPCR anhand der Klasse A

Mit der Gewinnung der ersten hochauflösenden dreidimensionalen Kristallstrukturen des Bakterienrhodopsins⁷ aus der Zellmembran des Halobacterium salinarium (Pebay-Peyroula et al., 1997) und des Rinderrhodopsins⁸ aus den Stäbchen der Netzhaut des Hausrindes (Palczewski et al., 2000) konnten erstmals Einblicke in die dreidimensionale Struktur von GPCR gewonnen werden. Die GPCR teilen viele gemeinsame strukturelle Merkmale wie die sieben hochkonservierten α -helikalen TM, den extrazellulären N-Terminus, den intrazellulären C-Terminus, drei ECL und drei ICL. Von der extrazellulären Zellmembranoberfläche aus betrachtet, sind die sieben Transmembrandomänen gegen den Uhrzeigersinn kreisförmig in der Zellmembran angeordnet und über ICL und ECL miteinander verbunden. Auch bei vielen GPCR findet sich am intrazellulären C-Terminus eine weitere α -helikale Sekundärstruktur, die als Helix 8 bezeichnet wird und die sich längst zur intrazellulären Seite der Zellmembran anordnet (Latorraca et al., 2017). Der Aminosäuresequenz-Vergleich von allen GPCR aus der Klasse A weist folgende hochkonservierte Aminosäuren auf: N^{1.50} (98%), D^{2.50} (90%), R^{3.50} (95%), W^{4.50} (97%), P^{5.50} (78%), P^{6.50} (99%) und P^{7.50} (88%) (Ballesteros und Weinstein, 1995; Kooistra et al., 2013; Isberg et al., 2015). Dabei gibt der jeweilige Prozentwert die Häufigkeit an mit der die Aminosäure in der Klasse A auftritt. Diese Aminosäuren sind für den Rezeptor strukturell wichtig und beeinflussen maßgeblich die Rezeptorfunktion.

1.1.3 Perzeption von GPCR anhand der Klasse A

Mit Hilfe von systematischen Aminosäureaustauschen und von Kristallstrukturanalysen mit Liganden-gebundenen GPCR konnte die Ligandenbindetasche von Klasse A GPCR genau charakterisiert werden. Die GPCR aus der Klasse A besitzen eine kleine und eine große Ligandenbindetasche, die von der extrazellulären Oberfläche des Rezeptors aus betrachtet, sackartige Einstülpungen innerhalb der Transmembrandomänen sind, wobei die kleine Ligandenbindetasche aus den TM1, TM2, TM3 und der TM7 und die große Ligandenbindetasche aus den TM3, TM4, TM5 und der TM6 geformt werden (Surgand et al., 2006; Kooistra et al., 2013). Folgende 13 Aminosäurepositionen sind an der Ligandenbindung beteiligt: (A/M/L/T/Y)^{1.39}, (G/F/N/S/V/Y)^{2.61}, D^{3.32}, (C/S/V)^{3.36}, (L/T/V/W)^{4.56}, (A/G/K/L/V/T)^{5.39}, (A/D/G/S/T)^{5.42/5.43}, (A/E/N/S/T)^{5.46}, (F/Y)^{6.51}, (F/N/S)^{6.52}, (F/H/M/N/T)^{6.55} und (F/I/L/N/T/Y)^{7.39} (Kooistra et al., 2013). Die Liganden können entweder in die kleine oder in die große Ligandenbindetasche binden. Einige Liganden binden in beide Ligandenbindetaschen und können zudem an die ECL2 binden. Sowohl

⁷ PDB ID: 1AP9: 2,5 Å aufgelöste Struktur des Bakterienrhodopsins

⁸ PDB ID: 1F88: 2,8 Å aufgelöste Struktur des Rinderrhodopsins

⁹ Die Aminosäuren sind im Einbuchstabencode dargestellt und nach Juan A. Ballesteros und Harel Weinstein durchnummeriert und hochgestellt, wobei die erste Zahl die Transmembrandomäne (1 bis 7) und die zweite Zahl die relative Position zur höchsten konservierten Aminosäure mit der Zahl 50 angibt (Ballesteros und Weinstein, 1995)

der N-Terminus als auch die ECL2 beeinflussen den Zugang des Liganden in die Ligandenbindetaschen und bestimmen somit die Selektivität und die Affinität des Rezeptors zum Liganden (Venkatakrisnan et al., 2013). Die Ligandenbindetaschen der Klasse A GPCR kann ein unterschiedliches Ausmaß an Größe und Tiefe im Rezeptor besitzen. Die aufgelösten Strukturen der Liganden-gebundenen GPCR zeigen eine maximale Tiefe der großen Ligandenbindetasche von ca. 14 Å in den Rezeptorkern, das ein Drittel der Zellmembrandicke entspricht (Venkatakrisnan et al., 2013). Die Kristallstrukturen zeigen zudem, dass der Histamin H₁-Rezeptor mit Doxepin¹⁰ die am tiefsten gelegene Ligandenbindetasche besitzt, die 5 Å tiefer ist als im Rinderrhodopsin¹¹ und im β₁-Adrenozeptor (β₁AR)¹² (Unal und Karnik, 2012). Dagegen weist der Adenosin A_{2A}-Rezeptor mit Koffein die geringste Penetration des Liganden in den Rezeptorkern auf und besitzt somit eine sehr flache – ca. 7 Å tiefe, an der extrazellulären Rezeptoroberfläche befindliche Ligandenbindetasche. Die GPCR mit Peptiden als Liganden, z. B. die κ- und μ-Opiodrezeptoren und der CXCR4-Chemokinrezeptor, besitzen voluminösere aber nicht so tiefe – ca. 7 - 10 Å tiefe, Ligandenbindetaschen (Venkatakrisnan et al., 2013) als GPCR mit kleinen niedermolekularen Liganden, da Peptide als endogene Liganden häufig deutlich größer und polarer sind als endogene niedermolekulare Liganden (Zhang et al., 2015a).

91% der bekannten Liganden sind zur Klasse A der GPCR zuzuordnen (Pandy-Szekeres et al., 2018). Des Weiteren liegen zurzeit 286 Strukturen von Rezeptor-Ligand-Komplexen¹³ vor, bei denen der Ligand entweder ein voller Agonist, Superagonist, dualer Agonist, partieller Agonist, inverser Agonist, allosterischer Agonist, neutraler Antagonist, dualer Antagonist oder allosterischer Modulator war¹⁴ (Gacasan et al., 2017). Volle Agonisten binden in der jeweiligen orthosterischen Ligandenbindetasche im Rezeptorkern und bewirken eine Konformationsänderung, die als aktive Rezeptorkonformation bezeichnet wird und eine maximale Rezeptoraktivität auslösen kann. Superagonisten lösen eine stärkere, supramaximale Rezeptoraktivität als die maximale Rezeptoraktivierung des endogenen Agonisten aus (Schrage et al., 2016). Duale Agonisten sind gezielt chimärisierte uni-molekulare Liganden, die orthosterisch zwei unterschiedliche GPCR binden können und somit zwei verschiedene Rezeptoraktivierungen auslösen. Partielle Agonisten binden in der Regel in den orthosterischen Ligandenbindetaschen, verursachen jedoch auch bei sehr hohen, gesättigten Konzentrationen nur eine submaximale Rezeptoraktivität (Nygaard et al., 2013), so dass weitere unterscheidbare aktive Rezeptorkonformationen vorliegen (Hoffmann et al., 2008). Inverse Agonisten dagegen verschieben das Gleichgewicht der Rezeptorzustände von den basal aktiven oder aktivierten Rezeptorkonformationen zu den inaktiven Konformationen, so dass sogar die Basalaktivität eines Rezeptors

¹⁰ Trizyklisches Antidepressivum. Siehe URL-Adresse: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/3158#section=Top>. Aufruf erfolgte am 01.08.2018.

¹¹ PDB ID: 1U19: 2,2 Å aufgelöste Struktur des Rinderrhodopsins

¹² PDB ID: 2VT4: 2,7 Å aufgelöste Struktur des β₁AR

¹³ Siehe URL-Adresse: <http://www.gpcrdb.org/structure/statistics> Aufruf erfolgte am 19.06.2018.

¹⁴ Für exakte Definitionen von Rezeptorliganden siehe auch: (Kenakin, 2017)

unterdrückt werden kann. Im Gegensatz dazu können eine heterologe Expression von G-Proteinen und bestimmte Aminosäureaustausche im Rezeptor die Basalaktivität eines Rezeptors erhöhen (Parnot et al., 2002; Mocking et al., 2016). Allosterische Agonisten binden dagegen außerhalb der orthosterischen Ligandenbindetasche und können in Abwesenheit des orthosterischen Agonisten bzw. inversen Agonisten eine Rezeptoraktivierung bzw. Rezeptorinaktivierung hervorrufen (Christopoulos et al., 2014). Durch das Besetzen der orthosterischen Ligandenbindetaschen im Rezeptorkern verhindern neutrale Antagonisten die Bindung von Agonisten oder inversen Agonisten ohne direkt den Rezeptorzustand zu beeinflussen, d. h. das vorherrschende Gleichgewicht zwischen den verschiedenen Konformationszuständen wird nicht beeinträchtigt. Somit wirkt ein neutraler Antagonist nur über die Verdrängung von Agonisten bzw. inversen Agonisten und über Verhinderung der Agonistenbindung bzw. der inversen Agonistenbindung. Somit können neutrale Antagonisten zum Beispiel eine agonistenabhängige Rezeptoraktivierung verhindern (Prather, 2004). Duale Antagonisten sind nicht-selektive Antagonisten, die zwei engverwandte GPCR antagonistisch beeinflussen.

Allosterische Modulatoren binden außerhalb der orthosterischen Ligandenbindetasche und verändern das Rezeptorzustandsgleichgewicht indem die Bindungsaffinität von Agonisten bzw. inversen Agonisten in die orthosterische Ligandenbindestelle beeinflusst wird. Positive allosterische Modulatoren fördern die Bindung von Agonisten, die einen aktiven Rezeptorzustand stabilisieren und eine G-Protein-Aktivierung verstärken. Unter den positiv allosterischen Modulatoren gibt es auch die sogenannten „ago-allosterischen Modulatoren“, die sowohl die Affinität der Ligandenbindung erhöhen (positive allosterische Modulation) als auch als partielle allosterische Rezeptoragonisten fungieren (allosterischer Agonismus) (Langmead und Christopoulos, 2014; Wold et al., 2018). Negative allosterische Modulatoren erschweren die Bindung von Agonisten und schwächen die G-Protein-Aktivierung ab. Im Gegensatz dazu verhindern neutrale allosterische Modulatoren die Bindung von positiven und negativen allosterischen Modulatoren in die allosterische Bindetasche (Wold et al., 2018) und können sogar obwohl sie keinen Einfluss auf die Ligandenaffinität des Rezeptors besitzen, die Kinetik der Ligandenbindung in die orthosterische Ligandenbindetasche verändern (Christopoulos et al., 2014; Langmead und Christopoulos, 2014) und die Anbindung von positiven und negativen allosterischen Modulatoren in die allosterische Bindetasche verhindern (Wold et al., 2018).

1.1.4 Transduktion bei GPCR anhand der Klasse A

Die Transduktion konnte erstmals am Rinderrhodopsin¹⁵ nachvollzogen werden. Das Rhodopsin besteht aus dem Transmembranprotein Opsin (40 kDa), das an der Aminosäure K296 in der TM7 kovalent an das Enantiomer 11-*cis*-Retinal gebunden ist. Die Absorption eines Photons bei einer Wellenlänge $\lambda = 500$ nm am 11-*cis*-Retinal

¹⁵ vom Altgriechischen ῥόδον (rhódon) mit der Bedeutung „die Rose“, wegen der rosa Farbe und vom Altgriechischen ὄψις (ópsis) mit der Bedeutung "die Sicht, das Sehen"

verursacht eine Isomerisierung zu dem Enantiomer *all-trans*-Retinal und zur Konformationsänderung des Opsins, das zum Sehen beiträgt (Palczewski et al., 2000). Das hochkonservierte D/E-RY-Trimotiv des Opsins mit E134^{3.49}, R135^{3.50} und Y136^{3.51} in der TM3 von Klasse A GPCR interagiert mit der TM6 und führt zur einer Arretierung der beiden transmembranären Domänen, die den inaktiven Rezeptorzustand stabilisieren, der auch als sogenannter „ionic lock“-Rezeptorzustand bezeichnet wird (Rovati et al., 2007). Beim „ionic lock“ entstehen zwei Ionenbindungen durch die positiv geladene Guanidingruppe des R135^{3.50} in der TM3: einmal zur benachbarten, negativ geladenen Carboxylatgruppe des E134^{3.49} in der TM3 (intrahelikale Ionenbindung) und einmal zur negativ geladenen Carboxylatgruppe E247^{6.30} in der TM6 (interhelikale Ionenbindung) (Palczewski et al., 2000; Rovati et al., 2017). Eine weitere Arretierung des inaktiven Rezeptorzustandes wird über eine Ionenbindung, der sogenannten „3-7 lock“ zwischen der protonierten Schiffischen Base des K296^{7.43} der TM7 und der negativ geladenen Carboxylatgruppe des E113^{3.28} der TM3 erreicht (Kim et al., 2004). Zusätzlich dienen fünf interhelikale Wasserstoffbrückenbindungen der Arretierung des inaktiven Rezeptorzustandes. Im Einzelnen befinden sie sich zwischen N55^{1.50} der TM1 und D83^{2.50} des NLXXX¹⁶D-Motivs in der TM2, zwischen N55^{1.50} der TM1 und A299^{7.46} der TM7, zwischen D83^{2.50} der TM2 und W265^{6.48} des CW^{6.48}XP-Motivs in der TM6, zwischen N73^{2.40} der TM2 und Y306^{7.53} des NPXXY-Motivs in der TM7, sowie zwischen M257^{6.40} der TM6 und N302^{7.49} der TM7 (Palczewski et al., 2000; Okada et al., 2002; Li et al., 2004; Pardo et al., 2007). Die obengenannten Bindungen des inaktivierten Rezeptorzustandes verhindern eine G-Protein-Kopplung. Bei der Transduktion vom inaktiven Rezeptorzustand zum aktiven Rezeptorzustand werden durch die sogenannten „molecular switches“ bzw. „microswitches“ die drei ionischen und die fünf interhelikalen Wasserstoffbrückenbindungen aufgelöst (Deupi und Kobilka, 2007; Trzaskowski et al., 2012). Hierbei unterscheidet man im Einzelnen den „ionic lock switch“ (Palczewski et al., 2000), der die obengenannte intrahelikale TM3-TM3- und interhelikale TM3-TM6-Ionenbindung auflöst. Desweiteren wird mit dem „3-7 lock switch“ (Kim et al., 2004) die dritte Ionenbindung zwischen TM3 und TM7 aufgelöst und schließlich löst der „rotamer toggle switch“ (Lin und Sakmar, 1996; Klein-Seetharaman et al., 2004) die drei interhelikalen Wasserstoffbrückenbindungen mit der TM7 auf. Zusätzlich entsteht bei der Transduktion vom inaktiven Rezeptorzustand zum aktiven Rezeptorzustand eine neue Wasserstoffbrückenbindung zwischen N302^{7.49} des NPXXY-Motivs in der TM7 und D83^{2.50} des NLXXXD-Motivs in der TM2 (Urizar et al., 2005). Außerdem richten sich bei dieser Transduktion das Indolringsystem des W265^{6.48} im CW^{6.48}XP-Motiv in der TM6 zum P215^{5.50} der TM5 und die aromatische Phenylgruppe des F261^{6.44} der TM6 zum L216^{5.51} der TM5 aus. Diese beiden Umlagerungen in der TM6 ermöglichen eine Krümmung der TM6 an dem hoch konservierten P267^{6.50}, was zu einer radialen Auswärtsbewegung der TM6 im intrazellulären Membranbereich führt, so dass sich der Abstand im intrazellulären Membranbereich zwischen TM3 und TM6 vergrößert. (Deupi

¹⁶ X steht für eine beliebige Aminosäure

und Standfuss, 2011; Standfuss et al., 2011). Durch diese Auswärtsbewegung der TM6 wird ein Raum für die Kopplung des G-Proteins im intrazellulären Membranbereich geschaffen (Bakker et al., 2008). Ein vereinfachtes Schema zur Transduktion vom inaktiven zum aktiven Rezeptorzustand findet sich in Abbildung 1.1.

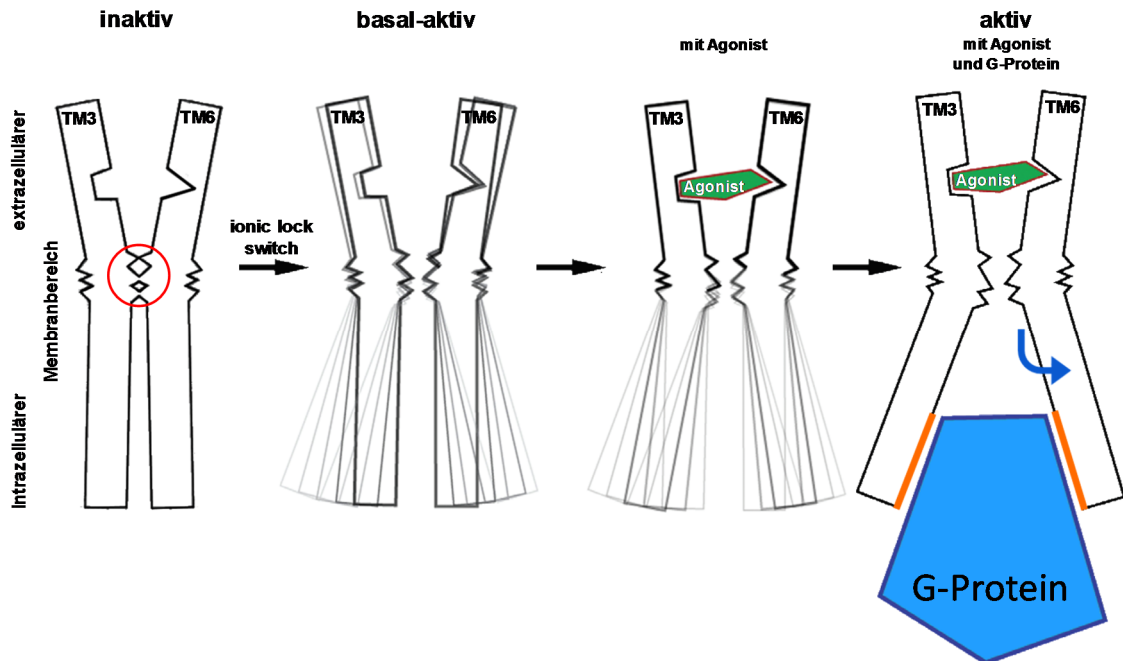


Abbildung 1.1: Transduktion vom inaktiven zum aktiven Rezeptorzustand Die verschiedenen Rezeptorzustände des schematisierten GPCR werden im Wesentlichen auf verschiedene Konformationen von TM3 und TM6 bestimmt. Bei Abwesenheit des Agonisten liegt der GPCR in einem inaktiven Rezeptorzustand (inaktiv) vor, der durch einen inversen Agonisten stabilisiert werden kann (hier nicht dargestellt). Dieser inaktive Rezeptorzustand weist die zwei Ionenbindungen (roter Kreis) auf und wird als sogenannter „ionic lock“-Rezeptorzustand bezeichnet. Durch die Auflösung der „ionic lock“-Bindungen („ionic lock switch“) kommt es zu einem Rezeptorzustand bei dem sich die TM3 und TM6 im intrazellulären Membranbereich dynamisch bewegen können. Dieser Rezeptorzustand kann auch als basal aktiver Rezeptorzustand bezeichnet werden, da genau genommen, das G-Protein thermodynamisch begründet, koppeln kann. Bei der Bindung des Agonisten werden die TM3 und TM6 im intrazellulären Membranbereich noch dynamischer bewegt. Somit gibt es genau genommen verschiedene energetisch günstige Rezeptorkonformationen im Agonist gebundenen Rezeptorzustand (mit Agonist). Im aktiven Rezeptorzustand (aktiv mit Agonist und G-Protein) kommt es zu einer Auswärtsbewegung der TM6 im intrazellulären Membranbereich (blauer Pfeil), so dass das G-Protein an den Interaktionsoberflächen des Rezeptors (orange) koppelt. Somit kommt es zu einem stabilen aktiven Rezeptorzustand (Rasmussen et al., 2011b). Stark modifizierte Abbildung aus der Vorlage von Nygaard et al. (2013) *Cell* **152**:532-542

Die genauen molekularen Konformationsänderungen der Transduktion konnten durch den Vergleich zweier hochaufgelöster Kristallstrukturen bestimmt werden (Rasmussen et al., 2011b). Hierzu wurde der β_2 AR einerseits mit dem inversen Agonisten Carazolol für die Darstellung des inaktiven Rezeptorzustands (Cherezov et al., 2007; Rasmussen et al., 2007; Rosenbaum et al., 2007) und andererseits mit dem hochaffinen Agonisten BI-167107 zusammen mit dem zugehörigen G_s -Protein¹⁷ (Rasmussen et al., 2011b) bzw.

¹⁷ PDB ID:3SN6: 3,2 Å aufgelöste Struktur des T4L- β_2 AR- G_s -Nb35-Komplexes

mit einem G-Protein imitierenden Nanoantikörper¹⁸ (Rasmussen et al., 2011a) für die Darstellung des aktiven Rezeptorzustands kristallisiert. Der Vergleich des inaktiven und aktiven Rezeptorzustands des β_2 AR wird in Abbildung 1.2 veranschaulicht.

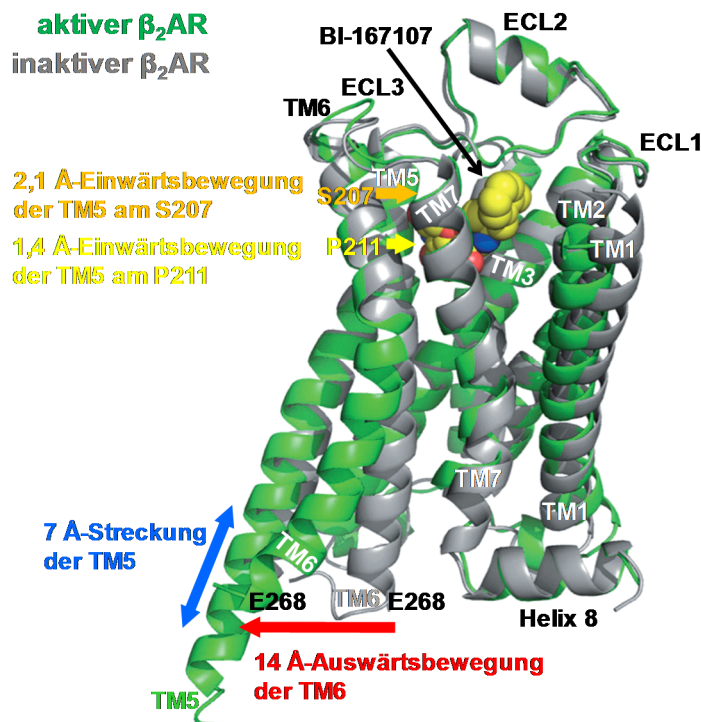


Abbildung 1.2: Vergleich des inaktiven Rezeptorzustands mit dem aktiven Rezeptorzustand des β_2 AR Der inaktive Rezeptorzustand ist in grau und der aktive Rezeptorzustand ist in grün dargestellt. Für den inaktiven Rezeptorzustand mit dem inversen Agonisten Carazolol (nicht dargestellt) wurde die dritte ICL des β_2 AR durch ein T4-Lysozym¹⁹ (Cherezov et al., 2007; Rosenbaum et al., 2007) oder ein Fab5-Fragment²⁰ (Day et al., 2007; Rasmussen et al., 2007) ersetzt. Für den aktiven Rezeptorzustand wurde der β_2 AR mit dem hochaffinen Agonisten BI167107 (gelbe Kalotten) und mit dem zugehörigen G_s -Protein (nicht dargestellt) stabilisiert (Rasmussen

et al., 2011b). Die größten Unterschiede zwischen dem inaktiven und aktiven Rezeptorzustand treten bei der TM5 und TM6 auf. Die TM5 bewegt sich erstens im extrazellulären Membranbereich an der Aminosäureposition S207 2,1 Å in die Ligandenbindetasche hinein (orangefarbener Pfeil), zweitens im extrazellulären Membranbereich an der Aminosäureposition P211 1,4 Å in den Rezeptorkern hinein und drittens streckt sie sich im intrazellulären Membranbereich um zwei helikale Windungen (ca. 7 Å) (blauer Pfeil). Die TM6 bewegt sich im intrazellulären Membranbereich um 14 Å radial auswärts (roter Pfeil) gemessen an dem α -Kohlenstoffatom²¹ des E268^{6,30}. (Rasmussen et al., 2011b). Stark modifizierte Abbildung aus der Vorlage von Kobilka (2013) *Angew Chem Int Ed* **52**:2-11

Aus dem Vergleich beider Rezeptorzustände wird die Abfolge folgender molekularer Konformationsänderungen angenommen (siehe Abbildung 1.3), die letztendlich in die radiale 14 Å-Auswärtsbewegung der TM6 im intrazellulären Membranbereich mündet und somit für die G-Protein-Kopplung einen größeren Raum entstehen lässt. Die Kopplung des G_s -Proteins bzw. eines Nanoantikörpers stabilisiert einen energetisch günstigen aktiven Rezeptorzustand.

¹⁸ Nanoantikörper werden mit Nb vom Englischen Nanobody abgekürzt (siehe Abbildung 1.3). (Yao et al., 2009; Nygaard et al., 2013). Die Nanoantikörper sind rekombinante, antigenspezifische Domänen von Schwere-Ketten-Antikörpern aus der Familie der Kameliden (Hassanzadeh-Ghassabeh et al., 2013; Muyldermans, 2013). PDB ID: 3P0G: 3,5 Å aufgelöste Struktur des β_2 AR-T4L-Nb80-Komplexes

¹⁹ PDB ID: 2RH1: 2,4 Å aufgelöste Struktur des β_2 AR-T4L-Komplexes

²⁰ PDB ID: 2R4R: 3,4 Å aufgelöste Struktur des β_2 AR-Fab5-Komplexes

²¹ Am α -Kohlenstoffatom befinden sich die Amino-, die Carboxy- und die funktionelle Seitengruppe der jeweiligen Aminosäure. Es bildet das Rückgrat der Aminosäurekette.

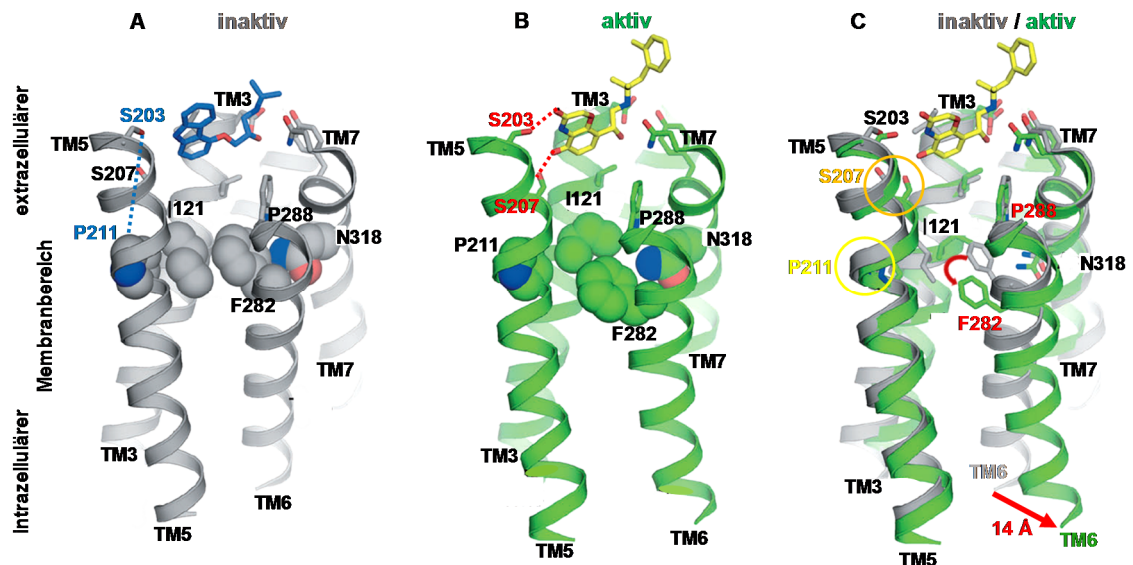


Abbildung 1.3: Molekulare Konformationsänderungen – „microswitches“ – bei der Transduktion zum aktiven Rezeptorzustand des β_2 AR Darstellung des inaktiven (A, grau) und aktiven (B, grün) Rezeptorzustands des β_2 AR mit Carazolol (A, blaues Stäbchenmodell), BI-167107 (B, C, gelbes Stäbchenmodell). (C) stellt die Überlagerung beider Zustände dar. In der Ligandenbindetasche des aktiven β_2 AR sind die molekularen Konformationsänderungen relativ klein. Es wird eine 2,1 Å-Einwärtsbewegung der TM5 an der Aminosäureposition S207^{5,46} beobachtet (orangener Kreis in C), gemessen am α -Kohlenstoffatom von S207^{5,46}, die durch zwei polare Hydroxy-Hydroxy-Wechselwirkungen (gestrichelte rote Linien in B) zwischen dem hochaffinen Agonisten BI-167107 mit den beiden Aminosäuren S203^{5,42} und S207^{5,46} in der TM5 verursacht wird. Durch diese beiden polaren Bindungen wird eine intrahelikale Wasserstoffbrückenbindung zwischen S203^{5,42} und P211^{5,50} in der TM5, die im inaktiven Rezeptorzustand vorliegt (blaue gestrichelte Linie in A), aufgelöst. Dies wiederum bewirkt eine 1,4 Å-Einwärtsbewegung der TM5 (gelber Kreis in C) an der hochkonservierten Aminosäure P211^{5,50} (vergleiche graue Kalotten mit blauen Stickstoffatom in A mit entsprechenden grünen Kalotten in B). Durch diese 1,4 Å-Einwärtsbewegung der TM5 lagern sich die folgenden drei hochkonservierten Aminosäuren I121^{3,40} (reine graue Kalotten in A und reine grüne Kalotten in B) der TM3, F282^{6,44} (graues und grünes Stäbchenmodell in C) der TM6 und N318^{7,45} (vergleiche graue Kalotten mit rotem Sauerstoffatom und blauem Stickstoffatom in A mit entsprechenden grünen Kalotten in B) der TM7 um. Die Umlagerung der funktionellen Gruppe der Aminosäure F282^{6,44} (C, roter Pfeil an der aromatischen Phenylgruppe) der TM6 erlaubt eine Krümmung der TM6 an der Aminosäure P288^{6,50}, so dass eine radiale 14 Å-Auswärtsbewegung der TM6 im intrazellulären Membranbereich (roter Pfeil) stattfindet. Mit der Aufklärung der Transduktion des G_s -Protein koppelnden β_2 AR konnte die zuvor beschriebene Transduktion des G_i -Protein koppelnden Opsins (Scheerer et al., 2008) bestätigt werden, so dass zurzeit eine für GPCR generalisiertes Transduktionsschema vermutet wird. Stark modifizierte Abbildung aus der Vorlage von Kobilka (2013) *Angew Chem Int Ed* 52:2-11

Ein Vergleich der mit dem Nanoantikörper und mit dem G_s -Protein kokristallisierten aktiven Rezeptorzustände (siehe Abbildung 1.4, oben) zeigt, dass die TM-Helices mit dem trimerischen G-Protein gestreckter und im intrazellulären Membranbereich voneinander entfernter sind als die TM-Helices mit dem kokristallisierten Nanoantikörper (Rasmussen et al., 2011b). Insgesamt wird im intrazellulären Membranbereich ein größerer Raum für die Kopplung des G-Proteins geschaffen, das nicht mit dem kokristallisierten G-Protein imitierenden Nanoantikörper beobachtet werden konnte. Bei dieser beobachteten G_s -Protein-Kopplung ergibt sich eine Interaktionsoberfläche von ca. 1300 Å² mit neun polaren und fünf hydrophoben intermolekularen Bindungen (siehe

Abbildung 1.4, unten). Die Interaktionsoberfläche ist nur zwischen dem β_2 AR und der G_{sa} -Proteinuntereinheit. Damit gibt es keine Interaktionsoberfläche zu den $G_{s\beta}$ - und G_{sy} -Proteinuntereinheiten (Rasmussen et al., 2011b). Dennoch muss diese Kopplung nicht der Realität entsprechen, da bei der Kristallisierung Lipide, Wassermoleküle und Ionen fehlen, die einen starken Einfluss auf die exakte räumliche Anordnung der funktionellen Gruppen der Aminosäuren haben. Möglicherweise bildet der Aromat von F139 im ICL2 des β_2 AR aufgrund der räumlichen Nähe zum Aromaten des F376 der $\alpha 5$ -Helix der G_{sa} -Proteinuntereinheit eine intermolekulare π - π -Stapelbindung aus, die die Kopplung entscheidend begünstigt.

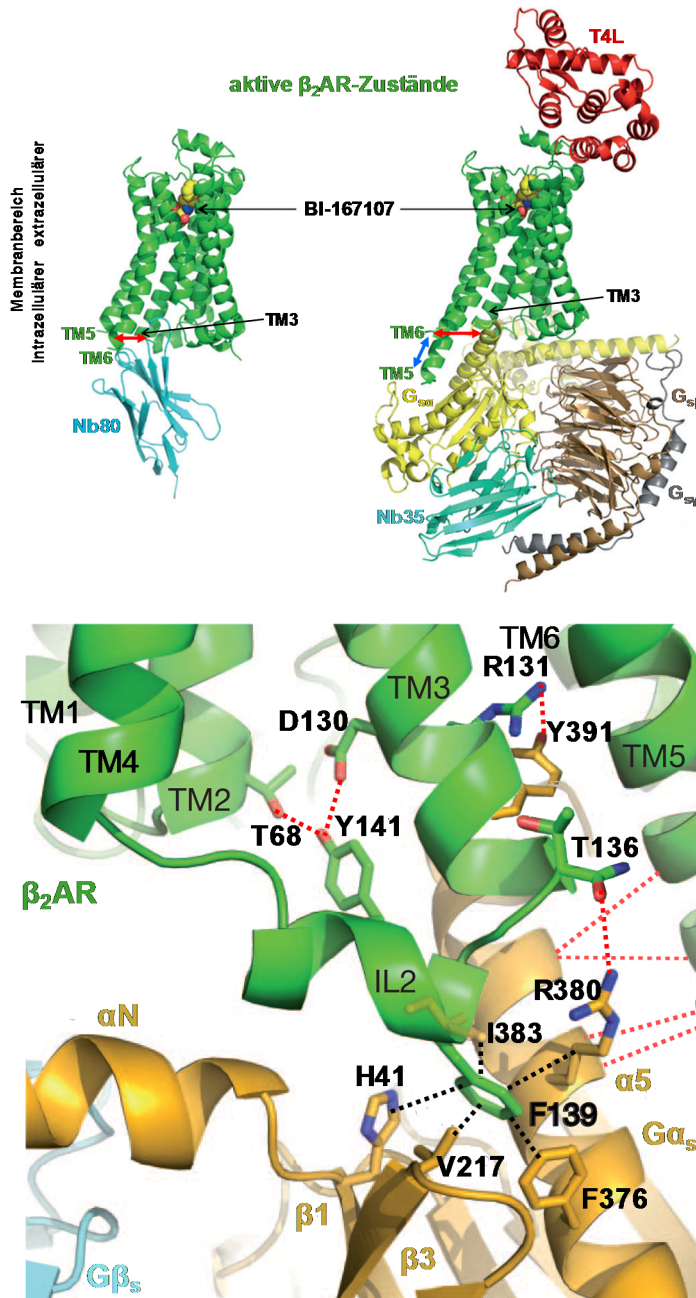


Abbildung 1.4: Molekulare Konformationsänderungen des β_2 AR durch die Kopplung eines G_s -Proteins

Beide β_2 AR-Kristallstrukturen (oben, grün) sind mit dem hochaffinen Agonisten BI-167107 (gelbe und blaue Kalotten) gewonnen und stellen somit jeweils einen aktiven Rezeptorzustand dar. Ein Vergleich mit einem Nanoantikörper (Nb80, türkis, oben links), der ein G-Protein simuliert, und einem trimerischen G_s -Protein (oben rechts) aus einer G_{sa} - (gelb), einer $G_{s\beta}$ - (braun) und einer $G_{s\gamma}$ -Untereinheit (grau) ergibt einen deutlichen Unterschied in der Rezeptorkonformation (grün). Die TM6-Helix (grün, oben links) mit dem kokristallisierten Nanoantikörper zeigt eine 11,4 Å-Auswärtsbewegung (roter Pfeil, links), wohingegen die TM6-Helix (grün, rechts) mit dem kokristallisierten G_s -Protein eine 14,0 Å-Auswärtsbewegung (roter Pfeil, oben rechts) im intrazellulären Membranbereich aufweist. Die 7 Å-Streckung der TM5 um zwei helikale Windungen im intrazellulären Membranbereich (blauer Pfeil, oben rechts) ist nur mit dem kokristallisierten trimerischen G_s -Protein (grün, oben rechts) zu beobachten. Ein an das G_s -Protein gebundener Nanoantikörper (Nb35, türkis, oben rechts) und ein an das

NH₂-Terminus des β_2 AR fusioniertes T4-Lysozym (T4L, rot, oben rechts) erleichtern die Kristallisation des β_2 AR, ohne die aktive Rezeptorkonformation groß zu beeinflussen. Durch die Kopplung des G_s -Proteins im intrazellulären Membranbereich des β_2 AR wird der „ionic lock“ Rezeptorzustand des β_2 AR aufgelöst, indem neun neue polare Bindungen (rot gestrichelte Linien, unten) ausgebildet werden. Erstens zwischen D130^{3,49} des D/E-RY-Motivs in der TM3 und Y141 in der ICL2, zweitens zwischen T68^{2,37} der TM2 und Y141 in der

ICL2, drittens zwischen R131^{3.50} des D/E-RY-Motivs in der TM3 und Y326^{7.49} des NPXXY-Motivs in der TM7 (nicht dargestellt), viertens zwischen R131^{3.50} des D/E-RY-Motivs in der TM3 mit Y391 der α 5-Helix der $G_{s\alpha}$ -Proteinuntereinheit, fünftens zwischen T136^{3.55} der TM3 und R380 der α 5-Helix der $G_{s\alpha}$ -Proteinuntereinheit, sechstens zwischen E225^{5.64} der TM5 und Q384 der α 5-Helix der $G_{s\alpha}$ -Proteinuntereinheit (unten), siebtens zwischen Q229^{5.68} der TM5 und Q384 der α 5-Helix der $G_{s\alpha}$ -Proteinuntereinheit (unten) und zwei zwischen K232^{5.71} der TM5 und D381 der α 5-Helix der $G_{s\alpha}$ -Proteinuntereinheit (unten). Die beiden polaren TM2-ICL2- und TM3-ICL2-Bindungen verursachen eine Umlagerung des F139 im ICL2 und folglich kann F139 hydrophobe Wechselwirkungen (schwarz gestrichelte Linien, unten) mit folgenden Aminosäuren H41, V217, F376, I383 und R380 der $G_{s\alpha}$ -Untereinheit eingehen. Somit werden Interaktionsoberflächen zwischen dem G_s -Protein und dem β_2 AR ausgebildet (Rasmussen et al., 2011b). Modifizierte Abbildungen aus den Vorlagen von Kobilka (2013) *Angew Chem Int Ed* **52**:2-11 und Rasmussen et al. (2011b) *Nature* **477**:549-555

1.1.5 Effektoreinheit von Klasse A GPCR

Die Struktur des β_2 AR mit dem koppelnden G_s -Protein zeigt, dass das G_s -Protein deutlich größer als der gekoppelte β_2 AR ist (siehe Abbildung 1.4). Das G_s -Protein besitzt einen Durchmesser von ca. 93 Å, während der Durchmesser des β_2 AR nur ca. 20 Å beträgt (Westfield et al., 2011). Die $G_{s\alpha}$ -Proteinuntereinheit setzt sich aus einer GDP²²/GTP²³-bindenden und einer α -helikalen Domäne mit 6 Helices zusammen, wobei nur die GDP/GTP-bindende Domäne der $G_{s\alpha}$ -Proteinuntereinheit die Interaktionsoberfläche zum β_2 AR ausbildet. In dieser GDP/GTP-bindenden Domäne findet der Austausch der beiden Guanin-Nukleotide GDP und GTP statt, der an der Grenzfläche zur α -helikalen Domäne liegt. Aus dem Vergleich zwischen einem aktiven GTP-gebundenen G_s -Protein (Tesmer et al., 1997) und einem inaktiven GDP-gebundenem G_i -Protein²⁴ (Wall et al., 1995) wurde schon in den 90er Jahren vermutet, dass zum einen die α -helikale Domäne eine immense Drehbewegung und zum anderen die α 5-Helix der GDP/GTP-bindenden Domäne eine lineare Bewegung durchführt. Die exakte Drehbewegung von 127° in Richtung des Rezeptors und die lineare Bewegung der α 5-Helix der GDP/GTP-bindenden Domäne um ca. 6 Å in den Rezeptorkern des β_2 AR hinein (siehe Abbildung 1.5), konnte an der Kokristallisierung von β_2 AR und dem zugehörigen G_s -Protein im aktiven Zustand bestimmt werden (Rasmussen et al., 2011b; Westfield et al., 2011; Kruse et al., 2013). Diese lineare Bewegung stabilisiert den aktiven G_s -Protein gekoppelten Rezeptorzustand.

²² Die Abkürzung GDP steht für Guanosin-5-diphosphat

²³ Die Abkürzung GTP steht für Guanosin-5-triphosphat

²⁴ PDB ID:1AZT: 1GP2: 2,3 Å aufgelöste Struktur der aktiven $G_{s\alpha}$ -Proteinuntereinheit, die mit Guanosin 5-O-[gamma-thio]-triphosphat (GTP γ S), eine nicht hydrolysierbare Form des GTP, sowie mit der katalytischen Domäne der Adenylzyklase kokristallisiert vorliegt

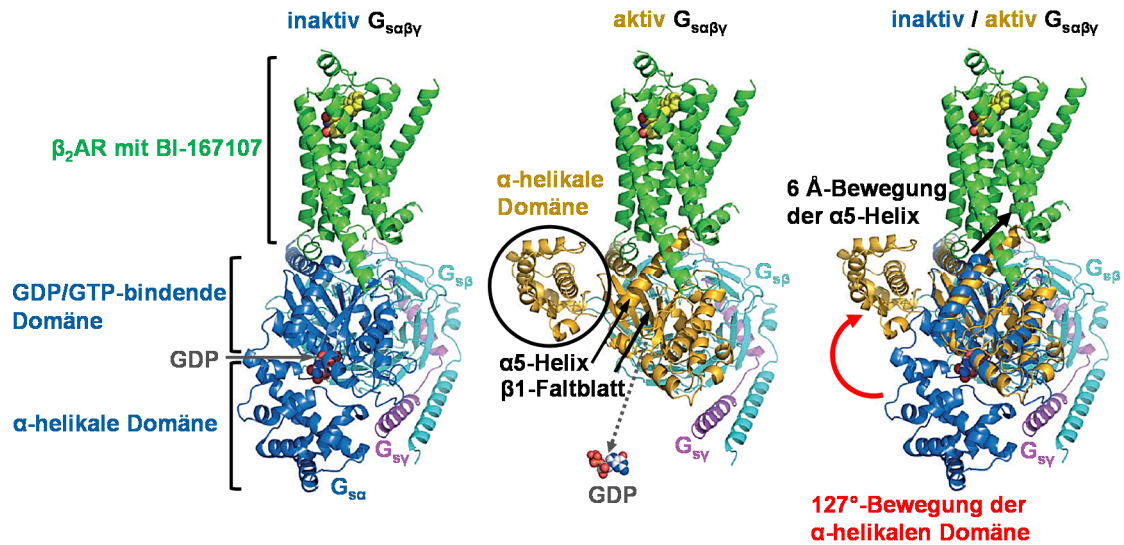


Abbildung 1.5: Vergleich der inaktiven und aktiven G_s -Proteine Inaktives GDP-gebundenes G_s -Protein (inaktiv $G_{s\alpha\beta\gamma}$, links), aktives, GDP-freies G_s -Protein (aktiv $G_{s\alpha\beta\gamma}$, Mitte) und Überlagerung (inaktiv/aktiv $G_{s\alpha\beta\gamma}$, rechts) mit dem β_2 AR (links, Mitte, rechts in grün) sind dargestellt. Das inaktive, GDP gebundene G_s -Proteins (links) leitet sich von der Kristallstruktur des heterotrimeren inaktiven GDP gebundenen G_i -Proteins (Wall et al., 1995) ab und ist *in silico* an den β_2 AR gebunden worden. Die $G_{s\alpha}$ -Proteinuntereinheit besteht aus einer GDP/GTP-bindenden Domäne und einer α -helikalen Domäne aus sechs α -Helices (blau, links). Die Bindestelle für die Guanin-Nukleotide befindet sich zwischen diesen beiden Domänen der $G_{s\alpha}$ -Proteinuntereinheit. Bei der Kopplung des G_s -Proteins an den β_2 AR durchläuft die $G_{s\alpha}$ -Proteinuntereinheit große strukturelle Veränderungen, wobei die α -helikale Domäne (schwarzer Kreis, Mitte) bei der Dissoziation von GDP (grau gestrichelter Pfeil, Mitte), um 127° verschoben wird (roter Pfeil, rechts). Die $\alpha 5$ -Helix der GDP/GTP-bindenden Domäne wird um ca. 6 Å in den Rezeptorkern des β_2 AR verschoben (schwarzer Pfeil, rechts), wodurch der aktive Rezeptorzustand stabilisiert wird. Das $\beta 1$ -Faltblatt der $G_{s\alpha}$ -Proteinuntereinheit mit H41 (schwarzer Pfeil, Mitte) bildet eine hydrophobe Bindung mit F139 der ICL2 des β_2 AR aus und stabilisiert zusätzlich die G-Protein-Kopplung (Rasmussen et al., 2011b). Modifizierte Abbildung aus der Vorlage: Kobilka (2013) *Angew Chem Int Ed* **52**:2-11

Interessanterweise gibt es einen allosterischen Effekt auf die Perzeption durch die Kopplung von G-Proteinen an den Rezeptor. Bei der G-Protein-Kopplung kommt es zu einer für den Liganden „geschlossenen“ Rezeptorkonformation mit der Ausbildung eines sogenannten Deckels über der orthosterischen Ligandenbindetasche (siehe Abbildung 1.6), so dass der Ausgang für den Liganden aus der orthosterischen Ligandenbindetasche im extrazellulären Membranbereich verhindert ist. Somit wird die Ligandenaffinität erhöht. Zudem erschwert diese geschlossene Rezeptorkonformation ein weiteres Binden von Liganden, die extrazellulär, außerhalb der Ligandenbindetasche, vorliegen (DeVree et al., 2016). Diese „geschlossene“ Rezeptorkonformation konnte mittels der kokristallisierten G-Protein imitierenden Nanoantikörper an G_s -, G_i - und G_q -Protein gekoppelten Rezeptoren beobachtet werden, so dass zurzeit vermutet wird, dass dieser allosterische Effekt eine generelle Eigenschaft von GPCR ist.

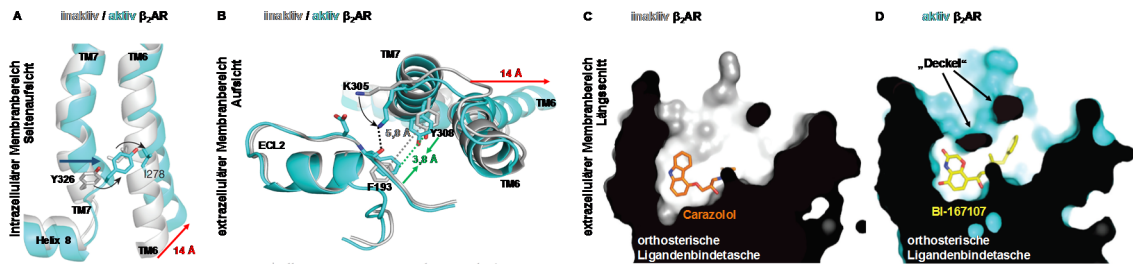


Abbildung 1.6: Allosterischer Effekt an der orthosterischen Ligandenbindestelle In der Seitenansicht im intrazellulären Membranbereich des inaktiven β_2 AR (grau) und des aktiven β_2 AR (hellblau) ist die um 14 Å radiale Auswärtsbewegung der TM6 (roter Pfeil) und die Einwärtsbewegung der TM7 (blauer Pfeil) zu sehen (A). Diese beiden Bewegungen der TM6 und TM7 bewirken, dass zwischen der aromatischen Seitenkette des Y326^{7,53} des NPXXY-Motivs in der TM7 (Stäbchenmodell) und der aliphatischen Seitenkette des I278^{6,40} (Stäbchenmodell) der TM6 eine hydrophobe Wechselwirkung entsteht. Dadurch wiederum bewegt sich die Seitenkette der Aminosäure Y308^{7,35} der TM7 auf die Seitenkette des F192^{ECL2} um 2 Å zu (grüne Pfeile) und es entsteht eine π - π -Stapelbindung (B). Zudem bewegt sich das K305^{7,32} der TM7 (schwarzer gebogener Pfeil) auf die Carbonylgruppe des F192^{ECL2} zu und es kommt zusätzlich zu einer polaren N-O-Bindung (schwarze gestrichelte Linie). Somit bilden die drei Aminosäuren F192^{ECL2}, K305^{7,32} und Y308^{7,35} den sogenannten Deckel über der Ligandenbindestasche aus. Ein Vergleich von Längsschnitten (C, D) durch den β_2 AR mit der orthosterischen Ligandenbindestasche zeigt die Ausbildung des Deckels über den hochaffinen Agonisten BI-167107 (gelbes Stäbchenmodell). Modifizierte Abbildung aus der Vorlage von DeVree et al. (2016) *Nature* **535**:182-186

Mit Hilfe der verschiedenen Kristallstrukturen des β_2 AR konnten entscheidende Einblicke in die Perzeption, in die Transduktion und in die assoziierte Effektoreinheit gewonnen werden. Zusammenfassend kann gesagt werden, dass für die Perzeption die TM3 (W109, T110, D113, V114, V117), TM5 (S203, S207), TM6 (F290), TM7 (Y308, I309, N312) und sogar ICL2 (F193) bestimmend sind und ECL2 (F192) und TM7 (K305, Y308) die Ligandenaffinität regulieren. Die TM2 (T68), TM3 (I121, D130, R131), TM5 (S207, P211), TM6 (F282, F288) und TM7 (N318, Y326) sowie ICL2 (Y141) sind hauptsächlich verantwortlich für die Transduktion. Die ICL2 (F139), TM3 (R131, T136) und TM5 (E225, Q229, K232) assoziieren mit der α_5 -Helix (F376, R380, D381, I383, Q384, Y391) und dem β_1 - (H41) und dem β_3 -Faltblatt (V217) der $G_{s\alpha}$ -Proteinuntereinheit.

1.2 G-Proteine als erstes Effektorsystem

Das heterotrimere G-Protein setzt sich aus einer G_{α^-} , G_{β^-} und einer G_{γ^-} -Proteinuntereinheit zusammen (Gilman, 1984b). Die G_{α^-} -Proteinuntereinheit ist die größte Untereinheit mit 39-45 kDa²⁵. Die G_{β^-} -Proteinuntereinheit ist mit 35 kDa mittelgroß und die G_{γ^-} -Proteinuntereinheit ist die kleinste Untereinheit mit 10 kDa (Gilman, 1984b). Die G_{α^-} -Proteinuntereinheit ist durch eine N-terminale Myristoylierung oder Palmitoylierung charakterisiert, die als Lipidanker fungiert (Kokame et al., 1992). Die G_{γ^-} -Proteinuntereinheit ist stets an ihrem C-terminalen CAAX-Motiv isoprenyliert (Higgins und Casey, 1994, 1996). Die G_{β^-} -Proteinuntereinheit besitzt dagegen keine posttranslationale Modifikation und ist in vivo über hydrophobe Wechselwirkungen mit

²⁵ Abkürzung Da ist eine Einheit der atomaren Masseneinheit. 1 Da ist definiert als 1/12 der Masse des C^{12} -Kohlenstoffatoms. Somit entspricht 1 Da = $1.66053873 \times 10^{-27}$ kg. Aminosäuren liegen im Bereich von 75 bis 204 Dalton.

der G_{γ} -Proteinuntereinheit stets verbunden (Sondek et al., 1996). Bei der Perzeption eines Agonisten kommt es zum Austausch von gebundenem GDP zu GTP an der G_{α} -Proteinuntereinheit des G-Proteins. Diese GTP-Bindung bewirkt eine Dissoziation²⁶ der $G_{\beta\gamma}$ -Proteinuntereinheit von der G_{α} -Proteinuntereinheit des heterotrimeren G-Proteins und stellt die G-Protein-Aktivierung dar (McCudden et al., 2005; Wettschureck und Offermanns, 2005; Oldham und Hamm, 2008). Diese Dissoziation wird durch die sogenannten GTP-Austauschfaktoren (GEF²⁷) katalysiert. Für heterotrimere G-Proteine erfüllen die membrangebundenen GPCR die Rolle der GEF (Flock et al., 2015; Stanley und Thomas, 2016). Hierbei wird die Assoziation von GTP an die G_{α} -Proteinuntereinheit beschleunigt. Die GTP-gebundene G_{α} -Proteinuntereinheit wirkt auf weitere Effektoren. Die dissoziierte $G_{\beta\gamma}$ -Proteinuntereinheit wirkt ebenfalls auf weitere Effektoren, so dass verschiedene Effektorsysteme gleichzeitig gesteuert werden.

Die G-Protein-Aktivierung kann durch folgende Prozesse beendet werden: Erstens, durch extrinsische GTPase-aktivierende Proteine (GAP²⁸), die die Hydrolyse von GTP an der G_{α} -Proteinuntereinheit zu GDP, einem Wassermolekül und einem freien Phosphation (P_i ²⁹) katalysieren (Ross und Wilkie, 2000). Diese GAP können RGS-Proteine sein (Berman et al., 1996; Mukhopadhyay und Ross, 1999). Die $G_{\alpha q/11}$ -Protein-aktivierte PLC³⁰- β (Berstein et al., 1992) und der $G_{\alpha 12/13}$ -Protein-aktivierte p115RhoGEF³¹ (Hart et al., 1998; Kozasa et al., 1998) fungieren ebenfalls als GAP. Zweitens, durch die $G_{\beta\gamma}$ -Proteinuntereinheit selbst, die als Guanin-Nukleotid-Dissoziationsinhibitor (GDI³²) fungiert und somit die GDP-Dissoziation von der G_{α} -Proteinuntereinheit unterdrückt (Higashijima et al., 1987; Ross und Wilkie, 2000; Ross, 2008). Drittens, durch die Phosphorylierung der ICL und des C-Terminus des Rezeptors mittels Serin-Threoninkinasen, wie die GPCR-Kinasen³³ (Benovic et al., 1987; Inglese et al., 1993; Lefkowitz, 1993) und die Proteinkinasen A (PKA³⁴) und C (PKC) (Lohse et al., 1990; Schleicher et al., 1993; Freedman et al., 1995). Somit wird

²⁶ Statt der vielfach beobachteten G_{α} - $G_{\beta\gamma}$ -Protein-Dissoziation bei einer G-Protein-Aktivierung wurde im Jahre 2003 eine Umlagerung dieser beiden Proteinuntereinheiten zueinander beobachtet (Bunemann et al., 2003), ohne dass sich die beiden Proteinuntereinheiten räumlich voneinander entfernen. Diese Umlagerung wurde bis jetzt nicht wieder beobachtet.

²⁷ Abkürzung GEF vom Englischen **G**uanine nucleotide **e**xchange factors für GTP-Austauschfaktoren. Neben den GPCR, die selbst als GEF wirken, existieren beim Menschen ca. 150 strukturell verschiedene GEF, die kleine monomere G-Proteine regulieren (Bos et al., 2007).

²⁸ Abkürzung GAP vom Englischen **G**TTPase **a**ctivating **p**rotein für GTPase aktivierende Proteine.

²⁹ Abkürzung P_i vom Englischen **i**norganic **p**hosphate; Unter physiologischen Bedingungen liegt das freie Phosphation als $H_2PO_4^-$ und HPO_4^{2-} vor.

³⁰ Abkürzung PLC steht für **P**hospholipase **C**

³¹ Abkürzung p115RhoGEF vom Englischen 115 kDa, Rho guanine nucleotide exchange factor 1 (siehe URL-Adresse: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/9138>)

³² Abkürzung GDI vom Englischen **g**uanine nucleotide **d**issoziation **i**nhibitor für Guanin-Nukleotid-Dissoziationsinhibitor

³³ GPCR-Kinasen werden als GRK abgekürzt vom Englischen **G** protein-coupled **r**eceptor **k**inase

³⁴ Die cAMP-abhängigen Proteinkinasen A (PKA) setzen sich aus zwei katalytischen und zwei regulatorischen Proteinuntereinheiten zusammen. Bei erhöhter intrazellulärer cAMP-Konzentration binden die beiden regulatorischen Untereinheiten insgesamt vier cAMP-Moleküle, was zur Dissoziation der beiden katalytischen Proteinuntereinheiten führt. Die beiden freigesetzten katalytischen Proteinuntereinheiten können die Hydroxygruppen von Serin und Threonin von zytoplasmatischen und sogar im Zellkern befindlichen Zielproteinen phosphorylieren (Taylor et al., 1992; Meinkoth et al., 1993; Skälhegg und Tasken, 2000).

der GPCR inaktiviert. Man spricht in diesem Fall von einer Desensibilisierung des GPCR (Goodman et al., 1996; Luttrell und Lefkowitz, 2002; Sato et al., 2015). Durch diese Phosphorylierungen werden hochaffine Bindestellen für das Adapterprotein Arrestin³⁵ geschaffen. Somit rekrutiert der phosphorylierte Rezeptor das Arrestin (Benovic et al., 1987; Lohse et al., 1990; Pippig et al., 1993; Gurevich et al., 1995) und blockiert damit räumlich eine erneute G-Protein-Kopplung, was zu einer vollständigen Desensibilisierung des Rezeptors führt (Ferguson, 2001; Smith und Rajagopal, 2016). Die Arrestin-Bindung kann je nach Bindungstyp³⁶ und GPCR-Klasse zur endozytotischen Internalisierung des Rezeptors führen (Hamdan et al., 2005; Smith und Rajagopal, 2016; Cahill et al., 2017). Für die Internalisierung bildet das Arrestin mit dem Strukturprotein Clathrin (Goodman et al., 1996), dem Adaptorprotein-2 (Laporte et al., 1999; Kang et al., 2009) und dem Phospholipid Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat (PIP₂) (Boucrot et al., 2006; Antonescu et al., 2011) und weiteren Proteinen (Shukla et al., 2011) einen Protein-Lipidkomplex, der sogenannte „clathrin coated pit“ aus (Laporte et al., 1999; Kirchhausen et al., 2014; Gurevich und Gurevich, 2015). Durch die Internalisierung kann es zum Abbau (Degradation des GPCR) aber auch zum Wiedereinbau (Recycling des GPCR) kommen. Dieser Wiedereinbau in die Zellmembran führt zu der sogenannten Resensibilisierung des GPCR (Ferguson, 2001; Moore et al., 2007; Premont und Gainetdinov, 2007; Hanyaloglu und von Zastrow, 2008; Kang et al., 2014). Die Arrestine sind selbst Effektoren, die weitere Effektoren innerhalb der Zelle steuern. Dazu gehören die Mitogen-aktivierten Proteinkinasen ERK, JNK und p38 sowie die Serin-Threoninkinase Akt, die Phosphoinositid-3-Kinase (PI3K) und die kleine monomerische GTPase RhoA (DeWire et al., 2007; Shukla et al., 2011). Überraschenderweise können endozytierte heterotrimere G-Proteine in Proteinkomplexen mit Arrestin und mit dem GPCR weitere Effektoren steuern (Thomsen et al., 2016).

1.3 Klassifizierung der Proteinuntereinheiten von heterotrimeren G-Proteinen

Beim Menschen gibt es 21 G_α-Proteinuntereinheiten, die von 16 verschiedenen Genen kodiert werden (Anantharaman et al., 2011). Die G_α-Proteinuntereinheiten werden basierend auf der Aminosäuresequenz in vier Familien gruppiert (G_{αs}, G_{αi}, G_{αq}, G_{α12}) (Simon et al., 1991; Hildebrandt, 1997; Downes und Gautam, 1999; Offermanns, 2003; Syrovatkina et al., 2016). Die G_{αs}-Proteinfamilie umfasst die folgenden G_α-Isoformen G_{αs-short}, G_{αs-long}, G_{αsXL} und G_{αolf}³⁷. Die G_{αi}-Proteinfamilie setzt sich aus den Isoformen G_{αi1},

³⁵ Es gibt 4 Arrestine (Ferguson, 2001). Arrestin1 ist 48 kDa groß und somit größer als die G_α-Proteinuntereinheit (Benovic et al., 1987).

³⁶ Arrestine können entweder nur am C-Terminus des GPCR oder am C-Terminus und den ICL binden.

³⁷ „olf“ steht für das Englische Wort: olfactory. Die G_{αolf}-Proteine werden in den Neuronen des Riechepithels exprimiert (Jones und Reed, 1989).

$G_{\alpha 2}$, $G_{\alpha 3}$, $G_{\alpha oA}$, $G_{\alpha oB}$, $G_{\alpha t1}$ ³⁸, $G_{\alpha t2}$ ³⁹, $G_{\alpha z}$ und $G_{\alpha gust}$ ⁴⁰ zusammen. Die Familie der $G_{\alpha q}$ -Proteine besteht aus den fünf Isoformen $G_{\alpha q}$, $G_{\alpha 11}$, $G_{\alpha 14}$, $G_{\alpha 15}$ und $G_{\alpha 16}$. Die $G_{\alpha 12}$ -Proteinfamilie umfasst die beiden $G_{\alpha 12}$ - und $G_{\alpha 13}$ -Proteinuntereinheiten. Eine weitere fünfte Familie von G_{α} -Proteinen, die G_{ν} -Proteine mit zwei Isoformen, findet sich bei Flagellaten, Schwämmen, Nesseltieren, Molusken und in einigen Vertebraten- und Invertebraten-Gruppen (Oka et al., 2009; Lokits et al., 2018). Die G_{β} -Proteinfamilie besteht aus 5 Genen, die jeweils eine Isoform codieren: $G_{\beta 1}$, $G_{\beta 2}$, $G_{\beta 3}$, $G_{\beta 4}$ und $G_{\beta 5}$. G_{ν} -Proteinfamilie wird von 11 verschiedenen Genen codiert. Diese Proteinfamilie lässt sich aufgrund der posttranslationalen Modifikation, der Isoprenylierung, in zwei Unterfamilien einteilen. Die drei G_{ν} -Proteine $G_{\nu 1}$, $G_{\nu 11}$ und $G_{\nu Cone}$ ⁴¹ werden farnelysiert und die restlichen acht G_{ν} -Proteine $G_{\nu 2}$, $G_{\nu 3}$, $G_{\nu 4}$, $G_{\nu 5}$, $G_{\nu 7}$, $G_{\nu 8}$, $G_{\nu 10}$ und $G_{\nu 12}$ werden geranylgeranyliert. In der Regel werden heterotrimere G-Proteine vereinfacht nach ihrer G_{α} -Proteinuntereinheit benannt. Die verschiedenen G_{α} -Proteine sowie die stets assoziierten $G_{\beta \gamma}$ -Proteine steuern weitere unterschiedliche Effektoren innerhalb der Zelle.

1.4 Effektorsysteme von heterotrimeren G-Proteinen

1.4.1 $G_{\alpha s}$ -Protein

Alle vier $G_{\alpha s}$ -Proteine aktivieren die Adenylylzyklasen⁴² (AC, EC⁴³: 4.6.1.1) als weiteren Effektor (Sunahara et al., 1997a; Sunahara et al., 1997b). Etwa 400 nM GTP gebundenes $G_{\alpha s}$ -Protein verursachen eine halbmaximale Aktivierung der AC (Sunahara et al., 1997a). Die membrangebundenen AC1-9 sind integrale Membranproteine, mit 12 Transmembrandomänen und zwei intrazellulären 40 kDa großen Domänen, die als C1- und C2-Domäne bezeichnet werden und gemeinsam die katalytische Untereinheit bilden (Taussig und Gilman, 1995; Tesmer et al., 1997; Sunahara und Taussig, 2002; Tesmer et al., 2002). Die $G_{\alpha s}$ -Proteinuntereinheit bindet allosterisch an die C2-Domäne. Hierbei gibt es eine Bewegung der $\alpha 2$ -Helix⁴⁴ der $G_{\alpha s}$ -Proteinuntereinheit in den freien Raum, der von den $\alpha 1$ -, $\alpha 2$ - und $\alpha 3$ -Helices und der $\alpha 1$ - $\alpha 2$ -Schleife der C2-Domäne gebildet wird (Tesmer et al., 1997; Sadana und Dessauer, 2009). Die $G_{\beta \gamma}$ -Proteinuntereinheiten können zusammen mit der $G_{\alpha s}$ -Proteinuntereinheit die AC2,

³⁸ $G_{\alpha t1}$ wird auch als $G_{\alpha t-r}$ (Offermanns, 2003) bezeichnet. Die $G_{\alpha t}$ -Proteine werden von den Photorezeptoren, den sogenannten Zapfen und Stäbchen, der Netzhaut exprimiert. Die Abkürzung „t“ steht für das ca. 84 kDa große heterotrimere G-Protein Transducin (Gilman, 1984a; Arshavsky et al., 2002).

³⁹ $G_{\alpha t2}$ wird auch als $G_{\alpha t-c}$ (Offermanns, 2003) bezeichnet.

⁴⁰ Abkürzung „gust“ steht für das heterotrimere G-Protein **Gustducin**. Die $G_{\alpha gust}$ -Proteine werden von den Geschmacksrezeptoren der Zunge exprimiert. Die Bezeichnung Gustducin leitet sich vom Englischen „gustatory transducin“ ab (McLaughlin et al., 1992; Margolskee, 2002).

⁴¹ Das Englische „cone“ bedeutet auf Deutsch Zapfen. Die $G_{\nu Cone}$ -Proteine werden von den Photorezeptoren, den sogenannten Zapfen der Netzhaut exprimiert.

⁴² Adenylylzyklasen (AC) setzen das Substrat Adenosin-5-triphosphat (ATP) zu zyklisches Adenosin-3,5-monophosphat (cAMP) und einem Pyrophosphat (PP_i), einem Anion der Diphosphorsäure H₄P₂O₇, um (Sutherland und Rall, 1958; Yan et al., 2016). Säugetiere besitzen neun verschiedene membranverankerte Adenylylzyklasen (AC1 bis AC9) und eine lösliche Isoform (AC10 = sAC), die nicht von $G_{\alpha s}$ -Proteinen gesteuert wird (Sunahara und Taussig, 2002; Rahman et al., 2013).

⁴³ Die **EC**-Nummer (*Enzyme Commission number*) ist ein Klassifizierungssystem für Enzyme. Die EC-Nummer der AC lautet: 4.6.1.1, siehe URL-Adresse: <https://enzyme.expasy.org/EC/4.6.1.1>, letzter Aufruf erfolgte am 01.01.2018

⁴⁴ Die $\alpha 2$ -Helix wird in der englischen Literatur häufig als switch II α -helix bezeichnet.

AC4, AC5, AC6 und AC7 verstärkt aktivieren (Sunahara und Taussig, 2002; Sadana und Dessauer, 2009).

Das cAMP ist ein ubiquitär vorkommender intrazellulärer Botenstoff, der verschiedenste zelluläre Effekte erzeugen kann. In erster Linie aktiviert es die cAMP-abhängigen PKA (Tesmer et al., 1997). Die PKA phosphorylieren verschiedenste Proteine, unter anderem, die EPAC⁴⁵-Proteine (de Rooij et al., 1998; Kawasaki et al., 1998), die CNG⁴⁶-Kanäle (Nakamura und Gold, 1987; Kaupp und Seifert, 2002; Pifferi et al., 2006; Wang et al., 2007) sowie Transkriptionsfaktoren wie CREB⁴⁷ (Gonzalez und Montminy, 1989; Mayr und Montminy, 2001) und CREM⁴⁸ (Fimia und Sassone-Corsi, 2001; Sassone-Corsi, 2012). Außerdem kann die PKA Phosphodiesterasen (PDE) phosphorylieren und damit wird der Abbau von cAMP zu Adenosin-5-monophosphat (AMP) beschleunigt (Rochais et al., 2004; Moorthy et al., 2011).

1.4.2 Gi-Protein

Die G_{αi}-Proteine hemmen die AC1, AC5 und AC6 (Hildebrandt et al., 1983; Bokoch et al., 1984; Katada et al., 1984a; Katada et al., 1984b; Sunahara et al., 1996; Sadana und Dessauer, 2009), indem die G_{αi}-Proteinuntereinheit mit der α2-Helix an die C1-Domäne statt der C2-Domäne allosterisch bindet (Dessauer et al., 1998). Eine geringere intrazelluläre cAMP-Konzentration führt zu einer verminderten PKA-Aktivität und erniedrigt den zellulären Phosphorylierungsstatus. Die genauen zellulären Funktionen der heterotrimeren G_i-Proteinfamilie wurde mittels Pertussistoxin (PTX⁴⁹) näher untersucht (Mangmool und Kurose, 2011). Die G_{βγ}-Proteine der Gi-Proteinfamilie aktivieren GIRK⁵⁰-Kanäle (Krapivinsky et al., 1995b; Kunkel und Peralta, 1995; Clapham und Neer, 1997; Krapivinsky et al., 1998; Hommers et al., 2003) und können sogar die AC1 stärker inhibieren als ihre assoziierten G_{αi}-Proteine (Sadana und Dessauer, 2009). Außerdem können alle G_{βγ}-Proteine die AC1, AC3 und AC8 hemmen (Sadana und Dessauer, 2009).

1.4.3 Gq-Protein

Die G_{αq}-Proteine aktivieren die Phospholipase C (PLC⁵¹), die die Hydrolyse von membranverankertem PIP₂ zu den zwei intrazellulären Botenstoffen IP₃ und DAG und

⁴⁵ Abkürzung EPAC vom Englischen **e**xchange factor directly activated by **c**AMP

⁴⁶ Abkürzung CNG vom Englischen **c**yclic **n**ucleotide **g**ated ion channel

⁴⁷ Abkürzung CREB vom Englischen **c**AMP response **e**lement **b**inding protein

⁴⁸ Abkürzung CREM vom Englischen **c**AMP responsive **m**odulator

⁴⁹ Das Pertussistoxin (PTX) ist ein Toxin aus dem Bakterium *Bordetella pertussis* (Locht und Keith, 1986; Stein et al., 1994) und besitzt eine katalytische ADP-Ribosyltransferase (Moss et al., 1984), die ein ADP-Riboserest von Nicotinamidadeninukleotid (NAD) auf ein C-terminales Cystein (z. B. C347 des G_i) der folgenden G_{αi}-Proteinuntereinheiten G_i, G_{αo}, und G_i überträgt (West et al., 1985; Carbonetti, 2010). Die ADP-Ribosylierung versetzt die G_{αi}-Proteinuntereinheit in einen inaktiven GDP-gebundenen Zustand, wodurch das G_{αi}-Protein vom Rezeptor entkoppelt (Locht und Antoine, 1995). Somit wird eine Inaktivierung der Adenylylzyklase verhindert und es kommt zu einer cAMP-Anreicherung (Mangmool und Kurose, 2011). Das G_z-Protein der G_{αi}-Proteinfamilie ist PTX-insensitiv. Der G_z-Protein gekoppelte Rezeptor Gpr176 ist im suprachiasmatischen Kern des Hypothalamus als orphan-GPCR exprimiert (Doi et al., 2016; Goto et al., 2017).

⁵⁰ Abkürzung GIRK vom Englischen **G** protein coupled inwardly **r**ectifying (**K**⁺) potassium channel

⁵¹ Alle PLC besitzen vier EF-Hand-Domänen, eine katalytische Triosephosphat~~is~~omerase, die sogenannte TIM-Region, und eine C-terminalen C2-Domäne (Jezyk et al., 2006; Hicks et al., 2008; Kadamur und Ross, 2013). Bis auf die

einem Proton katalysiert (Michell, 1975; Berridge, 1984; Berridge und Irvine, 1984; Nishizuka, 1992; Exton, 1996; Gudermann und Mederos y Schnitzler, 2010; Mederos y Schnitzler et al., 2011). Beim Menschen existieren insgesamt 13 PLC-Isoformen⁵² (Harden und Sondek, 2006; Jezyk et al., 2006; Cocco et al., 2015). Die $G_{\alpha q}$ -Proteine können die PLC- β -Isoformen aktivieren (Smrcka et al., 1991; Taylor et al., 1991; Waldo et al., 1991). Die PLC- γ -Isoformen werden nicht von $G_{\alpha q}$ -Proteinen aktiviert (Rebecchi und Pentylala, 2000), sondern von Rezeptortyrosinkinasen und löslichen Tyrosinkinasen (Kadamur und Ross, 2013). Die PLC- δ -Isoformen und die PLC- ζ -Isoform werden vermutlich nur durch Kalziumionen aktiviert (Rebecchi und Pentylala, 2000; Kadamur und Ross, 2013). Die PLC- ϵ -Isoform wird hingegen durch die kleinen monomeren G-Proteine aktiviert. Die PLC- η -Isoformen werden durch Kalziumionen und durch die $G_{\beta\gamma}$ -Proteinuntereinheit der G_i -Proteinfamilie aktiviert. Auch können die $G_{\beta\gamma}$ -Proteine der G_i -Proteinfamilie PLC- β und PLC- ϵ aktivieren (Camps et al., 1992a; Camps et al., 1992b; Katz et al., 1992; Harden et al., 2011; Madukwe et al., 2018).

Die beiden Hydrolyseprodukte der PLC- β -Isoformen, IP_3 und DAG (Waldo et al., 2010; Harden et al., 2011), aktivieren weitere intrazelluläre Effektorproteine, wie z. B. die IP_3 ⁵³- und RyR⁵⁴-Rezeptoren, die für die Kalziumfreisetzung aus dem endo- bzw. sarkoplasmatischem Retikulum verantwortlich sind (Streb et al., 1983; Berridge, 1984; Berridge und Irvine, 1984; Bosanac et al., 2004; Mikoshiba, 2007b, a; Berridge, 2009; Bootman, 2012; Putney und Tomita, 2012) oder im Falle des DAG die PKC und die TRPC-Kanäle⁵⁵, die den Phosphorylierungsstatus bzw. den Kalziumhaushalt in der Zelle ändern (Hofmann et al., 1999; Lucas et al., 2003; Storch et al., 2017a).

1.4.4 G_{12} -Protein

Die G_{12} -Proteinfamilie mit den beiden $G_{\alpha 12}$ - und $G_{\alpha 13}$ -Proteinen aktivieren die kleinen monomeren G-Proteine der Rho-Familie⁵⁶ (Mackay und Hall, 1998; Jaffe und Hall,

PLC- ζ -Isoform besitzen alle PLC-Isoformen zudem eine N-terminalen PH-Domäne. Die PH-Domäne, vom Englischen **Pleckstrin homology domain**, bindet je nach Isoform PIP_2 , freie Kalziumionen, $G_{\beta\gamma}$ -Proteine oder kleine monomere G-Proteine. Die EF-Hand-Domäne ist eine Kalziumbindedomäne, die aus zwei α -Helices mit einer dazwischenliegenden 12 Aminosäure-langen Schleife besteht (Cates et al., 1999). In den PLC- β -Isoformen stellen die beiden C-terminalen EF-Hand-Domänen die verantwortliche Struktur für die GAP-Funktion für die $G_{\alpha q}$ -Proteine dar (Rebecchi und Pentylala, 2000; Waldo et al., 2010; Kadamur und Ross, 2013). Hierbei wird die Hydrolyserate um mehr als 1000-fach gesteigert (Mukhopadhyay und Ross, 1999; Kadamur und Ross, 2013). Die PLC- β -Isoformen besitzen als Alleinstellungsmerkmal eine C-terminale Doppelwendel mit drei Helices, die als CC-Domäne vom Englischen **coiled-coil** bezeichnet wird, und eine Homodimerisierungsdomäne ist (Ilkaeva et al., 2002; Singer et al., 2002; Hicks et al., 2008). Diese CC-Domäne dient weiter als Verankerung zur Zellmembran und zur Bindung der $G_{\alpha q}$ -Proteine. Somit wird die $G_{\alpha q}$ -Proteinbindung stabilisiert und die GAP-Funktion erfüllt. Die TIM-Region weist eine zylinderförmige Struktur aus 8 Helices und 8 β -Faltblättern auf, die vermutlich die PIP_2 -Hydrolyse bewirkt. Die C2-Domäne bindet PIP_2 , freie Kalziumionen und die $G_{\alpha q}$ -Proteine (Kadamur und Ross, 2013).

⁵² 6 PLC-Familien mit PLC- $\beta 1$ bis PLC- $\beta 4$, PLC- $\gamma 1$ und PLC- $\gamma 2$, PLC- $\delta 1$, PLC- $\delta 3$ und PLC- $\delta 4$, PLC- ϵ , PLC- ζ , PLC- $\eta 1$ und PLC- $\eta 2$

⁵³ Beim Menschen existieren acht IP_3 -Rezeptor-Isoformen durch alternatives Spleißen aus drei Genen.

⁵⁴ Beim Menschen kodieren drei Gene für drei Ryanodinrezeptor-Isoformen: RyR1, RyR2 und RyR3. Der RyR1 wird in der Skelettmuskulatur und der RyR2 wird in der Herzmuskulatur exprimiert. Der RyR3 ist ubiquitär vorhanden. Der Ryanodin-Rezeptor ist wie der IP_3 -Rezeptor ein ligandengesteuerter Kalziumkanal (Zucchi und Ronca-Testoni, 1997).

⁵⁵ Die TRPC-Kanäle sind nicht selektive Kationenkanäle der „transient receptor potential classical“-Kanalfamilie (Hofmann et al., 1999; Lucas et al., 2003; Storch et al., 2017a).

⁵⁶ Die kleinen monomeren G-Proteine der Rho-Familie vom Englischen **Ras homologue gene family** werden beim Menschen von 22 Genen für 22 verschiedene Isoformen (Rho A, RhoB, RhoC, Rac1, Rac2, RhoG/Rac3, Cdc42, RhoD, Rho6/Rnd1, RhoN/Rnd2, RhoE/Rnd3, RhoG, RhoQ/TC10, RhoJ/TCL, RhoH/TTF, RhoV/Chp, RhoU/Wrch-1, RhoF/Rif, RhoBTB1, RhoBTB2, Miro-1 und Miro-2) kodiert und gehören zur übergeordneten Ras-Superfamilie der kleinen

2005), die unter anderem die sogenannten Stressfasern aus Aktinfilamenten (Etienne-Manneville und Hall, 2002; Jaffe und Hall, 2005) und die sogenannten fokalen Adhäsionskontakte⁵⁷ ausbilden (Ridley und Hall, 1992). Die kleinen monomeren G-Proteine der Rho-Familie beeinflussen damit die Zellmorphologie, Zellmotilität, Zellpolarität und die Zellkontraktion (Mackay und Hall, 1998; Jaffe und Hall, 2005; Worzfeld et al., 2008; Hanna und El-Sibai, 2013; Burridge und Guilluy, 2016). Alle G-Proteine der Rho-Familie haben eine N-terminale Konsensus-Aminosäuresequenz, die eine GDP/GTP-bindende Domäne ist. Der aktive GTP-gebundene Zustand der kleinen Rho-Proteine aktiviert eine Vielzahl von weiteren Effektoren wie z. B. die Proteinkinase N (PKN) (Amano et al., 1996; Morissette et al., 2000), die Phospholipase D (Bae et al., 1998), die c-Jun N-terminale Kinase (JNK) (Teramoto et al., 1996), die Citron-Kinase (Madaule et al., 1998), die LIM-Kinase (LIMK) (Ohashi et al., 2000), die Gerüstproteine Rhoophilin (Reid et al., 1996) und Rhotekin (Watanabe et al., 1996), die Myosin-Leichte-Ketten-Phosphatase (Kimura et al., 1996) und die Rho-assoziierten Proteinkinasen (ROCKI und ROCKII⁵⁸) (Leung et al., 1995; Leung et al., 1996; Matsui et al., 1996; Riento und Ridley, 2003). Zurzeit sind über 50 Effektoren bekannt (Bishop und Hall, 2000; Jaffe und Hall, 2005). Die kleinen monomeren Rho-Proteine werden durch 85 GEF⁵⁹, 80 GAP und 3 GDI reguliert (Van Aelst und D'Souza-Schorey, 1997; Sah et al., 2000; Fukuhara et al., 2001; Jaffe und Hall, 2005; Siehler, 2007; Meyer et al., 2008; Hanna und El-Sibai, 2013).

Folgende Effektoren werden sogar direkt von G_{α12/13}-Proteinen aktiviert wie z. B. das Hitzeschockprotein 90 (Vaiskunaite et al., 2001), die Serin-Threonin-Protein-Phosphatase 5 (Yamaguchi et al., 2002), der Glutamat-Transporter EAAT4⁶⁰ (Jackson et al., 2001), das Strukturprotein Radixin (Vaiskunaite et al., 2000), das HCLS1-assoziierte Protein X-1⁶¹ (Radhika et al., 2004), die PLC-ε (Lopez et al., 2001), das transmembranäre Adhäsionsprotein Cadherin (Meigs et al., 2001) und das für die Zytokinese wichtige Protein p140mDia⁶² (Watanabe et al., 1997).

GTP-bindenden Proteine mit einer molaren Proteinmasse von 20-40 kDa (Bishop und Hall, 2000; Jaffe und Hall, 2005; Boureux et al., 2007).

⁵⁷ Fokale Adhäsionskontakte sind große intrazelluläre Proteinkomplexe, die das Aktin-Zytoskelett an die Extrazelluläre Matrix (ECM) befestigen. Die in den fokalen Adhäsionskontakten gebündelten Aktin-Stressfasern werden mittels integraler Membranproteine, den sogenannten Integrinen (Müller-Esterl, 2018) an die extrazelluläre Matrix verbunden (Buhl et al., 1995; Narumiya et al., 1997)

⁵⁸ Abkürzung ROCK vom Englischen **R**ho-associated, **c**oiled-coil containing protein **k**inase; Die ROCKI wird auch als ROKβ bzw. p160ROCK und die ROCKII auch als ROKα bzw. Rho-Kinase bezeichnet (Riento und Ridley, 2003).

⁵⁹ Die RhoGEF-Proteine zeichnen sich durch die Anwesenheit einer N-terminalen homologen RGS-Domäne vom Englischen **r**egulator of **G** protein **s**ignaling aus, die aktive G_{α12}- und G_{α13}-Proteine bindet. Diese RGS-Domäne übt sowohl eine GAP-Aktivität auf die G_{α12}- und G_{α13}-Proteine als auch eine GEF-Aktivität auf das kleine monomere G-Protein Rho aus (Kozasa et al., 1998; Fukuhara et al., 2001; Tanabe et al., 2004; Meyer et al., 2008; Worzfeld et al., 2008; Siehler, 2009).

⁶⁰ Abkürzung EAAT4 vom Englischen **e**xcitatory **a**mino acid **t**ransporter **4**

⁶¹ Das **H**S1-assoziiierende Protein **X**-1 (HAX-1) wirkt anti-apoptisch und fördert das Überleben der Zellen. Mutationen im Hax-1 Gen führen zu schwerer kongenitaler Neutropenie, dem sogenannten Kostmann-Syndrom (Klein et al., 2007; Yap et al., 2011; Klein, 2017).

⁶² Das Protein p140mDia ist ein Säugetierhomolog des Drosophila proteins **D**iaphanous (Drosophila Formin Homology Protein). Es gehört zu den Formin-verwandten Proteinen der Diaphanous-Unterfamilie, die auch als Diaphanous-verwandten Formine (DRF = Diaphanous-related formins) bezeichnet werden (Aspenstrom, 2010).

1.5 Histamin und Histaminrezeptoren

1.5.1 Metabolismus und Funktion

Histamin ist ein Gewebshormon und ein Neurotransmitter in Säugetieren (Zimmermann et al., 2011). Histamin wird vesikulär gespeichert. In den Vesikeln ist das basische Histamin stets an das saure Proteoglykan Heparin ionisch gebunden (Wasserman, 1983). Die basophilen Granulozyten, die Mastzellen, die Thrombozyten, die enterochromaffin-ähnlichen Zellen⁶³ der Magenschleimhaut und die histaminergen Neuronen synthetisieren Histamin. Histamin ist ein biogenes Amin und wird chemisch in der IUPAC⁶⁴-Nomenklatur als 2-(1H-Imidazol-4-yl)-ethanamin bezeichnet.

Die anabolen und katabolen Reaktionen des Histamins sind in Abbildung 1.7 dargestellt.

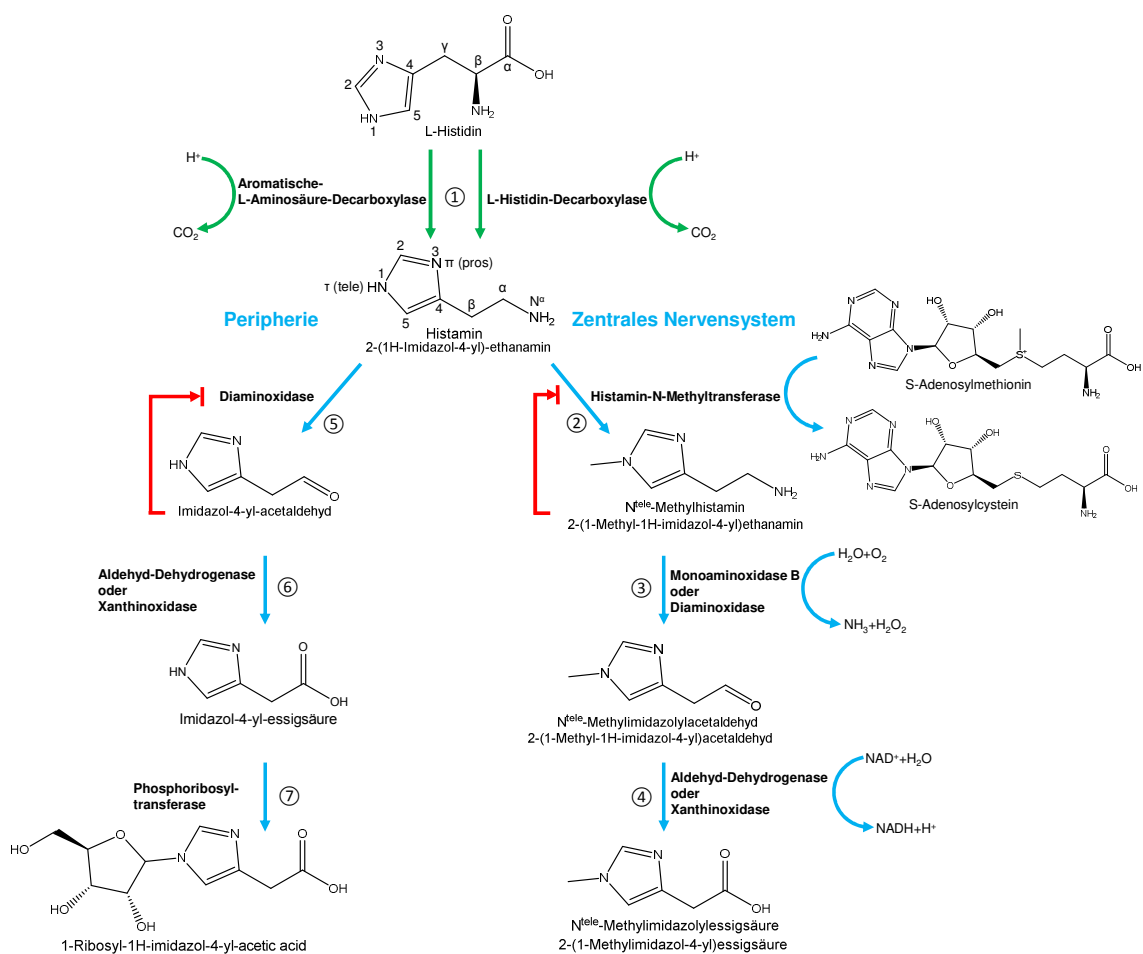


Abbildung 1.7: Anabolismus und Katabolismus von Histamin Das biogene Amin Histamin entsteht durch eine oxidative Decarboxylierung aus der semi-essentiellen Aminosäure L-Histidin (grüne Pfeile), indem das zentrale α-Kohlenstoffatom entweder durch das Enzym, die Aromatische-L-Aminosäure-Decarboxylase⁶⁵ (Green et al., 1987), oder durch das Enzym, die L-Histidin-Decarboxylase⁶⁶, als ein Kohlenstoffdioxidmolekül (CO₂) abgespalten wird ① (Maintz und Novak,

⁶³ Vom Englischen enterochromaffin-like cells

⁶⁴ Abkürzung IUPAC steht für International Union of Pure and Applied Chemistry

⁶⁵ EC 4.1.1.28, siehe URL-Adresse: <https://enzyme.expasy.org/EC/4.1.1.28>, letzter Aufruf erfolgte am 01.01.2018

⁶⁶ EC 4.1.1.22, siehe URL-Adresse: <https://enzyme.expasy.org/EC/4.1.1.22>, letzter Aufruf erfolgte am 01.01.2018

2007; Haas et al., 2008; Simons und Simons, 2011; Schlicker, 2013). Statt der IUPAC-Nomenklatur wird häufig die Nomenklatur nach Black und Ganellin verwendet, um die molekularen Wechselwirkungen besser zu benennen (Black und Ganellin, 1974). Die primäre Aminogruppe $N\alpha$ ist über eine Ethylengruppe mit dem Imidazolring verbunden, wobei der entferntere Stickstoff im Imidazolring als N^T (N^{tele}) und der zur Seitenkette nähere Stickstoff als N^{π} (N^{pros}) bezeichnet wird (siehe Histamin). Beim Menschen existieren zwei Abbauewege für Histamin (blaue Pfeile). Im zentralen Nervensystem (rechter Abbaueweg) wird das Histamin zuerst durch das zytosolische Enzym Histamin-N-Methyltransferase⁶⁷ ② zu N^{tele} -Methylhistamin methyliert, indem eine Methylgruppe von S-Adenosyl-L-Methionin auf den Imidazolring des Histamins übertragen wird (Barnes und Hough, 2002). In einem weiteren Schritt wird N^{tele} -Methylhistamin durch die Enzyme Monoaminoxidase B⁶⁸ oder Diaminoxidase⁶⁹ ③ zu N^{tele} -Methylimidazolacetaldehyd oxidativ desaminiert (Shih et al., 1999). Das Enzym Aldehyd-Dehydrogenase⁷⁰ oder Xanthinoxidase⁷¹ ④ oxidiert N^{tele} -Methylimidazolacetaldehyd zu N^{tele} -Methylimidazolylelessigsäure (Khandelwal et al., 1982a; Khandelwal et al., 1982b; Green et al., 1987; Prell et al., 1988; Prell und Green, 1994; Prell et al., 1996; Oguri und Yoneya, 2002; Maintz und Novak, 2007; Thakkar, 2011). In der Peripherie (linker Abbaueweg) spielt die Histaminmethylierung eine untergeordnete Rolle. Hier erfolgt der Abbau des Histamins vorwiegend über eine oxidative Desaminierung des primären Stickstoffatoms durch extrazelluläre Diaminoxidasen⁷² ⑤ (Barnes und Hough, 2002; Kovacova-Hanuszkova et al., 2015) zu Imidozal-4-yl-acetaldehyd. Die Aldehyd-Dehydrogenase oder die Xanthinoxidase ⑥ oxidiert Imidozal-4-yl-acetaldehyd zu Imidazol-4-yl-essigsäure (Oguri und Yoneya, 2002). Die Imidazol-4-yl-essigsäure wird durch eine Phosphoribosyltransferase ⑦ zu 1-Ribosyl-1H-imidazol-4-yl-essigsäure umgesetzt und über die Nieren ausgeschieden (Beall und Vanarsdel, 1961; Green et al., 1987). Die roten Pfeile stellen die Endprodukthemmung durch Imidozal-4-yl-acetaldehyd (links) und durch N^{tele} -Methylhistamin (rechts) dar. Die Abbildung wurde mit Hilfe des Programmes ChemDraw Professional 16.0 von PerkinElmer erstellt.

Histamin ist an einer Vielzahl von physiologischen und pathophysiologischen Prozessen beteiligt, die in Abbildung 1.8 dargestellt sind.

⁶⁷ EC 2.1.1.8, siehe URL-Adresse: <https://enzyme.expasy.org/EC/2.1.1.8>, letzter Aufruf erfolgte am 01.01.2018

⁶⁸ EC 1.4.3.4, siehe URL-Adresse: <https://enzyme.expasy.org/EC/1.4.3.4>, letzter Aufruf erfolgte am 01.01.2018

⁶⁹ Früher EC 1.4.3.6, jetzt EC 1.4.3.22, siehe URL-Adresse: <https://enzyme.expasy.org/EC/1.4.3.22>, letzter Aufruf erfolgte am 01.01.2018

⁷⁰ EC 1.2.1.3, siehe URL-Adresse: <https://enzyme.expasy.org/EC/1.2.1.3>, letzter Aufruf erfolgte am 01.01.2018

⁷¹ EC 1.17.1.4, siehe URL-Adresse: <https://www.uniprot.org/uniprot/P47989>, letzter Aufruf erfolgte am 01.01.2018

⁷² Früher EC 1.4.3.6, jetzt EC 1.4.3.22, siehe URL-Adresse: <https://enzyme.expasy.org/EC/1.4.3.22>, letzter Aufruf erfolgte am 01.01.2018

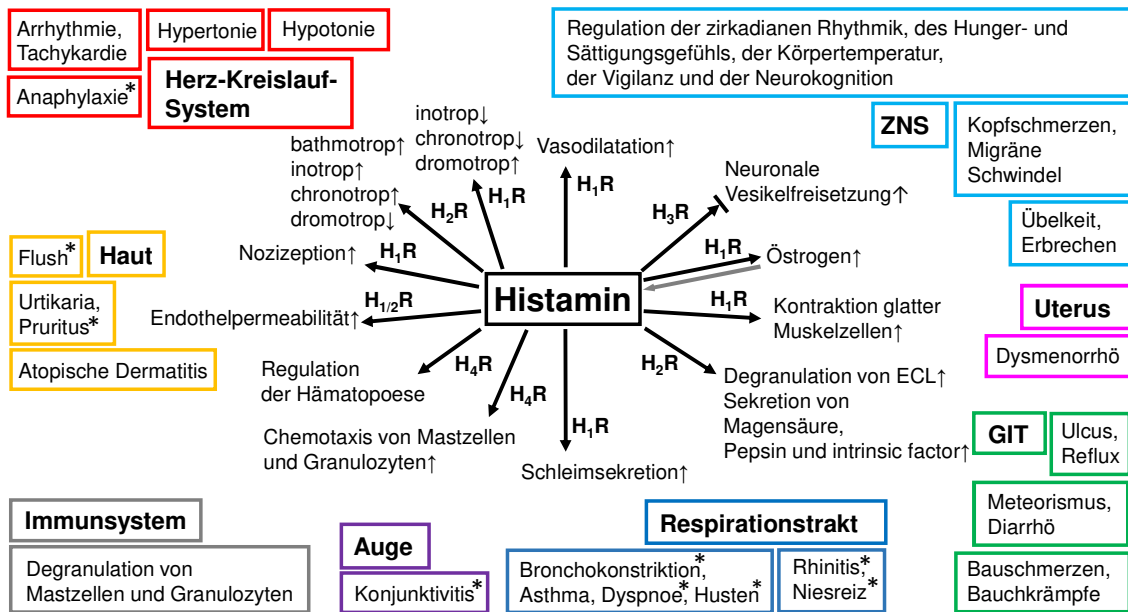


Abbildung 1.8: Funktionen von Histamin Das Histamin wird vesikulär freigesetzt und beeinflusst verschiedenste Organe und Gewebe (siehe Kästchen). Das Histamin wirkt über die vier verschiedenen G-Protein gekoppelten H₁-, H₂-, H₃- und H₄-Rezeptoren und verursacht verschiedenste zelluläre Effekte (siehe schwarze Pfeile). Das Östrogen ist ein Histaminliberator (grauer Pfeil) (Kierska et al., 1997). Der H₃-Rezeptor ist ein Autorezeptor im ZNS, der die Histamin-Freisetzung hemmt (schwarzer Pfeil mit Block) (Arrang et al., 1983). Die Histamin-Freisetzung bei allergischen Reaktionen ist von zentraler Bedeutung und vermittelt direkt eine Vielzahl von allergischen Symptomen (siehe Symptomkästchen mit Sternchen) (Kay, 2001; Maintz und Novak, 2007; del Cuillo et al., 2009; Seifert et al., 2013). An der Haut (gelb) bewirkt die Histamin-Freisetzung eine Hautrötung (Flush) durch Vasodilatation und Juckreiz (Pruritus); im Respirationstrakt (blau) bewirkt es eine Bronchokonstriktion, Husten, Niesreiz und Schnupfen (Rhinitis); am Auge (lila) bewirkt es eine Bindehautentzündung (Konjunktivitis) und unter Umständen bewirkt es sogar eine Anaphylaxie (rot). Eine Dysregulation bei der Histamin-Freisetzung oder beim Histamin-Abbau wie z. B. durch eine verminderte Diaminoxidase-Aktivität findet sich bei Nesselsucht (Urtikaria) und bei atopischer Dermatitis (gelb) (Maintz et al., 2006). Die Gastrin- und Acetylcholin-induzierte Histamin-Freisetzung aus den enterochromaffin-ähnlichen Zellen und den Mastzellen in der Magenwand (Rangachari, 1992; Hirschowitz et al., 1995; Andersson et al., 1998) bewirkt die Sekretion von Magensäure, Pepsin und dem sogenannten „intrinsic factor⁷³“ aus den Belegzellen der Magenschleimhaut. Dies wird exklusiv über H₂-Rezeptoren vermittelt (schwarzer Pfeil) und kann zu Magengeschwür (Ulcus) und Reflux führen (grün) (Binder und Donaldson, 1978; Mirossay et al., 1992; Rangachari, 1992; Hirschowitz et al., 1995). Am Herzen (rot) wirkt Histamin über die Aktivierung von myokardialen G_s-Protein gekoppelten H₂-Rezeptoren positiv bathmo-, ino- und chronotrop sowie negativ dromotrop (Verma und McNeill, 1976; Ginsburg et al., 1980; 2009), was zu Herzrhythmusstörungen (Arrhythmien) und zur Blutdrucksteigerung (Hypertonie) führt. Über die Aktivierung von G_{q/11}-Protein gekoppelten H₁-Rezeptoren in Koronararterien wirkt Histamin negativ ino- und chronotrop sowie positiv dromotrop. In den Blutgefäßen verursacht Histamin über die Aktivierung von G_{q/11}-Protein gekoppelten H₁-Rezeptoren eine endotheliale Vasodilatation, was zum Blutdruckabfall (Hypotonie) mit möglicher Reflertachykardie und einer Erhöhung der Endothelpermeabilität mit Ödembildung führen kann. Im Immunsystem wirkt das Histamin über die Aktivierung von G_i-Protein gekoppelten H₄-Rezeptoren chemotaktisch auf Mastzellen und Granulozyten. In der Gebärmutter kann das Histamin über G_{q/11}-Protein gekoppelte H₁-Rezeptoren durch Kontraktionen der Gebärmutterwand Regelschmerzen (Dysmenorrhö) verursachen (Maintz et al., 2006). Die histaminergen Neurone im hinteren Kern des Hypothalamus, dem Nucleus tuberomammillaris, (Haas und Panula, 2003) projizieren diffus in

⁷³ Der „intrinsic factor“ ist ein Glykoprotein, welches die Aufnahme von Cobalamin (Vitamin B₁₂) im Dünndarm ermöglicht (Latner, 1958).

viele Gehirnregionen und beeinflussen die zirkadiane Rhythmik (Nowak, 1994; Lin et al., 2011; Thakkar, 2011), das Hunger- und Sättigungsgefühl (Kjaer et al., 1994a; Haas und Panula, 2003), die Körpertemperatur (Kjaer et al., 1994b), die Vigilanz und die Neurokognition (Schwartz et al., 1991; Passani et al., 2000; Haas und Panula, 2003; Haas et al., 2008; Simons und Simons, 2011). Zudem spielen diese Neurone bei den pathophysiologischen Zuständen wie Erbrechen, Übelkeit, Kopfschmerzen, Migräne und Schwindel (Vertigo) eine wichtige Rolle (Maintz et al., 2006). Die Abbildung wurde in Anlehnung an Laura Maintz und Natalija Novak (2007) Am J Clin Nutr. **85**:1185-1196 erstellt.

Detaillierte Angaben mit Literatur zu Eigenschaften und Funktionen der einzelnen Histaminrezeptoren finden sich tabellarisch im Anhang (siehe Tabelle 1 im Anhang).

1.5.2 H₁-Antihistaminika und Entdeckung der Histamin-Rezeptoren

Die ersten antihistaminisch⁷⁴ wirkenden Substanzen wurden von Ernest Forneau, Daniel Bovet und Marie Staub zwischen 1933 und 1937 synthetisiert und Thymoxyethyl-diethylamin konnte die kontrahierende Wirkung des endogenen Histamins an der glatten Gefäßmuskulatur im Gastrointestinaltrakt und in den Bronchien des Meerschweinchens aufheben (Feinberg, 1946; Emanuel, 1999). Allerdings waren alle von ihnen synthetisierten Substanzen zu toxisch für eine Anwendung am Menschen. Fünf Jahre später, 1942, entwickelte Bernard Naftali Halpern bei Rhone Poulenc in Lyon das Ethylendiaminderivat Phenbenzamin⁷⁵, das erste am Menschen erfolgreich eingesetzte Antihistaminikum. Heinz Otto Schild beobachtete mit Hilfe verschiedener antihistaminisch wirkenden Substanzen, dass nicht alle Histamin-induzierten Effekte wie die Magensäureproduktion und die positive Ino- und Chronotropie antagonisiert werden (Ash und Schild, 1966). Somit konnte auf die Existenz von zwei verschiedenen Histaminrezeptorsubtypen geschlossen werden. Im Jahre 1972 konnte James W. Black erstmals mit Hilfe des neu entwickelten selektiven Histamin H₂-Rezeptorantagonists Burimamid selektiv die Magensäureproduktion erfolgreich unterdrücken und damit H₁- von H₂-Rezeptor vermittelte Effekte diskriminieren (Black et al., 1972; Wyllie et al., 1972). Jean Charles Schwartz und seine Mitarbeiter konnten an Cortexschnitten von Ratten zeigen, dass die neuronale Histamin-Freisetzung durch einen präsynaptischen Autorezeptor, dem Histamin H₃-Rezeptor, kontrolliert wird (Arrang et al., 1983; Arrang et al., 1987). Das letzte Mitglied der Histaminrezeptorfamilie, der Histamin H₄-Rezeptor, wurde im Jahre 2000 bei genomischen Datenbankeinträgen gefunden (Nakamura et al., 2000; Oda et al., 2000; Liu et al., 2001; Nguyen et al., 2001; Zhu et al., 2001).

Insgesamt existieren weltweit 64 H₁-Antihistaminika⁷⁶, die zugelassene Arzneimittel bzw. Wirkstoffkandidaten in klinischen Studien sind. Fälschlicherweise wurden H₁-Antihistaminika früher als neutrale Antagonisten deklariert. Jedoch sind alle genauer untersuchten H₁-Antihistaminika in der Lage die Basalaktivität des Histamin H₁-Rezeptor zu unterdrücken, so dass sie per Definition als inverse Agonisten fungieren (Bakker et

⁷⁴ Antihistaminisch bedeutet die Funktionen des körpereigenen Histamins aufzuheben (siehe Abbildung 1.8).

⁷⁵ Handelsname: Antergan®, chemische Bezeichnung nach IUPAC: N'-benzyl-N,N-dimethyl-N'-phenylethan-1,2-diamin (siehe URL-Adresse: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Antergan#section=Names-and-Identifiers>)

⁷⁶ siehe URL-Adresse: <https://www.ebi.ac.uk/chembl/db/index.php/target/inspect/127>

al., 2000; Kenakin, 2001; Leurs et al., 2002; Strange, 2002; Nijmeijer et al., 2010; Simons und Simons, 2011; Monczor et al., 2013).

Die H₁-Antihistaminika der ersten Generation, wie das Ethanolaminderivat Diphenhydramin⁷⁷, das Phenothiazin Promethazin⁷⁸ und das Ethylendiamin Mepyramin⁷⁹ (siehe Abbildung 1.9 A) konnten wegen ihrer hohen Lipophilie die Blut-Hirn-Schranke penetrieren und zusätzlich neben den in der Peripherie vorkommenden H₁-Rezeptoren zentrale H₁-Rezeptoren antagonisieren (Kiss et al., 2004). Aufgrund der hohen Lipophilie und der geringen H₁-Rezeptorselektivität binden die Antihistaminika der ersten Generation nicht nur an H₁-Rezeptoren, sondern auch an Monoamintransporter (Tatsumi et al., 1997) und an kardiale Ionenkanäle wie z. B. an dem hERG⁸⁰-Kaliumkanal (Lagrutta et al., 2008; Shimamura et al., 2011). Da die H₁-Antihistaminika der ersten Generation auch an viele GPCR⁸¹ wie Adrenozeptoren, Dopaminrezeptoren, Muskarinrezeptoren und Serotoninrezeptoren binden können, besitzen diese Antihistaminika anticholinerge, antiadrenerge, antidopaminerge und antiserotonerge Wirkungen wie z. B. Sedierung bzw. Somnolenz, Sehstörungen wie erweiterte Pupillen (Mydriasis), Mundtrockenheit, Verstopfung (Obstipation), Magenschmerzen (Gastralgie), Bauchschmerzen, Harnverhalt (Ischurie), Hypotonie, Arrhythmien (Tachykardie) und neurologische Effekte wie z. B. kognitive Defizite, Verwirrtheit und Halluzination (Simons und Simons, 2008, 2011; Collamati et al., 2016; Mahdy und Webster, 2017). Zudem nimmt sogar die Mortalität bei älteren Patienten bei der Medikation mit H₁-Antihistaminika zu (Collamati et al., 2016).

Um diese pharmakologischen Nebenwirkungen zu verhindern, wurden zwitterionische Antihistaminika⁸² entwickelt. Diese als zweite Generation bezeichneten Antihistaminika weisen eine hohe H₁-Rezeptorselektivität, ein deutlich geringeres Penetrationsvermögen an der Blut-Hirn-Schranke (Yanai, 2012) und lange Plasmahalbwertszeiten auf. Diese Eigenschaften lassen sich hauptsächlich auf die Einführung einer zusätzlichen polaren Carboxylatgruppe zurückführen (siehe Abbildung 1.9 B), die mit der Anionenbindestelle des H₁-Rezeptors interagiert (Shimamura et al., 2011). Für die Entwicklung neuer hochselektiver H₁-Antihistaminika wurde sogar ein computergestütztes molekulares Docking mit Ligand-Protein-Interaktion erfolgreich

⁷⁷ Handelsname: Benadryl®, IUPAC: 2-benzhydryloxy-N,N-dimethylethanamin (siehe URL-Adresse: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/diphenhydramine#section=Names-and-Identifiers>)

⁷⁸ Handelsname: Phenergan®, IUPAC: N,N-dimethyl-1-phenothiazin-10-ylpropan-2-amin (siehe URL-Adresse: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/promethazine#section=Names-and-Identifiers>)

⁷⁹ Handelsname: Pylramin®, IUPAC: N'-[(4-methoxyphenyl)methyl]-N,N-dimethyl-N'-pyridin-2-ylethan-1,2-diamin (siehe URL-Adresse: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/pyrilamine#section=Names-and-Identifiers>)

⁸⁰ Der hERG-Kanal ist spannungsabhängiger, einwärtsgerichteter Kaliumkanal. Die Inhibition von kardialen hERG-Kaliumkanälen kann zu einer QT-Verlängerung und zu einer Torsade-de-pointes-Arrhythmie führen (Lagrutta et al., 2008).

⁸¹ Die Gesamtsequenzidentität des H₁-Rezeptors ist mit dem muskarinischen M₂- mit 41% und mit dem muskarinischen M₃-Rezeptor mit 37% recht hoch (Kooistra et al., 2013).

⁸² Zu den zwitterionischen Antihistaminika mit einer zusätzlichen Carboxylatgruppe gehören z. B. Fexofenadin und Levocetirizin, die jeweils hohe Dissoziationshalbwertszeiten von 62 Minuten und 142 Minuten besitzen (Gillard et al., 2002).

eingesetzt (de Graaf et al., 2011; Kuhne et al., 2016). Mit diesen Analysen konnte die Ligandenbindetasche des H₁-Rezeptors weiter differenziert werden⁸³.

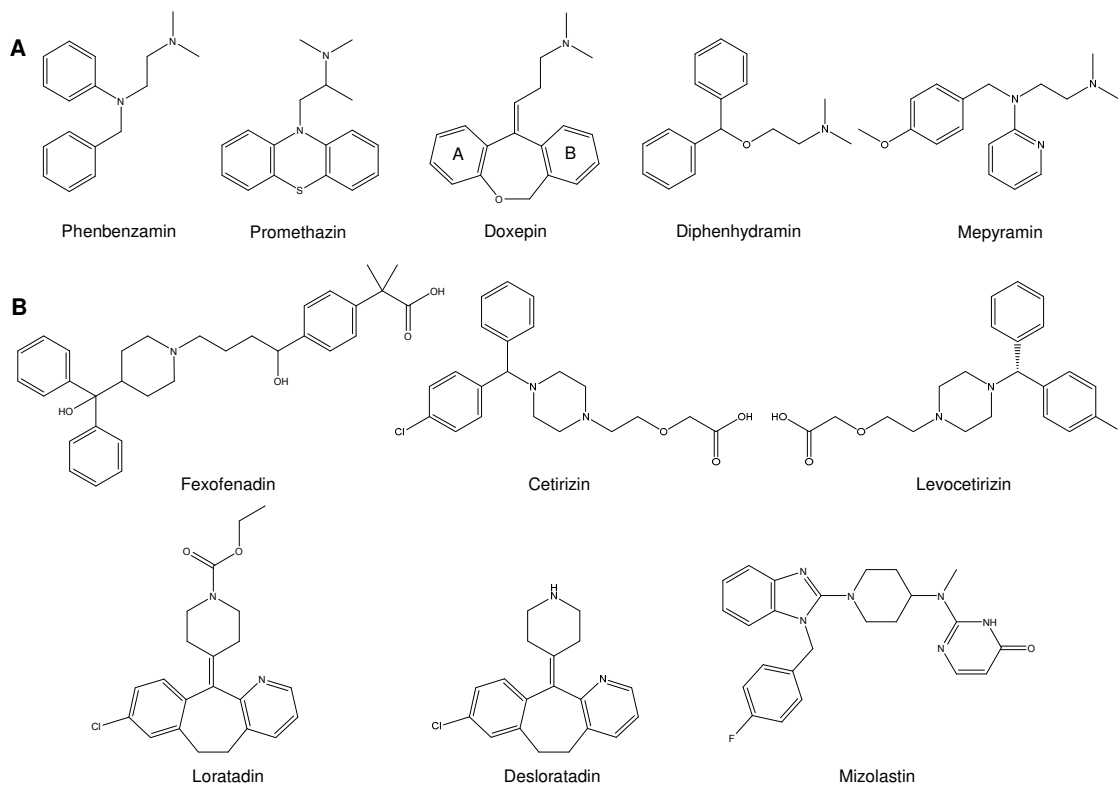


Abbildung 1.9 2^D-Skelettstrukturen von Antihistaminika der ersten Generation (A) und der zweiten Generation (B). Die Abbildung wurde mit Hilfe des Programmes ChemDraw Professional 16.0 von PerkinElmer erstellt.

1.5.3 Familie der Histaminrezeptoren

Die Effekte des Histamins werden über die vier Histamin H₁-, H₂-, H₃- und H₄-Rezeptorsubtypen aus der Klasse A der GPCR-Superfamilie vermittelt (Hill et al., 1997; Parsons und Ganellin, 2006; Lim et al., 2009; Shimamura et al., 2011; Micallef et al., 2013). Die annotierten Aminosäuresequenzen der vier Rezeptorsubtypen für Meerschweinchen und Mensch befinden sich im Anhang 8. Ein errechneter Vergleich (siehe Anhang 8) der Aminosäuresequenzen zwischen den einzelnen humanen und den einzelnen Meerschweinchen Histaminrezeptorsubtypen sowie zwischen den beiden Spezies ist in der Tabelle 1.1 dargestellt.

⁸³ Die Ligandenbindetasche für H₁-Antihistaminika der zweiten Generation wird in folgende vier Binderegionen unterteilt: 1. Die Binderegion mit D107^{3.32}, W428^{6.48}, Y431^{6.51}, I454^{7.39} und mit Y458^{7.43} für die protonierte Aminogruppe. 2. Die obere aromatische Binderegion mit Y108^{3.33}, W158^{4.56}, Y431^{6.51}, F432^{6.52} und mit F435^{6.55}, die z. B. mit dem aromatischen Ring B des tricyclischen Ringsystems des Doxepins wechselwirkt. 3. Die untere aromatische Binderegion mit F199^{5.47}, F424^{6.44} und mit W428^{6.48}, die z. B. mit dem aromatischen Ring A des tricyclischen Ringsystems des Doxepins wechselwirkt (Kuhne et al., 2016). Die Anionenbindetasche mit K191^{5.39} der TM5 und mit K179 in der ECL2, die mit der Carboxylatgruppe wechselwirkt (Wieland et al., 1999; Shimamura et al., 2011). Desloratadin (siehe Abbildung 1.13B) ist pharmakologisch auch ein H₁-Antihistaminikum zweiter Generation, weist aber keine Carboxylatgruppe auf und ist durch seine Planarität strukturchemisch nicht vergleichbar mit den anderen H₁-Antihistaminika der 2. Generation.

Rezeptor	hH ₁ R		hH ₂ R		hH ₃ R		hH ₄ R	
	gesamt	TM	gesamt	TM	gesamt	TM	gesamt	TM
hH ₁ R			31,2	35,9	27,7	28,5	25,7	25,2
hH ₂ R	31,2	35,9			28,3	28,1	24,3	25,5
hH ₃ R	27,7	28,5	28,3	28,1			40,5	43,3
hH ₄ R	25,7	25,2	24,3	25,5	40,5	43,3		
Rezeptor	gpH ₁ R		gpH ₂ R		gpH ₃ R		gpH ₄ R	
	gesamt	TM	gesamt	TM	gesamt	TM	gesamt	TM
gpH ₁ R			33,0	34,6	27,9	28,7	27	24,7
gpH ₂ R	33,0	34,6			26,7	27,8	26,2	27,2
gpH ₃ R	27,9	28,7	26,7	27,8			39,1	41,3
gpH ₄ R	27,0	24,7	26,2	27,2	39,1	41,3		
Rezeptor	hH ₁ R		hH ₂ R		hH ₃ R		hH ₄ R	
	gesamt	TM	gesamt	TM	gesamt	TM	gesamt	TM
gpH ₁ R	73,3	74,4						
gpH ₂ R			86,7	90,3				
gpH ₃ R					93,9	94,1		
gpH ₄ R							65,2	66,7

Tabelle 1.1: Vergleich der Aminosäuresequenzen der einzelnen Histaminrezeptorsubtypen Ein Vergleich der Aminosäuresequenzen der vier humanen Histaminrezeptorsubtypen (hH₁R, hH₂R, hH₃R und hH₄R) untereinander (Tabelle oben) liefert eine 24,3-40,5% ige Identität der Aminosäuresequenzen. Der höchste Grad an Sequenzidentität mit 40,5% findet sich zwischen dem humanen H₃- und dem humanen H₄-Rezeptor (Tabelle oben). Ein Vergleich der Aminosäuresequenzen der vier Meerschweinchen Histaminrezeptorsubtypen (gpH₁R, gpH₂R, gpH₃R und gpH₄R) untereinander (Tabelle Mitte) liefert eine 26,2-39,1% ige Identität der Aminosäuresequenzen. Der höchste Grad an Sequenzidentität mit 39,1% findet sich zwischen dem Meerschweinchen H₃- und dem Meerschweinschen H₄-Rezeptor (Tabelle Mitte). Ein Vergleich der Aminosäuresequenzen zwischen den humanen (hH₁R, hH₂R, hH₃R und hH₄R) und den Meerschweinchen (gpH₁R, gpH₂R, gpH₃R und gpH₄R) Histaminrezeptorsubtypen zeigt (Tabelle unten), dass die Gesamtsequenzidentität mit 65,2-93,9% zwischen beiden Spezies sehr hoch ist. Auffällig ist, dass die Sequenzidentität in dem Transmembrandomänenbereich zwischen den beiden Spezies stets höher ist als die Gesamtsequenzidentität (Tabelle unten). Jede Zahl repräsentiert den Prozentsatz der Identität in der Aminosäuresequenz. Die Gesamtsequenzidentitäten und die Sequenzidentitäten in den Transmembrandomänenbereichen ohne N- und C-Termini sowie der Aminosäuresequenzvergleich der einzelnen Histaminrezeptoren wurde mit Hilfe der UniprotKB Datenbank⁸⁴ und mit dem Programm Clustal Omega⁸⁵ bestimmt.

Der humane H₁-Rezeptor weist die höchste Sequenzidentität mit jeweils 41% in der orthosterischen Ligandenbindetasche mit dem humanen muskarinischen M₂- und dem humanen H₂-Rezeptor auf (Kooistra et al., 2013). Seine orthosterische Ligandenbindetasche ähnelt stark denen der Klasse A GPCR. Deswegen wird der H₁-Rezeptor häufig als Urrezeptor der Klasse A GPCR bezeichnet (Stark und Schubert-Zsilavec, 2004). Ein Klasse A und Klasse B GPCR-Stammbaum mit 101 Rezeptoren ist im Diskussionskapitel (siehe Abschnitt 4.1 mit Abbildung 4.1) ersichtlich.

⁸⁴ siehe URL-Adresse: <https://www.uniprot.org/uniprot/>

⁸⁵ siehe URL-Adresse: <https://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalo/>

1.5.4 Effektorsysteme des H₁-Rezeptors

Der G_{q/11}-Protein gekoppelte Histamin H₁-Rezeptor wird in zahlreichen Zellen exprimiert und bewirkt neben einer DAG-, IP₃-Freisetzung und einer intrazellulären Kalziumzunahme, eine Aktivierung verschiedener intrazellulärer Effektoren (siehe Abschnitt 1.4.3 und Hill et al., 1997) wie die Kalzium/Calmodulin-abhängigen Protein-Kinasen I und II (CaMK⁸⁶). Die beiden Kinasen phosphorylieren den Transkriptionsfaktor CREB⁸⁷ (Francis et al., 2008), der die Transkription der endothelialen Stickstoffmonoxid-Synthase (eNOS⁸⁸) (Li et al., 2003) und der induzierbaren Stickstoffmonoxid-Synthase (iNOS⁸⁹) (Tanimoto et al., 2007) erhöht. Des Weiteren induzieren H₁-Rezeptoren die Transkription des Transkriptionsfaktors NFκB in COS7-Zellen⁹⁰ (Bakker et al., 2001). Interessanterweise kann die NFκB-Aktivität sogar durch das Antihistaminikum Desloratadin unterdrückt werden (Wu et al., 2004). In der Literatur wird zudem beschrieben, dass durch H₁-Rezeptoren die Zellproliferation und die Expression des Proto-Onkogens c-fos in menschlichen glatten Muskelzellen der Aorta induziert wird (Sato et al., 1994), indem die kalzium-sensitive PKC das kaskadenartige Effektorsystem aus c-Raf-1, MEK-1 und MAP-Kinase (MAPK⁹¹) aktiviert (Megson et al., 2001). Auch wurde beobachtet, dass die H₁-Rezeptoraktivierung ohne Beteiligung der PLC-β zur Aktivierung der Phospholipase A₂ (PLA₂) und zur Freisetzung von Arachidonsäure in Blutplättchen von Menschen und Ratten führt (Murayama et al., 1990). Ein weiteres Effektorsystem, das durch die Aktivierung von H₁-Rezeptoren induziert wird, ist die kalziumunabhängige Aktivierung des ERK-Effektorsystems (ERK⁹²) mit Beteiligung der p42/p44 MAPK, p38MAPK und der c-JNK⁹³ in glatten DDT₁MF-2⁹⁴-Muskelzellen (Robinson und Dickenson, 2001). Außerdem konnte eine Aktivierung des MAPK, PLC-β, Src, PKC-δ und MEK Effektorsystems ohne einer Translokation von phosphoryliertem ERK (pERK) in den Zellkern von HeLa-Zellen⁹⁵ beobachtet werden (Jain et al., 2016).

⁸⁶ Abkürzung CaMK vom Englischen **Ca**²⁺/**cal**modulin-dependent protein **kin**ase

⁸⁷ Phosphorylierung der Aminosäureposition S133 durch die Calcium/Calmodulin-abhängige Protein-Kinase I (Francis et al., 2008)

⁸⁸ Abkürzung eNOS vom Englischen **endothelial Nitric Oxide Synthase**. Durch eine Phosphorylierung der Aminosäureposition S1177 durch die AMP-Kinase, vom **AMP**-activated protein **kin**ase, wird die eNOS aktiviert (Thors et al., 2004).

⁸⁹ Abkürzung iNOs vom Englischen **inducible Nitric Oxide Synthase**

⁹⁰ Abkürzung COS vom Englischen **CV**-1 **origin SV40**. Die COS-Zellen sind immortalisierte Zellen aus dem Nierengewebe einer afrikanischen grünen Meerkatze *Chlorocebus aethiops* (Gluzman, 1981).

⁹¹ Abkürzung MAPK vom Englischen **mitogen activated protein kinase**

⁹² Abkürzung ERK vom Englischen **extracellular regulated kinase**

⁹³ Abkürzung c-JNK vom Englischen **c-Jun N-terminal kinase**

⁹⁴ Es handelt sich um undifferenzierte glatte Muskelzellen aus dem Vas Deferens (Samenleiter) (Dickenson und Hill, 1991).

⁹⁵ HeLa-Zellen sind immortalisierte humane Epithelzellen aus einem Adenokarzinom der Zervix (Lucey et al., 2009).

1.5.5^{3D}-Strukturen des H₁-Rezeptors

Im Jahre 2011 wurde von der Forschergruppe um So Iwata (Shimamura et al., 2011) erstmals der Histamin H₁-Rezeptor⁹⁶ mit dem inversen Agonisten Doxepin⁹⁷ kristallisiert (siehe auch Abbildung 1.10). Bei nur einer 34,6%igen Gesamtsequenzidentität mit dem β_2 AR konnte eine erstaunlich hohe strukturelle Ähnlichkeit zwischen den inaktiven Reptorzuständen des Histamin H₁-Rezeptors und des β_2 AR festgestellt werden (Cordova-Sintjago et al., 2012). Alle hochkonservierten Motive, wie dem D/E-RY-Trimotiv in der TM3, dem CWXP-Motiv in der TM6 und dem NPXXY-Motiv in der TM7 sind beim H₁-Rezeptor vorhanden. Es existiert beim H₁-Rezeptor eine Disulfidbrücke zwischen C100 am Ende der ECL1 und C180 in der ECL2, die bei dem β_2 AR ebenfalls vorhanden ist. Eine zweite Disulfidbrücke befindet sich innerhalb der ECL3, zwischen C441 und C444, die nicht im β_2 AR vorhanden ist. Stattdessen weist der β_2 AR eine Disulfidbrücke innerhalb der ECL2 auf. Ein besonderes Merkmal des H₁-Rezeptors ist sein großer Ligandenbindetascheneingang. Dieser große Eingang wird durch eine Erweiterung in der ECL2⁹⁸ von sieben Aminosäuren ab dem hochkonservierten C180, die für die Disulfidbrücke verantwortlich ist, erreicht (Shimamura et al., 2011; Shiroishi und Kobayashi, 2017). Eine weitere Besonderheit ist, dass sich die TM4 unter Bindung eines inversen Agonisten abknicken kann⁹⁹. Die für die Stabilisierung des inaktiven Rezeptorzustandes zwei wichtigen Ionenbindungen (Kobilka und Deupi, 2007; Rovati et al., 2007), die zwischen dem R125^{3.50} und dem benachbarten D124^{3.49} des D/E-RY-Trimotivs als intrahelikale Ionenbindung und zwischen dem R125^{3.50} des D/E-RY-Trimotivs und dem E410^{6.30} der TM6 als interhelikale Ionenbindung herrschen, sind beim H₁-Rezeptor nicht ausgebildet. Somit fehlt dem Histamin H₁-Rezeptor der „ionic lock“-Rezeptorzustand. Anstelle dafür ist lediglich eine energieärmere Wasserstoffbrückenbindung zwischen R125^{3.50} der TM3 und Q416^{6.36} der TM6 ausgebildet. Dafür existiert beim H₁-Rezeptor eine dem β_2 AR ähnliche „3-7 lock“-Ionenbindung, die zwischen dem D107^{3.32} der TM3 und der *para*-Hydroxygruppe des Y458^{7.43} der TM7 ausgebildet ist (Cordova-Sintjago et al., 2012). Diese Bindung ist somit hauptsächlich für die Arretierung des inaktiven Rezeptorzustandes verantwortlich. Interessanterweise fehlt dem H₁-Rezeptor eine Palmitoylierungsstelle am C-Terminus, die der β_2 AR besitzt und zur Membranverankerung des Rezeptors dient (Shimamura et al., 2011; Panula et al., 2015; Shiroishi und Kobayashi, 2017).

⁹⁶ PDB ID: 3RZE: 3.1 Å aufgelöste Kristallstruktur des H₁R-T4-Lysozym-Komplexes mit dem inversen Agonisten Doxepin, Hierfür wurde ein T4-Lysozym zwischen den beiden Aminosäuren Q222 und G404 in der ICL3 eingefügt und die ersten N-terminalen 19 Aminosäuren (M1-K19) entfernt.

⁹⁷ Doxepin ist ein trizyklisches Antidepressivum mit der chemischen Bezeichnung nach IUPAC: (3E)-3-(6H-benzo[c][1]benzoxepin-11-ylidene)-N,N-dimethylpropan-1-amine (siehe URL-Adresse: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/doxepin#section=3D-Conformer>)

⁹⁸ Im Vergleich besitzt der Dopamin D3-Rezeptor eine Erweiterung in der ECL2 um 4 Aminosäuren, der β_2 AR um 5 Aminosäuren und der Adenosin A_{2A}-Rezeptor um sogar 8 Aminosäuren.

⁹⁹ Die Bindung des Doxepins führt zum Abknicken der TM4 an der Aminosäurenposition P161^{4.59}, so dass die TM4 im extrazellulären Membranbereich sich radial auswärts bewegt. Damit entsteht eine größere orthosterische Ligandenbindetasche und die aromatische Seitenkette des W158^{4.56} kann eine π - π -Stapelbindung mit Doxepin ausbilden.

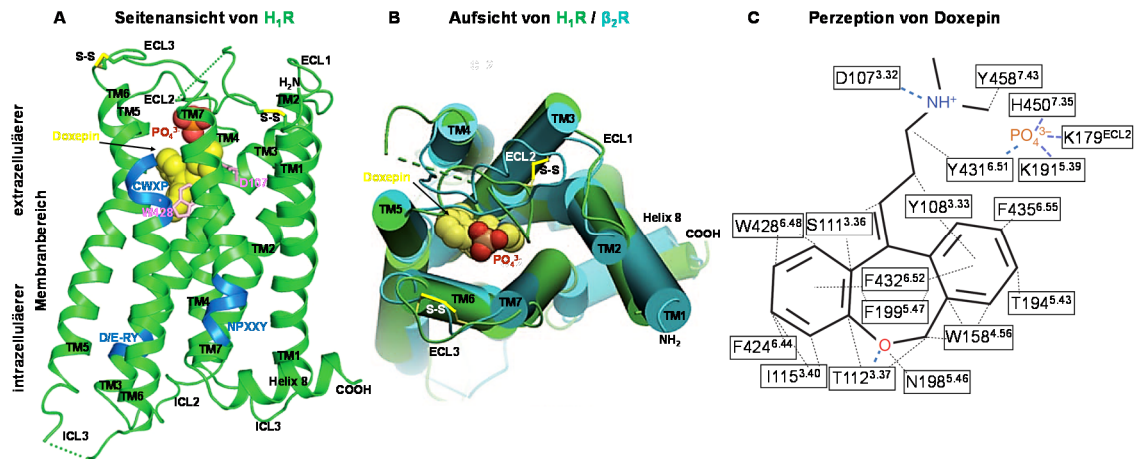


Abbildung 1.10: Inaktiver Rezeptorzustand des H₁-Rezeptors mit Doxepin A zeigt die Kokristallisation des H₁-Rezeptors (grün) mit Doxepin in Seitenansicht. B zeigt die überlagerten Kristallstrukturen der inaktiven Rezeptorzustände des H₁-Rezeptors (grün) und des β_2 AR (türkis) von der extrazellulären Seite. C zeigt Doxepin mit den interagierenden Aminosäuren des H₁-Rezeptors. Doxepin ist als gelbe Kalotte (A, B) und als 2^D-Skelettformel (C) dargestellt. Das Phosphat (PO_4^{3-}) als rot-orange Kalotte (A, B) und als Summenformel (C) dargestellt. Die Disulfidbrücken („S-S“) sind als gelbe Stäbchen hervorgehoben (A, B). Die beiden Aminosäuren W428^{6.48} des CWXP-Motivs in der TM6 und D107^{3.32} der TM3 des D/E-RY-Trimotivs in der TM3 sind als rosa Stäbchenmodelle dargestellt (A). Die drei hochkonservierten Motive D/E-RY, CWXP und NPXXY sind als blaue Helix-Abschnitte in der TM3, TM6 und TM7 hervorgehoben (A). In A ist die Helix 8 mit dem C-Terminus vollständig kristallisiert während der N-Terminus und die ICL3 partiell kristallisiert sind. In B weisen die Transmembrandomänen der beiden überlagerten Rezeptoren eine vergleichbare Anordnung auf, obwohl sie nur eine unter 40%ige Gesamtsequenzidentität besitzen. In C bildet die protonierte, tertiäre Aminogruppe des Doxepins (blau) eine polare Bindung zur negativ-geladenen Carboxygruppe des hochkonservierten D107^{3.32} der TM3 aus (blau gestrichelte Linie). Das Sauerstoffatom (rot) im trizyklischen Ringsystem des Doxepins bildet eine Wasserstoffbrückenbindung zum T112^{3.37} der TM3 aus (blau gestrichelte Linie). Außerdem geht das trizyklische Ringsystem des Doxepins sieben hydrophobe Bindungen mit S111^{3.36} der TM3, mit I115^{3.40} der TM3, mit W158^{4.56} der TM4, mit N198^{5.46} der TM5, mit T194^{5.43} der TM5, mit F424^{6.44} der TM6 und Y458^{7.43} der TM7 ein (schwarz gestrichelte Linien). Zusätzlich können sich energiereiche π - π -Stapelbindungen zwischen dem aromatischen trizyklischen Ringsystem des Doxepins und den aromatischen Seitenketten des Y108^{3.33} der TM3, F199^{5.47} der TM5, des W428^{6.48} des CWXP-Motivs in der TM6, des Y431^{6.51} der TM6, des F432^{6.52} der TM6 und des F435^{6.55} der TM6 ausbilden (schwarz gestrichelte Linien), die den inaktiven Rezeptorzustand stabilisieren. Dabei ist die π - π -Stapelbindung mit dem W428^{6.48} essentiell. Außerdem befindet sich im Eingang der orthosterischen Ligandenbindetasche des H₁-Rezeptors eine Anionenbindestelle („anion binding site“) mit einem Phosphat-Anion¹⁰⁰, um die sich folgende vier Aminosäuren des H₁-Rezeptors anordnen: K179 der ECL2, K191^{5.39} der TM5, Y431^{6.51} der TM6 und H450^{7.35} der TM7 (Shimamura et al., 2011). Stark modifizierte Abbildung aus der Vorlage von Shimamura et al. (2011) **475**: 65–70

Ein Vergleich des inaktiven Rezeptorzustands mit dem des aktiven Rezeptorzustands vom H₁-Rezeptor zeigt, dass Doxepin als auch Histamin an der gleichen Stelle, ca. 14 Å tief¹⁰¹, in der orthosterischen Ligandenbindetasche bindet (Venkatakrishnan et al., 2013). Dabei sind jeweils 15 Aminosäuren in der Ligandenbindetasche für die Bindung von Doxepin oder Histamin verantwortlich (vergleiche Abbildung 1.10 und 1.11). Von diesen Aminosäuren sind 12 Aminosäuren an beiden Liganden beteiligt. Die folgenden drei

¹⁰⁰ Das Phosphat-Anion (PO_4^{3-}) stammt aus dem Kristallisationspuffer des H₁-Rezeptors (Shimamura et al., 2011).

¹⁰¹ Diese Tiefe entspricht etwa ein Drittel der Zellmembrandicke.

Aminosäuren W103^{3.28}, A110^{3.35}, A195^{5.44} sind spezifisch für die Bindung mit Histamin, wobei die W103^{3.28} die wichtige und energiereiche π - π -Stapelbindung ausbildet (Bakker et al., 2004). Die folgenden vier Aminosäuren T112^{3.37} der TM3, I115^{3.40} der TM3, W158^{4.56} der TM4 und F424^{6.44} der TM6 sind spezifisch für die Bindung mit Doxepin, wobei das T112^{3.37} der TM3 eine polare Bindung mit dem Sauerstoffatom des Doxepins eingeht und die anderen drei Aminosäuren hydrophobe bzw. π - π -Stapelbindungen mit dem trizyklischen Ringsystem des Doxepins ausbilden. Eine weitere wichtige Besonderheit des H₁-Rezeptors ist die Anionenbindetasche im Eingangsbereich der Ligandenbindetasche (siehe Abbildung 1.10), die weder in den anderen Histamin-Rezeptorsubtypen noch in den anderen Klasse A Rezeptoren existiert. Sie wird von den folgenden vier Aminosäuren K179 der ECL2, K191^{5.39} der TM5 (Wieland et al., 1999; de Graaf et al., 2011), Y431^{6.51} der TM6 und H450^{7.35} der TM7 gebildet (Shimamura et al., 2011). Diese Anionenbindetasche wurde ausgenutzt, um selektive H₁-Rezeptor-Antihistaminika zu entwickeln. Alle zwitterionischen Antihistaminika interagieren mit der Anionenbindetasche und werden heutzutage als Antihistaminika der zweiten Generation bezeichnet.

Mit Hilfe von computergestützten molekularem Docking und molekulardynamischen Simulationen, basierend auf der Ko-Kristallisation vom H₁-Rezeptor und Doxepin oder der Kristallisation vom Rhodopsin, konnte die Bindung des endogenen Liganden Histamin postuliert werden (Jongejan et al., 2005; Cordova-Sintjago et al., 2012; Söldner et al., 2018). Die Ergebnisse zur Histaminbindung sind in Abbildung 1.11 ersichtlich.

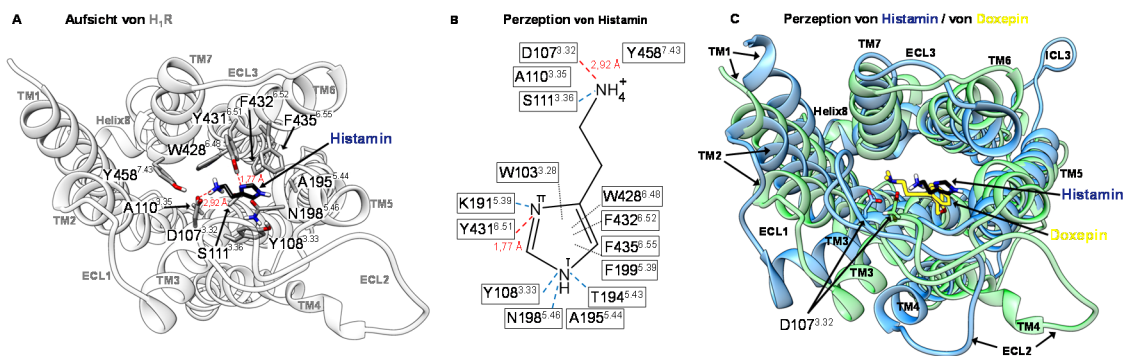


Abbildung 1.11: Aktiver Rezeptorzustand des H₁-Rezeptors mit Histamin A zeigt die Aufsicht des H₁-Rezeptors (hell grau) von der extrazellulären Seite. Die orthosterische Ligandenbindetasche weist das Histamin als Stäbchenmodell (schwarze Kohlenstoffatome, blaue Stickstoffatome und weiße Wassertoffatome) auf. Die funktionellen Seitenketten der Aminosäuren in der Ligandenbindetasche, die mit Histamin wechselwirken, sind als Stäbchenmodell (graue Kohlenstoffatome, blaue Stickstoffatome, weiße Wassertoffatome und rote Sauerstoffatome) räumlich dargestellt. B zeigt Histamin mit den interagierenden Aminosäuren des H₁-Rezeptors. Die protonierte primäre Aminogruppe der Ethylamin-Seitenkette ($pK_s^{102} = 9.75$) (Paiva et al., 1970) des Histamins geht zum einen eine polare Bindung zur Carboxylatgruppe des D107^{3.32} der TM3 (rot gestrichelte Linie, A, B) und zum anderen eine polare Bindung zur Hydroxygruppe des S111^{3.36} der TM3 ein (blau gestrichelte Linie, B). Der Bindungsabstand zur Carboxylatgruppe ist hierbei 1,9 Å (Cordova-Sintjago et al., 2012) oder 2,92 Å (Söldner et al., 2018) oder 2,5 Å (Jongejan et al., 2005). Der Bindungsabstand zur Hydroxygruppe beträgt dabei 2,9 Å (Cordova-

¹⁰² Der pK_s -Wert ist der negativ dekadische Logarithmus der Säurekonstante K_s .

Sintjago et al., 2012) oder 3,1 Å (Jongejan et al., 2005). Die Wechselwirkung mit A110^{3.35} ist noch unklar. Das nicht protonierte Stickstoffatom des Imidazolrings (N^{proS} bzw. N^π) bildet zum einen eine 3,1 Å (Cordova-Sintjago et al., 2012) oder eine 2,9 Å (Jongejan et al., 2005) lange Wasserstoffbrückenbindung (blau gestrichelte Linie, B) zum K191^{5.39} der TM5 (Wieland et al., 1999; Gillard et al., 2002; Bruysters et al., 2004; Bruysters et al., 2005b; Cordova-Sintjago et al., 2012) und zum anderen eine 1,77 Å lange Wasserstoffbrückenbindung (rot gestrichelte Linie, A, B) zum Y431^{6.51} der TM6 aus (Söldner et al., 2018). Das protonierte Stickstoffatom (N^{tele} bzw. N^τ) des Imidazolrings (pK_s = 6,04) (Paiva et al., 1970) bildet mit folgenden drei Aminosäuren polare Bindungen aus (blau gestrichelte Linie, B): *para*-Hydroxygruppe von Y108^{3.33} mit 4 Å (Cordova-Sintjago et al., 2012), Hydroxygruppe von T194^{5.42} der TM5 mit 4.1 Å (Cordova-Sintjago et al., 2012) und die Carbonylgruppe von N198^{5.46} der TM5 mit 2,6 Å (Cordova-Sintjago et al., 2012) oder 3,6 Å (Bruysters et al., 2004; Bruysters et al., 2005b; Jongejan et al., 2005). Die Wechselwirkung mit A195^{5.44} ist noch unklar. Aufgrund der räumlichen Nähe zu den aromatischen Seitenketten der Aminosäuren W103^{3.28} der TM3 (Bakker et al., 2004), F199^{5.47} der TM5, W428^{6.48} des CWXP-Motivs in der TM6, Y431^{6.51} der TM6, F432^{6.52} und F435^{6.55} (Bruysters et al., 2005a) der TM6 bildet der Imidazolring des Histamins hydrophobe Bindungen bzw. π-π-Stapelbindungen (schwarz gestrichelte Linien) aus (Cordova-Sintjago et al., 2012; Mocking et al., 2016; Söldner et al., 2018), die den aktiven Rezeptorzustand stabilisieren. Die Bindung mit dem W428^{6.48} bewirkt einen „rotamer toggle switch“, der wichtig für die Transduktion zum aktiven Rezeptorzustand ist. C zeigt die überlagerten 3^D-Strukturen des inaktiven Rezeptorzustands (grün) mit Doxepin (gelbes Stäbchenmodell) und des aktiven Rezeptorzustands (blau) mit Histamin (schwarzes Stäbchenmodell) von der extrazellulären Seite des H₁-Rezeptors. Beide Liganden befinden sich an der gleichen Stelle in der Ligandenbindetasche. Modifizierte Abbildung aus der Vorlage von Söldner et al. (2018) 24:346

Die postulierten Bindestellen für Histamin konnten mittels Aminosäureaustausche bestätigt werden. Die Austausch von D107^{3.32}A in der TM3 und von F432^{6.52}A in der TM6 führen jeweils zu einem vollständigen Verlust der Histaminbindung (Ohta et al., 1994; Bruysters et al., 2004; Söldner et al., 2018). Die Aminosäureaustausche von S111^{3.36}A, von K191^{5.39}A, von T194^{5.43}A, von N198^{5.46}A, von F435^{6.55}A und von Y458^{7.43}A schwächen jeweils die Histaminbindung stark ab (Ohta et al., 1994; Nonaka et al., 1998; Gillard et al., 2002; Bruysters et al., 2004; Bruysters et al., 2005a; Jongejan et al., 2005; Cordova-Sintjago et al., 2012). Bereits vor dem kristallisierten H₁-Rezeptor konnte ebenfalls durch gezielte Aminosäureaustausche festgestellt werden, dass die Aminosäuren D107^{3.32} der TM3, W158^{4.56} der TM4, K191^{5.39}, T194^{5.43} und N198^{5.46} der TM5, F432^{6.52} und F435^{6.55} der TM6 bei der Bindung anderer inverse Agonisten wie z. B. Acrivastin, Desloratadin, Fexofenadin, Levocetirizin, Meclozin, Mepyramin und Triprolidin beteiligt sind (Ohta et al., 1994; Wieland et al., 1999; Gillard et al., 2002; Panula et al., 2015). Damit binden vermutlich alle vorhandenen inversen Agonisten an der Histamin- bzw. Doxepin-Bindestelle.

Der Unterschied zwischen Histamin- und inverse Agonisten-Bindung liegt darin, dass bei der Histamin-Bindung zwei „rotamer toggle switches“ von S111^{3.36} und von W428^{6.48} erfolgen. Dabei bewegen sich die TM3 zur TM7 und die TM6, die eng an der TM7 liegt, zur TM5. Somit vergrößert sich der Abstand zwischen TM3 und TM6 - ein wesentliches Merkmal für die die Transduktion zum aktiven Rezeptorzustand. Dieser aktive Rezeptorzustand wird durch ein interhelikales Netzwerk aus

Wasserstoffbrückenbindungen um die Aminosäure N460^{7.45} der TM7¹⁰³ stabilisiert (Jongejan et al., 2005). Bei der inversen Agonisten-Bindung erfolgen keine der beiden „rotamer toggle switches“ zum aktiven Rezeptorzustand. Das W428^{6.48} des CWXP-Motivs in der TM6 bildet zum einen vermutlich eine Wasserstoffbrückenbindung zum N460^{7.45} der TM7 und zum anderen π - π -Stapelbindungen zum inversen Agonisten aus, die in erster Linie den inaktiven Rezeptorzustand stabilisieren. Damit ist die radiale Auswärtsbewegung der TM6 im intrazellulären Membranbereich nicht möglich (Jongejan et al., 2005; Panula et al., 2015).

Der endogene Ligand Histamin bindet mit einer kurzen Verweildauer von 15 s in der Ligandenbindetasche des H₁-Rezeptors (Mocking et al., 2016). Im Gegensatz dazu ist die Verweildauer von inversen Agonisten wie Acrivastin mit 936 ± 54 s, Bilastin 4380 ± 300 s, Desloratadin mit 9600 ± 3000 s oder mit 4320 s, Diphenhydramin mit 26 s oder $25,2 \pm 5,4$ s, Doxepin mit 1320 ± 420 s, Fexofenadin mit 3600 ± 1200 s, Levocetirizin mit 8400 ± 1200 s oder mit 12300 s, Mepyramin mit 234 ± 36 s oder mit 74,4 s, Olopatadin mit 10200 ± 600 s und Triprolidin mit 210 ± 240 s deutlich höher (Mocking et al., 2016; Bosma et al., 2017; Bosma et al., 2018). Somit liegt der Unterschied zwischen Histamin- und inverse Agonisten-Bindung in der Verweildauer, die sich in der erhöhten Anzahl an π - π -Stapelbindungen und hydrophoben Bindungen sowie den zusätzlichen polaren Bindungen durch die Anionenbindestelle begründet.

1.6 Mechanosensorik

Die Mechanosensorik bzw. die Mechanorezeption ist die Fähigkeit eines Organismus verschiedene mechanische Reize wie Druck- und Dehnungsreize sowie Drehmomente und Vibrationen wahrzunehmen (Kobayashi und Sokabe, 2010; Chen und Wong, 2013). Dafür werden in erster Linie integrale Membranproteinkomplexe, wie z. B. Ionenkanal- (Martinac, 2004; O'Hagan et al., 2005; Chen et al., 2015) und Zelladhäsionskomplexe (Tzima et al., 2005; Martino et al., 2018) verantwortlich gemacht. Neben diesen mechanosensorischen Proteinkomplexen in der Zellmembran wird auch das intrazelluläre Zytoskelett (Alenghat und Ingber, 2002; Harris et al., 2018) und die extrazelluläre Matrix (Ringer et al., 2017) selbst als mechanorezeptiv diskutiert. Unabhängig von der subzellulären mechanosensorischen Struktur muss durch eine mechanisch induzierte, elektrische oder biochemische Erregung eine genetisch oder epigenetisch Veränderung in der Zelle entstehen (Storch et al., 2012). Dies wird als Mechanotransduktion bezeichnet. Die beiden Prozesse, Mechanorezeption und –transduktion, sind essentiell für zahlreiche physiologische und pathophysiologische Prozesse wie Zellmigration (Eyckmans et al., 2011; Case und Waterman, 2015), Blutdruckregulation (Storch et al., 2012), Knochenhomöostase (Burger und Klein-Nulend, 1999; Raisz, 1999; Cowin, 2002; Klein-Nulend et al., 2013; Duffy und Jacobs,

¹⁰³ Das interhelikale Netzwerk von N460^{7.45} der TM7 besteht aus Wasserstoffbrückenbindungen zu S111^{3.36} der TM3, zu S114^{3.39} der TM3, zu R125^{3.50} der TM3 und zu D73^{2.50} des NLXXXD-Motivs in der TM2, und aus zwei weiteren Wasserstoffbrückenbindungen, die zwischen D73^{2.50} und N464^{7.49} des NPXXY-Motivs in der TM7 und zwischen der Carboxylatgruppe des D107^{3.32} und der *para*-Hydroxygruppe des Y458^{7.43} bestehen (Jongejan et al., 2005; Bakker et al., 2008; Cordova-Sintjago et al., 2012; Mocking et al., 2016).

2015), Miktion (Aizawa et al., 2017), Defäkation, Hunger- und Sättigungsregulation (Alcaino et al., 2017; Treichel et al., 2018), Lungenmechanik (Han et al., 2004; Orr et al., 2006; Goridis, 2017) Tastempfinden (Roudaut et al., 2012), Propriozeption (Woo et al., 2015), Gleichgewichtssinn (Garcia-Anoveros und Corey, 1997), Hören (Gillespie und Muller, 2009; Sotomayor et al., 2012), Allodynie (Thurm, 2001; Roudaut et al., 2012), Atherosklerose (Hahn und Schwartz, 2009), Lugenhochdruck (Bloodworth et al., 2015; Bertero et al., 2016; Dieffenbach et al., 2018), Bluthochdruck (Retailleau et al., 2015; Qi et al., 2016; Bersi et al., 2017), Hypertrophie des Herzens (Zou et al., 2004), Knochenschwund (Osteoporose), Taubheit (Usher Syndrom) (Kazmierczak et al., 2007), Muskelschwund (Muskeldystrophie), Myopathie (Corpeno Kalamgi et al., 2016; Kalamgi und Larsson, 2016), Lungenfibrose (Liu et al., 2015a; Chen et al., 2016; Tschumperlin et al., 2018) und Krebs (Orr et al., 2006; Hoffman et al., 2011). Während in der Haut, in den Skelettmuskeln, in den Sehnen, in bestimmten stark innervierten Blutgefäßabschnitten, im Herzen und im Innenohr von Säugetieren gut charakterisierte und abgrenzbare mechanosensitive Zellen wie Ruffini-Körperchen, Meissner Körperchen, Merkel-Zellen, Pacini-Korpuskeln, Muskelspindeln, Golgi-Sehnenorgane, Barorezeptoren und Haarsinneszellen existieren, sind in den nicht oder kaum innervierten Blutgefäßabschnitten die hinreichenden Kriterien für mechanosensitive Endothelzellen und für mechanosensitive glatte Gefäßmuskelzellen nicht bekannt (Thurm, 2001; Roudaut et al., 2012; Alcaino et al., 2017; Kultz-Buschbeck et al., 2017). Die Mechanosensorik kann durch weitere spezifische rezeptive Leistungen wie z. B. Diskriminationsfähigkeit, Reizschwelle, Ansprechcharakteristik, Sensitivität, rezeptive Feldgröße, Geschwindigkeit und Adaptationsvermögen charakterisiert werden (Thurm, 2001; Roudaut et al., 2012).

Die ersten und am besten untersuchten mechanosensitiven Ionenkanäle waren aus dem Darmbakterium *Escherichia coli*, die sich als Reaktion auf eine erhöhte laterale, seitliche Spannung in der Zellmembran öffneten (Martinac et al., 1987). Bei einer starken osmotischen Wandspannung¹⁰⁴ (Turgordruck) schützen diese mechanosensitiven Ionenkanäle¹⁰⁵ vor einer Lyse durch Perforation der Bakterienhülle (Levina et al., 1999; Balleza, 2012; Kocer, 2015). In der Zellmembran werden wässrige Poren¹⁰⁶ als sogenannte Druckventile gebildet, die den Ausstrom von osmotisch-aktiven Teilchen aus dem Zytosol in den Extrazellularraum ermöglichen. Dadurch wird der Turgordruck auf die Bakterienhülle verringert (Kung et al., 2010). Ein stark erhöhter Turgordruck von ca. 250 mmHg, was einer Zunahme von 10 mM osmotisch-aktiven Teilchen im Zytosol entspricht, führt zur Bakterienlyse (Booth et al., 2015). Die Forschergruppe um Ian Booth konnte zeigen, dass doppelt $MscS^-$ und $MscL^-$ gendefiziente Bakterien bei einem

¹⁰⁴ Ein Turgordruck von 5 - 8 mNm^{-1} öffnet $MscS$ und von 10 - 14 mNm^{-1} öffnet $MscL$ (Nakayama et al., 2013).

¹⁰⁵ Mechanosensitiver Ionenkanal mit einer mini-Leitfähigkeit von 0,3 - 0,4 nS ($MscM$ = mechanosensitive mini conductance ion channel), mit einer kleinen Leitfähigkeit von 1 nS ($MscS$ = mechanosensitive small conductance ion channel (Bass et al., 2002), der $MscK$ = K^+ -dependent channel (Kung et al., 2010)) und mit einer großen Leitfähigkeit von 3 nS [$MscL$ = mechanosensitive large conductance ion channel (Chang et al., 1998; Kung et al., 2010)]

¹⁰⁶ Wässrige Poren mit 16 Å Durchmesser in $MscS$ (Kung et al., 2010) und mit 25 – 30 Å in $MscL$ (Perozo et al., 2002a; Booth et al., 2015)

hypoosmotischen Schock lysieren, da sie den erhöhten Turgordruck beim Einstrom von Wassermolekülen nicht mehr senken können (Levina et al., 1999; Booth et al., 2015). Mit dem Einbringen der beiden aufgereinigten MscS- und MscL-Wildtyp-Ionenkanäle in künstliche Membranen konnte sogar gezeigt werden, dass die mechanische Aktivierbarkeit unabhängig von weiteren zellulären Strukturen und Proteinen erfolgt (Sukharev et al., 1993; Perozo et al., 2002a; Perozo et al., 2002b; Sukharev, 2002; Najem et al., 2015). Eukaryotische mechanosensitive Ionenkanäle werden in Epithelzellen exprimiert und können in mechanosensitiven Ionenkanalkomplexen mit weiteren Proteinen assoziiert sein. Elektrophysiologische Aufzeichnungen von Gehörzellen waren die ersten Experimente, die die Existenz von mechanosensitiven Ionenkanälen nahelegten (Ashmore, 1991). Im Innenohr sitzen auf der apikalen Membranoberfläche sensorischer Haarzellen Stereozilien¹⁰⁷, die in abnehmender Höhe aneinandergereiht sind (siehe Abbildung 1.12). Die mechanische Kraft, die durch Schallwellen oder durch Kopfbewegungen auf die Haarzelle übertragen wird, verbiegt das Stereozilienbündel und öffnet einen mechanisch aktivierbaren Ionenkanalkomplex¹⁰⁸, das einen Ioneneinstrom in die Haarzelle und eine Membrandepolarisation auslöst. Neuere Untersuchungen zeigen einen zweiten mechanosensitiven nicht-selektiven Kationenkanal Piezo2¹⁰⁹ (siehe Abbildung 1.12), der an der apikalen Oberfläche der Haarzellen exprimiert wird und die intrazelluläre Kalziumkonzentration reguliert (Wu et al., 2017b).

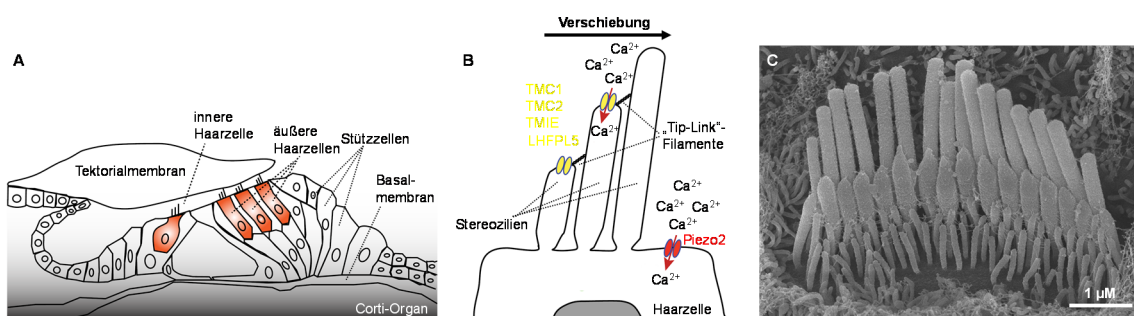


Abbildung 1.12: Das Corti-Organ Querschnitt durch das Corti-Organ mit den inneren und äußeren Haarzellen (rot), den Stützzellen, der Basalmembran und der Tektorialmembran. Nur die äußeren Haarzellen sind mit der Tektorialmembran verbunden (A). Schematische Darstellung der apikalen Membran einer Haarzelle mit Stereozilien, die über die sogenannten „Tip-Link“-Filamente verbunden sind. Der mechanosensitive Ionenkanalkomplex aus vier integralen Membranproteinen TMC1, TMC2, TMIE und LHFPL5 (gelb) und der mechanosensitive nicht-selektive Kationenkanal Piezo2 (rot) bewirken einen

¹⁰⁷ Die Spitzen der Stereozilien sind mit "Tip Link"-Filamenten bestehend aus den beiden Cadherinen, Cadherin 23 und Protocadherin 15, zu einem Stereozilienbündel miteinander verbunden. Mutationen in den beiden Cadherin-Genen, CDH23 und PCDH15, sind aufgrund des Fehlens der "Tip Link"-Filamente mit einer unorganisierten Bündelung der Stereozilien und mit einer vererbten Form von Taubheit und Erblindung, dem sogenannten Usher Syndrome Typ 1 (USH1) im Menschen assoziiert (Orr et al., 2006; Kazmierczak et al., 2007; Sotomayor et al., 2012).

¹⁰⁸ Mechanosensitiver Ionenkanalkomplex setzt sich aus vier integralen Membranproteinen TMC1 (transmembrane channel like 1), TMC2 (transmembrane channel like 2), TMIE und LHFPL5 [weitere Bezeichnung als TMHS (tetraspan membrane protein of hair cell stereocilia)] zusammen. Der mechanosensitive Ionenkanalkomplex ist am unteren Ende der „Tip-Link“-Filamente lokalisiert (Kurima et al., 2015), das einen nicht selektiven Kationeneinstrom reguliert (Zhao und Muller, 2015).

¹⁰⁹ Vom Griechischen πίεση (píesi) mit der Bedeutung „Druck“. Die beiden nicht-selektiven Kationenkanäle Piezo1 (Synonym: Fam38a) und Piezo2 (Synonym: Fam38b) sind große integrale Membranproteine mit 20 - 40 Transmembrandomänen. Die mechanische Aktivierung von Piezo-Kanälen führt zu einem nicht-selektiven Einstrom von Kationen (Coste et al., 2010; Xiao und Xu, 2010; Coste et al., 2012; Bagriantsev et al., 2014).

Kaziumeinstrom in die Haarzelle an der apikalen Haarzellmembran (B), was eine Membrandepolarisation verursacht. Elektronenmikroskopische Aufnahme der Stereozilien von einer inneren Haarzelle (C). Modifizierte Abbildungen aus den Vorlagen Wu et al. (2017) *Nature Neuroscience* **20**: 24-33 und Zhao und Müller (2015) *Current Opinion in Neurobiology* **34**:172-179)

Ein weiterer mechanosensitiver Kanalkomplex aus der Superfamilie der sogenannten DEG/ENaC-Ionenkanäle¹¹⁰ wurde zuerst im Fadenwurm *Caenorhabditis elegans* entdeckt. Mit Hilfe des mechanosensitiven Kanalkomplexes kann der Fadenwurm leichte Berührungen wahrnehmen (Corey und Garcia-Anoveros, 1996; Mano und Driscoll, 1999; O'Hagan et al., 2005). Weitere Vertreter der DEG/ENaC-Superfamilie wie Del-1, Unc-8 und Unc-105 sind porenbildende Untereinheiten von mechanosensitiven Ionenkanalkomplexen der mechanosensorischen Motorneurone von Nematoden, die für die Propriozeption entscheidend sind (Mano und Driscoll, 1999; Arnadottir und Chalfie, 2010). Des Weiteren beinhaltet die Superfamilie der DEG/ENaC die säuresensitiven ASIC-Ionenkanäle¹¹¹, die in mechanosensorischen Nervenendigungen der Haut, des Gastrointestinaltrakts, der Skelettmuskulatur und der Gefäße exprimiert werden (Lingueglia, 2007; Chen und Wong, 2013; Omerbasic et al., 2015). In den letzten Jahren wurden zahlreiche mechanosensitive Ionenkanäle wie die nicht-selektiven Kationenkanäle Piezo1 und Piezo2 (Coste et al., 2010; Coste et al., 2012), wie Mitglieder aus der Familie der K₂P-Kaliumkanäle¹¹² (Dedman et al., 2009; Brohawn, 2015), die spannungsabhängigen selektiven Kv-Kaliumkanäle¹¹³ (Morris et al., 2015), wie Mitglieder aus der Superfamilie der TRP-Kanäle¹¹⁴, sowie der purinerge ligandengesteuerte P2X₄-Kationenkanal (Kessler et al., 2011; Forst et al., 2016), der cAMP-gesteuerte CFTR¹¹⁵-Chloridkanal (Zhang et al., 2010) und Mitglieder aus der Familie der OSCA/TMEM63 Kanäle (Jojoa-Cruz et al., 2018; Murthy et al., 2018; Zhang et al., 2018) entdeckt.

¹¹⁰ Der mechanosensitive Kanalkomplex aus der DEG/ENaC-Superfamilie setzt sich aus den beiden porenbildenden Proteinen MEC-4 und MEC-10 zusammen, die zur Familie der **D**egenerine (DEG) gehören und mit den epithelialen Natriumkanälen (ENaC = **e**pithelial **N**atrium **c**hannel) verwandt sind. Frühere Arbeiten konnten zeigen, dass die beiden porenbildenden Proteine, MEC-4 und MEC-10, mit zwei weiteren Proteinen, dem humanen Protein Stomatin-ähnlichen MEC-2 und dem Paraoxonase-ähnlichen Membranprotein MEC-6 Protein zu einem Kanalkomplex assoziieren (Arnadottir und Chalfie, 2010; Xiao und Xu, 2010). Dieser mechanosensitive Kanalkomplex ist mit der ECM und dem Zytoskelett verbunden (Fronius und Clauss, 2008). MEC-4 kann zum einen Homotrimer oder zum anderen Heterotrimer mit MEC-10 in einem 2:1-Verhältnis ausbilden, was die Kanalpore darstellt (Chen et al., 2015).

¹¹¹ Abkürzung ASIC vom Englischen **A**cid-**S**ensing **I**on **C**hannel

¹¹² Die Familie der K₂P-Kaliumkanäle (**two pore domain K⁺ channels**) mit den mechanosensitiven TREK-Kanälen (**TWIK-Related K⁺ channels**) TREK1 (Berrier et al., 2013) und TREK2 (Chemin et al., 2005) und dem TRAAK-Kanal (**TWIK-related arachidonic acid stimulated K⁺ channel**) (Arnadottir und Chalfie, 2010; Brohawn et al., 2012; Brohawn et al., 2014; Brohawn, 2015).

¹¹³ Abkürzung Kv vom Englischen **K⁺-selective voltage gated potassium channel**. Sowohl eine Änderung der intrinsischen Kraft in der Lipid-Doppelschicht bei einem mechanischen Reiz als auch eine Änderung der Membranspannung aktiviert Kv-Kanäle (Schmidt et al., 2012; Morris et al., 2015). Eine neuere Untersuchung zeigt, dass bei Berührungen in somatosensorischen Neuronen der Trigemini- und Hinterwurzelganglien ein Kaliumstrom durch spannungsabhängige selektive Kv1.1-Kaliumkanäle stattfindet. Es wird vermutet, dass die spannungsabhängigen selektiven Kv1.1-Kanäle die Schwelle des Aktionspotentials festlegen (Hao et al., 2013).

¹¹⁴ Mitglieder der Superfamilie der TRP-Kanäle mit TRPA1, TRPN (auch NompC) (Cheng et al., 2010; TRP4 (Li et al., 2006)), TRPV1, TRPV2, TRPV4, TRPP1, TRPP2, TRPP3, TRPP4, TRPC1 (Maroto et al., 2005), TRPC3, TRPC5 (Shen et al., 2015; Lau et al., 2016), TRPC6 (Spasova et al., 2006), TRPY1, TRPM3, TRPM4, TRPM7 und TRPML3 (Pedersen und Nilius, 2007; Inoue et al., 2009; Arnadottir und Chalfie, 2010; Xiao und Xu, 2010; Zhang et al., 2010; Eijkelkamp et al., 2013; Hill-Eubanks et al., 2014; Plant, 2014; Liu und Montell, 2015).

¹¹⁵ Abkürzung CFTR vom Englischen **c**ystic **f**ibrosis **t**ransmembrane **c**onductance **r**egulator

Im Gegensatz zu den mechanosensitiven Ionenkanalkomplexen sind mechanosensitive Zelladhäsionskomplexe wichtig für die Zellmigration, für die Zell-Zell- und für die Zell-ECM-Adhäsionsverbindungen (Chen et al., 2004). Bei einem mechanischen Reiz werden Zelladhäsionsproteine wie z. B. die fokale Adhäsionskinase FAK¹¹⁶, die Tyrosinkinase c-Src¹¹⁷, Talin¹¹⁸, Vinculin¹¹⁹, p130Cas¹²⁰, Kindlin¹²¹, Paxillin und Zyxin¹²² (Smith et al., 2014; Malik-Sheriff et al., 2018) sowie das Vasodilatator-stimulierte Phosphoprotein VASP¹²³ an die fokalen Adhäsionskomplexe¹²⁴ rekrutiert, wodurch Aktinfilamente (F-Aktin) des Zytoskeletts¹²⁵ über die transmembranären Integrinrezeptoren¹²⁶ an die ECM gebunden werden (Byron und Frame, 2016; Martino et al., 2018). Außerdem werden kleine monomerische G-Proteine wie z. B. RhoA, Rac und Cdc42 aktiviert (Jansen et al., 2015; Burrige und Guilluy, 2016; Jansen et al., 2017). Das GTP-gebundene RhoA aktiviert zum einen die Formin-verwandten Proteine wie z. B. p140mDia, das eine Polymerisation von Aktinfilamenten hervorruft und zum anderen die ROCK, das eine Phosphorylierung der leichten Myosin II-Kette bewirkt. Die GTP-gebundenen Rac und Cdc42 katalysieren die Aktivierung des Wiskott-Aldrich-Syndrom Proteins WASP, das den Arp2/3-Komplex aktiviert und die Polymerisation von Aktinfilamenten induziert (Jaffe und Hall, 2005). Zudem werden mechanosensitive Transkriptionsfaktoren wie YAP¹²⁷ und TAZ¹²⁸ in den Zellkern transloziert, die die zelluläre Genexpression regulieren (Dupont et al., 2011; Cho et al.,

¹¹⁶ Die fokale Adhäsionskinase ist eine 125 kDa große zytosolische Tyrosinkinase (Xiong und Parsons, 1997).

¹¹⁷ Die Abkürzung c-Src setzt sich aus den beiden englischen Begriffen **cellular** und **sarcoma** zusammen.

¹¹⁸ Talin mit einer molaren Proteingröße von ca. 270 kDa besitzt elf Bindestellen für Vinculin und drei Bindestellen für F-Aktin (Critchley und Gingras, 2008; Ziegler et al., 2008; Ringer et al., 2017). Es ist der wichtigste Bindungspartner zwischen den Integrinen und den intrazellulären Aktomyosinfasern in fokalen Adhäsionskomplexen (Ziegler et al., 2008; Hoffman et al., 2011; Atherton et al., 2016).

¹¹⁹ Vinculin mit einer molaren Proteingröße von 116 kDa bindet direkt an F-Aktin (Ziegler et al., 2006; Huang et al., 2017)

¹²⁰ Abkürzung p130Cas vom Englischen p130 **Crk-associated substrate**

¹²¹ Die Familie der Kindlin-Proteine (Kindlin 1, 2 und 3) bindet auf der intrazellulären Membranseite an die β -Untereinheit von Integrinen und reguliert die Funktion der Integrine (Meves et al., 2009).

¹²² Zyxin besitzt eine N-terminale prolinreiche VASP-Bindedomäne und drei C-terminale Zink-bindende LIM-Domänen (Uemura et al., 2011).

¹²³ Das Vasodilatator-stimulierte Phosphoprotein VASP fördert die Polymerisation von Aktinfilamenten (Wu und Gunst, 2015).

¹²⁴ Bei den fokalen Adhäsionskomplexen handelt es sich um Zellmembran verankernde Komplexe aus 232 Zelladhäsionsproteinen (Byron und Frame, 2016; Wolfgang und José Luis, 2016; Ringer et al., 2017). Sie sind mit Aktinstressfasern, aber auch mit Mikrotubuli und Intermediärfilamenten verbunden (Jansen et al., 2015).

¹²⁵ Die tragende Struktur des Zytoskeletts ist bei den Säugetieren aus filamentösen Aktinpolymeren (F-Aktin, $\varnothing = 6$ nm), den Intermediärfilamenten ($\varnothing = 10$ nm) und Mikrotubuli ($\varnothing = 23$ nm) aufgebaut, wobei Mikrotubuli und Aktinpolymere polare Filamente mit zwei strukturell unterschiedlichen Enden sind, die in der Lage sind Stoß- und Zugkräfte bei der Polymerisation zu erzeugen. Im Gegensatz dazu sind die Intermediärfilamente unipolar und stabiler (Jansen et al., 2017).

¹²⁶ Integrine sind transmembranäre Adhäsionsproteine, die Heterodimere aus α - und β -Untereinheiten sind. Beim Menschen existieren insgesamt 18 α - und 8 β -Untereinheiten, die zur Ausbildung von 24 unterschiedlichen Heterodimeren führen (Hynes, 2002; Arnaout et al., 2005; Campbell und Humphries, 2011). Heterodimere Integrine sind bidirektionale Transmembranrezeptoren, die das Aktin-Zytoskelett mit der ECM verknüpfen und somit für die Zell-ECM-Adhäsion verantwortlich sind (Chen et al., 2004; Jansen et al., 2015; Jansen et al., 2017). Die extrazelluläre Domäne der Integrine bindet Proteine der ECM wie z. B. Fibronectin, Vitronectin, Kollagen und Laminin (Ringer et al., 2017) sowie das vaskuläre (VCAM-1) und interzelluläre Zelladhäsionsprotein (ICAM-1) (Hynes, 2002). Die intrazelluläre Domäne der Integrine ist über die fokalen Adhäsionsproteine, wie z. B. Talin, Vinculin und Kindlin mit Aktinfilamenten des Zytoskeletts verbunden (Calderwood et al., 2013; Atherton et al., 2016; Byron und Frame, 2016; Jansen et al., 2017).

¹²⁷ Abkürzung YAP vom Englischen **Yes-associated protein**

¹²⁸ Abkürzung TAZ vom Englischen **transcriptional co-activator with PDZ-binding motif**

2017; Jansen et al., 2017). Insgesamt kommt es zu verstärkten Kontraktionen des Actomyosin-Komplexes (Chrzanowska-Wodnicka und Burridge, 1996; Burridge und Guilly, 2016; Martino et al., 2018). Die Kontraktionen bewirken zudem eine Vergrößerung der fokalen Adhäsionskomplexe (Murrell et al., 2015; Jansen et al., 2017; Pandya et al., 2017). Diese vergrößerten Adhäsionskomplexe übertragen intrazelluläre, Actomyosin-generierte Stoß- und Zugkräfte auf die ECM, wodurch die Zelle während der Zellmigration nach vorne bewegt wird (Atherton et al., 2016). Zahlreiche weitere zelluläre Strukturen, transmembranäre und zytosolische Proteine wurden entdeckt, die eine Schlüsselrolle bei der Mechanotransduktion spielen wie z. B. die MAPK (Jansen et al., 2015; Jansen et al., 2017), VCAM¹²⁹ und ICAM¹³⁰ (Wolfgang und José Luis, 2016). Im Gegensatz zu den Integrinrezeptoren bilden Cadherine Zell-Zell-Adhäsionsverbindungen zwischen benachbarten Zellen aus (Wolfgang und José Luis, 2016). Die Cadherine wie z. B. das VE-Cadherin¹³¹ sind an der Mechanorezeption im vaskulären Endothel¹³² beteiligt (Barry et al., 2015) und bilden zudem die Endothelbarriere aus, die für die Gefäßpermeabilität entscheidend ist (Gavard, 2014).

Im vaskulären System herrschen zwei unterschiedliche Arten mechanischer Stimulationen, die die Morphologie der Endothelzellen definieren. Erstens, der Blutdruck, der als Perfusionsdruck die Gefäßwand ausdehnt (Hahn und Schwartz, 2009) und zweitens, der Blutfluss, der tangential, laterale Fluss-induzierte Scherkräfte auf die Endothelzellen ausübt (Davies, 2009; Hoffman et al., 2011; Hill-Eubanks et al., 2014). Die auf die Endothelzellen wirkende Fluss-induzierte Scherkraft ist proportional zur Blutviskosität und zur Geschwindigkeit des Blutflusses. Unter physiologischen Bedingungen sind menschliche Endothelzellen Scherkräften von 1 - 6 dyn cm⁻² im venösen und 10 - 40 dyn cm⁻² (dela Paz und D'Amore, 2009) bzw. 10 - 70 dyn cm⁻² im arteriellen Gefäßsystem mit einem arteriellen Durchschnittswert von 20 dyn cm⁻² ausgesetzt (Papaioannou und Stefanadis, 2005; Zhou et al., 2014). Diese Fluss-induzierte Scherkraft wirkt auf die apikale Zelloberfläche von Endothelzellen, die von einer Glykokalyx mit einer Schichtdicke von ca. 150 - 400 nm (Weinbaum et al., 2003; Weinbaum et al., 2007; Curry und Adamson, 2012; Tarbell und Shi, 2013) in vitro sowie 180 - 520 µm in vivo (Potter und Damiano, 2008; Savery und Damiano, 2008; Davies, 2009) bedeckt sind. Die mechanische Stimulation von Endothelzellen durch Fluss-induzierte Scherkräfte führt zur Umstrukturierung des endothelialen Aktinzytoskeletts

¹²⁹ Abkürzung VCAM vom Englischen **v**ascular **c**ell **a**dhesion **m**olecule

¹³⁰ Abkürzung ICAM vom Englischen **i**ntercellular **c**ell **a**dhesion **m**olecule

¹³¹ VE-Cadherin (vom Englischen **V**ascular **E**ndothelial-**C**adherin) ist mit β-Catenin an der Stabilisierung der endothelialen Zell-Zell-Adhäsionsverbindungen beteiligt (Gavard, 2014)

¹³² Alle Blutgefäße mit Ausnahme der Kapillaren besitzen den gleichen anatomischen Aufbau mit einer äußeren Schicht, der Tunica externa auch bekannt als Tunica adventitia, einer mittleren Schicht, der Tunica media und einer inneren Schicht, der Tunica intima (dela Paz und D'Amore, 2009). Die Tunica intima wird von einer einlagigen Zellschicht aus Endothelzellen, dem sogenannten Endothel (vom Lateinischen: endothelium), ausgekleidet, die dem Blutfluss ausgesetzt sind (Papaioannou und Stefanadis, 2005). Vaskuläre Endothelzellen sind flache Zellen mit einer Höhe von 0,2 µm am äußeren Zellrand bis 3 µm über dem Zellkern. Die glatten Gefäßmuskulzellen befinden sich dagegen in der Tunica intima, der am stärksten ausgeprägte Gefäßschicht (Seidel, 1997).

(Osborn et al., 2006) über die Wechselwirkung der ECM mit den Integrinen (Jalali et al., 1998) und den Intermediärfilamenten (Helmke et al., 2000).

Die Mechanorezeption der Endothelzellen auf Fluss-induzierte Scherkräfte soll durch einen mechanosensitiven Zelladhäsionskomplex bestehend aus VE-Cadherin, PECAM-1¹³³ und dem Tyrosinkinaserzeptor VEGFR2¹³⁴ vermittelt werden (Tzima et al., 2005; Conway et al., 2013). Ein weiterer Tyrosinkinaserzeptor Tie1¹³⁵ wird auch als Mechanosensor bei der Vermittlung von Scherkräften im Endothel diskutiert (Porat et al., 2004; Woo et al., 2011).

Darüber hinaus wurden viele weitere Mechanosensoren in Endothelzellen entdeckt (Johnson et al., 2011) wie z. B. GPCR mit dem Sphingosin-1-Phosphat-Rezeptor 1 (S1P₁), dem Bradykinin-B₂-Rezeptor (B2R) (Chachisvilis et al., 2006), dem GPR68-Rezeptor (Iloff und Xu, 2018; Xu et al., 2018) und dem purinergen P2Y₂-Rezeptor (Wang et al., 2015), heterotrimere G-Proteine (Gudi et al., 2003; Wang et al., 2015), nicht selektive Kationenkanäle wie TRPV4 (Hill-Eubanks et al., 2014; Du et al., 2016), TRPP2 (Forman et al., 2005; Sharif-Naeini et al., 2009), TRPC1 (Kerstein et al., 2013), Piezo1 und Piezo2 (Coste et al., 2010; Coste et al., 2012; Murthy et al., 2017; Wu et al., 2017a; Beech und Xiao, 2018), nicht-bewegliche primäre Zilien (Nauli et al., 2013), die endotheliale Glykokalyx (Secomb et al., 2001; Florian et al., 2003; Weinbaum et al., 2003; Tarbell et al., 2005; Bai und Wang, 2012; Curry und Adamson, 2012; Tarbell und Shi, 2013; Kang et al., 2017) und die sackförmigen Einstülpungen der Zellmembran, die sogenannten Caveolae (Stan, 2005) mit den Proteinen Caveolin1 (Yu et al., 2006) Caveolin2 und Caveolin 3 sowie Cavin1, Cavin2 und Cavin3 (Tzima et al., 2005; Johnson et al., 2011).

1.6.1 Fluss-induzierte Vasodilatation

Eine atheroprotektive Reaktion des Endothels wird durch die Fluss-induzierte Vasodilatation beschrieben, indem der laminare Blutfluss Fluss-induzierte Scherkräfte erzeugt, die den vaskulären endothelialen Wachstumsrezeptor VEGFR2 ligandenunabhängig aktivieren und eine NO-vermittelte Vasodilatation über eine kaskadenartige Aktivierung von PI3K, Akt und eNOS hervorrufen (Jin et al., 2003), indem die Akt-abhängige Phosphorylierung der eNOS zur endothelialen NO-Freisetzung und schließlich zur Vasodilatation des Gefäßes und zum Senken des Blutdrucks führt.

¹³³ PECAM-1 (vom Englischen **p**latelet **e**ndothelial **c**ell **a**dhesion **m**olecule) ist ein Thrombozyten-Endothelzellen-Adhäsionsmolekül, das auch unter der Bezeichnung Cluster of Differentiation 31 (CD31) bekannt ist.

¹³⁴ Der vaskuläre endotheliale Wachstumsrezeptor VEGFR2 (vom Englischen **v**ascular **e**ndothelial **g**rowth **f**actor **r**eceptor **2**) bindet an vaskuläre endotheliale Wachstumsfaktoren und ist an der Ausbildung neuer Blut- und Lymphgefäße (Angiogenese) beteiligt.

¹³⁵ Tie1 (vom Englischen **T**yrosine **k**inase with **I**mmunoglobulin-like and **E**GF **h**omology **1**) soll einerseits die embryonale Gefäßneubildung fördern und andererseits bei der Entwicklung einer Atherosklerose im Erwachsenenalter beteiligt sein (Porat et al., 2004; Woo und Baldwin, 2011; Woo et al., 2011).

1.6.2 Kriterien für die intrinsische Mechanosensitivität von Membranproteinen

Folgende notwendige und hinreichende Bedingungen müssen integrale Membranproteine erfüllen, um als Mechanosensoren zu gelten (Christensen und Corey, 2007; Arnadottir und Chalfie, 2010; Storch et al., 2012; Ranade et al., 2015; Syeda et al., 2016):

- Das mechanosensitive Membranprotein sollte in einer mechanosensitiven Zelle exprimiert sein und der Verlust dieses Proteins durch gendefiziente oder expressionsreduzierende Strategien sollte die Mechanosensitivität dieser Zelle stark reduzieren oder sogar eliminieren.
- Idealerweise sollte eine heterologe Expression des mechanosensitiven Membranproteins in einer nicht mechanosensitiven Zelle als heterologe Überexpressionsstrategie zu mechanosensitiven Zellreaktionen führen.
- Die oben aufgeführten zwei Strategien sollten auf Gewebe- und Organebene sowie im ganzen Organismus in situ bzw. in vivo entsprechende Ergebnisse erzielen.
- Die Ansprechcharakteristik und die Geschwindigkeit des Membranproteins sollten adäquat zur mechanosensitiven Reaktionszeit der Zelle sein, z. B. bei Ionenkanälen weniger als 5 ms, bei GPCR weniger als 500 ms und bei membrangebundenen Enzymen weniger als 50 μ s (Xiao und Xu, 2010; Storch et al., 2012).
- Das mechanosensitive Membranprotein sollte seine Mechanosensitivität behalten, wenn es aufgereinigt in eine künstliche und reine Lipidmembran eingebracht wird.
- Gezielte Aminosäureaustausche im Membranprotein sollten Eigenschaftsveränderungen in seiner Mechanosensitivität erzeugen.
- Die Stärke des mechanischen Stimulus sollte mit dem mechanosensitiven Effekt auf der Proteinebene und als zelluläre Antwort korrelieren.

1.6.3 Arten von äußeren mechanischen Krafteinwirkungen

Die äußere Einwirkung von mechanischer Kraft auf isolierte Zellen kann durch Anlegen von Fluss-induzierten lateralen Scherkräften, durch Membrandehnung, die durch Ansaugen der Zelle mit Unterdruck in der sogenannten „cell-attached“-Konfiguration oder durch Aufblähen der Zelle in der Ganzzellkonfiguration mit Überdruck über einer Glaspipette erreicht werden. Des Weiteren kann die Zellmembran durch eine punktuelle Ausübung von Druck auf einen Membranfleck manipuliert werden. Änderungen des osmotischen Druckgradienten können eine osmotisch bedingte Zellschwellung durch die extrazelluläre Applikation hypoosmotischer Lösungen induzieren. Jedoch ist die Zellschwellung als mechanischer Stimulus weniger artefaktfrei im Vergleich zu anderen mechanischen Krafteinwirkungen wie Scherkräfte oder einfache Druckapplikationen. Die hypoosmotische Zellschwellung durch den Wassereinstrom birgt die Gefahr, dass zusätzliche Effekte von den verdünnten intrazellulären Ionenkonzentrationen kommen.

Alle aufgeführten mechanischen Reize führen zur Beeinflussung der Oberflächenspannung¹³⁶ der Lipid-Doppelschicht (Ranade et al., 2015).

1.6.4 Vorstellungsmodelle zur Kraftübertragung auf Membranproteine

Die Zellmembran der Säugetiere setzt sich aus amphiphilen Phospholipiden zusammen, die jeweils aus einem polaren hydrophilen Phosphatkopf und zwei hydrophoben Kohlenwasserstoffketten aus Fettsäuren aufgebaut ist. Die hydrophoben Fettsäureketten assoziieren über hydrophobe Wechselwirkungen miteinander, während die polaren hydrophilen Köpfe mit wässriger Umgebung und miteinander in Wechselwirkung treten und eine ca. 30 Å (Andersen und Koeppe, 2007), 36 Å (de Meyer und Smit, 2009) bis 42.5 Å (Mitra et al., 2004) dicke Lipid-Doppelschicht ausbilden (Singer und Nicolson, 1972), die das wässrige Zytosol von dem Extrazellularraum abtrennt. Die biologischen Membranen besitzen die Eigenschaft, einen mechanischen Reiz auf die darin eingebetteten Proteine zu übertragen (Balleza, 2012). Es gibt drei unterschiedliche Möglichkeiten der mechanischen Aktivierung von integralen Membranproteinen in der Lipid-Doppelschicht (Christensen und Corey, 2007; Inoue et al., 2009; Arnadottir und Chalfie, 2010; Mederos y Schnitzler et al., 2011; Storch et al., 2012; Zanini und Gopfert, 2013):

- Erstens, das Membranmodell¹³⁷ nimmt an, dass die mechanische Kraft eine Änderung im Druck-Spannungsprofil der Zellmembran ausübt, die einen direkten Einfluss auf das Protein selber hat und dadurch Bewegungen von flexiblen Strukturen des Proteins stattfinden, die zu einer Konformationsänderung führen. Das bedeutet, dass flexible Strukturen im Membranprotein sensitiv auf Änderungen des Druck-Spannungsprofils der Zellmembran reagieren. Erstmals bestätigte sich das Membranmodell bei aufgereinigten bakteriellen mechanosensitiven Ionenkanälen in künstlichen Membranen aus Asolecithin (Sukharev et al., 1993).
- Zweitens, das Verankerungsmodell¹³⁸ besagt, dass das integrale Membranprotein an intrazelluläre Strukturen wie z. B. das Zytoskelett oder extrazellulären Strukturen wie die Glykocalyx oder sogar gleichzeitig an beiden Strukturen gebunden bzw. verankert ist. Auf einen mechanischen Reiz hin werden diese intrazellulären Verankerungsstrukturen bewegt, die eine passive Relativbewegung des integralen Membranproteins zu den mechanosensitiven Verankerungsstrukturen auslöst, wodurch eine Konformationsänderung im Membranprotein stattfindet.
- Drittens, das indirekte Modell beruht darauf, dass ein anderes intrinsisches mechanosensitives Protein die mechanische Erregung an das integrale Membranprotein weiter gibt. Damit ist das integrale Membranprotein im eigentlichen Sinne ein Mechanotransduktor.

¹³⁶ Die Oberflächenspannung ist die Kraft [N/m], die tangential auf eine Flüssigkeitsoberfläche bzw an einer Vakuum/Gas-Flüssigkeit-Grenzfläche wirkt.

¹³⁷ Das FFL-„Force-From-Lipid“-Prinzip (Teng et al., 2015)

¹³⁸ Das „tethered“-Modell (Zanini und Gopfert, 2013; Martinac, 2014)

Nur wenn das Membranmodell auf ein integrales Membranprotein zutrifft, spricht das für eine intrinsische Mechanosensitivität des Membranproteins. Das Membranprotein ist der Mechanosensor und bleibt weiterhin bei der Integration in eine künstliche Lipid-Doppelschicht mechanosensitiv unabhängig von weiteren zellulären Proteinen, sekundären Botenstoffen und extra- und intrazellulären Strukturen wie ECM und Zytoskelett.

1.6.5 Intrinsisches Kraftprofil mit lateralem Druck-Spannungsprofil in der Lipid-Doppelschicht

Die Membrandehnung kann Konformationsänderungen in integralen Membranproteinen verursachen, die die Membranpermeabilität, die Lipiddiffusion und die Organisation von Lipidflößen (lipid rafts) beeinflussen können. Das intrinsische Kraftprofil in einer Lipid-Doppelschicht „Force from Lipid“ (Anishkin et al., 2014; Teng et al., 2015) wird als die Richtung, Betrag und Tiefe entlang einer Lipid-Doppelschicht definiert. Es wird vermutet, dass der erhöhte laterale Druck in der Nähe der wässrigen Grenzflächen durch die verringerte laterale Kraft zur Mitte der Lipid-Doppelschicht hin kompensiert wird (Cantor, 1997). Das laterale Druck-Spannungsprofil der Lipid-Doppelschicht (siehe Abbildung 1.13) beschreibt, dass eine starke laterale Kraft in der Nähe der hydrophilen Köpfe und der Lipidhalse vorzufinden ist und durch Abstoßungskräfte der lipophilen Fettsäureketten und hydrophilen Kopfgruppen in der entspannten Lipid-Doppelschicht ausgeglichen wird (Anishkin et al., 2014), wobei auch Kräfte auf die Protein-Lipid-Grenzfläche wirken (Kung, 2005). Somit liegt der Nettobetrag des lateralen Druck-Spannungsprofils bei einer ruhenden, entspannten Lipid-Doppelschicht, die keine äußere Krafteinwirkung widerfährt, bei gleich Null (Gullingsrud und Schulten, 2004; Marsh, 2007). Transmembranäre Proteine sind viel weniger komprimierbar als die Lipid-Doppelschicht, was bedeutet, dass die Lipid-Doppelschicht 100- bis 1000-fach weicher als die eingebetteten Proteine ist und sich somit an das integrale Membranprotein anpasst (Andersen und Koepe, 2007). Eine Membrandehnung kann die Struktur der Lipid-Doppelschicht verdünnen, eine Stauchung die Struktur der Lipid-Doppelschicht verdichten, wodurch die laterale Spannung in der Lipid-Doppelschicht erhöht und eine hydrophobe Fehlpaarung an der Protein-Lipid-Grenzfläche erzeugt wird (Anishkin et al., 2014). Somit verursacht die Deformation der Lipid-Doppelschicht z. B. durch Membrandehnung oder Stauchung einen Energieaufwand, so dass transmembranäre Membranproteine ihre Konformation zugunsten einer Konformation mit einer kleineren hydrophoben Fehlpaarung an der Protein-Lipid-Grenzfläche einstellen, die zudem von der Lipid-Doppelschicht stabilisiert wird. Die Lipid-Doppelschicht dient somit als allosterischer Regulator der Membranproteinfunktion (Andersen und Koepe, 2007).

Während eine ruhende Zellmembran das integrale Membranprotein wie z. B. einen mechanosensitiven Ionenkanal in einer definierten Form hält, kann jeder Einfluss in das System z. B. in Form einer Membrandehnung oder das Einbringen von amphiphilen Substanzen wie z. B. Lokalanaesthetika oder Lysophospholipiden mit unterschiedlichen

Fettsäurelängen (Perozo et al., 2002b) zu einer Änderung der Oberflächenspannung zwischen der Wasser-Lipid-Grenzfläche, einer Deformation, Krümmung und einer Änderung des intrinsischen Kraftprofils in der Lipid-Doppelschicht führen. Somit wird ein in der Lipid-Doppelschicht eingebettetes, transmembranäres Protein wie z. B. ein Ionenkanal dazu veranlagt, eine andere Konformation einzunehmen (Perozo et al., 2002b; Kung et al., 2010; Kocer, 2015).

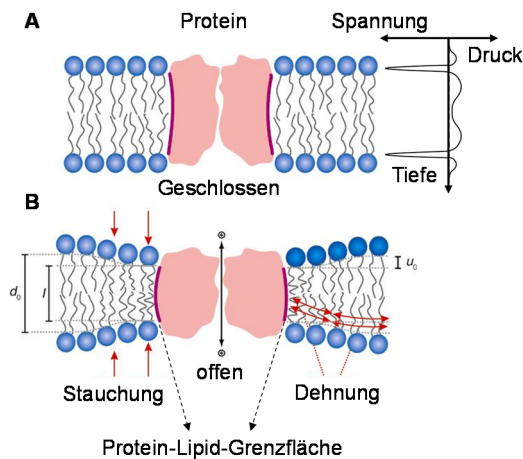


Abbildung 1.13: Laterales Druck-Spannungsprofil mit Membranmodell Lipid-Doppelschicht mit transmembranärem Protein (rosa), wo hydrophile Köpfchen in blau und hydrophobe, lipophile Fettsäurereste in grau dargestellt sind. Das integrale Protein befindet sich in einem geschlossenen Zustand in einer ruhenden, ungestörten Lipid-Doppelschicht. Rechts befindet sich ein laterales Druck-Spannungsprofil (intrinsisches Kraftprofil). Bei einer ungestörten Lipid-Doppelschicht stimmt die hydrophobe Proteinlänge (l) mit der Dicke der ruhenden, Lipid-Doppelschicht (d_0) überein ($l = d_0$) (A). Eine Membrandehnung oder Stauchung der Lipid-Doppelschicht stört die optimale

Übereinstimmung zwischen dem integralen Membranprotein und der Lipid-Doppelschicht: Die hydrophobe Länge des Proteins ist nun gegenüber der Dicke der Doppelschicht verändert u_0 ($l \neq d_u$). Durch die Membrandehnung oder Stauchung passen sich die hydrophoben Phospholipide an das hydrophobe Protein an, das dadurch eine energetisch günstigere Konformation einnimmt. Stark modifizierte Abbildung aus der Vorlage Andersen und Koeppel (2007) Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct. **36**:107–30

1.6.6 Myogener Tonus

Die autonome myogene Vasokonstriktion auf einen erhöhten intravaskulären Druck von präkapillaren Widerstandsgefäßen mit einem Innendurchmesser kleiner als $150 \mu\text{M}$ (Davis und Hill, 1999) schützt das nachfolgende Kapillarbett vor durch einen erhöhten Blutfluss bedingte Gefäßschädigungen und Durchblutungsstörungen. Somit gewährt die vaskuläre Autoregulation des Blutflusses einen konstanten Blutfluss im Kapillarbett, so dass die Sauerstoffversorgung lebenswichtiger Organe trotz Schwankungen des arteriellen Blutdrucks aufrechterhalten werden kann (Mederos y Schnitzler et al., 2008; Kauffenstein et al., 2012). Im Nierenkreislauf verhindert sie die Übertragung von erhöhten intravasalen Drücken auf die glomerulären Kapillaren, die zur Nierenschädigung und Entwicklung einer Proteinurie führen können. Die Autoregulation des zerebralen Blutflusses schützt das Gehirn vor einer Schädigung durch eine Zunahme des hydrostatischen Kapillardrucks (Roman und Van Dokkum, 2014). Die vaskuläre myogene Autoregulation, die auch unter der Bezeichnung „Myogener Tonus“ oder „Bayliss-Effekt“ bekannt ist, wurde schon im Jahre 1902 von William Maddock Bayliss beobachtet (Bayliss, 1902). Der myogene Tonus dient somit zur Aufrechterhaltung eines basalen Gefäßtonus, des peripheren Widerstandes, einer Autoregulation des Blutflusses und zur Aufrechterhaltung des hydrostatischen Kapillardrucks (Davis und Hill, 1999; Mederos y Schnitzler et al., 2008; Storch et al., 2012; Blodow et al., 2014; Mederos et al., 2016b). Die Dehnung der Gefäßwand auf

einen erhöhten Blutdruck depolarisiert glatte Gefäßmuskelzellen, die auf einen Kalziumeinstrom über spannungsgesteuerte L-Typ Kalziumkanäle (LTCC¹³⁹) und über eine Kalzium - Calmodulin vermittelte Phosphorylierung der 20 kDa leichten Myosinkette durch die Myosin-leichte-Ketten-Kinase (MLCK¹⁴⁰) kontrahieren und die myogene Vasokonstriktion auslösen (Mederos y Schnitzler et al., 2008; Kauffenstein et al., 2012; Roman und Van Dokkum, 2014). Die myogene Vasokonstriktion findet unabhängig vom Endothel (Bevan und Laher, 1991) und vom vegetativen Nervensystem statt (Blodow et al., 2014), was an denervierten und isolierten Gefäßabschnitten sowie an Organen belegt werden konnte (Bayliss, 1902; Davis und Hill, 1999). Es wurde schon in verschiedenen Arterien und Arteriolen des Gastrointestinaltraktes wie z. B. Mesenterialarterien (Blodow et al., 2014; Storch et al., 2015), des Herzens, der Niere und des zentralen Nervensystems untersucht (Osol et al., 2002; Jarajapu et al., 2008). Die Aufklärung der Mechanosensoren mit den zugrundeliegenden molekularen Mechanismen der myogenen Vasokonstriktion glatter Muskelzellen war und ist immer noch Gegenstand der Forschung der Arbeitsgruppen um Prof. Dr. rer. nat. Michael Mederos y Schnitzler und Dr. rer. nat. Ursula Storch am Walther-Straub-Institut in München.

1.6.7 Mechanosensitive GPCR

Im Jahre 2004 konnten Issei Komuro und Kollegen zum ersten Mal zeigen, dass der G_{q/11}-Protein gekoppelte Angiotensin II AT₁-Rezeptor bei mechanischer Stimulation ohne Beteiligung des Peptidhormons Angiotensin II in vivo als auch in vitro eine Rolle bei der Entwicklung einer belastungsinduzierten Herzhypertrophie spielt. Die Verwendung des inversen Agonisten Candesartan konnte die belastungsinduzierte Herzhypertrophie signifikant unterdrücken (Zou et al., 2004; Yasuda et al., 2008a). Zwei Jahre später wurde beschrieben, dass Immunzellen, insbesondere neutrophile Leukozyten, die aus HL60-Zellen stammen, temporäre Ausstülpungen der Zellmembran, die sogenannten Pseudopodien auf flussvermittelte Scherkräfte rückbildeten. Für diese Scherkraft induzierte Rückbildung der Pseudopodien kam nur der G_{i/o}-Protein gekoppelte Formylpeptidrezeptor Typ1 FPR₁ als Mechanosensor in Frage. Durch die Verwendung inverser Agonisten konnte die konstitutive Rezeptoraktivität des Formylpeptidrezeptors unterdrückt und die Rückbildung der Pseudopodien verhindert werden (Makino et al., 2006; Storch et al., 2012). Eine weitere Untersuchung konnte zeigen, dass der in Endothelzellen der Rinderaorta (BAEC¹⁴¹) überexprimierte Bradykinin B₂-Rezeptor in Abwesenheit des endogenen Liganden durch Fluss-induzierte Scherkräfte (30 dyn cm⁻²), sowie durch Membrandehnung mit hypoosmolarer Lösung (142 mOsm kg⁻¹) als auch durch eine erhöhte Membranfluidität durch Benzylalkohol (15 mM) aktiviert wurde. Diese mechanische Aktivierung des Bradykinin B₂-Rezeptors konnte unter Applikation eines

¹³⁹ Abkürzung LTCC vom Englischen voltage gated L-type calcium channel

¹⁴⁰ Abkürzung MLCK vom Englischen myosin light chain kinase

¹⁴¹ Abkürzung BAEC vom Englischen bovine aortic endothelial cell

selektiven B_2 -Rezeptorantagonisten (10 μM HOE140) signifikant unterdrückt werden (Chachisvilis et al., 2006; Storch et al., 2012).

Einen Einblick in den molekularen Mechanismus der mechanischen Aktivierung von GPCR konnte zum ersten Mal mit Hilfe der SCAM-Methode (SCAM¹⁴²) am Angiotensin II AT_1 -Rezeptor gewonnen werden. Die mechanische Aktivierung des AT_1 -Rezeptors durch Membrandehnung führte im Gegensatz zur Agonistenstimulation zur Rotation der TM7 gegen den Uhrzeigersinn in die orthosterische Ligandenbindetasche (siehe Abbildung 1.14). Der inverse Agonist Candesartan konnte die mechanische Rezeptoraktivierung unterdrücken, indem zwei Wasserstoffbrückenbindungen zwischen der Carboxylatgruppe des Candesartans einerseits zum Q257 der TM6 und andererseits zum T287 der TM7 ausgebildet werden und die Rotationsbewegung der TM7 sterisch verhindern und einen inaktiven Rezeptorzustand des AT_1 -Rezeptors stabilisieren (Yasuda et al., 2008a; Yasuda et al., 2008b; Akazawa et al., 2009; Sharif-Naeini et al., 2010). Somit führt die mechanische Aktivierung des AT_1 -Rezeptors zu einer weiteren aktiven, der Agonisten induzierten unterschiedlichen Rezeptorkonformation. Durch Membrandehnung bewegt sich die TM7 gegen den Uhrzeigersinn in die orthosterische Ligandenbindetasche (Yasuda et al., 2008a; Yasuda et al., 2008b; Storch et al., 2012), wohingegen die Agonistenstimulation zu einer radialen 14 Å Auswärtsbewegung der TM6 auf der intrazellulären Membranseite des β_2 AR (siehe Abbildung 1.2) führt (Rasmussen et al., 2007; Rasmussen et al., 2011b; Kobilka, 2013).

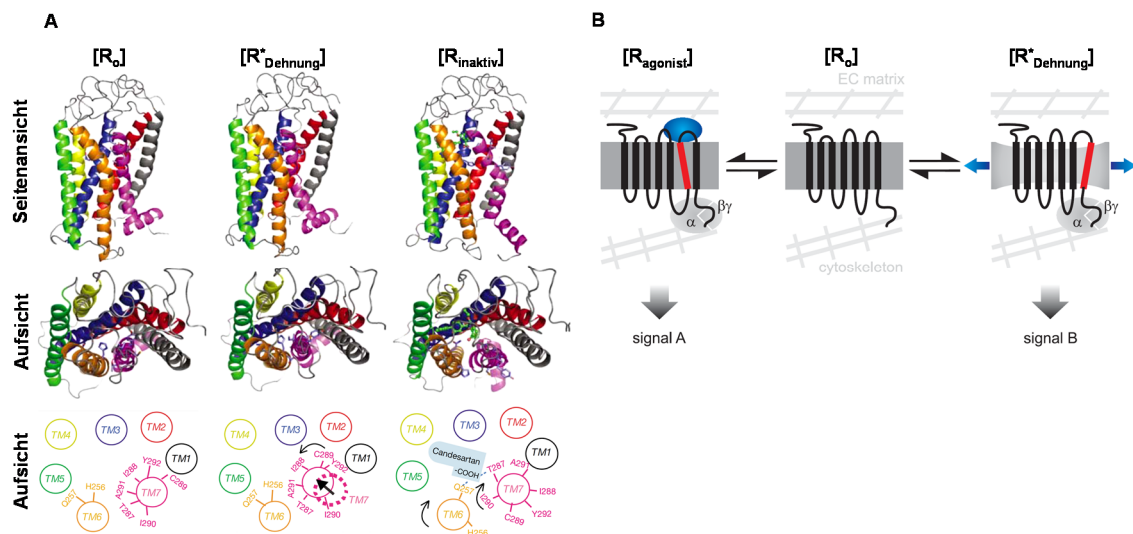


Abbildung 1.14: Rezeptormodell des AT_1 -Rezeptors mit unterschiedlichen Rezeptorzuständen in der Seitenaufsicht (A und B) und in der extrazellulären Aufsicht (A). GPCR können in unterschiedlichen Rezeptorzuständen vorliegen: Inaktiver Grundzustand in Abwesenheit eines Liganden [R_0], Agonisten-induzierter aktiver [R^*_{Agonist}] oder mechanisch induzierter aktiver [R^*_{Dehnung}] Rezeptorzustand sowie ein mit dem inversen Agonisten Candesartan stabilisierter inaktiver Rezeptorzustand [R_{inaktiv}].

¹⁴² Abkürzung SCAM vom Englischen substituted cysteine accessibility mapping. Mit Hilfe der SCAM-Methode können die Aminosäuresequenz sowie die funktionellen Zustände von Transmembranproteinen bestimmt werden. Hierfür wird jede in einer Transmembrandomäne befindliche Aminosäure einzeln nacheinander zu Cystein mutiert. Die auf diese Weise mutierten integralen Proteine werden anschließend heterolog in Zellen exprimiert und mit Sulfhydrylreagenzien (Methanithiosulfonat = MTS) behandelt, was zur Ausbildung einer irreversiblen Disulfidbrückenbindung führt (Javitch et al., 1995; Karlin und Akabas, 1998). Meistens wird die SCAM-Methode zur Bestimmung der orthosterischen Ligandenbindung von Transmembranproteinen benutzt.

Stattfindende Konformationsänderungen in den TM, die zu den beiden aktiven Rezeptorzuständen $[R^*_{\text{Agonist}}]$ und $[R^*_{\text{Dehnung}}]$ führen, sind als schwarze Pfeile (A) bzw. als rote Rechtecke (B) dargestellt. Der Agonist wird durch eine blaue Ellipse (B) und die Membrandehnung durch zwei entgegengesetzte blaue Pfeile (B) hervorgehoben. Das Zytoskelett (cytoskeleton) und die ECM (EC matrix) (B) sind in hellgrau dargestellt. Diese beiden unterschiedlichen aktiven Rezeptorkonformationen $[R^*_{\text{Agonist}}]$ und $[R^*_{\text{Dehnung}}]$ können des Weiteren unterschiedliche Effektorsysteme (signal A und B) anstoßen. Modifizierte Abbildungen aus den Vorlagen Yasuda et al. (2008) EMBO Rep. **9**:179-186 und Storch et al. (2012) Am J Physiol **302**:H1241-1249

In früheren Untersuchungen konnte von den Arbeitsgruppen um Prof. Dr. Michael Mederos y Schnitzler und PD Dr. Ursula Storch sowohl auf zellulärer Ebene und als auch in Blutgefäßen gezeigt werden, dass $G_{q/11}$ -Protein gekoppelte Rezeptoren wie der Histamin H_1 - (H_1R), der muskarinische M_5 - (M_5R), der Angiotensin II AT_1 - (AT_1R), der Endothelin ET_A (ET_{AR}), der Vasopressin V_{1A} -Rezeptor (V_{1AR}) und der Cysteinyl-Leukotrienrezeptor Typ1 (CysLT₁R) in Abwesenheit endogener Agonisten intrinsisch mechanosensitiv sind (Mederos y Schnitzler et al., 2008; Mederos y Schnitzler et al., 2011; Storch et al., 2012; Blodow et al., 2014; Storch et al., 2015; Mederos et al., 2016a).

Des Weiteren konnte die Arbeitsgruppe um Howard Allan Rockman und Kollegen eine G-Protein unabhängige β -Arrestin-2 Rekrutierung bei einer mechanischen Aktivierung des Angiotensin II AT_1 -Rezeptors bestätigen, die zu einer Phosphorylierung des AT_1 -Rezeptors durch die beiden GPCR-Kinasen GRK5 und GRK6 und einer anschließenden Aktivierung der extrazellulär-regulierten Kinasen ERK1/2 führt (Rakesh et al., 2010; Barauna et al., 2013). Bei einer Membrandehnung des AT_1 -Rezeptors wird ebenso die β -Arrestin-2 vermittelte Signalkaskade angestoßen wie mit allosterischen Modulatoren, die bevorzugt eine β -Arrestin-2 Rekrutierung anstelle einer G-Protein Aktivierung induzieren. Das bedeutet, dass die Membrandehnung wie ein allosterischer Modulator fungiert (Tang et al., 2014). Eine weitere Arbeitsgruppe um Jose Eduardo Krieger konnte zeigen, dass der Angiotensin II AT_1 -Rezeptor in Abwesenheit des endogenen Liganden Angiotensin II durch Scherkräfte (15 dyn cm^{-2} , 10 Minuten lang) aktiviert wird und eine ERK1/2-Aktivierung in CHO¹⁴³-K1-Zellen hervorruft, die durch den inversen Agonisten Candesartan und den selektiven $G_{q/11}$ -Protein Inhibitor YM-254890 vollständig unterdrückt werden konnten (Barauna et al., 2013).

Von den bisher untersuchten G-Protein gekoppelten Rezeptoren (siehe Abbildung 1.15) zeigte der Histamin H_1 -Rezeptor in der absteigenden Reihenfolge $H_1R > AT_1R > M_5R > V_{1AR}$ die ausgeprägteste Mechanosensitivität (Mederos y Schnitzler et al., 2008; Storch et al., 2012). Daher wurde der Histamin H_1 -Rezeptor in diesem Projekt auf molekularer Ebene genauer untersucht.

¹⁴³ Abkürzung CHO vom Englischen Chinese Hamster Ovary

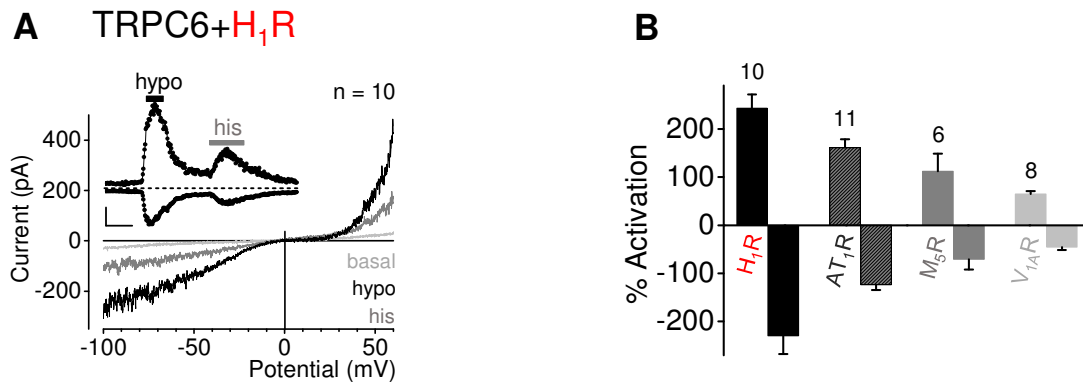


Abbildung 1.15: Mechanische Aktivierung von G_{q/11}-Protein gekoppelten Rezeptoren Die Koexpression von einem nicht selektivem TRPC-Kationenkanal (TRPC6) zusammen mit einem G_{q/11}-Protein gekoppelten Rezeptor (H₁R, M₅R, AT₁R, ET_AR und V_{1A}R) erzeugte mechanisch induzierbare einwärts- und auswärtsgerichtete Kationenströme in HEK293-Zellen bei Applikation einer hypoosmolaren Lösung in der Ganzzelleableitung (Mederos y Schnitzler et al., 2008). Es sind die Strom-Spannungs-Kurven mit dem Strom (pA) in der Ordinate und der Spannung (mV) in der Abszisse für den H₁R unter Basalaktivität (basal), bei mechanischer (hypo) sowie bei Agonisten Stimulation (his) dargestellt (A). Zudem wird der Strom-Zeit-Verlauf bei mechanischer und Agonisten Stimulation des H₁R gezeigt (A). Im Gegensatz dazu, zeigte die alleinige Überexpression des nicht-selektiven Kationenkanals TRPC6 keine Kationenströme auf einen mechanischen Reiz hin (Mederos y Schnitzler et al., 2008). Bemerkenswerterweise führte der mechanosensitive H₁R im Vergleich zu dem AT₁R, dem M₅R und dem V_{1A}R zu maximalen TRPC6-vermittelten Kationenströmen unter mechanischer Stimulation mit hypoosmolarer Lösung (B). Modifizierte Abbildung aus der Vorlage Mederos y Schnitzler et al. (2008) *Embo J* **27**:3092-3103

Weitere in der Literatur als intrinsisch mechanosensitiv deklarierte GPCR, die auf Fluss-induzierte Scherkräfte reagieren, sind der G_s-Protein gekoppelte Dopamin D₅-Rezeptor in primären Zilien des vaskulären Endothels (Abdul-Majeed und Nauli, 2011), der G_{i/o}-Protein gekoppelte Sphingosin-1-Phosphat Rezeptor Typ1 S1P₁R (Kauffenstein et al., 2012) in Gefäßendothelzellen bei der Angiogenese (Jung et al., 2012), der G_s-Protein und G_{q/11}-Proteingekoppelte Parathormonrezeptor Typ1 PTH₁R (Zhang et al., 2009) und der G_{i/o}-Protein gekoppelte Serotoninrezeptor Typ1B 5-HT_{1B} (Candelario und Chachisvilis, 2012; Wang et al., 2013b) in Prä-Osteoblasten¹⁴⁴ sowie der G_i-Protein gekoppelte Apelinrezeptor AplnR, der für die planare Polarisierung von vaskulären Endothelzellen von Bedeutung ist. Dadurch können sich die Endothelzellen parallel zur Blutflussrichtung ausrichten und den Strömungswiderstand senken (Kwon et al., 2016; Zhao et al., 2016). Außerdem wurde in der Literatur beschrieben, dass auch der Apelinrezeptor wie der zuvor beschriebene Angiotensin II AT₁-Rezeptor agonistenunabhängig zu einer belastungsinduzierten Herzhypertrophie beitragen kann, indem eine persistierende mechanische Aktivierung des Apelinrezeptors AplnR zur Vergrößerung von Kardiomyozyten führt (Scimia et al., 2012). Eine indirekte mechanische Stimulation von purinergen P2Y₆-Rezeptoren in Kardiomyozyten löst dagegen eine belastungsinduzierte Herzfibrose aus, indem Pannexin-1 zur Freisetzung von extrazellulärem Uridindiphosphat führt, das an den P2Y₆-Rezeptor bindet und eine

¹⁴⁴ Prä-Osteoblasten sind Vorläuferzellen von knochenbildenden Osteoblasten, die das Knochenwachstum regulieren.

G_{12/13}-Protein vermittelte Signalkaskade anstoßt (Nishida et al., 2008). Ein weiterer purinergere Rezeptor, der G_{q/11}-Protein gekoppelter P2Y₂-Rezeptor überträgt Fluss-induzierte Scherkräfte auf das Endothel und ist somit an der Blutdruckregulation beteiligt (Wang et al., 2015; Sathanoori et al., 2017). Außerdem wurde gezeigt, dass die beiden Chemokinrezeptoren CXCR1 und CXCR2 in Endothelzellen bei der durch Scherkräfte vermittelten Migration von Endothelzellen wie z. B. bei der Wundheilung beteiligt sind. Sowohl die mRNA-Expression der beiden Chemokinrezeptoren als auch die bei der Zellmigration zurückgelegte Strecke stieg bei zunehmenden Beträgen Fluss-induzierter Scherkräfte (5,56 dyn cm⁻², 10,02 dyn cm⁻² und 15,27 dyn cm⁻²) an (Zeng et al., 2011; Zeng et al., 2012). Eine im Jahre 2018 veröffentlichte Studie konnte einen neuen mechanosensitiven GPCR, den Waisen-GPR68 in Endothelzellen aufdecken, der an der Fluss-induzierten Vasodilatation von Widerstandsgefäßen dritter Ordnung beteiligt sein soll (Ilf und Xu, 2018; Xu et al., 2018). Eine im Anfang 2019 veröffentlichte Arbeit konnte zeigen, dass eine Heteromerisierung des mechanosensitiven Angiotensin II AT1-Rezeptors mit dem mechanosensitiven Bradykinin B2-Rezeptor eine Präeklampsie mit Bluthochdruck bei Schwangeren verursacht (Quitterer und AbdAlla, 2019; Quitterer et al., 2019).

1.6.8 Adhäsions-G-Protein gekoppelte Rezeptoren

In jüngsten Untersuchungen wurden neue mechanosensitive GPCR aus der zweitgrößten Familie der GPCR-Superfamilie (Fredriksson et al., 2003), die Adhäsions-G-Protein gekoppelten Rezeptoren (aGPCR¹⁴⁵), entdeckt. Bisher wurden sechs Vertreter aus der Familie der Adhäsions-G-Protein gekoppelten Rezeptoren als mechanosensitive Proteine beschrieben (Scholz et al., 2016b):

- Der bei der belastungsinduzierten Skelettmuskelhypertrophie beteiligte G_{12/13}-Protein-gekoppelte Rezeptor 56 (GPR56) (Yona et al., 2008; White et al., 2014).
- Der an der mechanischen Myelinisierung durch Schwann-Zellen beteiligte G_s-Protein-gekoppelte Rezeptor 126 (GPR126) (Petersen et al., 2015).
- Der in den Chordotonal-Neuronen der Fruchtfliege (*Drosophila melanogaster*) exprimierte und an der Propriozeption beteiligte Latrophilin/CIRL Adhäsions-G-protein gekoppelte Rezeptor (ADGRL) (Scholz et al., 2015).
- Die konstitutiv aktive, lange ungespaltene Isoform des G_s-Protein gekoppelten murinen 114 (GPR 114) mit nur einer unterschiedlichen Aminosäure Q230 in der Stachelsequenz reagiert mechanosensitiv auf Schüttelbewegungen, wohingegen die zweite lange ungespaltene Isoform in Nagetieren, die kein Q230 in der Stachelsequenz aufweist, nicht mechanosensitiv ist (Wilde et al., 2016).
- Der an der Lungenhomöostase beteiligte G_{q/11}-Protein-gekoppelte 116 (GPR 116). Die Sekretion und Aufnahme von oberflächenaktiven Surfactant-Proteinen von

¹⁴⁵ Abkürzung aGPCR vom Englischen Adhesion G-protein coupled receptor

epithelialen AT2-Zellen in der Lunge wird über eine $G_{q/11}$ -Protein vermitteltes Effektorsystem gesteuert, das wahrscheinlich durch die mechanische Dehnung von AT2-Zellen bei der Lungenexpansion ausgelöst wird (Brown et al., 2017).

- Der epidermale Wachstumsfaktor-Rezeptor E2 (EMR2/ADGRE2), der zur Ausbildung einer Nesselsucht (*vibratory urticaria*) auf Hautvibrationen bei Patienten mit einer p.C492Y Mutation in der GAIN-Domäne führt. Diese p.C492Y Mutation führt zu einer erhöhten Rezeptoraktivität bei mechanischer Stimulation, was letztendlich zu einer Degranulation von Histamin durch Mastzellen führt (Boyden et al., 2016).

Eine Besonderheit von Adhäsions-G-Protein gekoppelten Rezeptoren ist, dass sie einen langen extrazellulären N-Terminus besitzen, der durch eine Autoproteolyse¹⁴⁶, jeweils in ein N-terminales Fragment (NTF) und ein C-terminales Fragment mit sieben Transmembrandomänen (CTF) gespalten wird (Yona et al., 2008). Durch die Autoproteolyse kommt es zur Freisetzung einer in der GAIN-Domäne vorhandenen und noch an den N-Terminus des Adhäsions-G-Protein gekoppelten Rezeptors gebundenen Sequenz, der als sogenannter „Stachel“ bezeichnet wird und vermutlich als ein „tethered“ Peptidagonist an das C-terminale Fragment des Adhäsions-G-Protein gekoppelten Rezeptor bindet und diesen aktiviert (Scholz et al., 2016b; Wilde et al., 2016). Einige Vertreter der Adhäsions-G-Protein gekoppelten Rezeptoren werden nicht autoproteolytisch in ein NTF und ein CTF gespalten. Dennoch besitzen sie eine „Stachel“ Sequenz in der GAIN-Domäne, die den Rezeptor aktivieren kann (Krishnan et al., 2016). Es wird vermutet, dass eine Konformationsänderung in der GAIN-Domäne den „Stachel“ für eine Perzeption mit dem CTF zugänglich macht (Scholz et al., 2016a). Da die Adhäsions-G-Protein gekoppelten Rezeptoren über den langen N-Terminus an die ECM wie z. B. das Kollagen III (White et al., 2014) oder Laminin-211 (Petersen et al., 2015) und an intrazelluläre Strukturen wie z. B. das Zytoskelett verbunden sind (Scholz et al., 2016b), kann das Verankerungsmodell (siehe Abschnitt 1.6.3) für die Übertragung mechanischer Reize bei den aGPCR in Betracht gezogen werden.

1.7 Zielsetzung

Bisher wurden die physiologische und pathophysiologische Relevanz der Mechanosensitivität von G-Protein-gekoppelten Rezeptoren und die dazugehörigen Signalkaskaden ausreichend gut charakterisiert. Leider fehlen bislang Untersuchungen darüber, wie G-Protein-gekoppelte Rezeptoren überhaupt in der Lage sind, einen mechanischen Reiz wahrzunehmen.

Es stellt sich somit die Frage: Welche molekularen Strukturen der G-Protein-gekoppelten Rezeptoren sind für die Aufnahme des mechanischen Reizes verantwortlich?

¹⁴⁶ Die Autoproteolysereaktion wird durch eine ca. 320 Aminosäuren lange autoproteolytische GAIN-Domäne (GPCR autoproteolysis inducing domain) mit einer konservierten Cystein-reichen ca. 40-50 Aminosäuren langen proteolytischen GPCR-Stelle (GPS = GPCR proteolysis site) katalysiert (Yona et al., 2008; Arac et al., 2012).

In der vorliegenden Arbeit sollte der molekulare Mechanismus der Mechanosensitivität von G-Protein-gekoppelten Rezeptoren untersucht werden.

Mit Hilfe der intramolekularen dynamischen FRET-Photometrie, der Kamera-basierten ratiometrischen und zeitabhängigen Kalziumanalysen und mit der Patch-Clamp-Technik (Ganzzelleableitungen in der Spannungsklemme) sollte die Mechanosensitivität von G-Protein-gekoppelten Rezeptoren auf der molekularen Ebene genauer untersucht werden.

2 Material und Methoden

2.1 Kompetitiver Histamin-Enzymimmunoassay

Material	Hersteller
Human Histamine ELISA Kit	Arigo, # ARG80457
Präzisions-Einzelkanalpipetten (10 - 1000 µl)	Peqlab
Präzisions-Mehrkanalpipetten (250 µl)	Peqlab
Gestopfte Pipettenspitzen (10 - 1000 µl)	Sarstedt
Plattformschüttler	Heidolph Polymax 1040
Spektralphotometer Mikroplattenleser	FLUOstar Omega, BMG Labtech
Doppelt destilliertes Wasser/ Reinstwasser	Membrane pure, #180-0013
500 ml Messkolben	im Labor vorhanden
Fussfreie Präzisionstücher	Kimberly Clark KIMTECH SCIENCE Trocken-Reinigungstücher weiß, 210 x 110mm, 280 Stück/Packung

Für die quantitative Bestimmung der intraluminale Histaminkonzentration in Perfusatproben von ex vivo untersuchten murinen Mesenterialarterienabschnitten der ersten und zweiten Ordnung wurde ein handelsüblicher Histamin-Enzymimmunoassay Kit von Arigo biolaboratories mit einer Nachweisgrenze von $0,2 \text{ ng ml}^{-1}$ ($1,8 \text{ nM}$) und einem Detektionsbereich von $0,2 - 50 \text{ ng ml}^{-1}$ ($1,8 - 450 \text{ nM}$) gemäß Herstellerangaben verwendet. Dieser Enzymimmunoassay wird normalerweise für die Quantifizierung von Histaminkonzentrationen im menschlichen Urin und Plasma eingesetzt. Der Histamin-Enzymimmunoassay beruht auf einer kompetitiven Immunreaktion. Dabei ist der Boden der Mikrotiterplatte mit einer bekannten Menge an Histamin behaftet. Das Histamin in den Proben, was dem zu untersuchenden Antigen entspricht, und das an die Mikrotiterplatte gebundene Histamin konkurrieren um eine definierte Anzahl an freien Bindestellen eines Histamin-Antikörpers. Nach Einstellung der kompetitiven Immunreaktion wird nicht an die Mikrotiterplatte gebundener Antigen-Antikörper-Komplex und freies Antigen durch drei aufeinanderfolgende Waschschriffe entfernt. Der nun an die Mikrotiterplatte gebundene Antigen-Antikörper-Komplex wird mit Hilfe eines an das Enzym Peroxidase gekoppelten Anti-Ziegen-IgG-Antikörpers nachgewiesen. Die Konzentration des an die Mikrotiterplatte gebundenen Antigen-Antikörper-Komplexes ist umgekehrt proportional zur Histaminkonzentration in der Probe.

Zuerst wurde das Histamin in den Standardlösungen, Kontrolllösungen und den Perfusatproben quantitativ mit einem Acylierungsreagenz acyliert. Hierfür wurden jeweils $100 \mu\text{l}$ der Standardlösungen (unbekannte Zusammensetzung), der Kontrolllösungen (unbekannte Zusammensetzung) und jeweils $20 \mu\text{l}$ der Proben in Phosphat-gepufferter Salzlösung (in mM: 119 NaCl , $4,7 \text{ KCl}$, $1,6 \text{ CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, $1,2 \text{ KH}_2\text{PO}_4$, $11,1 \text{ Glucose}$, $1,2 \text{ Mg}_2\text{SO}_4$, 25 NaHCO_3) in die einzelnen Vertiefungen einer Reaktionsplatte (96 Lochschale) gegeben und mit $80 \mu\text{l}$ Verdünnungsmittel für das Acylierungsreagenz versetzt. Anschließend wurde zu jeder Vertiefung $25 \mu\text{l}$ Acylierungsreagenz und $200 \mu\text{l}$

Acylierungspuffer (unbekannte Zusammensetzung) hinzupipettiert und für 15 min bei Raumtemperatur auf einem Plattformschüttler geschüttelt¹⁴⁷. Danach wurden jeweils 25 µl der acylierten Standardlösungen, Positiv-Kontrolllösungen und Perfusatproben in eine weitere mit dem Antigen Histamin beschichtete Mikrotiterplatte überführt und mit 100 µl eines Histamin-Antikörpers („Histamine Antiserum“) versetzt und für weitere 30 Minuten geschüttelt. Während der Inkubationszeit konkurriert das Antigen der acylierten Kontrolllösungen, Standardlösungen, Perfusatproben sowie an die Festphase der Mikrotiterplatte gebundenes Antigen um eine feste Anzahl von Antikörperbindungsstellen. Sobald die kompetitive Bindungsreaktion im Gleichgewicht vorliegt, werden freies Antigen und freie Antigen-Antikörper-Komplexe durch drei aufeinanderfolgende Waschschriffe (3 x 350 µl Waschpuffer) entfernt. Als nächstes wurde 100 µl eines an das Enzym Peroxidase gekoppelte Anti-Ziegen-IgG-Detektionsantikörpers in jede Vertiefung der Mikrotiterplatte hinzugegeben und für weitere 10 Minuten geschüttelt. Nach drei aufeinanderfolgenden Waschschriffen wurde jeweils 100 µl einer gelben 3,3,5,5-Tetramethylbenzidin und Wasserstoffperoxid beinhaltenden Substratlösung in die einzelnen Vertiefungen hinzu pipettiert und Licht geschützt (Mikrotiterplatte in Alufolie eingewickelt!) für 15 Minuten bei Raumtemperatur geschüttelt. Das Enzym Peroxidase katalysiert mittels der Reduktion des Wasserstoffperoxids zu Wasser die Oxidation des Farbstoffes 3,3,5,5-Tetramethylbenzidins zu 3,3,5,5-Tetramethylbenzidindiimin, wodurch sich die Farbe der Lösung blau verfärbt (Weir et al., 1974; Mesulam, 1978; Martin et al., 1984; Li et al., 2009). Dieser blaue Farbstoff absorbiert im roten Wellenlängenbereich mit einer maximaler Absorption bei $\lambda = 652 \text{ nm}$ (Josephy et al., 1982). Das 3,3,5,5-Tetramethylbenzidindiimin entwickelt sich umgekehrt proportional zur Histaminmenge in der Probe. Das bedeutet, je weniger Histamin in der Probe vorhanden ist, desto tiefer ist der Blauton der Lösung. Die Farbentwicklung wurde durch die Zugabe von 100 µl einer 0,1-molaren Schwefelsäurelösung (0,1 M H₂SO₄) gestoppt. Die Schwefelsäure reduziert wiederum das 3,3,5,5-Tetramethylbenzidindiimin zu 3,3,5,5-Tetramethylbenzidin, wodurch sich die Lösung gelb verfärbt. Die Absorption des gelben Farbstoffs wurde bei einer Wellenlänge von $\lambda = 450 \text{ nm}$ gemessen. Je größer die Absorption ist desto geringer die zu bestimmende Histaminkonzentration. Die genaue Histaminkonzentration in den einzelnen intraluminalen Perfusatproben wurde aus den Absorptionen der Standardproben mit bekannter Histaminkonzentration mittels einer von uns mehrfach erstellten Standardkurve bestimmt.

2.2 Kultivierung eukaryotischer Zellen

Material	Hersteller
HEK293 Zellen, humane embryonale Nierenepithelzellen	DSMZ, # ACC 305
HEK293T-Zellen, humane embryonale Nierenepithelzellen	ATCC® CRL-3216™
HUVEC, cryokonservierte humane Endothelzellen aus der Nabelvene	Promocell, # C-1220, Charge: 1052601.1

¹⁴⁷ 50 Umdrehungen pro Minute.

HAoEC, cryokonservierte humane Endothelzellen aus der Aorta	Promocell, # C-12271, Charge: 2032705.1
DMEM, Dulbecco`s modifiziertes Eagle Medium	Sigma-Aldrich, # D6429
EMEM, Eagle`s minimal essentielles Medium¹⁴⁸	Sigma-Aldrich, # M4655
DPBS, Dulbecco`s Phosphat gepufferte Salin	Sigma-Aldrich, # D8537
HBSS, Hank`s balancierte Salzlösung mit 1 g l⁻¹ D-Glucose	Sigma-Aldrich, # H8264
0,02% EDTA-haltige 0,05%ige Trypsinlösung	Sigma-Aldrich, # T3927
FKS, Fetales Kälberserum	Gibco/ Life Technologies, # 10270
Penicillin/ Streptomycin (100x)	PAA laboratories, # 11-010
G418, Geneticin	Carl-Roth, # 2039.3
Endothelzellwachstumsmedium (Endothelial Cell Growth Medium mit 2% (V/V) FKS	Promocell, # C-22010
Cryo-SFM Einfriermedium	Promocell, # C-29910
DetachKit	Promocell, # C-41200
GeneJuice® Transfektionsreagenz	EMD Millipore Corporation, # 70967-3
Poly-L-Lysine Hydrobromid	Sigma-Aldrich, # P-1524
Pipettenspitze 10 µl	Sarstedt, # 70.1130
Pipettenspitze 200 µl	Sarstedt, # 70.760.012
Pipettenspitze 1000 µl	Sarstedt, # 70.762.010
Zellkulturflasche T-25	Sarstedt, # 83.3910
Zellkulturflasche T-75	Sarstedt, # 83.3911
6-Loch-Zellkulturplatte	Sarstedt, # 83.3920
24-Loch-Zellkulturplatte	Sarstedt, # 83.3922.005
96-Loch-Zellkulturplatte	Sarstedt, # 83.3924.005
15 ml Schraubröhre	Sarstedt, # 62.554.002
50 ml Schraubröhre	Sarstedt, # 62.547.254
SafeSeal Reagiergefäß, 1,5 ml	Sarstedt, # 72.706
Nalgene® Mr. Frosty® Cryo 1°C Freezing Container	Nalgene, # 5100-0001
CryoPure-Gefäß, 1,8 ml, grün	Sarstedt, # 72.379.005
2-Propanol	Carl-Roth, # 9866.5
neoLab-Deckgläser Stärke I, 30 mm Ø	neolab, # 1-6292
neoLab-Deckgläser Stärke I, 24 mm Ø	neolab, # 1-6290
Sicherheitswerkbank	ThermoFisher, Safe S2020 1.2
Pipetus	Hirschmann Laborgeräte
Absaugpumpe mit Auffangbehältnis	HLC, Ditabis, Model AC 04
Tischzentrifuge Heraeus Labofuge 400	ThermoFisher Scientific
Brutschrank HERA cell 200	ThermoFisher Scientific
Lichtmikroskop	Zeiss, Axiovert 40 CFL
Neubauer-Zählkammer	Marienfeld

¹⁴⁸ Eagle`s minimal essentielles Medium ist ein Zellkulturmedium, das 1959 von Harry Eagle hergestellt wurde. Es beinhaltet anorganische Salze, Aminosäuren, Vitamine, Glucose und Phenolrot (Yao und Asayama, 2017).

Deckglas für Haemocytometer, optisch plan, viereckig geschnitten 20 x 26 mm	Menzel GmbH & Co
Vierstelliger Handzähler	Clicker Counter mechanischer Handzähler

Da das Arbeiten mit Zellen ein steriles Umfeld erfordert, wurden hierzu alle anfallenden Tätigkeiten stets unter mikrobiologischen Sicherheitswerkbänken der Klasse II durchgeführt. Als Überexpressionssysteme wurden zwei Zelllinien verwendet, die HEK¹⁴⁹293-Zelllinie und die HEK293T¹⁵⁰-Zelllinie. Die HEK293T-Zelllinie wurde in dem standardisiertem Nährmedium EMEM¹⁵¹ und die HEK293-Zelllinie in dem etwas Nährstoff-reicherem Nährmedium DMEM¹⁵² kultiviert. Beide Nährmedien waren jeweils zusätzlich mit 10% (V/V) fetalem Kälberserum (FKS), 100 U ml⁻¹ Penicillin und 100 U ml⁻¹ Streptomycin angereichert. Die monoklonalen HEK293-Zelllinien (DSMZ, # ACC 305, Braunschweig), die eine stabile Expression des Histamin H₁-Rezeptor gewährleisten, wurden außerdem mit 800 µg ml⁻¹ Geneticin (G418) versetztem DMEM Selektionsmedium gehalten. Bei einer Konfluenz von nahezu 90% wurden die Zellen mit 10 ml DPBS¹⁵³ gewaschen und anschließend mit 2 ml einer 0,02% EDTA¹⁵⁴-haltigen 0,05%igen Trypsinlösung umspült. Die EDTA-Trypsinlösung schließt Zell-Zell- und Zell-Matrix-Kontakte auf, um Zellen aus dem Zellverbund und vom Flaschenboden zu lösen. Mit kräftigem Klopfen der Handinnenfläche gegen die seitliche Flaschenwand wurden die Zellen vom Flaschenboden gelöst und anschließend mit der fünffachen Menge an entsprechendem Nährmedium versetzt, um den Trypsinierungsprozess durch die im fetalen Kälberserum enthaltenen Proteaseinhibitoren und durch das zugeführte Kalzium des Nährmediums zu stoppen. Diese Zellsuspension wurde bei 1200 Umdrehungen pro Minute (U min⁻¹, rpm¹⁵⁵) für zwei Minuten zentrifugiert (Heraeus Labofuge 400 Centrifuge) und der gewonnene Überstand mittels einer sterilen Pasteurpipette, die an eine Vakuumpumpe (HLC, Ditabis, Model AC 04) angeschlossen ist, abgesaugt. Der zurückgebliebene, verdichtete Zellrückstand wurde sofort mit 10 ml Nährmedium aufgenommen und mit Hilfe einer serologischen Pipette resuspendiert. Die Zellsuspension wurde im Volumenverhältnis von 1:3, 1:5 oder 1:10 auf neue mit 20 ml Medium vorgewärmte T-75 Zellkulturflaschen überführt und im Brutschrank subkultiviert.

Außerdem wurden zwei verschiedene primäre Endothelzelllinien von Promocell kultiviert. Menschliche Endothelzellen aus der Nabelschnurvene (HUVEC¹⁵⁶), ein Versorgungsgefäß des Fötus bzw. des Kindes und menschliche Endothelzellen aus der Aorta (HAoEC¹⁵⁷), beide männlich und kaukasischen Ursprungs, wurden kryokonserviert

¹⁴⁹ Abkürzung HEK vom Englischen **H**uman **e**mbyronic **k**idney

¹⁵⁰ Abkürzung T vom Englischen Simian Vacuolating Virus 40 **T** antigen; Das SV40 T Antigen ermöglicht die Replikation von Plasmiden mit einem SV40 Replikationsursprung.

¹⁵¹ Abkürzung EMEM vom Englischen **E**agle's **m**inimum **e**ssential **m**edium

¹⁵² Abkürzung DMEM vom Englischen **D**ulbecco's **m**odified **E**agle's **m**edium

¹⁵³ Abkürzung DPBS vom Englischen **D**ulbecco's **p**hosphat **b**uffered **s**aline

¹⁵⁴ Abkürzung EDTA vom Englischen **E**thylenediaminetetraacetic **a**cid

¹⁵⁵ Abkürzung rpm vom Englischen revolutions **p**er **m**inutes

¹⁵⁶ Abkürzung HUVEC vom Englischen **H**uman **U**mbilical **V**ein **E**ndothelial **C**ells

¹⁵⁷ Abkürzung HAoEC vom Englischen **H**uman **A**ortic **E**ndothelial **C**ells

auf Trockeneis geliefert. Vor dem Auftauen wurde jeweils eine T-75 Zellkultuflasche mit 20 ml Endothelzellwachstumsmedium¹⁵⁸ mit 2% V/V¹⁵⁹ FKS im Brutschrank für 30 Minuten vorgewärmt. Das Kryoröhrchen wurde so schnell wie möglich bei 37°C im Wasserbad aufgetaut und mit 70%igem Ethanol desinfiziert. Das Röhrchen wurde nach vollständigem Abdampfen des Ethanols geöffnet und die Endothelzellen zügig in das vortemperierte Medium gegeben. Nach einer Stunde wurde ein Mediumwechsel mit Endothelzellwachstumsmedium durchgeführt und die Zellen bis zu einem konfluenten Stadium von 70 - 90% im Inkubator kultiviert. Für das Passagieren beider Endothelzelllinien wurde das DetachKit von Promocell¹⁶⁰ verwendet. Die Endothelzellen wurden in einem Volumenverhältnis von 1:3 und 1:5 passagiert und im Brutschrank bei 37°C subkultiviert. Die maximale Anzahl durchgeführter Passagen lag bei den primären Endothelzelllinien bei sechs, da sich die Endothelzellen bei weiterer Subkultivierung morphologisch zu fibroblastenähnlichen Zellen transformieren und die Endothelzell-spezifischen Eigenschaften verlieren. Nach Beendigung der Zellkulturarbeiten wurde der Absaugschlauch mit 70%igem Ethanol durchspült und die Arbeitsfläche abgewischt, um Zell- und Medienreste, die zur Kontamination führen, zu entfernen. Alle Zelllinien wurden in einer 5%igen Kohlenstoffdioxidatmosphäre bei einer Temperatur von 37°C im Brutschrank kultiviert.

2.3 Transiente Transfektionen

2.3.1 Säugerzellenexpressionsvektoren-Plasmid-DNA

Plasmidname	Ursprungsplasmid	Plasmid-nummer	Herkunft/ Klonierung
pcDNA3.1(+)		[007]	Clontech, # V790-20
rKir3.1-IRES-hKir3.2 pIRES	pIRES	[393]	Julie Straub
hTRPC6-pIRES2-EGFP	pIRES2-EGFP	[519]	Serap Erdogmus
pEYFP-N1		[234]	Clontech, # 6006-1
mGaq pcDNA	pcDNA	[183]	Bruce Conklin, University of California, San Francisco
gpH₁R pcDNA3.1/V5-His-TOPO	pcDNA3.1/V5-His-TOPO	[72]	Olaf Pinkenburg, Phillips Universität Marburg
hGnRHR pcDNA3	pcDNA3	[157]	Susanne. Roelle, Syral, Marckolsheim
ssGnRHR pcDNA3.1-C-(k) DYK	pcDNA3.1-C-(k) DYK	[542]	GenScript, USA
ssGnRHR2 pcDNA3.1-C-(k) DYK	pcDNA3.1-C-(k) DYK	[543]	GenScript, USA

¹⁵⁸ Dem Endothelzellwachstumsmedium für HAoEC fehlt der Endothelzellwachstumszusatz aus dem Rinder Hypothalamusgewebe. Anstelle enthält es den synthetischen, Insulin-ähnlichen Wachstumsfaktor LR3 IGF (Long arginine 3 Insulin Like Growth Factor) und den vaskulären Wachstumsfaktor VEGF (Vascular Endothel Growth Factor).

¹⁵⁹ Abkürzung % V/V steht für Volumenprozent

¹⁶⁰ Das DetachKit von Promocell besteht aus einer HEPES (Abkürzung HEPES vom Englischen 4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid) gepufferte Salzlösung (HEPES-BSS), einer 0,04%ige Trypsinlösung mit 0,03% EDTA und einer Trypsin-neutralisierende Lösung (TNS) mit 10% FKS.

3xHA hD₂R pcDNA3.1(+)	pcDNA3.1(+)	[568]	cDNA Resource Center, USA
3xHA-CXCR4 pcDNA3.1(+)	pcDNA3.1(+)	[599]	cDNA Resource Center, USA
3xHA hNTS₁R pcDNA3.1(+)	pcDNA3.1(+)	[598]	cDNA Resource Center, USA
hA_{2A}-CCPGCC^{il3e}-Cerulean pcDNA3	pcDNA3	[71]	Carsten Hoffmann, Universität Würzburg
mα₂AR-YFP-CFP pcDNA3	pcDNA3	[170]	Carsten Hoffmann, Universität Würzburg
MV11Q (U50-TetC) PG cmyc pFastBacDual	pFastBacDual	[562]	Christopher Yengo, Penn State University, USA
pmCerulean-N1 pcDNA3.1(+)	pcDNA3.1(+)	[130]	Serap Erdogmus
gpH₁R pcDNA3.1(+)	pcDNA3.1(+)	[132]	Serap Erdogmus
gpH₁R-Cerulean pcDNA3.1(+)	pcDNA3.1(+)	[131]	Serap Erdogmus
gpH₁R-D116A-F433A pcDNA3.1/V5-His-TOPO	pcDNA3.1/V5-His-TOPO	[298]	Michaela Winter
gpH₁R-PG2158-il3-e1-Cerulean pcDNA3.1(+)	pcDNA3.1(+)	[173]	Serap Erdogmus
gpH₁R-PG1783-il3-m-Cerulean pcDNA3.1(+)	pcDNA3.1(+)	[263]	Serap Erdogmus
gpH₁R-PG1660-il3-b-Cerulean pcDNA3.1(+)	pcDNA3.1(+)	[269]	Serap Erdogmus
gpH₁R-D116A-PG2158-il3-e1-F433A-Cerulean pcDNA3.1(+)	pcDNA3.1(+)	[400]	Serap Erdogmus
gpH₁R-D116A-PG1660-il3-b-F433A-Cerulean pcDNA3.1(+)	pcDNA3.1(+)	[401]	Serap Erdogmus
gpH₁R-D116A-PG1783-il3-m-F433A-Cerulean pcDNA3.1(+)	pcDNA3.1(+)	[402]	Serap Erdogmus
gpH₁R-PG2194-il3-e2-Cerulean pcDNA3.1(+)	pcDNA3.1(+)	[463]	Serap Erdogmus
gpH₁R-PG1413-ct-b-Cerulean pcDNA3.1(+)	pcDNA3.1(+)	[456]	Serap Erdogmus
gpH₁R-D116A-PG1413-ct-b-F433A-Cerulean pcDNA3.1(+)	pcDNA3.1(+)	[489]	Serap Erdogmus
gpH₁R-D116A-PG2194-il3-e2-F433A-Cerulean pcDNA3.1(+)	pcDNA3.1(+)	[490]	Serap Erdogmus
gpH₁R-PG1413-ct-b-F484P-Cerulean pcDNA3.1(+)	pcDNA3.1(+)	[506]	Serap Erdogmus
gpH₁R-PG1413-ct-b-R485A-Cerulean pcDNA3.1(+)	pcDNA3.1(+)	[513]	Serap Erdogmus
gpH₁R-PG1413-ct-b-R490A-R493A-Cerulean pcDNA3.1(+)	pcDNA3.1(+)	[514]	Serap Erdogmus

gpH₁R-PG1413-ct-b-F484P-F488 P-Cerulean pcDNA3.1(+)	pcDNA3.1(+)	[516]	Serap Erdogmus
gpH₁R-PG1413-ct-b-K486A-K489A-Cerulean pcDNA3.1(+)	pcDNA3.1(+)	[522]	Serap Erdogmus
gpH₁R-C472Stop pcDNA3.1(+)	pcDNA3.1(+)	[557]	Serap Erdogmus
hGnRHR-gpH₁R-CtShort20 pcDNA3.1(+)	pcDNA3.1(+)	[553]	Serap Erdogmus
pCerulean-MCS-N1 pcDNA3.1(+)	pcDNA3.1(+)	[494]	Serap Erdogmus
PG-4A-GY-Cerulean pcDNA3.1(+)	pcDNA3.1(+)	[496]	Serap Erdogmus
PG-(AAKAA)₂-GY-Cerulean pcDNA3.1(+)	pcDNA3.1(+)	[546]	Serap Erdogmus
PG-(AAKAA)₇-GY-Cerulean pcDNA3.1(+)	pcDNA3.1(+)	[551]	Serap Erdogmus
MV11Q (U50-TetC) PG-Cerulean pcDNA3.1(+)	pcDNA3.1(+)	[561]	Serap Erdogmus
hA_{2A}-CCPGCC^{li3e}-T298P-Cerulean pcDNA3	pcDNA3.1	[624]	Serap Erdogmus

Material	Hersteller
EMEM, Eagle`s minimal essentielles Medium	Sigma-Aldrich, # M4655
GeneJuice® von EMD Millipore Corporation	EMD Millipore Corporation, #70967-3
SafeSeal Reagiergefäß, 1,5 ml	Sarstedt, # 72.706
6-Loch-Zellkulturplatte	Sarstedt, # 83.3920

Sechzehn bis 24 Stunden vor einer transienten Transfektion wurden $1 - 3 \times 10^5$ HEK293T-Zellen in 2 ml EMEM pro 6-Loch-Schale ausgesät (siehe Abschnitt 2.4.1) und im Brutschrank kultiviert. Für eine hohe Transfektionsrate sollten die Zellen am Tag der Transfektion eine 50 - 80%ige Konfluenz besitzen. Die Zahlen in eckiger Klammer repräsentieren die Plasmidnummer für jedes im Labor befindliche Plasmid-DNA. Als Transfektionsreagenz wurde GeneJuice® von EMD Millipore Corporation eingesetzt. Es handelt sich hierbei um eine Formulierung aus kationischen Lipiden, die mit der negativ geladenen Plasmid-DNA in wässriger Lösung zu Liposomen komplexieren in deren Inhalt sich die Plasmid-DNA befindet. Die äußerlich positiv-geladenen Liposomen verschmelzen mit der negativ geladenen Zellmembran der HEK293T-Zellen und setzen die Plasmid-DNA für die Expression und Replikation ins Zytosol frei. Hierfür wurde für jede 6-Loch-Schale 100 µl serumfreies EMEM in ein steriles 1,5 ml Reagiergefäß vorgelegt, mit 300 µl Transfektionsreagenz gemischt und für 5 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Als nächstes wurde dieses Gemisch mit der entsprechenden Menge an Plasmid-DNA versetzt und für weitere 20 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Dieses Gemisch aus Plasmid pcDNA, Transfektionsreagenz und serumfreiem EMEM wurde dann tropfenweise auf die Zellen gegeben und über Nacht im Brutschrank für 24 - 48 Stunden inkubiert. Für HEK293-Zellen wurden Plasmid-DNA Mengen von 1 - 2 µg für Rezeptorexpression (gpH₁R, hGnRH, ssGnRHR/R2, hA_{2A}R, hNTS₁R, hD₂R,

hCXCR4, mα2R), 0,1 - 0,2 µg für die Expression eines gelb fluoreszierenden Proteins (pEYFP¹⁶¹-N1 [234]) oder 0,1 - 0,2 µg eines türkis fluoreszierenden Proteins (pmCerulean-N1 pcDNA3.1(+) [130]) pro 6-Loch-Schale eingesetzt. Die Kotransfektion diente bei nicht mit fluoreszierendem Protein fusionierten GPCR zur Visualisierung der transfizierten Zellen unter einem Lichtmikroskop. Dafür wurden die Zellen mit Licht einer Wellenlänge von $\lambda = 490$ nm Wellenlänge für EYFP und mit einer Wellenlänge von $\lambda = 430$ nm für mCerulean, einer weiterentwickelten, stabilen Variante von ECFP¹⁶² angeregt. Die maximale Emissionen liegen für EYFP liegt bei $\lambda = 527$ nm und für ECFP bei $\lambda = 476$ nm.

2.4 Generation stabiler monoklonaler HEK293-Zelllinien

2.4.1 Auszählen der HEK293-Zellen in einer Neubauer-Zählkammer

Material	Hersteller
Neubauer-Zählkammer	Marienfeld
Deckglas für Haemocytometer, optisch plan, viereckig geschnitten 20 x 26 mm	Menzel GmbH & Co
Vierstelliger Handzähler	Clicker Counter mechanischer Handzähler
Lichtmikroskop	Zeiss, Axiovert 40 CFL

Die beim Passagieren einer Zellkulturflasche erhaltene Zellsuspension wurde mit Hilfe einer Neubauer Zählkammer¹⁶³ lichtmikroskopisch ausgezählt. Dafür wurde ein Deckgläschen auf eine Neubauer-Zählkammer so gelegt, dass sogenannte Newtonsche Ringe zu erkennen sind. Anschließend wurde die Zellsuspension über eine sterile Glaskapillare mit Hilfe der Kapillarkräfte in in den Zwischenraum zwischen Deckgläschen und der Zählkammer befüllt. Unter dem Lichtmikroskop wurden die Zellen in den vier großen Eckquadranten, die aus jeweils 16 kleinen Quadranten bestehen, ausgezählt und der arithmetische Mittelwert (N) aus den Zellzahlen (n_1, n_2, n_3, n_4) der vier großen Eckquadranten ermittelt. Der ermittelte arithmetische Mittelwert N gibt die gemittelte Zellzahl in einem Milliliter Medium wieder.

$$N = \frac{(n_1 + n_2 + n_3 + n_4)}{4} \times 10^4 \quad \text{Formel 1}$$

Formel 1: Mit N = gemittelte Zellzahl in einem Milliliter Medium und n = Zellzahl in einem der vier Eckquadranten.

2.4.2 Elektroporation von HEK293-Zellen

Material	Hersteller
Neon™ Transfection System	Invitrogen, # MPK5000
Neon™ Transfection System 100 µL Kit	Invitrogen, # MPK10025

¹⁶¹ Abkürzung EYFP vom Englischen enhanced yellow fluorescent protein

¹⁶² Abkürzung ECFP vom Englischen enhanced cyan fluorescent protein

¹⁶³ siehe URL-Adresse: https://scienceservices.de/media/pdf/Broschuere_Marienfeld_Zaehlkammern_de.pdf. Letzter Aufruf erfolgte am 02.07.2018.

DMEM, Dulbecco`s modifiziertes Eagle Medium	Sigma-Aldrich, # D6429
FKS, Fetales Kälberserum	Gibco/ Life Technologies, # 10270
Zellkulturschale 100 x 20 mm	Sarstedt, # 83.3902

Für die Elektroporation von HEK293-Zellen wurde das Neon® Transfektionssystem von Invitrogen¹⁶⁴ verwendet. Dafür wurde die entsprechende Menge an Zellsuspensionsvolumen für die Zellzahl von 8×10^6 HEK293-Zellen mit der Neubauer-Zählkammer (siehe Abschnitt 2.4.1) bestimmt, das nötige Zellsuspensionsvolumen in eine 50 ml Schraubröhre überführt und bei 1200 rpm für zwei Minuten zentrifugiert. Der Überstand wurde abgesaugt und der verdichtete Zellrückstand mit der gleichen Menge an DPBS gewaschen und erneut zentrifugiert. Diesmal wurde der erhaltene Zellrückstand in 100 μ l Resuspensionspuffer (Buffer R für 100 μ l Neon®Tips, Neon™ Kit) resuspendiert. Eine 100 x 20 mm Zellkulturschale mit einer Kreisfläche¹⁶⁵ von 78,5 cm² wurde mit 10 ml Nährmedium DMEM (mit 10% FKS ohne Penicillin/Streptomycin) im Brutschrank vorgewärmt. Die Menge an gewünschter, mit dem Restriktionsenzym PvuI linearisierte Plasmid-DNA (8 - 16 μ g) wurde in einem sterilen 1,5 ml Reagiergefäß vorgelegt und mit den resuspendierten Zellen vermengt. Das Restriktionsenzym PvuI zerschneidet die Plasmid-DNA in der prokaryotischen Expressionskassette für das Ampicillinresistenzgen. Durch den Verdau mit dem Restriktionsenzym PvuI wurde verhindert, dass das für das Protein kodierende Gen nicht von den Säugetierzellen beim Einbau in die genomische DNA innerhalb der kodierenden Nukleotidsequenz aufgeschnitten wird. Die Elektroporation erfolgte nach Protokoll für HEK293-Zellen mit je zwei 1,100 V Pulsen mit einer Pulsdauer von 20 ms wodurch die HEK293-Zellmembran durchlässig wird und die Plasmid-DNA ins Zytosol eingeschleust wird. Nach 24 Stunden wurde das Nährmedium DMEM (mit 10% FKS ohne Antibiotikum) mit dem Selektionsmedium DMEM (mit 10% FKS, 100 U ml⁻¹ Penicillin/ Streptomycin und 800 μ g ml⁻¹ G418) ersetzt. Täglich wurde ein Mediumwechsel mit dem Selektionsmedium durchgeführt bis alle untransfizierten Zellen unter der eukaryotischen Selektion mit G418 abgestorben und einzelne monoklonale Zellverbände, die das gewünschte linearisierte und genomisch integrierte Plasmid-DNA stabil exprimieren, angewachsen sind. Anschließend wurden die monoklonalen Zellverbände mit 1 ml 0,02% EDTA-haltiger 0,05%ige Trypsinlösung vom Plastikboden gelöst und vereinzelt. Der Trypsinierungsprozess wurde durch die Zugabe von 5 ml Selektionsmedium DMEM (mit 10% FKS, 100 U ml⁻¹ Penicillin/ Streptomycin und 800 μ g ml⁻¹ G418) abgestoppt. Im nächsten Schritt wurde die Zellzahl der Zellsuspension mit Hilfe der Neubauer-Zählkammer bestimmt.

Aus der gemittelten Zellzahl ($c_1 = N$) wurde das Zellsuspensionsvolumen V_1 ermittelt, die aufgenommen in 30 ml Selektionsmedium V_2 einer finalen Zellkonzentration von 0,5 Zelle pro 100 μ l ($c_2 = 5$ Zellen pro 1 ml) entspricht (siehe Formel 2). Mit Hilfe einer

¹⁶⁴ Neon® Transfection System, Catalog Number MPK5000, Document Part Number 25-1056, Publication Number MAN0001632, Revision Date 17 March 2009

¹⁶⁵ Mit Hilfe der Formel für die Kreisflächenberechnung: $A = \pi \cdot r^2$ ergibt sich eine Kreisfläche von 78,5 cm².

Mehrkanalpipette wurden jeweils 100 µl pro Loch einer 96-Loch-Schale pipettiert und für 1 - 2 Wochen im Brutschrank bei 37°C kultiviert bis einzelne stabile monoklonale Zellverbände angewachsen sind. Als nächstes wurden die einzelnen hochgewachsenen stabilen monoklonalen Zellverbände jeweils in ein Loch einer 24-Loch-Schale überführt. Im nächsten Schritt jeweils in ein Loch einer 6-Loch-Schale transferiert und schließlich in eine T-25 bzw. T-75-Zellkulturflasche weiterkultiviert. Somit ergab sich nach folgender Rechenformel eine Zellkonzentration von 0,5 Zelle pro 100 µl vorgelegtem Selektionsmedium:

$$V_1 = \frac{c_2 \times V_2}{c_1} \quad \text{Formel 2}$$

Formel 2: Mit $c_1 = N$, $c_2 = 5$ Zellen ml^{-1} , $V_2 = 30$ ml Selektionsmedium¹⁶⁶, $V_1 =$ unverdünnte Zellsuspension [ml], die in 30 ml vorgelegtem Selektionsmedium aufgenommen wird.

2.5 Einfrieren und Auftauen von Zellen

Material	Hersteller
Nalgene® Mr. Frosty® Cryo 1°C Freezing Container	Nalgene, # 5100-0001
CryoPure-Gefäß, 1,8 ml, grün	Sarstedt, # 72.379.005
2-Propanol	Carl-Roth, # 9866.5
DMEM, Dulbecco`s modifiziertes Eagle Medium	Sigma-Aldrich, # D6429
EMEM, Eagle`s minimal essentielles Medium	Sigma-Aldrich, # M4655
FKS, Fetales Kälberserum	Gibco/ Life Technologies, # 10270
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Carl Roth, # A994.2
Cryo-SFM Einfriermedium	Promocell, # C-29910
Zellkulturflasche T-25	Sarstedt, # 83.3910
Zellkulturflasche T-75	Sarstedt, # 83.3911

T-25 und T-75 Zellkulturflaschen mit HEK293-Zelllinien wurden optimalerweise mit einer kleinen Passagen-Anzahl ($P \times 3$) bei einer 80 - 90%igen Konfluenz mit einer 0,02% EDTA-haltigen 0,05%igen Trypsinlösung vom Flaschenboden gelöst und in der fünffachen Menge an Nährmedium aufgenommen. Anschließend wurde die erhaltene Zellsuspension zentrifugiert (1200 rpm für 2min), der Überstand abgesaugt und der verdichtete Zellrückstand in der entsprechenden Menge (0,5 ml für eine T-25 Zellkulturflasche und 1 ml für eine T-75 Zellkulturflasche) an kaltem Einfriermedium (42,5 ml DMEM oder EMEM, 5 ml FKS und 2,5 ml DMSO¹⁶⁷) resuspendiert. Die Zellsuspension wurde zügig in ein Kryoröhrchen pipettiert und zur konditionierten Kühlung in die bis zur Markierung mit 100%igem 2-Propanol befüllte Einfrierbox von Nalgene®, Mr. Frosty^{TM168} überführt und bei -80°C über Nacht eingefroren. Die Einfrierbox gewährleistet eine Abkühlgeschwindigkeit von -1°C pro Minute. Am Folgetag wurde das Kryoröhrchen in den

¹⁶⁶ Selektionsmedium besteht aus DMEM mit 10% FKS, 100 U ml^{-1} Penicillin/ Streptomycin und 800 µg ml^{-1} G418

¹⁶⁷ Abkürzung DMSO von der chemischen Verbindung **Dimethylsulfoxid**

¹⁶⁸ Siehe URL-Adresse:

<https://assets.thermofisher.com/TFS-Assets/LCD/manuals/Nalgene-Mr-Frosty-EN-8-0404-28-0211.pdf>. Letzter Aufruf erfolgte am 02.07.2018.

flüssigen Stickstoff überführt und bei -196°C gelagert. Zum Einfrieren der primären humanen Endothelzellen (HUVEC und HAoEC) wurde das Einfriermedium CryoSFM von Promocell benutzt. Wie bei den HEK293-Zellen wurden die primären humanen Endothelzellen in einer möglichst frühen Populationsverdopplungszeit von P_{x2} kryokonserviert.

Zum Auftauen der Zellen wurde das aus dem flüssigen Stickstoff entnommene Kryoröhrchen in heißes Wasser gehalten und die aufgetaute Zellsuspension sofort in eine im Brutschrank vorgewärmte T-25 oder T-75 Zellkulturflasche überführt. Nach einstündiger Kultivierung im Brutschrank wurden die frisch aufgetauten Zellen unter dem Lichtmikroskop auf ihre notwendige Adhärenz hin überprüft. Sobald die Zellen adhären und angewachsen waren, spätestens nach zwei Stunden, wurde ein Mediumwechsel mit frischem Nährmedium ohne Selektionszusatz durchgeführt, um das in der hohen Konzentration vorliegende zytotoxische DMSO des Einfriermediums zu entfernen. Bei den stabilen Zelllinien wurde entweder am Abend des gleichen Tages oder am Folgetag diese frische Nährmedium (DMEM mit 10% FKS und 100 U ml^{-1} Penicillin/ Streptomycin) mit Selektionsmedium (DMEM mit 10% FKS und 100 U ml^{-1} Penicillin/ Streptomycin und $800\text{ }\mu\text{g ml}^{-1}$ G-418) ersetzt und subkultiviert.

2.6 Beschichtung mit Poly-L-Lysin

Material	Hersteller
Poly-L-Lysin Hydrobromid	Sigma-Aldrich, # P1524
6-Loch-Zellkulturplatte	Sarstedt, # 83.3920
neoLab-Deckgläser Stärke I, 30 mm Ø	neolab, # 1-6292
µ-Slide VI 0.1, ibiTreat	ibidi, # 80666
Injekt® 2 ml, Luer-Ansatz, zentrisch	B. Braun Melsungen AG, PZN 02057895

Poly-L-Lysin ist ein positiv geladenes, synthetisches Polymer, das aus konstitutionellen Repetiereinheiten von L-Lysin und Hydrobromid aufgebaut ist. Für die Wasserlöslichkeit wird das Hydrobromidsalz des Polykations verwendet, das ein molekulares Gewicht von über $M_{\text{W}}^{169} = 300000\text{ g mol}^{-1}$ besitzt. Das Polykation erhöht die elektrostatische Wechselwirkung zwischen der negativ geladenen Zellmembran und der soliden Oberfläche von Deckgläsern (neoLab-Deckgläser Stärke I, 30 mm Ø) und Plastikzellkulturwaren (Loch-Schalen, ibidi® µ-slides). Durch die Adsorption des Polykations an die Kultivierungsoberfläche wird die positive Ladung für die Anhaftung der Zellen erhöht. Hierzu wurde 100 mg kristallines Poly-L-Lysin in einem Liter sterilisiertem Reinstwasser gelöst, in 50 ml Röhrchen aliquotiert und bei -20°C gelagert. Für die Poly-L-Lysin Beschichtung wurden die Deckgläser einzeln in ein Loch der 6-Loch-Platte gelegt und mit jeweils 1 ml der Poly-L-Lysin-Lösung ($0,1\text{ g l}^{-1}$) überschichtet und für mindestens 1 Stunde bei Raumtemperatur stehengelassen. Die µ-slides von ibidi wurden mit Hilfe einer 2 ml-Spritze befüllt. Anschließend wurde die Poly-L-Lysin-Lösung abgesaugt, die Deckgläser mit jeweils 1 ml DPBS gewaschen

¹⁶⁹ Abkürzung M_{W} vom Englischen **M**olecular **W**eight

und mit 1,5 ml Nährmedium versetzt. Die sechs Kanäle der ibidi μ -Slide VI 0.1 Kammer wurden trockengesaugt und bis zum Aussäen der Zellen im Brutschrank aufbewahrt, um eine optimale Belüftung der Kammer zu gewährleisten.

2.7 Herstellung einer Cholesterol-Methyl- β -cyclodextrin Einschlussverbindung

Material	Hersteller
Cholesterol	Sigma-Aldrich, # C8667
Methyl- β -cyclodextrin	Sigma-Aldrich, # 332615
2-Propanol	Carl-Roth, # 6752.5
Magnetrührer mit Heizfunktion	IKA® RET control visc C

Für die Herstellung einer 10 mM Cholesterol-Methyl- β -cyclodextrin Einschlussverbindung wurde 10 g Methyl- β -cyclodextrin in 50 ml Reinstwasser unter ständigem Rühren in einem 100 ml Becherglas bei einer Temperatur von 60°C gelöst, wobei die Temperatur der Lösung mit Hilfe eines Laborthermometers regelmäßig kontrolliert wurde. Alle folgenden Schritte wurden bei dieser Temperatur durchgeführt. In einem zweiten Becherglas wurden 300 mg Cholesterol in 6 ml 2-Propanol gelöst und unter ständigem Rühren tropfenweise zur wässrigen Lösung von Methyl- β -cyclodextrin hinzugegeben. Die klare Lösung von Methyl- β -cyclodextrin wurde mit zunehmender Cholesteroltitration trüb. Nach ungefähr 30 Minuten klärte sich die Lösung wieder auf und das komplette Cholesterol wurde von Methyl- β -cyclodextrin komplexiert (Burger, 2000). Nach dreistündigem Rühren wurde die klare Lösung auf Raumtemperatur abgekühlt, in einen 250 ml Duran® Rundkolben überführt und das Produkt aus Cholesterol-Methyl- β -cyclodextrin durch Gefriertrocknung als Pulver isoliert. Die Gefriertrocknung wurde von Herrn Dr. rer. hum. biol. Wolfgang Zwickenpflug am Walther-Straub-Institut durchgeführt. Für die Beladung der HEK293 Zellen wurde eine 5 mM Cholesterolkonzentration eingesetzt. Die Cholesterolkonzentration wurde wie nachfolgend beschrieben, berechnet:

$$\frac{W}{G} \times 100 = p = \frac{m(\text{Cholesterol})}{m(\text{Cholesterol-Methyl-}\beta\text{-cyclodextrin})} = \frac{0,3 \text{ g}}{10 \text{ g}} \times 100 = 3 \% \quad \text{Formel 3}$$

Formel 3: Mit Grundwert G, mit Prozentwert W, mit Prozentsatz p, mit $m(\text{Cholesterol}) = 0,3 \text{ g}$, $MW(\text{Cholesterol}) = 386,65 \text{ g mol}^{-1}$ und $m(\text{Cholesterol-Methyl-}\beta\text{-cyclodextrin}) = 10 \text{ g}$, wobei $m = \text{Masse}$ und $MW = \text{Molekulargewicht}$ sind. 300 mg Cholesterol in 10 g gefriergetrocknetem Pulver aus Cholesterol-Methyl- β -cyclodextrin, entsprechen einem prozentualen Anteil von 3 % reinem Cholesterol (siehe Formel 3). Mittels des Molekulargewichtes von Cholesterol $M_w = 386,65 \text{ g mol}^{-1}$ wurde eine Cholesterolmenge von $m(\text{Cholesterol}) = 1,9 \text{ g}$ für 1 Liter Badlösung berechnet, das einer gefriergetrockneten Pulvermenge von $m(\text{Cholesterol-Methyl-}\beta\text{-cyclodextrin}) = 64,3 \text{ g}$ entspricht. Für eine 6-Lochschale wurden insgesamt 6 ml 5 mM Cholesterol angesetzt. Dafür wurde eine gefriergetrocknete Pulvermenge von $m(\text{Cholesterol-Methyl-}\beta\text{-cyclodextrin}) = 0,39 \text{ g}$ in 6 ml Badlösung „Iso150“ eingewogen und gelöst. Jeweils 1 ml der hergestellten 5 mM Cholesterol-Lösung wurden in jedes Loch der 6-Lochschale mit HEK293 Zellen pipettiert und für 10 Minuten im Brutschrank bei 37°C inkubiert.

2.8 Anfärbung mit FIAsh

Material	Hersteller
Dimethylsulfoxid, 99,8%	Sigma-Aldrich, # 494429
FIAsh, 1 mM in DMSO	Carsten Hoffmann, Würzburg, Rudolf-Virchow-Zentrum
Hank`s balancierte Salzlösung	Sigma-Aldrich, # H8264
1,2-Ethandithiol	Fluka, # 02390-25ml
2,3-Dimercapto-1-propanol	Fluka, # 38520-5ml
Absaugpumpe mit Auffangbehältnis	HLC, Ditabis, Model AC 04
15 ml Schraubröhre	Sarstedt, # 62.554.002
50 ml Schraubröhre	Sarstedt, # 62.547.254
Pipetus	Hirschmann Laborgeräte
SafeSeal Reagiergefäß, 1,5 ml	Sarstedt, # 72.706
Serologische Pipette, 10 ml	Sarstedt, # 86.1254.025
Pipettenspitze, 10µl	Sarstedt, # 70.1130
Pipettenspitze, 200µl	Sarstedt, # 70.760.012
Pipettenspitze, 1000µl	Sarstedt, # 70.762.010
UV/VIS-Spektralphotometer	Eppendorf BioPhotometer Plus

Alle Arbeitsschritte zur FIAsh¹⁷⁰-Anfärbung der Rezeptorkonstrukte in den HEK293-Zellen wurden unter einem Abzug durchgeführt, um Geruchsbelästigungen durch die flüchtigen Schwefelwasserstoffverbindungen¹⁷¹, wie EDT¹⁷² und BAL¹⁷³ bzw. 2,3-Dimercapto-1-propanol, so gering wie möglich zu halten. FIAsh wurde als Feststoff und auch als eine 1 mM FIAsh-DMSO-Stammlösung von Carsten Hoffmann (Rudolf-Virchow-Zentrum, Julius-Maximilians-Universität, Würzburg) zur Verfügung gestellt. Für eine 1 mM FIAsh-DMSO-Stammlösung wurde eine entsprechende Menge an FIAsh-Feststoff ($MW_{\text{FIAsh}} = 664 \text{ g mol}^{-1}$) in entsprechenden Volumen an DMSO aufgelöst. Es gilt 100 µg FIAsh-Reinsubstanz auf 150,6 µl wasserfreies DMSO oder ein Vielfaches davon. Die anschließende FIAsh-Konzentration wurde fluorimetrisch mit einem UV/VIS-Spektralphotometer (Eppendorf BioPhotometer Plus) bestimmt. Dafür wurden 1 – 5 µl der FIAsh-DMSO-Lösung mit 1 ml einer leichtalkalischen Natriumhydroxidlösung (2 - 3 NaOH¹⁷⁴-Plättchen in 50 ml Reinstwasser) versetzt, weil ein alkalischer pH-Wert wichtig für den Extinktionskoeffizienten ϵ_{λ} ist. Aus der ermittelten Extinktion wurde die Konzentration der DMSO-haltigen FIAsh-Stammlösung mit Hilfe

¹⁷⁰ FIAsh vom Englischen Fluorescein arsenical helix binder ist eine unter einem Kilodalton kleine, arsenhaltige chemische Verbindung, die sich von dem fluoreszierenden Farbstoff Fluorescein ableitet und bevorzugt an ein sechs Aminosäuren langes CCPGCC Tetracysteinbindemotiv von Proteinen bindet. Die Bindung besteht somit aus vier Disulfidbrücken, die durch Oxidation der vier Cysteine des FIAshs zum FIAsh-EDT₂ resultiert. Das gebundene FIAsh-EDT₂ wird mit Licht der Wellenlänge von $\lambda = 508 \text{ nm}$ angeregt und emittiert Licht mit einer Wellenlänge von $\lambda = 528 \text{ nm}$ als Fluoreszenzlicht. Durch diese Eigenschaft eignet sich an Proteine gebundenes FIAsh auch zur unspezifischen Anfärbung von Zellen.

¹⁷¹ Gasförmiges Schwefelwasserstoffgas (H₂S)

¹⁷² Abkürzung EDT der chemischen Verbindung 1,2-Ethandithiol

¹⁷³ Abkürzung BAL vom Englischen **British-Anti-Lewisite**. Synonym für 2,3-Dimercapto-1-propanol, Dimercaprol.

¹⁷⁴ Chemische Formel NaOH von Natriumhydroxid

des Lambert-Beer'schen Gesetzes berechnet (siehe Formel 4.1), und eventuell weiter mit DMSO verdünnt.

$$E_{\lambda} = \log_{10} \frac{I_1}{I_0} = \epsilon_{\lambda} \times c \times d \quad \text{Formel 4}$$

$$c = \frac{\log_{10} \frac{I_1}{I_0}}{\epsilon_{\lambda} \times d} = \frac{E_{\lambda}}{\epsilon_{\lambda} \times d} \quad \text{Formel 4.1}$$

Formel 4.1: Mit E_{λ} = Extinktion¹⁷⁵, I_1 = Intensität des transmittierten Lichts [$W \cdot m^{-2}$], I_0 = Intensität des einfallenden (eingestrahlenen) Lichts [$W \cdot m^{-2}$], c = Konzentration der absorbierenden Substanz [$mol \cdot l^{-1}$], ϵ_{λ} = dekadischer molarer Extinktionskoeffizient bei der Wellenlänge λ [$l \cdot mol^{-1} \cdot cm^{-1}$] und der Weglänge d des Lichts im Material [cm]. Der dekadische molare Extinktionskoeffizient für FIAsh beträgt $\epsilon_{499} = 75000 l \cdot mol^{-1} \cdot cm^{-1}$. Die DMSO-haltige FIAsh-Stammlösung wurde jeweils zu 20 μl -Volumina in 0,2 ml Reagiergefäße aliquotiert und lichtgeschützt bei $-20^{\circ}C$ gelagert. Die zur Markierung verwendeten HEK293-Zellen wurden am Vortag auf mit Poly-L-Lysin beschichtete Deckgläschen mit 30 mm Durchmesser einer 6-Lochschale ausgesät.

Die verwendeten Konzentrationen und Mengen beziehen sich jeweils für die Markierung eines Lochs einer 6-Lochschale. In zwei 1,5 ml Reagiergefäße wurden jeweils 1 ml DMSO vorgelegt. In eines der Reagiergefäße wurde 2,1 μl EDT pipettiert und gut vermengt, was einer 25 mM EDT-Lösung entspricht. In das dritte Reagiergefäß wurde jeweils 1 μl der 25 mM EDT-Lösung und 1 μl der 1 mM FIAsh-Stammlösung gegeben und für 10 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert¹⁷⁶. In dieser 10-minütigen Inkubationszeit wurde das gesamte FIAsh in die fluoreszierende FIAsh-EDT₂-Form überführt, wobei die Endkonzentration der FIAsh-EDT₂-Lösung 1 μM betrug. In der Zwischenzeit wurden die Zellen zweimal mit HBSS (ohne Phenolrot mit 1 g l^{-1} D-Glucose) gewaschen und in 1 ml HBSS-Lösung aufgenommen. Zusätzlich wurde 1 ml HBSS-Lösung in ein neues leeres Reagiergefäß pipettiert. Als nächstes wurde 200 – 800 μl der HBSS-Lösung aus dem neuen Reagiergefäß entnommen und zum FIAsh-EDT₂-Gemisch gegeben und mit einem Vortexmischer gut gemischt. Dieses Vorgemisch wurde zurück in das Reagiergefäß mit den restlichen 800 -200 μl HBSS-Lösung pipettiert und erneut gut mit dem Vortexer gemischt, um das ganze FIAsh-EDT₂ zu lösen. Als nächstes wurde diese frisch zubereitete FIAsh-EDT₂-haltige Lösung zu den Zellen in einem Loch einer 6-Lochschale hinzupipettiert und für 1 Stunde im Brutschrank bei 37 C inkubiert. Die finale zur Markierung verwendete FIAsh-EDT₂-Konzentration in einem Loch einer 6-Lochschale betrug 500 nM. Während der Inkubationszeit wurde die Waschlösung hergestellt. In das zweite mit 1 ml DMSO vorgelegte Reagiergefäß wurden 42 μl EDT pipettiert, um eine 500 mM EDT-Lösung zu erhalten. In eine 50 ml-Schraubröhre wurde 50 ml HBSS-Lösung und 25 μl der 500 mM EDT-Lösung vermengt, das eine Waschlösung mit einem EDT-Gehalt von 250 μM ergab. Nach Ablauf der einstündigen Inkubationszeit wurden die Zellen zweimal mit 2 ml HBSS-Lösung gewaschen, um nicht an das CCPGCC Tetracysteinmotiv gebundene FIAsh-EDT₂-Molekül zu entfernen. Anschließend wurden 2 ml der finalen 250 μM

¹⁷⁵ Synonym: optische Dichte

¹⁷⁶ Für die Markierung einer kompletten 6-Lochplatte wurden 6 μl der 25 mM EDT-Lösung und 6 μl der 1 mM FIAsh-Stammlösung eingesetzt.

EDT-haltigen Waschlösung in jedes Loch einer 6-Loschschale gegeben und für weitere 10 Minuten im Brutschrank bei 37°C inkubiert, um unspezifisch an Cysteine des Histamin H₁-Rezeptors gebundene FIAsh-EDT₂-Moleküle zu verdrängen. Nach der 10-minütigen Inkubation wurde die Waschlösung abgesaugt und die Zellen zweimal mit 1 ml HBSS-Lösung gewaschen, dann mit 1 ml isotonischem Messpuffer „Iso 150“¹⁷⁷ versetzt und fluorimetrisch mit Hilfe der FRET-Photometrie gemessen. Die FRET-Messungen wurden in einem Zeitfenster von fünf bis sechs Stunden vollzogen, da der Akzeptorfluorophor FIAsh mit der Zeit von seinem Tetracysteinmotiv abdissoziiert und das Zytoskelett der HEK293-Zellen durch die Anfärbung beschädigt wird.

2.9 Ratiometrische Kamera-basierte Kalziummessungen mit Fura-2 an Einzelzellen

Material	Hersteller
Fura-2-Acetoxymethylester	Biotrend, # 50034
Rinderserumalbumin	Sigma-Aldrich, # A7030-50G
Gelatine aus der Rindergesichtshaut	Sigma-Aldrich, # G9391
Natriumchlorid, >99,8%	Carl-Roth, # 9265.1
Kaliumchlorid; ≥99,5%	Carl-Roth, # 6781.1
Kalziumdichlorid-Dihydrat, ≥99%	Sigma-Aldrich, # C5080-500G
HEPES, PUFFERAN® ≥99,5%	Carl-Roth, # 9105.3
D(+)-Glucose, ≥99,5%	Sigma-Aldrich, # G7528-1KG
Magnesiumchlorid-Hexahydrat, ≥99%	Carl-Roth, # 2189.1
D(+)-Mannitol, BioUltra, ≥99%	Sigma-Aldrich, # 63559-1KG
Histamin-Dihydrochlorid	Sigma-Aldrich, # H 7250
Mepyramin maleat	Tocris, # 0660
YM 254890	Taiho Pharmaceutical
Leuprolid	Tocris, # 2873
Gonadoliberin	Sigma-Aldrich, # L7134
neoLab Deckgläser Stärke I, 24 mm Ø	Neolab, # 1-6290
ibidi®-Kammer, µ-Slide I ^{0.4} Luer ibiTreat	ibidi, # 80176
Application Note 11	ibidi
Inverses Fluoreszenzmikroskop	Olympus IX71
Monochromator, Polychrom V	TILLPhotonics
EMCCD-Kamera IXon ^{EM}	Andor Technology
Gaswaschflasche	im Labor vorhanden
Original-Perfusor®-Spritzen 50 ml	B. Braun Melsungen AG, PZN 00570097
50 ml Schraubröhre	Sarstedt, # 62.547.254
Discofix®-3, Dreiwegehähne	B. Braun Melsungen AG, PZN 02133047
3-Stopper Tygon Standard R-3607 Schlauch	Ismatec, # SC0069

¹⁷⁷ Isotonische Messlösung „Iso 150“ [mM]: 55 NaCl, 5 KCl, 2 CaCl₂ * 2H₂O, 10 HEPES, 10 Glucose, 1 MgCl₂ * 6H₂O, mit NaOH auf einen pH-Wert von 7,4 eingestellt und mit Mannitol isotonisch auf 300 ± 5 mOsmol l⁻¹ aufgestockt.

Ismatec Peristaltikpumpe Reglo Analog MS-4/ 8-100	Ismatec, # ISM 827B
--	---------------------

Für die ratiometrische Kamera-basierte Kalziummessungen mit Fura-2 an Einzelzellen wurden jeweils 200.000 HUVEC oder HAoEC 4 - 6 Stunden, 200.000 - 600.000 HEK293T-Zellen 48 - 72 Stunden oder 600.000 monoklonale HEK293-Zellen 24 Stunden vor der Durchführung des Experiments auf mit Poly-L-Lysin beschichtete Deckgläschen von neolab (Stärke I, 24 mm Ø) ausgesät und im Brutschrank bei 37°C kultiviert. Zuvor wurden die Glasplättchen einzeln in die Vertiefungen einer 6-Lochschale gelegt und jeweils mit 1,5 ml des entsprechenden Kulturmediums überschichtet. Nach 24 oder 48 Stunden wurden die HEK293T-Zellen mit den pcDNA-Säugetierexpressionsvektoren, die für einen $G_{q/11}$ -Protein gekoppelten Rezeptor (jeweils 1 µg: gpH₁R, hGnRHR, ssGnRHR, ssGnRHR2 oder hNTS₁R), für ein gelb fluoreszierendes Protein (0,1 µg EYFP) und für die $G_{\alpha q}$ -Untereinheit eines $G_{q/11}$ -Proteins (0,5 µg $G_{\alpha q}$ -Protein) kodieren, transfiziert. Vor der Messung wurden die Zellen nach Absaugen des Kulturmediums mit jeweils 1 ml einer HEPES gepufferten Badlösung HBS¹⁷⁸ mit folgender Zusammensetzung [mM]: 140 NaCl, 5 KCl, 1 MgCl₂ * 6H₂O, 2 CaCl₂ * 2H₂O, 5 Glucose, 10 HEPES (mit NaOH auf pH = 7,4 eingestellt) gewaschen. Anschließend wurden die Zellen mit 800 - 1000 µl einer 5 µM **Fura-2-Acetoxymethylester-(Fura-2-AM)**¹⁷⁹-haltigen HBS überschichtet und für 10 Minuten im Brutschrank bei 37°C inkubiert. Für eine bessere Löslichkeit von Fura-2-AM in HBS wurde der Fura-2-AM-haltigen HBS 0,1% Rinderalbumin zuvor zugesetzt und für 5 Minuten im Ultraschallbad geschallt. Fura-2-AM ist eine inaktive Vorstufe von Fura-2, die durch fünf kovalent gebundenene Acetoxymethylestergruppen zellmembrangängig ist (Tsien, 1981). In der Zelle spalten endogene Acetylerasen die Estergruppen hydrolytisch ab (Tsien, 1981) und setzen die freie Carbonsäure als die eigentliche Wirkform frei, die aufgrund der fünffach negativen Ladung nicht mehr aus der Zelle gelangen kann. Fura-2 ist ein ratiometrischer Kalziumionen-Indikator, der die freien intrazellulären Kalziumionen chelieren kann, ohne die intrazelluläre Konzentration an freien Kalziumionen stark zu beeinflussen (Grynkiewicz et al., 1985). Das Prinzip der Messmethode beruht darauf, dass die kalziumfreie Form von Fura-2 ein Anregungsmaximum bei $\lambda = 380$ nm und die kalziumgebundene Form ein Anregungsmaximum bei $\lambda = 340$ nm besitzt, wohingegen das Emissionmaximum von kalziumfreier und kalziumgebundener Form von Fura-2 unverändert bei $\lambda = 510$ nm als Fluoreszenzlicht liegt. Somit kann aus dem Quotienten (**Ratio, R** = F_{340}/F_{380}) beider Fluoreszenzintensitäten die freie intrazelluläre Kalziumkonzentration in der einzelnen Zelle ermittelt werden (Tsien et al., 1985; Hayashi und Miyata, 1994). Eine Erhöhung der freien intrazellulären Kalziumkonzentration zum Beispiel bei Freisetzung aus dem endoplasmatischem bzw. sarkoplasmatischem Retikulum induziert eine Erhöhung der

¹⁷⁸ Abkürzung HBS steht für **H**ank's **b**alancierte **S**alzlösung

¹⁷⁹ Hierzu wurde 1 mg Fura-2-AM in 200 µl DMSO gelöst, um eine 5 mM Fura-2-AM Stammlösung zu erhalten, die direkt zu 10 µl-Aliquots portioniert und lichtgeschützt bei -20°C gelagert werden. Für die Konzentration zur Beladung der Zellen wurde die Stammlösung 1:1000 verdünnt.

Fura-2 Fluoreszenzintensität bei $\lambda = 340$ nm-Anregung und gleichzeitig eine Abnahme der Fura-2 Fluoreszenzintensität bei $\lambda = 380$ nm-Anregung. Mit der nachfolgenden mathematischen Formel kann die absolute freie intrazelluläre Kalziumkonzentration $[Ca^{2+}]_i$ in einer Zelle berechnet werden:

$$[Ca^{2+}]_i = K_d \times \left(\frac{R - R_{\min}}{R_{\max} - R} \right) \times \frac{F_{380\min}}{F_{380\max}} \quad \text{Formel 5}$$

Formel 5: Dabei ist R der Quotient der beiden zuvor gemessenen Fluoreszenzintensitäten (F_{340}/F_{380}) in HBS. R_{\min} ist der minimale Wert des Quotienten der Fluoreszenzintensität (F_{340}/F_{380}) in absolut kalziumfreier ($[Ca^{2+}]_e = 0$ nM) HBS, die mit mit 2 mM EGTA¹⁸⁰ und mit 5 μ M Ionomycin¹⁸¹ versetzt wurde. R_{\max} stellt den maximalen Wert des Quotienten der Fluoreszenzintensität (F_{340}/F_{380}) in der gesättigter Kalziumlösung ($[Ca^{2+}]_e = 95$ mM), die mit 10 mM HEPES (pH = 8,0 mit NaOH) und mit 5 μ M Ionomycin versetzt wurde. $F_{380\max}$ ist die maximale Fluoreszenzintensität bei $\lambda = 380$ nm, die in gesättigter Kalziumlösung gemessen wird. $F_{380\min}$ ist die minimale Fluoreszenzintensität bei $\lambda = 380$ nm, die in der absolut kalziumfreien HBS bestimmt wird. K_d ist die Dissoziationskonstante von Fura-2 für Kalziumionen bei Raumtemperatur (21 - 23°C) und liegt bei 264 nM (Grynkiewicz et al., 1985). Bei der Kalibrierung der freien intrazellulären Kalziumkonzentration für HEK293-Zellen wurde Folgendes ermittelt: $R_{\min} = 0,13$, $R_{\max} = 9,722$ und $(F_{380\min}/F_{380\max}) = 16,47$. Damit sind die optischen Eigenschaften vom Objektiv, von den Filtern, von den Prismen, von den Spiegeln, von der Perfusionsmesskammer, vom Glasplättchen, von der Beschichtung, von der Badlösung, und von den Zellen selbst mitberücksichtigt.

¹⁸⁰ EGTA ist die Abkürzung vom Englischen Ethylene glycol-bis(2-aminoethylether)-N,N,N',N'-tetraacetic acid und wird als Komplexbildner für divalente Kationen mit höherer Affinität für Kalziumionen als Magnesiumionen eingesetzt.

¹⁸¹ Ionomycin ist ein Carrier-Ionophor aus dem Bakterium Streptomyces conglobatus für Kalziumionen.

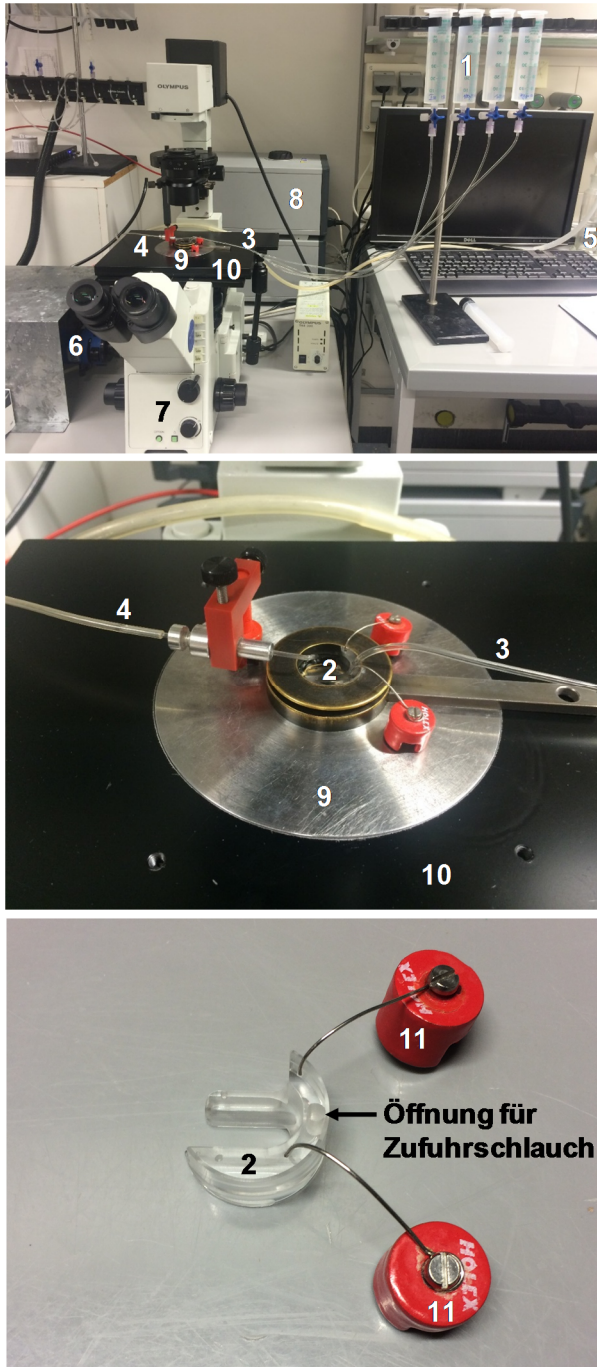


Abbildung 2.1: Aufbau des Messstand für ratiometrische Kalziummessungen mit Fura-2

Oben: Für eine gleichmäßige Perfusion von den Badlösungen (1: isotone Badlösungen „Iso 150“ versetzt mit oder ohne Agonisten, inversen Agonisten und Inhibitoren sowie hypotone Badlösung „Hypo150“) in der Perfusionsmesskammer (2, unten) wurde ein Zufluss über einen englumigen Zufuhrschlauch (3) mittels Gravitation durchgeführt. Der kontinuierliche Abfluss (4) der Badlösungen wurde über eine Waschflasche (5) mittels einer Membranvakuumpumpe gewährleistet. Die EMCCD¹⁸²-Kamera IXon^{EM} (6) ist über einen Dual View (MAG BiosystemsTM DV2TM Dual-Channel) an einen optischen Seitenausgang des inversen Olympus IX71 Mikroskops (7) angeschlossen. Die Anregung erfolgte über eine Xenon-Lampe (8, Polychrom V mit FDU2). Mitte: Die Deckgläschen-Einbauvorrichtung (9) aus magnetisch nichtrostendem Edelstahl mit Messingschraubverschluss in dem das Deckgläschen mit 24 mm Durchmesser eingespannt wird. Die Deckgläschen-Einbauvorrichtung (9) befindet sich in der vorgesehenen Öffnung des Mikroskopiertisches (10). Unten: Die Perfusionsmesskammer (2) aus Plexiglas liegt auf dem Deckgläschen und wird mit Hilfe von zwei Messkammerhalterungen (11, Dauermagnete mit Federstahl) fixiert.

Die Deckgläschen wurden in einer eigens im Hause angefertigten Einbauvorrichtung eingespannt und mit 1 ml einer HEPES gepufferten

HBS überschichtet und während der Messung mit der isotonischen Badlösung „Iso 150“ perfundiert. Die Iso 150-Badlösung beinhaltet [mM]: 55 NaCl, 5 KCl, 2 CaCl₂ * 2H₂O, 10 HEPES, 10 Glucose, 1 MgCl₂ * 6H₂O, die mit NaOH auf pH = 7,4 und wurde mit Mannitol isotonisch (300 ± 5 mOsmol l⁻¹) eingestellt. Außerdem wurde eine hypoosmolare Badlösung mit 150 mOsmol l⁻¹ („Hypo 150“) mit den gleichen Ionenkonzentrationen wie die Iso 150-Badlösung ohne zugesetztes Mannitol verwendet. Die Agonisten-Stimulation an den transfizierten HEK293T-Zellen erfolgte mittels Perfusion für ca. 1 Minute einer Iso 150-Badlösung mit folgenden Agonisten: 100 µM Histamin, 200 nM Gonadoliberin

¹⁸² Abkürzung EMCCD vom Englischen **E**lectron **M**ultiplying **C**harge **C**oupled **D**evice

(GnRH¹⁸³) und 200 nM Leuprolid¹⁸⁴. Der spezifische inverse Agonist Mepyramin (30 – 100 μ M) als auch der spezifische G_{q/11}-Inhibitor YM-254890 (100 nM) wurden ebenfalls über kontinuierliche Perfusion appliziert. Das inverse Mikroskop ist mit einem Ölimmersionsobjektiv UPlanSApo 20x/0.85, mit einem Filterset für FURA-2, bestehend aus einem Anregungsfilter mit Kurzpassfiltercharakteristik, der nur Wellenlängen bis $\lambda = 410$ nm durchlässt (SP¹⁸⁵410), einem dichroitischen Strahlenteiler, der eine Langpassfiltercharakteristik hat und das hindurchtretende Fluoreszenzlicht von Fura-2 als Interferenzfilter durchlässt und die beiden Anregungslichter für Fura-2 als Spiegel reflektieren. Die Grenzwellenlänge dieses Strahlenteilers liegt ebenfalls bei $\lambda = 410$ nm (DCLP¹⁸⁶410) und einem Emissionsfilter mit Langpassfiltercharakteristik, der Wellenlängen größer als $\lambda = 440$ nm durchlässt (LP440). Daneben besitzt das Mikroskop einen CFP-Filterset für die Detektion der blauen Fluoreszenz (Anregungsfilter DT-Blue¹⁸⁷, Strahlenteiler DCLP460 und Emissionslangpassfilter LP470), einen YFP-Filterset für die Detektion der gelben Fluoreszenz (Anregungskurzpassfilter SP B51, dichroitischer Strahlenteiler DCLP515 und Emissionsbandpassfilter: BP535/30), einen Dualband CFP/YFP-Filterset (Anregungsfilter: Ex-CFP/YFP, Dichroitischer Strahlenteiler: DC-CFP/YFP, Emissionsfilter: Em-CFP/YFP) und einen Monochromator (Polychrom V von TILL Photonics, Gräfelfing). Die Intensitäten der Fluoreszenzsignale von Fura-2, Cerulean und von EYFP wurden bei Anregungswellenlängen: $\lambda = 340$ nm und $\lambda = 380$ nm für FURA-2, $\lambda = 430$ nm für mCerulean und $\lambda = 500$ nm für EYFP mit einer EMCCD-Kamera (IXon^{EM}, Andor Technology Ltd., United Kingdom) aufgenommen. Zur Bestimmung der durch die Agonisten-Stimulation freigesetzter Kalziumionen wurden HEK293T-Zellen auf dem 24 mm \varnothing Glasplättchen mit monochromatischem Licht der Wellenlängen $\lambda = 380$ nm und $\lambda = 340$ nm angeregt. Vor jeder Messung wurden die einzelnen HEK293T-Zellen in definierte räumliche Bereiche (ROI)¹⁸⁸ mit einem Bildverarbeitungsprogramm TILLvisION Version 4.5.60 von TILL Photonics GmbH zugeordnet und aus dem Quotienten R der gemessenen Fluoreszenzintensitäten von kalziumgebundener ($F_{340\text{nm}}$) und kalziumfreier Form ($F_{380\text{nm}}$) von Fura-2 die freie intrazelluläre Kalziumkonzentration jeder einzelnen HEK293-Zelle durch die Analysensoftware TILLvisION von TILL Photonics GmbH (Gräfelfing, Deutschland) berechnet. Als Ausschlusskriterien wurden sowohl HEK293-Zellen, die zu Beginn der Messung eine basale intrazelluläre Kalziumkonzentration von mehr als 150 nM aufwiesen als auch solche HEK293-Zellen, die eine transiente Kalziumzunahme kleiner als 120 nM bei Agonisten-Stimulation zeigten, festgelegt. Desweiteren wurden fluorimetrische Kalziummessungen von HUVEC und HAoEC in ibidi[®]-Kammern (μ -Slide I^{0.4} Luer ibi Treat, Martinsried, Deutschland) durchgeführt, die einen homogenen laminaren Perfusionsfluss weitgehend gewähren. Die Kammern wurden am Vortag über

¹⁸³ Abkürzung GnRH vom Englischen **G**onadotropin-**R**eleasing-**H**ormon

¹⁸⁴ Synonym für Leuprorelin

¹⁸⁵ Abkürzung SP vom Englischen **S**hort **P**ass

¹⁸⁶ Abkürzung DCLP vom Englischen **D**ichroic **L**ong **P**ass

¹⁸⁷ DT-blue ist ein Bandpassfilter, der nur Wellenlängen $\lambda = 436 \pm 10$ nm durchlässt

¹⁸⁸ Abkürzung ROI vom Englischen **R**egion **O**f **I**nterest

Nacht im Brutschrank bei 37°C temperiert und mit Carbogen¹⁸⁹ begast. Die ibidi-Kammern wurden morgens mit Rindergelatine aus der Gesichtshaut (Sigma-Aldrich, # G9391, Taufkirchen) beschichtet. Dafür wurde eine Gelatine-Stammlösung mit einer Konzentration von 1 mg ml⁻¹ hergestellt, indem 1 mg Rindergelatine in 1 ml PBS mit Hilfe eines Vortexmischers gelöst wurde. Diese frisch zubereitete Gelatine-Stammlösung wurde mit PBS auf eine Gelatine-Endkonzentration von 20 µg ml⁻¹ verdünnt. Mittels einer 2 ml-Spritze wurden die vorbehandelten ibidi-Kammern mit der verdünnten Gelatine-Lösung befüllt und für eine halbe Stunde im Brutschrank bei 37°C inkubiert. Anschließend wurde diese Lösung abgesaugt und die Gelatine-beschichtete ibidi-Kammer im Brutschrank bei 37°C bis zur Befüllung aufbewahrt. Die HUVEC oder HAoEC wurden in einer Zelldichte von 30.000 – 70.000 ml⁻¹ gleichmäßig mit Hilfe einer 2 ml-Spritze befüllt. Das gesamte Fassungsvermögen für eine µ-Slide I^{0.4} Kammer beträgt 220 µl aus 100 µl Kanalvolumen mit jeweils zwei 60 µl Reservoirs, so dass im Kanal etwa 7.000 bis 15.000 HUVEC bzw. HAoEC vorliegen. Nach einer zweistündigen Inkubation im Brutschrank wurden die HUVEC bzw. HAoEC mit 5 µM Fura-2-AM-haltige HBS beladen und anschließend mit 1 ml einer HEPES gepufferten HBS gewaschen und sofort fluorimetrisch gemessen.

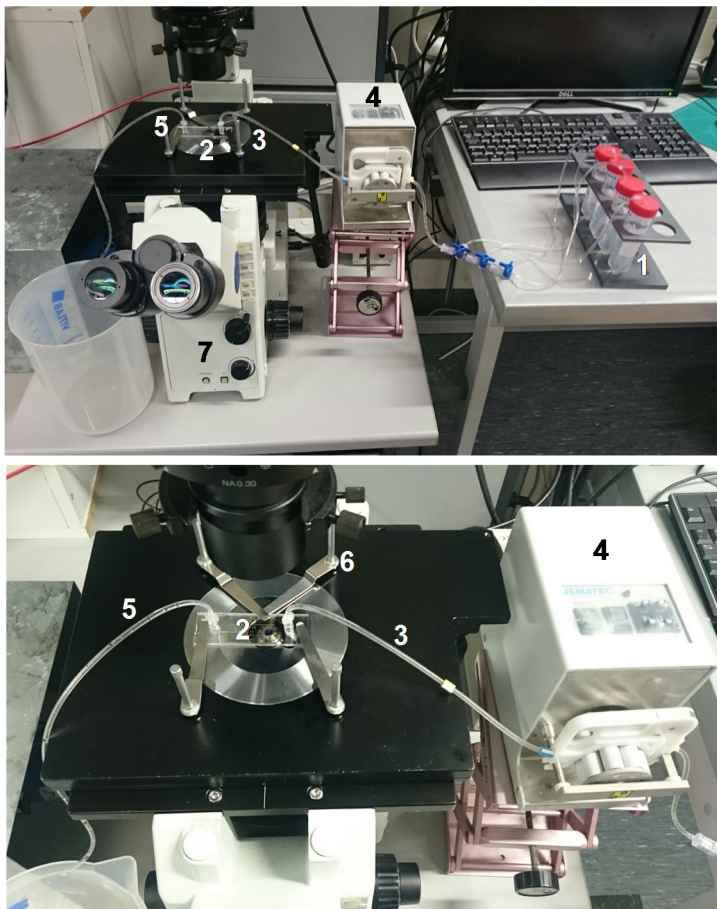


Abbildung 2.2: Aufbau des Messstandes für ratiometrische Kalziummessungen mit Fura-2 für Fluss-induzierte Scherkräfte

Oben: Eine laminare Perfusion von den Badlösungen (1, isotonen Badlösungen „Iso 150“ versetzt mit oder ohne Agonisten, inversen Agonisten und Inhibitoren) in der ibidi-Kammer (2) wurde über einen englumigen Zufuhrschlauch (3) mit Hilfe einer Schlauchquetschpumpe (Ismatec-Pumpe Reglo Analog MS-4/8-100 Peristaltik mit 8 Rollen) erreicht (4). Unten: Für eine laminare Flüssigkeitsströmung der Badlösung mit einer definierten Flussrate wurde die ibidi-Kammer (2) mit zwei weiblichen Luer-Lock-Anschlüssen an zwei 3-Stopper Tygon Standard R-3607 Schläuche (Zufuhr- und Abflussschlauch) angeschlossen. Die Fluss-induzierte Scherkraft wurde ebenfalls mit Hilfe einer Schlauchquetschpumpe-Pumpe von Ismatec angelegt, die definierte

¹⁸⁹ Carbogen setzt sich aus 5 % (V/V) Kohlenstoffdioxid (CO₂) und 95 % (V/V) Sauerstoff (O₂) zusammen.

Flussraten lieferte. Der Abfluss (4) der Badlösungen wurde über einen Abflussschlauch (5) in einem Auffangbehälter gewährleistet. Die ibidi-Kammer wurde mit Hilfe von vier Objektträgerhaltern (6) fixiert.

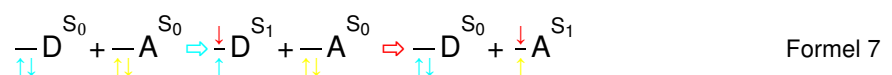
Für die fluorimetrischen Kalziummessungen wurde eine Schlauchquetschpumpe von Ismatec (Ismatec Reglo, Wertheim, Deutschland) über einen 3-Stopper Tygon Standard R-3607 Schlauch an eine mit Fura-2 beladene Scherkräftekammer luftblasenfrei angeschlossen. Es wurden gemäß Angaben des Herstellers Scherkräfte mit Flussraten von $3,04 \text{ ml min}^{-1}$ für 4 dyn cm^{-2} (Pumpeneinstellung = 16) und $15,19 \text{ ml min}^{-1}$ für 20 dyn cm^{-2} (Pumpeneinstellung = 79) angelegt. Die beiden applizierten Scherkräfte wurden nach der Formel berechnet:

$$\tau = \eta \times 131,6 \times \phi \quad \text{Formel 6}$$

Formel 6: Mit τ = Scherkraft [dyn cm^{-2}], η = dynamische Viskosität der Badlösung mit $\eta \approx 0.0072 \text{ dyn s cm}^{-2}$, und ϕ = Flussrate [ml min^{-1}] für μ -Slide $1^{0.4}$ ibidi-Kammer mit einem geometrischen und Maßeinheiten-Umrechnungsfaktor von $131,6 \text{ min s}^{-1} \text{ ml}^{-1}$ nach Cornish et al, 1928.

2.10 FRET-Photometrie

Der von Theodor Förster im Jahre 1948 beschriebene Förster-Resonanz-Energie-Transfer, der auch unter dem Namen Fluoreszenz-Resonanz-Energie-Transfer, kurz **FRET**, bekannt ist (Förster, 1948) bezieht sich auf eine strahlenlose Energieübertragung von einem angeregten Donorfluoreszenzfarbstoff auf einen zweiten Akzeptorfluoreszenzfarbstoff im Grundzustand. Diese transferierte Energie wird nicht in Form von elektromagnetischer Strahlung bzw. Photonen, sondern strahlungslos über Coulomb'sche Dipol-Dipol-Wechselwirkungen übertragen, wobei der Eigendrehimpuls, der sogenannte Spin, beider Fluoreszenzfarbstoffe insgesamt erhalten bleibt. In der Quantenphysik wird diese Energieübertragung auch als ein Singulett-Singulett-Transfer von Valenzelektronen ($S_0 \rightarrow S_1$ im Jablonski-Diagramm, siehe Abbildung 2.3) ohne Spinumkehr beschrieben, der aber beim Singulett-Triplett-Transfer stattfindet und die Phosphoreszenz charakterisiert (Zander, 1981). Dabei gilt, dass die Elektronen im S_0 -Zustand mit antiparallelem Spin vorliegen und kein magnetisches Drehmoment besitzen (siehe Formel 7). Im angeregten S_1 -Zustand ist der Spin des angeregten Elektrons weiterhin mit dem nicht angeregten Elektron antiparallel und es gibt auch hier kein magnetisches Drehmoment (Breitmaier und Jung, 2012).



Formel 7: Der FRET kann somit physikalisch-mathematisch mit D = Donorfluoreszenzfarbstoff, A = Akzeptorfluoreszenzfarbstoff, S_0 = Singulett-Grundzustand, S_1 = angeregter Singulett-Zustand, \Rightarrow = Photonen-Energiezufuhr ($E = h\nu^{190}$), \Rightarrow = FRET, $\uparrow\downarrow$ = antiparallele Spinrichtung im angeregten Singulett-Zustand und $\uparrow\downarrow$ = antiparallele Spinrichtung im Singulett-Grundzustand ausgedrückt werden.

190 Einsteinsche Gleichung für die Energie eines Photons mit Planckschem Wirkungsquantum h und mit der Frequenz des Photons ν

Der FRET zwischen zwei Fluoreszenzfarbstoffen hängt von der Energietransferrate k_T ab, die ein Maß für einen strahlenlosen Energietransfers (FRET) zwischen zwei Fluoreszenzfarbstoffen ist. Diese Größe wird durch folgende Parameter bestimmt: Erstens, von der anfänglichen Fluoreszenzlebensdauer des Donorfluoreszenzfarbstoffs τ_D in Abwesenheit des Akzeptorfluoreszenzfarbstoffs. Zweitens, von der Rate der emittierten Photonen des Donorfluoreszenzfarbstoffs k_D und drittens, von der Entfernung R_{DA} zwischen dem Emissionsdipol des Donorfluoreszenzfarbstoffs und dem Absorptionsdipol des Akzeptorfluoreszenzfarbstoffs (siehe Abbildung 2.5). Bei dem Abstand R_{DA} bei der die FRET-Effizienz E_{FRET} einer strahlenfreien Energieübertragung zwischen zwei Fluoreszenzfarbstoffen genau 50% beträgt, wird als der Förster-Radius R_0 bezeichnet. Die FRET-Effizienz gibt den Anteil an Photonen wieder, die vom Donorfluoreszenzfarbstoff absorbiert und in einen strahlenlosen Energietransfer (FRET) auf den Akzeptorfluoreszenzfarbstoff mündet. Eine hohe FRET-Effizienz würde demnach bedeuten, dass jedes absorbierte Photon durch den Donorfluoreszenzfarbstoff idealerweise in einem FRET zwischen dem Donor- und Fluoreszenzfarbstoff resultiert.

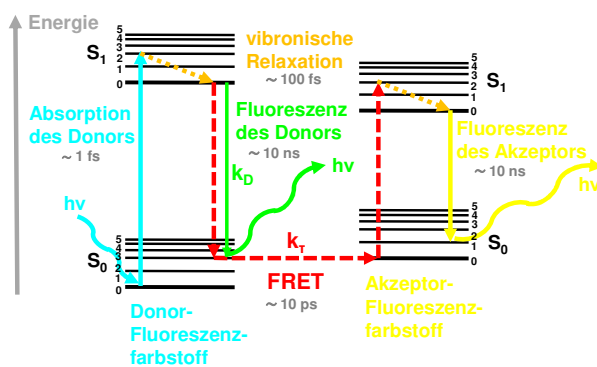


Abbildung 2.3: Jablonski-Diagramm für FRET Durch die Absorption von energiereicher, kurzwelliger Strahlung im sichtbaren Bereich ($h\nu$, türkis) wird das Valenzelektron des Donorfluoreszenzfarbstoffs auf einen angeregten S_1 -Zustand mit den Schwingungszuständen (0,1,2,3,4,5) angehoben. Das angeregte Valenzelektron des Donorfluoreszenzfarbstoffs fällt zunächst, innerhalb von 100 fs (Zander, 1981), durch strahlungslose vibronische Relaxation (orange gestrichelter Pfeil) in den Grundzustand (0) mit der geringsten Energie des angeregten S_1 -Zustands zurück. Im angeregten Schwingungsgrundzustand des S_1 -Zustands kann das angeregte Valenzelektron des Donorfluoreszenzfarbstoffs entweder die erhöhte Energie im zweistelligen Nanosekundenbereich als Photon emittieren (Fluoreszenz des Donors k_D , $h\nu$, grün) oder im zweistelligen Pikosekundenbereich (Xu et al., 2005) in Form eines strahlungslosen Energietransfers (FRET, rot gestrichelte Pfeile) auf den Akzeptorfluoreszenzfarbstoff im S_0 -Grundzustand übertragen. Die Rate des strahlenlosen Energietransfers vom Donorfluoreszenzfarbstoff auf den Akzeptorfluoreszenzfarbstoff ist als k_T (rot gestrichelter horizontaler Pfeil) hervorgehoben. Somit wird das Valenzelektron des Akzeptorfluoreszenzfarbstoffs auf den energiereicheren S_1 -Zustand angehoben (roter gestrichelter Aufwärtspfeil). Das Valenzelektron im angeregten Akzeptorfarbstoff fällt zunächst wieder durch vibronische Relaxation auf den Schwingungsgrundzustand (0) des S_1 -Zustands zurück (orange gestrichelter Pfeil) und strahlt dabei die Energie als langwelliges Licht im sichtbaren Bereich ab ($h\nu$, gelb). Durch das FRET nimmt die Fluoreszenzintensität des Donorfluoreszenzfarbstoffs ab ($h\nu$, grün), während die des Akzeptorfluoreszenzfarbstoffs im zweistelligen Nanosekundenbereich ($h\nu$, gelb) zunimmt. Abbildung in Anlehnung an Hochreiter et al (2015) Sensors **15**:26281-26314

gestrichelter Pfeil) in den Grundzustand (0) mit der geringsten Energie des angeregten S_1 -Zustands zurück. Im angeregten Schwingungsgrundzustand des S_1 -Zustands kann das angeregte Valenzelektron des Donorfluoreszenzfarbstoffs entweder die erhöhte Energie im zweistelligen Nanosekundenbereich als Photon emittieren (Fluoreszenz des Donors k_D , $h\nu$, grün) oder im zweistelligen Pikosekundenbereich (Xu et al., 2005) in Form eines strahlungslosen Energietransfers (FRET, rot gestrichelte Pfeile) auf den Akzeptorfluoreszenzfarbstoff im S_0 -Grundzustand übertragen. Die Rate des strahlenlosen Energietransfers vom Donorfluoreszenzfarbstoff auf den Akzeptorfluoreszenzfarbstoff ist als k_T (rot gestrichelter horizontaler Pfeil) hervorgehoben. Somit wird das Valenzelektron des Akzeptorfluoreszenzfarbstoffs auf den energiereicheren S_1 -Zustand angehoben (roter gestrichelter Aufwärtspfeil). Das Valenzelektron im angeregten Akzeptorfarbstoff fällt zunächst wieder durch vibronische Relaxation auf den Schwingungsgrundzustand (0) des S_1 -Zustands zurück (orange gestrichelter Pfeil) und strahlt dabei die Energie als langwelliges Licht im sichtbaren Bereich ab ($h\nu$, gelb). Durch das FRET nimmt die Fluoreszenzintensität des Donorfluoreszenzfarbstoffs ab ($h\nu$, grün), während die des Akzeptorfluoreszenzfarbstoffs im zweistelligen Nanosekundenbereich ($h\nu$, gelb) zunimmt. Abbildung in Anlehnung an Hochreiter et al (2015) Sensors **15**:26281-26314

Mit der nachfolgenden Formel kann die Energietransferrate k_T^{191} eines FRET zwischen zwei Fluoreszenzfarbstoffen berechnet werden (Lakowicz, 2006a; Claussen et al., 2013; Masters, 2014)

$$k_T = \frac{1}{\tau_D} \times \frac{R_0^6}{R_{DA}^6} = \frac{1}{\tau_D} \times \left(\frac{R_0}{R_{DA}} \right)^6 \quad \text{Formel 8}$$

Auf die mathematische Formel 8 zurückgreifend ergibt sich die FRET-Effizienz E_{FRET} zu:

$$E_{\text{FRET}} = \frac{k_T \times \tau_D}{1 + (k_T \times \tau_D)} = \frac{R_0^6}{R_0^6 + R_{DA}^6} = \frac{1}{1 + \left(\frac{R_{DA}}{R_0} \right)^6} \quad \text{Formel 9}$$

Formel 8 und 9: Mit k_T = Energietransferrate, wobei $k_T = \tau_D^{-1}$, τ_D = Fluoreszenzlebensdauer des Donorfluoreszenzfarbstoffs in Abwesenheit des Akzeptors, R_0 = Förster-Radius, R_{DA} = Abstand zwischen Donor- und Akzeptorfluoreszenzfarbstoff.

Da die FRET-Effizienz E_{FRET} mit der sechsten Potenz des Abstandes beider Farbstoffe abnimmt, sollte die Entfernung R_{DA} zwischen dem Donor- und dem Akzeptorfluoreszenzfarbstoff unter $R_{DA} \leq 10 \text{ nm}$ ($\leq 100 \text{ \AA}$) liegen.

Eine weitere Berechnungsmöglichkeit der FRET-Effizienz E_{FRET} besteht in der Verwendung experimentell ermittelter Fluoreszenzintensitäten des Donorfluoreszenzfarbstoffs in Anwesenheit (F_{DA}) und in Abwesenheit (F_D) des Akzeptorfluoreszenzfarbstoffs:

$$E_{\text{FRET}} = 1 - \frac{F_{DA}}{F_D} \quad \text{Formel 10}$$

Formel 10: Mit F_{DA} = Fluoreszenzintensität in Anwesenheit des Akzeptorfluoreszenzfarbstoffs, F_D = Fluoreszenzintensität in Abwesenheit des Akzeptorfluoreszenzfarbstoffs.

Als eine weitere notwendige Bedingung sollte das Emissionsspektrum des Donorfluoreszenzfarbstoffs mit dem Absorptionsspektrum des Akzeptorfarbstoffs überlappen (siehe Abbildung 2.4), wobei die überlappende Fläche der Spektren J als das Integral proportional zur Energietransferrate k_T und zur sechsten Potenz des Förster-Radius R_0 ist (Xu et al., 2005; Lakowicz, 2006a; Claussen et al., 2013; Masters, 2014):

$$J(\lambda) = \int_0^{\infty} f_D(\lambda) \epsilon_A(\lambda) \lambda^4 d\lambda \quad \text{Formel 11}$$

Formel 11: $f_D(\lambda)$ = normierte Fluoreszenzintensität des Donorfarbstoffs bei der Wellenlänge λ ($\lambda_{\text{Cerulean}} = 433 \text{ nm}$), $\epsilon_A(\lambda)$ = Extinktionskoeffizient des Akzeptorfarbstoffs, λ = Wellenlänge in nm

¹⁹¹ Die Energietransferrate k_T ist indirekt proportional zur Fluoreszenzlebensdauer des Donorfluoreszenzfarbstoffs τ_D , wodurch der Kehrwert der Fluoreszenzlebensdauer des Donorfluoreszenzfarbstoffs τ_D der Energietransferrate k_T entspricht.

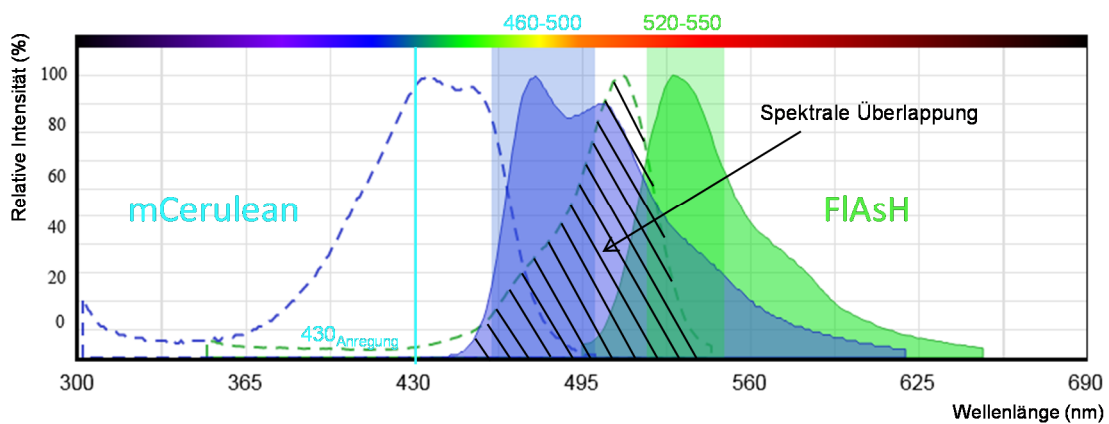


Abbildung 2.4: Die Anregungs- und Emissionsspektren der beiden Fluorochrome FIAsh und Cerulean unter Angabe der maximalen Exzitations- und Emissionswellenlängen Gestrichelte Flächen stellen die Anregungs- bzw. Exzitationsspektren und die farbigen Flächen die Emissionsspektren beider Fluorochrome dar. Die beiden Emissionsspektren werden durch die beiden Bandpassfilter, YFP- bzw. FIAsh-Emissionsfilter (BP535/30, 520-550 nm, grüner Balken) und CFP- bzw. Cerulean Emissionsfilter (BP480/40, 460-500 nm, blauer Balken) eingegrenzt. Die schwarz-schraffierte Fläche gibt die spektrale Überlappung wieder. Die Anregungs- und Emissionsspektren mit den Emissionsfiltern wurden mit Hilfe des online Web tools Spectrum Viewer von AAT Bioquest mit der URL-Adresse <https://www.aatbio.com/spectrum/> erstellt. Letzter Aufruf erfolgte am 09.05.2018.

Als letzte notwendige Bedingung sollten der Donor- und der Akzeptorfluoreszenzfarbstoff möglichst parallele elektronische Schwingungsfelder (Dipolachsen) besitzen (siehe Abbildung 2.5). Der Orientierungsfaktor κ^2 ($0 \leq \kappa^2 \leq 4$), das durch die relative Orientierung der Dipolachsen beider Fluoreszenzfarbstoffe zueinander festgelegt ist, kann die Wahrscheinlichkeit und das Ausmaß eines FRET bestimmen (Lakowicz, 2006b; Claussen et al., 2013). Die Energietransferrate k_T und die sechste Potenz des Förster-Radius R_0 sind direkt proportional zum Orientierungsfaktor κ^2 .

$$\kappa^2 = (\cos \theta_{DA} - 3 \cos \theta_D \cos \theta_A)^2 \quad \text{Formel 12}$$

Formel 12: Mit κ^2 = Orientierungsfaktor der Dipolachsen beider Fluoreszenzfarbstoffe, θ_{DA} = Winkel zwischen dem Emissionsdipol des Donorfluoreszenzfarbstoffs und dem Absorptionsdipol des Akzeptorfluoreszenzfarbstoffs, θ_D = Winkel zwischen dem Emissionsdipol des Donorfluoreszenzfarbstoffs und dem Verbindungsvektor R_{DA} zwischen dem Donor- und dem Akzeptorfluoreszenzfarbstoff, θ_A = Winkel zwischen dem Absorptionsdipol des Akzeptorfluoreszenzfarbstoffs und dem Verbindungsvektor R_{DA} zwischen dem Donor- und Akzeptorfluoreszenzfarbstoff.

Da der Kosinus nur Werte zwischen 0 und 1 annehmen kann, können für den Orientierungsfaktor κ^2 aus der obigen Gleichung (siehe Formel 12) nur Werte zwischen 0 und 4 berechnet werden, wobei der Wert $\kappa^2 = 0$ bei senkrechter bzw. orthogonal-perpendikularer ($\theta_{DA} = 90^\circ$), $\kappa^2 = 1$ bei paralleler ($\theta_{DA} = 0^\circ$) und $\kappa^2 = 4$ bei linear-abhängiger, kollinearer Anordnung des Donor-Emissionsdipols zum Akzeptor-Absorptionsdipol zustandekommt (Lakowicz, 2006c; Clegg, 2009; Vogel et al., 2012).

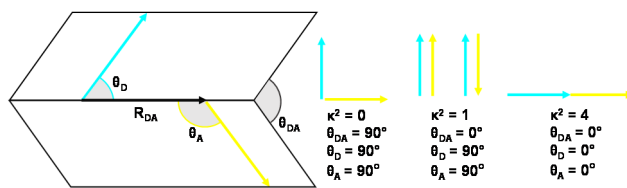


Abbildung 2.5: Schematische Darstellung der elektrischen Schwingungsfelder (Dipolachsen) Bei einer senkrechten bzw. orthogonal-perpendikularen Anordnung der beiden Dipolachsen zueinander ($\kappa^2 = 0$, $\theta_{DA} = 90^\circ$) ist ein FRET ausgeschlossen. Bei

einer parallelen ($\kappa^2 = 1$, $\theta_{DA} = 0^\circ$) und einer kollinearen ($\kappa^2 = 4$, $\theta_{DA} = 0^\circ$) Anordnung beider Dipolachsen zueinander findet ein FRET statt. Mit $\kappa^2 =$ Orientierungsfaktor der Dipolachsen beider Farbstoffe zueinander, $\theta_{DA} =$ Winkel zwischen dem Emissionsdipol des Donorfluoreszenzfarbstoffs und dem Absorptionsdipol des Akzeptorfluoreszenzfarbstoffs, $\theta_D =$ Winkel zwischen dem Emissionsdipol des Donorfluoreszenzfarbstoffs (türkis farbener Pfeil) und dem Verbindungsvektor (R_{DA} , schwarzer Pfeil) zwischen dem Donor- und dem Akzeptorfluoreszenzfarbstoff, $\theta_A =$ Winkel zwischen dem Absorptionsdipol des Akzeptorfluoreszenzfarbstoffs (gelber Pfeil) und dem Verbindungsvektor (schwarzer Pfeil) zwischen dem Donor- und Akzeptorfluoreszenzfarbstoff. Abbildung in Anlehnung an Lakowicz (2006) Springer **3. Auflage**:449

In der Realität sind die Farbstoffe nicht in einer bestimmten Orientierung fixiert, somit können sie sich mit einer gewissen Rotationskorrelationszeit von ca. 15 ns für fluoreszierende Proteine wie z. B. für das gelb fluoreszierende Protein Venus (Pons, 2013) frei bewegen. In Lösungen beträgt der Orientierungsfaktor $\kappa^2 = \frac{2}{3}$. Dieser Wert trifft für kleine Fluorophore wie z. B. FIAsH zu, aber weniger für die großen fluoreszierenden Proteine, die aufgrund ihrer Größe in ihrer Rotation stark sterisch eingeschränkt sind. Somit nimmt man an, dass bei einem Wert von $\kappa^2 = \frac{2}{3}$ die Dipole der Fluoreszenzfarbstoffe frei rotieren können. Der Orientierungsfaktor κ^2 , der durch die Größe und die Lage beider Farbstoffe im elektrischen Schwingungsfeld festgelegt ist, kann somit Auskunft über die Effizienz des FRET geben. Zusammenfassend gehen in die Berechnung des Förster-Radius R_0 der Orientierungsfaktor $\kappa^2 = \frac{2}{3}$ der Dipol-Dipol-Wechselwirkung, die spektrale Überlappung zwischen dem Emissionsspektrum des Donors und dem Absorptionsspektrum des Akzeptors $J(\lambda)$, die Fluoreszenzquantenausbeute des Donors Q_D in Abwesenheit des Akzeptors, die normierte Fluoreszenzintensität des Donors $f_D(\lambda)$, der molare Extinktionskoeffizient des Akzeptors $\epsilon_A(\lambda)$ und der refraktive Index (Brechungsindex) des Mediums n ein. Der Försterradius R_0 ist die Distanz zwischen Akzeptor und Donor, bei der die Hälfte der Donorfluoreszenzmoleküle einen FRET vollzogen hat oder die Hälfte der Akzeptormoleküle von einem Grundzustand S_0 in einen angeregten Zustand S_1 gewechselt ist.

Name	Absorptionsmaximum [nm]	Emissionsmaximum [nm]	Molarer Extinktionskoeffizient [$10^3 \text{ l mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$]	Fluoreszenzquantenausbeute
ECFP	433/ 434	475/ 477	26/ 29/ 30/ 33	0,36/ 0,40/ 0,41
EYFP	514/ 515	527/ 528	80,4/ 84	0,61
mTFP1	462	492	64	0,85
mKO2	551	565	63,8	0,62
FIAsH	508	528	70	0,85
Cerulean	433 - 435	475-475	43	0,62
mVenus	515	528	92,2	0,57
mTurquoise2	434	474	30	0.93 ± 0.02

Tabelle 2.1: Übersicht über Parameter fluoreszierender Proteine und FIAsH (Gudermann et al., 1997; Griffin et al., 1998; Patterson et al., 2001; Gaietta et al., 2002; Nagai et al., 2002; Rizzo et al., 2004; Ai et al., 2006; Lelimosin et al., 2009; Sun et al., 2009; Goedhart et al., 2012; Wall et al., 2015)

FRET-Paare	spektrale Überlappung $J(\lambda)$ [$m^6 \text{ mol}^{-1}$]
EYFP-ECFP	$2,338 \times 10^{-27}$
mTFP1-mKO2	$2,623 \times 10^{-27}$
FIAsH-mCerulean	$2,874 \times 10^{-27}$

Tabelle 2.2: Die spektrale Überlappung $J(\lambda)$ [$m^6 \text{ mol}^{-1}$] wurde mit Hilfe von a|e - UV-Vis-IR Spectral Software 2.2, FluorTools, letzte Version (26.01.2015) www.fluortools.com, bestimmt. Letzter Aufruf erfolgte am 07.04.2017.

Für die Berechnung des Förster-Radius wurde die nachfolgende mathematische Formel (Formel 13.1) verwendet:

$$R_0^6 = \frac{9000 \ln 10 \kappa^2 Q_D}{128 \pi^5 n^4 N_A} \int_0^\infty f_D(\lambda) \varepsilon_A(\lambda) d\lambda \lambda^4 \quad \text{Formel 13}$$

$$R_0^6 = \frac{9000 \ln 10 \kappa^2 Q_D}{128 \pi^5 n^4 N_A} J(\lambda) \quad \text{Formel 13.1}$$

Formel 13.1: Mit R_0 = Förster-Radius, κ^2 = Orientierungsfaktor, Q_D = Fluoreszenzquantenausbeute des Donors in Abwesenheit des Akzeptors, $J(\lambda)$ = spektrale Überlappung, $f_D(\lambda)$ = normierte Fluoreszenzintensität des Donorfarbstoffs bei der Wellenlänge λ ($\lambda_{\text{Cerulean}} = 433\text{nm}$), $\varepsilon_A(\lambda)$ = Extinktionskoeffizient des Akzeptorfarbstoffs, λ = Wellenlänge in nm und n = Brechungsindex des Mediums. Eine Vereinfachung der mathematischen Formel 13 für die Berechnung des Förster-Radius erfolgt mit Einsetzen der Avogadro-Konstante $N_A = 6,02214 \times 10^{23} \text{ mol}^{-1}$, das zur nachfolgenden Gleichung führt:

$$R_0^6 = 8,785 \times 10^{-25} \text{ mol} (\kappa^2 n^4 Q_D J(\lambda) m^6 \text{ mol}^{-1})$$

Für die Berechnung des Förster-Radius für folgende FRET-Paare: ECFP-EYFP, mTFP1-mKO2 und Cerulean-FIAsH wurde der Brechungsindex n für wässrige Lösungen $n = 1,4$ und der Orientierungsfaktor $\kappa^2 = \frac{2}{3}$ gesetzt.

ECFP-EYFP

mit $Q_{\text{ECFP}} = 0,40$, $J_{\text{ECFP-EYFP}} = 2,338 \times 10^{-25} m^6 \text{ mol}^{-1}$

$$R_0^6 = \frac{9000 \ln 10 \kappa^2 Q_D J(\lambda)}{128 \pi^5 n^4 N_A}$$

$$R_0^6 = 8,785 \times 10^{-25} \text{ mol} (\kappa^2 n^4 Q_D J(\lambda) m^6 \text{ mol}^{-1})$$

$$R_0^6 = 8,785 \times 10^{-25} \text{ mol} (1,623 \times 10^{-26} m^6 \text{ mol}^{-1})$$

$$R_0^6 = 1,418 \times 10^{-50}$$

$$R_0 = \sqrt[6]{1,418 \times 10^{-50} m^6}$$

$$R_0 = 4,92 \times 10^{-9} \text{ m}$$

$$R_0 = 4,92 \text{ nm}$$

Cerulean-FIAsH

mit $Q_{\text{mCerulean}} = 0,62$, $J_{\text{mCerulean-FIAsH}} = 2,874 \times 10^{-25} m^6 \text{ mol}^{-1}$

$$R_0^6 = \frac{9000 \ln 10 \kappa^2 Q_D J(\lambda)}{128 \pi^5 n^4 N_A}$$

$$R_0^6 = 8,785 \times 10^{-25} \text{ mol } (\kappa^2 n^4 Q_D J(\lambda) \text{ m}^6 \text{ mol}^{-1})$$

$$R_0^6 = 8,785 \times 10^{-25} \text{ mol } (3,0923 \times 10^{-26} \text{ m}^6 \text{ mol}^{-1})$$

$$R_0^6 = 2,7165 \times 10^{-50} \text{ m}^6$$

$$R_0 = \sqrt[6]{2,7165 \times 10^{-50} \text{ m}^6}$$

$$R_0 = 5,4828 \times 10^{-9} \text{ m}$$

$$R_0 = 5,48 \text{ nm}$$

mTFP1-mKO2

mit $Q_{\text{mTFP1}} = 0,62$, $J_{\text{mTFP1-mKO2}} = 2,623 \times 10^{-25} \text{ m}^6 \text{ mol}^{-1}$

$$R_0^6 = \frac{9000 \ln 10 \kappa^2 Q_D J(\lambda)}{128 \pi^5 n^4 N_A}$$

$$R_0^6 = 8,785 \times 10^{-25} \text{ mol } (\kappa^2 n^4 Q_D J(\lambda) \text{ m}^6 \text{ mol}^{-1})$$

$$R_0^6 = 8,785 \times 10^{-25} \text{ mol } (3,8691 \times 10^{-26} \text{ m}^6 \text{ mol}^{-1})$$

$$R_0^6 = 3,3990 \times 10^{-50} \text{ m}^6$$

$$R_0 = \sqrt[6]{3,3990 \times 10^{-50} \text{ m}^6}$$

$$R_0 = 5,6915 \times 10^{-9} \text{ m}$$

$$R_0 = 5,69 \text{ nm}$$

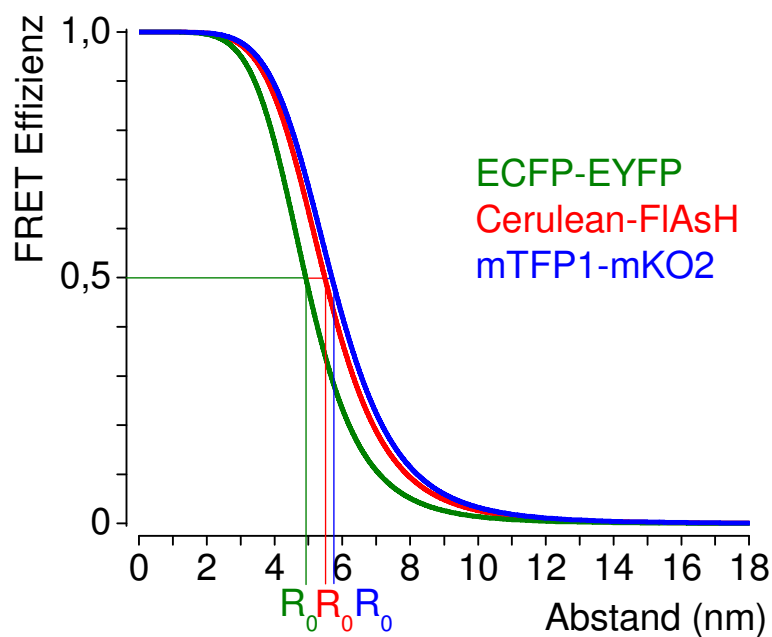


Abbildung 2.6: FRET-Effizienzen für die drei FRET-Paare ECFP-EYFP, Cerulean-FIAsH, mTFP1-mKO2 in Abhängigkeit des Abstandes (nm) der Fluorochrome zueinander, wobei R_0 der Abstand ist, bei dem die FRET-Effizienz 50% beträgt.

Für die Durchführung der dynamischen FRET-Experimente wurde das inverse Fluoreszenzmikroskop Olympus IX70 ausgestattet mit einem UPlanSApo 100x/1,40 Ölimmersionsobjektiv und dem Dual Emission Photometry System von TILL-Photonics (Martinsried, Deutschland), verwendet (siehe Abbildung 2.10). Hierbei handelt es sich nicht um ein Imaging System, sondern um ein zwei Photodiodesystem, das keine subzelluläre räumliche Auflösung ermöglicht. Mit den beiden Photodioden (Hamamatsu) können simultan in zwei unterschiedlichen Kanälen Photonen detektiert werden, womit simultane Fluoreszenzmessungen mit einer Frequenz von 10 Hz aufgenommen werden konnten. Die Fluoreszenzintensitätsmessungen beruhen auf dem inneren photoelektrischen Effekt bei Halbleitern. Es kommt bei Bestrahlung des Photodiodesmaterials zur Bildung von ungebundenen Elektron-Loch-Paaren, die die elektrische Leitfähigkeit der Halbleiterdiode erhöhen. Die Photodioden werden über einen virtuellen Kurzschluss mit einem Transimpedanzverstärker betrieben. Dabei gilt, dass die Fluoreszenzintensität proportional ist zum Photostrom in Sperrrichtung und dieser Strom ist wieder proportional zur Ausgangsspannung am Transimpedanzverstärker. Die eingestellte Belichtungsdauer war 4,6 ms – defakto aufgrund des Galvanometers des Polychroms V mindestens 9,2 ms. Während dieser Belichtungsdauer wurden die beiden Fluoreszenzintensitäten bzw. die analoge Ausgangsspannung des Transimpedanzverstärkers mit 10 kHz abgetastet. Hierzu diente der Analog-Digital-(A/D)-Wandler des Patch-Clamp-Verstärkers (EPC-10 USB von HEKA Elektronik, Dr. Schulze GmbH, Lambrecht/Pfalz). Für jede fortlaufende Aufzeichnung eines Datenpunktes werden von der HEKA Software mindestens 400 ms benötigt. Diese Begrenzung der zeitlichen Auflösung eines Datenpunktes auf mindestens 400 ms verhinderte eine Erhöhung der Abtastfrequenz bei der FRET-Photometrie. Höhere Abtastfrequenzen über 50 Hz führten zur zeitlich verspäteten Aufzeichnung von Datenpunkten. Das Nyquist-Shannon-Theorem (Nyquist, 1928) besagt, dass die Frequenz mit der die aufgezeichneten digitalen Werte aufgenommen werden, die sogenannte Abtastfrequenz, mindestens doppelt so hoch wie die höchste Signalfrequenz sein sollte, um das ursprüngliche Signal aus den aufgezeichneten Datenpunkten originalgetreu ohne Signalverlust wiedergeben zu können (Shannon, 1949; Pawley, 2006). Die Kanäle der beiden Photodioden wurden folgendermaßen gewählt: A/D 0 = FIAsH-Fluoreszenz und A/D 1 = Cerulean-Fluoreszenz. Zudem wurde für die schnelle Applikation von Lösungen¹⁹² ein Überdrucksystem von ALA Scientific Instruments (ALA-Octaflow, 8er Kanalsystem) mit einem Druckregulator (PR-10 Pressure, P = 0,7 bar) verwendet, das einen schnellen Lösungswechsel innerhalb von 5 - 10 ms gewährleistete. Die acht Perfusionseingänge des 8er Kanals münden in einen Ausgang aus 8 Quarzmikrokapillaren, die mit Polyimid beschichtet sind und einen Durchmesser von jeweils $d = 100 \mu\text{m}$ aufweisen (QMM Quartz MicroManifold®, ALA Scientific Instruments, Inc., Farmingdale, NY, USA).

¹⁹² Isotone Badlösungen mit oder ohne Agonist bzw. inversem Agonisten bzw. hypotone Lösungen mit 150, 175, 200, 225, 250 und 275 mOsmol für mechanische Stimulation.

Für die Scherkräftemessungen wurde eine Spritzenpumpe von B. Braun (Perfusor Secura FT, B. Braun Melsungen AG) mit Förderraten von 0,1 - 99,9 ml h⁻¹ eingesetzt, das an eine Scherkräftekammer von ibidi (μ -Slide VI 0.1 ibiTreat, # 80666, ibidi) über ein schwarzes Perfusionsset von ibidi (schwarzes Perfusion Set, Länge 50 cm, Innendurchmesser 0.5 mm, Reservoir 2 ml, # 10966, ibidi) angeschlossen ist.

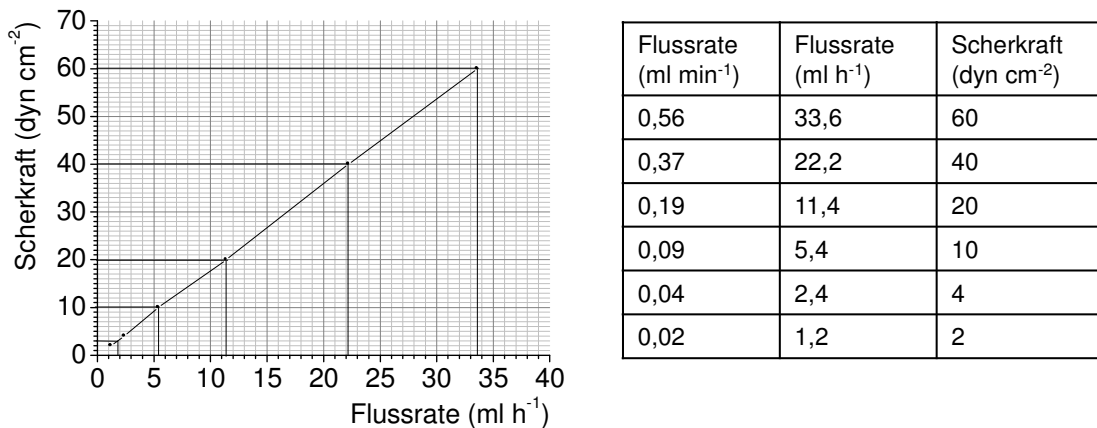


Abbildung 2.7: Eichgerade der applizierten Flussraten und Fluss-induzierten Scherkräften für das schwarze Perfusionsset von ibidi (schwarzes Perfusion Set, Länge 50 cm, Innendurchmesser 0.5 mm, Reservoir 2 ml, # 10966, ibidi). Durch Anlegen definierte Flussraten wurde die gewünschte Scherkraft erzeugt (Tabelle rechts). Die basale Flussgeschwindigkeit betrug 1,9 ml h⁻¹, was einer Scherkraft von 3 dyn cm⁻² entsprach. Steigende Strömungsgeschwindigkeiten von 5,4, 11,4, 22,2 und 33,6 ml h⁻¹ entsprachen jeweils Fluss-induzierten Scherkräften von 10, 20, 40 und 60 dyn cm⁻².

Im Strahlengang befinden sich mehrere optische Filter (TILL Filtersets, Martinsried und AHF Analysetechnik, Tübingen), die den Lichtstrahl, der auf die zu messende Zelle auftrifft und von dieser emittiert wird, detektieren. Dieser emittierte Lichtstrahl wird am Ende des Strahlengangs in zwei Lichtstrahlen des gelben und blauen Fluorophors aufgetrennt. Die Anregung erfolgt über den Polychrom V Monochromator von TillPhotonics mit einer FDU-2-Kontrolleinheit, eine Lichtquelle, die monochromatisches Licht erzeugt. Das monochromatische Licht des Polychrom V ist genau genommen nicht Licht einer Wellenlänge, sondern ein Spektrum von Wellenlängen mit einer Gaußschen Intensitätsverteilung. Für dieses Projekt wurde eine Haupt-Anregungswellenlänge von $\lambda = 430$ nm mit einer Bandbreite von 430 ± 15 nm verwendet. Um einen exakten Spektralbereich der Anregung zu bekommen, verwenden wir den direkt nachgeschalteten Bandpassfilter „DT Blue“ DT-Blue (**B**and**p**ass BP436/20), der nur Licht zwischen 426 und 446 nm durchlässt. Dieses Anregungslicht trifft nun auf die zu messende Zelle und regt dort Fluorochrome an, die Licht mit einer größeren Wellenlänge emittieren. Dieses emittierte Licht größerer Wellenlänge trifft nun auf den nachgeschalteten dichroitischen Strahlenteiler mit Langpass-Charakteristik „DCLP 460“ (FRET Cube **D**ichroic **L**ong**p**ass DCLP460), der nur Licht größer als $\lambda = 460$ nm durchlässt und kleinere Wellenlängen herausfiltert. Dieser emittierte Lichtstrahl wird durch zwei Spiegel in den Kurzpassfilter SP 650 (**S**hort**p**ass SP650) umgelenkt. Dieser Kurzpassfilter lässt nur Licht mit einer Wellenlänge kleiner 650 nm durch. Das Licht größer als $\lambda = 650$ nm wird zum einen direkt auf eine bildgebende Kamera und zum

anderen über einen Spiegel auf die Kamera projiziert. Damit entsteht ein überlagertes Bild, das die Zelle und die Blenden im Rotlicht visualisiert. Die vier Blenden dienen dazu die zu messende Zelle einzurahmen, um die Fluoreszenz benachbarter Zellen auszuschließen. Der emittierte Lichtstrahl kleiner als $\lambda = 650$ nm, wird vom nachgeschalteten dichroitischen Strahlenteiler mit Langpass-Charakteristik „DCLP 505“ (Dual-Emission Cube Longpass DCLP505) bei der Wellenlänge von $\lambda = 505$ nm aufgetrennt. Das Licht, das größer als $\lambda = 505$ nm ist, geht einfach durch den Strahlenteiler durch. Das Licht, das kleiner als $\lambda = 505$ nm ist, wird reflektiert. Zwei Emissionsfilter, die den beiden Photodioden vorgeschaltet sind, begrenzen jeweils spektral die Fluoreszenzemissionen für die Photodioden. Damit wird zum einen nur Licht mit der Wellenlänge von $\lambda = 520$ bis $\lambda = 550$ nm „BP535/30“ (Bandpass BP535/30) und zum anderen Licht mit der Wellenlänge von $\lambda = 460$ bis $\lambda = 500$ nm „BP480/40“ (Bandpass BP480/40) von den Photodioden simultan detektiert. In Abbildung 2.8 sind die verschiedenen Transmissionsspektren zu den verwendeten Filtern und Strahlenteilern gezeigt, dargestellt sind die prozentuale Durchlässigkeit gegenüber der jeweiligen Wellenlänge und die Transmissionsgüte im Sperrbereich.

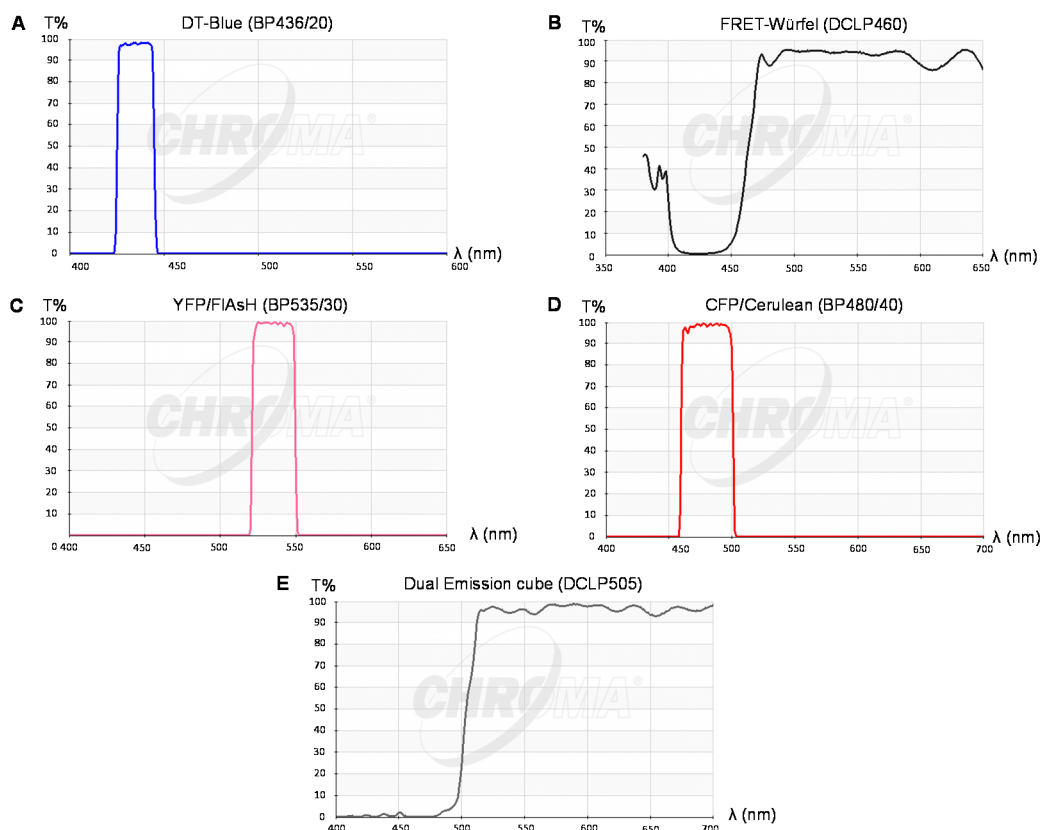


Abbildung 2.8: Verwendete Filtersets Anregungsfilter für Cerulean DT-Blue (BP436/20) (A), FRET-Würfel (DCLP460) (B), Emissionsfilter für FIAsH, YFP/FIAsH (BP535/30) (C), Emissionsfilter für Cerulean, CFP/Cerulean (BP480/40) (D), Strahlenteiler, Dual Emission cube (DCLP505) (E). siehe URL-Adresse: <https://www.chroma.com/spectra-viewer>.

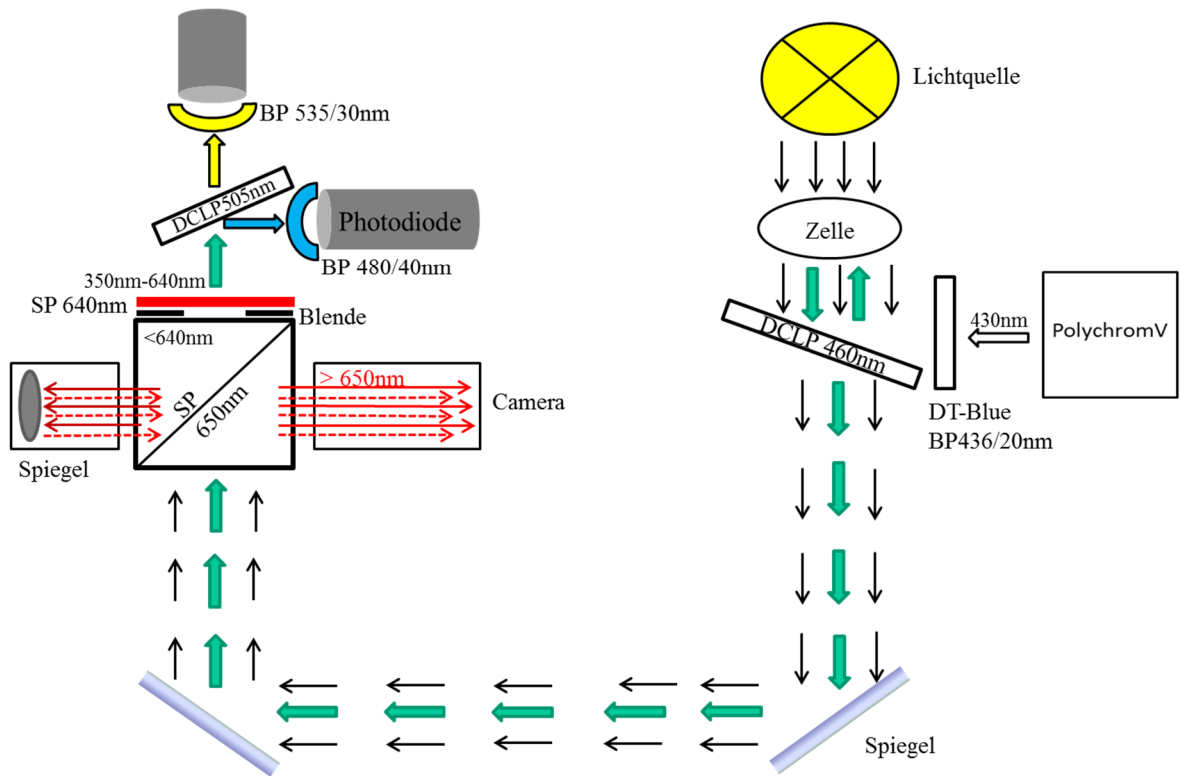


Abbildung 2.9: Strahlengang im Fluoreszenzmikroskop Im Strahlengang sind mehrere optische Filter DT-Blue, DCLP 460, SP 650, SP 640, DCLP 505, BP 535/30, und BP 480/40 (TILLPhotonics, Martinsried oder AHF Analysentechnik, Tübingen) eingebaut, die den von der Lichtquelle, Xenonlampe (Polychrom V, TILLPhotonics, Martinsried) gespeisten Lichtstrahl in die beiden Fluoreszenzstrahlen des mCerulean und FIAsh lenken. Die beiden Photodioden detektieren jeweils Licht im Wellenlängenbereich von $\lambda = 460 - 500 \text{ nm}$ oder im Wellenlängenbereich von $\lambda = 520 - 550 \text{ nm}$.

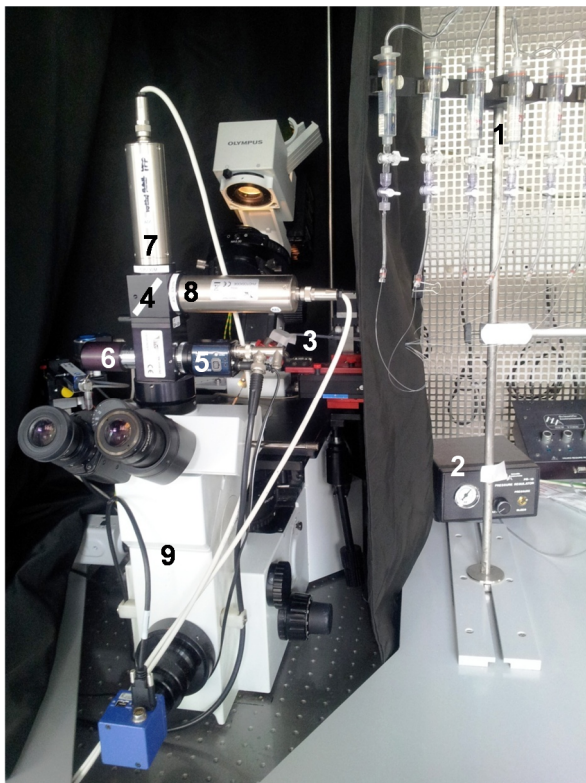


Abbildung 2.10: Aufbau des Messstandes für die FRET-Photometrie Für eine gleichmäßige Perfusion von Badlösungen (isotone Badlösungen „Iso 150“ versetzt mit oder ohne Agonisten, inversen Agonisten und Inhibitoren sowie hypotone Badlösung „Hypo150“) wurde ein Zufluss über einen $100 \mu\text{m}$ Durchmesser Zufuhrschlauch (3) mittels einer Überdruckapplikation ALA VM8 - 8er Kanalsystem (1) mit einem ALA Analog Pressure Regulator, PR-10 (2) bei $P = 0,7 \text{ bar}$ durchgeführt. Der Strahlenteiler Dual Emission Cube DCLP 505 (4) teilt den Lichtstrahl in einen gelben und einen türkisen Lichtstrahl auf, die von den beiden Photodioden (7,8) detektiert werden. Für die Visualisierung der zu messenden Zelle und Blenden wurde eine bildgebende Kamera (5) und ein Spiegel (6), die an das Fluoreszenzmikroskop Olympus IX70 (8) angeschlossen sind, verwendet.

Es gibt zwei problematische Phänomene, die bei Fluoreszenzmessungen zweier Fluorochrome auftreten können:

- Zum einen gibt es das optische Übersprechen – der sogenannte „cross talk“ - auf der Anregungsseite. Hier wird mit der Wellenlänge von $\lambda = 430$ nm, die eigentlich nur das Cerulean anregen soll, auch das FIAsH mitangeregt.
- Zum anderen gibt es das Durchbluten - das sogenannte „bleed-through“ - auf der Emissionsseite. Es begründet sich durch ein Überlappen der Emissionsspektren von Cerulean und FIAsH und bedeutet, dass im gelben Detektionskanal auch emittiertes Licht des FRET-Donors Cerulean mitdetektiert wird und andersherum im blauen Detektionskanal auch emittiertes Licht des FRET-Akzeptors FIAsH ist.

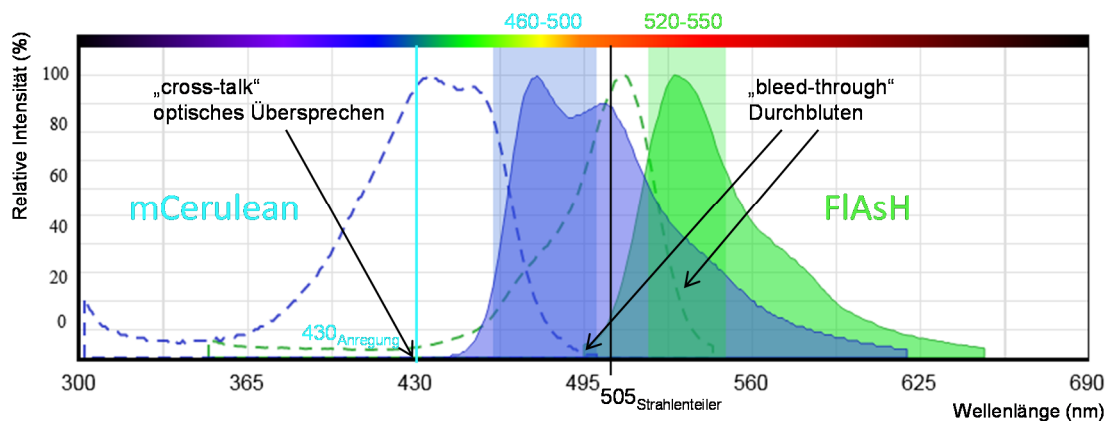


Abbildung 2.11: Anregungs- und Emissionsspektren der Fluorochrome FIAsH und mCerulean
Veranschaulichung der Anregungs- und Emissionsspektren für die beiden verwendeten Fluorochrome, nämlich für den FRET-Donor Cerulean und den FRET-Akzeptor FIAsH. Wie man hier sieht, wird das Cerulean mit der Anregungswellenlänge von $\lambda = 430$ nm im Anregungsmaximum optimal angeregt. Das FRET-Donor-Emissionsspektrum von mCerulean liegt im blauen Detektionskanal mit einer Bandbreite von $\lambda = 460$ bis $\lambda = 500$ nm. Der gelbe Detektionskanal mit den Wellenlängengrenzen von $\lambda = 520$ bis $\lambda = 550$ nm liegt im Emissionsmaximum des FRET-Akzeptors FIAsH. Gezeigt sind zudem die Spektralbereiche in denen die beiden Bandpassfilter, Emissions-Filter YFP/FIAsH (BP535/30, $\lambda = 520 - 550$ nm, grün, rechts) und Emissions Filter CFP/Cerulean (BP480/40, $\lambda = 460 - 500$ nm, blau, links), durchlässig sind. Durch die schwarzen Pfeile werden das optische Übersprechen („cross-talk“, links) und das Durchbluten („bleed-through“, rechts) angezeigt. Die Anregungs- und Emissionsspektren mit den Emissionsfiltern wurden mit Hilfe des online Web tools Spectrum Viewer von AAT Bioquest mit der URL-Adresse <https://www.aatbio.com/spectrum/> erstellt. Letzter Aufruf erfolgte am 09.05.2018.

2.10.1 Bestimmung der FRET-Effizienz

Material	Hersteller
2,3-Dimercapto-1-propanol (British-Anti-Lewisite, BAL)	Fluka, # 38520-5ml
FIAsH, 1 mM in DMSO	Carsten Hoffmann, Würzburg, Rudolf-Virchow-Zentrum

Die Effizienz des Förster-Resonanz-Energietransfers E wird aus den relativen Fluoreszenzintensitäten in Anwesenheit F_{DA} und in Abwesenheit des Akzeptors F_D nach folgender Formel (siehe Formel 14) bestimmt, wobei die FRET-Effizienz E Werte zwischen 0 und 1 annehmen kann.

$$E = 1 - \frac{F_{DA}}{F_D} \quad \text{Formel 14}$$

Formel 14: Mit F_{DA} = Fluoreszenzintensität des Donors in Anwesenheit des Akzeptors und F_D = Fluoreszenzintensität des Donors in Abwesenheit des Akzeptors.

Für die Bestimmung der FRET-Effizienzen der verwendeten FRET-gpH₁R-Konstrukte wurden FIAsH markierte monoklonale HEK293-Zellen mit den stabil exprimierenden gpH₁R-Konstrukten in 1 ml isotonischer Messlösung „Iso 150“ (siehe Fussnote 177) versetzt und mit Hilfe der FRET-Photometrie gemessen. Durch die Applikation von 10 mM 2,3-Dimercapto-1-propanol (**British-Anti-Lewisite**, BAL) wird das FIAsH von seinem CCPGCC Tetracystein-Bindemotiv verdrängt, wodurch die Fluoreszenzintensität des Akzeptorfarbstoffs FIAsH ab- und die des Donorfarbstoffs Cerulean zunimmt, das zu einer maximalen FRET-Abnahme führt. Aus diesem resultierenden FRET-Abfall wurde die FRET-Effizienz aus den normalisierten Fluoreszenzintensitäten des Donors Cerulean in Gegenwart (vor BAL-Zugabe), und in Abwesenheit des Akzeptors FIAsH (nach BAL-Zugabe) berechnet (siehe Formel 15).

$$E = 1 - \frac{F_{\text{CerNormbeforeBAL}}}{F_{\text{CerNormBAL}}} = 1 - \frac{1}{F_{\text{CerNormBAL}}} \quad \text{Formel 15}$$

Formel 15: Mit $F_{\text{CerNormbeforeBAL}}$ = normierte Fluoreszenzintensität von Cerulean in Gegenwart von FIAsH und $F_{\text{CerNormBAL}}$ = normierte Fluoreszenzintensität von Cerulean in Abwesenheit von FIAsH. Der Wert für $F_{\text{CerNormbeforeBAL}}$ beträgt stets 1.

2.10.2 Intramolekularer dynamischer FRET

Um herauszufinden, ob der Agonist und die mechanische Stimulation tatsächlich unterschiedliche aktive Rezeptorkonformationen hervorrufen, wurde die Methode des intramolekularen dynamischen FRET bedient. Diese FRET-Methode eignet sich, um Konformationsänderungen an GPCR genauer zu untersuchen. Durch Rezeptoraktivierung können sich die beiden Fluorochrome entweder voneinander entfernen, was zu einer FRET-Abnahme führt, oder sie können sich bis auf wenige nm annähern, was eine FRET-Zunahme zur Folge hat (siehe Abbildung 2.12 A). In diesem Projekt wurde ein Meerschweinchen Histamin H₁-Rezeptor (gpH₁R) verwendet (siehe Abbildung 2.12 B, C, D und E), der am C-Terminus mit Cerulean, einem photostabilen türkis fluoreszierendem Protein fusioniert ist. In der dritten intrazellulären Schleife dagegen wurde anstatt eines fluoreszierenden Proteins ein Tetracystein-Bindemotiv mit folgender Aminosäuresequenz CCPGCC eingefügt. Da vermutet wurde, dass unterschiedliche Positionen für das Tetracysteinmotiv in der dritten intrazellulären Schleife unterschiedlich gut Konformationsänderungen des Rezeptors detektieren könnten, wurde das CCPGCC Tetracysteinbindemotiv an fünf unterschiedlichen Stellen im Rezeptor eingefügt. Vier der FIAsH-Bindemotive wurden in der dritten intrazellulären Schleife eingefügt und im Nachfolgenden als **il3-b** für Anfang (*beginning*), **il3-m** für Mitte (*middle*) und **il3-e1** und **il3-e2** für Ende (*end*) bezeichnet. Ein weiteres FIAsH-Bindemotiv wurde am Anfang des C-Terminus, nach der TM7 inseriert und als **ct-b** (*c-terminus beginning*) bezeichnet. Der Einbau des CCPGCC Tetracysteinbindemotivs wurde jeweils nach der Aminosäure L²²⁷ für das il3-b, L²⁶⁶ für das il3-m, T³⁹¹ für das il3-e1, T⁴⁰³

für das il3-e2 und L⁴⁷¹ für das ct-b-Konstrukt vorgenommen. Ein bemerkenswerter Vorteil von FIAsh gegenüber fluoreszierenden Proteinen wie z. B. YFP ist, dass die Transduktion des Rezeptors kaum durch die Größe des Fluorochroms sterisch behindert wird. Für die Berechnung der normierten Fluoreszenzintensitäten von FIAsh und Cerulean wurden jeweils die Fluoreszenzintensitäten beider Fluoreszenzfarbstoffe um das optische Überlappen, das Durchbluten und das Photobleichen der nachstehenden Formel 16 korrigiert, wobei das Durchbluten jeweils für FIAsh 154,89% und für Cerulean 62,67% betrug.

$$\text{FRET}_{\text{Norm}} \times \frac{F_{\text{FIAsh}}}{F_{\text{Cerulean}}} = (F_{\text{FIAsh}} - m \times t) - \frac{0,6267 (F_{\text{Cerulean}} m \times t)}{[(F_{\text{Cerulean}} - m \times t) - 1,5489 (F_{\text{FIAsh}} - m \times t)]} \quad \text{Formel 16}$$

Formel 16: Mit F_{FIAsh} = FIAsh-Fluoreszenzintensität in Volt [V], F_{Cerulean} = Cerulean-Fluoreszenzintensität in Volt [V], m = Steigung der Fluoreszenzspur über die Zeit t bis zur ersten Applikation von Agonisten, inversen Agonisten und hypoosmolarer Lösung, t = Zeit [s].

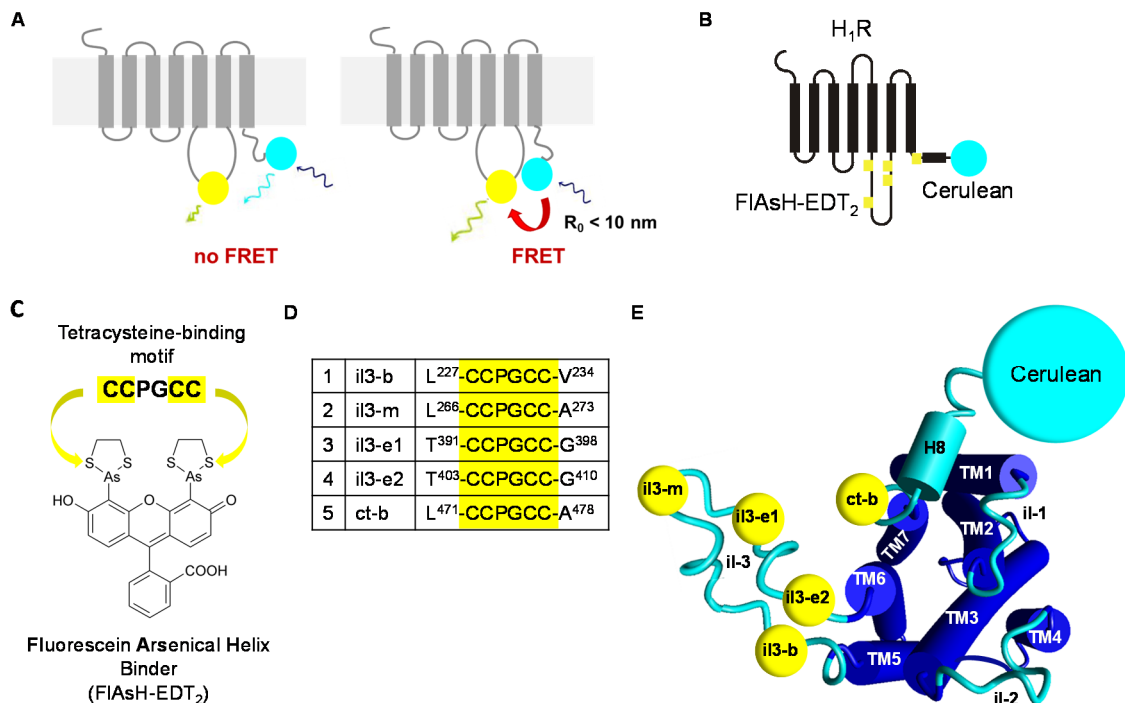


Abbildung 2.12: Verwendete FRET-H₁-Rezeptorkonstrukte Schematische Darstellung der Methode des intramolekularen dynamischen FRET (A) mit Hilfe der FRET-Photometrie verwendeten gpH₁R-Konstrukte (B). Cerulean wurde C-terminal an den gpH₁R gebunden. Das Tetracystein-Bindemotiv (CCPGCC) für FIAsh wurde an vier verschiedenen Positionen in der dritten intrazellulären Schleife und am Anfang des C-Terminus eingefügt, das zur spezifischen Markierung von lebenden Zellen mit FIAsh-EDT₂ dient (B, C). Die Positionen des FIAsh-Bindemotivs sind in gelb hervorgehoben und in der Tabelle angegeben. Die FRET-Rezeptorkonstrukte werden als il3-b für Anfang, il3-m für Mitte und il3-e1 und il3-e2 für Ende der dritten intrazellulären Schleife und ct-b für den Beginn des C-Terminus bezeichnet. Die Aminosäurepositionen für den Einschub des Tetracystein-Bindemotivs (CCPGCC) sind im Einbuchstabencode für Aminosäuren dargestellt, wobei das Tetracystein-Bindemotiv (CCPGCC) gelb hinterlegt ist (D). Abbildung E aus modifizierter Vorlage Shimamura T et al. (2011) Nature **475**:65-70

2.10.3 Klonierung der FRET-H₁-Rezeptorkonstrukte

Für die Klonierung der gpH₁R-Konstrukte il3-b, il3-m, il3-e1, il3-e2 und ct-b wurden folgende Plasmide verwendet: gpH₁R pcDNA3.1/V5-His-TOPO [72],

hA2 α R-FIAsH3-CerFP [71] und pcDNA3.1(+) [007]. Für die Amplifikation des gpH₁R diente der gpH₁R pcDNA3.1/V5-His-TOPO [72] als cDNA-Matrize, wobei an das 5[′](PO₄³⁻)-Ende eine NotI- und an das 3[′](OH)-Ende eine XhoI-Restriktionsschnittstelle eingefügt wurde. Die cDNA des gpH₁R mitsamt der eingefügten Restriktionsschnittstellen wurden mittels der PCR amplifiziert. Das PCR-Produkt wurde mit Hilfe der Agarose-Gelelektrophorese nach Größe der DNA-Fragmente aufgetrennt. Der gpH₁R wurde aus dem Gel isoliert und mit Hilfe des Gelextraktionskits von ThermoFisher nach Anleitung (GeneJET Gel Extraction Kit, # K0691, Thermo Scientific™) extrahiert. Damit die klebrigen Enden der Restriktionsschnittstellen frei für die Ligation in den pcDNA3.1(+) Vektor vorlagen, wurde der aufgereinigte Extraktionsansatz mit den beiden Restriktionsenzymen XhoI und NotI verdaut. Gleichzeitig wurde das pcDNA3.1(+) Plasmid mit den gleichen Restriktionsenzymen verdaut und linearisiert. Die beiden verdauten Ansätze wurden erneut auf ein 1%iges Agarosegel aufgetragen und erneut aus dem Gel extrahiert. Anschließend wurde der linearisierte pcDNA3.1(+) Vektor mit der alkalischen Phosphatase dephosphoryliert und mit dem verdauten gpH₁-Rezeptor ligiert. Im nächsten Schritt wurde der gesamte Ligationsansatz in DH5 α Bakterien transformiert und die Plasmid-cDNA mit einer Mini-Präparation aufgereinigt und sequenziert. Somit wurde das Zwischenprodukt gpH₁R pcDNA3.1(+) fertig gestellt. Für das türkis fluoreszierendes Protein mCerulean dagegen wurde das hA2 α R-FIAsH3-CerFP [71] Plasmid, das von Carsten Hoffmann aus Würzburg zur Verfügung gestellt wurde, als cDNA-Vorlage eingesetzt. Hierfür wurde jeweils am 5[′](PO₄³⁻)-Ende eine XhoI- und an das 3[′](OH)-Ende eine XbaI-Restriktionsschnittstelle eingefügt, mit der PCR Methode vervielfältigt und mit Hilfe der Agarose-Gelelektrophorese extrahiert. Das extrahierte Cerulean als auch das Zwischenprodukt gpH₁R pcDNA3.1(+) wurden mit den beiden Restriktionsenzymen XhoI und XbaI verdaut, mittels Gelelektrophorese erneut aufgereinigt und nach Dephosphorylierung des linearisierten gpH₁R pcDNA3.1(+) Vektors miteinander ligiert. Auch hier wurde der Ligationsansatz in DH5 α Bakterien transformiert, die Plasmid-cDNA mit einer Mini-Präparation aufgereinigt und zum Sequenzieren eingeschickt. Womit ein an dem C-Terminus mit Cerulean fusionierter gpH₁-Rezeptor, gpH₁-Cerulean pcDNA3.1(+), hergestellt worden ist. Für den Einbau des Tetracystein-Bindemotivs CCPGCC im Einbuchstabencode für das FIAsH mit folgender Nukleotidsequenz: TGTTGTCCGGGGTGTGT wurden einerseits jeweils einmal im gpH₁-Cerulean pcDNA3.1(+) Plasmid vorhandene Restriktionsschnittstellen (*unique cutter*) wie BsiWI für il3-b, Pml für il3-e1 und BmgBI für il3-e2 in der dritten intrazellulären Schleife verwendet. Andererseits wurden über zielgerichtete Mutagenesen jeweils neue nicht im gpH₁-Cerulean pcDNA3.1(+) Plasmid vorhandene Restriktionsschnittstellen (*absent sites*), wie SacII für il3-m in der dritten intrazellulären Schleife und SacII für ct-b am Anfang des C-Terminus des gpH₁-Rezeptors eingefügt. Die von Metabion oder Sigma-Aldrich bezogenen Oligonukleotide für das FIAsH-Bindemotiv mit den Überhängen für die jeweiligen Restriktionsschnittstellen wurden für die Ligation hybridisiert und phosphoryliert. Die phosphorylierten Oligonukleotide wurden als nächstes mit den entsprechenden Restriktionsendonukleasen linearisiertem und

dephosphoryliertem Vektor gpH₁R-Cerulean pcDNA3.1(+) ligiert. Der Ligationsansatz wurde in kompetente DH5 α -Zellen transformiert und die Plasmid-cDNA mit einer Mini-Präparation aufgereinigt und sequenziert. Von der richtigen Plasmid-cDNA wurde eine Midi-Aufreinigung durchgeführt und von der aufgereinigten Plasmid-cDNA eine stabile HEK293 Zelllinie hergestellt.

2.11 Konfokalmikroskopie

Material	Hersteller
μ-Slide 8 Well Glass Bottom	ibidi, # 80827
μ-Slide 4 Well Glass Bottom	ibidi, # 80427
Poly-L-Lysin Hydrobromid	Sigma-Aldrich, # P-1524
Methanol, absolut	Carl-Roth, # 8388.2
DPBS, Dulbecco's Phosphat gepufferte Salin	Sigma-Aldrich, # D8536

Die Konfokalmikroskopie wurde an einem Breitband-Konfokalsystem von Leica TCS SP5 II (Leica, Deutschland) durchgeführt. Hierfür wurden stabile und transient transfizierte HEK293 Zellen auf Poly-L-Lysin beschichtete Glasbodenkammern jeweils mit 4 bzw. 8 einzelnen Kammern von ibidi (4 bzw. 8 μ -Slide Glass Bottom) ausgesät und am Folgetag mit eiskaltem 100%igem Methanol überschichtet und für 5 Minuten bei -20°C fixiert. Anschließend wurde das Methanol abgesaugt und die fixierten HEK293-Zellen zweimal mit eiskaltem PBS gewaschen. Mit einem 63 x 1,40 UV-Öl-Immersionsobjektiv, einem Scanformat von 512 x 512 Pixel und einer Scangeschwindigkeit von 400 Hz wurde der richtige Bildausschnitt ausgewählt und unmittelbar danach das konfokale Bild mit einem einem Scanformat von 1024 x 1024 Pixel, einer Scanfrequenz von 100 Hz, einer Durchschnittsscanlinie (*Line average*) von 4 und einem Zoomfaktor von 2 - 5 aufgenommen. Die HEK293 Zellen wurden mit einer Wellenlänge von $\lambda = 405$ nm, die von einem 405 nm blauen Diodenlaser mit einer 6%igen Laserintensität gepeist wurde, angeregt und die Emission bei einem Wellenlängenbereich von 521 - 557 nm gemessen. Mit Durchlicht wurde ein weiteres Bild von der Zelle aufgenommen.

2.12 Kultivierung prokaryotischer Zellen

Material	Hersteller
Trypton/ Pepton aus Casein, pankreatisch verdaut	Carl-Roth, # 8952.4
Hefeextrakt	Carl-Roth, # 2363.4
NaCl ($\geq 99,5$ %, p.a., ACS, ISO)	Carl-Roth # 3957.2
Agar-Agar, Kobe I	Carl-Roth, # 5210.4
Ampicillin-Ratiopharm 2,0 g (entspricht 2,12 g Ampicillin-Natrium)	ratiopharm GmbH, PZN 02036634
Kanamycinsulfat	Carl-Roth, # T832.1
Petrischale 92x16mm	Sarstedt, # 82.1472.001

Für alle anfallenden molekularbiologischen Tätigkeiten wurde der Standard Bakterienstamm *Escherichia coli*¹⁹³ DH5 α verwendet. Die *E. coli* DH5 α -Bakterien wurden entsprechend der auf dem Plasmid kodierten Resistenz mit Selektionsantibiotikum versetztem LB¹⁹⁴-Medium oder auf LB-Agar-Platten über Nacht bei 37°C kultiviert.

2.13 Herstellung kompetenter E.Coli DH5 α -Bakterien

Material	Hersteller
Trypton / Pepton aus Casein, pankreatisch verdaut	Carl-Roth, # 8952.4
Hefeextrakt aus Bierhefe	Carl-Roth, # 2363.4
NaCl ($\geq 99, 5 \%$, p.a., ACS, ISO)	Carl-Roth # 3957.2
KCl	Carl-Roth # 6781.1
MgCl₂*6H₂O	Sigma-Aldrich, # M2670
MgSO₄*7H₂O	Sigma-Aldrich, # M5921
HEPES	Carl-Roth, # 9105,3
CaCl₂*2H₂O	Sigma-Aldrich, # C5080
MnCl₂*2H₂O	Merck, # UN 3077
LB-Agarplatten ohne Selektionsantibiotikum	im Labor hergestellt (siehe Abschnitt 2.12)
Inkubationsschüttler, MaxQ™ 6000	Thermofisher scientific
Blockheizthermostat Modell HX-1	Peqlab
Sorvall-Zentrifuge	Thermofisher scientific

Das hier beschriebene Protokoll zur Herstellung ultrakompetenter *E. coli*-DH5 α -Bakterien beruht auf die CaCl₂-Methode nach Douglas Hanahan und wurde entsprechend dem Protokoll über Herstellung kompetenter Bakterien nach Hiroto Okayama gezüchtet. Hiroto Okayama verwendete MnCl₂ anstatt CaCl₂ (Hanahan, 1983; Inoue et al., 1990). Die bei -80°C eingefrorene *E. coli* DH5 α -Bakterien wurden auf Eis aufgetaut. 10, 20 und 50 μ l der bei 4°C aufgetauten *E. coli*-DH5 α -Bakteriensuspension wurde auf jeweils eine LB-Agarplatte ohne Selektionsantibiotikum mit Hilfe geformter Pasteurpipetten oder Drigalskispatel ausgetrichen. Eine weitere Platte ohne Selektionsantibiotikum wurde als Negativkontrolle über Nacht bei 37°C mitgezüchtet. Am nächsten Morgen wurden zehn bis zwölf Bakterienkolonien von einer LB-Agar-Platte mit Hilfe einer einzigen gelben Pasteurpipette gepickt und in einen mit 250 ml SOB-Medium

¹⁹³ DH5 α mit folgendem Genotyp verwendet: F⁻ endA1 hsdR17 (r_k⁻, m_k⁺) supE44 thi-1 λ ⁻ recA1 gyrA96 relA1 deoR Δ (lacZYA-argF)-U169 ϕ 80dlacZ Δ M15 (Grant et al., 1990). Die endA1-Mutation inaktiviert eine intrazelluläre Endonuklease, die die Plasmid-cDNA abbaut (Wright, 1971) und die recA1-Mutation eliminiert die homologe Rekombination (Bryant, 1988). Diese Mutationen vermindern Deletionen und Multimerisierungen der Plasmid-cDNA (Hanahan, 1983; Schmidt, 1986; Raleigh et al., 1988; Grant et al., 1990; Hanahan et al., 1991; Casali, 2003). Zum Schutz vor Fremd-DNA methylieren DAM- und die DCM-Methylasen in *E. coli* DH5 α -Bakterien (*dam*⁺ und *dcm*⁺ *E. coli* DH5 α -Stamm) eingedrungene Fremd-DNA an folgenden Sequenzabschnitten: GA^{6m}TC, CC^{5m}AGG und CC^{5m}TGG. Die Methylierung von Plasmid-cDNA wird im Abschnitt Mutagenese näher beschrieben.

¹⁹⁴ Das LB steht für lysogeny broth und ist ein Kulturmedium für die Bakterienanzucht mit folgender Zusammensetzung: 10 g/l NaCl, 10 g/l Trypton/ Pepton, 5 g/l Hefeextrakt. Alle Bestandteile wurden abgewogen und mit Reinstwasser auf 1000 ml aufgefüllt und autoklaviert. Das Selektionsantibiotikum (100 mg ml⁻¹ Ampicillin oder 50 mg ml⁻¹ Kanamycin) wurde erst zugegeben, wenn die Lösung unter 50°C (handwarm!) abgekühlt ist. Für die Herstellung der LB-Agar-Platten wurden zusätzlich 20 g/l Agar eingewogen. Das autoklavierte LB-Agar-Gemisch wurde unter vorsichtigem Schwenken abgekühlt, mit dem Selektionsantibiotikum (100 mg ml⁻¹ Ampicillin oder 50 mg ml⁻¹ Kanamycin) versetzt. Anschließend in 92 mm Petrischalen ausgegossen und ausgehärtet.

versetzten Schikanekolben gegeben, um eine klonale Selektion zu verhindern. Diese gezielt nicht-klonalen Bakterien dienen entgegen einer klonalen Selektion zur Erhöhung der Kompetenz und wurden bei 18°C und 250 rpm¹⁹⁵ bis zu einer optischen Dichte von $OD_{600} \leq 0,6$ gezüchtet. Bei einer nicht schädlichen Wellenlänge von $\lambda = 600$ nm spiegelt dieser Wert die Wachstumsphase von Bakterien im Kultivierungsmedium wieder. Als Probenblindwert wurde das SOB-Medium gesetzt und von dem Messwert abgezogen. Nach ca. 50 - 60 Stunden wurde die $OD_{600} \leq 0,6$ units ml⁻¹ erreicht. Anschließend wurde der Kolben mit den E. coli DH5 α -Bakterien in SOB-Medium aus dem Schüttler entnommen und für 10 Minuten auf Eis gestellt. Die E. coli DH5 α -Bakterien wurden in eine vorgekühlte Zentrifugenflasche aus Stahl überführt und bei 2500 U min⁻¹ für 10 Minuten bei 4°C zentrifugiert (Sorvall, Thermofisher Scientific RC5C). Der Überstand mit dem SOB-Medium wurde verworfen und das Zellpellet in 80 ml eiskaltem TB-Medium resuspendiert. Diese Bakteriensuspension wurde erneut 10 Minuten auf Eis inkubiert. Als nächstes wurden die E. coli DH5 α -Bakterien bei 2500 U min⁻¹ für 10 Minuten bei 4°C zentrifugiert und der Überstand mit dem TB-Medium dekantiert. Das Pellet wurde in 20 ml mit 1,5 ml DMSO versetztem TB-Medium resuspendiert, womit eine 7% (m/V) DMSO Endkonzentration als Einfrierschutz für die E. coli DH5 α -Bakterien resultierte. Wiederum wurde die Zellsuspension für 10 Minuten auf Eis inkubiert. Die Bakteriensuspension wurde so schnell wie möglich zu 100 μ l Volumina in 0,5 ml Reagiergefäßen aliquotiert und sofort in flüssigen Stickstoff überführt. Die gefrorenen E. coli DH5 α -Bakterien wurden umgehendst bei -80°C gelagert. Im Anschluss wurde die Kompetenz der hergestellten E. coli DH5 α -Bakterien überprüft. Hierfür wurden jeweils 1 pg, 10 pg, 100 pg, 500 pg und 1 ng eines bekannten Plasmids mit einer Kanamycinresistenz transformiert, auf Platten mit einer Kanamycinresistenz ausgestrichen, über Nacht bei 37°C im Schüttler gezüchtet und die Anzahl der hochwachsenden Kolonien bestimmt.

Material	Gehalt	Einwaage
Trypton / Pepton aus Casein	2% (m/V)	40 g
Hefeextrakt aus Bierhefe	0,5% (m/V)	10 g
NaCl, MW = 58,44 g mol⁻¹	10 mM	1,1688 g
KCl, MW = 74,55 g mol⁻¹	2,5 mM	0,37275 g
MgCl₂*6H₂O, MW = 203,3 g mol⁻¹	10 mM	4,066 g
MgSO₄*7H₂O, MW = 246,48 g mol⁻¹	10 mM	4,9296g

Tabelle 2.3: Einwaagen für das SOB-Medium Für das SOB-Medium wurden die Einwaagen der einzelnen Bestandteile in 2 l Reinstwasser gelöst und autoklaviert.

Material	Gehalt	Einwaage
HEPES, MW = 238,81 g mol⁻¹	10 mM	0,47662 g
CaCl₂*2H₂O, MW = 147,02 g mol⁻¹	15 mM	0,44106 g
KCl, MW = 74,55 g mol⁻¹	250 mM	3,7775 g
MnCl₂*2H₂O, MW = 161,87 g mol⁻¹	55 mM	1,78057

¹⁹⁵ Abkürzung rpm vom Englischen revolutions per minute

Tabelle 2.4: Einwaagen für das TB-Medium Für das TB-Medium wurden alle Komponenten außer $\text{MnCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ in 200 ml Reinstwasser aufgenommen und der pH-Wert mit KOH auf 6,7 eingestellt. Die entsprechende Menge an $\text{MnCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ wurde darin gelöst, sterilfiltriert (0,45 μm Porengröße) und bei 4°C kühl gelagert.

2.14 Transformation von Plasmid-DNA in kompetente E. coli DH5 α -Bakterien

Material	Hersteller
LB-Agarplatten mit 100 mg ml ⁻¹ Ampicillin	im Labor hergestellt (siehe Abschnitt 2.12)
LB-Agarplatten mit 50 mg ml ⁻¹ Kanamycin	im Labor hergestellt (siehe Abschnitt 2.12)
LB-Medium ohne Selektionsantibiotikum	Im Labor hergestellt (siehe Abschnitt 2.12)
Inkubationsschüttler, MaxQ™ 6000	ThermoFisher scientific
Blockheizthermostat Modell HX-1	Peqlab
Sorvall-Zentrifuge	ThermoFisher scientific

Vor Beginn der Transformation werden der Schüttler auf 37°C, der Thermoblock mit dem Stahl-Einsatz für 0,5 ml Reagiergefäße auf 42°C eingestellt und die LB-Agar-Platten mit dem jeweiligen Selektionsantibiotikum (100 mg ml⁻¹ Ampicillin bzw. 50 mg ml⁻¹ Kanamycin) im Brutschrank bei 37°C vorgewärmt. Die 100 μl aliquotierten und bei -80°C gelagerten, eingefrorenen E. coli DH5 α -Bakterien wurden auf Eis aufgetaut und mit der entsprechenden Menge an Plasmid-cDNA¹⁹⁶ versetzt und für 30 Minuten auf Eis inkubiert. Danach wurde dieses Gemisch für 30 s bei 42°C im Blockheizthermostat erhitzt („heat shock“) und sofort erneut für 2 Minuten auf Eis gestellt. Anschließend wurde zu jedem Ansatz 250 μl LB-Medium ohne Selektionsantibiotikum dazugegeben und für 60 Minuten bei 37°C und 250 U min⁻¹ im Inkubationsschüttler geschüttelt. Bei Ampicillin-Resistenz tragender Plasmid-cDNA kann der Inkubationsschritt im Schüttler entfallen. Nach der Inkubation wurde der gesamte Ansatz mit transformierten E. coli DH5 α -Bakterien auf die LB-Agarplatten mit dem jeweiligen Selektionantibiotikum ausplattiert und über Nacht bei 37°C im Brutschrank kultiviert. Nach ca. 16 Stunden wurden die Platten aus dem Brutschrank entnommen und die Anzahl der hochgewachsenen Kolonien mit der transformierten Plasmid-cDNA bestimmt. Dabei spiegelt jeder Klon monoklonale E. coli DH5 α -Bakterien mit der gewünschten Plasmid-cDNA wieder. Die LB-Agarplatten wurden bis zur Weiterverarbeitung mit Parafilm abgeklebt und kühl bei 2-8°C gelagert. Für die Isolierung der Plasmid-cDNA aus den transformierten E. coli DH5 α -Bakterien wurde entweder eine Mini-Präparation mit Aufreinigung geringer cDNA-Mengen (0,1 - 1 μg Plasmid-cDNA) oder eine Midi-Präparation mit Aufreinigung mittlerer cDNA-Mengen (1 - 10 μg Plasmid-DNA) durchgeführt.

2.15 Mini-Präparation von Plasmid-DNA

Material	Hersteller
----------	------------

¹⁹⁶ Für die Transformation wurde entweder 1 μg Plasmid-DNA aus einem Ligationsansatz bzw. 0,1 – 1 μg Plasmid-DNA aus einer Plasmid-DNA-Präparation eingesetzt.

Hi-Yield® Plasmid Mini DNA-Kit	Süd-Laborbedarf GmbH, # Cat.No. HYPD100
LB-Medium mit 100 mg ml⁻¹ Ampicillin	im Labor hergestellt (siehe Abschnitt 2.12)
LB-Medium mit 50 mg ml⁻¹ Kanamycin	im Labor hergestellt (siehe Abschnitt 2.12)
Thermo Inkubationsschüttler TS-100 (SC-18, 20 x 0.5 ml + 12 x 1.5 ml)	Peqlab
Blockheizthermostat Modell HX-1	Peqlab
Tischzentrifuge Heraeus Fresco 21	Thermofisher Scientific
Tischzentrifuge Heraeus Pico 12	Thermofisher Scientific
Photometer Bio Photometer plus 6123	eppendorf
Rotilabo®-Einmalküvetten	Carl-Roth, # XK20.1

Für eine Mini-Präparation wurde mit Hilfe einer sterilen gelben Pipettenspitze ein einzelner Klon ohne umgebende Satellitenklone von der kultivierten LB-Agar-Platte gepickt und in eine 15 ml Schraubröhre mit 2 - 4 ml mit Selektionsantibiotikum versetztem LB-Medium (100 mg ml⁻¹ Ampicillin bzw. 50 mg ml⁻¹ Kanamycin) abgeworfen und über Nacht bei 37°C, 250 U min⁻¹ im Inkubationsschüttler geschüttelt. Als Negativkontrolle wurde zusätzlich eine saubere sterile Pipettenspitze in 2 - 4 ml Selektionsantibiotikum versetztem LB-Medium überführt und mitkultiviert. Nach ca. sechzehnständiger Kultivierung wurden 2 ml der trüben E. coli DH5α-Bakteriensuspension (OD₆₀₀=3 - 6 units ml⁻¹) bei 13.000 U min⁻¹ für eine Minute zentrifugiert und der Überstand verworfen. Alle anfallenden Zentrifugationsschritte wurden bei 13.000 U min⁻¹ durchgeführt. Die nachfolgenden Schritte wurden gemäß dem Handbuch des Hi-Yield® Plasmid Mini DNA-Kits (Süd-Laborbedarf GmbH, SLG, Gauting, Deutschland) durchgeführt. Das E. coli DH5α-Bakterienpellet wurde mit 200 µl RNase A versetztem PD1 Puffer resuspendiert und mit 200 µl PD2 Puffer vermengt. Das Reagiergefäß wurde 10-mal sanft über Kopf invertiert und für zwei Minuten bei Raumtemperatur stehen gelassen, wodurch störende RNA (mRNA, rRNA, tRNA) durch die RNase A degradiert, die E. coli DH5α-Bakterien alkalisch lysiert und die Plasmid-cDNA aus den E. coli DH5α-Bakterien freigesetzt wird. Anschließend wurde das alkalische Lysat durch den Zusatz von 300 µl PD3 Puffer neutralisiert (Birnboim und Doly, 1979). Längere Inkubationszeiten führen zur Freisetzung von genomischer bakterieller DNA in Lösung und zur Degradation der Plasmid-DNA, dass auf jeden Fall gemieden werden sollte. Anschließend wurde dieser Ansatz mit gefällten, unlöslichen DH5α-Zellfragmenten, Proteinen und genomischer DNA für drei Minuten zentrifugiert und der Durchlauf mit der Plasmid-DNA in eine Spin-Säule mit Auffangbehältnis (PD Column auf 2ml Collection Tube gesetzt) überführt und erneut für 30 Sekunden zentrifugiert. Die Plasmid-DNA bindet in Gegenwart von chaotropen Salzen an die Glasfasermatrix der Spin-Säule. Die Spin-Säule wurde mit jeweils 400 µl W1 Puffer und mit 600 µl Ethanol versetztem Waschpuffer überschichtet und für eine Minute zentrifugiert, wobei Verunreinigungen entfernt wurden. Die Spin-Säule wurde für weitere drei Minuten trocken zentrifugiert, um auch die restlichen Waschpufferreste zu entfernen. Die gereinigte, trockene Spin-Säule wurde in ein neues autoklaviertes 1,5 ml Reagiergefäß gesetzt. Auf die Spin-Säulen Filter wurde 30 µl Reinstwasser pipettiert,

jedoch ohne den Filter mit der Pipettenspitze zu berühren. Nach zweiminütiger Inkubation bei Raumtemperatur wurde die Plasmid-cDNA durch eine anschließende zweiminütige Zentrifugation eluiert. Eine Phenol- oder Alkoholfällung war in diesem Fall nicht erforderlich. Die Plasmid-cDNA-Ausbeute und die Reinheit der wässrigen Plasmid-cDNA-Lösung wurden photometrisch am UV/VIS Spektralphotometer ermittelt.

2.16 Midi-Präparation von Plasmid-cDNA

Material	Hersteller
NucleoBond® Xtra Midi (50 Preparationen)	Macherey-Nagel, # 740410.50
2-Propanol ROTIPURAN® (≥99,8%, p.a.)	Carl-Roth, # 6752.4
Ethanol (≥99,8%, p.a.)	Carl-Roth, # 9065.3
Thermo Inkubationsschüttler TS-100 (SC-18, 20 x 0.5 ml + 12 x 1.5 ml)	Peqlab
Blockheizthermostat Modell HX-1	Peqlab
Tischzentrifuge Heraeus Fresco 21	Thermofisher Scientific
Tischzentrifuge Heraeus Pico 12	Thermofisher Scientific
Photometer Bio Photometer plus 6123	eppendorf
Rotilabo®-Einmalküvetten	Carl-Roth, # XK20.1

Die Aufreinigung größere Mengen an Plasmid-cDNA wurde nach Vorschrift des NucleoBond® Xtra plasmid purification, High-copy plasmid purification Midi Kits (Macherey-Nagel GmbH & C. KG, Düre, Deutschland) durchgeführt. Hierfür wurde ein einzelner gepickter Klon (siehe Mini-Präparation) in einen autoklavierten Erlenmeyer-Kolben mit 250 ml Selektionsantibiotikum versetztem LB-Medium (100 mg ml^{-1} Ampicillin bzw. 50 mg ml^{-1} Kanamycin) überführt und über Nacht bei 37°C , 250 U min^{-1} im Inkubationsschüttler igeschüttelt. Die transformierten E. coli DH5 α -Bakterien wurden am Folgetag in eine Zentrifugenflasche überführt und bei 6000 U min^{-1} für zehn Minuten zentrifugiert (Sorvall RC5C, Thermofisher Scientific). Der Überstand wurde dekantiert und das E. coli DH5 α -Bakterienpellet wurde mit 8 ml Resuspensionpuffer (Buffer RES+RNase A) resuspendiert, wobei die RNase A störende RNA (mRNA, rRNA, tRNA) degradierte. Die E. coli DH5 α -Bakterien wurden durch die Zugabe von 8 ml alkalischem Lysepuffer (*Buffer LYS* mit Natriumhydroxid) und dem Detergenz Natrium-Dodecyl-Sulfat für fünf Minuten bei Raumtemperatur lysiert und anschließend mit 8 ml Neutralisationspuffer (*Neutralization Buffer NEU*) neutralisiert, wobei die Zentrifugenflasche nach jedem Pipettiervorgang so lange über Kopf invertiert wurde bis eine homogene Suspension vorlag. Je nach Anzahl der Proben wurden die Säulen (NucleoBond® Xtra Säule) mit eingesetztem Filter (NucleoBond® Xtra Filter) mit jeweils 12 ml Äquilibrationpuffer (*Buffer EQU*) äquilibriert. Als nächstes wurde die Suspension aus weißem Präzipitat mit gefällten, unlöslichen E. coli DH5 α -Bakterienfragmenten, Proteinen und der in Lösung befindlichen Plasmid-cDNA auf die Säule mit dem äquilibrierten Filter gegossen und die Suspension mit Hilfe der Gravitation durch den Filter durchlaufen gelassen. Bei der Filtration binden die negativ geladenen Sauerstoffatome der Phosphatgruppen des Rückgrates der Plasmid-cDNA an die positiv geladenen Methyl-Hydroxyethyl-Aminogruppen des

Kieselsäure-Anionen-Austauscherharzes des Filters. Anschließend wurde der Filter mit 5 ml Equilibration Buffer *EQU* gewaschen. Im nächsten Schritt wurde der Filter mit 8 ml Waschpuffer (Buffer Wash) gewaschen und die Plasmid-DNA mit 5 ml Elutionspuffer (*Buffer ELU*) in ein steriles 15 ml Zentrifugationsröhrchen eluiert. Durch den Zusatz von 3,5 ml Isopropanol zum Eluat wurde die gelöste Plasmid-cDNA gefällt und bei 9995 U min^{-1} bei Raumtemperatur für 15 Minuten zentrifugiert. Der Überstand wurde vorsichtig mittels einer Glaspipette, die an eine Vakuumpumpe angeschlossen ist, abgesaugt. Das zurückgebliebene Plasmid-DNA-Pellet wurde mit 2 ml 70 %igem Ethanol aufgenommen und erneut bei 9995 U min^{-1} für weitere fünf Minuten zentrifugiert. Der Alkohol wurde wiederum abgesaugt und das Plasmid-DNA-Pellet bei Raumtemperatur für eine Stunde luftgetrocknet. Nach einer Stunde wurde das luftgetrocknete Plasmid-DNA-Pellet in 250 μl Reinstwasser aufgenommen und durch langsames Auf- und Abpipettieren gelöst. Anschließend wurden der Gehalt und die Reinheit der wässrigen Plasmid-cDNA-Lösung am UV/Vis Spektralphotometer photometrisch bestimmt.

2.17 Bestimmung der Plasmid-cDNA-Konzentration und – Reinheit

Material	Hersteller
Photometer Bio Photometer plus 6123	eppendorf
Rotilabo®-Einmalküvetten	Carl-Roth, # XK20.1

Die aufgereinigte Plasmid-cDNA Konzentration wurde mittels UV-Spektralphotometrie bestimmt. Hierfür wurde eine wässrige 1:50 bzw eine 1:100 Verdünnung der Plasmid-DNA Lösung mit Reinstwasser (Leitfähigkeit = $0,55 \mu\text{S cm}^{-1}$ bei 20°C) hergestellt und in einer Quarzküvette mit $d = 1 \text{ cm}$ Schichtdicke gegen den Blindwert Reinstwasser gemessen. Aus der gemessenen Absorption bei $\lambda = 260 \text{ nm}$ wurde die Konzentration der Plasmid-DNA nach dem Lambert-Beer'schen Gesetz ermittelt (siehe Formel 17). Der Quotient aus der Absorption bei $\lambda = 260 \text{ nm}$ und der Absorption bei $\lambda = 280 \text{ nm}$ ist ein Kriterium für den Reinheitsgrad der Plasmid-DNA-Lösung, wobei ein Wert von $A_{260/280} = 1,8$ für reine Doppelstrang-DNA spricht. Eine Absorption von $A_{260/280} \geq 1,9$ steht für Kontaminationen mit RNA (mRNA, rRNA, tRNA). Bei reiner Einzelstrang-RNA ist der Quotient $A_{260/280} = 2$. Zudem wurde die Absorption bei $\lambda = 230 \text{ nm}$ bestimmt, bei der Ethanol und Waschpuffer absorbieren, die durch eine zu kurze Trocknungszeit des Plasmid-DNA-Pellets bei einer Midi-Präparation bzw. zu kurze Trockenzentrifugationszeiten der Spin-Säule bei einer Mini-Präparation in dem Plasmid-DNA-Pellet bzw. in der Spin-Säule zurückbleiben und die Reinheit der Aufreinigung stören. Somit erschließt sich aus dem Quotienten der Absorptionen bei $\lambda = 260 \text{ nm}$ und $\lambda = 230 \text{ nm}$ das Ausmaß der Verunreinigung der Plasmid-DNA-Lösung mit Waschpuffern und Ethanol. Liegt keine Kontamination mit Waschpuffern und Ethanol vor, wurden Werte von $A_{260/230} = 2,3$ gemessen. Aus der Absorption doppelsträngiger DNA bei $\lambda = 260 \text{ nm}$ wurde die Konzentration der doppelsträngigen DNA nach dem

Lambert-Beer'schen Gesetz berechnet, wobei eine $A_{260} = 1$ einer DNA-Konzentration von 50 mg ml^{-1} gleichkommt:

$$A = c \times d \times \epsilon \quad \text{Formel 17}$$

Formel 17: Mit A = Absorption, c = Plasmid-DNA-Konzentration, d = Schichtdicke der Küvette mit $d = 1 \text{ cm}$ und ϵ = Extinktionskoeffizient doppelsträngiger DNA bei $\lambda = 260 \text{ nm}$.

2.18 Sequenzierung von Plasmid-cDNA

Material	Hersteller
LIGHTRUN tube Barcodes	GATC, SKU#B50200200
PrimerSelect	DNASTAR Lasergene
SeqMan	DNASTAR Lasergene
SeqBuilder	DNASTAR Lasergene

Isolierte, aufgereinigte Plasmid-DNA aus Mini-oder Midi-Präparation oder mit PCR vervielfältigte Plasmid-DNA-Fragmente wurden zur Überprüfung der cDNA-Nucleotidsequenzabfolge mit Sequenzierungsprimern in $1,5 \text{ ml}$ Reagiergefäßen gemischt und zum Sequenzieren per Post eingeschickt. Hierfür wurde über GATC Biotechnologie in Köln die Didesoxy-Sequenzierungsmethode nach Sanger (Sanger et al., 1977a; Sanger et al., 1977b; Smith et al., 1977) mit Fluoreszenzfarbstoff markierten Didesoxynukleosidtriphosphate eingesetzt. Das Sequenzierergebnis der von der Sequenziertechnologie ABI 3730xl DNA-Analyzer-Systeme analysierten Proben wurde am Folgetag jeweils in den folgenden Formaten als Chromatogramm (.ab1, ABI-Datei), als Text-Datei (.seq, SEQ-Datei) und als FASTA-Format (.fas, FAS-Datei) zur Verfügung gestellt. Dafür wurde aufgereinigte Plasmid-DNA oder amplifiziertes PCR-Produkt mit Sequenzierungsprimern nach Herstellerangaben zusammenpipettiert: Entweder $5 \mu\text{l}$ einer $80 - 100 \text{ ng } \mu\text{l}^{-1}$ aufgereinigten wässrigen Plasmid-DNA-Lösung oder $5 \mu\text{l}$ eines aus dem Gel extrahierten wässrigen $20 - 80 \text{ ng } \mu\text{l}^{-1}$ PCR-Produkts wurden jeweils mit $5 \mu\text{l}$ einer $5 \mu\text{M}$ ($5 \text{ pmol } \mu\text{l}^{-1}$) wässrigen Sequenzierprimerlösung gemischt und in autoklavierten $1,5 \text{ ml}$ Reagiergefäßen zum Sequenzieren eingeschickt. Die Sequenzierungsprimer wurden mit zur Hilfenahme des Programmes PrimerSelect von DNASTAR Lasergene entworfen, wobei der Sequenzierprimer folgende Eigenschaften besitzen sollte:

- Die Schmelztemperatur T_m sollte zwischen 45° und 65°C liegen
- eine Länge von ca. 20 bp haben
- der Guanin-Cytosin-Gehalt (GC-Gehalt) sollte zwischen 40 und 60% betragen
- Maximal drei Guanin-Cytosin-Paarungen mit jeweils drei Wasserstoffbrücken zwischen Primerdimeren und in mit sich selber gefalteten Haarnadelstrukturen ausbilden.

Das Sequenzierergebnis wurde mit Hilfe des Programmes DNASTAR Lasergene SeqMan und DNASTAR Lasergene SeqBuilder auf die Richtigkeit der Nucleotidsequenzabfolge hin überprüft.

Primername	Sequenz [5'-3']	Schmelztemperatur T _m [°C]	GC-Gehalt [%]	Länge [bp]
gpH₁R 1693 sense	AACAGCTCCCTCCCTTCCTTCTCA	60,4	54,1	24
gpH₁R 2158 sense	TGGAGGAGGCTGCGTTCACA	58,8	60,0	20
gpH₁R 2286 sense	GTTCTTCATGGTCATTGCCTTCTG	56,6	45,8	24
gpH₁R 1800 antisense	GCACCCCACTGGCATCTTTTGAG	61,5	56,5	23
gpH₁R 1677 sense	GCACCGCCAGCTCATCAACA	59,2	60,0	20
gpH₁R 2514 antisense	CCGAGGAGAGGGTTAGGGATAGG	58,1	60,9	23
gpH₁R 1453 sense	CTCTCCTTCCTGTGGGTGATTCC	57,6	56,5	23
Cerulean 3094 sense	AGCTGAGCAAAGACCCCAACGAGA	62,1	54,2	24
pcDNA3.1(+) 1906 antisense	AATCCTCCCCCTTGCTGTCC	56,6	60,0	20
pcDNA3.1(+) 782 sense	TAGGCGTGACGGTGGGAGGTCT	60,6	60,9	23
gpH₁R 2262 sense	TTCTCTGCTGGATCCCCTACTTTG	57,6	50,0	24
gpH₁R 2265 sense	TCTGCTGGATCCCCTACTTTGTGT	57,8	50,0	24
hGnRHR 807 sense	GGTTGCATTTGCCACTTCATTTAC	56,6	41,7	24
hGnRHR 810 sense	TGCATTTGCCACTTCATTTACTGT	55,4	37,5	24
hGnRHR 730 sense	CAGGACCCCCACGAACTACAAC	58,0	56,5	23
CMV 532 sense	TAGGCGTGACGGTGGGAGGTC	65,8	63,6	22
MV1IQ 2308 sense	GCCTGTATCCGCATCCAAAAGA	57,8	50,0	22
MV1IQ 2336 sense	GAGGCTGGCTGATGAGAAAGAAG	56,2	52,2	23
MV1IQ 304 antisense	TGCCACTAAGACGATACCACAATA	53,3	41,7	24

MV11Q 438 antisense	TCATCTCTGGCCATCTGCTTGTAT	56,7	45,8	24
----------------------------	--------------------------	------	------	----

Tabelle 2.5: Charakterisierung der verwendeten Sequenzierungsprimer Die Sequenzierungsprimer wurden von metabion (Planegg, Deutschland) oder von Sigma-Aldrich (Taufkirchen, Deutschland) in einer wässrigen 100 μM (100 pmol μl^{-1}) Lösung bezogen. Für die Sequenzierung wurde eine wässrige 1:20 Verdünnung mit Reinstwasser angesetzt und wie unter 2.1.8 beschrieben, weiterverwendet. Die Zahl im Primernamen gibt die Anhybridisierungsposition des Sequenzierungsprimers am 5`OH-Ende der Nukleobase im jeweiligen Expressionsvektor wieder.

2.19 Polymerase-Ketten-Reaktion

Material	Hersteller
Thermocycler, peqSTAR 96X	Peqlab
Multiply®-Pro Gefäß 0,2ml, PP	Sarstedt. # 72.737.002
Multiply®-μStrip Pro 8er Kette	Sarstedt. # 72.991.002
Pfu DNA Polymerase (2,5 Units μl^{-1})	Thermo Scientific, # EP0501
dNTP Mix (10 mM)	Thermo Scientific, # R0192

Die Polymerase-Ketten-Reaktion (*Polymerase-Chain-Reaction*, PCR) dient zur selektiven Vervielfältigung eines definierten Abschnitts eines DNA-Doppelstranges (Mullis et al., 1986; Saiki et al., 1988). Der Mechanismus der Polymerasen-Ketten-Reaktion beruht darauf, dass kurze Oligonukleotide bekannter Sequenz mit 20 - 45 bp Basenlänge (Vorwärts- und Rückwärtsprimer, „*sense*- und *antisense primer*“, „*forward and reverse primer*“) komplementär an die beiden Einzelstränge eines denaturierten DNA-Doppelstranges (Matritze, *template*) anhybridisieren und eine thermostabile Pfu-DNA-Polymerase die beiden Einzelstränge komplementär zur DNA-Matritze mit den DNA-Bausteinen, den 2`-Desoxyribonukleosid-5`-triphosphaten (=Desoxyribonukleotide, dNTPs¹⁹⁷), an den 3`OH-Enden der anhybridisierten DNA-Fragmenten auffüllt. Außerdem werden bei der DNA-Synthese Diphosphate (Pyrophosphate, PP_a) freigesetzt. Zudem besitzt die Pfu-DNA-Polymerase eine Korrekturlesefunktion einer 3`-5`-Exonuklease (*proof-reading*), die falsch eingebaute Nukleotide wieder aus dem neu synthetisierten DNA-Strang entfernt (Lundberg et al., 1991). Außerdem führt die Verwendung der Pfu-DNA-Polymerase zu PCR-Produkten mit stumpfen Enden (*blunt ends*). Dieser Reaktionsansatz aus Denaturierung des DNA-Stranges, Anhybridisierung der Oligonukleotide (*Annealing*) und der DNA-Elongation (*Extension*) wurde so lange wiederholt (25 - 45 Zyklen) bis die gewünschte DNA-Region in ausreichender Kopienzahl vorlag. Zu Beginn der PCR wurde der Deckel des Thermocyclers für 1 Minute auf 110°C erhitzt, um ein Verdunsten des PCR-Reaktionsansatzes zu vermeiden. Bei klassischen PCR-Maschinen, die keine Funktion zum Erhitzen des Deckels besitzen, wird der PCR-Ansatz mit 25 μl Mineral- bzw. Paraffinöl überschichtet, um ein Verdunsten

¹⁹⁷ Die Abkürzung dNTP steht für ein Gemisch aus vier gleichen Anteilen von Desoxyadenosintriphosphat (dATP), Desoxycytidintriphosphat (dCTP), Desoxyguanosintriphosphat (dGTP) und Desoxythymidintriphosphat (dTTP).

des Gefäßinhalts zu vermeiden. Nachfolgendes Pipettierschema wurden für einen 20 µl PCR-Reaktionsansatz mit dem dazugehöriges PCR-Programm verwendet.

20 µl PCR-Reaktionsansatz

- 1 µg Plasmid-cDNA
- 1 µl Vorwärtsprimer, 100 µM [100 mol µl⁻¹]
- 1 µl Rückwärtsprimer, 100 µM [100 mol µl⁻¹]
- 1 µl dNTP-Mix, [10 mM]
- 2 µl 10-fach Pfu DNA-Polymerase-Puffer¹⁹⁸
- 1 µl Pfu-DNA-Polymerase¹⁹⁹ [2,5 U µl⁻¹]
- 13 µl Reinstwasser

PCR-Programm

- Initiale Denaturierung für 1 min bei 95°C
- 25-45 Zyklen bestehend aus:
 - Denaturierung für 30 s bei 95°C
 - Hybridisierung für 30 s bei T_m-10°C oder
Temperaturgradient: 50°C ≤ T_m ≤ 65°C
 - Elongation für 2 min bei 72°C (1 - 2 min pro kb)
- Finale Elongation für 5 min bei 72°C
- Abkühlung und Lagerung des Reaktionsansatzes bei 8°C

Der abgekühlte Reaktionsansatz wurde durch anschließende Agarose-Gelelektrophorese analysiert.

Primername	Erkennungssequenz für Restriktionsendonukleasen mit Schnittmuster [I]	Sequenz [5´-3´]	Schmelztemperatur T _m [°C]	GC-Gehalt [%]	Länge [bp]
gpH₁R-NotI sense	5´G/CGGCCGC3´ 3´CGCCGGC/G5´	5´ATTAA GCGGCCGC ATG TCTTTCCTCCCAG GAAT3´	73,5	51,5	33
gpH₁R-XhoI antisense	5´C/TCGAG3´ 3´GAGCT/C5	5´TAAT CTCGAG AGGGG GGATACGCAGGATCC3´	69,3	56,7	30
Cerulean-XhoI sense	5´C/TCGAG3´ 3´GAGCT/C5	5´AAAT CTCGAG GTGAGC AAGGCGAGGAGCT3´	71,0	56,7	30

¹⁹⁸ Pfu DNA-Polymerase-Puffer: 200 mM Tris-HCl (pH=8,8, 25°C), 100 mM (NH₄)₂SO₄, 100 mM KCl, 1 mg ml⁻¹ BSA, 1% (V/V) Triton X-100, 20 mM MgSO₄

¹⁹⁹ 20 mM Tris-HCl (pH 8.2), 1 mM DTT, 0,1 mM EDTA, 100 mM KCl, 0.1% (V/V) Nonidet P40, .1% (v/v) Tween 20, 50% (V/V) Glycerol

Cerulean-XbaI antisense	5`T/CTAGA3` 3`AGATC/T5`	5`GGCCCTCTAGATTACT TGTACAGCTCGTCCA3`	65,1	50,0	32
Cerulean-g-XhoI sense	5`C/TCGAG3` 3`GAGCT/C5`	5`AAATCTCGAGGGTGAG CAAGGGCGAGGAGCT3`	72,9	58,1	31

Tabelle 2.6: Verwendete Vorwärts- und Rückwärtsprimer zur Amplifikation des gpH₁-Rezeptors und des türkis fluoreszierenden Proteins Cerulean um das Zielkonstrukt gpH₁R-Cerulean pcDNA3.1 (+) [131] zu erhalten Die rot markierten Nukleotide geben die Erkennungssequenz der über die PCR eingefügten Restriktionsschnittstellen für die Restriktionsendonukleasen NotI, XhoI und XbaI wieder. Der 5'-Überhang mit den grau hinterlegten Nukleotiden steigert die Effizienz der Restriktionsendonuklease auf 50 – 100 % (siehe Tabelle „Cleavage Close to End of DNA Fragments“, Catalog & Technical Reference, New England Biolabs, Seite 330, (Moreira und Noren, 1995).

Primernamen	Erkennungssequenz für Restriktionsendonukleasen mit Schnittmuster []	Sequenz [5`-3`]	Schmelztemperatur T _m [°C]	GC-Gehalt [%]	Länge [bp]
hGnRHR-EcoRI-gpH₁R-Ct-XhoI sense	EcoRI 5`G/AATTC3` 3`CTTAA/G5` XhoI 5`C/TCGAG3` 3`GAGCT/C5`	ATTAAGAATTC AATGA GAATTCAGGAAGAC CTTCAAGAG GATCCTGCG TATCCCCCTCTCGA GAATTA	86,3	41,5	70
hGnRHR-EcoRI-gpH₁R-Ct-XhoI antisense	EcoRI 5`G/AATTC3` 3`CTTAA/G5` XhoI 5`C/TCGAG3` 3`GAGCT/C5`	TAATT CTCGAGAGGGGG GATACGCAG GATCCTCTT GAAGGTCTTCCT GAAATTCTCATTGAATT CTTAAT	86,3	41,5	70

Tabelle 2.7: Verwendete Vorwärts- und Rückwärtsprimer zur Amplifikation des C-Terminus des gpH₁-Rezeptors für die Klonierung der Rezeptorchimäre aus dem hGnRHR und dem C-Terminus des gpH₁R hGnRHR = gpH₁R-CtShort20 pcDNA3.1 (+) [553] Auch hier geben die rot markierten Nukleobasen die Erkennungssequenz der durch das Prinzip der PCR eingefügten Restriktionsschnittstellen für die Restriktionsendonukleasen EcoRI und XhoI wieder. Der 5'-Überhang mit den grau markierten Nukleotiden steigert die Effizienz der Restriktionsendonuklease auf 50 – 100 % (siehe Tabelle „Cleavage Close to End of DNA Fragments“, Catalog & Technical Reference, New England Biolabs, Seite 330, (Moreira und Noren, 1995).

Primernamen	Erkennungssequenz für Restriktionsendonukleasen mit Schnittmuster []	Sequenz [5`-3`]	Schmelztemperatur T _m [°C]	GC-Gehalt [%]	Länge [bp]
MV1IQ NotI sense	5`G/CGGCCGC3` 3`CGCCGGC/G5`	TATAAGCGGCCG CATGGCCGCCTCCGAG CTGTA	87,5	63,7	33
MV1IQ XhoI antisense	5`C/TCGAG3` 3`GAGCT/C5`	TTAATCTCGAGGCCCT CCTCATACGCATGT	77,9	51,7	31

Tabelle 2.8: Verwendete Vorwärts- und Rückwärtsprimer zur Amplifikation des MV1IQ Die rot markierte Region in der Sequenz ist die Restriktionssequenz der verwendeten Restriktionsendonukleasen NotI und XhoI. Der 5'-Überhang mit den grau markierten Nukleotiden steigert die Effizienz der Restriktionsendonuklease auf 50 – 100 % (siehe Tabelle „Cleavage Close to End of DNA Fragments“, Catalog & Technical Reference, New England Biolabs, Seite 330, (Moreira und Noren, 1995).

2.20 Agarose-Gelelektrophorese

Material	Hersteller
Agarose NEEO Ultra Qualität	Carl-Roth, # 2267.3
Gene Ruler 1kb DNA ladder	Thermo Scientific, # SM0311
Gene Ruler 100 bp DNA ladder	Thermo Scientific, # SM0241
6X DNA Loading Dye	Thermo Scientific, # R0611
Rotisafe GelStain	Carl-Roth, # 3865.1
Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan (TRIS)	Carl-Roth, # 4855.2
Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA)	Sigma-Aldrich, # E9884
Essigsäure (90-100%)	MERCK; # 8.18755.2500
12 Zahn-Gelkamm 1.5 mm	Peqlab, # 40-1214-12D
16 Zahn-Gelkamm 1.5 mm	Peqlab, # 40-1214-16D
20 Zahn-Gelkamm 1.5 mm	Peqlab, # 40-1214-20D
Elektrophoresekammer mit Gelkammer	Peqlab, # 40-1214 Class II
Peqlab Power Supplies	Peqlab, # EV200 Series

Mit der Agarose-Gelelektrophorese erfolgte eine Auftrennung von DNA-Fragmente entsprechend ihrer molekularen Größe. Für die Auftrennung von DNA-Fragmenten von 0,5 - 10 kb Basenlänge wurden 1 %ige (m/V) Agarosegele, für kleinere DNA-Fragmente $\leq 0,5$ kb 2 %ige (m/V) Agarosegele verwendet. Die Agarose wurde in 1 %igem TRIS-Acetat-EDTA-Puffer (TAE) gelöst. Hierfür wurde ein 50-fach konzentrierter TAE-Puffer mit Reinstwasser 1:50 verdünnt.

50-fach TRIS-Acetat-EDTA-Puffer (TAE):

- 242 g TRIS-Base [40 mM]
- 57,1 ml Essigsäure [20 mM]
- 100 ml 0,5 M EDTA [1 mM, pH = 8]
- mit Reinstwasser auf 1000 ml aufgefüllt
- mit NaOH auf den pH = 8,5 eingestellt

Agarose-Gelelektrophorese:

- 200 ml 1-fach TAE-Puffer
- 2 bzw. 4 g Agarose (für 1 bzw. 2 %iges Agarosegel)
- in der Mikrowelle für 5 min bei 800 Watt aufkochen, bis sich gesamte Agarose vollständig gelöst hat.

Die abgekühlte viskose Agarose-TAE-Lösung wurde zum Visualisieren der DNA-Banden unter UV-Licht mit 10 μl Rotisafe von Carl-Roth vermengt, in einen Gelschlitten gegossen, mit einem Gelkamm (12, 16 oder 20 Zähne) bestückt und bei Raumtemperatur ausgehärtet. Das erstarrte Gel wurde in eine Elektrophoresekammer überführt und mit weiterem TAE-Puffer überschichtet. Anschließend wurde der Gelkamm vorsichtig herausgenommen, um die geformten Taschen nicht zu verletzen. In die geformten Gel-Taschen wurden jeweils 10 μl einer DNA-Leiter (Gene Ruler 100bp bzw. 1kb DNA ladder) zur Charakterisierung der DNA-Banden bzw. 20 μl einer mit 3,33 μl 6X Loading Dye²⁰⁰ versetzter wässriger DNA-Lösung pipettiert. Anschließend wurde zur Auftrennung der DNA ein elektrisches Feld für ca. 30 Minuten mit einer Spannung von $U = 150\text{ V}$ angelegt. Das angelegte elektrische Feld und die Porengröße des Gels führten dazu, dass negativ-geladene DNA abhängig von der Gesamtladung und der Länge des DNA-Stranges zum Pluspol (Anode) wanderten. Größere DNA-Fragmente mit einer größeren negativen Gesamtladung wurden von den Poren des Agarosegels stärker zurückgehalten als kürzere DNA-Fragmente mit einer kleineren negativen Gesamtladung, womit die Auftrennung der DNA im Agarosegel erfolgte. Nach ca. 30 Minuten wurde die Agarose-Gelelektrophorese gestoppt und das Agarosegel zum Visualisieren der DNA-Banden mit UV-Licht von $\lambda = 254\text{ nm}$ und $\lambda = 365\text{ nm}$ belichtet, abfotografiert und mit dem Programm IrfanView bearbeitet.

2.20.1 Aufreinigung von Plasmid-cDNA aus Agarosegelen

Material	Hersteller
GeneJET™ Gel Extraction Kit	Thermofisher Scientific, # K0691
2-Propanol ROTIPURAN® (≥99,8%, p.a.)	Carl-Roth, # 6752.4
Ethanol (≥99,8%, p.a.)	Carl-Roth, # 9065.3
Thermo Inkubationsschüttler TS-100 (SC-18, 20 x 0.5 ml + 12 x 1.5 ml)	Peqlab
Tischzentrifuge Heraeus Fresco 21	Thermofisher Scientific

Zur Gewinnung von Plasmid-cDNA aus Agarosegelen wurde die Belichtung mit UV-Licht so kurz wie möglich gehalten um DNA-Strangbrüche zu meiden. Die DNA-Bande wurde unter UV-Licht von $\lambda = 365\text{ nm}$ mit 70 %iger Intensität mit Hilfe eines sauberen Skalpell aus dem Gel herausgeschnitten (siehe Abbildung 2.13) und für die Plasmid-cDNA-Extraktion in ein vorher leer abgewogenes 1,5 ml Reagiergefäß überführt. Anschließend wurde das Gewicht des Gelstücks aus Leergewicht und Gewicht des vollen Reaktionsgefäßes bestimmt. Die Gelextraktion wurde gemäß der Herstellervorschrift des GeneJET™ Gel Extraction Kits durchgeführt. Für 1 %ige Gele wurde das Bindungspuffer (Binding Buffer) im 1:1 Verhältnis [Volumen (μl): Gewicht (mg)], z. B. 100 μl Bindungspuffer für ein 100 mg schweres Gelstück, für 2 %ige Gele im 2:1 Verhältnis zur ermittelten Masse des Gelstücks hinzugefügt und für 10 Minuten bei 50 - 60°C im Thermoschüttler bis zum vollständigen Auflösen des Gels unter Schütteln

²⁰⁰ Das 6X Loading Dye erhöht die Dichte der wässrigen DNA-Lösung, womit die DNA in die Gel-Taschen sedimentiert und nicht aus den Gel-Taschen herausdiffundiert.

inkubiert. Das chaotrope Salz Guanidiniumthiocyanat im Bindungspuffer bricht die Struktur des Agarosegels auf, denaturiert Proteine und fördert die Bindung der Plasmid-DNA über die 3'-Hydroxygruppe an die Silicamembran der Kieselgel-Säule (Vogelstein und Gillespie, 1979; Marko et al., 1982; Boom et al., 1990). Als nächstes wurden 800 μl der Gel-Puffer-Lösung auf die Kieselgel-Säule mit Auffangbehälter (GeneJET purification column) transferiert und für eine Minute bei 13000 U min^{-1} zentrifugiert. Der Durchlauf wurde verworfen, die Säule nochmals mit 100 μl Bindungspuffer versetzt und erneut zentrifugiert. Nachdem der Durchlauf verworfen wurde, wurde die mit Plasmid-cDNA gebundene Säule mit 700 μl eines Ethanol-haltigen Waschpuffers gewaschen, um Verunreinigungen wie DNA-bindende Proteine zu entfernen. Anschließend wurde die Kieselgel-Säule für eine Minute bei 13000 U min^{-1} trocken zentrifugiert und in ein neues autoklaviertes 1,5 ml Reagiergefäß gesetzt. Die Silica-Membran der Kieselgel-Säule wurde mit 20 - 40 μl Reinstwasser benetzt und nach ca. zwei Minuten Einwirkzeit die Plasmid-cDNA bei 13000 U min^{-1} für zwei Minuten eluiert.

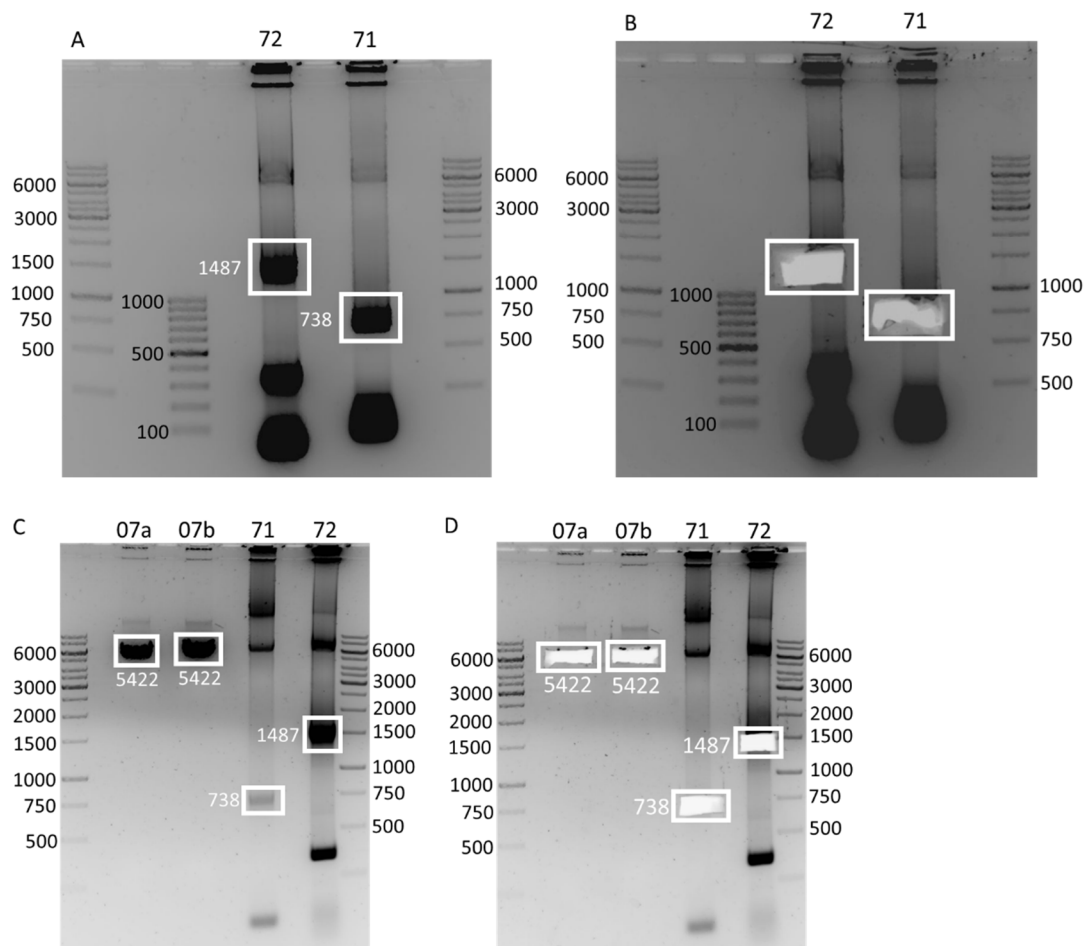


Abbildung 2.13: Agarose-Gelelektrophoresebilder der PCR-Reaktionsansätze zur Amplifikation des gPH_1 -Rezeptors und des türkis fluoreszierenden Proteins mCerulean Der PCR-Ansatz wurde bei einer Spannung von $U = 150 \text{ V}$ für 30 Minuten bis eine Stunde in einem 1 %igem Agarosegel aufgetrennt und abgelichtet. Die Gelbilder sind links und rechts von DNA-Leitern zur Größenbestimmung von DNA-Fragmenten flankiert. Die Zahlen neben den Banden geben die Größe des DNA-Fragments in Basenpaaren (bp) an. Zwei Plasmid-cDNAs dienten als DNA-Matrize für die beiden vervielfältigten Proteine:

gpH₁R pcDNA3.1/V5-His-TOPO [72] und hA2αR-FIAsH3-CerFP [71]. Der gpH₁-Rezeptor besitzt eine Länge von 1487 Basenpaaren, die neben der 1500 bp Bande liegt. Die Cerulean Bande liegt neben der 750 bp Bande, das ungefähr der Größe des Cerulean von 738 bp entspricht. In den unteren beiden Gelbildern, Abbildung (C) und (D), sind die Banden des jeweils mit den Restriktionsenzymen NotI und XhoI [07a] und XbaI und XhoI [07b] linearisierten Vektors pcDNA3.1(+) [07] mit 5422 Basenpaaren zu sehen. In den beiden rechten Gelbildern, Abbildung (B) und (D), wurden die DNA-Banden des linearisierten Vektors und die beiden mit PCR amplifizierten DNA-Banden mit Hilfe eines Skalpell herausgeschnitten und durch anschließende Gelextraktion (GeneJET™ Gel Extraction Kit) aufgereinigt.

2.21 Zielgerichtete Mutagenese

Material	Hersteller
Pfu DNA Polymerase (2,5 Units μl⁻¹)	Thermo Scientific, # EP0501
Q5® High-Fidelity DNA Polymerase	New England Biolabs, # M0491S
Q5® Reaction Buffer	New England Biolabs, # B9027S
FastDigest DpnI	ThermoFisher Scientific, # FD1704
Thermocycler, peqSTAR 96X	Peqlab
Blockheizthermostat Modell HX-1	Peqlab
Multiply®-Pro Gefäß 0,2ml, PP	Sarstedt. # 72.737.002
Multiply®-μStrip Pro 8er Kette	Sarstedt. # 72.991.002
dNTP Mix (10 mM)	ThermoFisher Scientific, # R0192
QuikChange Primer Design Programm	Agilent Technologies

Die Methode der zielgerichteten Mutagenese führt zum gezielten Austausch einzelner Nukleotide in einer schon bekannten Nukleotidsequenz. Dafür werden Nukleotide in einem Gen ersetzt (exchange), eliminiert (deletion) oder auch eingefügt (insertion), was zu einer Funktionsänderung²⁰¹ von Proteinen führen kann. In diesem Projekt führte der gezielte Austausch zweier Aminosäuren in der Bindetasche des gpH₁-Rezeptors zum Verlust der Histaminbindung (loss of function mutation). Dafür wurden D116^{3.32} der TM3 zu A116^{3.32} und F433^{6.55} der TM6 zu A433^{6.55} zu Alanin ausgetauscht. Zur Untersuchung der Helix 8 des gpH₁-Rezeptors wurden einerseits mögliche PIP₂-Bindestellen zu Alanin ausgetauscht (R485A, R490A-R493A und K486A-K489A) und andererseits die Helixstruktur durch den Einbau von Prolinen zerstört (F484P und F484-F488P). Weiterhin können mit der zielgerichteten Mutagenese neue Restriktionsschnittstellen in ein Gen eingefügt werden, um DNA-Fragmente einzuklonieren. In den gpH₁-Rezeptor wurden jeweils die SacII- und die HpaI-Schnittstellen für den Einbau des sechs Aminosäuren langes CCPGCC FIAsH-Bindemotivs eingefügt. Für die zielgerichtete Mutagenese wurden Oligonukleotide von 25 - 50 bp Basenlänge eingesetzt, die den beiden Einzelsträngen des gpH₁-Cerulean pcDNA3.1(+) [131] Plasmids komplementär sind und ungefähr mittig die Punktmutation beinhalteten. Obwohl eine veränderte Nukleotidsequenz vorlag, fand eine Anhybridisierung der Oligonukleotide mit der denaturierten DNA statt. Die Oligonukleotide wurden mit Hilfe des QuikChange® Primer Design Programmes von Agilent Technologies (Waldbronn, Deutschland) gestaltet.

²⁰¹ Die Funktionsveränderung kann entweder zu einer verminderten bzw. zu einem Verlust (loss of function mutation) oder zu einer Verstärkung (gain of function mutation) der Proteinfunktion führen.

Hierfür wurde die gesamte cDNA Sequenz des gpH₁-Cerulean pcDNA3.1(+) [131] Plasmids zur Kalkulierung der optimalen Mutageneseprimer in das Programm eingefügt und die einzelnen Positionen für die Nukleotid- bzw. Aminosäureaustausche ausgewählt. Die gestalteten Mutageneseprimer wurden von metabion (Planegg, Deutschland) oder von Sigma-Aldrich (Taufkirchen, Deutschland) synthetisiert und in einer wässrigen 100 µM (100pmol µl⁻¹) Lösung zugestellt. Folgender PCR-Ansatz und PCR-Programm wurden für die Mutagenese mit der Pfu-DNA-Polymerase von Thermofisher Scientific verwendet.

25 µl PCR-Ansatz:

- 20-25 ng Plasmid-cDNA [50 ng µl⁻¹]
- 1 µl Vorwärtsprimer [2,5 µM]
- 1 µl Rückwärtsprimer [2,5 µM]
- 1 µl dNTP-Mix [0,1 mM]
- 2,5 µl 10-fach Pfu DNA-Polymerase-Puffer
- 0,5 µl Pfu DNA-Polymerase [2,5 U µl⁻¹]
- auf 25 µl mit Reinstwasser auffüllen

PCR-Programm

- Initiale Denaturierung für 3 min bei 95°C
- 25-35 Zyklen bestehend aus:
 - Denaturierung für 30 s bei 95°C
 - Hybridisierung für 30 s bei T_m-10°C oder
Temperaturgradient: 50°C ≤ T_m ≤ 65°C
 - Elongation für 5 - 11 min bei 72°C (1 - 2 min pro kb)
- Finale Elongation für 5 - 11 min bei 72°C
- Abkühlung und Lagerung des Reaktionsansatzes bei 8°C

Die Q5[®] High-Fidelity DNA-Polymerase von New England Biolabs besitzt wie die Pfu-DNA-Polymerase von Thermofisher die 3`-5`Exonukleaseaktivität, eine Druckfehlerkorrekturfunktion. Jedoch ist die Q5[®] High-Fidelity DNA-Polymerase zusätzlich an ein kleines Protein von 7 kDa Größe, der sogenannten Sso7d-Domäne²⁰² aus dem *Sulfolobus solfataricus*, fusioniert, das nochmal die Fehlerrate deutlich reduziert (Wang et al., 2004).

²⁰² Die Sso7d-Domäne dient zur Stabilisierung des DNA-Polymerase-Komplexes während einer DNA-Polymerisation und steigert somit die Prozessivität der PCR. Die Prozessivität wird definiert als eine Fähigkeit der Polymerase, die DNA-Replikation ohne eine Dissoziation von der DNA-Matrize durchzuführen. Sie kann gemessen werden als die durchschnittliche Anzahl von Nukleotiden, die pro Bindungsereignis (=Hybridisierung und Elongation) eingebaut werden (Wang et al., 2004). Außerdem zeigt sie eine 12-mal geringere Fehlerrate als die Pfu-DNA-Polymerase.

Enzym	Prozessivität	Umsatzrate (kcat s ⁻¹)	t _{1/2} (min) bei 97,5°C
Pfu-DNA-Polymerase	6 ± 0.5	3.2 ± 0.1	730
mit Sso7d fusionierte Pfu-DNA-Polymerase	55 ± 3	5.7 ± 0.2	789

Tabelle 2.9: Vergleich der Pfu-DNA-Polymerase mit oder ohne einer Sso7d Domäne Eine handelsübliche hochreine thermostabile Pfu-DNA-Polymerase mit und ohne Sso7d-Fusionsprotein. Die katalytische Aktivität wurde bestimmt durch die Umsatzrate (kcat s⁻¹) des Nukleotideinbaus bei einem Überschuss an dNTPs. Die thermische Stabilität wurde bestimmt als die Halbwertszeit t_{1/2} der verbleibenden Aktivität des Enzyms nach einer Inkubation bei 97,5°C (Wang et al., 2004).

Für die Mutagenese mit der Q5® High-Fidelity DNA-Polymerase von New England Biolabs wurde der PCR-Ansatz gemäß Herstellerangaben angesetzt.

25 µl PCR-Ansatz:

- 1 µl Plasmid-cDNA [50 ng µl⁻¹]
- 1,25 µl Vorwärtsprimer [10 µM]
- 1,25 µl Rückwärtsprimer [10 µM]
- 0,5 µl dNTP-Mix [10 mM]
- 5 µl 5-fach Q5® High-Fidelity DNA-Polymerase mit 10 mM MgCl₂
- 0,3 µl Q5® High-Fidelity DNA-Polymerase [2 U µl⁻¹]
- 14,5 µl Reinstwasser

PCR-Programm:

- Initiale Denaturierung für 30 s bei 98°C
- 25 Zyklen bestehend aus:
 - Denaturierung für 10 s bei 95°C
 - Hybridisierung für 30 s bei T_m-10°C oder
Temperaturgradient: 50°C ≤ T_m ≤ 65°C
 - Elongation für 6 min bei 72°C (10s pro kb)
- Finale Elongation für 5 min bei 72°C
- Abkühlung und Lagerung des Reaktionsansatzes bei 4°C

Bei Verwendung von Primern mit Schmelztemperaturen T_m ≥ 72°C wurde ein 2-stufiges PCR-Protokoll („2-step PCR“) verwendet, indem die Hybridisierung und die Elongation zu einem einzigen Schritt (6 Minuten bei 72°C) zusammengefasst werden. Die DNA-Polymerisation wurde so lange fortgeführt bis ein neuer vollständiger Plasmid-DNA-Strang mit der gewünschten Mutation synthetisiert wurde. Im nächsten Schritt wurde die Tatsache genutzt, dass die DAM-Methylase (**D**esoxy-**A**denosin-**M**ethylase) in *dam*⁺-Bakterienstämmen wie im *E. coli* DH5α-Bakterienstamm die Aminogruppe an der Position 6 des Adenins A^{6m} der

Plasmid-cDNA methyliert (Geier und Modrich, 1979; Weiner et al., 1994). Das Restriktionsenzym DpnI erkennt genau diese A^{6m}-Methylierungen in der Plasmid-DNA und zerschneidet demzufolge nur die DNA-Matrize im PCR-Ansatz und nicht das PCR-Produkt, das keine Methylierungen aufweist. Hierfür wurde dem PCR-Ansatz 1 µl des Restriktionsenzym DpnI zugesetzt und für 4 - 6 Stunden bei 37°C auf dem Heizblock inkubiert. Anschließend wurde der gesamte Ansatz in kompetente E. coli DH5α-Bakterien wie unter Abschnitt 2.14 beschrieben, transformiert. Einzelne Kolonien transformierter E. coli DH5α-Bakterien wurden mittels Minipräparation (siehe Abschnitt 2.15) aufgereinigt und zum Sequenzieren (siehe Abschnitt 2.18) eingeschickt.

Primername	Sequenz [in 5'-3' Richtung]	Schmelztemperatur T _m [°C]	GC-Gehalt [%]	Länge [bp]
gpH₁R-D116A-a347c sense	CTTCTGGCTCTCTATGGCTTATGTGG CCAGCACAG	80,4	54,3	35
gpH₁R-D116A-a347c antisense	CTGTGCTGGCCACATAAGCCATAGA GAGCCAGAAG	80,4	54,3	35
gpH₁R-F433A-t1297g-t1298c sense	TCTCTGCTGGATCCCCTACGCTGTG TTCTTCATGGTCATT	78,1	50,0	40
gpH₁R-F433A-t1297g-t1298c antisense	AATGACCATGAAGAACACAGCGTAG GGGATCCAGCAGAGA	78,1	50,0	40

Tabelle 2.10: Mutageneseprimer (sense und antisense) die zum Verlust der Histaminbindung in der orthosterischen Ligandenbindetasche des gpH₁-Rezeptors führten Dafür wurden das D116^{3,32} in der TM3 und F433^{6,55} in der TM6 jeweils zu Alanin ausgetauscht. Die Positionen des Aminosäureaustauschs und des Nukleotidaustauschs sind in rot, entsprechend der Plasmid-cDNA-Matrize (gpH₁R-PG1660-il3-b-Cerulean pcDNA3.1(+) [269], gpH₁R-PG1783-il3-m-Cerulean pcDNA3.1(+) [263], gpH₁R-PG2158-il3-e1-Cerulean pcDNA3.1(+) [173], gpH₁R-PG2194-il3-e2-Cerulean pcDNA3.1(+) [463], gpH₁R-PG1413-ct-b-Cerulean pcDNA3.1(+) [456]) im Primernamen dargestellt. In den Sequenzen, die komplementär zum gpH₁-Rezeptor-Gen sind, sind die einzelnen Nukleotid-Austausche in rot markiert.

Primername	Sequenz [5'-3']	Schmelztemperatur T _m [°C]	GC-Gehalt [%]	Länge [bp]
gpH₁R-il3-m-Sa cll-t796c sense	GGGAAGGAGTCACCGCGGGAGGAT CCAAAAA	79,0	58,1	31
gpH₁R-il3-m-Sa cll-t796c antisense	TTTTTGGATCCTCCC GCGGTGACTC CTTCCC	79,0	58,1	31
gpH₁R-ct-b-Sa cll-a1410g sense (1.Mutation)	GAACCCACTCATCTACCCGCTGTGC AATGAGAATTCA	79,5	47,4	38
gpH₁R-ct-b-Sa cll-a1410g antisense (1.Mutation)	TGAAATTCTCATTGCACAGCGGGTA GATGAGTGGGTTTC	79,5	47,4	38

gpH₁R-ct-b-Sa cII-a1410g-t141 2g sense (2.Mutation)	CCACTCATCTACCCGCGGTGCAATG AGAATTTCA	78,0	50,0	34
gpH₁R-ct-b-Sa cII-a1410g-t141 2g antisense (2.Mutation)	TGAAATTCTCATTGCACCGCGGGTA GATGAGTGG	78,0	50,0	34
gpH₁R-ct-b-Sa cII-a1410g-t141 2g sense	TGAACCCACTCATCTACCCGCGGTG CAATGAGAATTTTCAGG	79,2	51,3	41
gpH₁R-ct-b-Sa cII-a1410g-t141 2g antisense	CCTGAAATTCTCATTGCACCGCGGG TAGATGAGTGGGTTCA	79,2	51,3	41
gpH₁R-il3-e2-H pal-c1222g sense (1.Mutation)	CGTCAGGGCTGCATGTGAACCGGG AG	78,5	65,4	26
gpH₁R-il3-e2-H pal-c1222g antisense (1.Mutation)	CTCCCGGTTCAATGCAGCCCTGAC G	78,5	65,4	26
gpH₁R-il3-e2-H pal-c1222g-g12 24t sense (2.Mutation)	CAGGGCTGCATGTTAACCGGGAGC GGA	78,6	63,0	27
gpH₁R-il3-e2-H pal-c1222g-g12 24t antisense (2.Mutation)	TCCGCTCCCGGTTAACATGCAGCCC TG	78,6	63,0	27
gpH₁R-il3-e2-H pal-c1222g-g12 24t sense	AGTACACGTCAGGGCTGCATGTTAA CCGGGAGCG	79,9	58,9	34
gpH₁R-il3-e2-H pal-c1222g-g12 24t antisense	CGCTCCCGGTTAACATGCAGCCCTG ACGTGTACT	79,9	58,9	34

Tabelle 2.11: Mutageneseprimer (sense und antisense) zur Regeneration neuer Restriktionsschnittstellen im gpH₁-Rezeptor, um das FIAsH-Bindemotiv (CCPGCC) einzufügen Im Primernamen sind die neu eingefügten Restriktionsschnittstellen (HpaI und SacII) mit dem gewünschten Zielkonstruktnamen (gpH₁R-il3-m-Cerulean, gpH₁R-il3-e2-Cerulean und gpH₁R-ct-b-Cerulean) und die Positionen der Nukleobasenaustausche entsprechend der DNA-Matrize gpH₁R-Cerulean pcDNA3.1(+) [131] in rot markiert.

Primernamen	Sequenz [5'-3']	Schmelztemperatur T _m [°C]	GC-Gehalt [%]	Länge [bp]
gpH₁R-ct-b-R4 85A-a1453g-g1 454c Cerulean sense	CGCGGTGCAATGAGAATTTCCGCGAA GACCTTCAAGAGGATC	80,2	51,3	41

gpH₁R-ct-b-R4 85A-a1453g-g1 454c Cerulean antisense	GATCCTCTTGAAGGTCTTC GCG AAAA TTCTCATTGCACCGCG	80,2	51,3	41
gpH₁R-ct-b-R4 90A-R493A a1468g-g1469c -c1477g-g1478 c Cerulean sense	AATTT CAGGAAGACCTTCAAGGCGA TCCTG GCTATCCCCCCTCTCG	79,5	54,4	46
gpH₁R-ct-b-R4 90A-R493A a1468g-g1469c -c1477g-g1478 c Cerulean antisense	CGAGAGGGGGGATA GCCAGGATCG CCTTGAAGGTCTTCTGAAATT	79,5	54,4	46
gpH₁R-ct-b-K4 86A-K489A a1456g-a1457c -a1465g-a1466 c Cerulean sense	GTGCAATGAGAATTT CAGGGCG ACT TC GCGAGGATCCTGCGTATCCCC	79,6	57,2	49
gpH₁R-ct-b-K4 86A-K489A a1456g-a1457c -a1465g-a1466 c Cerulean antisense	GGGGATACGCAGGATCCTC GCG AA GGT GCCCTGAAATTCTCATTGCAC	79,6	57,2	49
gpH₁R-ct-b-F48 4P-t1450c-t145 1c Cerulean sense (1.Mutation)	GTGCGCGGTGCAATGAGAAT CC CAG GAAGACCTTCAAGAG	80,1	55	40
gpH₁R-ct-b-F48 4P-t1450c-t145 1c Cerulean antisense (1.Mutation)	CTCTTGAAGGTCTT CCTGG ATTCTC ATTGCACCGCGCAC	80,1	55	40
gpH₁R-ct-b-F48 4P-F488P-t145 0c-t1451c-t146 2c-t1463c Cerulean sense (2.Mutation)	GAGAATCCCAGGAAGAC CCCA AGA GGATCCTGCGTAT	82,8	55,3	38
gpH₁R-ct-b-F48 4P-F488P-t145 0c-t1451c-t146 2c-t1463c Cerulean antisense (2.Mutation)	ATACGCAGGATCCTT GGGG TCT TCTGGGATTCTC	82,8	55,3	38
gpH₁R-ct-b-F48 4P-F488P t1450c-t1451c-t 1462c-t1463c Cerulean sense	GTTGTGCGCGGTGCAATGAGAAT CC CAGGAAGACCCCCAA GAGGATCCTG	91,9	58	50

gpH₁R-ct-b-F48 4P-F488P t1450c-t1451c-t 1462c-t1463c Cerulean antisense	CAGGATCCTCTTGGGGGTCTTCCTG GGATTCTCATTGCACCGCGCACAAAC	91,9	58	50
hA_{2A}R-CCPGC C^{13e}-T298P-a89 2c-Cerulean sense	GCGAGTTCGCCAGCCCTTCCGCAA GATC	84,2	65,5	29
hA_{2A}R-CCPGC C^{13e}-T298P-a89 2c-Cerulean antisense	GATCTTGCGGAAGGGCTGGCGGAA CTCGC	84,2	65,5	29

Tabelle 2.12: Mutageneseprimer, die zur Untersuchung der Helix 8 Struktur im gpH₁-Rezeptor und im hA_{2A}-Rezeptors verwendet wurden Zur Untersuchung der Helix 8 des gpH₁-Rezeptors wurden einerseits mögliche PIP₂-Bindestellen jeweils zu Alanin mutiert (R485A, R490A-R493A und K486A-K489A) und andererseits die Helix 8 Sekundärstruktur durch den Einbau von Prolinen zerstört (F484P, F484-F488P und T298P). Als DNA-Matrize diente für alle Helix 8 Mutationen des gpH₁-Rezeptors das gpH₁R-PG1413-ct-b-Cerulean pcDNA3.1(+) [456] Plasmid und für die Helix 8 Mutation des hA_{2A}-Rezeptors das hA_{2A}R-CCPGC^{13e}-Cerulean [71] Plasmid. Die Basenfehlpaarungen und die Position der Aminosäureaustausche sind in rot markiert.

Primername	Sequenz [5'-3']	Schmelztemperatur T _m [°C]	GC-Gehalt [%]	Länge [bp]
gpH₁R-C472St op g1415a-c1416g sense (Stop=TAG)	CCCACTCATCTACCCACTGTAGAAT GAGAATTCAGGAAGAC	79,2	45,3	42
gpH₁R-C472St op g1415a-c1416g antisense (Stop=TAG)	GTCTTCCTGAAATTCTCATTCTACAG TGGGTAGATGAGTGGG	79,2	45,3	42
gpH₁R-C472St op c2400a sense (Stop=TGA)	CACTCATCTACCCACTGTGAATGA GAATTCAGGAAGA	78,5	41,1	39
gpH₁R-C472St op c2400a antisense (Stop=TGA)	TCTTCCTGAAATTCTCATTTCACAGT GGGTAGATGAGTG	78,5	41,1	39

Tabelle 2.13: Verwendete Mutageneseprimer für einen um den C-Terminus gekürzten gpH₁-Rezeptor Hier wurde das gpH₁R-Cerulean pcDNA3.1(+) [131] Plasmid als DNA-Matrize eingesetzt. Es wurden parallel zwei verschiedene Nukleobasenaustausche angesetzt, die zum gewünschten Zielkonstrukt gpH₁R-C472Stop pcDNA3.1(+) [557] mit dem Stopcodon (Stop = TAG und TGA) führten. Die Basenfehlpaarungen und die Position der Aminosäureaustausche sind in rot markiert.

Primername	Sequenz [5'-3']	Schmelztemperatur T _m [°C]	GC-Gehalt [%]	Länge [bp]
hGnRHR-gpH ₁ R ct-StopEFL→PL CL t985c-g986c-g98 8t-a989t-t992g sense (1.Mutation)	CTTTGATCCAATTATCTATGGATAT TTTTCTCTGCCATTATGCAATGAGA ATTTCAAGGAAGACCTTCAAGAGGA TC	80,1	36,9	76
hGnRHR-gpH ₁ R ct-StopEFL→PL CL t985c-g986c-g98 8t-a989t-t992g antisense (1.Mutation)	GATCCTCTTGAAGGCTCTTCTGAA ATTCTCATTGCATAATGGCAGAGAA AAATATCCATAGATAAGTGGATCAA AG	80,1	36,9	76
hGnRHR- gpH ₁ R ct-PLCL→PLCSt op c1042t-t1043a-c1 044g sense (2.Mutation)	TCCTGCGTATCCCCCTTAGGAGC ATGCATCTAGAGG	78,4	56,8	37
hGnRHR- gpH ₁ R ct-PLCL→PLCSt op c1042t-t1043a-c1 044g antisense (2.Mutation)	CCTCTAGATGCATGCTCCTAAGGG GGGATACGCAGGA	78,4	56,8	37

Tabelle 2.14: Mutageneseprimer, die nach der Umklonierung des C-Terminus des gpH₁-Rezeptors an den hGnRH Rezeptor gebraucht wurden, um die durch die Restriktionsschnittstellen EcoRI und XhoI modifizierten Aminosäuren (StopEF und L) an die Aminosäuresequenz des gpH₁-Rezeptors anzugleichen Die Sequenzen der Mutageneseprimer sind dem gpH₁-Rezeptor-Gen komplementär. In zwei aufeinanderfolgenden Mutageneseansätzen (1. und 2. Mutation) wurde die Rezeptorchimäre hGnRHR-gpH₁CtShort20 pcDNA3.1(+) [553] fertig synthetisiert. Die Basenfehlpaarungen und die Aminosäureaustausche sind in rot markiert.

2.22 Präparativer Verdau von Plasmid-cDNA oder PCR-Produkten mit Restriktionsendonukleasen

Material	Hersteller
Restriktionsendonukleasen	Thermofisher Scientific
Alkalische Phosphatase, CIAP (1 U µl ⁻¹)	Thermofisher Scientific, # 18009027
Blockheizthermostat Modell HX-1	Peqlab

Enzymname	Erkennungssequenz mit Schnittstelle [/]	Bestellnummer	Einsatz
FastDigest NheI	5'G/CTAGC3' 3'CGATC/G5	FD0974	Linearisierung von Plasmid-cDNA und Regeneration von stumpfen oder klebrigen Enden von PCR-Produkten
FastDigest KpnI	5'GGTAC/C3' 3'CATGG5	FD0524	Linearisierung von Plasmid-cDNA und Regeneration von stumpfen oder klebrigen Enden von PCR-Produkten

FastDigest XhoI	5' C/TCGAG 3' 3' GAGCT/C 5'	FD0694	Linearisierung von Plasmid-cDNA und Regeneration von stumpfen oder klebrigen Enden von PCR-Produkten
FastDigest EcoRI (BstEI)	5' G/AATTC 3' 3' CTTAA/G 5'	FD0274	Linearisierung von Plasmid-cDNA und Regeneration von stumpfen oder klebrigen Enden von PCR-Produkten
FastDigest XbaI	5' T/CTAGA 3' 3' AGATC/T 5'	FD0684	Linearisierung von Plasmid-cDNA und Regeneration von stumpfen oder klebrigen Enden von PCR-Produkten
FastDigest NotI	5' G/CGGCCGC 3' 3' CGCCGGC/G 5'	FD0593	Linearisierung von Plasmid-cDNA und Regeneration von stumpfen oder klebrigen Enden von PCR-Produkten
FastDigest PvuI	5' CGAT/CG 3' 3' GC/TAGC 5'	FD0624	Zur Linearisierung der Plasmid-cDNA für eine Elektroporation
FastDigest DpnI	5' GA^{m6}/TC 3' 3' CT/A^{m6}G 5'	FD1704	Zur Zerstörung der DNA-Matrize bei einer zielgerichteten Mutagenese

Tabelle 2.15: Verwendeten „FastDigest“-Restriktionsendonukleasen Für den präparativen Verdau von Plasmid-cDNA oder PCR-Produkten mit zwei unterschiedlichen „FastDigest“-Restriktionsendonukleasen wurde immer der „FastDigest“ 10-fach Puffer verwendet. Folgende Abkürzungen stehen für A^{m6} = N6-Methyladenin, N = G, A, T oder C.

Enzymname	Bestellnummer	Funktion
Klenow Fragment, LC [2 U µl⁻¹]	EP0054	Auffüllen der klebrigen 5'-Phosphat-Überhängen zu glatten („blunt end“) DNA-Fragmenten. Es besitzt eine 5'-3'-Polymeraseaktivität und eine 3-5-Exonuklease („proof reading“) Aktivität. Eine 5'-3'-Exonukleaseaktivität der DNA-Polymerase I existiert nicht, d. h. 3'OH Überhänge werden nicht zu glatten DNA-Enden abgebaut.
T4 DNA Ligase [5 U µl⁻¹]	EL0014	Bildung einer Phosphodiesterbindung zwischen 5'Phosphat- und 3'OH-Gruppen von stumpfen oder klebrigen DNA-Fragmenten
T4 Polynukleotid-Kinase (T4 PNK)	EK0031	Transfer des γ-Phosphats von ATP zur 5'-OH-Gruppe von doppelsträngiger DNA
Alkalische Phosphatase CIAP (Calf Intestinal Alkaline Phosphatase) [1 U µl⁻¹]	18009027	Dephosphorylierung der Phosphatgruppe am 5'-phosphorylierten Ende der linearisierten Plasmid-cDNA um eine Selbstligation des Plasmids zu verhindern

Tabelle 2.16 Weitere verwendete Enzyme für molekularbiologische Zwecke

Enzymname	Erkennungssequenz mit Schnittstelle []	Bestellnummer	ICL3-Position	sense und antisense Oligonukleotide für das FIAsh-Motiv (CCPGCC) [in 5'-3' Richtung]
FastDigest BsiWI (Pfl23II)	5' CCANNN/NTGG 3' 3' GGTN/NNNNACC 5	FD0854	il3-b	GTA CTA TGTTGTCCGGGGT GTTGT GTAC ACAACACCCCGGACAACA
Cfr42I (SaclI) [10 U µl ⁻¹]	5' CCGC/GG 3' 3' GG/CGCC 5'	ER0201	il3-m	TATGTTGTCCGGGGT GTTGT GCGC GC ACAACACCCCGGACAACA TAGC
FastDigest PmlI (Eco721)	5' CAC/GTG 3' 3' GTG/CAC 5	FD0364	il3-e1	G TGTTGTCCGGGGT GTTGTGG CC ACAACACCCCGGACAACA C

Ajil (BmgBI) [5 U μl^{-1}]	5' CAC/GTC3' 3' GTG/CAG5	ER1941	il3-e2	ATGTTGTCCGGGGTGTGTGG CCACAACACCCCGGACAACAT
Cfr42I (SaclI) [10 U μl^{-1}]	5' CCGC/GG3' 3' GG/CGCC5'	ER0201	ct-b	TTGTTGTCCGGGGTGTGTGCGC GCACAACACCCCGGACAACAAGC

Tabelle 2.17: Restriktionsendonukleasen, die für den Einbau des FIAsH-Bindemotivs (CCPGCC) eingesetzt wurden Für den präparativen Verdau mit zwei unterschiedlichen konventionellen Restriktionsendonukleasen wurde das Kalkulierungsprogramm DoubleDigest Calculator von Thermofisher Scientific verwendet, das die optimalen Reaktionsbedingungen, wie z. B. die Vorgabe des optimalen Reaktionspuffers (jeweils 10-fach Buffer B, Buffer G, Buffer O, Buffer R und das Tango Buffer), wie z. B die Angabe des Mengenverhältnisses beider Restriktionsenzyme zueinander und die zu einsetzende Enzymkonzentration berechnet. Bei dem präparativen Verdau mit „FastDigest“-Restriktionsenzymen wurde nur das 10-fach „FastDigest“ Puffer verwendet. Entsprechend dem „IUPAC nucleotide code“ steht N für alle vier Nukleobasen Guanin, Adenin, Thymin und Cytosin. Die gelb markierte Sequenz kodiert das sechs Aminosäuren lange CCPGCC FIAsH-Bindemotiv. Mit Hilfe der zusätzlichen Nukleotide links und rechts der gelb markierten Sequenz wurden die durch den Restriktionsverdau des gpH₁-Rezeptors entstandenen klebrigen Enden aufgefüllt und außerdem eine Leserasterverschiebung unterbunden. Die Oligonukleotide wurden in einer wässrigen 100 μM (100 pmol μl^{-1}) Lösung von metabion (Planegg, Deutschland) oder von Sigma-Aldrich (Taufkirchen, Deutschland) bezogen.

Alle Restriktionsendonukleasen zum Restriktionsverdau von ringförmiger Plasmid-DNA und von PCR-Produkten wurden von Thermofisher Scientific (Taufkirchen, Deutschland) bezogen. Die optimalen Reaktionsbedingungen für eine optimale Enzymaktivität wurden aus der Tabelle „Reaction Conditions for Restriction Enzymes“ von Thermofisher Scientific mit den Empfehlungen für ein optimales Puffersystem mit 50 - 100%ige Enzymaktivität [U²⁰³], Enzymmenge [U μg^{-1}] cDNA-Menge [μg], optimale Arbeitstemperatur und Hitzeinaktivierungstemperatur für das Enzym entnommen. Für den präparativen Verdau von Plasmid-cDNA oder PCR-Produkt wurde folgendes Pipettierschema standardmäßig angesetzt:

20 μl präparativer Verdau-Ansatz

- 1 μg Plasmid-cDNA oder 10 μl Eluat (aus dem Agarose-Gel extrahiertes PCR-Produkt)
- 1 - 2 μl konventionelles Restriktionsenzym [5 - 10 U μl^{-1}]
- 2 μl 10-fach Puffersystem²⁰⁴
- mit Reinstwasser auf 20 μl auffüllen
- 1 - 16 Stunden Inkubation bei der optimalen Arbeitstemperatur

²⁰³ Eine Enzymeinheit [U] wird definiert als die Menge an Enzym, die 1 μg DNA in einer Stunde in einem 50 μl Ansatz verdaut.

²⁰⁴ Puffersysteme für konventionelle Restriktionsenzyme: Alle verwendeten Restriktionsendonukleasen brauchen divalente freie Magnesiumionen als Kofaktor für die Enzymaktivität. Zugewetztes BSA stabilisiert das Enzym und steigert somit die Enzymaktivität (Meselson und Yuan, 1968). 1X Buffer B: 10 mM Tris-HCl (pH=7,5 bei 37°C), 10 mM MgCl₂, 0,1 mg ml⁻¹ BSA. 1X Buffer G: 10 mM Tris-HCl (pH=7,5 bei 37°C), 10 mM MgCl₂, 50 mM NaCl, 0,1 mg ml⁻¹ BSA. 1X Buffer O: 50 mM Tris-HCl (pH=7,5 bei 37°C), 10 mM MgCl₂, 100 mM NaCl, 0,1 mg ml⁻¹ BSA. 1X Buffer R: 10 mM Tris-HCl (pH=8.5 bei 37°C), 10 mM MgCl₂, 100 mM KCl, 0,1 mg ml⁻¹ BSA. 1X Buffer Tango™: 33 mM Tris-acetat (pH=7.9 bei 37°C), 10 mM Mg(CH₃CO₂)₂, 66 mM KCH₃CO₂, 0,1 mg ml⁻¹ BSA. (siehe URL-Adresse: <https://www.thermofisher.com/de/de/home/brands/thermo-scientific/molecular-biology/thermo-scientific-restriction-mo-difying-enzymes/restriction-enzymes-thermo-scientific/conventional-restriction-enzymes-thermo-scientific.html>)

Bei Verwendung von „FastDigest“-Restriktionsenzymen wurden für den Verdau von 1 µg Plasmid-DNA oder 10 µl eines aus dem Agarose-Gel extrahierten PCR-Produktes jeweils 1 µl „FastDigest“-Restriktionsenzym und 2 µl „FastDigest“-10-fach Puffer mit Reinstwasser auf ein Endvolumen von 20 µl aufgefüllt und auf einem Heizblock für 15 - 30 Minuten bei 37°C inkubiert. Die meisten Enzyme besitzen eine optimale Arbeitstemperatur bei 37°C. Einige Enzyme wie SwaI (Esp3I) brauchen jedoch zusätzlich einen Oxidationsschutz wie Dithiothreitol (DTT²⁰⁵). Alle verwendeten Enzyme wurden bei -20°C gelagert. Die konventionellen Typ II Restriktionsendonukleasen erkennen eine spezifische 4–6–8 bp lange palindromische Sequenz und zerschneiden die DNA selektiv nur in dieser Erkennungssequenz (siehe Tabelle über Restriktionsendonukleasen). Durch den präparativen Verdau wurden glatte („*blunt ends*“) oder klebrige Enden („*sticky ends*“) mit einer 5`Phosphatgruppe und 3`Hydroxygruppe regeneriert, wodurch die doppelsträngige Plasmid-DNA (=Vektor) linearisiert und die klebrigen oder stumpfen Enden des PCR-Produktes (=Insert) freigesetzt wurden. Der komplette Ansatz mit der linearisierten Plasmid-DNA bzw. dem präparativ verdautem PCR-Produkt wurde durch eine anschließende Agarose-Gelelektrophorese für 30 Minuten bei U = 150 V aufgetrennt und die DNA-Banden entsprechend der Größe der DNA-Fragmente aus dem Gel extrahiert. Als nächstes wurden die 5`Phosphatgruppen des linearisierten Vektors dephosphoryliert, um eine Selbstligation des Vektors zu unterbinden. Dafür wurde folgender Ansatz verwendet:

20 µl Dephosphorylierungs-Ansatz

- 10 µl Geleluat des linearisierten Vektors
- 2,5 µl alkalische Phosphatase, aus dem Kälberdarm²⁰⁶
- 2,5 µl 10-fach Dephosphorylierungspuffer [500 mM Tris-HCl (pH=8,5), 1 mM EDTA]
- 5 µl Reinstwasser
- erste Inkubation des Ansatzes für 30 min bei 37°C
- 2,5 µl alkalische Phosphatase, aus dem Kälberdarm
- zweite Inkubation des Ansatzes für 30 min bei 37°C

2.23 Ligation mit der T4-DNA-Ligase

Material	Hersteller
T4 DNA Ligase [5 U µl ⁻¹]	ThermoFisher Scientific, # EL0014
Adenosin-5-triphosphat	Boehringer, # 127531
Thermocycler, peqSTAR 96X	Peqlab

²⁰⁵ 2 µl DDT [20 mM] wurden einem 20 µl-Ansatz als Reduktionsmittel hinzupipettiert. Das DDT schützt freie Thiolgruppen im Enzym vor einer Oxidation zu Disulfidgruppen, wodurch das Enzym stabilisiert wird.

²⁰⁶ Abkürzung CIAP vom Englischen Calf Intestinal Alkaline Phosphatase, Die Enzymaktivität beträgt 0,01 U µl⁻¹.

Bei einer Ligation mit einer T4-DNA-Ligase werden zwei DNA-Fragmente mit Bildung einer Phosphodiesterbindungen zwischen der 5´Phosphat- und der 3´Hydroxygruppen von stumpfen oder klebrigen Enden unter Freisetzung von Pyrophosphat zu einem neuen doppelsträngigen Plasmid-cDNA-Strang zusammengefügt (Weiss et al., 1968). Die T4-DNA-Ligase benötigt für die Ligation 1 mM ATP als Substrat und 10 mM freie Magnesiumionen als Kofaktor. Folgender Pipeittieransatz wurde für die Ligation von einem linearisiertem dephosphoryliertem Vektor (Vektor) und einem präparativ verdautem PCR-Produkt (Insert), standardmäßig angesetzt:

20 µl Ligations-Ansatz:

- 0:1:3:5 µl präparativ-verdautes, aus dem Gel eluiertes PCR-Produkt
- 1 µl linearisierter dephosphorylierter Vektor
- 1 µl T4-DNA-Ligase²⁰⁷
- 2 µl 10-fach T4-DNA-Ligase-Puffer²⁰⁸
- 2 µl ATP [1mM]
- auf 20 µl mit Reistwasser auffüllen
- Inkubation des gesamten Ansatzes für 1 Stunde bei Raumtemperatur

Für die Ligation von glatten, stumpfen DNA-Fragmenten wurde dem Ansatz zusätzlich 2 µl 50 %iges Polyethylenglykol 4000 hinzugegeben. Nach der Inkubation des Ligations-Ansatzes bei Raumtemperatur für 1 Stunde wurde der gesamte Ansatz in kompetente E. coli DH5α-Bakterien transformiert.

Primername	Sequenz [5´-3´]	Schmelztemperatur T _m [°C]	GC-Gehalt [%]	Länge [bp]
CCPGCC-4A-GY-Cerulean sense	TCGAAGGCAGTGTCCGGGGTGTGTGCAGCAGCAGCA	91,9	57,5	36
CCPGCC-4A-GY-Cerulean antisense	TCGATGCTGCTGCTGCTGCAACAACACCCGACAACAGCCAT	91,3	57,5	37
CCPGCC-(AAKAA)₂-GY-Cerulean sense	TCGAAGGCAGTGTCCGGGGTGTGTGCAGCAAAAGCAGCAGCAGCAAAAGCAGCAGGGTAC	95,4	54,6	60
CCPGCC-(AAKAA)₂-GY-Cerulean antisense	TCGAGTACCCTGCTGCTTTTGTCTGCTGCTGCTTTTGTCTGCAACAACACCCGGACAACATGCCAT	95,3	54,6	64

²⁰⁷ T4-DNA-Ligase Lagerungspuffer: 20 mM Tris-HCl (pH = 7,5), 50 mM KCl, 1 mM DTT, 0,1 mM EDTA, 50% (V/V) Glycerol]1 µl 10-fach T4-PNK-Puffer A (500 mM Tris-HCl (pH = 7,6, 25°C), 100 mM MgCl₂, 50 mM DTT, 1 mM Spermidin (siehe URL-Adresse: <https://www.thermofisher.com/order/catalog/product/EL0014#/EL0014>))

²⁰⁸ T4-DNA-Ligase Puffer: 400 mM Tris-HCl, 100 mM MgCl₂, 100 mM DTT, 5 mM ATP (pH = 7,8, 25°C) (siehe URL-Adresse: <https://www.thermofisher.com/order/catalog/product/EL0014#/EL0014>)

CCPGCC-(AAKAA)₇-GY-Cerulean sense	TCGA AAGGCAG TGTCCGGGGTGTGT GCAGCAAAG CAGCAGCAGCAAAGCAGCAGCAGCAAAGCAGC AGCAGCAAAGCAGCAGCAGCAAAGCAGCAGCA GCAAAGCAGCAGCAGCAAAGCAGCAGGGTAC	57,5	53,9	135
CCPGCC-(AAKAA)₇-GY-Cerulean antisense	TCGA GTACCCTGCTGCTTTTGCTGCTGCTGCTTTTG CTGCTGCTGCTTTTGCTGCTGCTGCTTTTGCTGCTG CTGCTTTTGCTGCTGCTGCTTTTGCTGCTGCTGCTT TTGCTGC ACAACACCCCGGACAAC ATGCCAT	57,5	53,9	139

Tabelle 2.18: Sense und antisense Oligonukleotide für FRET-Konstrukte mit α -Helices definierter Länge zwischen dem CCPGCC FIAsH-Bindemotiv und dem türkis fluoreszierendem Protein mCerulean Die gelb markierte Basensequenz kodiert das FIAsH-Bindemotiv und die rot hinterlegte Nucleotidsequenz füllt die klebrigen Enden des XhoI-verdauten Vektors pCerulean-MCS-N1 pcDNA3.1(+) [494] auf (Wang und Feng, 2003; Zagrovic et al., 2005).

Die Oligonukleotide („sense“ und „antisense“) für das CCPGCC FIAsH-Bindemotiv und für die FRET-Abstandskonstrukte (CCPGCC-4A-GY-Cerulean, CCPGCC-(AAKAA)₂-GY-Cerulean, CCPGCC-(AAKAA)₇-GY-Cerulean) wurden in einer 100 μ M (100 pmol μ l⁻¹) wässrigen Lösung von metabion (Planegg, Deutschland) oder von Sigma-Aldrich (Taufkirchen, Deutschland) geliefert und für die Ligation hybridisiert.

50 μ l Hybridisierungsansatz:

- 2 μ l sense Oligonukleotid [100 μ M]
- 2 μ l antisense Oligonukleotid [100 μ M]
- 46 μ l Hybridisierungspuffer²⁰⁹

Hybridisierungsprotokoll in der PCR-Maschine:

- Erhitzen der PCR-Maschine auf 110°C
- 30 Zyklen bestehend aus:
 - Starttemperatur für 1 min 30 s bei T_m = 70°C
 - Hybridisierung für 1 min 30 s bei [(T_m - 1°C) - 1°C]
 (Zyklusende bei T_m = 25°C)
- Abkühlung und Lagerung des Reaktionsansatzes bei 4°C

Nach der Hybridisierung der Oligonukleotide wurden die 5´OH-Enden mit dem Enzym T4-Polynukleotidkinase von (T4-PNK, Thermofisher Scientific) in die natürlich vorkommende 5´Phosphatgruppe umgewandelt, die für die Ligation mit der T4-DNA-Ligase notwendig sind.

10 μ l Phosphorylierungsansatz für Oligonukleotide:

- 2 μ l der hybridisierten Oligonukleotide
- 1 μ l T4-PNK²¹⁰

²⁰⁹ Hybridisierungspuffer: 100 mM KCH₃CO₂, HEPES-KOH (pH = 7,4), 2 mM Mg(CH₃CO₂)₂, 0,1% DMSO

²¹⁰ T4-PNK Lagerungspuffer: 20 mM Tris-HCl (pH = 7.5), 25 mM KCl, 0.1 mM EDTA, 2mM DTT and 50% (V/V) Glycerol (siehe URL-Adresse: <https://www.thermofisher.com/order/catalog/product/EK0031#/EK0031>)

- 1mM ATP
- 1 µl 10-fach T4-PNK-Puffer A²¹¹
- 5 µl Reinstwasser
- Inkubation für 30 min bei 37°C
- Hitzeinaktivierung der T4-PNK für 10 min bei 70°C

Die phosphorylierten Oligonukleotide wurden als nächstes mit dem linearisierten dephosphorylierten Vektor gpH₁R-Cerulean pcDNA3.1(+) [131] für das CCPGCC FIAsh-Bindemotiv bzw. mit dem linearisiertem dephosphoryliertem Vektor pCerulean-MCS-N1 pcDNA3.1(+) [494] für die FRET-Abstandskonstrukte (PG-4A-GY-Cerulean, PG-(AAKAA)₂-GY-Cerulean, PG-(AAKAA)₇-GY-Cerulean) für 1 Stunde bei Raumtemperatur nach folgendem Pipettierschema ligiert.

20 µl Ligations-Ansatz für phosphorylierte Oligonukleotide:

- 0:1:3:5 µl hybridisierte, phosphorylierte Oligonukleotide
- 1 µl linearisierter dephosphorylierter Vektor
- 1 µl T4-DNA-Ligase
- 2 µl 10-fach T4-DNA-Ligase-Puffer
- 2 µl ATP [1mM]
- auf 20 µl mit Reinstwasser auffüllen

Für die Ligation von glatten DNA-Fragmenten wurde zum Ligationsansatz zusätzlich 2 µl 50 % Polyethylenglykol 4000 hinzugegeben. Nach Inkubation bei Raumtemperatur für eine Stunde wurde der gesamte Ligationsansatz in kompetente E. coli DH5α-Bakterien transformiert.

2.24 Fluorimetrisches Nitrat-Nitrit-Assay-Kit

Material	Hersteller
fluorimetrisches Nitrat-Nitrit-Assay-Kit	Cayman Chemical Company, # 780051
Präzisions-Einzelkanalpipetten (10 - 1000 µl)	Peqlab
Präzisions-Mehrkanalpipetten (250 µl)	Peqlab
Gestopfte Pipettenspitzen (10 - 1000 µl)	Sarstedt
Spektralphotometer Mikroplattenleser	FLUOstar Omega, BMG Labtech
Doppelt destilliertes Wasser/ Reinstwasser	Membrane pure, #180-0013
Fusselreie Präzisionstücher	Kimberly Clark KIMTECH SCIENCE Trocken-Reinigungstücher weiß, 210 x 110mm, 280 Stück/Packung

²¹¹ T4-PNK Puffer: 500 mM Tris-HCl (pH = 7.6, 25°C), 100 mM MgCl₂, 50 mM DTT, 1 mM Spermidin (siehe URL-Adresse: <https://www.thermofisher.com/order/catalog/product/EK0031#/EK0031>)

Für die quantitative Bestimmung der intraluminalen NO-Produktion in Perfusatsproben von allen ex vivo untersuchten murinen Mesenterialarterienabschnitten der ersten und zweiten Ordnung (siehe Abschnitt 4.9 mit Abbildung 4.9) wurde ein handelsüblicher fluorimetrischer Nitrat-Nitrit-Assay-Kit von (Cayman Chemical Company, Michigan USA) mit einer Nachweisgrenze von 30 nM-0,2 µM und einem Detektionsbereich von 60 nM-3.85 µM gemäß Herstellerangaben verwendet, das in vivo Metabolite von NO (Nitrat und Nitrit) detektiert. Das Prinzip des fluorimetrischen Nitrat-Nitrit-Assays beruht darauf, dass in einem ersten Reaktionsschritt das komplette in der Perfusatsprobe vorhandene Nitrat durch das Enzym Nitrat-Reduktase in Nitrit umgesetzt wird. Anschließend reagiert das gesamte Nitrit in einem zweiten Reaktionsschritt mit 2,3-Diaminonaphthalen zum fluoreszierenden 1(H)-Naphthotriazol. Aus der Emission des 1(H)-Naphthotriazols bei der Wellenlänge von $\lambda = 430$ nm kann auf die gesamte Nitrat-Nitrit-Konzentration in den murinen Perfusatsproben geschlossen werden.

2.25 Statistik

Der Umfang der Stichproben (n) wurde als ein Säulendiagramm mit dem Mittelwert (mean) und dem Standardfehler bzw. der Standardabweichung des Mittelwerts (SEM = *standard error of the mean*) in Abbildungen im Ergebnisteil (siehe Abschnitt 3) dargestellt. Für die Darstellung des Stichprobenumfangs (n) wurden der Mittelwert und die Varianz bzw. die Streuung des Mittelwerts, die sogenannte Standardabweichung berechnet. Aus den ermittelten Mittelwerten wurde anschließend die Signifikanz mit Hilfe von Statistikttests (du Prel et al., 2010) zwischen zwei bzw. mehr als zwei (> 2) verschiedenen Stichprobensätzen (siehe Tabelle 2.19) berechnet. Der anschaulichkeithalber wurden alle nicht-normalverteilten Daten als Säulen- bzw. Balkendiagramm anstelle von Boxplots mit dem Mittelwert und dem SEM (Mittelwert ± SEM) angegeben.

Datensatz								
Stichprobenumfang	2				> 2			
Verteilung	normal / parametrisch		nicht-normal / nicht-parametrisch		normal / parametrisch		nicht-normal / nicht-parametrisch	
Abhängigkeit	gepaart	ungepaart	gepaart	ungepaart	gepaart	ungepaart	gepaart	ungepaart
Statistiktest	Student t Test	Student t Test	Wilcoxon-Vorzeichen-Rang-Test	Mann-Whitney -U-Test	ANOVA	ANOVA	Friedman-Test	Kruskal-Wallis Test

Tabelle 2.19: Auswahl der Signifikanztests

3 Ergebnisse

3.1 Alle verwendeten H₁-Rezeptorkonstrukte sind funktionell

Als erstes wurde überprüft, ob alle gpH₁R-Konstrukte (il3-b, il3-m il3-e1; il3-e2 und ct-b) in die Zellmembran von HEK293-Zellen inserieren (Membranlokalisation) und eine funktionelle G_{q/11}-Proteinaktivierung durch den endogenen Liganden Histamin hervorrufen. Zu diesem Zweck wurden ratiometrische Kamera-basierte Kalziummessungen mit Fura-2 an Einzelzellen durchgeführt (siehe unter Abschnitt 2.9). Bei allen mit den gpH₁R-Konstrukten transfizierten HEK293-Zellen kam es unter Agonisten-Stimulation mit 100 µM Histamin zu transienten Zunahmen an freien intrazellulären Kalziumkonzentrationen (siehe Abbildung 3.1 A-F), die belegen, dass alle gpH₁R-Konstrukte in die Zellmembran funktionell inserieren und eine für den Kalziumanstieg notwendige Rezeptor-vermittelte Aktivierung von G_{q/11}-Proteinen hervorrufen. Außerdem wurden untransfizierte HEK293-Zellen auf eine mechanische Stimulation mit hypoosmotischer Lösung (Hypo, 150 mOsm kg⁻¹) überprüft. Untransfizierte HEK293-Zellen reagierten auf mechanische Stimulation mit hypoosmotischer Lösung mit keinen transienten Zunahmen des freien intrazellulären Kalziums (siehe Abbildung 3.3 A). Wohingegen mit dem Wildtyp gpH₁-Rezeptor transient transfizierte HEK293-Zellen als Positivkontrolle signifikante Kalziumzunahmen zeigten (siehe Abbildung 3.3 B). Eine Membranlokalisation der gpH₁R-Konstrukte konnte auch mittels konfokaler Lasermikroskopie optisch gezeigt werden (Abbildung 3.2 A-J).

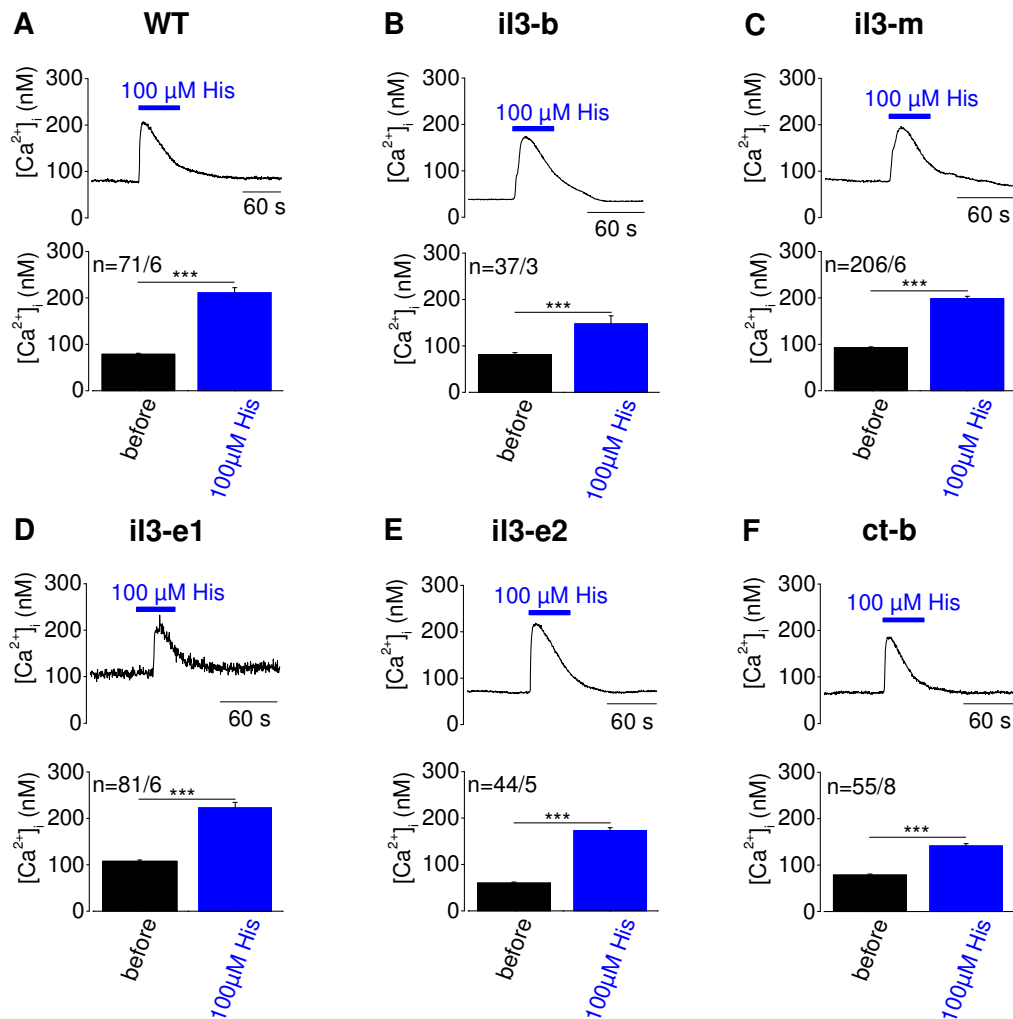


Abbildung 3.1: Alle gpH₁R-Konstrukte verursachen transiente Kalziumzunahmen auf Agonisten-Stimulation mit Histamin (A-F) Ratiometrische Kalziummessungen von HEK293-Zellen, die jeweils mit 1 µg Plasmid-DNA der oben angegebenen gpH₁R-Konstrukten (gpH₁R-Cerulean pcDNA3.1(+)) [131] = Wildtyp = WT, gpH₁R-PG1660-Cerulean pcDNA3.1(+)) [269] = il3-b, gpH₁R-PG1783-Cerulean pcDNA3.1(+)) [263] = il3-m, gpH₁R-PG2158-Cerulean pcDNA3.1(+)) [173] = il3-e1; gpH₁R-PG2194-il3-e2-Cerulean pcDNA3.1(+)) [463] = il3-e2 und gpH₁R-PG1413-ct-b-Cerulean pcDNA3.1(+)) [456] = ct-b für 24 Stunden transient transfiziert und für 10 Minuten mit 5 µM Fura-2-AM beladen wurden. Die Applikation von 100 µM Histamin für jeweils eine Minute führte zu signifikanten transienten Kalziumzunahmen. Für jedes gpH₁R-Konstrukt wird eine repräsentative Spur der intrazellulären Kalziumkonzentration [Ca²⁺]_i (oben) mit der angegebenen Applikation von 100 µM Histamin (His, blauer Balken über der Kalziumspur) gezeigt. Die Zusammenfassung aller Kalziummessungen unterschiedlicher gpH₁R-Konstrukte wird jeweils unter der repräsentativen Kalziumspur als Säulendiagramm dargestellt (unten). Die schwarzen Säulen zeigen die basale Kalziumkonzentration vor der Stimulation mit Histamin und die blauen Balken die maximale Kalziumerhöhung [Ca²⁺]_i während der Stimulation mit 100 µM Histamin. Alle HEK293-Zellen mit Ausgangskalziumkonzentrationen von [Ca²⁺]_i ≥ 150 nM und maximalen Kalziumerhöhungen während einer Histaminstimulation [Ca²⁺]_i ≤ 120 nM [Ca²⁺]_i wurden für die Gesamtauswertungen nicht mitberücksichtigt. Die Zahlen neben der Ordinate geben die Anzahl der gemessenen HEK293-Zellen von verschiedenen transienten Transfektionen auf 24 mm Glasplättchen aus mindestens drei Experimentiertagen an. Die Signifikanz wurde zwischen der Erhöhung der Kalziumkonzentration unter Histamin zur basalen Kalziumkonzentration mit dem Wilcoxon-Vorzeichen-Rang-Test getestet. (Mittelwert ± SEM, ***P < 0,001). Die Zahlen in eckiger Klammer repräsentieren die Plasmidnummer für die im Labor zur Verfügung stehende Plasmid-DNA (siehe Kapitel 2.3).

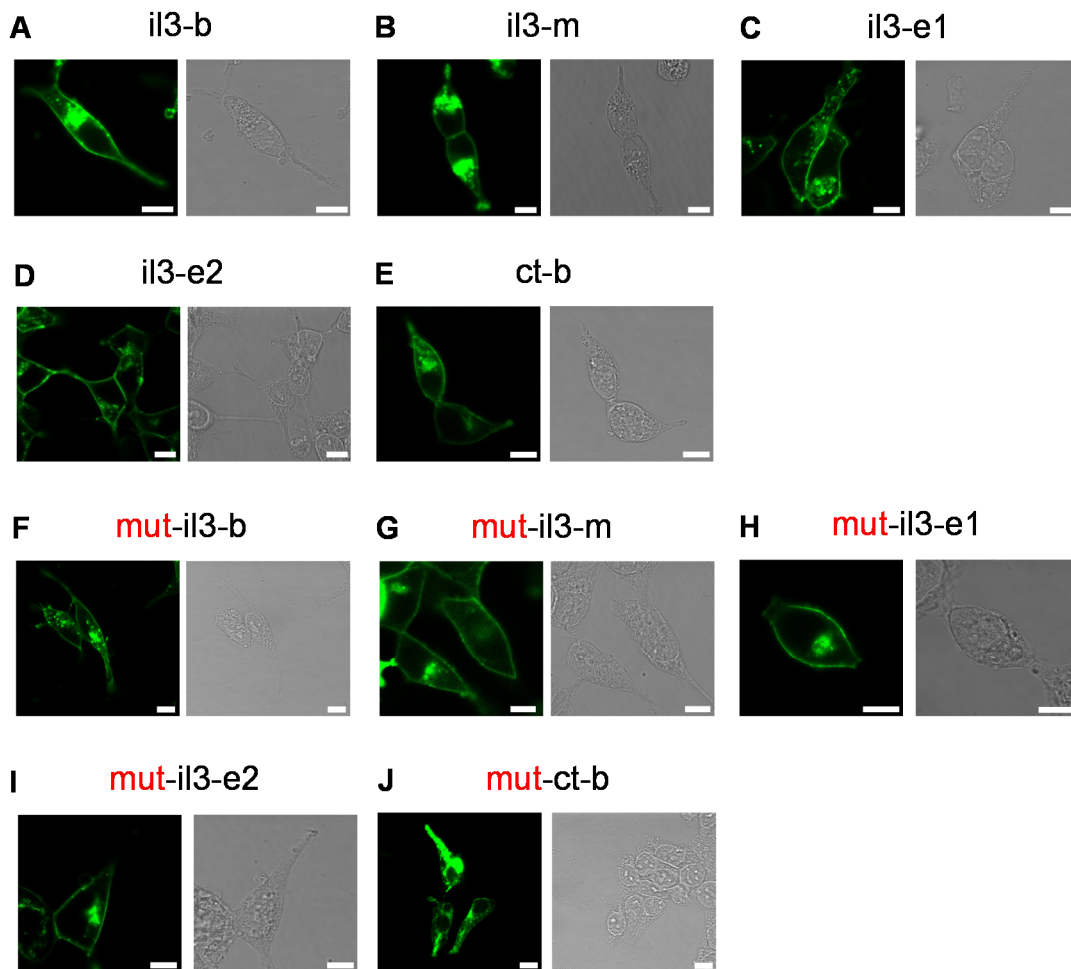


Abbildung 3.2: Membranlokalisierung der gpH₁R-Konstrukte Repräsentative Konfokalbilder (A-J) von HEK293-Zellen, die stabil eines der angegebenen gpH₁R-Konstrukte exprimieren und eine Membranlokalisierung der gpH₁R-Konstrukte durch die Fluoreszenz des türkis fluoreszierenden Proteins Cerulean (Membranfärbung links) und die Zelle im Durchlicht (rechts) zeigen. Weiße Maßstabsbalken (rechts unten) geben einen Maßstab von 10 μm an. Für die Kennzeichnung „mut“ siehe Kapitel 3.5.

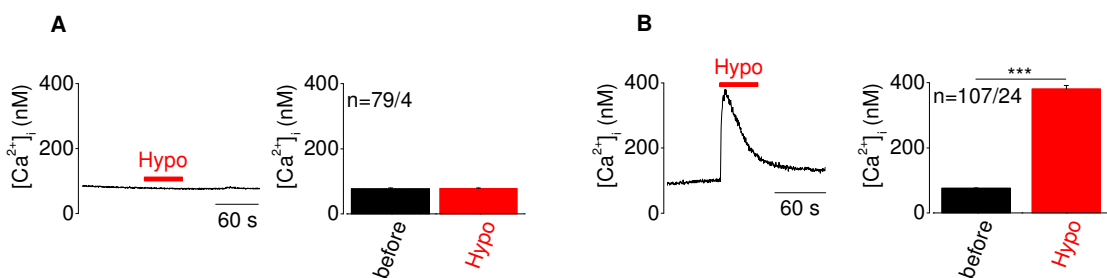


Abbildung 3.3: Nicht-transfizierte HEK293-Zellen reagieren nicht auf mechanische Stimulation mit hypoosmotischer Lösung Ratiometrische Kamera-basierte Kalziummessungen mit Fura-2 an untransfizierten HEK293-Zellen lieferten keine Kalziumerhöhungen unter mechanischer Stimulation für eine Minute (roter Balken) mit hypoosmotischer Lösung (Hypo, 150 mOsm kg^{-1}) (A). Wohingegen für 24 Stunden transient transfizierte HEK293-Zellen mit 1 μg gpH₁ pcDNA3.1/V5-His-TOPO [72] und 0,1 μg pEYFP-N1 [234] signifikante Kalziumzunahmen zeigten (B). Es werden jeweils repräsentative Kalziumspuren $[\text{Ca}^{2+}]_i$ (jeweils links) (Hypo, roter Balken über der Kalziumspur) angezeigt. Die Zusammenfassung der Kalziummessungen wird als Säulendiagramm dargestellt (rechts). Die schwarzen Säulen zeigen die basale Kalziumkonzentration vor der Stimulation mit hypoosmotischer Lösung. Wohingegen die roten Säulen die maximale Kalziumzunahme $[\text{Ca}^{2+}]_i$ während der mechanischen Stimulation mit hypoosmotischer Lösung

zeigen. Alle HEK293-Zellen mit Ausgangskalziumpkonzentrationen von $[Ca^{2+}]_i \geq 150$ nm und maximalen Kalziuserhöhungen während einer Histaminstimulation $[Ca^{2+}]_i \leq 120$ nm $[Ca^{2+}]_i$ wurden für die Auswertungen nicht mitberücksichtigt. Die Zahlen neben der Ordinate geben die Anzahl der gemessenen HEK293-Zellen von verschiedenen Transfektionen auf 24 mm Glasplättchen aus mindestens drei Experimentiertagen an. Die Signifikanz wurde zwischen der Erhöhung der Kalziumpkonzentration unter hypoosmotischer Stimulation zur basalen Kalziumpkonzentration mit dem Wilcoxon-Vorzeichen-Rang-Test getestet (Mittelwert \pm SEM, ***P < 0,001). Die Zahlen in eckiger Klammer repräsentieren die Plasmidnummer für die im Labor zur Verfügung stehende Plasmid-DNA (siehe Kapitel 2.3).

3.2 Der mechanosensitive H₁-Rezeptor nimmt einen mechanisch induzierten Rezeptorzustand an

Um herauszufinden, ob die Agonistenstimulation und die mechanische Stimulation des gpH₁-Rezeptors unterschiedliche Rezeptorzustände hervorrufen, wurden dynamische intramolekulare FRET-Experimente (siehe Abschnitte 2.6, 2.8 und 2.10.2) durchgeführt. Interessanterweise wurden durch die mechanische Stimulation mit einer hypoosmotischen Lösung, die eine hypoosmotische Membrandehnung bewirkt, signifikant stärkere Abnahmen des FRET-Signals mit größeren Amplituden als unter Agonistenstimulation mit Histamin in seiner maximal wirksamen Konzentration beobachtet (siehe Abbildung 3.4 A und B), die unabhängig von der Reihenfolge der Anwendung ist (siehe Abbildung 3.5 A und B). Im Gegensatz zu allen anderen gpH₁R-Konstrukten (il3-b, il3-m, il3-e1 und il3-e2) zeigte insbesondere das ct-b gpH₁R-Konstrukt keine Agonisten induzierten FRET-Signaländerungen (Abbildung 3.5 A). Die mechanische Stimulation von FIASH-markierten gpH₁R-Konstrukten führte bei maximal wirksamen Konzentrationen unabhängig von der Reihenfolge der Stimulusanwendung zu einer signifikant stärkeren Reduktion der FRET-Signale als mit Histaminstimulation (Abbildung 3.4 B und 3.5 B). Aus der Zusammenfassung der dynamischen FRET-Messungen geht hervor, dass der gpH₁-Rezeptor stark mechanosensitiv ist und höchst wahrscheinlich unterschiedliche aktive Rezeptorzustände bei einer Agonisten- bzw. bei einer mechanischen Stimulation annimmt. Es wird vermutet, dass die mechanische Rezeptoraktivierung größtenteils zu einer Bewegung der TM7 führt.

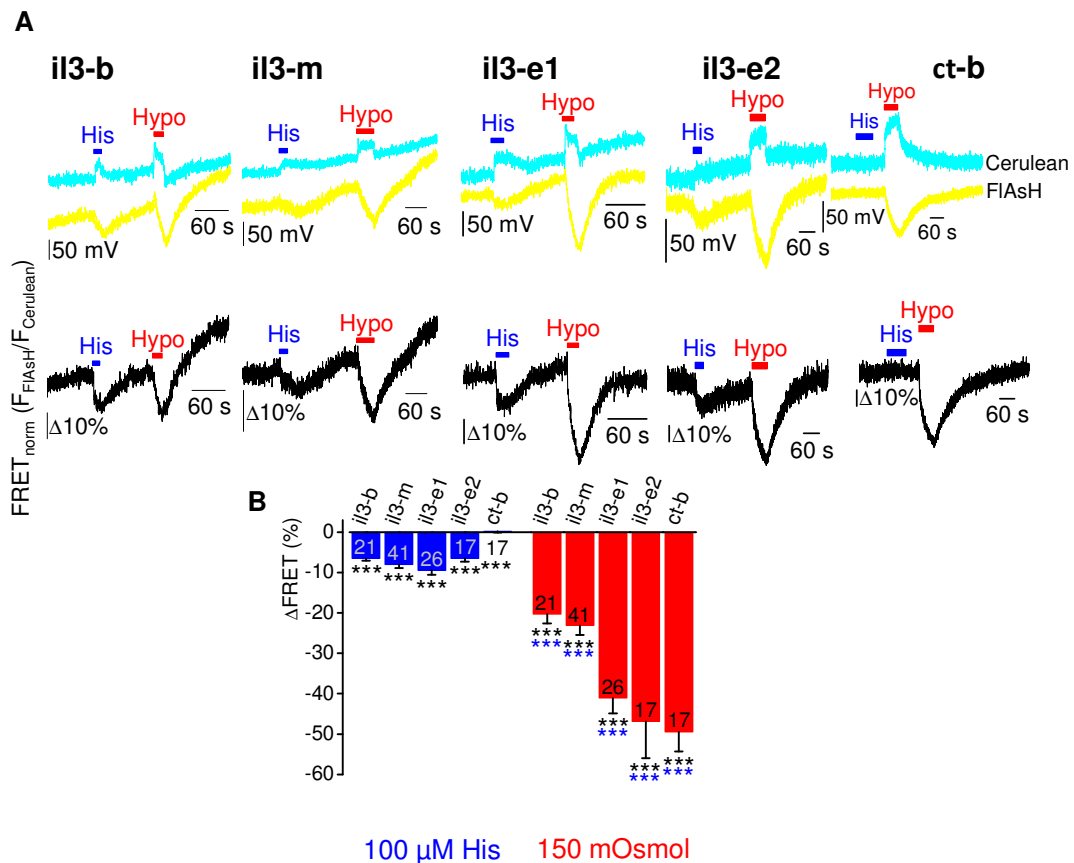


Abbildung 3.4: Alle gpH₁R-Konstrukte sind mechanosensitiv und nehmen bei der mechanischen Stimulation eine der Agonisten induzierten unterschiedlichen aktiven Rezeptorzustand an
 Dynamische FRET-Messungen von FIAsh angefärbten monoklonalen HEK293-Zellen mit stabil exprimierten gpH₁R-Konstrukten (il3-b, il3-m, il3-e1, il3-e2 und ct-b). Wie oben gezeigt wird, kommt es während einer Applikation von 100 μ M Histamin (His, blauer Balken) in allen vier gpH₁R-Konstrukten (il3-b, il3-m, il3-e1 und il3-e2) mit Ausnahme des ct-b-Konstruktes zu einer Zunahme des Cerulean Fluoreszenzsignals (türkise Fluoreszenzspur) und zeitgleich, simultan zu einer Abnahme des FIAsh Fluoreszenzsignals (gelbe Fluoreszenzspur), das in einer Abnahme des FRET-Signals (schwarze Spur) resultiert. Das bedeutet, dass sich die beiden Fluorochrome FlAsH und Cerulean während einer Agonistenstimulation mit Histamin voneinander wegbewegen. Als mechanischer Stimulus wurde eine hypoosmotische Lösung (150 mOsm kg⁻¹) appliziert (Hypo, roter Balken) (A). Die Zusammenfassung der dynamischen FRET-Messungen wird als Säulen-diagramm dargestellt. Histamin induzierte FRET-Änderungen werden in blau, hypoosmotisch induzierte FRET-Änderungen in rot angezeigt. Zahlen in den Säulen geben die Anzahl der gemessenen Zellen auf 30 mm Glasplättchen von mindestens 3 Experimentiertagen an. Es wurden Signifikanzen zwischen den FRET-Signalen der einzelnen gpH₁R-Konstrukte bei einer Histaminstimulation oder bei einer mechanischen Stimulation mit dem *Kruskal-Wallis Test berechnet (Mittelwert \pm SEM, ***P < 0.001). Signifikante Unterschiede wurden zwischen den FRET-Abnahmen unter Histaminstimulation und mechanischer Stimulation mit dem *Wilcoxon-Vorzeichen-Rangtest bestimmt (Mittelwert \pm SEM, ***P < 0.001) (B).

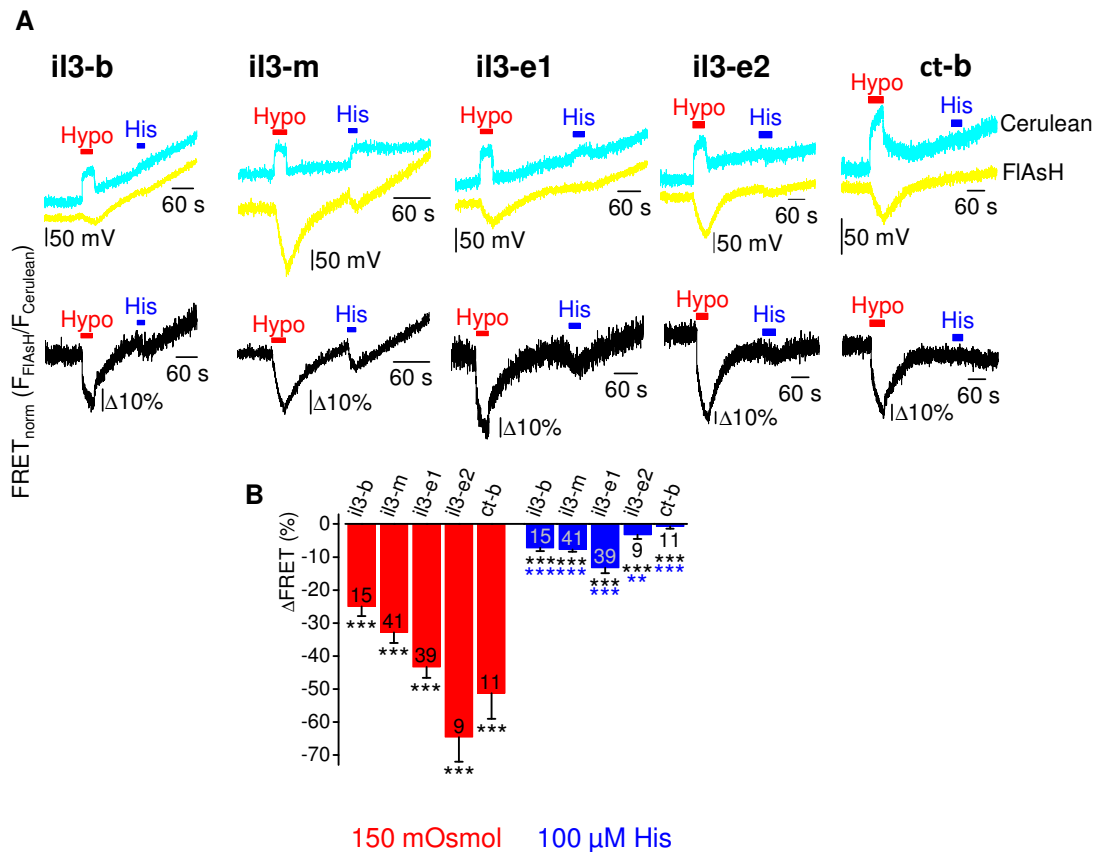


Abbildung 3.5: Aktivierte Rezeptorkonformationsänderungen bei umgekehrter Stimulationsreihenfolge Dynamische FRET-Messungen von FIAsH markierten, monoklonalen HEK293-Zellen mit stabil exprimierenden gpH₁R-Konstrukten (il3-b, il3-m, il3-e1, il3-e2 und ct-b). Als erstes wurde eine hypoosmotische Lösung mit 150 mOsm kg⁻¹ (Hypo, roter Balken) appliziert, das bei allen gpH₁R-Konstrukten zu einer Zunahme des Cerulean Fluoreszenzsignals (türkise Fluoreszenzspur) und zeitgleich, simultan zu einer Abnahme des FIAsH Fluoreszenzsignals (gelbe Fluoreszenzspur) führt und in einer Abnahme des FRET-Signals (schwarze Spur) resultiert. Die Applikation von 100 μM Histamin führte bei allen gpH₁R-Konstrukten außer dem ct-b-Konstrukt zu Abnahmen des FRET-Signals (A). Die FRET-Messungen wurden in einem Säulendiagramm zusammengefasst. Hypoosmotisch induzierte FRET-Signaländerungen werden in rot und Histamin induzierte FRET-Signaländerungen werden in blau angezeigt. Zahlen an den Säulen geben die Anzahl der gemessenen Zellen auf 30 mm Glasplättchen von mindestens 3 Experimentiertagen an. Es wurden Signifikanzen zwischen den FRET-Signaländerungen der einzelnen gpH₁R-Konstrukte bei einer mechanischen Stimulation oder bei einer Histaminstimulation mit dem *Kruskal-Wallis Test berechnet (Mittelwert ± SEM, ***P < 0.001). Signifikante Unterschiede wurden zwischen den FRET-Abnahmen unter Hypo und Histamin mit dem *Wilcoxon-Vorzeichen-Rangtest bestimmt (Mittelwert ± SEM, ***P < 0.001) (B).

3.3 Intrinsische Mechanosensitivität des H₁-Rezeptors

Ein generelles Kriterium für mechanosensitive integrale Membranproteine ist, dass sich die Stärke des mechanischen Reizes in der Größe der Proteinaktivierung widerspiegeln sollte. Um die intrinsische Mechanosensitivität des gpH₁-Rezeptors zu untersuchen, wurden fünf unterschiedliche hypoosmolare Lösungen mit absteigender Osmolarität (275, 250, 225, 200 und 150 mOsm kg⁻¹) mit Hilfe der FRET-Photometrie (siehe Abschnitt 2.10.2) verwendet. Durch die 150 mOsm kg⁻¹ Badlösung wird ein stärkerer mechanosensitiver Stimulus als durch die 275 mOsm kg⁻¹ Badlösung ausgelöst. Bei der Untersuchung des il3-b-Konstrukts wurde eine Korrelation zwischen der Zunahme der

mechanischen Stimulation mit hypoosmolaren Lösungen abnehmender Osmolarität und der schrittweisen, graduellen Abnahme der FRET-Signale beobachtet (siehe Abbildung 3.6 A und B). Das bedeutet, dass die abnehmende Osmolarität der Badlösungen eine stärkere mechanische gpH₁-Rezeptoraktivierung hervorruft. Diese Ergebnisse zeigen, dass der gpH₁-Rezeptor mechanosensitiv ist und durch die Korrelation der Amplituden der mechanisch induzierten FRET-Signale mit der Stärke des mechanischen Stimulus das Kriterium für intrinsisch mechanosensitive Proteine für den gpH₁-Rezeptor erfüllt wird.

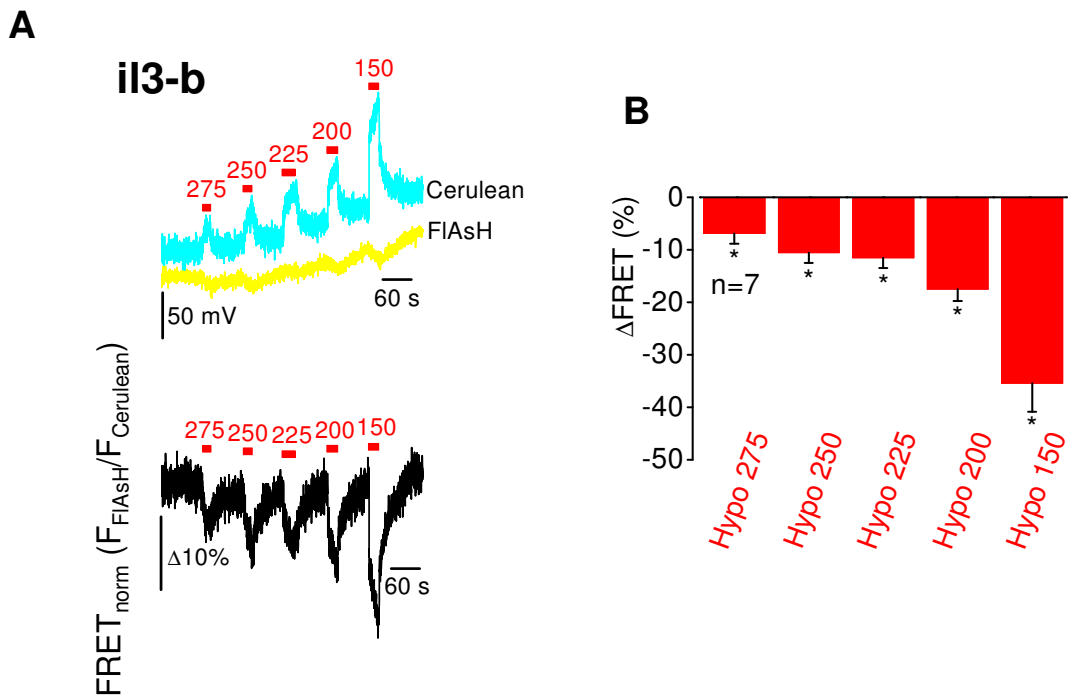


Abbildung 3.6: Zusammenhang der mechanisch induzierten FRET-Signale mit der Stärke des mechanischen Stimulus Repräsentative Fluoreszenzspuren (türkis, Cerulean und gelb, FIAsh) und davon abgeleitete mechanisch induzierte Abnahmen des FRET-Signals des il3-b-gpH₁R-Konstrukts bei Anwendung verschiedener hypoosmotischer Lösungen mit 275, 250, 225, 200 und 150 mOsm kg⁻¹. Zusammenfassung der osmotisch induzierten FRET-Signalabnahmen bei Anwendung von Lösungen mit den angegebenen Osmolaritäten (Hypo 275, Hypo 250, Hypo 225, Hypo 200, Hypo 150, rote Säulen) Zahlen neben der Ordinate geben die Anzahl der gemessenen Zellen auf 30 mm Glasplättchen von mindestens 3 Experimentiertagen an (A). Signifikante Unterschiede wurden mit dem Wilcoxon-Vorzeichen-Rang-Test berechnet (Mittelwert ± SEM, *P < 0,05).

3.4 Komplett Inhibition der mechanischen Rezeptoraktivierung durch einen spezifischen G_{αq/11}-Protein Inhibitor

Um zu klären, ob die mechanische Aktivierung des gpH₁-Rezeptors eine G_{q/11}-Protein Aktivierung auslöst, wurden HEK293-Zellen mit den gpH₁R-Konstrukten (il3-b, il3-m, il3-e1) mit dem selektiven G_{αq/11}-Protein Inhibitor YM-254890 behandelt. Der selektive G_{αq/11}-Inhibitor YM-254890 hemmt spezifisch den GDP/GTP-Austausch an der G_α-Untereinheit des G_{q/11}-Proteins (Nishimura et al., 2010; Kamato et al., 2016), indem er die Freisetzung von GDP von der G_α-Untereinheit unterdrückt. Die ratiometrischen

Kamera-basierten Kalziummessungen mit Fura-2 (siehe Abschnitt 2.9) zeigen, dass in allen drei gpH₁R-Konstrukten (il3-b, il3-m, il3-e1) transiente Kalziumzunahmen sowohl unter 100 μ M Histamin als auch unter hypoosmotischer Lösung (150 mOsm kg⁻¹) durch den spezifischen G_{q/11}-Inhibitor YM 254890 (100 nM) unterdrückt werden (siehe Abbildung 3.7 A und B). Das bedeutet, dass die mechanische Rezeptoraktivierung ein G_{q/11}-Protein vermitteltes Effektorsystem aktiviert.

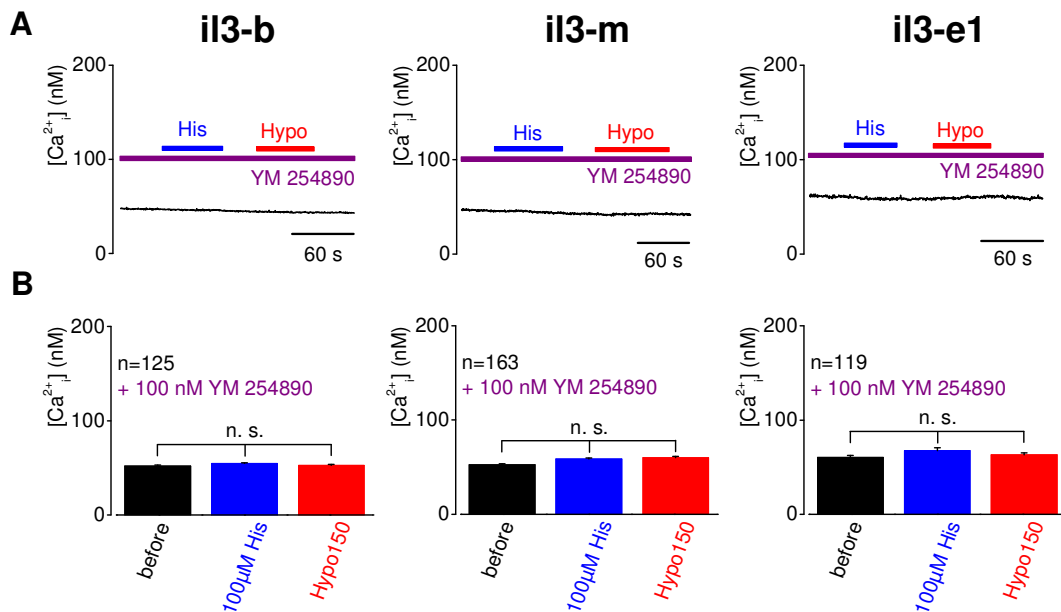


Abbildung 3.7: Der spezifische G_{q/11}-Inhibitor YM 254890 verhindert mechanisch induzierte transiente Kalziumzunahmen Stabile monoklonale HEK293-Zellen mit den gpH₁R-Konstrukten (il3-b, il3-m und il3-e1) wurden für jeweils für 20 Minuten mit 5 μ M Fura-2-AM und 100 nM des spezifischen G_{q/11}-Inhibitors YM 254890 beladen und die Kalziumkonzentration ratiometrisch gemessen. Wie gezeigt wird, kommt es während einer 100 μ M Histaminstimulation (His, blaue Balken) und einer hypoosmotischen Membrandehnung durch eine hypoosmotische Lösung (150 mOsm kg⁻¹, Hypo, roter Balken) zu keiner Kalziumzunahme unter dem spezifische G_{q/11}-Inhibitor 100 nM YM 254890. Für die drei stabilen monoklonalen Zelllinien ist eine repräsentative Spur der intrazellulären Kalziumkonzentration [Ca²⁺]_i (oben) mit der angegebenen Applikation von 100 μ M Histamin (His, blauer Balken) und hypotonischer Lösung (Hypo, roter Balken) gezeigt (A). Die Zusammenfassung aller Kalziummessungen der HEK293-Zellen mit den gpH₁R-Konstrukten (il3-b, il3-m und il3-e1) wird als Säulendiagramm dargestellt (unten). Die schwarzen Säulen geben die basale Kalziumkonzentration vor der Stimulation mit Histamin, die blauen Säulen die maximale Kalziumkonzentration [Ca²⁺]_i während der Histaminstimulation (100 μ M His) und die roten Säulen die mechanische Stimulation mit einer hypoosmolaren Lösung (150 mOsm kg⁻¹, Hypo 150) wieder. Alle HEK293-Zellen mit Ausgangskalziumkonzentrationen von [Ca²⁺]_i \geq 150 nm wurden für die Gesamtauswertung nicht mitberücksichtigt. Die Zahlen neben der Ordinate geben die Anzahl der gemessenen HEK293-Zellen auf 24 mm Glasplättchen aus mindestens 3 Experimentiertagen an. Die Signifikanz wurde zwischen den Zunahmen der Kalziumkonzentrationen unter Histamin und mechanischer Stimulation mit hypoosmotischer Lösung zur basalen Kalziumkonzentration mit dem Wilcoxon-Vorzeichen-Rang-Test getestet (Mittelwert \pm SEM, *P < 0,05).

3.5 Die mechanische Rezeptoraktivierung ist unabhängig von der Histaminbindung bzw. von der orthosterischen Ligandenbindetasche

Um zu klären, ob die mechanische Rezeptoraktivierung des gpH₁-Rezeptors unabhängig von der Agonistenbindung ist, wurden gpH₁R-Konstrukte verwendet, die durch den Austausch zweier Aminosäuren in der orthosterischen Ligandenbindetasche ihre Fähigkeit verloren haben, den endogenen Liganden Histamin zu binden. Dafür wurde das Aspartat in der TM3, an der Aminosäureposition 116, und das Phenylalanin in der TM6, an der Aminosäureposition 433, jeweils mit Hilfe der zielgerichteten Mutagenese²¹² (siehe Abschnitt 2.21) zu Alanin ausgetauscht. Die Ergebnisse der FRET-Messungen zeigen, dass die gpH₁R-Mutante nicht auf die Agonistenstimulation mit Histamin reagiert, aber immer noch mechanosensitiv ist (siehe Abbildung 3.8 A). Alle transfizierten HEK293-Zellen mit gpH₁R-Konstrukten mit einer mutierten orthosterischen Ligandenbindetasche (**mut-il3-b**, **mut-il3-m**, **mut-il3-e1**, **mut-il3-e2** und **mut-ct-b**) mit Ausnahme des **mut-il3-e2** gpH₁R-Konstrukts zeigen keine Abnahmen des FRET-Signals bei Applikation von 100 µM Histaminlösung. Beim **mut-il3-e2** gpH₁R-Konstrukt konnte nur eine signifikante Reduktion des FRET-Signals bei Histaminstimulation festgestellt werden (siehe Abbildung 3.8 A und B). Wohingegen die mechanische Stimulation mit hypoosmolarer Lösung (150 mOsm kg⁻¹) bei allen fünf mutierten gpH₁R-Konstrukten zur Abnahme des FRET-Signals führt (siehe Abbildung 3.8 A). Unter mechanischer Stimulation konnten mit Ausnahme des **mut-il3-e2** gpH₁R-Konstrukts keine signifikanten Unterschiede der mechanisch induzierten FRET-Signale zum Wildtyp-Rezeptor beobachtet werden. Die mechanisch induzierten Abnahmen des FRET-Signals entsprechen denen des Wildtyp-Rezeptors (siehe Abbildung 3.8 C). Diese FRET-Ergebnisse lassen vermuten, dass die mechanisch induzierte H₁R-Aktivierung unabhängig von der Agonistenbindung erfolgt.

²¹² Als DNA-Matrize für die zielgerichtete Mutagenese dienten die Plasmid-DNA der il3-b, il3-m, il3-e1, il3-e2 und ct-b gpH₁R-Konstrukte folgender Expressionsvektoren: gpH₁R-PG1660-Cerulean pcDNA3.1(+) [269] = il3-b, gpH₁R-PG1783-Cerulean pcDNA3.1(+) [263] = il3-m, gpH₁R-PG2158-Cerulean pcDNA3.1(+) [173] = il3-e1; gpH₁R-PG2194-il3-e2-Cerulean pcDNA3.1(+) [463] = il3-e2 und gpH₁R-PG1413-ct-b-Cerulean pcDNA3.1(+) [456] = ct-b.

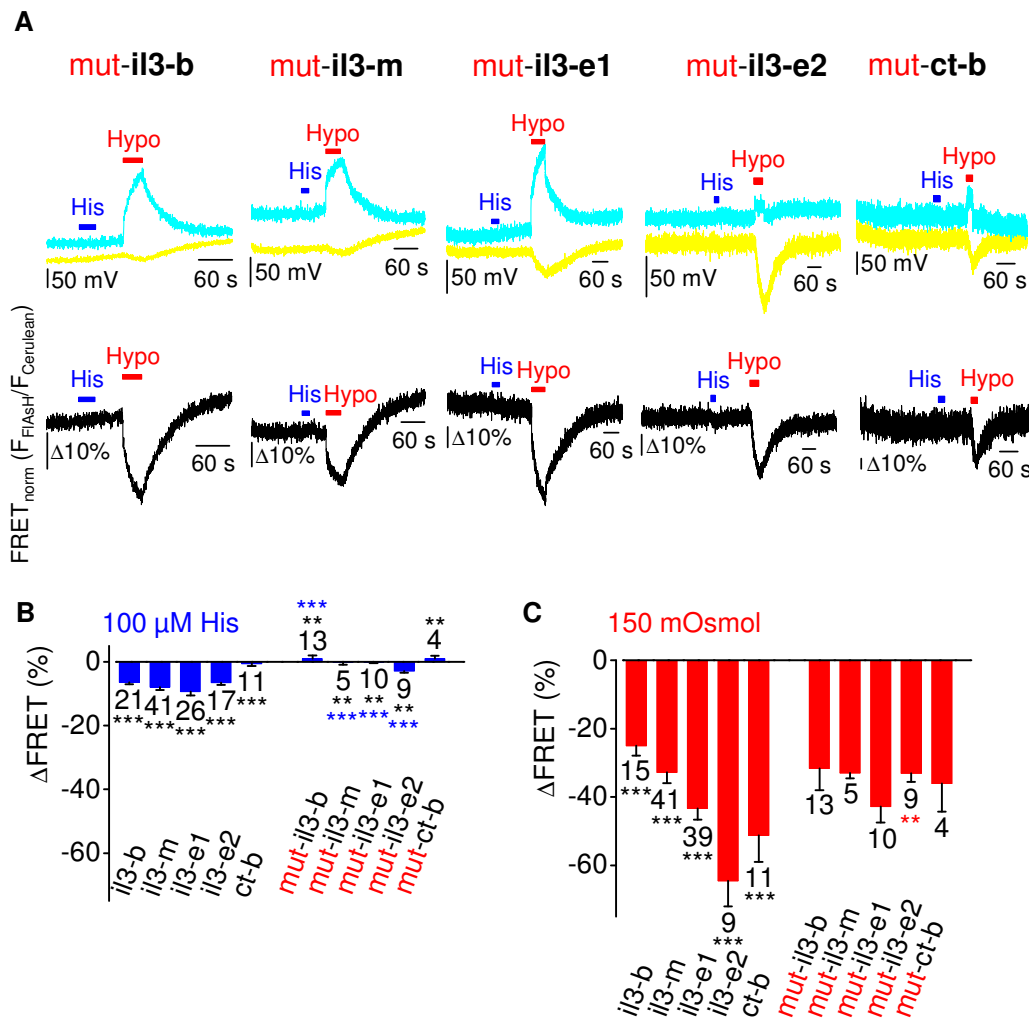
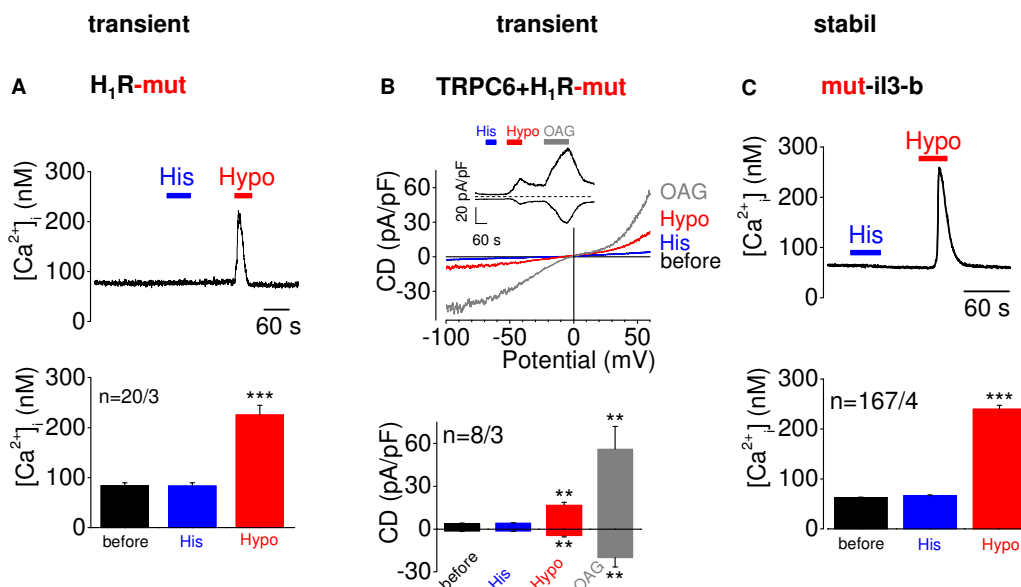


Abbildung 3.8: Die mechanische Aktivierung des gpH₁-Rezeptors erfolgt unabhängig von der Histaminbindung in der orthosterische Ligandenbindetasche Dynamische FRET-Messungen von FIAsh markierten, monoklonalen HEK293-Zellen mit stabil exprimierenden gpH₁R-Konstrukten (*mut-il3-b*, *mut-il3-m*, *mut-il3-e1*, *mut-il3-e2* und *mut-ct-b*). Wie gezeigt wird, kommt es während einer 100 μM Histaminstimulation (His, blauer Balken) in folgenden gpH₁R-Konstrukten (*mut-il3-b*, *mut-il3-m*, *mut-il3-e1* und *mut-ct-b*) mit Ausnahme des *mut-il3-e2* gpH₁R-Konstrukts zu keiner Änderung der Fluoreszenzspuren beider Fluorochrome (FIAsh, gelbe Fluoreszenzspur und Cerulean, türkise Fluoreszenzspur), womit keine Abnahme des FRET-Signals (schwarze Fluoreszenzspur) detektiert wird. Wohingegen die Applikation einer 150 mOsm kg⁻¹ hypoosmolaren Lösung (Hypo, roter Balken) bei allen fünf gpH₁R-Konstrukten (*mut-il3-b*, *mut-il3-m*, *mut-il3-e1*, *mut-il3-e2* und *mut-ct-b*) zu einer Abnahme des FRET-Signals führt, das wiederum bedeutet, dass sich die beiden Fluorochrome während einer mechanischen Aktivierung des gpH₁R voneinander wegbewegen (A). Die Zusammenfassung der dynamischen FRET-Messungen wird als Säulendiagramm dargestellt. Histamin induzierte FRET-Änderungen werden in blau, hypoosmotisch induzierte FRET-Änderungen in rot angezeigt. Zahlen an den Säulen geben die Anzahl der gemessenen Zellen auf 30 mm Glasplättchen von mindestens 4 Experimentiertagen an. Es wurden Signifikanzen zwischen den FRET-Signalen der einzelnen *il3-b*, *il3-m*, *il3-e1*, *il3-e2* und *ct-b* gpH₁R-Wildtyp-Konstrukten und den in der orthosterischen Ligandenbindetasche mutierten *mut-il3-b*, *mut-il3-m*, *mut-il3-e1*, *mut-il3-e2* und *mut-ct-b* gpH₁R-Konstrukten sowohl während einer Histaminstimulation (B) als auch bei einer mechanischen Stimulation mit hyposomolarer Lösung (150 mOsm kg⁻¹) (C) mit dem *Kruskal-Wallis Test berechnet (Mittelwert ± SEM, **P < 0.01, ***P < 0.001). Signifikante Unterschiede wurden auch zwischen den FRET-Signalabnahmen unter Histaminstimulation und mechanischer Stimulation mit dem Wilcoxon-Vorzeichen-Rangtest bestimmt (Mittelwert ± SEM, **P < 0.01, ***P < 0.001) (B, C).

Zusätzlich wurde der Verlust der Agonistenbindestelle für Histamin mit ratiometrischen Kalziummessungen mit Fura-2 (siehe Abbildung 3.9 A und C) und elektrophysiologischer Datenerhebung (siehe Abbildung 3.9 B) verifiziert. Vorläufige ratiometrische Kalziummessungen mit Fura-2 (siehe Abbildung 3.9 A) von Frau Dr. med. vet. Michaela Winter in der Arbeitsgruppe AG Mederos y Schnitzler am Walther-Straub-Institut in München konnten belegen, dass der in der orthosterischen Ligandenbindetasche mutierte gpH₁R-Wildtyprezeptor²¹³ keine Kalziumzunahmen unter 100 µM Histamin, aber eine deutliche Kalziumerhöhung in Gegenwart von hypoosmolarer Lösung (250 mOsm kg⁻¹) zeigte. Für die elektrophysiologischen Experimente wurden HEK293T-Zellen mit dem klassischen DAG-sensitiven, nicht Kalzium-selektivem TRPC6-Kationenkanal und der gpH₁-Rezeptormutante²¹⁴ transient transfiziert und in der Ganzzellkonfiguration („*whole-cell-configuration*“) der „Patch-Clamp“ Technik in der Spannungsklemme („*voltage-clamp*“) (Hamill et al., 1981) gemessen (siehe Abbildung 3.9 B). Wie erwartet, wurden keine Stromzunahmen unter Agonistenstimulation mit 100 µM Histamin aufgenommen. Die mechanische Aktivierung dagegen mit hypoosmolarer Lösung (250 mOsm kg⁻¹) führte zu signifikanten einwärts- und auswärtsgerichteten Strömen. Als Positivkontrolle wurde OAG²¹⁵ als Zell-permeables DAG²¹⁶ Analogon eingewaschen, was zu maximalen TRPC6 vermittelten einwärts- und auswärtsgerichteten Strömen führte. Die elektrophysiologischen Messungen in der Ganzzelleitung wurden von Frau PD Dr. Ursula Storch am Walther-Straub-Institut in München durchgeführt und ausgewertet. Durch diese Ergebnisse konnte gezeigt werden, dass die mechanische Aktivierung des gpH₁-Rezeptors unabhängig von der Agonistenbindung ist.



²¹³ HEK293T-Zellen wurden für 24 Stunden mit 1 µg gpH₁R-D116A-F433A pcDNA3.1(+) V5-His-TOPO [298] transient transfiziert und die Kalziumkonzentration ratiometrisch mit Fura-2 gemessen.

²¹⁴ HEK293T-Zellen wurden für 48 Stunden mit 2 µg hTRPC6-pIRES2-EGFP [123] und mit 2 µg gpH₁R-D116A-F433A pcDNA3.1(+) V5-His-TOPO [298] transient transfiziert und in der „Patch-Clamp“ Technik gemessen.

²¹⁵ Abkürzung OAG steht für 1-Oleoyl-2-acetyl-glycerol

²¹⁶ Abkürzung DAG steht für Diacylglycerol

Abbildung 3.9: Die mechanische Aktivierung des gpH₁-Rezeptors ist unabhängig von der Agonistenbindung in die orthosterische Ligandenbindetasche Ratiometrische Kalziummessungen mit Fura-2 an HEK293T-Zellen, die jeweils mit 1 µg Plasmid-DNA der Wildtyp gpH₁-Rezeptormutante H₁R-**mut** (A) (gpH₁R-D116A-F433A pcDNA3.1(+)-V5-His-TOPO [298]) für 24 Stunden transient transfiziert bzw. von stabilen monoklonalen HEK293-Zellen mit dem **mut**-il3-b Konstrukt (C), die jeweils für 10 Minuten mit 5 µM Fura-2-AM beladen wurden, zeigen keine Kalziumzunahme bei der Applikation von 100 µM Histamin (His, blauer Balken), aber eine deutliche Erhöhung der intrazellulären Kalziumkonzentration bei der Perfusion mit einer hypoosmolaren Lösung (150 mOsm kg⁻¹) (Hypo, roter Balken). Es werden jeweils eine exemplarische Spur der intrazellulären Kalziumkonzentration einer HEK293T-Zelle mit dem transient transfizierten gpH₁R-D116A-F433A pcDNA3.1(+)-V5-His-TOPO [298] Konstrukt bzw. einer stabilen, monoklonalen HEK293-Zelle mit dem **mut**-il3-b Konstrukt über die Zeit dargestellt (A und C, oben). Die Zusammenfassung aller Kalziummessungen wird als Säulendiagramm dargestellt (A und C, unten). Die schwarzen Säulen zeigen die basale Kalziumkonzentration vor einer 100 µM Histaminstimulation. Die blauen Säulen geben die Kalziumkonzentration während einer 100 µM Histaminstimulation, die roten Säulen geben die mechanische Stimulation mit einer 150 mOsm kg⁻¹ hypoosmolaren Lösung wieder. Alle HEK293-Zellen mit einer Ausgangskalziumkonzentrationen von [Ca²⁺]_i ≥ 150 nm wurden für die Gesamtauswertung nicht mitberücksichtigt. Die Zahlen neben der Ordinate geben die Anzahl der gemessenen HEK293T-Zellen von unterschiedlichen transienten Transfektionen (A) und verschiedenen Zellpassagen (C) auf 24 mm Glasplättchen aus mindestens 3 Experimentiertagen an. Die Signifikanz wurde zwischen den Kalziumzunahmen unter Histamin- bzw. mechanischer Stimulation zur basalen Kalziumkonzentration mit dem *Wilcoxon-Vorzeichen-Rangtest bestimmt (Mittelwert ± SEM, ***P < 0.001) (A). Für die elektrophysiologischen Experimente wurden HEK293T-Zellen mit 2 µg hTRPC6-pIRES EGFP [123] Konstrukt und mit 2 µg der gpH₁-Rezeptormutante gpH₁R-D116A-F433A pcDNA3.1(+)-V5-His-TOPO [298] für jeweils 48 Stunden transient transfiziert und in der Ganzzellkonfiguration in der „Patch-Clamp“ Technik gemessen. Die Strom-Spannungskurve (B, oben) und der Strom-Zeit-Verlauf (B, unten) zeigen keine Stromzunahmen unter Agonistenstimulation mit 100 µM Histamin (His, blau). Dagegen führt die mechanische Aktivierung mit hypoosmolarer Lösung (Hypo, rot, 250 mOsm kg⁻¹) zu einwärts- und auswärtsgerichteten Strömen. Als Positivkontrolle wurde 300 µM OAG (grau) als Zellgängiges DAG-Analogon eingewaschen, was zu maximalen TRPC6 vermittelten Strömen führt. Die Stromdichten CD („current densities“, pA/pF) sind als Säulendiagramme (B, unten) dargestellt. Sie wurden bei Haltepotentialen von ± 60 mV vor und während der Superfusion mit 100 µM Histamin (His, blau), hypoosmolarer Lösung (250 mOsm kg⁻¹, Hypo, rot) und 300 µM OAG (grau) berechnet. Die Zahlen geben die Anzahl transient transfizierter HEK293T-Zellen von mindestens 3 Experimentiertagen an. Zur statistischen Auswertung wurde die Zunahme der Stromdichten CD während einer Histaminstimulation bzw. bei einer mechanischen Stimulation zur Ausgangsstromdichte (schwarz, before) mit dem *Wilcoxon-Vorzeichen-Rangtest ermittelt (Mittelwert ± SEM, *P < 0.05, **P < 0.01, ***P < 0.001) (B). Die Zahlen in eckiger Klammer repräsentieren die Plasmidnummer für die im Labor zur Verfügung stehende Plasmid-DNA (siehe Kapitel 2.3).

3.6 Der inverse Agonist Mepyramin hemmt partiell die mechanische Rezeptoraktivierung des H₁-Rezeptors

Eine weitere interessante Fragestellung ist der Einfluss inverser Agonisten auf den mechanisch aktiven Rezeptorzustand des gpH₁-Rezeptors. Der spezifische inverse Agonist Mepyramin²¹⁷ ist ein antiallergischer Wirkstoff aus der Gruppe der Antihistaminika der ersten Generation (siehe Abbildung 1.9 A). Es inhibiert die Histamin induzierte G_{q/11}-Proteinaktivierung am H₁-Rezeptor und die PLC-β vermittelte

²¹⁷ Hersteller: Tocris, Bristol, United Kingdom, # 0660, CAS-Nummer: 59-33-6; chemische Bezeichnung nach IUPAC: N-(4-Methoxybenzyl)-N,N-dimethyl-N-(2-pyridinyl)-1,2-ethandiamin

PIP₂-Hydrolyse zu IP₃ und DAG, womit die intrazelluläre Kalziummobilisierung aus dem endoplasmatischem bzw. sarkoplasmatischem Retikulum unterbleibt und ein inaktiver Rezeptorzustand stabilisiert wird (Hill, 1990; Liu et al., 1994; Fitzsimons et al., 2004). In der FRET-Photometrie kommt es beim Einwaschen des selektiven inversen Agonisten Mepyramin mit maximaler Inhibitionskonzentration zu Zunahmen des FRET-Signals (siehe Abbildung 3.10 A und B), die einen konstitutiv aktiven Rezeptorzustand des gpH₁-Rezeptors belegen. Demnach stabilisiert Mepyramin einen inaktiven Rezeptorzustand des gpH₁-Rezeptors und zeigt zudem, dass das vorliegende FRET-Messsystem sensitiv genug ist, inaktive Rezeptorzustände von konstitutiv aktiven Rezeptorzuständen zu unterscheiden. Die mechanische Stimulation führt trotz Anwesenheit des inversen Agonisten Mepyramin zu Abnahmen des FRET-Signals (siehe Abbildung 3.10 A und B), das bedeutet, dass der Rezeptor in dem inaktiven Rezeptorzustand immer noch mechanisch aktiviert werden kann. Genauso gut konnten Zunahmen des FRET-Signals beim Auswaschen des inversen Agonisten beobachtet werden (siehe Abbildung 3.10 A und B), die eine Transduktion in den konstitutiv aktiven Rezeptorzustand zeigen. Stabile monoklonale HEK293-Zellen mit den gpH₁R-Konstrukten (il3-b, il3-m, il3-e1, il3-e2 und ct-b), die mit 30 µM Mepyramin behandelt werden, zeigen eine 22%ige (il3-b), 8%ige (il3-m), 61%ige (il3-e1), 74%ige (il3-e2) und eine 67%ige (ct-b) Abnahme des mechanisch aktivierten FRET-Signals gegenüber unbehandelten HEK293-Zellen (siehe Abbildung 3.10 C). Interessanterweise zeigt das Konstrukt mit dem FIAsh-Bindemotiv am Beginn des C-Terminus (ct-b) eine konzentrationsabhängige Reduktion des FRET-Signals (siehe Abbildung 3.10 D). Die Applikation einer submaximalen Inhibitionskonzentration von 10 µM Mepyramin reduziert das FRET-Signal um 35%, wobei eine maximale Inhibitionskonzentration von 30 µM Mepyramin das FRET-Signal um 67% reduziert. Zudem wurden stabile monoklonale HEK293-Zellen mit den in der orthosterischen Ligandenbindetasche mutierten gpH₁R-Konstrukten (**mut-il3-b**, **mut-il3-m** und **mut-il3-e1**) mit einer 30 µM Mepyraminlösung gemessen. Auch hier wurde eine Zunahme des FRET-Signals unter 30 µM Mepyramin (siehe Abbildung 3.11 A und B) durch eine Transduktion in einen inaktiven Rezeptorzustand beobachtet. Die mechanisch induzierten FRET-Signale (siehe Abbildung 3.11 C) waren in Gegenwart des spezifischen inversen Agonisten Mepyramin um 55% (**mut-il3-b**), 18% (**mut-il3-m**) und 69% (**mut-il3-e1**) reduziert. Insgesamt deuten diese FRET-Ergebnisse daraufhin, dass der spezifische inverse Agonist Mepyramin einen inaktiven Rezeptorzustand stabilisieren kann, der allerdings nicht vollständig mechanisch induzierte Konformationsänderungen hemmen kann.

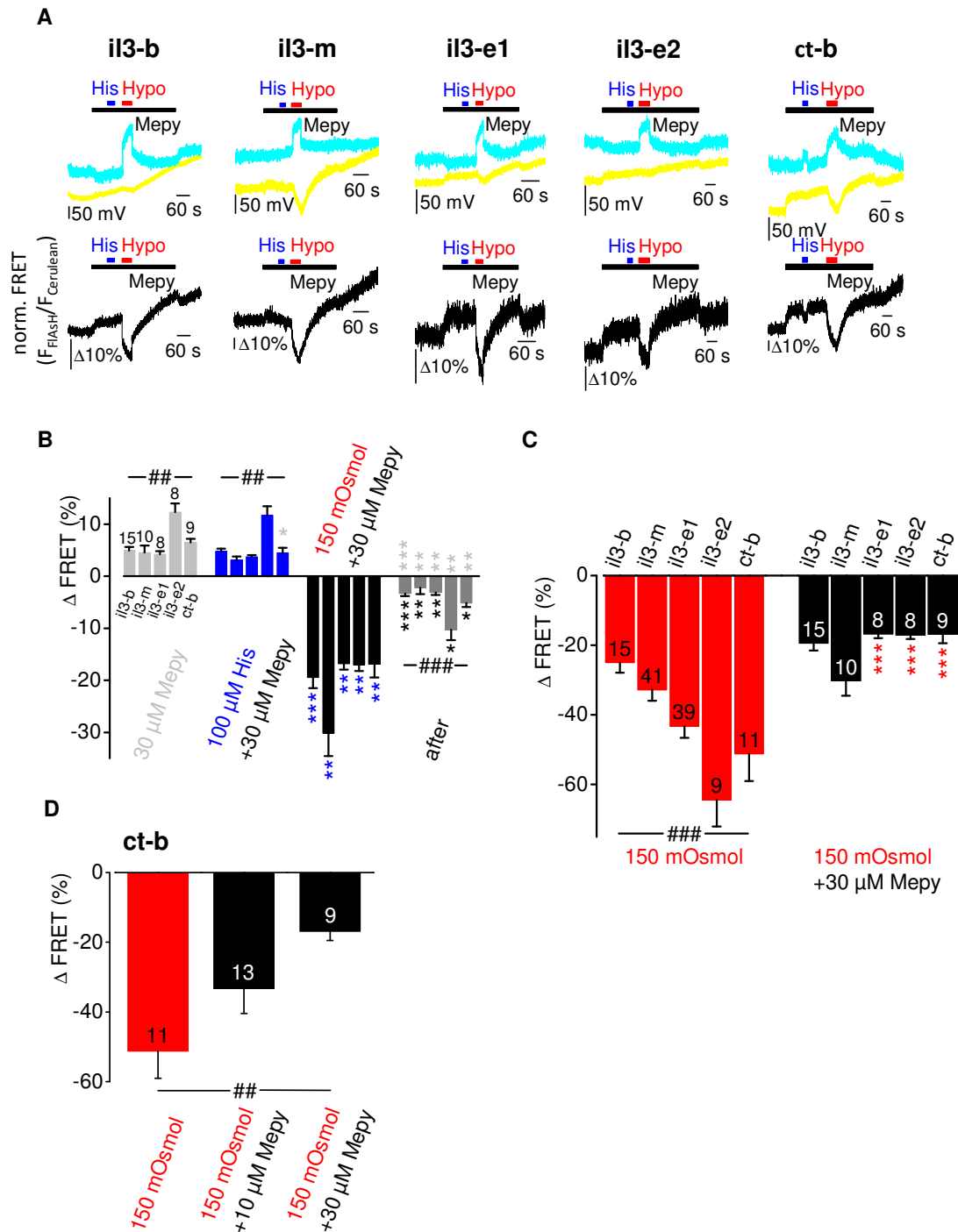


Abbildung 3.10: Hemmung der mechanischen Rezeptoraktivierung des gpH₁-Rezeptors mit dem spezifischen inversen Agonisten Mepyramin Dynamische intramolekulare FRET-Messungen von FIA5H markierten, stabilen HEK293-Zellen mit stabil exprimierten gpH₁R-Konstrukten (il3-b, il3-m, il3-e1, il3-e2 und ct-b). Wie gezeigt wird, kommt es in allen fünf gpH₁R-Konstrukten während einer 30 μM Mepyraminstimulation (Mepy, schwarzer Balken) zu einer Zunahme des FRET-Signals (schwarze Spur), die mit einer Annäherung beider Fluorochrome zueinander stattfindet. Der inverse Agonist Mepyramin bewirkt, dass die türkise Cerulean-Fluoreszenzspur ab- und die gelbe FIA5H-Fluoreszenzspur zunehmen. Eine 100 μM Histaminstimulation (His, blauer Balken) in Gegenwart des inversen Agonisten Mepyramin führt in allen fünf gpH₁R-Konstrukten außer dem ct-b-Konstrukt zu keiner Änderung des FRET-Signals. Wohingegen die Applikation einer 150 mOsm kg⁻¹ hypoosmolaren Lösung (Hypo, roter Balken) trotz Anwesenheit des inversen Agonisten Mepyramin zu einer Abnahme des FRET-Signals führt, womit sich die beiden Fluorochrome während einer mechanischen Aktivierung des gpH₁R voneinander wegbewegen. Auch beim

Auswaschen des inversen Agonisten Mepyramin kommt es zu einer Abnahme des FRET-Signals, die den gpH_1 -Rezeptor in einen konstitutiv aktiven Rezeptorzustand versetzt (A). Die Zusammenfassung der dynamischen FRET-Messungen wird als Säulendiagramm dargestellt. Mepyramin induzierte FRET-Änderungen werden in hellgrau, Histamin induzierte FRET-Änderungen in blau, hypoosmotisch induzierte FRET-Änderungen in Anwesenheit des inversen Agonisten Mepyramin in schwarz und in Abwesenheit von Mepyramin in grau angezeigt. Zahlen an den Säulen geben die Anzahl der gemessenen HEK293-Zellen auf 30 mm Glasplättchen von mindestens 3 Experimentiertagen an. Es wurden Signifikanzen zwischen den FRET-Signalen der einzelnen *il3-b*, *il3-m*, *il3-e1*, *il3-e2* und *ct-b* gpH_1 -Konstrukten zueinander während einer Mepyramin-, Histamin- und einer mechanischen Stimulation in An- und in Abwesenheit des inversen Agonisten Mepyramin mit dem #Kruskal-Wallis Test (Mittelwert \pm SEM, ##P < 0.01, ###P < 0.001) (B, C, D) bestimmt. Signifikante Unterschiede wurden auch zwischen den FRET-Signalen innerhalb eines gpH_1 -Konstruktes mit dem *Wilcoxon-Vorzeichen-Rangtest berechnet (Mittelwert \pm SEM, *P < 0.05, **P < 0.01, ***P < 0.001) (B). In Anwesenheit des inversen Agonisten Mepyramin sind die mechanisch induzierten Abnahmen des FRET-Signals bei den *il3-e1*, *il3-e2* und *ct-b* gpH_1 -Konstrukten signifikant reduziert (Mann-Whitney-U-Test, Mittelwert \pm SEM, ***P < 0.001) (C). Das *ct-b* gpH_1 -Konstrukt zeigt eine signifikante konzentrationsabhängige Hemmung des mechanisch induzierten FRET-Signals mit 10 μ M bzw. 30 μ M Mepyramin, das mit dem #Kruskal-Wallis Test bestätigt wird (Mittelwert \pm SEM, ##P < 0.01) (D).

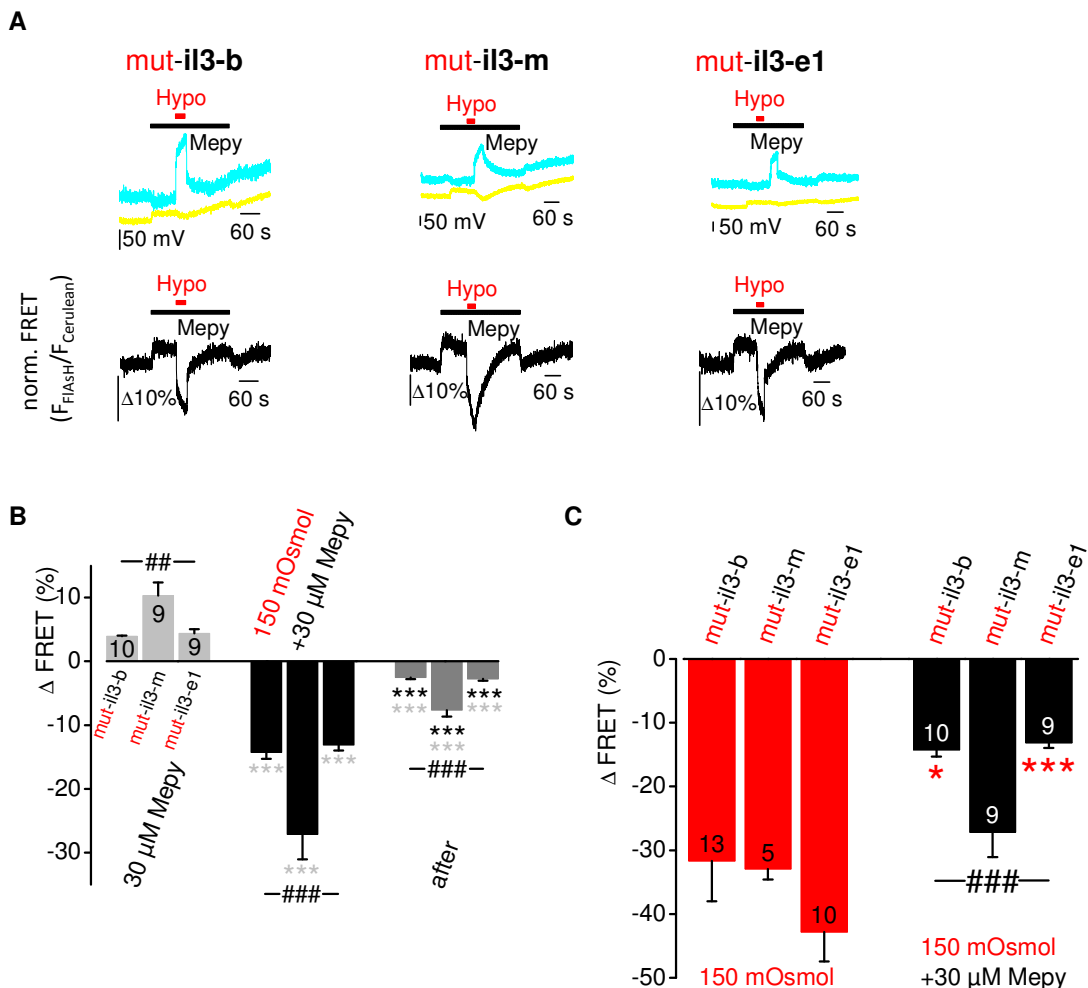


Abbildung 3.11: Hemmung des mechanisch induzierten FRET-Signals durch den inversen Agonisten Mepyramin in gpH_1 -Rezeptormutanten Dynamische intramolekulare FRET-Messungen von FIAsh markierten, stabilen monoklonalen HEK293-Zellen mit stabil exprimierenden und in der orthosterischen Ligandenbindetasche mutierten gpH_1 -Konstrukten (*mut-il3-b*, *mut-il3-m*, *mut-il3-e1*). Wie gezeigt wird,

kommt es in allen drei mutierten gpH₁R-Konstrukten während einer 30 µM Mepyraminstimulation (Mepy, schwarzer Balken) zu einer Zunahme des FRET-Signals (schwarze Spur). Der inverse Agonist Mepyramin bewirkt, dass die türkise Cerulean-Fluoreszspur ab und die gelbe FIAH-Fluoreszspur zunimmt. Die Applikation einer hypoosmolaren Lösung (150 mOsm kg⁻¹, Hypo, roter Balken) führt in Gegenwart des inversen Agonisten Mepyramin immer noch zu einer Abnahme des FRET-Signals. Auch beim Auswaschen des inversen Agonisten Mepyramin kommt es zu einer Abnahme des FRET-Signals, die den gpH₁-Rezeptor in einen konstitutiv aktiven Rezeptorzustand versetzt (A). Die Zusammenfassung der dynamischen FRET-Messungen wird als Säulendiagramm dargestellt. Mepyramin induzierte FRET-Signaländerungen werden in hellgrau, hypoosmotisch induzierte FRET-Signaländerungen in Anwesenheit des inversen Agonisten Mepyramin in schwarz und FRET-Signaländerungen in Abwesenheit von Mepyramin in grau angezeigt. Zahlen an den Säulen geben die Anzahl der gemessenen HEK293-Zellen auf 30 mm Glasplättchen von mindestens 3 Experimentiertagen an. Es wurden Signifikanzen zwischen den FRET-Signalen der einzelnen gpH₁R-Konstrukten (**mut-il3-b**, **mut-il3-m**, **mut-il3-e1**) zueinander während einer Mepyramin- und einer mechanischen Stimulation in An- (150 mOsmol + 30 µM Mepy, schwarze Balken) und in Abwesenheit (30 µM Mepy, graue Balken) des inversen Agonisten Mepyramin mit der # ANOVA bestimmt (Mittelwert ± SEM, ##P < 0.01, ###P < 0.001) (B). Signifikante Unterschiede wurden auch zwischen Änderungen des FRET-Signals innerhalb eines gpH₁R-Konstruktes mit dem gepaarten *Student t test (Mittelwert ± SEM, **/**P < 0.001) berechnet (B). In Anwesenheit des inversen Agonisten Mepyramin sind die mechanisch induzierten Abnahmen des FRET-Signals bei den **mut-il3-b** und **mut-il3-e1** gpH₁R-Konstrukten signifikant reduziert (ungepaarter *Student t Test, Mittelwert ± SEM, ***P < 0.001) (C). Die mechanisch induzierten FRET-Signale (150 mOsmol + 30 µM Mepy, schwarze Balken) zwischen den mutierten gpH₁-Rezeptoren während einer 30 µM Mepyramin Applikation sind signifikant unterschiedlich (# ANOVA²¹⁸ Mittelwert ± SEM, ##P < 0.01, ###P < 0.001) (C).

3.7 Ein weiterer inverser H₁-Rezeptoragonist - Desloratadin hemmt partiell die mechanische Rezeptoraktivierung

Um herauszufinden, ob weitere inverse Agonisten die mechanische Rezeptoraktivierung unterdrücken können, wurde Desloratadin als ein zusätzlicher inverser Agonist mit Hilfe der FRET-Photometrie verwendet. Im Gegensatz zu Mepyramin handelt es sich bei dem inversen Agonisten Desloratadin²¹⁹ (Wu et al., 2004) um ein Antihistaminikum der zweiten Generation. Für die dynamischen intramolekularen FRET-Messungen wurde eine maximale Inhibitionskonzentration von 30 µM Desloratadin²²⁰ verwendet. Die Perfusion mit einer 30 µM Desloratadinlösung zeigt wie bei Mepyramin Zunahmen im FRET-Signal (siehe Abbildung 3.12 A, B und C), womit ein inaktiver Rezeptorzustand des gpH₁-Rezeptors stabilisiert wird. Die mechanisch induzierten Abnahmen des FRET-Signals (siehe Abbildung 3.12 B und C) sind bei den in der orthosterischen Ligandenbindetasche mutierten gpH₁-Rezeptoren jeweils um 48% (**mut-il3-e1**) bzw. um 35% (**mut-il3-b**) vermindert. Somit führt die mechanische

²¹⁸ Abkürzung ANOVA vom Englischen analysis of variance

²¹⁹ Hersteller: LKT-Laboratories, Inc., #D1774; chemische Bezeichnung nach IUPAC: 8-Chlor-11-(piperidin-4-yliden)-5,6-dihydro-11H-benzo[5,6]cyclohepta[1,2-b]pyridin). Es ist das pharmakologisch aktive Stoffwechselprodukt Descarboethoxyloratadin von Loratadin. Die Hydrolyse des Ethylesters im Loratadin durch die beiden Cytochromsysteme CYP2D6 und CYP3A4 in der Leber wird das Salz der Carbonsäure freigesetzt. Durch diese freigesetzte negative Ladung des Carboxylats ist die Blut-Hirn-Schranke weniger passierbar und anticholinerge Nebenwirkungen des Zentralnervensystems wie z. B. Sedation treten weniger auf. Siehe <https://www.pharmawiki.ch/wiki/index.php?wiki=loratadin>, letzter Aufruf erfolgte 10.05.2019.

²²⁰ Hierzu wurde 9.4 mg Desloratadin in 968 µl DMSO gelöst, um eine 30 mM Desloratadin Stammlösung zu erhalten, die direkt zu 20 µl-Aliquots portioniert und lichtgeschützt bei -20°C gelagert wurden. Für die Arbeitskonzentration wurde die Stammlösung 1:1000 in der „Iso 150“ Badlösung und den Badlösungen verdünnt.

Stimulation trotz Anwesenheit des inversen Agonisten Desloratadin zu FRET-Abnahmen (siehe Abbildung 3.12 A). Die FRET-Ergebnisse zeigen, dass der inaktive gpH₁-Rezeptor immer noch mechanisch aktiviert wird.

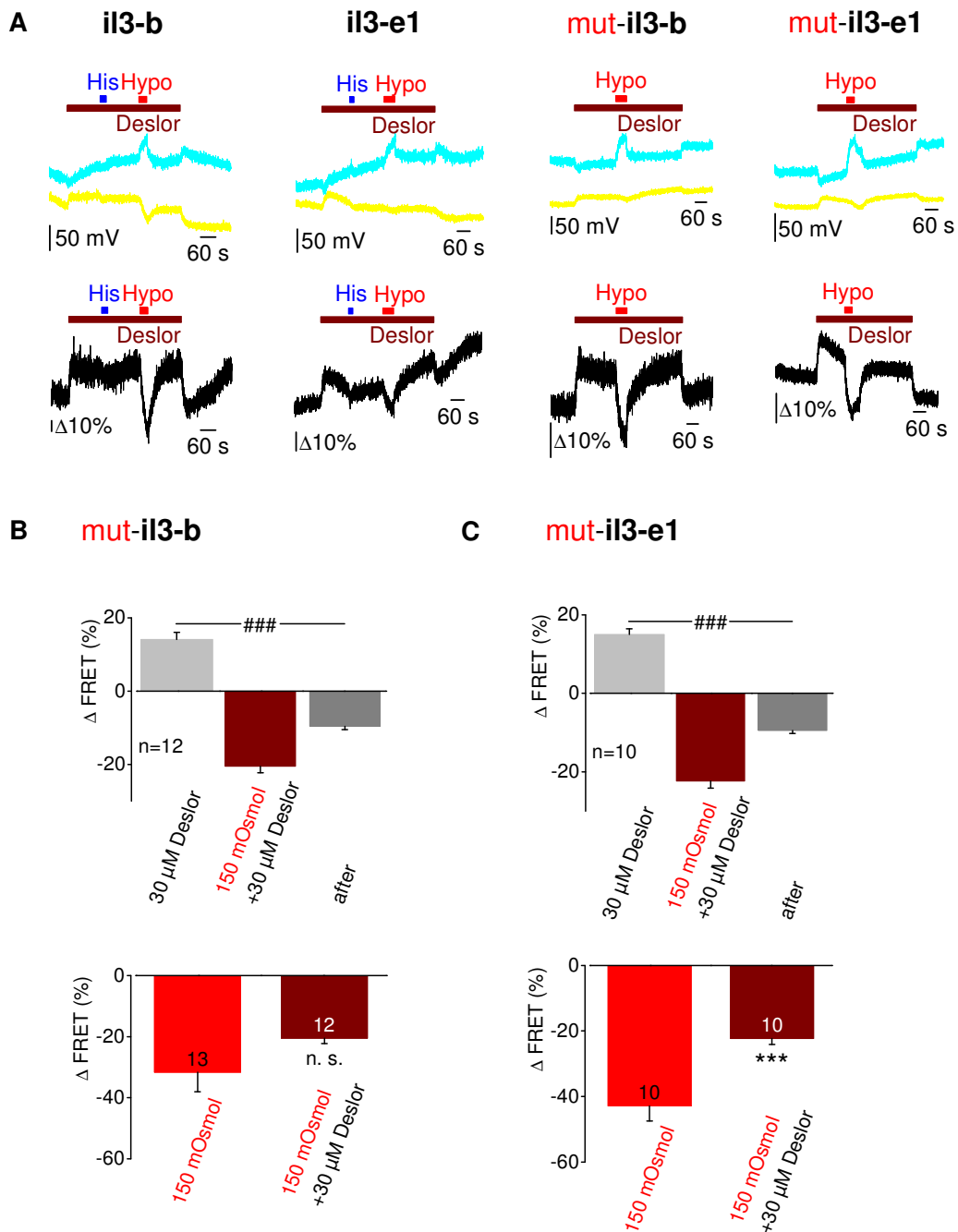


Abbildung 3.12: Partielle Hemmung mechanisch induzierter FRET-Signale durch den inversen H₁-Rezeptoragonisten Desloratadin Dynamische intramolekulare FRET-Messungen von FIAsh markierten, stabilen monoklonalen HEK293-Zellen mit stabil exprimierenden, in der orthosterischen Ligandenbindetasche mutierten gpH₁R-Konstrukten (il3-b, il3-e1, mut-il3-b, mut-il3-e1). Wie oben gezeigt wird, bewirkt die Applikation einer 30 μM Desloratadinlösung in allen vier gpH₁R-Konstrukten (Deslor, brauner Balken) eine Zunahme des FRET-Signals (schwarze Spur). Der inverse Agonist Desloratadin führt dazu, dass die türkise Cerulean-Fluoreszspur ab und die gelbe FIAsh-Fluoreszenzspur zunimmt. Die Perfusion mit einer hypoosmolaren Lösung (150 mOsm kg⁻¹, Hypo, roter Balken) führt in Gegenwart des inversen Agonisten zu einer Abnahme des FRET-Signals. Auch beim Auswaschen des inversen Agonisten kommt es zu einer Abnahme des FRET-Signals (A). Die Zusammenfassung der dynamischen

FRET-Messungen wird als Säulendiagramm dargestellt. Desloratadin induzierte FRET-Signaländerungen werden in hellgrau, mechanisch induzierte FRET-Signaländerungen in Anwesenheit des inversen Agonisten in braun und FRET-Signaländerungen in Abwesenheit von Desloratadin in grau angezeigt. Zahlen an den Säulen geben die Anzahl der gemessenen HEK293-Zellen auf 30 mm Glasplättchen von mindestens 3 Experimentiertagen an. Signifikante Unterschiede wurden zwischen den FRET-Signalen innerhalb eines gpH₁R-Konstruktes während einer Desloratadin- und einer mechanischen Stimulation mit dem #Friedmann-Test (Mittelwert ± SEM, ###P < 0.001) für das **mut-il3-b** gpH₁R-Konstrukt und mit der # ANOVA (Mittelwert ± SEM, ###P < 0.001) für das **mut-il3-e1** gpH₁R-Konstrukt berechnet (B, C). In Anwesenheit des inversen Agonisten Desloratadin sind die mechanisch induzierten Abnahmen des FRET-Signals bei dem **mut-il3-e1** gpH₁R-Konstrukt signifikant reduziert (ungepaarter *Student t Test, Mittelwert ± SEM, ***P < 0.001) (C).

3.8 Hemmung der mechanischen H₁-Rezeptoraktivierung mit dem partiellen H₁-Rezeptoragonisten Mizolastin

Des Weiteren wurde Mizolastin als ein weiteres Antihistaminikum der zweiten Generation mit einer mittleren inhibitorischen Konzentration (IC₅₀) von 47 nM (Benavides et al., 1995) verwendet, um den Effekt auf die mechanische Rezeptoraktivierung zu untersuchen. Es wurden mit FIAsH angefärbte monoklonale HEK293-Zellen mit den stabil exprimierenden Wildtyp gpH₁R-Konstrukten il3-b, il3-e1 und ct-b und den mutierten gpH₁R-Konstrukten **mut-il3-b** und **mut-il3-e1** mit Hilfe der FRET-Photometrie gemessen. Die HEK293-Zellen wurden mit einer maximalen Inhibitionskonzentration von 10 µM Mizolastinlösung²²¹ perfundiert. Interessanterweise zeigt die Applikation von Mizolastin im Vergleich zu Mepyramin und Desloratadin keine FRET-Zunahme, sondern eine FRET-Abnahme (siehe Abbildung 3.13 A und B). Womit es sich bei Mizolastin im Gegensatz zu Mepyramin und Desloratadin mit großer Wahrscheinlichkeit um einen partiellen Agonisten des gpH₁-Rezeptors handelt. In Anwesenheit des partiellen Agonisten Mizolastin sind mechanisch induzierte Abnahmen des FRET-Signals (siehe Abbildung 3.13 C) signifikant reduziert. Ebenfalls konnten Zunahmen des FRET-Signals beim Auswaschen des partiellen Agonisten (siehe Abbildung 3.13 A und B) beobachtet werden, die eine Transduktion des gpH₁-Rezeptors in den konstitutiv aktiven Rezeptorzustand zeigen. Das wiederum belegt, dass der Partialagonist Mizolastin antagonistisch bezüglich mechanischer Aktivierung wirkt. Mit dem partiellen Agonisten Mizolastin wird die mechanische Rezeptoraktivierung (siehe Abbildung 3.13 C) bei dem il3-b Konstrukt um 35%, bei dem il3-e1 Konstrukt um 54%, bei dem ct-b Konstrukt um 53%, bei dem **mut-il3-b** Konstrukt um 37% und bei dem **mut-il3-e1** Konstrukt um 45% unterdrückt. Somit führt die mechanische Aktivierung des gpH₁-Rezeptors immer noch in Gegenwart des partiellen Agonisten Mizolastin zu Abnahmen des FRET-Signals (siehe Abbildung 3.13 A und B).

²²¹ Hersteller: Selleckchem, # S2107, München, Deutschland, chemische Bezeichnung nach IUPAC: 2-[[1-[1-[(4-fluorophenyl)methyl]benzimidazol-2-yl]piperidin-4-yl]-methylamino]-1H-pyrimidin-6-one. Hierzu wurde 50 mg Mizolastin in 1.1561 ml DMSO gelöst, um eine 100 mM Mizolastin Stammlösung zu erhalten, die direkt zu 50 µl-Aliquots portioniert und lichtgeschützt bei -20°C gelagert wurden. Für die Arbeitskonzentration wurde die Stammlösung 1:10000 in der „Iso 150“ Badlösung und den anderen Badlösungen verdünnt.

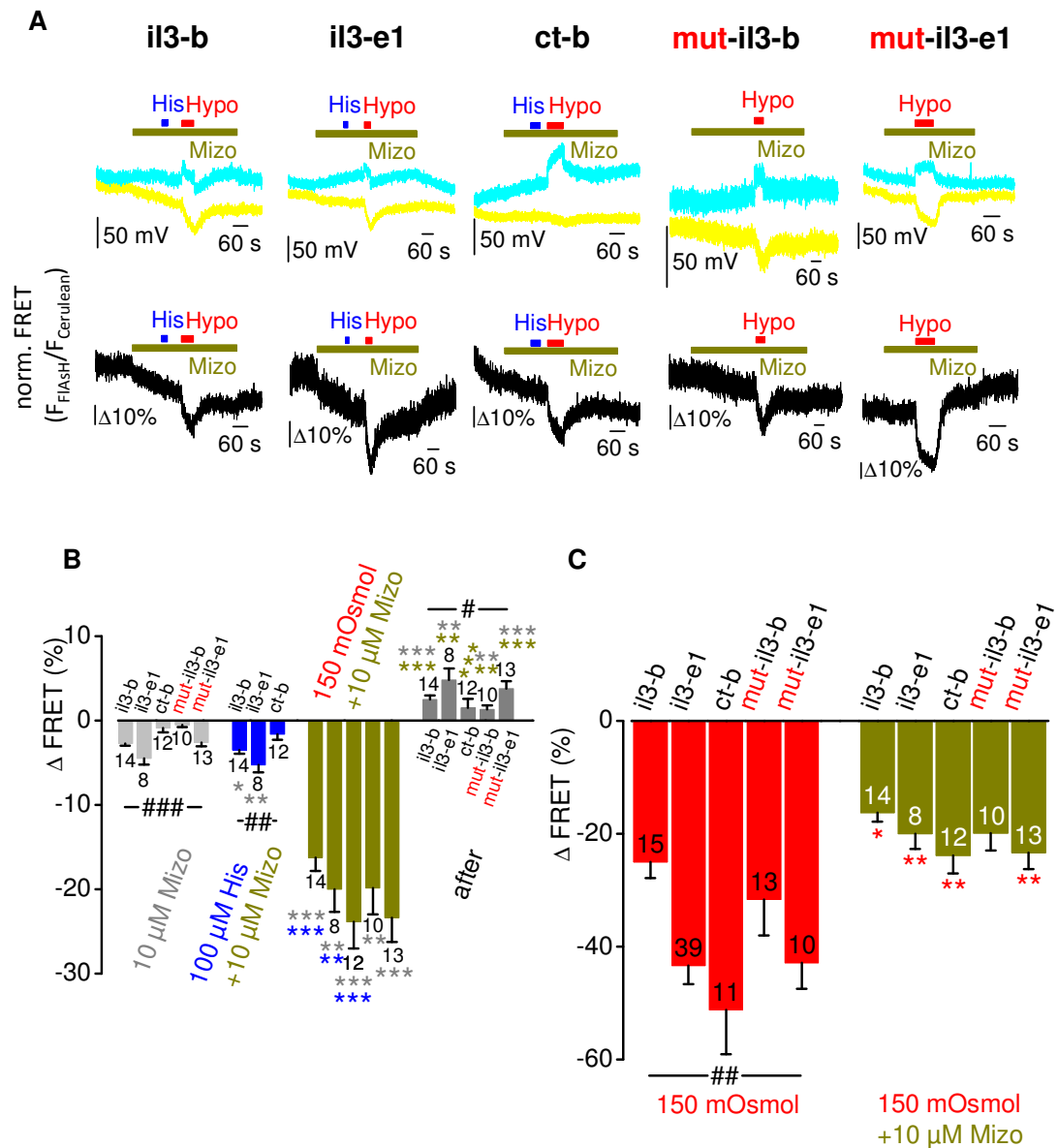


Abbildung 3.13: Reduktion mechanisch induzierter FRET-Signale mit dem partiellen Agonisten Mizolastin Dynamische FRET-Messungen von FIAsh markierten, monoklonalen HEK293-Zellen mit stabil exprimierenden gpH₁R-Konstrukten (il3-b, il3-e1, ct-b, mut-il3-b, mut-il3-e1). Die Applikation einer 10 μM Mizolastinlösung führt in allen fünf gpH₁R-Konstrukten (Mizo, dunkelgelber Balken) zu einer Zunahme der türkisen Cerulean-Fluoreszspur und zu einer Abnahme der gelben FIAsh-Fluoreszenzspur, das in einer Abnahme des FRET-Signals (schwarze Spur) resultiert. Die Perfusion mit einer hypoosmolaren Lösung (150 mOsm kg⁻¹, Hypo, roter Balken) bewirkt in Gegenwart von Mizolastin eine Abnahme des FRET-Signals. Beim Lösungswechsel des partiellen Agonisten kommt es zu einer Zunahme des FRET-Signals (A). Die Zusammenfassung der dynamischen FRET-Messungen wird als Säulendiagramm dargestellt. Mizolastin induzierte FRET-Signaländerungen werden in hellgrau, Histamin induzierte FRET-Signaländerungen in Anwesenheit von Mizolastin in blau, mechanisch induzierte FRET-Signaländerungen in Anwesenheit des partiellen Agonisten Mizolastin in dunkelgelb und in Abwesenheit von Mizolastin in grau dargestellt. Zahlen an den Säulen geben die Anzahl der gemessenen HEK293-Zellen auf 30 mm Glasplättchen von mindestens 3 Experimentiertagen an. Signifikante Unterschiede wurden zwischen den FRET-Signalen der einzelnen il3-b, il3-e1, ct-b, mut-il3-b und mut-il3-e1 gpH₁R-Konstrukten zueinander während einer Mizolastin-, Histamin- und einer mechanischen Stimulation mit einer hypoosmolaren Lösung (Hypo, 150 mOsm kg⁻¹) in An- bzw. in Abwesenheit von Mizolastin mit dem #Kruskal-Wallis Test bestimmt (Mittelwert ± SEM,

#P < 0.05, ##P < 0.01, ###P < 0.001) (B, C). Außerdem wurden signifikante Unterschiede zwischen den FRET-Signalen innerhalb eines gpH₁R-Konstruktes mit dem *Wilcoxon-Vorzeichen-Rangtest berechnet (Mittelwert ± SEM, *P < 0.05, **P < 0.01, ***P < 0.001) (B). In Gegenwart von Mizolastin sind mechanisch induzierte FRET-Signalabnahmen bei den il3-b, il3-e1, ct-b gpH₁R-Konstrukten mit dem ungepaarten *Student t Test (Mittelwert ± SEM, *P < 0.05, **P < 0.01) und bei dem **mut-il3-e1** gpH₁R-Konstrukt mit dem *Mann Whitney Test (Mittelwert ± SEM, **P < 0.01) signifikant reduziert (C).

3.9 Membranmodell und Verankerungsmodell als Kraftübertragungsmodell für den H₁-Rezeptor

Als nächstes wurde der Einfluss des Zytoskeletts auf die mechanische Rezeptoraktivierung genauer überprüft. Um diese Frage zu beantworten, wurden folgende Zytoskelett-Modulatoren verwendet (siehe Abbildung 3.14).

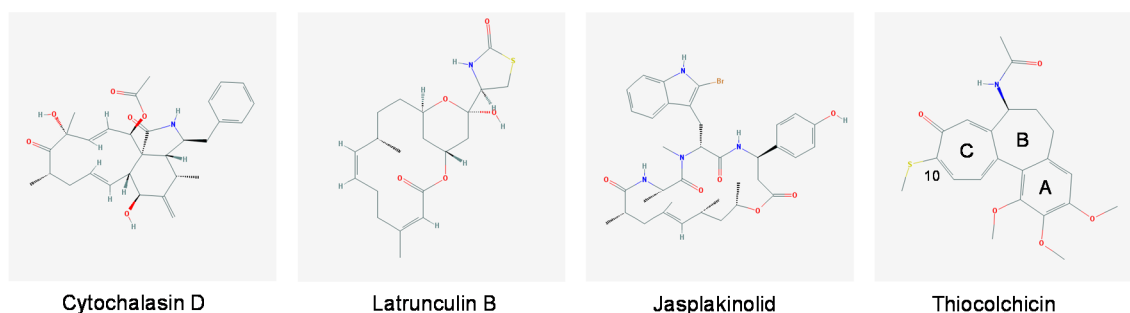


Abbildung 3.14: Übersicht über die 2^D-Skelettstrukturen der eingesetzten Zytoskelett-Modulatoren
PubChem National Center for Biotechnology Information U.S. National Library of Medicine (Kim et al., 2019), <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/>. Letzter Aufruf erfolgte am 13.04.2019.

Zuerst wurden FIAsH markierte monoklonale HEK293-Zellen mit den stabil exprimierenden il3-b, il3-m und il3-e1 gpH₁R-Konstrukten mit den beiden Zytoskelettinhibitoren (30 Minuten mit 5 µM Cytochalasin D²²² bzw. 10 Minuten mit 500 nM Latrunculin B²²³) behandelt und anschließend mit Hilfe der FRET-Photometrie gemessen (siehe Abbildung 3.15 A, C und E). Interessanterweise sind mechanisch induzierte FRET-Signale um 41-70% in mit Cytochalasin D (siehe Abbildung 3.15 B und D) bzw. um 103% in mit Latrunculin B (siehe Abbildung 3.15 F) behandelten HEK293-Zellen mit dem il3-b gpH₁R-Konstrukt signifikant erhöht (siehe Abbildung 3.15 E und F). Auch in der umgekehrten Reihenfolge der Rezeptoraktivierung konnte dies

²²² Cytochalasin D ist ein sekundäres Stoffwechselprodukt des Schimmelpilzes *Zygosporium mansonii*, das die Polymerisation von freiem globulärem G-Aktin zu filamentösem F-Aktin in der Zelle unterbindet. Es bindet mit einer hohen Affinität ($K_d \approx 2$ nM) an die wachsenden Enden des filamentösen Aktinpolymeren (F-Aktin) und mit einer geringeren Affinität ($K_d \approx 2-20$ µM) an monomeres G-Aktin und verhindert somit die Assemblierung und Dissoziation von G-Aktin vom filamentösen Aktinpolymeren. Außerdem induziert Cytochalasin D in Anwesenheit von Magnesiumionen (50 µM Mg²⁺) die Bildung von Aktin-Dimeren, die sich nicht zu filamentösem F-Aktin zusammenfügen können (Brenner und Korn, 1980; Flanagan und Lin, 1980; Goddette und Frieden, 1986b, a; Goddette et al., 1986; Cooper, 1987; Nair et al., 2008). Für eine 1 mM Stammlösung wurde 1 mg Cytochalasin D (# C8273, Sigma-Aldrich, Steinheim) in 1,97 ml DMSO gelöst, direkt zu 50 µl-Aliquots portioniert und lichtgeschützt bei -20°C gelagert. Für die Arbeitskonzentration wurde die Stammlösung 1:200 in der Badlösung verdünnt.

²²³ Latrunculin B, gewonnen aus dem roten Meeresschwamm *Latrunculia magnifica*, unterdrückt die Polymerisation von freiem monomeren G-Aktin zu filamentösem F-Aktin. Es fördert die Bildung eines 1:1 molaren Latrunculin B - G-Aktin-Komplexes ($K_d = 200$ nM), womit die Polymerisation von freiem monomeren G-Aktin zu einem F-Aktin-Filament verhindert wird (Spector et al., 1983; Coue et al., 1987; Spector et al., 1989; Spector et al., 1999; Yarmola et al., 2000; Wakatsuki et al., 2001). Für eine 2 mM Latrunculin B-Stammlösung wurde 1 mg Latrunculin B (# 428020, Calbiochem, Darmstadt) in 1,26 ml DMSO gelöst, direkt zu 50 µl-Aliquots portioniert und lichtgeschützt bei -20°C gelagert. Für die Arbeitskonzentration wurde die Stammlösung 1:4000 in der Badlösung verdünnt.

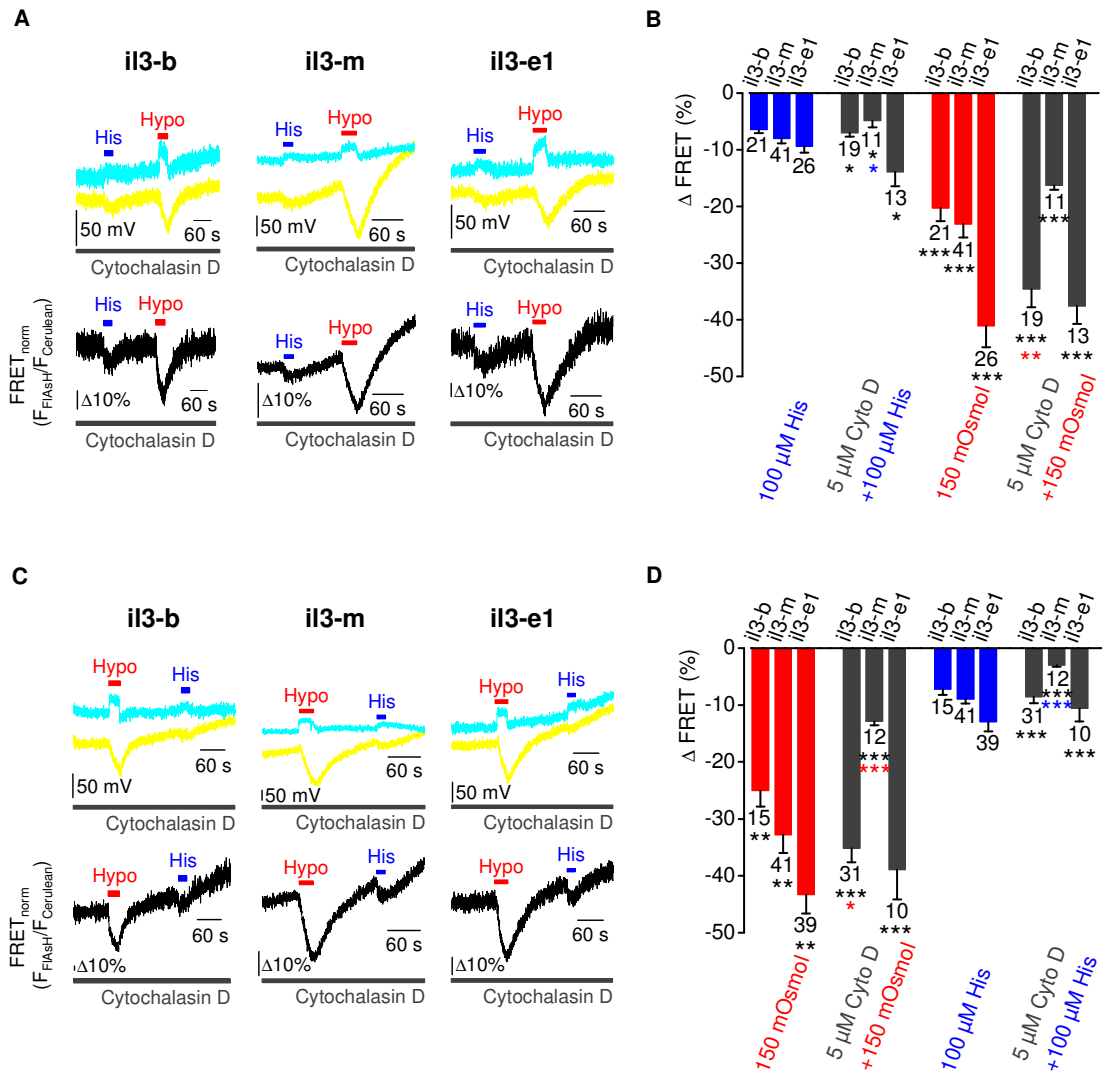
beobachtet werden (siehe Abbildung 3.15 A-D). Diese FRET-Ergebnisse offenbaren, dass das Aktin-Zytoskelett einen inhibitorischen Effekt (siehe Abbildung 3.15 B und D) auf die mechanische Rezeptoraktivierung ausübt. Der $\text{il3-b gpH}_1\text{-Rezeptor}$ ist stärker mechanosensitiv und reagiert mit größeren FRET-Abnahmen bei einem zerstörten Zytoskelett. Im Gegensatz dazu zeigt das $\text{il3-m gpH}_1\text{R-Konstrukt}$ verringerte Abnahmen des mechanisch induzierten FRET-Signals um 61-67%, was auf eine die Mechanosensitivität des Rezeptors modulierenden Einfluss des Zytoskeletts hinweist (siehe Abbildung 3.15 B und D). Beim $\text{il3-e1 gpH}_1\text{R-Konstrukt}$ wurden keine signifikanten Unterschiede in der mechanischen Rezeptoraktivierung festgestellt (siehe Abbildung 3.15 B und D).

Als nächstes wurde der Effekt einer verstärkten Polymerisation des Aktin-Zytoskeletts durch den Einsatz von Jasplakinolid²²⁴ auf die mechanische Rezeptoraktivierung näher untersucht. Hierfür wurden FIAsh markierte HEK293-Zellen mit dem stabil exprimierenden $\text{il3b gpH}_1\text{R-Konstrukt}$ jeweils für 20 Minuten mit 8 nM Jasplakinolid inkubiert und mit Hilfe der FRET-Photometrie gemessen. Es wurden keine signifikanten Unterschiede zwischen den mechanisch induzierten FRET-Signalen behandelter und unbehaltener HEK293-Zellen festgestellt (siehe Abbildung 3.15 F). Des Weiteren wurde der Einfluss der Mikrotubuli auf die mechanische Rezeptoraktivierung betrachtet. Stabile, FIAsh angefarbte HEK293-Zellen mit dem $\text{il3-b gpH}_1\text{R-Konstrukt}$ wurden für zwei Stunden mit 10 μM Thiocolchicin²²⁵ behandelt und mittels der FRET-Photometrie gemessen. Eine gestörte Assemblierung der Mikrotubuli durch Thiocolchicin zeigt keinen signifikanten Unterschied in der mechanischen Rezeptoraktivierung (siehe Abbildung 3.15 F). Das bedeutet, dass ein intaktes Aktin-Zytoskelett die mechanische Rezeptoraktivierung vermindert, ein zerstörtes Aktin-Zytoskelett bewirkt dagegen eine verstärkte mechanische Rezeptoraktivierung. Der $\text{gpH}_1\text{-Rezeptor}$ ist sowohl immer noch durch den endogenen Liganden Histamin (100 μM) als auch durch eine mechanische Stimulation mit einer hypoosmolaren Lösung (150 mOsm kg^{-1}) aktivierbar (siehe Abbildung 3.15 E). Es wurden signifikant größere Abnahmen der mechanisch induzierten FRET-Signale in HEK293-Zellen mit zerstörtem als intaktem Aktin-Zytoskelett beobachtet (siehe Abbildung 3.15 F). Diese Resultate lassen

²²⁴ Jasplakinolid, ein makrozyklisches Peptid aus dem Meeresschwamm *Jaspis johnstoni*, ist ein potenter Induktor der Aktin-Polymerisation. Es bindet an F-Aktin ($K_d = 15 \text{ nM}$) und stabilisiert das filamentöse F-Aktinnetzwerk, womit die Depolymerisation zu Aktin-Monomeren unterdrückt wird (Scott et al., 1988; Bubb et al., 1994; Cramer, 1999; Bubb et al., 2000; Holzinger, 2010; Holzinger und Blaas, 2016). Für eine 16 μM Stammlösung wurde 100 μg Jasplakinolid (# 2792, biotechnique, R&D Systems, Wiesbaden) in 8,807 ml DMSO gelöst, direkt zu 500 μl -Aliquots portioniert und lichtgeschützt bei -20°C gelagert. Für die Arbeitskonzentration wurde die Stammlösung 1:2000 in der Badlösung verdünnt.

²²⁵ Thiocolchicin ist ein Derivat des sekundären Pflanzeninhaltsstoffs Colchicin der Herbstzeitlose (*Colchicum autumnale*) aus der Familie der Liliengewächse (Liliaceae). Im Gegensatz zu Colchicin besitzt Thiocolchicin eine Thiomethyl-Gruppe anstatt einer Methoxy-Gruppe am C-10 Kohlenstoffatom des C-Rings (siehe Abbildung 3.13). Das Thiocolchicin ($K_d = 1,0 - 2,3 \mu\text{M}$) bindet in einem 1:1 molarem Verhältnis an die α - β -Dimerisierungsschnittstelle von Tubulin, das aus α - und β -Tubulin zusammengesetzt ist. Es interagiert mit dem B-Ring an der α -Untereinheit und mit dem A- und C-Ring an der β -Untereinheit des 110 kDa großen α - β -Heterodimers, womit die Assemblierung der Tubuli an die wachsenden Enden der Mikrotubuli verhindert wird (Margolis und Wilson, 1977; Choudhury et al., 1983; Lambeir und Engelborghs, 1983; Chabin und Hastie, 1989; Kang et al., 1990; Hastie, 1991; Skoufias und Wilson, 1992; Vandecandelaere et al., 1997; Chaudhuri et al., 2000; Passarella et al., 2008; Calligaris et al., 2010). Für eine 10 mM Stammlösung wurde 5 mg Thiocolchicin (# SML0954, Sigma-Aldrich, Taufkirchen) in 1,203 ml DMSO gelöst, direkt zu 50 μl -Aliquots portioniert und lichtgeschützt bei -20°C gelagert. Für die Arbeitskonzentration wurde die Stammlösung 1:1000 in der Badlösung verdünnt.

vermuten, dass sowohl das Membranmodell (il3-b) als auch das Verankerungsmodell (il3-m) als Kraftübertragungsmodelle auf den gpH₁-Rezeptor zutreffen.



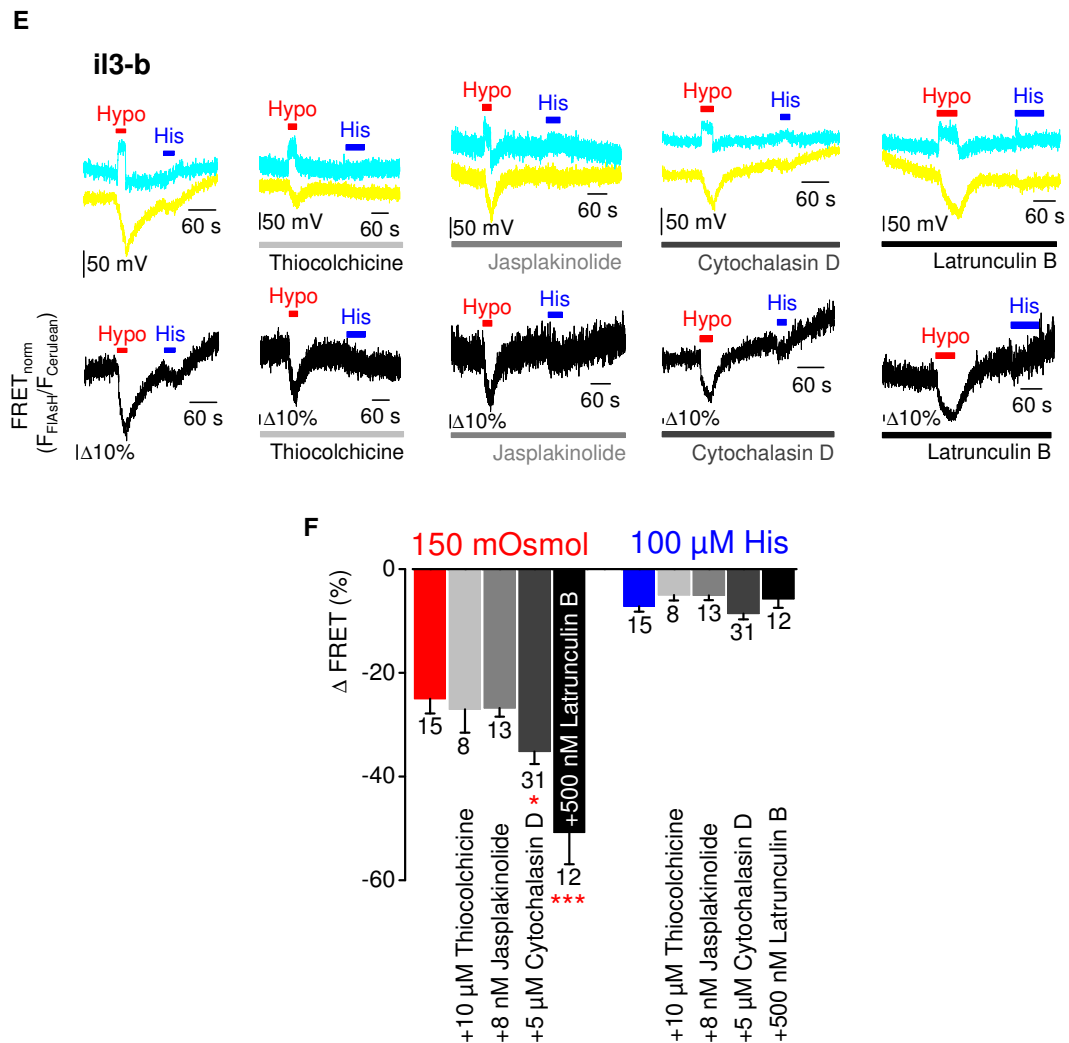
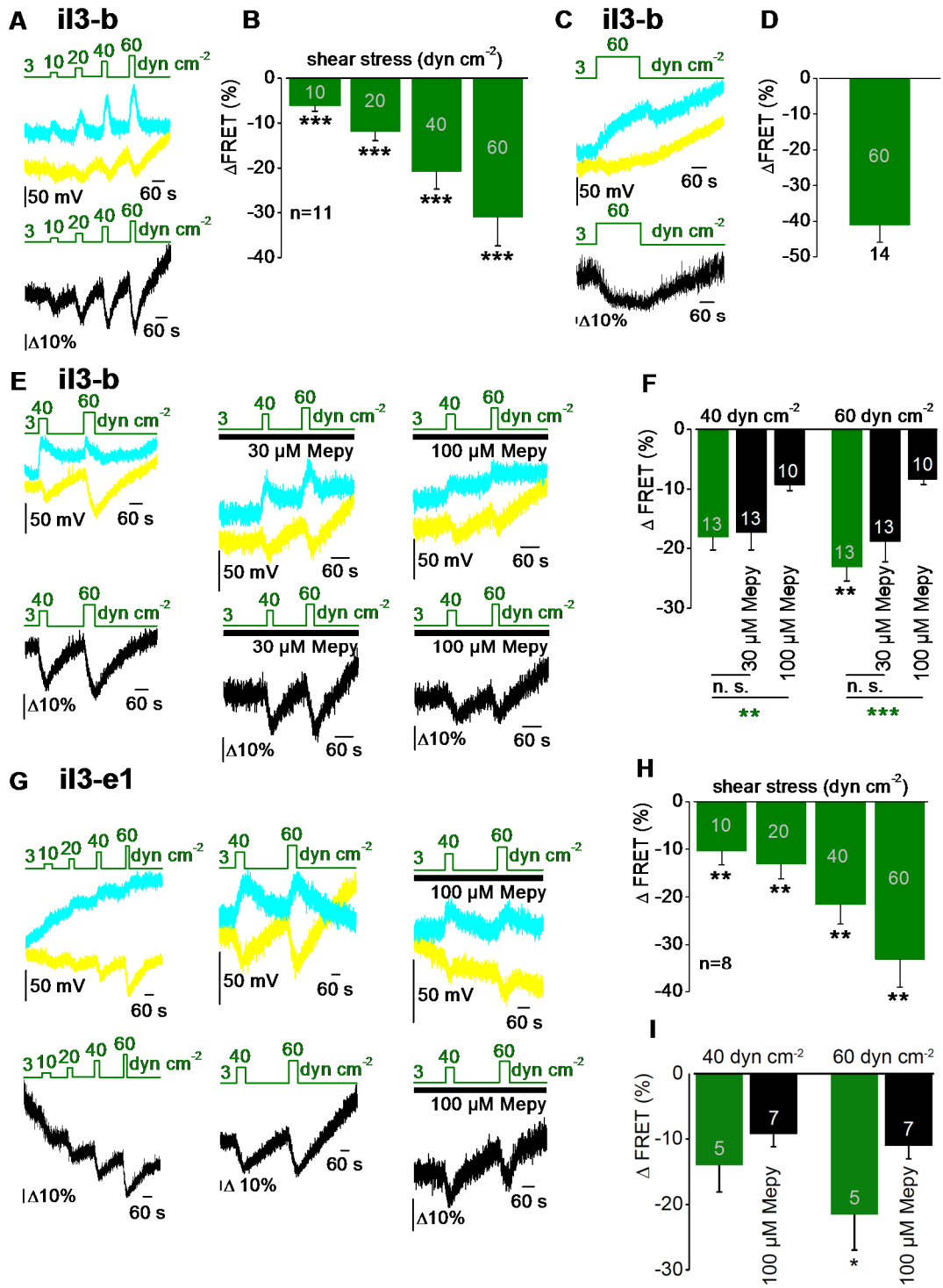


Abbildung 3.15: Verstärkung mechanisch induzierter FRET-Signale unter Verwendung von Zytoskeletthinhibitoren Dynamische FRET-Messungen von FIAsh markierten, monoklonalen HEK293 Zellen mit stabil exprimierenden gpH₁R-Konstrukten (il3-b, il3-m und il3-e1). Die HEK293 Zellen wurden vor jeder Messung mit den Zytoskelett-Modulatoren behandelt (siehe Abbildung 3.13). Wie gezeigt wird, kommt es während einer 100 μM Histaminstimulation (His, blauer Balken) und bei einer mechanischen Aktivierung mit einer hypoosmolaren Lösung (150 mOsm kg⁻¹, Hypo, roter Balken) zu einer Zunahme der türkisen Cerulean-Fluoreszenzspur und zeitgleich zu einer Abnahme der gelben FIAsh-Fluoreszenzspur, was zu einer Abnahme des FRET-Signals (schwarze Spur) führt (A, C, E). Das bedeutet, dass sich die beiden Fluorochrome während einer Agonistenstimulation mit Histamin und bei einer mechanischen Stimulation mit einer hypoosmolaren Lösung voneinander wegbewegen (A, C, E). Die Zusammenfassung der dynamischen FRET-Messungen wird als Säulendiagramm dargestellt (B, D, F). In Abwesenheit der Zytoskelett-Modulatoren werden Histamin induzierte FRET-Signaländerungen in blau, mechanisch induzierte FRET-Signaländerungen in rot angezeigt. In Anwesenheit der Zytoskelett-Modulatoren werden Histamin und mechanisch induzierte FRET-Signaländerungen für Cytochalasin D (Cyto D) in dunkelgrau (A, B, C, D, E, F), für Latrunculin B in schwarz (D, F), für Jasplakinolide in grau (D, F) und für Thiocolchicin in hellgrau (D, F) angezeigt. Zahlen an den Säulen geben die Anzahl der gemessenen HEK293-Zellen auf 30 mm Glasplättchen von mindestens 3 Experimentiertagen an. Es wurden Signifikanzen zwischen den FRET-Signalen der einzelnen gpH₁R-Konstrukte bei einer Histamin Stimulation bzw. bei einer mechanischen Stimulation in An- und Abwesenheit von 5 μM Cytochalasin D mit dem *Kruskal-Wallis Test berechnet (Mittelwert ± SEM, *P < 0.05, **P < 0.01, ***P < 0.001) (B, D). Signifikante Unterschiede wurden zwischen den FRET-Signalabnahmen unter Histamin Stimulation und mechanischer Stimulation in Anwesenheit von 5 μM Cytochalasin D mit dem */*Mann-Whitney-U-Test bestimmt (Mittelwert ± SEM,

*P < 0.05, **P < 0.01, ***P < 0.001) (B, D). Außerdem wurden signifikante Unterschiede bei mechanischer Aktivierung des β -gpH₁R-Konstruktes in Anwesenheit von 500 nM Latrunculin B mit dem *gepaarten Student t Test berechnet (Mittelwert \pm SEM, *P < 0.05, ***P < 0.001) (F).

3.10 Der H₁-Rezeptor ist ein Mechanosensor für Fluss-induzierte Scherkräfte

Als nächstes wurden Fluss-induzierte Scherkräfte als ein physiologischerer mechanischer Stimulus angewendet. Tatsächlich wurden ähnliche Abnahmen der FRET-Signale (siehe Abbildung 3.16 A, E, G, J, L und N) wie mit einer hypoosmotischen Membrandehnung detektiert. Außerdem wurde auch hier eine Korrelation zwischen der Stärke der mechanischen Stimulation und der Erhöhung der FRET-Signalabnahmen beobachtet. Die schrittweise Erhöhung von Scherkräften von 10, 20, 40 und 60 dyn cm⁻² bewirkte eine entsprechende Vergrößerung der FRET-Signalabnahme (siehe Abbildung 3.16 A, B, G, H, L und M). Darüber hinaus wurden durch Scherkräfte induzierte FRET-Signale, die durch 40 und 60 dyn cm⁻² hervorgerufen wurden, durch den inversen Agonisten Mepyramin (100 μ M) signifikant unterdrückt (siehe Abbildung 3.16 E, F, G, I, J, K, N, und O). 30 μ M Mepyramin reduziert die mechanische Rezeptoraktivierung nur partiell. Wohingegen 100 μ M Mepyramin zu einer signifikanten Reduktion der mechanisch induzierten FRET-Antwort führte (siehe Abbildung 3.16 F, I, K und O). Auch eine permanente Applikation von 60 dyn cm⁻² inaktiviert den gpH₁-Rezeptor nicht (siehe Abbildung 3.16 C und D). Das bedeutet, dass der gpH₁-Rezeptor intrinsisch mechanosensitiv ist und Scherkräfte direkt wahrnehmen kann. Daher könnten H₁-Rezeptoren eine physiologische Rolle als Mechanosensoren für Fluss-induzierte Scherkräfte spielen.



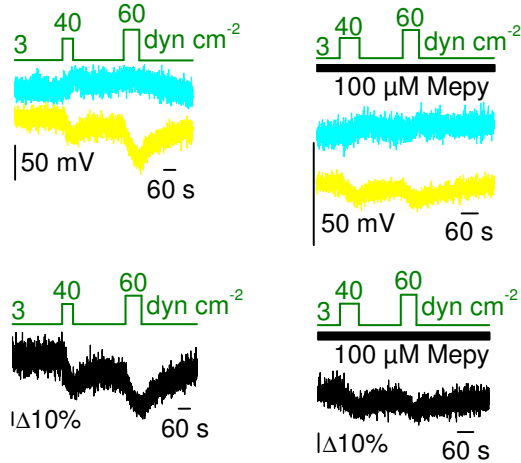
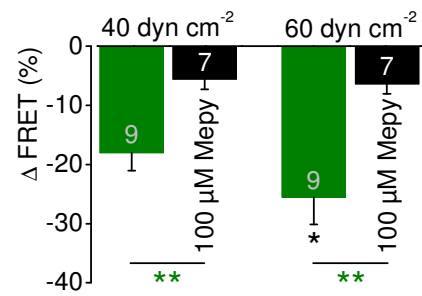
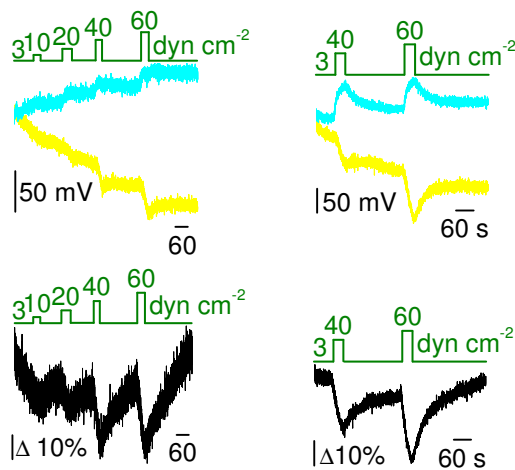
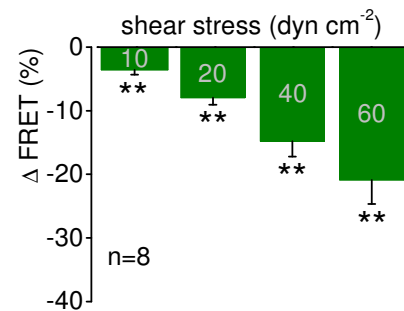
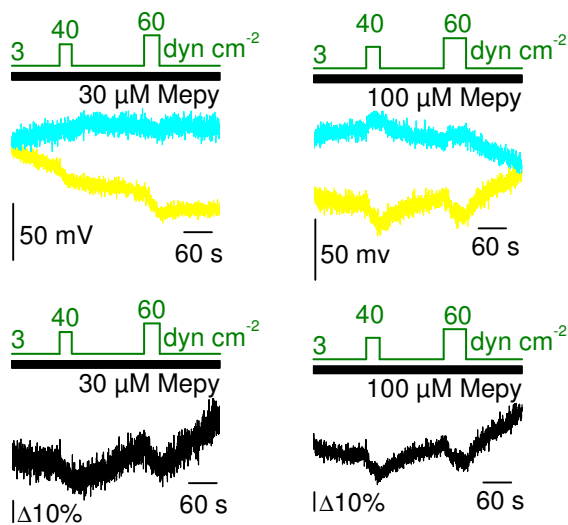
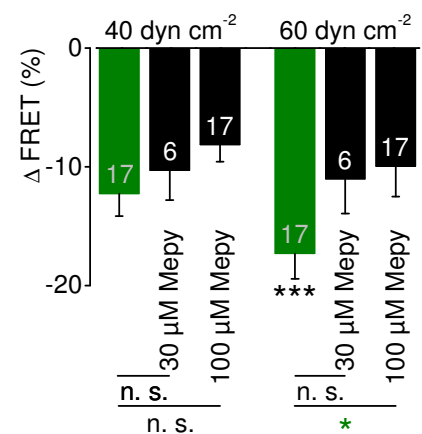
J ct-b**K****L mut-il3-b****M****N mut-il3-b****O**

Abbildung 3.16: Der H₁-Rezeptor wird durch Fluss-induzierte Scherkräfte aktiviert Dynamische FRET-Messungen von FIAsh markierten, monoklonalen HEK293 Zellen mit stabil exprimierenden gpH₁R-Konstrukten (il3-b, il3-e1, ct-b und mut-il3-b). Die Applikation von definierten Fluss-induzierten Scherkräften (10, 20, 40 und 60 dyn cm⁻², grüne Spur) zu einer basalen Scherkraft von 3 dyn cm⁻² führt zur Zunahme der türkisen Cerulean-Fluoreszenzspur und zeitgleich zu einer Abnahme der gelben

FIAsh-Fluoreszenzspur, was in einer Abnahme des FRET-Signals (schwarze Spur) resultiert (A, C, E, G, J, L, N). Das bedeutet, dass sich die beiden Fluorochrome bei einer direkten Applikation von Scherkräften voneinander wegbewegen. In Anwesenheit des spezifischen inversen Agonisten Mepyramin (schwarzer Balken über der FRET-Spur) sind die FRET-Signale reduziert (A, C, E, G, J, L, N). Die Zusammenfassung der dynamischen FRET-Messungen wird als Säulendiagramm dargestellt (B, D, F, H, I, K, M, O). Mechanisch induzierte FRET-Signale werden in grün, in Gegenwart des spezifischen inversen Agonisten Mepyramin (30 μM bzw. 100 μM) in schwarz angezeigt. Zahlen an den Säulen geben die Anzahl der gemessenen Zellen in PLL beschichteten Scherkräftekammern von ibidi ($\mu\text{-Slide 1}^{\text{0.4}}$ Luer ibiTreat, Martinsried, Deutschland) von mindestens 3 Experimentiertagen an. Es wurden signifikante Unterschiede zwischen den FRET-Signalabnahmen bei zunehmender mechanischer Stimulation mit steigenden Scherkräfteträgen (10, 20, 40 und 60 dyn cm^{-2}) mit der *ANOVA berechnet (Mittelwert \pm SEM, **P < 0.01) (B, H, M). In Gegenwart von 100 μM Mepyramin waren die FRET-Signale bei mechanischer Aktivierung mit Scherkräfteträgen von 40 und 60 dyn cm^{-2} mit dem ungepaarten *Student t Test (Mittelwert \pm SEM, **P < 0.01, ***P < 0,001) (F, K) und mit dem *Mann Whitney Test (Mittelwert \pm SEM *P < 0,05) (O) signifikant unterschiedlich. Auch wurden in Abwesenheit des inversen Agonisten Mepyramin signifikante Unterschiede zwischen den FRET-Signalen mit Scherkräfteträgen von 40 und 60 dyn cm^{-2} mit dem *gepaarten Student t test (Mittelwert \pm SEM, *P < 0,05, **P < 0,01) (F, I, K) und mit dem *gepaarten Wilcoxon-Vorzeichen-Rang Test (Mittelwert \pm SEM *P < 0,05) (O) berechnet.

3.11 Der endotheliale H_1 -Rezeptor ist mechanosensitiv für Fluss-induzierte Scherkräfte

Um herauszufinden, ob H_1 -Rezeptoren Mechanosensoren für Fluss-induzierte Scherkräfte in Endothelzellen sind, wurden ratiometrische Kalziummessungen mit Fura-2 an HUVEC und HAoEC durchgeführt (siehe Abschnitt 2.9). Die Perfusionsströmung mit einer Fluss-induzierten Scherkraft von $\tau = 4 \text{ dyn cm}^{-2}$ verursacht eine signifikante Erhöhung der intrazellulären Kalziumkonzentration in HUVEC (siehe Abbildung 3.17 C und F). Eine sprunghafte Erhöhung der Scherkraft von $\tau = 4 \text{ dyn cm}^{-2}$ auf $\tau = 20 \text{ dyn cm}^{-2}$ führt zu einem weiteren transienten Kalziumanstieg (siehe Abbildung 3.17 C und F), was darauf hindeutet, dass Endothelzellen mechanosensitiv gegenüber adäquaten Fluss-induzierten Scherkräften sind. Um zu zeigen, dass Endothelzellen endogene H_1 -Rezeptoren exprimieren, wurde immer Histamin (100 μM) als ein dritter Stimulus appliziert (siehe Abbildung 3.17 C und F). Sowohl Histamin als auch Fluss-induzierte Scherkräfte erzeugen vorübergehende transiente intrazelluläre Kalziumzunahmen in HUVEC (siehe Abbildung 3.17 C), die darauf hindeuten, dass HUVEC endogene H_1 -Rezeptoren exprimieren und sensitiv auf Fluss-induzierte Scherkräfte reagieren. Darüber hinaus unterdrückt der inverse Agonist Mepyramin größtenteils durch Scherkraft erzeugte Kalziumsignale (siehe Abbildung 3.17 C und F). Endogen exprimierter humaner H_1 -Rezeptor ist auch sensitiv gegenüber hypoosmotischer Membrandehnung, die durch kurzzeitige Applikation ($t \leq 60 \text{ s}$) einer hypoosmolaren Lösung (150 mOsm kg^{-1}) (siehe Abbildung 3.17 A und B) induziert wurde, ähnlich zum heterolog überexprimiertem gpH_1 -Rezeptor (siehe Abbildung 3.3 B). Gleichermaßen unterdrückt Mepyramin vollständig hypoosmotisch induzierte Kalziumtransienten (siehe Abbildung 3.17 A und B), was darauf hinweist, dass endogen exprimierte humane H_1 -Rezeptoren intrinsisch mechanosensitiv sind und Mechanosensoren für Fluss-induzierte Scherkräfte in primären Endothelzellen sind.

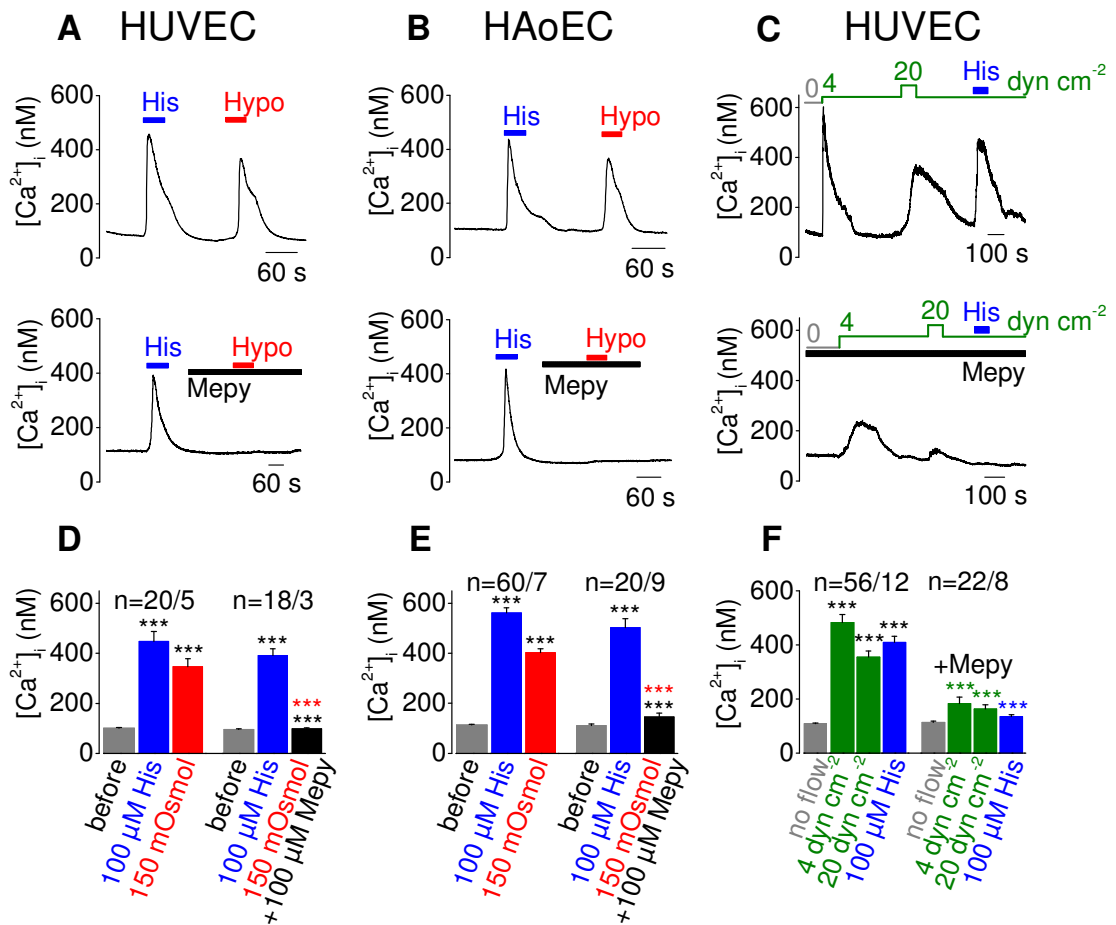


Abbildung 3.17: Im Endothel endogen exprimierter H₁-Rezeptor ist Mechanosensor für Fluss-induzierte Scherkräfte Fluorimetrische Kalziummessungen von primären humanen Endothelzellen aus der Nabelschnurvene (HUVEC = *Human Umbilical Vein Endothelial Cells*) und von primären Endothelzellen der menschlichen Aorta (HAoEC = *Human Aortic Endothelial Cells*). Die Endothelzellen wurden 24 Stunden nach Aussäen auf 24 mm Glasplättchen oder in Gelatine (Sigma-Aldrich, # G9391, Taufkirchen) beschichtete Scherkräftekammern (μ -Slide^{10.4} Luer ibiTreat, Martinsried, Deutschland) für jeweils 10 Minuten mit 5 μ M Fura-2-AM beladen. Die Perfusion mit 100 μ M Histamin (His, blauer Balken) führte zu signifikanten intrazellulären Kalziumzunahmen (A, B, C). Die Applikation einer hypoosmolaren Lösung (150 mOsm kg⁻¹, Hypo, roter Balken) für jeweils 1 Minute führte zu signifikanten transienten intrazellulären Kalziumerhöhungen [Ca²⁺]_i, die in Gegenwart von 100 μ M Mepyramin (Mepy) unterdrückt werden konnten (A, B). Es wird je eine repräsentative Spur der intrazellulären Kalziumkonzentration [Ca²⁺]_i (nM) während der Applikation von 100 μ M Histamin (His, blauer Balken), bei einer hypoosmotisch induzierten Membrandehnung mit einer hypoosmolaren Lösung (150 mOsm kg⁻¹, Hypo, roter Balken) (A, B) sowie bei den beiden angelegten Scherkräfteträgern ($\tau = 4$ dyn cm⁻², $\tau = 20$ dyn cm⁻², grüne Spur) angezeigt (C). Die Zusammenfassung aller fluorimetrischen Kalziummessungen wird als Säulendiagramm dargestellt. Die grauen Säulen zeigen die basale intrazelluläre Kalziumkonzentration (before, no flow) vor der Stimulation mit Histamin bzw. mit einer Scherkraft von $\tau = 4$ dyn cm⁻². Die blauen Säulen zeigen den maximalen Kalziumanstieg [Ca²⁺]_i bei einer Histaminstimulation (100 μ M His). Die roten Säulen zeigen die Kalziumzunahme bei einer mechanischen Stimulation mit einer hypoosmolaren Lösung (150 mOsmol). Die schwarzen Säulen zeigen den Kalziumanstieg bei einer mechanischen Stimulation in Anwesenheit des inversen Agonisten Mepyramin (150 mOsmol+100 μ M Mepy). Die grünen Säulen repräsentieren den intrazellulären Kalziumanstieg [Ca²⁺]_i bei einer mechanischen Stimulation mit Fluss-induzierten Scherkräften ($\tau = 4$ dyn cm⁻², $\tau = 20$ dyn cm⁻²). Alle Endothelzellen mit Ausgangskalziumkonzentrationen von $80 \text{ nM} \leq [\text{Ca}^{2+}]_i \leq 150 \text{ nM}$ wurden für die Gesamtauswertung nicht mitberücksichtigt. Es wurden nur Zellen mit Kalziumzunahmen von $[\text{Ca}^{2+}]_i \geq 20 \text{ nM}$ zur basalen Kalziumkonzentration ausgewertet. Die

Zahlen an den Säulen geben die Anzahl der gemessenen Endothelzellen auf 24 mm Glasplättchen oder in Scherkräftekammern aus mindestens 3 Experimentiertagen an. Die Signifikanz wurde zwischen der Erhöhung der intrazellulären Kalziumkonzentrationen unter Histaminstimulation bzw. mechanischer Stimulation mit hypoosmolarer Lösung (150 mOsm kg⁻¹) oder mit Fluss-induzierten Scherkräften ($\tau = 4 \text{ dyn cm}^{-2}$, $\tau = 20 \text{ dyn cm}^{-2}$) zur basalen Anfangskalziumkonzentration mit dem *Wicoxon-Vorzeichen-Rang-Test (Mittelwert \pm SEM, ***P < 0,001) (D, E, F) berechnet. Außerdem waren die Kalziumsignale in Gegenwart des inversen Agonisten Mepyramin (100 μ M) signifikant reduziert (Mann-Whitney-U-Test, Mittelwert \pm SEM, ***P < 0,001) (D, E, F).

3.12 Die C-terminale Helix 8 als das entscheidende mechanosensorische Strukturelement von G_{q/11}-Protein gekoppelten Rezeptoren

Überraschenderweise sind nicht alle GPCR mechanosensitiv. Um für die Mechanosensitivität der GPCR wichtige strukturelle Motive im Rezeptor zu identifizieren, wurden mechanosensitive und nicht mechanosensitive GPCR hinsichtlich ihrer Sekundärstruktur verglichen. Interessanterweise zeigen die beiden G_{q/11}-Protein gekoppelten humanen GPCR, der NTS₁R²²⁶ und der GnRHR²²⁷ keine Kalziumzunahmen (siehe Abbildung 3.19 A und F) in ratiometrischen Kalziummessungen mit Fura-2 (siehe Abschnitt 2.9) bei einer mechanischen Stimulation mit einer hypoosmolaren Lösung (150 mOsm kg⁻¹), zeigen jedoch immer noch prominente Kalziumzunahmen bei einer Agonistenstimulation²²⁸ (siehe Abbildung 3.19 A und F). Diese Rezeptoren unterscheiden sich von den mechanosensitiven GPCR (siehe unter Abschnitt 1.6.7) wie den H₁-, AT₁-, M₅-, ET_A- oder CysLT₁-Rezeptoren darin, dass ihnen eine C-terminale achte Helix („Helix 8“) (Abbildung 3.18 A und B) als Sekundärstruktur fehlt (Millar et al., 2004; White et al., 2012; Flanagan und Manilall, 2017). Es handelt sich um eine 1 bis 4 Windungen kurze Helix (siehe Abbildung 3.18 A), die sich am Anfang des C-Terminus von vielen GPCR befindet und senkrecht, perpendicular zu den anderen sieben Transmembrandomänen (TM1-TM7), aber parallel und proximal zur Zellmembran liegt (Huynh et al., 2009).

²²⁶ Abkürzung NTS₁R steht für den **Neurotensinrezeptor Typ 1**. Der G_{q/11}-Protein gekoppelte NTS₁R ist an verschiedenen physiologischen und pathophysiologischen Prozessen (Mustain et al., 2011) wie z. B. bei einem erniedrigten Blutdruck (Hypotonie), bei der Opioid-unabhängigen Analgesie (Antinozizeption) (Boules et al., 2013), bei einer erniedrigten Körpertemperatur (Hypothermie), bei der Nahrungsmittelaufnahme (Remaury et al., 2002; St-Gelais et al., 2006; Fredrickson et al., 2014), bei der Blutzuckerregulation (Mazella et al., 2012), bei gastrointestinalem Tumorwachstum (Wu et al., 2012; Qiu et al., 2017) und bei der Regulation der Darmmotilität (Katsanos et al., 2008) beteiligt.

²²⁷ Abkürzung GnRHR vom Englischen **Gonadotropin-releasing hormone receptor**. Der in der Hirnanhangdrüse (Hypophyse) exprimierte G_{q/11}-Protein gekoppelte GnRHR spielt eine zentrale Rolle bei der Reproduktion von Säugetieren (Janjic et al., 2017).

²²⁸ Für eine 100 μ M Neurotensinacetat-Stammlösung wurde 1 mg Neurotensinacetat (# N6383, Sigma Aldrich, Schnelldorf, Deutschland) in 5,978 ml Reinstwasser gelöst, direkt zu 500 μ M-Aliquots portioniert und lichtgeschützt bei -20°C gelagert. Für eine 200 nM Neurotensin Arbeitskonzentration wurde die Stammlösung 1:500 in der Badlösung verdünnt. Für eine 400 μ M Gonadoliberin-Stammlösung wurde 1 mg Gonadoliberin (# L7134, Sigma Aldrich, Schnelldorf, Deutschland) in 2.115 ml Reinstwasser gelöst, direkt zu 100 μ M-Aliquots portioniert und lichtgeschützt bei -20°C gelagert. Für eine 200 nM Gonadoliberin Arbeitskonzentration wurde die Stammlösung 1:500 in der Badlösung verdünnt.

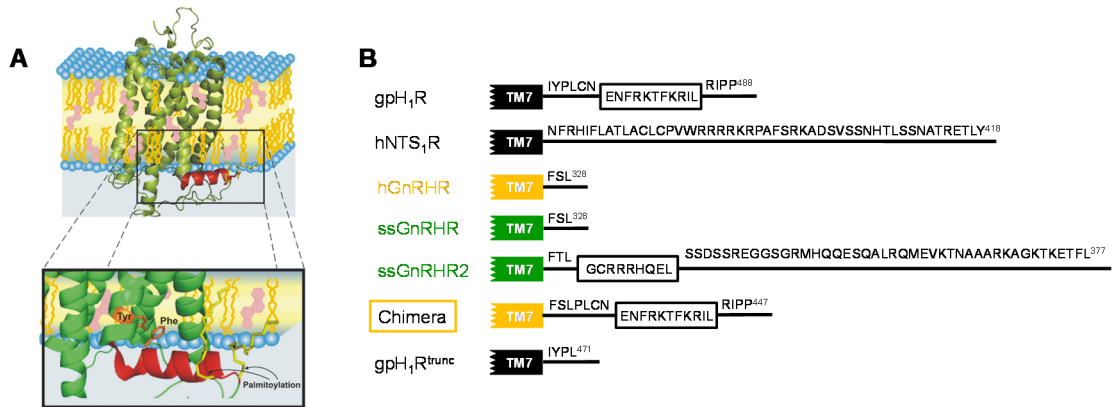


Abbildung 3.18: Die räumliche Anordnung der Helix 8 in der Lipid-Doppelschicht (A) und die Aminosäuresequenzen der C-Termini untersuchter GPCR (B) Lipid-Doppelschicht mit transmembranärem Rinder Rhodopsinrezeptor (grün), wo hydrophile Köpfe in blau und hydrophobe, lipophile Fettsäurereste in gelb dargestellt sind. Cholesterin-Moleküle (rosa) sind in die Lipid-Doppelschicht eingebettet. In der Seitenaufsicht ist die Struktur vom Rinder Rhodopsinrezeptor (PDB ID: 1U19) dargestellt, die die sieben Transmembrandomänen mit miteinander verbundenen intrazellulären und extrazellulären Schleifen zeigt. Die Helix 8 liegt perpendicular zu den anderen sieben Transmembrandomänen, aber parallel und proximal zur Lipid-Doppelschicht. Die konservierten aromatischen Aminosäurereste des Tyrosins (Tyr) der TM7 und des Phenylalanins (Phe) der Helix 8 sind als oranges Stäbchenmodell hervorgehoben. Es wird angenommen, dass die amphiphile Helix 8 (rot) mit den negativ geladenen Phospholipiden wie z. B. mit PIP₂ der Lipid-Doppelschicht wechselwirkt und dadurch die Rezeptorfunktion beeinflusst. Posttranslationelle Modifikationen wie z. B. die Palmitoylierung (schwarze Pfeile, "Palmitoylation"), dargestellt als gelbes Stäbchenmodell, dient zur Verankerung der Helix 8 an der zytosolischen Seite der Lipid-Doppelschicht (Huynh et al., 2009). Abbildung aus der Vorlage von John Huynh et al. (2009) *Molecular and Cellular Endocrinology* **302**:118–127. Die Aminosäuresequenzen der C-Termini vom H₁-Rezeptor des Meerschweinchens (gpH₁R), vom humanen NTS₁-Rezeptor hNTS₁R), vom humanen GnRH-Rezeptor (hGnRHR), der kurzen und langen Isoformen des GnRH-Rezeptors des Hausschweines (ssGnRHR und ssGhRHR2), vom C-terminal gekürztem H₁-Rezeptor des Meerschweinchens (gpH₁R^{trunc}) und der Rezeptor-Chimäre (Chimera), bestehend aus dem mit dem C-Terminus des gpH₁R fusioniertem hGnRHR (B). Die Transmembrandomäne 7 (TM7) wird figurativ ohne eine Aminosäuresequenz angezeigt. Die Aminosäuresequenz einer α -helikalen Helix ist eingerahmt (Rechteck). Die Aminosäuresequenz des C-Terminus beginnt mit Isoleucin an der Position 468 im Fall des gpH₁R, mit Phenylalanin an Position 326 im Fall des hGnRHR, im Fall des ssGnRHR und im Fall der Rezeptor-Chimäre, mit Phenylalanin an Position 323 im Fall des ssGnRHR2. Die angegebene Zahl gibt die Nummer der letzten Aminosäure an.

Die Rolle der Helix 8 bei der Mechanosensitivität von GPCR wurde bisher nicht näher untersucht. Es wurde jedoch eine Beteiligung der Helix 8 an der Protein/Lipid-Wechselwirkung, der Rezeptor-Internalisierung, der Dimerisierung oder der Kopplung an G-Proteine diskutiert (Sato et al., 2016; Sato, 2019). Bemerkenswerterweise gibt es zwei verschiedene GnRHR-Isoformen des Hausschweines *Sus scrofa* (ss) (Roch et al., 2014), eine C-terminal kurze, ohne eine Helix 8 (ssGnRHR) und eine C-terminal lange mit einer Helix 8 (ssGnRHR2) (siehe Abbildung 3.18 B). Während die kurze ssGnRHR-Isoform (siehe Abbildung 3.19 B) keine Kalziumzunahmen unter mechanischer Stimulation mit einer hypoosmolaren Lösung (150 mOsm kg⁻¹) zeigt, reagiert die lange ssGnRHR2 mit einer C-terminalen Helix 8 auf mechanische Stimulation mit deutlichen Kalziumtransienten (siehe Abbildung 3.19 C). Das bedeutet, dass die kurze ssGnRHR-Isoform nicht mechanosensitiv ist. Um zu zeigen, dass die GnRH-Rezeptoren in HEK293-Zellen exprimiert werden und in die

Zellmembran inserieren, wurden jeweils der GnRH-Superagonist Leuprolid²²⁹ (200 nM) und das endogene hypothalamische Hormon Gonadoliberin (200 nM) als Positivkontrollen in ratiometrischen Kalziummessungen mit Fura-2 verwendet (siehe Abbildung 3.19 A-D). Diese Ergebnisse führten zur Hypothese, dass die Helix 8 ein wesentliches Strukturmotiv für mechanosensitive GPCR sein könnte. Daraufhin wurde eine Rezeptor-Chimäre aus dem nicht mechanosensitiven menschlichen GnRHR und dem C-Terminus des mechanosensitiven gpH₁-Rezeptor mit einer Helix 8 erzeugt (siehe Abbildung 3.18 B). Diese Rezeptor-Chimäre ist funktionell und zeigt Kalziumzunahmen sowohl bei mechanischer Stimulation mit hypoosmolarer Lösung (150 mOsm kg⁻¹) als auch bei Agonisten Stimulation mit 200 nM Gonadoliberin (Abbildung 3.19 D), was darauf hinweist, dass die Übertragung der C-terminalen Helix 8 ausreichend ist, um einen ursprünglich nicht mechanosensitivem Rezeptor (hGnRHR) mechanosensitive Eigenschaften zu verleihen. Darüber hinaus wurde die Helix 8 durch eine Kürzung des C-Terminus aus dem gpH₁-Rezeptor entfernt (siehe Abbildung 3.18 B). Der um die Helix 8 gekürzte gpH₁-Rezeptor ist unempfindlich gegenüber mechanischer Stimulation mit hypoosmolarer Lösung (150 mOsm kg⁻¹), reagiert jedoch immer noch auf eine Histaminstimulation mit deutlichen Kalziumtransienten (siehe Abbildung 3.19 E), wodurch erneut die Hypothese der Helix 8 als strukturelles Merkmal für mechanosensitive GPCR gestützt wird. Außerdem konnte gezeigt werden, dass die Agonisten-Aktivierung notwendigerweise keine Helix 8 braucht (siehe Abbildung 3.19 A, B, E und F).

²²⁹ Für eine 400 µM Leuprolid-Stammlösung wurde 1 mg Leuprolid (# 2873, Tocris, Bristol, United) in 2.067 ml Reinstwasser gelöst, direkt zu 100 µM-Aliquots portioniert und lichtgeschützt bei -20°C gelagert. Für eine 200 nM Leuprolid Arbeitskonzentration wurde die Stammlösung 1:2000 in der Badlösung verdünnt. Leuprolid ist ein 9 Aminosäuren langes Peptid, das als GnRH-Analogen die Sexualhormonproduktion senkt und zur Behandlung von hormonabhängigen Tumoren eingesetzt wird (Wilson et al., 2007). Siehe unter <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Leuprorelin>. Letzter Aufruf erfolgte am 05.07.2019.

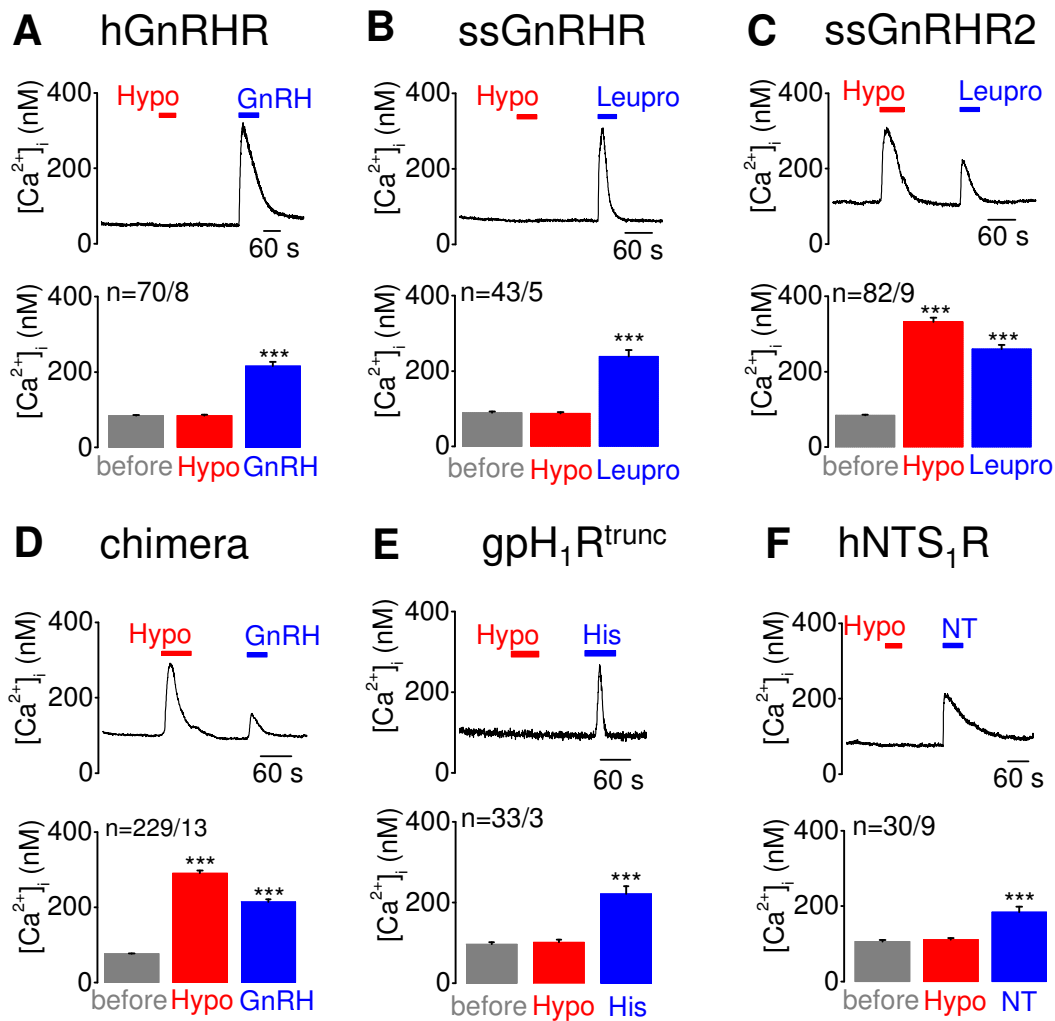


Abbildung 3.19: Helix 8 als das entscheidende mechanosensorische Strukturelement von G_{q/11}-gekoppelten Rezeptoren Ratiometrische Kalziummessungen mit Fura-2 an HEK293-Zellen, die jeweils mit 1 µg Plasmid-DNA der GnRH-Rezeptor (hGnRHR = pcDNA3 [157], ssGnRHR = ssGnRHR pcDNA3.1-C-(k)DYK [542], ssGnRHR2 = ssGnRHR2 pcDNA3.1-C-(k)DYK [543], chimera = hGnRH-gpH₁CtShort20 pcDNA3.1 (+) [553]) und mit 3xHA hNTS₁R pcDNA3.1(+) [598] für 24 Stunden transfiziert wurden. Wenn das Rezeptorkonstrukt nicht mit Cerulean fusioniert ist, wurden zudem noch 0,2 µg pEYFP-N1 [234] zur Sichtbarmachung der erfolgreichen Transfektion co-transfiziert. Bei Transfektionen mit dem C-Terminus gekürztem gpH₁-Rezeptor (gpH₁R^{trunc} = gpH₁R-C472Stop pcDNA3.1(+)) [557]) wurden die HEK293-Zellen mit 1 µg G_{αq} pcDNA [183] co-transfiziert (E). Nach 24 Stunden wurden die HEK293 Zellen für 10 Minuten mit 5 µM Fura-2-AM beladen. Die Applikation von einer hypoosmolaren Lösung (150 mOsm kg⁻¹, Hypo, roter Balken) für jeweils eine Minute führte nur bei der langen Isoform ssGnRHR2 (C) und bei der Rezeptor-Chimäre (D) zu signifikanten transienten Kalziumerhöhungen. Es wurden keine intrazellulären Kalziumerhöhungen für den hGnRHR (A), für die kurze ssGnRHR Isoform (B), für den C-terminus gekürzten gpH₁R^{trunc} (E) und für den hNTS₁R mit keiner C-terminalen Helix 8 (F), detektiert. Als Positivkontrollen wurden 200 nM Gonadoliberin (GnRH, blauer Balken), 200 nM Leuprolid (Leupro, blauer Balken) und 100 µM Histamin (His, blauer Balken) appliziert, das zu prominenten intrazellulären Kalziumzunahmen führte (A, B, C, D). Für jedes Rezeptorkonstrukt wird eine repräsentative Spur der intrazellulären Kalziumkonzentration [Ca²⁺]_i (nM) mit den angegebenen Applikation von einer hypoosmolaren Lösung (150 mOsm kg⁻¹, Hypo, roter Balken), 200 nM Gonadoliberin (GnRH, blauer Balken), 200 nM Leuprolid (Leupro, blauer Balken), 100 µM Histamin (His, blauer Balken) sowie 200 nM Neurotensin (NT, blauer Balken) angezeigt (A, B, C, D, F). Die Zusammenfassung aller Kalziummessungen unterschiedlicher Rezeptorkonstrukte wird als Säulendiagramm dargestellt. Die grauen Säulen zeigen die basale Kalziumkonzentration [Ca²⁺]_i (nM) vor der Stimulation mit hypoosmolarer Lösung, die blauen Säulen

die maximale Kalziumkonzentration $[Ca^{2+}]_i$ (nM) während der Agonistenstimulation und die roten Säulen während einer mechanischen Stimulation mit einer hypoosmolaren Lösung. Alle HEK293-Zellen mit Ausgangskalziumkonzentrationen von $[Ca^{2+}]_i \geq 150$ nm und maximalen Kalziumzunahmen $[Ca^{2+}]_i \leq 120$ nm wurden für die Gesamtauswertungen nicht mitberücksichtigt. Die Zahlen neben der Ordinate geben die Anzahl der gemessenen HEK293-Zellen von verschiedenen Transfektionen auf 24 mm Glasplättchen aus mindestens 3 Experimentiertagen an. Die Signifikanzen wurde zwischen der Erhöhung der Kalziumkonzentration $[Ca^{2+}]_i$ (nM) unter mechanischer Stimulation zur basalen Kalziumkonzentration und zwischen der Zunahme der Kalziumkonzentration bei Agonistenstimulation zur basalen Kalziumkonzentration mit dem *Wilcoxon-Vorzeichen-Rang-Test (Mittelwert \pm SEM, ***P < 0,001) berechnet (A, B, C, D). Die Zahlen in eckiger Klammer repräsentieren die Plasmidnummer für jedes im Labor zur Verfügung stehende Plasmid DNA.

3.13 PIP₂-Verarmung der Zellmembran reduziert die mechanische Rezeptoraktivierung des Histamin H₁-Rezeptors

In der Literatur wird gezeigt, dass auch eine im Angiotensin II AT₁-Rezeptor vorhandene amphiphile Helix 8 ein hochaffines Peptidmotiv für saure Phospholipide wie PIP₂ der Zellmembran besitzt (Hirst et al., 2015). Um herauszufinden, ob Phosphatidylinositolphosphate wie z. B. PIP₂ in der Zellmembran mit basischen Aminosäuren der C-terminalen Helix 8 wechselwirken und die mechanische Rezeptoraktivierung beeinflussen, wurde Wortmannin, ein PI3K²³⁰-Inhibitor und Myosin-leichte-Ketten-Kinase-Inhibitor bei niedrigen (< 100 nM) und ein PI4K²³¹-Inhibitor bei sehr hohen Konzentrationen (20 μ M), eingesetzt. Nur die Inhibition von PI4K durch 20 μ M Wortmannin²³² führte zur PIP₂-Entleerung der HEK293-Zellmembran. Die Auswirkung der PIP₂-Entleerung auf die mechanische Stimulation des gpH₁-Rezeptors wurde mit FIAsH markierten stabilen HEK293-Zellen mit dem ct-b gpH₁R-Konstrukt durchgeführt, die für jeweils 10 Minuten mit 20 μ M Wortmannin inkubiert und mit Hilfe der FRET-Photometrie gemessen wurden. Mechanisch induzierte FRET-Signale waren in PIP₂-verarmten HEK293-Zellen sowohl unter einer hypoosmotischen Membrandehnung (150 mOsm kg⁻¹) als auch unter Fluss-induzierten Scherkräften (40 und 60 dyn cm⁻²) signifikant reduziert (siehe Abbildung 3.20 C, F, D und G). Des Weiteren wurde der Einfluss von Wortmannin auf die Transduktion bzw. den Rezeptorzustand des gpH₁ Rezeptors erforscht, indem unbehandelte mit FIAsH markierte HEK293-Zellen mit 100 nM bzw. mit 20 μ M Wortmannin (siehe Abbildung 3.20 A und B) perfundiert wurden. Die Messung des ct-b Konstrukts ergab, dass die Anwendung von 20 μ M Wortmannin, jedoch nicht von 100 nM Wortmannin einen Anstieg des FRET-Signals verursacht (siehe Abbildung 3.20 A und D), was darauf hindeutet, dass eine PIP₂-Verarmung der HEK293-Zellmembran eine Transduktion des gpH₁-Rezeptors in einen inaktiven Rezeptorzustand induziert. Es wurden keine

²³⁰ Abkürzung PI3K steht für Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat-3-kinase = Phosphoinositid-3-kinase

²³¹ Abkürzung PI4K steht für Phosphoinositid-4-kinase

²³² Für eine 20 mM Wortmannin-Stammlösung wurde 1 mg Wortmannin (# W1628, Sigma-Aldrich, Steinheim) in 116,71 μ l DMSO gelöst, direkt zu 10 μ M-Aliquots portioniert und lichtgeschützt bei -20°C gelagert. Für die Arbeitskonzentration wurde die Stammlösung 1:1000 in der Badlösung verdünnt.

signifikanten Unterschiede der mechanisch induzierten FRET-Signale bei der Perfusion mit 100 nM Wortmannin ermittelt (siehe Abbildung 3.20 D). Diese FRET-Ergebnisse weisen darauf hin, dass die Wechselwirkung der basischen Aminosäuren des gpH₁-Rezeptors mit dem Phospholipid PIP₂ der Zellmembran von wesentlicher Bedeutung für die Mechanosensitivität von GPCR ist.

ct-b

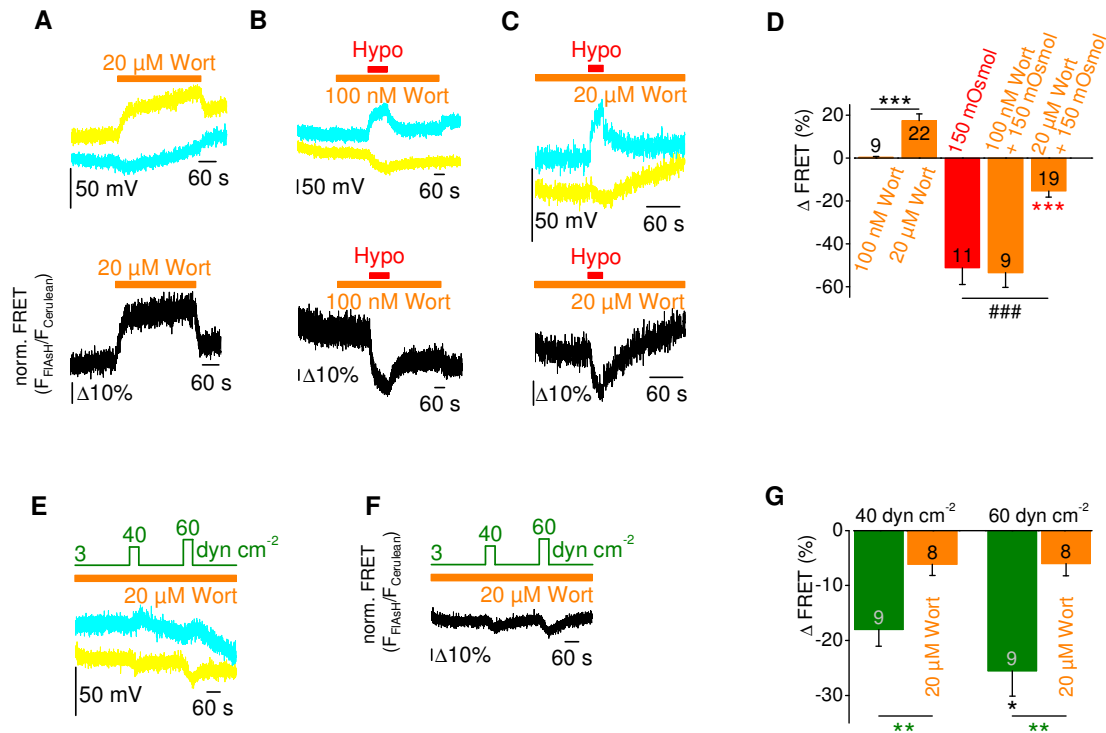


Abbildung 3.20: PIP₂-Mangel der HEK293-Zellmembran reduziert die mechanische Rezeptoraktivierung Dynamische FRET-Messungen von FIAsh markierten, monoklonalen HEK293-Zellen mit dem stabil exprimierenden ct-b gpH₁R-Konstrukt. Wie gezeigt wird, kommt es bei Wortmannin (100 nM, 20 µM) behandelten HEK293-Zellen sowohl während einer Perfusion mit einer hypoosmolaren Lösung (150 mOsm kg⁻¹, Hypo, roter Balken) (B,C) als auch bei Applikation von festgelegten Scherkraftbeträgen von 40 und 60 dyn cm⁻² (40, 60 dyn cm⁻², grüne Spur) (E) zu einer Zunahme der türkisen Cerulean-Fluoreszenzspur und zeitgleich zu einer Abnahme der gelben FIAsh-Fluoreszenzspur (B,C,E), was in einer Abnahme des FRET-Signals (schwarze Spur) resultiert (B, C, F). Wohingegen die alleinige Applikation von 20 µM Wortmannin zu einer Zunahme des FRET-Signals führt (F), das in einer Abnahme der türkisen Cerulean Fluoreszenzspur und in einer Zunahme der gelben FIAsh Fluoreszenzspur begründet liegt (A). Die Zusammenfassung der dynamischen FRET-Messungen wird als Säulendiagramm dargestellt (D, G). Zahlen an den Säulen geben die Anzahl der gemessenen Zellen auf 30 mm Glasplättchen (D) oder in mit PLL beschichteten Scherkräftekammern von ibidi (µ-Slide I^{0.4} Luer ibiTreat, Martinsried, Deutschland) (G) von mindestens 3 Experimentiertagen wieder. Es wurden signifikante Unterschiede zwischen den FRET-Signalen in Anwesenheit von Wortmannin (20 µM) bei mechanischer Stimulation mit hypoosmolarer Lösung (150 mOsm kg⁻¹) oder mit definierten Scherkraftbeträgen (40 und 60 dyn cm⁻²) mit dem */*ungepaarten Student t Test (Mittelwert ± SEM, **P < 0,01, ***P < 0,001) und mit der #ANOVA (Mittelwert ± SEM ###P < 0,001) (D, G) berechnet. In Abwesenheit von Wortmannin wurden signifikante Unterschiede zwischen den Scherkraftbeträgen von 40 und 60 dyn cm⁻² mit dem *gepaarten Student t Test (Mittelwert ± SEM *P < 0,05) berechnet (G). Außerdem wurden signifikante Unterschiede zwischen den FRET-Signalen bei Applikation unterschiedlicher Wortmannin Konzentrationen (100 nM, 20 µM) mit dem *ungepaarten Student t Test (Mittelwert ± SEM, ***P < 0,001) berechnet (D).

3.14 Veränderungen in der C-terminalen Helix 8 des H₁-Rezeptors verringern die mechanische Rezeptoraktivierung

Um die Hypothese der Helix 8 als das entscheidende Strukturmotiv für mechanosensitive GPCR weiter zu untersuchen, wurde zuerst die α -helikale Struktur der Helix 8 im ct-b gpH₁R-Konstrukt durch Aminosäureaustausche von Phenylalanin gegen Prolin (F484P und F484P-F488P) zerstört, das auf eine mechanische Stimulation mit größten Abnahmen des FRET-Signals reagierte (siehe Abbildung 3.4 A und B). In der Strukturformel des Prolins fehlt das Amidproton, womit keine Wasserstoffbrückenbindung zum Sauerstoffatom der Carbonylgruppe, der in der α -Helix übereinanderliegenden Aminosäure ausgebildet wird und die α -helikale Struktur der Helix einknickt (Woofson und Williams, 1990; Yun et al., 1991; Kim und Kang, 1999). Beide Helix-8-Mutanten (ct-b-F484P und ct-b-F484P-F488P) zeigen vergleichbare Histamin induzierte Kalziumtransienten (siehe Abbildung 3.22 A und B) als auch ähnliche FRET-Effizienzen (siehe Abbildung 3.24 E). Mechanisch induzierte FRET-Signale (siehe Abbildung 3.21 B) sind bei dem ct-b-F484P Konstrukt um 89% und bei dem ct-b-F484P-F488P Konstrukt um 90% signifikant reduziert. Mechanisch induzierte Kalziumzunahmen (siehe Abbildung 3.22 C) sind bei den beiden Helix-8-Mutanten signifikant reduziert, was auf eine entscheidende Rolle der C-terminalen Helix 8 für die Mechanosensitivität von GPCR hinweist. Wie in Abschnitt 3.13 gezeigt wird, führt eine PIP₂-Entleerung der Zellmembran zu einer Reduktion der mechanischen Rezeptoraktivierung des gpH₁-Rezeptors (siehe Abschnitt 3.12). Deshalb wird eine Wechselwirkung der positiv geladenen Seitenketten der basischen Aminosäuren in der Helix 8 mit den negativ geladenen Phosphorsäureestern des PIP₂ vermutet. Daraufhin wurden mögliche PIP₂-Interaktionsstellen in der Helix 8 durch den Austausch ausgewählter basischer Aminosäuren²³³ (R485, R490, R493, K486 und K489) gegen Alanin entfernt. Zudem wurden basische Aminosäuren mit der gleichen Orientierung, die sich drei Aminosäuren weiter befanden mutiert, um eine „interkalierende“ Bindung von PIP₂ zu unterbinden bzw. zu reduzieren. Die in der Helix 8 des ct-b gpH₁R-Konstrukts mutierten FRET-Konstrukte (ct-b-R485A, ct-b-R490A-R493A und ct-b-K486A-K489A) sind stets funktionell und zeigen transiente Kalziumzunahmen unter Histaminstimulation (siehe Abbildung 3.22 A und B). Mechanisch induzierte FRET-Signale (siehe Abbildung 3.21 B) sind bei dem ct-b-R485A Konstrukt um 98% und bei dem ct-b-R490A-R483A Konstrukt um 91% signifikant unterdrückt. Ebenfalls sind mechanisch induzierte transiente Kalziumzunahmen (siehe Abbildung 3.22 C) signifikant reduziert. Insgesamt weisen diese Ergebnisse darauf hin, dass die Wechselwirkung positiv geladener Seitenketten basischer Aminosäuren in der Helix 8 mit den negativ geladenen

²³³ Folgende in der Helix 8 mutierte gpH₁R-Konstrukte wurden mittels ortsspezifischer Mutagenese erhalten und mittels der FRET-Photometrie auf die mechanische Rezeptoraktivierung hin näher untersucht:

ct-b-F484P = gpH ₁ R-PG1413-H8-F484P-Cerulean	pcDNA3.1(+)	[506],
ct-b-F484P-F488P = gpH ₁ R-PG1413H8-F484P-F488P-Cerulean	pcDNA3.1(+)	[516],
ct-b-R485A = gpH ₁ R-PG1413-H8-R485A-Cerulean	pcDNA3.1(+)	[513],
ct-b-R490A-R493A = gpH ₁ R-PG1413-H8-R490A-R493A-Cerulean	pcDNA3.1(+)	[514] und
ct-b-K486A-K489A = gpH ₁ R-PG1413H8-K486A-K489A-Cerulean	pcDNA3.1(+)	[522].

Phosphorsäureestern des PIP₂ in der Zellmembran von wesentlicher Bedeutung für die Mechanosensitivität von GPCR ist. Abschließend ist festzuhalten, dass diese Ergebnisse bestätigen, dass die Helix 8 das entscheidende mechanosensorische Strukturelement von GPCR ist.

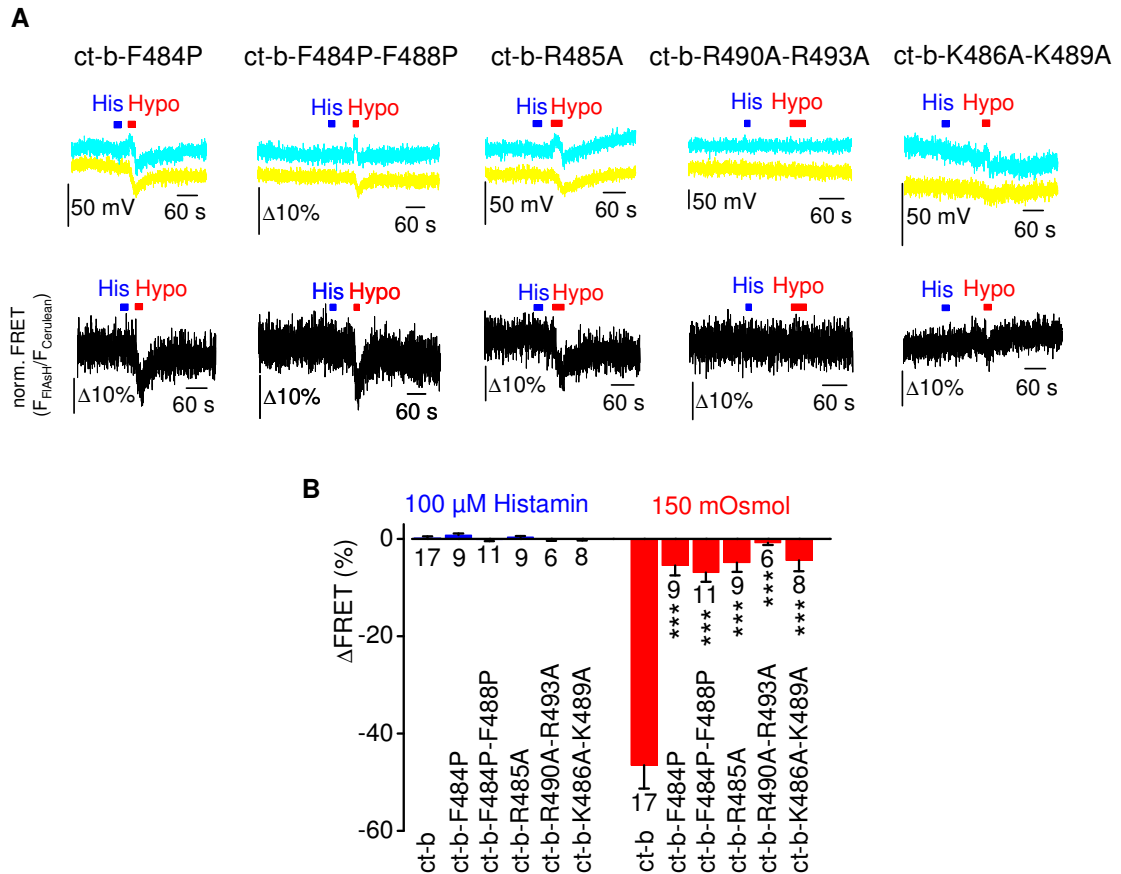


Abbildung 3.21: Mutationen in der C-terminalen Helix 8 des Histamin H₁-Rezeptors verringern die mechanische Rezeptoraktivierung Dynamische FRET-Messungen von FIAsH markierten, transient transfizierten HEK293-Zellen mit den in der Helix 8 mutierten ct-b gpH₁R-Konstrukten (ct-b-F484P, ct-b-F484P-F488P, ct-b-R485A, ct-b-R490A-R493A, ct-b-K486A-K489A) und den stabil exprimierenden HEK293-Zellen mit dem Wildtyp ct-b gpH₁R-Konstrukt. Bei Applikation einer 100 μM Histaminlösung (His, blauer Balken) wurden keine Änderungen in der türkisen Cerulean- als auch in der gelben FIAsH Fluoreszenzspur sowie den FRET-Signalen (schwarze Spur) wie beim Wildtyp ct-b gpH₁-Rezeptor festgestellt. Jedoch führte die Applikation einer hypoosmolaren Lösung (150 mOsm kg⁻¹, Hypo, roter Balken) bei allen Helix 8 mutierten ct-b gpH₁R-Konstrukten zu signifikant verminderten Abnahmen des FRET-Signals (A). Die Zusammenfassung der dynamischen FRET-Messungen wird als Säulendiagramm dargestellt (B). Zahlen an den Säulen geben die Anzahl der gemessenen Zellen auf 30 mm Glasplättchen von mindestens 3 Experimentiertagen wieder. Es wurden höchst signifikante Unterschiede zwischen den FRET-Signalen der Helix 8 Mutanten (ct-b-F484P, ct-b-F484P-F488P, ct-b-R485A, ct-b-R490A-R493A, ct-b-K486A-K489A) zum Wildtyp ct-b gpH₁-Rezeptor bei mechanischer Stimulation mit einer hypoosmolaren Lösung (150 mOsm kg⁻¹, roter Balken) mit dem *Mann Whitney Test berechnet (Mittelwert \pm SEM, ***P < 0,001) (B).

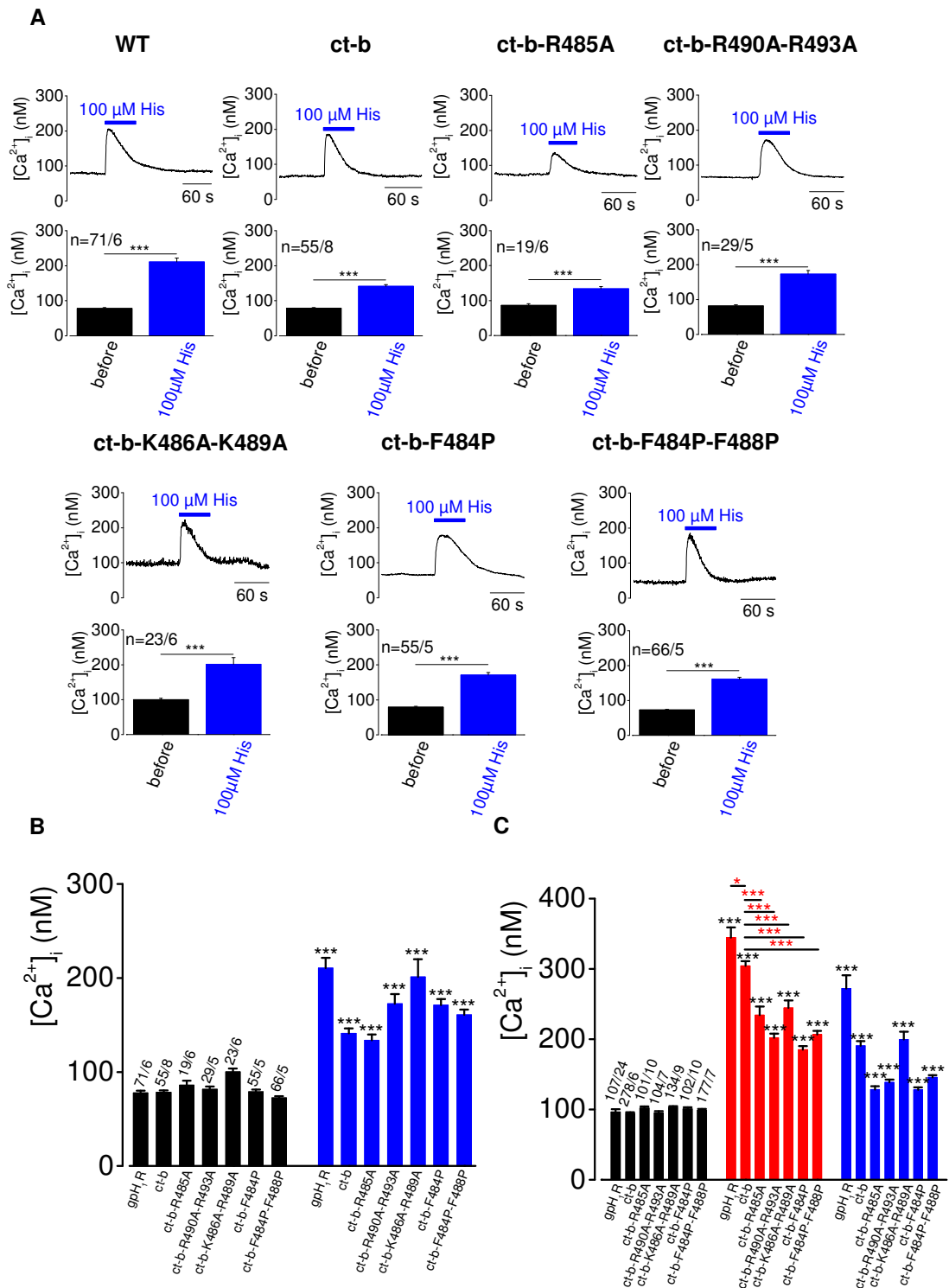


Abbildung 3.22: Alle in der C-terminalen Helix 8 mutierten gpH₁R-Konstrukte zeigen transiente Kalziumzunahmen auf Agonistenstimulation mit Histamin, wobei die Kalziumzunahmen unter mechanischer Stimulation signifikant reduziert sind Ratiometrische Kalziummessungen mit Fura-2 an HEK293-Zellen, die jeweils mit 2 μg Plasmid-DNA der gpH₁R-Konstrukten (Wildtyp = WT = gpH₁R-Cerulean pcDNA3.1(+) [131], gpH₁R pcDNA3.1/V5-His-TOPO [072], ct-b = gpH₁R-PG1413-H8-Cerulean pcDNA3.1(+) [456], ct-b-F484P = gpH₁R-PG1413-H8-F484P-Cerulean pcDNA3.1(+) [506], ct-b-F484P-F488P = gpH₁R-PG1413H8-F484P-F488P-Cerulean pcDNA3.1(+) [516], ct-b-R485A = gpH₁R-PG1413-H8-R485A-Cerulean pcDNA3.1(+) [513], ct-b-R490A-R493A = gpH₁R-PG1413-H8-R490A-R493A-Cerulean pcDNA3.1(+) [514] und

ct-b-K486A-K489A = gpH₁R-PG1413H8-K486A-K489A-Cerulean pcDNA3.1(+) [522]) und mit 1 µg G_{αq} pcDNA [183] co-transfiziert wurden. Wenn das Rezeptorkonstrukt nicht mit Cerulean fusioniert ist, wurden zudem 0,2 µg pEYFP-N1 [234] zur Sichtbarmachung der erfolgreichen Transfektion co-transfiziert. Nach 24 Stunden wurden die HEK293-Zellen für 10 Minuten mit 5 µM Fura-2-AM beladen. Die Applikation von 100 µM Histamin für jeweils eine Minute führte zu signifikanten transienten Kalziumerhöhungen. Für jedes gpH₁R-Konstrukt wird eine repräsentative Spur der intrazellulären Kalziumkonzentration [Ca²⁺]_i (nM) mit der angegebenen Applikation von 100 µM Histamin (His, blauer Balken) gezeigt (A). Die Zusammenfassung aller Kalziummessungen unterschiedlicher gpH₁R-Konstrukte wird als Säulendiagramm dargestellt. Die schwarzen Säulen zeigen die basale Anfangskalziumkonzentration [Ca²⁺]_i vor der Stimulation mit Histamin, die blauen Säulen die maximale [Ca²⁺]_i während der Stimulation mit 100 µM Histamin und die roten Säulen während einer mechanischen Stimulation mit einer hypoosmolaren Badlösung (150 mOsm kg⁻¹). Alle HEK293-Zellen mit Ausgangskalziumkonzentrationen von [Ca²⁺]_i ≥ 150 nm und maximalen Kalziumzunahmen [Ca²⁺]_i ≤ 120 nm wurden für die Gesamtauswertungen nicht mitberücksichtigt. Die Zahlen über den schwarzen Säulen geben die Anzahl der gemessenen HEK293-Zellen von verschiedenen Transfektionen auf 24 mm Glasplättchen aus mindestens 5 Experimentiertagen an. Die Signifikanz wurde zwischen der Erhöhung der Kalziumkonzentration unter Histamin zur basalen Kalziumkonzentration bzw. zwischen der Zunahme der Kalziumkonzentration bei einer mechanischen Stimulation mit einer hypoosmolaren Badlösung (150 mOsm kg⁻¹) zur basalen Kalziumkonzentration mit dem *Wilcoxon-Vorzeichen-Rang-Test (Mittelwert ± SEM, ***P < 0,001) berechnet (B, C). Zudem wurden signifikante Unterschiede zwischen den Kalziumzunahmen [Ca²⁺]_i bei mechanischer Stimulation mit einer hypoosmolaren Badlösung (150 mOsm kg⁻¹) zwischen den einzelnen in der Helix 8 mutierten gpH₁-Rezeptoren und dem Wildtyp gpH₁-Rezeptor mit dem *Mann Whitney Test (Mittelwert ± SEM, ***P < 0,001) berechnet (C).

3.15 Cholesterolverarmung in der Zellmembran reduziert die mechanische H₁-Rezeptoraktivierung

Um die Rolle der Membranzusammensetzung bei der mechanischen Rezeptoraktivierung zu untersuchen, wurde sowohl die Verarmung als auch die Anreicherung von Cholesterol, ein wesentlicher Bestandteil von Zellmembranen, näher untersucht. Für eine cholesterolare Zellmembran wurden stabil exprimierende HEK293-Zellen mit dem ct-b gpH₁R-Konstrukt entweder für 24 Stunden mit 10 µM Fluvastatin²³⁴ oder für 30 Minuten mit 5 mM Methyl-β-Cyclodextrin²³⁵ behandelt und mit Hilfe der FRET-Photometrie gemessen (siehe Abbildung 3.23 A). Mechanisch induzierte FRET-Signale (siehe Abbildung 3.23 A und B) waren nach der Cholesterolverarmung der Zellmembran signifikant niedriger, was darauf hindeutet, dass Cholesterol den mechanisch induzierten Rezeptorzustand des gpH₁-Rezeptors stabilisiert. Eine Cholesterol angereicherte Zellmembran hat dagegen keinen signifikanten Einfluss auf die mechanische Rezeptoraktivierung des gpH₁-Rezeptors. Insgesamt deuten die

²³⁴ Fluvastatin gehört zur Arzneistoffklasse der Statine und wird bei erhöhten Cholesterinwerten eingesetzt. Es handelt sich um einen selektiven HMG-CoA-Reduktase-Inhibitor (3-Hydroxy-3-Methylglutaryl-Coenzym-A), der die Cholesterinsynthese in der Zelle unterbindet. Für eine 25 mM Stammlösung wurden 50 mg Fluvastatin (# 3309, biotechnie, R&D Systems, Wiesbaden) in 4,614 ml Wasser gelöst, direkt zu 200 µl-Aliquots portioniert und lichtgeschützt bei -20°C gelagert. Für die Arbeitskonzentration wurde die Stammlösung 1:2500 in der Badlösung verdünnt.

²³⁵ Methyl-β-cyclodextrin (# 332615, Sigma-Aldrich) ist ein zyklisches Oligosaccharid, das aus einer Einheit aus sieben α-1,4 glykosidisch verknüpften Glucosemolekülen aufgebaut ist. Die amphiphile Eigenschaft der glykosidischen Verbindung ermöglicht den Einschluss von Cholesterol aus der Zellmembran in den hydrophoben Hohlraum der toroidalen Form des zyklischen Oligosaccharids, womit es zur Cholesterolverarmung in der Zellmembran kommt. Für eine Cholesterolanreicherung der Zellmembran wurden 5 mM Cholesterol mit Hilfe von 50 mM Methyl-β-Cyclodextrin komplexiert (siehe Abschnitt 2.7) und innerhalb von 10 Minuten in die Zellmembran von HEK293-Zellen eingeschleust.

FRET-Ergebnisse darauf hin, dass Cholesterol einen mechanisch induzierten Rezeptorzustand stabilisiert und die Mechanosensitivität der GPCR von der Membranzusammensetzung und der Wechselwirkung von Helix 8 mit PIP₂ abhängt.

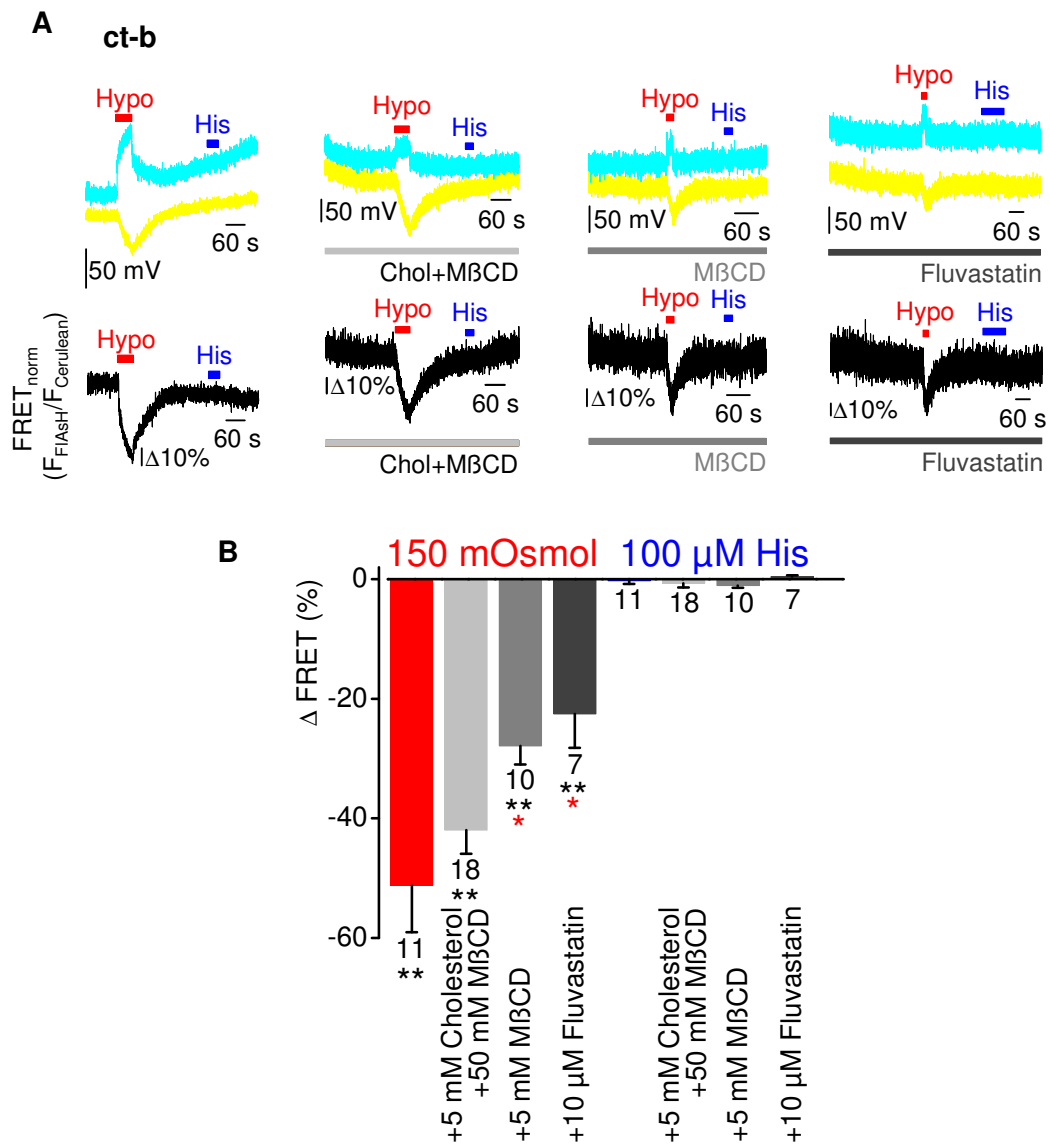


Abbildung 3.23: Cholesterolverarmung in der HEK293-Zellmembran reduziert die mechanische H₁-Rezeptoraktivierung. Dynamische FRET-Messungen von FIAsh markierten, monoklonalen HEK293-Zellen mit stabil exprimierendem gpH₁R-Konstrukt (ct-b). Für eine cholesterolare Zellmembran wurden die HEK293-Zellen vor jeder Messung entweder mit 10 μM Fluvastatin für 24 Stunden oder mit 5 mM Methyl-β-cyclodextrin (MβCD) für 30 Minuten inkubiert. Für eine cholesterorreiche Zellmembran wurden die HEK293-Zellen vor jeder Messung mit dem wasserlöslichen Komplex aus 5 mM Cholesterol (Chol) und 50 mM Methyl-β-cyclodextrin (MβCD) für 10 Minuten inkubiert. Wie oben gezeigt wird, kommt es nur während einer mechanischen Aktivierung mit einer hypoosmolaren Lösung (150 mOsm kg⁻¹, Hypo, roter Balken) zu einer Zunahme der türkisen Cerulean-Fluoreszenzspur -und zeitgleich zu einer Abnahme der gelben FIAsh-Fluoreszenzspur, was zu einer Abnahme des FRET-Signals (schwarze Spur) führt (A). Das bedeutet, dass sich die beiden Fluorochrome während einer mechanischen Stimulation mit einer hypoosmolaren Lösung voneinander wegbewegen. Eine 100 μM Histaminstimulation (His, blauer Balken) zeigte weder eine Änderung beider Fluoreszenzspuren noch der FRET-Spur (A). Die Zusammenfassung der dynamischen FRET-Messungen wird als Säulendiagramm dargestellt (B). Mechanisch induzierte FRET-Signalabnahmen von unbehandelten HEK293-Zellen werden in rot, Histamin induzierte

FRET-Signaländerungen in blau angezeigt. Sowohl mechanisch induzierte als auch Histamin induzierte FRET-Signaländerungen von cholesterolarmen HEK293-Zellen werden für Methyl- β -cyclodextrin in grau (A, B), für Fluvastatin in dunkelgrau (A, B) dargestellt. Sowohl mechanisch induzierte als auch Histamin induzierte FRET-Signale von cholesterolreichen HEK293-Zellen werden für den wasserlöslichen Cholesterol-Methyl- β -cyclodextrin-Komplex in hellgrau angezeigt. Zahlen an den Säulen geben die Anzahl der gemessenen Zellen auf 30 mm Glasplättchen von mindestens 3 Experimentiertagen an. Es wurden signifikante Unterschiede zwischen den FRET-Signalabnahmen unter mechanischer Stimulation (150 mOsm kg^{-1}) mit dem ungepaarten *Student t Test bestimmt (Mittelwert \pm SEM, * $P < 0.05$) (B). Signifikante Unterschiede wurden auch bei mechanischer Aktivierung zwischen den verschiedenen Cholesterol-Zusammensetzungen der HEK293-Zellmembranen mit der * ANOVA berechnet (Mittelwert \pm SEM, ** $P < 0.01$) (B).

3.16 Vergleichbare FRET-Effizienzen der H₁-Rezeptorkonstrukte

Um maximale FRET-Effizienzen (*FRET efficiency*, siehe Abbildung 3.24 F) von FRET-Donor-Akzeptor-Paaren mit FIAsH als Akzeptorfluorophor bestimmen zu können, wurden alle gpH₁R-Konstrukte mit 10 mM BAL²³⁶ behandelt, welches das Akzeptorfluorophor FIAsH vollständig von seinem Tetracysteinbindemotiv entfernt (siehe Abschnitt 2.10.1). Dadurch erholt sich die Fluoreszenzintensität des Donorfluorophors Cerulean vollständig, was zu maximalen FRET-Signalabnahmen führt (siehe Abbildung 3.24 A-D). Aus dem Vergleich der maximalen FRET-Effizienzen (siehe Abbildung 3.24 E) zwischen den einzelnen gpH₁R-Konstrukten können Aussagen über Transduktion sowie den verschiedenen Rezeptorzuständen zwischen den einzelnen gpH₁R-Konstrukten getroffen werden. Alle gpH₁R-Konstrukte zeigen sowohl ähnliche maximale FRET-Abnahmen (*BAL-induced FRET decrease (%)*, siehe Abbildung 3.24 E) als auch gleiche FRET-Effizienzen (*FRET-efficiency*, siehe Abbildung 3.24 F), was darauf hindeutet, dass alle gpH₁R-Konstrukte in Hinsicht auf Agonistenstimulation und mechanische Rezeptoraktivierung miteinander vergleichbar sind und Aussagen über Rezeptorzustände und Transduktion getroffen werden können.

²³⁶ Abkürzung BAL steht für British-Anti-Lewisite. Es ist ein Derivat von Glycerin und wird als Antidot bei Schwermetallvergiftungen eingesetzt. Im zweiten Weltkrieg wurde es als Antidot zum Kampfstoff Lewisite entwickelt. Was zur Namensgebung British Anti-Lewisite führte. Chemische Bezeichnung nach IUPAC: 2,3-Dimercapto-1-propanol.

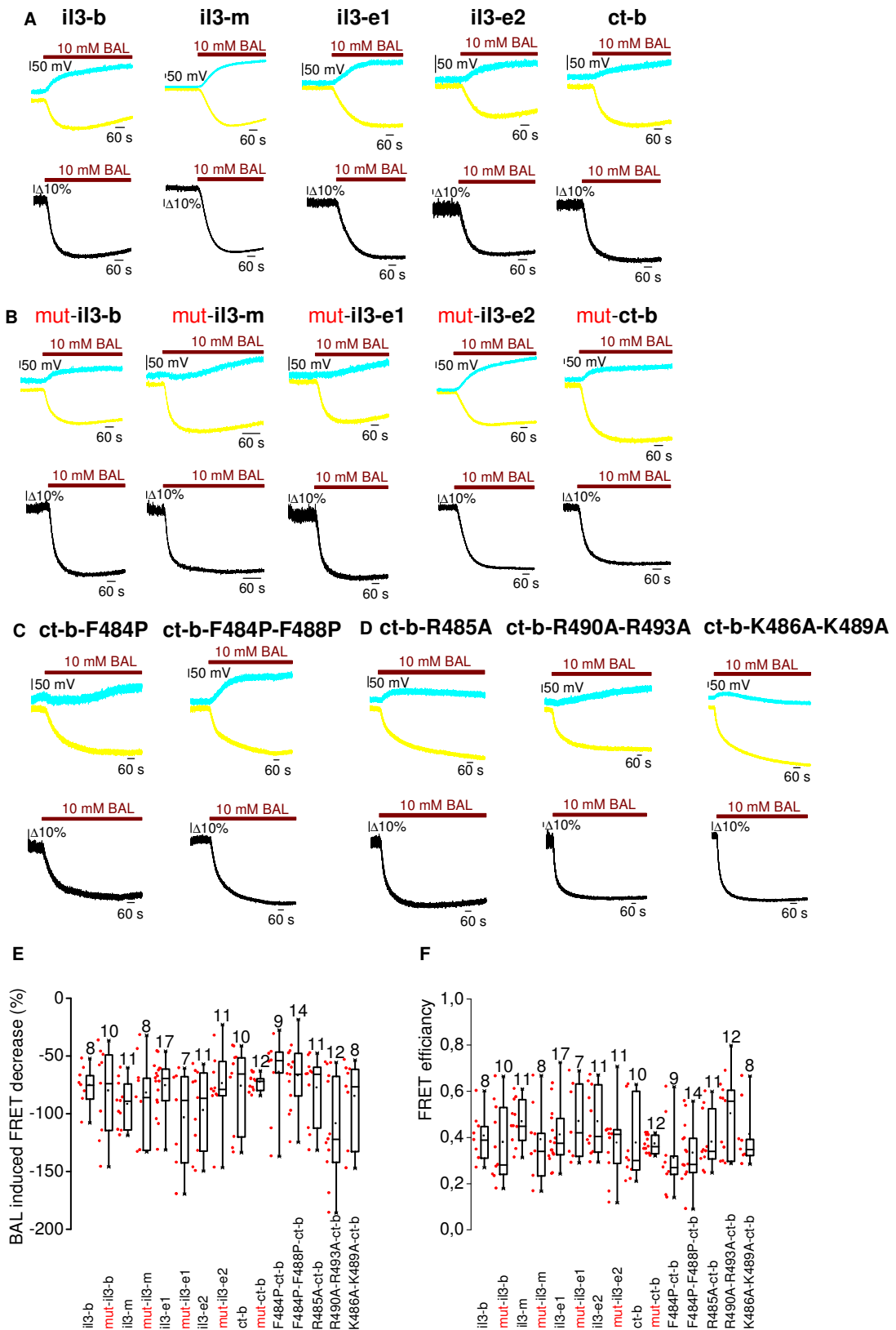


Abbildung 3.24: Vergleichbare maximale FRET-Abnahmen und FRET-Effizienzen aller gpH1-R-Konstrukte. Dynamische FRET-Messungen von FIAsH markierten, monoklonalen HEK293-Zellen mit stabil exprimierenden gpH1-R-Konstrukten (il3-b, il3-m, il3-e1, il3-e2, ct-b, **mut-il3-b**, **mut-il3-m**, **mut-il3-e1**, **mut-il3-e2**) und von transient transfizierten HEK293-Zellen mit nachfolgenden gpH1-R-Konstrukten (**mut-ct-b** = gpH1-D116A-PG1413-H8-F433A-Cerulean pcDNA3.1(+)^[489], F484P-ct-b =

gpH1-PG1413-H8-F484P-Cerulean pcDNA3.1(+) [506], F484P-F488P-ct-b =
 gpH1-PG1413H8-F484P-F488P-Cerulean pcDNA3.1(+) [516], R485A-ctb =
 gpH1R-PG1413-ct-b-R485A-Cerulean pcDNA3.1(+) [513], R490A-R493A-ct-b =
 gpH1R-PG1413-ct-b-R490A-R493A-Cerulean pcDNA3.1(+) [514] und K486A-K489A-ct-b =
 gpH1R-PG1413-ct-b-K486A-K489A-Cerulean pcDNA3.1(+) [522]). Die Applikation von 10 mM BAL (brauner Balken) verdrängt das Akzeptorfluorochrom FIAsh vollständig von seinem CCPGCC Tetracysteinbindemotiv, wodurch die gelbe FIAsh-Fluoreszenzspur ab und simultan die türkise Cerulean Fluoreszenzspur zunimmt. Aus dem normalisierten Verhältnis der FIAsh und Cerulean Fluoreszenz ergeben sich in Gegenwart von BAL maximale Abnahmen des FRET-Signals (A, B, C, D). Die Zusammenfassung der dynamischen FRET-Messungen wird als Boxplot-Diagramm dargestellt (E, F). Durch 10 mM BAL erzeugte maximale FRET-Signalabnahmen (BAL-induced FRET decrease (%), E) werden als Boxplot (Box 25%-75% [rechts] und Datenpunkte in rot [links]) angezeigt. Zahlen über dem oberen Whisker geben die Anzahl der gemessenen Zellen auf 30 mm Glasplättchen von mindestens 3 Experimentiertagen an. Es wurden keine signifikanten Unterschiede zwischen den durch BAL erzeugten maximalen Abnahmen des FRET-Signals in % (E) und zwischen den FRET-Effizienzen (FRET efficiency, F) aller gpH₁R-Konstrukte mit dem Kruskal-Wallis Test (Mittelwert ± SEM) bestimmt. Die FRET-Effizienzen wurden aus der normalisierten Cerulean-Fluoreszenz mittels der mathematischen Formel $E = 1 - [1 / (F_{CerNormBAL})]$ bestimmt (siehe Abschnitt 2.10.1).

3.17 Langsame Aktivierungskinetik des H₁-Rezeptors bei mechanischer Stimulation

Um herauszufinden, ob die Aktivierungskinetik von Agonisten induzierten FRET-Signalen mit dem veröffentlichten muskarinischen G_{q/11} Protein gekoppeltem M₃-Rezeptor (Hoffmann et al., 2012) vergleichbar ist und die Aktivierungskinetik mechanisch induzierter FRET-Signale unterschiedlich zur Agonisten induzierten Aktivierungskinetik ist, wurden die Halbwertszeiten $\tau_{\frac{1}{2}}$ der Aktivierungskinetiken von Agonist und hypoosmotisch induzierten Abnahmen des FRET-Signals (siehe Abbildung 3.25 A-C) berechnet. Die Kinetikmessungen wurden mit dem il3-e1 gpH₁R-Konstrukt mit Hilfe der FRET-Photometrie durchgeführt (siehe Abbildung 3.25 A-C). Die Kinetikmessungen wurden von mir und von Frau Nicole Ziegler in der Arbeitsgruppe von Herrn Prof. Dr. Carsten Hoffman am Rudolf-Virchow-Zentrum in Würzburg durchgeführt. Die Bestimmung der Halbwertszeiten $\tau_{\frac{1}{2}}$ der Abnahmekinetik aus den normalisierten FRET-Signalen wurde von Herrn Prof. Dr. Michael Mederos y Schnitzler am Walther-Straub-Institut in München durchgeführt. Es wurde ein exponentieller Fit für Histamin induzierte Abnahmen des FRET-Signals und ein bi-exponentieller Fit bei hypoosmotisch bedingten Abnahmen des FRET-Signals angewandt. Die Halbwertszeit $\tau_{\frac{1}{2}}$ der Abnahmekinetik des FRET-Signals ergibt sich aus der mathematischen Formel:

$$\tau_{\frac{1}{2}} = T \times \ln 2 \quad \text{Formel 18}$$

Formel 18: Mit T = Abnahmekinetik, $\tau_{\frac{1}{2}}$ = Halbwertszeit der Abnahmekinetik

Die Aktivierungskinetik von Histamin induzierten FRET-Signalen des gpH₁-Rezeptor in physiologischer Hanks balancierter Salzösung (HBS) ist geringfügig langsamer (2,4-fach), liegt jedoch im gleichen Bereich (siehe Abbildung 3.25 D) wie für den G_{q/11}-Protein gekoppelten muskarinischen M₃-Rezeptor bereits gezeigt worden ist

(Hoffmann et al., 2012). Bei allen FRET-Messungen wurde eine isotonische Badlösung²³⁷ („Iso150“) und eine hypoosmolare Lösung („Hypo150“) mit jeweils 55 mM NaCl Gehalt verwendet. Daraufhin wurde untersucht, ob eine reduzierte NaCl-Konzentration die Aktivierungskinetik der Agonisten induzierten FRET-Signale beeinflusst. Die Histamin induzierten FRET-Signalabnahmen liegen in der gleichen Größenordnung (siehe Abbildung 3.25 A und B), aber die Aktivierungskinetik in der „Iso 150“ Badlösung mit 55 mM ist signifikant langsamer als in physiologischer HBS mit 140 mM NaCl (siehe Abbildung 3.25 D). Daher könnte die reduzierte NaCl-Konzentration die Rezeptorfunktion modulieren. Die Aktivierungskinetik mechanisch induzierter FRET-Signalabnahmen (siehe Abbildung 3.25 D) ist signifikant langsamer als die Aktivierungskinetik von Agonisten induzierten FRET-Signalabnahmen (siehe Abbildung 3.25 D). Diese Ergebnisse deuten daraufhin, dass die mechanische Rezeptoraktivierung eine signifikant langsamere Aktivierungskinetik gegenüber der Agonisten induzierten Rezeptoraktivierung besitzt. Außerdem ist festzuhalten, dass die Aktivierungskinetik in Badlösung mit geringer, unphysiologischer NaCl-Konzentration (55 mM) signifikant langsamer ist als in physiologischer Badlösung mit 140 mM NaCl. Das bedeutet im Fall des Histamin H₁-Rezeptors, dass eine erhöhte Natriumkonzentration die Rezeptoraktivierung erleichtert.

²³⁷ Um eine isotonische Badlösung mit gleicher Ionenzusammensetzung wie die hypoosmolare Messlösung zu erhalten, wurde die hypoosmolare Messlösung mit 55 mM NaCl und 150 mOsm kg⁻¹ mit dem Zuckeralkohol Mannitol auf eine Osmolarität von 300 mOsm kg⁻¹ aufgefüllt. Isotonische Messlösung „Iso 150“ [mM]: 55 NaCl, 5 KCl, 2 CaCl₂ * 2H₂O, 10 HEPES, 10 Glucose, 1 MgCl₂ * 6H₂O, mit NaOH auf einen pH-Wert von 7,4 eingestellt und mit Mannitol auf 300 ± 5 mOsmol l⁻¹ aufgestockt.

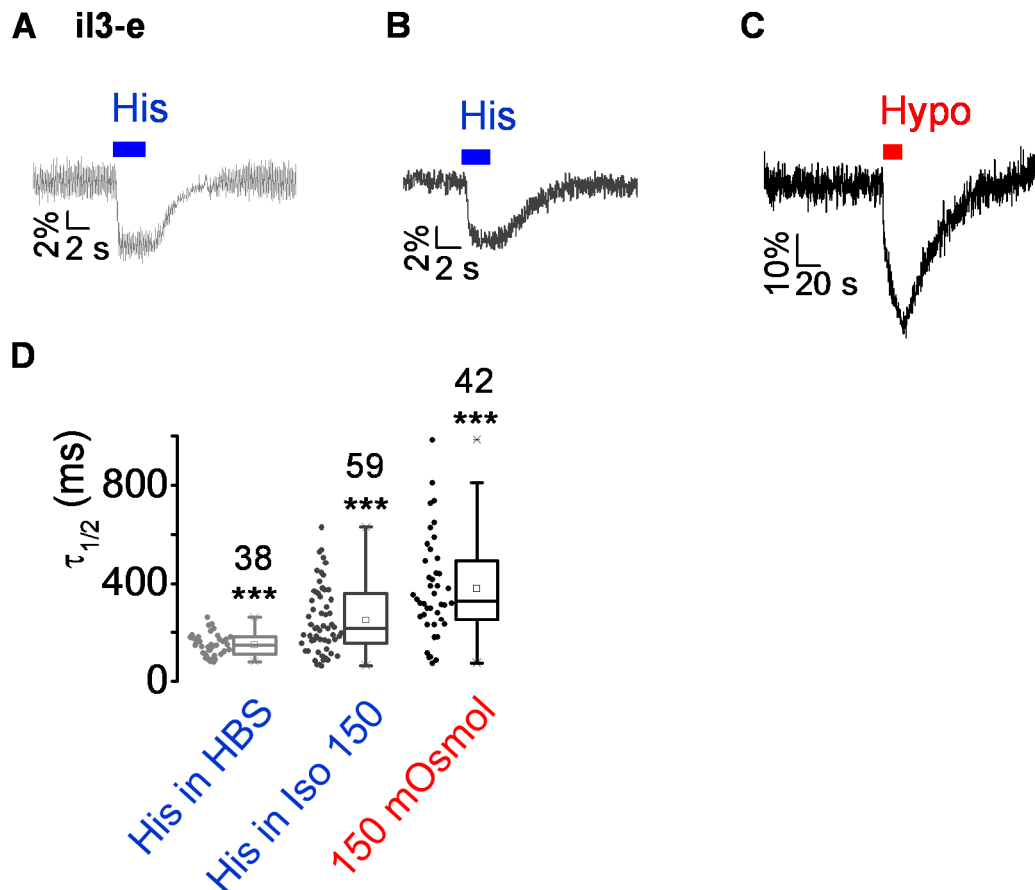


Abbildung 3.25: Unterschiedliche Aktivierungskinetiken von Agonist - und hypoosmotisch induzierten Abnahmen des FRET-Signals Dynamische FRET-Messungen von FIAsh markierten stabilen monoklonalen HEK293 Zellen mit dem il3-e1 gpH₁R-Konstrukt. Es werden repräsentative normalisierte FRET-Spuren in physiologischer Hanks balancierte Salzlösung (HBS, links, hellgraue FRET-Spur) oder in isotonischer Badlösung (Iso 150, Mitte, dunkelgraue FRET-Spur) unter Applikation von 100 μ M Histamin (His, blauer Balken) und die FRET-Spur (rechts, schwarze FRET-Spur) in hypoosmotischer Lösung (150 mOsm kg^{-1} , Hypo, roter Balken) gezeigt (A, B, C). Die Zusammenfassung der Aktivierungskinetiken der FRET-Signale wird als Boxplot-Diagramm dargestellt (D). Die Halbwertszeiten $\tau_{1/2}^1$ werden als Boxplotdiagramm (Box 25%-75% [rechts], einzelne Datenpunkte [links]) mit den entsprechenden Mittelwerten angezeigt. Zahlen über dem oberen Whisker geben die Anzahl der gemessenen Zellen auf Glasplättchen von mindestens 3 Experimentiertagen an. Die Aktivierungskinetik in Agonisten induzierten FRET-Signalen beträgt in isotonischer Lösung mit 55 mM NaCl Konzentration (His in Iso 150) $\tau_{1/2}^1 = 251 \pm 18$ ms und in physiologischer Hanks balancierte Salzlösung mit 140 nM NaCl (His in HBS) $\tau_{1/2}^1 = 148 \pm 7$ ms. Die Aktivierungskinetik von mechanisch induzierten FRET-Signalen (150 mOsmol) beträgt $\tau_{1/2}^1 = 381 \pm 32$ ms. Es wurden signifikante Unterschiede zwischen den Halbwertszeiten $\tau_{1/2}^1$ der Aktivierungskinetiken der FRET-Signalen mit dem *Kruskal-Wallis Test (Mittelwert \pm SEM, ***P < 0,001) bestimmt (D).

3.18 Inaktiverer Rezeptorzustand des H₁-Rezeptors in Gegenwart von 55 mM NaCl

Um herauszufinden, ob eine reduzierte NaCl-Konzentration (55 mM NaCl) die Rezeptorfunktion beeinflusst und einen in physiologischer Salzlösung (140 mM NaCl)

unterschiedlichen Rezeptorzustand hervorruft, wurden HEK293-Zelllinien mit dem il3-e1 und mit dem ct-b gpH₁R-Konstrukt mittels der FRET-Photometrie alternierend mit 55 mM NaCl-haltiger „Iso150“ Badlösung und mit 140 mM NaCl-haltiger Hanks balancierter Salzlösung perfundiert (siehe Abbildung 3.26 A und B). Die FRET-Messungen wurden von mir und von Frau Dr. rer. nat. Diana Gabriel am Walther-Straub-Institut in München durchgeführt. Die Auswertung der dynamischen FRET-Messungen wurde von mir und von Frau PD Dr. Ursula Storch am Walther-Straub-Institut vollzogen. Der Wechsel zwischen der isotonischen Badlösung „Iso 150“ mit niedriger 55 mM NaCl-Konzentration und der isotonischen Hanks balancierten Salzlösung mit physiologischer 140 mM NaCl-Konzentration führte sowohl bei dem il3-e1 als auch bei dem ct-b gpH₁R-Konstrukt zu deutlichen FRET-Signalabnahmen (siehe Abbildung 3.26 A und B). Im Gegensatz dazu führte der Wechsel von der isotonischen Hanks balancierten Salzlösung mit 140 mM NaCl auf die isotonische Badlösung „Iso 150“ mit 55 mM NaCl zu FRET-Signalzunahmen (siehe Abbildung 3.26 A und B). Diese FRET-Ergebnisse weisen daraufhin, dass eine veränderte NaCl-Konzentration den Rezeptorzustand beeinflusst. Der gpH₁-Rezeptor liegt in Gegenwart reduzierter NaCl Konzentration in einem inaktiveren Rezeptorzustand als in Gegenwart hoher NaCl Konzentration vor. Das bedeutet vermutlich, dass die Natriumionen einen positiv allosterischen Effekt (siehe Abschnitt 1.1.3) auf den gpH₁-Rezeptor ausüben und eine Transduktion in einen aktiveren Rezeptorzustand bewirken. Interessanterweise zeigt das c-tb gpH₁R-Konstrukt gegenüber dem il3-e1 gpH₁R-Konstrukt eine signifikante größere Änderung des FRET-Signals beim Wechsel zwischen der isotonischen Badlösung „Iso 150“ und der isotonischen Hanks balancierten Salzlösung, was darauf hinweist, dass vermutlich die TM7 eine Transduktion in einen aktiveren Rezeptorzustand vollzieht und das ct-b gpH₁R-Konstrukt sensitiver auf diese Transduktion mit größeren FRET-Signalabnahmen als das il3-e1 gpH₁R-Konstrukt reagiert.

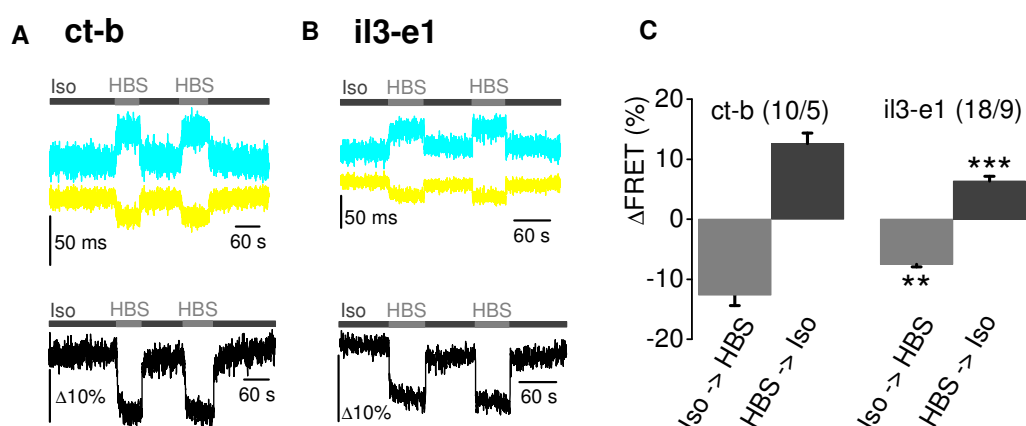


Abbildung 3.26: Änderungen des FRET-Signals beim Wechsel zwischen einer 55 mM NaCl haltigen isotonischen Badlösung und einer 140 mM NaCl haltigen Salzlösung Dynamische FRET-Messungen von FIAsh markierten, monoklonalen HEK293 Zellen mit stabil exprimierenden gpH₁R-Konstrukten (il3-e1 und ct-b). Es werden repräsentative Fluoreszenzspuren und normalisierte FRET-Spuren unter Applikation von isotonischer Badlösung „Iso150“ mit 55 mM NaCl (Iso, dunkelgrauer Balken) und von Hanks balancierter Salzlösung mit 140 mM NaCl (HBS, grauer Balken) angezeigt (A, B). Beim Wechsel zwischen der

isotonischen Badlösung mit 55 mM NaCl auf die 140 mM NaCl Hanks balancierte Salzlösung nimmt die türkise Cerulean-Fluoreszenzspur zu und zeitgleich nimmt die gelbe FIAsH-Fluoreszenzspur ab, das zu FRET-Signalabnahmen (schwarze Spur) führt (A, B). Im Gegensatz dazu kommt es beim Wechsel von 140 mM NaCl-haltiger HBS auf 55 mM NaCl-haltiger Badlösung zu FRET-Signalzunahmen, die zu entgegengesetzten Verläufen der türkisen Cerulean-Fluoreszenzspur und gelben FIAsH-Fluoreszenzspur führt (A, B). Die Zusammenfassung der dynamischen FRET-Messungen wird als Säulendiagramm dargestellt (C). Die erste Ziffer in der Klammer gibt die Anzahl der gemessenen Zellen auf 30 mm Glasplättchen wieder. Die zweite Ziffer in der Klammer steht für die Anzahl der Experimentiertage. Es wurden signifikante Unterschiede des FRET-Signals beim Wechsel zwischen einer 55 mM NaCl-haltigen isotonischen Badlösung und einer 140 mM NaCl-haltigen Hanks balancierten Salzlösung mit dem *gepaarten student t-Test (Mittelwert \pm SEM, **P < 0,01, ***P < 0,001) zwischen den ct-b und il3-e1 gpH₁R-Konstrukten berechnet (C).

3.19 Validierung der FRET-Messungen

Für die Korrelation von gemessener Änderung des FRET-Signals [%] zur tatsächlich vorliegenden Entfernung [nm] zwischen dem Donor und Akzeptor Fluorophor wurden FRET-Konstrukte²³⁸ mit α -Helices definierter Länge (Zagrovic et al., 2005) zwischen dem türkis fluoreszierenden Protein Cerulean und dem gelb fluoreszierenden Fluorophor FIAsH generiert (siehe Tabelle 3.1). Die Länge der α -Helices in den beiden PG-(AAKAA)₂-Cerulean und PG-(AAKAA)₇-Cerulean FRET-Konstrukten ist durch die Methode der Röntgenkleinwinkelstreuung (SAXS²³⁹) bekannt (Zagrovic et al., 2005). Die Länge der vier Alanine in dem PG-4A-GY-Cerulean Konstrukt wurde mit Hilfe des Programms CCP4 Molecular Graphics Version 2.10.6 aus der Kristallstruktur (PDB ID: 5KDL²⁴⁰) der 4-Alanin-Insertionsvariante der an die GTPyS²⁴¹ gebundenen G_{ai1}-Untereinheit (Kaya et al., 2016) ermittelt (siehe Abbildung 3.27 B). Die Entfernung zwischen dem Akzeptorfluorophor FIAsH und den Donorfluorophor Cerulean im PG-4A-GY-Cerulean FRET-Konstrukt beträgt $5,4 \pm 0,3$ Å (siehe Tabelle 3.1).

Konstruktname	Peptidsequenz	Abstand [nm]
PG-4A-GY-Cerulean	MA-CCPGCC-AAAA-GY-SR-Cerulean	$5,4 \pm 0,3$ Å
PG-(AAKAA) ₂ -GY-Cerulean	MA-CCPGCC-(AAKAA) ₂ -GY-SR-Cerulean	$7,9 \pm 0,4$ Å
PG-(AAKAA) ₇ -GY-Cerulean	MA-CCPGCC-(AAKAA) ₇ -GY-SR-Cerulean	$14,2 \pm 0,6$ Å

Tabelle 3.1: FRET-Konstrukte mit α -Helices definierter Länge zwischen dem türkis fluoreszierendem Donorfluorophor Cerulean und dem gelb fluoreszierendem Akzeptorfluorophor FIAsH Die gelb hervorgehobene Aminosäuresequenz gibt das Tetracysteinbindemotiv für das FIAsH wieder, wobei die grün markierte Peptidsequenz für eine α -helikale Sekundärstruktur steht. Die grau markierten Aminosäuren sind

²³⁸ Folgende FRET-Konstrukte wurden durch Ligation von Oligonukleotiden in den mit dem Restriktionsenzym XhoI geschnittenem und linearisiertem pCerulean-MCS-N1 pcDNA3.1(+) [494] Vektor erhalten (siehe Abschnitt 2.23 mit der Tabelle 2.19): PG-4A-GY-Cerulean pcDNA3.1 (+) [496], PG-(AAKAA)₂-GYCerulean pcDNA3.1 (+) [546] und PG-(AAKAA)₇-GY-Cerulean pcDNA3.1 (+) [551]. Hierfür wurde jeweils eine α -Helix bildende Peptidsequenz (grüne Peptidsequenz in Tabelle 3.1) in den Vektor eingebaut.

²³⁹ Abkürzung SAXS vom Englischen für **S**mall-angle **X**-ray **s**cattering. Mit Hilfe der Röntgenkleinwinkelstreuung können Dichteunterschiede in einer Probe im Nanobereich ermittelt werden und somit Rückschlüsse auf die Größe von Nanopartikeln geschlossen werden (Garcia-Diez et al., 2016).

²⁴⁰ Zugriffsschlüssel PDB ID: 5KDL (Kaya et al., 2016) aus der Proteindatenbank (RCSB PDB Protein Data Bank) (Berman et al., 2000) mit der URL-Adresse <http://www.rcsb.org/>, letzter Aufruf erfolgte am 17.05.2017

²⁴¹ Abkürzung GTPyS steht für die chemische Verbindung Guanosin-5-O-[gamma-thio]triphosphat. GTPyS ist ein nicht hydrolysierbares Analogon von Guanosin-5-triphosphat.

durch die Religation der XhoI Restriktionsschnittstelle in den mit dem Restriktionsenzym XhoI geschnittenem und linearisiertem pCerulean-MCS-N1 pcDNA3.1(+) [494] Vektor entstanden.

Ein weiteres FRET-Konstrukt, das MV1IQ (U50-TetC)-PG-Cerulean²⁴², wurde vom MV1IQ (U50-TetC) pFastBacDual Vektor generiert, welches von Christopher Yengo, MS. PhD (Penn State University, USA) zur Verfügung gestellt wurde. In der oberen 50-kDa-Region des Myosin V Motorproteins²⁴³ ist ein CCPGCC Tetracysteinbindemotiv zwischen den beiden Aminosäurepositionen G291 und G298 eingefügt, das die Anfärbung des Myosins mit FIAsH erlaubt (Sun et al., 2006). Mit Hilfe des Programmes CCP4MG Version 2.10.6 wurde der Abstand zwischen der Aminosäureposition P294 im Tetracysteinbindemotiv CCP²⁹⁴GCC und der Aminosäureposition D794 am Ende des C-Terminus des Myosins aus der Kristallstruktur (PDB ID: 1OE9) des Myosin V Motorproteins (Coureux et al., 2004) ermittelt (Abbildung 3.27). Die Entfernung zwischen dem Akzeptorfluorophor FIAsH und dem Donorfluorophor Cerulean beträgt ca. 83,61 Å (siehe Abbildung 3.27).

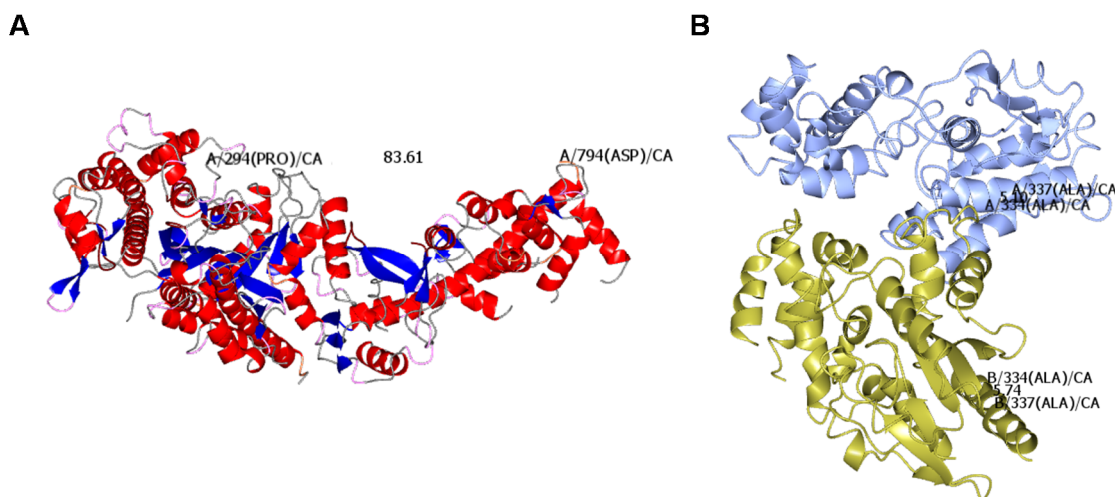


Abbildung 3.27: Kristallstrukturen der 4-Alanin-Insertionsvariante der an GTP γ S gebundenen G α _{i1}-Proteins und der oberen 50-kDa-Region des Myosin V Motorproteins Es sind jeweils die Entfernungen in Ångström Å zwischen den Aminosäurepositionen P294 und D794 im Myosin V Motorprotein mit 83,61 Å (A) bzw. zwischen den Aminosäurepositionen Q333 und F334 mit der 4 Alanin-Insertion in der α 5-Helix des G α _{i1}-Proteins dargestellt (B). Die Entfernung zwischen A334 und A337 beträgt in der A-Kette des G α _{i1}-Proteins 5,10 Å und in der B-Kette des G α _{i1}-Proteins 5,75 Å (B). Für die Ermittlung der Entfernungen wurde das Programm CCP4MG Version 2.10.6, letzte Version (18.01.2016) verwendet.

Um die maximalen FRET-Effizienzen der einzelnen FRET-Konstrukte zu ermitteln, wurden HEK293-Zellen mit den zuvor beschriebenen FRET-Konstrukten (siehe Tabelle 3.1 und Abbildung 3.27) transient exprimiert, mit FIAsH angefärbt und mit Hilfe der FRET-Photometrie unter Verwendung von 10 mM BAL gemessen (siehe Abschnitt

²⁴² Mit Hilfe der PCR wurde die obere 50-kDa-Region von Myosin V mit einer einzigen IQ-Domäne [=MV1IQ (U50-TetC)], ohne ein cmyc-Taq (E-Q-K-L-I-S-E-E-D-L) und ohne ein FLAG-Tag (D-Y-K-D-D-D-K) mit einer zusätzlichen NotI Restriktionsschnittstelle am 5' (PO₄³⁻)-Ende und einer zusätzlichen XhoI Restriktionsschnittstelle am 3' (OH)-Ende amplifiziert und das erhaltene PCR-Produkt in den mit NotI und XhoI geschnittenem gpH₁-Cerulean pcDNA3.1(+) [131] Vektor eingebaut, bei dem das gpH₁ mit den beiden Restriktionsenzymen NotI und XhoI herausgeschnitten wurde.

²⁴³ Das Motorprotein Myosin V ist z. B. für den Transport von Organellen, Vesikeln, mRNA, Lipiden an den Aktinfilamenten verantwortlich. Beim Menschen gibt es drei Myosine der Klasse V (Va, Vb und Vc), die in unterschiedlichem Gewebe vorkommen (Trybus, 2008).

2.10.1). Aus der maximalen Abnahme des FRET-Signals (siehe Abbildung 3.28 A) wurde die maximale FRET-Effizienz aus den normalisierten Fluoreszenzintensitäten des Donorfluorophors Cerulean in Gegenwart (vor BAL-Zugabe) und in Abwesenheit des Akzeptorfluorophors FIAsH (nach BAL-Zugabe) für jedes FRET-Konstrukt einzeln berechnet (siehe Abschnitt 2.10.1). Die Relation der FRET-Effizienzen der einzelnen FRET-Konstrukte zur Entfernung zwischen FIAsH und Cerulean (siehe Abbildung 3.28 B) zeigt, dass nur für das MV1IQ (U50-TetC)-PG-Cerulean FRET-Konstrukt eine Korrelation zwischen der aus der maximalen FRET-Signalabnahme ermittelten FRET-Effizienz zur FIAsH-Cerulean Entfernung besteht. Für alle anderen FRET-Konstrukte konnte diese Korrelation nicht erfüllt werden (siehe Abbildung 3.28 B).

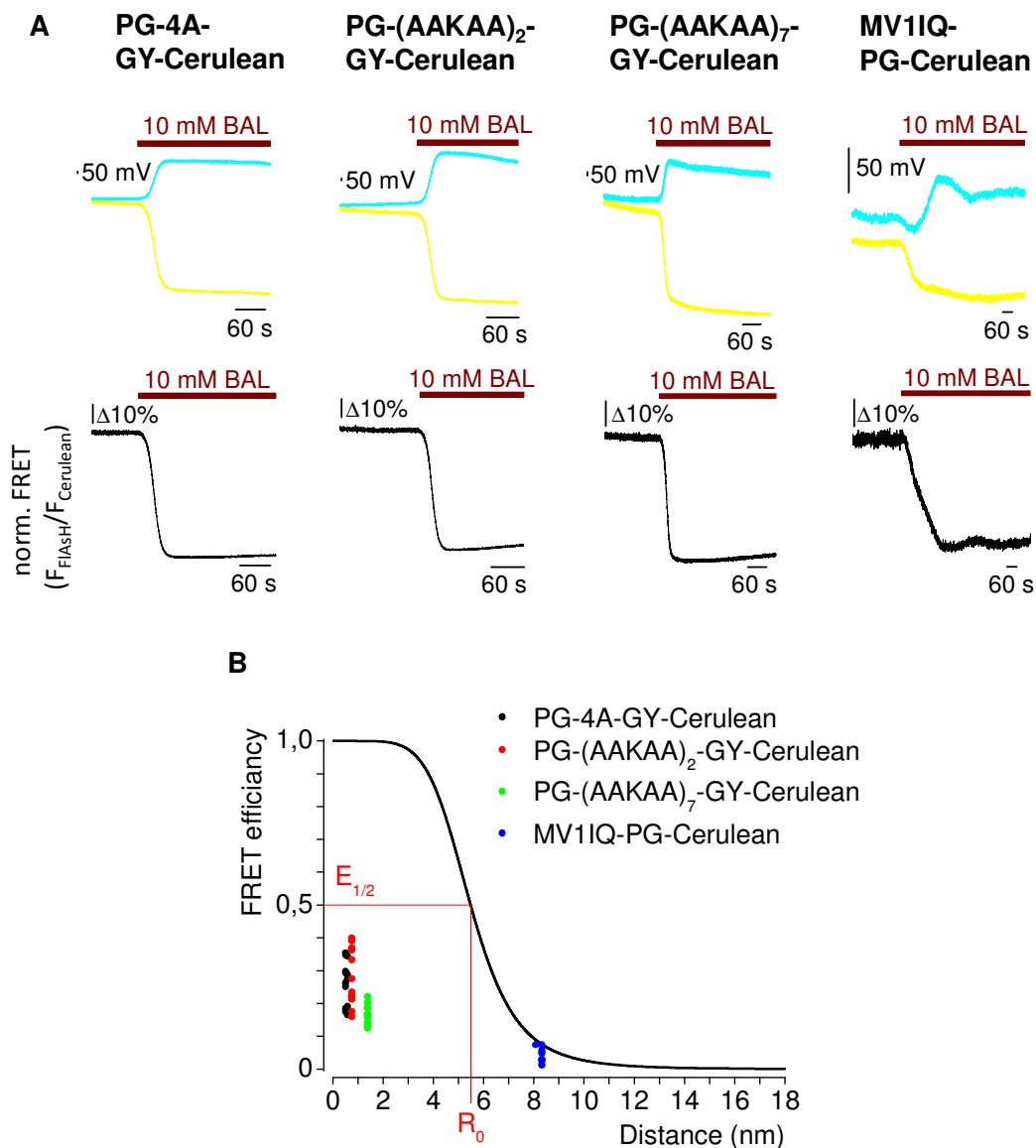


Abbildung 3.28: Bestimmung der maximalen FRET-Effizienz aus maximalen Abnahmen des FRET-Signals in Gegenwart von 10 mM BAL Dynamische FRET-Messungen von FIAsH markierten, transient transfizierten HEK293-Zellen mit folgenden FRET-konstrukten (PG-4A-GY-Cerulean = PG-4A-GY-Cerulean pcDNA3.1 (+) [496], PG-(AAKAA)₂-GY-Cerulean = PG-(AAKAA)₂-GY-Cerulean pcDNA3.1 (+) [546] und PG-(AAKAA)₇-GY-Cerulean = PG-(AAKAA)₇-GY-Cerulean pcDNA3.1 (+) [551] und

MV11Q-PG-Cerulean = MV11Q (U50-TetC)PG-Cerulean pcDNA3.1 (+) [561]). Die Applikation von 10 mM BAL (brauner Balken) verdrängt das FIAsh vollständig von seinem Tetracysteinbindemotiv, womit die gelbe FIAsh-Fluoreszenzspur ab und zeitgleich die türkise Cerulean-Fluoreszenzspur zunimmt. Aus dem normalisierten Verhältnis der FIAsh Fluoreszenzintensität zur Cerulean Fluoreszenzintensität ergeben sich in Gegenwart von 10 mM BAL maximale Abnahmen des FRET-Signals (A). Die maximalen FRET-Effizienzen wurden aus der normalisierten Cerulean Fluoreszenzintensität mittels der mathematischen Formel $E = 1 - [1/(FCerNormBAL)]$ bestimmt (siehe Abschnitt 2.10.1). Es wird die Korrelation der berechneten FRET-Effizienzen (*FRETEfficiency*) der FRET-Konstrukte zum Abstand [*Distance*, (nm)] zwischen FIAsh und Cerulean angezeigt (B). Der Abstand R_0 gibt die halbmaximale FRET-Effizienz $E_{1/2}$ des Cerulean-FIAsh-FRET-Donor-Akzeptor-Paares ($R_0 = 5,4828$ nm, siehe Abschnitt 2.10.1) wieder (B).

3.20 Bestimmung der Histaminkonzentration in murinen Gefäßperfusaten

Um die gesamte intravaskuläre Histamin-Konzentration in murinen Gefäßperfusaten zu bestimmen, wurde ein handelsüblicher, kommerziell erhältlicher Enzym-Immunoassay mit einer Nachweisgrenze von 1,8 nM (0,2 ng ml⁻¹) (siehe Abbildung 3.29) und einem Detektionsbereich von 1,8 – 450 nM (0,2 – 50 ng ml⁻¹) nach den Anweisungen des Herstellers (Histamin ELISA Kit, ARG80457, Arigo Biolaboratories) durchgeführt (siehe Abschnitt 2.1). Es wurde die Absorption bei $\lambda = 450$ nm für Perfusatproben aus Wildtyp Mesenterialarterien (C57BL/6J), die während der Vasodilatationsexperimente gesammelt wurden (siehe Abschnitt 4.9) (nach Vorverengung mit 35 mM KCl) und (nach Vorverengung mit 20 nM U46619) an einem Mikroplattenleser (FLUOstar Omega, BMG Labtech) bestimmt. Alle Proben wurden in Triplets analysiert.

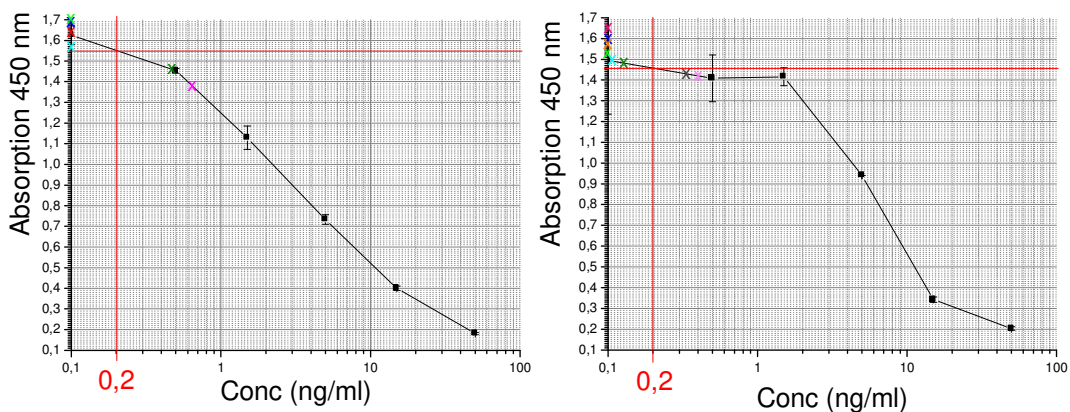


Abbildung 3.29: Kompetitiver Histamin-Enzymimmunoassay Die ermittelten Mittelwerte der optischen Dichte (farbige x, Ordinate) bei der Wellenlänge von $\lambda = 450$ nm sind gegen die Histaminkonzentration (ng ml⁻¹, Abszisse) aufgetragen. In der Abszisse ist der dekadische Logarithmus zur Basis 10 angegeben. Im Koordinatensystem gibt die Ordinate die Absorption bei der Wellenlänge $\lambda = 450$ nm und die Abszisse die Histaminkonzentration (ng ml⁻¹) wieder. Es wurde die Absorption bei $\lambda = 450$ nm für Perfusatproben aus Wildtyp Mesenterialarterien (C57BL/6J) ($n = 6$ nach Vorverengung mit 35 mM KCl, links) und ($n = 8$ nach Vorverengung mit 20 nM U46619, rechts) bestimmt.

3.21 Bestimmung der NO-Produktion in Gefäßperfusaten

Um die gesamte intravaskuläre Nitratkonzentrationen in vaskulären Gefäßperfusaten aus Wildtyp- (C57BL/6J) und H₁-Rezeptor gendefizienten (H₁R-KO) Mesenterialarterien

als Maß für die NO-Produktion bei einer Fluss-induzierten Vasodilatation (siehe Abschnitt 4.9 mit Abbildung 4.8) zu bestimmen, wurde ein im Handel kommerziell erhältliches fluorimetrisches Nitrat/Nitrit-Assay-Kit (Cayman Chemical Company, # 780051, Michigan USA) gemäß den Anweisungen des Herstellers verwendet (siehe Abschnitt 2.24). Dafür wurden die Gefäßperfusate verwendet, die während der Vasodilatationsexperimente gesammelt wurden (siehe Abschnitt 4.9 mit Abbildung 4.9). Die Nitratkonzentration wurde auf das Gesamtvolumen der Perfusate normalisiert, die während der Fluss-induzierten Vasodilatation nach Vorkonstruktion mit dem Thromboxan A₂-Rezeptor Agonisten (20 nM) U46619 (Coleman et al., 1981; Tanaka et al., 2004) gesammelt wurden. Alle Proben wurden in Triplets analysiert. Die Nitratkonzentrationen in Gefäßperfusaten aus H₁-Rezeptor gendefizienten (H₁R-KO) Mesenterialarterien sind signifikant verringert (siehe Abbildung 3.30), was darauf hindeutet, dass Fluss-induzierte Scherkräfte H₁-Rezeptoren aktivieren und zur NO-Produktion führen. Die Nitratkonzentrationen in Gefäßperfusaten aus H₁R^{-/-} waren stark verringert (Abbildung 3.30). Diese Ergebnisse legen nahe, dass durch Scherkräfte arterielle H₁-Rezeptoren aktiviert werden, die zu einer Fluss-vermittelten Freisetzung und Produktion von NO führt.

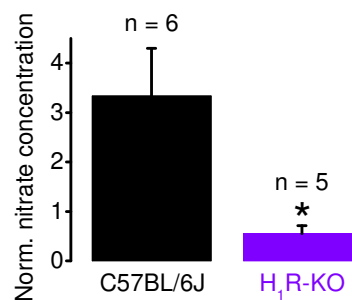


Abbildung 3.30: Fluorimetrische Bestimmung der NO-Produktion in murinen Gefäßperfusaten
Zusammenfassung der normalisierten Nitratkonzentrationen [*normalized nitrate concentration* (μM)] in Gefäßperfusaten aus Wildtyp-Arterien (C57BL/6J) und aus Histamin H₁-Rezeptor gendefizienten (H₁R^{-/-}) Arterien, die während der Fluss-induzierten Vasodilatation gesammelt wurden, wobei n die Anzahl der Einzelversuche angibt. Die Nitratkonzentrationen in Gefäßperfusaten aus H₁-Rezeptor gendefizienten (H₁R-KO) Mesenterialarterien sind im Vergleich zu den Wildtyp-Arterien signifikant verringert (Mittelwert ± SEM, *P < 0,05, ungepaarter Student-t-Test).

4 Diskussion

In der vorliegenden Arbeit konnte auf der molekularen Ebene gezeigt werden, dass der Histamin H_1 -Rezeptor intrinsisch mechanosensitiv ist und unabhängig vom endogenen Liganden Histamin mechanisch aktiviert werden kann. Überraschenderweise spielt das Vorhandensein einer C-terminalen Helix 8 eine Schlüsselrolle bei der mechanischen Aktivierbarkeit des $G_{\alpha/11}$ -Protein gekoppelten Histamin H_1 -Rezeptors. Somit stellt sich die Frage, ob die Existenz einer C-terminalen Helix 8 eine notwendige Voraussetzung für die mechanische Aktivierbarkeit aller Mitglieder der GPCR-Superfamilie ist?

4.1 Mechanosensitive G-Protein gekoppelte Rezeptoren

In den letzten Jahren wurden viele zelluläre Strukturen wie Transmembranproteine, Adhäsionsproteine, zytosolische Proteine und das Zytoskelett als Mechanosensoren diskutiert. Zum ersten Mal konnte durch die Forschergruppe um Issei Komura (2004) eine Liganden-unabhängige mechanische Rezeptoraktivierung belegt werden, indem eine chronische mechanische Aktivierung des Angiotensin II AT_1 -Rezeptors ohne Beteiligung des endogenen Liganden Angiotensin II zur pathophysiologischen Entwicklung einer kardialen Hypertrophie führte (Zou et al., 2004). Im Gegensatz zur vorliegenden Arbeit, wurde die Phosphorylierung durch ERK-Kinasen als Messsystem für eine mechanische Rezeptoraktivierung verwendet, die sich stromabwärts im Effektorsystem der mechanischen Rezeptoraktivierung befindet. Diese persistierende mechanische Aktivierung von Angiotensin II AT_1 -Rezeptoren am Herzen führte zu Phosphorylierungsreaktionen durch ERK- und Janus-Kinasen und zur Translokation der $G_{\alpha/11}$ -Untereinheit ins Zytosol. In der vorliegenden Arbeit wurde dagegen die Transduktion bzw. der Rezeptorzustand bei einer mechanischen Stimulation entweder durch hypoosmotisch bedingte Membrandehnung oder durch Fluss-induzierte Scherkräfte mit Hilfe der intramolekularen dynamischen FRET-Photometrie bestimmt (siehe Abschnitt 3.2 und Abschnitt 3.10), um einen direkt am Rezeptor stattfindende mechanische Reaktion aufzunehmen.

Durch den Einsatz von Angiotensinogen defizienten Mäusen ($Agt^{-/-}$) und eines gegen den endogenen Liganden Angiotensin II gerichteten und neutralisierenden Antikörpers konnte die Beteiligung von Angiotensin II bei der Mechanosensitivität ausgeschlossen werden. Das Experiment mit selektiven inversen Agonisten zeigte, dass die beobachtete Mechanosensitivität des Angiotensin II AT_1 -Rezeptors, genaugenommen die selektive Beeinflussung der Mechanosensitivität rezeptorabhängig ist. Die mechanische Rezeptoraktivierung konnte auch hier durch den Einsatz eines selektiven inversen Agonisten (siehe Abschnitt 3.6 und Abschnitt 3.7) signifikant unterdrückt werden, womit erstmals eine mechanische Stimulation des AT_1 -Rezeptors gezeigt wurde (Zou et al., 2004; Yasuda et al., 2008a).

Durch die Verwendung eines selektiven inversen Agonisten wurde belegt, dass der Rezeptor, direkt durch Membrandehnung aktiviert wird. Ein wesentlicher Unterschied der vorliegenden Arbeit ist, dass die Mechanosensitivität direkt am Rezeptor und proximal in

der Postrezeptorsignalkaskade experimentell beobachtet wurde. Zou et al. (2004) haben die Mechanosensitivität nur distal detektiert. In unseren FRET-Untersuchungen wurde die membraninduzierte Rezeptoraktivierung ungefähr eine Minute lang fortlaufend aufgezeichnet (siehe Abschnitt 3.2 und Abschnitt 3.10). Wohingegen Zou et al. (2004) die mechanische Stimulation stets an einem definierten Zeitpunkt, punktuell nach fünf, acht bzw. 45 Minuten betrachtet hat. Die Phosphorylierung durch ERK-Kinasen blieb bei COS-7-Zellen, die entweder den $G_{q/11}$ -Protein gekoppelten Endothelin ET_A -Rezeptor oder den G_s -Protein gekoppelten adrenergen β_2 -Rezeptor überexprimierten aus (Zou et al., 2004). Elf Jahre später konnten Jiang et al. (2015) wichtige Aminosäurepositionen im AT_1 -Rezeptor (L212, Q257 und C289) aufdecken, die zur mechanischen Aktivierung des AT_1 -Rezeptors und zur Entwicklung einer Hypertrophie von Kardiomyozyten beitragen (Jiang et al., 2015). Interessanterweise konnten schon Yasuda et al. (2008) zeigen, dass die Aminosäureposition C289 der TM7 bei der mechanisch-induzierten Rezeptorkonformation des AT_1 -Rezeptors beteiligt ist (Yasuda et al., 2008b). Die mechanische Rezeptoraktivierung wurde wie bei Zou et al. (2004) an einem fixen Zeitpunkt von 10 Minuten bestimmt und nicht über eine bestimmte Zeitspanne aufgenommen.

Dagegen konnte die Arbeitsgruppe um Prof. Dr. Michael Mederos y Schnitzler zeigen, dass HEK293-Zellen, die $G_{q/11}$ -Protein gekoppelte Rezeptoren wie z. B. den Endothelin ET_A -Rezeptor, den Vasopressin $V_{1A}R$, den Histamin H_1R , den muskarinischen M_5R , und den nicht-kalziumselektiven TRPC6-Kationenkanal co-exprimierten, auf eine Membrandehnung mit zeitabhängigen TRPC6-Einwärts- und Auswärtsströmen reagierten (Mederos y Schnitzler et al., 2008). Die Membrandehnung wurde entweder durch ein direktes Aufblähen der Zelle über die Glaspipette, durch Superfusion mit einer hypoosmolaren Lösung in der Ganzzellkonfiguration oder durch Ansaugen der Zelle mit Hilfe der Glaspipette ohne Aufreißen der Zellmembran in der „cell-attached“-Konfiguration erreicht, das zur Registrierung von TRPC6-Kationenströmen führte. Hierfür wurde die DAG-vermittelte Kationenkanalaktivierung des TRPC6 (Hofmann et al., 1999) in der klassischen Ganzzelleableitung wie in der vorliegenden Arbeit (siehe Abschnitt 3.5) als Messmethode für die mechanische Rezeptoraktivierung angewandt. Der Einsatz eines selektiven Endothelin ET_A -Rezeptor Antagonisten Darusentan ($10 \mu\text{M}$) konnte diese TRPC6 induzierten Ströme signifikant unterdrücken (Mederos y Schnitzler et al., 2008), womit erneut eine mechanische Aktivierung von $G_{q/11}$ -Protein gekoppelten Rezeptoren belegt werden konnte. Hingegen, zeigten HEK293-Zellen, die nur den TRPC6-Kanal exprimieren, keine Aktivierung des TRPC6-Kanals auf eine mechanische Stimulation. Somit führte nur die Co-expression des TRPC-Kationenkanals mit einem $G_{q/11}$ -Protein gekoppelten Rezeptor in HEK293-Zellen zu mechanisch induzierbaren einwärts- und auswärtsgerichteten Kationenströmen. Dieser Befund, dass der TRPC6-Kanal keine intrinsische Mechanosensitivität aufweist, ist völlig konträr zu der Beobachtung von Maria A. Spassova et al. (2006), und entkräftete die Arbeiten von Jonathan Soboloff und Donald L. Gill, die eine Aktivierung des TRPC6 auf hypoosmotische Membrandehnung

zeigten, die durch das Tarantelpeptid GsMTx-4 gehemmt wurde (Spasova et al., 2006). Spasova et al. mussten exorbitante Unterdrücke über die Patchpipette applizieren, um TRPC6-Kanäle im isolierten Membranfleck zu aktivieren. Erst ein Unterdruck von $84 \pm 15 \text{ mmHg}^{244}$ (umgerechnet $114 \pm 20 \text{ cmH}_2\text{O}$ oder $111991 \pm 19998 \text{ dyn cm}^{-2}$) führte zu einer Kanalaktivierung. Dieser applizierte Unterdruck ist unphysiologisch hoch und findet sich lediglich natürlich als Turgordruck bei Bodenbakterien. Normalerweise reichen Unterdrücke von $6 \text{ cmH}_2\text{O}$ (umgerechnet $4,4 \text{ mmHg}$ oder 5884 dyn cm^{-2}) aus, um endogene mechanosensitive Ionenkanäle von Wirbeltieren in Membranflecken zu identifizieren (Sackin, 1995b, a). Eine volle mechanische Aktivierung läßt sich häufig bereits bei einem Unterdruck von $35 \text{ cmH}_2\text{O}$ (umgerechnet 26 mmHg oder $34323 \text{ dyn cm}^{-2}$) erreichen (Erleben, 1989). Des Weiteren sind heterolog exprimierte mechanosensitive Tandemporen-Kaliumkanäle bei Unterdrücken von 40 mmHg ($54 \text{ cmH}_2\text{O}$) halbmaximal mechanisch aktivierbar (Martinac, 2004; Hamill, 2006). Sogar die gut untersuchten prokaryotischen mechanosensitiven Ionenkanäle, die als sogenannte Drucksicherheitsventile vor einem erhöhtem Turgordruck schützen (Levina et al., 1999; Balleza, 2012; Kocer, 2015), werden bereits bei einem halbmaximalen Druck von ca. 30 mmHg ($41 \text{ cmH}_2\text{O}$) für den MscS, von 40 mmHg ($54 \text{ cmH}_2\text{O}$) für den MscK und von 79 mmHg ($107 \text{ cmH}_2\text{O}$) für den MscL aktiviert (Martinac, 2004; Hamill, 2006). Somit sind $84 \pm 15 \text{ mmHg}$ Unterdruck sogar für prokaryotische mechanosensitive Ionenkanäle als Aktivierungsschwelle sehr hoch.

Unter physiologischen Bedingungen herrschen Scherkräfte von 1 dyn cm^{-2} bis 29 dyn cm^{-2} im venösen (Lipowsky et al., 1978; Papaioannou und Stefanadis, 2005) und $10 - 70 \text{ dyn/cm}^2$ (Papaioannou und Stefanadis, 2005; dela Paz und D'Amore, 2009) im arteriellen Gefäßsystem mit einem arteriellen Durchschnittswert von 20 dyn cm^{-2} (Papaioannou und Stefanadis, 2005; Zhou et al., 2014). In Leitungsarterien sind gewöhnlich Scherkräfte von bis zu 10 dyn cm^{-2} vorzufinden (Papaioannou und Stefanadis, 2005). Somit lag die auf die HUVEC applizierte Scherspannung von 4 dyn cm^{-2} und 20 dyn cm^{-2} (siehe Abschnitt 3.11 mit Abbildung 3.17 C und F) im physiologischen Bereich.

Interessanterweise war der G_s -Protein gekoppelte adrenerge $\beta_2\text{AR}$ wie schon bei Zou et al. (2004) gezeigt, nicht mechanosensitiv (Mederos y Schnitzler et al., 2008). Mit der Verwendung verschiedener hypoosmolaren Lösungen absteigender Osmolarität (250 mOsm kg^{-1} , 200 mOsm kg^{-1} , 150 mOsm kg^{-1} und 100 mOsm kg^{-1}) wurde die intrinsische Mechanosensitivität des adrenergen $\beta_2\text{AR}$ näher untersucht, indem die intrazelluläre Erhöhung der cAMP-Spiegel durch hypoosmotisch induzierte Membrandehnung detektiert wurde (Mederos y Schnitzler et al., 2008). Interessanterweise blieb eine intrazelluläre Erhöhung der cAMP-Spiegel bei mechanischer Stimulation des $\beta_2\text{AR}$ aus. Wohingegen unter dem β_2 -Agonisten

²⁴⁴ $1 \text{ dyn cm}^{-2} = 10^{-6} \text{ bar} = 1 \text{ g cm s}^{-2} = 10^{-5} \text{ N} = 7,50062 \times 10^{-4} \text{ mmHg}$. Somit entspricht $84 \text{ mmHg} = 111991 \text{ dyn cm}^{-2}$.
 $1 \text{ mmHg} = 1,36 \text{ cmH}_2\text{O}$. $84 \text{ mmHg} = 114 \text{ cmH}_2\text{O}$. $1 \text{ mmHg} = 133 \text{ Pa}$.

Isopreterenol und dem Adenylzyklaseaktivator Forskolin (Seamon et al., 1981) erhöhte cAMP-Spiegel beobachtet werden konnten (Mederos y Schnitzler et al., 2008). Diese Beobachtungen deuten daraufhin, dass der adrenerge β_2 AR mit hoher Wahrscheinlichkeit nicht mechanosensitiv ist. Es wäre aufschlussreich zu ergründen, warum einige GPCR nicht mechanosensitiv sind. Somit stellt sich die weiterführende Frage, welche strukturellen Unterschiede des adrenergen G_s -Protein gekoppelten β_2 AR im Vergleich zu den mechanosensitiven $G_{q/11}$ -Protein gekoppelten Rezeptoren sind dafür verantwortlich, dass der β_2 AR nicht mechanosensitiv ist?

Ayako Makino et al. (2006) konnten mittels intermolekularer FRET-Untersuchungen nur zwei Jahre nach Entdeckung des mechanosensitiven Angiotensin II AT_1 -Rezeptors den $G_{i/o}$ -Protein gekoppelten Formylpeptidrezeptor Typ1 FPR_1 als einen Mechanosensor für Fluss-induzierte Scherkräfte in neutrophilen Leukozyten beschreiben, der für die Rückbildung von Pseudopodien, den temporären Ausstülpungen von neutrophilen Leukozyten verantwortlich ist. Auch hier konnte durch die Verwendung von inversen Agonisten die rezeptorabhängige Mechanosensitivität des Formylpeptidrezeptors aufgehoben und die Rückbildung der Pseudopodien verhindert werden (Makino et al., 2006; Storch et al., 2012). Hierfür wurden intermolekulare FRET-Messungen zwischen der $G_{\alpha i1}$ -Untereinheit mit einem gelb fluoreszierenden Protein ($G_{\alpha i1}$ -YFP-F46L) und der $G_{\beta 1 \gamma 2}$ -Untereinheit des G_i -Proteins mit einem türkis fluoreszierendes Protein (CFP-N- $G_{\beta 1}$) in differenzierten HL60-Zellen durchgeführt. Fluss-induzierte Scherkräfte (5 dyn cm^{-2}) zeigten FRET-Signalabnahmen, die vermutlich auf eine Abnahme der konstitutiven Rezeptoraktivität des Formylpeptidrezeptors Typ1 FPR_1 durch mechanische Stimulation hinweist (Makino et al., 2006). Es ist zu hinterfragen, ob eine Überexpression des G_i -Proteins zu einer konstitutiven Aktivität des Formylpeptidrezeptors Typ1 FPR_1 führt? Ein bedeutender Unterschied zur vorliegenden Arbeit ist, dass mit Hilfe der intramolekularen FRET-Photometrie die Mechanosensitivität direkt am Rezeptor experimentell betrachtet wurde (siehe Abschnitt 3.2). Ayako Makino et al. (2006) hat dagegen die Mechanosensitivität nur distal durch G_i -Protein-Aktivierung mit Hilfe der intermolekularen FRET-Methode, die in einer Dissoziation des G_i -Proteins resultiert, detektiert. In dieser vorliegenden Arbeit wurde die mechanisch induzierte Konformationsänderung des H_1 -Rezeptors mit Hilfe der intramolekularen FRET-Photometrie (siehe Abschnitt 2.10.2) genauer untersucht, indem die mechanische Rezeptoraktivierung des Histamin H_1 -Rezeptors ca. eine Minute lang aufgezeichnet wurde (siehe Abschnitt 3.2 und Abschnitt 3.10).

Die Arbeitsgruppe um John A. Frangos konnte erstmals unter Anwendung der intramolekularen dynamischen FRET-Photometrie zeigen, dass der $G_{q/11}$ - sowie der G_i -Protein-gekoppelte Bradykinin B_2 -Rezeptor auf Fluss-induzierte Scherkräfte (16 dyn cm^{-2} und 30 dyn cm^{-2}), auf eine hypoosmotische Membrandehnung (Osmolaritätsänderung von 284 mOsm kg^{-1} auf 142 mOsm kg^{-1}) sowie auf eine erhöhte Membranfluidität (15 mM Benzylalkohol) reagierte (Chachisvilis et al., 2006). Mit Hilfe der intramolekularen dynamischen FRET-Untersuchungen von Endothelzellen aus der Aorta des Hausrindes, die ein B_2 -Rezeptor-Konstrukt mit einem gelb fluoreszierenden

Protein in der dritten intrazellulären Schleife und einem cyan fluoreszierenden Protein am C-Terminus heterolog exprimierten, zeigten deutliche FRET-Signalabnahmen auf eine mechanische Stimulation, womit erstmals eine Konformationsänderung eines GPCR auf einen mechanischen Reiz beobachtet wurde. Die Agonisten und mechanisch induzierten FRET-Signale führten zu vergleichbaren FRET-Signalabnahmen. Erneut konnte die Verwendung eines selektiven B₂-Rezeptorantagonisten HOE140 (10 µM) die mechanische Aktivierung des Bradykinin B₂-Rezeptors signifikant unterdrücken (Chachivilis et al., 2006; Storch et al., 2012). Ein Vorteil der intramolekularen dynamischen FRET-Untersuchung ist das direkte Monitoring der mechanischen Rezeptoraktivierung des B₂-Rezeptors. Ein großer Nachteil dagegen ist, dass das B₂-Rezeptor-Konstrukt nur eine minimale FRET-Änderung von 1-2% detektiert. Diese minimale Änderung des FRET-Signals ist mit einer großen Wahrscheinlichkeit durch die sterische Hinderung des gelb fluoreszierenden Proteins in der dritten intrazellulären Schleife begründet. Wie in dieser vorliegenden Arbeit gezeigt (siehe Abschnitt 3.15), ruft auch hier eine Veränderung des lateralen Druck-Spannungsprofils in der Lipid-Doppelschicht mit einer erhöhten Membranfluidität einen mechanisch induzierten Rezeptorzustand des Bradykinin B₂-Rezeptors hervor. Chachivilis et al. (2006) konnten zum ersten Mal beobachten, dass mechanosensitive GPCR an der Vermittlung mechanischer Stimuli in Endothelzellen, wie auch Gegenstand in dieser vorliegenden Arbeit, beteiligt sind (siehe Abschnitt 3.11).

Des Weiteren konnten John A. Frangos und Mirianas Chachivilis mit intramolekularen dynamischen FRET-Untersuchungen einen Agonisten-unabhängigen Rezeptorzustand des G_s-, G_{q/11}- und G_{i/o}-Protein gekoppelten Parathormon PTH₁-Rezeptors in murinen präosteoblastischen MC3T3-E1-Zellen unter Applikation Fluss-induzierter Scherkräfte (16 dyn cm⁻²) beobachten, das unterschiedlich zum Agonisten induzierten Rezeptorzustand ist. Die Applikation Fluss-induzierter Scherkräfte führte zu einer FRET-Signalzunahme um ca. +25%. Wohingegen die Applikation des Parathormons PTH 1-34 (1 µM) eine deutliche FRET-Signalabnahme um -35% verursachte und damit einen Agonisten-induzierten Rezeptorzustand belegt. Für die dynamischen intramolekularen FRET-Messungen wurde ein PTH₁-Rezeptor-Konstrukt mit einem gelb fluoreszierenden Protein (Citrin) in der dritten intrazellulären Schleife und ein türkis fluoreszierendes Protein (Cerulean) am C-Terminus des PTH₁-Rezeptors heterolog exprimiert. Interessanterweise war die Zunahme des FRET-Signals auf Fluss-induzierte Scherkräfte in Anwesenheit des endogenen Agonisten PTH 1-34 (1 µM) um 50% reduziert, dass vermutlich durch einen anderen Konformationszustand des PTH₁-Rezeptors bei einer Agonistenstimulation bedingt sein kann (Zhang et al., 2009). Interessanterweise konnte zudem eine Zunahme des FRET-Signals bei einer erhöhten Membranfluidität durch die Verwendung von Benzylalkohol (15 mM) erreicht werden (Zhang et al., 2009). Sowohl bei der Applikation von Benzylalkohol (15 mM) als auch von Methyl-β-Cyclodextrin (10 mM) nahm das FRET-Signal zu, was auf einen Rezeptorzustand des PTH₁-Rezeptors hindeutet, der wahrscheinlich einem mechanisch induzierten Rezeptorzustand ähnelt. Beim PTH₁-Rezeptor löste die Fluss-induzierte

Scherkraft von 16 dyn cm^{-2} FRET-Signalzunahmen wie bei der Applikation von Benzylalkohol (15 mM) oder bei einer Cholesterolverarmung der Zellmembran durch Methyl- β -Cyclodextrin (10 mM) aus. Daher erscheint es, dass die Fluss-induzierte Scherkraft auch zu einer Erhöhung der Membranfluidität führt, obwohl das Zeichen der FRET-Änderung zwischen dem PTH₁-Rezeptor (FRET-Signalzunahme) und dem B₂-Rezeptor (FRET-Signalabnahme) unterschiedlich ist. Schon im Jahre 2001 wurde durch Peter R. J. Butler et al. gezeigt, dass Fluss-induzierte Scherkräfte zu einer erhöhten Membranfluidität in der Lipiddoppelschicht führen können (Butler et al., 2001). In beiden Arbeiten fehlt ein entscheidendes Experiment, das den Einfluss einer cholesterolarmen Zellmembran auf die mechanische Aktivierbarkeit des PTH₁-Rezeptors und des B₂-Rezeptors näher untersucht. In unseren FRET-Untersuchungen (siehe Abschnitt 3.15 mit Abbildung 3.24 A und B) konnte beobachtet werden, dass Cholesterol in der Zellmembran die FRET-Signalabnahmen unter hypoosmotischer Membrandehnung signifikant verringert (siehe Abschnitt 3.15 mit Abbildung 3.24 A und B), was darauf hinweist, dass eine Cholesterolverarmung der Zellmembran das intrinsische Kraftprofil in einer Lipid-Doppelschicht beeinflusst und dadurch einen mechanisch induzierbaren Rezeptorzustand des H₁-Rezeptors stabilisiert.

Auch der G_{i/o}-gekoppelte humane Serotonin 5-HT_{1B}-Rezeptor konnte durch Fluss-induzierte Scherkräfte aktiviert werden. Analog zum Bradykinin B₂- und PTH₁-Rezeptor wurde erneut ein FRET-Rezeptorkonstrukt mit einem gelb fluoreszierenden Protein (Citritin) in der dritten intrazellulären Schleife und einem türkis fluoreszierendem Protein (Cerulean) am C-Terminus²⁴⁵ des 5-HT_{1B}-Rezeptors konstruiert. Dynamische intramolekulare FRET-Untersuchungen zeigten im Vergleich zum Bradykinin B₂-, PTH₁- und zum Histamin H₁-Rezeptor FRET-Signalzunahmen um ca. +10-12% unter dem endogenen Liganden Serotonin (500 μM) (Candelario und Chachisvilis, 2012). Dagegen konnte die Applikation Fluss-induzierter Scherkräfte (16 dyn cm^{-2}) FRET-Signalabnahmen um ca. -4-6% induzieren, was erneut auf einen Agonisten-unterschiedlichen, mechanisch induzierbaren Rezeptorzustand hinweist. Wie beim PTH₁-Rezeptor beobachtet wurde, waren Fluss-induzierte FRET-Signalabnahmen in Gegenwart des endogenen Liganden um 90% reduziert, womit der Effekt des Agonisten durch Scherkräfte gemildert wird. Im Gegensatz zum Histamin H₁-Rezeptor (siehe Abschnitt 3.10 mit Abbildung 3.16) und zum Bradykinin B₂-Rezeptor (Chachisvilis et al., 2006) zeigte der Serotonin 5HT_{1B}-Rezeptor mechanisch induzierte FRET-Signalabnahmen und Agonisten induzierte FRET-Signalzunahmen (Candelario und Chachisvilis, 2012). Dagegen zeigte der PTH₁-Rezeptor mechanisch induzierte FRET-Signalzunahmen auf Fluss-induzierte Scherkräfte und FRET-Signalabnahmen auf Agonistenstimulation (Zhang et al., 2009). Diese beiden Rezeptoren zeigten erstmals eine Agonisten-unterschiedliche Transduktion durch mechanische Stimulation. Um die

²⁴⁵ Das Donorfluorochrom Cerulean wurde an einen um fünf Aminosäuren gekürzten C-Terminus des humanen Serotonin 5-HT_{1B}-Rezeptor fusioniert, um eine bessere FRET-Effizienz zu erzielen (Candelario und Chachisvilis, 2012).

Frage zu beantworten, ob die mechanische Rezeptoraktivierung tatsächlich unabhängig von der Agonistenstimulation ist, wurde die Histaminbindung durch zwei Aminosäureaustausche (D116A und F433A) in der orthosterischen Ligandenbindetasche unterbunden und die H₁-Rezeptormutante (H₁R-mut) näher auf die mechanische Aktivierung hin untersucht (siehe Abschnitt 3.5). FRET-Messungen, ratiometrische Kalziummessungen mit Fura-2 sowie elektrophysiologische Messungen in der Ganzzelleableitung mit der H₁-Rezeptormutante zeigten keine FRET-Signalabnahmen (siehe Abschnitt 3.5 mit Abbildung 3.8 A), keine Kalziumzunahmen (siehe Abschnitt 3.5 mit Abbildung 3.9 A und C) sowie keine TRPC vermittelte Kationenströme (siehe Abschnitt 3.5 mit Abbildung 3.9 B) auf Agonistenstimulation, aber immer noch deutliche FRET-Signalabnahmen, Kalziumzunahmen und Kationenströme auf hypoosmotisch induzierte Membrandehnung. Somit zeigten diese Ergebnisse, dass die H₁-Rezeptormutante nicht mehr auf die Agonistenstimulation reagierte, aber immer noch mechanosensitiv war (siehe Abbildung 3.8 A). Somit kann belegt werden, dass die mechanische Rezeptoraktivierung unabhängig von der Agonistenbindung ist (siehe Abschnitt 3.5).

Des Weiteren führte die Verwendung von Benzylalkohol (15 mM) wie schon beim Bradykinin B₂-Rezeptor und beim PTH₁-Rezeptor beobachtet zu einer gleichen FRET-Signaländerung wie bei der Applikation Fluss-induzierter Scherkräfte. Es ist fraglich, ob die Verwendung von Benzylalkohol einen dynamischen intramolekularen FRET ermöglicht, da eine Arbeit vom Jahre 2012 zeigt, dass die Verwendung von Benzylalkohol eine Phasentrennung in der Lipid-Doppelschicht verursacht (Muddana et al., 2012), was zu einer räumlichen Neuordnung und folglich zu einer Anreicherung von integralen Proteinen führen kann. Das würde im Hinblick auf die FRET-Untersuchungen bedeuten, dass dadurch auch ein intermolekularer FRET zwischen dem Donor- und dem Akzeptorfluorochrom von zwei räumlich nicht weit voneinander getrennten ($R_0 < 10$ nm) Rezeptorkonstrukten stattfinden kann und dadurch nicht ausschließlich intramolekulare, sondern auch intermolekulare dynamische FRET-Messungen detektiert werden können. Im Gegensatz zu den Arbeiten von Mirianas Chachivilis (Chachivilis et al., 2006; Zhang et al., 2009; Candelario und Chachivilis, 2012) wurde in der vorliegenden Arbeit das kleine gelb fluoreszierende arsenhaltige Molekül FIAsh anstelle von YFP bzw. Citrin als ein Akzeptorfluorochrom verwendet (siehe Abschnitt 2.10.2 mit Abbildung 2.12). Mit einer atomaren Masseneinheit von $< 0,7$ kDa besitzt FIAsh gegenüber fluoreszierende Proteine wie z. B. YFP und Citrin mit einer atomaren Masseneinheit von ~ 27 kDa - 30 kDa (Cody et al., 1993; Hoffmann et al., 2005; Adams und Tsien, 2008; Hoffmann et al., 2010) einen wesentlichen Größenvorteil, so dass Konformationsänderungen von Proteinen kaum durch die Größe des gelb fluoreszierende FIAsh sterisch gehindert werden. Somit können verschiedene Rezeptorzustände von GPCR genauer untersucht werden. Auch die Verwendung von

eCFP²⁴⁶ (Poea-Guyon et al., 2013) anstelle von mCerulean²⁴⁷ als ein Donorfluorochrom bringt einige Nachteile wie eine geringe Quantenausbeute, einen geringen Extinktionskoeffizienten (Rizzo et al., 2004), eine pH-Wert abhängige Fluoreszenzintensität (Poea-Guyon et al., 2013) und eine geringere Photostabilität (Fredj et al., 2012) mit sich, so dass bei zeitaufgelösten dynamischen FRET-Untersuchungen ein schnelleres Photobleichen mit einer schnellen Abnahme der Fluoreszenzintensität über die Zeit erfolgen kann.

Da wir FRET-basierte Experimente mit hypoosmolaren Lösungen durchgeführt haben, sind Änderungen des pH-Wertes und der Chloridkonzentration möglich, die das türkis fluoreszierende Protein beeinflussen können (Germond et al., 2016). Daher wurde bei allen unseren FRET-Untersuchungen mCerulean als eine verbesserte, photostabilere Variante von eCFP verwendet.

Interessanterweise zeigte bisher nur der PTH₁-Rezeptor²⁴⁸ ein Vertreter aus der Klasse B der GPCR-Superfamilie typischerweise mit einem relativ langen N- (120 Aminosäuren) und relativ langem C-Terminus mit 130 Aminosäuren (Gardella und Vilardaga, 2015) im Gegensatz zu Klasse A GPCR eine mechanisch induzierte FRET-Signalzunahme, was höchstwahrscheinlich für eine andere mechanisch induzierte Transduktion von Klasse B GPCR spricht. Es wäre aufschlussreich, weitere Klasse B GPCR mit aufgeklärter Struktur wie z. B. den Glucagon-ähnliche Peptid-1-Rezeptor (GLP-1 Rezeptor) (Jazayeri et al., 2017; Liang et al., 2018), den Calcitonin Rezeptor (Liang et al., 2017), den Glucagon Rezeptor (Zhang et al., 2017b) sowie den *Corticotropin-releasing factor* Rezeptor Typ 1 (CRF₁R) (Hollenstein et al., 2013) auf eine mechanische Stimulation mit Fluss-induzierten Scherkräften zu untersuchen.

Im Jahre 2008 konnte Noritaka Yasuda erstmals einen Vorschlag für eine mechanisch induzierten Rezeptorzustand des G_{q/11}-gekoppelten Angiotensin II AT₁-Rezeptors auf molekularer Ebene mit Hilfe der SCAM-Methode (siehe Abschnitt 1.6.7) machen, die im Gegensatz zur Agonisten induziertem Rezeptorzustand eine Rotation und Verschiebung der TM7 gegen den Uhrzeigersinn in die orthosterische Ligandenbindetasche durch

²⁴⁶ Das eCFP (Abkürzung vom Englischen enhanced cyan fluorescent protein) ist eine Weiterentwicklung der aus der Qualle *Aequorea victoria* gewonnenem grün fluoreszierendem Protein GFP (green fluorescent protein), indem die Aminosäurepositionen N146I, M153T, V163A, F64L, S65T und T66W ausgetascht wurden. Durch den T66W Aminosäureaustausch wurde das fünfgliedrige konjugierte π -Imidazolion-Ringsystem um den aromatischen Heterozyklus des Tryptophans vergrößert (Fabienne et al., 2016).

²⁴⁷ Das Cerulean ist eine weiterentwickelte Variante von eCFP, das durch folgende Aminosäureaustausche S72A, Y145A und H148D gewonnen wurde (Rizzo et al., 2004). Im Gegensatz zu eCFP liegt mCerulean (*monomeric Cerulean*) als ein Monomer aufgrund der zusätzlichen A206K Mutation vor (Malo et al., 2007; Day und Davidson, 2009; Fabienne et al., 2016), wodurch idealerweise eine 1:1 - Stöchiometrie zwischen dem Akzeptor-Fluorochrom FIAsh und dem Donor-Fluorochrom mCerulean vorliegt. Zudem besitzt es einen höheren Extinktionskoeffizienten, eine höhere Quantenausbeute mit $QY_{mCerulean} = 0,62$ gegenüber $QY_{eCFP} = 0,40$ (Day und Davidson, 2009) bzw. mit $QY_{mCerulean} = 0,67$ gegenüber $QY_{eCFP} = 0,37$ (Fabienne et al., 2016) und eine mindestens 1,5-fach (Day und Davidson, 2009) bis 2,5-fach stärkere (Rizzo et al., 2004) Leuchtkraft als eCFP sowie ein besseres Signal-Rausch-Verhältnis in FRET-basierten Untersuchungen (Rizzo et al., 2004; Day und Davidson, 2009). Die Fluoreszenzlebensdauer von Cerulean besitzt eine mono-exponentielle Kinetik gegenüber eCFP mit einer bi-exponentiellen Kinetik (Bae et al., 2003). Das Cerulean ist auch photostabiler (Rizzo et al., 2004) und reagiert nicht so empfindlich gegenüber pH-Wertänderungen (Kremers et al., 2006; Shaner et al., 2007; Markwardt et al., 2011; Poea-Guyon et al., 2013) und Chloridkonzentrationen.

²⁴⁸ Zugriffsschlüssel PDB ID: 6NBF, 6NBH, 6NBI (Zhao et al., 2019b) aus der Proteindatenbank (RCSB PDB Protein Data Bank) (Berman et al., 2000) mit der URL-Adresse <http://www.rcsb.org/>, letzter Aufruf erfolgte am 21.07.2019.

Membrandehnung suggeriert (Yasuda et al., 2008a; Yasuda et al., 2008b; Storch et al., 2012). Interessanterweise zeigte der Histamin H₁-Rezeptor mit dem FIA₅H-Bindemotiv am Beginn des C-Terminus keine FRET-Signalabnahme als Reaktion auf Histamin, aber die größte mechanisch-induzierte FRET-Signalabnahme bei einer hypoosmotischen Membrandehnung. In dieser Arbeit konnte Noritaka Yasudas Vorschlag einer mechanischen Rezeptoraktivierung, die eine Rotation und Verschiebung der TM7 gegen den Uhrzeigersinn in die orthosterische Ligandenbindetasche vermutet (Yasuda et al., 2008b) bestärkt werden, da mechanisch vermittelte FRET-Signalabnahmen umso größer waren, je näher sich das FIA₅H-Tetracysteinbindemotiv an der TM7 befand: ct-b > il3-e2 > il3-e1 > il3-m > il3-b (siehe Abschnitt 3.4). Im Gegensatz dazu wurde ein inaktiver Rezeptorzustand des Angiotensin II AT₁-Rezeptors mit dem selektiven inversen Agonisten Candesartan stabilisiert, indem die Konformationsänderung der TM7 in den aktiven Rezeptorzustand unterdrückt wird. Wasserstoffbrückenbindungen zwischen der Carboxygruppe des inversen Agonisten Candesartan und den Aminosäurepositionen Q257 der TM6 und T287 der TM7 arretieren den AT₁-Rezeptor im inaktiven Rezeptorzustand (Yasuda et al., 2008a; Yasuda et al., 2008b; Akazawa et al., 2009; Sharif-Naeini et al., 2010). Somit besitzt der Angiotensin II AT₁R zwei unabhängige Perzeptionen und Transduktionen: eine Chemosensorik und eine Mechanosensorik sowie ihre entsprechenden Transduktionen.

Aus den Untersuchungen in der klassischen Ganzzelleableitung konnten Michael Mederos et al. (2008) zeigen, dass der Histamin H₁-Rezeptor am stärksten mechanosensitiv war und den stärksten zeitabhängigen TRPC6-Einwärts- und Auswärtsstrom auslöste (Mederos y Schnitzler et al., 2008). Wie erwartet zeigte die H₁-Rezeptormutante mit den zwei Aminosäureaustauschen D116A und F433A in der orthosterischen Ligandenbindetasche keine einwärts- und auswärtsgerichteten TRPC6-Kationenströme auf Histamin, aber deutliche Stromzunahmen auf eine mechanische Stimulation mit einer hypoosmolaren Lösung (siehe Abschnitt 3.5 mit Abbildung 3.9). Auch Bongnam Jung et al. konnten (2012) zeigen, dass der Sphingosin S1P₁-Rezeptor trotz einer zerstörten orthosterischen Ligandenbindetasche (R120A) für Sphingosin-1-phosphat immer noch mechanosensitiv auf Fluss-induzierte Scherkräfte im vaskulären Endothel reagierte (Jung et al., 2012). Diese Befunde stehen im Einklang mit der Agonisten-unabhängigen mechanischen Rezeptoraktivierung des Histamin H₁-Rezeptors (siehe Abschnitt 3.11).

Bei der Mehrheit der GPCR bewirkt eine Rezeptoraktivierung eine konsekutive sogenannte β -Arrestin-1- oder -2-Rekrutierung (Benovic et al., 1987; Lohse et al., 1990; Pippig et al., 1993; Gurevich et al., 1995). Diese β -Arrestin-Rekrutierung kann wiederum in eine Desensibilisierung, eine eigene β -Arrestin-vermittelte Signalweiterleitung oder in eine Rezeptorinternalisierung münden bzw. enden (Hamdan et al., 2005; DeWire et al., 2007; Smith und Rajagopal, 2016; Cahill et al., 2017). Mit Hilfe des

Biolumineszenz-Resonanz-Energie-Transfers²⁴⁹ (BRET) kann die β -Arrestin-Rekrutierung als ein strahlungsfreier Energietransfer zwischen dem BRET-Donor, dem biolumineszierenden Enzym Luciferase (Rluc) aus der Seefeder *Renilla reniformis*, und dem BRET-Akzeptorfluorochrom, einem gelb fluoreszierenden Protein wie z. B. Venus, gemessen werden (Hamdan et al., 2005; Pflieger und Eidne, 2006; Salahpour et al., 2012; Donthamsetti et al., 2015).

In COS7-Zellen, die den AT₁-Rezeptor mit dem gelb fluoreszierenden Protein Venus (AT₁R-Venus), und β -Arrestin-2 mit der *Renilla* Luciferase (β Arr2-RLuc) co-exprimierten, löste sowohl eine Membrandehnung mit hypoosmolarer Lösung (273 mOsm kg⁻¹) als auch eine Agonistenstimulation mit Angiotensin II (100 nM) eine β -Arrestin-2-Rekrutierung aus, das in beiden Fällen durch den selektiven inversen Agonisten Losartan (1 μ M) unterdrückt werden konnte (Mederos y Schnitzler et al., 2008). Mit der BRET-Methode können einige Nachteile, die mit der Verwendung von FRET-basierten Experimenten verbunden sind, wie die gleichzeitige Anregung des Donor- und Akzeptor-Fluorochroms mit der Anregungswellenlänge des Donor-Fluorochroms, das sogenannte optische Übersprechen („cross-talk“), das Photobleichen beider Fluorochrome mit der Anregungswellenlänge des Donor-Fluorochroms (siehe Abschnitt 2.10 mit Abbildung 2.11) und die Autofluoreszenz der gemessenen Probe umgangen werden (Pflieger und Eidne, 2006). Außerdem wird keine externe Lichtquelle, die monochromatisches Licht speist, zur Anregung des BRET-Donors benötigt und somit entfällt das Fluoreszenzsignal des angeregten Donor-Fluorochroms, was zu einem besserem Signal zu Rausch-Verhältnis führt (Lohse et al., 2012).

Die Arbeitsgruppe um Howard Allan Rockman konnte zeigen, dass die osmotisch bedingte β -Arrestin-2-Rekrutierung an den AT₁-Rezeptor einen ähnlichen Rezeptorzustand auslöst wie mit allosterischen Agonisten für das β -Arrestin Effektorsystem („ β -Arrestin biased agonists“), die eine β -Arrestin-Rekrutierung ohne eine vorangegangene orthosterische Ligandenbindung und ohne eine G-Protein-Aktivierung verursachen. Es wird angenommen, dass die Membrandehnung aktive Konformationen des AT₁-Rezeptors und des β -Arrestin-2 induziert, die ausschließlich durch allosterische Agonisten stabilisiert werden können. Somit fungiert die Membrandehnung als ein sogenannter allosterischer Agonist für die β -Arrestin-2-Rekrutierung (Rakesh et al., 2010; Scimia et al., 2012; Tang et al., 2014; Hodavance et al., 2016. Rakesh et al. (2010). Sowohl in vitro als auch in vivo Experimenten wurde beobachtet, dass eine Membrandehnung erstens zur Phosphorylierung des AT₁-Rezeptors durch die beiden GPCR-Kinasen GRK5 und GRK6, zweitens zur β -Arrestin-2-Rekrutierung und drittens zu einer ERK1/2-Aktivierung

²⁴⁹ Die Methode des Biolumineszenz-Resonanz-Energie-Transfers beruht darauf, dass bei der Oxidation des Substrats Coelenterazin h durch das Enzym *Renilla*-Luciferase Licht mit einer Wellenlänge von $\lambda = 475\text{-}480$ nm emittiert wird (Biolumineszenz), das den BRET-Akzeptorfluorochrom Venus in einer Entfernung von < 10 nm (< 100 Å) anregt und dann Licht mit einer Wellenlänge von $\lambda = 530$ nm emittiert wird. Das BRET-Signal wird als ein Verhältnis beider emittierter Wellenlängen von YFP und *Renilla*-Luciferase (YFP/Rluc) dargestellt (Hamdan et al., 2005; Pflieger und Eidne, 2006; Salahpour et al., 2012; Donthamsetti et al., 2015).

fürhte, die durch die Verwendung eines spezifischen inversen Agonisten (Losartan oder Candesartan) unterdrückt werden konnten (Rakesh et al., 2010). Diese Befunde lassen vermuten, dass eine Liganden-unabhängige mechanische Rezeptoraktivierung des AT₁-Rezeptors andere Effektorsysteme außer dem G_{q/11}-Protein Effektorsystem aktiviert. Dagegen stützen unsere ratiometrischen Kamera-basierten Kalziummessungen mit Fura-2 an HEK293-Zellen, die den Histamin H₁-Rezeptor stabil exprimierten, die Hypothese, dass GPCR Liganden-unabhängig als Mechanosensoren fungieren und eine G_{αq/11}-Protein-Aktivierung bewirken können. Mit der Verwendung des spezifischen G_{αq/11}-Protein Inhibitors YM-254890 konnten osmotisch bedingte Kalziumerhöhungen signifikant unterdrückt werden (siehe Abschnitt 3.4).

Kriti Rakesh et al. (2010) zeigten mit intermolekularen FRET-Messungen zwischen mit dem monomeren CFP fusioniertem AT₁-Rezeptor (AT₁R-mCFP) und mit dem YFP gebundenem β-Arrestinen (β-arrestin-1-YFP und β-arrestin-2-YFP) nur eine minimale 3-5%ige mechanisch induzierte (137 mOsm kg⁻¹) FRET-Signalzunahme (Rakesh et al., 2010). Wohingegen die Agonistenstimulation mit einer 10-fach höheren Angiotensin II Konzentration (1 μM) als sonst üblich angewandt eine 20-25%ige FRET-Signalzunahme zeigte. Diese 10-fach höhere, supramaximale Angiotensin II Konzentration führte zu einer maximalen Aktivierung des AT₁-Rezeptors und schließlich zu einer β-Arrestin-Rekrutierung. Die hypoosmotisch bedingte Membrandehnung führte dagegen nur zu einer 5-7-fach geringeren β-Arrestin-Rekrutierung. Die β-Arrestin-Rekrutierung konnte nur bei sehr hohen Angiotensin II Konzentration detektiert werden. Daraus kann man folgern, dass die hypoosmotische Membrandehnung vermutlich vielmehr eine G_{q/11}-Proteinaktivierung hervorruft, die nicht durch das AT₁R-mCFP-β-arrestin-YFP FRET-Paar detektiert werden konnte. Mit der Verwendung eines FRET-Sensors für Diacylglycerol (DAGR = Diacylglycerol-Reporter), der eine Diacylglycerol-bindende C1-Domäne der Proteinkinase C βII zwischen einem türkis fluoreszierenden (CFP) und einem gelb fluoreszierenden Protein YFP hat, wurde auf die mechanisch induzierte Bildung des sekundären Botenstoffs DAG hin näher untersucht (Rakesh et al., 2010). Bei einer Aktivierung des AT₁-Rezeptors mit 100 nM Angiotensin II transloziert der DAG-FRET-Sensor vom Zytosol zur Plasmamembran, um neu gebildetes DAG zu binden, was zu einer ca. ziemlich geringen 2%igen FRET-Signalzunahme führt, die proportional zur vorhandenen DAG-Konzentration ist (Violin et al., 2006). Eine hypoosmotische Membrandehnung (137 mOsmkg⁻¹) resultierte in keiner Änderung des FRET-Signals, was auf ein Ausbleiben einer G_{q/11}-Protein-Aktivierung hinweist. Es ist fraglich, ob der DAG-FRET-Sensor, der nur eine 2%igen FRET-Änderung auf 1 μM Angiotensin zeigte überhaupt sensitiv genug ist, um eine mechanisch induzierte G_{q/11}-Protein-Stimulation zu detektieren. Auch fehlt das entscheidende FRET-Kontrollexperiment zwischen dem AT₁R-mCFP und einer mit YFP fusionierten G_α-Untereinheit des G_{q/11}-Proteins (G_α-YFP), um die G-Protein-Aktivierung bei einer mechanischen Aktivierung des AT₁-Rezeptors zu untersuchen.

Auch die Forschungsergebnisse von Maria Cecilia Scimia (2012) gelangen zu einer ähnlichen Erkenntnis, dass eine Agonisten-unabhängige mechanische Aktivierung des

Apelinrezeptors eine β -Arrestin-Rekrutierung begünstigt und eine G_i -Protein-Aktivierung verhindert (Scimia et al., 2012). Wie schon früher für den Angiotensin II AT_1 -Rezeptor beschrieben (Zou et al., 2004) trägt auch die mechanische Aktivierung des Apelinrezeptors zur Ausbildung einer belastungs-induzierten Herzhypertrophie bei (Scimia et al., 2012). Sowohl Apelinrezeptor- als auch β -Arrestin-2-gendefiziente Mäuse entwickelten keine Herzhypertrophie bei anhaltender Überlastung. Dagegen zeigte die Apelin-induzierte G_i -Protein-Aktivierung protektive Effekte am Herzen (Scimia et al., 2012). Somit ist der G_i -Protein gekoppelte Apelinrezeptor ein weiterer mechanosensitiver GPCR. Anhand der vorab erwähnten Untersuchungen wird eine Agonisten-unabhängige β -Arrestin-Rekrutierung in Abwesenheit einer G -Protein-Aktivierung vorgeschlagen, demgegenüber können jedoch unsere ratiometrischen Kalziummessungen mit Fura-2 mit dem potenten, spezifischen $G_{q/11}$ -Protein Inhibitor YM-254890 zeigen, dass in der Tat eine $G_{q/11}$ -Protein-Aktivierung unter hypoosmotischer Membrandehnung stattfindet (siehe Abschnitt 3.6). Eine $G_{q/11}$ -Protein vermittelte Signalweiterleitung konnte signifikant unter dem spezifischen $G_{q/11}$ -Protein Inhibitor YM-254890 (100 nM) verhindert werden (siehe Abschnitt 3.4), indem die Freisetzung von GDP von der G_α -Untereinheit des $G_{q/11}$ -Proteins unterdrückt wird (Nishimura et al., 2010; Kamato et al., 2016). Das wiederum bedeutet, dass die mechanische Rezeptoraktivierung des Histamin H_1 -Rezeptors auch ein $G_{q/11}$ -Protein vermitteltes Effektorsystem durchläuft.

Merel J. W. Adjobo-Hermans et al. (2011) konnten mit der Verwendung eines G_q -Protein-FRET-Sensors, bei dem die G_α -Untereinheit an ein monomeres türkis fluoreszierendes Protein mTurquoise ($G_{\alpha q}$ -mTq $\Delta 6$) und die $G_{\beta\gamma}$ -Untereinheit an ein monomeres YFP (YFP-G $\gamma 2$) fusioniert ist, die Aktivierungskinetik des $G_{q/11}$ -Proteins sowohl bei einer Histaminstimulation als auch bei einer hypoosmotischen Membrandehnung analysieren. Merel J. W. Adjobo-Hermans et al. (2011) beobachteten, dass HeLa-Zellen, die den Histamin H_1 -Rezeptor und den $G_{q/11}$ -Protein FRET-Sensor heterolog exprimierten eine deutliche ca. -10% ige FRET-Signalabnahme auf Histamin (100 μ M) zeigten, die durch den selektiven inversen Agonisten Mepyramin (10 μ M) unterdrückt werden konnten, wobei die Aktivierungskinetik bei einer Histamin induzierten $G_{q/11}$ -Protein-Aktivierung $T_{1/2} = 350$ ms betrug. Auch löste die hypoosmotische Membrandehnung eine eindeutige FRET-Signalabnahme aus (Adjobo-Hermans et al., 2011), was auf eine Agonisten-unabhängige mechanische Aktivierung des H_1 -Rezeptors mit einer nachfolgenden Aktivierung des G_q -Proteins hinweist. Diese Resultate stehen im Einklang mit unseren ratiometrischen Kalzium-Messungen mit dem selektiven $G_{q/11}$ -Protein-Inhibitor YM-254890 (siehe Abschnitt 3.4). Die Kinetik der Histamin induzierten FRET-Signaländerung lag dagegen bei intramolekularen dynamischen FRET-Messungen mit dem $\beta 3$ -e gpH $_1$ R-Konstrukt in physiologischer HBS mit 140 mM NaCl bei $T_{1/2} = 148 \pm 7$ ms (siehe Abschnitt 3.17). Diese schnelle Aktivierungskinetik unter Histaminstimulation in intramolekularen FRET-Untersuchungen kann somit durch die direkt am Rezeptor stattfindende Transduktion begründet werden. Dagegen vermuten die Forschergruppen um Dr. Evi Kostenis und um Dr. Jürgen Wess, dass eine

β -Arrestin-Rekrutierung nur in Gegenwart von G-Proteinen möglich ist (Grundmann et al., 2018). Das würde im Hinblick auf eine mechanische Rezeptoraktivierung bedeuten, dass eine $G_{q/11}$ -Protein unabhängige Rekrutierung von β -Arrestin-2 bei mechanischer Aktivierung des Angiotensin II AT_1 -Rezeptors durch hypoosmotische Membrandehnung mit nachfolgender Phosphorylierung von ERK1/2 wie Wei Tang et al. (2014) für den Angiotensin II AT_1 -Rezeptor beschrieben hat (Tang et al., 2014) nur mit einer vorangegangenen G-Protein-Aktivierung erfolgen kann. Eine Arrestin-vermittelte Internalisierung in Abwesenheit von G-Proteinen ist möglich, aber keine ERK1/2 Phosphorylierung.

Eine im Jahre 2017 veröffentlichte Untersuchung beobachtete, dass eine direkte Aktivierung von $G_{q/11}$ -Proteinen durch Fluss-induzierte Scherkräfte ohne einer vorangegangenen GPCR-Aktivierung in menschlichen koronaren Endothelzellen möglich ist (Dela Paz et al., 2017). Nathaniel G. dela Paz et al. konnten mit der Verwendung eines *Proximity-Ligation-Assays* zeigen, dass eine Agonistenstimulation mit Sphingosin-1-phosphat am Sphingosin $S1P_3$ -Rezeptor zur Dissoziation des $G_{q/11}$ -Protein führte, das erstens in einer Rekrutierung von GPCR-Kinase 2 (GRK2) und zweitens in einer β -Arrestin-Rekrutierung resultierte. Wohingegen die Rekrutierung von GRK2 und β -Arrestinen bei der Applikation Fluss-induzierter Scherkräfte (14 dyn cm^{-2}) ausblieb, was zu einer verringerten Internalisierung des $S1P_3$ -Rezeptors führte. Außerdem konnte diese Dissoziationsreaktion des $G_{q/11}$ -Proteins nicht durch einen selektiven Antagonisten (VPC23019) des $S1P_3$ -Rezeptors, aber durch den nicht-hydrolysierbaren GDP-Analogen, GDP- β -S²⁵⁰ unterbunden werden (Dela Paz et al., 2017). Diese Befunde deuten darauf hin, dass heterotrimere $G_{q/11}$ -Proteine auch anscheinend unabhängig von einer GPCR-Aktivierung durch Fluss-induzierte Scherkräfte im vaskulären Endothel aktiviert werden können. Nathaniel G. dela Paz et al. (2017) haben ein *in-situ* Verfahren (*Proximity Ligation Assay*) verwendet, dass die Mechanosensitivität in der Postrezeptorsignalkaskade distal an der G-Protein-Aktivierung experimentell beobachtet. Ein großer Unterschied des *in situ* Verfahrens zur dynamischen intramolekularen FRET-Photometrie und zu ratiometrischen Kalziummessungen mit Fura-2 ist, dass Protein-Protein-Interaktionen über ein PCR-Produkt detektiert werden (Fredriksson et al., 2002). Für dieses *in-situ* Verfahren müssen zwei spezifische Antikörper für beide Interaktionspartner (GPCR und G-Protein) vorhanden sein, die mit einer ähnlichen Bindungsstärke (Affinität) an die Zielproteine binden müssen, um vergleichbare Ergebnisse erzielen zu können.

Im Gegensatz dazu konnte die Arbeit von Jung et al, 2012 zeigen, dass ein weiterer Sphingosinrezeptor, der Sphingosin $S1P_1$ -Rezeptor als Mechanosensor für laminare Scherkräfte im vaskulären Endothel agiert und bei der Angiogeneese eine Rolle spielt. Die Verwendung eines nicht-selektiven Antagonisten (FTY720-P) und einer shRNA²⁵¹

²⁵⁰ Abkürzung GDP- β -S steht für die chemische Bezeichnung Guanosin-5'-O-(2-thiodiphosphat). Es ist ein nicht-hydrolysierbares GDP-Analogen, das die G-Protein-Aktivierung hemmt.

²⁵¹ Die Abkürzung shRNA vom Englischen small hairpin ribonucleic acid ist ein kleines RNA-Molekül mit einer Haarnadelstruktur, das Gene mittels der RNA-Interferenz still legt (Paddison et al., 2002).

(*small hairpin RNA*) gegen den S1P₁-Rezeptor konnten die mechanisch-induzierte Aktivierung des S1P₁-Rezeptor inhibieren (Jung et al., 2012). Auch im Rahmen der vorliegenden Arbeit zeigte die Applikation Fluss-induzierter Scherkräfte (4 dyn cm⁻², 20 dyn cm⁻²) signifikante Erhöhungen der intrazellulären Kalziumkonzentration in HUVEC, die durch den selektiven inversen H₁-Rezeptoragonisten Mepyramin signifikant unterdrückt werden konnten (siehe Abschnitt 3.11 mit Abbildung 3.17). Diese Befunde zeigen, dass endogen exprimierte H₁-Rezeptoren intrinsisch mechanosensitiv sind und Mechanosensoren für Fluss-induzierte Scherkräfte in Endothelzellen sind. Somit ist es fraglich, ob G-Proteine an sich mechanosensitiv sind? Interessanterweise konnte der inverse Agonist Mepyramin in maximaler Konzentration (100 µM) die durch Scherkraft-induzierten Kalziumzunahmen in HUVEC nicht vollständig unterdrücken (siehe Abschnitt 3.11 mit Abbildung 3.17 C und F), was auf einen unterschiedlichen mechanisch aktiven Rezeptorzustand hinweist. Da laminare und oszillatorische Strömungen unterschiedliche zelluläre Effektorsysteme aktivieren können (Givens und Tzima, 2016), kann davon ausgegangen werden, dass unterschiedliche mechanische Reize unterschiedliche Mechanotransduktoren aktivieren können. Die hypoosmotisch bedingte Membrandehnung aktiviert hauptsächlich H₁-Rezeptoren in Endothelzellen (siehe Abschnitt 3.11 mit Abbildung 3.17 A und D), die durch den inversen Agonisten vollständig unterdrückt werden. Wohingegen der Blutfluss nicht nur H₁-Rezeptoren, sondern vermutlich auch andere Mechanosensoren in Endothelzellen aktiviert, die Kalziumanstiege in HUVEC hervorrufen können (siehe Abschnitt 3.11 mit Abbildung 3.17). Offensichtlich ist die Mechanotransduktion des mechanischen Stimulus in Endothelzellen komplexer als gedacht und beinhaltet verschiedene mechanosensitive Proteine. Der Blutdruck kann einerseits als Perfusionsdruck (Hahn und Schwartz, 2009) und andererseits als Fluss-induzierte Scherkraft (Davies, 2009; Hoffman et al., 2011; Hill-Eubanks et al., 2014) auf das Gefäßendothel wirken. Normalerweise findet in gesunden Gefäßen eine laminare Strömung des Blutflusses statt, die sich jedoch bei einer Verengung der Gefäße durch z. B. atherosklerotische Plaques in eine turbulente Strömung umwandeln kann und folglich zur Transkription unterschiedlicher mechanosensitiver Proteine in Endothelzellen führt.

Untersuchungen aus dem Jahre 2014 deuten darauf hin, dass die G_{αq/11}-Untereinheit des G_{αq/11}-Proteins mit dem gekoppeltem S1P₃-Rezeptor Teil eines mechanosensitiven Komplexes bestehend aus dem Thrombozyten-Endothelzellen-Zelladhäsionsmolekül PECAM-1²⁵² und dem Heparansulfat-Proteoglykan Syndecan-1 in Zell-Zell-Kontakten von Endothelzellen ist. Unter Fluss-induzierten Scherkräften (14 dyn cm⁻²) kam es zu einer schnellen Dissoziation (7-15 s) der G_{αq/11}-Untereinheit und Syndecan-1 von PECAM-1 (dela Paz et al., 2014). Überraschenderweise nahm die Assoziation von PECAM-1 mit der G_{αq/11}-Untereinheit und Syndecan-1 nach 60 s unter Fluss-vermittelten Scherkräften auch wieder zu, was eine Co-Lokalisation des mechanosensitiven

²⁵² Abkürzung PECAM-1 vom Englischen **p**latelet **e**ndothelial **c**ell **a**dhesion **m**olecule ist ein Thrombozyten-Endothelzellen-Adhäsionsmolekül, das auch unter der Bezeichnung Cluster of Differentiation 31 (CD31) bekannt ist.

Komplexes an die Zell-Zell-Verbindungen zeigte (dela Paz et al., 2014). In früheren Untersuchungen konnte Laura A. Otte et al. (2009) mit Hilfe von Co-Immunopräzipitationen in HUVEC zeigen, dass die $G_{\alpha_q/11}$ -Untereinheit innerhalb von 15 s auf einen Strömungsimpuls von 14 dyn cm^{-2} vom PECAM-1 dissoziiert und nach 30 s wieder erneut reassoziert (Otte et al., 2009). Interessanterweise wurde eine Assemblierung von PECAM-1 und der G_{α} -Untereinheit über Syndecane für den Bradykinin B_2 -Rezeptor, für den Chemokin CXCR4-Rezeptor sowie für den Chemokin CXCR7-Rezeptor vorgeschlagen (dela Paz et al., 2014). Das Thrombozyten-Endothelzellen-Adhäsionsmolekül PECAM-1 ist auch in der Lage einen weiteren mechanosensitiven Komplex aus VE-Cadherin und VEGFR2 bzw. VEGFR3 auszubilden (Tzima et al., 2005; Conway et al., 2013; Coon et al., 2015). John Noel und Kollegen (2013) konnten zeigen, dass ein weiterer mechanosensitiver Proteinkomplex aus PECAM-1, dem ATP-sensitiven K_{ATP} -Kaliumkanal (Kir 6.2), dem membranständigen Caveolin-1 und der NADPH Oxidase 2 (NOX2) zur Erfassung von turbulenten Strömungen im Blutsystem in pulmonalen mikrovaskulären Endothelzellen dienen könnte (Noel et al., 2013). Eine interessante weiterführende Fragestellung wäre, ob auch der mechanosensitive Histamin H_1 -Rezeptor über die $G_{\alpha_q/11}$ -Untereinheit mit Syndecan-1 und mit PECAM-1 in Zell-Zell-Kontakten von Endothelzellen assoziiert?

In der Abbildung 4.1 ist ein phylogenetischer Stammbaum von Klasse A und Klasse B GPCR mit 101 Rezeptoren dargestellt. Wie schon in Abschnitt 1.5.3 erläutert, weist der humane Histamin H_1 -Rezeptor eine hohe Sequenzidentität mit Klasse A GPCR auf. Der Histamin H_1 -Rezeptor (H_1R) sitzt am roten Ast des phylogenetischen GPCR-Stammbaums. Interessanterweise verzweigt der rote Ast als einer der ersten Knotenpunkte. Folglich besteht eine hohe Wahrscheinlichkeit, dass der H_1 -Rezeptor der sogenannte Urrezeptor als gemeinsamer Vorfahre von vielen mechanosensitiven GPCR ist, wobei alle bisher als mechanosensitiv beschriebenen GPCR an dicken dunkelblauen Ästen des phylogenetischen GPCR-Stammbaums sitzen.

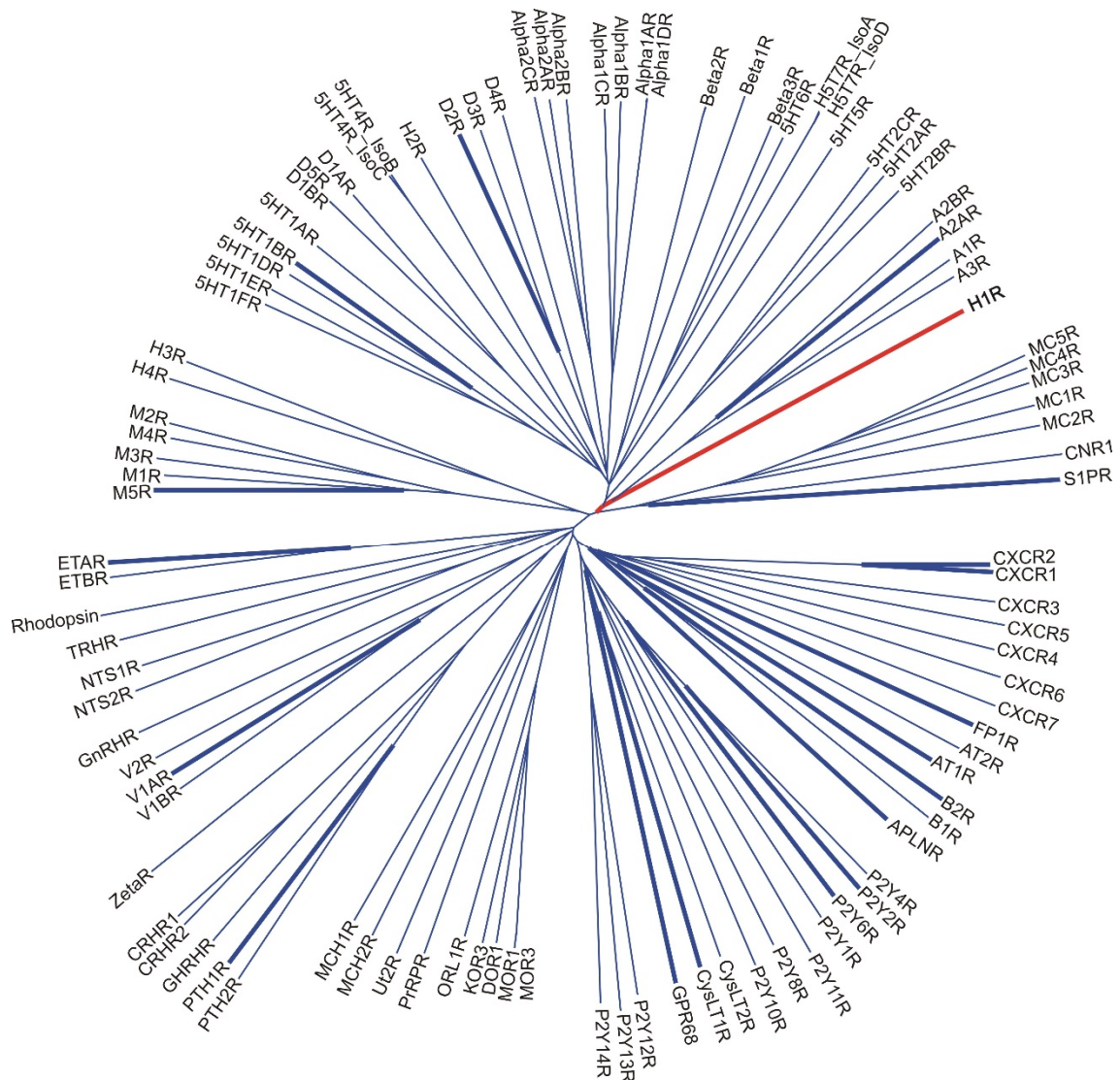


Abbildung 4.1: Phylogenetischer GPCR-Stammbaum Der phylogenetische radiale Stammbaum wurde anhand der Aminosäuresequenzen von humanen GPCR mit Hilfe der online Programme: Clustal Omega < Multiple Sequence Alignment < EMBL-EBI (Sievers et al., 2011; McWilliam et al., 2013; Li et al., 2015) mit der URL-Adresse <https://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalo/> und Trex-online (Boc et al., 2012) mit der URL-Adresse <http://www.trex.uqam.ca/index.php?action=newick&project=trex> erstellt. Letzter Aufruf erfolgte am 30.04.2018. Der Histamin H₁-Rezeptor (H₁R) sitzt am roten und alle 19 bisher in der Literatur und in dieser vorliegenden Arbeit als mechanosensitiv beschriebenen GPCR sitzen an dicken dunkelblauen Ästen des phylogenetischen GPCR-Stammbaums.

4.2 Verankerungsmodell und Membranmodell

Im Gegensatz zum Histamin H₁-Rezeptor kann für die sechs in der Literatur als mechanosensitiv beschriebenen Adhäsions-G-Protein gekoppelten Rezeptoren²⁵³ mit

²⁵³ Die sechs mechanosensitiven Adhäsions-G-Protein gekoppelten Rezeptoren: Der G_{12/13}-Protein gekoppelte Rezeptor 56 (Yona et al., 2008; White et al., 2014) (GPR56/ADGRG1), der bei der belastungsinduzierten Skelettmuskelhypertrophie (White et al., 2014) eine Rolle spielt. Der G_s-Protein gekoppelte Rezeptor 126 (GPR126/ADGRG6), der bei der mechanisch bedingten Meylinisierung durch Schwann-Zellen (Petersen et al., 2015) involviert ist. Der Latrophilin/CIRL Adhäsions-G-protein gekoppelte Rezeptor (ADGRL), der in den Chordotonal-Neuronen der Fruchtfliege vorkommt (*Drosophila melanogaster*) und bei der Propriozeption der Fruchtfliege beteiligt ist (Scholz et al., 2015). Die lange konstitutiv-aktive Isoform des GPR114, die sich nur in einer einzigen Aminosäure Q230 in der Stachelsequenz von der nicht mechanosensitiven Isoform unterscheidet und wie der GPR126 auch auf Schüttelbewegungen als mechanischer Reiz reagiert (Wilde et al., 2016). Der epidermale

großer Wahrscheinlichkeit das Verankerungsmodell für die Übertragung mechanischer Reize in Betracht gezogen (siehe Abschnitt 1.10.6). Ein besonderes Merkmal von Adhäsions-G-Protein gekoppelten Rezeptoren ist, dass sie einen extrem langen extrazellulären N-Terminus von 320 bis 5878 Aminosäuren besitzen (Scholz et al., 2016a), die durch eine Autoproteolysereaktion²⁵⁴, jeweils in ein N-terminales Fragment (NTF) und ein C-terminales Fragment mit sieben Transmembrandomänen (CTF) gespalten wird (Yona et al., 2008). Durch die Autoproteolysereaktion wird eine in der GAIN-Domäne vorhandene und an den N-Terminus gebundene Peptidsequenz, der sogenannte „Stachel“ freigesetzt. Durch die Bindung des „Stachels“ an das C-terminale Fragment des Adhäsions-G-Protein gekoppelten Rezeptor wird der Rezeptor aktiviert (Scholz et al., 2016b; Wilde et al., 2016). Einige Vertreter der Adhäsions-G-Protein gekoppelten Rezeptoren gehen jedoch keine Autoproteolysereaktion ein. Dennoch besitzen sie eine „Stachel“-Sequenz in der GAIN-Domäne, die den Rezeptor aktivieren kann (Krishnan et al., 2016). Wahrscheinlich findet eine Transduktion in der GAIN-Domäne in einen aktiven Zustand statt, die den „Stachel“ freisetzt und für eine Perzeption mit der CTF zugänglich macht (Scholz et al., 2016a). Steven E. Boyden et al. (2016) konnten erstmals zeigen, dass eine Punktmutation (*gain of function mutation*) p.C492Y²⁵⁵ in der GAIN-Domäne des epidermalen Wachstumsfaktor-Rezeptors E2 (EMR2/ADGRE2) zu einer verstärkten Dissoziation des NTF von der CTF bei mechanischer Stimulation führt (Boyden et al., 2016), was vermutlich einen mechanisch aktiven Rezeptorzustand stabilisiert. Daraus ergibt sich, dass für eine mechanische Rezeptoraktivierung zuerst eine Freisetzung des „Stachels“ und des CTF vom NTF erfolgen muss, um einen mechanisch aktiven Rezeptorzustand zu induzieren. Wogegen die „Stachel“-Sequenz des GPR114 bereits ohne eine vorangegangene Autoproteolysereaktion an das CTF gebunden ist und eine mechanische Stimulation wie beim Histamin H₁-Rezeptor zu einer Konformationsänderung des Rezeptors führte, wodurch der Rezeptor mit der gebundenen „Stachel“-Sequenz in der GAIN-Domäne eine mechanisch-induzierte Konformation einnimmt, die eine G-Protein-Aktivierung über die CTF auslöst (Scholz et al., 2015; Wilde et al., 2016). Im Gegensatz dazu wird beim GPR126 eine Autoproteolysereaktion durch mechanische Stimulation postuliert, die eine Freisetzung der Stachelsequenz hervorruft (Wilde et al., 2016). Des Weiteren ist der lange N-Terminus an die ECM wie z. B. das Kollagen III (White et al., 2014) oder Laminin-211 (Petersen et al., 2015) und an intrazelluläre Strukturen wie z. B. das Zytoskelett verbunden ist (Scholz et al., 2016b). Somit kann mit einer großen Wahrscheinlichkeit das Verankerungsmodell (siehe Abschnitt 1.10.6) für die Übertragung mechanischer Reize gegenüber Klasse A GPCR in Betracht gezogen

Wachstumsfaktor-Rezeptor E2 (EMR2/ADGRE2), der zur Ausbildung einer Nesselsucht (vibratory urticaria) auf Hautvibrationen bei Patienten mit einer p.C492Y Mutation in der GAIN-Domäne führt. Diese p.C492Y Mutation führt zu einer erhöhten Rezeptoraktivität bei mechanischer Stimulation, was letztendlich in einer Degranulation von Mastzellen resultiert (Boyden et al., 2016).

²⁵⁴ Die Autoproteolysereaktion wird durch eine ca. 320 Aminosäuren lange autoproteolytische GAIN-Domäne (GPCR autoproteolysis inducing domain) mit einer konservierten Cystein-reichen ca. 40-50 Aminosäuren langen proteolytischen GPCR-Stelle (GPS = GPCR proteolysis site) katalysiert (Yona et al., 2008; Arac et al., 2012).

²⁵⁵ Der C492Y Aminosäureaustausch liegt 26 Aminosäuren distal von der proteolytischen GPCR-Stelle (Boyden et al., 2016).

werden. Dagegen wird beim Histamin H_1 -Rezeptor sowohl das Membranmodell als auch das Verankerungsmodell als Kraftübertragungsmodelle in Erwägung gezogen. Die FRET-Untersuchungen mit den Zytoskeletthinhibitoren mit dem β -adrenergen H_1 -Rezeptor-Konstrukt zeigten, dass das Aktin-Zytoskelett einen inhibitorischen Effekt (siehe Abbildung 3.15 B und D) auf die mechanische Rezeptoraktivierung ausübt. Der H_1 -Rezeptor war stärker mechanosensitiv bei einem zerstörten Aktin-Zytoskelett und reagierte mit größeren FRET-Signalabnahmen. Im Gegensatz dazu zeigte das β -adrenerge H_1 -Rezeptor-Konstrukt verringerte Abnahmen des mechanisch induzierten FRET-Signals, das auf einen modulierenden Einfluss des Zytoskeletts hinweist (siehe Abbildung 3.15 B und D). Diese FRET-Ergebnisse belegen, dass für den Histamin H_1 -Rezeptor sowohl das Membranmodell als auch das Verankerungsmodell für die Übertragung mechanischer Reize zutreffen.

4.3 Einfluss der Membraneigenschaften auf die intrinsische Mechanosensitivität von GPCR

Mark A. Haidekkar et al. (2000) konnten mit Hilfe von FRAP-Untersuchungen²⁵⁶ in HUVEC zeigen, dass Fluss-induzierte Scherkräfte zu einer erhöhten Membranfluidität führen (Haidekkar et al., 2000). Hierfür wurden HUVEC mit dem fluoreszierenden Molekül 9-(Dicyanovinyl)-julolidin (DCVJ) markiert und die Fluoreszenzintensität in Abhängigkeit Fluss-induzierter Scherkräfte gemessen. Die Methode beruht darauf, dass sich die Fluoreszenzintensität des DCVJ in Abhängigkeit der Viskosität bzw. der Fluidität der Zellmembran ändert. Mit einer zunehmenden Fluss-induzierten Scherkraft ($1,3 \text{ dyn cm}^{-2}$, $12,7 \text{ dyn cm}^{-2}$, 35 dyn cm^{-2}) konnte eine stufenweise Abnahme der Fluoreszenzintensität des DCVJ beobachtet werden, was darauf hinweist, dass Fluss-induzierte Scherkräfte zu einer erhöhten Membranfluidität führen.

Auch Peter J. Butler et al. (2001) konnten mit Hilfe von FRAP-Messungen zeigen, dass sich die Membranfluidität der Zellmembran von Endothelzellen aus der Aorta des Hausrindes, die Fluss-induzierten Scherkräften (10 dyn cm^{-2} bzw. 20 dyn cm^{-2}) ausgesetzt waren, erhöhte (Butler et al., 2001). Des Weiteren konnten Kimiko Yamamoto und Joji Ando (2013) ebenfalls mit Hilfe der FRAP-Methode und der Laurdan-Zwei-Photonen-Fluoreszenz-Mikroskopie²⁵⁷ an humanen Endothelzellen aus der Pulmonalarterie beobachten, dass Fluss-induzierte Scherkräfte (5 dyn cm^{-2} bis 20 dyn cm^{-2}) die Membranfluidität erhöhen und die parallele Anordnung der Lipide in der Lipid-Doppelschicht stören (Yamamoto und Ando, 2013, 2015). Da in allen

²⁵⁶ Bei der FRAP-Methode wird die Kinetik der Erholung der Fluoreszenz nach Photobleichen eines Fluoreszenzfarbstoffs wie z. B. DCVJ (chemische Bezeichnung: 9-(Dicyanovinyl)-julolidin) bzw. DiI-C18 (chemische Bezeichnung: 1,1-Dioctadecyl-3,3,3,3-tetramethylindo-carbocyaninperchlorat) bestimmt (vom Englischen fluorescence recovery after photobleaching) (Meyvis et al., 1999).

²⁵⁷ Bei der Zwei-Photonen-Fluoreszenzmikroskopie werden im Gegensatz zur klassischen Fluoreszenzmikroskopie genau zwei Photonen zur Anregung eines Elektrons im Grundzustand S_0 benötigt (Parasassi et al., 1997; Gaus et al., 2006). Laurdan ist ein fluoreszierender Farbstoff, (chemische Bezeichnung: 1-(6-(Dimethylamino)-2-naphthalyl)-1-dodecanon), der sich in die Zellmembran einlagert. Laurdan besitzt einen bathochromen Effekt, indem es in wässriger Umgebung (polar) sein Emissionsmaximum von $\lambda = 440 \text{ nm}$ (unpolar) um 50 nm in den rotwelligen Spektralbereich $\lambda = 490 \text{ nm}$ (polar) verschiebt. Mit Hilfe der zwei Emissionsmaxima kann die Polarität der Zellmembran gemessen werden.

Untersuchungen in die Zellmembran integrierende fluoreszierende Moleküle verwendet werden, ist zu hinterfragen, wie spezifisch binden diese fluoreszierenden Moleküle wie DCVJ, DiIC18 und Laurdan in die Zellmembran und wird dadurch die Anordnung der Lipide in der Lipid-Doppelschicht beeinflusst?

Sowohl Peter J. Butler et al. (2001) als auch Kimiko Yamamoto und Joji Ando (2013) haben die Endothelzellen mit Benzylalkohol bzw. mit Cholesterol beladen und anschließend die Membranfluidität gemessen. Benzylalkohol führte zu einer erhöhten Membranfluidität, wohingegen eine Cholesterolanreicherung in der Zellmembran zu einer erhöhten Membranrigidität führte. Eine Zugabe von Cholesterol verhinderte die durch Scherkräfte induzierte Abnahme der Membranlipidordnung und reduzierte die durch Fluss-induzierte Scherkräfte gesteigerte Membranfluidität (Yamamoto und Ando, 2013). Das bedeutet, dass bei einer erhöhten Membranrigidität Konformationsänderungen von integralen Proteinen wie z. B den GPCR eingeschränkter ablaufen. Im Gegensatz dazu soll eine hypoosmotische Membrandehnung die Lipid-Ordnung in der Membran erhöhen und dadurch die Membranfluidität senken (Yamamoto und Ando, 2015). Folglich verändert Cholesterol die physikochemischen Eigenschaften der Lipid-Doppelschicht, indem durch eine Zunahme der Lipid-Ordnung die Membranfluidität verringert und die Membranrigidität erhöht wird (Chini und Parenti, 2009). Jens A. Lundbæk und Olaf S. Andersen (2012) vermuten, dass die Lipid-Doppelschicht durch den Cholesteroleinschluss dicker wird und somit mehr Energie für die räumliche Anpassung der hydrophoben Länge des integralen Proteins an der Protein-Lipid-Grenzfläche (siehe Abbildung 1.14) aufgewendet wird (A. Lundbæk und Andersen, 2012), was zu Konformationsänderungen von integralen Proteinen führen kann. Viele GPCR reichern sich in den sogenannten „lipid-rafts“, den Cholesterol-reichen Mikrodomänen in der Lipid-Doppelschicht an (Chini und Parenti, 2004). Interessanterweise zeigte die aktive Konformation des adrenergen β_2 -Rezeptors eine vertikale Elongation der TM5 (siehe Abschnitt 1.1.4 mit Abbildung 1.2), was somit mit der von Lundbæk und Andersen aufgestellten Hypothese entsprechen würde, die auch eine vertikale Elongation eines integralen Proteins bei einer Cholesterol-reichen dicken Membran vorschlagen. Des Weiteren soll Cholesterol die Dimerisierung von GPCR fördern und die Kopplung von G-Proteinen beeinflussen (Cherezov et al., 2007; Chini und Parenti, 2009; Zheng et al., 2012). Zheng et al. (2012) konnten wie schon am Beispiel des adrenergen β_2 -AR gezeigt (Cherezov et al., 2007; Chini und Parenti, 2009; Cang et al., 2014), eine Wechselwirkung von Cholesterolemolekülen mit Palmitoylresten des dimerisierten μ -Opioid-Rezeptors beobachten, dass anscheinend wichtig für eine G-Protein-Kopplung ist. Bei einer Cholesterolverarmung der Lipid-Doppelschicht durch den HMG-CoA-Reduktasehemmer Simvastatin konnten sie eine verringerte G-Protein-Kopplung und Aktivierung von Effektorsystemen feststellen (Zheng et al., 2012). Mit Hilfe der Rasterkraft-Mikroskopie (AFM = atomic force microscopy) basierten

Einzelmolekülkraft-Spektroskopie²⁵⁸ (SMFS = single molecule force spectroscopy) konnte gezeigt werden, dass eine Anreicherung einer künstlichen Lipid-Membran mit dem wasserlöslichen Cholesterolanalogon Cholesterylhemisuccinat die mechanische Stabilität des adrenergen β_2 -Rezeptors erhöhte (Zocher et al., 2012). Folglich sollte eine Cholesterolextraktion aus der Zellmembran die Membranfluidität bei einer hypoosmotischen Membrandehnung entgegen der erwarteten Erhöhung der Membranfluidität senken. Intramolekulare dynamische FRET-Untersuchungen an Cholesterol verarmten HEK293-Zellen mit dem ct-b gpH₁R-Konstrukt zeigten eine signifikante Reduktion der mechanischen Rezeptoraktivierung durch hypoosmotische Membrandehnung (siehe Abschnitt 3.15 mit Abbildung 3.24 A und B), was darauf hindeutet, dass Cholesterol den mechanisch induzierten Rezeptorzustand des H₁-Rezeptors stabilisiert und die Mechanosensitivität des H₁-Rezeptors direkt von der Zusammensetzung der Zellmembran abhängt. Eine Cholesterolzugabe mit Hilfe des wasserlöslichen Komplexes aus 5 mM Cholesterol und 50 mM Methyl- β -cyclodextrin hatte dagegen keinen signifikanten Einfluss auf die mechanische Rezeptoraktivierung des H₁-Rezeptors (siehe Abschnitt 3.15). Wahrscheinlich war die Cholesterolanreicherung der Zellmembran nicht ausreichend genug, um eine Änderung des FRET-Signals zu detektieren. Da das lipophile Cholesterolmolekül sich in der Zellmembran anreichert, kann man vermutlich mit einer direkten Cholesterolzugabe ins Nährmedium die Cholesterolanreicherung in der Zellmembran erhöhen. Insgesamt deuten die FRET-Ergebnisse (siehe Abschnitt 2.7 und 3.15) darauf hin, dass Cholesterol einen mechanisch induzierten Rezeptorzustand stabilisiert und die Mechanosensitivität der GPCR von der Cholesterolzusammensetzung in der Lipid-Doppelschicht abhängt. Laut Literatur existieren eine Reihe von Cholesterolbindestellen in GPCR, das CCM-Motif (*cholesterol consensus motif*) (Hanson et al., 2008), das CRAC-Motif (*cholesterol recognition/interaction amino acid consensus*) (Pucadyil und Chattopadhyay, 2004; Jafurulla et al., 2011) und das CARC-Motiv (Fantini und Barrantes, 2013), die alle eine Wasserstoffbrückenbindung zur Hydroxygruppe des Cholesterols eingehen. Das SSD-Motif (*sterol sensing domain*) dagegen geht eine Wechselwirkung mit dem Sterolring des Cholesterols ein. Interessanterweise zeigten Michael A. Hanson et al. (2008), dass das CCM-Motif mit der Peptidsequenz [(R,K)^{4.39-4.43}]-[(W,Y)^{4.50}]-[(I,V,L)^{4.46}]-[(F,Y)^{2.41}] eine 44%ige Gesamtsequenzidentität in Klasse A GPCR besitzt (Hanson et al., 2008). Das würde bedeuten, dass das Cholesterol einerseits eine direkte Wechselwirkung mit dem GPCR (Hanson et al., 2008; Wacker et al., 2013; Zhang et al., 2015b) eingeht und andererseits den Rezeptorzustand indirekt durch eine Änderung der physikalischen Eigenschaften der Zellmembran moduliert. Interessanterweise konnten die Kristallstrukturen mehrerer GPCR, wie des β_2 AR (Hanson et al., 2008), des Adenosin A_{2A}-Rezeptors (Bai und Wang, 2012) und des

²⁵⁸ Mit Hilfe der Rasterkraft-Mikroskopie basierten Einzelmolekülkraft-Spektroskopie (Abkürzung SMFS vom Englischen *single molecule force spectroscopy*) können physikochemische Wechselwirkungen zwischen einzelnen Molekülen, Proteinen und Zellen gemessen werden (Zlatanova et al., 2000; Neuman und Nagy, 2008). Mit dieser Methode können sogar die mechanischen Eigenschaften der Zellmembran wie z.B. die Membranrigidität bzw. Membranfluidität gemessen werden (Rotsch und Radmacher, 2000; Lulevich et al., 2006; Haase und Pelling, 2015; Ragazzon et al., 2016).

Serotonin 5-HT_{2B}-Rezeptors (Wacker et al., 2013)) eine direkte Bindung von Cholesterolemolekülen an den GPCR zeigen, was abermals auf eine direkte Wechselwirkung von Cholesterol mit dem GPCR schließen lässt. Auch Madhura Mohole et al. (2018) konnten am Beispiel des Serotonin 5HT_{1A}-Rezeptors zeigen, dass die polare Hydroxygruppe des Cholesterols mit den aromatischen Aminosäureresten des Tyrosins, Tryptophans und Phenylalanins von GPCR wechselwirkt (Mohole et al., 2018). Die Arbeit von Agostino Bruno et al. (2012) am metabotropen Glutamat mGlu₂-Rezeptor zeigte, dass die α -helikale Sekundärstruktur der Helix 8 durch eine Cholesterolverarmung der Zellmembran aufgelöst wird (Bruno et al., 2012). Wohingegen eine Cholesterolanreicherung die Dicke der Zellmembran erhöhte und die α -Helix 8 in der Membran stabilisierte (Bruno et al., 2012). Im Falle der Mechanosensitivität des Histamin H₁-Rezeptors würde das bedeuten, dass die Helix 8 in einer Cholesterol-armen Zellmembran nicht mehr als ein Mechanosensor fungieren kann und die mechanische Rezeptoraktivierung unterbleibt. Unsere FRET-Ergebnisse zeigten, dass mechanisch induzierte FRET-Signale (siehe Abbildung 3.23 A und B) bei einer Cholesterolverarmung der Zellmembran signifikant niedriger waren und somit die Ergebnisse von Agostino Bruno et al. (2012) unterstützen. Angesichts dieser Ergebnisse liegt die Schlussfolgerung nahe, dass einerseits geladene Aminosäurereste in der C-terminalen Helix 8 des GPCR elektrostatische Wechselwirkungen mit der polaren Hydroxygruppe des Cholesterols in der Protein-Lipid-Grenzfläche (Zocher et al., 2012; Marquardt et al., 2016) eingehen und andererseits hydrophobe Wechselwirkungen zwischen den langen Palmitinfettsäureresten in der C-terminalen Helix 8 mit dem Sterolring des Cholesterolemoleküls herrschen, so dass der Rezeptorzustand stabilisiert wird (Goddard und Watts, 2012; Oddi et al., 2017). Es stehen folgende weiterführende FRET-Untersuchungen an Cholesterol verarmten HEK293-Zellen mit den ct-b und il3-e1 gpH₁R-Konstrukten aus, um die mechanische Aktivierung des H₁-Rezeptors erstens bei zunehmender mechanischer Stimulation und zweitens durch verschiedene Arten mechanischer Stimuli näher zu untersuchen:

- Applikation hypoosmolarer Lösungen mit steigender Osmolarität (175 mOsmol kg⁻¹, 200 mOsmol kg⁻¹, 250 mOsmol kg⁻¹)
- Applikation Fluss-induzierter Scherkräfte (10 dyn cm⁻², 20 dyn cm⁻², 40 dyn cm⁻² und 60 dyn cm⁻²)
- Druckapplikation über eine Glaspipette in der klassischen Ganzzellkonfiguration mit Anlegen von Über- bzw. Unterdruck

Ein weiteres, ausgesprochen aufschlussreiches Experiment wäre den Histamin gpH₁-Rezeptor in künstliche Liposomen (Bangham et al., 1974; Akbarzadeh et al., 2013; Siontorou et al., 2017) mit unterschiedlicher Lipidlänge zu überführen und die mechanische Aktivierbarkeit in Abhängigkeit der Dicke der Lipid-Doppelschicht zu untersuchen. Auch der Einsatz von amphiphilen Substanzen wie z. B. aus der Wirkstoffklasse der Lokalanästhetika kann die physikochemischen Eigenschaften der Zellmembran beeinflussen, was indirekt die mechanische Aktivierung von GPCR modulieren kann. H. Tsuchiya et al. (2010), S. S. Efimova et al. (2016) sowie Justyna

Mildner et al. (2019) zeigten eine Zunahme der Membranfluidität in künstlichen Lipid-Membranen durch die Anwendung von amphiphilen Lokalanästhetika (Tsuchiya et al., 2010; Efimova et al., 2016; Mildner et al., 2019).

4.4 Beeinflussung der Mechanosensitivität durch C-Terminus Eigenschaften

Die amphiphile Helix 8 kommt in vielen GPCR stromabwärts des hoch konservierten NPXXY-Motiv am Ende der TM7 vor, die parallel zur Zellmembran und perpendicular zur TM7 liegt (siehe Abschnitt 3.12 und Abbildung 3.20) (Aratake et al., 2012). Viele Klasse A GPCRs weisen eine amphiphile Helix 8 mit folgender Aminosäuresequenz [F(RK)X²⁵⁹X(FL)XXX(LF)] als eine regulär existierende Sekundärstruktur auf (Wu et al., 2010; Zhang et al., 2015a; Lee et al., 2018). Im inaktiven Rezeptorzustand geht das Tyrosin des NPXXY-Motivs mit dem am Anfang der Helix 8 gelegenen Phenylalanin eine aromatische π - π -Stapelwechselwirkung ein (Fritze et al., 2003; Scheerer et al., 2008; Sato et al., 2016). Bei einer Rezeptoraktivierung, wie am Beispiel des Protease-aktivierten PAR1-Rezeptors gezeigt, wird ein „7-8-1-Aktivierungsmechanismus“ vorgeschlagen, indem N-terminale Aminosäuren der Helix 8 mit der TM7 und der intrazellulären Schleife il-1 des GPCR wechselwirken und dadurch eine G-Protein-Kopplung hervorrufen (Swift et al., 2006). Louisa Dowal et al. (2011) zeigten, dass ein allosterischer Ligand des PAR1-Rezeptors (JF5 mit $IC_{50} = 1 \text{ mg kg}^{-1}$) an der Helix 8 bindet und einen Rezeptorzustand des PAR1-Rezeptors stabilisiert, die eine selektive G_{12} -Protein-Kopplung anstelle einer $G_{q/11}$ -Protein-Kopplung hervorruft. Diese allosterische Modulation der Helix 8 durch den allosterischen Liganden JF5 hatte sogar einen antithrombotischen Effekt (Dowal et al., 2011). Austin Gehret et al. (2010) konnten mit Hilfe von Aminosäureaustauschen der positiv geladenen Aminosäuren (Lysin und Arginin) in der Helix 8 beobachten, dass bei Agonistenbindung positiv geladene Aminosäurereste der Helix 8 mit der GRK2 interagieren und eine GRK2 vermittelte Phosphorylierung des *Thyrotropin-releasing hormone* Rezeptors²⁶⁰ (TRH) fördern (Gehret et al., 2010).

Bisher wurden mehrere Rollen (Huynh et al., 2009; Alexiev, 2013; Sato et al., 2016) für die C-terminale Helix 8 entschlüsselt, wie die G-Protein-Kopplung (Faussner et al., 2005; Okuno et al., 2005; Delos Santos et al., 2006; Swift et al., 2006; Anavi-Goffer et al., 2007; Ahn et al., 2010; Dowal et al., 2011; Feierler et al., 2011; Kaye et al., 2011; Liu et al., 2015b; Sato et al., 2016; Liang et al., 2017; Sato, 2019), die Rezeptorinternalisierung mit Rezeptorphosphorylierung durch G-Protein-gekoppelte Kinasen (Faussner et al., 2005; Anavi-Goffer et al., 2007; Gehret et al., 2010; Aratake et al., 2012) und anschließende β -Arrestin-Rekrutierung (Gehret et al., 2010; Feierler et al., 2011; Kirchberg et al., 2011), die Rezeptordimerisierung (Huang et al., 2013; Parmar et al., 2017), der

²⁵⁹ X steht für eine beliebige Aminosäure

²⁶⁰ Der TRH-Rezeptor besitzt zwischen dem NPXXY-Motiv und den Palmitoylierungsstellen C335 und C337 eine amphipathische Helix 8 (Gehret et al., 2010).

Rezeptortransport in die Zellmembran (Thielen et al., 2005; Suvorova et al., 2009; Ahn et al., 2010; Donnellan et al., 2011; Feierler et al., 2011; Karpinsky-Semper et al., 2015; Zhu et al., 2015; Parmar et al., 2017), die Membranlokalisation (Donnellan et al., 2011; Feierler et al., 2011; Spomer et al., 2014; Zhu et al., 2015), die allosterische Rezeptormodulation (Dowal et al., 2011) und die Signalweiterleitung (Faussner et al., 2005; Swift et al., 2006; Anavi-Goffer et al., 2007; Karpinsky-Semper et al., 2015; Zhu et al., 2015) über RGS-Proteine (Karpinsky-Semper et al., 2015). Folglich kann die Helix 8 einerseits als ein Sensor für die Detektion von Rezeptorzuständen fungieren und andererseits die Rezeptorfunktion allosterisch modulieren. Eine im Jahre 2017 veröffentlichte Strukturaufklärung des Angiotensin II AT₂-Rezeptors²⁶¹ zeigte eine bisher unbekannt Konformation der C-terminalen Helix 8 im intrazellulären Membranbereich, die sich auf der zytosolischen Oberfläche des Rezeptors im Inneren des transmembranären Rezeptorkerns befindet und eine G-Protein-Kopplung als auch eine β -Arrestin-Rekrutierung an den AT₂-Rezeptor sterisch verhindert (Tate, 2017; Zhang et al., 2017a). Allerdings sollte man bedenken, dass für die Strukturaufklärung des AT₂-Rezeptors große Teile des N-Terminus (34 Aminosäuren) sowie des C-Terminus (28 Aminosäuren) entfernt wurden. Dadurch entfallen mögliche putative Cystein-Palmitoylierungsstellen und weitere posttranslationale Modifikationen des C-Terminus, die einen Einfluss auf die Konformation der C-terminalen Helix 8 haben können. Deshalb ist diese veröffentlichte AT₂-Rezeptorstruktur (Zhang et al., 2017a) bezüglich der neuen Helix 8 Konformation unter Vorbehalt zu betrachten. Im Gegensatz zu Klasse A GPCR besitzen einige Klasse B GPCR eine relativ lange C-terminale Helix 8 wie anhand der Strukturen des Calcitonin Rezeptors (Liang et al., 2017) mit 6 Windungen, des Glucagon Rezeptors mit 6 Windungen (Siu et al., 2013), des Glucagon-ähnlichen Peptid-1-Rezeptors (GLP-1 Rezeptor) mit 5 Windungen (Liang et al., 2018) und des Parathormonrezeptors Typ1 (PTH₁R) mit 5 Windungen (Zhao et al., 2019a) veranschaulicht wurde, die 2-3 Windungen länger ist als die Helix 8 des Histamin H₁-Rezeptors mit nur 3 Windungen (Shimamura et al., 2011). Es ist zu hinterfragen, ob diese lange Helix 8 der Klasse B GPCR als ein Mechanosensor fungiert oder weitere Funktionen am GPCR ausübt? Mit Hilfe der Kryo-Elektronenmikroskopiestrukturen des Calcitonin-, des GLP-1- und des PTH₁-Rezeptors gekoppelt an G_s-Proteine konnte gezeigt werden, dass die lange Helix 8 mit der G _{β} -Untereinheit des G_s-Proteins interagiert (Liang et al., 2017; Zhang et al., 2017c) und anscheinend wichtig für die G-Protein-Kopplung ist. Im Gegensatz dazu fehlt einem weiteren Vertreter der Klasse B GPCR, dem G_s-Protein gekoppeltem *Corticotropin-releasing factor* Rezeptors Typ 1²⁶² (CRF₁R) eine C-terminale Helix 8 (Hollenstein et al., 2013). Somit stellt sich die Frage, ist der G_s-Protein gekoppelte CRF₁R mechanosensitiv? Um diese Frage zu beantworten, können analog zum H₁-Rezeptor intramolekulare dynamische FRET-Messungen mit einem in HEK293-Zellen heterolog exprimierten FRET-Rezeptorkonstrukt (CRF₁R) mit einem FIAsh-Bindemotiv am Ende der il-3e und einem mCerulean am Ende der TM7

²⁶¹ PDB ID: 5UNF; 2,8 Å aufgelöste Struktur des Angiotensin II AT₂-Rezeptors (Zhang et al., 2017a)

²⁶² PDB ID: 4K5Y; 2,977 Å aufgelöste Struktur des *Corticotropin-releasing factor* Rezeptors Typ 1 (Hollenstein et al., 2013)

durchgeführt werden. Zweitens kann die Bildung von cAMP bei einer Gs-gekoppelten Aktivierung des CRF₁R mit Hilfe intermolekularer FRET-Messungen mit einem EPAC-FRET-Konstrukt²⁶³ durchgeführt werden, womit Änderungen im cAMP-Spiegel detektiert werden können (Storch et al., 2017b, c). Drittens kann ein erhöhter cAMP-Spiegel auch mittels ratiometrischer Kalziummessungen mit Fura-2 durch die Co-Expression des CRF₁R mit dem zyklisch-Nukleotid-gesteuertem CNG-Kanal (Kaupp und Seifert, 2002; Biel und Michalakis, 2009) gemessen werden.

Mit der Verwendung der intramolekularen FRET-basierten Untersuchung am adrenergen β_2 AR konnte die Arbeitsgruppe um Brian Kobilka (2007) schon früh beobachten, dass der C-Terminus bei einer orthosterischen Ligandenbindung eine Konformationsänderung vollzieht und zu FRET-Signaländerungen führt (Granier et al., 2007). Für die FRET-Untersuchungen²⁶⁴ wurde das CCPGCC Tetracystein-Bindemotiv (siehe Abbildung 2.8) an jeweils zwei Positionen im C-Terminus des β_2 AR eingesetzt. Im Gegensatz zur vorliegenden Arbeit wurde FIAsh als ein Donorfluorochrom und Alexa Fluor 568 als ein Akzeptorfluorochrom eingesetzt. Alle verwendeten Liganden (Agonist, partieller Agonist, inverser Agonist, Antagonist) zeigten FRET-Signalzunahmen beim β_2 -AR-351-CCPGCC-Konstrukt um +2,76% bis +6,24% (Granier et al., 2007). Dagegen zeigte das β_2 AR-C-ter-CCPGCC-Konstrukt²⁶⁵ nur minimale Änderungen des FRET-Signals um 1 - 2%. Diese Ergebnisse stehen im Einklang mit unseren Befunden mit den il3-b, il3-m, il3-e1 und il3-e2 gpH₁R-Konstrukten bei Agonistenstimulation mit Histamin (siehe Abschnitt 3.2 mit Abbildungen 3.4 und 3.5) und bei Applikation des partiellen Agonisten Mizolastin (siehe Abschnitt 3.8 mit Abbildung 3.13), das auch zu FRET-Signalabnahmen führte. Im Gegensatz zum β_2 AR-C-ter-CCPGCC-Konstrukt verursachte der Einsatz von selektiven inversen Agonisten wie Mepyramin (siehe Abschnitt 3.6 mit Abbildung 3.10 und 3.11) und Desloratadin (siehe Abschnitt 3.7 mit Abbildung 3.12) FRET-Signalzunahmen wie beim β_2 -AR-351-CCPGCC-Konstrukt. Man sollte jedoch bedenken, dass FRET-Messungen mit dem β_2 AR-C-ter-CCPGCC-Konstrukt nur kleine FRET-Signaländerungen von 1-2% zeigten. Angesichts dieser FRET-Ergebnisse liegt die Schlussfolgerung nahe, dass sich das distale Ende des C-Terminus bei einer Agonistenstimulation vom Rezeptorkern weg bewegt (Granier et al., 2007).

Hier in dieser vorliegenden Arbeit konnten wir zum ersten Mal eine weitere Rolle für die C-terminale Helix 8 zeigen. Bis jetzt war die Rolle der Helix 8 für die Mechanosensitivität

²⁶³ Das EPAC-Protein ist N-terminal an ein türkis fluoreszierendes Protein (mTurquoise) und C-terminal an ein gelb fluoreszierendes Protein (YFP) fusioniert. Bei einer Gs-Protein-Aktivierung bindet das cAMP an EPAC und verursacht eine Konformationsänderung des EPAC-Proteins, wodurch sich die beiden Fluorochrome voneinander wegbewegen und das FRET-Signal abnimmt (Storch et al., 2017b, c).

²⁶⁴ Für die FRET-Untersuchungen am adrenergen β_2 AR wurde das CCPGCC Tetracystein-Bindemotiv (siehe Abbildung 2.8) an jeweils zwei Positionen im C-Terminus des β_2 AR eingesetzt. Einerseits zwischen der Aminosäureposition G351 und S356, welches zehn Aminosäuren von der Palmitoylierungsstelle am Ende der C-terminalen Helix 8 entfernt liegt (β_2 -AR-351-CCPGCC) und andererseits am distalen Ende des C-Terminus (β_2 -C-ter-CCPGCC). Das Akzeptor-Fluorochrom, Alexa Fluor 568, wurde an das Cystein C265 am Ende der ICL3 des β_2 AR fusioniert (Granier et al., 2007).

²⁶⁵ Bei der Verwendung von Agonisten war das FRET-Signal um -1.43% bis -2.15% reduziert. Unter dem inversen Agonisten nahm das FRET-Signal um ca. -0.88% ab. Die Applikation des partiellen Agonisten führte zu FRET-Signalzunahmen von ca. 1,23% (Granier et al., 2007).

von GPCR nicht aufgedeckt. Daher wollten wir genauer untersuchen, ob die C-terminale Helix 8 für die Mechanosensitivität von GPCR essentiell sein könnte. Interessanterweise besitzen mehrere in der Literatur als mechanosensitiv deklarierte GPCR (siehe Abbildung 4.1) eine C-Terminale Helix 8 wie der $G_{q/11}$ -gekoppelte Histamin H_1 - (Shimamura et al., 2011), der Angiotensin II AT_1 - (Zhang et al., 2015b), der muskarinische M_1 - (Maeda et al., 2019), M_2 - (Haga et al., 2012) und M_3 -Rezeptor (Karpinsky-Semper et al., 2015), der $G_{q/11}$ -und G_i -gekoppelte Bradykinin B_2 - (Feierler et al., 2011), der Cysteinyl-Leukotrien CystLT1- (Aratake et al., 2012; Bandaru et al., 2014; Thompson et al., 2014), der purinerge $P2Y_6$ -Rezeptor (Besada et al., 2006), der Chemokin CXCR1-Rezeptor (Park et al., 2012b), der Parathormonrezeptor Typ1 (Zhao et al., 2019a) sowie der $G_{i/o}$ -gekoppelte 5-HT $_{1B}$ -Rezeptor (Wang et al., 2013a; García-Nafría et al., 2018b; Yin et al., 2018), der Apelinrezeptor (Ma et al., 2017), der Formylpeptid FP_1R - (Suvorova et al., 2009) und der Sphingosin-1-Phosphat Rezeptor 1 $S1P_1$ -Rezeptor (Hanson et al., 2012).

In unserer Arbeit wurden weitere mechanosensitive GPCR mit einer C-terminalen Helix 8 entdeckt: Der $G_{i/o}$ -Protein gekoppelte Dopamin D_2 -Rezeptor (Wang et al., 2018) und der G_s -Protein gekoppelte Adenosin A_{2A} -Rezeptor (Jaakola et al., 2008; Doré et al., 2011; Xu et al., 2011; Bai und Wang, 2012; Congreve et al., 2012; Hino et al., 2012; Lebon et al., 2015; Carpenter et al., 2016; Segala et al., 2016; Cheng et al., 2017; Weinert et al., 2017b; Eddy et al., 2018; García-Nafría et al., 2018a; Rucktooa et al., 2018; White et al., 2018b). Bei einer Zerstörung der α -helikalen Struktur der Helix 8 durch Aminosäureaustausche zu Prolin (F484P und F484P-F488P) konnte gezeigt werden, dass die mechanisch induzierte Rezeptoraktivierung des Histamin H_1 -Rezeptors (siehe Abschnitt 3.14 mit Abbildung 3.22) unterdrückt wurde. Darüber hinaus führte die Entfernung des C-terminus mit der Helix 8 des mechanosensitiven H_1 -Rezeptors (siehe Abschnitt 3.12 mit Abbildung 3.19) zum Verlust seiner Mechanosensitivität (siehe Abschnitt 3.12 mit Abbildung 3.19 E). Alle Helix 8-Rezeptormutanten zeigten Histamin-induzierte Kalziumzunahmen (siehe Abschnitt 3.14 mit Abbildung 3.23), eine Membranlokalisation (siehe Abschnitt 3.1 mit Abbildung 3.2), ähnliche FRET-Signaländerungen (siehe Abschnitt 3.16 mit Abbildung 3.25 A-D und E) und ähnliche FRET-Effizienzen (siehe Abschnitt 3.16 mit Abbildung 3.25 A-D und F), womit die Funktionalität aller in der Helix 8 mutierten H_1 -Rezeptoren belegt werden konnte. Die mechanisch induzierten FRET-Signaländerungen (siehe Abschnitt 3.14 mit Abbildung 3.22 B) als auch die Kalziumtransienten unter mechanischer Stimulation (siehe Abschnitt 3.14 mit Abbildung 3.23 C) der Helix-8-Rezeptormutanten waren signifikant reduziert, was auf eine wesentliche Rolle der Helix 8 für die Mechanosensitivität des H_1 -Rezeptors hervorhebt. Diese Ergebnisse führten zur Hypothese, dass die Helix 8 eine essentielle Struktur für die Mechanosensitivität von GPCR sein könnte.

Im Gegensatz zum Menschen besitzt das Hausschwein zwei Isoformen des GnRH-Rezeptors, eine kurze Isoform, bei der die Helix 8 fehlt (GnRHR) und eine lange Isoform mit einer C-terminalen Helix 8 (GnRHR2) (siehe Abschnitt 3.12 mit Abbildung 3.18 B). Mit Hilfe ratiometrischer Kalziummessungen mit Fura-2 (siehe Abschnitt 2.9)

konnte gezeigt werden, dass jeweils die kurze Isoform des GnRH-Rezeptors des Hausschweins (ssGnRH) (Millar et al., 2004) nicht mechanosensitiv ist (siehe Abschnitt 3.12 mit Abbildung 3.19 A und B), wohingegen die lange Isoform des GnRH-Rezeptors des Hausschweins (ssGnRHR2) auf eine mechanische Stimulation (150 mOsm kg^{-1}) mit einem deutlichen intrazellulären Kalziumanstieg reagierte (siehe Abschnitt 3.12 mit Abbildung 3.19 C). Durch die Übertragung der Helix 8 des mechanosensitiven gpH_1 -Rezeptors auf den nicht mechanosensitiven humanen GnRH-Rezeptor (siehe Abbildung 3.18 B) konnte sowohl unter hypoosmotischer Membrandehnung (150 mOsm kg^{-1}) als auch bei der Agonistenstimulation mit Gonadoliberin (200 nM) eindeutige Kalziumzunahmen beobachtet werden (siehe Abschnitt 3.12 mit Abbildung 3.19 D), dass auf eine mechanische Aktivierbarkeit der Rezeptorchimäre hindeutete. Auch der humane $G_{q/11}$ -Protein gekoppelte Neurotensin NTS_1 -Rezeptor, der selbst keine C-terminale Helix 8 besitzt (siehe Abbildung 3.18 B), zeigte keinen Kalziumanstieg auf eine mechanische Stimulation mit 150 mOsm kg^{-1} (siehe Abschnitt 3.12 mit Abbildung 3.19 F).

Um herauszufinden, ob das Vorhandensein der Helix 8 ein generelles Kriterium für die Mechanosensitivität von GPCR ist, wurden weitere Vertreter aus der GPCR Superfamilie, $G_{i/o}$ - und G_s -Protein gekoppelte Rezeptoren mit bzw. ohne einer C-terminalen Helix 8 (siehe Abbildung 4.2) auf ihre Mechanosensitivität hin überprüft. Erst kürzlich wurde die Struktur des humanen $G_{i/o}$ -Protein gekoppelten Dopamin D_2 -Rezeptors mit dem atypischem Neuroleptikum Risperidon veröffentlicht (Wang et al., 2018). Interessanterweise besitzt der humane D_2 -Rezeptor einen dem gpH_1 -Rezeptor vergleichbar kurzen C-Terminus mit einer C-terminalen Helix 8²⁶⁶ mit 3 Windungen (Wang et al., 2018) wie der humane Histamin H_1 -Rezeptor (Shimamura et al., 2011).

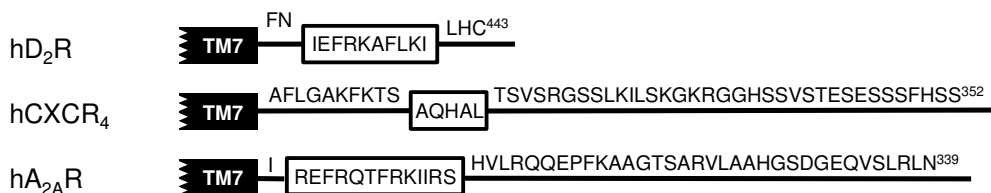


Abbildung 4.2: Aminosäuresequenzen der C-Termini vom humanen Dopamin D_2 -Rezeptor (hD₂R), vom humanen Chemokinrezeptor CXCR₄ (hCXCR₄) und vom humanen Adenosin A_{2A} -Rezeptor (hA_{2A}R) Die Transmembrandomäne 7 (TM7) wird figurativ ohne eine Aminosäuresequenz angezeigt. Die Aminosäuresequenz einer α -helikalen Helix ist eingerahmt (Rechteck). Die Aminosäuresequenz des C-Terminus beginnt mit Phenylalanin an der Position 429 im Fall des hD₂R, mit Alanin an der Position 303 im Fall des hCXCR₄ und mit Arginin an der Position 292 im Fall des hA_{2A}R. Die angegebene Zahl gibt die Nummer der letzten Aminosäure an.

²⁶⁶ Die Helix 8 des humanen Dopamin D_2 -Rezeptors weist folgende Aminosäuresequenz im Einbuchstabencode auf: E⁴³²FRKAF LKILHC⁴⁴³ (Sensoy und Weinstein, 2015) bzw. T⁴²⁷FNIEFRKAF LKILHC⁴⁴³ (Huynh et al., 2009). Mit Hilfe des Programms CCP4 Molecular Graphics Version 2.10.10 konnte aus der 2.867 Å aufgelösten Struktur des humanen Dopamin D_2 -Rezeptors mit dem Zugriffsschlüssel PDB-ID: 6CM4 (Wang et al., 2018) die nachstehende Aminosäuresequenz I⁴³¹EFRKAF LKI⁴⁴⁰ der Helix 8 bestimmt werden.

Aus der Literatur ist bekannt, dass die $G_{\beta\gamma}$ -Proteinuntereinheiten der Pertussistoxin-sensitiven G_i -Proteinfamilie GIRK²⁶⁷-Kanäle aktivieren (Huang et al., 1995; Krapivinsky et al., 1995b; Kunkel und Peralta, 1995; Clapham und Neer, 1997; Krapivinsky et al., 1998; Hommers et al., 2003). Um herauszufinden, ob der $G_{i/o}$ -Protein gekoppelte D₂R mechanosensitiv ist, wurden elektrophysiologische Untersuchungen von transient transfizierten CHO-K1-Zellen mit dem heterotetrameren Kir3.1/Kir3.2-Kanal und dem hD₂R in der Ganzzellkonfiguration („whole-cell-configuration“) der „Patch-Clamp“ Technik in der Spannungsklemme („voltage-clamp“) (Hamill et al., 1981) durchgeführt (siehe Abbildung 4.3). Da CHO-K1-Zellen keine endogenen Kir3.x-Kanäle exprimieren, wurde die CHO-K1-Zelllinie²⁶⁸ anstelle der HEK293T-Zelllinie als ein Überexpressionssystem für den heterotetrameren Kir3.1/Kir3.2-Kanal in Co-Expression mit dem hD₂R verwendet. Elektrophysiologische Messungen in der klassischen Ganzzelleitung von CHO-K1-Zellen, die den hD₂R und den heterotetrameren Kir3.1/Kir3.2-Kanal überexprimierten, konnte sowohl eine hypoosmotische Membrandehnung (250 mOsm kg⁻¹) als auch eine Agonistenstimulation mit Dopamin (10 μ M) eine Zunahme des einwärtsgerichteten Kaliumstroms auslösen (siehe Abbildung 4.3 A), wodurch die mechanische Stimulation des $G_{i/o}$ -gekoppelten hD₂R belegt wurde. Angesichts dieser elektrophysiologischen Ergebnisse liegt die Schlussfolgerung nahe, dass der humane $G_{i/o}$ -gekoppelte Dopamin D₂-Rezeptor ein weiterer mechanosensitiver GPCR aus der GPCR Superfamilie ist. Beili Wu et al. (2010) konnten erstmals die Struktur des humanen $G_{i/o}$ -Protein gekoppelten CXCR₄ (hCXCR₄) mit dem niedermolekularen Antagonisten IT1t²⁶⁹ auflösen (Wu et al., 2010). Die Strukturaufklärung lieferte die Information, dass dem hCXCR₄ im Gegensatz zu den beiden mechanosensitiv deklarierten CXCR₁ (Park et al., 2012a) und CXCR₂ (de Kruijff et al., 2011) Chemokinrezeptoren (Zeng et al., 2011; Zeng et al., 2012) eine amphiphile C-terminale Helix 8 fehlte. Betrachtet man allerdings die Struktur des hCXCR₄ genauer, stellt man immer noch die Existenz einer einzigen α -helikalen Windung im C-Terminus (siehe Abbildung 4.2) fest (Wu et al., 2010; Bruno et al., 2012). Elektrophysiologische Messungen von CHO-K1-Zellen in der Ganzzellkonfiguration, die den heterotetrameren Kir3.1/Kir3.2-Kanal und den hCXCR₄ co-exprimierten, zeigten keinen einwärtsrektifizierenden Kaliumstrom bei hypoosmotischer Membrandehnung (240 mOsm kg⁻¹). In Gegenwart des allosterischen Agonisten ATI 2341 (10 μ M) des

²⁶⁷ Abkürzung GIRK vom Englischen **G** protein coupled inwardly rectifying (**K**⁺) potassium channel. Die Familie der G-Protein gekoppelten einwärtsgerichteten (rektifizierende) Kaliumkanäle, die Kir3.x-Kanäle, vereint die vier Untereinheiten: Kir3.1-, Kir3.2-, Kir3.3- und Kir3.4. Es wird angenommen, dass eine funktionelle transmembranäre Kanaleinheit als ein Heterotetramer mit der Kir3.1-Untereinheit in der Zellmembran vorliegt, das sich mit den Kir3.2-, Kir3.3- bzw. der Kir3.4-Untereinheiten zusammensetzt (Krapivinsky et al., 1995a; Riven et al., 2006; Zylbergold et al., 2010) und einen einwärtsgerichteten Kaliumstrom ins Zellinnere auslöst. Dieser einwärtsgerichtete Kaliumstrom kann in elektrophysiologischen Experimenten gemessen werden (Reuveny et al., 1994; Takao et al., 1994; Wickman et al., 1994; Krapivinsky et al., 1995b; Dellling et al., 2002).

²⁶⁸ Bei den CHO-K1-Zellen handelt es sich um immortalisierte fibroblasten-ähnliche Zellen, die von primären Zellen abstammen, die im Jahre 1957 aus einer Eierstockbiopsie eines adulten chinesischen Zwerghamsters (*Cricetulus griseus*) gewonnen wurden (Puck et al., 1958; Lewis et al., 2013).

²⁶⁹ PDB ID: 3ODU: 2.5 Å aufgelöste Kristallstruktur des CXCR4-T4-Lysozym-Komplexes mit dem Antagonisten IT1t. Hierfür wurde ein T4-Lysozym zwischen den beiden Aminosäurepositionen S229 und K230 und G404 in der ICL3 eingefügt. Der CXCR4-T4-Lysozym-Komplex enthält eine thermostabilisierende L125^{3,41}-Mutation (Wu et al., 2010).

hCXCR₄ (Quoyer et al., 2013; Planesas et al., 2015) konnte jedoch ein maximaler einwärtsgerichteter Kaliumstrom aufgezeichnet werden. Dagegen zeigten CHO-K1-Zellen, die nur den heterotetrameren Kir3.1/Kir3.2-Kanal heterolog exprimierten, keine Zunahme des einwärtsrektifizierenden Kaliumstroms als Antwort auf eine mechanische Stimulation (250 mOsm kg^{-1}), aber eine maximale Zunahme des einwärtsgerichteten Kaliumstrom unter dem potenten und selektiven Kir3.x-Kanalaktivator ML297 ($3 \mu\text{M}$) (Kaufmann et al., 2013). Wie in früheren Untersuchungen beobachtet wurde, verringerte die mechanische Aktivierung des Kir3.x-Kanals den basalen einwärtsgerichteten Kaliumstrom (Ji et al., 1998) in CHO-K1-Zellen, womit eine konstitutive Aktivität des Kir3.x-Kanals (Stanfield et al., 2002; Voigt et al., 2008) belegt wird. Diese Ergebnisse weisen darauf hin, dass die C-terminale Helix 8 auch für die Mechanorezeption von $G_{i/o}$ -Protein gekoppelten Rezeptoren entscheidend ist.

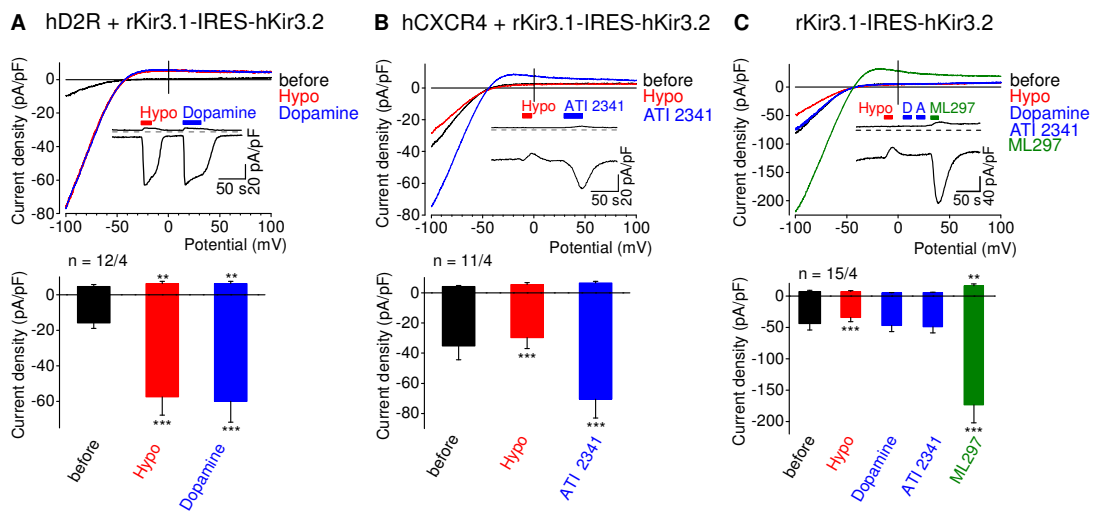


Abbildung 4.3: Mechanische Aktivierbarkeit von $G_{i/o}$ -Protein gekoppelten Rezeptoren mit einer C-terminalen Helix 8 Für die elektrophysiologischen Messungen wurden CHO-K1-Zellen mit $1 \mu\text{g}$ rKir3.1-IRES-hKir3.2-pIRES (393) und mit $1 \mu\text{g}$ 3xHA-hD2R pcDNA3.1(+) (568) von cDNA Resource Center USA (Catalog Number: #DRD020TN01) oder mit $1 \mu\text{g}$ 3xHA-hCXCR4 pcDNA3.1(+) (599) von cDNA Resource Center USA (Catalog Number: #CXCR40TN00) für 24 Stunden transient transfiziert und in der Ganzzellkonfiguration in der Spannungsklemme gemessen. Es wurde jeweils $0,2 \mu\text{g}$ pCerulean-N1 pcDNA3.1(+) (130) zum Visualisierung einer erfolgreichen Transfektion kotransfiziert. Es ist jeweils ein repräsentativer Strom-Spannungs-Verlauf mit einem Strom-Zeit-Verlauf (A, B, C, oben) dargestellt. Die Applikation einer 250 mOsm kg^{-1} hypoosmolaren Lösung (Hypo, roter Balken) als auch von $10 \mu\text{M}$ Dopamin (blauer Balken) führte zur Zunahme des einwärtsgerichteten Kaliumstroms bei hD2R transfizierten CHO-K1-Zellen (A). Dagegen kommt es bei hCXCR4 transfizierten CHO-Zellen zur Abnahme des einwärtsrektifizierenden Kaliumstroms bei hypoosmolarer Membrandehnung (250 mOsm kg^{-1} , Hypo, roter Balken) und zur Zunahme des einwärtsrektifizierenden Kaliumstroms unter dem allosterischen Agonisten des hCXCR₄, $10 \mu\text{M}$ ATI 2341 (blauer Balken) (B). Nur mit dem Kir3.1/Kir3.2-Kanal heterolog exprimierte CHO-Zellen zeigten keine Stromzunahmen unter $10 \mu\text{M}$ Dopamin (blauer Balken) sowie unter $10 \mu\text{M}$ ATI 2341 (blauer Balken), aber maximale einwärtsgerichtete Kaliumströme unter dem selektiven Kir3.x-Kanal Aktivator, $3 \mu\text{M}$ ML297 (olivgrüner Balken). Auch hier hemmt die mechanische Stimulation mit einer 250 mOsm kg^{-1} Lösung (Hypo, roter Balken) den einwärtsgerichteten Kaliumstrom (C). Die Stromdichten (*current densities*) CD (pA/pF) wurden bei Haltepotentialen von $\pm 100 \text{ mV}$ vor und während der Superfusion mit $10 \mu\text{M}$ Dopamin (blau), mit hypoosmolarer Lösung (250 mOsm kg^{-1} , Hypo, rot), $10 \mu\text{M}$ ATI 2341 (blau) und unter $3 \mu\text{M}$ ML297 (olivgrün) berechnet. Die Zahl gibt die Anzahl an gemessenen

CHO-K1-Zellen an vier Experimentiertagen an. Zur statistischen Auswertung wurde die Zunahme der Stromdichten während einer Agonistenstimulation mit 10 μM Dopamin bzw. 10 μM ATI 2341, unter dem Kir3.x-Kanalaktivator 3 μM ML297 und einer mechanischen Stimulation (250 mOsm kg^{-1}) zur basalen Ausgangsstromdichte (before, schwarz) mit dem gepaarten Student t-Test ermittelt (Mittelwert \pm SEM, **P < 0.01, ***P < 0.001). Das Säulenndiagramm (A, B, C, unten) gibt die maximalen Stromdichten (pA/pF) des Kir3.1/Kir3.2-Kanals in Gegenwart eines $G_{i/o}$ -Protein gekoppelten Rezeptors [hD2R (A), hCXCR4 (B)] oder in Abwesenheit eines $G_{i/o}$ -Protein gekoppelten Rezeptors (C) wieder.

Als nächstes wurde der humane Adenosin A_{2A} -Rezeptor ($hA_{2A}R$) als ein Vertreter der G_s -Protein gekoppelten Rezeptoren auf eine mechanische Aktivierbarkeit hin überprüft. Der $hA_{2A}R$ besitzt im Vergleich zum Histamin H_1 - mit 21 Aminosäuren und zum Dopamin D_2 -Rezeptor mit 15 Aminosäuren einen relativ langen C-Terminus mit 48 Aminosäuren mit einer C-terminalen Helix 8²⁷⁰ (siehe Abbildung 4.2), die 3 Windungen ausbildet (Wang et al., 2018). Intramolekulare dynamische FRET-Untersuchungen mit dem humanem Adenosin A_{2A} -CCPGCC^{IL3e}-Cerulean pcDNA3 [71] Rezeptorkonstrukt²⁷¹, zeigte sowohl unter Agonistenstimulation (10 μM Adenosin) (Hoffmann et al., 2005) als auch unter mechanischer Stimulation (150 mOsm kg^{-1}) FRET-Signalabnahmen. Wie schon beim Histamin H_1 -Rezeptor in FRET-Untersuchungen beobachtet (siehe Abschnitt 3.2 mit Abbildung 3.4 und 3.5), waren die FRET-Signalabnahmen unter Agonistenstimulation mit $\Delta\text{FRET}(\%) = -6,20$ signifikant geringer als hypoosmotisch induzierte FRET-Signalabnahmen (150 mOsm kg^{-1}) mit $\Delta\text{FRET}(\%) = -34,93$ (siehe Abbildung 4.4 C). Bei einer zerstörten α -helikalen Helix 8 ($hA_{2A}R$ -T298P) waren die Agonisten induzierten FRET-Signalabnahmen (10 μM Adenosin) mit $\Delta\text{FRET}(\%) = -7,01$ ($hA_{2A}R$ -WT) im Vergleich zum Wildtyp A_{2A} -Rezeptor ($hA_{2A}R$ -WT) mit $\Delta\text{FRET}(\%) = -6,20$ ($hA_{2A}R$ -T298P) nicht signifikant unterschiedlich (siehe Abbildung 4.4 C). Eine Zerstörung der α -helikalen Struktur der C-terminalen Helix 8 mit nur einem Aminosäureaustausch an der Aminosäureposition Threonin 298 zu Prolin (T298P) führte wie beim gpH₁-Rezeptor (siehe Abschnitt 3.14 mit Abbildung 3.22 B) zu einer signifikanten Verringerung der Mechanosensitivität des humanen A_{2A} -Rezeptors. Mechanisch induzierte FRET-Signale waren bei der Helix-8-Mutante (T298P) um 67% reduziert. Bei dem ct-b-F484P gpH₁R-Konstrukt waren mechanisch induzierte FRET-Signale um -89% und bei dem ct-b-F484P-F488P gpH₁R-Konstrukt um -90% (siehe Abschnitt 3.14 mit Abbildung 3.22 B) signifikant reduziert. Insgesamt zeigte sich, dass ein einziger Aminosäureaustausch zu Prolin in der C-terminalen Helix 8 des GPCR (F484P bzw. T298P) ausreichend ist, um eine mechanische Rezeptoraktivierung von GPCR zu unterbinden.

²⁷⁰ Die Helix 8 des humanen Adenosin $A_{2A}R$ weist folgende Aminosäuresequenz im Einbuchstabencode auf: R296^{8,47}QTFRKIIIRSHVL308^{8,59} (Jaakola et al., 2008). Mit Hilfe des Programms CCP4 Molecular Graphics Version 2.10.10 konnte aus den aufgelösten Strukturen des humanen $A_{2A}R$ mit den Zugriffsschlüsseln PDB-ID:3QAK (Xu et al., 2011), PDB-ID: 5G53 (Carpenter et al., 2016), PDB-ID: 5NM2 (Weinert et al., 2017a), PDB-ID: 3EML (Jaakola et al., 2008), PDB-ID: 5OLG (Rucktooa et al., 2018), PDB-ID: 5WF5 (White et al., 2018a), PDB-ID: 6AQF (Eddy et al., 2018), PDB-ID: 5MZJ (Cheng et al., 2017), PDB-ID: 3RFM (Doré et al., 2011), PDB-ID: 3VGA (Hino et al., 2012), PDB-ID: 3UZC (Congreve et al., 2012), PDB-ID: 4E1Y (Liu et al., 2012c), PDB-ID: 4UG2 (Lebon et al., 2015), PDB-ID: 5IU4 (Segala et al., 2016) die nachstehende Aminosäuresequenz R293^{8,44}EFRQTFRKIIIRS305^{8,56} der Helix 8 bestimmt werden.

²⁷¹ Das Adenosin A_{2A} -CCPGCC^{IL3e}-Cerulean pcDNA3 [71] Rezeptorkonstrukt wurde von Herrn Prof. Dr. rer. nat. Carsten Hoffmann vom Rudolf-Virchow-Zentrum in Würzburg zur Verfügung gestellt.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass die Existenz einer C-terminalen Helix 8 eine Schlüsselrolle in der Mechanosensitivität der $G_{q/11}$ -, G_s - und $G_{i/o}$ -Protein gekoppelten Rezeptoren in der GPCR Superfamilie einnimmt. Insgesamt deuten unsere Ergebnisse daraufhin, dass die C-terminale Helix 8 das entscheidende mechanosensorische Strukturelement für die mechanische Aktivierung von $G_{q/11}$ -, $G_{i/o}$ - und G_s -Protein gekoppelten Rezeptoren ist (Abbildung 5.1). Erstmals konnte der molekulare Mechanismus der Mechanosensitivität von GPCRs aufgedeckt und eine Schlüsselrolle der Helix 8 als ein wesentliches Strukturelement für die Mechanosensitivität von GPCRs gezeigt werden.

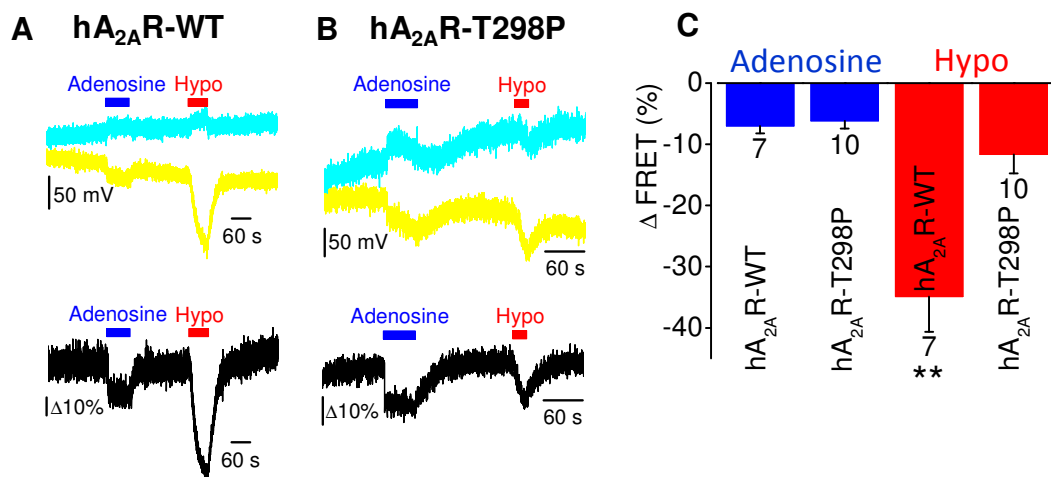


Abbildung 4.4: Der humane Adenosin A_{2A}-Rezeptor mit einer C-terminalen Helix 8 ist mechanosensitiv Dynamische FRET-Messungen von FIASH markierten, transient transfizierten HEK293-Zellen mit dem Wildtyp hA_{2A}-CCPGCC^{IL3e}-Cerulean pcDNA3 [71] (hA_{2A}R-WT) Rezeptorkonstrukt und mit der in der Helix 8 mutiertem hA_{2A}-CCPGCC^{IL3e}-T298P-Cerulean pcDNA3 Rezeptorkonstrukt (hA_{2A}R-T298P). Wie gezeigt wird, kommt es während einer 10 μ M Adenosinstimulation (Adenosine, blauer Balken) in beiden hA_{2A}Rezeptorkonstrukten (hA_{2A}R-WT, hA_{2A}R-T298P) zu einer Zunahme des Cerulean Fluoreszenzsignals (türkise Spur) und zeitgleich zu einer Abnahme des FIASH Fluoreszenzsignals (gelbe Spur), was in einer Abnahme des FRET-Signals (schwarze Spur) resultiert. Das bedeutet, dass sich die beiden Fluorochrome während einer Agonistenstimulation voneinander wegbewegen. Als mechanischer Stimulus wurde eine hypoosmolare Lösung (150 mOsm kg⁻¹, Hypo, roter Balken) eingewaschen, das in beiden hA_{2A}-Rezeptorkonstrukten zu einer Abnahme des FRET-Signals führt (A, B). Die Zusammenfassung der dynamischen FRET-Messungen wird als Säulendiagramm dargestellt (C). Adenosin induzierte FRET-Änderungen werden in blau, hypoosmotisch induzierte FRET-Änderungen in rot angezeigt. Zahlen an den Säulen geben die Anzahl der gemessenen Zellen auf 30 mm Glasplättchen von mindestens 3 Versuchstagen an. Es wurden signifikante Unterschiede zwischen den FRET-Signalen der Helix 8 Mutante (hA_{2A}R-T298P) zum Wildtyp hA_{2A}R (hA_{2A}R-WT) bei mechanischer Stimulation mit einer hypoosmolaren Lösung (150 mOsm kg⁻¹, Hypo 150, roter Balken) mit dem Student-t-Test berechnet (Mittelwert \pm SEM, **P < 0.01) bestimmt (C).

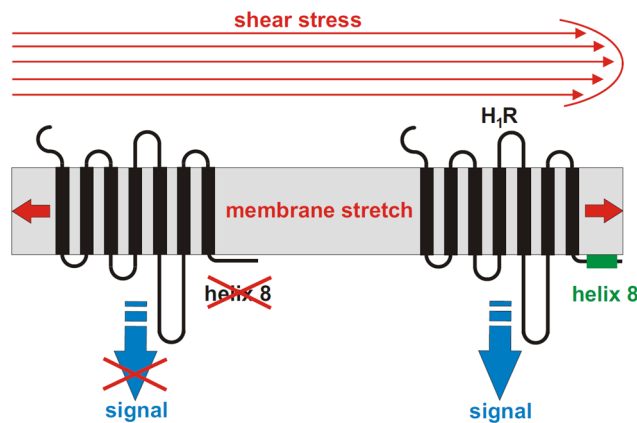


Abbildung 4.5: Modell zur mechanischen Aktivierung von GPCR

Die Mechanosensitivität von GPCR hängt vom Vorhandensein einer intakten Helix 8 ab. GPCR, denen eine Helix 8 fehlt, sind nicht mechanosensitiv (links). Eine intakte Helix 8 (rechts, „helix 8“) stabilisiert den mechanisch induzierten Rezeptorzustand und führt zur Aktivierung von GPCR (rechts, signal). Mechanische Reize wie z. B. Membrandehnung und Fluss-induzierte Scherkräfte können zu einer Verlängerung der Helix 8 führen (Wolny et al., 2014), die

zur Aktivierung des G-Proteins und anschließender Aktivierung weiterer Effektorsysteme führen (rechts, blauer gestrichelter Pfeil „signal“). Der GPCR ist in schwarz dargestellt. Die Helix 8 wird als ein grünes rechteckiges Kästchen (rechts) hervorgehoben, das parallel zur Zellmembran (grauer Rechteck) liegt. Rote dünne Pfeile zeigen Fluss-induzierte Scherkräfte („shear stress“) an, wobei die dicken rotfarbenen Pfeile die Membrandehnung („membrane stretch“) repräsentieren. Abbildung wurde in Zusammenarbeit mit Prof. Dr. rer. nat. Michael Mederos y Schnitzler erstellt.

4.5 PIP₂-Interaktion beeinflusst die mechanische Aktivierbarkeit des Histamin H₁-Rezeptors

Hirst et al. (2015) konnten zeigen, dass die amphiphile Helix 8 im C-Terminus des Angiotensin II AT_{1A}-Rezeptors ein hochaffines Peptidmotiv für anionische Phospholipide wie z. B. PIP₂ der Zellmembran ist. Hirst et al. (2015) vermuten, dass die Helix 8 mit PIP₂ in der Zellmembran elektrostatisch wechselwirkt und sich aus der Lipid-Doppelschicht herausbewegt, das zu einer Konformationsänderung in der Helix 8 führt (Hirst et al 2015). Eine elektrostatische Wechselwirkung zwischen PIP₂ mit der C-terminalen Helix 8 führte zu einer Konformationsänderung der Helix 8, indem positiv geladene basische Aminosäuren der C-terminalen Helix 8 mit negativ geladenen Phosphatgruppen der Phospholipide wechselwirken und eine Kippbewegung der Helix 8 vom hydrophilen Zytosol in die Lipid-Doppelschicht veranlassen. Auch die Arbeitsgruppe um Alexandros Makriyannis aus Northeastern University in Boston konnte am humanen Cannabinoid CB1-Rezeptor zeigen, dass die C-terminale Helix 8 mit Phospholipiden der Zellmembran interagiert (Tiburu et al., 2011). Um herauszufinden, ob PIP₂ mit basischen Aminosäuren der C-terminalen Helix 8 wechselwirkt und die mechanische Rezeptoraktivierung beeinflusst, wurde 20 µM Wortmannin, ein PI4K²⁷²-Inhibitor bei hohen Konzentrationen, in der FRET-Photometrie eingesetzt (siehe Abschnitt 3.13). Mechanisch induzierte FRET-Signale waren in einer PIP₂-verarmten Lipid-Doppelschicht sowohl unter einer hypoosmotischen Membrandehnung (150 mOsm kg⁻¹) als auch unter Fluss-induzierten Scherkräften (40 dyn cm⁻² und 60 dyn cm⁻²) signifikant reduziert (siehe Abschnitt 3.13 mit Abbildung 3.21 C, F, D und G). Dynamische FRET-Untersuchungen mit dem ct-b gpH₁R-Konstrukt ergab, dass das FRET-Signal unter Wortmannin (20 µM) zunahm (siehe Abschnitt 3.13 mit Abbildung 3.21 A und D), was verglichen mit unseren

²⁷² Abkürzung PI4K steht für Phosphoinositid-4-kinase

FRET-Untersuchungen mit den inversen Agonisten (siehe Abschnitt 3.6 und 3.7) bedeuten würde, dass eine PIP_2 -Verarmung der Zellmembran eine Transduktion des Histamin H_1 -Rezeptors in einen inaktiven Rezeptorzustand induziert. Es wurden jedoch keine signifikanten Unterschiede der mechanisch induzierten FRET-Signale bei der Perfusion mit nur 100 nM Wortmannin ermittelt (siehe Abbildung 3.21 D). Insgesamt weisen diese FRET-Ergebnisse darauf hin, dass die Wechselwirkung positiv geladener Seitenketten basischer Aminosäuren in der Helix 8 mit den negativ geladenen Phosphorsäureestern des PIP_2 in der Zellmembran von wesentlicher Bedeutung für die Mechanosensitivität von GPCR ist.

Eine Verarmung der Lipid-Doppelschicht an dem Phospholipid PIP_2 durch Wortmannin (20 μM) führte sowohl unter hypoosmotischer Membrandehnung (150 mOsm kg^{-1}) als auch unter Fluss-induzierten Scherkräften (40 dyn cm^{-2} und 60 dyn cm^{-2}) zur signifikanten Reduktion der mechanischen Aktivierbarkeit des Histamin H_1 -Rezeptors (siehe Abschnitt 3.13 mit Abbildung 3.21 C, F, D und G). Interessanterweise führte die alleinige Applikation von 20 μM Wortmannin zu FRET-Signalzunahmen, was darauf hindeutet, dass elektrostatische Wechselwirkungen zwischen den positiv geladenen Aminosäureresten der Helix 8 und den negativ geladenen Phosphatgruppen aufgelöst werden und dadurch die Helix 8 sich nach der von Hirst et al. (2015) gestellten Hypothese aus der Zellmembran herauszieht und wegbewegt. Durch Aminosäureaustausche positiv geladener Aminosäuren in der C-terminalen Helix 8 jeweils zu Alanin (R485A, R490A-R493A, K486A-K489A) konnte die mechanische Rezeptoraktivierung des H_1 -Rezeptors signifikant unterdrückt werden (siehe Abschnitt 3.16 mit Abbildung 3.19). Demzufolge führt sowohl eine PIP_2 -Entleerung der Zellmembran als auch die Entfernung positiv geladener Aminosäurereste in der Helix 8 zu einer Konformationsänderung der Helix 8, das dadurch nicht mehr als ein Mechanosensor agieren kann. Austin Gehret et al. (2010) konnten zusätzlich zeigen, dass bei Agonistenbindung an den *Thyrotropin-releasing hormone* (TRH) Rezeptor positiv geladene Aminosäurereste der Helix 8 mit der G-Protein-gekoppelten Kinase GRK2 interagieren und eine GRK2 vermittelte Phosphorylierung des Rezeptors fördern (Gehret et al., 2010). Der TRH-Rezeptor besitzt zwischen dem NPXXY-Motiv und den Palmitoylierungsstellen C335 und C337 eine amphipathische Helix 8. Die Ergebnisse zeigen, dass positive Aminosäurereste wie z. B. Lysin und Arginin in der Helix 8 von GPCR auch wichtig für die GRK-abhängige Phosphorylierung wichtig sind. Wohingegen lipophile ungeladene Aminosäurereste wie z. B. Leucin und Phenylalanin anscheinend wichtig für die Ausbildung einer α -helikalen Sekundärstruktur der Helix 8 in künstlichen Membranen sind (Ahn et al., 2010).

4.6 Anbindung an das Aktin-Zytoskelett

Ein systematischer Aminosäuresequenzvergleich aus dem Jahre 2015 deckte ein konserviertes Bindemotiv für das Aktin-bindende Protein Filamin A (FLNa) im C-Terminus von über 20% aller humanen GPCR auf (Tirupula et al., 2015). Mit der Verwendung der isothermen Titrations-Kalorimetrie und der

Kernspinresonanzspektroskopie (NMR²⁷³-Spektroskopie) konnte eine Bindung zwischen der Immunglobulin (Ig) Domäne (Nakamura et al., 2007) von FLNa mit dem FLNa-Bindemotiv beobachtet werden, wodurch filamentöses F-Aktin mit dem GPCR quervernetzt wird (Tirupula et al., 2015). Unsere FRET-Untersuchungen mit dem Histamin H₁-Rezeptor zeigten eine signifikante mechanisch-induzierte FRET-Signalabnahmen in Gegenwart von Zytoskelettinhibitoren (siehe Abschnitt 3.9 mit Abbildung 3.15 F), die die Polymerisation von freiem globulärem G-Aktin zu filamentösem F-Aktin verhindern. Wohingegen eine verstärkte Aktin-Polymerisation keinen Unterschied der mechanischen Aktivierbarkeit des H₁-Rezeptors in Abwesenheit des Zytoskelettinduktors zeigte (siehe Abschnitt 3.9 mit Abbildung 3.15 F). Man könnte anhand dieser FRET-Ergebnisse die Vermutung äußern, dass der C-Terminus des H₁-Rezeptors an das Aktin-Zytoskelett koppelt und eine Zerstörung des Aktin-Zytoskeletts den H₁-Rezeptor vom Aktin-Zytoskelett entkoppelt und zur Freisetzung der C-terminalen Helix 8 führt. Durch die Entkopplung des GPCR vom Aktin-Zytoskelett können mechanisch-induzierte Konformationsänderungen der Helix 8 leichter ablaufen, was demnach zu stärkeren FRET-Signalabnahmen unter mechanischer Stimulation führen sollte.

Zusätzlich befinden sich im distalen Ende der C-Termini von GPCR eine PDZ1/2²⁷⁴-Proteininteraktionsdomäne (Dunn und Ferguson, 2015), die über die Bindung von z. B. NHERF1/2²⁷⁵-Gerüstproteinen (Lu et al., 2013) sowie F-Aktin-bindenden ERM²⁷⁶-Proteinen mit dem Aktin-Zytoskelett vernetzt werden (Fam et al., 2005; Paquet et al., 2006; Weinman et al., 2006). Atsuo Kuramasu et al. (2006) behaupten, dass der Histamin H₁-Rezeptor angeblich keine PDZ-Proteininteraktionsdomäne im relativ kurzen C-Terminus besitzt (Kuramasu et al., 2006), der betrachtet man die Kristallstruktur (siehe Abschnitt 1.5.5 mit Abbildung 1.10 A) größtenteils nur aus der Helix 8 besteht (siehe Abbildung 3.12 mit Abbildung 3.18 B) (Shimamura et al., 2011). Jedoch besteht immer noch die Möglichkeit einer indirekten Wechselwirkung des C-Terminus des H₁-Rezeptors mit dem Aktin-Zytoskelett, da aus der Literatur bekannt ist, dass Proteine mit einer PDZ-Proteininteraktionsdomäne wie z. B. GIPC1²⁷⁷ mit der Helix 8 des Dopamin D₂-Rezeptors wechselwirkt (Jeanneteau et al., 2004; Sensoy und Weinstein, 2015). Özge Sensoy und Harel Weinstein (2015) konnten mit Hilfe computergestützter molekulardynamischer Simulationen eine Wechselwirkung von GIPC1 mit der C-terminalen Helix 8 des D₂R feststellen. Sie beobachteten, dass sich die C-terminale Helix 8 durch eine Depalmitoylierung aus der Zellmembran herausbewegt und mit der PDZ-Domäne des GIPC1 wechselwirkt (Sensoy und Weinstein, 2015). Daraus ergibt sich, dass die Helix 8 durch die C-terminale Palmitoylierung in der Zellmembran

²⁷³ NMR vom Englischen **n**uclear **m**agnetic **r**esonance

²⁷⁴ PDZ vom Englischen **P**ost synaptic density 95 protein/Drosophila melanogaster septate junction protein **D**iscs large/tight junction protein **Z**onula occludens-1

²⁷⁵ NHERF vom Englischen **N**a⁺/**H**⁺ exchange regulatory **c**ofactor

²⁷⁶ ERM steht für **E**zrin-**R**adixin-**M**oesin-ähnliches Protein

²⁷⁷ Abkürzung GIPC steht für das 333 Aminosäuren lange **G**AIP **C**-terminus-interacting **p**rotein. Siehe URL-Adresse: <https://www.uniprot.org/uniprot/O14908>

verankert wird und dadurch eine Wechselwirkung mit der PDZ-Domäne des GIPC1 verhindert wird.

Weiterführende Experimente im Bezug auf die Modulation der Mechanosensitivität durch das Aktin-Zytoskelett wären, zum einen die NHERF1/2-Bindung an die PDZ-Proteininteraktionsdomänen in mechanosensitiven GPCR zu unterbinden und die mechanosensitive Rezeptoraktivierung genauer zu untersuchen. Zu diesem Zweck könnte die NHERF1/2-Expression mit der Verwendung von shRNAs (*short hairpin RNA*) unterdrückt bzw. mit der Verwendung von sgRNAs (*single guide RNA*) ausgeschaltet werden, um den mechanosensitiven GPCR vom Aktin-Zytoskelett zu entkoppeln. Zum anderen könnte die heterologe Expression eines mechanosensitiven GPCR mit einer in der Literatur beschriebenen NHERF1-E68A Patientenmutante²⁷⁸ (Courbebaisse et al., 2012; Storch et al., 2017a) die Bindung von NHERF1 an den mechanosensitiven GPCR verhindern und dadurch die Mechanosensitivität des GPCR beeinflussen. Eine weitere Quervernetzung des C-Terminus von GPCR ist über die N-terminale EVH-Domäne²⁷⁹ (Enabled/VASP Homology Domain) der sogenannten Homer Adapterproteine möglich, die an das filamentöse F-Aktin knüpfen können (Shiraishi-Yamaguchi und Furuichi, 2007; Magalhaes et al., 2012). Es wäre interessant, ob eine Herunterregulation bzw. eine Ausschaltung der mRNA Expression einzelner Homerproteine (Shiraishi-Yamaguchi und Furuichi, 2007) die Mechanorezeption von GPCR moduliert.

Diese Ergebnisse deuten daraufhin, dass sich die Helix 8 vermutlich bei einer Agonistenstimulation aus der Zellmembran herausbewegt. Wohingegen eine mechanische Stimulation wahrscheinlich zu einem weiteren Eindringen der Helix 8 in die Zellmembran führt.

4.7 Aktivierung von GPCR durch Transmembranpotential

Insgesamt können GPCR nicht nur durch chemische Botenstoffe wie Hormone, Neurotransmitter und Zytokine, sondern auch Agonisten-unabhängig durch mechanische Reize aktiviert werden. Yair Ben-Chaim et al. (2006) konnten erstmals am muskarinischen M₂-Rezeptor zeigen, dass Transmembranpotentialänderungen zu einer Zunahme der Agonistenaffinität führte (Ben-Chaim et al., 2006). Bei einer spannungsabhängigen Aktivierung des M₂-Rezeptors wurde eine Verschiebung von Ladungen im Rezeptor beschrieben, das eine Liganden-abhängige Konformationsänderung in der orthosterischen Ligandenbindetasche induziert (Navarro-Polanco et al., 2011; Dekel et al., 2012), wodurch die Agonistenaffinität und die G-Protein-Kopplung beeinflusst werden (Ben-Chaim et al., 2006; Rinne et al., 2015). Von der Forschergruppe um Prof. Dr. Moritz Bünemann aus dem Institut für Pharmakologie

²⁷⁸ Die Mutation (E68A) in der PDZ1-Domäne von NHERF1 verhindert die Bindung an PDZ-Domäne (Courbebaisse et al., 2012; Storch et al., 2017a).

²⁷⁹ Die EVH-Domäne bindet an ein PPXXF-Bindemotiv im C-Terminus von GPCR wie am Beispiel der beiden metabotropen Glutamatrezeptoren mGluR₁ und mGluR₅ (Brakeman et al., 1997; Tu et al., 1998; Kuramasu et al., 2006) sowie dem adrenergen α_{1D} Rezeptor (Tu et al., 1998) gezeigt wurde, das sogar zu einer agonisten-unabhängigen Rezeptoraktivierung der beiden metabotropen Glutamatrezeptoren mGluR₁ und mGluR₅ führen kann (Ango et al., 2001).

und Klinische Pharmazie der Philipps-Universität Marburg konnte mit intramolekularen dynamischen FRET-Untersuchungen von adrenergen und muskarinischen GPCR in der klassischen Ganzzell-Ableitung gezeigt werden, dass adrenerge α_{2A} - (Rinne et al., 2013) und β_1 -Rezeptoren (Birk et al., 2015) sowie muskarinischen M_1 -, M_3 - und M_5 -Rezeptoren (Rinne et al., 2015) durch Transmembranpotentialänderungen aktiviert werden. Diese spannungsabhängige Rezeptoraktivierung konnte sogar durch allosterische (Hoppe et al., 2018) und volle Agonisten moduliert werden (Rinne et al., 2013; Birk et al., 2015; Rinne et al., 2015). Eine Hyperpolarisation ($V_m = -90$ mV) in Anwesenheit eines Agonisten löste bei allen Rezeptoren einen aktiven Rezeptorzustand aus, indem das FRET-Signal abnahm (Rinne et al., 2013; Birk et al., 2015; Rinne et al., 2015). Dagegen führte eine Membrandepolarisation auf $V_m = +40$ mV bis $V_m = +60$ mV bei allen Rezeptoren mit Ausnahme des muskarinischen M_1 -Rezeptors zu FRET-Signalzunahmen (Rinne et al., 2013; Birk et al., 2015; Rinne et al., 2015; Hoppe et al., 2018), das einen inaktiven Rezeptorzustand belegt. Überraschenderweise ist eine spannungsabhängige Aktivierung der α_{2A} -, M_1 -, M_3 -Rezeptoren auch in Abwesenheit von G-Proteinen möglich, weil weder durch Pertussistoxin (PTX, 50 ng ml⁻¹) noch durch das nicht-hydrolysierbare GTP γ S (500 μ M) eine spannungsabhängige Rezeptoraktivierung beeinflusst wurde. Bisher wurden weitere spannungsabhängige GPCR entdeckt: Der $G_{q/11}$ -Protein gekoppelte purinerge P_2Y_1 -Rezeptor (Martinez-Pinna et al., 2005; Gurung et al., 2008), die beiden metabotropen Glutamatrezeptoren, der $G_{i/o}$ -Protein gekoppelte mGluR3 und der $G_{q/11}$ -Protein gekoppelte mGluR1a (Ohana et al., 2006), der $G_{i/o}$ -Protein gekoppelte Dopamin D_2 -Rezeptor (Sahlholm et al., 2008a; Sahlholm et al., 2008b), der adrenerge β_1 -Rezeptor (Birk et al., 2015), die beiden $G_{i/o}$ -Protein gekoppelten Histamin H_3 - und H_4 -Rezeptoren (Sahlholm et al., 2012).

Insgesamt zeigt sich, dass GPCR außer der konventionellen Ligandenbindung auch in der Lage sind andere Stimuli wie mechanische Reize und Transmembranpotentiale zu perzipieren. Diese Reize können agonisten-unabhängig bzw. agonisten-abhängig (allosterische Modulatoren) die Rezeptorfunktion beeinflussen.

4.8 Monovalente Natriumionen als allosterische Modulatoren von GPCR

Monovalente und divalente Kationen können als allosterische Modulatoren²⁸⁰ (siehe Abschnitt 1.13) an GPCR fungieren (Katritch et al., 2014; van der Westhuizen et al., 2015). Mit Hilfe computergestützter molekulardynamischer Simulationen konnten Yi Shang et al. (2014) und Jana Selent et al. (2010) zeigen, dass ein positiv-geladenes Natriumkation (Na^+) zuerst beim Eintritt aus dem Extrazellularraum über die orthosterische Ligandenbindetasche des Rezeptors mit der hochkonservierten

²⁸⁰ Allosterische Modulatoren verändern das Gleichgewicht zwischen aktiven und inaktiven Rezeptorzuständen, das die Bindungsaffinität von Agonisten in die orthosterische Ligandenbindestelle beeinflusst. Positiv-allosterische Modulatoren fördern die Bindung von Agonisten, die einen aktiven Rezeptorzustand stabilisieren. Wohingegen negative-allosterische Modulatoren die Bindung von Agonisten verhindern und einen inaktiven Rezeptorzustand stabilisieren (Shang et al., 2014; Gentry et al., 2015; Hoppe et al., 2018) wie am Beispiel der Opioidrezeptoren: δ -OR (Vickery et al., 2016a), μ -OR, und κ -OR (Shang et al., 2014) beschrieben wurde.

Aminosäureposition D^{3.32} der TM3 wechselwirkt und dann weiter zur allosterischen Na⁺-Bindetasche wandert und zwei Ionenbindungen ausbildet: einmal mit der negativ-geladenen Carboxylatgruppe des Aspartats D^{2.50} der TM2 und einmal mit der negativ geladenen Hydroxylatgruppe des Serins S^{3.39} der TM3 (Selent et al., 2010; Shang et al., 2014). Mit der Gewinnung von Kristallstrukturen des Adenosin A_{2A}R²⁸¹ (Liu et al., 2012b; White et al., 2018b), des adrenergen β₁AR²⁸² (Miller-Gallacher et al., 2014), des PAR1-Rezeptors²⁸³ (Zhang et al., 2012), des δ-Opiodrezeptors²⁸⁴ (δ-OR) (Fenalti et al., 2014) und des Dopamin D₄-Rezeptors²⁸⁵ (Wang et al., 2017) konnte eine allosterische Na⁺-Bindetasche²⁸⁶ in vielen GPCR aufgedeckt werden. Es wurden weitere GPCR mit einer allosterischen Na⁺-Bindetasche beschrieben: der adrenerge α_{2A}-Rezeptor (Wilson et al., 2001), der Histamin H₃-Rezeptor (Schnell und Seifert, 2010), der Dopamin D₂-Rezeptor (Selent et al., 2010), der Bradykinin B₂-Rezeptor (Quitterer et al., 1996) und der muskarinische M₃-Rezeptor (Miao et al., 2015).

Eine Permeation von freien Natriumkationen im GPCR kann demnach auch bei einer Membrandepolarisation auftreten, das eine Ladungsverschiebung im GPCR verursacht und dadurch die Rezeptorfunktion beeinflusst (Katritch et al., 2014; Vickery et al., 2016a; Vickery et al., 2016b). Interessanterweise ist die Aminosäureposition D^{2.50} mit nahezu 84,8% hoch konserviert in Klasse A GPCR (Katritch et al., 2014). Bei einer Mehrzahl von Klasse A GPCR wird der Rezeptor bei einer allosterischen Na⁺-Bindung in einen inaktiven Rezeptorzustand versetzt. Eine Rezeptoraktivierung kann erst wieder bei einer Zerstörung der allosterischen Na⁺-Bindetasche mit Aufhebung der Ionenbindung zwischen dem Aspartat D^{2.50} und dem Na⁺ erfolgen (Gurung et al., 2008; Liu et al., 2012c; Katritch et al., 2014; Miao et al., 2015), was darauf hindeutet, dass diese Ionenbindung eine Rezeptoraktivierung erschwert und den GPCR im inaktiven Rezeptorzustand stabilisiert. Diese Ergebnisse deuten daraufhin, dass Natriumionen als ein negativ allosterischer Modulator fungieren können. Durch eine Protonierung der negativ-geladenen Carboxylatgruppe des Aspartats D^{2.50} konnte die allosterische Na⁺-Bindung aufgelöst und ein aktiver Rezeptorzustand stabilisiert werden (Miao et al., 2015; Vickery et al., 2016a). Gustavo Fenalti et al. (2014) konnte mit Hilfe von Aminosäureaustauschen (D95^{2.50}, N131^{3.35}, N310^{7.45} und N314^{7.49}) in der allosterischen Na⁺-Bindetasche des δ-OR eine gesteigerte Aktivierung des β-Arrestin-Effektorsystems

²⁸¹ PDB ID: 4E1Y: 1,8 Å aufgelöste Struktur des A_{2A}R-BRIL-Komplexes mit dem hochaffinen Antagonisten ZM241385 (Liu et al., 2012c). PDB-ID: 5WF5: 2,6 Å aufgelöste Struktur des A_{2A}R-T4L-Komplexes mit dem vollen Agonisten UK432097 (White et al., 2018b)

²⁸² PDB-ID: 4BVN: 2,1 Å aufgelöste Struktur des adrenergen β₁AR mit dem partiellen Agonisten Cyanopindolol (Miller-Gallacher et al., 2014)

²⁸³ PDB-ID: 3VW7: 2,2 Å aufgelöste Struktur des PAR1-T4L-Komplexes mit dem selektiven Antagonisten Vorapaxar (Zhang et al., 2012)

²⁸⁴ PDB-ID: 4N6H: 1,8 Å aufgelöste Struktur des δOR-BRIL-Komplexes mit dem selektivem Antagonisten Naltrindol (Fenalti et al., 2014)

²⁸⁵ PDB-ID: 5WIV: 2,1 Å aufgelöste Struktur des Dopamin D₄-BRIL-Komplexes mit dem atypischem Neuroleptikum Nemonaprid (Wang et al., 2017)

²⁸⁶ Die allosterische Na⁺-Bindetasche der Klasse A GPCR wurde aus Aminosäurevergleichen ermittelt und setzt sich wie folgt aus den konservierten Aminosäuren: N^{1.50} (96,8%), V^{1.53} (27,1%), L^{2.46} (90,8%), A^{2.47} (42,2%), A^{2.49} (26,6%), D^{2.50} (84,8%), S^{3.39} (29,0%), L^{3.43} (83,8%), F^{6.44} (31,5%), W^{6.48} (26,4%), N^{7.45} (28,3%), S^{7.46} (26,0%), N^{7.49} (86,0%), P^{7.50} (94,1%) und Y^{7.53} (91,5%) zusammen (Katritch et al., 2014).

trotz Anwesenheit des selektiven Antagonisten Naltrindol (25 μM) zeigen (Fenalti et al., 2014). Des Weiteren konnten Arnault Massink et al. (2015) ebenso mit Hilfe von Aminosäureaustauschen in der allosterischen Na^+ -Bindetasche des Adenosin $\text{A}_{2\text{A}}$ -Rezeptors (D52^{2.50}A, S91^{3.39}A, W246^{6.48}A, N280^{7.45}A und N284^{7.49}A) die Na^+ -Bindung unterdrücken, wodurch die negativ allosterische Modulation durch das Natriumion aufgehoben und die G_s -Protein-Aktivierung unter dem selektiven Agonisten CGS21680 (0,1 nM-10 μM) verhindert wurde (Massink et al., 2015; White et al., 2018b). Daraus kann man folgern, dass in Gegenwart erhöhter Natriumkonzentration einerseits die Agonistenaffinität abnimmt und andererseits eine G_s -Protein-Kopplung stattfindet. Überraschenderweise gab es beim adrenergen β_1 -Rezeptor keine Änderung der Agonistenaffinität in Gegenwart zunehmender Natriumkonzentrationen (0 mM, 150 mM, 1 M NaCl) (Miller-Gallacher et al., 2014), der laut Jennifer L. Miller-Gallacher et al. (2014) auch eine allosterische Na^+ -Bindetasche besitzen soll. Hier wurde dagegen ein nicht Liganden gebundener Rezeptorzustand des adrenergen β_1 -Rezeptors stabilisiert (Miller-Gallacher et al., 2014). Der EC_{50} -Wert für einen allosterischen Effekt des Natriumions beträgt z. B. für den $\text{A}_{2\text{A}}$ -Rezeptor: 40 - 48 mM (Miller-Gallacher et al., 2014), für den Neurotensin NTS1-Rezeptor: 43 mM (White et al., 2012; Miller-Gallacher et al., 2014) und liegt für viele GPCR im Durchschnitt bei $\text{EC}_{50} < 50$ mM (49 ± 7 mM) (Gutierrez-de-Teran et al., 2013; Katrich et al., 2014) deutlich unter der physiologischen Natriumkonzentration von 140 - 150 mM.

Im Histamin H_1 -Rezeptor befinden sich auch die beiden hochkonservierten Aminosäurepositionen D^{2.50} der TM2 und S^{3.39} der TM3 (siehe Abbildung 4.5), die für die Ausbildung einer allosterischen Na^+ -Bindetasche entscheidend sein können.

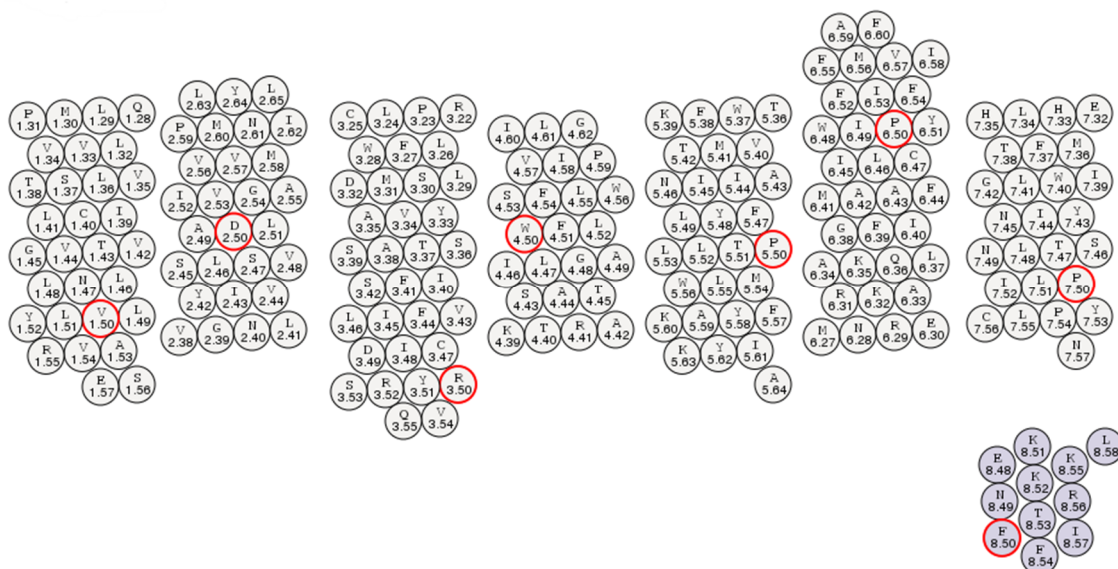


Abbildung 4.6: Snakeplot-Diagramm des humanen Histamin H_1 -Rezeptors mit den TM1-TM7 und der Helix 8 Die Aminosäuren sind im Einbuchstabencode mit der jeweiligen Position in der Ballesteros und Weinstein Nummerierung (TM.XX) angezeigt und als Kreise dargestellt. Die am höchsten konservierten Aminosäuren (TM.50) sind in rot eingekreist. Die Abbildung wurde mit Hilfe der Datenbank GPCR-GPCR-SSFE 2.0 (Worth et al., 2017) mit der URL-Adresse: http://www.ssfa-7tmr.de/ssfe2/snakes/temp/Snake-Plot_hrh1_human_5d8b844eefe8d. Letzter Aufruf erfolgt am 10.12.2017

Im Rahmen dieser vorliegenden Arbeit wurden hypoosmolare und isotonische Lösungen mit 55 mM Na⁺ verwendet. Der geringe Natriumgehalt, der deutlich unter der physiologischen Natriumkonzentration von 140 mM Na⁺ liegt, könnte somit einen direkten Einfluss auf die basale Rezeptoraktivität, die Agonistenaffinität und die Aktivierungskinetik des Histamin H₁-Rezeptors haben.

Die Aktivierungskinetik unter Histamin war in FRET-basierten Untersuchungen mit dem il3-e1 gpH₁R-Konstrukt in Gegenwart von 55 mM Na⁺ („His in Iso 150“) signifikant langsamer als in HBS-balancierter Lösung („His in HBS“) mit physiologischer 140 mM Na⁺ (siehe Abschnitt 3.17 mit Abbildung 3.26). Diese Ergebnisse weisen daraufhin, dass eine allosterische Na⁺-Bindung wahrscheinlich im Gegensatz zu den Opiodrezeptoren (Shang et al., 2014), dem muskarinischen M₃-Rezeptor (Miao et al., 2015) und dem Adenosin A_{2A}-Rezeptor (Massink et al., 2015; White et al., 2018b) einen positiv allosterischen Effekt mit einer erhöhten Agonistenaffinität am H₁-Rezeptor bewirkt. Interessanterweise war die Agonisten-unabhängige mechanisch-induzierte Aktivierungskinetik (150 mOsm kg⁻¹) des Histamin H₁-Rezeptors sogar signifikant langsamer als die Agonisten-induzierte Aktivierungskinetik mit 55 mM Na⁺ (siehe Abschnitt 3.17 mit Abbildung 3.26), daraus ergibt sich, dass eine nicht vollständig besetzte Na⁺-Bindetasche keinen positiv allosterischen Effekt mehr ausüben kann und der Liganden-freie Rezeptor in einer inaktiven Rezeptorkonformation gehalten wird.

Der wiederholbare Wechsel zwischen der isotonischen Badlösung mit niedriger 55 mM Na⁺ und der isotonischen HBS-balancierten Lösung („Iso → HBS“) führte zu eindeutigen FRET-Signalabnahmen, entgegen dem Wechsel zwischen der isotonischen HBS-balancierten Lösung und der isotonischen Badlösung („HBS → Iso“), das zu FRET-Signalzunahmen in Abwesenheit des Agonisten führte (siehe Abschnitt 3.18 mit Abbildung 3.27). Diese FRET-Ergebnisse bestärken einen positiv-allosterischen Effekt des allosterisch gebundenen Na⁺ im Liganden-freien Histamin H₁-Rezeptor. Für die FRET-Untersuchungen wurden die il3-e1 und ct-b gpH₁R-Konstrukte verwendet, die stets sowohl bei einer Agonistenstimulation, ausgenommen beim ct-b gpH₁R-Konstrukt, als auch bei einer hypoosmotischen Membrandehnung immer FRET-Signalabnahmen zeigten (siehe Abschnitt 3.2 mit Abbildung 3.4 und 3.5). Erstaunlicherweise weist der nicht mechanosensitive humane GnRH-Rezeptor (siehe Abbildung 4.6) im Gegensatz zu den bisher genannten GPCR ein neutrales Asparagin N^{2.50} in der TM2 und ein Prolin P^{3.39} in der allosterischen Na⁺-Bindetasche auf (Katritch et al., 2014). Jedoch befinden sich im GnRH-Rezeptor auch polare Aminosäurepositionen: T^{2.47} in der TM2, D^{7.49} und Y^{7.50} in der TM7, die wahrscheinlich auch als eine alternative allosterische Na⁺-Bindetasche fungieren können. Dadurch wäre der GnRH-Rezeptor immer noch in der Lage ein allosterisches Natriumion zu binden (Katritch et al., 2014) und den Rezeptorzustand zu modulieren.

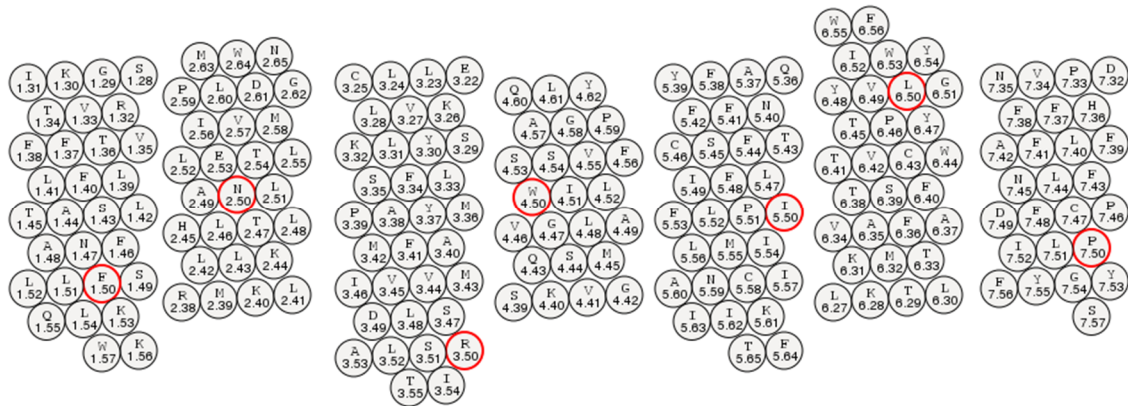


Abbildung 4.7: Snakeplot-Diagramm des humanen GnRH-Rezeptors mit den TM1-TM7 Die Aminosäuren sind im Einbuchstabencode mit der jeweiligen Position in der Ballesteros und Weinstein Nummerierung (TM.XX) angezeigt und als Kreise dargestellt. Die am höchsten konservierten Aminosäuren (TM.50) sind in rot eingekreist. Die Abbildung wurde mit Hilfe der Datenbank GPCR-GPCR-SSFE 2.0 (Worth et al., 2017) mit der URL-Adresse: http://www.ssfa-7tmr.de/ssfe2/snakes/temp/Snake-Plot_gnrhr_human_5d8d2386179dc. Letzter Aufruf erfolgte am 25.09.2019

Um die Aktivierungskinetik Fluss-induzierter FRET-Signale bei einer allosterischen Modulation mit Na^+ genauer zu untersuchen, stehen weitere FRET-Messungen mit Applikation schrittweiser Erhöhung der Scherkräfte von 10, 20, 40 und 60 dyn cm^{-2} in physiologischer Natriumkonzentration mit 140 mM Na^+ aus.

Zusammenfassend lässt sich schlussfolgern, dass GPCR nicht nur durch chemische Signale, durch Aminosäureaustausche, die eine konstitutive Rezeptoraktivität stabilisieren, sondern interessanterweise auch Liganden-unabhängig durch mechanische Reize oder durch Transmembranpotentiale aktiviert werden können, wobei Natriumionen im Falle des H_1 -Rezeptors auch als positiv-allosterische Modulatoren die Rezeptoraffinität zum Agonisten erhöhen und insgesamt die Aktivierungsgeschwindigkeit erhöhen können.

4.9 Physiologische Relevanz von Histamin H_1 -Rezeptoren

Mechanosensitive Histamin H_1 -Rezeptoren werden im arteriellen Gefäßsystem, sowohl in Endothelzellen (Noso et al., 1990; Hao et al., 2008) als auch in glatten Muskelzellen exprimiert (Takagishi et al., 1995). Die Expression von humanen H_1 -Rezeptoren in glatten Muskelzellen kann aufgrund von atherosklerotischen Plaques in der Aorta Intima erhöht sein (Takagishi et al., 1995). In der Literatur wurde beschrieben, dass die Dichte an Histamin H_1 -Rezeptoren in Endothelzellen höher als in glatten Muskelzellen der Meerschweinchen Aorta ist (Hide et al., 1988). Die endothelialen H_1 -Rezeptoren könnten somit eine Rolle bei der Fluss-induzierten Vasodilatation von arteriellen Gefäßen spielen (Dux et al., 2002). Um eine mögliche physiologische Rolle von mechanosensitiven H_1 -Rezeptoren bei der Fluss-induzierten Vasodilatation zu untersuchen, wurde das mRNA Expressionsprofil in primären Endothelzellen, die aus der menschlichen Nabelschnurvene (HUVEC) stammen und als ein in-vitro-Modell für die Analyse der Mechanosensitivität endogen exprimierter H_1 -Rezeptoren dienen (siehe Abschnitt 3.11 mit Abbildung 3.17A und B), bestimmt. Interessanterweise ist der H_1 -Rezeptor, der am

stärksten exprimierte GPCR als jeder andere von uns untersuchte GPCR in Endothelzellen (siehe Abbildung 4.8).

Der Vergleich des H₁-Rezeptor messenger RNA Expressionsprofils mit anderen GPCR zeigte eine mindestens 5-fach höhere Genexpression des H₁-Rezeptors (H1R) als andere von uns getestete GPCR, die auf ihre Expressionsrate in HUVEC getestet wurden, indem quantitative Echtzeit-PCR (qRT-PCR = *quantitative real time PCR*) Experimente von Frau Laura Danner am Walther-Straub-Institut in München durchgeführt wurden. Der Histamin H₁-Rezeptor zeigte eine mehr als 15-fach höhere mRNA-Expression als andere G_{q/11}-Protein gekoppelte Rezeptoren und eine mehr als 6-fach höhere mRNA-Expression als der G_s-Protein-gekoppelte β₂AR. Die mRNA-Expressionsniveaus anderer mechanosensitiver GPCR wie V_{1A}R, CysLT₁R, GPR68-Rezeptor, D₅R und PTH₁R lagen unter der Nachweisgrenze. Die mRNA-Expression des mechanosensitiven Angiotensin II AT₁R war mehr als 400-fach niedriger als die mRNA-Expression des mechanosensitiven H₁-Rezeptors, was auf eine vernachlässigbare Rolle von Angiotensin II AT₁R für die Mechanosensorik in Endothelzellen (HUVEC) hinweist. Die H₁-Rezeptor mRNA Expression beträgt zum nächsten G_{q/11}-Protein gekoppelten muskarinergen M₁-Rezeptor 15-fach, zum purinergen P₂Y₁-Rezeptor 11-fach, zum muskarinischen M₅-Rezeptor 10-fach, zum Histamin H₃-Rezeptor 9-fach und zu den adrenergen β₂- und β₃-Rezeptoren jeweils 6- und 5-fach (siehe Abbildung 4.7). Die relative mRNA Expression vom Histamin H₁-Rezeptor und von Endothelzellmarkern²⁸⁷ wie z. B. CD31 (*cluster of differentiation 31*), vWF (*von Willenbrandt Faktor*) und Cadherin in HUVEC zeigte darüber hinaus, dass die relative mRNA-Expression vom H₁-Rezeptor in HUVEC mindestens 6-fach höher als im Vergleich zu dem Endothelzellmarker Cadherin 5 ist (siehe Abbildung 4.8).

²⁸⁷ Endothelzellmarker: das Thrombozyten-Endothelzellen-Zelladhäsionsmolekül CD31 (**cluster of differentiation 31**), ein 130 kDa schweres transmembranäres Glykoprotein, ist ein Mitglied der Immunglobulin-Superfamilie, das auch unter der Bezeichnung PECAM-1 (**platelet endothelial cell adhesion molecule 1**) bekannt ist. Es wird auf der Zelloberfläche von adulten und embryonalen Endothelzellen, Thrombozyten, Monozyten, Makrophagen, Granulozyten (Pusztaszeri et al., 2006), dendritischen Zellen, T- und B-Zellen sowie natürlichen Killerzellen (Marelli-Berg et al., 2013), pluripotenten Knochenmarkstammzellen und braunem Fettgewebe exprimiert (Ordonez, 2012). Bei einer Entzündung vermittelt es die Adhäsion von Leukozyten an das Endothel und die transendotheliale Migration von Leukozyten in den Entzündungsort (Pusztaszeri et al., 2006; Ordonez, 2012). Außerdem spielt es eine wichtige Rolle bei der Angiogenese (Pusztaszeri et al., 2006) und wurde auch als ein Mechanosensor für Blutfluss vermittelte Scherkräfte beschrieben (Tzima et al., 2005; Conway et al., 2013; Chistiakov et al., 2016; Meza et al., 2017). Cadherin 5, das auch als VE-Cadherin (**Vascular Endothelial Cadherin**) bekannt, ist ein Kalzium-abhängiges transmembranes Glykoprotein, das in fokalen Adhäsionsverbindungen zwischen benachbarten Endothelzellen vorkommt und Zell-Zell-Kontakte vermittelt. Das CD31 bindet zusammen mit Cadherin 5 an β-Catenin, das über das α-Catenin an das filamentöse F-Aktin anbindet (Matsumura et al., 1997). Der von Willebrand Faktor (vWF = **von Willebrand Faktor**) ist ein Glykoprotein, das von Endothelzellen, Megakaryozyten und Thrombozyten exprimiert wird und den Blutgerinnungsfaktor VIII aus der Blutzirkulation bindet. Bei einer Verletzung des Endothels vermittelt es die Adhäsion von Thrombozyten aus der Blutbahn an das Endothel, das die Blutung stillt (Horvath et al., 2004; Pusztaszeri et al., 2006; Ordonez, 2012).

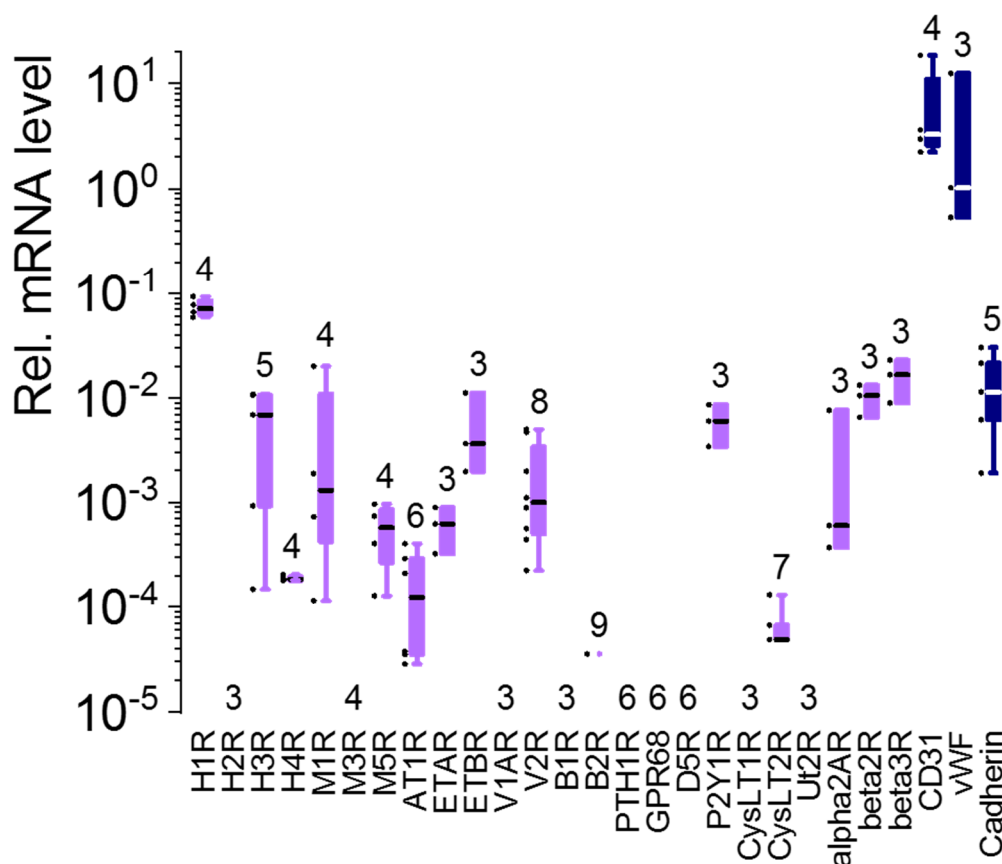


Abbildung 4.8: Das relative mRNA Expressionsprofil von GPCR und Endothelzellmarkern in HUVEC

Die Histamin $H_1/H_2/H_3/H_4$ -Rezeptoren: H_1R ($G_{q/11}$), H_2R (G_s), H_3R und H_4R ($G_{i/o}$), muskarinische $M_1/M_3/M_5$ -Rezeptoren: M_1R ($G_{q/11}$), M_3R ($G_{q/11}$) und M_5R ($G_{q/11}$), Endothelin ET_A/ET_B -Rezeptoren: $ETAR$ ($G_{q/11}$, G_s) und $ETBR$ ($G_{q/11}$, $G_{i/o}$), Vasopressin V_{1A}/V_{1B} - und V_2 -Rezeptoren: V_1AR ($G_{q/11}$), V_1BR ($G_{q/11}$), V_2R (G_s), Bradykinin B_1/B_2 -Rezeptoren: B_1R ($G_{q/11}$) und B_2R ($G_{q/11}$), Cysteinyl-Leukotrien CysLT1/CysLT2-Rezeptoren: CysLT1R ($G_{q/11}$) und CysLT2R ($G_{q/11}$), Urotensin II Ut2-Rezeptor ($G_{q/11}$), adrenerge α_2 -, β_2/β_3 -Rezeptoren: α_2AR ($G_{i/o}$), β_2AR (G_s), β_3AR ($G_{i/o}$), purinerge $P2Y_{1/2/4/6}$ -Rezeptoren: $P2Y_1R$ ($G_{q/11}$), $P2Y_2R$ ($G_{q/11}$), $P2Y_4R$ ($G_{q/11}$) und $P2Y_6R$ ($G_{q/11}$ und $G_{12/13}$) und der GPR68-Rezeptor ($G_{q/11}$): GPR68 sind als Boxplots (lila) mit Median (schwarz) und Interquartilbereichen angezeigt. Die Endothelzellmarker: CD31 (cluster of differentiation 31), vWF (von Willebrand Faktor), Cadherin 5: Endothelzellmarker sind als Boxplots (dunkelblau) mit Median (weiß) und Interquartilbereichen dargestellt. Die Zahlen geben die Anzahl der unabhängigen Experimente an. Mit Hilfe der Webseite: IUPHAR/PBS Guide to Pharmacology mit der URL-Adresse: <http://www.guidetopharmacology.org> konnte die Art der G-Protein-Kopplung bestimmt werden.

Zur Klärung der Fragestellung, ob der Histamin H_1 -Rezeptor bei der Fluss-induzierten Vasodilatation eine Rolle spielt, wurde die flussvermittelte Vasodilatation an isolierten Abschnitten von murinen Mesenterialarterien erster und zweiter Ordnung von Frau Laura Danner am Walther-Straub-Institut in München gemessen²⁸⁸. Hierfür wurden murine

²⁸⁸ Es wurden isolierte Abschnitte der Mesenterialarterien der Verzweigungen erster und zweiter Ordnung auf zwei Glaskapillaren aufgezogen, mit Hilfe eines chirurgischen Fadens an beiden Enden des Gefäßabschnittes festgebunden und ein intraluminaler Druckgradient angelegt. Der Fluss wurde durch Anlegen eines intraluminalen Druckgradienten von 5 und 15 mmHg erzeugt, was zu Scherkräfteträgen von jeweils 4,8 dyn cm^{-2} und 8,8 dyn cm^{-2} führte (siehe Abbildung 4.8 A).

Mesenterialarteriensegmente entweder mit dem Thromboxan A₂-Rezeptor Agonisten (20 nM) U46619 (Coleman et al., 1981; Tanaka et al., 2004) oder mit 35 mM KCl haltiger Lösung bis zu 20% vorverengt (siehe Abbildung 4.9 A). In Wildtyp-Arterien (C57BL/6J) führte die Applikation einer intravaskulären Scherkraft von $+4,8 \pm 0,5 \text{ cm}^{-2}$ und $+8,8 \pm 1,1 \text{ dyn cm}^{-2}$ zu einer zunehmenden Vasodilatation, die durch die beiden inversen H₁-Rezeptoragonisten Mepyramin (100 μM) bzw. Desloratadin (30 μM) signifikant unterdrückt wurde, was darauf hinweist, dass arterielle H₁-Rezeptoren an der Fluss-induzierten Vasodilatation beteiligt sind. Um unspezifische Effekte von inversen Agonisten auszuschließen, wurden zusätzlich Mesenterialarterien von Histamin H₁-Rezeptor gendefizienten (H₁R^{-/-}) und von Quadrupel H₁-, H₂-, H₃- und H₄-Rezeptoren gendefizienten Mäusen (H_{1,2,3,4}R^{-/-}) untersucht, um die mit den inversen Agonisten erzielten Ergebnisse zu bestätigen. Die Fluss-induzierte Vasodilatation der H₁R^{-/-} oder der (H_{1,2,3,4}R^{-/-}) gendefizienten Arterien waren signifikant vermindert (siehe Abbildung 4.9 B). Außerdem gab es keine signifikanten Unterschiede zwischen H₁R^{-/-}, H_{1,2,3,4}R^{-/-} oder zwischen den mit den selektiven Agonisten Mepyramin (C57BL/6J+Mepy) bzw. Desloratadin (C57BL/6J+Deslor) inkubierten Mesenterialarterien von Wildtyp-Mäusen (siehe Abbildung 4.9 C). Diese Ergebnisse bekräftigen die Ergebnisse mit den inversen Agonisten. Außerdem war die Nitratkonzentrationen in Gefäßperfusaten von H₁-Rezeptor gendefizienten (H₁R^{-/-}) Mesenterialarterien bzw. von Wildtyp-Mesenterialarterien (C57BL/6J), die mit Mepyramin (C57BL/6J+Mepy) bzw. mit Desloratadin (C57BL/6J+Deslor) behandelt wurden, stark verringert (siehe Abbildung 4.9 G).

Diese Ergebnisse folgern, dass durch Scherkräfte arterielle H₁-Rezeptoren aktiviert werden, die mit einer großen Wahrscheinlichkeit zu einer endothel-abhängigen, NO-vermittelten, Fluss-induzierten Vasodilatation führen.

Aus der Literatur ist bekannt, dass Histamin die Endothelzellpermeabilität erhöht und die Kontraktion von arteriellen glatten Muskelzellen induziert (Takagishi et al., 1995). Um eine Beteiligung von in glatten Gefäßmuskelzellen exprimierten H₁-Rezeptoren an der Fluss-induzierten Vasodilatation auszuschließen, wurden Mesenterialarterien von Tamoxifen induzierbaren, glattmuskelspezifischen G_{q11}-Protein knockdown Mäusen (SmG_{q11}^{-/-}Tam⁺)²⁸⁹ näher untersucht (siehe Abbildung 4.9 B). Es gab keine signifikanten Unterschiede zwischen Mesenterialarterien von Wildtyp-Mäusen (C57BL/6J) und von glattmuskulären G_{q11}-Protein knockdown (SmG_{q11}^{-/-}Tam⁺) Mäusen oder von Wurfgeschwistern (SmG_{q11}^{+/+}Tam⁺), die als Kontrolle dienten (siehe Abbildung 4.9 B). Unter dem selektiven G_{q11}-Protein-Inhibitor YM-254890 (Nishimura et al., 2010; Kamato

²⁸⁹ Die glattmuskelspezifische Cre-transgene Mauslinie (SMMHC-CreER^{T2}; Gnaq^{fllox/fllox}; Gna11^{-/-}) wurde freundlicherweise von Herrn Prof. Dr. Stefan Offermanns vom Max-Planck-Institut für Herz- und Lungenforschung in Bad Neuheim zur Verfügung gestellt, in der die Cre-Rekombinase mit der modifizierten Östrogenrezeptorbindungsdomäne (CreER^{T2}) fusioniert ist, das unter der Kontrolle des Promoters für die glattmuskulären schweren Myosinketten (SMMHC = smooth muscle myosin heavy chain) steht (Wirth et al., 2008). Die induzierbare SMMHC-Cre-Expression wurde durch peritoneale 1 mg Tamoxifeninjektionen an fünf aufeinanderfolgenden Tagen erreicht. Hier mussten die Gefäßabschnitte allerdings zuerst mit 35 mM Kaliumchlorid anstelle des Thromboxan A₂ Rezeptor Agonisten U46619 vorverengt werden, da das G_{q11}-Effektorsystem in den glattmuskelspezifischen G_{q11}-Protein knockdown Mäusen (SmG_{q11}^{-/-}Tam⁺) beeinträchtigt war.

et al., 2016) (siehe Abschnitt 3.4 mit Abbildung 3.7) konnte die Fluss-induzierte Vasodilatation in Wild-Typ-Mesenterialarterien (C57BL/6J+YM) signifikant unterdrückt werden (siehe Abbildung 4.9 B). Die Tamoxifen induzierten $G_{q/11}$ -Protein knockdown Arterien (Sm $G_{q/11}^{-/-}$ Tam⁺) zeigten eine ähnliche Fluss-induzierte Vasodilatation wie die Arterien von Wildtypmäusen (C57BL/6J), was darauf hindeutet, dass $G_{q/11}$ -Protein gekoppelte Rezeptoren, die von vaskulären glatten Muskelzellen exprimiert werden, nicht an der Fluss-induzierten Vasodilatation beteiligt sind. Darüber hinaus konnte die intraluminale Applikation des inversen Agonisten Desloratadin (Sm $G_{q/11}^{-/-}$ Tam⁺⁺Deslor) die Fluss-induzierte Vasodilatation ähnlich stark wie der selektive und potente $G_{q/11}$ -Protein Inhibitor YM-254890 (C57BL/6J+YM) unterdrücken. Die Bestimmung der Gefäßaußendurchmesser bei intraluminalen Drücken von 50 mmHg und 120 mmHg waren bei verschiedenen experimentellen Bedingungen (0 dyn cm⁻², 60 mM K⁺, 300 μM Acetylcholin, 0 mM Ca²⁺) nicht signifikant unterschiedlich zwischen den verschiedenen Mausgenotypen (siehe Abbildung 4.9 C-F), was darauf hindeutet, dass die unterschiedlichen Mausgenotypen vergleichbar sind. Insgesamt legen diese Ergebnisse nahe, dass endotheliale H₁-Rezeptoren und nicht vaskuläre glattmuskelspezifische H₁-Rezeptoren zur Fluss-induzierten Vasodilatation beitragen. Diese Befunde sprechen stark dafür, dass endotheliale H₁-Rezeptoren eine Schlüsselrolle bei der Fluss-induzierten Vasodilatation spielen.

Im Gegensatz dazu konnte die Arbeitsgruppe um Stefan Offermanns vor kurzem den mechanosensitiven nicht-selektiven Kationenkanal Piezo1 als einen primären Mechanosensor sowie den $G_{q/11}$ -Protein gekoppelten purinergen P2Y₂-Rezeptor als einen Mechanotransduktor für Fluss-induzierte Scherkräfte (5 dyn cm⁻², 15 dyn cm⁻² und 25 dyn cm⁻²) in Endothelzellen vorschlagen. ShengPeng Wang et al. (2016) konnten beobachten, dass Endothelzellen bei einer mechanischen Aktivierung von Piezo1 ATP freisetzen, das autokrin an purinergen P2Y₂-Rezeptor wirkt und zur endothelabhängigen NO-vermittelten Vasodilatation führt (Wang et al., 2015; Wang et al., 2016). Die Fluss-induzierte Vasodilatation war in endothelspezifischen Piezo1- und in P2Y₂-Rezeptor gendefizienten Mäusen signifikant reduziert, das daraufhin weist, dass das $G_{q/11}$ -Protein Effektorsystem durch Fluss-induzierte Scherkräfte aktiviert wird (Wang et al., 2015; Wang et al., 2016). Tamoxifen induzierbare, endothelspezifische $G_{q/11}$ -Protein gendefiziente Mäuse waren jedoch signifikant stärker an der Fluss-induzierten Vasodilatation beteiligt als Tamoxifen induzierbare, endotheliale Piezo1- und P2Y₂-Rezeptor gendefiziente Mäuse (Wang et al., 2016), was unsere Befunde mit der Beteiligung des $G_{q/11}$ -Protein Effektorsystems durch die mechanische Stimulation von H₁-Rezeptoren (siehe Abbildung 4.9) an der Fluss-induzierten Vasodilatation eindeutig bestärkt. Nathaniel G. dela Paz and John A. Frangos (2019) vermuten dagegen, dass Fluss-induzierte Scherkräfte (14 dyn cm⁻²) eine direkte Interaktion der G_{βγ}-Untereinheiten mit Piezo1 hervorruft (Dela Paz und Frangos, 2019), was daraufhin deutet, dass Piezo1 erst durch eine vorangeschaltene $G_{q/11}$ -Protein-Aktivierung aktiviert wird. Das bedeutet, dass Piezo1 somit nicht der eigentliche primäre Mechanosensor für Fluss-induzierte Scherkräfte im Endothel ist, sondern stromabwärts des

$G_{q/11}$ -Protein-Effektorsystems liegt Interessanterweise soll der purinerge $P2Y_2$ -Rezeptor laut einer veröffentlichten Modellstruktur eine C-Terminale Helix 8 besitzen (Ivanov et al., 2007).

Somit stellt sich folgende interessante Fragestellung: Ist der $G_{q/11}$ -Protein gekoppelte purinerge $P2Y_2$ -Rezeptor intrinsisch mechanosensitiv, weil er eine amphiphile Helix 8 besitzt?

Die Arbeitsgruppe um Ardem Patapoutian konnte mittels eines Hochdurchsatzverfahrens (*high-throughput screening*) den $G_{q/11}$ -Protein gekoppelten GPR68-Rezeptor als einen neuen im Endothel exprimierten mechanosensitiven Rezeptor aufdecken, der wie der Histamin H_1 -Rezeptor an der Fluss-induzierten Vasodilatation beteiligt sein soll (Iliff und Xu, 2018; Xu et al., 2018). Allerdings wurden alle Versuche, die zur Entdeckung des neuen mechanosensitiven GPCR dienen, mit Hilfe einer MDA-MB-231-Brustkrebszelllinie und nicht mit nativen Endothelzellen durchgeführt, wo das messenger RNA Expressionsprofil zur nativen Endothelzelllinie stark verändert sein kann. Überraschenderweise konnte eine Herunterregulation des mechanosensitiven Kationenkanals Piezo1 nicht den intrazellulären Kalziumanstieg auf Scherkräfte unterbinden. Zudem ist ein saurer pH-Wert zwischen 6,9 bis 7,4 für eine maximale mechanische Stimulation des GPR68-Rezeptors notwendig (Xu et al., 2018). Entgegen den Befunden von Mederos et al. (2008) konnten Jie Xu et al. (2018) keine intrazelluläre Kalziumzunahmen bei einer mechanischen Stimulation der in der Literatur als mechanosensitiv beschriebenen $G_{q/11}$ -Protein gekoppelten H_1 -, AT_1 , M_5 -, ET_A - und V_{1A} -Rezeptoren feststellen (Mederos y Schnitzler et al., 2008). Somit besteht eine Diskrepanz, womit kein weiterer mechanosensitiver GPCR außer dem GPR68-Rezeptor mechanisch induzierte Kalziumzunahmen zeigte. Somit kann behauptet werden, dass das verwendete Hochdurchsatzverfahren keine laminaren Scherkräfte erzeugen konnte, um den in der Literatur schon mehrmals als mechanosensitiv beschriebenen Angiotensin AT_1 -Rezeptor (Zou et al., 2004; Mederos y Schnitzler et al., 2008; Yasuda et al., 2008a; Yasuda et al., 2008b; Jiang et al., 2015; Forst et al., 2016) zu aktivieren. Demgegenüber können wir in dieser vorliegenden Arbeit erneut bestätigen, dass der Histamin H_1 -Rezeptor eindeutige Kalziumzunahmen bei mechanischer Stimulation erzeugte (siehe Abschnitt 3.11 mit Abbildung 3.17). Außerdem konnten durch Scherkräfte (4 dyn cm^{-2} und 20 dyn cm^{-2}) induzierte Kalziumzunahmen in HUVEC signifikant mit dem selektiven H_1 -Rezeptoragonisten Mepyramin gehemmt werden (siehe Abschnitt 3.11 mit Abbildung 3.17 C), was darauf hinweist, dass sogar endogen exprimierte H_1 -Rezeptoren Mechanosensoren für Fluss-induzierte Scherkräfte in Endothelzellen sind.

Interessanterweise geht aus dem phylogenetischen GPCR-Stammbaum hervor, dass der von Storch et al. (2015) als ein neuer Mechanosensor beschriebene Cysteinyl-Leukotrienrezeptor Typ1 $CysLT_1R$ (Storch et al., 2015) aus dem Ast des GPR68 hervorspringt (siehe Abbildung 4.1). Dadurch kann man vermuten, dass sich der mechanosensitive $CysLT_1R$ vom mechanosensitivem GPR68 ableitet und wie von Storch et al. (2015) belegt, wichtig für die Blutdruckregulation ist (Storch et al., 2015). Zudem zeigten Untersuchungen mit Mesenterialarterien dritter Ordnung von

GPR68-Rezeptor gendefizienten Mäusen (GPR68^{-/-}) eine Unterdrückung der Fluss-induzierten Vasodilatation durch Scherkräfte. Interessanterweise zeigten Mesenterialarterien erster und zweiter Ordnung keinen Unterschied zwischen Wildtyp- und GPR68-Rezeptor gendefizienten Mäusen, was darauf hinweist, dass der GPR68-Rezeptor kaum in Leitungsgefäßen exprimiert wird (Iliff und Xu, 2018; Xu et al., 2018). Im Gegensatz dazu, konnte die Fluss-induzierte Vasodilatation von Mesenterialarterien erster und zweiter Ordnung von Wildtyp-Mäusen durch die beiden selektiven inversen H₁-Rezeptoragonisten Mepyramin und Desloratadin signifikant unterdrückt werden (siehe Abbildung 4.9 B), dass somit eine Beteiligung von H₁-Rezeptoren an der Fluss-induzierten Vasodilatation in Leitungsgefäßen belegt.

Insgesamt deuten diese Daten daraufhin, dass auch der Ort der Expression von mechanosensitiven GPCR im Gefäßbett entscheidend ist: Der Histamin H₁-Rezeptor ist vorwiegend in Leitungsgefäßen (erste und zweite Ordnung), wohingegen der GPR68-Rezeptor hauptsächlich in Widerstandsgefäßen (ab dritte Ordnung) vorzufinden ist und folglich beide Rezeptoren zusammen eine Rolle bei der Regulation des Blutflusses spielen. Somit können unterschiedliche Mechanosensoren in verschiedenen Abschnitten des arteriellen Gefäßbetts unterschiedliche Effektorsysteme aktivieren und die Blutdruckregulation modulieren. Folglich sind nicht nur transmembranäre mechanosensitive Proteine wie z. B. GPCR an der endothelabhängigen, Fluss-induzierten Vasodilatation für die Regulation des Blutflusses beteiligt, sondern viele weitere intrazelluläre Proteine wie Ionenkanäle wie z. B. Piezo1 (Wang et al., 2016), die alle zusammen mehrere Effektorsysteme aktivieren und den Blutfluss regulieren können.

Desweiteren konnten in früheren Untersuchungen Prof. Dr. rer. nat. Michael Mederos und PD Dr. rer. nat. Ursula Storch zeigen, dass mechanosensitive AT₁-Rezeptoren an der myogenen Vasokonstriktion in kleinen Arterien und Arteriolen beteiligt sind. Die Messung eines isolierten Hirnarteriensegments der Ratte zeigte eine myogene Vasokonstriktion bei einem konstanten intraluminalen Druck von 60 mmHg (Mederos y Schnitzler et al., 2008). Die Verwendung des inversen AT₁-Rezeptor Agonisten Losartan (1 µM) verursachte eine reversible Vasodilatation des Gefäßes, was darauf hinweist, dass mechanosensitive AT₁-Rezeptoren tatsächlich am myogenen Tonus beteiligt sind. Die Viabilität der Zelle wurde durch die Applikation von 60 mM KCl bestätigt, das zu einer maximalen myogenen Reaktion führte. Im Gegensatz verursachte eine kalziumfreie Lösung eine maximale Vasodilatation (Mederos y Schnitzler et al., 2008). Folglich spielt die mechanische Aktivierung des Angiotensin II AT₁-Rezeptors, insbesondere des murinen AT_{1B}-Subtyps (Blodow et al., 2014) und des Cysteinyl-Leukotrienrezeptors Typ1 CysLT₁R eine entscheidende Rolle für den myogenen Tonus (Storch et al., 2015). Der myogene Tonus in Widerstandsgefäßen konnte durch die gleichzeitige Verabreichung des inversen Agonisten Candesartan für den AT₁-Rezeptor und des selektiven CysLT₁-Rezeptorantagonist Pranlukast um 64% reduziert werden, das der 63%igen Reduktion des myogenen Tonus mit dem selektiven G_{q/11}-Protein Inhibitor YM-254890 vergleichbar war (Storch et al., 2015; Mederos et al., 2016b).

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass mechanosensitive GPCR im arteriellen Gefäßsystem zu zwei mechanisch-induzierbaren physiologischen Prozessen beitragen: Erstens zur myogenen Vasokonstriktion glatter Muskelzellen durch Angiotensin II AT₁-Rezeptoren und Cysteinyl-Leukotrien CysLT₁R-Rezeptoren und zweitens zur Fluss-induzierten Vasodilatation über endotheliale Histamin H₁-Rezeptoren und GPR68-Rezeptoren.

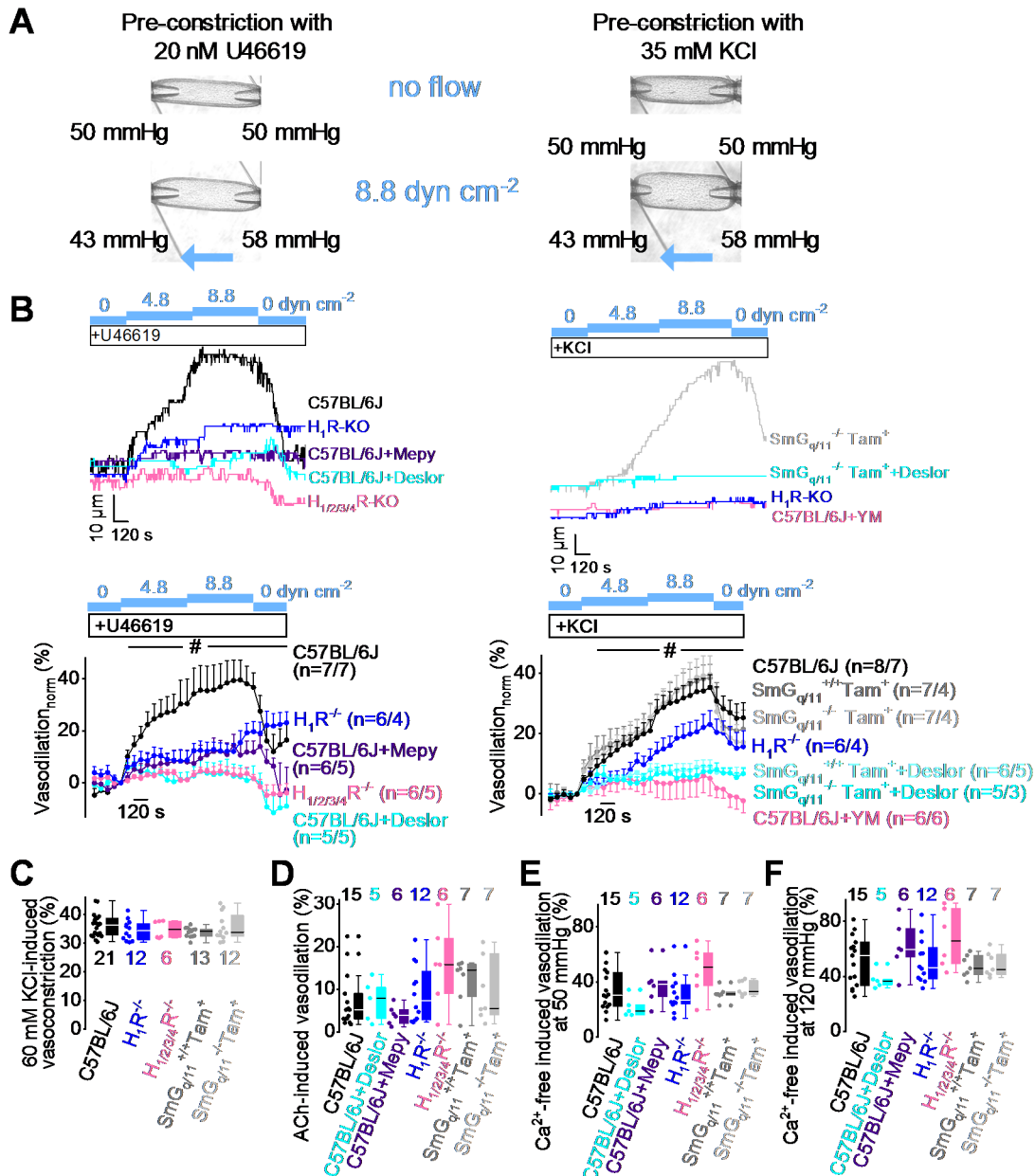


Abbildung 4.9: Histamin H₁-Rezeptoren vermitteln die endotheliale Fluss-induzierte Vasodilatation
 Repräsentative Bilder eines mesenterialen Arteriensegments, das entweder mit 20 nM U46619 (links, „+U46619“) oder mit 35 mM KCl (rechts, „+KCl“) vorverengt wurde und entweder bei keiner Strömung (no flow: Zufluss- und Abflussdruck betrug jeweils 50 mmHg) oder bei einer intravaskulären Strömung von Δ15 mmHg aufgenommen wurde (8.8 dyn cm⁻²: Zuflussdruck betrug 58 mmHg und der Ausflußdruck betrug 43 mmHg), das eine Scherkraft von +8,8 dyn cm⁻² induzierte. Blaue Pfeile zeigen die Flussrichtung an (A). Repräsentative Zeitverläufe von Messungen des Gefäßaußendurchmessers (Durchschnittlicher Gefäßaußendurchmesser betrug 215 μm ± 8 μm bei n = 57) von Mesenterialarteriensegmenten erster und zweiter Ordnung. Gefäße von Wildtyp-Mäusen (C57BL/6J), von Tamoxifen induzierten,

glattemuskelspezifischen $G_{q/11}$ -Protein knockdown in Mäusen ($SmG_{q/11}^{-/-}Tam^{+}$) oder von ihren entsprechenden Wildtyp-Wurfgeschwistern ($SmG_{q/11}^{+/+}Tam^{+}$), von Histamin H_1 -Rezeptor gendefizienten ($H_1R^{-/-}$) und von Quadrupel H_1 -, H_2 -, H_3 - und H_4 -Rezeptoren gendefizienten Mäusen ($H_{1,2,3,4}R^{-/-}$) verwendet. Der intravasale Fluss wurde von keiner Strömung (Zufluss- und Abflussdruck betrug jeweils 50 mmHg) zuerst auf $\Delta 5$ mmHg (Zuflussdruck betrug 53 mmHg und der Abflussdruck betrug 48 mmHg) und anschließend auf $\Delta 15$ mmHg (Zuflussdruck betrug 58 mmHg und der Abflussdruck betrug 43 mmHg) erhöht. Die Flussraten bei $\Delta 5$ mmHg und $\Delta 15$ mmHg entsprachen $27,1 \pm 3,9$ oder $32,4 \pm 5,9$ $\mu\text{l min}^{-1}$, wodurch eine Fluss-induzierten Scherkraft von $4,8 \pm 0,5$ dyn cm^{-2} bei $\Delta 5$ mmHg bzw. $8,8 \pm 1,1$ dyn cm^{-2} bei $\Delta 15$ mmHg induziert wurde. Mesenterialarterien wurden entweder mit den inversen selektiven H_1 -Rezeptoragonisten Mepyramin ($100 \mu\text{M}$, „Mepy“) und Desloratadin ($30 \mu\text{M}$, „Deslor“) oder mit dem selektiven $G_{q/11}$ -Protein Inhibitor YM-254890 (100nM , „YM“) für 30 Minuten intravaskulär inkubiert, wobei n die Anzahl der Arterien und die Anzahl der Mäuse angibt. Eine Vorkonstriktion der Mesenterialarterien wurde entweder mit 20nM U46619 (links, „+U46619“) oder mit 35mM KCl (rechts, „+KCl“). # $P < 0,05$ ab 8. Minute; Kruskal-Wallis-Test. Die Daten werden als Mittelwert \pm SEM angezeigt (B). (C-F) Gefäßparameter der untersuchten Mesenterialarteriensegmente (C-F). Maximale Vasokonstriktion bei Applikation von 60mM KCl (C). Vasodilatation bei Applikation von Acetylcholin ($300 \mu\text{M}$, „ACh“) (D). Maximale Vasodilatation durch kalziumfreie Lösung bei einem intraluminalen Druck von 50mmHg (E) und bei einem intraluminalen Druck von 120mmHg (F). Unter der Verwendung des Kruskal-Wallis-Signifikanztests wurden keine signifikanten Unterschiede zwischen den verschiedenen Mausgenotypen beobachtet. Die Daten werden als Boxplots plus Interquartilbereiche dargestellt.

Ausblick

Die C-terminale Helix 8 kann durch posttranslationelle Modifikationen wie Palmitoylierungen²⁹⁰ in der Zellmembran verankert sein. Interessanterweise besitzt der mechanosensitive Histamin H₁-Rezeptor keine Palmitoylierungen im C-Terminus (Huynh et al., 2009). Wohingegen die im Vergleich zum H₁-Rezeptor (siehe Abschnitt 1.6.7 mit Abbildung 1.15 B) weniger mechanosensitiven GPCR (Mederos y Schnitzler et al., 2008) wie z. B der Angiotensin II AT₁-Rezeptor [mAT_{1A}R (C355), hAT₁R (C355)] eine (Clement et al., 2009), der muskarinische M₅-Rezeptor eine putative [rM5R (C511), mM5R (C512) (Huang et al., 2012)] und der am wenigsten mechanosensitive Vasopressin V_{1A}-Rezeptor zwei [rV_{1A}R (C371, C372), hV_{1A}R (C364, C365) (Thibonnier et al., 2001; Huynh et al., 2009)] Cystein-Palmitoylierungsstellen aufweisen. Auch der nicht mechanosensitive adrenerge β₂AR besitzt eine Cystein-Palmitoylierung (C341) am Ende der Helix 8 (Liu et al., 2012a; Adachi et al., 2016), die mit Cholesterol und Caveolin-1 (Oddi et al., 2017) wechselwirkt und bei der Homodimerisierung des Rezeptors eine Rolle spielt (Cherezov et al., 2007; Chini und Parenti, 2009; Zheng et al., 2012). Unter der Annahme, dass Palmitat-Verankerungen des C-Terminus in der Lipid-Doppelschicht die Freiheitsgrade der Helix 8 einschränkt, stellt sich folgende interessante Fragestellung: Reduziert der C-terminale Palmitoylierungsgrad die Mechanosensitivität von GPCR?

Neben dem Palmitoylierungsgrad ist ein Augenmerk auf die Länge des C-Terminus der verschieden starken mechanosensitiven Rezeptoren zu richten. Auffällig ist, dass die Länge des C-Terminus nachfolgender GPCR: hH₁R (21 Aminosäuren) (Shimamura et al., 2011), hM₁R (37 Aminosäuren) (Borroto-Escuela et al., 2010), hAT₁R (55 Aminosäuren) (Zhang et al., 2015b), V_{1A}R (61 Aminosäuren) (Thibonnier et al., 2001), hβ₂R (84 Aminosäuren) (Rasmussen et al., 2007) mit der Stärke der mechanischen Aktivierbarkeit korreliert H₁R > M₁R > AT₁R > V_{1A}R > β₂R (siehe Abschnitt 1.6.7 mit Abbildung 1.15 B) (Mederos y Schnitzler et al., 2008). Wir vermuten, dass eine Verlängerung des C-Terminus die mechanische Aktivierbarkeit verringern sollte.

Somit könnten neue Einblicke in die Modulation der Mechanosensitivität der GPCR gewonnen werden. Zusammenfassend kann man festhalten, dass sowohl der Palmitoylierungsgrad als auch die Länge des C-Terminus einen Einfluss auf die Mechanosensitivität des GPCR haben könnte.

²⁹⁰ Der Prozess der Palmitoylierung ist eine posttranslationale Modifikation von vielen GPCR, bei der die funktionellen Thiolgruppen von Cysteinen, die vermehrt im C-Terminus von GPCR vorzufinden sind (Huynh et al., 2009), mit sauren Carboxygruppen der Palmitinsäure zu einer Thioesterverbindung reagieren und den C-Terminus in der Lipid-Doppelschicht verankern (Chini und Parenti, 2009).

Zusammenfassung

G-Protein-gekoppelte Rezeptoren (GPCR) sind wichtig für zahlreiche physiologische und pathophysiologische Vorgänge und stellen molekulare Zielstrukturen für etwa 38% aller zugelassenen Medikamente dar. Interessanterweise sind GPCR nicht nur Sensoren für Ionen, Transmitter und Hormone, sondern können auch durch physikalische Reize wie das Transmembranpotential sowie durch mechanische Reize aktiviert werden. Unsere bisherigen Ergebnisse zeigen, dass Histamin H_1 -Rezeptoren (H_1R), die an der Regulation des Schlaf-Wach-Zyklus, des allergisch bedingten Juckreizes, der systemischen Vasodilatation und der Bronchokonstriktion beteiligt sind, stark mechanosensitiv sind. Das Ziel dieser Forschungsarbeit war die Untersuchung der mechanosensorischen Eigenschaften von H_1R sowohl auf molekularer als auch auf physiologischer Ebene. Mittels ratiometrischer Kalziummessungen mit Fura-2, elektrophysiologischer Messungen in der Ganzzellkonfiguration und intramolekularer dynamischer FRET-Messungen mit verschiedenen H_1R -Konstrukten konnte beobachtet werden, dass für die Mechanosensitivität keine Agonistenbindung erforderlich ist. Interessanterweise führten mechanische Stimulationen im Vergleich zur Agonistenstimulation zu unterschiedlichen aktiven Rezeptorkonformationen. Darüber hinaus zeigte sich auf molekularer Ebene, dass die C-terminale Helix 8 entscheidend ist für die Mechanosensitivität von GPCR. Interessanterweise waren GPCR, die keine C-terminale Helix 8 besitzen wie der humane GnRH-Rezeptor, der humane Neurotensin NTS_1 -Rezeptor und der humane Chemokin CXCR4-Rezeptor nicht mechanosensitiv. Die Übertragung der Helix 8 vom mechanosensitiven H_1R auf den nicht mechanosensitiven humanen GnRH-Rezeptor führte zur Mechanosensitivität des GnRH-Rezeptors, wohingegen das Abschneiden der Helix 8 vom mechanosensitiven H_1R zum Verlust der Mechanosensitivität führte. Diese Daten deuten darauf hin, dass die C-terminale Helix 8 ein entscheidendes strukturelles Element für die Mechanosensitivität von GPCR darstellt. Diese Ergebnisse werfen ein neues Licht auf das Konzept der Mechanosensitivität von GPCR. Auf der physiologischen Ebene konnten wir feststellen, dass endotheliale H_1R Sensoren für Scherkräfte darstellen und an der Fluss-induzierten Vasodilatation beteiligt sind. Zusammengefasst konnten wir zeigen, dass mechanische Reize bestimmte Konformationsänderungen in mechanosensitiven GPCR hervorrufen, die möglicherweise auf eine Elongation der Helix 8 zurückzuführen sind. Dadurch kommt es zur G-Protein-Aktivierung, zur Signaltransduktion und schließlich zum zellulären Effekt.

Summary

G protein-coupled receptors (GPCRs) are important for numerous physiological and pathophysiological processes and represent molecular targets for approximately 30% of all approved drugs. Interestingly, GPCRs are not only sensors for ions, transmitters and hormones, but they can also be activated by physical stimuli such as transmembrane potential and mechanical stimuli. Our previous results show that histamine H₁ receptors (H₁R), which are involved in sleep-wake regulation, allergic itching, systemic vasodilation and bronchoconstriction, are highly mechanosensitive. In this study, we aimed to analyze the mechanosensory properties of H₁Rs both on the molecular and on the physiological level. When performing ratiometric calcium measurements with Fura-2, whole-cell patch clamp measurements, and intramolecular dynamic FRET measurements of various H₁R constructs, we observed that agonist binding was not required for mechanosensitivity. Interestingly, mechanical stimulation led to different active receptor states compared to agonist stimulation. In addition, at the molecular level, we found that the C-terminal helix 8 which is a structural motif of several GPCR, is critical for mechanosensitivity. GPCRs that lack a C-terminal helix 8 like the humane GnRH receptor, the human neurotensin NTS1 receptor and the human chemokine CXCR4 were not mechanosensitive. By transferring helix 8 from mechanosensitive H₁R to the non-mechanosensitive human GnRH receptor, the GnRH receptor became mechanosensitive, while removal of the helix 8 from mechanosensitive H₁R resulted in a loss of mechanosensitivity. These findings suggest, that the C-terminal helix 8 is the major determinant of the mechanosensitivity of GPCR thus shading new light on the concept of mechanosensation of GPCR. On the physiological level, we found that H₁R are endothelial sensors for shear stress mediating flow-induced vasodilation. Altogether, our results suggest that mechanical stimuli induce distinct conformational changes in mechanosensitive GPCR that might reflect elongations of the helix 8 thereby leading to G-protein activation and subsequent signal transduction which finally results in cellular effects.

Anhang

Eigenschaften	hH ₁ R	hH ₂ R	hH ₃ R	hH ₄ R	Literatur
Genlokus	Chromosom 3, 3q25	Chromosom 5, 5q35.2	Chromosom 21, 20q13.33	Chromosom 18, 18q11.2	(Fukui et al., 1994; De Backer et al., 1998; Micallef et al., 2013; Panula et al., 2015)
Anzahl der Aminosäuren	487	359	445	390	(Fukui et al., 1994; Nakamura et al., 2000; Fukushima et al., 2001; Leurs et al., 2009;
Disulfidbrücke	2	1	1	1	Micallef et al., 2013; Panula et al., 2015; Nieto-Alamilla et al., 2016)
Palmitoylierung	0	1	1	1	
Glykolysierung	2	1	1	2	
Molekulare Proteinmasse	56 kDa	40 kDa	49 kDa	44 kDa	(Fukui et al., 1994; Nakamura et al., 2000; Micallef et al., 2013)
Isoformen	keine	keine	20	3	(Fukui et al., 1994; van Rijn et al., 2008; Panula et al., 2015; Garcia-Galvez und Arias-Montano, 2016; Mocking et al., 2016; Nieto-Alamilla et al., 2016)
G-Protein-Kopplung	G _{αq/11}	G _{αs}	G _{αi/o}	G _{αi/o}	(Seifert et al., 2013; Panula et al., 2015)
Basalaktivität	+	+	++	++	(Leurs et al., 2002; Panula et al., 2015)
Effektor-systeme und intra- und extrazelluläre Botenstoffe	PLC-β↑, IP ₃ ↑, DAG↑, [Ca ²⁺] _i ↑, PKC↑, COX↑, PLA ₂ ↑, AA↑, PLD↑, eNOS↑, iNOS↑, cGMP↑, NO↑, NFκB↑, PI3K↑, Akt↑, Calcineurin↑, NFAT↑, IL-6↑, IL-8↑, GM-CSF↑, IL-4↑, c-Fos↑, CaMK↑, CREB↑, TNFα↑, ERK1/2↑, p42/p44↑, MAPK↑, p38MAPK↑,	AC↑, cAMP↑, PKA↑, c-Fos↑, c-Jun, PKC↑, p70S6Kinase↑, ANP↓, IL-12↓, H ⁺ /K ⁺ -ATPase↑, HCl↑, CREB↑, AP-1↓, TNFα↓, Kv3.2↓, spannungsabhängige L-Typ Kalziumkanäle↑, [Ca ²⁺] _i ↑, ERK1/2↑, MAPK↑, Akt2↓, GSK3α/β↓, PLA ₂ ↓, AA↓	AC↓, cAMP↓, PKA↓, [Ca ²⁺] _i ↓, G _{βγ} ↑, GIRK↑, [K ⁺] _i ↑, CREB↓, spannungsabhängige N-Typ Kalziumkanäle↓, Na ⁺ /H ⁺ -Austauscher↓, MAPK↑, PI3K↑, Akt↑, GSK3β↓, Bcl-2↓, ERK1/2↑, PLA ₂ ↑, COX↑, AA↑, PGE ₂ ↑	AC↓, cAMP↓, G _{βγ} ↑, [Ca ²⁺] _i ↑, PI3K↑, Akt↑, MAPK↑, ERK1/2↑, p38MAPK↑, AP-1↑	(Bakker et al., 2001; Megson et al., 2001; Robinson und Dickenson, 2001; Leurs et al., 2002; Jutel et al., 2005; Criado et al., 2010;

	c-JNK↑, Na ⁺ /H ⁺ -Austauscher↑, TRPC-Kanäle↑, β-Catenin↑				Panula et al., 2015; Mocking et al., 2016; Mahdy und Webster, 2017)
Vorkommen	Herz, Blutgefäße, Lunge, Uterus, ZNS, Nebennierenmark, Neurone, glatte Gefäßmuskulatur des Gastrointestinaltraktes und des Respirationstraktes, Endothelzellen, Hepatozyten, Epithelzellen, neutrophile und eosinophile Granulozyten, Monozyten, dendritische Zellen, T- und B-Zellen	Herz, Blutgefäße, Lunge, Magen, Uterus, ZNS, Neurone, Belegzellen, glatte Gefäßmuskulatur des Respirationstraktes, Hepatozyten, Chondrozyten, Endothelzellen, Epithelzellen, neutrophile und eosinophile Granulozyten, Makrophagen, Monozyten, dendritische Zellen, T- und B-Zellen	Herz, Lunge, Gastrointestinaltrakt ZNS, PNS, Endothel, enterochromaffin-ähnliche Zellen, Autorezeptor auf histaminergen Neuronen, Heterorezeptor auf verschiedenen Neuronen im ZNS und PNS, Endothelzellen, Eosinophile, dendritische Zellen, Monozyten	Milz, Thymus, Lunge, Dünndarm, Dickdarm, Herz, Knochenmark, ZNS, basophile, eosinophile und neutrophile Granulozyten, dendritische Zellen, T-Zellen, Mastzellen, Langerhans-Zellen, Neurone, Fibroblasten, endokrine Zellen, Hepatozyten	(Hill et al., 1997; Nakamura et al., 2000; Criado et al., 2010; Simons und Simons, 2011; Micallef et al., 2013; Panula et al., 2015)
Physiologie	Kontraktion glatter Muskelzellen, Bronchokonstriktion↑, Kontraktion des Darms (Peristaltik)↑, Stimulation der endothelialen NO-Synthase, die zur NO-Freisetzung und Vasodilatation führt, Endothelzellkontraktion führt zur erhöhten Gefäßpermeabilität Freisetzung von Adrenalin aus dem Nebennierenmark Positive Dromotropie, negative Chronotropie und negative Inotropie durch kardiale H ₁ -Rezeptoren der Koronararterien vermittelt verstärkte Depolarisation und erhöhte neuronale Erregungsleitung↑, Hyperpolarisation durch Ca ²⁺ -abhängige Kaliumströme, reduziertes Hunger- und verstärktes Sättigungsgefühl, Erhöhte Vigilanz↑, verkürzte zirkadiane Rhythmik	Stimulation der Sekretion von Magensäure↑, Pepsin↑ und intrinsic factor↑ Negative Dromotropie, positive Chrono- und Ino- und Bathmotropie durch myokardiale H ₂ -Rezeptoren vermittelt Hyperpolarisation, verminderte neuronale Erregungsleitung↓, Erleichterung der Signaltransduktion im ZNS, Hemmung Ca ²⁺ -abhängiger Kaliumströme, Hemmung der Lymphozytenfunktion	Autoinhibition: Hemmung der neuronalen Histamin-Synthese und Histamin-Freisetzung. Hemmung der Neurotransmitter-Freisetzung Regulierung einer Vielzahl von Neurotransmittern: Noradrenalin, Acetylcholin, Serotonin und Dopamin. erhöhte Vigilanz, gesteigerte Neurokognition, Hunger- und Sättigungsgefühl Zunahme spannungsabhängiger Ca ²⁺ -Ströme in glatter Muskulatur, Hemmung der neuronalen Erregungsweiterleitung von histaminergen Neuronen im Nucleus Tuberosus durch H ₂ -Autorezeptoren	Immunantwort: Erhöhte Chemotaxis von Granulozyten und Mastzellen, Freisetzung von Interleukinen und Interferonen	(Zavec und Levi, 1978; Hauf et al., 1996; Hill et al., 1997; Nakamura et al., 2000; Oda et al., 2000; Hofstra et al., 2003; 2009; Criado et al., 2010; Micallef et al., 2013; Panula et al., 2015)
Pathophysiologie	allergische Reaktionen: allergische Rhinitis, Niesreiz, Husten, Dyspnoe, Konjunktivitis, Urtikaria, Flush, Emesis/Vomitus↑, Schlafstörungen und andere	Magengeschwür (Ulcus) und gastroösophageale Refluxkrankheit (Reflux), Arrhythmien, Tachykardie	kognitive Beeinträchtigungen: ADHS, Aufmerksamkeits- und Lerndefizite, neurologische Störungen: Schizophrenie, Morbus Alzheimer, Schlafstörungen,	entzündliche Erkrankungen: allergische Rhinitis, atopische Dermatitis, Neurodermatitis, Asthma, Juckreiz, Autoimmunerkrankungen, Arthritis, neurologische	(Maintz et al., 2006; Esbensen et al., 2008; Millan-Guerrero et al., 2011; Simons und

	ZNS-Störungen, erhöhte vaskuläre Endothelpermeabilität, Ödembildung (Larynxödem, Lungenödem), Anaphylaxie, Hypotonie, Dysmenorrhö		Narkolepsie, Migräne, neuropathischer Schmerz, Adipositas	Schmerzen, Lupus erythematoses	Simons, 2011; Stokes et al., 2012; Micallef et al., 2013; Klimek und Sperl, 2015; Panula et al., 2015)
--	---	--	--	-----------------------------------	--

Tabelle 1: Übersicht über die Charakteristika von Histamin-Rezeptoren. IP₃ = Inositoltrisphosphat, DAG = Diacylglycerol, NOS = NO-Synthase, cAMP = zyklisches Adenosinmonophosphat, MAPK = Mitogen-aktivierte-Proteinkinase, PLA₂ = Phospholipase A₂, AA = Arachidonsäure, PLC = Phospholipase C, B-Zellen = B-Lymphozyten, T-Zellen = T-Lymphozyten, IL = Interleukin, INF = Interferon, PKC = Proteinkinase C, PLC = Phospholipase C, PLD = Phospholipase D; NFκB = NFκB-Kerntranskriptionsfaktor, ZNS = zentrales Nervensystem, PNS = peripheres Nervensystem, ADHS = Aufmerksamkeits-Defizit-Hyperaktivitäts-Störung, ANP = atriales natriuretisches Peptid, NFAT = NFAT-Kerntranskriptionsfaktor (*nuclear factor of activated T-cells*), CREB = *cAMP-response element binding protein*, GM-CSF = Granulozyten-Monozyten-Kolonie-stimulierender Faktor (*granulocyte macrophage colony-stimulating factor*), Kv3.2 = spannungsabhängiger Kaliumkanal (*voltage-gated potassium channel*), GSK3β = Glykogensynthase-Kinase 3 β, H⁺/K⁺-ATPase = Protonen-Kalium-ATPase, HCl = Salzsäure, PI3K = Phosphoinositid-3-kinase, GIRK = G-protein-gekoppelte einwärts gleichrichtende Kaliumkanäle (*G protein inwardly rectifying potassium channels*), COX = Cyclooxygenase, PGE₂ = Prostaglandin E₂, ERK1/2 = *extracellular signal-regulated kinases 1/2*, Bcl-2 = *B-cell lymphoma 2*, AP-1 = Transkriptionsfaktor Eine Aktivierung bzw. Zunahme werden als Aufwärtspfeil (↑), eine Inaktivierung bzw. Abnahme werden als Abwärtspfeil (↓) dargestellt.

Aminoacid sequences of Guinea Pig Histamine Receptor Subtypes (gpH1R, gpH2R, gpH3R, gpH4R), where N and C termini are highlighted in yellow and transmembrane domains (TM) are shown in green, 10.12.2018, <https://www.uniprot.org/uniprot>

>gpH1R, 488 aa protein, Accession: AAC60674.1

```

1 msflpgmtpv tlnsfswale drmlagnstt tptrqlmplv vvlssvslvt valnllvlva
61 vrserklhtv gnlyivslsv adlivgavvm pmsilylhrs awilgrplcl fwlsmdyvas
121 tasifsvfil cidryrsvqg plrylryrtk trasatilga wllsflwvip ilgwhhfmmap
181 tseprekkce tdfydvtwfk vmtainfnyl ptllmlwfyi riykavrrhc qhrqlnssl
241 psfsemklkl enakvdtrrm gkespwedpk rcskdasgvh tpmssqhlv dmpcaavlse
301 deggevgrtrq mpmlavgdgr ccealnhmhs qlelsgqsra thsisarpee wtvvdggsfp
361 itdsdtstea apmaggprsg sngldyikf twrrlrshsr qytsghlnr erkaakglgc
421 imaafilcwi pyfvffmvia fckscsnepv hmfiiwlgyl nstlnplyp lcnenfrktf
481 krilripp

```

>gpH2R, 359 aa protein, Accession: AAA65713.1

```

1 mafngtvpsf cmdftvykvt isviliilil vtvagnvvvc lavglnrirl sltncfivsl
61 avtdlllgll vlpfsaiyql sckwsfskvf cniytsldvm lctasilnlf misldrycav
121 tdplrypvli tparvaislv fiwvisitls flsihlgnw s rnetskdndt ivkckvqvne
181 vyglvdglvt fylpllimci tyfrifkiar eqarrinhig swkaatireh katvflaavm
241 gaficwfpv ftvfvyrglk gddavne vfe dvvlwlgvan salnpilya lnrdfrtayh
301 qlfcclrash nshetslrln nsqlnrsqcq eprwqedkpl nlqvwsgtev tapqgatnr

```

>gpH3R, 445 aa protein, Accession: NP_001166208.1

```

1 merappdglm nasgalagea aaaaggartf saawtavlaa lmallivatv lgnalvmlaf
61 vadsslrtqn nffllnlais dflvgvfcip lyvpyvltgr wtfgrglckl wlvvdylct
121 ssvfnivlis ydrflsvtra vsyraqqgdtr ravrkmlv wvlafillygp ailsweylsg
181 gssipeghcy aeefynwyfl itastlefft pflsvtffnl siylniqrtr rlrldggare
241 agpdplpeaq sppppppgc wgcwpgkqge smplhrygv eagggaeage aalgggsgaa
301 asptssgss srgterprsl krgskpsass aslekrmkvm sqsitqrfl srckkvaks
361 aiivsifglc wapytllmi raachghcvp dywetsfwl lwansavnpv lyplchysfr
421 raftkllcpq klkvqphssl ehcwk

```

>gpH4R, 389 aa protein, Accession: NP_001166218.1

```

1 mlannstia tsikisltfl mslalaiml gnvvvilafi vdrnlrhrsn yfflnlaiad
61 ffvgaiaipl yipssltiywt sgkqacvfwl itdylctas vynivlisyd rygsvsnavw
121 yraqhsgtwk iatqmvavwi fsfmgtpmi lidswqnt tecepgflkk wyfalptsl
181 eflipillva yfsahiywsl wkreklsrcl shpvlpdsds ssdhghscrq dpdsratlpa
241 rkettaslgk dksrrkssl fsirayknsn viaskmgfls hsdslalqqr ehiefrark
301 laksaila afaicwapys lttviysffp ernltkstwy htawflqwf nsvfnpflypl
361 qhkrfqkaf klpvrrqst pphnrsist

```

Results for job clustalo-I20181210-154554-0038-26854691-p2m, 10.12.2018

<https://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalo/> (Madeira et al., 2019)

Alignment of aminoacid sequences of guinea pig histamine receptor subtypes (gpH1R, gpH2R, gpH3R, gpH4R):

```

gpH3R,      ---merappdglmnasgalagea---aaaaggartf---saawtavlaal---mallivatvlg---nalvmlaf 57
gpH4R,      -----m-la-----nstialtsikisltflmsl---laiaimlgnvvvi 36
gpH1R,      msflpgmtpv---tlnsfswale---drmlagnstt---tptrqlmplv---vvlssvslvtvalnllvl 58
gpH2R,      mafn-gtvpsfcmfd-----tvykvtisviliililvtvagnvvvc 40
           :       :  ::  :. :  * : *

gpH3R,      lafvadsslrtqnnffllnlaisdflvgvfciplyvpyvltgrwtfgrglcklwlvdyl 117
gpH4R,      lafi vdrnlrhrsn yfflnlai adffvgaiaipl yipsslt-ywtsgkqacvfwl itdyl 95
gpH1R,      yavrserklhtvgnlyivslsvadlivgavvm pmsilylhrsawilgrplclfwlsmdyv 118
gpH2R,      lavglnrirlsltncfivslavtdlllgllvlpfsaiyqlsckwsfskvfcniytsldvm 100
           * . : * : * : : : * : : : * : : * : * : * : * : * : * : * : * : * :

gpH3R,      lctssvfnivlis ydrflsvtravsyraqqgdtr ravrkmlv wvlafilly-gpailswe 176
gpH4R,      lctasvynivlisydryqsvsnavvyraqhsgtwkiatqmvavwifsfmtn-gpmilisd 154
gpH1R,      astasifsvfilcidryrsvqgplrylryrtktr-asatilgawllsfl--wvipilgwh 175
gpH2R,      lctasilnlfmisldrycavtdplrypvlitpar-vaislvfiwvisitlsflsihlgnw 159
           . * : * : : : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * :

gpH3R,      ylsaggss--ipeghcyaeefynwyfl itastlefft pflsvtffnl siylniqrtrrlr 234
gpH4R,      sw---q--nsttecepgflkkwyfalptslleflipillvayfsahiywslwkreklsr 208
gpH1R,      hfmaptse-prekkcetdfydvtwfkvmtainfnylptllmlwfyiriykavrrhcqhrq 234
gpH2R,      srnetskdndt ivkckvqv--nevvgldvlgvtfyppllimcityfrifkiareqarr-- 215
           . * : * : : : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * :

gpH3R,      dggareagpdplpeaqss-----ppqpppgcwgcpkqg----- 268
gpH4R,      clsh-----pvlpsds-s-----ssdhghs---crqdpd-----s 234
gpH1R,      lins-----slpsfsemklklenakvdtrrmgkespwedpkrcskdasgvhtpmssqh 288
gpH2R,      -----inhigs-wka----- 224

```

gpH3R,	ge-----smplhrygvgeagpgaeage--aalggsgaas----p	303
gpH4R,	ra-----tlp-----arkett--aslgskd-----	253
gpH1R,	lvdmpcaavlsedeggevtrqmpmlavgdgrcceaalmhmsqlelsgqsraithsarp	348
gpH2R,	-----	224
gpH3R,	ts---ssgssr---gterprslkrsgkpsassaslekrmkmv-----sqsitqrfrl	350
gpH4R,	-----rrkssllfsirayknsnviaskmgfl-shsdsalalqgrehiel	295
gpH1R,	eewtvvdgqsfpitdsdtsteaapmggqprsgsngldyikftwrrlrshsrqytsqhlh	408
gpH2R,	-----at	226
gpH3R,	srdkkvakslaiivsfglcwapytllmiiraach-ghcvpdywetsfllwansavnp	409
gpH4R,	frarklaksllaillaafaicwapyslttviysffpernlkstwytawflqwfnsfvnp	355
gpH1R,	nrrerkaakqlgcimaafilcwipyfvffmviafck--scsnepvhmftiwlgylnstlnp	466
gpH2R,	irehkatvtlaavmgafiiicwfpvftvfvyrglkg-ddavnevfedvvlwlgansaln	285
	* : * : * . : . * : * * * : . . : * * : * * : * *	
gpH3R,	vlyplchysfrraftkllcpqklkvqphsslehc-----wk-----	445
gpH4R,	flyplchkrfqaflkilpvrqrstpphnsist-----	389
gpH1R,	liyplcnenfrktfkrilripp-----	488
gpH2R,	ilyaalnrdrftayhqlfcccrlashnshetslrlnnsqlnrsqcqepwqedkplnlqvw	345
	..* : * : * : * : * :	
gpH3R,	-----	445
gpH4R,	-----	389
gpH1R,	-----	488
gpH2R,	sgtevtapqgatnr	359

Percent Identity Matrix - created by Clustal2.1

1: gpH3R_	100.00	39.11	27.92	26.67
2: gpH4R_	39.11	100.00	26.95	26.19
3: gpH1R_	27.92	26.95	100.00	33.00
4: gpH2R_	26.67	26.19	33.00	100.00

Aminoacid sequences of Guinea Pig Histamine Receptor Subtypes (gpH1RTM, gpH2RTM, gpH3RTM, gpH4RTM) without N- and C-Termini:

>gpH1RTM

```

1 lv vvlssvslvt valnllvlya
61 vrserklhtv gnylivslsv adliygavvm pmsilylhrs awilgrplcl fwlsmdyvas
121 tasifsvfil cidryrsvqq plrylryrtk trasatilga wllsflwvip ilgwhhfmmap
181 tsepreekce tdfydvtwfk vmtaiinfyl ptllmlwfyi riykavrrhc qhrqlinssl
241 psfsemklkl enakvdtfrm gkespvedpk rcskdasgvh tpmppsqhvl dmpcaavlse
301 deggevtrq mpmlavgdgr cceaalmhms qlelsgqsra thsisarpee wtvvdgqsfp
361 itdsdtstea apmggqprsg sngldyikf twrrlrshsr qytsqhlhnr erkaakqlgc
421 imaafilcwi pyfvffmvia fckscsnepv hmftiwlgy l nstlnpliyp l
    
```

>gpH2RTM

```

1 viliilil vtvagnvvc lavglnrslr sltncfivsl
61 avtdlllgll vlpfsaiyql sckwsfskvf cniytsldvm lctasilnlf misldrycav
121 tdplrypvli tparvaislv fiwvisitls flsihlgwns rnetskdndt ivkckqvqne
181 vyglvdglvt fylpllimci tyfrifkiar eqarrinhig swkaatireh katvtlaavm
241 gafiiicwfpv ftvfvyrglk gddavnevfe dvvlwlgyan salnpilya
    
```

>gpH3RTM

```

1 lmallivatv lgnalvmlaf
61 vadsslrtqn nffllnlais dflvgvfcip lyvpyvltgr wtfgrglckl wlvvdyllet
121 ssvfnivlis ydrflsvtra vsyraqqgd rravrkmlv wvlaflllygp ailsweylsg
181 gssipeghcy aeaffynwyfl itastlefft pflsvtffnl siylniqrrt rlrldggare
241 agpdplpeaq ssppqpppgc wgcwpgqgqe smplhryvgv eagpgaeage aalggsgaa
301 asptsssgs srgterprsl krgskpsass aslekrmkmv sqsitqrfrl srdkkvaksl
361 aiivsifglc wapytllmii raachghcvp dywyetsfwl lwansavnpv lypchysf
    
```

>gpH4RTM

```

1 l msllaiaiml gnvvvilafi vdrnlrhrsn yfflnlaiad
61 ffvgaiaipl yipsslywt sgkqacvfwl itdyllctas vynivlisyd ryqsvsnaww
121 yraqhsgtwk iatqmvavvi fsfmgngpmi lisdswqnst tecepgflkk wyfalptsl
181 eflipillva yfsahiywsl wkreklsrc lshpvlpsdss ssdhghscrq dpdsratlpa
241 rkettaslg sdsrrkssll fsirayknsn viaskmgfls hsdslalqqr ehiefrark
301 lakslaila afaicwapys lttviysffp ernltkstwy htawflqwf n sfvnpflypl
361 c
    
```

Results for job clustalo-I20181210-171034-0335-5785945-p1m, 10.12.2018

Alignment of aminoacid sequences of guinea pig histamine receptor subtypes (gpH1RTM, gpH2RTM, gpH3RTM, gpH4RTM) without N- and C-Termini:

gpH3RTM	---lmallivatvlgna lvmalfvadsslrtqnnffllnlaisdflvgvfciplyvpyvl	57
gpH4RTM	---lmsllaiaimlgnvvvilafivdrnlrhrsn yfflnlaiadffvgaiaiplyipssl	57

gpH1RTM	lvvvlssvslvtvalnllvlyavrserklhtvgnyivslsvadlivgavvmpmsilylh	60
gpH2RTM	--viliililvtvagnvvvclavglnrllrsltnclfivslavtdlllgllvlpfsaiyql : : : . : * : * * . : * : * : : : * : : : * : : * : : *	58
gpH3RTM	tgrwtfgrglcklwlvdvdyllctssvfnivlisdrflsvtravsyraqqgdtrravrk	117
gpH4RTM	t-ywtsgkqacvfwlitdyllctasvynivlisdryqsvsnawwyrqhsqgtwkiaq	116
gpH1RTM	rsawilgrplclfwlsmdyvastasifsvfilcidryrsvqqplrylryrtktr-asati	119
gpH2RTM	skwsfskvfcniytsldvmlctasilnlfmislrycavtdplrypvlitpar-vaisl * . : * : : * : . * : * : : : * : * : * : * : * : *	117
gpH3RTM	vlwvlafilly-gpailsweylsggss--ipeghcyaeffynwyflitastlefftpfls	174
gpH4RTM	vavwifsfmtn-gpmilisdsw----q--nsttecepgflkkwyfalptsilleflipill	169
gpH1RTM	lgawllsfl--wvipilgwhhfmaptse-prekkcetdfydvtfkwmtaiinfylptll	176
gpH2RTM	vfiwvisitlsflsihlgwnsrnetskdndtivrckvqv--nevyglvdglvtfypल्ली : * : : : * . . . * . : : . : * * *	175
gpH3RTM	vtffnlisiylniqrtrrlrldggareag-----pdplpeaqsppppppgcwg	222
gpH4RTM	vayfsahiywslwkreklsrclsh-----pvlpsds-sssdhghs---	208
gpH1RTM	mlwfyiriykavrrhcqhrqlinsslpfssemklklenakvdtrrmgkespvedpkrcsk	236
gpH2RTM	mcityfriefkiareqarr-----inhigswka----- : * : . : :	202
gpH3RTM	-----cwpkgq-ge-----smplhrygvgeagpgaeage--aal	253
gpH4RTM	-----crqdpdsra-----tlp-----arkett--asl	229
gpH1RTM	dasgvhtpmpssqhlvdmpcaavlsedeggevgt rqpmpmlavgdgrccealnhmhsqlel	296
gpH2RTM	-----	202
gpH3RTM	ggsgaaas----pts---ssgsssr---gterprslkrsgkpsassaslekrmkmv---	300
gpH4RTM	gsdks-----rrkssllfsirayknsnviaskmgfl-sh	262
gpH1RTM	sgqsraithsisarpeewtvvdggsfpitdsdtsteaapmqqprsgsnsgldyikftwrr	356
gpH2RTM	-----	202
gpH3RTM	----sqsitqrfrlrsrdkkvaksilaiivsfglcwapytllmiiraach-ghcvpdywye	355
gpH4RTM	sdsalalqrehielfrarklaksllaifaicwapyslttviysffpernlktstwyh	322
gpH1RTM	lrshsrqytsghlnrnrerkaakqlgcimaafilcwipyfvfvmviafck--scsnepvhm	414
gpH2RTM	-----atirehkatvtlaavmgafiicwfpfyftvfvyrglkg-ddavnevfed * : * : * . : : * : * * * : . . .	249
gpH3RTM	tsfwllwansavnpvlyplchysf	379
gpH4RTM	tafwlqwfnsvnpflyplc----	342
gpH1RTM	ftiwlgylnstlnplypl-----	433
gpH2RTM	vvlwlgansalnpilya----- : * * : * * : * * : *	267

Percent Identity Matrix - created by Clustal2.1

1: gpH3RTM	100.00	41.32	28.65	27.76
2: gpH4RTM	41.32	100.00	24.70	27.24
3: gpH1RTM	28.65	24.70	100.00	34.60
4: gpH2RTM	27.76	27.24	34.60	100.00

Aminoacid sequences of human Histamine Receptor Subtypes (hH1R, hH2R, hH3R, hH4R, where N and C termini are highlighted in yellow and transmembrane domains (TM) are shown in green, 10.12.2018, <https://www.uniprot.org/uniprot>

>hH1R, 487 aa protein, Accession:AAH60802.1

1 mslpnssccll edkmcegnkt tmaspqlmpl vvvlsticlv tvgnlllvly avrserklht
61 vgnlyivsls vadliygavv mpmnilyllm skwslgrplc lfwlsmdyva stasifsvfi
121 lcidryrsvq qplrylkyrt ktrasatilt awflsflwvi pilgwnhfmq qtsvrredkc
181 etdfydvtf kvmtainfyp lptllmlwfy akiyavrqrh cqhrelinrs lpsfseiklr
241 penpkgdakk pgkespwevl krpkkdaggg svlkspsqtp kemkspvvs qeddrevdkl
301 ycfpldiehm qaaagssrd yvavnshgq lktdeqglnt hgaseisedq mlgdsqsfsr
361 tdsdttteta pgkgklrsgs ntgldyikft wkrlrshsrq yvsglhmre rkaakqlgfi
421 maafilcwip yfiffmvi af cknccnehlh mftiwlgyin stlnplyipl cnenfkktfk
481 rilhirs

>hH2R, 359 aa protein, Accession: AAN01270.1

1 mapngtassf cldstackit itvvlavllit itvagnvvvc lavglnrnlr nltncfiysl
61 aidtlllgll vlpfsaiyql sckwsfqkvf cniytsldvm lctasilnlf misldrycav
121 mdplrypvlv tprvrvaislv liwvisitls flsihlgnw s rnetskgnht tsckkvqvne
181 vyglvdglvt fylpplimci tyrifkvar dqakrinhis swkaatireh katvllaavm
241 gafiicwfpv ftafvyrqlr gddaine vle aivlwlgyan salnpilya lnrdrftgyq
301 qlfccrlanr nshktslrns asqlsrtqsr eprqkeekpl klqvwsgtev tapqgatr

>hH3R, 445 aa protein, Accession:AAH96840.1

1 merappdgpl nasgalagea aaaggargfs aawtavlaal mallivatvl gnalvmlafv
61 adsslrtnnn fflnlaisd flvgafcipl yvpyvltgrw tfgrglcklw lvvdyllects
121 safnivlisy drflsvtrav syraqqgdtr ravrkmlvw vlaflllygpa ilsweylsgg
181 ssipeghcya effynwfyfli tastlefft flsvtffnls iylniqrtrr lrlgdareaa
241 gpepppeaqp spppppgcw cwqkghgeam plhrygvgea avgaeageat lgggggggsv
301 asptsssgss srgterprsl krgskpsass aslekrmkmv sqsftqrfl srdrkvaks
361 avivsfqglc wapytllmi raachghcvp dyweesfwl lwansavnpv lyplchhsfr
421 raftklcpq klkiqphssl ehcwk

>hH4R, 390 aa protein, Accession:AAN01271.1

1 mpdtnstinl slstrvtlaf fmslvafaim lgnalvilaf vvdknlrhrs syfflnlais
61 dffvgvisip lyiphthlfew dfgkeicvfw ltttdyllcta svynivlisy drylsvsnav
121 syrtqhtgvl kvltlmvavv vlafvlngpm ilvseswkde gsecepgffs ewyilaitsf
181 lefvipvilv ayfnmniyws lwkrdhlsrc qshpgltavs snicghsfrg rlssrrlsa
241 stevpasfhs erqrrksslm fssrtkmnsn tiaskmgsfs qsdsvalhqr ehvellrarr
301 laksllailg vfavcwapys lftiylsfys satgpksvwy riafwlqwf n sfvnplypl
361 chkrfqkafk kifcikkqpl psqhsrsvss

Results for job clustalo-I20181210-151518-0139-62397044-p2m, 10.12.2018
<https://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalo/> (Madeira et al., 2019)

Alignment of aminoacid sequences of human Histamine Receptor Subtypes (hH1R, hH2R, hH3R, hH4R):

Table with 4 columns: Subtype (hH1R, hH2R, hH3R, hH4R), Sequence alignment (dashes and colored characters), and Position (1-487). The alignment shows conserved regions across the subtypes, with positions 1-100, 121-241, and 361-481 highlighted in yellow in the original image.

hH1R,	pvvfsqeddrevdklycfpldiehmqaaagssrddyavnvrshgqlktdeqglnthgase	345
hH2R,	-----	214
hH3R,	-----e-----amplhrygvgeaavgaeag-----eatlggg-----ggggsv	300
hH4R,	-----rgrlss-----rrsls-----ast	242
hH1R,	isedqmlgdsqsfstrdsdtttetapggkklrsgsntgldy-----ikftwkrlrshsrq	400
hH2R,	-----rin-----hi	219
hH3R,	aspt-----sssgssr-----gterprslkrsgkpsassaslekrmk-----vsqs	343
hH4R,	evpa-----sf---hse---rqrksslmfssrktmnsntiaskmgsfsqsdsvalh	288
hH1R,	yvsglhmnrerkaakqlgfimaafilcwipyfiffmviafckn--cnehlhmftiwlgy	458
hH2R,	sswkaatirehkatvtlaavmgafiicwfpfyftafvyrgl-rgddainevleaivlwlgy	278
hH3R,	ftqrfrlrsdrkvakslavivsigflcwapytllmiiiraachg-hcvpdywetsfwllw	402
hH4R,	qrehvellrarrlaksllaillgvfavcwapyslftivlsfyssatgpksvwyriaflwq * : : * . : . * : * * * : . . . : * * :	348
hH1R,	instlnplylpcnenfkktfkrilhirs-----	487
hH2R,	ansalnplyaalnrdftrgyqqlfcrlanrshktslrnsasqlrtsreprqgeek	338
hH3R,	ansavnplylchhsfrraftkllcpqkklkqphsslehcw-----	445
hH4R,	fnsfvnplylchkrfqaflkifcikkqplpsqhsrsvss----- ** . * * : * : . * : : : : :	390
hH1R,	-----	487
hH2R,	plklqvwsqtevtapqgatdr	359
hH3R,	-----	445
hH4R,	-----	390

Percent Identity Matrix - created by Clustal2.1

1: hH1R_	100.00	31.21	27.71	25.68
2: hH2R_	31.21	100.00	28.34	24.27
3: hH3R_	27.71	28.34	100.00	40.47
4: hH4R_	25.68	24.27	40.47	100.00

Aminoacid sequences of human Histamine Receptor Subtypes (hH1RTM, hH2RTM, hH3RTM, hH4RTM) without N- and C-Termini:

>hH1RTM

```

1 vvvlsticlv tvgnlllvly avrserklht
61 vgnlyivsls vadlivgavv mpmnilyllm skwslgrplc lfwlsmdyva stasifsvfi
121 lcidryrsvq qplrylkyrt ktrasatilg awflsflwvi pilgwnhfmq qtsvrredkc
181 etdfydvtfw kvmtainfy lptllmlwfy akiykavrqh cqhrelinrs lpsfseiklr
241 penpkgdakk pgkespwevl krkpkdaggg svlkspsqtp kemkspvvs qeddrevdkl
301 ycfpldiehm qaaaegssrd yvavnvrshgq lktdeqglnt hgaseisedq mlgdsqsfsr
361 tdsdttteta pgkgklrsgs ntgldyikft wkrlrshsrq yvsglhmnre rkaakqlgfi
421 maafilcwip yfiffmviaf cknccnehlh mftiwlgyin stlnplylpl

```

>hH2RTM

```

1 itvvlavlil itvagnvvvc lavglrrrlr nltncfivsl
61 aيتدلللgl vlpfσαιyql scwsvfgkfv cniytsldvm lctasilnlf misldrycav
121 mdplyrvlv tprvvaivslv liwvisitls flsihlgwns rnetskgnht tskckvqvne
181 vyglvdglvt fylpllimci tyyrifkvar dqakrinhis swkaatireh katvtlaavm
241 gafiiicwfp ftafvyrglr gddainevle aivlwlgyan salnpilya

```

>hH3RTM

```

1 mallivatvl gnalvmlafv
61 adsslrrtqnn fflnlaisd flvgafcipl yvpyvltgrw tfgrglcklw lvvdyllects
121 safnivlisy drflsvtrav syraqqgdtr ravrkmlwv vlafillygpa ilsweylsgg
181 ssipeghcya effynwyfli tastlefft flsvtffnls iylniqrtr lrlgdgareaa
241 gpepppeaqp sppsppgcwg cwqkghgeam plhrygvgea avgaeageat lgggggggsv
301 asptsssgss srgterprsl krgskpsass aslekrmkmv sqsftqrfl srdrkvaksl
361 avivsiglc wapytllmii raachghcvp dywyetsfwl lwansavnpv lylplch

```

>hH4RTM

```

1 f fmslvafaim lgnalvilaf vvdknlrhrs syfflnlais
61 dffvgvisip lyiphltfew dfgkeicvfw lttedyllcta svynivlisy drylsvsnav
121 syrtqhtgvl kivtlmvavv vlafvlngpm ilvseswkde gsecepgffs ewyilaitsf
181 lefvipvilv ayfnmniyws lwkrdhlsrsrc qshpghtavs snicghsfrg lrssrrlsaa
241 stevpasfhs erqrrksslm fssrktmnsn tiaskmgsfs qsdsvalhqr ehvellrarr
301 lakslaillg vfavcwapys lftivlsfys satgpksvwy riaflwqwf n sfvnplylpl
361 ch

```

Results for job clustalo-I20181210-163201-0256-35429179-p1m, 10.12.2018
Alignment of aminoacid sequences of human histamine receptor subtypes (hH1RTM, hH2RTM, hH3RTM, hH4RTM) without N- and C-Termini:

```

hH1RTM      lvvvlsticlvvtvgnlllvlyavrserklhtvgnlyivslsvadlivgavvmpmnilyl1    60
hH2RTM      itvvlavlilitvagnvvvclavglnrnltnctfivslaitdlllgllvlpfsaiyql      60
hH3RTM      ---lmallivatvlgналvmlafvadsslrtqnnffllnlaisdfllvgafciplyvpyvl    57
hH4RTM      --ffmslvafaimlgналvilafvvdknlrhrssyfflnlaisdffvgvisiplyiphtl    58
              .:: : . : * :* *. : * : . :.:.*:*:*:*: * . :* : *

hH1RTM      mskwslgrplclfwlsmdyvastasifsvfilcidryrsvqqplrylkyrtktras-ati    119
hH2RTM      sckwsfgkvfcniytsldvmlctasilnlfmisldrycavmdplrypvltvprva-isl    119
hH3RTM      tgrwtfgrglcklwlvvdyllctssafnvlisyrflsvtravsvraqqgdtravrakm    117
hH4RTM      f-ewdfgkeicvfwltdydlctasvynivlisyrflsvnavsvrtqhtgvlkivt1m    117
              .* :* : * :: * : .*:* .:..:.. ** : * : * . :

hH1RTM      lgawflsfl--wvipilgnwhfmqgts-vrredkcetdfydvtwfkvmtainfylvptll    176
hH2RTM      vliwvisitlsflsihlgwnsrnetskgnhttskckvqvn--evyglvdglvtfylvpli    177
hH3RTM      llvwvlafllly-gpailsweylsggs--sipeghcyaeffynwyflitastlefftppfls    174
hH4RTM      vavwvlaf1vn-gpmilvseswk-----degsecepffsewylaitstflefvipvil    170
              : *.:.: * : ..* . . : * * :

hH1RTM      mlwfyakiyavrqhcqhrelinrslpsfseiklrpenpk-gdakppgkespwevlkrkp    235
hH2RTM      mcityyrifkvardqakri-----nhis-----                200
hH3RTM      vtffnlisiylniqrrtrrlrldgarea-----agpepppeaqpspppppgcwgvcwqkgh    227
hH4RTM      vayfnmniywslwkrhdhlsrcqshp-----gl----tav----ssnicghsf----    209
              : * : : :

hH1RTM      kdagggsvlkspsqtpkemkspvvsqeddrevdklycpldiehmqaaaegssrdyvav    295
hH2RTM      -----                200
hH3RTM      -----ge-----amplhrygvgeaavgaeag----            248
hH4RTM      -----rgrlss-----                215

hH1RTM      nrshgqlktdeqglnthgaseisedqmlgdsqsfstrdsdtttetapggkklrsgsntg-    354
hH2RTM      -----                200
hH3RTM      ---eatlggg-----ggggsvaspt-----sssgsss----rgrterprslkrsgkpsa    289
hH4RTM      ---rrsls-----astevpa-----sf---hs---erqrrksslmfsrtrkm    248

hH1RTM      ----ldyikftwkr1rshsrqyvsglhmnrerkaakqlgfimaafilcwipyfiffmvia    410
hH2RTM      -----swka-----atirehkatvtlaavmgafiicwfpfyftafvyrg    238
hH3RTM      ssaslekrmkm-----vsqsftqrflsrdrkvakslavivsifglcwapytllmiira    343
hH4RTM      nsntiaskmgsfsqsdsvalhgrehvellrarlkslail1gvfavcwapyslftivls    308
              * :: : *. :.:. * :* * * : .

hH1RTM      fc-k-nccnehlhmftiwlgyinstlnpliypl-- 441
hH2RTM      lrgd-dainevleai1v1wlgysansalnpi1ya--- 269
hH3RTM      achg-hcvpdywetsf1llwansavn1vlyplch 377
hH4RTM      fyssatgpk1svw1ria1fw1lq1w1fns1fvn1pllyplch 343
              . : * * : * * : * * : *

```

Percent Identity Matrix - created by Clustal2.1

1: hH1RTM	100.00	35.85	28.49	25.15
2: hH2RTM	35.85	100.00	28.08	25.48
3: hH3RTM	28.49	28.08	100.00	43.28
4: hH4RTM	25.15	25.48	43.28	100.00

Literaturverzeichnis

- (2009). 6.5 Antihistaminika. In *Anästhesiologische Pharmakotherapie*, H. Thiel, and N. Roewer, eds. (Stuttgart: Georg Thieme Verlag).
- A. Lundbæk, J., and Andersen, O. (2012). Cholesterol Regulation of Membrane Protein Function by Changes in Bilayer Physical Properties-An Energetic Perspective.
- Abdul-Majeed, S., and Nauli, S.M. (2011). Dopamine receptor type 5 in the primary cilia has dual chemo- and mechano-sensory roles. *Hypertension* *58*, 325-331.
- Adachi, N., Hess, D.T., McLaughlin, P., and Stamler, J.S. (2016). S-Palmitoylation of a Novel Site in the beta2-Adrenergic Receptor Associated with a Novel Intracellular Itinerary. *J Biol Chem* *291*, 20232-20246.
- Adams, S.R., and Tsien, R.Y. (2008). Preparation of the membrane-permeant biarsenicals FIAsh-EDT2 and ReAsh-EDT2 for fluorescent labeling of tetracysteine-tagged proteins. *Nat Protoc* *3*, 1527-1534.
- Adjobo-Hermans, M.J., Goedhart, J., van Weeren, L., Nijmeijer, S., Manders, E.M., Offermanns, S., and Gadella, T.W., Jr. (2011). Real-time visualization of heterotrimeric G protein Gq activation in living cells. *BMC Biol* *9*, 32.
- Ahn, K.H., Nishiyama, A., Mierke, D.F., and Kendall, D.A. (2010). Hydrophobic residues in helix 8 of cannabinoid receptor 1 are critical for structural and functional properties. *Biochemistry* *49*, 502-511.
- Ai, H.W., Henderson, J.N., Remington, S.J., and Campbell, R.E. (2006). Directed evolution of a monomeric, bright and photostable version of *Clavularia cyan* fluorescent protein: structural characterization and applications in fluorescence imaging. *Biochem J* *400*, 531-540.
- Aizawa, N., Ichihara, K., Fukuhara, H., Fujimura, T., Andersson, K.E., Homma, Y., and Igawa, Y. (2017). Characteristics of the mechanosensitive bladder afferent activities in relation with microcontractions in male rats with bladder outlet obstruction. *Sci Rep* *7*, 7646.
- Akazawa, H., Yasuda, N., and Komuro, I. (2009). Mechanisms and functions of agonist-independent activation in the angiotensin II type 1 receptor. *Mol Cell Endocrinol* *302*, 140-147.
- Akbarzadeh, A., Rezaei-Sadabady, R., Davaran, S., Joo, S.W., Zarghami, N., Hanifehpour, Y., Samiei, M., Kouhi, M., and Nejati-Koshki, K. (2013). Liposome: classification, preparation, and applications. *Nanoscale Res Lett* *8*, 102-102.
- Alcaino, C., Farrugia, G., and Beyder, A. (2017). Mechanosensitive Piezo Channels in the Gastrointestinal Tract. *Curr Top Membr* *79*, 219-244.
- Alenghat, F.J., and Ingber, D.E. (2002). Mechanotransduction: all signals point to cytoskeleton, matrix, and integrins. *Sci STKE* *2002*, pe6.
- Alexander, S.P., Christopoulos, A., Davenport, A.P., Kelly, E., Marrion, N.V., Peters, J.A., Faccenda, E., Harding, S.D., Pawson, A.J., Sharman, J.L., *et al.* (2017). THE CONCISE GUIDE TO PHARMACOLOGY 2017/18: G protein-coupled receptors. *Br J Pharmacol* *174 Suppl 1*, S17-S129.
- Alexiev, U. (2013). Dynamics of Helix 8 in GPCR Function. In *Encyclopedia of Biophysics*, G.C.K. Roberts, ed. (Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg), pp. 549-552.
- Amano, M., Mukai, H., Ono, Y., Chihara, K., Matsui, T., Hamajima, Y., Okawa, K., Iwamatsu, A., and Kaibuchi, K. (1996). Identification of a putative target for Rho as the serine-threonine kinase protein kinase N. *Science* *271*, 648-650.

- Anantharaman, V., Abhiman, S., de Souza, R.F., and Aravind, L. (2011). Comparative genomics uncovers novel structural and functional features of the heterotrimeric GTPase signaling system. *Gene* 475, 63-78.
- Anavi-Goffer, S., Fleischer, D., Hurst, D.P., Lynch, D.L., Barnett-Norris, J., Shi, S., Lewis, D.L., Mukhopadhyay, S., Howlett, A.C., Reggio, P.H., *et al.* (2007). Helix 8 Leu in the CB1 cannabinoid receptor contributes to selective signal transduction mechanisms. *J Biol Chem* 282, 25100-25113.
- Andersen, O.S., and Koepppe, R.E., 2nd (2007). Bilayer thickness and membrane protein function: an energetic perspective. *Annu Rev Biophys Biomol Struct* 36, 107-130.
- Andersson, K., Chen, D., Mattsson, H., Sundler, F., and Hakanson, R. (1998). Physiological significance of ECL-cell histamine. *Yale J Biol Med* 71, 183-193.
- Ango, F., Prézeau, L., Muller, T., Tu, J.C., Xiao, B., Worley, P.F., Pin, J.P., Bockaert, J., and Fagni, L. (2001). Agonist-independent activation of metabotropic glutamate receptors by the intracellular protein Homer. *Nature* 411, 962-965.
- Anishkin, A., Loukin, S.H., Teng, J., and Kung, C. (2014). Feeling the hidden mechanical forces in lipid bilayer is an original sense. *Proc Natl Acad Sci U S A* 111, 7898-7905.
- Antonescu, C.N., Aguet, F., Danuser, G., and Schmid, S.L. (2011). Phosphatidylinositol-(4,5)-biphosphate regulates clathrin-coated pit initiation, stabilization, and size. *Mol Biol Cell* 22, 2588-2600.
- Arac, D., Boucard, A.A., Bolliger, M.F., Nguyen, J., Soltis, S.M., Sudhof, T.C., and Brunger, A.T. (2012). A novel evolutionarily conserved domain of cell-adhesion GPCRs mediates autoproteolysis. *EMBO J* 31, 1364-1378.
- Aratake, Y., Okuno, T., Matsunobu, T., Saeki, K., Takayanagi, R., Furuya, S., and Yokomizo, T. (2012). Helix 8 of leukotriene B4 receptor 1 inhibits ligand-induced internalization. *FASEB J* 26, 4068-4078.
- Arnadottir, J., and Chalfie, M. (2010). Eukaryotic mechanosensitive channels. *Annu Rev Biophys* 39, 111-137.
- Arnaut, M.A., Mahalingam, B., and Xiong, J.P. (2005). Integrin structure, allostery, and bidirectional signaling. *Annu Rev Cell Dev Biol* 21, 381-410.
- Arrang, J.M., Garbarg, M., Lancelot, J.C., Lecomte, J.M., Pollard, H., Robba, M., Schunack, W., and Schwartz, J.C. (1987). Highly potent and selective ligands for histamine H3-receptors. *Nature* 327, 117-123.
- Arrang, J.M., Garbarg, M., and Schwartz, J.C. (1983). Auto-inhibition of brain histamine release mediated by a novel class (H3) of histamine receptor. *Nature* 302, 832-837.
- Arshavsky, V.Y., Lamb, T.D., and Pugh, E.N., Jr. (2002). G proteins and phototransduction. *Annu Rev Physiol* 64, 153-187.
- Ash, A.S., and Schild, H.O. (1966). Receptors mediating some actions of histamine. *Br J Pharmacol Chemother* 27, 427-439.
- Ashmore, J.F. (1991). The electrophysiology of hair cells. *Annu Rev Physiol* 53, 465-476.
- Aspenstrom, P. (2010). Formin-binding proteins: modulators of formin-dependent actin polymerization. *Biochim Biophys Acta* 1803, 174-182.
- Atherton, P., Stutchbury, B., Jethwa, D., and Ballestrem, C. (2016). Mechanosensitive components of integrin adhesions: Role of vinculin. *Exp Cell Res* 343, 21-27.
- Attwood, T.K., and Findlay, J.B. (1993). Design of a discriminating fingerprint for G-protein-coupled receptors. *Protein Eng* 6, 167-176.

- Attwood, T.K., and Findlay, J.B. (1994). Fingerprinting G-protein-coupled receptors. *Protein Eng* 7, 195-203.
- Bae, C.D., Min, D.S., Fleming, I.N., and Exton, J.H. (1998). Determination of interaction sites on the small G protein RhoA for phospholipase D. *J Biol Chem* 273, 11596-11604.
- Bae, J.H., Rubini, M., Jung, G., Wiegand, G., Seifert, M.H., Azim, M.K., Kim, J.S., Zumbusch, A., Holak, T.A., Moroder, L., *et al.* (2003). Expansion of the genetic code enables design of a novel "gold" class of green fluorescent proteins. *J Mol Biol* 328, 1071-1081.
- Bagriantsev, S.N., Gracheva, E.O., and Gallagher, P.G. (2014). Piezo proteins: regulators of mechanosensation and other cellular processes. *J Biol Chem* 289, 31673-31681.
- Bai, K., and Wang, W. (2012). Spatio-temporal development of the endothelial glycocalyx layer and its mechanical property in vitro. *J R Soc Interface* 9, 2290-2298.
- Bakker, R.A., Jongejan, A., Sansuk, K., Hacksell, U., Timmerman, H., Brann, M.R., Weiner, D.M., Pardo, L., and Leurs, R. (2008). Constitutively active mutants of the histamine H1 receptor suggest a conserved hydrophobic asparagine-cage that constrains the activation of class A G protein-coupled receptors. *Mol Pharmacol* 73, 94-103.
- Bakker, R.A., Schoonus, S.B., Smit, M.J., Timmerman, H., and Leurs, R. (2001). Histamine H(1)-receptor activation of nuclear factor-kappa B: roles for G beta gamma- and G alpha(q/11)-subunits in constitutive and agonist-mediated signaling. *Mol Pharmacol* 60, 1133-1142.
- Bakker, R.A., Weiner, D.M., ter Laak, T., Beuming, T., Zuiderveld, O.P., Edelbroek, M., Hacksell, U., Timmerman, H., Brann, M.R., and Leurs, R. (2004). 8R-lisuride is a potent stereospecific histamine H1-receptor partial agonist. *Mol Pharmacol* 65, 538-549.
- Bakker, R.A., Wieland, K., Timmerman, H., and Leurs, R. (2000). Constitutive activity of the histamine H(1) receptor reveals inverse agonism of histamine H(1) receptor antagonists. *Eur J Pharmacol* 387, R5-7.
- Ballesteros, J.A., and Weinstein, H. (1995). [19] Integrated methods for the construction of three-dimensional models and computational probing of structure-function relations in G protein-coupled receptors. In *Methods in Neurosciences*, S.C. Sealfon, ed. (Academic Press), pp. 366-428.
- Balleza, D. (2012). Mechanical properties of lipid bilayers and regulation of mechanosensitive function: from biological to biomimetic channels. *Channels (Austin)* 6, 220-233.
- Bandaru, S., Marri, V.K., Kasera, P., Kovuri, P., Girdhar, A., Mittal, D.R., Ikram, S., Gv, R., and Nayarisseri, A. (2014). Structure based virtual screening of ligands to identify cysteinyl leukotriene receptor 1 antagonist. *Bioinformation* 10, 652-657.
- Bangham, A.D., Hill, M.W., and Miller, N.G.A. (1974). Preparation and Use of Liposomes as Models of Biological Membranes. In *Methods in Membrane Biology: Volume 1*, E.D. Korn, ed. (Boston, MA: Springer US), pp. 1-68.
- Barauna, V.G., Magalhaes, F.C., Campos, L.C., Reis, R.I., Kunapuli, S.P., Costa-Neto, C.M., Miyakawa, A.A., and Krieger, J.E. (2013). Shear stress-induced Ang II AT1 receptor activation: G-protein dependent and independent mechanisms. *Biochem Biophys Res Commun* 434, 647-652.
- Barnes, W.G., and Hough, L.B. (2002). Membrane-bound histamine N-methyltransferase in mouse brain: possible role in the synaptic inactivation of neuronal histamine. *J Neurochem* 82, 1262-1271.

- Barry, A.K., Wang, N., and Leckband, D.E. (2015). Local VE-cadherin mechanotransduction triggers long-ranged remodeling of endothelial monolayers. *J Cell Sci* 128, 1341-1351.
- Bass, R.B., Strop, P., Barclay, M., and Rees, D.C. (2002). Crystal structure of *Escherichia coli* MscS, a voltage-modulated and mechanosensitive channel. *Science* 298, 1582-1587.
- Bayliss, W.M. (1902). On the local reactions of the arterial wall to changes of internal pressure. *J Physiol* 28, 220-231.
- Beall, G.N., and Vanarsdel, P.P., Jr. (1961). Histamine metabolism. *Calif Med* 95, 237-238.
- Beech, D.J., and Xiao, B. (2018). Piezo channel mechanisms in health and disease. *J Physiol* 596, 965-967.
- Ben-Chaim, Y., Chanda, B., Dascal, N., Bezanilla, F., Parnas, I., and Parnas, H. (2006). Movement of 'gating charge' is coupled to ligand binding in a G-protein-coupled receptor. *Nature* 444, 106-109.
- Benavides, J., Schoemaker, H., Dana, C., Claustre, Y., Delahaye, M., Prouteau, M., Manoury, P., Allen, J., Scatton, B., Langer, S.Z., *et al.* (1995). In vivo and in vitro interaction of the novel selective histamine H1 receptor antagonist mizolastine with H1 receptors in the rodent. *Arzneimittelforschung* 45, 551-558.
- Benovic, J.L., Kuhn, H., Weyand, I., Codina, J., Caron, M.G., and Lefkowitz, R.J. (1987). Functional desensitization of the isolated beta-adrenergic receptor by the beta-adrenergic receptor kinase: potential role of an analog of the retinal protein arrestin (48-kDa protein). *Proc Natl Acad Sci U S A* 84, 8879-8882.
- Berman, D.M., Wilkie, T.M., and Gilman, A.G. (1996). GAIP and RGS4 are GTPase-activating proteins for the Gi subfamily of G protein alpha subunits. *Cell* 86, 445-452.
- Berman, H.M., Westbrook, J., Feng, Z., Gilliland, G., Bhat, T.N., Weissig, H., Shindyalov, I.N., and Bourne, P.E. (2000). The Protein Data Bank. *Nucleic Acids Research* 28, 235-242.
- Berridge, M.J. (1984). Inositol trisphosphate and diacylglycerol as second messengers. *Biochem J* 220, 345-360.
- Berridge, M.J. (2009). Inositol trisphosphate and calcium signalling mechanisms. *Biochim Biophys Acta* 1793, 933-940.
- Berridge, M.J., and Irvine, R.F. (1984). Inositol trisphosphate, a novel second messenger in cellular signal transduction. *Nature* 312, 315-321.
- Berrier, C., Pozza, A., de Lacroix de Lavalette, A., Chardonnet, S., Mesneau, A., Jaxel, C., le Maire, M., and Ghazi, A. (2013). The purified mechanosensitive channel TREK-1 is directly sensitive to membrane tension. *J Biol Chem* 288, 27307-27314.
- Bersi, M.R., Khosravi, R., Wujciak, A.J., Harrison, D.G., and Humphrey, J.D. (2017). Differential cell-matrix mechanoadaptations and inflammation drive regional propensities to aortic fibrosis, aneurysm or dissection in hypertension. *J R Soc Interface* 14.
- Berstein, G., Blank, J.L., Jhon, D.Y., Exton, J.H., Rhee, S.G., and Ross, E.M. (1992). Phospholipase C-beta 1 is a GTPase-activating protein for Gq/11, its physiologic regulator. *Cell* 70, 411-418.
- Bertero, T., Oldham, W.M., Cottrill, K.A., Pisano, S., Vanderpool, R.R., Yu, Q., Zhao, J., Tai, Y., Tang, Y., Zhang, Y.Y., *et al.* (2016). Vascular stiffness mechanoactivates YAP/TAZ-dependent glutaminolysis to drive pulmonary hypertension. *J Clin Invest* 126, 3313-3335.

- Besada, P., Shin, D.H., Costanzi, S., Ko, H., Mathe, C., Gagneron, J., Gosselin, G., Maddileti, S., Harden, T.K., and Jacobson, K.A. (2006). Structure-activity relationships of uridine 5'-diphosphate analogues at the human P2Y6 receptor. *J Med Chem* *49*, 5532-5543.
- Bevan, J.A., and Laher, I. (1991). Pressure and flow-dependent vascular tone. *FASEB J* *5*, 2267-2273.
- Biel, M., and Michalakis, S. (2009). Cyclic Nucleotide-Gated Channels. In *cGMP: Generators, Effectors and Therapeutic Implications*, H.H.H.W. Schmidt, F. Hofmann, and J.-P. Stasch, eds. (Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg), pp. 111-136.
- Binder, H.J., and Donaldson, R.M., Jr. (1978). Effect of cimetidine on intrinsic factor and pepsin secretion in man. *Gastroenterology* *74*, 371-375.
- Birk, A., Rinne, A., and Bunemann, M. (2015). Membrane Potential Controls the Efficacy of Catecholamine-induced beta1-Adrenoceptor Activity. *J Biol Chem* *290*, 27311-27320.
- Birnboim, H.C., and Doly, J. (1979). A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucleic Acids Res* *7*, 1513-1523.
- Bishop, A.L., and Hall, A. (2000). Rho GTPases and their effector proteins. *Biochem J* *348 Pt 2*, 241-255.
- Black, J.W., Duncan, W.A., Durant, C.J., Ganellin, C.R., and Parsons, E.M. (1972). Definition and antagonism of histamine H₂-receptors. *Nature* *236*, 385-390.
- Black, J.W., and Ganellin, C.R. (1974). Naming of substituted histamines. *Experientia* *30*, 111-113.
- Blodow, S., Schneider, H., Storch, U., Wizemann, R., Forst, A.L., Gudermann, T., and Mederos y Schnitzler, M. (2014). Novel role of mechanosensitive AT1B receptors in myogenic vasoconstriction. *Pflugers Arch* *466*, 1343-1353.
- Bloodworth, N.C., West, J.D., and Merryman, W.D. (2015). Microvessel mechanobiology in pulmonary arterial hypertension: cause and effect. *Hypertension* *65*, 483-489.
- Boc, A., Diallo, A.B., and Makarenkov, V. (2012). T-REX: a web server for inferring, validating and visualizing phylogenetic trees and networks. *Nucleic Acids Res* *40*, W573-579.
- Bockaert, J., and Pin, J.P. (1999). Molecular tinkering of G protein-coupled receptors: an evolutionary success. *EMBO J* *18*, 1723-1729.
- Bokoch, G.M., Katada, T., Northup, J.K., Ui, M., and Gilman, A.G. (1984). Purification and properties of the inhibitory guanine nucleotide-binding regulatory component of adenylate cyclase. *J Biol Chem* *259*, 3560-3567.
- Boom, R., Sol, C.J., Salimans, M.M., Jansen, C.L., Wertheim-van Dillen, P.M., and van der Noordaa, J. (1990). Rapid and simple method for purification of nucleic acids. *J Clin Microbiol* *28*, 495-503.
- Booth, I.R., Miller, S., Muller, A., and Lehtovirta-Morley, L. (2015). The evolution of bacterial mechanosensitive channels. *Cell Calcium* *57*, 140-150.
- Bootman, M.D. (2012). Calcium signaling. *Cold Spring Harb Perspect Biol* *4*, a011171.
- Borroto-Escuela, D.O., Garcia-Negredo, G., Garriga, P., Fuxe, K., and Ciruela, F. (2010). The M(5) muscarinic acetylcholine receptor third intracellular loop regulates receptor function and oligomerization. *Biochim Biophys Acta* *1803*, 813-825.
- Bos, J.L., Rehmann, H., and Wittinghofer, A. (2007). GEFs and GAPs: critical elements in the control of small G proteins. *Cell* *129*, 865-877.

- Bosanac, I., Michikawa, T., Mikoshiba, K., and Ikura, M. (2004). Structural insights into the regulatory mechanism of IP3 receptor. *Biochim Biophys Acta* 1742, 89-102.
- Bosma, R., van den Bor, J., Vischer, H.F., Labeaga, L., and Leurs, R. (2018). The long duration of action of the second generation antihistamine bilastine coincides with its long residence time at the histamine H1 receptor. *Eur J Pharmacol* 838, 107-111.
- Bosma, R., Witt, G., Vaas, L.A.I., Josimovic, I., Gribbon, P., Vischer, H.F., Gul, S., and Leurs, R. (2017). The Target Residence Time of Antihistamines Determines Their Antagonism of the G Protein-Coupled Histamine H1 Receptor. *Front Pharmacol* 8, 667.
- Boucrot, E., Saffarian, S., Massol, R., Kirchhausen, T., and Ehrlich, M. (2006). Role of lipids and actin in the formation of clathrin-coated pits. *Exp Cell Res* 312, 4036-4048.
- Boules, M., Li, Z., Smith, K., Fredrickson, P., and Richelson, E. (2013). Diverse roles of neurotensin agonists in the central nervous system. *Front Endocrinol (Lausanne)* 4, 36.
- Boureau, A., Vignal, E., Faure, S., and Fort, P. (2007). Evolution of the Rho family of ras-like GTPases in eukaryotes. *Mol Biol Evol* 24, 203-216.
- Boyden, S.E., Desai, A., Cruse, G., Young, M.L., Bolan, H.C., Scott, L.M., Eisch, A.R., Long, R.D., Lee, C.C., Satorius, C.L., *et al.* (2016). Vibratory Urticaria Associated with a Missense Variant in ADGRE2. *N Engl J Med* 374, 656-663.
- Brakeman, P.R., Lanahan, A.A., O'Brien, R., Roche, K., Barnes, C.A., Haganir, R.L., and Worley, P.F. (1997). Homer: a protein that selectively binds metabotropic glutamate receptors. *Nature* 386, 284-288.
- Breitmaier, E., and Jung, G. (2012). 29 Photoreaktionen. In *Organische Chemie*, E. Breitmaier, and G. Jung, eds. (Georg Thieme Verlag).
- Brenner, S.L., and Korn, E.D. (1980). The effects of cytochalasins on actin polymerization and actin ATPase provide insights into the mechanism of polymerization. *J Biol Chem* 255, 841-844.
- Brohawn, S.G. (2015). How ion channels sense mechanical force: insights from mechanosensitive K2P channels TRAAK, TREK1, and TREK2. *Ann N Y Acad Sci* 1352, 20-32.
- Brohawn, S.G., del Marmol, J., and MacKinnon, R. (2012). Crystal structure of the human K2P TRAAK, a lipid- and mechano-sensitive K⁺ ion channel. *Science* 335, 436-441.
- Brohawn, S.G., Su, Z., and MacKinnon, R. (2014). Mechanosensitivity is mediated directly by the lipid membrane in TRAAK and TREK1 K⁺ channels. *Proc Natl Acad Sci U S A* 111, 3614-3619.
- Brown, K., Filuta, A., Ludwig, M.G., Seuwen, K., Jaros, J., Vidal, S., Arora, K., Naren, A.P., Kandasamy, K., Parthasarathi, K., *et al.* (2017). Epithelial Gpr116 regulates pulmonary alveolar homeostasis via Gq/11 signaling. *JCI Insight* 2.
- Bruno, A., Costantino, G., de Fabritiis, G., Pastor, M., and Selent, J. (2012). Membrane-sensitive conformational states of helix 8 in the metabotropic Glu2 receptor, a class C GPCR. *PLoS One* 7, e42023.
- Bruysters, M., Jongejan, A., Akdemir, A., Bakker, R.A., and Leurs, R. (2005a). A G(q/11)-coupled mutant histamine H(1) receptor F435A activated solely by synthetic ligands (RASSL). *J Biol Chem* 280, 34741-34746.
- Bruysters, M., Jongejan, A., Gillard, M., van de Manakker, F., Bakker, R.A., Chatelain, P., and Leurs, R. (2005b). Pharmacological differences between human and guinea pig histamine H1 receptors: Asn84 (2.61) as key residue within an additional binding pocket in the H1 receptor. *Mol Pharmacol* 67, 1045-1052.

- Bruysters, M., Pertz, H.H., Teunissen, A., Bakker, R.A., Gillard, M., Chatelain, P., Schunack, W., Timmerman, H., and Leurs, R. (2004). Mutational analysis of the histamine H1-receptor binding pocket of histaprodifens. *Eur J Pharmacol* *487*, 55-63.
- Bryant, F.R. (1988). Construction of a recombinase-deficient mutant recA protein that retains single-stranded DNA-dependent ATPase activity. *J Biol Chem* *263*, 8716-8723.
- Bubb, M.R., Senderowicz, A.M., Sausville, E.A., Duncan, K.L., and Korn, E.D. (1994). Jaspilkinolide, a cytotoxic natural product, induces actin polymerization and competitively inhibits the binding of phalloidin to F-actin. *J Biol Chem* *269*, 14869-14871.
- Bubb, M.R., Spector, I., Beyer, B.B., and Fosen, K.M. (2000). Effects of jaspilkinolide on the kinetics of actin polymerization. An explanation for certain in vivo observations. *J Biol Chem* *275*, 5163-5170.
- Buhl, A.M., Johnson, N.L., Dhanasekaran, N., and Johnson, G.L. (1995). G alpha 12 and G alpha 13 stimulate Rho-dependent stress fiber formation and focal adhesion assembly. *J Biol Chem* *270*, 24631-24634.
- Bunemann, M., Frank, M., and Lohse, M.J. (2003). Gi protein activation in intact cells involves subunit rearrangement rather than dissociation. *Proc Natl Acad Sci U S A* *100*, 16077-16082.
- Burger, E.H., and Klein-Nulend, J. (1999). Mechanotransduction in bone--role of the lacuno-canalicular network. *FASEB J* *13 Suppl*, S101-112.
- Burger, K. (2000). Cholesterin und Progesteron: Modulatoren G-Protein-gekoppelter Signaltransduktionswege (Mainz: Johannes Gutenberg-Universität).
- Burridge, K., and Guilluy, C. (2016). Focal adhesions, stress fibers and mechanical tension. *Exp Cell Res* *343*, 14-20.
- Butler, P.J., Norwich, G., Weinbaum, S., and Chien, S. (2001). Shear stress induces a time- and position-dependent increase in endothelial cell membrane fluidity. *Am J Physiol Cell Physiol* *280*, C962-969.
- Byron, A., and Frame, M.C. (2016). Adhesion protein networks reveal functions proximal and distal to cell-matrix contacts. *Curr Opin Cell Biol* *39*, 93-100.
- Cahill, T.J., 3rd, Thomsen, A.R., Tarrasch, J.T., Plouffe, B., Nguyen, A.H., Yang, F., Huang, L.Y., Kahsai, A.W., Bassoni, D.L., Gavino, B.J., *et al.* (2017). Distinct conformations of GPCR-beta-arrestin complexes mediate desensitization, signaling, and endocytosis. *Proc Natl Acad Sci U S A* *114*, 2562-2567.
- Calderwood, D.A., Campbell, I.D., and Critchley, D.R. (2013). Talins and kindlins: partners in integrin-mediated adhesion. *Nat Rev Mol Cell Biol* *14*, 503-517.
- Calligaris, D., Verdier-Pinard, P., Devred, F., Villard, C., Braguer, D., and Lafitte, D. (2010). Microtubule targeting agents: from biophysics to proteomics. *Cell Mol Life Sci* *67*, 1089-1104.
- Campbell, I.D., and Humphries, M.J. (2011). Integrin structure, activation, and interactions. *Cold Spring Harb Perspect Biol* *3*.
- Camps, M., Carozzi, A., Schnabel, P., Scheer, A., Parker, P.J., and Gierschik, P. (1992a). Isozyme-selective stimulation of phospholipase C-beta 2 by G protein beta gamma-subunits. *Nature* *360*, 684-686.
- Camps, M., Hou, C., Sidiropoulos, D., Stock, J.B., Jakobs, K.H., and Gierschik, P. (1992b). Stimulation of phospholipase C by guanine-nucleotide-binding protein beta gamma subunits. *Eur J Biochem* *206*, 821-831.

- Candelario, J., and Chachisvilis, M. (2012). Mechanical Stress Stimulates Conformational Changes in 5-Hydroxytryptamine Receptor 1B in Bone Cells. *Cellular and Molecular Bioengineering* 5, 277-286.
- Cang, X., Yang, L., Yang, J., Luo, C., Zheng, M., Yu, K., Yang, H., and Jiang, H. (2014). Cholesterol-beta1 AR interaction versus cholesterol-beta2 AR interaction. *Proteins* 82, 760-770.
- Cantor, R.S. (1997). The lateral pressure profile in membranes: a physical mechanism of general anesthesia. *Biochemistry* 36, 2339-2344.
- Carbonetti, N.H. (2010). Pertussis toxin and adenylate cyclase toxin: key virulence factors of *Bordetella pertussis* and cell biology tools. *Future Microbiol* 5, 455-469.
- Carpenter, B., Nehme, R., Warne, T., Leslie, A.G., and Tate, C.G. (2016). Structure of the adenosine A(2A) receptor bound to an engineered G protein. *Nature* 536, 104-107.
- Casali, N. (2003). *Escherichia coli* host strains. *Methods Mol Biol* 235, 27-48.
- Case, L.B., and Waterman, C.M. (2015). Integration of actin dynamics and cell adhesion by a three-dimensional, mechanosensitive molecular clutch. *Nat Cell Biol* 17, 955-963.
- Cates, M.S., Berry, M.B., Ho, E.L., Li, Q., Potter, J.D., and Phillips, G.N., Jr. (1999). Metal-ion affinity and specificity in EF-hand proteins: coordination geometry and domain plasticity in parvalbumin. *Structure* 7, 1269-1278.
- Chabin, R.M., and Hastie, S.B. (1989). Association of thiocolchicine with tubulin. *Biochem Biophys Res Commun* 161, 544-550.
- Chachisvilis, M., Zhang, Y.L., and Frangos, J.A. (2006). G protein-coupled receptors sense fluid shear stress in endothelial cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103, 15463-15468.
- Chang, G., Spencer, R.H., Lee, A.T., Barclay, M.T., and Rees, D.C. (1998). Structure of the MscL homolog from *Mycobacterium tuberculosis*: a gated mechanosensitive ion channel. *Science* 282, 2220-2226.
- Chaudhuri, A.R., Seetharamalu, P., Schwarz, P.M., Hausheer, F.H., and Luduena, R.F. (2000). The interaction of the B-ring of colchicine with alpha-tubulin: a novel footprinting approach. *J Mol Biol* 303, 679-692.
- Chemin, J., Patel, A.J., Duprat, F., Lauritzen, I., Lazdunski, M., and Honore, E. (2005). A phospholipid sensor controls mechanogating of the K⁺ channel TREK-1. *EMBO J* 24, 44-53.
- Chen, C.C., and Wong, C.W. (2013). Neurosensory mechanotransduction through acid-sensing ion channels. *J Cell Mol Med* 17, 337-349.
- Chen, C.S., Tan, J., and Tien, J. (2004). Mechanotransduction at cell-matrix and cell-cell contacts. *Annu Rev Biomed Eng* 6, 275-302.
- Chen, H., Qu, J., Huang, X., Kurundkar, A., Zhu, L., Yang, N., Venado, A., Ding, Q., Liu, G., Antony, V.B., *et al.* (2016). Mechanosensing by the alpha6-integrin confers an invasive fibroblast phenotype and mediates lung fibrosis. *Nat Commun* 7, 12564.
- Chen, Y., Bharill, S., Isacoff, E.Y., and Chalfie, M. (2015). Subunit composition of a DEG/ENaC mechanosensory channel of *Caenorhabditis elegans*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 112, 11690-11695.
- Cheng, L.E., Song, W., Looger, L.L., Jan, L.Y., and Jan, Y.N. (2010). The role of the TRP channel NompC in *Drosophila* larval and adult locomotion. *Neuron* 67, 373-380.
- Cheng, R.K.Y., Segala, E., Robertson, N., Deflorian, F., Doré, A.S., Errey, J.C., Fiez-Vandal, C., Marshall, F.H., and Cooke, R.M. (2017). Structures of Human A1 and A2A Adenosine Receptors with Xanthenes Reveal Determinants of Selectivity. *Structure* 25, 1275-1285.e1274.

- 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., *et al.* (2007). High-resolution crystal structure of an engineered human beta2-adrenergic G protein-coupled receptor. *Science* *318*, 1258-1265.
- Chini, B., and Parenti, M. (2004). G-protein coupled receptors in lipid rafts and caveolae: how, when and why do they go there? *J Mol Endocrinol* *32*, 325-338.
- Chini, B., and Parenti, M. (2009). G-protein-coupled receptors, cholesterol and palmitoylation: facts about fats. *J Mol Endocrinol* *42*, 371-379.
- Chistiakov, D.A., Orekhov, A.N., and Bobryshev, Y.V. (2016). Endothelial PECAM-1 and its function in vascular physiology and atherogenic pathology. *Exp Mol Pathol* *100*, 409-415.
- Cho, S., Irianto, J., and Discher, D.E. (2017). Mechanosensing by the nucleus: From pathways to scaling relationships. *J Cell Biol* *216*, 305-315.
- Choudhury, G.G., Banerjee, A., Bhattacharyya, B., and Biswas, B.B. (1983). Interaction of colchicine analogues with purified tubulin. *FEBS Lett* *161*, 55-59.
- Christensen, A.P., and Corey, D.P. (2007). TRP channels in mechanosensation: direct or indirect activation? *Nat Rev Neurosci* *8*, 510-521.
- Christopoulos, A., Changeux, J.P., Catterall, W.A., Fabbro, D., Burris, T.P., Cidowski, J.A., Olsen, R.W., Peters, J.A., Neubig, R.R., Pin, J.P., *et al.* (2014). International Union of Basic and Clinical Pharmacology. XC. multisite pharmacology: recommendations for the nomenclature of receptor allosterism and allosteric ligands. *Pharmacol Rev* *66*, 918-947.
- Chrzanowska-Wodnicka, M., and Burridge, K. (1996). Rho-stimulated contractility drives the formation of stress fibers and focal adhesions. *J Cell Biol* *133*, 1403-1415.
- Clapham, D.E., and Neer, E.J. (1997). G protein beta gamma subunits. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* *37*, 167-203.
- Claussen, J., Hildebrandt, N., and Medintz, I. (2013). FRET - Förster Resonance Energy Transfer: From Theory to Applications.
- Clegg, R.M. (2009). Chapter 1 Förster resonance energy transfer—FRET what is it, why do it, and how it's done. In *Laboratory Techniques in Biochemistry and Molecular Biology* (Elsevier), pp. 1-57.
- Clement, M., Cabana, J., Holleran, B.J., Leduc, R., Guillemette, G., Lavigne, P., and Escher, E. (2009). Activation induces structural changes in the liganded angiotensin II type 1 receptor. *J Biol Chem* *284*, 26603-26612.
- Cocco, L., Follo, M.Y., Manzoli, L., and Suh, P.G. (2015). Phosphoinositide-specific phospholipase C in health and disease. *J Lipid Res* *56*, 1853-1860.
- Cody, C.W., Prasher, D.C., Westler, W.M., Prendergast, F.G., and Ward, W.W. (1993). Chemical structure of the hexapeptide chromophore of the Aequorea green-fluorescent protein. *Biochemistry* *32*, 1212-1218.
- Coleman, R.A., Humphrey, P.P., Kennedy, I., Levy, G.P., and Lumley, P. (1981). Comparison of the actions of U-46619, a prostaglandin H₂-analogue, with those of prostaglandin H₂ and thromboxane A₂ on some isolated smooth muscle preparations. *Br J Pharmacol* *73*, 773-778.
- Collamati, A., Martone, A.M., Poscia, A., Brandi, V., Celi, M., Marzetti, E., Cherubini, A., and Landi, F. (2016). Anticholinergic drugs and negative outcomes in the older population: from biological plausibility to clinical evidence. *Aging Clin Exp Res* *28*, 25-35.

- Congreve, M., Andrews, S.P., Doré, A.S., Hollenstein, K., Hurrell, E., Langmead, C.J., Mason, J.S., Ng, I.W., Tehan, B., Zhukov, A., *et al.* (2012). Discovery of 1,2,4-Triazine Derivatives as Adenosine A2A Antagonists using Structure Based Drug Design. *Journal of Medicinal Chemistry* *55*, 1898-1903.
- Conway, D.E., Breckenridge, M.T., Hinde, E., Gratton, E., Chen, C.S., and Schwartz, M.A. (2013). Fluid shear stress on endothelial cells modulates mechanical tension across VE-cadherin and PECAM-1. *Curr Biol* *23*, 1024-1030.
- Coon, B.G., Baeyens, N., Han, J., Budatha, M., Ross, T.D., Fang, J.S., Yun, S., Thomas, J.L., and Schwartz, M.A. (2015). Intramembrane binding of VE-cadherin to VEGFR2 and VEGFR3 assembles the endothelial mechanosensory complex. *J Cell Biol* *208*, 975-986.
- Cooper, J.A. (1987). Effects of cytochalasin and phalloidin on actin. *J Cell Biol* *105*, 1473-1478.
- Cordova-Sintjago, T.C., Fang, L., Bruysters, M., Leurs, R., and Booth, R.G. (2012). Molecular determinants of ligand binding at the human histamine H1 receptor: Site-directed mutagenesis results analyzed with ligand docking and molecular dynamics studies at H1 homology and crystal structure models. *J Chem Pharm Res* *4*, 2937-2951.
- Corey, D.P., and Garcia-Anoveros, J. (1996). Mechanosensation and the DEG/ENaC ion channels. *Science* *273*, 323-324.
- Corpeno Kalamgi, R., Salah, H., Gastaldello, S., Martinez-Redondo, V., Ruas, J.L., Fury, W., Bai, Y., Gromada, J., Sartori, R., Guttridge, D.C., *et al.* (2016). Mechano-signalling pathways in an experimental intensive critical illness myopathy model. *J Physiol* *594*, 4371-4388.
- Coste, B., Mathur, J., Schmidt, M., Earley, T.J., Ranade, S., Petrus, M.J., Dubin, A.E., and Patapoutian, A. (2010). Piezo1 and Piezo2 are essential components of distinct mechanically activated cation channels. *Science* *330*, 55-60.
- Coste, B., Xiao, B., Santos, J.S., Syeda, R., Grandl, J., Spencer, K.S., Kim, S.E., Schmidt, M., Mathur, J., Dubin, A.E., *et al.* (2012). Piezo proteins are pore-forming subunits of mechanically activated channels. *Nature* *483*, 176-181.
- Coue, M., Brenner, S.L., Spector, I., and Korn, E.D. (1987). Inhibition of actin polymerization by latrunculin A. *FEBS Lett* *213*, 316-318.
- Courbebaisse, M., Leroy, C., Bakouh, N., Salaun, C., Beck, L., Grandchamp, B., Planelles, G., Hall, R.A., Friedlander, G., and Prie, D. (2012). A new human NHERF1 mutation decreases renal phosphate transporter NPT2a expression by a PTH-independent mechanism. *PLoS One* *7*, e34764.
- Coureux, P.D., Sweeney, H.L., and Houdusse, A. (2004). Three myosin V structures delineate essential features of chemo-mechanical transduction. *EMBO J* *23*, 4527-4537.
- Cowin, S.C. (2002). Mechanosensation and fluid transport in living bone. *J Musculoskelet Neuronal Interact* *2*, 256-260.
- Cramer, L.P. (1999). Role of actin-filament disassembly in lamellipodium protrusion in motile cells revealed using the drug jasplakinolide. *Curr Biol* *9*, 1095-1105.
- Criado, P.R., Criado, R.F., Maruta, C.W., and Machado Filho, C. (2010). Histamine, histamine receptors and antihistamines: new concepts. *An Bras Dermatol* *85*, 195-210.
- Critchley, D.R., and Gingras, A.R. (2008). Talin at a glance. *J Cell Sci* *121*, 1345-1347.
- Curry, F.E., and Adamson, R.H. (2012). Endothelial glycocalyx: permeability barrier and mechanosensor. *Ann Biomed Eng* *40*, 828-839.

- Davies, M.N., Secker, A., Freitas, A.A., Mendao, M., Timmis, J., and Flower, D.R. (2007). On the hierarchical classification of G protein-coupled receptors. *Bioinformatics* *23*, 3113-3118.
- Davies, P.F. (2009). Hemodynamic shear stress and the endothelium in cardiovascular pathophysiology. *Nat Clin Pract Cardiovasc Med* *6*, 16-26.
- Davis, M.J., and Hill, M.A. (1999). Signaling mechanisms underlying the vascular myogenic response. *Physiol Rev* *79*, 387-423.
- Day, P.W., Rasmussen, S.G., Parnot, C., Fung, J.J., Masood, A., Kobilka, T.S., Yao, X.J., Choi, H.J., Weis, W.I., Rohrer, D.K., *et al.* (2007). A monoclonal antibody for G protein-coupled receptor crystallography. *Nat Methods* *4*, 927-929.
- Day, R.N., and Davidson, M.W. (2009). The fluorescent protein palette: tools for cellular imaging. *Chem Soc Rev* *38*, 2887-2921.
- De Backer, M.D., Loonen, I., Verhasselt, P., Neefs, J.M., and Luyten, W.H. (1998). Structure of the human histamine H1 receptor gene. *Biochem J* *335* (Pt 3), 663-670.
- de Graaf, C., Kooistra, A.J., Vischer, H.F., Katritch, V., Kuijter, M., Shiroishi, M., Iwata, S., Shimamura, T., Stevens, R.C., de Esch, I.J., *et al.* (2011). Crystal structure-based virtual screening for fragment-like ligands of the human histamine H(1) receptor. *J Med Chem* *54*, 8195-8206.
- de Kruijff, P., Lim, H.D., Roumen, L., Renjaan, V.A., Zhao, J., Webb, M.L., Auld, D.S., Wijkman, J.C., Zaman, G.J., Smit, M.J., *et al.* (2011). Identification of a novel allosteric binding site in the CXCR2 chemokine receptor. *Mol Pharmacol* *80*, 1108-1118.
- de Meyer, F., and Smit, B. (2009). Effect of cholesterol on the structure of a phospholipid bilayer. *Proc Natl Acad Sci U S A* *106*, 3654-3658.
- de Rooij, J., Zwartkruis, F.J., Verheijen, M.H., Cool, R.H., Nijman, S.M., Wittinghofer, A., and Bos, J.L. (1998). Epac is a Rap1 guanine-nucleotide-exchange factor directly activated by cyclic AMP. *Nature* *396*, 474-477.
- Dedman, A., Sharif-Naeini, R., Folgering, J.H., Duprat, F., Patel, A., and Honore, E. (2009). The mechano-gated K(2P) channel TREK-1. *Eur Biophys J* *38*, 293-303.
- Dekel, N., Priest, M.F., Parnas, H., Parnas, I., and Bezanilla, F. (2012). Depolarization induces a conformational change in the binding site region of the M2 muscarinic receptor. *Proc Natl Acad Sci U S A* *109*, 285-290.
- del Cuvillo, A., Sastre, J., Montoro, J., Jauregui, I., Davila, I., Ferrer, M., Bartra, J., Mullol, J., and Valero, A. (2009). Allergic conjunctivitis and H1 antihistamines. *J Investig Allergol Clin Immunol* *19 Suppl 1*, 11-18.
- dela Paz, N.G., and D'Amore, P.A. (2009). Arterial versus venous endothelial cells. *Cell Tissue Res* *335*, 5-16.
- Dela Paz, N.G., and Frangos, J.A. (2019). Rapid flow-induced activation of Galphaq/11 is independent of Piezo1 activation. *Am J Physiol Cell Physiol* *316*, C741-C752.
- Dela Paz, N.G., Melchior, B., and Frangos, J.A. (2017). Shear stress induces Galphaq/11 activation independently of G protein-coupled receptor activation in endothelial cells. *Am J Physiol Cell Physiol* *312*, C428-C437.
- dela Paz, N.G., Melchior, B., Shayo, F.Y., and Frangos, J.A. (2014). Heparan sulfates mediate the interaction between platelet endothelial cell adhesion molecule-1 (PECAM-1) and the Galphaq/11 subunits of heterotrimeric G proteins. *J Biol Chem* *289*, 7413-7424.
- Delling, M., Wischmeyer, E., Dityatev, A., Sytnyk, V., Veh, R.W., Karschin, A., and Schachner, M. (2002). The neural cell adhesion molecule regulates cell-surface delivery

of G-protein-activated inwardly rectifying potassium channels via lipid rafts. *J Neurosci* **22**, 7154-7164.

Delos Santos, N.M., Gardner, L.A., White, S.W., and Bahouth, S.W. (2006). Characterization of the residues in helix 8 of the human beta1-adrenergic receptor that are involved in coupling the receptor to G proteins. *J Biol Chem* **281**, 12896-12907.

Dessauer, C.W., Tesmer, J.J., Sprang, S.R., and Gilman, A.G. (1998). Identification of a G α binding site on type V adenylyl cyclase. *J Biol Chem* **273**, 25831-25839.

Deupi, X., and Kobilka, B. (2007). Activation of G protein-coupled receptors. *Adv Protein Chem* **74**, 137-166.

Deupi, X., and Standfuss, J. (2011). Structural insights into agonist-induced activation of G-protein-coupled receptors. *Curr Opin Struct Biol* **21**, 541-551.

DeVree, B.T., Mahoney, J.P., Velez-Ruiz, G.A., Rasmussen, S.G., Kuszak, A.J., Edwald, E., Fung, J.J., Manglik, A., Masureel, M., Du, Y., *et al.* (2016). Allosteric coupling from G protein to the agonist-binding pocket in GPCRs. *Nature* **535**, 182-186.

DeWire, S.M., Ahn, S., Lefkowitz, R.J., and Shenoy, S.K. (2007). Beta-arrestins and cell signaling. *Annu Rev Physiol* **69**, 483-510.

Dickenson, J.M., and Hill, S.J. (1991). Histamine-stimulated increases in intracellular calcium in the smooth muscle cell line, DDT1MF-2. *Biochem Pharmacol* **42**, 1545-1550.

Dieffenbach, P.B., Maracle, M., Tschumperlin, D.J., and Fredenburgh, L.E. (2018). Mechanobiological Feedback in Pulmonary Vascular Disease. *Front Physiol* **9**, 951.

Doi, M., Murai, I., Kunisue, S., Setsu, G., Uchio, N., Tanaka, R., Kobayashi, S., Shimatani, H., Hayashi, H., Chao, H.W., *et al.* (2016). Gpr176 is a Gz-linked orphan G-protein-coupled receptor that sets the pace of circadian behaviour. *Nat Commun* **7**, 10583.

Donnellan, P.D., Kimbembe, C.C., Reid, H.M., and Kinsella, B.T. (2011). Identification of a novel endoplasmic reticulum export motif within the eighth alpha-helical domain (alpha-H8) of the human prostacyclin receptor. *Biochim Biophys Acta* **1808**, 1202-1218.

Donthamsetti, P., Quejada, J.R., Javitch, J.A., Gurevich, V.V., and Lambert, N.A. (2015). Using Bioluminescence Resonance Energy Transfer (BRET) to Characterize Agonist-Induced Arrestin Recruitment to Modified and Unmodified G Protein-Coupled Receptors. *Curr Protoc Pharmacol* **70**, 2 14 11-14.

Doré, Andrew S., Robertson, N., Errey, James C., Ng, I., Hollenstein, K., Tehan, B., Hurrell, E., Bennett, K., Congreve, M., Magnani, F., *et al.* (2011). Structure of the Adenosine A2A Receptor in Complex with ZM241385 and the Xanthines XAC and Caffeine. *Structure* **19**, 1283-1293.

Dowal, L., Sim, D.S., Dilks, J.R., Blair, P., Beaudry, S., Denker, B.M., Koukos, G., Kuliopulos, A., and Flaumenhaft, R. (2011). Identification of an antithrombotic allosteric modulator that acts through helix 8 of PAR1. *Proc Natl Acad Sci U S A* **108**, 2951-2956.

Downes, G.B., and Gautam, N. (1999). The G protein subunit gene families. *Genomics* **62**, 544-552.

Du, J., Wang, X., Li, J., Guo, J., Liu, L., Yan, D., Yang, Y., Li, Z., Zhu, J., and Shen, B. (2016). Increasing TRPV4 expression restores flow-induced dilation impaired in mesenteric arteries with aging. *Sci Rep* **6**, 22780.

du Prel, J.B., Rohrig, B., Hommel, G., and Blettner, M. (2010). Choosing statistical tests: part 12 of a series on evaluation of scientific publications. *Dtsch Arztebl Int* **107**, 343-348.

- Duffy, M.P., and Jacobs, C.R. (2015). Seeing the unseen: cell strain and mechanosensing. *Biophys J* 108, 1583-1584.
- Dunn, H.A., and Ferguson, S.S. (2015). PDZ Protein Regulation of G Protein-Coupled Receptor Trafficking and Signaling Pathways. *Mol Pharmacol* 88, 624-639.
- Dupont, S., Morsut, L., Aragona, M., Enzo, E., Giulitti, S., Cordenonsi, M., Zanconato, F., Le Digabel, J., Forcato, M., Bicciato, S., *et al.* (2011). Role of YAP/TAZ in mechanotransduction. *Nature* 474, 179-183.
- Dux, M., Schwenger, N., and Messlinger, K. (2002). Possible role of histamine (H1- and H2-) receptors in the regulation of meningeal blood flow. *Br J Pharmacol* 137, 874-880.
- Eddy, M.T., Lee, M.-Y., Gao, Z.-G., White, K.L., Didenko, T., Horst, R., Audet, M., Stanczak, P., McClary, K.M., Han, G.W., *et al.* (2018). Allosteric Coupling of Drug Binding and Intracellular Signaling in the A2A Adenosine Receptor. *Cell* 172, 68-80.e12.
- Efimova, S.S., Medvedev, R.Y., Schagina, L.V., and Ostroumova, O.S. (2016). An increase in model lipid membrane fluidity as a result of local anesthetic action. *Cell and Tissue Biology* 10, 324-331.
- Eijkelkamp, N., Quick, K., and Wood, J.N. (2013). Transient receptor potential channels and mechanosensation. *Annu Rev Neurosci* 36, 519-546.
- Emanuel, M.B. (1999). Histamine and the antiallergic antihistamines: a history of their discoveries. *Clin Exp Allergy* 29 Suppl 3, 1-11; discussion 12.
- Erxleben, C. (1989). Stretch-activated current through single ion channels in the abdominal stretch receptor organ of the crayfish. *J Gen Physiol* 94, 1071-1083.
- Esbenshade, T.A., Browman, K.E., Bitner, R.S., Strakhova, M., Cowart, M.D., and Brioni, J.D. (2008). The histamine H3 receptor: an attractive target for the treatment of cognitive disorders. *Br J Pharmacol* 154, 1166-1181.
- Etienne-Manneville, S., and Hall, A. (2002). Rho GTPases in cell biology. *Nature* 420, 629-635.
- Exton, J.H. (1996). Regulation of phosphoinositide phospholipases by hormones, neurotransmitters, and other agonists linked to G proteins. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 36, 481-509.
- Eyckmans, J., Boudou, T., Yu, X., and Chen, C.S. (2011). A hitchhiker's guide to mechanobiology. *Dev Cell* 21, 35-47.
- Fabienne, M., Marie, E., Asma, F., and Hélène, P. (2016). Engineering fluorescent proteins towards ultimate performances: lessons from the newly developed cyan variants. *Methods and Applications in Fluorescence* 4, 012001.
- Fam, S.R., Paquet, M., Castleberry, A.M., Oller, H., Lee, C.J., Traynelis, S.F., Smith, Y., Yun, C.C., and Hall, R.A. (2005). P2Y1 receptor signaling is controlled by interaction with the PDZ scaffold NHERF-2. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102, 8042-8047.
- Fantini, J., and Barrantes, F.J. (2013). How cholesterol interacts with membrane proteins: an exploration of cholesterol-binding sites including CRAC, CARC, and tilted domains. *Front Physiol* 4, 31.
- Faussner, A., Bauer, A., Kalatskaya, I., Schussler, S., Seidl, C., Proud, D., and Jochum, M. (2005). The role of helix 8 and of the cytosolic C-termini in the internalization and signal transduction of B(1) and B(2) bradykinin receptors. *FEBS J* 272, 129-140.
- Feierler, J., Wirth, M., Welte, B., Schussler, S., Jochum, M., and Faussner, A. (2011). Helix 8 plays a crucial role in bradykinin B(2) receptor trafficking and signaling. *J Biol Chem* 286, 43282-43293.

- Feinberg, S.M. (1946). Histamine antagonists; summary of developments in nonspecific inhibition of histamine, anaphylaxis, and allergy. *J Allergy* 17, 217-230.
- Fenalti, G., Giguere, P.M., Katritch, V., Huang, X.P., Thompson, A.A., Cherezov, V., Roth, B.L., and Stevens, R.C. (2014). Molecular control of delta-opioid receptor signalling. *Nature* 506, 191-196.
- Ferguson, S.S. (2001). Evolving concepts in G protein-coupled receptor endocytosis: the role in receptor desensitization and signaling. *Pharmacol Rev* 53, 1-24.
- Fimia, G.M., and Sassone-Corsi, P. (2001). Cyclic AMP signalling. *J Cell Sci* 114, 1971-1972.
- Findlay, J.B., Donnelly, D., Bhogal, N., Hurrell, C., and Attwood, T.K. (1993). Structure of G-protein-linked receptors. *Biochem Soc Trans* 21, 869-873.
- Fitzsimons, C.P., Monczor, F., Fernandez, N., Shayo, C., and Davio, C. (2004). Mepyramine, a histamine H1 receptor inverse agonist, binds preferentially to a G protein-coupled form of the receptor and sequesters G protein. *J Biol Chem* 279, 34431-34439.
- Flanagan, C.A., and Manilall, A. (2017). Gonadotropin-Releasing Hormone (GnRH) Receptor Structure and GnRH Binding. *Front Endocrinol (Lausanne)* 8, 274.
- Flanagan, M.D., and Lin, S. (1980). Cytochalasins block actin filament elongation by binding to high affinity sites associated with F-actin. *J Biol Chem* 255, 835-838.
- Flock, T., Ravarani, C.N., Sun, D., Venkatakrisnan, A.J., Kayikci, M., Tate, C.G., Veprintsev, D.B., and Babu, M.M. (2015). Universal allosteric mechanism for Galpha activation by GPCRs. *Nature* 524, 173-179.
- Florian, J.A., Kosky, J.R., Ainslie, K., Pang, Z., Dull, R.O., and Tarbell, J.M. (2003). Heparan sulfate proteoglycan is a mechanosensor on endothelial cells. *Circ Res* 93, e136-142.
- Flower, D.R. (1999). Modelling G-protein-coupled receptors for drug design. *Biochim Biophys Acta* 1422, 207-234.
- Forman, J.R., Qamar, S., Paci, E., Sandford, R.N., and Clarke, J. (2005). The remarkable mechanical strength of polycystin-1 supports a direct role in mechanotransduction. *J Mol Biol* 349, 861-871.
- Forst, A.L., Olteanu, V.S., Mollet, G., Wlodkowski, T., Schaefer, F., Dietrich, A., Reiser, J., Gudermann, T., Mederos y Schnitzler, M., and Storch, U. (2016). Podocyte Purinergic P2X4 Channels Are Mechanotransducers That Mediate Cytoskeletal Disorganization. *J Am Soc Nephrol* 27, 848-862.
- Förster, T. (1948). Zwischenmolekulare Energiewanderung und Fluoreszenz. *Annalen der Physik* 437, 55-75.
- Francis, H., Glaser, S., Demorrow, S., Gaudio, E., Ueno, Y., Venter, J., Dostal, D., Onori, P., Franchitto, A., Marziani, M., *et al.* (2008). Small mouse cholangiocytes proliferate in response to H1 histamine receptor stimulation by activation of the IP3/CaMK I/CREB pathway. *Am J Physiol Cell Physiol* 295, C499-513.
- Fredj, A., Pasquier, H., Demachy, I., Jonasson, G., Levy, B., Derrien, V., Bousmah, Y., Manoussaris, G., Wien, F., Ridard, J., *et al.* (2012). The single T65S mutation generates brighter cyan fluorescent proteins with increased photostability and pH insensitivity. *PLoS One* 7, e49149.
- Fredrickson, P., Boules, M., and Richelson, E. (2014). Neurotensin agonists in the regulation of food intake. *Int J Obes (Lond)* 38, 474.

- 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., and Schioth, H.B. (2005). The repertoire of G-protein-coupled receptors in fully sequenced genomes. *Mol Pharmacol* *67*, 1414-1425.
- Fredriksson, S., Gullberg, M., Jarvius, J., Olsson, C., Pietras, K., Gustafsdottir, S.M., Ostman, A., and Landegren, U. (2002). Protein detection using proximity-dependent DNA ligation assays. *Nat Biotechnol* *20*, 473-477.
- Freedman, N.J., Liggett, S.B., Drachman, D.E., Pei, G., Caron, M.G., and Lefkowitz, R.J. (1995). Phosphorylation and desensitization of the human beta 1-adrenergic receptor. Involvement of G protein-coupled receptor kinases and cAMP-dependent protein kinase. *J Biol Chem* *270*, 17953-17961.
- Fritze, O., Filipek, S., Kuksa, V., Palczewski, K., Hofmann, K.P., and Ernst, O.P. (2003). Role of the conserved NPxxY(x)5,6F motif in the rhodopsin ground state and during activation. *Proc Natl Acad Sci U S A* *100*, 2290-2295.
- Fronius, M., and Clauss, W.G. (2008). Mechano-sensitivity of ENaC: may the (shear) force be with you. *Pflügers Archiv - European Journal of Physiology* *455*, 775-785.
- Fukuhara, S., Chikumi, H., and Gutkind, J.S. (2001). RGS-containing RhoGEFs: the missing link between transforming G proteins and Rho? *Oncogene* *20*, 1661-1668.
- Fukui, H., Fujimoto, K., Mizuguchi, H., Sakamoto, K., Horio, Y., Takai, S., Yamada, K., and Ito, S. (1994). Molecular cloning of the human histamine H1 receptor gene. *Biochem Biophys Res Commun* *201*, 894-901.
- Fukushima, Y., Saitoh, T., Anai, M., Ogihara, T., Inukai, K., Funaki, M., Sakoda, H., Onishi, Y., Ono, H., Fujishiro, M., *et al.* (2001). Palmitoylation of the canine histamine H2 receptor occurs at Cys(305) and is important for cell surface targeting. *Biochim Biophys Acta* *1539*, 181-191.
- Gacasan, S., Baker, D., and Parrill, A. (2017). G protein-coupled receptors: the evolution of structural insight, Vol 4.
- Gaietta, G., Deerinck, T.J., Adams, S.R., Bouwer, J., Tour, O., Laird, D.W., Sosinsky, G.E., Tsien, R.Y., and Ellisman, M.H. (2002). Multicolor and electron microscopic imaging of connexin trafficking. *Science* *296*, 503-507.
- Garcia-Anoveros, J., and Corey, D.P. (1997). The molecules of mechanosensation. *Annu Rev Neurosci* *20*, 567-594.
- Garcia-Diez, R., Gollwitzer, C., Krumrey, M., and Varga, Z. (2016). Size Determination of a Liposomal Drug by Small-Angle X-ray Scattering Using Continuous Contrast Variation. *Langmuir* *32*, 772-778.
- Garcia-Galvez, A.M., and Arias-Montano, J.A. (2016). [Isoforms of the human histamine H3 receptor: Generation, expression in the central nervous system and functional implications]. *Gac Med Mex* *152*, 94-102.
- García-Nafría, J., Lee, Y., Bai, X., Carpenter, B., and Tate, C.G. (2018a). Cryo-EM structure of the adenosine A2A receptor coupled to an engineered heterotrimeric G protein. *eLife* *7*, e35946.
- García-Nafría, J., Nehmé, R., Edwards, P.C., and Tate, C.G. (2018b). Cryo-EM structure of the serotonin 5-HT1B receptor coupled to heterotrimeric Go. *Nature* *558*, 620-623.
- Gardella, T.J., and Vilardaga, J.P. (2015). International Union of Basic and Clinical Pharmacology. XCIII. The parathyroid hormone receptors--family B G protein-coupled receptors. *Pharmacol Rev* *67*, 310-337.

- Gaus, K., Zech, T., and Harder, T. (2006). Visualizing membrane microdomains by Laurdan 2-photon microscopy (Review). *Molecular Membrane Biology* *23*, 41-48.
- Gavard, J. (2014). Endothelial permeability and VE-cadherin: a wacky comradeship. *Cell Adh Migr* *8*, 158-164.
- Gehret, A.U., Jones, B.W., Tran, P.N., Cook, L.B., Greuber, E.K., and Hinkle, P.M. (2010). Role of helix 8 of the thyrotropin-releasing hormone receptor in phosphorylation by G protein-coupled receptor kinase. *Mol Pharmacol* *77*, 288-297.
- Geier, G.E., and Modrich, P. (1979). Recognition sequence of the dam methylase of *Escherichia coli* K12 and mode of cleavage of Dpn I endonuclease. *J Biol Chem* *254*, 1408-1413.
- Gentry, P.R., Sexton, P.M., and Christopoulos, A. (2015). Novel Allosteric Modulators of G Protein-coupled Receptors. *J Biol Chem* *290*, 19478-19488.
- Germond, A., Fujita, H., Ichimura, T., and Watanabe, T.M. (2016). Design and development of genetically encoded fluorescent sensors to monitor intracellular chemical and physical parameters. *Biophys Rev* *8*, 121-138.
- Gillard, M., Van Der Perren, C., Moguilevsky, N., Massingham, R., and Chatelain, P. (2002). Binding characteristics of cetirizine and levocetirizine to human H(1) histamine receptors: contribution of Lys(191) and Thr(194). *Mol Pharmacol* *61*, 391-399.
- Gillespie, P.G., and Muller, U. (2009). Mechanotransduction by hair cells: models, molecules, and mechanisms. *Cell* *139*, 33-44.
- Gilman, A.G. (1984a). G proteins and dual control of adenylate cyclase. *Cell* *36*, 577-579.
- Gilman, A.G. (1984b). G proteins and dual control of adenylate cyclase. *Cell* *36*, 577-579.
- Ginsburg, R., Bristow, M.R., Stinson, E.B., and Harrison, D.C. (1980). Histamine receptors in the human heart. *Life Sci* *26*, 2245-2249.
- Givens, C., and Tzima, E. (2016). Endothelial Mechanosignaling: Does One Sensor Fit All? *Antioxid Redox Signal* *25*, 373-388.
- Gluzman, Y. (1981). SV40-transformed simian cells support the replication of early SV40 mutants. *Cell* *23*, 175-182.
- Goddard, A.D., and Watts, A. (2012). Regulation of G protein-coupled receptors by palmitoylation and cholesterol. *BMC Biol* *10*, 27.
- Goddette, D.W., and Frieden, C. (1986a). Actin polymerization. The mechanism of action of cytochalasin D. *J Biol Chem* *261*, 15974-15980.
- Goddette, D.W., and Frieden, C. (1986b). The kinetics of cytochalasin D binding to monomeric actin. *J Biol Chem* *261*, 15970-15973.
- Goddette, D.W., Uberbacher, E.C., Bunick, G.J., and Frieden, C. (1986). Formation of actin dimers as studied by small angle neutron scattering. *J Biol Chem* *261*, 2605-2609.
- Goedhart, J., von Stetten, D., Noirclerc-Savoye, M., Lelimosin, M., Joosen, L., Hink, M.A., van Weeren, L., Gadella, T.W., Jr., and Royant, A. (2012). Structure-guided evolution of cyan fluorescent proteins towards a quantum yield of 93%. *Nat Commun* *3*, 751.
- Gonzalez, G.A., and Montminy, M.R. (1989). Cyclic AMP stimulates somatostatin gene transcription by phosphorylation of CREB at serine 133. *Cell* *59*, 675-680.

- Goodman, O.B., Jr., Krupnick, J.G., Santini, F., Gurevich, V.V., Penn, R.B., Gagnon, A.W., Keen, J.H., and Benovic, J.L. (1996). Beta-arrestin acts as a clathrin adaptor in endocytosis of the beta2-adrenergic receptor. *Nature* *383*, 447-450.
- Goridis, C. (2017). Physiology: Mechanosensor of lung inflation identified. *Nature* *541*, 165-166.
- Goto, K., Doi, M., Wang, T., Kunisue, S., Murai, I., and Okamura, H. (2017). G-protein-coupled receptor signaling through Gpr176, Gz, and RGS16 tunes time in the center of the circadian clock [Review]. *Endocr J* *64*, 571-579.
- Granier, S., Kim, S., Shafer, A.M., Ratnala, V.R., Fung, J.J., Zare, R.N., and Kobilka, B. (2007). Structure and conformational changes in the C-terminal domain of the beta2-adrenoceptor: insights from fluorescence resonance energy transfer studies. *J Biol Chem* *282*, 13895-13905.
- Grant, S.G., Jessee, J., Bloom, F.R., and Hanahan, D. (1990). Differential plasmid rescue from transgenic mouse DNAs into *Escherichia coli* methylation-restriction mutants. *Proc Natl Acad Sci U S A* *87*, 4645-4649.
- Green, J.P., Prell, G.D., Khandelwal, J.K., and Blandina, P. (1987). Aspects of histamine metabolism. *Agents Actions* *22*, 1-15.
- Griffin, B.A., Adams, S.R., and Tsien, R.Y. (1998). Specific covalent labeling of recombinant protein molecules inside live cells. *Science* *281*, 269-272.
- Grundmann, M., Merten, N., Malfacini, D., Inoue, A., Preis, P., Simon, K., Ruttiger, N., Ziegler, N., Benkel, T., Schmitt, N.K., *et al.* (2018). Lack of beta-arrestin signaling in the absence of active G proteins. *Nat Commun* *9*, 341.
- Grynkiewicz, G., Poenie, M., and Tsien, R.Y. (1985). A new generation of Ca²⁺ indicators with greatly improved fluorescence properties. *J Biol Chem* *260*, 3440-3450.
- Gudermann, T., Kalkbrenner, F., Dippel, E., Laugwitz, K.L., and Schultz, G. (1997). Specificity and complexity of receptor-G-protein interaction. *Adv Second Messenger Phosphoprotein Res* *31*, 253-262.
- Gudermann, T., and Mederos y Schnitzler, M. (2010). Phototransduction: keep an eye out for acid-labile TRPs. *Curr Biol* *20*, R149-152.
- Gudi, S., Huvar, I., White, C.R., McKnight, N.L., Dusserre, N., Boss, G.R., and Frangos, J.A. (2003). Rapid activation of Ras by fluid flow is mediated by G α (q) and G β gamma subunits of heterotrimeric G proteins in human endothelial cells. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* *23*, 994-1000.
- Gullingsrud, J., and Schulten, K. (2004). Lipid bilayer pressure profiles and mechanosensitive channel gating. *Biophys J* *86*, 3496-3509.
- Gurevich, V.V., Dion, S.B., Onorato, J.J., Ptasienski, J., Kim, C.M., Sterne-Marr, R., Hosey, M.M., and Benovic, J.L. (1995). Arrestin interactions with G protein-coupled receptors. Direct binding studies of wild type and mutant arrestins with rhodopsin, beta 2-adrenergic, and m2 muscarinic cholinergic receptors. *J Biol Chem* *270*, 720-731.
- Gurevich, V.V., and Gurevich, E.V. (2015). Arrestins: Critical Players in Trafficking of Many GPCRs. *Prog Mol Biol Transl Sci* *132*, 1-14.
- Gurung, I.S., Martinez-Pinna, J., and Mahaut-Smith, M.P. (2008). Novel consequences of voltage-dependence to G-protein-coupled P2Y1 receptors. *Br J Pharmacol* *154*, 882-889.
- Gutierrez-de-Teran, H., Massink, A., Rodriguez, D., Liu, W., Han, G.W., Joseph, J.S., Katritch, I., Heitman, L.H., Xia, L., Ijzerman, A.P., *et al.* (2013). The role of a sodium ion binding site in the allosteric modulation of the A(2A) adenosine G protein-coupled receptor. *Structure* *21*, 2175-2185.

- Haas, H., and Panula, P. (2003). The role of histamine and the tuberomamillary nucleus in the nervous system. *Nat Rev Neurosci* *4*, 121-130.
- Haas, H.L., Sergeeva, O.A., and Selbach, O. (2008). Histamine in the nervous system. *Physiol Rev* *88*, 1183-1241.
- Haase, K., and Pelling, A.E. (2015). Investigating cell mechanics with atomic force microscopy. *Journal of the Royal Society, Interface* *12*, 20140970-20140970.
- Haga, K., Kruse, A.C., Asada, H., Yurugi-Kobayashi, T., Shiroishi, M., Zhang, C., Weis, W.I., Okada, T., Kobilka, B.K., Haga, T., *et al.* (2012). Structure of the human M2 muscarinic acetylcholine receptor bound to an antagonist. *Nature* *482*, 547-551.
- Hahn, C., and Schwartz, M.A. (2009). Mechanotransduction in vascular physiology and atherogenesis. *Nat Rev Mol Cell Biol* *10*, 53-62.
- Haidekker, M.A., L'Heureux, N., and Frangos, J.A. (2000). Fluid shear stress increases membrane fluidity in endothelial cells: a study with DCVJ fluorescence. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* *278*, H1401-1406.
- Hamdan, F.F., Audet, M., Garneau, P., Pelletier, J., and Bouvier, M. (2005). High-throughput screening of G protein-coupled receptor antagonists using a bioluminescence resonance energy transfer 1-based beta-arrestin2 recruitment assay. *J Biomol Screen* *10*, 463-475.
- Hamill, O.P. (2006). Twenty odd years of stretch-sensitive channels. *Pflugers Arch* *453*, 333-351.
- Hamill, O.P., Marty, A., Neher, E., Sakmann, B., and Sigworth, F.J. (1981). Improved patch-clamp techniques for high-resolution current recording from cells and cell-free membrane patches. *Pflugers Arch* *391*, 85-100.
- Han, B., Bai, X.H., Lodyga, M., Xu, J., Yang, B.B., Keshavjee, S., Post, M., and Liu, M. (2004). Conversion of mechanical force into biochemical signaling. *J Biol Chem* *279*, 54793-54801.
- Hanahan, D. (1983). Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *J Mol Biol* *166*, 557-580.
- Hanahan, D., Jessee, J., and Bloom, F.R. (1991). Plasmid transformation of *Escherichia coli* and other bacteria. *Methods Enzymol* *204*, 63-113.
- Hanna, S., and El-Sibai, M. (2013). Signaling networks of Rho GTPases in cell motility. *Cell Signal* *25*, 1955-1961.
- Hanson, M.A., Cherezov, V., Griffith, M.T., Roth, C.B., Jaakola, V.P., Chien, E.Y., Velasquez, J., Kuhn, P., and Stevens, R.C. (2008). A specific cholesterol binding site is established by the 2.8 Å structure of the human beta2-adrenergic receptor. *Structure* *16*, 897-905.
- Hanson, M.A., Roth, C.B., Jo, E., Griffith, M.T., Scott, F.L., Reinhart, G., Desale, H., Clemons, B., Cahalan, S.M., Schuerer, S.C., *et al.* (2012). Crystal structure of a lipid G protein-coupled receptor. *Science* *335*, 851-855.
- Hanyaloglu, A.C., and von Zastrow, M. (2008). Regulation of GPCRs by endocytic membrane trafficking and its potential implications. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* *48*, 537-568.
- Hao, F., Tan, M., Xu, X., and Cui, M.Z. (2008). Histamine induces Egr-1 expression in human aortic endothelial cells via the H1 receptor-mediated protein kinase Cdelta-dependent ERK activation pathway. *J Biol Chem* *283*, 26928-26936.

- Hao, J., Padilla, F., Dandonneau, M., Lavebratt, C., Lesage, F., Noel, J., and Delmas, P. (2013). Kv1.1 channels act as mechanical brake in the senses of touch and pain. *Neuron* *77*, 899-914.
- Harden, T.K., and Sondek, J. (2006). Regulation of phospholipase C isozymes by ras superfamily GTPases. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* *46*, 355-379.
- Harden, T.K., Waldo, G.L., Hicks, S.N., and Sondek, J. (2011). Mechanism of activation and inactivation of Gq/phospholipase C-beta signaling nodes. *Chem Rev* *111*, 6120-6129.
- Harris, A.R., Jreij, P., and Fletcher, D.A. (2018). Mechanotransduction by the Actin Cytoskeleton: Converting Mechanical Stimuli into Biochemical Signals. *Annual Review of Biophysics* *47*, 617-631.
- Hart, M.J., Jiang, X., Kozasa, T., Roscoe, W., Singer, W.D., Gilman, A.G., Sternweis, P.C., and Bollag, G. (1998). Direct stimulation of the guanine nucleotide exchange activity of p115 RhoGEF by G α 13. *Science* *280*, 2112-2114.
- Hassanzadeh-Ghassabeh, G., Devoogdt, N., De Pauw, P., Vincke, C., and Muyldermans, S. (2013). Nanobodies and their potential applications. *Nanomedicine (Lond)* *8*, 1013-1026.
- Hastie, S.B. (1991). Interactions of colchicine with tubulin. *Pharmacol Ther* *51*, 377-401.
- Hauf, G.F., Roskamm, H., Reindell, H., Hauptmann, S., Holubarsch, C., Keul, J., Poche, R., and Vos, F.P.-d. (1996). Herzinsuffizienz. In *Herzkrankheiten: Pathophysiologie Diagnostik Therapie*, H. Roskamm, and H. Reindell, eds. (Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg), pp. 421-474.
- Hayashi, H., and Miyata, H. (1994). Fluorescence imaging of intracellular Ca²⁺. *J Pharmacol Toxicol Methods* *31*, 1-10.
- Helmke, B.P., Goldman, R.D., and Davies, P.F. (2000). Rapid displacement of vimentin intermediate filaments in living endothelial cells exposed to flow. *Circ Res* *86*, 745-752.
- Hicks, S.N., Jezyk, M.R., Gershburg, S., Seifert, J.P., Harden, T.K., and Sondek, J. (2008). General and versatile autoinhibition of PLC isozymes. *Mol Cell* *31*, 383-394.
- Hide, M., Fukui, H., Watanabe, T., Wada, H., and Yamamoto, S. (1988). Histamine H1-receptor in endothelial and smooth muscle cells of guinea-pig aorta. *Eur J Pharmacol* *148*, 161-169.
- Higashijima, T., Ferguson, K.M., Sternweis, P.C., Smigel, M.D., and Gilman, A.G. (1987). Effects of Mg²⁺ and the beta gamma-subunit complex on the interactions of guanine nucleotides with G proteins. *J Biol Chem* *262*, 762-766.
- Higgins, J.B., and Casey, P.J. (1994). In vitro processing of recombinant G protein gamma subunits. Requirements for assembly of an active beta gamma complex. *J Biol Chem* *269*, 9067-9073.
- Higgins, J.B., and Casey, P.J. (1996). The role of prenylation in G-protein assembly and function. *Cell Signal* *8*, 433-437.
- Hildebrandt, J.D. (1997). Role of subunit diversity in signaling by heterotrimeric G proteins. *Biochem Pharmacol* *54*, 325-339.
- Hildebrandt, J.D., Sekura, R.D., Codina, J., Iyengar, R., Manclark, C.R., and Birnbaumer, L. (1983). Stimulation and inhibition of adenylyl cyclases mediated by distinct regulatory proteins. *Nature* *302*, 706-709.
- Hill-Eubanks, D.C., Gonzales, A.L., Sonkusare, S.K., and Nelson, M.T. (2014). Vascular TRP channels: performing under pressure and going with the flow. *Physiology (Bethesda)* *29*, 343-360.

- Hill, S.J. (1990). Distribution, properties, and functional characteristics of three classes of histamine receptor. *Pharmacol Rev* 42, 45-83.
- Hill, S.J., Ganellin, C.R., Timmerman, H., Schwartz, J.C., Shankley, N.P., Young, J.M., Schunack, W., Levi, R., and Haas, H.L. (1997). International Union of Pharmacology. XIII. Classification of histamine receptors. *Pharmacol Rev* 49, 253-278.
- Hino, T., Arakawa, T., Iwanari, H., Yurugi-Kobayashi, T., Ikeda-Suno, C., Nakada-Nakura, Y., Kusano-Arai, O., Weyand, S., Shimamura, T., Nomura, N., *et al.* (2012). G-protein-coupled receptor inactivation by an allosteric inverse-agonist antibody. *Nature* 482, 237.
- Hirschowitz, B.I., Keeling, D., Lewin, M., Okabe, S., Parsons, M., Sewing, K., Wallmark, B., and Sachs, G. (1995). Pharmacological aspects of acid secretion. *Dig Dis Sci* 40, 3S-23S.
- Hirst, D.J., Lee, T.H., Pattenden, L.K., Thomas, W.G., and Aguilar, M.I. (2015). Helix 8 of the angiotensin- II type 1A receptor interacts with phosphatidylinositol phosphates and modulates membrane insertion. *Sci Rep* 5, 9972.
- Hoffman, B.D., Grashoff, C., and Schwartz, M.A. (2011). Dynamic molecular processes mediate cellular mechanotransduction. *Nature* 475, 316-323.
- Hoffmann, C., Gaietta, G., Bunemann, M., Adams, S.R., Oberdorff-Maass, S., Behr, B., Vilardaga, J.P., Tsien, R.Y., Ellisman, M.H., and Lohse, M.J. (2005). A FIAsh-based FRET approach to determine G protein-coupled receptor activation in living cells. *Nat Methods* 2, 171-176.
- Hoffmann, C., Gaietta, G., Zurn, A., Adams, S.R., Terrillon, S., Ellisman, M.H., Tsien, R.Y., and Lohse, M.J. (2010). Fluorescent labeling of tetracysteine-tagged proteins in intact cells. *Nat Protoc* 5, 1666-1677.
- Hoffmann, C., Nuber, S., Zabel, U., Ziegler, N., Winkler, C., Hein, P., Berlot, C.H., Bunemann, M., and Lohse, M.J. (2012). Comparison of the activation kinetics of the M3 acetylcholine receptor and a constitutively active mutant receptor in living cells. *Mol Pharmacol* 82, 236-245.
- Hoffmann, C., Zurn, A., Bunemann, M., and Lohse, M.J. (2008). Conformational changes in G-protein-coupled receptors-the quest for functionally selective conformations is open. *Br J Pharmacol* 153 Suppl 1, S358-366.
- Hofmann, T., Obukhov, A.G., Schaefer, M., Harteneck, C., Gudermann, T., and Schultz, G. (1999). Direct activation of human TRPC6 and TRPC3 channels by diacylglycerol. *Nature* 397, 259-263.
- Hofstra, C.L., Desai, P.J., Thurmond, R.L., and Fung-Leung, W.P. (2003). Histamine H4 receptor mediates chemotaxis and calcium mobilization of mast cells. *J Pharmacol Exp Ther* 305, 1212-1221.
- Hollenstein, K., Kean, J., Bortolato, A., Cheng, R.K., Dore, A.S., Jazayeri, A., Cooke, R.M., Weir, M., and Marshall, F.H. (2013). Structure of class B GPCR corticotropin-releasing factor receptor 1. *Nature* 499, 438-443.
- Holzinger, A. (2010). Jasplakinolide: An Actin-Specific Reagent that Promotes Actin Polymerization. In *Cytoskeleton Methods and Protocols*, R.H. Gavin, ed. (Totowa, NJ: Humana Press), pp. 71-87.
- Holzinger, A., and Blaas, K. (2016). Actin-Dynamics in Plant Cells: The Function of Actin-Perturbing Substances: Jasplakinolide, Chondramides, Phalloidin, Cytochalasins, and Latrunculins. *Methods Mol Biol* 1365, 243-261.

- Hommers, L.G., Lohse, M.J., and Bunemann, M. (2003). Regulation of the inward rectifying properties of G-protein-activated inwardly rectifying K⁺ (GIRK) channels by Gbeta gamma subunits. *J Biol Chem* *278*, 1037-1043.
- Hoppe, A., Marti-Solano, M., Drabek, M., Bunemann, M., Kolb, P., and Rinne, A. (2018). The allosteric site regulates the voltage sensitivity of muscarinic receptors. *Cell Signal* *42*, 114-126.
- Horvath, B., Hegedus, D., Szapary, L., Marton, Z., Alexy, T., Koltai, K., Czopf, L., Wittmann, I., Juricskay, I., Toth, K., *et al.* (2004). Measurement of von Willebrand factor as the marker of endothelial dysfunction in vascular diseases. *Exp Clin Cardiol* *9*, 31-34.
- Hu, G.M., Mai, T.L., and Chen, C.M. (2017). Visualizing the GPCR Network: Classification and Evolution. *Sci Rep* *7*, 15495.
- Huang, C.L., Slesinger, P.A., Casey, P.J., Jan, Y.N., and Jan, L.Y. (1995). Evidence that direct binding of G beta gamma to the GIRK1 G protein-gated inwardly rectifying K⁺ channel is important for channel activation. *Neuron* *15*, 1133-1143.
- Huang, D.L., Bax, N.A., Buckley, C.D., Weis, W.I., and Dunn, A.R. (2017). Vinculin forms a directionally asymmetric catch bond with F-actin. *Science* *357*, 703-706.
- Huang, J., Chen, S., Zhang, J.J., and Huang, X.Y. (2013). Crystal structure of oligomeric beta1-adrenergic G protein-coupled receptors in ligand-free basal state. *Nat Struct Mol Biol* *20*, 419-425.
- Huang, X., Zheng, G., and Zhan, C.G. (2012). Microscopic binding of M5 muscarinic acetylcholine receptor with antagonists by homology modeling, molecular docking, and molecular dynamics simulation. *J Phys Chem B* *116*, 532-541.
- Huynh, J., Thomas, W.G., Aguilar, M.I., and Pattenden, L.K. (2009). Role of helix 8 in G protein-coupled receptors based on structure-function studies on the type 1 angiotensin receptor. *Mol Cell Endocrinol* *302*, 118-127.
- Hynes, R.O. (2002). Integrins: bidirectional, allosteric signaling machines. *Cell* *110*, 673-687.
- Iliff, A.J., and Xu, X.Z.S. (2018). A Mechanosensitive GPCR that Detects the Bloody Force. *Cell* *173*, 542-544.
- Ilkaeva, O., Kinch, L.N., Paulssen, R.H., and Ross, E.M. (2002). Mutations in the carboxyl-terminal domain of phospholipase C-beta 1 delineate the dimer interface and a potential Galphaq interaction site. *J Biol Chem* *277*, 4294-4300.
- Inglese, J., Freedman, N.J., Koch, W.J., and Lefkowitz, R.J. (1993). Structure and mechanism of the G protein-coupled receptor kinases. *J Biol Chem* *268*, 23735-23738.
- Inoue, H., Nojima, H., and Okayama, H. (1990). High efficiency transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *Gene* *96*, 23-28.
- Inoue, R., Jian, Z., and Kawarabayashi, Y. (2009). Mechanosensitive TRP channels in cardiovascular pathophysiology. *Pharmacol Ther* *123*, 371-385.
- Isberg, V., de Graaf, C., Bortolato, A., Cherezov, V., Katritch, V., Marshall, F.H., Mordalski, S., Pin, J.P., Stevens, R.C., Vriend, G., *et al.* (2015). Generic GPCR residue numbers - aligning topology maps while minding the gaps. *Trends Pharmacol Sci* *36*, 22-31.
- Ivanov, A.A., Ko, H., Cosyn, L., Maddileti, S., Besada, P., Fricks, I., Costanzi, S., Harden, T.K., Calenbergh, S.V., and Jacobson, K.A. (2007). Molecular modeling of the human P2Y2 receptor and design of a selective agonist, 2'-amino-2'-deoxy-2-thiouridine 5'-triphosphate. *J Med Chem* *50*, 1166-1176.

- Jaakola, V.P., Griffith, M.T., Hanson, M.A., Cherezov, V., Chien, E.Y., Lane, J.R., Ijzerman, A.P., and Stevens, R.C. (2008). The 2.6 angstrom crystal structure of a human A2A adenosine receptor bound to an antagonist. *Science* *322*, 1211-1217.
- Jackson, M., Song, W., Liu, M.Y., Jin, L., Dykes-Hoberg, M., Lin, C.I., Bowers, W.J., Federoff, H.J., Sternweis, P.C., and Rothstein, J.D. (2001). Modulation of the neuronal glutamate transporter EAAT4 by two interacting proteins. *Nature* *410*, 89-93.
- Jaffe, A.B., and Hall, A. (2005). Rho GTPases: biochemistry and biology. *Annu Rev Cell Dev Biol* *21*, 247-269.
- Jafurulla, M., Tiwari, S., and Chattopadhyay, A. (2011). Identification of cholesterol recognition amino acid consensus (CRAC) motif in G-protein coupled receptors. *Biochemical and Biophysical Research Communications* *404*, 569-573.
- Jain, R., Watson, U., and Saini, D.K. (2016). ERK activated by Histamine H1 receptor is anti-proliferative through spatial restriction in the cytosol. *Eur J Cell Biol* *95*, 623-634.
- Jalali, S., Li, Y.S., Sotoudeh, M., Yuan, S., Li, S., Chien, S., and Shyy, J.Y. (1998). Shear stress activates p60src-Ras-MAPK signaling pathways in vascular endothelial cells. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* *18*, 227-234.
- Janjic, M.M., Stojilkovic, S.S., and Bjelobaba, I. (2017). Intrinsic and Regulated Gonadotropin-Releasing Hormone Receptor Gene Transcription in Mammalian Pituitary Gonadotrophs. *Front Endocrinol (Lausanne)* *8*, 221.
- Jansen, K.A., Atherton, P., and Ballestrem, C. (2017). Mechanotransduction at the cell-matrix interface. *Semin Cell Dev Biol* *71*, 75-83.
- Jansen, K.A., Donato, D.M., Balcioglu, H.E., Schmidt, T., Danen, E.H., and Koenderink, G.H. (2015). A guide to mechanobiology: Where biology and physics meet. *Biochim Biophys Acta* *1853*, 3043-3052.
- Jarajapu, Y.P., Guberski, D.L., Grant, M.B., and Knot, H.J. (2008). Myogenic tone and reactivity of cerebral arteries in type II diabetic BBZDR/Wor rat. *Eur J Pharmacol* *579*, 298-307.
- Javitch, J.A., Fu, D., Chen, J., and Karlin, A. (1995). Mapping the binding-site crevice of the dopamine D2 receptor by the substituted-cysteine accessibility method. *Neuron* *14*, 825-831.
- Jazayeri, A., Rappas, M., Brown, A.J.H., Kean, J., Errey, J.C., Robertson, N.J., Fiez-Vandal, C., Andrews, S.P., Congreve, M., Bortolato, A., *et al.* (2017). Crystal structure of the GLP-1 receptor bound to a peptide agonist. *Nature* *546*, 254-258.
- Jeanneteau, F., Guillin, O., Diaz, J., Griffon, N., and Sokoloff, P. (2004). GIPC Recruits GAIP (RGS19) To Attenuate Dopamine D2 Receptor Signaling. *Molecular Biology of the Cell* *15*, 4926-4937.
- Jezyk, M.R., Snyder, J.T., Gershberg, S., Worthylake, D.K., Harden, T.K., and Sondek, J. (2006). Crystal structure of Rac1 bound to its effector phospholipase C-beta2. *Nat Struct Mol Biol* *13*, 1135-1140.
- Ji, S., John, S.A., Lu, Y., and Weiss, J.N. (1998). Mechanosensitivity of the cardiac muscarinic potassium channel. A novel property conferred by Kir3.4 subunit. *J Biol Chem* *273*, 1324-1328.
- Jiang, G., Gong, H., Niu, Y., Yang, C., Wang, S., Chen, Z., Ye, Y., Zhou, N., Zhang, G., Ge, J., *et al.* (2015). Identification of Amino Acid Residues in Angiotensin II Type 1 Receptor Sensing Mechanical Stretch and Function in Cardiomyocyte Hypertrophy. *Cell Physiol Biochem* *37*, 105-116.
- Jin, Z.G., Ueba, H., Tanimoto, T., Lungu, A.O., Frame, M.D., and Berk, B.C. (2003). Ligand-independent activation of vascular endothelial growth factor receptor 2 by fluid

shear stress regulates activation of endothelial nitric oxide synthase. *Circ Res* 93, 354-363.

Johnson, B.D., Mather, K.J., and Wallace, J.P. (2011). Mechanotransduction of shear in the endothelium: basic studies and clinical implications. *Vasc Med* 16, 365-377.

Jojoa-Cruz, S., Saotome, K., Murthy, S.E., Tsui, C.C.A., Sansom, M.S., Patapoutian, A., and Ward, A.B. (2018). Cryo-EM structure of the mechanically activated ion channel OSCA1.2. *Elife* 7.

Jones, D.T., and Reed, R.R. (1989). Golf: an olfactory neuron specific-G protein involved in odorant signal transduction. *Science* 244, 790-795.

Jongejan, A., Bruysters, M., Ballesteros, J.A., Haaksma, E., Bakker, R.A., Pardo, L., and Leurs, R. (2005). Linking agonist binding to histamine H1 receptor activation. *Nat Chem Biol* 1, 98-103.

Josephy, P.D., Eling, T., and Mason, R.P. (1982). The horseradish peroxidase-catalyzed oxidation of 3,5,3',5'-tetramethylbenzidine. Free radical and charge-transfer complex intermediates. *J Biol Chem* 257, 3669-3675.

Jung, B., Obinata, H., Galvani, S., Mendelson, K., Ding, B.S., Skoura, A., Kinzel, B., Brinkmann, V., Rafii, S., Evans, T., *et al.* (2012). Flow-regulated endothelial S1P receptor-1 signaling sustains vascular development. *Dev Cell* 23, 600-610.

Jutel, M., Blaser, K., and Akdis, C.A. (2005). Histamine in allergic inflammation and immune modulation. *Int Arch Allergy Immunol* 137, 82-92.

Kadamur, G., and Ross, E.M. (2013). Mammalian phospholipase C. *Annu Rev Physiol* 75, 127-154.

Kalamgi, R.C., and Larsson, L. (2016). Mechanical Signaling in the Pathophysiology of Critical Illness Myopathy. *Front Physiol* 7, 23.

Kamato, D., Mitra, P., Davis, F., Osman, N., Chaplin, R., Cabot, P.J., Afroz, R., Thomas, W., Zheng, W., Kaur, H., *et al.* (2016). Gaq proteins: molecular pharmacology and therapeutic potential. *Cell Mol Life Sci*.

Kang, D.S., Kern, R.C., Puthenveedu, M.A., von Zastrow, M., Williams, J.C., and Benovic, J.L. (2009). Structure of an arrestin2-clathrin complex reveals a novel clathrin binding domain that modulates receptor trafficking. *J Biol Chem* 284, 29860-29872.

Kang, D.S., Tian, X., and Benovic, J.L. (2014). Role of beta-arrestins and arrestin domain-containing proteins in G protein-coupled receptor trafficking. *Curr Opin Cell Biol* 27, 63-71.

Kang, G.J., Getahun, Z., Muzaffar, A., Brossi, A., and Hamel, E. (1990). N-acetylcolchicolin O-methyl ether and thicolchicine, potent analogs of colchicine modified in the C ring. Evaluation of the mechanistic basis for their enhanced biological properties. *J Biol Chem* 265, 10255-10259.

Kang, H., Liu, J., Sun, A., Liu, X., Fan, Y., and Deng, X. (2017). Vascular smooth muscle cell glycocalyx mediates shear stress-induced contractile responses via a Rho kinase (ROCK)-myosin light chain phosphatase (MLCP) pathway. *Sci Rep* 7, 42092.

Karlin, A., and Akabas, M.H. (1998). [8] Substituted-cysteine accessibility method. In *Methods in Enzymology* (Academic Press), pp. 123-145.

Karpinsky-Semper, D., Tayou, J., Levay, K., Schuchardt, B.J., Bhat, V., Volmar, C.H., Farooq, A., and Slepak, V.Z. (2015). Helix 8 and the i3 loop of the muscarinic M3 receptor are crucial sites for its regulation by the Gbeta5-RGS7 complex. *Biochemistry* 54, 1077-1088.

- Katada, T., Bokoch, G.M., Northup, J.K., Ui, M., and Gilman, A.G. (1984a). The inhibitory guanine nucleotide-binding regulatory component of adenylate cyclase. Properties and function of the purified protein. *J Biol Chem* *259*, 3568-3577.
- Katada, T., Northup, J.K., Bokoch, G.M., Ui, M., and Gilman, A.G. (1984b). The inhibitory guanine nucleotide-binding regulatory component of adenylate cyclase. Subunit dissociation and guanine nucleotide-dependent hormonal inhibition. *J Biol Chem* *259*, 3578-3585.
- Katritch, V., Cherezov, V., and Stevens, R.C. (2013). Structure-function of the G protein-coupled receptor superfamily. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* *53*, 531-556.
- Katritch, V., Fenalti, G., Abola, E.E., Roth, B.L., Cherezov, V., and Stevens, R.C. (2014). Allosteric sodium in class A GPCR signaling. *Trends Biochem Sci* *39*, 233-244.
- Katsanos, G.S., Anogianaki, A., Castellani, M.L., Ciampoli, C., De Amicis, D., Orso, C., Pollice, R., Vecchiet, J., Tete, S., Salini, V., *et al.* (2008). Biology of neurotensin: revisited study. *Int J Immunopathol Pharmacol* *21*, 255-259.
- Katz, A., Wu, D., and Simon, M.I. (1992). Subunits beta gamma of heterotrimeric G protein activate beta 2 isoform of phospholipase C. *Nature* *360*, 686-689.
- Kauffman, G., Laher, I., Matrougui, K., Guerineau, N.C., and Henrion, D. (2012). Emerging role of G protein-coupled receptors in microvascular myogenic tone. *Cardiovasc Res* *95*, 223-232.
- Kaufmann, K., Romaine, I., Days, E., Pascual, C., Malik, A., Yang, L., Zou, B., Du, Y., Sliwoski, G., Morrison, R.D., *et al.* (2013). ML297 (VU0456810), the first potent and selective activator of the GIRK potassium channel, displays antiepileptic properties in mice. *ACS Chem Neurosci* *4*, 1278-1286.
- Kaupp, U.B., and Seifert, R. (2002). Cyclic nucleotide-gated ion channels. *Physiol Rev* *82*, 769-824.
- Kawasaki, H., Springett, G.M., Mochizuki, N., Toki, S., Nakaya, M., Matsuda, M., Housman, D.E., and Graybiel, A.M. (1998). A family of cAMP-binding proteins that directly activate Rap1. *Science* *282*, 2275-2279.
- Kay, A.B. (2001). Allergy and allergic diseases. First of two parts. *N Engl J Med* *344*, 30-37.
- Kaya, A.I., Lokits, A.D., Gilbert, J.A., Iverson, T.M., Meiler, J., and Hamm, H.E. (2016). A Conserved Hydrophobic Core in Galphai1 Regulates G Protein Activation and Release from Activated Receptor. *J Biol Chem* *291*, 19674-19686.
- Kaye, R.G., Saldanha, J.W., Lu, Z.L., and Hulme, E.C. (2011). Helix 8 of the M1 muscarinic acetylcholine receptor: scanning mutagenesis delineates a G protein recognition site. *Mol Pharmacol* *79*, 701-709.
- Kazmierczak, P., Sakaguchi, H., Tokita, J., Wilson-Kubalek, E.M., Milligan, R.A., Muller, U., and Kachar, B. (2007). Cadherin 23 and protocadherin 15 interact to form tip-link filaments in sensory hair cells. *Nature* *449*, 87-91.
- Kenakin, T. (2001). Inverse, protean, and ligand-selective agonism: matters of receptor conformation. *FASEB J* *15*, 598-611.
- Kenakin, T. (2017). Theoretical Aspects of GPCR-Ligand Complex Pharmacology. *Chem Rev* *117*, 4-20.
- Kerstein, P.C., Jacques-Fricke, B.T., Rengifo, J., Mogen, B.J., Williams, J.C., Gottlieb, P.A., Sachs, F., and Gomez, T.M. (2013). Mechanosensitive TRPC1 channels promote calpain proteolysis of talin to regulate spinal axon outgrowth. *J Neurosci* *33*, 273-285.

- Kessler, S., Clauss, W.G., and Fronius, M. (2011). Laminar shear stress modulates the activity of heterologously expressed P2X(4) receptors. *Biochim Biophys Acta* *1808*, 2488-2495.
- Khandelwal, J.K., Hough, L.B., and Green, J.P. (1982a). Histamine and some of its metabolites in human body fluids. *Klin Wochenschr* *60*, 914-918.
- Khandelwal, J.K., Hough, L.B., Morrishow, A.M., and Green, J.P. (1982b). Measurement of tele-methylhistamine and histamine in human cerebrospinal fluid, urine, and plasma. *Agents Actions* *12*, 583-590.
- Kierska, D., Fogel, W.A., and Maslinski, C. (1997). Histamine concentration and metabolism in mouse mammary gland during the estrous cycle. *Inflamm Res* *46*, 63-64.
- Kim, J.M., Altenbach, C., Kono, M., Oprian, D.D., Hubbell, W.L., and Khorana, H.G. (2004). Structural origins of constitutive activation in rhodopsin: Role of the K296/E113 salt bridge. *Proc Natl Acad Sci U S A* *101*, 12508-12513.
- Kim, M.K., and Kang, Y.K. (1999). Positional preference of proline in alpha-helices. *Protein Sci* *8*, 1492-1499.
- Kim, S., Chen, J., Cheng, T., Gindulyte, A., He, J., He, S., Li, Q., Shoemaker, B.A., Thiessen, P.A., Yu, B., *et al.* (2019). PubChem 2019 update: improved access to chemical data. *Nucleic Acids Res* *47*, D1102-D1109.
- Kimura, K., Ito, M., Amano, M., Chihara, K., Fukata, Y., Nakafuku, M., Yamamori, B., Feng, J., Nakano, T., Okawa, K., *et al.* (1996). Regulation of myosin phosphatase by Rho and Rho-associated kinase (Rho-kinase). *Science* *273*, 245-248.
- Kirchberg, K., Kim, T.-Y., Möller, M., Skegrod, D., Dasara Raju, G., Granzin, J., Büldt, G., Schlesinger, R., and Alexiev, U. (2011). Conformational dynamics of helix 8 in the GPCR rhodopsin controls arrestin activation in the desensitization process. *Proceedings of the National Academy of Sciences* *108*, 18690-18695.
- Kirchhausen, T., Owen, D., and Harrison, S.C. (2014). Molecular structure, function, and dynamics of clathrin-mediated membrane traffic. *Cold Spring Harb Perspect Biol* *6*, a016725.
- Kiss, R., Kovari, Z., and Keseru, G.M. (2004). Homology modelling and binding site mapping of the human histamine H1 receptor. *Eur J Med Chem* *39*, 959-967.
- Kjaer, A., Knigge, U., Rouleau, A., Garbarg, M., and Warberg, J. (1994a). Dehydration-induced release of vasopressin involves activation of hypothalamic histaminergic neurons. *Endocrinology* *135*, 675-681.
- Kjaer, A., Larsen, P.J., Knigge, U., and Warberg, J. (1994b). Histaminergic activation of the hypothalamic-pituitary-adrenal axis. *Endocrinology* *135*, 1171-1177.
- Klabunde, T., and Hessler, G. (2002). Drug design strategies for targeting G-protein-coupled receptors. *Chembiochem* *3*, 928-944.
- Klein-Nulend, J., Bakker, A.D., Bacabac, R.G., Vatsa, A., and Weinbaum, S. (2013). Mechanosensation and transduction in osteocytes. *Bone* *54*, 182-190.
- Klein-Seetharaman, J., Yanamala, N.V., Javeed, F., Reeves, P.J., Getmanova, E.V., Loewen, M.C., Schwalbe, H., and Khorana, H.G. (2004). Differential dynamics in the G protein-coupled receptor rhodopsin revealed by solution NMR. *Proc Natl Acad Sci U S A* *101*, 3409-3413.
- Klein, C. (2017). Kostmann's Disease and HCLS1-Associated Protein X-1 (HAX1). *J Clin Immunol* *37*, 117-122.
- Klein, C., Grudzien, M., Appaswamy, G., Germeshausen, M., Sandrock, I., Schaffer, A.A., Rathinam, C., Boztug, K., Schwinzer, B., Rezaei, N., *et al.* (2007). HAX1 deficiency

causes autosomal recessive severe congenital neutropenia (Kostmann disease). *Nat Genet* **39**, 86-92.

Klimek, L., and Sperl, A. (2015). Allergische Rhinitis: Der Trend geht zu topischen Therapeutika. *Dtsch Arztebl International* **112**, -18-.

Kobayashi, T., and Sokabe, M. (2010). Sensing substrate rigidity by mechanosensitive ion channels with stress fibers and focal adhesions. *Curr Opin Cell Biol* **22**, 669-676.

Kobilka, B. (2013). The structural basis of G-protein-coupled receptor signaling (Nobel Lecture). *Angew Chem Int Ed Engl* **52**, 6380-6388.

Kobilka, B.K., and Deupi, X. (2007). Conformational complexity of G-protein-coupled receptors. *Trends Pharmacol Sci* **28**, 397-406.

Kocer, A. (2015). Mechanisms of mechanosensing - mechanosensitive channels, function and re-engineering. *Curr Opin Chem Biol* **29**, 120-127.

Kokame, K., Fukada, Y., Yoshizawa, T., Takao, T., and Shimonishi, Y. (1992). Lipid modification at the N terminus of photoreceptor G-protein alpha-subunit. *Nature* **359**, 749-752.

Kolakowski, L.F., Jr. (1994). GCRDb: a G-protein-coupled receptor database. *Receptors Channels* **2**, 1-7.

Kooistra, A.J., Kuhne, S., de Esch, I.J., Leurs, R., and de Graaf, C. (2013). A structural chemogenomics analysis of aminergic GPCRs: lessons for histamine receptor ligand design. *Br J Pharmacol* **170**, 101-126.

Kovacova-Hanusikova, E., Buday, T., Gavliakova, S., and Plevkova, J. (2015). Histamine, histamine intoxication and intolerance. *Allergol Immunopathol (Madr)* **43**, 498-506.

Kozasa, T., Jiang, X., Hart, M.J., Sternweis, P.M., Singer, W.D., Gilman, A.G., Bollag, G., and Sternweis, P.C. (1998). p115 RhoGEF, a GTPase activating protein for G α 12 and G α 13. *Science* **280**, 2109-2111.

Krapivinsky, G., Gordon, E.A., Wickman, K., Velimirovic, B., Krapivinsky, L., and Clapham, D.E. (1995a). The G-protein-gated atrial K⁺ channel IKACH is a heteromultimer of two inwardly rectifying K(+) channel proteins. *Nature* **374**, 135-141.

Krapivinsky, G., Kennedy, M.E., Nemeč, J., Medina, I., Krapivinsky, L., and Clapham, D.E. (1998). G β binding to GIRK4 subunit is critical for G protein-gated K⁺ channel activation. *J Biol Chem* **273**, 16946-16952.

Krapivinsky, G., Krapivinsky, L., Wickman, K., and Clapham, D.E. (1995b). G β binds directly to the G protein-gated K⁺ channel, IKACH. *J Biol Chem* **270**, 29059-29062.

Kremers, G.J., Goedhart, J., van Munster, E.B., and Gadella, T.W., Jr. (2006). Cyan and yellow super fluorescent proteins with improved brightness, protein folding, and FRET Forster radius. *Biochemistry* **45**, 6570-6580.

Krishnan, A., Nijmeijer, S., de Graaf, C., and Schiöth, H.B. (2016). Classification, Nomenclature, and Structural Aspects of Adhesion GPCRs. In *Adhesion G Protein-coupled Receptors: Molecular, Physiological and Pharmacological Principles in Health and Disease*, T. Langenhan, and T. Schöneberg, eds. (Cham: Springer International Publishing), pp. 15-41.

Kruse, A.C., Manglik, A., Kobilka, B.K., and Weis, W.I. (2013). Applications of molecular replacement to G protein-coupled receptors. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* **69**, 2287-2292.

- Kuhne, S., Kooistra, A.J., Bosma, R., Bortolato, A., Wijtmans, M., Vischer, H.F., Mason, J.S., de Graaf, C., de Esch, I.J., and Leurs, R. (2016). Identification of Ligand Binding Hot Spots of the Histamine H1 Receptor following Structure-Based Fragment Optimization. *J Med Chem* *59*, 9047-9061.
- Kuhtz-Buschbeck, J.P., Schaefer, J., and Wilder, N. (2017). Mechanosensitivity: From Aristotle's sense of touch to cardiac mechano-electric coupling. *Prog Biophys Mol Biol* *130*, 126-131.
- Kung, C. (2005). A possible unifying principle for mechanosensation. *Nature* *436*, 647-654.
- Kung, C., Martinac, B., and Sukharev, S. (2010). Mechanosensitive channels in microbes. *Annu Rev Microbiol* *64*, 313-329.
- Kunkel, M.T., and Peralta, E.G. (1995). Identification of domains conferring G protein regulation on inward rectifier potassium channels. *Cell* *83*, 443-449.
- Kuramasu, A., Sukegawa, J., Yanagisawa, T., and Yanai, K. (2006). Recent advances in molecular pharmacology of the histamine systems: roles of C-terminal tails of histamine receptors. *J Pharmacol Sci* *101*, 7-11.
- Kurima, K., Ebrahim, S., Pan, B., Sedlacek, M., Sengupta, P., Millis, B.A., Cui, R., Nakanishi, H., Fujikawa, T., Kawashima, Y., *et al.* (2015). TMC1 and TMC2 Localize at the Site of Mechanotransduction in Mammalian Inner Ear Hair Cell Stereocilia. *Cell Rep* *12*, 1606-1617.
- Kwon, H.B., Wang, S., Helker, C.S., Rasouli, S.J., Maischein, H.M., Offermanns, S., Herzog, W., and Stainier, D.Y. (2016). In vivo modulation of endothelial polarization by Apelin receptor signalling. *Nat Commun* *7*, 11805.
- Lagerstrom, M.C., and Schioth, H.B. (2008). Structural diversity of G protein-coupled receptors and significance for drug discovery. *Nat Rev Drug Discov* *7*, 339-357.
- Lagrutta, A.A., Trepakova, E.S., and Salata, J.J. (2008). The hERG channel and risk of drug-acquired cardiac arrhythmia: an overview. *Curr Top Med Chem* *8*, 1102-1112.
- Lakowicz, J.R. (2006a). Energy Transfer. In *Principles of Fluorescence Spectroscopy*, J.R. Lakowicz, ed. (Boston, MA: Springer US), pp. 443-475.
- Lakowicz, J.R. (2006b). Fluorescence Anisotropy. In *Principles of Fluorescence Spectroscopy*, J.R. Lakowicz, ed. (Boston, MA: Springer US), pp. 353-382.
- Lakowicz, J.R. (2006c). *Principles of Fluorescence Spectroscopy*, 3 edn (University of Maryland School of Medicine Baltimore, MD 21201 USA: Springer-Verlag US).
- Lambeir, A., and Engelborghs, Y. (1983). A quantitative description of microtubule formation in the presence of tubulin-colchicine. *Eur J Biochem* *132*, 369-373.
- Lander, E.S., Linton, L.M., Birren, B., Nusbaum, C., Zody, M.C., Baldwin, J., Devon, K., Dewar, K., Doyle, M., FitzHugh, W., *et al.* (2001). Initial sequencing and analysis of the human genome. *Nature* *409*, 860-921.
- Langmead, C.J., and Christopoulos, A. (2014). Functional and structural perspectives on allosteric modulation of GPCRs. *Curr Opin Cell Biol* *27*, 94-101.
- Laporte, S.A., Oakley, R.H., Zhang, J., Holt, J.A., Ferguson, S.S., Caron, M.G., and Barak, L.S. (1999). The beta2-adrenergic receptor/betaarrestin complex recruits the clathrin adaptor AP-2 during endocytosis. *Proc Natl Acad Sci U S A* *96*, 3712-3717.
- Latner, A.L. (1958). Intrinsic factor and vitamin B12 absorption. *Br Med J* *2*, 278-281.

- Latorraca, N.R., Venkatakrishnan, A.J., and Dror, R.O. (2017). GPCR Dynamics: Structures in Motion. *Chem Rev* *117*, 139-155.
- Lau, O.C., Shen, B., Wong, C.O., Tjong, Y.W., Lo, C.Y., Wang, H.C., Huang, Y., Yung, W.H., Chen, Y.C., Fung, M.L., *et al.* (2016). TRPC5 channels participate in pressure-sensing in aortic baroreceptors. *Nat Commun* *7*, 11947.
- Lebon, G., Edwards, P.C., Leslie, A.G.W., and Tate, C.G. (2015). Molecular Determinants of CGS21680 Binding to the Human Adenosine A_{2A} Receptor. *Molecular Pharmacology* *87*, 907-915.
- Lee, Y., Basith, S., and Choi, S. (2018). Recent Advances in Structure-Based Drug Design Targeting Class A G Protein-Coupled Receptors Utilizing Crystal Structures and Computational Simulations. *J Med Chem* *61*, 1-46.
- Lefkowitz, R.J. (1993). G protein-coupled receptor kinases. *Cell* *74*, 409-412.
- Lefkowitz, R.J. (2004). Historical review: a brief history and personal retrospective of seven-transmembrane receptors. *Trends Pharmacol Sci* *25*, 413-422.
- Lelimosin, M., Noirclerc-Savoie, M., Lazareno-Saez, C., Paetzold, B., Le Vot, S., Chazal, R., Macheboeuf, P., Field, M.J., Bourgeois, D., and Royant, A. (2009). Intrinsic dynamics in ECFP and Cerulean control fluorescence quantum yield. *Biochemistry* *48*, 10038-10046.
- Leung, T., Chen, X.Q., Manser, E., and Lim, L. (1996). The p160 RhoA-binding kinase ROK alpha is a member of a kinase family and is involved in the reorganization of the cytoskeleton. *Mol Cell Biol* *16*, 5313-5327.
- Leung, T., Manser, E., Tan, L., and Lim, L. (1995). A novel serine/threonine kinase binding the Ras-related RhoA GTPase which translocates the kinase to peripheral membranes. *J Biol Chem* *270*, 29051-29054.
- Leurs, R., Chazot, P.L., Shenton, F.C., Lim, H.D., and de Esch, I.J. (2009). Molecular and biochemical pharmacology of the histamine H4 receptor. *Br J Pharmacol* *157*, 14-23.
- Leurs, R., Church, M.K., and Tagliatela, M. (2002). H1-antihistamines: inverse agonism, anti-inflammatory actions and cardiac effects. *Clin Exp Allergy* *32*, 489-498.
- Levina, N., Totemeyer, S., Stokes, N.R., Louis, P., Jones, M.A., and Booth, I.R. (1999). Protection of *Escherichia coli* cells against extreme turgor by activation of MscS and MscL mechanosensitive channels: identification of genes required for MscS activity. *EMBO J* *18*, 1730-1737.
- Lewis, N.E., Liu, X., Li, Y., Nagarajan, H., Yerganian, G., O'Brien, E., Bordbar, A., Roth, A.M., Rosenbloom, J., Bian, C., *et al.* (2013). Genomic landscapes of Chinese hamster ovary cell lines as revealed by the *Cricetulus griseus* draft genome. *Nat Biotechnol* *31*, 759-765.
- Li, B., Du, Y., Li, T., and Dong, S. (2009). Investigation of 3,3',5,5'-tetramethylbenzidine as colorimetric substrate for a peroxidatic DNAzyme. *Anal Chim Acta* *651*, 234-240.
- Li, H., Burkhardt, C., Heinrich, U.R., Brausch, I., Xia, N., and Forstermann, U. (2003). Histamine upregulates gene expression of endothelial nitric oxide synthase in human vascular endothelial cells. *Circulation* *107*, 2348-2354.
- Li, J., Edwards, P.C., Burghammer, M., Villa, C., and Schertler, G.F. (2004). Structure of bovine rhodopsin in a trigonal crystal form. *J Mol Biol* *343*, 1409-1438.
- Li, W., Cowley, A., Uludag, M., Gur, T., McWilliam, H., Squizzato, S., Park, Y.M., Buso, N., and Lopez, R. (2015). The EMBL-EBI bioinformatics web and programmatic tools framework. *Nucleic Acids Res* *43*, W580-584.

- Li, W., Feng, Z., Sternberg, P.W., and Xu, X.Z. (2006). A *C. elegans* stretch receptor neuron revealed by a mechanosensitive TRP channel homologue. *Nature* *440*, 684-687.
- Liang, Y.-L., Khoshouei, M., Glukhova, A., Furness, S.G.B., Zhao, P., Clydesdale, L., Koole, C., Truong, T.T., Thal, D.M., Lei, S., *et al.* (2018). Phase-plate cryo-EM structure of a biased agonist-bound human GLP-1 receptor–Gs complex. *Nature* *555*, 121.
- Liang, Y.L., Khoshouei, M., Radjainia, M., Zhang, Y., Glukhova, A., Tarrasch, J., Thal, D.M., Furness, S.G.B., Christopoulos, G., Coudrat, T., *et al.* (2017). Phase-plate cryo-EM structure of a class B GPCR-G-protein complex. *Nature* *546*, 118-123.
- Lim, H.D., Adami, M., Guaita, E., Werfel, T., Smits, R.A., de Esch, I.J., Bakker, R.A., Gutzmer, R., Coruzzi, G., and Leurs, R. (2009). Pharmacological characterization of the new histamine H4 receptor agonist VUF 8430. *Br J Pharmacol* *157*, 34-43.
- Lin, J.S., Sergeeva, O.A., and Haas, H.L. (2011). Histamine H3 receptors and sleep-wake regulation. *J Pharmacol Exp Ther* *336*, 17-23.
- Lin, S.W., and Sakmar, T.P. (1996). Specific tryptophan UV-absorbance changes are probes of the transition of rhodopsin to its active state. *Biochemistry* *35*, 11149-11159.
- Lingueglia, E. (2007). Acid-sensing ion channels in sensory perception. *J Biol Chem* *282*, 17325-17329.
- Lipowsky, H.H., Kovalcheck, S., and Zweifach, B.W. (1978). The distribution of blood rheological parameters in the microvasculature of cat mesentery. *Circ Res* *43*, 738-749.
- Liu, C., Ma, X., Jiang, X., Wilson, S.J., Hofstra, C.L., Blevitt, J., Pyati, J., Li, X., Chai, W., Carruthers, N., *et al.* (2001). Cloning and pharmacological characterization of a fourth histamine receptor (H(4)) expressed in bone marrow. *Mol Pharmacol* *59*, 420-426.
- Liu, C., and Montell, C. (2015). Forcing open TRP channels: Mechanical gating as a unifying activation mechanism. *Biochem Biophys Res Commun* *460*, 22-25.
- Liu, F., Lagares, D., Choi, K.M., Stopfer, L., Marinkovic, A., Vrbanac, V., Probst, C.K., Hiemer, S.E., Sisson, T.H., Horowitz, J.C., *et al.* (2015a). Mechanosignaling through YAP and TAZ drives fibroblast activation and fibrosis. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* *308*, L344-357.
- Liu, Q., Horio, Y., Fujimoto, K., and Fukui, H. (1994). Does the [3H]mepyramine binding site represent the histamine H1 receptor? Re-examination of the histamine H1 receptor with quinine. *J Pharmacol Exp Ther* *268*, 959-964.
- Liu, R., Nahon, D., le Roy, B., Lenselink, E.B., and AP, I.J. (2015b). Scanning mutagenesis in a yeast system delineates the role of the NPxxY(x)(5,6)F motif and helix 8 of the adenosine A(2B) receptor in G protein coupling. *Biochem Pharmacol* *95*, 290-300.
- Liu, R., Wang, D., Shi, Q., Fu, Q., Hizon, S., and Xiang, Y.K. (2012a). Palmitoylation regulates intracellular trafficking of beta2 adrenergic receptor/arrestin/phosphodiesterase 4D complexes in cardiomyocytes. *PLoS One* *7*, e42658.
- Liu, W., Chun, E., Thompson, A.A., Chubukov, P., Xu, F., Katritch, V., Han, G.W., Roth, C.B., Heitman, L.H., AP, I.J., *et al.* (2012b). Structural basis for allosteric regulation of GPCRs by sodium ions. *Science* *337*, 232-236.
- Liu, W., Chun, E., Thompson, A.A., Chubukov, P., Xu, F., Katritch, V., Han, G.W., Roth, C.B., Heitman, L.H., IJerman, A.P., *et al.* (2012c). Structural Basis for Allosteric Regulation of GPCRs by Sodium Ions. *Science* *337*, 232-236.
- Locht, C., and Antoine, R. (1995). A proposed mechanism of ADP-ribosylation catalyzed by the pertussis toxin S1 subunit. *Biochimie* *77*, 333-340.

- Locht, C., and Keith, J.M. (1986). Pertussis toxin gene: nucleotide sequence and genetic organization. *Science* 232, 1258-1264.
- Lohse, M.J., Benovic, J.L., Caron, M.G., and Lefkowitz, R.J. (1990). Multiple pathways of rapid beta 2-adrenergic receptor desensitization. Delineation with specific inhibitors. *J Biol Chem* 265, 3202-3211.
- Lohse, M.J., Nuber, S., and Hoffmann, C. (2012). Fluorescence/bioluminescence resonance energy transfer techniques to study G-protein-coupled receptor activation and signaling. *Pharmacol Rev* 64, 299-336.
- Lokits, A.D., Indrischek, H., Meiler, J., Hamm, H.E., and Stadler, P.F. (2018). Tracing the evolution of the heterotrimeric G protein alpha subunit in Metazoa. *BMC Evol Biol* 18, 51.
- Lopez, I., Mak, E.C., Ding, J., Hamm, H.E., and Lomasney, J.W. (2001). A novel bifunctional phospholipase c that is regulated by Galpha 12 and stimulates the Ras/mitogen-activated protein kinase pathway. *J Biol Chem* 276, 2758-2765.
- Lu, G., Wu, Y., Jiang, Y., Wang, S., Hou, Y., Guan, X., Brunzelle, J., Sirinupong, N., Sheng, S., Li, C., *et al.* (2013). Structural insights into neutrophilic migration revealed by the crystal structure of the chemokine receptor CXCR2 in complex with the first PDZ domain of NHERF1. *PLoS One* 8, e76219.
- Lucas, P., Ukhanov, K., Leinders-Zufall, T., and Zufall, F. (2003). A diacylglycerol-gated cation channel in vomeronasal neuron dendrites is impaired in TRPC2 mutant mice: mechanism of pheromone transduction. *Neuron* 40, 551-561.
- Lucey, B.P., Nelson-Rees, W.A., and Hutchins, G.M. (2009). Henrietta Lacks, HeLa cells, and cell culture contamination. *Arch Pathol Lab Med* 133, 1463-1467.
- Lulevich, V., Zink, T., Chen, H.-Y., Liu, F.-T., and Liu, G.-y. (2006). Cell Mechanics Using Atomic Force Microscopy-Based Single-Cell Compression. *Langmuir* 22, 8151-8155.
- Lundberg, K.S., Shoemaker, D.D., Adams, M.W., Short, J.M., Sorge, J.A., and Mathur, E.J. (1991). High-fidelity amplification using a thermostable DNA polymerase isolated from *Pyrococcus furiosus*. *Gene* 108, 1-6.
- Luttrell, L.M., and Lefkowitz, R.J. (2002). The role of beta-arrestins in the termination and transduction of G-protein-coupled receptor signals. *J Cell Sci* 115, 455-465.
- Ma, Y., Yue, Y., Ma, Y., Zhang, Q., Zhou, Q., Song, Y., Shen, Y., Li, X., Ma, X., Li, C., *et al.* (2017). Structural Basis for Apelin Control of the Human Apelin Receptor. *Structure* 25, 858-866 e854.
- Mackay, D.J., and Hall, A. (1998). Rho GTPases. *J Biol Chem* 273, 20685-20688.
- Madaule, P., Eda, M., Watanabe, N., Fujisawa, K., Matsuoka, T., Bito, H., Ishizaki, T., and Narumiya, S. (1998). Role of citron kinase as a target of the small GTPase Rho in cytokinesis. *Nature* 394, 491-494.
- Madeira, F., Park, Y.M., Lee, J., Buso, N., Gur, T., Madhusoodanan, N., Basutkar, P., Tivey, A.R.N., Potter, S.C., Finn, R.D., *et al.* (2019). The EMBL-EBI search and sequence analysis tools APIs in 2019. *Nucleic acids research* 47, W636-W641.
- Madukwe, J.C., Garland-Kuntz, E.E., Lyon, A.M., and Smrcka, A.V. (2018). G protein betagamma subunits directly interact with and activate phospholipase C. *J Biol Chem* 293, 6387-6397.
- Maeda, S., Qu, Q., Robertson, M.J., Skiniotis, G., and Kobilka, B.K. (2019). Structures of the M1 and M2 muscarinic acetylcholine receptor/G-protein complexes. *Science* 364, 552-557.

- Magalhaes, A.C., Dunn, H., and Ferguson, S.S. (2012). Regulation of GPCR activity, trafficking and localization by GPCR-interacting proteins. *Br J Pharmacol* *165*, 1717-1736.
- Mahdy, A.M., and Webster, N.R. (2017). Histamine and antihistamines. *Anaesthesia & Intensive Care Medicine* *18*, 210-215.
- Maintz, L., Bieber, T., and Novak, N. (2006). Die verschiedenen Gesichter der Histaminintoleranz. *Dtsch Arztebl International* *103*, 3477-.
- Maintz, L., and Novak, N. (2007). Histamine and histamine intolerance. *Am J Clin Nutr* *85*, 1185-1196.
- Makino, A., Prossnitz, E.R., Bunemann, M., Wang, J.M., Yao, W., and Schmid-Schonbein, G.W. (2006). G protein-coupled receptors serve as mechanosensors for fluid shear stress in neutrophils. *Am J Physiol Cell Physiol* *290*, C1633-1639.
- Malik-Sheriff, R.S., Imtiaz, S., Grecco, H.E., and Zamir, E. (2018). Diverse patterns of molecular changes in the mechano-responsiveness of focal adhesions. *Sci Rep* *8*, 2187.
- Malo, G.D., Pouwels, L.J., Wang, M., Weichsel, A., Montfort, W.R., Rizzo, M.A., Piston, D.W., and Wachter, R.M. (2007). X-ray structure of Cerulean GFP: a tryptophan-based chromophore useful for fluorescence lifetime imaging. *Biochemistry* *46*, 9865-9873.
- Mangmool, S., and Kurose, H. (2011). G(i/o) protein-dependent and -independent actions of Pertussis Toxin (PTX). *Toxins (Basel)* *3*, 884-899.
- Mano, I., and Driscoll, M. (1999). DEG/ENaC channels: a touchy superfamily that watches its salt. *Bioessays* *21*, 568-578.
- Marelli-Berg, F.M., Clement, M., Mauro, C., and Caligiuri, G. (2013). An immunologist's guide to CD31 function in T-cells. *J Cell Sci* *126*, 2343-2352.
- Margolis, R.L., and Wilson, L. (1977). Addition of colchicine--tubulin complex to microtubule ends: the mechanism of substoichiometric colchicine poisoning. *Proc Natl Acad Sci U S A* *74*, 3466-3470.
- Margolskee, R.F. (2002). Molecular mechanisms of bitter and sweet taste transduction. *J Biol Chem* *277*, 1-4.
- Marko, M.A., Chipperfield, R., and Birnboim, H.C. (1982). A procedure for the large-scale isolation of highly purified plasmid DNA using alkaline extraction and binding to glass powder. *Anal Biochem* *121*, 382-387.
- Markwardt, M.L., Kremers, G.J., Kraft, C.A., Ray, K., Cranfill, P.J., Wilson, K.A., Day, R.N., Wachter, R.M., Davidson, M.W., and Rizzo, M.A. (2011). An improved cerulean fluorescent protein with enhanced brightness and reduced reversible photoswitching. *PLoS One* *6*, e17896.
- Maroto, R., Raso, A., Wood, T.G., Kurosky, A., Martinac, B., and Hamill, O.P. (2005). TRPC1 forms the stretch-activated cation channel in vertebrate cells. *Nat Cell Biol* *7*, 179-185.
- Marquardt, D., Kucerka, N., Wassall, S.R., Harroun, T.A., and Katsaras, J. (2016). Cholesterol's location in lipid bilayers. *Chem Phys Lipids* *199*, 17-25.
- Marsh, D. (2007). Lateral pressure profile, spontaneous curvature frustration, and the incorporation and conformation of proteins in membranes. *Biophys J* *93*, 3884-3899.
- Martin, T.L., Mufson, E.J., and Mesulam, M.M. (1984). The light side of horseradish peroxidase histochemistry. *J Histochem Cytochem* *32*, 793.
- Martinac, B. (2004). Mechanosensitive ion channels: molecules of mechanotransduction. *J Cell Sci* *117*, 2449-2460.

- Martinac, B. (2014). The ion channels to cytoskeleton connection as potential mechanism of mechanosensitivity. *Biochim Biophys Acta* 1838, 682-691.
- Martinac, B., Buechner, M., Delcour, A.H., Adler, J., and Kung, C. (1987). Pressure-sensitive ion channel in *Escherichia coli*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 84, 2297-2301.
- Martinez-Pinna, J., Gurung, I.S., Vial, C., Leon, C., Gachet, C., Evans, R.J., and Mahaut-Smith, M.P. (2005). Direct voltage control of signaling via P2Y1 and other G α q-coupled receptors. *J Biol Chem* 280, 1490-1498.
- Martino, F., Perestrelo, A.R., Vinarsky, V., Pagliari, S., and Forte, G. (2018). Cellular Mechanotransduction: From Tension to Function. *Front Physiol* 9, 824.
- Massink, A., Gutierrez-de-Teran, H., Lenselink, E.B., Ortiz Zacarias, N.V., Xia, L., Heitman, L.H., Katritch, V., Stevens, R.C., and AP, I.J. (2015). Sodium ion binding pocket mutations and adenosine A2A receptor function. *Mol Pharmacol* 87, 305-313.
- Masters, B.R. (2014). Paths to Förster's resonance energy transfer (FRET) theory. *The European Physical Journal H* 39, 87-139.
- Matsui, T., Amano, M., Yamamoto, T., Chihara, K., Nakafuku, M., Ito, M., Nakano, T., Okawa, K., Iwamatsu, A., and Kaibuchi, K. (1996). Rho-associated kinase, a novel serine/threonine kinase, as a putative target for small GTP binding protein Rho. *EMBO J* 15, 2208-2216.
- Matsumura, T., Wolff, K., and Petzelbauer, P. (1997). Endothelial cell tube formation depends on cadherin 5 and CD31 interactions with filamentous actin. *J Immunol* 158, 3408-3416.
- Mayr, B., and Montminy, M. (2001). Transcriptional regulation by the phosphorylation-dependent factor CREB. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2, 599-609.
- Mazella, J., Beraud-Dufour, S., Devader, C., Massa, F., and Coppola, T. (2012). Neurotensin and its receptors in the control of glucose homeostasis. *Front Endocrinol (Lausanne)* 3, 143.
- McCudden, C.R., Hains, M.D., Kimple, R.J., Siderovski, D.P., and Willard, F.S. (2005). G-protein signaling: back to the future. *Cell Mol Life Sci* 62, 551-577.
- McLaughlin, S.K., McKinnon, P.J., and Margolskee, R.F. (1992). Gustducin is a taste-cell-specific G protein closely related to the transducins. *Nature* 357, 563-569.
- McWilliam, H., Li, W., Uludag, M., Squizzato, S., Park, Y.M., Buso, N., Cowley, A.P., and Lopez, R. (2013). Analysis Tool Web Services from the EMBL-EBI. *Nucleic Acids Res* 41, W597-600.
- Mederos y Schnitzler, M., Storch, U., and Gudermann, T. (2011). AT1 receptors as mechanosensors. *Curr Opin Pharmacol* 11, 112-116.
- Mederos y Schnitzler, M., Storch, U., Meibers, S., Nurwakagari, P., Breit, A., Essin, K., Gollasch, M., and Gudermann, T. (2008). Gq-coupled receptors as mechanosensors mediating myogenic vasoconstriction. *EMBO J* 27, 3092-3103.
- Mederos, Y.S.M., Storch, U., and Gudermann, T. (2016a). Mechanosensitive Gq/11 - protein coupled receptors mediate myogenic vasoconstriction. *Microcirculation*.
- Mederos, Y.S.M., Storch, U., and Gudermann, T. (2016b). Mechanosensitive Gq/11 Protein-Coupled Receptors Mediate Myogenic Vasoconstriction. *Microcirculation* 23, 621-625.
- Megson, A.C., Walker, E.M., and Hill, S.J. (2001). Role of protein kinase C α in signaling from the histamine H(1) receptor to the nucleus. *Mol Pharmacol* 59, 1012-1021.

- Meigs, T.E., Fields, T.A., McKee, D.D., and Casey, P.J. (2001). Interaction of Galpha 12 and Galpha 13 with the cytoplasmic domain of cadherin provides a mechanism for beta-catenin release. *Proc Natl Acad Sci U S A* *98*, 519-524.
- Meinkoth, J.L., Alberts, A.S., Went, W., Fantozzi, D., Taylor, S.S., Hagiwara, M., Montminy, M., and Feramisco, J.R. (1993). Signal transduction through the cAMP-dependent protein kinase. *Mol Cell Biochem* *127-128*, 179-186.
- Meselson, M., and Yuan, R. (1968). DNA restriction enzyme from *E. coli*. *Nature* *217*, 1110-1114.
- Mesulam, M.M. (1978). Tetramethyl benzidine for horseradish peroxidase neurohistochemistry: a non-carcinogenic blue reaction product with superior sensitivity for visualizing neural afferents and efferents. *J Histochem Cytochem* *26*, 106-117.
- Meves, A., Stremmel, C., Gottschalk, K., and Fassler, R. (2009). The Kindlin protein family: new members to the club of focal adhesion proteins. *Trends Cell Biol* *19*, 504-513.
- Meyer, B.H., Freuler, F., Guerini, D., and Siehler, S. (2008). Reversible translocation of p115-RhoGEF by G(12/13)-coupled receptors. *J Cell Biochem* *104*, 1660-1670.
- Meyvis, T.K.L., De Smedt, S.C., Van Oostveldt, P., and Demeester, J. (1999). Fluorescence Recovery After Photobleaching: A Versatile Tool for Mobility and Interaction Measurements in Pharmaceutical Research. *Pharmaceutical Research* *16*, 1153-1162.
- Meza, D., Shanmugavelayudam, S.K., Mendoza, A., Sanchez, C., Rubenstein, D.A., and Yin, W. (2017). Platelets modulate endothelial cell response to dynamic shear stress through PECAM-1. *Thromb Res* *150*, 44-50.
- Miao, Y., Caliman, A.D., and McCammon, J.A. (2015). Allosteric effects of sodium ion binding on activation of the m3 muscarinic g-protein-coupled receptor. *Biophys J* *108*, 1796-1806.
- Micallef, S., Stark, H., and Sasse, A. (2013). Polymorphisms and genetic linkage of histamine receptors. *Life Sci* *93*, 487-494.
- Michell, R.H. (1975). Inositol phospholipids and cell surface receptor function. *Biochim Biophys Acta* *415*, 81-47.
- Mikoshiba, K. (2007a). The IP3 receptor/Ca²⁺ channel and its cellular function. *Biochem Soc Symp*, 9-22.
- Mikoshiba, K. (2007b). IP3 receptor/Ca²⁺ channel: from discovery to new signaling concepts. *J Neurochem* *102*, 1426-1446.
- Mildner, J., Wnętrzak, A., and Dynarowicz-Latka, P. (2019). Cholesterol and Cardiolipin Importance in Local Anesthetics–Membrane Interactions: The Langmuir Monolayer Study. *The Journal of Membrane Biology* *252*, 31-39.
- Millan-Guerrero, R.O., Baltazar-Rodriguez, L.M., Cardenas-Rojas, M.I., Ramirez-Flores, M., Isais-Millan, S., Delgado-Enciso, I., Caballero-Hoyos, R., and Trujillo-Hernandez, B. (2011). A280V polymorphism in the histamine H3 receptor as a risk factor for migraine. *Arch Med Res* *42*, 44-47.
- Millar, R.P., Lu, Z.L., Pawson, A.J., Flanagan, C.A., Morgan, K., and Maudsley, S.R. (2004). Gonadotropin-releasing hormone receptors. *Endocr Rev* *25*, 235-275.
- Miller-Gallacher, J.L., Nehme, R., Warne, T., Edwards, P.C., Schertler, G.F., Leslie, A.G., and Tate, C.G. (2014). The 2.1 Å resolution structure of cyanopindolol-bound beta1-adrenoceptor identifies an intramembrane Na⁺ ion that stabilises the ligand-free receptor. *PLoS One* *9*, e92727.

- Mirossay, L., Di Gioia, Y., Chastre, E., Emami, S., and Gespach, C. (1992). Pharmacological control of gastric acid secretion: molecular and cellular aspects. *Biosci Rep* *12*, 319-368.
- Mitra, K., Ubarretxena-Belandia, I., Taguchi, T., Warren, G., and Engelman, D.M. (2004). Modulation of the bilayer thickness of exocytic pathway membranes by membrane proteins rather than cholesterol. *Proc Natl Acad Sci U S A* *101*, 4083-4088.
- Mocking, T.A.M., Bosma, R., Rahman, S.N., Verweij, E.W.E., McNaught-Flores, D.A., Vischer, H.F., and Leurs, R. (2016). Molecular Aspects of Histamine Receptors. In *Histamine Receptors: Preclinical and Clinical Aspects*, P. Blandina, and M.B. Passani, eds. (Cham: Springer International Publishing), pp. 1-49.
- Mohole, M., Prasanna, X., Sengupta, D., and Chattopadhyay, A. (2018). Molecular Signatures of Cholesterol Interaction with Serotonin Receptors. In *Biochemical and Biophysical Roles of Cell Surface Molecules*, K. Chattopadhyay, and S.C. Basu, eds. (Singapore: Springer Singapore), pp. 151-160.
- Mombaerts, P. (2004). Genes and ligands for odorant, vomeronasal and taste receptors. *Nat Rev Neurosci* *5*, 263-278.
- Monczor, F., Fernandez, N., Fitzsimons, C.P., Shayo, C., and Davio, C. (2013). Antihistaminergics and inverse agonism: potential therapeutic applications. *Eur J Pharmacol* *715*, 26-32.
- Moore, C.A., Milano, S.K., and Benovic, J.L. (2007). Regulation of receptor trafficking by GRKs and arrestins. *Annu Rev Physiol* *69*, 451-482.
- Moorthy, B.S., Gao, Y., and Anand, G.S. (2011). Phosphodiesterases catalyze hydrolysis of cAMP-bound to regulatory subunit of protein kinase A and mediate signal termination. *Mol Cell Proteomics* *10*, M110 002295.
- Moreira, R.F., and Noren, C.J. (1995). Minimum duplex requirements for restriction enzyme cleavage near the termini of linear DNA fragments. *Biotechniques* *19*, 56, 58-59.
- Morissette, M.R., Sah, V.P., Glembotski, C.C., and Brown, J.H. (2000). The Rho effector, PKN, regulates ANF gene transcription in cardiomyocytes through a serum response element. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* *278*, H1769-1774.
- Morris, C.E., Prikryl, E.A., and Joos, B. (2015). Mechanosensitive gating of Kv channels. *PLoS One* *10*, e0118335.
- Muddana, H.S., Chiang, H.H., and Butler, P.J. (2012). Tuning membrane phase separation using nonlipid amphiphiles. *Biophys J* *102*, 489-497.
- Mukhopadhyay, S., and Ross, E.M. (1999). Rapid GTP binding and hydrolysis by G(q) promoted by receptor and GTPase-activating proteins. *Proc Natl Acad Sci U S A* *96*, 9539-9544.
- Müller-Esterl, W. (2018). Struktur und Dynamik des Cytoskeletts. In *Biochemie: Eine Einführung für Mediziner und Naturwissenschaftler - Unter Mitarbeit von Ulrich Brandt, Oliver Anderka, Stefan Kerscher, Stefan Kieß und Katrin Ridinger* (Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg), pp. 500-515.
- Mullis, K., Faloona, F., Scharf, S., Saiki, R., Horn, G., and Erlich, H. (1986). Specific enzymatic amplification of DNA in vitro: the polymerase chain reaction. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* *51 Pt 1*, 263-273.
- Munk, C., Isberg, V., Mordalski, S., Harpsoe, K., Rataj, K., Hauser, A.S., Kolb, P., Bojarski, A.J., Vriend, G., and Gloriam, D.E. (2016). GPCRdb: the G protein-coupled receptor database - an introduction. *Br J Pharmacol* *173*, 2195-2207.

- Murayama, T., Kajiyama, Y., and Nomura, Y. (1990). Histamine-stimulated and GTP-binding proteins-mediated phospholipase A2 activation in rabbit platelets. *J Biol Chem* *265*, 4290-4295.
- Murrell, M., Oakes, P.W., Lenz, M., and Gardel, M.L. (2015). Forcing cells into shape: the mechanics of actomyosin contractility. *Nat Rev Mol Cell Biol* *16*, 486-498.
- Murthy, S.E., Dubin, A.E., and Patapoutian, A. (2017). Piezos thrive under pressure: mechanically activated ion channels in health and disease. *Nat Rev Mol Cell Biol* *18*, 771-783.
- Murthy, S.E., Dubin, A.E., Whitwam, T., Jojoa-Cruz, S., Cahalan, S.M., Mousavi, S.A.R., Ward, A.B., and Patapoutian, A. (2018). OSCA/TMEM63 are an Evolutionarily Conserved Family of Mechanically Activated Ion Channels. *Elife* *7*.
- Mustain, W.C., Rychahou, P.G., and Evers, B.M. (2011). The role of neurotensin in physiologic and pathologic processes. *Curr Opin Endocrinol Diabetes Obes* *18*, 75-82.
- Muyldermans, S. (2013). Nanobodies: natural single-domain antibodies. *Annu Rev Biochem* *82*, 775-797.
- Nagai, T., Ibata, K., Park, E.S., Kubota, M., Mikoshiba, K., and Miyawaki, A. (2002). A variant of yellow fluorescent protein with fast and efficient maturation for cell-biological applications. *Nat Biotechnol* *20*, 87-90.
- Nair, U.B., Joel, P.B., Wan, Q., Lowey, S., Rould, M.A., and Trybus, K.M. (2008). Crystal structures of monomeric actin bound to cytochalasin D. *J Mol Biol* *384*, 848-864.
- Najem, J.S., Dunlap, M.D., Rowe, I.D., Freeman, E.C., Grant, J.W., Sukharev, S., and Leo, D.J. (2015). Activation of bacterial channel MscL in mechanically stimulated droplet interface bilayers. *Sci Rep* *5*, 13726.
- Nakamura, F., Osborn, T.M., Hartemink, C.A., Hartwig, J.H., and Stossel, T.P. (2007). Structural basis of filamin A functions. *The Journal of Cell Biology* *179*, 1011-1025.
- Nakamura, T., and Gold, G.H. (1987). A cyclic nucleotide-gated conductance in olfactory receptor cilia. *Nature* *325*, 442-444.
- Nakamura, T., Itadani, H., Hidaka, Y., Ohta, M., and Tanaka, K. (2000). Molecular cloning and characterization of a new human histamine receptor, HH4R. *Biochem Biophys Res Commun* *279*, 615-620.
- Nakayama, Y., Yoshimura, K., and Iida, H. (2013). Electrophysiological characterization of the mechanosensitive channel MscCG in *Corynebacterium glutamicum*. *Biophys J* *105*, 1366-1375.
- Narumiya, S., Ishizaki, T., and Watanabe, N. (1997). Rho effectors and reorganization of actin cytoskeleton. *FEBS Lett* *410*, 68-72.
- Nauli, S.M., Jin, X., AbouAlaiwi, W.A., El-Jouni, W., Su, X., and Zhou, J. (2013). Non-motile primary cilia as fluid shear stress mechanosensors. *Methods Enzymol* *525*, 1-20.
- Navarro-Polanco, R.A., Moreno Galindo, E.G., Ferrer-Villada, T., Arias, M., Rigby, J.R., Sanchez-Chapula, J.A., and Tristani-Firouzi, M. (2011). Conformational changes in the M2 muscarinic receptor induced by membrane voltage and agonist binding. *J Physiol* *589*, 1741-1753.
- Neuman, K.C., and Nagy, A. (2008). Single-molecule force spectroscopy: optical tweezers, magnetic tweezers and atomic force microscopy. *Nat Methods* *5*, 491-505.
- Nguyen, T., Shapiro, D.A., George, S.R., Setola, V., Lee, D.K., Cheng, R., Rauser, L., Lee, S.P., Lynch, K.R., Roth, B.L., *et al.* (2001). Discovery of a novel member of the histamine receptor family. *Mol Pharmacol* *59*, 427-433.

- Nieto-Alamilla, G., Marquez-Gomez, R., Garcia-Galvez, A.M., Morales-Figueroa, G.E., and Arias-Montano, J.A. (2016). The Histamine H3 Receptor: Structure, Pharmacology, and Function. *Mol Pharmacol* 90, 649-673.
- Nijmeijer, S., Leurs, R., and Vischer, H.F. (2010). Constitutive activity of the histamine H(1) receptor. *Methods Enzymol* 484, 127-147.
- Nishida, M., Sato, Y., Uemura, A., Narita, Y., Tozaki-Saitoh, H., Nakaya, M., Ide, T., Suzuki, K., Inoue, K., Nagao, T., *et al.* (2008). P2Y6 receptor-G α 12/13 signalling in cardiomyocytes triggers pressure overload-induced cardiac fibrosis. *EMBO J* 27, 3104-3115.
- Nishimura, A., Kitano, K., Takasaki, J., Taniguchi, M., Mizuno, N., Tago, K., Hakoshima, T., and Itoh, H. (2010). Structural basis for the specific inhibition of heterotrimeric Gq protein by a small molecule. *Proc Natl Acad Sci U S A* 107, 13666-13671.
- Nishizuka, Y. (1992). Intracellular signaling by hydrolysis of phospholipids and activation of protein kinase C. *Science* 258, 607-614.
- Noel, J., Wang, H., Hong, N., Tao, J.Q., Yu, K., Sorokina, E.M., Debolt, K., Heayn, M., Rizzo, V., Delisser, H., *et al.* (2013). PECAM-1 and caveolae form the mechanosensing complex necessary for NOX2 activation and angiogenic signaling with stopped flow in pulmonary endothelium. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 305, L805-818.
- Nonaka, H., Otaki, S., Ohshima, E., Kono, M., Kase, H., Ohta, K., Fukui, H., and Ichimura, M. (1998). Unique binding pocket for KW-4679 in the histamine H1 receptor. *Eur J Pharmacol* 345, 111-117.
- Nordstrom, K.J., Sallman Almen, M., Edstam, M.M., Fredriksson, R., and Schioth, H.B. (2011). Independent HHsearch, Needleman--Wunsch-based, and motif analyses reveal the overall hierarchy for most of the G protein-coupled receptor families. *Mol Biol Evol* 28, 2471-2480.
- Noso, N., Hide, M., Nakamura, K., and Yamamoto, S. (1990). Histamine H1-receptor of vascular endothelial cells cultured from guinea pig skin. *Arch Dermatol Res* 282, 115-119.
- Nowak, J.Z. (1994). Histamine in the central nervous system: its role in circadian rhythmicity. *Acta Neurobiol Exp (Wars)* 54 Suppl, 65-82.
- Nygaard, R., Zou, Y., Dror, R.O., Mildorf, T.J., Arlow, D.H., Manglik, A., Pan, A.C., Liu, C.W., Fung, J.J., Bokoch, M.P., *et al.* (2013). The dynamic process of beta(2)-adrenergic receptor activation. *Cell* 152, 532-542.
- Nyquist, H. (1928). Certain Topics in Telegraph Transmission Theory. *Transactions of the American Institute of Electrical Engineers* 47, 617-644.
- O'Hagan, R., Chalfie, M., and Goodman, M.B. (2005). The MEC-4 DEG/ENaC channel of *Caenorhabditis elegans* touch receptor neurons transduces mechanical signals. *Nat Neurosci* 8, 43-50.
- Oda, T., Morikawa, N., Saito, Y., Masuho, Y., and Matsumoto, S. (2000). Molecular cloning and characterization of a novel type of histamine receptor preferentially expressed in leukocytes. *J Biol Chem* 275, 36781-36786.
- Oddi, S., Stepniewski, T.M., Totaro, A., Selent, J., Scipioni, L., Dufrusine, B., Fezza, F., Dainese, E., and Maccarrone, M. (2017). Palmitoylation of cysteine 415 of CB1 receptor affects ligand-stimulated internalization and selective interaction with membrane cholesterol and caveolin 1. *Biochim Biophys Acta* 1862, 523-532.
- Offermanns, S. (2003). G-proteins as transducers in transmembrane signalling. *Prog Biophys Mol Biol* 83, 101-130.

- Oguri, S., and Yoneya, Y. (2002). Assay and biological relevance of endogenous histamine and its metabolites: application of microseparation techniques. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci* *781*, 165-179.
- Ohana, L., Barchad, O., Parnas, I., and Parnas, H. (2006). The metabotropic glutamate G-protein-coupled receptors mGluR3 and mGluR1a are voltage-sensitive. *J Biol Chem* *281*, 24204-24215.
- Ohashi, K., Nagata, K., Maekawa, M., Ishizaki, T., Narumiya, S., and Mizuno, K. (2000). Rho-associated kinase ROCK activates LIM-kinase 1 by phosphorylation at threonine 508 within the activation loop. *J Biol Chem* *275*, 3577-3582.
- Ohta, K., Hayashi, H., Mizuguchi, H., Kagamiyama, H., Fujimoto, K., and Fukui, H. (1994). Site-directed mutagenesis of the histamine H1 receptor: roles of aspartic acid107, asparagine198 and threonine194. *Biochem Biophys Res Commun* *203*, 1096-1101.
- Oka, Y., Saraiva, L.R., Kwan, Y.Y., and Korsching, S.I. (2009). The fifth class of Galpha proteins. *Proc Natl Acad Sci U S A* *106*, 1484-1489.
- Okada, T., Fujiyoshi, Y., Silow, M., Navarro, J., Landau, E.M., and Shichida, Y. (2002). Functional role of internal water molecules in rhodopsin revealed by X-ray crystallography. *Proc Natl Acad Sci U S A* *99*, 5982-5987.
- Okuno, T., Yokomizo, T., Hori, T., Miyano, M., and Shimizu, T. (2005). Leukotriene B4 Receptor and the Function of Its Helix 8. *Journal of Biological Chemistry* *280*, 32049-32052.
- Oldham, W.M., and Hamm, H.E. (2008). Heterotrimeric G protein activation by G-protein-coupled receptors. *Nat Rev Mol Cell Biol* *9*, 60-71.
- Omerbasic, D., Schuhmacher, L.N., Bernal Sierra, Y.A., Smith, E.S., and Lewin, G.R. (2015). ASICs and mammalian mechanoreceptor function. *Neuropharmacology* *94*, 80-86.
- Ordonez, N.G. (2012). Immunohistochemical endothelial markers: a review. *Adv Anat Pathol* *19*, 281-295.
- Orr, A.W., Helmke, B.P., Blackman, B.R., and Schwartz, M.A. (2006). Mechanisms of mechanotransduction. *Dev Cell* *10*, 11-20.
- Osborn, E.A., Rabodzey, A., Dewey, C.F., Jr., and Hartwig, J.H. (2006). Endothelial actin cytoskeleton remodeling during mechanostimulation with fluid shear stress. *Am J Physiol Cell Physiol* *290*, C444-452.
- Osol, G., Brekke, J.F., McElroy-Yaggy, K., and Gokina, N.I. (2002). Myogenic tone, reactivity, and forced dilatation: a three-phase model of in vitro arterial myogenic behavior. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* *283*, H2260-2267.
- Otte, L.A., Bell, K.S., Loufrani, L., Yeh, J.C., Melchior, B., Dao, D.N., Stevens, H.Y., White, C.R., and Frangos, J.A. (2009). Rapid changes in shear stress induce dissociation of a G alpha(q/11)-platelet endothelial cell adhesion molecule-1 complex. *J Physiol* *587*, 2365-2373.
- Paddison, P.J., Caudy, A.A., Bernstein, E., Hannon, G.J., and Conklin, D.S. (2002). Short hairpin RNAs (shRNAs) induce sequence-specific silencing in mammalian cells. *Genes Dev* *16*, 948-958.
- Paiva, T.B., Tominaga, M., and Paiva, A.C. (1970). Ionization of histamine, N-acetylhistamine, and their iodinated derivatives. *J Med Chem* *13*, 689-692.
- 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., *et al.* (2000). Crystal structure of rhodopsin: A G protein-coupled receptor. *Science* *289*, 739-745.

- Pandy-Szekeres, G., Munk, C., Tsonkov, T.M., Mordalski, S., Harpsoe, K., Hauser, A.S., Bojarski, A.J., and Gloriam, D.E. (2018). GPCRdb in 2018: adding GPCR structure models and ligands. *Nucleic Acids Res* *46*, D440-D446.
- Pandya, P., Orgaz, J.L., and Sanz-Moreno, V. (2017). Actomyosin contractility and collective migration: may the force be with you. *Curr Opin Cell Biol* *48*, 87-96.
- Panula, P., Chazot, P.L., Cowart, M., Gutzmer, R., Leurs, R., Liu, W.L., Stark, H., Thurmond, R.L., and Haas, H.L. (2015). International Union of Basic and Clinical Pharmacology. XCVIII. Histamine Receptors. *Pharmacol Rev* *67*, 601-655.
- Papaioannou, T.G., and Stefanadis, C. (2005). Vascular wall shear stress: basic principles and methods. *Hellenic J Cardiol* *46*, 9-15.
- Paquet, M., Asay, M.J., Fam, S.R., Inuzuka, H., Castleberry, A.M., Oller, H., Smith, Y., Yun, C.C., Traynelis, S.F., and Hall, R.A. (2006). The PDZ scaffold NHERF-2 interacts with mGluR5 and regulates receptor activity. *J Biol Chem* *281*, 29949-29961.
- Parasassi, T., Gratton, E., Yu, W.M., Wilson, P., and Levi, M. (1997). Two-photon fluorescence microscopy of laurdan generalized polarization domains in model and natural membranes. *Biophysical Journal* *72*, 2413-2429.
- Pardo, L., Deupi, X., Dolker, N., Lopez-Rodriguez, M.L., and Campillo, M. (2007). The role of internal water molecules in the structure and function of the rhodopsin family of G protein-coupled receptors. *ChemBiochem* *8*, 19-24.
- Park, S.H., Das, B.B., Casagrande, F., Tian, Y., Nothnagel, H.J., Chu, M., Kiefer, H., Maier, K., De Angelis, A.A., Marassi, F.M., *et al.* (2012a). Structure of the chemokine receptor CXCR1 in phospholipid bilayers. *Nature* *491*, 779-783.
- Park, S.H., Das, B.B., Casagrande, F., Tian, Y., Nothnagel, H.J., Chu, M., Kiefer, H., Maier, K., De Angelis, A.A., Marassi, F.M., *et al.* (2012b). Structure of the chemokine receptor CXCR1 in phospholipid bilayers. *Nature* *491*, 779.
- Parmar, V.K., Grinde, E., Mazurkiewicz, J.E., and Herrick-Davis, K. (2017). Beta2-adrenergic receptor homodimers: Role of transmembrane domain 1 and helix 8 in dimerization and cell surface expression. *Biochim Biophys Acta* *1859*, 1445-1455.
- Parnot, C., Miserey-Lenkei, S., Bardin, S., Corvol, P., and Clauser, E. (2002). Lessons from constitutively active mutants of G protein-coupled receptors. *Trends Endocrinol Metab* *13*, 336-343.
- Parsons, M.E., and Ganellin, C.R. (2006). Histamine and its receptors. *Br J Pharmacol* *147 Suppl 1*, S127-135.
- Passani, M.B., Bacciottini, L., Mannaioni, P.F., and Blandina, P. (2000). Central histaminergic system and cognition. *Neurosci Biobehav Rev* *24*, 107-113.
- Passarella, D., Giardini, A., Peretto, B., Fontana, G., Sacchetti, A., Silvani, A., Ronchi, C., Cappelletti, G., Cartelli, D., Borlak, J., *et al.* (2008). Inhibitors of tubulin polymerization: synthesis and biological evaluation of hybrids of vindoline, anhydrovinblastine and vinorelbine with thiocolchicine, podophyllotoxin and baccatin III. *Bioorg Med Chem* *16*, 6269-6285.
- Patterson, G., Day, R.N., and Piston, D. (2001). Fluorescent protein spectra. *J Cell Sci* *114*, 837-838.
- Pawley, J.B. (2006). Points, Pixels, and Gray Levels: Digitizing Image Data. In *Handbook Of Biological Confocal Microscopy*, J.B. Pawley, ed. (Boston, MA: Springer US), pp. 59-79.
- Pebay-Peyroula, E., Rummel, G., Rosenbusch, J.P., and Landau, E.M. (1997). X-ray structure of bacteriorhodopsin at 2.5 angstroms from microcrystals grown in lipidic cubic phases. *Science* *277*, 1676-1681.

- Pedersen, S.F., and Nilius, B. (2007). Transient receptor potential channels in mechanosensing and cell volume regulation. *Methods Enzymol* *428*, 183-207.
- Perozo, E., Cortes, D.M., Somporpisut, P., Kloda, A., and Martinac, B. (2002a). Open channel structure of MscL and the gating mechanism of mechanosensitive channels. *Nature* *418*, 942-948.
- Perozo, E., Kloda, A., Cortes, D.M., and Martinac, B. (2002b). Physical principles underlying the transduction of bilayer deformation forces during mechanosensitive channel gating. *Nat Struct Biol* *9*, 696-703.
- Petersen, S.C., Luo, R., Liebscher, I., Giera, S., Jeong, S.J., Mogha, A., Ghidinelli, M., Feltri, M.L., Schoneberg, T., Piao, X., *et al.* (2015). The adhesion GPCR GPR126 has distinct, domain-dependent functions in Schwann cell development mediated by interaction with laminin-211. *Neuron* *85*, 755-769.
- Pfleger, K.D., and Eidne, K.A. (2006). Illuminating insights into protein-protein interactions using bioluminescence resonance energy transfer (BRET). *Nat Methods* *3*, 165-174.
- Pifferi, S., Boccaccio, A., and Menini, A. (2006). Cyclic nucleotide-gated ion channels in sensory transduction. *FEBS Lett* *580*, 2853-2859.
- Pippig, S., Andexinger, S., Daniel, K., Puzicha, M., Caron, M.G., Lefkowitz, R.J., and Lohse, M.J. (1993). Overexpression of beta-arrestin and beta-adrenergic receptor kinase augment desensitization of beta 2-adrenergic receptors. *J Biol Chem* *268*, 3201-3208.
- Planesas, J.M., Perez-Nueno, V.I., Borrell, J.I., and Teixido, J. (2015). Studying the binding interactions of allosteric agonists and antagonists of the CXCR4 receptor. *J Mol Graph Model* *60*, 1-14.
- Plant, T.D. (2014). TRPs in Mechanosensing and Volume Regulation. In *Mammalian Transient Receptor Potential (TRP) Cation Channels: Volume II*, B. Nilius, and V. Flockerzi, eds. (Cham: Springer International Publishing), pp. 743-766.
- Poea-Guyon, S., Pasquier, H., Merola, F., Morel, N., and Erard, M. (2013). The enhanced cyan fluorescent protein: a sensitive pH sensor for fluorescence lifetime imaging. *Anal Bioanal Chem* *405*, 3983-3987.
- Pons, T. (2013). Single-Molecule Applications. In *FRET – Förster Resonance Energy Transfer*, I. Medintz, and N. Hildebrandt, eds. (Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA), pp. 323-356.
- Porat, R.M., Grunewald, M., Globerman, A., Itin, A., Barshtein, G., Alhonen, L., Alitalo, K., and Keshet, E. (2004). Specific induction of tie1 promoter by disturbed flow in atherosclerosis-prone vascular niches and flow-obstructing pathologies. *Circ Res* *94*, 394-401.
- Potter, D.R., and Damiano, E.R. (2008). The hydrodynamically relevant endothelial cell glycocalyx observed in vivo is absent in vitro. *Circ Res* *102*, 770-776.
- Prather, P.L. (2004). Inverse agonists: tools to reveal ligand-specific conformations of G protein-coupled receptors. *Sci STKE* *2004*, pe1.
- Prell, G.D., and Green, J.P. (1994). Measurement of histamine metabolites in brain and cerebrospinal fluid provides insights into histaminergic activity. *Agents Actions* *41 Spec No*, C5-8.
- Prell, G.D., Hough, L.B., Khandelwal, J., and Green, J.P. (1996). Lack of a precursor-product relationship between histamine and its metabolites in brain after histidine loading. *J Neurochem* *67*, 1938-1944.

- Prell, G.D., Khandelwal, J.K., Burns, R.S., and Green, J.P. (1988). Histamine metabolites in cerebrospinal fluid of the rhesus monkey (*Macaca mulatta*): cisternal-lumbar concentration gradients. *J Neurochem* *50*, 1194-1199.
- Premont, R.T., and Gainetdinov, R.R. (2007). Physiological roles of G protein-coupled receptor kinases and arrestins. *Annu Rev Physiol* *69*, 511-534.
- Pucadyil, T.J., and Chattopadhyay, A. (2004). Cholesterol modulates ligand binding and G-protein coupling to serotonin(1A) receptors from bovine hippocampus. *Biochim Biophys Acta* *1663*, 188-200.
- Puck, T.T., Cieciura, S.J., and Robinson, A. (1958). Genetics of somatic mammalian cells. III. Long-term cultivation of euploid cells from human and animal subjects. *J Exp Med* *108*, 945-956.
- Pusztaszeri, M.P., Seelentag, W., and Bosman, F.T. (2006). Immunohistochemical expression of endothelial markers CD31, CD34, von Willebrand factor, and Fli-1 in normal human tissues. *J Histochem Cytochem* *54*, 385-395.
- Putney, J.W., and Tomita, T. (2012). Phospholipase C signaling and calcium influx. *Adv Biol Regul* *52*, 152-164.
- Qi, Y.X., Yao, Q.P., Huang, K., Shi, Q., Zhang, P., Wang, G.L., Han, Y., Bao, H., Wang, L., Li, H.P., *et al.* (2016). Nuclear envelope proteins modulate proliferation of vascular smooth muscle cells during cyclic stretch application. *Proc Natl Acad Sci U S A* *113*, 5293-5298.
- Qiu, S., Pellino, G., Fiorentino, F., Rasheed, S., Darzi, A., Tekkis, P., and Kontovounisios, C. (2017). A Review of the Role of Neurotensin and Its Receptors in Colorectal Cancer. *Gastroenterol Res Pract* *2017*, 6456257.
- Quitterer, U., and AbdAlla, S. (2019). Discovery of Pathologic GPCR Aggregation. *Front Med (Lausanne)* *6*, 9.
- Quitterer, U., AbdAlla, S., Jarnagin, K., and Muller-Esterl, W. (1996). Na⁺ ions binding to the bradykinin B2 receptor suppress agonist-independent receptor activation. *Biochemistry* *35*, 13368-13377.
- Quitterer, U., Fu, X., Pohl, A., Bayoumy, K.M., Langer, A., and AbdAlla, S. (2019). Beta-Arrestin1 Prevents Preeclampsia by Downregulation of Mechanosensitive AT1-B2 Receptor Heteromers. *Cell* *176*, 318-333 e319.
- Quoyer, J., Janz, J.M., Luo, J., Ren, Y., Armando, S., Lukashova, V., Benovic, J.L., Carlson, K.E., Hunt, S.W., 3rd, and Bouvier, M. (2013). Pepducin targeting the C-X-C chemokine receptor type 4 acts as a biased agonist favoring activation of the inhibitory G protein. *Proc Natl Acad Sci U S A* *110*, E5088-5097.
- Radhika, V., Onesime, D., Ha, J.H., and Dhanasekaran, N. (2004). Galpha13 stimulates cell migration through cortactin-interacting protein Hax-1. *J Biol Chem* *279*, 49406-49413.
- Ragazzon, M.R.P., Vagia, M., and Gravidahl, J.T. (2016). Cell Mechanics Modeling and Identification by Atomic Force Microscopy. *IFAC-PapersOnLine* *49*, 603-610.
- Rahman, N., Buck, J., and Levin, L.R. (2013). pH sensing via bicarbonate-regulated "soluble" adenylyl cyclase (sAC). *Front Physiol* *4*, 343.
- Raisz, L.G. (1999). Physiology and pathophysiology of bone remodeling. *Clin Chem* *45*, 1353-1358.
- Rakesh, K., Yoo, B., Kim, I.M., Salazar, N., Kim, K.S., and Rockman, H.A. (2010). beta-Arrestin-biased agonism of the angiotensin receptor induced by mechanical stress. *Sci Signal* *3*, ra46.

- Raleigh, E.A., Murray, N.E., Revel, H., Blumenthal, R.M., Westaway, D., Reith, A.D., Rigby, P.W., Elhai, J., and Hanahan, D. (1988). McrA and McrB restriction phenotypes of some *E. coli* strains and implications for gene cloning. *Nucleic Acids Res* 16, 1563-1575.
- Ranade, S.S., Syeda, R., and Patapoutian, A. (2015). Mechanically Activated Ion Channels. *Neuron* 87, 1162-1179.
- Rangachari, P.K. (1992). Histamine: mercurial messenger in the gut. *Am J Physiol* 262, G1-13.
- Rasmussen, S.G., Choi, H.J., Fung, J.J., Pardon, E., Casarosa, P., Chae, P.S., Devree, B.T., Rosenbaum, D.M., Thian, F.S., Kobilka, T.S., *et al.* (2011a). Structure of a nanobody-stabilized active state of the beta(2) adrenoceptor. *Nature* 469, 175-180.
- 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., *et al.* (2007). Crystal structure of the human beta2 adrenergic G-protein-coupled receptor. *Nature* 450, 383-387.
- Rasmussen, S.G., DeVree, B.T., Zou, Y., Kruse, A.C., Chung, K.Y., Kobilka, T.S., Thian, F.S., Chae, P.S., Pardon, E., Calinski, D., *et al.* (2011b). Crystal structure of the beta2 adrenergic receptor-Gs protein complex. *Nature* 477, 549-555.
- Rebecchi, M.J., and Pentylala, S.N. (2000). Structure, function, and control of phosphoinositide-specific phospholipase C. *Physiol Rev* 80, 1291-1335.
- Reid, T., Furuyashiki, T., Ishizaki, T., Watanabe, G., Watanabe, N., Fujisawa, K., Morii, N., Madaule, P., and Narumiya, S. (1996). Rhotekin, a new putative target for Rho bearing homology to a serine/threonine kinase, PKN, and rhotillin in the rho-binding domain. *J Biol Chem* 271, 13556-13560.
- Remaury, A., Vita, N., Gendreau, S., Jung, M., Arnone, M., Poncelet, M., Culouscou, J.M., Le Fur, G., Soubrie, P., Caput, D., *et al.* (2002). Targeted inactivation of the neurotensin type 1 receptor reveals its role in body temperature control and feeding behavior but not in analgesia. *Brain Res* 953, 63-72.
- Retailleau, K., Duprat, F., Arhatte, M., Ranade, S.S., Peyronnet, R., Martins, J.R., Jodar, M., Moro, C., Offermanns, S., Feng, Y., *et al.* (2015). Piezo1 in Smooth Muscle Cells Is Involved in Hypertension-Dependent Arterial Remodeling. *Cell Rep* 13, 1161-1171.
- Reuveny, E., Slesinger, P.A., Inglese, J., Morales, J.M., Iniguez-Lluhi, J.A., Lefkowitz, R.J., Bourne, H.R., Jan, Y.N., and Jan, L.Y. (1994). Activation of the cloned muscarinic potassium channel by G protein beta gamma subunits. *Nature* 370, 143-146.
- Ridley, A.J., and Hall, A. (1992). The small GTP-binding protein rho regulates the assembly of focal adhesions and actin stress fibers in response to growth factors. *Cell* 70, 389-399.
- Riento, K., and Ridley, A.J. (2003). Rocks: multifunctional kinases in cell behaviour. *Nat Rev Mol Cell Biol* 4, 446-456.
- Ringer, P., Colo, G., Fassler, R., and Grashoff, C. (2017). Sensing the mechanochemical properties of the extracellular matrix. *Matrix Biol* 64, 6-16.
- Rinne, A., Birk, A., and Bunemann, M. (2013). Voltage regulates adrenergic receptor function. *Proc Natl Acad Sci U S A* 110, 1536-1541.
- Rinne, A., Mobarec, J.C., Mahaut-Smith, M., Kolb, P., and Bunemann, M. (2015). The mode of agonist binding to a G protein-coupled receptor switches the effect that voltage changes have on signaling. *Sci Signal* 8, ra110.
- Riven, I., Iwanir, S., and Reuveny, E. (2006). GIRK channel activation involves a local rearrangement of a preformed G protein channel complex. *Neuron* 51, 561-573.

- Rizzo, M.A., Springer, G.H., Granada, B., and Piston, D.W. (2004). An improved cyan fluorescent protein variant useful for FRET. *Nat Biotechnol* *22*, 445-449.
- Robinson, A.J., and Dickenson, J.M. (2001). Activation of the p38 and p42/p44 mitogen-activated protein kinase families by the histamine H(1) receptor in DDT(1)MF-2 cells. *Br J Pharmacol* *133*, 1378-1386.
- Roch, G.J., Busby, E.R., and Sherwood, N.M. (2014). GnRH receptors and peptides: skating backward. *Gen Comp Endocrinol* *209*, 118-134.
- Rochais, F., Vandecasteele, G., Lefebvre, F., Lugnier, C., Lum, H., Mazet, J.L., Cooper, D.M., and Fischmeister, R. (2004). Negative feedback exerted by cAMP-dependent protein kinase and cAMP phosphodiesterase on subsarcolemmal cAMP signals in intact cardiac myocytes: an in vivo study using adenovirus-mediated expression of CNG channels. *J Biol Chem* *279*, 52095-52105.
- Roman, R.J., and Van Dokkum, R.P. (2014). Commentary on the special issue on the impact of myogenic tone in health and disease. *Curr Vasc Pharmacol* *12*, 779.
- Rosenbaum, D.M., Cherezov, V., Hanson, M.A., Rasmussen, S.G., Thian, F.S., Kobilka, T.S., Choi, H.J., Yao, X.J., Weis, W.I., Stevens, R.C., *et al.* (2007). GPCR engineering yields high-resolution structural insights into beta2-adrenergic receptor function. *Science* *318*, 1266-1273.
- Ross, E.M. (2008). Coordinating speed and amplitude in G-protein signaling. *Curr Biol* *18*, R777-R783.
- Ross, E.M., and Wilkie, T.M. (2000). GTPase-activating proteins for heterotrimeric G proteins: regulators of G protein signaling (RGS) and RGS-like proteins. *Annu Rev Biochem* *69*, 795-827.
- Rotsch, C., and Radmacher, M. (2000). Drug-Induced Changes of Cytoskeletal Structure and Mechanics in Fibroblasts: An Atomic Force Microscopy Study. *Biophysical Journal* *78*, 520-535.
- Roudaut, Y., Lonigro, A., Coste, B., Hao, J., Delmas, P., and Crest, M. (2012). Touch sense: functional organization and molecular determinants of mechanosensitive receptors. *Channels (Austin)* *6*, 234-245.
- Rovati, G.E., Capra, V., and Neubig, R.R. (2007). The highly conserved DRY motif of class A G protein-coupled receptors: beyond the ground state. *Mol Pharmacol* *71*, 959-964.
- Rovati, G.E., Capra, V., Shaw, V.S., Malik, R.U., Sivaramakrishnan, S., and Neubig, R.R. (2017). The DRY motif and the four corners of the cubic ternary complex model. *Cell Signal* *35*, 16-23.
- Rucktooa, P., Cheng, R.K.Y., Segala, E., Geng, T., Errey, J.C., Brown, G.A., Cooke, R.M., Marshall, F.H., and Doré, A.S. (2018). Towards high throughput GPCR crystallography: In Meso soaking of Adenosine A2A Receptor crystals. *Scientific Reports* *8*, 41.
- Sackin, H. (1995a). Mechanosensitive channels. *Annu Rev Physiol* *57*, 333-353.
- Sackin, H. (1995b). Stretch-activated ion channels. *Kidney Int* *48*, 1134-1147.
- Sadana, R., and Dessauer, C.W. (2009). Physiological roles for G protein-regulated adenylyl cyclase isoforms: insights from knockout and overexpression studies. *Neurosignals* *17*, 5-22.
- Sah, V.P., Seasholtz, T.M., Sagi, S.A., and Brown, J.H. (2000). The role of Rho in G protein-coupled receptor signal transduction. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* *40*, 459-489.

- Sahlholm, K., Marcellino, D., Nilsson, J., Fuxe, K., and Arhem, P. (2008a). Voltage-sensitivity at the human dopamine D2S receptor is agonist-specific. *Biochem Biophys Res Commun* *377*, 1216-1221.
- Sahlholm, K., Nilsson, J., Marcellino, D., Fuxe, K., and Arhem, P. (2008b). Voltage-dependence of the human dopamine D2 receptor. *Synapse* *62*, 476-480.
- Sahlholm, K., Nilsson, J., Marcellino, D., Fuxe, K., and Arhem, P. (2012). Voltage sensitivities and deactivation kinetics of histamine H(3) and H(4) receptors. *Biochim Biophys Acta* *1818*, 3081-3089.
- Saiki, R.K., Gelfand, D.H., Stoffel, S., Scharf, S.J., Higuchi, R., Horn, G.T., Mullis, K.B., and Erlich, H.A. (1988). Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science* *239*, 487-491.
- Salahpour, A., Espinoza, S., Masri, B., Lam, V., Barak, L.S., and Gainetdinov, R.R. (2012). BRET biosensors to study GPCR biology, pharmacology, and signal transduction. *Front Endocrinol (Lausanne)* *3*, 105.
- Sanger, F., Air, G.M., Barrell, B.G., Brown, N.L., Coulson, A.R., Fiddes, C.A., Hutchison, C.A., Slocombe, P.M., and Smith, M. (1977a). Nucleotide sequence of bacteriophage phi X174 DNA. *Nature* *265*, 687-695.
- Sanger, F., Nicklen, S., and Coulson, A.R. (1977b). DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc Natl Acad Sci U S A* *74*, 5463-5467.
- Santos, R., Ursu, O., Gaulton, A., Bento, A.P., Donadi, R.S., Bologa, C.G., Karlsson, A., Al-Lazikani, B., Hersey, A., Oprea, T.I., *et al.* (2017). A comprehensive map of molecular drug targets. *Nat Rev Drug Discov* *16*, 19-34.
- Sassone-Corsi, P. (2012). The cyclic AMP pathway. *Cold Spring Harb Perspect Biol* *4*.
- Sathanoori, R., Bryl-Gorecka, P., Muller, C.E., Erb, L., Weisman, G.A., Olde, B., and Erlinge, D. (2017). P2Y2 receptor modulates shear stress-induced cell alignment and actin stress fibers in human umbilical vein endothelial cells. *Cell Mol Life Sci* *74*, 731-746.
- Sato, P.Y., Chuprun, J.K., Schwartz, M., and Koch, W.J. (2015). The evolving impact of G protein-coupled receptor kinases in cardiac health and disease. *Physiol Rev* *95*, 377-404.
- Sato, T. (2019). Conserved 2nd Residue of Helix 8 of GPCR May Confer the Subclass-Characteristic and Distinct Roles through a Rapid Initial Interaction with Specific G Proteins. *Int J Mol Sci* *20*.
- Sato, T., Kawasaki, T., Mine, S., and Matsumura, H. (2016). Functional Role of the C-Terminal Amphipathic Helix 8 of Olfactory Receptors and Other G Protein-Coupled Receptors. *Int J Mol Sci* *17*.
- Satoh, T., Sugama, K., Matsuo, A., Kato, S., Ito, S., Hatanaka, M., and Sasaguri, Y. (1994). Histamine as an activator of cell growth and extracellular matrix reconstruction for human vascular smooth muscle cells. *Atherosclerosis* *110*, 53-61.
- Savery, M.D., and Damiano, E.R. (2008). The endothelial glycocalyx is hydrodynamically relevant in arterioles throughout the cardiac cycle. *Biophys J* *95*, 1439-1447.
- Scheerer, P., Park, J.H., Hildebrand, P.W., Kim, Y.J., Krauss, N., Choe, H.W., Hofmann, K.P., and Ernst, O.P. (2008). Crystal structure of opsin in its G-protein-interacting conformation. *Nature* *455*, 497-502.
- Schleicher, S., Boekhoff, I., Arriza, J., Lefkowitz, R.J., and Breer, H. (1993). A beta-adrenergic receptor kinase-like enzyme is involved in olfactory signal termination. *Proc Natl Acad Sci U S A* *90*, 1420-1424.

- Schlicker, E. (2013). Kapitel 6 - Pharmakologie des Histamins. In Allgemeine und spezielle Pharmakologie und Toxikologie (Elfte Ausgabe), K. Aktories, U. Förstermann, F. Hofmann, and K. Starke, eds. (Munich: Urban & Fischer), pp. 199-206.
- Schmidt, D., del Marmol, J., and MacKinnon, R. (2012). Mechanistic basis for low threshold mechanosensitivity in voltage-dependent K⁺ channels. *Proc Natl Acad Sci U S A* *109*, 10352-10357.
- Schmidt, J.J. (1986). DNA cloning: A practical approach Volumes 1 and 2: Edited by D M Glover. pp 190 and 245. IRL Press, Oxford. 1985. £13.50 each or £24 for the two ISBN 0-947945-18-7 and-19-5. *Biochemical Education* *14*, 91-91.
- Schnell, D., and Seifert, R. (2010). Modulation of histamine H(3) receptor function by monovalent ions. *Neurosci Lett* *472*, 114-118.
- Scholz, N., Gehring, J., Guan, C., Ljaschenko, D., Fischer, R., Lakshmanan, V., Kittel, R.J., and Langenhan, T. (2015). The adhesion GPCR latrophilin/CIRL shapes mechanosensation. *Cell Rep* *11*, 866-874.
- Scholz, N., Monk, K.R., Kittel, R.J., and Langenhan, T. (2016a). Adhesion GPCRs as a Putative Class of Metabotropic Mechanosensors. In *Adhesion G Protein-coupled Receptors: Molecular, Physiological and Pharmacological Principles in Health and Disease*, T. Langenhan, and T. Schöneberg, eds. (Cham: Springer International Publishing), pp. 221-247.
- Scholz, N., Monk, K.R., Kittel, R.J., and Langenhan, T. (2016b). Adhesion GPCRs as a Putative Class of Metabotropic Mechanosensors. *Handb Exp Pharmacol* *234*, 221-247.
- Schrage, R., De Min, A., Hochheiser, K., Kostenis, E., and Mohr, K. (2016). Superagonism at G protein-coupled receptors and beyond. *Br J Pharmacol* *173*, 3018-3027.
- Schwartz, J.C., Arrang, J.M., Garbarg, M., Pollard, H., and Ruat, M. (1991). Histaminergic transmission in the mammalian brain. *Physiol Rev* *71*, 1-51.
- Scimia, M.C., Hurtado, C., Ray, S., Metzler, S., Wei, K., Wang, J., Woods, C.E., Purcell, N.H., Catalucci, D., Akasaka, T., *et al.* (2012). APJ acts as a dual receptor in cardiac hypertrophy. *Nature* *488*, 394-398.
- Scott, V.R., Boehme, R., and Matthews, T.R. (1988). New class of antifungal agents: jasplakinolide, a cyclodepsipeptide from the marine sponge, *Jaspis* species. *Antimicrob Agents Chemother* *32*, 1154-1157.
- Seamon, K.B., Padgett, W., and Daly, J.W. (1981). Forskolin: unique diterpene activator of adenylate cyclase in membranes and in intact cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* *78*, 3363-3367.
- Secomb, T.W., Hsu, R., and Pries, A.R. (2001). Effect of the endothelial surface layer on transmission of fluid shear stress to endothelial cells. *Biorheology* *38*, 143-150.
- Segala, E., Guo, D., Cheng, R.K.Y., Bortolato, A., Deflorian, F., Doré, A.S., Errey, J.C., Heitman, L.H., Ijzerman, A.P., Marshall, F.H., *et al.* (2016). Controlling the Dissociation of Ligands from the Adenosine A2A Receptor through Modulation of Salt Bridge Strength. *Journal of Medicinal Chemistry* *59*, 6470-6479.
- Seidel, C.L. (1997). Cellular Heterogeneity of the Vascular Tunica Media. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology* *17*, 1868-1871.
- Seifert, R., Strasser, A., Schneider, E.H., Neumann, D., Dove, S., and Buschauer, A. (2013). Molecular and cellular analysis of human histamine receptor subtypes. *Trends Pharmacol Sci* *34*, 33-58.
- Selent, J., Sanz, F., Pastor, M., and De Fabritiis, G. (2010). Induced effects of sodium ions on dopaminergic G-protein coupled receptors. *PLoS Comput Biol* *6*.

- Sensoy, O., and Weinstein, H. (2015). A mechanistic role of Helix 8 in GPCRs: Computational modeling of the dopamine D2 receptor interaction with the GIPC1-PDZ-domain. *Biochim Biophys Acta* 1848, 976-983.
- Shaner, N.C., Patterson, G.H., and Davidson, M.W. (2007). Advances in fluorescent protein technology. *J Cell Sci* 120, 4247-4260.
- Shang, Y., LeRouzic, V., Schneider, S., Bisignano, P., Pasternak, G.W., and Filizola, M. (2014). Mechanistic insights into the allosteric modulation of opioid receptors by sodium ions. *Biochemistry* 53, 5140-5149.
- Shannon, C.E. (1949). Communication in the Presence of Noise. *Proceedings of the IRE* 37, 10-21.
- Sharif-Naeini, R., Folgering, J.H., Bichet, D., Duprat, F., Delmas, P., Patel, A., and Honore, E. (2010). Sensing pressure in the cardiovascular system: Gq-coupled mechanoreceptors and TRP channels. *J Mol Cell Cardiol* 48, 83-89.
- Sharif-Naeini, R., Folgering, J.H., Bichet, D., Duprat, F., Lauritzen, I., Arhatte, M., Jodar, M., Dedman, A., Chatelain, F.C., Schulte, U., *et al.* (2009). Polycystin-1 and -2 dosage regulates pressure sensing. *Cell* 139, 587-596.
- Shen, B., Wong, C.O., Lau, O.C., Woo, T., Bai, S., Huang, Y., and Yao, X. (2015). Plasma membrane mechanical stress activates TRPC5 channels. *PLoS One* 10, e0122227.
- Shih, J.C., Chen, K., and Ridd, M.J. (1999). Monoamine oxidase: from genes to behavior. *Annu Rev Neurosci* 22, 197-217.
- Shimamura, T., Shiroishi, M., Weyand, S., Tsujimoto, H., Winter, G., Katritch, V., Abagyan, R., Cherezov, V., Liu, W., Han, G.W., *et al.* (2011). Structure of the human histamine H1 receptor complex with doxepin. *Nature* 475, 65-70.
- Shiraishi-Yamaguchi, Y., and Furuichi, T. (2007). The Homer family proteins. *Genome Biol* 8, 206.
- Shiroishi, M., and Kobayashi, T. (2017). Structural Analysis of the Histamine H1 Receptor. In *Histamine and Histamine Receptors in Health and Disease*, Y. Hattori, and R. Seifert, eds. (Cham: Springer International Publishing), pp. 21-30.
- Shukla, A.K., Xiao, K., and Lefkowitz, R.J. (2011). Emerging paradigms of beta-arrestin-dependent seven transmembrane receptor signaling. *Trends Biochem Sci* 36, 457-469.
- Siehl, S. (2007). G12/13-dependent signaling of G-protein-coupled receptors: disease context and impact on drug discovery. *Expert Opin Drug Discov* 2, 1591-1604.
- Siehl, S. (2009). Regulation of RhoGEF proteins by G12/13-coupled receptors. *Br J Pharmacol* 158, 41-49.
- Sievers, F., Wilm, A., Dineen, D., Gibson, T.J., Karplus, K., Li, W., Lopez, R., McWilliam, H., Remmert, M., Soding, J., *et al.* (2011). Fast, scalable generation of high-quality protein multiple sequence alignments using Clustal Omega. *Mol Syst Biol* 7, 539.
- Simon, M.I., Strathmann, M.P., and Gautam, N. (1991). Diversity of G proteins in signal transduction. *Science* 252, 802-808.
- Simons, F.E., and Simons, K.J. (2008). H1 antihistamines: current status and future directions. *World Allergy Organ J* 1, 145-155.
- Simons, F.E., and Simons, K.J. (2011). Histamine and H1-antihistamines: celebrating a century of progress. *J Allergy Clin Immunol* 128, 1139-1150 e1134.
- Singer, A.U., Waldo, G.L., Harden, T.K., and Sondek, J. (2002). A unique fold of phospholipase C-beta mediates dimerization and interaction with G alpha q. *Nat Struct Biol* 9, 32-36.

- Singer, S.J., and Nicolson, G.L. (1972). The fluid mosaic model of the structure of cell membranes. *Science* *175*, 720-731.
- Siontorou, C.G., Nikoleli, G.-P., Nikolelis, D.P., and Karapetis, S.K. (2017). Artificial Lipid Membranes: Past, Present, and Future. *Membranes (Basel)* *7*, 38.
- Siu, F.Y., He, M., de Graaf, C., Han, G.W., Yang, D., Zhang, Z., Zhou, C., Xu, Q., Wacker, D., Joseph, J.S., *et al.* (2013). Structure of the human glucagon class B G-protein-coupled receptor. *Nature* *499*, 444-449.
- Skalhegg, B.S., and Tasken, K. (2000). Specificity in the cAMP/PKA signaling pathway. Differential expression, regulation, and subcellular localization of subunits of PKA. *Front Biosci* *5*, D678-693.
- Skoufias, D.A., and Wilson, L. (1992). Mechanism of inhibition of microtubule polymerization by colchicine: inhibitory potencies of unliganded colchicine and tubulin-colchicine complexes. *Biochemistry* *31*, 738-746.
- Smith, J.S., and Rajagopal, S. (2016). The beta-Arrestins: Multifunctional Regulators of G Protein-coupled Receptors. *J Biol Chem* *291*, 8969-8977.
- Smith, M., Brown, N.L., Air, G.M., Barrell, B.G., Coulson, A.R., Hutchison, C.A., 3rd, and Sanger, F. (1977). DNA sequence at the C termini of the overlapping genes A and B in bacteriophage phi X174. *Nature* *265*, 702-705.
- Smith, M.A., Hoffman, L.M., and Beckerle, M.C. (2014). LIM proteins in actin cytoskeleton mechanoresponse. *Trends Cell Biol* *24*, 575-583.
- Smrcka, A.V., Hepler, J.R., Brown, K.O., and Sternweis, P.C. (1991). Regulation of polyphosphoinositide-specific phospholipase C activity by purified Gq. *Science* *251*, 804-807.
- Söldner, C.A., Horn, A.H.C., and Sticht, H. (2018). Binding of histamine to the H1 receptor—a molecular dynamics study. *Journal of Molecular Modeling* *24*, 346.
- Sondek, J., Böhm, A., Lambright, D.G., Hamm, H.E., and Sigler, P.B. (1996). Crystal structure of a G-protein beta gamma dimer at 2.1 Å resolution. *Nature* *379*, 369-374.
- Sotomayor, M., Weihofen, W.A., Gaudet, R., and Corey, D.P. (2012). Structure of a force-conveying cadherin bond essential for inner-ear mechanotransduction. *Nature* *492*, 128-132.
- Spassova, M.A., Hewavitharana, T., Xu, W., Soboloff, J., and Gill, D.L. (2006). A common mechanism underlies stretch activation and receptor activation of TRPC6 channels. *Proc Natl Acad Sci U S A* *103*, 16586-16591.
- Spector, I., Braet, F., Shochet, N.R., and Bubb, M.R. (1999). New anti-actin drugs in the study of the organization and function of the actin cytoskeleton. *Microsc Res Tech* *47*, 18-37.
- Spector, I., Shochet, N.R., Blasberger, D., and Kashman, Y. (1989). Latrunculins--novel marine macrolides that disrupt microfilament organization and affect cell growth: I. Comparison with cytochalasin D. *Cell Motil Cytoskeleton* *13*, 127-144.
- Spector, I., Shochet, N.R., Kashman, Y., and Groweiss, A. (1983). Latrunculins: novel marine toxins that disrupt microfilament organization in cultured cells. *Science* *219*, 493-495.
- Spomer, L., Gertzen, C.G., Schmitz, B., Haussinger, D., Gohlke, H., and Keitel, V. (2014). A membrane-proximal, C-terminal alpha-helix is required for plasma membrane localization and function of the G Protein-coupled receptor (GPCR) TGR5. *J Biol Chem* *289*, 3689-3702.

- Sriram, K., and Insel, P.A. (2018). G Protein-Coupled Receptors as Targets for Approved Drugs: How Many Targets and How Many Drugs? *Mol Pharmacol* **93**, 251-258.
- St-Gelais, F., Jomphe, C., and Trudeau, L.E. (2006). The role of neurotensin in central nervous system pathophysiology: what is the evidence? *J Psychiatry Neurosci* **31**, 229-245.
- Stan, R.V. (2005). Structure of caveolae. *Biochim Biophys Acta* **1746**, 334-348.
- Standfuss, J., Edwards, P.C., D'Antona, A., Fransen, M., Xie, G., Oprian, D.D., and Schertler, G.F. (2011). The structural basis of agonist-induced activation in constitutively active rhodopsin. *Nature* **471**, 656-660.
- Stanfield, P.R., Nakajima, S., and Nakajima, Y. (2002). Constitutively active and G-protein coupled inward rectifier K⁺ channels: Kir2.0 and Kir3.0. *Rev Physiol Biochem Pharmacol* **145**, 47-179.
- Stanley, R.J., and Thomas, G.M. (2016). Activation of G Proteins by Guanine Nucleotide Exchange Factors Relies on GTPase Activity. *PLoS One* **11**, e0151861.
- Stark, H., and Schubert-Zsilavecz, M. (2004). H1-Antihistaminika: Entwicklungen, Strukturen und neue Tendenzen. *Pharmazie in unserer Zeit* **33**, 92-98.
- Stein, P.E., Boodhoo, A., Armstrong, G.D., Cockle, S.A., Klein, M.H., and Read, R.J. (1994). The crystal structure of pertussis toxin. *Structure* **2**, 45-57.
- Stokes, J.R., Romero, F.A., Jr., Allan, R.J., Phillips, P.G., Hackman, F., Misfeldt, J., and Casale, T.B. (2012). The effects of an H3 receptor antagonist (PF-03654746) with fexofenadine on reducing allergic rhinitis symptoms. *J Allergy Clin Immunol* **129**, 409-412, 412 e401-402.
- Storch, U., Blodow, S., Gudermann, T., and Mederos, Y.S.M. (2015). Cysteinyl leukotriene 1 receptors as novel mechanosensors mediating myogenic tone together with angiotensin II type 1 receptors-brief report. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* **35**, 121-126.
- Storch, U., Forst, A.L., Pardatscher, F., Erdogmus, S., Philipp, M., Gregoritzka, M., Mederos, Y.S.M., and Gudermann, T. (2017a). Dynamic NHERF interaction with TRPC4/5 proteins is required for channel gating by diacylglycerol. *Proc Natl Acad Sci U S A* **114**, E37-E46.
- Storch, U., Mederos y Schnitzler, M., and Gudermann, T. (2012). G protein-mediated stretch reception. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* **302**, H1241-1249.
- Storch, U., Straub, J., Erdogmus, S., Gudermann, T., and Mederos, Y.S.M. (2017b). Dynamic monitoring of Gi/o-protein-mediated decreases of intracellular cAMP by FRET-based Epac sensors. *Pflugers Arch* **469**, 725-737.
- Storch, U., Straub, J., Erdogmus, S., Gudermann, T., and Mederos, Y.S.M. (2017c). Erratum to: Dynamic monitoring of Gi/o-protein-mediated decreases of intracellular cAMP by FRET-based Epac sensors. *Pflugers Arch* **469**, 1231-1232.
- Strange, P.G. (2002). Mechanisms of inverse agonism at G-protein-coupled receptors. *Trends Pharmacol Sci* **23**, 89-95.
- Streb, H., Irvine, R.F., Berridge, M.J., and Schulz, I. (1983). Release of Ca²⁺ from a nonmitochondrial intracellular store in pancreatic acinar cells by inositol-1,4,5-trisphosphate. *Nature* **306**, 67-69.
- Sukharev, S. (2002). Purification of the small mechanosensitive channel of *Escherichia coli* (MscS): the subunit structure, conduction, and gating characteristics in liposomes. *Biophys J* **83**, 290-298.

- Sukharev, S.I., Martinac, B., Arshavsky, V.Y., and Kung, C. (1993). Two types of mechanosensitive channels in the *Escherichia coli* cell envelope: solubilization and functional reconstitution. *Biophys J* 65, 177-183.
- Sun, M., Oakes, J.L., Ananthanarayanan, S.K., Hawley, K.H., Tsien, R.Y., Adams, S.R., and Yengo, C.M. (2006). Dynamics of the upper 50-kDa domain of myosin V examined with fluorescence resonance energy transfer. *J Biol Chem* 281, 5711-5717.
- Sun, Y., Booker, C.F., Kumari, S., Day, R.N., Davidson, M., and Periasamy, A. (2009). Characterization of an orange acceptor fluorescent protein for sensitized spectral fluorescence resonance energy transfer microscopy using a white-light laser. *J Biomed Opt* 14, 054009.
- Sunahara, R.K., Dessauer, C.W., and Gilman, A.G. (1996). Complexity and diversity of mammalian adenylyl cyclases. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 36, 461-480.
- Sunahara, R.K., Dessauer, C.W., Whisnant, R.E., Kleuss, C., and Gilman, A.G. (1997a). Interaction of G α with the cytosolic domains of mammalian adenylyl cyclase. *J Biol Chem* 272, 22265-22271.
- Sunahara, R.K., and Taussig, R. (2002). Isoforms of mammalian adenylyl cyclase: multiplicities of signaling. *Mol Interv* 2, 168-184.
- Sunahara, R.K., Tesmer, J.J., Gilman, A.G., and Sprang, S.R. (1997b). Crystal structure of the adenylyl cyclase activator G α . *Science* 278, 1943-1947.
- Surgand, J.S., Rodrigo, J., Kellenberger, E., and Rognan, D. (2006). A chemogenomic analysis of the transmembrane binding cavity of human G-protein-coupled receptors. *Proteins* 62, 509-538.
- Sutherland, E.W., and Rall, T.W. (1958). Fractionation and characterization of a cyclic adenine ribonucleotide formed by tissue particles. *J Biol Chem* 232, 1077-1091.
- Suvorova, E.S., Gripentrog, J.M., Jesaitis, A.J., and Miettinen, H.M. (2009). Agonist-dependent phosphorylation of the formyl peptide receptor is regulated by the membrane proximal region of the cytoplasmic tail. *Biochim Biophys Acta* 1793, 406-417.
- Swift, S., Leger, A.J., Talavera, J., Zhang, L., Bohm, A., and Kuliopulos, A. (2006). Role of the PAR1 receptor 8th helix in signaling: the 7-8-1 receptor activation mechanism. *J Biol Chem* 281, 4109-4116.
- Syeda, R., Florendo, M.N., Cox, C.D., Kefauver, J.M., Santos, J.S., Martinac, B., and Patapoutian, A. (2016). Piezo1 Channels Are Inherently Mechanosensitive. *Cell Rep* 17, 1739-1746.
- Syrovatkina, V., Alegre, K.O., Dey, R., and Huang, X.Y. (2016). Regulation, Signaling, and Physiological Functions of G-Proteins. *J Mol Biol* 428, 3850-3868.
- Takagishi, T., Sasaguri, Y., Nakano, R., Arima, N., Tanimoto, A., Fukui, H., and Morimatsu, M. (1995). Expression of the histamine H1 receptor gene in relation to atherosclerosis. *Am J Pathol* 146, 981-988.
- Takao, K., Yoshii, M., Kanda, A., Kokubun, S., and Nukada, T. (1994). A region of the muscarinic-gated atrial K⁺ channel critical for activation by G protein beta gamma subunits. *Neuron* 13, 747-755.
- Tanabe, S., Kreutz, B., Suzuki, N., and Kozasa, T. (2004). Regulation of RGS-RhoGEFs by G α 12 and G α 13 proteins. *Methods Enzymol* 390, 285-294.
- Tanaka, K.A., Szlam, F., Katori, N., Tsuda, A., and Levy, J.H. (2004). In vitro effects of antihypertensive drugs on thromboxane agonist (U46619)-induced vasoconstriction in human internal mammary artery. *Br J Anaesth* 93, 257-262.

- Tang, W., Strachan, R.T., Lefkowitz, R.J., and Rockman, H.A. (2014). Allosteric modulation of beta-arrestin-biased angiotensin II type 1 receptor signaling by membrane stretch. *J Biol Chem* *289*, 28271-28283.
- Tang, X.L., Wang, Y., Li, D.L., Luo, J., and Liu, M.Y. (2012). Orphan G protein-coupled receptors (GPCRs): biological functions and potential drug targets. *Acta Pharmacol Sin* *33*, 363-371.
- Tanimoto, A., Wang, K.Y., Murata, Y., Kimura, S., Nomaguchi, M., Nakata, S., Tsutsui, M., and Sasaguri, Y. (2007). Histamine upregulates the expression of inducible nitric oxide synthase in human intimal smooth muscle cells via histamine H1 receptor and NF-kappaB signaling pathway. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* *27*, 1556-1561.
- Tarbell, J.M., and Shi, Z.D. (2013). Effect of the glycocalyx layer on transmission of interstitial flow shear stress to embedded cells. *Biomech Model Mechanobiol* *12*, 111-121.
- Tarbell, J.M., Weinbaum, S., and Kamm, R.D. (2005). Cellular fluid mechanics and mechanotransduction. *Ann Biomed Eng* *33*, 1719-1723.
- Tate, C.G. (2017). Structural biology: A receptor that might block itself. *Nature* *544*, 307-308.
- Tatsumi, M., Groshan, K., Blakely, R.D., and Richelson, E. (1997). Pharmacological profile of antidepressants and related compounds at human monoamine transporters. *Eur J Pharmacol* *340*, 249-258.
- Taussig, R., and Gilman, A.G. (1995). Mammalian membrane-bound adenylyl cyclases. *J Biol Chem* *270*, 1-4.
- Taylor, S.J., Chae, H.Z., Rhee, S.G., and Exton, J.H. (1991). Activation of the beta 1 isozyme of phospholipase C by alpha subunits of the Gq class of G proteins. *Nature* *350*, 516-518.
- Taylor, S.S., Knighton, D.R., Zheng, J., Ten Eyck, L.F., and Sowadski, J.M. (1992). cAMP-dependent protein kinase and the protein kinase family. *Faraday Discuss*, 143-152.
- Teng, J., Loukin, S., Anishkin, A., and Kung, C. (2015). The force-from-lipid (FFL) principle of mechanosensitivity, at large and in elements. *Pflugers Arch* *467*, 27-37.
- Teramoto, H., Crespo, P., Coso, O.A., Igishi, T., Xu, N., and Gutkind, J.S. (1996). The small GTP-binding protein rho activates c-Jun N-terminal kinases/stress-activated protein kinases in human kidney 293T cells. Evidence for a Pak-independent signaling pathway. *J Biol Chem* *271*, 25731-25734.
- Tesmer, J.J., Sunahara, R.K., Fancy, D.A., Gilman, A.G., and Sprang, S.R. (2002). Crystallization of complex between soluble domains of adenylyl cyclase and activated Gs alpha. *Methods Enzymol* *345*, 198-206.
- Tesmer, J.J., Sunahara, R.K., Gilman, A.G., and Sprang, S.R. (1997). Crystal structure of the catalytic domains of adenylyl cyclase in a complex with Gs alpha.GTPgammaS. *Science* *278*, 1907-1916.
- Thakkar, M.M. (2011). Histamine in the regulation of wakefulness. *Sleep Med Rev* *15*, 65-74.
- Thibonnier, M., Plesnicher, C.L., Berrada, K., and Berti-Mattera, L. (2001). Role of the human V1 vasopressin receptor COOH terminus in internalization and mitogenic signal transduction. *Am J Physiol Endocrinol Metab* *281*, E81-92.
- Thielen, A., Oueslati, M., Hermosilla, R., Krause, G., Oksche, A., Rosenthal, W., and Schulein, R. (2005). The hydrophobic amino acid residues in the membrane-proximal C

tail of the G protein-coupled vasopressin V2 receptor are necessary for transport-competent receptor folding. *FEBS Lett* **579**, 5227-5235.

Thompson, M.D., Cole, D.E., Capra, V., Siminovitch, K.A., Rovati, G.E., Burnham, W.M., and Rana, B.K. (2014). Pharmacogenetics of the G protein-coupled receptors. *Methods Mol Biol* **1175**, 189-242.

Thomsen, A.R.B., Plouffe, B., Cahill, T.J., 3rd, Shukla, A.K., Tarrasch, J.T., Dosey, A.M., Kahsai, A.W., Strachan, R.T., Pani, B., Mahoney, J.P., *et al.* (2016). GPCR-G Protein-beta-Arrestin Super-Complex Mediates Sustained G Protein Signaling. *Cell* **166**, 907-919.

Thors, B., Halldorsson, H., and Thorgeirsson, G. (2004). Thrombin and histamine stimulate endothelial nitric-oxide synthase phosphorylation at Ser1177 via an AMPK mediated pathway independent of PI3K-Akt. *FEBS Lett* **573**, 175-180.

Thurm, U. (2001). Mechanosensorik. In *Neurowissenschaft: Vom Molekül zur Kognition*, J. Dudel, R. Menzel, and R.F. Schmidt, eds. (Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg), pp. 333-353.

Tiburu, E.K., Tyukhtenko, S., Zhou, H., Janero, D.R., Struppe, J., and Makriyannis, A. (2011). Human cannabinoid 1 GPCR C-terminal domain interacts with bilayer phospholipids to modulate the structure of its membrane environment. *AAPS J* **13**, 92-98.

Tirupula, K.C., Ithychanda, S.S., Mohan, M.L., Naga Prasad, S.V., Qin, J., and Karnik, S.S. (2015). G protein-coupled receptors directly bind filamin A with high affinity and promote filamin phosphorylation. *Biochemistry* **54**, 6673-6683.

Treichel, A.J., Farrugia, G., and Beyder, A. (2018). The touchy business of gastrointestinal (GI) mechanosensitivity. *Brain Res* **1693**, 197-200.

Trybus, K.M. (2008). Myosin V from head to tail. *Cell Mol Life Sci* **65**, 1378-1389.

Trzaskowski, B., Latek, D., Yuan, S., Ghoshdastider, U., Debinski, A., and Filipek, S. (2012). Action of molecular switches in GPCRs--theoretical and experimental studies. *Curr Med Chem* **19**, 1090-1109.

Tschumperlin, D.J., Ligresti, G., Hilscher, M.B., and Shah, V.H. (2018). Mechanosensing and fibrosis. *J Clin Invest* **128**, 74-84.

Tsien, R.Y. (1981). A non-disruptive technique for loading calcium buffers and indicators into cells. *Nature* **290**, 527-528.

Tsien, R.Y., Rink, T.J., and Poenie, M. (1985). Measurement of cytosolic free Ca²⁺ in individual small cells using fluorescence microscopy with dual excitation wavelengths. *Cell Calcium* **6**, 145-157.

Tsuchiya, H., Ueno, T., Mizogami, M., and Takakura, K. (2010). Local anesthetics structure-dependently interact with anionic phospholipid membranes to modify the fluidity. *Chemico-Biological Interactions* **183**, 19-24.

Tu, J.C., Xiao, B., Yuan, J.P., Lanahan, A.A., Leoffert, K., Li, M., Linden, D.J., and Worley, P.F. (1998). Homer Binds a Novel Proline-Rich Motif and Links Group 1 Metabotropic Glutamate Receptors with IP3 Receptors. *Neuron* **21**, 717-726.

Tzima, E., Irani-Tehrani, M., Kiosses, W.B., Dejana, E., Schultz, D.A., Engelhardt, B., Cao, G., DeLisser, H., and Schwartz, M.A. (2005). A mechanosensory complex that mediates the endothelial cell response to fluid shear stress. *Nature* **437**, 426-431.

Uemura, A., Nguyen, T.N., Steele, A.N., and Yamada, S. (2011). The LIM domain of zyxin is sufficient for force-induced accumulation of zyxin during cell migration. *Biophys J* **101**, 1069-1075.

- Unal, H., and Karnik, S.S. (2012). Domain coupling in GPCRs: the engine for induced conformational changes. *Trends Pharmacol Sci* 33, 79-88.
- Urizar, E., Claeysen, S., Deupi, X., Govaerts, C., Costagliola, S., Vassart, G., and Pardo, L. (2005). An activation switch in the rhodopsin family of G protein-coupled receptors: the thyrotropin receptor. *J Biol Chem* 280, 17135-17141.
- Vaiskunaite, R., Adarichev, V., Furthmayr, H., Kozasa, T., Gudkov, A., and Voyno-Yasenetskaya, T.A. (2000). Conformational activation of radixin by G13 protein alpha subunit. *J Biol Chem* 275, 26206-26212.
- Vaiskunaite, R., Kozasa, T., and Voyno-Yasenetskaya, T.A. (2001). Interaction between the G alpha subunit of heterotrimeric G(12) protein and Hsp90 is required for G alpha(12) signaling. *J Biol Chem* 276, 46088-46093.
- Van Aelst, L., and D'Souza-Schorey, C. (1997). Rho GTPases and signaling networks. *Genes Dev* 11, 2295-2322.
- van der Westhuizen, E.T., Valant, C., Sexton, P.M., and Christopoulos, A. (2015). Endogenous allosteric modulators of G protein-coupled receptors. *J Pharmacol Exp Ther* 353, 246-260.
- van Rijn, R.M., van Marle, A., Chazot, P.L., Langemeijer, E., Qin, Y., Shenton, F.C., Lim, H.D., Zuiderveld, O.P., Sansuk, K., Dy, M., *et al.* (2008). Cloning and characterization of dominant negative splice variants of the human histamine H4 receptor. *Biochem J* 414, 121-131.
- Vandecandelaere, A., Martin, S.R., and Engelborghs, Y. (1997). Response of microtubules to the addition of colchicine and tubulin-colchicine: evaluation of models for the interaction of drugs with microtubules. *Biochem J* 323 (Pt 1), 189-196.
- Venkatakrishnan, A.J., Deupi, X., Lebon, G., Tate, C.G., Schertler, G.F., and Babu, M.M. (2013). Molecular signatures of G-protein-coupled receptors. *Nature* 494, 185-194.
- Venter, J.C., Adams, M.D., Myers, E.W., Li, P.W., Mural, R.J., Sutton, G.G., Smith, H.O., Yandell, M., Evans, C.A., Holt, R.A., *et al.* (2001). The sequence of the human genome. *Science* 291, 1304-1351.
- Verma, S.C., and McNeill, J.H. (1976). Cardiac histamine receptors and cyclic AMP. *Life Sci* 19, 1797-1801.
- Vickery, O.N., Machtens, J.P., Tamburrino, G., Seeliger, D., and Zachariae, U. (2016a). Structural Mechanisms of Voltage Sensing in G Protein-Coupled Receptors. *Structure* 24, 997-1007.
- Vickery, O.N., Machtens, J.P., and Zachariae, U. (2016b). Membrane potentials regulating GPCRs: insights from experiments and molecular dynamics simulations. *Curr Opin Pharmacol* 30, 44-50.
- Violin, J.D., Dewire, S.M., Barnes, W.G., and Lefkowitz, R.J. (2006). G protein-coupled receptor kinase and beta-arrestin-mediated desensitization of the angiotensin II type 1A receptor elucidated by diacylglycerol dynamics. *J Biol Chem* 281, 36411-36419.
- Vogel, S.S., Nguyen, T.A., van der Meer, B.W., and Blank, P.S. (2012). The impact of heterogeneity and dark acceptor states on FRET: implications for using fluorescent protein donors and acceptors. *PLoS One* 7, e49593.
- Vogelstein, B., and Gillespie, D. (1979). Preparative and analytical purification of DNA from agarose. *Proc Natl Acad Sci U S A* 76, 615-619.
- Voigt, N., Maguy, A., Yeh, Y.H., Qi, X., Ravens, U., Dobrev, D., and Nattel, S. (2008). Changes in I_K, ACh single-channel activity with atrial tachycardia remodelling in canine atrial cardiomyocytes. *Cardiovasc Res* 77, 35-43.

- Wacker, D., Wang, C., Katritch, V., Han, G.W., Huang, X.P., Vardy, E., McCorvy, J.D., Jiang, Y., Chu, M., Siu, F.Y., *et al.* (2013). Structural features for functional selectivity at serotonin receptors. *Science* *340*, 615-619.
- Wakatsuki, T., Schwab, B., Thompson, N.C., and Elson, E.L. (2001). Effects of cytochalasin D and latrunculin B on mechanical properties of cells. *J Cell Sci* *114*, 1025-1036.
- Waldo, G.L., Boyer, J.L., Morris, A.J., and Harden, T.K. (1991). Purification of an AIF4- and G-protein beta gamma-subunit-regulated phospholipase C-activating protein. *J Biol Chem* *266*, 14217-14225.
- Waldo, G.L., Ricks, T.K., Hicks, S.N., Cheever, M.L., Kawano, T., Tsuboi, K., Wang, X., Montell, C., Kozasa, T., Sondek, J., *et al.* (2010). Kinetic scaffolding mediated by a phospholipase C-beta and Gq signaling complex. *Science* *330*, 974-980.
- Wall, K.P., Dillon, R., and Knowles, M.K. (2015). Fluorescence quantum yield measurements of fluorescent proteins: a laboratory experiment for a biochemistry or molecular biophysics laboratory course. *Biochem Mol Biol Educ* *43*, 52-59.
- Wall, M.A., Coleman, D.E., Lee, E., Iniguez-Lluhi, J.A., Posner, B.A., Gilman, A.G., and Sprang, S.R. (1995). The structure of the G protein heterotrimer Gi alpha 1 beta 1 gamma 2. *Cell* *83*, 1047-1058.
- Wang, C., Jiang, Y., Ma, J., Wu, H., Wacker, D., Katritch, V., Han, G.W., Liu, W., Huang, X.-P., Vardy, E., *et al.* (2013a). Structural Basis for Molecular Recognition at Serotonin Receptors. *Science* *340*, 610-614.
- Wang, C., Jiang, Y., Ma, J., Wu, H., Wacker, D., Katritch, V., Han, G.W., Liu, W., Huang, X.P., Vardy, E., *et al.* (2013b). Structural basis for molecular recognition at serotonin receptors. *Science* *340*, 610-614.
- Wang, J., and Feng, J.A. (2003). Exploring the sequence patterns in the alpha-helices of proteins. *Protein Eng* *16*, 799-807.
- Wang, S., Che, T., Levit, A., Shoichet, B.K., Wacker, D., and Roth, B.L. (2018). Structure of the D2 dopamine receptor bound to the atypical antipsychotic drug risperidone. *Nature* *555*, 269-273.
- Wang, S., Chennupati, R., Kaur, H., Iring, A., Wettschureck, N., and Offermanns, S. (2016). Endothelial cation channel PIEZO1 controls blood pressure by mediating flow-induced ATP release. *J Clin Invest* *126*, 4527-4536.
- Wang, S., Iring, A., Strlic, B., Albarran Juarez, J., Kaur, H., Troidl, K., Tonack, S., Burbiel, J.C., Muller, C.E., Fleming, I., *et al.* (2015). P2Y(2) and Gq/G(1)(1) control blood pressure by mediating endothelial mechanotransduction. *J Clin Invest* *125*, 3077-3086.
- Wang, S., Wacker, D., Levit, A., Che, T., Betz, R.M., McCorvy, J.D., Venkatakrisnan, A.J., Huang, X.P., Dror, R.O., Shoichet, B.K., *et al.* (2017). D4 dopamine receptor high-resolution structures enable the discovery of selective agonists. *Science* *358*, 381-386.
- Wang, Y., Prosen, D.E., Mei, L., Sullivan, J.C., Finney, M., and Vander Horn, P.B. (2004). A novel strategy to engineer DNA polymerases for enhanced processivity and improved performance in vitro. *Nucleic Acids Res* *32*, 1197-1207.
- Wang, Z., Jiang, Y., Lu, L., Huang, R., Hou, Q., and Shi, F. (2007). Molecular mechanisms of cyclic nucleotide-gated ion channel gating. *J Genet Genomics* *34*, 477-485.
- Wasserman, S.I. (1983). Mediators of immediate hypersensitivity. *J Allergy Clin Immunol* *72*, 101-119.

- Watanabe, G., Saito, Y., Madaule, P., Ishizaki, T., Fujisawa, K., Morii, N., Mukai, H., Ono, Y., Kakizuka, A., and Narumiya, S. (1996). Protein kinase N (PKN) and PKN-related protein rhophilin as targets of small GTPase Rho. *Science* *271*, 645-648.
- Watanabe, N., Madaule, P., Reid, T., Ishizaki, T., Watanabe, G., Kakizuka, A., Saito, Y., Nakao, K., Jockusch, B.M., and Narumiya, S. (1997). p140mDia, a mammalian homolog of *Drosophila* diaphanous, is a target protein for Rho small GTPase and is a ligand for profilin. *EMBO J* *16*, 3044-3056.
- Weinbaum, S., Tarbell, J.M., and Damiano, E.R. (2007). The structure and function of the endothelial glycocalyx layer. *Annu Rev Biomed Eng* *9*, 121-167.
- Weinbaum, S., Zhang, X., Han, Y., Vink, H., and Cowin, S.C. (2003). Mechanotransduction and flow across the endothelial glycocalyx. *Proc Natl Acad Sci U S A* *100*, 7988-7995.
- Weiner, M.P., Costa, G.L., Schoettlin, W., Cline, J., Mathur, E., and Bauer, J.C. (1994). Site-directed mutagenesis of double-stranded DNA by the polymerase chain reaction. *Gene* *151*, 119-123.
- Weinert, T., Olieric, N., Cheng, R., Brunle, S., James, D., Ozerov, D., Gashi, D., Vera, L., Marsh, M., Jaeger, K., *et al.* (2017a). Serial millisecond crystallography for routine room-temperature structure determination at synchrotrons. *Nat Commun* *8*, 542.
- Weinert, T., Olieric, N., Cheng, R., Brünle, S., James, D., Ozerov, D., Gashi, D., Vera, L., Marsh, M., Jaeger, K., *et al.* (2017b). Serial millisecond crystallography for routine room-temperature structure determination at synchrotrons. *Nature Communications* *8*, 542.
- Weinman, E.J., Hall, R.A., Friedman, P.A., Liu-Chen, L.Y., and Shenolikar, S. (2006). The association of NHERF adaptor proteins with g protein-coupled receptors and receptor tyrosine kinases. *Annu Rev Physiol* *68*, 491-505.
- Weir, E.E., Pretlow, T.G., Pitts, A., and Williams, E.E. (1974). A more sensitive and specific histochemical peroxidase stain for the localization of cellular antigen by the enzyme-antibody conjugate method. *J Histochem Cytochem* *22*, 1135-1140.
- Weiss, B., Jacquemin-Sablon, A., Live, T.R., Fareed, G.C., and Richardson, C.C. (1968). Enzymatic breakage and joining of deoxyribonucleic acid. VI. Further purification and properties of polynucleotide ligase from *Escherichia coli* infected with bacteriophage T4. *J Biol Chem* *243*, 4543-4555.
- West, R.E., Jr., Moss, J., Vaughan, M., Liu, T., and Liu, T.Y. (1985). Pertussis toxin-catalyzed ADP-ribosylation of transducin. Cysteine 347 is the ADP-ribose acceptor site. *J Biol Chem* *260*, 14428-14430.
- Westfield, G.H., Rasmussen, S.G., Su, M., Dutta, S., DeVree, B.T., Chung, K.Y., Calinski, D., Velez-Ruiz, G., Oleskie, A.N., Pardon, E., *et al.* (2011). Structural flexibility of the G alpha s alpha-helical domain in the beta2-adrenoceptor Gs complex. *Proc Natl Acad Sci U S A* *108*, 16086-16091.
- Wettschureck, N., and Offermanns, S. (2005). Mammalian G proteins and their cell type specific functions. *Physiol Rev* *85*, 1159-1204.
- White, J.F., Noinaj, N., Shibata, Y., Love, J., Kloss, B., Xu, F., Gvozdenovic-Jeremic, J., Shah, P., Shiloach, J., Tate, C.G., *et al.* (2012). Structure of the agonist-bound neurotensin receptor. *Nature* *490*, 508-513.
- White, J.P., Wrann, C.D., Rao, R.R., Nair, S.K., Jedrychowski, M.P., You, J.S., Martinez-Redondo, V., Gygi, S.P., Ruas, J.L., Hornberger, T.A., *et al.* (2014). G protein-coupled receptor 56 regulates mechanical overload-induced muscle hypertrophy. *Proc Natl Acad Sci U S A* *111*, 15756-15761.

- White, K.L., Eddy, M.T., Gao, Z.-G., Han, G.W., Lian, T., Deary, A., Patel, N., Jacobson, K.A., Katritch, V., and Stevens, R.C. (2018a). Structural Connection between Activation Microswitch and Allosteric Sodium Site in GPCR Signaling. *Structure* *26*, 259-269.e255.
- White, K.L., Eddy, M.T., Gao, Z.G., Han, G.W., Lian, T., Deary, A., Patel, N., Jacobson, K.A., Katritch, V., and Stevens, R.C. (2018b). Structural Connection between Activation Microswitch and Allosteric Sodium Site in GPCR Signaling. *Structure* *26*, 259-269 e255.
- Wickman, K.D., Iniguez-Lluhl, J.A., Davenport, P.A., Taussig, R., Krapivinsky, G.B., Linder, M.E., Gilman, A.G., and Clapham, D.E. (1994). Recombinant G-protein beta gamma-subunits activate the muscarinic-gated atrial potassium channel. *Nature* *368*, 255-257.
- Wieland, K., Laak, A.M., Smit, M.J., Kuhne, R., Timmerman, H., and Leurs, R. (1999). Mutational analysis of the antagonist-binding site of the histamine H(1) receptor. *J Biol Chem* *274*, 29994-30000.
- Wilde, C., Fischer, L., Lede, V., Kirchberger, J., Rothmund, S., Schoneberg, T., and Liebscher, I. (2016). The constitutive activity of the adhesion GPCR GPR114/ADGRG5 is mediated by its tethered agonist. *FASEB J* *30*, 666-673.
- Wilson, A.C., Meethal, S.V., Bowen, R.L., and Atwood, C.S. (2007). Leuprolide acetate: a drug of diverse clinical applications. *Expert Opin Investig Drugs* *16*, 1851-1863.
- Wilson, M.H., Highfield, H.A., and Limbird, L.E. (2001). The role of a conserved inter-transmembrane domain interface in regulating alpha(2a)-adrenergic receptor conformational stability and cell-surface turnover. *Mol Pharmacol* *59*, 929-938.
- Wirth, A., Benyo, Z., Lukasova, M., Leutgeb, B., Wettschureck, N., Gorbey, S., Orsy, P., Horvath, B., Maser-Gluth, C., Greiner, E., *et al.* (2008). G12-G13-LARG-mediated signaling in vascular smooth muscle is required for salt-induced hypertension. *Nat Med* *14*, 64-68.
- Wold, E.A., Chen, J., Cunningham, K.A., and Zhou, J. (2018). Allosteric Modulation of Class A GPCRs: Targets, Agents, and Emerging Concepts. *J Med Chem*.
- Wolfgang, H.G., and José Luis, A. (2016). Cellular mechanotransduction. *AIMS Biophysics* *3*, 50-62.
- Wolny, M., Batchelor, M., Knight, P.J., Paci, E., Dougan, L., and Peckham, M. (2014). Stable single alpha-helices are constant force springs in proteins. *J Biol Chem* *289*, 27825-27835.
- Woo, K.V., and Baldwin, H.S. (2011). Role of Tie1 in shear stress and atherosclerosis. *Trends Cardiovasc Med* *21*, 118-123.
- Woo, K.V., Qu, X., Babaev, V.R., Linton, M.F., Guzman, R.J., Fazio, S., and Baldwin, H.S. (2011). Tie1 attenuation reduces murine atherosclerosis in a dose-dependent and shear stress-specific manner. *J Clin Invest* *121*, 1624-1635.
- Woo, S.H., Lukacs, V., de Nooij, J.C., Zaytseva, D., Criddle, C.R., Francisco, A., Jessell, T.M., Wilkinson, K.A., and Patapoutian, A. (2015). Piezo2 is the principal mechanotransduction channel for proprioception. *Nat Neurosci* *18*, 1756-1762.
- Woolfson, D.N., and Williams, D.H. (1990). The influence of proline residues on alpha-helical structure. *FEBS Lett* *277*, 185-188.
- Worth, C.L., Kreuchwig, F., Tiemann, J.K.S., Kreuchwig, A., Ritschel, M., Kleinau, G., Hildebrand, P.W., and Krause, G. (2017). GPCR-SSFE 2.0-a fragment-based molecular modeling web tool for Class A G-protein coupled receptors. *Nucleic Acids Res*.
- Worzfeld, T., Wettschureck, N., and Offermanns, S. (2008). G(12)/G(13)-mediated signalling in mammalian physiology and disease. *Trends Pharmacol Sci* *29*, 582-589.

- Wright, M. (1971). Mutants of *Escherichia coli* lacking endonuclease I, ribonuclease I, or ribonuclease II. *J Bacteriol* *107*, 87-94.
- Wu, B., Chien, E.Y., Mol, C.D., Fenalti, G., Liu, W., Katritch, V., Abagyan, R., Brooun, A., Wells, P., Bi, F.C., *et al.* (2010). Structures of the CXCR4 chemokine GPCR with small-molecule and cyclic peptide antagonists. *Science* *330*, 1066-1071.
- Wu, J., Lewis, A.H., and Grandl, J. (2017a). Touch, Tension, and Transduction - The Function and Regulation of Piezo Ion Channels. *Trends Biochem Sci* *42*, 57-71.
- Wu, R.L., Anthes, J.C., Kreutner, W., Harris, A.G., and West, R.E., Jr. (2004). Desloratadine inhibits constitutive and histamine-stimulated nuclear factor-kappaB activity consistent with inverse agonism at the histamine H1 Receptor. *Int Arch Allergy Immunol* *135*, 313-318.
- Wu, Y., and Gunst, S.J. (2015). Vasodilator-stimulated phosphoprotein (VASP) regulates actin polymerization and contraction in airway smooth muscle by a vinculin-dependent mechanism. *J Biol Chem* *290*, 11403-11416.
- Wu, Z., Grillet, N., Zhao, B., Cunningham, C., Harkins-Perry, S., Coste, B., Ranade, S., Zebarjadi, N., Beurg, M., Fettiplace, R., *et al.* (2017b). Mechanosensory hair cells express two molecularly distinct mechanotransduction channels. *Nat Neurosci* *20*, 24-33.
- Wu, Z., Martinez-Fong, D., Tredaniel, J., and Forgez, P. (2012). Neurotensin and its high affinity receptor 1 as a potential pharmacological target in cancer therapy. *Front Endocrinol (Lausanne)* *3*, 184.
- Wyllie, J.H., Hesselbo, T., and Black, J.W. (1972). Effects in man of histamine H₂ - receptor blockade by burimamide. *Lancet* *2*, 1117-1120.
- Xiao, R., and Xu, X.Z. (2010). Mechanosensitive channels: in touch with Piezo. *Curr Biol* *20*, R936-938.
- Xiong, W., and Parsons, J.T. (1997). Induction of apoptosis after expression of PYK2, a tyrosine kinase structurally related to focal adhesion kinase. *J Cell Biol* *139*, 529-539.
- Xu, F., Wu, H., Katritch, V., Han, G.W., Jacobson, K.A., Gao, Z.G., Cherezov, V., and Stevens, R.C. (2011). Structure of an agonist-bound human A_{2A} adenosine receptor. *Science* *332*, 322-327.
- Xu, J., Mathur, J., Vessieres, E., Hammack, S., Nonomura, K., Favre, J., Grimaud, L., Petrus, M., Francisco, A., Li, J., *et al.* (2018). GPR68 Senses Flow and Is Essential for Vascular Physiology. *Cell* *173*, 762-775 e716.
- Xu, Q.H., Wang, S., Korystov, D., Mikhailovsky, A., Bazan, G.C., Moses, D., and Heeger, A.J. (2005). The fluorescence resonance energy transfer (FRET) gate: a time-resolved study. *Proc Natl Acad Sci U S A* *102*, 530-535.
- Yamaguchi, Y., Katoh, H., Mori, K., and Negishi, M. (2002). G_α(12) and G_α(13) interact with Ser/Thr protein phosphatase type 5 and stimulate its phosphatase activity. *Curr Biol* *12*, 1353-1358.
- Yamamoto, K., and Ando, J. (2013). Endothelial cell and model membranes respond to shear stress by rapidly decreasing the order of their lipid phases. *J Cell Sci* *126*, 1227-1234.
- Yamamoto, K., and Ando, J. (2015). Vascular endothelial cell membranes differentiate between stretch and shear stress through transitions in their lipid phases. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* *309*, H1178-1185.
- Yan, K., Gao, L.N., Cui, Y.L., Zhang, Y., and Zhou, X. (2016). The cyclic AMP signaling pathway: Exploring targets for successful drug discovery (Review). *Mol Med Rep* *13*, 3715-3723.

- Yanai, K. (2012). Anticholinergic activity of antihistamines. *Clin Neurophysiol* 123, 633-634.
- Yao, T., and Asayama, Y. (2017). Animal-cell culture media: History, characteristics, and current issues. *Reprod Med Biol* 16, 99-117.
- Yao, X.J., Velez Ruiz, G., Whorton, M.R., Rasmussen, S.G., DeVree, B.T., Deupi, X., Sunahara, R.K., and Kobilka, B. (2009). The effect of ligand efficacy on the formation and stability of a GPCR-G protein complex. *Proc Natl Acad Sci U S A* 106, 9501-9506.
- Yap, S.V., Koontz, J.M., and Kontrogianni-Konstantopoulos, A. (2011). HAX-1: a family of apoptotic regulators in health and disease. *J Cell Physiol* 226, 2752-2761.
- Yarmola, E.G., Somasundaram, T., Boring, T.A., Spector, I., and Bubb, M.R. (2000). Actin-latrunculin A structure and function. Differential modulation of actin-binding protein function by latrunculin A. *J Biol Chem* 275, 28120-28127.
- Yasuda, N., Akazawa, H., Qin, Y., Zou, Y., and Komuro, I. (2008a). A novel mechanism of mechanical stress-induced angiotensin II type 1-receptor activation without the involvement of angiotensin II. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* 377, 393-399.
- Yasuda, N., Miura, S., Akazawa, H., Tanaka, T., Qin, Y., Kiya, Y., Imaizumi, S., Fujino, M., Ito, K., Zou, Y., *et al.* (2008b). Conformational switch of angiotensin II type 1 receptor underlying mechanical stress-induced activation. *EMBO Rep* 9, 179-186.
- Yin, W., Zhou, X.E., Yang, D., de Waal, P.W., Wang, M., Dai, A., Cai, X., Huang, C.Y., Liu, P., Wang, X., *et al.* (2018). Crystal structure of the human 5-HT1B serotonin receptor bound to an inverse agonist. *Cell Discov* 4, 12.
- Yona, S., Lin, H.H., Siu, W.O., Gordon, S., and Stacey, M. (2008). Adhesion-GPCRs: emerging roles for novel receptors. *Trends Biochem Sci* 33, 491-500.
- Yu, J., Bergaya, S., Murata, T., Alp, I.F., Bauer, M.P., Lin, M.I., Drab, M., Kurzchalia, T.V., Stan, R.V., and Sessa, W.C. (2006). Direct evidence for the role of caveolin-1 and caveolae in mechanotransduction and remodeling of blood vessels. *J Clin Invest* 116, 1284-1291.
- Yun, R.H., Anderson, A., and Hermans, J. (1991). Proline in alpha-helix: stability and conformation studied by dynamics simulation. *Proteins* 10, 219-228.
- Zagrovic, B., Jayachandran, G., Millett, I.S., Doniach, S., and Pande, V.S. (2005). How large is an alpha-helix? Studies of the radii of gyration of helical peptides by small-angle X-ray scattering and molecular dynamics. *J Mol Biol* 353, 232-241.
- Zander, M. (1981). Theoretische Grundlagen der Lumineszenz organischer Moleküle. In *Fluorimetrie*, M. Zander, ed. (Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg), pp. 4-44.
- Zanini, D., and Gopfert, M.C. (2013). Mechanosensation: tethered ion channels. *Curr Biol* 23, R349-351.
- Zavec, J.H., and Levi, R. (1978). Histamine-induced negative inotropism: mediation by H1-receptors. *J Pharmacol Exp Ther* 206, 274-280.
- Zeng, Y., Shen, Y., Huang, X.L., Liu, X.J., and Liu, X.H. (2012). Roles of mechanical force and CXCR1/CXCR2 in shear-stress-induced endothelial cell migration. *Eur Biophys J* 41, 13-25.
- Zeng, Y., Sun, H.R., Yu, C., Lai, Y., Liu, X.J., Wu, J., Chen, H.Q., and Liu, X.H. (2011). CXCR1 and CXCR2 are novel mechano-sensors mediating laminar shear stress-induced endothelial cell migration. *Cytokine* 53, 42-51.
- Zhang, C., Srinivasan, Y., Arlow, D.H., Fung, J.J., Palmer, D., Zheng, Y., Green, H.F., Pandey, A., Dror, R.O., Shaw, D.E., *et al.* (2012). High-resolution crystal structure of human protease-activated receptor 1. *Nature* 492, 387-392.

- Zhang, D., Zhao, Q., and Wu, B. (2015a). Structural Studies of G Protein-Coupled Receptors. *Mol Cells* **38**, 836-842.
- Zhang, H., Han, G.W., Batyuk, A., Ishchenko, A., White, K.L., Patel, N., Sadybekov, A., Zamlynyy, B., Rudd, M.T., Hollenstein, K., *et al.* (2017a). Structural basis for selectivity and diversity in angiotensin II receptors. *Nature* **544**, 327-332.
- Zhang, H., Qiao, A., Yang, D., Yang, L., Dai, A., de Graaf, C., Reedtz-Runge, S., Dharmarajan, V., Zhang, H., Han, G.W., *et al.* (2017b). Structure of the full-length glucagon class B G-protein-coupled receptor. *Nature* **546**, 259-264.
- Zhang, H., Unal, H., Gati, C., Han, G.W., Liu, W., Zatsepin, N.A., James, D., Wang, D., Nelson, G., Weierstall, U., *et al.* (2015b). Structure of the Angiotensin receptor revealed by serial femtosecond crystallography. *Cell* **161**, 833-844.
- Zhang, M., Wang, D., Kang, Y., Wu, J.X., Yao, F., Pan, C., Yan, Z., Song, C., and Chen, L. (2018). Structure of the mechanosensitive OSCA channels. *Nat Struct Mol Biol* **25**, 850-858.
- Zhang, W.K., Wang, D., Duan, Y., Loy, M.M., Chan, H.C., and Huang, P. (2010). Mechanosensitive gating of CFTR. *Nat Cell Biol* **12**, 507-512.
- Zhang, Y., Sun, B., Feng, D., Hu, H., Chu, M., Qu, Q., Tarrasch, J.T., Li, S., Sun Kobilka, T., Kobilka, B.K., *et al.* (2017c). Cryo-EM structure of the activated GLP-1 receptor in complex with a G protein. *Nature* **546**, 248-253.
- Zhang, Y.L., Frangos, J.A., and Chachisvilis, M. (2009). Mechanical stimulus alters conformation of type 1 parathyroid hormone receptor in bone cells. *Am J Physiol Cell Physiol* **296**, C1391-1399.
- Zhao, B., and Muller, U. (2015). The elusive mechanotransduction machinery of hair cells. *Curr Opin Neurobiol* **34**, 172-179.
- Zhao, H., Yao, P., Li, L., and Chen, L. (2016). Apelin receptor signaling: a novel mechanism of endothelial cell polarization. *Acta Biochim Biophys Sin (Shanghai)* **48**, 1138-1139.
- Zhao, L.-H., Ma, S., Sutkeviciute, I., Shen, D.-D., Zhou, X.E., de Waal, P.W., Li, C.-Y., Kang, Y., Clark, L.J., Jean-Alphonse, F.G., *et al.* (2019a). Structure and dynamics of the active human parathyroid hormone receptor-1. *Science* **364**, 148-153.
- Zhao, L.H., Ma, S., Sutkeviciute, I., Shen, D.D., Zhou, X.E., de Waal, P.W., Li, C.Y., Kang, Y., Clark, L.J., Jean-Alphonse, F.G., *et al.* (2019b). Structure and dynamics of the active human parathyroid hormone receptor-1. *Science* **364**, 148-153.
- Zheng, H., Pearsall, E.A., Hurst, D.P., Zhang, Y., Chu, J., Zhou, Y., Reggio, P.H., Loh, H.H., and Law, P.Y. (2012). Palmitoylation and membrane cholesterol stabilize mu-opioid receptor homodimerization and G protein coupling. *BMC Cell Biol* **13**, 6.
- Zhou, T., Zheng, Y., Qiu, J., Hu, J., Sun, D., Tang, C., and Wang, G. (2014). Endothelial mechanotransduction mechanisms for vascular physiology and atherosclerosis, Vol 14.
- Zhu, S., Zhang, M., Davis, J.E., Wu, W.H., Surrao, K., Wang, H., and Wu, G. (2015). A single mutation in helix 8 enhances the angiotensin II type 1a receptor transport and signaling. *Cell Signal* **27**, 2371-2379.
- Zhu, Y., Michalovich, D., Wu, H., Tan, K.B., Dytko, G.M., Mannan, I.J., Boyce, R., Alston, J., Tierney, L.A., Li, X., *et al.* (2001). Cloning, expression, and pharmacological characterization of a novel human histamine receptor. *Mol Pharmacol* **59**, 434-441.
- Ziegler, W.H., Gingras, A.R., Critchley, D.R., and Emsley, J. (2008). Integrin connections to the cytoskeleton through talin and vinculin. *Biochem Soc Trans* **36**, 235-239.

- Ziegler, W.H., Liddington, R.C., and Critchley, D.R. (2006). The structure and regulation of vinculin. *Trends Cell Biol* 16, 453-460.
- Zimmermann, A.S., Burhenne, H., Kaever, V., Seifert, R., and Neumann, D. (2011). Systematic analysis of histamine and N-methylhistamine concentrations in organs from two common laboratory mouse strains: C57Bl/6 and Balb/c. *Inflamm Res* 60, 1153-1159.
- Zlatanova, J., Lindsay, S.M., and Leuba, S.H. (2000). Single molecule force spectroscopy in biology using the atomic force microscope. *Prog Biophys Mol Biol* 74, 37-61.
- Zocher, M., Zhang, C., Rasmussen, S.G., Kobilka, B.K., and Muller, D.J. (2012). Cholesterol increases kinetic, energetic, and mechanical stability of the human beta2-adrenergic receptor. *Proc Natl Acad Sci U S A* 109, E3463-3472.
- Zou, Y., Akazawa, H., Qin, Y., Sano, M., Takano, H., Minamino, T., Makita, N., Iwanaga, K., Zhu, W., Kudoh, S., *et al.* (2004). Mechanical stress activates angiotensin II type 1 receptor without the involvement of angiotensin II. *Nat Cell Biol* 6, 499-506.
- Zucchi, R., and Ronca-Testoni, S. (1997). The sarcoplasmic reticulum Ca²⁺ channel/ryanodine receptor: modulation by endogenous effectors, drugs and disease states. *Pharmacol Rev* 49, 1-51.
- Zylbergold, P., Ramakrishnan, N., and Hebert, T. (2010). The role of G proteins in assembly and function of Kir3 inwardly rectifying potassium channels. *Channels (Austin)* 4, 411-421.

Eigene Publikationen

AMPK Dilates Resistance Arteries via Activation of SERCA and BKCa Channels in Smooth Muscle. Schneider H, Schubert KM, Blodow S, Kreutz CP, **Erdogmus S**, Wiedenmann M, Qiu J, Fey T, Ruth P, Lubomirov LT, Pfitzer G, Mederos Y Schnitzler M, Hardie DG, Gudermann T, Pohl U. Hypertension. 2015 Jul;66(1):108-16. doi: 10.1161/HYPERTENSIONAHA.115.05514. Epub 2015 Jun 1. PMID: 26034200

Dynamic NHERF interaction with TRPC4/5 proteins is required for channel gating by diacylglycerol. Storch U, Forst AL, Pardatscher F, **Erdogmus S**, Philipp M, Gregoritzka M, Mederos Y Schnitzler M, Gudermann T. Proc Natl Acad Sci U S A. 2017 Jan 3;114(1):E37-E46. doi: 10.1073/pnas.1612263114. Epub 2016 Dec 19. PMID: 27994151

Dynamic monitoring of Gi/o-protein-mediated decreases of intracellular cAMP by FRET-based Epac sensors. Storch U, Straub J, **Erdogmus S**, Gudermann T, Mederos Y Schnitzler M, Pflugers Arch. 2017 Jun;469(5-6):725-737. doi: 10.1007/s00424-017-1975-1. Epub 2017 Apr 6. Erratum in: Pflugers Arch. 2017 Sep;469(9):1231-1232. PMID: 28386636

Erratum to: Dynamic monitoring of Gi/o-protein-mediated decreases of intracellular cAMP by FRET-based Epac sensors. Storch U, Straub J, **Erdogmus S**, Gudermann T, Mederos Y Schnitzler M. Pflugers Arch. 2017 Sep;469(9):1231-1232. doi: 10.1007/s00424-017-1985-z. No abstract available. PMID: 28474133

Small Fluorescein Arsenical Hairpin-Based Förster Resonance Energy Transfer Analysis Reveals Changes in Amino- to Carboxyl-Terminal Interactions upon OAG Activation of Classical Transient Receptor Potential 6. Fiedler S, Storch U, **Erdogmus S**, Gudermann T, Mederos Y Schnitzler M, Dietrich A. Mol Pharmacol. 2019 Jul;96(1):90-98. doi: 10.1124/mol.119.115949. PMID: 31171574

Helix 8 is the essential structural motif of mechanosensitive GPCRs. **Erdogmus S**, Storch U, Danner L, Becker J, Winter M, Ziegler N, Wirth A, Offermanns S, Hoffmann C, Guderman T, and Mederos y Schnitzler M. Nature Communications 2019 Dec 19;10(1):5784. doi: 10.1038/s41467-019-13722-0

Kongressbeiträge

- Department of Pathology Ion Channels and Transporters in Immunity (ICTI) Program 2020–2021 Seminar Series, 19th August 2019, talk with the title: "The Role of Voltage-Gated Calcium Channel Subunits in T cells"
- 6th Annual Retreat of the Department of Pathology, New York, USA, 14th June 2019, poster talk with the title: "Calcium influx in Human T cells is Independent of Voltage gated Calcium Channels"
- 83rd Annual Meeting of the German Society for Experimental and Clinical Pharmacology and Toxicology (DGPT), Heidelberg, Germany, 06th–09th March 2017, poster talk with the title: "Mechanosensitive histamine H₁ receptors are sensors for fluid shear stress in the endothelium mediating flow-induced vasodilation"
- 8th Lübeck Workshop on Smooth Muscle Function, Lübeck, Germany, 12th December 2017, invited talk with the title: "Mechanosensitive histamine H₁-receptors in the endothelium contribute to flow-induced vasodilatation"
- EPHAR 2016, 7th European Congress of Pharmacology, Istanbul, Turkey, 26th–30th July 2016, poster talk with the title: "Mechanical forces activate histamine H₁-receptors"
- MHA (Munich heart alliance) Winter Meeting, Munich, Germany, 08th January 2016, poster talk with the title: "Mechanosensitivity of histamine H₁-receptors: a novel aspect of Helix 8"
- Receptors, G Proteins and Integration of Ca²⁺ Signaling in the Cardiovascular System, MDC Communications Center, Berlin-Buch, Germany, 20th–22nd November 2014, poster talk with the title: "Insights in the mechanosensitivity of histamine H₁-receptors on the molecular level"
- SBMS Postgraduate Symposium 2014, University of Queensland, Brisbane, Australia, 03th–05th November 2014, invited talk with the title: "Mechanosensitivity of histamine H₁ receptors: molecular aspects"
- MHA (Munich heart alliance) Summer Meeting, Starnberg, Germany, 11th July 2014, poster talk with the title: "Stretch-induced histamine H₁-receptor activation is independent from agonist binding and from cytoskeleton"
- MHA (Munich heart alliance) Summer Meeting, Starnberg, Germany, 11th July 2014, invited talk with the title: "Molecular aspects of the mechanosensitivity of histamine H₁ receptor"
- 80th Annual Meeting of the German Society for Experimental and Clinical Pharmacology and Toxicology (DGPT), April 1st–3rd, 2014 Hannover, Germany, talk with the title: "Agonist and mechanically induced receptor activations evoke distinct active receptor conformations"
- 93rd Annual Meeting of German Society for Physiology DPG (Deutsche Physiologische Gesellschaft), Mainz, Germany, 13th–15th March 2014, talk with the title: "Mechanically induced active conformation of the histamine H₁ receptor differs from agonist induced active conformation"
- MHA (Munich heart alliance) Summer Meeting, Starnberg, Germany, 19th July 2013, poster talk with the title: "G-protein coupled receptors as mechanosensors"
- MHA (Munich heart alliance) Winter Meeting, Munich, Germany, 21st January 2013, poster talk with the title: "Mechanosensation of G-protein coupled receptors"
- 11th International Symposium on Resistance Arteries (ISRA 2014) from Molecular Machinery to Clinical Challenges, Banff-Canada, 7th–11th September 2014, poster

coauthor, poster title: "5'adenosine monophosphate-activated protein kinase (AMPK) induces vasodilation in resistance arteries via BKCa-mediated hyperpolarization and sarco/endoplasmic reticulum ATPase (SERCA)-driven calcium sequestration"

Eidesstattliche Versicherung

Erdoğmus, Serap

Ich erkläre hiermit an Eides statt,


dass ich die vorliegende Dissertation mit dem Titel

„Konformationsänderungen mechanosensitiver G-Protein gekoppelter Rezeptoren mittels intramolekularem dynamischem FRET“

selbständig verfasst, mich außer der angegebenen keiner weiteren Hilfsmittel bedient und alle Erkenntnisse, die aus dem Schrifttum ganz oder annähernd übernommen sind, als solche kenntlich gemacht und nach ihrer Herkunft unter Bezeichnung der Fundstelle einzeln nachgewiesen habe.

Ich erkläre des Weiteren, dass die hier vorgelegte Dissertation nicht in gleicher oder in ähnlicher Form bei einer anderen Stelle zur Erlangung eines akademischen Grades eingereicht wurde.

02.12.2019



Ort, New York

Unterschrift

Danksagung

Für ein erfolgreiches Gelingen dieser vorliegenden Arbeit waren eine Reihe mir nahestehender Menschen beteiligt. Ich schulde jedem Einzelnen meinen tiefsten Dank! Mein herzlicher Dank gilt Herrn Professor. Dr. Thomas Gudermann für die Ermöglichung der naturwissenschaftlichen Promotion an der Medizinischen Fakultät und seine jederzeit vorhandene Unterstützung, Diskussionsbereitschaft und die stets motivierenden Worte. Besonders beim Herrn Professor Dr. Michael Mederos y Schnitzler möchte ich mich für die jahrelange Betreuung, Zusammenarbeit und tolle Unterstützung meiner Doktorarbeit bedanken. Er war jederzeit ansprechbar und hilfsbereit, das habe ich nie als selbstverständlich angesehen. Einen herzlichen Dank schulde ich genauso Frau PD. Dr. Ursula Storch, die mich die ganze Doktorandenzeit hindurch vollendst unterstützt hat. Vielen Dank euch allen, dass ihr stets ein offenes Ohr für mich gehabt hat und an mich geglaubt habt! Ihr alle habt mir geistige Anregungen gegeben und mich bei der Entwicklung meiner wissenschaftlichen Karriere unterstützt, was keine Selbstverständlichkeit ist! Ein besonderer Dank geht an Frau Laura Danner, die mich beim Gelingen dieser Doktorarbeit klasse unterstützt hat. Für Ihre hilfsbereite und freundliche Art möchte ich mich herzlichst bedanken. Besonders wichtig war für mich, dass es offene und ehrliche Kritik und eine konstruktive Fehlerkultur gab. Für diese ehrliche und offene Kommunikation zwischen den Kollegen bin ich sehr dankbar. Des Weiteren möchte ich mich bei meinen Labor-Kollegen Dr. Michaela Winter, Dr. Anna-Lena Forst, Dr. Stephanie Blodow, Dr. Julie Straub, Dr. Diana Gabriel, Jasmin Becker, Roman Geisseler, Aaron Treder, Vlad Olteanu, Robert Mayer und Joanna Zaisserer für die wundervolle Zeit miteinander und stete Hilfsbereitschaft bedanken. Das gilt natürlich auch für meine Familie, die mich mich auf meinem Weg durch die Promotion mit ihrer unendlichen Geduld immer unterstützt und motiviert hat. Eure Unterstützung bedeutet mir unendlich viel! Ihr habt mich jahrelang unterstützt und mir starken Rückhalt gewährt. Ohne die Unterstützung zahlreicher Personen hätte ich diese Arbeit nicht erfolgreich abschließen können. Der größte Dank gebührt meinen Eltern, ohne deren Unterstützung die vorliegende Arbeit nicht möglich gewesen wäre.

Herzliches Dankeschön euch allen!